

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.498>

<https://orcid.org/0000-0002-8739-1766>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Vika Gabė

*Streptococcus mutans* biologinės  
plėvelės slopinimas naudojant galo  
rūgšties esterius

**DAKTARO DISERTACIJA**

Medicinos ir sveikatos mokslai,  
Medicina (M 001)

VILNIUS 2023

Disertacija rengta 2015–2022 metais Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedroje.

**Disertacija ginama eksternu.**

**Mokslinis konsultantas:**

**doc. dr. Tomas Kačergius** (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

**Gynimo taryba:**

Pirmininkė – **prof. dr. Ligita Jančorienė** (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Nariai:

**prof. dr. Dan Ericson** (Malmės universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, odontologija – M 002),

**doc. dr. Dovilė Karčiauskaitė** (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

**prof. dr. Vygandas Rutkūnas** (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, odontologija – M 002),

**doc. dr. Birutė Zablockienė** (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2023 m. rugpjūčio 29 d. 14 val. Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Didžiojoje auditorijoje (203 aud.). Adresas: M. K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101, Vilnius, Lietuva. Tel. 8 (5) 239 87 41; el. paštas: vika.gabe@mf.vu.lt.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.498>

<https://orcid.org/0000-0002-8739-1766>

VILNIUS UNIVERSITY

Vika Gabė

# Inhibition of *Streptococcus mutans* Biofilm Using Gallic Acid Esters

## **SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION**

Medicine and Health Sciences,  
Medicine (M 001)

VILNIUS 2023

This dissertation was written between 2015 and 2022 at the Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine of the Institute of Biochemical Sciences at the Faculty of Medicine of Vilnius University.

**The dissertation is defended on an external basis.**

**Academic consultant:**

**Assoc. Prof. Dr. Tomas Kačergius** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

**Chairman – Prof. Dr. Ligita Jančorienė** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

**Members:**

**Prof. Dr. Dan Ericson** (Malmö University, Medicine and Health Sciences, Odontology – M 002),

**Assoc. Prof. Dr. Dovilė Karčiauskaitė** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

**Prof. Dr. Vygandas Rutkūnas** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Odontology – M 002),

**Assoc. Prof. Dr. Birutė Zablockienė** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 14:00 o'clock, 29 June, 2023 in Main hall of Vilnius University Medicine faculty room. Address: M. K. Ciurlionio str. 21/27, LT-03101, Vilnius, Lithuania. Tel. 8 (5) 239 87 41; e-mail: vika.gabe@mf.vu.lt.

The text of this dissertation can be accessed at the Library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

*„Mokslo žmogus nesiekia greito rezultato. Jis nesitiki, kad jo pažangios idėjos bus lengvai įgyvendintos. Jo darbas kaip sodininko – ateičiai. Jo pareiga yra padėti pamatus ir nurodyti kelią tiems, kurie ateis.“*

Nikola Tesla



# TURINYS

SANTRUMPOS .....	11
1. ĮVADAS .....	13
1.1. Darbo aktualumas.....	13
1.2. Darbo tikslas .....	15
1.3. Darbo uždaviniai .....	15
1.4. Mokslinio darbo naujumas .....	15
1.5. Mokslinio darbo teorinė ir taikomoji reikšmė.....	16
1.6. Ginamieji disertacijos teiginiai .....	16
2. LITERATŪROS APŽVALGA .....	17
2.1. <i>Streptococcus mutans</i> ir biologinės plėvelės vaidmuo dantų ėduonies patogenezėje.....	17
2.1.1. Burnos mikrobiomas ir mikrobiota .....	17
2.1.2. <i>Streptococcus mutans</i> biologinės savybės.....	20
2.1.3. Biologinės plėvelės samprata.....	22
2.1.4. Dantų biologinė plėvelė .....	26
2.1.5. Dantų ėduonies patogenezė.....	29
2.1.6. <i>Streptococcus mutans</i> virulentiškumo veiksniai ir jų vaidmuo dantų ėduonies patogenezėje .....	33
2.1.7. <i>Streptococcus mutans</i> biologinės plėvelės susidarymo prevencija .....	42
2.2. Galo rūgšties esteriai .....	44
2.2.1. Galo rūgšties ir jos darinių vieta fitocheminių medžiagų klasifikacijoje .....	44
2.2.2. Galo rūgšties ir jos darinių paplitimas gamtoje .....	46
2.2.3. Galo rūgšties ir jos esterių struktūra, fizinės ir cheminės savybės .....	47
2.2.4. Galo rūgšties ir jos esterių gydomosios savybės .....	49
3. MEDŽIAGOS IR METODAI .....	52
3.1. Tyrimo eiga ir vykdymo etapai .....	52
3.2. Tiriamoji medžiaga ir jos paruošimas.....	54
3.3. Bakterijų kultūra ir kultivavimo sąlygos .....	55

3.4. Mikroskiedimo skystoje terpėje metodas .....	56
3.5. Eksperimentinės plokštelės, skirtos biologinės plėvelės slopinimo tyrimui ant skirtingų standžių paviršių, paruošimo eiga .....	57
3.6. Kolorimetrijos metodas .....	58
3.7. Optinės profilometrijos metodas .....	59
3.8. Biologinės plėvelės acidogeniškumo nustatymas .....	60
3.9. Biologinėje plėvelėje esančių ląstelių paruošimas genų raiškos tyrimui.....	61
3.10. RNR išskyrimas .....	61
3.11. Kiekybinė tikrojo laiko atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininė reakcija .....	62
3.12. Duomenų statistinis įvertinimas .....	63
4. TYRIMŲ REZULTATAI .....	65
4.1. Galo rūgšties esterių poveikis <i>S. mutans</i> gyvybingumui.....	65
4.2. Galo rūgšties esterių poveikis, slopinantis <i>S. mutans</i> biologinės plėvelės susidarymą ant polistireno paviršiaus .....	66
4.3. Galo rūgšties esterių poveikis, slopinantis <i>S. mutans</i> biologinės plėvelės susidarymą ant stiklo paviršiaus .....	70
4.4. Galo rūgšties esterių poveikis, slopinantis <i>S. mutans</i> biologinės plėvelės acidogeniškumą.....	81
4.5. Galo rūgšties esterių poveikio <i>S. mutans</i> genams, atsakingiems už biologinės plėvelės susidarymą ir acidogeniškumą, raiškos analizė .....	84
5. REZULTATŲ APTARIMAS.....	88
6. IŠVADOS .....	93
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	94
SANTRAUKA .....	107
ABBREVIATIONS.....	108
1. INTRODUCTION.....	110
1.1. Importance of the Work .....	110
1.2. Aim of the Study .....	112
1.3. Objectives of the Study .....	112
1.4. Novelty of the Study .....	112
1.5. Practical Value of the Study .....	113



1.6. Defensive Statements .....	113
2. METHODS .....	114
2.1. Investigation Progress and Execution Stages .....	114
2.2. Research Material and Its Preparation .....	116
2.3. Bacterial Strain and Culture Conditions .....	117
2.4. Microdilution Method for Determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC).....	118
2.5. The Progress of the Preparation of the Experimental Plate for the Study of Biofilm Inhibition on Different Rigid Surfaces.....	119
2.6. Colorimetric Method .....	120
2.7. Optical Profilometry Method .....	121
2.8. Biofilm Acidogenicity Assay .....	122
2.9. Analysis of Gene Expression.....	122
2.10. RNA Isolation .....	123
2.11. Quantitative Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction .....	124
2.12. Statistical Data Analysis.....	125
3. RESULTS .....	127
3.1. Effect of Gallic Acid Esters on the Viability of <i>S. mutans</i> .....	127
3.2. Inhibitory Effect of Gallic Acid Esters on <i>S. mutans</i> Biofilm Formation on Polystyrene Surface .....	128
3.3. Inhibitory Effect of Gallic Acid Esters on <i>S. mutans</i> Biofilm Formation on Glass Surface .....	132
3.4. Effect of Gallic Acid Esters in Inhibiting Acidogenicity of <i>S. mutans</i> Biofilm.....	143
3.5. Expression Analysis of the Effect of Gallic Acid Esters on <i>S. mutans</i> Genes Responsible for Biofilm Formation and Acidogenicity .....	146
4. DISCUSSION OF THE RESULTS.....	150
5. CONCLUSIONS.....	155
REFERENCES.....	156
STUDY APPROBATION.....	161
ACKNOWLEDGEMENTS .....	163
ABOUT THE AUTHOR.....	164

PADĒKA .....	165
DARBO APROBACIJA .....	166
APIE AUTOREŅ.....	168

## SANTRUMPOS

ATCC	Amerikos ląstelių kultūrų kolekcija (angl. <i>American Type Culture Collection</i> )
<i>atpD</i>	Genas, koduojantis F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPazės F <sub>1</sub> baltymų komplekso β subvienetą
<i>atpF</i>	Genas, koduojantis F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPazės F <sub>0</sub> baltymų komplekso b subvienetą
AT-PGR	Atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininė reakcija
CDC	Ligų kontrolės ir prevencijos centras (angl. <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> )
dH <sub>2</sub> O	Distiliuotas vanduo
ddH <sub>2</sub> O	Dejonizuotas vanduo
DMSO	Dimetilo sulfoksidas
DNR	Deoksiribonukleorūgštis
CHX	Chlorheksidinas
C1-MG	Metilo galatas
C2-EG	Etilo galatas
C3-EG	Propilo galatas
C4-EG	Butilo galatas
C5-EG	Pentilo galatas
C8-OG	Oktilo galatas
C12-LG	Laurilo galatas
ECDC	Europos ligų prevencijos ir kontrolės centras (angl. <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> )
EPM	Ekstraląstelinė polimerinė medžiaga (angl. <i>extracellular polymeric substance</i> , EPS)
ERY	Eritromicinas
JAV	Jungtinės Amerikos valstijos
GbpB	Gliukanus prijungiantis baltymas B (angl. <i>glucan-binding protein B</i> )
<i>gbpB</i>	Genas, koduojantis gliukanus prijungiantį baltymą B
GR	Galo rūgštis
Gtf	Gliukoziltransferazė
GtfB	Gliukoziltransferazė B
<i>gtfB</i>	Genas, koduojantis gliukoziltransferazę B
GtfC	Gliukoziltransferazė C

<i>gtfC</i>	Genas, koduojantis gliukoziltransferazę C
GtfD	Gliukoziltransferazę D
<i>gtfD</i>	Genas, koduojantis gliukoziltransferazę D
Ftf	Fruktoziltransferazę
KSP	Kompetenciją skatinantis peptidas (angl. <i>competence-stimulating peptide</i> , CSP)
KSV	Kolonijas sudarantys vienetai
µm	Mikrometras
MSK	Minimali slopinamoji koncentracija (angl. <i>minimum inhibitory concentration</i> , MIC)
nm	Nanometras
OT	Optinis tankis
<i>p</i>	Statistinio reikšmingumo lygmuo
proc.	Procentai
pH	Vandenilio jonų koncentracijos rodiklis
PSO	Pasaulio sveikatos organizacija (angl. <i>World Health Organization</i> , WHO)
RNR	Ribonukleorūgštis
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
SAG	Seilių agliutinas (angl. <i>salivary agglutinin glycoprotein</i> )
SpaP	Streptokokų antigenas P (angl. <i>Streptococcal protein antigen P</i> )
SrtA	Sortazę A
THB	<i>Todd Hewitt</i> buljonas (angl. <i>Todd Hewitt broth</i> )

# 1. ĮVADAS

## 1.1. Darbo aktualumas

Biologinė plėvele (angl. *biofilm*) vadinama mikroorganizmų sankaupa, kurioje mikroorganizmų ląstelės yra apgaubtos jų pačių pagaminta ekstraląsteline polimerine medžiaga (EPM, angl. *Extracellular polymeric substance*), padedančia joms jungtis ne tik tarpusavyje, bet ir prie standaus paviršiaus (Vert ir kt. 2012). Žinoma, kad EPM biologinėje plėvelėje tarpstančioms mikroorganizmų ląstelėms suteikia apsaugą nuo nepalankių aplinkos sąlygų ir įgalina jas komunikuoti tarpusavyje cheminiais signalais. Todėl biologines plėveles formuojantys mikroorganizmai įgyja atsparumą ir sukelia lėtines bei sunkiai gydomas ligas (Dwivedi ir kt. 2015, Sharma ir kt. 2019, Yu ir kt. 2017, Yumoto ir kt. 2019).

*Streptococcus mutans* yra komensalinė bakterijų rūšis aptinkama žmogaus burnoje esančiose biologinėse plėvelėse, kurios nuolatos formuojasi dantų, dantenų ir liežuvio paviršiuje (Bedoya-Correa ir kt. 2019, Hong ir kt. 2016). Įprastai sveikų asmenų burnoje nustatomas santykinai mažas *S. mutans* bakterijų kiekis (Gross ir kt. 2012), tačiau įvairūs žmogaus organizmo ir vietinės aplinkos pokyčiai, kurie atsiranda, pavyzdžiui, vartojant daug rafinuoto cukraus ir kitų angliavandenių, gali lemti šios bakterijos išsivyravimą dantų biologinėje plėvelėje ir tuomet sutrinka jos homeostazė, nes maiste esantį cukrų ir kitus angliavandenius *S. mutans* labai greitai fermentuoja iki organinių rūgščių, kurios kaupiasi danties paviršiuje ir sukelia danties kietųjų audinių (emalio, dentino, cemento) demineralizaciją – vystosi dantų ėduonis (Chen ir kt. 2021, Kiid ir kt. 2019). Neretai mutantinis streptokokas įvardijamas kaip pirminio ir pasikartojančio dantų ėduonies sukėlėjas, todėl kariesogeninių plėvelių slopinimo problema yra aktuali visą žmogaus gyvenimą (FDI, World Dental Federation 2015, Nima ir kt. 2021). Deja, nepaisant gausios profilaktikos priemonių pasiūlos, dantų ėduonis vis dar išlieka viena labiausiai paplitusių ligų pasaulyje (Bowen ir kt. 2018, Peres ir kt. 2019). Taip yra todėl, kad *S. mutans* bakterija iš visų burnoje randamų mikroorganizmų yra geriausiai prisitaikiusi išlikti burnoje ir kolonizuoti joje esančius paviršius.

Vienas iš pagrindinių *S. mutans* ėduonies formavimąsi lemiančių veiksnių yra šios bakterijos gebėjimas formuoti biologinę plėvelę (Matsumoto-Nakano 2018). Struktūriniu požiūriu *S. mutans* biologinės plėvelės EPM sudaryta iš gliukano polimerų, kuriuos gamina trys fermento gliukoziltransferazės (Gtf) izoformos – GtfB, GtfC ir GtfD, koduojamos atitinkamai *gtfB*, *gtfC* ir *gtfD* genų (Jeong ir kt. 2013). GtfB ir GtfC dalyvauja netirpių gliukanų, kurie

sudaro didžiąją dalį EPM, gamyboje, o GtfD – tik tirpių gliukanų (Kidd ir kt. 2019). Manoma, kad gliukanai padidina biologinės plėvelės porėtumą, todėl cukrus ir kiti angliavandeniai gali patekti į gilesnius jos sluoksnius, taip pat sulaiko rūgštis ir tokiu būdu prisideda prie danties kietųjų audinių demineralizacijos proceso (Guo ir kt. 2015). Pradinėje adhezijoje prie danties paviršiaus gliukanai nedalyvauja, jie gali prisijungti tik tuo atveju, jei pelikulėje yra gliukaną prijungiančių baltymų (Gbp, angl. *Glucan-binding protein*) (Mieher ir kt. 2018). *S. mutans* gamina keturis struktūriškai skirtingus Gbp variantus – GbpA, GbpB, GbpC ir GbpD, už kurių gamybą atsako atitinkamai *gbpA*, *gbpB*, *gbpC*, *gbpD* genai (Lemos ir kt. 2019, Mieher ir kt. 2018, You 2019).

Kitas svarbus virulentiškumo veiksnys yra *S. mutans* biologinės plėvelės rūgščių gamyba – acidogeniškumas, kuris tiesiogiai susijęs su danties audinio demineralizacijos procesu ir kariozinių ertmių susidarymu (Guo ir kt. 2015). Kariesogeninės plėvelės acidogeniškumą padeda palaikyti  $F_1F_0$ -H/ATPazė, kuri veikia rūgštinėje aplinkoje – vandenilio protonus ( $H^+$ ) perneša iš bakterinės ląstelės vidaus į išorę (Lamont ir kt. 2013).  $F_1F_0$ -H/ATPazė sudaryta iš membranoje įsiterpusio  $F_0$  baltymų komplekso ir periferijoje išsidėsčiusio  $F_1$  baltymų komplekso, kurių svarbiausius subvienetus  $\alpha$  ir  $\beta$  koduoja atitinkamai *atpF* ir *atpD* genai (Gong ir kt. 2009).

Kadangi pastaruoju metu pastebimas didėjantis *S. mutans* atsparumas dažniausiai klinikinėje praktikoje naudojamoms cheminėms medžiagoms, o dažnas jų naudojimas neigiamai veikia burnos mikrobiomą ir neretai turi šalutinį poveikį, todėl ieškoma antimikrobinių medžiagų, kurios atrankiai slopintų kariesogeninių plėvelių susidarymą (Bescos ir kt. 2020, Chen ir kt. 2021, Lee ir kt. 2019). Šiuo metu daug dėmesio sulaukia fitocheminės medžiagos, t. y. augaluose aptinkami biologiškai aktyvūs cheminiai junginiai, kurie skirtingai nei sintetinės antimikrobinės medžiagos, dažniausiai nesukelia šalutinio poveikio ir padeda kurti sveikatai palankias ekosistemas (Abu-Lafi ir kt. 2019, Chen ir kt. 2020, Masalha ir kt. 2018, Rossiter ir kt. 2017). Augaluose ir jų vaisiuose gausu fitocheminių medžiagų, pavyzdžiui polifenolių – galo rūgšties (GR) ir jos darinių, kurie turi daug naudingų savybių. GR alkilo – esteriai metilo, propilo, oktilo, laurilo galatai daug metų yra plačiai naudojami kaip antioksidantai maisto produktuose, farmacijos ir kosmetikos gaminiuose (Kim ir kt. 2019). Įvairių autorių duomenimis, GR alkilo esteriai pasižymi antibakterinėmis (Badhani ir kt. 2015, Valle ir kt. 2018), antivirusinėmis (Hurtado ir kt. 2008), priešvėžinėmis (Sales ir kt. 2018) ir neuroprotektinėmis (Nayeem ir kt. 2016) savybėmis. Vis dėlto literatūroje trūksta duomenų apie GR alkilo esterių, turinčių skirtingą struktūrinę

grandinę, panaudojimą *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymui ir acidogeniškumui slopinti.

## 1.2. Darbo tikslas

Ištirti galo rūgšties esterių – metilo, etilo, oktilo ir laurilo galatų poveikio veiksmingumą *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymo slopinimui bei jo priklausomybę nuo struktūrinės alkilo grandinės ilgio.

## 1.3. Darbo uždaviniai

1. Įvertinti metilo, etilo, oktilo ir laurilo galatų poveikį *S. mutans* gyvybingumui, nustatant jų minimalias slopinamąsias koncentracijas.
2. Nustatyti metilo, etilo, oktilo ir laurilo galatų poveikio veiksmingumą *S. mutans* biologinės plėvelės kiekybiniam formavimuisi ant standžių paviršių (polistireno, stiklo) bei jo priklausomybę nuo struktūrinės alkilo grandinės ilgio.
3. Ištirti metilo, etilo, oktilo ir laurilo galatų gebėjimą slopinti rūgščių susidarymą (acidogeniškumą) *S. mutans* biologinėje plėvelėje.
4. Nustatyti etilo, oktilo ir laurilo galatų poveikį *S. mutans* biologinės plėvelės formavimąsi lemiančių genų (*gfpB*, *gfpC*, *gfpD*) kiekybinei raiškai.
5. Įvertinti etilo, oktilo ir laurilo galatų poveikį *S. mutans* biologinės plėvelės acidogeniškumą lemiančių genų kiekybinei raiškai:
  - 5.1. etilo galato – *atpD* ir *atpF* genų raiškai;
  - 5.2. oktilo ir laurilo galatų – *atpD* geno raiškai.

## 1.4. Mokslinio darbo naujumas

Didėjantis *S. mutans* atsparumas antimikrobinėms medžiagoms verčia ieškoti naujų dantų ėduonies prevencijos priemonių (Chen ir kt. 2021), kurios padėtų atrankiai slopinti kariesogeninių plėvelių susidarymą ir kartu palankiai veiktų burnos mikrobiomą, todėl tyrimui buvo pasirinkti natūraliai augaluose aptinkami biologiškai aktyvūs junginiai – GR esteriai (galatai). Nors trumpą alkilo grandinę turintys metilo ir etilo galatai bei ilgą grandinę turintys – oktilo ir laurilo galatai yra plačiai tyrinėti ir ilgą laiką naudojami pramonėje junginiai, tačiau literatūroje nėra duomenų apie šių junginių poveikį *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymui ir acidogeniškumui.

Šiame darbe pristatomas nustatytas GR esterių – metilo, etilo, oktilo ir laurilo galatų *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą ant standžių paviršių

(polistireno, stiklo) *in vitro* sąlygomis slopinamas poveikis, kurio stiprumas priklauso nuo struktūrinės alkilo grandinės ilgio. Pirmą kartą GR esterių, turinčių skirtingą alkilo grandinės ilgį, veiksmingumas prieš kariesogeninės plėvelės susidarymą tirtas taikant kolorimetrijos, profilometrijos metodus bei atliekant genų raiškos analizę. Be to, šiame darbe pristatomi dar iki šiol netyrinėto GR esterių poveikio acidogeniškumui rezultatai, kurie rodo, kad alkilinti galatai mažina *S. mutans* biologinės plėvelės acidogeniškumą.

### 1.5. Mokslinio darbo teorinė ir taikomoji reikšmė

Darbe pateikti duomenys praplečia žinias apie *S. mutans* virulentiškumo veiksnių raišką genų lygmenyje, šių bakterijų svarbius komunikacijos mechanizmus, kai susidaro biologinė plėvelė, veikiant GR esteriams. Pristatomi duomenys gali būti pravartūs tolesniems kariesogeninių biologinių plėvelių tyrimams.

Gauti rezultatai yra svarbūs ne tik moksliniu, bet ir praktiniu požiūriu. Ilgos alkilo grandinės galo rūgšties esteriai, turintys mažesnes veikliąsias koncentracijas, gali būti pritaikyti streptokokinėms ir kitoms infekcijoms gydyti. Be to, nedidelėmis dozėmis juos galima derinti su antibiotikais siekiant sukelti sinerginį antimikrobinį poveikį, sumažinant antibiotikų dozes ir taip sprendžiant bakterijų atsparumo antimikrobinėms medžiagoms problemą medicinoje.

Taikomoji darbo reikšmė labai didelė – galo rūgšties esteriai galėtų būti naudojami slopinti *S. mutans* biologinių plėvelių susidarymą *in vivo* sąlygomis, siekiant sumažinti bakterijų agregaciją ir adheziją prie standaus paviršiaus bei acidogeniškumą. Tyrimo duomenys gali būti panaudoti kuriant naujas farmacines priemones dantų ėduonies prevencijai.

### 1.6. Ginamieji disertacijos teiginiai

1. Galo rūgšties esteriai – metilo, etilo, oktilo ir laurilo galatai – *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą slopina mažesnėmis už minimalias koncentracijas, kurios slopina *S. mutans* bakterijas.
2. Galo rūgšties esteriai – metilo, etilo, oktilo ir laurilo galatai veiksmingai mažina *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą ant standžių paviršių ir šis poveikis priklauso nuo struktūrinės alkilo grandinės ilgio.
3. Galo rūgšties esteriai – metilo, etilo, oktilo ir laurilo galatai mažina *S. mutans* biologinės plėvelės acidogeniškumą.



## 2. LITERATŪROS APŽVALGA

### 2.1. *Streptococcus mutans* ir biologinės plėvelės vaidmuo dantų ėduonies patogenezėje

#### 2.1.1. Burnos mikrobiomas ir mikrobiota

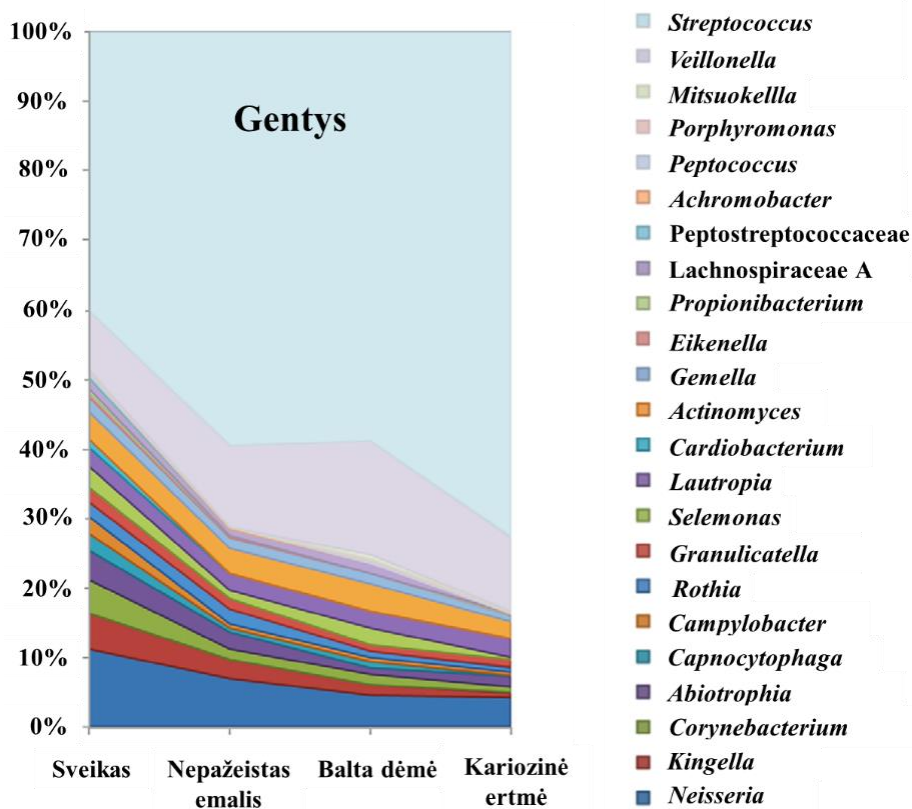
Žmogaus kūną kolonizuoja daugybė gyvų mikroorganizmų, kurie nuolatos sąveikaudami tarpusavyje kuria unikalias bendrijas. Tam tikroje aplinkoje egzistuojančių mikroorganizmų visuma yra vadinama mikrobiomu (Nasidze ir kt. 2009, Marchesi ir kt. 2015). Žmogaus burna dėl joje esančios nuolatinės drėgmės, optimalaus pH, temperatūros, maisto likučių yra labai palanki terpė mikroorganizmams daugintis, todėl jai būdinga didelė mikroorganizmų rūšių įvairovė (Balčiūnienė ir kt. 1992). Remiantis klasikiniiais ir naujausiais molekuliniais tyrimo metodais nustatyta, kad suaugusio žmogaus burnos mikrobiomą sudaro daugiau nei 700 skirtingų bakterijų rūšių (Krishan ir kt. 2017, Yumoto ir kt. 2019), sveiko asmens burnoje aptinkama nuo 100 iki 200 bakterijų rūšių (Willis ir kt. 2020). Išsiaiškinus sveikų ir burnos ligomis sergančių asmenų burnos mikrobiomo ypatumus ir įvertinus jų skirtumus, nustatyta, kad mikroorganizmų rūšinė sudėtis turi įtakos žmogaus sveikatai (Gross ir kt. 2012, Krishan ir kt. 2017, Bowen ir kt. 2018). Dauguma burnoje tarpstančių mikroorganizmų yra komensalai ir sąlyginiai patogenai, kurie padeda apsaugoti organizmą nuo patogeninių mikroorganizmų invazijos (Nasidze ir kt. 2009).

Siekiant apibūdinti konkrečius mikroorganizmus tam tikroje aplinkoje yra vartojamas mikrobiotos terminas (Marchesi ir kt. 2015). Kiekvieno žmogaus burnos mikrobiota gali būti skirstoma į autochtoninę ir alochtoninę. Rūšys, kurios yra pastovios ir nuolatos aptinkamos burnoje vadinamos autochtoninėmis, o tos, kurios į burną patenka atsitiktinai iš aplinkos, nosiaryklės, žarnyno – alochtoninėmis arba tranzitinėmis (Balčiūnienė ir kt. 1992, Beliavičiūtė 2007, Grigalauskienė ir kt. 2015).

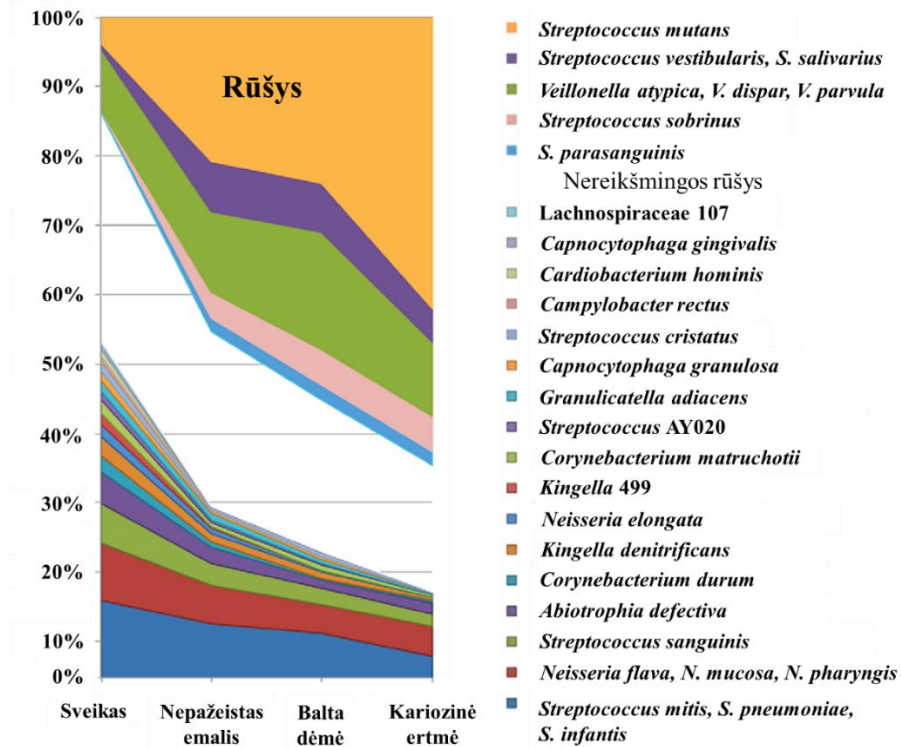
Didžiausią (20–40 proc.) burnos mikrobiotos dalį sudaro gramteigiamos *Streptococcus* (gr. *streptos* – grandinė, *kokkos* – grūdas) genties bakterijos (**1 pav.**) (Nasidze ir kt. 2009, Gross ir kt. 2012).

Vienos streptokokų rūšys burnoje aptinkamos trumpą laiką po gimimo arba tam tikru gyvenimo periodu, kitos – visą gyvenimą. Streptokokų klasifikacija nuolatos keitėsi ir iki šiol nėra vienos bendros klasifikacijos, nes ši gentis yra labai įvairialypė. Naujaisi filogenetinės analizės duomenys atskleidė, kad visi streptokokai turėtų būti skirstomi į devynias grupes: *bovis*, *mutans*, *salivarius*, *sobrinus*, *pluranimalium*, *anginosus*, *mitis*, *suis* ir *pyogenes* (Póntigo ir kt.

2015, Pan ir kt. 2018). Normaliomis sąlygomis žmogaus burnoje aptinkami *mitis* (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*), *anginosus* (*S. constellatus*, *S. gordonii*, *S. sanguinis*), *mutans* (*S. mutans*), *sobrinus* (*S. sobrinus*) bei salivarius (*S. salivarius*, *S. vestibularis*) grupių streptokokai, o kitų grupių atstovai tik atsitiktinai į ją patenka iš nosiaryklės ar žarnyno (Andruškienė 2012). Reikia pabrėžti, kad atskirų streptokokų rūšių santykis nėra vienodas. Sveiko žmogaus burnoje vyrauja tokios streptokokų rūšys kaip *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, o *S. mutans*, *S. sobrinus* ar *S. salivarius* bakterijų kiekis paprastai yra sąlyginai mažas. Esant patologijai, streptokokų rūšių santykis pasikeičia, pavyzdžiui, dantų ėduonies atveju burnoje įsivyroja kariesogenai – *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. parasanguinis* (**2 pav.**) (Gross ir kt. 2012).



**1 pav.** Bakterijų genčių procentinis kiekis (%) esant įvairioms dantų ėduonies stadijoms (Gross ir kt. 2012).



**2 pav.** Bakterijų rūšių procentinis kiekis (%) esant įvairioms dantų ėduonies stadijoms (Gross ir kt. 2012).

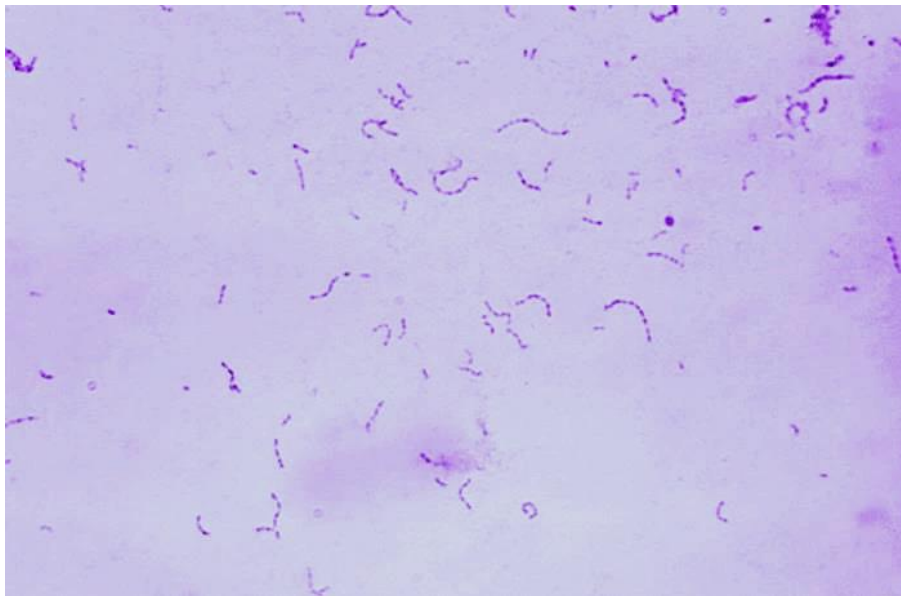
Mokslininkų grupės atliktos analizės (Gross ir kt. 2012) duomenimis be streptokokų, žmogaus burnoje dažniausiai yra aptinkamos *Veillonella* (10 proc.), *Neisseria* (10 proc.), *Corynebacterium* (5 proc.), *Kingella* (5 proc.) ir kitų genčių bakterijos.

Kiti autoriai pastebi, kad vaikų ir suaugusių asmenų bakterijų rūšinė sudėtis labai skiriasi. Vaikų burnoje vyrauja *Veillonella*, *Neisseria*, *Rothia*, *Haemophilus*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Leptotrichia*, *Fusobacterium*, o suaugusiųjų – *Haemophilus*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Oribacterium*, *Rothia*, *Treponema* genčių bakterijų rūšys (Struzycka 2014).

Taigi, įvairių autorių atliktos studijos ir gauti skirtingi duomenys rodo, kad žmogaus burna tai itin sudėtinga ekosistema, o kiekvieno atskiro asmens burnos mikrobiota yra labai skirtinga ir nėra pastovi, nes ją veikia aplinkos veiksniai (Filoche ir kt. 2008).

### 2.1.2. *Streptococcus mutans* biologinės savybės

*Streptococcus mutans* (*S. mutans*) yra gramteigiamos, rutulio formos bakterijos, kurių ląstelės tepinėliuose išsidėsto trumpomis grandinėlėmis (**3 pav.**) (Spellerberg ir kt. 2015).

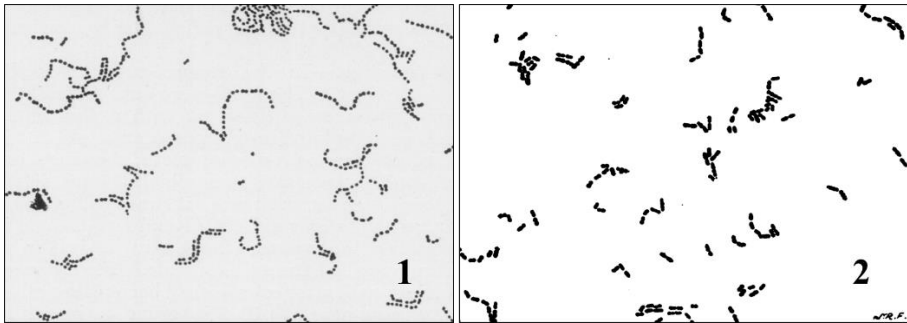


**3 pav.** Gramo būdu dažytos *Streptococcus mutans* bakterijos, kurios buvo kultivuotos tioglikolato buljone. Vaizdas padidintas 1000× (CDC, Dr. Richard Facklam, ID: 1043).

J. K. Clarke 1924 metais pirmasis išskyrė *S. mutans* iš žmogaus eduoonies pažeistų dantų. Jis pastebėjo, kad šiai bakterijų rūšiai yra būdingas fenotipinis kintamumas, todėl pavadino ją mutantiniu streptokoku. Kultivuojamas mitybinėje terpėje, kurios pH neutralus arba šarminis, *S. mutans* yra rutulio formos, 0,5–0,75  $\mu\text{m}$  skersmens kokai, išsidėstę poromis arba trumpomis grandinėlėmis, o kultivuojamas mitybinėje terpėje, kurios pH yra silpnai rūgštinis, *S. mutans* tampa trumpomis lazdelėmis (1,5–3  $\mu\text{m}$  dydžio), kurios tepinėliuose taip pat išsidėsto poromis arba labai trumpomis grandinėlėmis (**4 pav.**) (Clarke 1924, Whiley ir kt. 2015).

*S. mutans* yra fakultatyvus anaerobas, geriau dauginasi padidėjusio  $\text{CO}_2$  kiekiu aplinkoje (5–10 proc.), augimui optimali temperatūra yra 37 °C. Kultivuojamas kraujo agare, po 2 parų suformuoja labai smulkias, 0,5–1 mm dydžio, balkšvos arba pilkšvos spalvos, lygiais arba nelygiais kraštais kolonijas, kurias supa  $\alpha$ -hemolizės arba  $\gamma$ -hemolizės ir labai retai  $\beta$ -hemolizės

zona. Terpėje su sacharozė formuoja stambesnes, 1 mm dydžio, nelygiais kraštais, iškilias, matines kolonijas, kurias supa tirpaus egzopolisacharido lašeliai (Whiley ir kt. 2015). Auginant *S. mutans* skystoje terpėje iš pradžių terpė susidrumsčia, vėliau joje susiformuoja smulkios, grūdėtos nuosėdos (Clarke 1924).



**4 pav.** *Streptococcus mutans* morfologinės savybės po 24 val. kultivavimo: **1** – buljone, **2** – buljone su gliukoze. Vaizdas padidintas 1200× (Clarke 1924).

Mutantinio streptokoko padermės fermentuoja daugelį angliavandenių iki rūgščių, įskaitant laktozę, maltozę, manitolį, melibiozę, sacharozę, sorbitolį, rafinozę, inuliną, N-acetil-gliukozaminą (Whiley ir kt. 2015). Rūgštys susidaro labai greitai, per 24 val. terpės pH rodmenys pakinta nuo 7,00 iki 4,20 (Clarke 1924). *S. mutans* sintetina  $\alpha$ -D-gliukozidazę,  $\beta$ -D-gliukozidazę,  $\alpha$ -D-galaktozidazę, tačiau negamina katalazės ir ureazės bei yra atsparus bacitracinui (Kačergius ir kt. 2008).

Remiantis sienelės paviršiaus polisacharidais, turinčiais ramnozės ir gliukozės, *S. mutans* padermės yra skirstomos į keturis serologinius variantus (c, e, f ir k). Iš ėduonies pažeistų dantų dažniausiai (80 proc.) išskiriamas serovaras c, apie 20 proc. atvejų – serovaras e ir 10 proc. atvejų – serovarai f ir k (Bedoya-Correa ir kt. 2019, Lemos ir kt. 2019).

2002 m. buvo atlikta *S. mutans* UA159 padermės genomo sekoskaita (GenBank sistemoje prieigos numeris AE0111141333) (Ajdić ir kt. 2002, Bedoya-Correa ir kt. 2019). Nustatyta, kad genomą sudaro maždaug 2 Mb bazių porų, koduojančių maždaug 2 000 genų (Lemos ir kt. 2019), iš kurių virš 280 (15 proc.) yra skirti angliavandenių pernašai ir metabolizmui (Ajdić ir kt. 2002). Reikia pabrėžti, kad nė viena kita gramteigiama bakterija nepasižymi tokiu gebėjimu įsisavinti tiek daug skirtingų angliavandenių (Whiley ir kt. 2015). Nors šiuo metu jau yra sekvenuoti 188 *S. mutans* padermių genomi, kurie viešai prieinami Nacionalinio biotechnologijų informacijos centro (angl. *National Center for Biotechnology Information*,

NCBI) duomenų bazėje, tačiau moksliniuose tyrimuose dažniausiai naudojama referentinė UA159 padermė (Bedoya-Correa ir kt. 2019).

### 2.1.3. Biologinės plėvelės samprata

Dar 18 amžiuje buvo pastebėta, kad mikroorganizmai aplinkoje tarpsta ne tik kaip pavienės ląstelės, bet geba telktis į grupes ir sudaryti gleivingus daugialąsčius darinius (Krzyściak ir kt. 2014). Didžiąją laiko dalį mikrobiologijos moksle bakterijos buvo apibūdinamos būtent kaip planktoniniai mikroorganizmai, pavienės ląstelės dispersiškai pasklidusios aplinkoje bei aprašomos remiantis jų augimo pobūdžiu mitybinėse terpėse (Donlan 2002). Šiandien žinome, kad dauguma bakterijų natūralioje aplinkoje netarpsta kaip laisvos, pavienės suspenduotos ląstelės grynoje kultūroje, o besidaugindamos aplinkoje, kurioje gausu maistinių medžiagų, neretai formuoja įvairaus pavidalo polimikrobines sankaupas – kolonijas, nuosėdas, plėveles (Flemming ir kt. 2010).

Terminą biologinė plėvelė (angl. *biofilm*) vienas pirmųjų pavartojo 1978 metais aplinkos mikrobiologas Bill'as Costerton'as, išskeldamas naują mikrobiologinę paradigmą – biologinės plėvelės teoriją. B. Costerton'as teigė, kad biologinės plėvelės, kurias dengia tarpląstelinė matrica (glikokaliksas), padeda bakterijoms tvirtintis prie įvairių paviršių. Jo manymu, sėslios, biologinėje plėvelėje tarpstančios, bakterijų populiacijos vyrauja ne tik gamtoje, bet ir pramonėje bei medicinoje (Costerton ir kt. 1978). Šiandien jau žinome, kad su biologinėmis plėvelėmis susijusios infekcijos yra gana plačiai paplitusios medicinoje, o jų svarba yra visuotinai pripažinta (Høiby 2014). Daugiau nei keturis dešimtmečius mokslininkai tyrinėja biologines plėveles, surinkta nemažai duomenų, kurie patvirtina, kad iš tikrųjų sėslios bakterijos labai skiriasi nuo tų, kurios yra laisvai pasklidusios aplinkoje ir gyvuoja kaip pavieniai atskiri organizmai.

Tarptautinė teorinės ir taikomosios chemijos sąjunga (angl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC) rekomenduoja (Vert ir kt. 2012) biologinėmis plėvelėmis vadinti mikroorganizmų sankaupą, kurioje mikroorganizmų ląstelės yra apgaubtos jų pačių pagaminta ekstraląsteline polimerine medžiaga (EPM) (angl. *Extracellular polymeric substance*, EPS), padedančia joms jungtis ne tik tarpusavyje, bet ir prie standaus paviršiaus (Vert ir kt. 2012). Skirtingai nei įprastoje plėvelėje, biologinėje plėvelėje mikroorganizmai yra negrįžtamai susieti tarpusavyje, jų neįmanoma pašalinti skalaujant (Donlan 2002, Bowen ir kt. 2018).

Nurodoma (Vasuedan 2014), kad bakterinės biologinės plėvelės pagrindinės sudedamosios dalys yra bakterijų ląstelės ir EPM. Biologinės

plėvelės sudedamosios dalys išvardytos **1 lentelėje**, o jų kiekis yra išreikštas procentais. Pati svarbiausia sudedamoji dalis, be kurios neįmanoma suformuoti biologinės plėvelės, yra būtent EPM, kuri sudaro 50–90 proc. sausosios masės (Donlan 2002, Flemming ir kt. 2010). Įprastai EPM storis yra nuo 0,2 iki 1  $\mu\text{m}$ , biologinės plėvelės dydis neviršija 10–30 nm (Jamal ir kt. 2018).

**1 lentelė.** Biologinės plėvelės sudėtis (Vasudevan 2014)

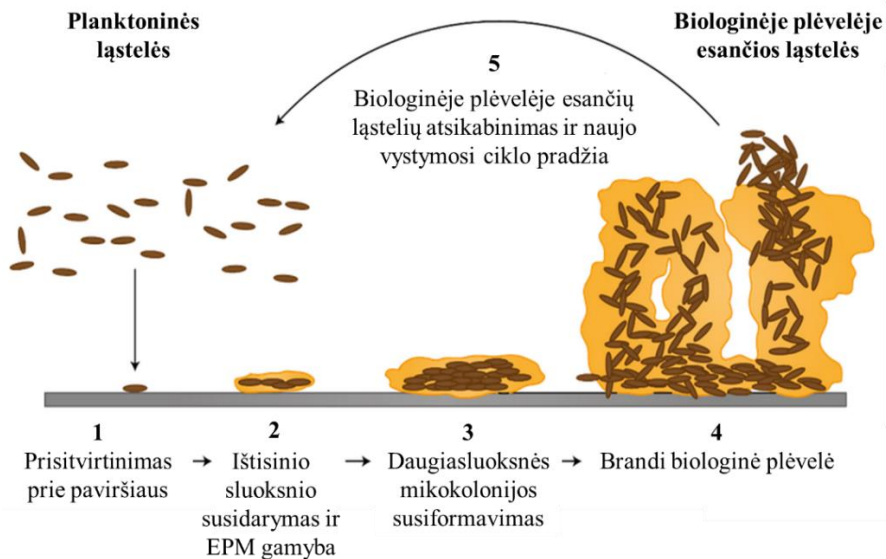
Sudėtinė dalis	Procentinė matrixo dalis (%)
Vanduo	Iki 97 %
Bakterijos	2–5 %
Polisacharidai	1–2 %
Baltymai	<1–2 % įskaitant fermentus
Nukleorūgštys	<1–2 %
Jonai	Prisijungę ir laisvi

Skirtingų mikroorganizmų EPM cheminės ir fizinės savybės gali skirtis, tačiau ji sudaryta iš polisacharidų, baltymų, nukleorūgščių, lipidų (Donlan 2002, Vasudevan 2014, Karygianni ir kt. 2020) bei priklausomai nuo aplinkos, kurioje formavosi biologinė plėvelė, joje papildomai gali būti aptinkama ir neląstelinės kilmės medžiagų (mineralų kristalų, molio ar dumblo dalelių), kraujo komponentų (Donlan 2002). Labai svarbi biologinės plėvelės sudedamoji dalis yra vanduo, kuris savo ruožtu sudaro galimybę atskiroje uždaroje terpėje mikroorganizmams lengvai judėti ir gauti maistinių medžiagų (Vasudevan 2014). EPM yra būdingas didelis įsotinimas vandeniu (hidratacija) – iki 97 proc., kadangi prie įkrautų molekulių (jonų) per vandenilinius ryšius jungiasi vandens molekulės (Donlan 2002). Kai kuriuose literatūros šaltiniuose dėl savo išvaizdos ir vandeningos konsistencijos biologinės plėvelės kartais vadinamos tiesiog gleivėmis (angl. *slime*) (Flemming ir kt. 2010). Bakterijos biologines plėveles gali formuoti ant įvairių abiotinių (medicinoje naudojamų siūlų, kateterių, implantų, dirbtinių širdies vožtuvų, pramonėje – vamzdynuose) ir biotinių (gyvų organizmų audinių) paviršių (Donlan 2002).

Išsiskiriamos keturios bakterinės biologinės plėvelės vystymosi stadijos, kurios vaizduojamos **5 paveiksle** (Jamal ir kt. 2018, Vasudevan 2014):

1. Bakterijų patekimas ir prisitvirtinimas prie standaus paviršiaus. Bakterijų patekimas ant standaus paviršiaus yra nulemtas elektrostatinės ir hidrofobinės sąveikos, van der Waalso jėgų ir kitų fizikocheminių parametrų. Bakterijoms prisitvirtinti labai svarbūs yra paviršiaus baltymai. Ši stadija yra grįžtamo pobūdžio.

2. Bakterijų akumuliacija, agregacija ir mikrokolonijų susidarymas. Ši stadija yra negrįžtamo pobūdžio.
3. Biologinės plėvelės biomasės tankio didėjimas, trimatės struktūros susiformavimas.
4. Biologinėje plėvelėje esančių bakterijų atsiskyrimas ir dispersija. Dėl įvairių priežasčių (veikiančių mechaninių jėgų, maistinių medžiagų trūkumo, pH pokyčio) dalis bakterijų atsiskiria nuo biologinės plėvelės, kad galėtų patekti į naujas ekologines nišas ir jas kolonizuoti.



**5 pav.** Biologinės plėvelės vystymosi stadijos. Bakterijos prisitvirtina prie paviršiaus (1), pradeda gaminti ekstraląstelinę polimerinę medžiagą (EPM) (2), toliau pradeda formuotis daugiasluoksnė struktūra (mikrokolonija) (3), kurioje daugėja EMP ir susiformuoja brandi biologinė plėvelė (4), galiausiai dalis biologinėje plėvelėje esančių ląstelių atsikabina ir tampa planktoninėmis (5) (Hollmann ir kt.).

Kiti autoriai (Yu ir kt. 2017, Olmo ir kt. 2020) išskiria penkias biologinės plėvelės vystymosi stadijas: (1) grįžtamas prisitvirtinimas prie paviršiaus, (2) negrįžtamas prisitvirtinimas prie paviršiaus, (3) dauginimasis ir mikrokolonijų susiformavimas (10–100  $\mu\text{m}$  storio), (4) dauginimasis, kurio metu kaupiasi EPM ir susiformuoja trijų matmenų struktūra, ir (5) dalies bakterinių ląstelių atsiskyrimas.



Biologinės plėvelės formavimasis yra sudėtingas ir labai koordinuotas procesas, vykstantis uždaroje mikroorganizmų grupėje. Kitaip tariant, skirtingose biologinės plėvelės vystymosi stadijose ją sudarantys mikroorganizmai komunikuoja tarpusavyje cheminiais signalais (Dwivedi ir kt. 2015, Leung ir kt. 2015). Bakterinių ląstelių tarpusavio ryšio procesas, apimantis ekstraląstelių signalinių molekulių, vadinamų autoinduktoriais, gamybą, aptikimą ir atsaką į jas, yra apibrėžiamas kaip kvorumo jutimas (angl. *quorum sensing*, QS) (Rutherford ir kt. 2012). Kvorumo jutimo reiškinys yra pastebėtas ir aprašytas 1960–1970 metais. Tuo metu vienos ląstelės kitai signalizavimo reiškinys buvo laikomas anomalija ir priskiriamas tik kelioms bakterijų rūšims. Tačiau šiandien žinome, kad komunikacija tarp ląstelių nėra išimtis, bet veikia norma bakterijų pasaulyje (Bassler ir kt. 2006).

Biologinės plėvelės atveju šios struktūros susidarymui reikalinga speciali signalinė sistema, kuri apima ir tam tikrų genų valdymo mechanizmus (transkripcijos lygmenyje). Jos dėka mikroorganizmai įvertina aplinkoje esančių tos pačios rūšies bakterijų skaičių ir geba atitinkamai reaguoti į pasikeitusią aplinką. Kvorumo jutimo būdu biologinėje plėvelėje esantys mikroorganizmai gali sinchronizuoti savo veiksmus grupėje, pavyzdžiui, sulaukyti maistines medžiagas ir tokiu būdu apsaugoti nuo žalingo aplinkos poveikio (Dwivedi ir kt. 2015).

Nustatyta, kad 65–80 proc. visų bakterinės kilmės infekcijų yra siejamos su bakterijų gebėjimu sudaryti biologinę plėvelę (Fleming ir kt. 2017, Abu Bakar ir kt. 2018, Jamal ir kt. 2018). Tarp medicinai svarbių ligų sukėlėjų yra nemažai mikroorganizmų, kurie formuoja biologines plėveles žmogaus organizme: tai *Streptococcus* genties bakterijos, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, mieliagrybis *Candida albicans* (Donlan 2002, Sharma ir kt. 2019). Ligų kontrolės ir prevencijos centras (angl. *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) įspėja, kad žmonijos sveikata yra grėsmingoje padėtyje, nes šie mikroorganizmai sukelia lėtines ir sunkiai gydomas infekcines ligas (Yumoto ir kt. 2019, Vestby ir kt. 2020). Įrodyta, kad biologinėje plėvelėje esantys mikroorganizmai yra 10–1000 kartų atsparesni antimikrobinų ir kitų biologiškai aktyvių medžiagų veikimui nei tie patys mikroorganizmai, esantys planktoninio būvio, o tai neretai ir lemia lėtinių infekcijų persistenciją organizme (Sharma ir kt. 2019, Yu ir kt. 2017). Biologinėje plėvelėje yra nuo 0,1 proc. iki 10 proc. bakterinių ląstelių, kurios išvengia antimikrobinų medžiagų poveikio, išlieka gyvybingos ir palankiomis sąlygomis toliau tęsia infekcinį procesą (Vasuedan ir kt. 2014). Tačiau didžiausią nerimą kelia tai, kad biologinėse plėvelėse vyksta

horizontali genų pernaša (transformacija, konjugacija), dėl kurios atsiranda bakterijos, pasižyminčios dauginiu (angl. *Multiple drug resistance*, MDR) ir ypatingu (angl. *Extreme drug resistance*, XDR) atsparumu antimikrobiniais vaistams (Slobodníková ir kt. 2016, Zaman ir kt. 2017, Yumoto ir kt. 2019).

Moksliniais tyrimais įrodyta, kad kvorumo jutimo procesu bakterijos geba valdyti ne tik biologinės plėvelės formavimąsi, bet ir virulentiškumo veiksnių raišką bei sporuliacijos procesą (Bassler ir kt. 2006).

Šiandien mokslininkai aktyviai tyrinėja biologines plėveles bei jų koordinavimo mechanizmus, nes išsiaiškinus ir supratus šiuos sudėtingus mechanizmus galima kurti naujas terapijos priemones (Rutherford ir kt. 2012, Mukherjee ir kt. 2019) ir spręsti mikroorganizmų atsparumo antimikrobiniais vaistams problemą (Yumoto ir kt. 2019).

#### 2.1.4. Dantų biologinė plėvelė

Pirmąjį dantų apnašo tyrimą 17 amžiuje (1674 metais) atliko olandų gamtininkas A. Levenhukas, kuris savo paties dantų apnašose pastebėjo judrius gyvus mikroorganizmus (Seminario ir kt. 2005, Høiby 2014). Šimtmečiu vėliau žmogaus danties emalį tyrinėti ėmėsi amerikiečių odontologas W. D. Miller'is, kuris pirmasis 1890 metais išleistame straipsnyje nuodugniai aprašė danties paviršiuje aptinkamą lipnų, želatinos pavidalo apnašą, sudarytą daugiausiai iš mikroorganizmų, ir iškėlė prielaidą, kad šis apnašas gali būti tiesiogiai susijęs su žalingu rūgščių poveikiu tam tikriems danties paviršiams (Silverstone ir kt. 1981).

Apnašos ant dantų (angl. *plaque*) pradeda formotis tik jiems išdygus (Praškevičius ir kt. 2000), jos susidaro nuolatos ir yra natūralus visiems žmonėms nuo gimimo iki mirties vykstantis procesas, kurio neįmanoma išvengti (Kiid ir kt. 2019). Burnos gleivinė dažnai atsinaujina, todėl mikroorganizmams tenka pakartotinai tvirtintis prie gleivinės epitelio ląstelių. Pastovios apnašos formuojasi tik ant kietųjų dantų paviršių, kur nėra intensyvios ląstelių kaitos (Beliavičiūtė 2007).

Taigi, dantų paviršiuje formuojasi dviejų tipų apnašas – baltasis dantų apnašas ir bakterinė plėvelė. Baltasis dantų apnašas (lot. *materia alba*) yra silpnai prisitvirtinęs prie danties paviršiaus ir sudarytas iš maisto likučių, žuvusių bakterijų, leukocitų, burnos gleivinės epitelio ląstelių. Šis dantų apnašas kaupiasi nevalant dantų ir lengvai pašalinamas vandens srove (Praškevičius ir kt. 2000, Kačergius ir kt. 2008). Kiekvieno žmogaus burnoje dantų paviršiuje formuojasi apnašas, kuris dar vadinamas dantų bakterine plėvele arba tiesiog biologine plėvele. Šis apnašas yra sudėtingas darinys, kurį sunku pašalinti nuo danties paviršiaus. Dantų biologinė plėvelė apibrėžiama

kaip tanki bakterijų masė, stipriai prisitvirtinusi prie paviršiaus, ir ją gaubia šeimininko ir bakterinės kilmės polimerų matrica (Kačergius ir kt. 2008). Dantų bakterinę plėvelę padengęs baltųjų apnašų sluoksniu stiprina žalingą bakterinių apnašų poveikį dantims (Praškevičius ir kt. 2000). Paskaičiuota, kad 1 mm<sup>3</sup> dantų apnašo sveria maždaug 1 mg ir jį sudaro daugiau nei 200 mln. bakterinių ląstelių (Seminario ir kt. 2005).

Burnoje susidaranti dantų bakterinė plėvelė mažai kuo skiriasi nuo kitų gamtoje aptinkamų biologinių plėvelių. Didžiąją jos dalį (apie 80 proc.) sudaro vanduo (Praškevičius ir kt. 2000), o likusią (20 proc.) – organinės arba mineralinės medžiagos. Iš organinių medžiagų tai seilių glikoproteinai, bakterinės kilmės baltymai (40 proc.), lipidai, įvairūs angliavandeniai, gliukanai (10–20 proc.), fruktanai (1–2 proc.). Pastebima, kad kalcio, fluoro, magnio, fosforo ir kitų mineralinių medžiagų dantų biologinėje plėvelėje yra daugiau negu seilėse (Bowen ir kt. 2009, Krzyściak ir kt. 2014).

Kaip ir dauguma biologinių plėvelių, dantų bakterinė plėvelė praeina keturias vystymosi stadijas (Balčiūnienė ir kt. 1992, Praškevičius ir kt. 2000, Seminario ir kt. 2005, Chen ir kt. 2021, Struzycka 2014):

**I stadija.** Iš pradžių švarų danties paviršių padengia plona maždaug 1 μm storio plėvelė vadinama emalio pelikule, ji sudaryta iš seilėse esančių baltymų, glikoproteinų, fosfoglikoproteinų, fermentų ir kitų organinių ir neorganinių komponentų. Burnoje esančios bakterijos kartu su seilėmis patenka ant susiformavusios pelikulės. Nuvalytą danties paviršių kolonizuoti geba nedaugelis bakterijų, todėl šioje biologinės plėvelės vystymosi stadijoje danties paviršiuje aptinkamos daugiausiai (95 proc.) streptokokų rūšys – *S. oralis*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*, o *S. mutans* bei pavieniai kokai ir lazdelės sudaro tik 2 proc. Pašalinus emalio pelikulę, vėl naujas jos sluoksniu burnoje susiformuoja per 20–30 min.

**II stadija.** Bakterijos, esančios pelikulėje, metabolizuodamos šeimininko produktus (seilių baltymus) arba maiste esančias medžiagas, auga, dauginasi ir dantų paviršiuje formuoja mikrokolonijas, prie kurių palaipsniui prisijungia ir kitos burnos bakterijos – gramneigiami kokai (*Veillonella*, *Neisseria* spp.), gramteigiamos lazdelės (*Actinomyces viscosus*). Šioje stadijoje danties paviršiuje sąveikauja tarpusavyje skirtingų rūšių mikroorganizmai. Būtent per pirmąsias 5 dienas vyksta didžiausi bakterinių apnašų pokyčiai, vėliau nusistovi dinaminė pusiausvyrą.

**III stadija.** Bakterijos gamina EPM, didėja dantų apnašų biomasės tankis, daugėja sluoksnių ir kaupiasi medžiagų apykaitos produktai. Storėjant apnašų sluoksniui, į jo vidų sunkiau patenka deguonis, todėl žuvusias aerobines bakterijas keičia anaerobinės. Dantų apnašas palaipsniui pradeda formotis ir

po dantenomis, bakterijos ir jų metabolizmo produktai patenka į dantų kišenes.

**IV stadija.** Prie bakterinės plėvelės prisijungia judrios bakterijos – spirochetos, vibrionai, *Fusobacterium* spp. Biologinė plėvelė padengia ir dantenų vageles, iš ten ir atgal pradeda judėti judrios bakterijos. Maždaug per 10–20 dienų minkštosios bakterinės apnašos mineralizuojasi ir susiformuoja dantų akmenys, kurie susiję su gingivito ir periodontito patogenezė.

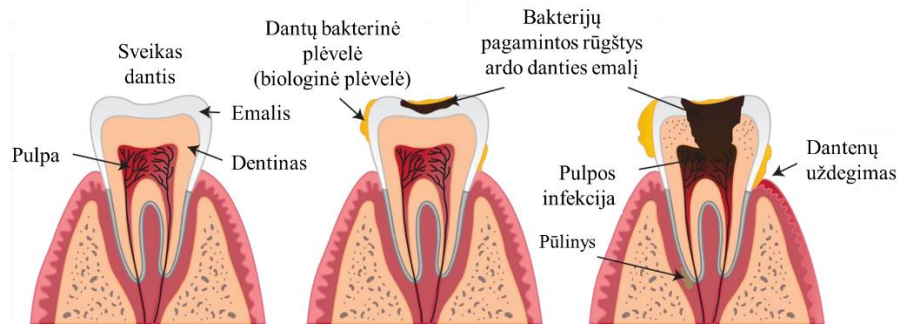
Kad ir kaip kruopščiai stengtumės valyti dantis, negalime visiškai panaikinti biologinės plėvelės, nes ką tik idealiai nuvalyto danties paviršiuje ji vėl pradeda vystytis, o po paros pradeda formotis mikrokolonijos (Grigalauskienė ir kt. 2014). Ankstyvoje stadijoje reguliarius bakterinio apnašo šalinimas padeda sumažinti patologinio proceso burnoje riziką. Prasta higiena ir kiti veiksniai gali sutrikdyti burnos homeostazę, tuomet dėl metabolinės ir fiziologinės mikroorganizmų veiklos pakinta aplinkos sąlygos biologinėje plėvelėje, ir jos lemia lėtines ligas (Jamal ir kt. 2018, Yumoto ir kt. 2019). Viršdanteninės apnašos yra susijusios su ėduonies atsiradimu ir jose vyrauja gramteigiamos bakterijos (*S. mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *Lactobacillus* spp.), o podanteninės susijusios su dantenų uždegimu ir jose vyrauja gramneigiamos anaerobinės bakterijos (*Actinobacillus* spp., *Campylobacter* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*) (Struzycka 2014). Šaknies ėduonis iš esmės skiriasi, nes dantų šaknis neturi emalio sluoksnio. Nors dažniausiai pažeidimuose vyrauja *Actinomyces*, *Atopobium*, *Prevotella* genčių bakterijos, tačiau *S. mutans* siejamas ir su šaknies ėduonies atsiradimu (Andruškienė 2012, Krishnan ir kt. 2017).

Literatūroje daugėja duomenų, patvirtinančių, kad dantų bakterinės plėvelės yra susijusios ne tik su infekcinėmis (Chamat-Hedemand ir kt. 2020), bet ir sisteminėmis (aterosklerozė, diabetas) bei autoimuninėmis ligomis. Įprastai *S. mutans* siejamas su burnos patologijomis, tačiau nustatyta, kad ši bakterija gali kolonizuoti ne tik burnoje esančius paviršius. *In vitro* tyrimai parodė, kad tos *S. mutans* padermės, kurių paviršiuje aptinkama kolageną prijungiančių baltymų (angl. *collagen-binding proteins*, CBPs) – streptokokų antigenas P (angl. *Streptococcal protein antigen P*, SpaP), su sienele susiję baltymai WapA, Cnm ir Cbm, kurie padeda prisitvirtinti prie kolageno turinčių ląstelių įvairiose žmogaus organizmo vietose (Avilés-Reyes ir kt. 2017). Jei burnos gleivinė pažeista, tokios *S. mutans* padermės gali patekti į kraują ir prisitvirtinti prie kraujagyslių endotelio, todėl endotelio paviršiuje susidaro kraujo ląstelių sancaupos, kurios sukelia cerebrines hemoragijas (Tonomura ir kt. 2016). Įdomius rezultatus 2020 metais gavo S. Naka su kolegomis, atlikę eksperimentą *in vivo* sąlygomis. Žiurkės buvo intraveniniu būdu užkrėstos *S. mutans* kultūra, po kurio laiko joms pasireiškė

imunoglobulino A (IgA) nefropatija (Bergerio liga). Šie literatūroje pateikti duomenys pabrėžia biologinių plėvelių tyrimų svarbą.

### 2.1.5. Dantų ėduonies patogenezė

Dantų ėduonis, arba kariesas (lot. *caries dentis* – puvisis), apibrėžiamas kaip lėtinis, infekcinės kilmės progresuojantis danties kietųjų audinių (emalio, dentino, cemento) irimas, kurį sukelia danties paviršiuje esančios rūgštys (Grabauskas ir kt. 1991, Kiid ir kt. 2019). Burnoje ilgalaikis mažas pH veikiant organinėms rūgštims ir apnašos lemia danties kietuosiuose audiniuose esančių mineralinių medžiagų (pirmiausiai hidroksiapatito –  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) tirpimą (Praškevičius ir kt. 2000, Kačergius ir kt. 2008) (**6 pav.**).



**6 pav.** Dantų ėduonies etiopatogenezė. Danties paviršiuje susiformuoja biologinė plėvelė, bakterijų gaminamos rūgštys iš pradžių ardo danties emalį, o vėliau ir dentino sluoksnius, tai lemia infekcijos pradžią ir danties ėduonies atsiradimą (Hollmann ir kt.).

A. J. Nowak'as (2019) nurodo, kad dantų ėduonies liga yra bakterijų ir angliavandenių kompleksinės sąveikos rezultatas. Laikui bėgant danties įtrūkimuose ir lygiuose danties paviršiuose susikaupusiose dantų apnašose esančios rūgštys gali demineralizuoti emalį ir dentiną. Skiriamos kelios klinikinės ėduonies stadijos. Pirmasis dantų ėduonies klinikinis simptomas yra pakitusi emalio spalva. Pažeistoje vietoje atsiranda dėmė, kuri gali būti balta, matinė, pilka, rusva, ruda arba juoda. Šioje ligos stadijoje, paprastai pacientai niekuo nesiskundžia. Danties emalio spalva pakinta dėl popaviršinės emalio demineralizacijos, dėl ko keičiasi emalio optinės savybės (Balčiūnienė ir kt. 1992). Jei demineralizacija nenutrūksta, palaiipsniui dėmės paviršiuje susidaro mažų ertmių, į kurias patenka mikroorganizmai, ertmės didėja ir emalis sparčiai yra ir susidaro kariozinė ertmė (Balčiūnienė ir kt. 1992, Nowak ir kt.

2019). Taigi, dar 1890 metais W. D. Miller'io iškelta prielaida, kad dantų emalį gadina lipni želatiną primenanti plėvelė dantų paviršiuje ir joje esančios rūgštys, pasitvirtino (Clarke 1924).

Dauguma autorių sutartinai teigia, kad dantų ėduonis yra daugialypė liga (Struzycka 2014, Pūrienė 2008, Almonaitis 2008, Andruškienė 2012, Balčiūnienė ir kt. 1992, Mačiulskienė 2014, Peres ir kt. 2019), ir išskiria šiuos rizikos veiksnius, kurie turi įtakos ėduonies atsiradimui, t. y. didelis kariesogeninių bakterijų skaičius, dažnas cukraus vartojimas, sutrikusi seilių funkcija, danties audinių fizinė ir cheminė struktūra (emalio struktūra, mineralizacijos laipsnis), danties morfologinės ypatybės ir padėtis dantų lanke, genotipas, individualus imuninis atsakas, nepakankamas fluoro preparatų vartojimas, prasta burnos higiena, blogos socialinės ir ekonominės sąlygos bei elgsenos ypatumai (Andruškienė 2012, Balčiūnienė 1992, Mačiulskienė 2014, Pitts ir kt. 2017, Struzycka 2014, Nowak ir kt. 2019). Apibendrinus literatūroje pateiktus duomenis galima teigti, kad dantų ėduonies patogenezę lemiantys veiksniai yra bakterijos, esančios biologinėje plėvelėje ir seilėse, ir dažnas angliavandenių vartojimas.

Bakterijos yra vienas pagrindinių etiologinių veiksnių, lemiančių ėduonies židinių atsiradimą dantų paviršiuje (Belavičiūtė 2007, Mačiulskienė 2014). Įvairios bakterijos, tarpdamos žmogaus burnoje, išskiria metabolizmo produktus – rūgštis (pieno, acto, skruzdžių, sviesto, propiono ir kitas), vandenilio sulfidą, amonio junginius, kurie sumažina dantų biologinės plėvelės pH nuo 7,00 iki 4,50–4,00 (Praškevičius ir kt. 2000, Moynihan ir kt. 2004, Friuli ir kt. 2020). Daugiausiai rūgščių gamina streptokokai (Praškevičius ir kt. 2000). Streptokokai yra prisitaikę išgyventi rūgštinėje aplinkoje, todėl toliau gamina rūgštis bei gliukanus, kurie skatina apnašų kaupimąsi (Andruškienė 2012). Burnoje rūgštims mažiau jautrūs yra ne tik streptokokai, bet ir laktobakterijos bei bifidobakterijos, kurios dėl sumažėjusio pH tampa labiau konkurencingos (Moynihan ir kt. 2004, Kiid ir kt. 2019, Gross ir kt. 2012).

Literatūros duomenimis, prie kariesogenų priskiriamos šios bakterijų rūšys: streptokokai (*Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii*), laktobakterijos (*Lactobacillus gasseri*, *L. jensenii*, *L. casei*, *L. paracasei*) bei bifidobakterijos (*Bifidobacterium dentium*, *B. longum*, *B. adolescentis*), veilonelės (*Veilonella atypica*, *V. dispar*, *V. parvula*), *Scardovia wiggsiae*, *Actinomyces* spp., *Prevotella* spp., *Selenomonas* spp., mieliagrybis *Candida albicans*. *Lactobacillus fermentum* siejama su dantų ėduonies atsiradimu, o *Bifidobacterium dentium* geba metabolizuoti rafinozę didesniais kiekiais nei *S. mutans*. Nustatyta, kad gramteigiama anaerobinė bakterija *S. wiggsiae* gamina daug rūgščių ir atspari

rūgštiniam pH – jos buvimas vaikų biologinėje plėvelėje susijęs su ankstyvuju vaikų dantų ėduonimi. Suaugusiųjų dantų ėduonies pasireiškimui turi įtakos *Prevotella* ir *Actinomyces* gentims priskiriamų bakterijų įsivyravimas dantų biologinėje plėvelėje. *Prevotella* spp. nebūdinga gaminti daug rūgščių, tačiau būdingas padidėjęs kolagenazių aktyvumas, o tai lemia proteolizinį aktyvumą, kuris taip pat prisideda prie dantų ėduonies atsiradimo. Tačiau *A. viscosus* gaureliams būdingas stiprus avidiškumas cemente esančiam kolageniui, dėl to jungiasi prie hidroksiapatito. *Candida* genties rūšys taip pat siejamos su dantų ėduonimi. *Candida albicans* ir *A. viscosus* gamina polisacharidus, kurie tampa energijos šaltiniu kitoms bakterijų rūšims (Gross ir kt. 2012, Chen ir kt. 2021). Taip pat yra žinoma, kad *C. albicans* ant minkštųjų audinių ir protezų paviršių sudaro mišrias mikroorganizmų bendrijas, kurių įsivyravimas gali nulemti gleivinės pažeidimą. Nustatyta, kad terpėje esant sacharozės *C. albicans* per gliukoziltransferazę (Gtf) jungiasi prie *S. mutans* paviršiaus ir kartu su juo kolonizuoja dantų paviršius (Bowen ir kt. 2018).

Taigi, dantų ėduonies etiologijoje vienas svarbiausių veiksnių yra kariesogeninės bakterijos, kurios tarpsta dantų biologinėje plėvelėje. Pirminis kariesogenas yra *S. mutans*, nes pasižymi didžiausiu virulentiškumu (Chen ir kt. 2021). Antriniai kariesogenai yra *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Actinomyces* ir *Fusobacterium* genčių rūšys (Gross ir kt. 2012).

Šiandien niekam nekyla abejonių, kad dantų ėduonies atsiradimui įtakos turi angliavandenių vartojimas (Andruškienė 2012). Patys angliavandeniai nėra žalingi dantims (Grigalauskienė ir kt. 2015), tačiau dažnas angliavandenių vartojimas lemia kariesogeninių bakterijų įsivyravimą burnoje (Chen ir kt. 2021).

Cukrus, arba sacharozė, yra vandenyje tirpus saldaus skonio sacharidas, kuris yra vienas dažniausių saldiklių, naudojamų maisto gamyboje norint pagerinti maisto ir gėrimų skonį (Kiid ir kt. 2019). Kiti cukrūs, kaip maltozė, gliukozė, fruktozė, taip pat gali prisidėti prie dantų demineralizacijos proceso. Nustatyta, kad laktozė yra mažiau acidogeniška (Seminaro ir kt. 2005). Į burną patenkę cukrūs ir kiti fermentuojami angliavandeniai yra hidrolizuojami seilėse esančio fermento amilazės (Friuli ir kt. 2020). Taigi, pavartojus sacharozės, burnoje prasideda glikolizės procesas, kurio metu bakterijos, esančios dantų apnaše, taip pat pradeda gaminti ir išskirti į aplinką rūgštis (Andruškienė 2012). Cukraus reikšmė dantų ėduonies etiogenezėje buvo įrodyta dar 1960 metais atliekant klinikinius tyrimus su eksperimentiniais gyvūnais. Grauzikams, užkrėstiems tam tikra streptokokų paderme ir kasdien maitinamiems kariesogeniniu maistu, po kurio laiko išsivystė dauginiai dantų ėduonies pažeidimai (Kiid ir kt. 2019). Žinoma, kad praskalavus burną 10

proc. gliukozės tirpalu, jau po 2–3 min. pH burnoje sumažėja iki 5,00 arba 4,00 reikšmės ir atsistato tik po valandos (Roberto Stefano kreivė). Jei dantų paviršiuje yra susiformavęs mikrobinis apnašas, tuomet pH grįžimo į normą laikotarpis yra ilgesnis (Andruškienė 2012, Bedonya-Correa ir kt. 2019).

Cukraus ir kitų angliavandenių sąsają su dantų ėduonimi įrodo ir duomenys, kurie buvo gauti vykdant archeologinius kasinėjimus. Mezolito ir ankstyvojo neolito periodu gyvenusių žmonių iškastinių dantų apnašose retais atvejais aptinkama *S. mutans* (Achtman ir kt. 2020). Vystantis žemdirbystei, palaiptiui žmogaus racione atsirado vis daugiau maisto produktų, kurių sudėtyje yra angliavandenių, todėl nenuostabu, kad bronzos ir geležies amžiaus žmonių iškastinių dantų apnašose nustatomos danties ėduonį sukeliančios *S. mutans* bakterijos. Jau III–IV tūkstantmetyje prieš Kristų daugiau nei pusės (60 proc.) Brazilijos populiacijos gyventojų dantys buvo pažeisti ėduonies (Turner ir kt. 1983). Tuo pačiu metu Aristotelis (384–322 metai prieš Kristų) pastebėjo, kad nuo figų ir saldumynų genda dantys (Ruby ir kt. 2010). Vėliau paaiškėjo, kad žmogaus burnos mikrobiomo sudėties pokytis yra susijęs su dietos pasikeitimais. Didėjant suvartojamo cukraus kiekiui proporcingai didėja ir dantų ėduonies paplitimas (Bowen ir kt. 2018). PSO atkreipia dėmesį, kad dauguma žmonių net neįsivaizduoja, kiek daug kasdien suvartoja pridėtinio cukraus. Paskaičiuota, kad saldinto gazuoto gėrimo skardinėje gali būti iki 10 arbatinių šaukštelių cukraus (40 g), o pomidorų padažo valgomajame šaukšte yra šaukštelis cukraus (4 g) (Guideline WHO 2015).

Taigi, normaliomis sąlygomis danties emalyje vyrauja dinaminė pusiausvyra tarp demineralizacijos ir remineralizacijos procesų (Balčiūnienė ir kt. 1992). Tačiau pasikeitus sąlygoms seilėse esančios mineralinės medžiagos gali nusėsti ant dantų paviršių ir skatinti demineralizaciją arba dantų akmenų formavimąsi. Tokios dviejų kryptių cheminės reakcijos (mineralinių medžiagų tirpimas ir jų susidarymas ant danties paviršiaus) burnoje vyksta daug kartų per dieną (Struzycka 2014), kadangi burnoje tarpstantys mikroorganizmai skaido joje esančias maisto medžiagas, kad palaikytų savo gyvybines funkcijas. Nors dantų bakterinei plėvelei būdinga nuolatinė mikrobu veikla ir rūgštingumo svyravimai, tačiau mikrobinų apnašų kaupimasis ant dantų paviršiaus dar nereiškia, kad išsivystys ėduonis. Priešingu atveju užtektų kiekvieną apnašomis padengtą paviršių laikyti ėduonies židiniu. Dantų ėduonis išsivysto dėl nuolatinės mikrobiotos pusiausvyros pokyčių, kurie kyla dėl pakitusios vietinės aplinkos, ir galiausiai demineralizacijos proceso įsivyravimo danties emalyje (Moynihan ir kt. 2004, Kiid ir kt. 2019, Mačiulskienė 2014).



### 2.1.6. *Streptococcus mutans* virulentiškumo veiksniai ir jų vaidmuo dantų ėduonies patogenezėje

*Streptococcus mutans* turi keletą virulentiškumo veiksnių, kurie reikalingi burnoje esančių paviršių kolonizacijai, medžiagų apykaitai bei išlikimui. Taigi, pagrindiniais *S. mutans* virulentiškumą lemiančiais veiksniais įvardijamos šios bakterijos adhezinės savybės, angliavandenių įsisavinimas (Krzyściak ir kt. 2014, Bedoya-Correa ir kt. 2019) bei kvorumo jutimo sąlygota rūgščių gamyba (acidogeniškumas), tolerancija rūgštims ir gebėjimas formuoti biologinę plėvelę (Leung ir kt. 2015, Matsumoto-Nakano 2018). *S. mutans* virulentiškumo veiksniai apibendrinami **7 paveiksle** ir juos koduojantys genai pateikiami **2 lentelėje**.

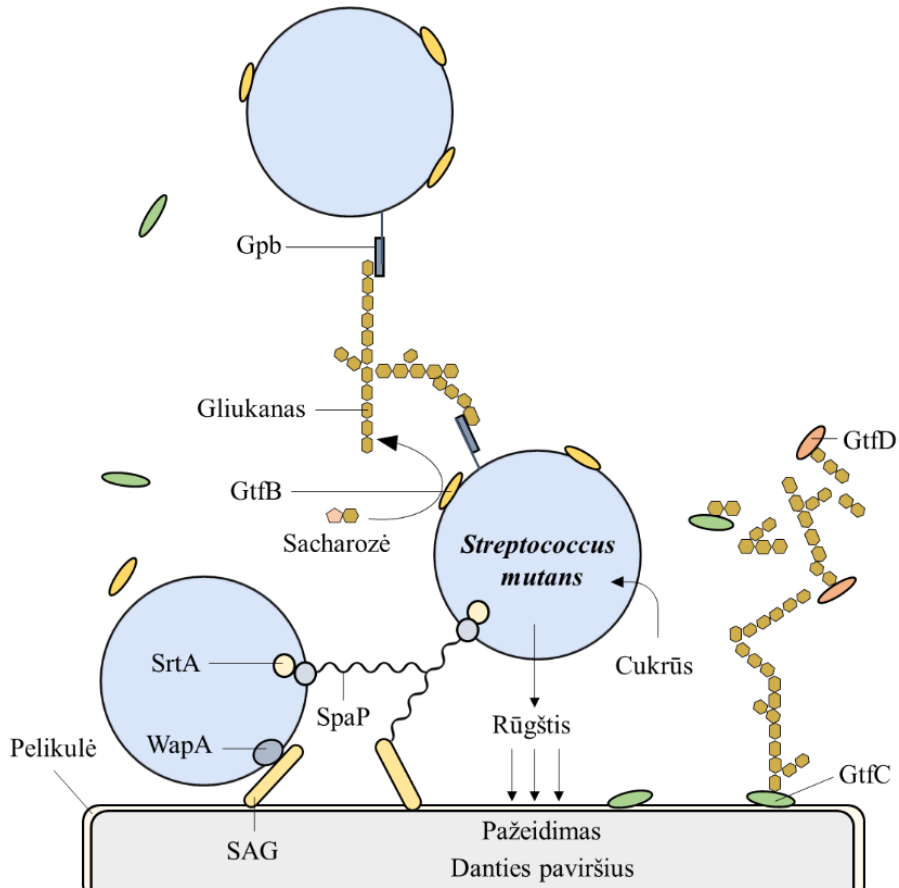
Bakterijų gebėjimas kolonizuoti ir išlikti ant įvairių paviršių priklauso nuo jų adhezinių savybių. Žinoma, kad *S. mutans* adhezinių savybių įgyja dviem būdais: nuo sacharozės priklausomu ir nuo sacharozės nepriklausomu (Matsumoto-Nakano 2018).

Adhezinių savybių *S. mutans* prisitvirtinti prie paviršiaus, kuris priklauso nuo sacharozės, suteikia egzopolisacharidai – gliukano ir fruktano polimerai, kurie atlieka labai svarbų vaidmenį biologinės plėvelės raidoje. Iš gliukano ir fruktano polimerų kolonizuojamame paviršiuje suformuojamas pamatinis karkasas prie kurio jungiasi kiti burnoje tarpstantys mikroorganizmai (Mieher ir kt. 2018, Bedonya-Correa ir kt. 2019, Lemos ir kt. 2019).

Gliukano ir fruktano polimerų gamyboje dalyvauja į supančią terpę *S. mutans* išskiriami fermentai – atitinkamai gliukoziltransferazė (Gtf) ir fruktoziltransferazė (Ftf arba SacB) (Nobbs ir kt. 2009), kurios hidrolizuoja sacharozę iki gliukozės ir fruktozės, taip pat sujungia gliukozės arba fruktozės liekanas tarpusavyje per glikozidinę jungtį ir tokiu būdu susidaro atitinkamai gliukano arba fruktano polimeras (Bedonya-Correa ir kt. 2019).

Gtf iš gliukozės liekanų gamina tirpius ir netirpius gliukanus. Tirpūs gliukanai (dažnai vadinami dekstranais) yra linijiniai polimerai, kuriuose vyrauja lengvai suardomos  $\alpha$ -1,6 glikozidinės jungtys. Dekstranai yra svarbūs ne tik bakterijų adhezijai, bet ir kaip papildomas išorinis angliavandenių šaltinis, kuris gali būti panaudotas stingant maistinių medžiagų. Išskiriamas fermentas dekstranazė A (Dex A) ardo  $\alpha$ -1,6 glikozidines jungtis ir susidaro oligosacharidai, pavyzdžiui, maltodekstranai, kurie pernešami į ląstelės vidų, kur juos fermentas dekstranazė B (DexB) hidrolizuoja iki gliukozės (Colby ir kt. 1997). Netirpūs gliukanai (dar vadinami mutanais) yra labiau šakoti polimerai, kuriuose vyrauja  $\alpha$ -1,3 glikozidinės jungtys. Mutanų daugiausia yra biologinėje plėvelėje, jie stipriai jungiasi prie dantų emalio, suriša bakterijas tarpusavyje ir su dantų apnašomis, ir jų negali suardyti bakterijų fermentai

(Balčiūnienė ir kt. 1992, Andruškienė 2012, Bedonya-Correa ir kt. 2019, Lemos ir kt. 2019). Apskritai gliukanai padidina biologinės plėvelės porėtumą, todėl sacharozė gali patekti į gilesnius jos sluoksnius ir tai nulemia suintensyvėjusią rūgščių gamybą arti danties paviršiaus (Seminario ir kt. 2005).



**7 pav.** *Streptococcus mutans* virulentiškumo veiksmų apibendrinta schema. Gpb – gliukaną prijungiantis baltymas; GtfB – gliukoziltransferazė B; GtfC – gliukoziltransferazė C; GtfD – gliukoziltransferazė D; SAG – seilių agliutinas; SrtA – sortazė A; SpaP – streptokokų antigenas P; WapA – paviršinis adhezinis baltymas. Paveikslas nupieštas naudojant MS PowerPoint 2016 remiantis Nobbs ir kt. (2009) bei Bowen ir kt. (2011).

**2 lentelė.** *Streptococcus mutans* virulentiškumo veiksnius koduojantys genai ir jų funkcijos (pagal You 2019)

Virulentiškumo veiksnys	Genas	Funkcija
Adhezija	<i>spaP</i>	Koduoja SpaP, kuris jungiasi prie seilių agliutinino (SAG).
	<i>gtfB, gtfC, gtfD, ftf</i>	Koduoja gliukoziltransferazes (Gtf) – GtfB, GtfC, GtfD ir fruktoziltransferazę (Ftf), kurios iš gliukozės sintetina atitinkamai gliukanus ir fruktanus.
	<i>gbpA–D</i>	Koduoja gliukaną prijungiančius baltymus (Gbp) – GbpA, GbpB, GbpC ir GbpD.
Angliavandenių pernaša ir metabolizmas	<i>eno</i>	Koduoja enolazę, kuri katalizuoja fosfoenolpiruvato susidarymą.
	<i>ldh</i>	Koduoja pieno rūgšties dehidrogenazę.
	<i>relA</i>	Dalyvauja valdant gliukozės fosfotransferazės ir gliukozės pernašos sistemas.
Tolerancija rūgštimis	<i>atpD</i>	Koduoja F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> –ATPazę, kuri pašalina H protonus iš bakterijos vidaus į išorę.
	<i>aguD</i>	Koduoja agmatino deiminazės sistemą (AgDS), kuri padeda toleruoti rūgštis.
	<i>brpA</i>	Koduoja valdymo baltymą BrpA.
	<i>relA</i>	Koduoja valdymo baltymą RelA.
Biologinės plėvelės susidarymas	<i>relA</i>	Koduoja RelA baltymą, kuris reikalingas biologinės plėvelės susidarymui ir kvorumo jutimui.
	<i>comDE</i>	Genai reikalingi biologinės plėvelės susidarymui ir kvorumo jutimui.
Valdymo signalų perdavimo sistema	<i>vicR</i>	Koduoja histidino kinazę bei atsako už <i>gbpB, gtfB, gtfC, gtfD</i> ir <i>ftf</i> raišką.
	<i>brpA</i>	Koduoja valdymo baltymą BrpA. Atsakingas už biologinės plėvelės susidarymą.
	<i>relA</i>	Atsakingas už biologinės plėvelės susidarymą ir gliukozės pernašos sistemą.

*S. mutans* gamina tris struktūriškai skirtingas Gtf – GtfB, GtfC ir GtfD, kurias koduoja genai – atitinkamai *gtfB, gtfC* ir *gtfD*, o jų raišką reguliuoja *vicR* genas (Jeong ir kt. 2013). GtfB dalyvauja netirpių gliukanų, GtfC –

mišrių (netirpių ir tirpių), o GtfD – tik tirpių gliukanų gamyboje (Mieher ir kt. 2018). Žinoma, kad GtfB jungiasi prie *S. mutans* sienelės, GtfC – prie dantų paviršiuje esančios pelikulės, o GtfD pasitarnauja kaip GtfB pradmuo (Bowen ir kt. 2011). Nustatyta, kad Gtf santykis bakterijų kultūroje yra 5 : 0,25 : 1 (Matsumoto-Nakano 2018). GtfB jungiasi ne tik prie *S. mutans*, bet ir kitų mikroorganizmų sienelės, pavyzdžiui, prie *C. albicans* sienelėje esančio manano (Lemos ir kt. 2019). Įdomu, tai kad *C. albicans* prie biologinės plėvelės vystymosi prisideda gamindama farnesolį, kuris pagerina *S. mutans* augimą, todėl neretai šie mikroorganizmai kartu išskiriami iš mažamečių vaikų ėduonies pažeistų dantų (Kim ir kt. 2017).

Ftf dalyvauja gaminant fruktaną, kuris yra iš dalies tirpus vandenyje, ir teigiama, kad pirmiausia tarnauja kaip išorinis angliavandenių šaltinis. Fruktanas skaido fermentas fruktanazė A (FruA) ir susidaro fruktozė (Colby ir kt. 1997). Taip pat yra įrodymų, kad fruktanas sąveikauja su gliukanu, tačiau jo įtaka biologinės plėvelės vystymuisi nėra iki galo aiški (Nagasawa ir kt. 2017).

Svarbu pažymėti, kad pradinėje adhezijoje prie danties paviršiaus gliukanai nedalyvauja, jie gali prisijungti tik tuo atveju, jei pelikulėje yra gliukaną prijungiančių baltymų (Nobbs ir kt. 2009). Taigi, dar vienas labai svarbus adhezinas, skirtas nuo sacharozės priklausomam prisitvirtinimui prie paviršiaus, yra gliukaną prijungiantis baltymas (angl. *Glucan-binding protein*, Gbp), kuriuo *S. mutans* jungiasi prie gliukano polimero (Mieher ir kt. 2018). Žinomi keturi Gbp variantai – GbpA, GbpB, GbpC ir GbpD (Krzyściak ir kt. 2014, Lemos ir kt. 2019). Teigiama, kad visi Gbp variantai yra bakterijų išskiriami į aplinkinę terpę, tačiau prie bakterijos sienelės paprastai visada prisijungę yra GbpC, o GbpB – tik kartais (Mattos-Graner ir kt. 2001). Kiekvienas atskiras Gbp įneša savo indėlį į brandžios biologinės plėvelės susidarymą. GbpA daugiau tarpusavyje sujungia gliukano molekules, o GbpD – tiek bakterijų, tiek egzopolisacharidų elementus. Labai svarbus vaidmuo tenka GbpC, kurio pagrindinė funkcija yra prijungti bakteriją prie gliukano polimero. Tyrimais nustatyta, kad GbpA praradimas nesukelia biologinės plėvelės biomasės tankio pokyčių, tačiau GbpC praradimas mažina biologinės plėvelės biomasės tankį ir bakterijų agregaciją (Lynch ir kt. 2007). GbpB imunologiškai skiriasi nuo kitų Gbp ir jis išskiriamas tiek iš klinikinių, tiek iš laboratorijoje kultivuojamų *S. mutans* padermių. *In vitro* tyrimai parodė, kad GbpB kiekis teigiamai koreliuoja su biologinės plėvelės biomasės tankiu (Mattos-Graner ir kt. 2001). Manoma, kad GbpB yra svarbi peptidogliukano hidrolazė ir dalyvauja peptidogliukano biosintezėje, tačiau baltymo gliukaną surišančios savybės nėra aiškios (Lynch ir kt. 2007). Genai, kurie atsakingi už šių baltymų gamybą yra *gbpA–D* (Mieher ir kt. 2018, You 2019).

*S. mutans* turi daug didelio afiniteto paviršiaus adhezinių baltymų, kurie leidžia kolonizuoti įvairius paviršius net ir nesant sacharozės. Nuo sacharozės nepriklausomame kelyje *S. mutans* paviršiuje esantys baltymai jungiasi prie seilių agliutinino (angl. *salivary agglutinin glycoprotein*, SAG), dar vadinamo gp340, EMP bei kitų mikroorganizmų.

Nuo sacharozės nepriklausančiam prisitvirtinimui vienas pagrindinių *S. mutans* adhezinių baltymų yra antigeno I/II (Ag I/II) šeimai priskiriamas streptokokų antigenas P (angl. *Streptococcal protein antigen P*, SpaP), dar žinomas kaip Ag I/II, P1, PAc, Sr, AgB, SspB, SoaA (Nobbs ir kt. 2009, You 2019). Įrodyta, kad *S. mutans* SpaP yra labai svarbus burnos paviršių pirminei kolonizacijai (Crowley ir kt. 1999, Zhuang ir kt. 2016), kadangi jungiasi prie seilėse esančio SAG bei prolino baltymo gausa pasižyminčios dantų pelikulės, dengiančios ne tik emalį, bet ir kitus burnos paviršius (Krzyściak ir kt. 2014, Matsumoto-Nakano 2018, You 2019). Žinoma, kad AgI/II šeimos adheziniai taip pat sąveikauja su kitomis bakterijomis ir šeimininko baltymais – fibronektinu ir kolagenu (Lemos ir kt. 2019). SpaP turi du antigeninius determinantus (antigenas I ir II) ir tris variantus – A, B, C (Fereires ir kt. 2017). SpaP gamybą koduoja *spaP* genas (Jeong ir kt. 2013).

Nustatyta, kad adhezijoje, kuri nepriklauso nuo sacharozės, dalyvauja ir kiti paviršiniai baltymai, pavyzdžiui, WapA (angl. *Wall-associated protein A*), SMU\_63c, Cnm ir Cbm, kurie padidina *S. mutans* virulentiškumą. Įdomu tai, kad, kultivuojant *S. mutans* bakterijų kultūrą terpėje su sacharoze, slopinama geno *wapA*, kuris koduoja WapA baltymo sintezę, raiška (Zhu ir kt. 2006). Dar žinoma, kad iš paviršinių baltymų SpaP, WapA ir SMU\_63c biologinėje plėvelėje formuojasi amiloidinių skaidulų sankaupos. 5–13 nm skersmens ir nuo kelių nm iki kelių μm dydžio amiloidinės skaidulos yra EPM dalis ir sąveikaudamos su ekstraląstelinėmis DNR (angl. *extracellular DNA*, eDNA) ir RNR (angl. *extracellular RNA*, eRNA) molekulėmis suteikia jai stabilumo (Besingi ir kt. 2017, Lemos ir kt. 2019).

Kai kurių *S. mutans* padermių sienelėje aptinkami kolageną prijungiantys baltymai (angl. *collagen-binding proteins*, CBPs) – Cnm ir Cbm, kurie padeda *S. mutans* prisitvirtinti prie kolageno turinčių ląstelių įvairiose žmogaus organizmo vietose (Avilés-Reyes ir kt. 2017). Cnm ir Cbm pasiskirstymas tarp *S. mutans* yra atitinkamai 10–20 proc. ir 2 proc. (Kim ir kt. 2020). Įrodyta, kad Cnm gali prisijunti prie I tipo kolageno, kurio daug yra dentine, taip pat jungiasi prie vainikinių arterijų endotelio ląstelių, o tai gali lemti širdies ir kraujagyslių ligas, smegenų hemoragijas. Cbm dažniausiai aptinkamas tarp serovaro k padermių ir siejamas su infekciniu endokarditu (Matsumoto-Nakano 2018). Nustatyta, kad SpaP variantas B ir Cnm potipiai siejami su

didesniu dantų ėduonies dažniu ir galėtų būti naudojami kaip dantų ėduonies žymenys (Freires ir kt. 2017).

Kaip ir daugelio gramteigiųjų bakterijų paviršiaus baltymų, taip ir dauguma *S. mutans* adhezinių priklauso LPxTG šeimai. Šie paviršiaus baltymų pirmtakai turi konservatyvią LPxTG seką, kurią atpažįsta ir prie kurios prisijungia sienelėje esanti sortazė A (SrtA). LPxTG seka pasitarnauja kaip substratas, kurį SrtA suskaido ir prijungia *S. mutans* adhezinius prie peptidoglikano sluoksnio (Lee ir kt. 2002, Nobbs ir kt. 2009). Taigi, SrtA yra labai svarbi tokių adhezinių baltymų kaip GbpC, SpaP, WapA ir kitų išsidėstymui ląstelės paviršiuje (Ajdic ir kt. 2002, Liao ir kt. 2014), ir tai įrodo tyrimai, atlikti P. L. Zhuang'o su kolegomis (2016), kurie nustatė, kad klaidingos mutacijos *srtA* gene sumažina SrtA fermentinį aktyvumą, o SrtA mutantai neformuoja biologinės plėvelės (Lemos ir kt. 2019).

*S. mutans* adhezijai prie paviršiaus svarbios ir nukleorūgštys, kurios yra viena iš EPM sudedamųjų dalių. Ekstraląstelinės DNR ir RNR padeda bakterijoms agreguoti tarpusavyje ir formuoti vientisą biologinę plėvelę (Karygianni ir kt. 2020). S. Liao (Liao ir kt. 2014) teigia, kad ekstraląstelinė DNR sąveikauja su egzopolisacharidais, taip pat spėja, kad kartu su amiloidinėmis skaidulomis sudaro nanopluoštus, kurie sukelia ląstelių agregaciją ir kartu prijungia prie substrato.

Be adhezinių savybių, *S. mutans* virulentiškumui labai svarbios ir tokios savybės kaip angliavandenių pernaša ir metabolizmas. *S. mutans* padermės UA159 genomo analizė rodo, kad ši bakterijų rūšis geba metabolizuoti tiek daug įvairių angliavandenių, kaip nė viena kita gramteigiama bakterija. Apie tai, kokius angliavandenius gali metabolizuoti, paminėta 2.1.2 poskyryje. Nustatyta, kad *S. mutans* genome yra užkoduota keturiolika skirtingiems monosacharidams ir disacharidams specifiskų, nuo fosfoenolpiruvato priklausomų fosfotransferazės sistemų bei dviejų tipų pernašos ATPazės, dar vadinamos ABC (angl. *ATP binding cassette*) nešikliais, kurios dalyvauja oligosacharidų pernašoje (Lemos ir kt. 2019). Pagrindinis energijos gavimo būdas yra angliavandenių fermentacija, kai vykstant glikolizei gaunamas piruvatas, kuris vėliau redukuojamas iki pieno ir skruzdžių rūgšties, etanolio arba acetato, dėl šių medžiagų prasideda terpės rūgštėjimas (Mitchell 2003). Genai *eno*, *ldh* ir *relA* yra reikalingi angliavandenių pernašai ir metabolizmui. *eno* koduoja enolazę, kuri katalizuoja fosfotransferazės sistemos pagrindinio komponento fosfoenolpiruvato susidarymą, o *ldh* koduoja pieno rūgšties dehidrogenazę, kuri reikalinga pieno rūgščiai susidaryti bakterinės ląstelės viduje (You 2019).

Gebėjimas fermentuoti daugelį angliavandenių susijęs su kitu *S. mutans* virulentiškumo veiksnium – rūgščių gamyba, arba kitaip vadinamuoju

acidogeniškumu (angl. *acidogenicity*), kai anaerobinėmis sąlygomis angliavandeniai skaidomi iki organinių rūgščių. Nors *S. mutans* gali fermentuoti angliavandenius iki skruzdžių rūgšties, acetato ar etanolio, tačiau paprastai galutinis medžiagų apykaitos produktas yra pieno rūgštis, kuri daugiausiai ir lemia terpės rūgštingumo padidėjimą (Bedonya-Correa ir kt. 2019).

Svarbu tai, kad *S. mutans* virulentiškumui įtakos turi ne tik acidogeniškumas, bet ir šių bakterijų gebėjimas toleruoti rūgštis (angl. *acid tolerance* arba *aciduricity*) (Guo ir kt. 2015). Žinoma, kad *S. mutans* gali daugintis ir vykdyti glikolizę terpėje, kurios pH reikšmė itin žema, todėl ši savybė suteikia joms pranašumą prieš mažiau rūgštims tolerantiškas bakterijų rūšis. *S. mutans* ir kitos acidofilinės bakterijos išgyvena terpėje, kurios pH reikšmė yra mažesnė nei 4,00, o komensalai tarpstantys burnoje akimirksniu žūsta pH esant 5,50–6,00 (Bedonya-Correa ir kt. 2019). Teigiama, kad pH reikšmei sumažėjus nuo 5,00 iki 2,00, *S. mutans* bakterijos išlieka gyvybingos, auga ir dauginasi, o didžioji dalis bioplėvelėje esančių bakterijų tokiomis ekstremaliomis sąlygomis neišgyvena ir žūsta net *mitis* grupės streptokokai (Baker ir kt. 2017). *S. mutans*, kaip ir kitos acidofilinės bakterijos, turi įvairių prisitaikymo būdų, kurie leidžia joms adaptuotis ir daugintis žemo pH sąlygomis (Kačergius ir kt. 2008). Šiuo atžvilgiu svarbiausias *S. mutans* prisitaikymas yra iš ląstelės citoplazmos į išorę vandenilio protonus ( $H^+$ ) pernešanti  $F_1F_0$ -H/ATPazė, kuri labai aktyviai veikia esant žemoms pH reikšmėms ir mažiau aktyvi esant optimalioms pH reikšmėms (Lamont ir kt. 2013, Bowen ir kt. 2018).  $F_1F_0$ -H/ATPazė sudaryta iš membranoje įsiterpusio  $F_0$  komplekso, kuris reikalingas vandenilio protonų ( $H^+$ ) pernašai, ir periferijoje išsidėsčiusio  $F_1$  baltymų komplekso, kuriam būdingas ATPazės aktyvumas.  $F_1F_0$ -H/ATPazė protonų pernašos operoną sudaro *atpEBF* genai, kurie atitinkamai koduoja  $F_0$  komplekso subvienetus c, a ir b, bei *atpHAGDC* genai, kurie atitinkamai koduoja  $F_1$  komplekso subvienetus  $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$ , ir  $\epsilon$ . Tyrėjai (Gong ir kt. 2009), nagrinėdami rūgščių poveikį *S. mutans* dviejų komponentų signalo perdavimo sistemos (angl. *Two-component signal transduction system*, TCSTS) genų raiškai, naudojo  $F_1F_0$ -H/ATPazės subvienetus b ir  $\beta$ , kuriuos atitinkamai koduoja *atpF* ir *atpD* genai.

Toleruoti rūgštinę aplinką padeda ir agmatino deiminazės sistema (angl. *agmatine deiminase system*, AgDS) bei šarmų gamyba (You 2019). Žinoma, kad kai kurie burnoje aptinkami streptokokai metabolizmo metu susidariusių amoniako ir  $CO_2$  junginių poveikį neutralizuoja gamindami ureazę arba arginino deiminazės sistemą. *S. mutans* nebūdinga nei ureazė, nei arginino deiminazės sistema, tačiau šios bakterijos turi AgDS, kuri labai panaši į arginino deiminazės sistemą. Dantų apnašose susidariusį agmatiną

(dekarboksilintą arginino darinį) AgDS verčia į amoniaką, CO<sub>2</sub>, putresciną ir ATP. Manoma, kad AgDS nekeičia terpės pH, tačiau teigiama, kad susidaręs amoniakas gali neutralizuoti rūgščių poveikį ląstelės viduje (Liao ir kt. 2014, Lemos ir kt. 2019). Genai, kurie atsako už toleranciją rūgštims, yra *atpD*, *aguD*, *brpA*, *relA* (You 2019). Nuo rūgščių poveikio *S. mutans* padeda apsisaugoti citoplazminė membrana, kuri normaliomis sąlygomis yra iš dalies pralaidi protonams. Taip pat nustatyta, kad rūgštinėje aplinkoje *S. mutans* bakterijos indukuoja turimus transkripcinius ir fiziologinius mechanizmus, kurie aktyvuoja buferinę sistemą ląstelės citoplazmoje, dėl to pakinta jos riebalų rūgščių sudėtis (Lemos ir kt. 2019). Žinoma, kad *S. mutans* turi reparacijos mechanizmus, kurie padeda ištaisyti rūgščių sukeltas DNR ir baltymų pažeidimus (Baker ir kt. 2017).

Dar viena *S. mutans* savybė, kuri turi įtakos šios bakterijų rūšies virulentiškumui, yra gebėjimas formuoti biologinę plėvelę. Įvairiuose literatūros šaltiniuose nurodoma ir neretai pabrėžiama, kad iš visų burnoje aptinkamų bakterijų rūšių *S. mutans* yra geriausiai prisitaikiusi formuoti biologinę plėvelę (Biswas ir kt. 2012, Kidd ir kt. 2019, Krzyściak ir kt. 2014). Atlikti tyrimai su *S. mutans* UA159 paderme parodė, kad sėslios biologinėje plėvelėje esančios ląstelės labai skiriasi nuo planktoninių. Nustatyta, kad sėslios ląstelės, palyginti su planktoninėmis, pasižymi didesne tolerancija rūgštims, jos yra atsparesnės chlorheksidino poveikiui, efektyviau panaudoja sacharozę (kas lemia stipresnę adheziją) bei skiriasi genų raiška (Liu ir kt. 2013, Silva ir kt. 2014). Genai, atsakingi už *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą, yra *smu630*, *relA* ir *comDE* (You 2019). Biologinei plėvelei susidaryti yra reikalingi valdymo signalų perdavimo sistemos baltymai VicKR ir CovR, kurie atsako už genų, koduojančių egzopolisacharidų gamybą, raišką (Lemos ir kt. 2019). Histidino proteinkinazė VicK reaguoja į cheminį signalą ir toliau perduoda jį kitiems valdymo baltymams VicR ir GcrR. Atlikto tyrimo (Deng ir kt. 2021) duomenimis, Vick mutantų savybė formuoti biologinę plėvelę buvo užslopinta ir EPM gamyba vyko tik ląstelės paviršiuje, o daugumos genų, atsakingų už EPM gamybą, raiška sumažėjo, išskyrus *gtfB* geną. Kalbant apie VicR baltymą, nustatyta, kad jis teigiamai valdo *gbpB*, o CovR slopina *gtfB*, *gtfC* ir *gbpC* genų transkripciją (Lemos ir kt. 2019). Teigiama, kad dauguma duomenų apie *S. mutans* biologinę plėvelę yra surinkta atliekant stebėjimus atskirais laiko momentais arba esant nekintančioms sąlygoms. Tačiau burnoje mikroaplinka dinamiškai kinta ir vyksta nuolatinė bakterinės plėvelės restruktūrizacija, todėl ateityje mokslininkų dėmesys turėtų būti sutektas į šios bakterijų rūšies matricos susidarymo, struktūrinės organizacijos ir persitvarkymo mechanizmus, kurie



gali suteikti naujų įžvalgų apie biologinės plėvelės EPM sudėtį ir struktūrą (Karygianni ir kt. 2020).

Tokie *S. mutans* virulentiškumo veiksniai kaip acidogeniškumas, tolerancija rūgštims ir gebėjimas formuoti biologinę plėvelę yra valdomi cheminiais signalais, dar vadinamais kvorumo jutimu (Leung ir kt. 2015, Matsumoto-Nakano 2018), kuris yra labai svarbus bakterijų prisitaikymui prie aplinkos, išlikimui ir virulentiškumui. Ši signalų perdavimo sistema koordinuotai vykdo specifinių genų raišką tam, kad atsakas į aplinkos pasikeitimus būtų suderintas visos populiacijos lygmeniu (Lemos ir kt. 2019). Kvorumo jutimą indukuoja ląstelių tankio pokytis (You 2019), rūgštinis pH, maistinių medžiagų trūkumas, oksidacinis stresas ir kiti veiksniai (Leung ir kt. 2015). Kvorumo jutimas taip pat aktyvuoja bakteriocinų, vadinamų mutaciniais, gamybą (Matsumoto-Nakano 2018). *S. mutans* cheminių signalų perdavimo veikimo mechanizmo svarbiausios dalys yra signalinė molekulė vadinama kompetenciją skatinančių peptidu (angl. *competence-stimulating peptide*, KSP), ir dviejų komponentų signalo perdavimo sistema (angl. *Two-component signal transduction system*, TCSTS), dar įvardijama kaip ComDE (Lemos ir kt. 2019). Tam tikras aplinkos veiksnio pokytis burnoje sukelia KSP gamybą. Iš pradžių pagaminamas propeptidas (ComC), kurį transformuoja ir išskiria į terpę ABC nešiklis (ComAB), ir susidaro modifikuotas KSP, kuris dar kartą pakinta dėl sąveikos su membranoje esančia proteaze ir tik tada sąveikauja su histidino kinaze (ComD), kuri aktyvuoja citoplazmoje esančio atsako reguliatoriaus (ComE) fosforilinimą ir tokiu būdu aktyvuoja biologinei plėvelei susidaryti ar bakteriocinui gaminti reikalingų genų raišką (Bikash et al. 2018). Taigi, kvorumo jutimui ir biologinės plėvelės susidarymui reikalingi šie genai: *comD* genas, koduojantis histidino kinazę ComD, ir *comE* genas, koduojantis atsako reguliatorių ComE. Valdymo signalų perdavimo sistemai reikalingi *vicR*, *brpA* ir *relA* genai (You 2019). Žinoma, kad valdymo signalų perdavimo sistemos baltymas BrpA atsako už biologinės plėvelės susidarymą. Tyrimais nustatyta, kad *brpA* geno delecija labai mažai veikia *S. mutans* augimą, tačiau stipriai sutrikdo biologinės plėvelės susidarymą. Be to, BrpA mutantai yra mažiau jautrūs rūgščių ir oksidacijos poveikiui, tačiau daugiau jautrūs antimikrobinių medžiagų poveikiui (Lemos ir kt. 2019). Baltymas RelA reikalingas biologinės plėvelės susidarymui ir rūgščių tolerancijai, todėl glaudžiai susijęs su *S. mutans* virulentiškumu. J. A. C. Lemos su kolegomis (2004), atlikę eksperimentą su *S. mutans* RelA mutantais, kurie buvo kultivuoti optimalaus ir rūgštinio pH sąlygomis, nustatė, kad rūgštys planktoninių ląstelių augimą sulėtino tik kultivavimo pradžioje, o biologinėje plėvelėje esančios sėslios ląstelės tapo atsparios rūgščių poveikiui ir glikolizės būdu sumažino pH rodiklį veiksmingiau, nei laukinio tipo padermė.

### 2.1.7. *Streptococcus mutans* biologinės plėvelės susidarymo prevencija

Tradicinės dantų ėduonies kontrolės ir apsaugos priemonės yra dantų apnašų kontrolė (asmeninė ir profesionali burnos higiena), fluoro preparatų naudojimas, vandens fluoravimas, mityba, seilių pH neutralizuojančio poveikio stimuliavimas, kramtomosios gumos naudojimas, silantai, vietinių emalio remineralizacijos reakcijų skatinimas, antibakterinių ir cheminių medžiagų arba probiotikų vartojimas (Kang ir kt. 2008, Grigalauskienė ir kt. 2015, Kiid ir kt. 2019, Yon ir kt. 2019, Zhang ir kt. 2020). Deja, nepaisant esamos didelės tradicinių dantų ėduonies prevencijos priemonių įvairovės ir gausos, kasmet daugybė žmonių mūsų planetoje susiduria su šia liga (FDI, World Dental Federation 2015).

Sukaupta labai daug duomenų apie dantų ėduonies etiopatogenezę. Nustatyti pagrindiniai ligą lemiantys veiksniai, tarp kurių svarbiausias yra burnoje aptinkamas pirminis kariesogenas *Streptococcus mutans* dėl gebėjimo formuoti lipnią biologinę plėvelę danties paviršiuje (Chen ir kt. 2021). Deja, taip pat paaiškėjo, kad *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymas yra daugialypis procesas. Įvairių tyrimų duomenys patvirtina, kad biologinė plėvelė yra sudėtinga ir labai organizuota struktūra, o jos formavimasis yra koordinuotas procesas, dėl to *S. mutans* gali keistis ir prisitaikyti prie kintančių aplinkos sąlygų (Sharma ir kt. 2019, Karygianni ir kt. 2020).

Žinios apie *S. mutans* biologinės plėvelės vystymosi stadijas ir veikimo mechanizmus gali padėti kuriant efektyvias dantų ėduonies prevencijos priemones. Teigiama (Koo ir kt. 2017), kad biologinės plėvelės slopinimas gali būti nukreiptas į visas jos vystymosi stadijas (biologinės plėvelės vystymosi stadijos aprašytos 2.1.3 poskyryje).

Bakterijų patekimo ir prisitvirtinimo stadijoje gali būti blokuojama adhezija arba adhezinių gamyba (Karygianni ir kt. 2020). Galima slopinti pradinę adheziją, šiuo atveju slopinamos planktoninės ląstelės ir slopinama tiek nuo sacharozės priklausoma, tiek nepriklausoma adhezija. Pavyzdžiui, nuo sacharozės priklausomos adhezijos atveju slopinama Gtf ir Gbp gamyba (Ajdic ir kt. 2002). Šioje *S. mutans* biologinės plėvelės vystymosi stadijoje galima slopinti kvorumo jutimą ir dviejų komponentų sistemą, taip pat acidogeniškumą ir toleranciją rūgštims (Scharnow ir kt. 2019).

Bakterijų akumuliacijos, agregacijos ir mikrokolonijų susidarymo stadijoje slopinama EPM gamyba ir ląstelių dalijimasis (Karygianni ir kt. 2020). EPM gamybą būtų galima mažinti veikiant Gtf raišką. Kalesinkas ir kolegos (2015) parinko priešprasminį oligonukleotidą, kuris stipriai slopino *S. mutans* iRNR *gtfB* ir *gtfC* genų raišką, taip pat sumažino bakterijų tarpusavio agregaciją. Kita mokslininkų grupė (Askari ir kt. 2020) ištyrė *Silybum marianum* vaisių

ekstrakto poveikį *relA*, *gtfC*, *brpA* ir *comDE* genų raiškai ir nustatė, kad ekstraktas statistiškai reikšmingai sumažino šių genų raišką *in vitro* sąlygomis bei dantų ėduonies vystymąsi ir *in vivo* sąlygomis.

Biomasės tankio didėjimo, trimatės struktūros susiformavimo stadijos biologinė plėvelė gali būti suardyta fiziškai pašalinant ar pažeidžiant EPM vientisumą fermentais, natūraliais biologiškai aktyviais junginiais, nanodalelėmis (Sharma ir kt. 2019), antiamiloidiniais vaistais (Karygianni ir kt. 2020).

Galiausiai paskutinės stadijos biologinėje plėvelėje esančių bakterijų atsiskyrimas ir dispersija, anot D. Fleming ir K. P. Rumbaugh (2017), gali vykti pasyviai arba aktyviai. Išorinių jėgų sukeltas fizinis biologinės plėvelės poslinkis, kuris įvyksta dėl mechaninio trikdymo, pavyzdžiui, dantų valymo ar intersticinio skysčio tėkmės, priskirtinas pasyviai dispersijai. Pasyvios dispersijos metu paprastai atsikabina dalis biologinės plėvelės arba ji gali būti visiškai pašalinama nuo paviršiaus. Aktyvų dispersijos procesą inicijuoja biologinėje plėvelėje esančios bakterijos, reaguodamos į aplinkos pokyčius, pavyzdžiui, maistinių medžiagų trūkumą, toksiškų šalutinių produktų ar antimikrobinų medžiagų poveikį, bakteriofagus, fagocitus ir kita. Aktyvi dispersija yra gyvybiškai svarbi biologinės plėvelės vystymosi ciklo dalis, kuri padeda bakterijoms išlikti. Šioje stadijoje naudojant fermentus, įvairius junginius ir kitas priemones galima sukelti pasyvią ar aktyvią *S. mutans* dispersiją, ir tokiu būdu biologinėje plėvelėje esančios bakterijos pereina į planktoninę būseną.

Klinikinėje praktikoje siekiant sumažinti infekcijos riziką paprastai naudojamos burnos higienos ir profilaktinės priemonės, kurių sudėtyje yra įvairių cheminių medžiagų. Vienos dažniausių yra plataus spektro antimikrobinu poveikiu pasižymintys natrio fluoridas, chlorheksidinas (CHX) (Lee ir kt. 2019), triklozanas (Kalesinskas ir kt. 2014). Deja, šios plačiai naudojamos medžiagos turi trūkumą, nes sukelia šalutinį poveikį, ypač jei naudojamos ilgą laiką arba netinkamai. Pavyzdžiui, CHX yra citotoksiškas žmogaus periodonto raiščio ląstelėms, slopina šių ląstelių baltymų sintezę ir trikdo mitochondrijų veiklą (Lee ir kt. 2016). Be to, nustatyta, kad CHX neigiamai veikia burnos mikrobiomą. Savaitę panaudojus skalavimo skystį su CHX, burnoje pradeda vyrauti rūgštinis pH, kuris palankus dantų ėduonies išsivystymui, ir sumažėja nitratų redukuojančių bakterijų kiekis, kuris turi įtakos širdies ir kraujagyslių būklei (Bescos ir kt. 2020). Jau kelis dešimtmečius bene dažniausiai odontologijoje naudojamas kalcio hidroksidas efektyviai neveikia prieš *S. mutans* (Lee ir kt. 2016). Negana to, pastaruoju metu pastebima, kad mažėja *S. mutans* jautrumas natrio fluoridui (Liao ir kt.

2017), CHX (Kaspar ir kt. 2019), todėl kyla poreikis ieškoti alternatyvių dantų ėduonies prevencijos priemonių (Lee ir kt. 2016).

Liaudies medicinoje kelis tūkstančius metų naudojami žolelių ekstraktai, nes žmogus nuolatos ieškojo būdų, kaip apsaugoti nuo ligų, eksperimentuodamas atradavo, kurios augalinės ar gyvūninės kilmės medžiagos gali padėti nuo ligų. Nenuostabu, kad žolelių ekstraktai nuo seno buvo pasitelkiami odontologijoje įvairiems negalavimams gydyti: skausmui malšinti, uždegimui mažinti, taip pat naudojami kaip antioksidantai, antimikrobiniai preparatai, kurie veiksmingai kontroliuoja mikroboų apnašas sergant gingivitu ir periodontitu (Kumar ir kt. 2013, Monviltaitė ir kt. 2016). Natūralūs produktai gali būti rekomenduojami dantų ėduonies prevencijai, nes jie gali turėti mažiau šalutinių poveikių nei su sintetinės antimikrobinės medžiagos (Chen ir kt. 2020).

## 2.2. Galo rūgšties esteriai

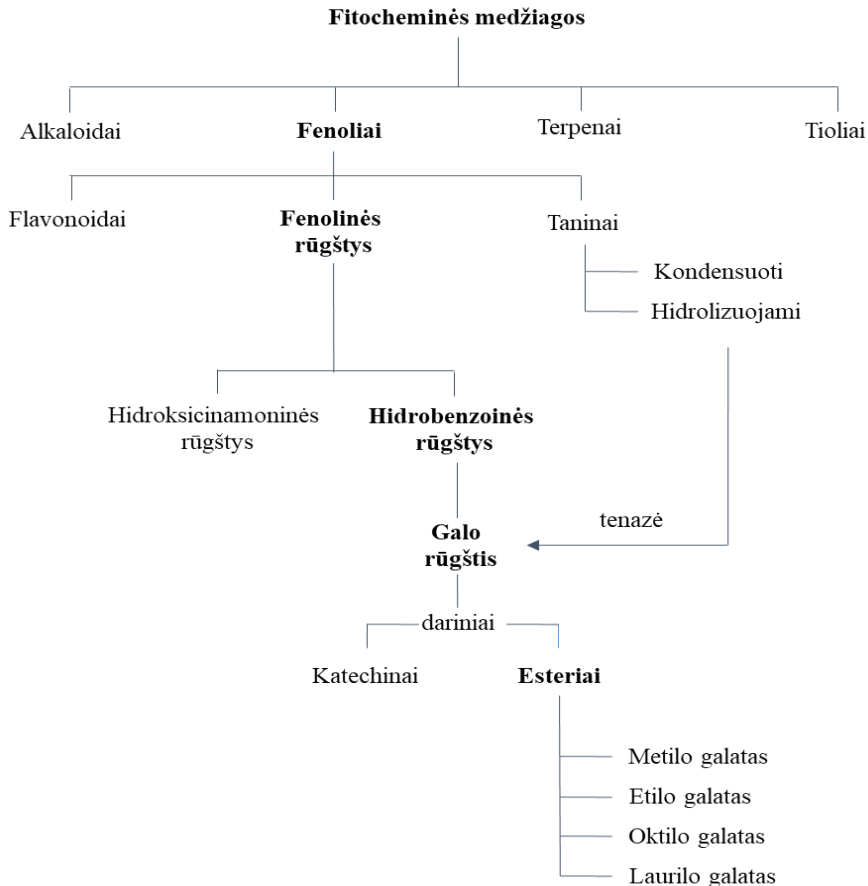
### 2.2.1. Galo rūgšties ir jos darinių vieta fitocheminių medžiagų klasifikacijoje

Fitocheminės medžiagos (gr. *phyto* – augalas) yra natūralūs ir biologiškai aktyvūs cheminiai junginiai, aptinkami augaluose. Šios medžiagos augalams suteikia ne tik spalvą, kvapą, skonį, bet ir apsaugą nuo žalingo aplinkos poveikio, pavyzdžiui, UV spinduliuotės, džiovavimo, taršos, kenkėjų, patogeninių mikroorganizmų (Saxena ir kt. 2013). Ypač daug fitocheminių medžiagų sukaupia augalai, kurie pasižymi gydomosiomis savybėmis ir nuo seno naudojami liaudies medicinoje (Nayeem ir kt. 2016). Žmogaus organizmui fitocheminės medžiagos nėra gyvybiškai būtinos, tačiau jos turi savybių, kurios naudingos tam tikrų ligų gydymui ir prevencijai (Saxena ir kt. 2013). Žinoma daugiau nei tūkstantis fitocheminių medžiagų, kurios naudojamos šiuolaikinėje medicinoje, dar daug yra nežinomų arba jų poveikis mažai ištirtas.

Augaluose aptinkama labai daug įvairių skirtingų fitocheminių medžiagų. Skiriamos keturios pagrindinės fitocheminių medžiagų klasės: alkaloidai, fenoliai, terpenai (terpenoidai, karotenoidai) ir organinės sieros junginiai, dar vadinami tioliais (Thomas ir kt. 2015) (**8 pav.**). Toliau šiame skyriuje plačiau bus apžvelgiamos fitocheminių medžiagų grupės, kurios tiesiogiai susijusios su tiriamuoju darbu.

Galo rūgštis (GR) ir jos dariniai yra priskiriami fenoliams – didžiausiai fitocheminių medžiagų klasei, apimančiai daugiau nei 2 000 junginių (sudaro 45 proc.), kurių molekulė sudaryta iš vieno arba kelių benzeno žiedų, prisijungusių mažiausiai vieną hidroksigrupę (–OH) (Thakur ir kt. 2018, Rais

ir kt. 2017, Valstybinė lietuvių enciklopedija). Struktūriniu požiūriu fenoliams priskiriami junginiai yra labai skirtingi: vieni jų yra paprastos molekulės, kiti – sudėtingos polimerinės medžiagos (Montvilaitė ir kt. 2019). Išskiriamos trys fenolių klasės: fenolinės rūgštys, flavonoidai ir taninai (raugai) (Yang ir kt. 2020).



**8 pav.** Galo rūgšties (GR) ir jos darinių vieta fitocheminių medžiagų klasifikacijoje (sudaryta remiantis Nayeem ir kt. 2016, Yang ir kt. 2020).

GR ir jos dariniai priklauso fenolinėms rūgštims, kurios savo struktūroje turi vieną karboksilo grupę ( $-\text{COOH}$ ) (Saxena ir kt. 2013), o atsižvelgiant į struktūros ypatumus skirstomos į du poklasius: hidroksicinamonines ir hidrobenzoines rūgštis (Martins ir kt. 2011, Thomas ir kt. 2015). Tyrimais įrodyta, kad fenolinės rūgštys slopina oksidacinius procesus žmogus organizme, gali būti naudojamos virškinamojo trakto, širdies ir kraujagyslių, neurologinių, vėžinių, infekcinių ligų gydymui, taip pat uždegiminiams procesams ir cholesterolio kiekiui kraujyje mažinti (Mandal ir kt. 2010).

Tiek hidroksicinamoninės, tiek hidrobenzoinės rūgštys bei jų dariniai – seniai žinomos ir plačiai pasaulyje įvairiose srityse naudojamos medžiagos. Literatūros duomenimis, susidomėjimas hidrobenzoinės rūgšties dariniais – GR ir GR esteriais ne mažėja, o tik didėja (Daglia ir kt. 2014, Yang ir kt. 2020). Šios medžiagos laikomos labai daug žadančiais junginiais kuriant naujas terapines priemones. Teigiama, kad GR ir jos dariniai yra gamtoje dažni ir natūraliai aptinkami, paprastos struktūros ir biologiškai aktyvūs junginiai, todėl būtina nuodugnai iširti jų panaudojimo galimybes (Badhani ir kt. 2015, Choubey ir kt. 2015, Nayeem ir kt. 2016).

### 2.2.2. Galo rūgštis ir jos darinių paplitimas gamtoje

Galo rūgštis (GR) ir jos dariniai yra augalų antriniai metabolitai, kurių yra gausu daugelyje vaisių, daržovių, taip pat arbatoje, kavoje, vyne bei vaistiniuose augaluose. Nustatyta, kad daug GR turi raudonos ir tamsiai mėlynos uogos (braškės, žemuogės, mėlynės, gervuogės, serbentai). Paskaičiuota, kad šviežiose *Vitis vinifera* ir *V. aestivalis* vynuogėse GR gali būti iki 4 g/kg, o raudono ar balto vyno taurėje – nuo kelių iki kelių dešimčių miligramų (Daglia ir kt. 2014). Įvairių tyrimų duomenimis, GR ir jos dariniai nustatyti įvairiuose augaluose – *Acacia nilotica*, *Allanblackia floribunda*, *Bridelia micrantha*, *Caesalpinia sappan*, *Dillenia indica*, *Diospyros cinnabarina*, *Garcinia densivenia*, *Hamamelis virginiana*, *Paratecoma peroba*, *Psidium guajava*, *Syzygium cordatum*, *Rhus typhina*, *R. coriaria*, *Rubus suavissimus*, *Tamarix nilotica*, *Toona sinensis*, *Terminalia bellirica*, *Vitis vinifera*, *Oenothera bienni* (Nayeem ir kt. 2016, Badhani ir kt. 2015, Abu-Reidah ir kt. 2015, Sales ir kt. 2018, Mohan ir kt. 2017). Tai tik nedidelė augalų sąrašo dalis. Tiesa, augalai nėra vienintelis GR ir jos darinių šaltinis, šių junginių randama ir grybuose (Badhani ir kt. 2015).

Augaluose GR aptinkama laisvų rūgščių, esterių, katechino darinių ir hidrolizuojamų taninų, dar vadinamų galotaniniais pavidalu, o pastarieji sudaryti iš esterifikuotos GR ir gliukozės molekulės. Hidrolizuojant galotaninus, pavyzdžiui, veikiant fermentu tanaze, atskeliama GR (**8 pav.**) (Pengelly 2004, Nayeem ir kt. 2016).

Pirmasis GR išskyrė 1786 m. švedų vaistininkas ir chemikas K. V. Šelė (*C. W. Scheele*) iš turkiško ąžuolo galų (Freudenberg 1929). Galo rūgštis pavadinimas kilo nuo galų. Galai (lot. *galla* – rašalinis riešutėlis) – tai patologinės, dažniausiai riešutėlio formos augalo organų (lapų, ūglių, vaisių) išaugos, kurias sukelia kai kurie vabzdžiai, nematodai, erkės, parazitiniai grybai, bakterijos, virusai. Nustatyta, kad galų audinio cheminė sudėtis

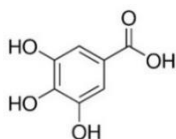
skiriasi nuo sveiko organo (Visuotinė lietuvių enciklopedija). Augalui ginantis nuo parazitų, pažeisto organo išaugose susikaupia didelis galotaninų kiekis.

Geležies sulfatu paveikti fermentuoti galotaninai turi tamsų atspalvį, tai žmonės pastebėjo senovėje ir galus naudojo rašalo gamybai, dažymui (Paaver ir kt. 2010). Dėl šios savybės GR ir šiandien naudojama farmacijoje, fotografijoje, chromatografijoje ir kitur. Be to, GR ir kai kurie jos esteriai, kaip propilo galatas (E 310), oktilo galatas (E 311) ir laurilo galatas (E 312), yra patvirtinti Europos Sąjungoje (ES) bei Jungtinėse Amerikos valstijose (JAV) ir yra plačiai naudojami kosmetikos bei maisto pramonėje siekiant pailginti produkto vartojimo trukmę. Šios medžiagos priskiriamos prie antioksidantų ir konservantų, nes atitinkamai lėtina gaminių oksidavimąsi ir saugo nuo žalingos mikroorganizmų veiklos (gedimo) (Hurtado ir kt. 2008, Valle ir kt. 2018, 2008 m. gruodžio 16 d. ES parlamento ir tarybos reglamentas (EB) Nr. 1333/2008 dėl maisto priedų).

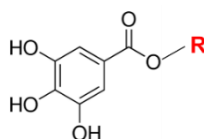
Kadangi GR ir jos darinių poreikis yra didelis, šios medžiagos yra sintetamos cheminiu būdu (Yang ir kt. 2020).

### 2.2.3. Galo rūgšties ir jos esterių struktūra, fizinės ir cheminės savybės

Galo rūgšties (GR) molekulė yra sudaryta iš aromatinio žiedo, prie kurio prijungta viena karboksilo (–COOH) ir trys hidroksilo grupės, išsidėsčiusios 3, 4 ir 5 pozicijose (**9 pav.**).



Galo rūgštis



Galatai

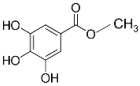
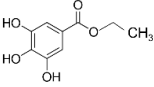
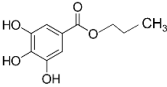
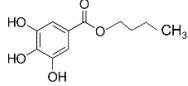
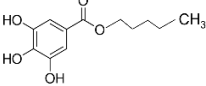
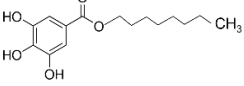
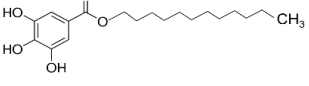
**9 pav.** Galo rūgšties (GR) ir GR *n*-alkilo esterių (galatų) cheminė struktūra. R – radikalas (Gutierrez ir kt. 2020).

GR chemiškai apibūrinama kaip 3,4,5-trihidroksibenzoinė rūgštis, kurios molekulinė formulė yra  $C_7H_6O_5$  (Daukšas ir kt. 2003). Išgryninta GR yra gelsvai baltos spalvos kristalų pavidalo, jos molekulinė masė yra 170,12 g/mol, lydymosi temperatūra – 250 °C, tirpumas vandenyje siekia 1,1 proc. esant 20 °C temperatūrai (Choubey ir kt. 2015, Yang ir kt. 2020, Nayeem ir kt. 2016). GR rūgštis dažnai jungiasi į dimerus, susidaro galotanas – elago rūgštis (Badhani ir kt. 2015, Nayeem ir kt. 2016). Iš alkilo galatų didžiausiu hidrofobiškumu pasižymi oktilo galatas (C8-OG) ir laurilo arba dodecilo galatas (C12-LG) (Ortega ir kt. 2003).

GR dariniai būna dviejų formų – esterio arba katechino. Esteriai yra tokie cheminiai junginiai, kuriuose rūgščių bent viena hidroksilo grupė pakeista alkilo grupe (–O–) (Visuotinė lietuvių enciklopedija). Iš GR esterių dažniausiai pasitaikantys alkilo esteriai yra metilo (C1-MG), etilo (C2-EG), propilo (C3-PG), butilo (C4-BG), pentilo (C5-PG), C8-OG ir C12-LG galatai (Badhani ir kt. 2015, Yang ir kt. 2020). Šių GR esterių struktūrinės ir cheminės formulės pateikiamos **3 lentelėje**.

Alkilo galatai yra jau daugiau nei pusė amžiaus plačiai naudojami maistiniai priedai, todėl nenuostabu, kad siekiant įvertinti šių medžiagų poveikį žmogaus organizmui buvo atlikti išsamūs farmakologiniai ir toksikologiniai tyrimai. Dar 1976 metais Jungtinis FAO/PSO maisto priedų ekspertų komitetas (angl. *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, JECFA) nustatė, kad saugi bendro suvartojamo C3-PG, C8-OG ir C12-LG paros norma žmogui yra 0,2 mg kg<sup>-1</sup> kūno vienetui (Ortega ir kt. 2003).

**3 lentelė.** Kai kurie galo rūgšties (GR) *n*-alkilo esteriai, jų cheminės ir struktūrinės formulės (Gutierrez ir kt. 2020)

<b>Esterio pavadinimas</b>	<b>Molekulinė formulė</b>	<b>Radikalas (R)</b>	<b>Struktūrinė formulė</b>
Metilo galatas (C1-MG)	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	–CH <sub>3</sub>	
Etilo galatas (C2-EG)	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	–CH <sub>2</sub> –CH <sub>3</sub>	
Propilo galatas (C3-PG)	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	–(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> –CH <sub>3</sub>	
Butilo galatas (C4-BG)	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	–(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> –CH <sub>3</sub>	
Pentilo galatas (C5-PG)	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	–(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> –CH <sub>3</sub>	
Oktilo galatas (OG, C8-OG)	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	–(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> –CH <sub>3</sub>	
Laurilo galatas (LG, C12-LG)	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	–(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> –CH <sub>3</sub>	



#### 2.2.4. Galo rūgštis ir jos esterų gydomosios savybės

Nėra abejonių, kad galo rūgštis (GR) ir jos dariniai yra biologiškai aktyvios medžiagos, kurios pasižymi gydomosiomis savybėmis. Daugiausiai literatūroje duomenų yra apie GR antioksidacines savybes, t. y. gebėjimą efektyviai neutralizuoti laisvuosius radikalus (Hubková ir kt. 2014). Pažymima, kad iš visų fenolių būtent GR pasižymi stipriausiomis antioksidacinėmis savybėmis (Badhani ir kt. 2015).

Yra duomenų, kad GR ir jos dariniai gali būti naudojami įvairių ligų gydymui – arterosklerozės, hiperlipidemijos, krūtinės anginos, makšties infekcijos, insulto ir kepenų ligų. GR dariniai gali būti naudojami nutukimui gydyti (kaip fruktozės inhibitoriai), burnos priežiūrai, siekiant skatinti seilių tekėjimą ir išvengti kserostomijos. Taip pat teigiama, kad GR pagreitina burnos opų gijimą ir gali veiksmingai apsaugoti nuo patogenų, sukeliančių ne tik opas, bet ir dantenų uždegimą bei kitas burnos ligas (Choubey ir kt. 2015).

Žinoma, kad GR alkilo esteriai pasižymi priešvėžinėmis (Dai ir kt. 2010, Badhani ir kt. 2015) ir neuroprotektinėmis savybėmis, sukelia vėžinių ląstelių apoptozę, slopina skvaleno epoksidazę (Nayeem ir kt. 2016). C1-MG turi priešvėžinių ir antimikrobinių savybių (Badhani ir kt. 2015). *In vitro* tyrimais su pelėmis buvo nustatyta, kad laurilo galatas (C12-LG) gali apsaugoti nuo odos navikų susidarymo ir net sukelti jau susidariusių navikų regresiją (Ortega ir kt. 2003). Studija su *Acacia nilotica* lapų ekstraktu (Mohan ir kt. 2017) atskleidė, kad vyraujantis junginys lapuose buvo etilo galatas (C2-EG). Šios studijos autoriai teigia, kad C2-EG yra daug žadantis fenolio junginys, nes nėra toksiškas ir nesukelia šalutinio poveikio, todėl galėtų būti naudojamas burnos karcinomai gydyti. Kita mokslininkų komanda (Sales ir kt. 2018) išsiaiškino, kad *Terminalia bellirica* medžio vaisiuose aptinkami GR ir oktilo galatas (C8-OG) galėtų būti naudojami krūties vėžiui gydyti. Jie nustatė, kad mažesnės C8-OG koncentracijos veikė efektyviau nei tos pačios GR koncentracijos.

Literatūroje gausu duomenų apie GR antibakterines savybes. GR baktericidiškai veikia platų spektrą patogenų, įskaitant *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* (Choubey ir kt. 2015), *Helicobacter pylori* (Nayeem ir kt. 2016), *Acinetobacter* spp. (Dharmaratne ir kt. 2018). Dauguma rezultatų gauta atliekant tyrimą skystos terpės skiedimo metodu. K. Rendeková su kolegomis (2016) atlikto tyrimą su europinio pūkenio (*Cotinus coggygia*) lapų ekstraktu ir nustatė, kad ekstrakte vyrauja galotaninai, GR ir metilo galatas (C1-MG).

Gauti ekstraktai baktericidiškai veikė tiek *S. aureus* planktonines, tiek ir biologinėje plėvelėje esančias ląsteles.

Fenolių antibakterinis poveikis gali būti keleriopas: šios biologiškai aktyvios medžiagos sąveikauja su bakterijų baltymais ir ląstelės struktūromis, gali pažeisti citoplazminę membraną, sumažinti jos pralaidumą, slopinti sienelės ir nukleorūgščių sintezę. Be to, teigiama, kad veikia ne tik bakterijų planktonines ląsteles, bet ir esančias biologinėje plėvelėje. Fenoliai veikia bakterijų biologinės plėvelės valdymo mechanizmus (kaip kvorumo jautimas) bei kitus valdymo mechanizmus, kurie nesusiję su bakterijų augimu (Slobonikova ir kt. 2016). Kiti autoriai mano, kad GR ir jos esterių antimikrobinis poveikis susijęs su šių medžiagų poveikiu bakterijų citoplazminės membranos lipofilinėms savybėms. Veikimo mechanizmai, kurie galėtų paaiškinti GR ir jos darinių antimikrobinį poveikį, yra tai, kad šios medžiagos slopina bakterijų egzofermentus, kurie reikalingi jų dauginimuisi, arba tiesiogiai veikia bakterijų metabolizmą, slopindami oksidacinį fosforilinimą (Kang ir kt. 2008).

Tiriant GR ir jos esterių poveikį krakmolo skaidymui (Gutierrez su ir kt. 2020) nustatyta, kad trumpesnės grandinės alkilo esteriai efektyviau slopina krakmolo skaidymą ir kad jie galėtų būti naudojami reaktyviosios hiperglikemijos prevencijai.

Labai įdomius rezultatus gavo P. de Valle su kolegomis (2018) tirdami GR, propilo galato (C3-PG) ir C8-OG poveikį pieno rūgšties bakterijoms (*Carnobacterium divergens*, *Leuconostoc carnosum*), kurios aptinkamos sugedusiuose mėsos gaminiuose. Tyrėjai nustatė, kad efektyviausiai bakterijų augimą slopino C8-OG, po to ėjo C3-PG ir GR. Be to, paaiškėjo, kad GR ir jos darinių antimikrobiniam poveikiui daro įtaką terpės rūgštingumas (pH). Tiriamieji fenoliniai junginiai efektyviau veikė esant pH 5,0 ir tik C8-OG pasižymėjo baktericidiniu poveikiu esant ir mažesniai rūgštingumui (pH 6,0).

Kalbant apie burnos ligų gydymą, vienas tyrimas parodė, kad daug fenolinių junginių turinčių augalinių produktų – juodosios ir žaliosios arbatos, vynuogių sėklų, gervuogių, granatų žievės, juodųjų serbentų, dygiosios slyvos uogų ir gudobelės uogų odelės ekstraktai yra veiksmingi prieš burnos streptokokus – būtent prieš įvairias *S. mutans* padermes. Šio tyrimo duomenimis, raudonųjų vynuogių sėklų ekstraktas pasižymėjo stipriausiu poveikiu prieš *S. mutans* (Smullen ir kt. 2007).

Tyrėjų grupė (Kang ir kt. 2008) teigia, kad GR ir C1-MG yra antimikrobinės medžiagos, veikiančios prieš burnos ligas sukeliančius patogenus. Ši tyrėjų grupė atliko tyrimą su GR ir C1-MG ir nustatė, kad kai

kurios *Lactobacillus* spp. buvo mažiau jautrios jų poveikiui, o jautriausia šioms medžiagoms buvo *A. viscosus*. Taip pat nustatė, kad *S. mutans* biologines plėveles efektyviau slopino C1-MG nei GR.

Laukinis augalas sicilinis žagrenis (*Rhus coriaria*), kuris paplitęs Viduržemio jūros regione (Davis 1972), nuo senų laikų yra naudojamas ne tik kaip prieskonis maistui ir gėrimams pagardinti (dėl rūgštaus skonio), bet ir liaudies medicinoje įvairioms ligoms gydyti, kartu dantų ir dantenų negalavimams mažinti (Abu-Reidah ir kt. 2015). Vieno tyrimo duomenimis, kad *R. coriaria* vaisių ekstraktas bakteriostatiškai ir baktericidiškai veikė *Probionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* bei *Pseudomonas aeruginosa* bakterijų padermes (Ali-Shtayeh 2013). Kaip teigia šio tyrimo autoriai, toks efektyvus slopinamas poveikis galėjo pasireikšti dėl *R. coriaria* vaisiuose gausiai aptinkamų polifenolinių junginių.

Taip pat literatūroje yra duomenų, kad GR esteriai gali būti naudojami virusinėms ligoms gydyti. Nustatyta, kad C1-MG slopina *Herpes simplex* viruso, pentilo galatas (C5-PG) – žmogaus imunodeficito viruso (ŽIV) (Kratz ir kt. 2008), o C8-OG – gripo ir poliomieliito virusų (Hurtado ir kt. 2008) dauginimąsi.

Be to, teigiama (Luo 2022), kad GR ir jos esteriai dėl mažo citotoksiškumo, antioksidacinių ir uždegimą mažinančių savybių galėtų būti naudojami kaip dangos komponentas gaminant įvairias medicinos priemones. Tyrimais įrodyta, kad GR ir jos esteriai afiniškai sąveikauja su metalo jonais ir gali būti naudojami įvairių medžiagų, iš jų stiklo, metalo bei sintetinių polimerų dengimui. Nustatyta, kad GR esteriai slopina kraujagyslių aterosklerozę (Wang ir kt. 2015) ir kaulo rezorbciją (Shavandi ir kt. 2018), todėl šie junginiai nagrinėjami kaip daug žadanti medžiaga kuriant medicinoje naudojamąs priemones (implantus, kateterius).

### 3. MEDŽIAGOS IR METODAI

#### 3.1. Tyrimo eiga ir vykdymo etapai

Tyrimas atliktas 2015–2017 metais Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto (VU MF) Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos (FBMLM) katedros laboratorijoje bendradarbiaujant su Al-Qasemi akademijos Mokslinių tyrimų centro (MTC, Izraelis) mokslininkais.

Al-Qasemi akademijos MTC mokslininkai naudodami skirtingo poliškumo tirpiklius iš sicilinio žagrenio (*Rhus coriaria*), karpotojo viršūklio (*Terminalia bellirica*) vaisių bei tikrojo vynmedžio (*Vitis vinifera*) sėklų paruošė ekstraktus ir chromatografijos metodu išgavo atskiras frakcijas, kuriose nustatė atitinkamai didelį metilo galato (C1-MG), etilo (C2-EG) ir oktilo (C8-OG) galatų kiekį (Kacergius ir kt. 2017, Gabe ir kt. 2019, 2020).

Žinoma, kad augaluose aptinkami polifenoliai pasižymi antimikrobinu poveikiu prieš *Streptococcus* genties bakterijas (Abachi ir kt. 2016), todėl remiantis šiais literatūros duomenimis buvo nuspręsta ištirti alkilo galatų poveikį *S. mutans* biologinių plėvelių susidarymui ant standžių paviršių (polistireno, stiklo) *in vitro* sąlygomis.

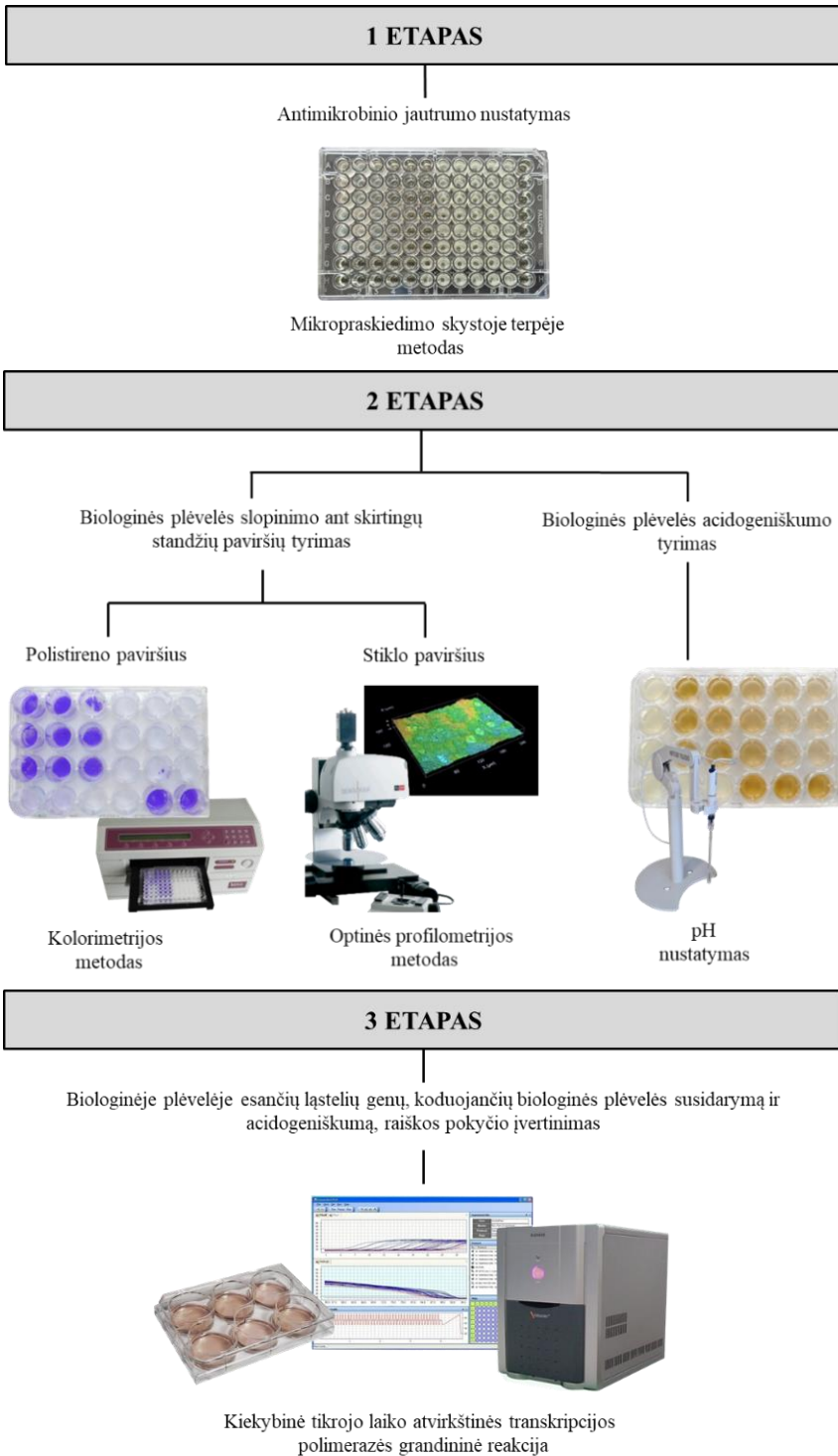
Tyrimas buvo vykdytas trimis etapais (**10 pav.**). Pirmojo ir antrojo etapo tyrimai atlikti VU MF FBMLM katedroje, o trečiojo – Al-Qasemi akademijos MTC.

Pirmajame etape mikroskiedimo skystoje terpėje metodu buvo ištirtas C1-MG, išskirtas iš *R. coriaria* vaisių, bei sintetinių C2-EG, C8-OG ir C12-LG galatų poveikis *S. mutans* gyvybingumui. Įvertinus galatų antimikrobinį poveikį *S. mutans* gyvybingumui, buvo planuojami tolesni eksperimentai.

Antrajame etape buvo tiriamas C1-MG, išskirtas iš *R. coriaria* vaisių, bei sintetinių C2-EG, C8-OG ir C12-LG galatų poveikis *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymui ant standaus paviršiaus. Alkilo galatų poveikis *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymui buvo tirtas kolorimetrijos metodu nustatant susidariusios biologinės plėvelės biomasės tankį ir optinės profilometrijos metodu – susidariusios biologinės plėvelės storį ir paviršiaus šiurkštumą. Šiame etape taip pat buvo įvertintas GR esterių poveikis *S. mutans* biologinės plėvelės acidogeniškumui. Iš viso buvo atliktas 41 eksperimentas.

Trečiajame etape atlikti genų, kurie atsakingi už biologinės plėvelės susidarymą ir jos polimerinės matricos sintezę, kiekybinės raiškos tyrimai.

Disertantė savarankiškai atliko pirmojo ir antrojo etapo tyrimus bei gautų duomenų statistinę analizę.



**10 pav.** Bendra tyrimų schema.

### 3.2. Tiriamoji medžiaga ir jos paruošimas

Tyrime naudoti keturi skirtingi GR esteriai – metilo galatas (C1-MG), etilo galatas (C2-EG), oktilo galatas (C8-OG) ir laurilo galatas (C12-LG) (**11 pav.**).



**11 pav.** Galo rūgšties (GR) esteriai: **1** – metilo (C1-MG), **2** – etilo (C2-EG), **3** – oktilo (C8-OG) ir **4** – laurilo (C12-LG) galatas.

C1-MG buvo išgautas iš sicilinio žagrenio (*Rhus coriaria*) augalinės žaliavos, kuri buvo įsigyta iš Al Alim Ltd. (Medicinal Herb Center, Zippori, Izraelis). Sicilinio žagrenio augalinio ekstrakto paruošimo ir C1-MG išskyrimo metodika yra aprašyta 2017 metų straipsnyje (Kacergius ir kt. 2017). Sicilinio žagrenio ekstraktų veikliųjų junginių kokybinė ir kiekybinė analizė buvo atlikta Izraelyje pasitelkus efektyviosios didelio slėgio skysčių chromatografijos (angl. *High-performance liquid chromatography*, HPLC) ir ultraefektyviosios didelio slėgio skysčių chromatografijos (angl. *Ultra high-performance liquid chromatography*, UHPLC) metodus. Kiti eksperimentams naudoti GR esteriai buvo sintetiniai – C2-EG (grynumas  $\geq 96$  proc.), C8-OG (grynumas  $\geq 99$  proc.) ir C12-LG (grynumas  $\geq 99$  proc.), įsigyti iš gamintojo „Sigma“ (Rehovot, Izraelis).

Tiriamosios medžiagos svėrimui naudotos precizinės svarstyklės „Kern EG 420-3NM“ (KERN & Sohn GmbH, Vokietija) (0,02–420 g). Kadangi C8-OG ir C12-LG iš alkilo galatų pasižymi didžiausiu hidrofobiškumu (Ortega 2003), todėl jiems tirpinti naudotas dimetilo sulfoksidas (DMSO, Sigma-Aldrich chemie GmbH, Prancūzija). Tiriamieji GR esteriai buvo ištirpinti ir gauta pradinė 100 mg/ml koncentracija, iš jos – galutinės tiriamųjų medžiagų koncentracijos. Galutinės koncentracijos darbiniai tirpalai buvo paruošti naudojant dejonizuotą vandenį (ddH<sub>2</sub>O), kuris paruoštas naudojant ultrašvaraus vandens aparatą EMD Millipore Synergy (Merck, JAV).

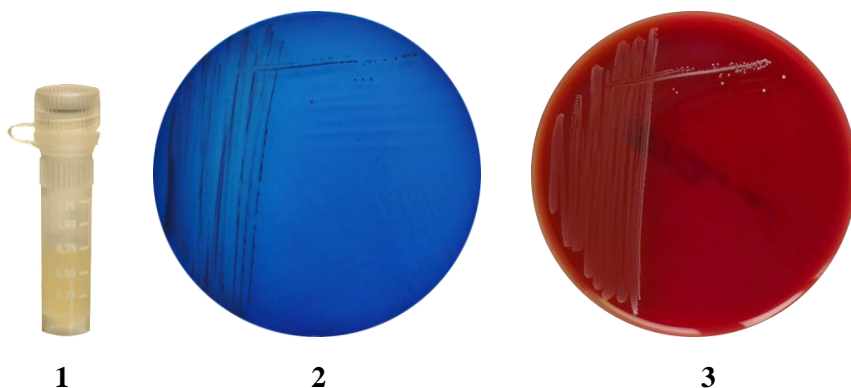
Galutinės GR esterų koncentracijos, kurios buvo naudotos eksperimentams, pateikiamos **4 lentelėje**.

**4 lentelė.** Tyrime naudotų galo rūgšties (GR) esterų galutinės koncentracijos

Medžiagos pavadinimas	Koncentracija, µg/ml					
Metilo galatas (C1-MG)	550	700	850	1000		
Etilo galatas (C2-EG)	550	580	610	640	670	700
Oktilo galatas (C8-OG)	27,5	27,7	27,9	28,1	28,3	
Laurilo galatas (C12-LG)	29,5	30,5	31,5	32,5	33,5	

### 3.3. Bakterijų kultūra ir kultivavimo sąlygos

Tyrimams naudota *Streptococcus mutans* padermė UA159 (ATCC 700610, JAV), kuri 1982 metais buvo išskirta iš vaiko, sergančio dantų ėduonimi. Paruošti bakterijų kultūros koncentratai buvo saugomi liesame 10 proc. piene (Difco, BD BioSciences, JAV) –70 °C temperatūroje. Prieš kiekvieną eksperimentą bakterijos kultivuotos skystoje Bacto™ *Todd Hewitt Broth* terpėje (THB, BD BioSciences, JAV) (**12.1 pav.**) 18 val. 37 °C temperatūroje anaerobinėmis sąlygomis (95 proc. N<sub>2</sub>, 5 proc. CO<sub>2</sub>). Kultūros grynumas tikrintas atliekant pasėlius į standžias terpes – *Mitis Salivarius* agarą (MSA, Difco, BD BioSciences, JAV) (**12.2 pav.**) bei Kolumbijos agarą su 7 proc. avių kraujo priedu (E&O Laboratories, Jungtinė Karalystė) (**12.3 pav.**).



**12 pav.** *S. mutans* UA159 grynoji kultūra: **1** – *Todd Hewitt Broth* (THB) terpėje, **2** – *Mitis salivarius* agare ir **3** – Kolumbijos agare su 7 proc. avių kraujo priedu.

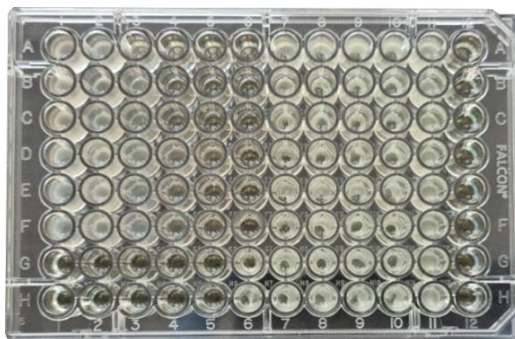
### 3.4. Mikroskiedimo skystoje terpėje metodas

Tirtų GR esterių, eritromicino (ERY), chlorheksidino (CHX) ir dimetilo sulfoksido (DMSO) minimali slopinamoji koncentracija (MSK) nustatyta taikant dvigubo serijinio mikroskiedimo skystoje terpėje metodą (Wiegand ir kt. 2008). Tyrimui buvo naudota plokščiadugnė 96 šulinėlių plokštelė (Falcon, Corning Incorporated, JAV). *S. mutans* bakterijų kultūros suspensija, kurios optinis tankis atitiko 0,5 McFarland standartą (Liofilchem, Italija), buvo paruošta skystoje Bacto™ *Todd Hewitt Broth* terpėje (THB, BD BioSciences, JAV).

Iš pradžių plokštelės šulinėliai buvo pripildyti mitybinės terpės. Toliau šulinėliuose buvo atliekamas tiriamųjų medžiagų dvigubas skiedimas. Tiriamosios medžiagos 100 µl buvo perkelta į pirmąjį plokštelės šulinėlį ir sumaišyta su mitybine terpe. Veiksmai kartoti perkeliant 100 µl iš buvusio šulinėlio į kitą, kol šulinėlių eilutėje buvo gautas tiriamosios medžiagos dvigubas serijinis skiedimas. Kiekvienos tiriamosios medžiagos dvigubas serijinis skiedimas pakartotas tris kartus. Galiausiai šulinėliai buvo užsėti *S. mutans* bakterijų kultūra (100 µl) pasiekiant juose  $10^6$  KSV/ml koncentraciją. Užpildytos plokštelės buvo inkubuotos 18 val. 37 °C temperatūroje anaerobinėmis sąlygomis (95 proc. N<sub>2</sub>, 5 proc. CO<sub>2</sub>).

Tyrimo metu buvo naudota neigiama (THB) ir teigiama (THB užsėta *S. mutans* kultūra) kontrolė. Papildomai kaip teigiama kontrolė buvo naudotas serijinis dvigubas eritromicino (ERY, Sigma-Aldrich, Vokietija) ir 0,12 proc. chlorheksidino tirpalo (CHX) (BENU vaistinė, Lietuva) skiedimas. ERY buvo ištirpintas DMSO gaunant pradinę tiriamojo tirpalo koncentraciją 10 mg/ml.

MSK apibrėžta kaip mažiausia tiriamosios medžiagos koncentracija, kuriai esant plika akimi matomas bakterijų augimo slopinimas (**13 pav.**).



**13 pav.** Plokštelėse vaizdas, iliustruojantis galo rūgšties (GR) esterio minimalios slopinamosios koncentracijos (MSK) nustatymą.



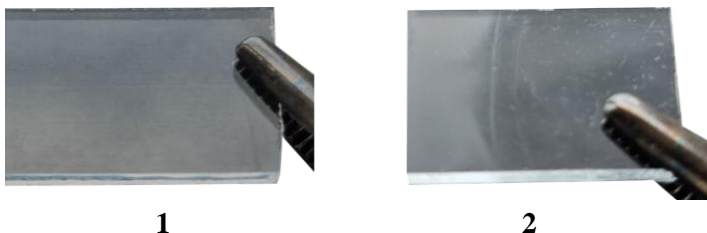
### 3.5. Eksperimentinės plokštelės, skirtos biologinės plėvelės slopinimo tyrimui ant skirtingų standžių paviršių, paruošimo eiga

Norint įvertinti GR esterių poveikį *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymui ant standžių paviršių, eksperimentiškai buvo tirtas biologinės plėvelės susidarymas ant polistireno ir stiklo. Prieš kiekvieną eksperimentą, naudojant mikroplokštelių skaitytuvą (Dynex MRX Microplate Reader, JAV), parinkus 630 nm bangos ilgį, bakterijų kultūros optinis tankis (OT) buvo koreguotas iki 0,2 reikšmės, siekiant gauti bakterijų kultūros koncentraciją –  $1,6 \times 10^8$  KSV/ml.

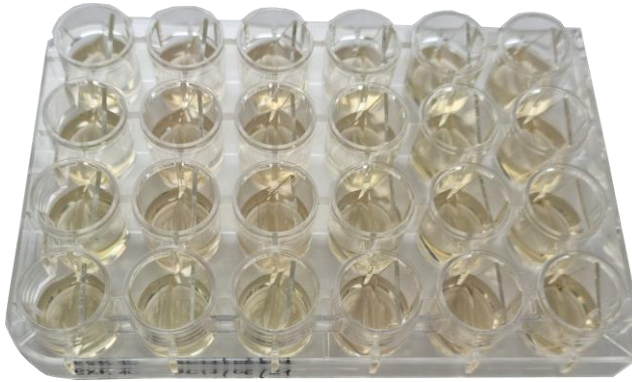
Siekiant įvertinti GR esterių poveikį biologinės plėvelės susidarymui ant polistireno paviršiaus, buvo naudojamos ląstelių kultūroms kultivuoti skirtos polistireno 24 šulinėlių plokštelės (Sarstedt, Vokietija), kurios iš pradžių buvo pripildytos THB terpe su 1 proc. sacharozės (Sigma-Aldrich, JAV), o po to – skirtingos koncentracijos C1-MG, C2-EG, C8-OG ir C12-LG tirpalais (**4 lentelė**). Kiekvieno ekperimento metu buvo naudota neigiama (THB) ir teigiama (THB užsėta *S. mutans* kultūra) kontrolė.

Toliau kiekvienas šulinėlis buvo užsėtas *S. mutans* bakterijų kultūra santykiu 1 : 100. Paruoštos plokštelės kultivuotos 24 val. 37 °C, anaerobinėmis sąlygomis (95 proc. N<sub>2</sub>, 5 proc. CO<sub>2</sub>). Po inkubacijos ant polistireno paviršiaus susidariusios biologinės plėvelės biomasės tankis buvo įvertintas kolorimetrijos metodu.

Tie patys eksperimento etapai buvo atlikti siekiant įvertinti GR esterių poveikį biologinės plėvelės susidarymui ant stiklo. Šiuose eksperimentuose naudotos 1,2 × 26 mm dydžio stiklo plokštelės, kurios buvo išpjautos iš standartinių mikroskopijai naudojamų 1 mm storio objektinių stiklelių (76 × 26 mm; Thermo Fisher Scientific, JAV) (**14.1 pav.**). Galiausiai, pripildžius plokštelės šulinėlius tiriamąja medžiaga ir bakterijų kultūra, į jų vidų buvo įstatytos sterilios stiklo plokštelės (vertikaliajoje pozicijoje) (**15 pav.**). Ant stiklo plokštelės paviršiaus susidariusios biologinės plėvelės (**14.2 pav.**) kiekis buvo įvertintas optinės profilometrijos metodu.



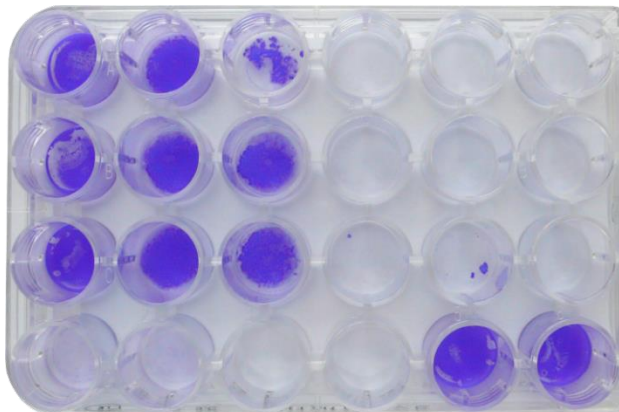
**14 pav.** Stiklo plokštelės vaizdas: **1** – prieš įstatant į šulinėlį (sterili), **2** – po ekspozicijos.



**15 pav.** Paruoštos plokštelės, skirtos susidariusios biologinės plėvelės kiekiui įvertinti optinės profilometrijos metodu, vaizdas prieš kultivavimą.

### 3.6. Kolorimetrijos metodas

Iš pradžių, praėjus 24 val. inkubacijos laikotarpiui, iš plokštelės buvo pašalinta THB terpė. Po to šulinėliai buvo praplauti distiliuotu vandeniu, siekiant pašalinti su biologine plėvele silpnai susijungusias bakterines ląsteles. Likusios šulinėlio dugne prisitvirtinusios bakterijos buvo fiksuotos 95 proc. etanoliumi (Honeywell, Vokietija). Toliau šulinėlio dugne užfiksuota ir kambario temperatūroje išdžiovinta *S. mutans* biologinė plėvelė buvo dažyta 0,01 proc. kristalvioleto tirpalu (Merck KGaA, Vokietija) 15 min., paskui iš šulinėlių pašalinti dažai ir plokštelė išdžiovinta kambario temperatūroje (**16 pav.**).



**16 pav.** Eksperimentinės plokštelės vaizdas po *S. mutans* biologinės plėvelės kultivavimo 24 val. *Todd Hewitt* buljono (THB) terpėje esant skirtingoms galo rūgšties (GR) esterių koncentracijoms ir dažymo 0,01 proc. kristalvioleto tirpalu.

Toliau dažai ekstrahuoti 33 proc. acto rūgšties tirpalu (Merck KGaA, Vokietija) į kiekvieną šulinėlį įpilant po 1 ml ir palaikant 30 min. kambario temperatūroje. Tuomet ekstrahuotas dažų tirpalas (200 µl) iš kiekvieno šulinėlio buvo perkeltas atitinkamai į 96 plokščiadugnių šulinėlių plokštelę (Falcon, Corning Incorporated, JAV). Galiausiai buvo išmatuotas mėginių OT naudojant mikroplokštelių skaitytuvą, parinkus 595 nm bangos ilgį. Siekiant atmesti šulinėlių sienelių dažymąsi, mėginių OT reikšmės buvo koreguotos atimant iš jų neigiamos kontrolės OT reikšmę.

### 3.7. Optinės profilometrijos metodas

Praėjus 24 val. inkubacijos laikotarpiui, stiklo plokštelės buvo ištrauktos iš šulinėlių ir išdžiovinotos kambario temperatūroje. Stiklo plokštelių paviršiuje (**14.2 pav.**) susiformavusios biologinės plėvelės šiurkštumas ir storis buvo išmatuotas naudojant optinį profilometrą *Plu 2300* (Sensofar, Terrassa, Ispanija) su įmontuotu konfokaliniu objektyvu (50× didinimas), kurio regos laukas apima 253 × 190 µm plotą.

Iš pradžių, siekiant išmatuoti susidariusios biologinės plėvelės šiurkštumą, kiekvienos stiklo plokštelės paviršius buvo skenuotas nuo apačios iki viršaus. Norint išmatuoti biologinės plėvelės storį, kiekvienos stiklo plokštelės viduryje skalpeliu buvo padarytas vertikalus įbrėžimas ir vėliau skenuotos penkios stiklo sritys nuo apačios iki viršaus. Visi vaizdai buvo fiksuoti vertikalaus skenavimo režimu, o iš vaizdų surinkti duomenys toliau buvo analizuoti naudojant *Gwyddion 2.40* ir *Gwyddion 2.50* programinę įrangą (<http://gwyddion.net>), kad būtų galima apskaičiuoti paviršiaus šiurkštumo ir biologinės plėvelės storio parametrus. Siekiant pašalinti formos ir banguotumo klaidas, buvo pasirinktas vidutinis filtras (10 pikselių arba 3 µm).

Siekiant kiekybiškai įvertinti biologinės plėvelės paviršiaus šiurkštumą, buvo nustatytas vienas iš svarbiausių paviršiaus parametrų –  $Rq$  (šiurkštumo vidutinė kvadratinė paklaida), apibrėžiantis išmatuotų aukščio nuokrypių vidurkį.  $Rq$  apskaičiuotas remiantis ISO 4287/1-1997 standartu pagal šią formulę:

$$Rq = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{j=1}^N r^2_j},$$

kur  $N$  yra taškų skaičius atrankos ilgyje, o  $r_j$  – aukščio reikšmė taške  $j$ . Siekiant išmatuoti biologinės plėvelės storį, nurodantį biologinės plėvelės išsivystymo laipsnį, naudojamas dirbtinai pagaminto vertikalaus įbrėžimo aukštis ant kiekvieno stiklelio su prisitvirtinusiomis bakterijomis. Biologinės plėvelės

storis apskaičiuojamas sukuriant aukščio pasiskirstymo kreivę, pagrįstą visu nuskaitytos sritys, kurioje yra įbrėžimas, plotu, o po to pritaikoma Gauso funkcija, kuri apibrėžta:

$$f(x) = y_0 + a \exp[-(x - x_0)^2/b^2],$$

kur  $y_0$  yra smailės aukštis,  $a$  – amplitudės (aukščio) pasiskirstymas,  $x_0$  – smailės padėtis ir  $b$  – standartinis nuokrypis. Paviršiaus šiurkštumo ir biologinės plėvelės storio parametrų fonas koreguojamas atėmus neigiamos kontrolės (THB) stiklo plokštelės  $Rq$  ir storio reikšmes.

Atliekant eksperimentines procedūras, šulinėliai be *S. mutans* bakterijų buvo naudoti kaip tuščioji kontrolė, o nepaveiktos *S. mutans* bakterijos – kaip eksperimentinės kontrolės. Procentinis GR esterių slopinamasis poveikis *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymui buvo apskaičiuotas naudojant OT, paviršiaus šiurkštumo ( $Rq$ ) ir biologinės plėvelės storio parametrus pagal lygtį:

$$\text{GR esterio slopinimasis poveikis (\%)} = \left( \frac{\text{Parametras}_{\text{kontrolė}} - \text{Parametras}_{\text{paveiktos}}}{\text{Parametras}_{\text{kontrolė}}} \right) \times 100 \text{ \%}.$$

### 3.8. Biologinės plėvelės acidogeniškumo nustatymas

Siekiant įvertinti GR esterių poveikį *S. mutans* biologinės plėvelės acidogeniškumui buvo išmatuotos mitybinės terpės, kurioje 24 val. buvo kultivuota bakterijų kultūra, pH (vandenilio jonų koncentracijos rodiklis). Tuo tikslu eksperimentai buvo vykdyti laikantis metodikos, kuri detaliam aprašyta 3.5 skyriuje. Kiekvieno eksperimento metu, po 24 val. kultivavimo iš šulinėlių pipete buvo išsiurbta THB terpė nepažeidžiant susiformavusios biologinės plėvelės ir perkelta į 1,5 ml tūrio mėgintuvėlius. Mitybinės terpės pH išmatuotas naudojant mikroelektrodą *InLab® Micro Pro ISM®*, kuris buvo prijungtas prie stacionaraus pH matuoklio *SevenCompact™ S210-Bio* (Mettler-Toledo GmbH, Šveicarija) arba *Knick 766 Calimatic* (Elektronische Meßgeräte GmbH & Co., Vokietija). Prieš atliekant matavimą mikroelektrodas buvo kalibruojamas naudojant standartinius pH buferinius tirpalus (pH 4,01 ir 7,00).

### 3.9. Biologinėje plėvelėje esančių ląstelių paruošimas genų raiškos tyrimui

*S. mutans* kultūra buvo kultivuota skystoje Luria–Bertani (LB) terpėje. Po kultivavimo bakterijų kultūra praskiesta šviežia LB terpe su 1 proc. sacharozės siekiant gauti galutinę koncentraciją –  $0,5 \times 10^5$  KSV/ml, ir tolygiai paskirstyta į 50 ml talpos mėgintuvėlius (po 30 ml/mėgintuvėlis). Į kiekvieną mėgintuvėlį įpiltas tam tikros koncentracijos GR esteris. Toliau bakterijos buvo kultivuotos šešių šulinėlių plokštelėse – viename šulinėlyje 5 ml, atlikti trys pakartojimai (iš viso 15 ml). *S. mutans* bakterijų kultūra THB terpėje naudota kaip teigiama kontrolė. Plokštelės su pripildytais šulinėliais buvo kultivuotos 24 val. 37 °C, anaerobinėmis sąlygomis (95 proc. N<sub>2</sub>, 5 proc. CO<sub>2</sub>). Po kultivavimo pirmiausiai iš šulinėlių pipete išsiurbtos planktoninės ląstelės, o po to nuo dugno nugramdyta biologinė plėvelė. Iki RNR išskyrimo surinkta tiriamoji medžiaga buvo laikoma –4 °C temperatūroje.

### 3.10. RNR išskyrimas

Iš pradžių *S. mutans* bakterijų kultūra buvo centrifuguota 4800× g 10 min. kambario temperatūroje, naudojant centrifugą Eppendorf Centrifuge 5415R (Vokietija). Po to nuosėdos buvo sumaišytos su fosfatiniu buferiniu tirpalu (500 μl) ir dar kartą centrifuguotos 500× g 4 °C temperatūroje 10 min. Procedūra buvo pakartota du kartus.

Tiriant C2-EG poveikį *S. mutans* genų, kurie atsakingi už biologinės plėvelės gamybą, raiškai gautos nuosėdos buvo paveiktos 700 μl RNR gryninimo tirpalu GENEzol™ TriRNA (Geneaid Biotech Ltd., Taivanas), o po to tris kartus užšaldytos –80 °C temperatūroje ir atšildytos kambario temperatūroje, kad įvyktų ląstelių lizė. Galutinis tiriamosios medžiagos paruošimas atliktas remiantis gamintojo pateiktomis rekomendacijomis.

C8-OG ir C12-LG atveju bendroji RNR buvo išgryninta taikant CTAB (angl. *Cetyl trimethyl ammonium bromide*) ir QIAGEN RNeasy Mini Kit metodus. Iš pradžių nuosėdos buvo paveiktos CTAB/PVP/BME tirpalu, po to tris kartus užšaldytos –80 °C temperatūroje ir atšildytos kambario temperatūroje, kad įvyktų ląstelių lizė. Toliau tiriamoji medžiaga buvo paruošta remiantis Jordon-Thaden (2015) pateikta metodika. Lizatas buvo paveiktas DNR nukleaze iš rinkinio TURBO DNR, tuomet ekstrahuotas dviem ciklais naudojant chloroformo/IAA tirpalą. Nusodinimui buvo naudota 1/20 tūrio 5 M NaCl ir du tūriai etanolio, toliau gautas tirpalas inkubuotas 20 min. –20 °C temperatūroje. RNR gryninimas buvo atliktas naudojant Qiagen surišimo kolonėles, plovimo buferinį tirpalą Qiagen ir vandenį be RNR nukleazių (50 μl).

Taikant ultravioletinių spindulių spektroskopijos metodą spektrofotometru DS-11 (DeNovix, Inc., JAV) buvo įvertintas visų mėginių bendras RNR kiekis ir grynumas.

### 3.11. Kiekybinė tikrojo laiko atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininė reakcija

Tiriant etilo galato (C2-EG), oktilo galato (C8-OG) ir laurilo galato (C12-LG) poveikį *S. mutans* genų raiškos lygiui nustatyti buvo taikyta kiekybinė tikrojo laiko atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininė reakcija (AT-PGR). 1 µg RNR atvirkštine tvarka buvo nurašytas naudojant DNR sintezės rinkinį qPCRBIO cDNA Synthesis Kit (PCR Biosystems Ltd, Anglija) modifikuotą atvirkštinę transkriptazę (M-MLV) ir atsitiktinius heksamerinius pradmenis.

Siekiant įvertinti etilo galato (C2-EG) poveikį *S. mutans* genų *gpbB*, *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *atpD* ir *atpF* raiškos lygiui, kiekybinė tikrojo laiko AT-PGR buvo atlikta naudojant DNR amplifikatorių Exicycler™ 96 Quantitative Thermal Block (Bioneer, Korėja). Susintetintos DNR kiekiui nustatyti naudotas rinkinys qPCRBIO SyGreen Mix (PCR Biosystems Ltd, Anglija). Tuo tarpu, oktilo galato (C8-OG) ir laurilo galato (C12-LG) poveikio *S. mutans* genų *gpbB*, *gtfB*, *gtfC*, *gtfD* ir *atpD* raiškos lygiui ištirti kiekybinė tikrojo laiko AT-PGR atlikta naudojant DNR amplifikatorių Biorad CT030008 (Biorad Ltd., Anglija), susintetintos DNR kiekiui nustatyti naudotas rinkinys Sso SyGreen Mix (Biorad Ltd., Anglija). Remiantis gamintojo aprašymu gautas bendras reakcijos tūris buvo 20 µl, kDNR šablono kiekis – 100 ng, o galutinė bendra tiesioginės ir atvirkštinės krypties pradmenų koncentracija buvo 400 nM. Kiekybinės tikrojo laiko AT-PGR sąlygos nurodomos **5** ir **6 lentelėse**.

Šiam tyrimui PGR pradmenys buvo parinkti remiantis literatūros šaltinių analize. Naudotų pradmenų sekos ir literatūros šaltiniai nurodomi **7 lentelėje**. Siekiant patikrinti genomines DNR taršą, buvo panaudota visuminė RNR, kuri nebuvo nurašyta atvirkštine tvarka, ir nešabloninės kontrolės. Kiekybiniam PGR duomenų įvertinimui taikytas palyginamasis Livak  $\Delta\Delta C_T$  metodas (Livak ir kt. 2001) kaip standartinė santykinių genų raiškos duomenų analizės procedūra.  $C_T$  vertės, kurios gautos iš eksperimentinių RNR mėginių, normalizuotos iki etaloninio geno 16S rRNR, ir apskaičiuotas  $\Delta C_T$  verčių ( $\Delta\Delta C_T$ ) skirtumas tarp tiriamųjų ir kontrolinių mėginių.

**5 lentelė.** Etilo galato (C2-EG) kiekybinės tikrojo laiko atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininės reakcijos (AT-PGR) sąlygos

Etapas	Temperatūra, °C	Laikas	Ciklų skaičius
Pradinė denatūracija	95	5 min.	1
Pradmenų prilydimas	95	15 sek.	40
Grandinės prailginimas	60	1 min.	40
Galutinė sintezė	72		1

**6 lentelė.** Oktilo galato (C8-OG) ir laurilo galato (C12-LG) kiekybinės tikrojo laiko atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininės reakcijos (AT-PGR) sąlygos

Etapas	Temperatūra, °C	Laikas	Ciklų skaičius
Pradinė denatūracija	95	30 sek.	1
Pradmenų prilydimas	96	30 sek.	40
Grandinės prailginimas	60	30 sek.	40
Galutinė sintezė	72		1

**7 lentelė.** Tyrime naudotos *S. mutans* specifinių pradmenų nukleotidų sekos ir literatūros šaltiniai

Genas	Pradmens seka (5' -3')	Kryptis	Šaltinis
<i>gpbB</i>	ATGGCGGTTATGGACACGTT	Tiesioginė	Cecchi ir kt.
	TTTGCCACCTTGAACACCT	Atvirkštinė	2019
<i>gtfB</i>	AGCAATGCAGCCAATCTACAAAT	Tiesioginė	Shemesh ir kt. 2006
	ACGAACCTTGGCGTTATTGTCA	Atvirkštinė	
<i>gtfC</i>	GGTTAACGTCAAAATTAGCTGTATTAGC	Tiesioginė	
	CTCAACCAACCGCCACTGTT	Atvirkštinė	
<i>gtfD</i>	ACAGCAGACAGCAGCCAAGA	Tiesioginė	
	ACTGGGTTTGCTGCGTTTG	Atvirkštinė	
<i>atpD</i>	CCAGGCGGTTTCATTCATCTGAC	Tiesioginė	Gong ir kt. 2009
	GGCGGGATTTCGGTATTTACTG	Atvirkštinė	
<i>atpF</i>	CGGCTAAAAGAACACTAAG	Tiesioginė	
	CGGTCGTCTAAAAGATAAG	Atvirkštinė	

### 3.12. Duomenų statistinis įvertinimas

Kolorimetrijos, profilometrijos ir pH matavimų duomenų kaupimui ir statistinei analizei atlikti buvo naudota Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 23.0 programa (IBM Cop., Armonk, NY, JAV). Skirtumai tarp kontrolinės (nepaveiktos) ir paveiktos grupės buvo įvertinti taikant vienos krypties dispersijos analizę (One-way ANOVA) pasirinkus *LSD post-hoc* testą. Pateikti duomenys yra išreikšti kaip vidurkiai ± standartinė paklaida.

Laikyta, kad  $p < 0,05$  rodo statistiškai reikšmingą skirtumą. Siekiant įvertinti genų raišką, kiekvienu atveju buvo atlikti trys nepriklausomi eksperimentai su dviem pakartojimais ( $n = 6$ ). Gautų duomenų statistinė analizė buvo atlikta naudojant vienos krypties dispersijos analizę pasirinkus Tukio ir Kramerio (*Tukey-Kramer*) testą, esant 0,05 reikšmingumo lygmeniui. Pateikti duomenys yra išreikšti kaip vidurkiai  $\pm$  standartinė paklaida.



## 4. TYRIMŲ REZULTATAI

### 4.1. Galo rūgšties esterių poveikis *S. mutans* gyvybingumui

Mikroskiedimo skystoje terpėje metodu buvo ištirtas galo rūgšties (GR) esterių – metilo galato (C1-MG), etilo galato (C2-EG), oktilo galato (C8-OG) ir laurilo galato (C12-LG) poveikis *S. mutans* gyvybingumui. Tuo tikslu buvo nustatyta šių medžiagų minimali slopinamoji koncentracija. Gauti duomenys pateikiami **8 lentelėje**.

**8 lentelė.** Galo rūgšties (GR) esterių (C1-MG, C2-EG, C8-OG, C12-LG), chlorheksidino (CHX, teigiama kontrolė), eritromicino (ERY, teigiama kontrolė) ir dimetilo sulfoksido (DMSO, tirpiklis) MSK, nustatyta *S. mutans* bakterijoms.

Tiriamoji medžiaga	MSK, µg/ml
C1-MG	780
C2-EG	1560
C8-OG	97
C12-LG	97,6
CHX	2,25
ERY	4,8
DMSO	$25 \times 10^3$

Nors pagrindinis tyrimo tikslas buvo rasti GR esterių koncentracijas, kurios slopina *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą, tačiau žinios apie GR esterių antibakterinį poveikį leidžia pagrįsti atliktų eksperimentų rezultatus. Biologinės plėvelės formavimąsi slopinanti koncentracija turėtų būti mažesnė už nustatytą MSK, o tai atsispindi gautuose rezultatuose, kurie detaliam aptariami šio darbo 4.2 ir 4.3 skyriuose.

Nustatyta, kad tirtų GR esterių antimikrobinis poveikis *S. mutans* bakterijoms nėra vienodas. Trumpos alkilo grandinės GR esteriai – C1-MG ir C2-EG pasižymėjo silpnesniu poveikiu, palyginti su ilgos alkilo grandinės (C8-OG ir C12-LG) esteriais. C1-MG ir C2-EG MSK atitinkamai buvo 780 µg/ml ir 1560 µg/ml, o C8-OG ir C12-LG atveju – atitinkamai 97 µg/ml ir 97,6 µg/ml. Taigi, paaiškėjo, kad trumpos ir ilgos alkilo grandinių GR esterių antimikrobinis slopinamasis poveikis skiriasi santykiu 1 : 16.

Taip pat tyrimo metu įvertintas dimetilo sulfoksido (DMSO), kurį naudojome GR esteriams tirpinti, antimikrobinis poveikis *S. mutans* bakterijų kultūrai. Nustatyta labai didelė šio tirpiklio MSK vertė, t. y.  $25 \times 10^3$  µg/ml.

Gauti duomenys patvirtino, kad tyrimuose naudotas DMSO kaip C8-OG ir C12-LG tirpiklis neturėjo įtakos mūsų atliktų eksperimentų su šiais GR esteriais rezultatams.

#### 4.2. Galo rūgšties esterių poveikis, slopinantis *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą ant polistireno paviršiaus

Kolorimetrijos metodo pagalba buvo iširta kaip skirtingos GR esterių – metilo (C1-MG), etilo (C2-EG), oktilo (C8-OG) ir laurilo (C12-LG) galatų koncentracijos veikia *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą ant polistireno paviršiaus.

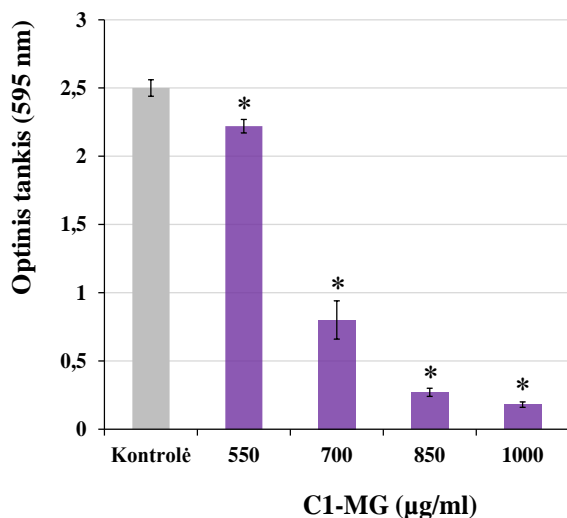
Tiriant nustatyta, kad slopinamąjį poveikį *S. mutans* biologinės plėvelės biomasės tankiui ant polistireno paviršiaus turėjo šios keturios C1-MG koncentracijos: 550 µg/ml, 700 µg/ml, 850 µg/ml ir 1000 µg/ml. Biologinei plėvelei slopinti naudotos 550 µg/ml ir 700 µg/ml C1-MG koncentracijos buvo mažesnės už nustatytą MSK (t. y. 780 µg/ml µg/ml, **8 lentelė**).

Kaip matyti iš **17 paveikslo**, visos naudotos C1-MG koncentracijos statistiškai reikšmingai sumažino *S. mutans* biologinės plėvelės, kuri buvo kultivuota THB terpėje su 1 proc. sacharozės, biomasės tankį polistireno paviršiuje, palyginti su nepaveiktomis bakterijomis ( $p < 0,05$ ). C1-MG slopinamasis poveikis priklausė nuo dozės, o stipriausiai pasireiškė esant 700 µg/ml, 850 µg/ml ir 1000 µg/ml koncentracijoms ir biologinės plėvelės susidarymas buvo užslopintas atitinkamai 68 proc., 89 proc. ir 93 proc.

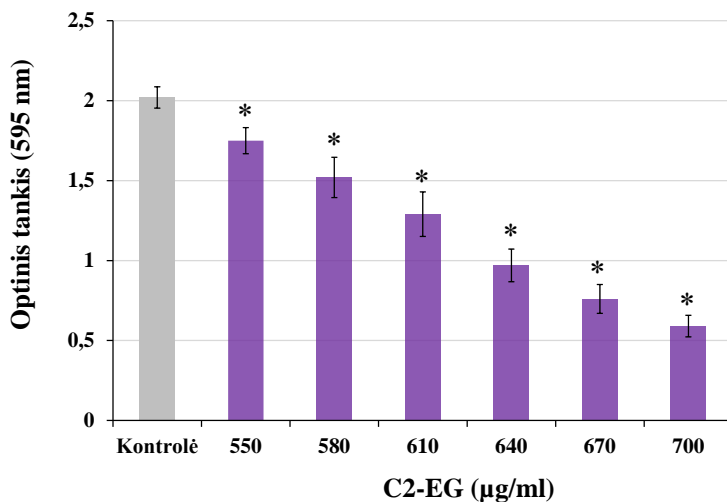
Etilo galato (C2-EG) atveju buvo nustatytos šešios koncentracijos, kurias slopinamai paveikė *S. mutans* biologinės plėvelės biomasės tankį, t. y. 550 µg/ml, 580 µg/ml, 610 µg/ml, 640 µg/ml, 670 µg/ml ir 700 µg/ml (**18 pav.**). Visos biologinei plėvelei slopinti naudotos C2-EG koncentracijos buvo mažesnės už nustatytą MSK (t. y. 1560 µg/ml µg/ml, **8 lentelė**).

**18 paveiksle** matyti, kad C2-EG koncentracijos 580 µg/ml, 610 µg/ml, 640 µg/ml, 670 µg/ml ir 700 µg/ml labai sumažino *S. mutans* biologinės plėvelės, kuri buvo kultivuota THB terpėje su 1 proc. sacharozės, biomasės tankį ant polistireno paviršiaus, lyginant su kontroline nepaveiktų bakterijų grupe. Nustatytas skirtumas yra statistiškai reikšmingas ( $p < 0,05$ ).

Stulpelinėje diagramoje (**18 pav.**) pastebimas C2-EG *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą slopinantis poveikis, kuris priklauso nuo dozės. Efektyviausiai veikė 700 µg/ml koncentracija, kuri sumažino *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą 68 proc., palyginti su kontroline grupe. Deja, pastaroji C2-EG koncentracija nesugebėjo visiškai užslopinti *S. mutans* biologinės plėvelės vystymosi ant polistireno paviršiaus.



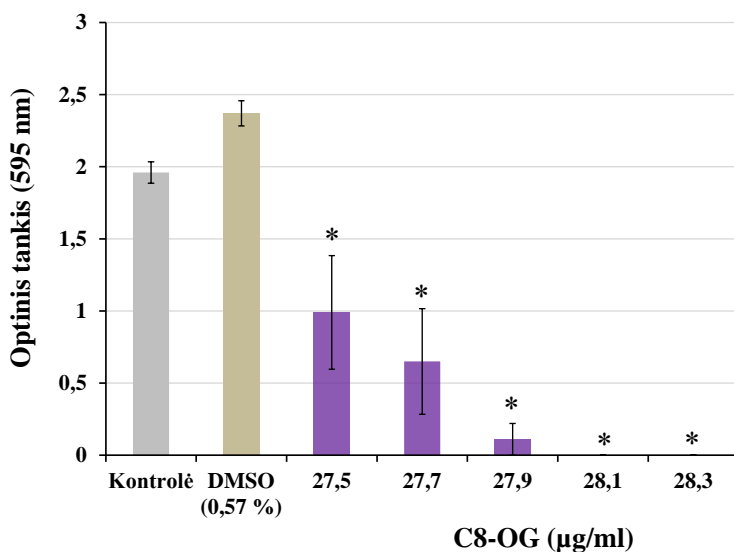
**17 pav.** *S. mutans* biologinės plėvelės biomasės tankis ant polistireno paviršiaus po 24 val. kultivavimo THB terpėje esant 1 proc. sacharozės ir skirtingoms metilo galato (C1-MG) koncentracijoms. Pateikti duomenys (n=9) yra trijų nepriklausomų eksperimentų vidurkiai ± standartinė paklaida. Duomenys, pažymėti žvaigždute (\*), reikšmingai skiriasi nuo kontrolinės nepaveiktų bakterijų grupės ( $p < 0,05$ ).



**18 pav.** *S. mutans* biologinės plėvelės biomasės tankis ant polistireno paviršiaus po 24 val. kultivavimo THB terpėje esant 1 proc. sacharozės ir skirtingoms etilo galato (C2-EG) koncentracijoms. Duomenys (n=9) yra trijų nepriklausomų eksperimentų vidurkiai ± standartinė paklaida. Duomenys,

pažymėti žvaigždute (\*), reikšmingai skiriasi nuo kontrolinės nepaveiktų bakterijų grupės ( $p < 0,05$ ).

Kalbant apie oktilo galatą (C8-OG), tyrimo metu nustatyta, kad šio GR esterio 27,5  $\mu\text{g/ml}$ , 27,7  $\mu\text{g/ml}$ , 27,9  $\mu\text{g/ml}$ , 28,1  $\mu\text{g/ml}$  ir 28,3  $\mu\text{g/ml}$  koncentracijos efektyviai veikia prieš *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą ant polistireno paviršiaus (19 pav.).

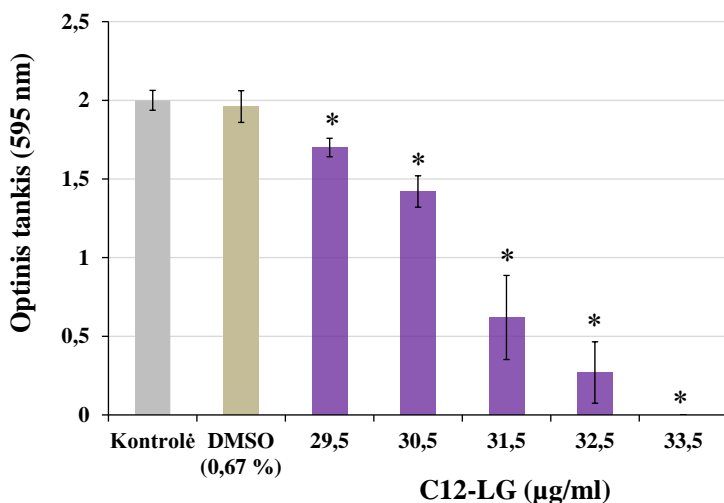


**19 pav.** *S. mutans* biologinės plėvelės biomasės tankis ant polistireno paviršiaus po 24 val. kultivavimo THB terpėje esant 1 proc. sacharozės ir skirtingoms oktilo galato (C8-OG) koncentracijoms. Duomenys ( $n=9$ ) yra trijų nepriklausomų eksperimentų vidurkiai  $\pm$  standartinė paklaida. Duomenys, pažymėti žvaigždute (\*), reikšmingai skiriasi nuo kontrolinės nepaveiktų bakterijų grupės ( $p < 0,05$ ).

C8-OG koncentracijos, slopinančios biologinę plėvelę, buvo mažesnės už nustatytą MSK (t. y. 97  $\mu\text{g/ml}$ , 8 lentelė) bei patenka į labai siauras ribas turintį koncentracijų diapazoną. Tai rodo, kad šis C8-OG slopinamasis aktyvumas nesusijęs su baktericidiniu poveikiu. Kolorimetrijos tyrimas atskleidė, kad visos tirtos C8-OG koncentracijos statistiškai reikšmingai sumažino *S. mutans* biologinės plėvelės biomasės tankį ant polistireno paviršiaus, jei lygintume su kontroline nepaveiktų bakterijų grupe ( $p < 0,05$ ). Šis biologinę plėvelę slopinantis C8-OG poveikis buvo priklausomas nuo koncentracijos. Svarbu tai, kad 28,1  $\mu\text{g/ml}$  ir 28,3  $\mu\text{g/ml}$  C8-OG koncentracijos 100 proc. užslopino *S. mutans* biologinės plėvelės vystymąsi

ant polistireno paviršiaus, palyginti su kontroline nepaveiktų bakterijų grupe. Be to, svarbu pažymėti, jog 0,57 proc. DMSO (tirpiklis) neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos biologinei plėvelei susidaryti ant polistireno paviršiaus, lyginant su nepaveiktomis bakterijomis ( $p>0,05$ ). Svarbu pažymėti, kad C8-OG poveikis, slopinantis *S. mutans* biologinių plėvelių susidarymą ant polistireno paviršiaus, buvo daug stipresnis nei C2-EG ir C1-MG atveju. Šiuo atžvilgiu, C2-EG ir C1-MG koncentracijos slopinamojo poveikio diapazono ribos buvo atitinkamai 550–700  $\mu\text{g/ml}$  ir 550–1000  $\mu\text{g/ml}$ .

Biologinės plėvelės kiekio įvertinimas kolorimetrijos metodu parodė, kad laurilo galato (C12-LG) 29,5  $\mu\text{g/ml}$ , 30,5  $\mu\text{g/ml}$ , 31,5  $\mu\text{g/ml}$ , 32,5  $\mu\text{g/ml}$  ir 33,5  $\mu\text{g/ml}$  koncentracijos taip pat slopina *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą ant polistireno paviršiaus kultivuojant THB terpėje su 1 proc. sacharozės (**20 pav.**).



**20 pav.** *S. mutans* biologinės plėvelės biomasės tankis ant polistireno paviršiaus po 24 val. kultivavimo THB terpėje esant 1 proc. sacharozės ir skirtingoms laurilo galato (C12-LG) koncentracijoms. Duomenys ( $n=9$ ) yra trijų nepriklausomų eksperimentų vidurkiai  $\pm$  standartinė paklaida. Duomenys, pažymėti žvaigždute (\*), reikšmingai skiriasi nuo kontrolinės nepaveiktų bakterijų grupės ( $p<0,05$ ).

Svarbu pažymėti, kad šios biologinę plėvelę slopinančios koncentracijos buvo mažesnės nei nustatyta MSK (t. y. 97,6  $\mu\text{g/ml}$ , **8 lentelė**), o tai rodo, kad tirtų C12-LG koncentracijų poveikis nėra baktericidinis. C12-LG poveikis, slopinantis biologinės plėvelės susidarymą ant polistireno paviršiaus, buvo priklausomas nuo dozės. Iš **20 paveikslo** matyti, kad C12-LG koncentracija

nuo 30,5 µg/ml iki 33,5 µg/ml statistiškai reikšmingai sumažino *S. mutans* biologinės plėvelės biomą ant polistireno paviršiaus, jei lygintume su kontrolinės nepaveiktų bakterijų grupės biomasės tankiu ( $p < 0,05$ ). Reikia pabrėžti, kad 33,5 µg/ml C12-LG koncentracija visiškai (100 proc.) užslopino biologinės plėvelės biomasės gamybą, palyginti su kontroline nepaveiktų bakterijų grupe. Nustatyta, kad 0,67 proc. DMSO (tirpiklis) neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymui ant polistireno paviršiaus, lyginant su kontroline nepaveiktų bakterijų grupe ( $p > 0,05$ ). Įdomu tai, kad, kaip ir C8-OG atveju, biologinę plėvelę slopinančios C12-LG koncentracijos taip pat pateko į gana siaurų ribų intervalą – nuo 29,5 µg/ml iki 33,5 µg/ml. Tačiau biologinę plėvelę slopino mažesnės C12-LG koncentracijos nei C8-OG, bet daug didesnė nei C2-EG ir C1-MG, kurių anksčiau nustatytų slopinamųjų koncentracijų ribos buvo atitinkamai 550–700 µg/ml ir 500–1000 µg/ml.

#### 4.3. Galo rūgšties esterių poveikis, slopinantis *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą ant stiklo paviršiaus

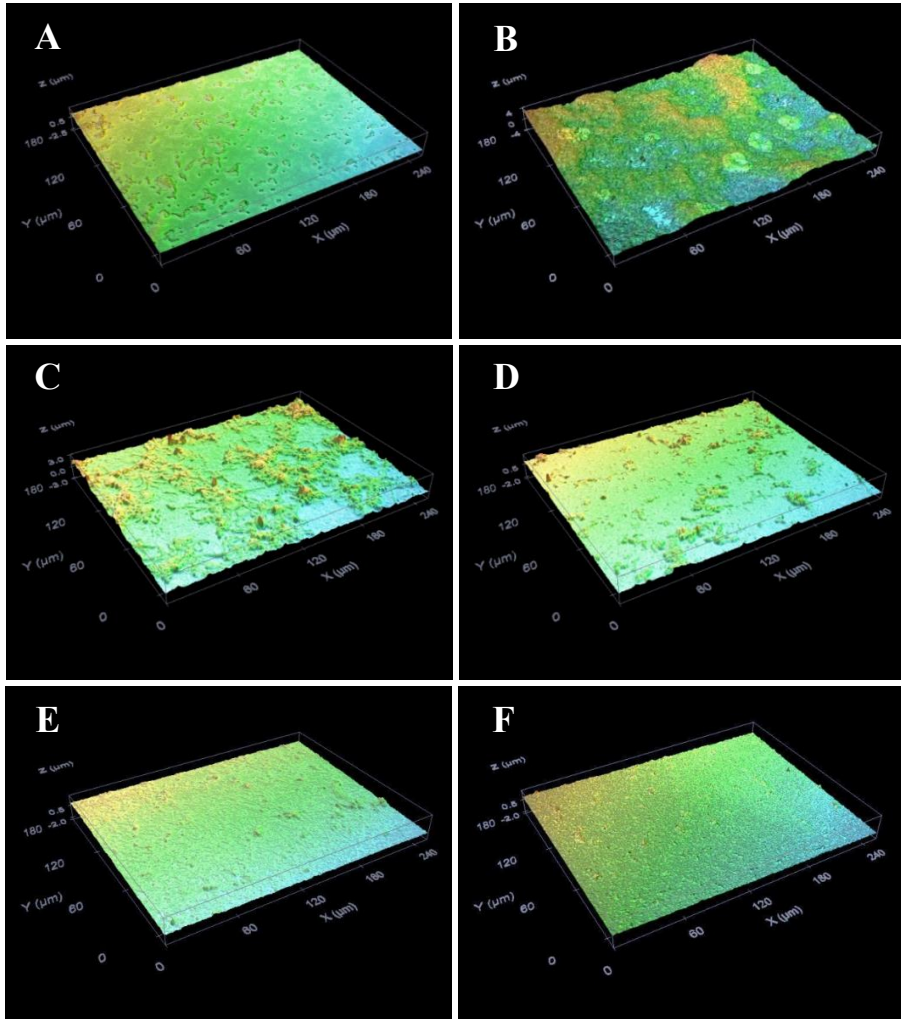
*S. mutans* biologinės plėvelės susidarymas ant stiklo paviršiaus, veikiant skirtingoms GR esterių – metilo galato (C1-MG), etilo galato (C2-EG), oktilo galato (C8-OG) ir laurilo galato (C12-LG) koncentracijoms, buvo tiriamas optinės profilometrijos metodu, kuriuo buvo apskaičiuoti *S. mutans* biologinės plėvelės kiekybiniai parametrai – paviršiaus šiurkštumas ( $R_q$ ) ir storis.

Tyrimo metu nustatyti *S. mutans* bakterijų kultūros, kuri buvo kultivuota 24 val. THB terpėje be 1 proc. sacharozės ir C1-MG, paviršiaus šiurkštumo ( $R_q$ ) ir storio parametrai, kurie buvo atitinkamai  $0,04 \pm 0,01$  ir  $0,02 \pm 0,01$  µm (**21A pav.**). Mitybinėje terpėje su 1 proc. sacharozės ir be C1-MG pastebimas *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymas (**21B pav.**).

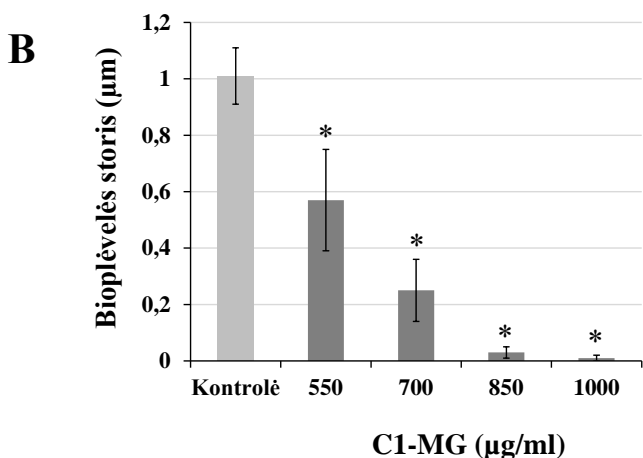
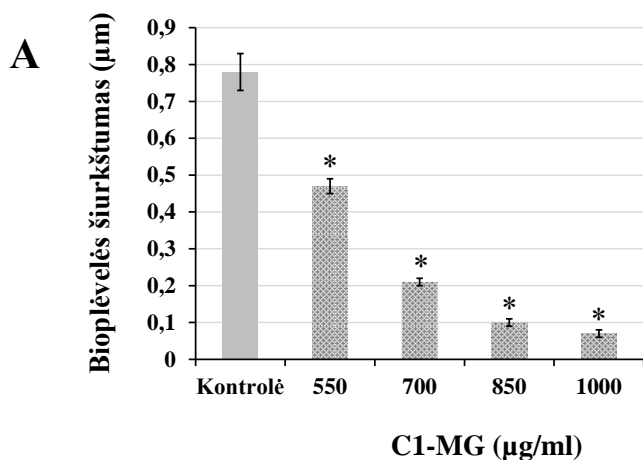
Į mitybinę terpę pridėjus 1 proc. sacharozės ir skirtingos koncentracijos 550 µg/ml, 700 µg/ml, 850 µg/ml ir 1000 µg/ml C1-MG (**21C–F pav.**), buvo fiksuotas nuo koncentracijos priklausomas mažėjantis biologinės plėvelės susidarymas ant stiklo paviršiaus.

Biologinės plėvelės kiekybinis įvertinimas schemiškai pavaizduotas **22 paveiksle**, kuriame matoma, kad biologinės plėvelės paviršiaus šiurkštumas ( $R_q$ ) (**22A pav.**) ir biologinės plėvelės storis (**22B pav.**) padidėjo kontrolinėje nepaveiktų bakterijų grupėje (**22 pav.**), o C1-MG slopinamasis poveikis buvo priklausomas nuo koncentracijos ( $p < 0,05$ ; **22 pav.**). Šiuo atžvilgiu C1-MG koncentracijos 850 µg/ml ir 1000 µg/ml efektyviai sumažino biologinės plėvelės paviršiaus šiurkštumą ( $R_q$ ) atitinkamai 94 proc.

ir 99 proc. (**22A pav.**). Be to, šios C1-MG koncentracijos sumažino *S. mutans* biologinės plėvelės storį atitinkamai 97 proc. ir 99 proc. (**22B pav.**).



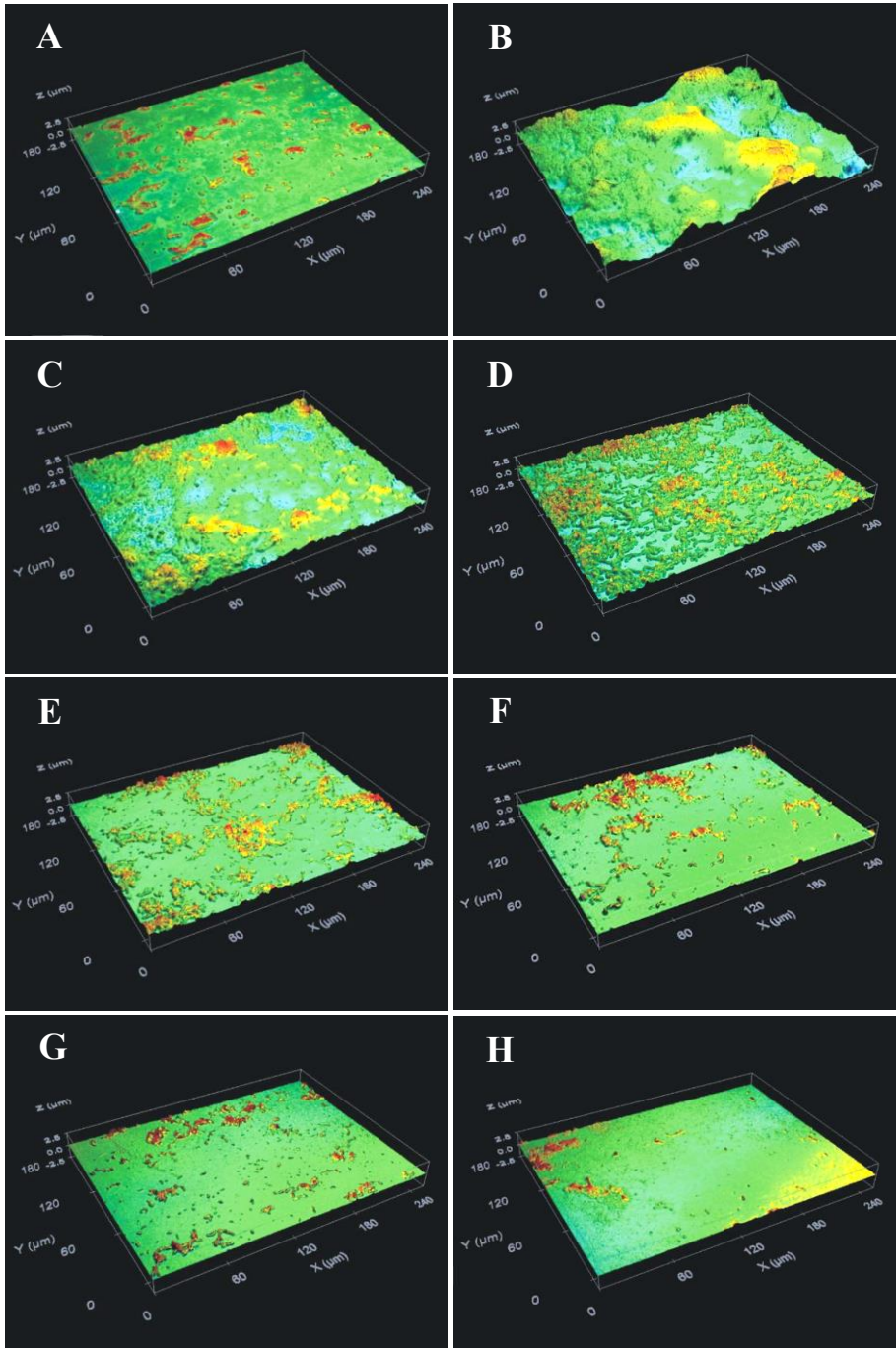
**21 pav. (A–F).** Stiklo plokštelių su *S. mutans* biologine plėvele paviršiaus optiniai profiliai po 24 val. kultivavimo THB terpėje. Stiklo plokštelės, kuri buvo inkubuota kartu su bakterijų kultūra terpėje be metilo galato (C1-MG): **A** – nesant 1 proc. sacharozės, **B** – esant 1 proc. sacharozės, bei terpėje esant 1 proc. sacharozės ir skirtingoms C1-MG koncentracijoms: **C** – 550 µg/ml, **D** – 700 µg/ml, **E** – 850 µg/ml, **F** – 1000 µg/ml, paviršiaus profilis. Vaizdas padidintas 50×.



**22 pav.** *S. mutans* biologinės plėvelės kiekiai ant stiklo paviršiaus po 24 val. kultivavimo THB terpėje esant 1 proc. sacharozės ir skirtingoms metilo galato (C1-MG) koncentracijoms: **A** – biologinės plėvelės paviršiaus šiuurkštumo parametras (*Rq*), **B** – biologinės plėvelės storis. Duomenys pateikti kaip vidurkiai ± standartinė paklaida iš trijų nepriklausomų eksperimentų (n=18, biologinės plėvelės šiuurkštumas; n=15, biologinės plėvelės storis). Duomenys, pažymėti žvaigždute (\*), statistiškai reikšmingai skiriasi nuo kontrolinės grupės ( $p < 0,05$ ).

Kultivuojant *S. mutans* bakterijų kultūrą THB terpėje be sacharozės ir C2-EG (**23A pav.**) biologinės plėvelės šiuurkštumas ir storis buvo atitinkamai  $0,07 \pm 0,01$  ir  $0,1 \pm 0,01$  μm. THB terpėje esantis 1 proc. sacharozės taip pat sukėlė *S. mutans* bakterijų prisitvirtinimą prie stiklo plokštelės paviršiaus ir lėmė biologinės plėvelės susidarymą (**23B pav.**).





**23 pav. (A–F).** Stiklo plokštelių su *S. mutans* biologine plėvele paviršiaus optiniai profiliai po 24 val. kultivavimo THB terpėje. Stiklo plokštelės, kuri buvo inkubuota kartu su bakterijų kultūra terpėje be etilo galato (C2-EG): **A** – nesant 1 proc. sacharozės, **B** – esant 1 proc. sacharozės, bei terpėje esant

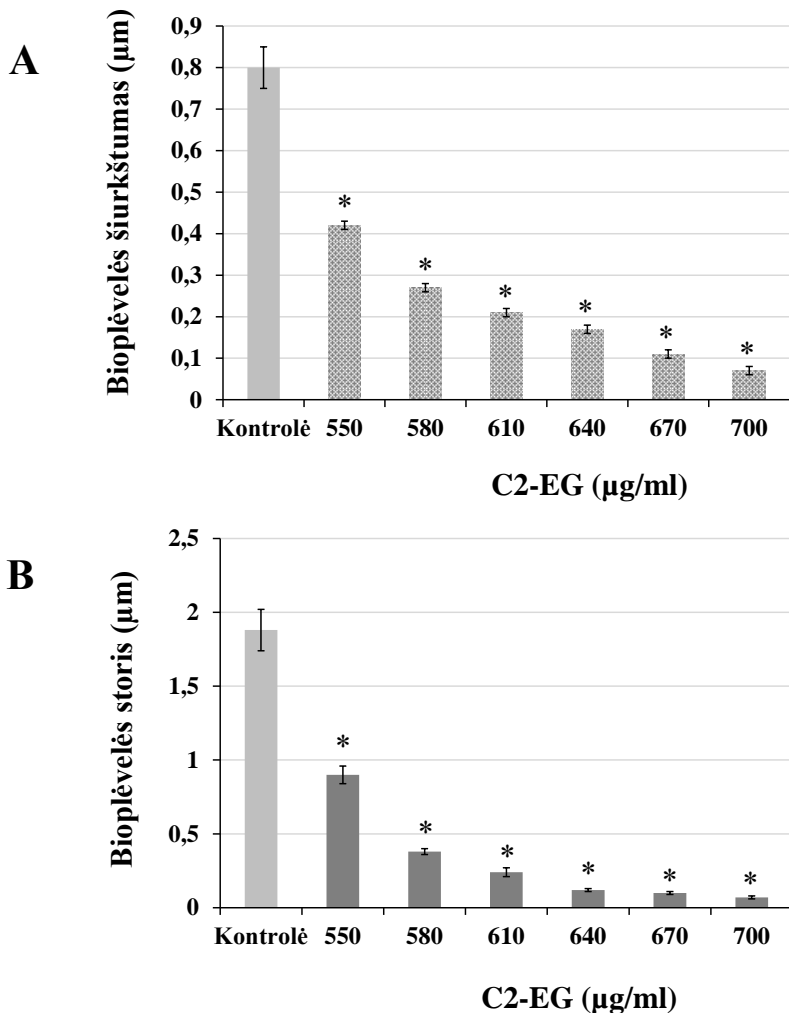
1 proc. sacharozės ir skirtingoms C2-EG koncentracijoms: C – 550 µg/ml, D – 580 µg/ml, E – 610 µg/ml, F – 640 µg/ml, G – 670 µg/ml, H – 700 µg/ml. Vaizdas padidintas 50×.

Kaip ir C1-MG atveju, THB terpėje su 1 proc. sacharozės ir skirtinga 550 µg/ml, 580 µg/ml, 610 µg/ml, 640 µg/ml, 670 µg/ml ir 700 µg/ml C2-EG koncentracija (**23C–H pav.**) taip pat nustatytas nuo koncentracijos priklausomas *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą ant stiklo paviršiaus slopinantis poveikis.

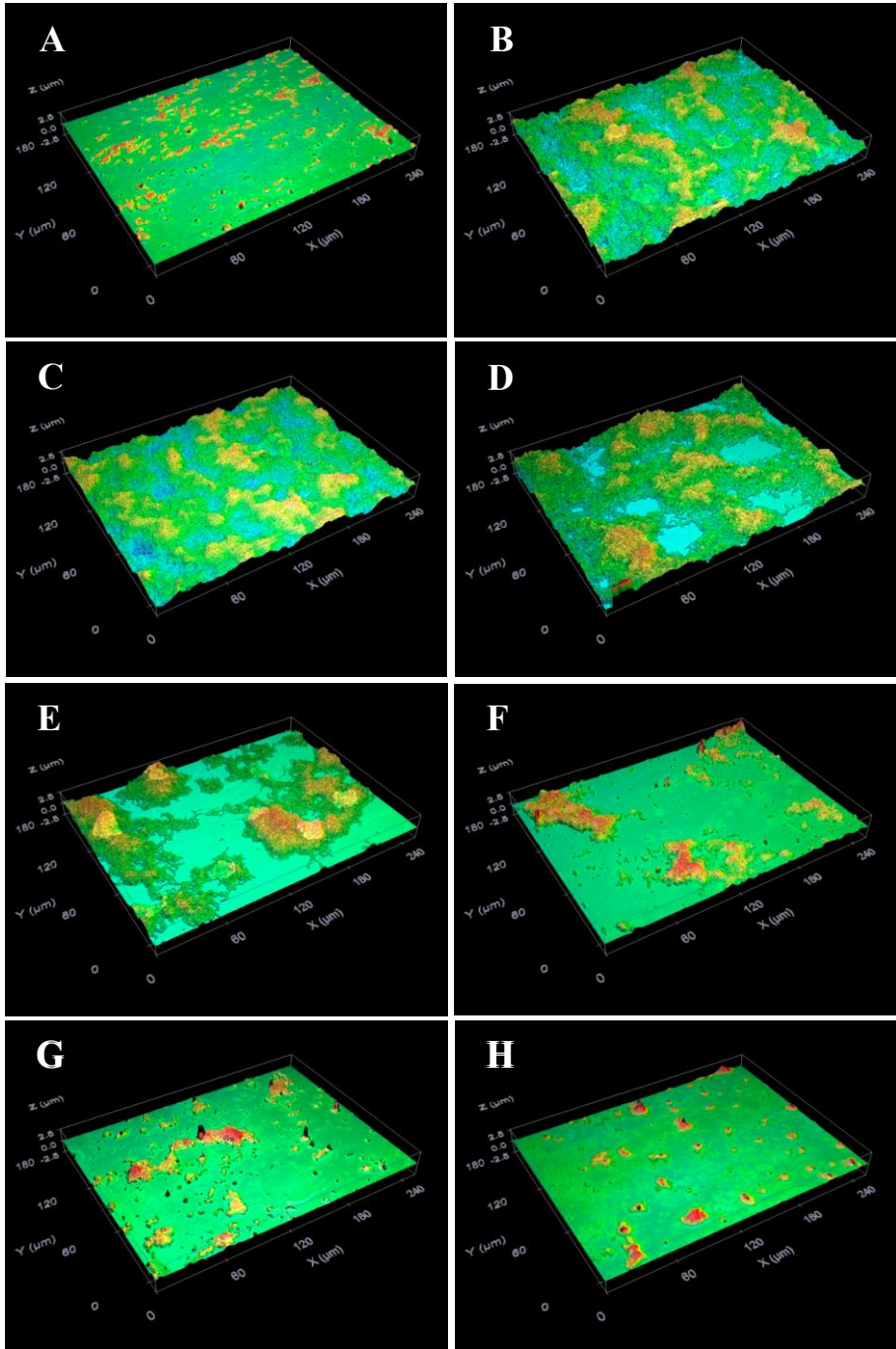
Ant stiklo plokštelės paviršiaus susidariusios *S. mutans* biologinės plėvelės kiekybinis įvertinimas atskleidė, kad kontrolinės nepaveiktų bakterijų grupės biologinės plėvelės paviršiaus šiurkštumas (*Rq*) (**24A pav.**) ir storis (**24B pav.**) buvo didesni, tačiau C2-EG veikė slopinamai ir poveikis taip pat buvo priklausomas nuo koncentracijos ( $p < 0,05$ ; **24 pav.**). Nustatyta, kad C2-EG koncentracijos 640 µg/ml, 670 µg/ml ir 700 µg/ml veiksmingai sumažino biologinės plėvelės paviršiaus šiurkštumą (*Rq*) atitinkamai 79 proc., 86 proc. ir 91 proc. (**24A pav.**). Be to, šios C2-EG koncentracijos sumažino ir *S. mutans* biologinės plėvelės storį atitinkamai 94 proc., 95 proc. ir 96 proc. (**24B pav.**). C2-EG 700 µg/ml koncentracija beveik visiškai užslopino *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą ant stiklo paviršiaus, priešingai nei biologinės plėvelės susidarymą ant polistireno paviršiaus. C2-EG optinės profilometrijos tyrimo rezultatai panašūs į C1-MG. Tačiau svarbu pažymėti, kad šiame tyrime, norint visiškai nuslopinti *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą ant stiklo paviršiaus, reikėjo mažesnės C2-EG koncentracijos negu C1-MG, t. y. atitinkamai 700 µg/ml ir 1000 µg/ml. Vadinas, C2-EG veiksmingiau slopino *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą.

Atliekant optinės profilometrijos tyrimą su C8-OG, stiklo plokštelių paviršių analizė parodė, kad 1 proc. sacharozės THB terpėje turėjo įtakos *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymui (**25B** ir **26 pav.**), palyginti su bakterijų kultūra, kuri buvo kultivuota terpėje be C8-OG ir 1 proc. sacharozės (**25A pav.**).

Tiriant C8-OG poveikį *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymui nustatyta, kad kultivuojant bakterijų kultūrą THB terpėje be sacharozės ir C8-OG biologinės plėvelės šiurkštumas (*Rq*) ir storis buvo atitinkamai  $0,1 \pm 0,01$  ir  $0,16 \pm 0,01$  µm. Be to, reikia pažymėti, kad 0,57 proc. DMSO (tirpiklis) neturėjo didelės įtakos biologinės plėvelės susidarymui (**25C** ir **26 pav.**).

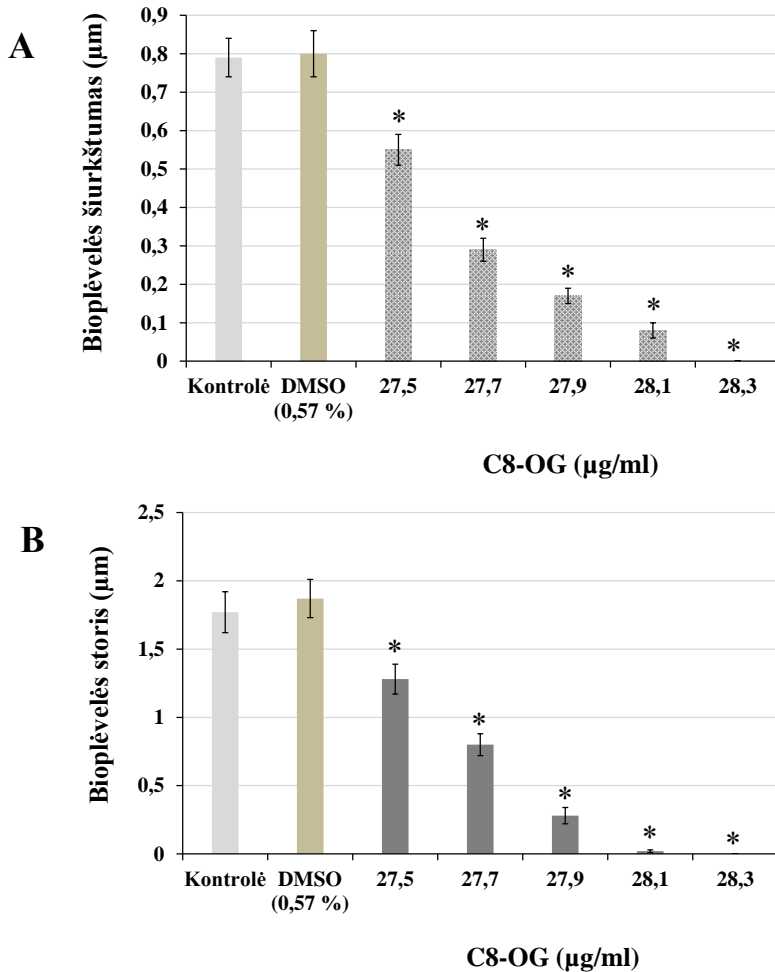


**24 pav.** *S. mutans* biologinės plėvelės kiekiai ant stiklo paviršiaus po 24 val. kultivavimo THB terpėje esant 1 proc. sacharozės ir skirtingoms etilo galato (C2-EG) koncentracijoms: **A** – biologinės plėvelės paviršiaus šiurkštumo parametras (*Rq*), **B** – biologinės plėvelės storis. Duomenys pateikti kaip vidurkiai ± standartinė paklaida iš trijų nepriklausomų eksperimentų (n=18, biologinės plėvelės šiurkštumas; n=15, biologinės plėvelės storis). Duomenys, pažymėti žvaigždute (\*), statistškai reikšmingai skiriasi nuo kontrolinės grupės ( $p < 0,05$ ).



**25 pav. (A–H).** Stiklo plokštelių su *S. mutans* biologine plėvele paviršiaus optiniai profiliai po 24 val. kultivavimo THB terpėje. Stiklo plokštelės, kuri buvo inkubuota kartu su bakterijų kultūra terpėje be oktilo galato (C8-OG): **A** – nesant 1 proc. sacharozės, **B** – esant 1 proc. sacharozės, **C** – esant 1 proc.

sacharozės ir 0,57 proc. dimetilo sulfoksido (DMSO), bei terpėje esant 1 proc. sacharozės ir skirtingoms C8-OG koncentracijoms: D – 27,5 µg/ml, E – 27,7 µg/ml, F – 27,9 µg/ml, G – 28,1 µg/ml, H – 28,3 µg/ml, paviršiaus profilis. Vaizdas padidintas 50×.



**26 pav.** Skirtingų oktilo galato (C8-OG) koncentracijų ir dimetilo sulfoksido (DMSO) poveikis *S. mutans* biologinės plėvelės, kultivuotos 24 val. THB terpėje su 1 proc. sacharozės, kiekiui ant stiklo paviršiaus: **A** – biologinės plėvelės paviršiaus šiurkštumo parametras ( $Rq$ ), **B** – biologinės plėvelės storis. Duomenys pateikti kaip vidurkiai  $\pm$  standartinė paklaida iš trijų nepriklausomų eksperimentų ( $n=18$ , biologinės plėvelės šiurkštumas;  $n=15$ , biologinės plėvelės storis). Duomenys, pažymėti žvaigždute (\*), statistiškai reikšmingai skiriasi nuo kontrolinės grupės ( $p<0,05$ ).

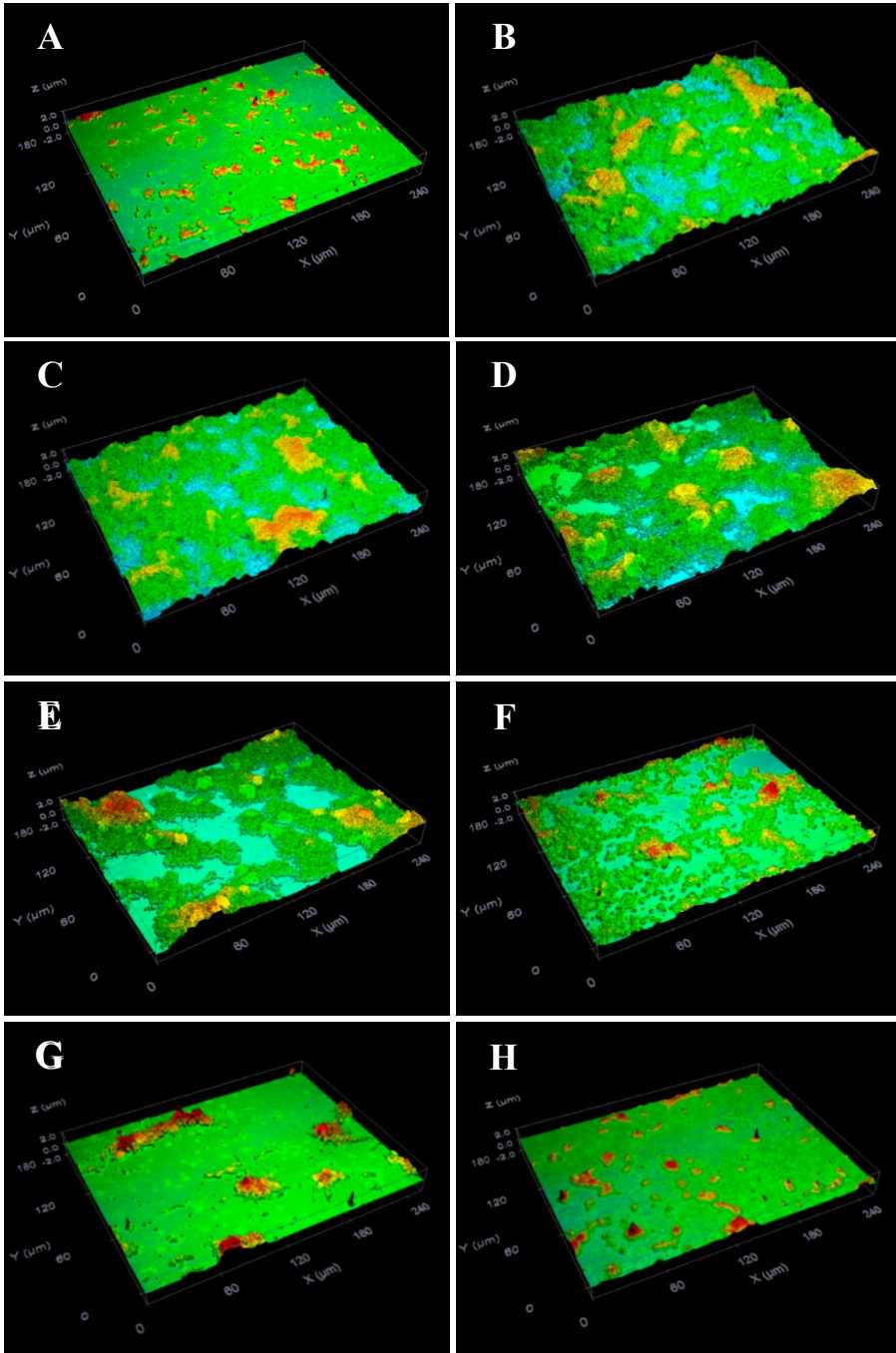
THB terpėje su 1 proc. sacharozės ir C8-OG *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymas ant stiklo paviršiaus buvo slopinamas priklausomai nuo koncentracijos (**25D–H** ir **26 pav.**). C8-OG koncentracijos 27,5 µg/ml, 27,7 µg/ml, 27,9 µg/ml, 28,1 µg/ml, 28,3 µg/ml labai sumažino biologinės plėvelės paviršiaus šiurkštumą (*Rq*) (**26A pav.**) ir storį (**26B pav.**), lyginant su kontroline nepaveiktų bakterijų grupe ( $p < 0,05$ ).

Svarbu pabrėžti, kad C8-OG koncentracija 28,3 µg/ml visiškai (t.y. 100 proc.) užslopinė *S. mutans* biologinės plėvelės vystymąsi ant stiklo paviršiaus. Lyginant su ankstesniais rezultatais, kurie buvo gauti naudojant C1-MG ir C2-EG, siekiant užslopinti *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą ant stiklo paviršiaus reikėjo daug mažesnės C8-OG koncentracijos.

Galiausiai, tiriant C12-LG poveikį *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymui ant stiklo paviršiaus, taip pat buvo nustatyta, kaip matyti **27B** ir **28 paveiksluose**, kad bakterijų prisitvirtinimą ir biologinės plėvelės susidarymą ant stiklo paviršiaus nulėmė THB terpėje esantis 1 proc. sacharozės, o ne bakterijų, kurios buvo kultivuojamos šulinėlyje be C12-LG ir 1 proc. sacharozės, agregacija (**27A pav.**).

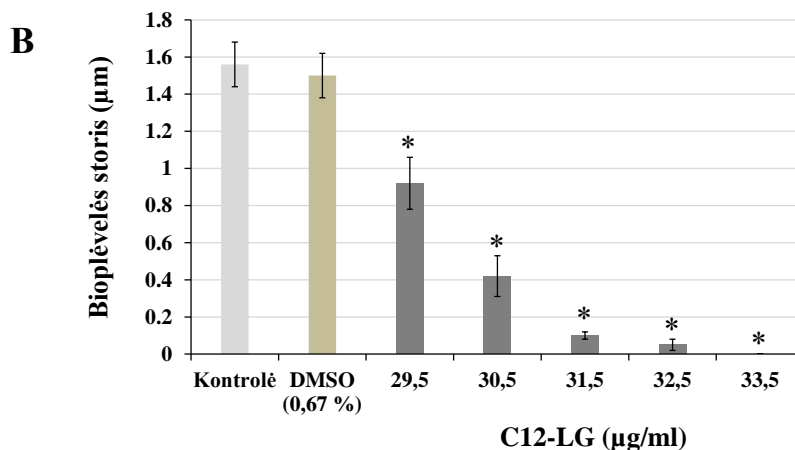
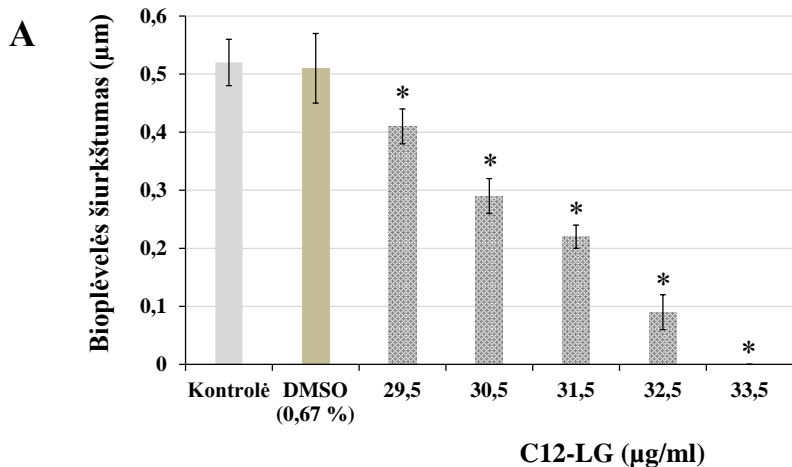
Kultivuojant *S. mutans* THB terpėje be sacharozės ir C12-LG, biologinės plėvelės paviršiaus šiurkštumas (*Rq*) ir storis buvo atitinkamai  $0,1 \pm 0,01$  ir  $0,15 \pm 0,01$  µm. Taip pat nustatyta, kad 0,67 proc. DMSO (tirpiklio) koncentracija šiek tiek sumažino biologinės plėvelės susidarymą, palyginti su kontroline nepaveiktų bakterijų grupe ( $p > 0,05$ ) (**27C** ir **28 pav.**). *S. mutans* bakterijų kultūrą kultivuojant THB terpėje su 1 proc. sacharozės ir C12-LG 29,5 µg/ml, 30,5 µg/ml, 31,5 µg/ml, 32,5 µg/ml ir 33,5 µg/ml koncentracija, buvo nustatytas *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymo ant stiklo paviršiaus slopinimas ir šis poveikis priklausė nuo koncentracijos (**27D–H** ir **28 pav.**).

Visos C12-LG koncentracijos statistiškai reikšmingai sumažino biologinės plėvelės paviršiaus šiurkštumą (*Rq*) (**28A pav.**) ir storį (**28B pav.**), palyginti su kontroline nepaveiktų bakterijų grupe ( $p < 0,05$ ). Svarbu tai, kad *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą ant stiklo paviršiaus visiškai (100 proc.) užslopinė C12-LG 33,5 µg/ml koncentracija.



**27 pav. (A–H).** Stiklo plokštelių su *S. mutans* biologine plėvele paviršiaus optiniai profiliai po 24 val. kultivavimo THB terpėje. Stiklo plokštelės, kuri buvo inkubuota kartu su bakterijų kultūra terpėje be laurilo galato (C12-LG): **A** – nesant 1 proc. sacharozės, **B** – esant 1 proc. sacharozės, **C** – esant 1 proc.

sacharozės ir 0,67 proc. dimetilo sulfoksido (DMSO), bei terpėje esant 1 proc. sacharozės ir skirtingoms C12-LG koncentracijoms: **D** – 29,5 µg/ml, **E** – 30,5 µg/ml, **F** – 31,5 µg/ml, **G** – 32,5 µg/ml, **H** – 33,5 µg/ml, paviršiaus profilis. Vaizdas padidintas 50×.



**28 pav.** Skirtingų laurilo galato (C12-LG) koncentracijų ir dimetilo sulfoksido (DMSO) poveikis *S. mutans* biologinės plėvelės, kultivuotos 24 val. THB terpėje su 1 proc. sacharozės, kiekiui ant stiklo paviršiaus: **A** – biologinės plėvelės ant stiklo paviršiaus šiurkštumo parametras (*Rq*), **B** – biologinės plėvelės storis. Duomenys pateikti kaip vidurkiai ± standartinė paklaida iš trijų nepriklausomų eksperimentų (n=18, biologinės plėvelės šiurkštumas; n=15, biologinės plėvelės storis). Duomenys, pažymėti žvaigždute (\*), statistiškai reikšmingai skiriasi nuo kontrolinės nepaveiktų bakterijų grupės ( $p < 0,05$ ).



#### 4.4. Galo rūgšties esterių poveikis, slopinantis *S. mutans* biologinės plėvelės acidogeniškumą

Tyrimo metu buvo įvertintas GR esterių – metilo galato (C1-MG), etilo galato (C2-EG), oktilo galato (C8-OG) ir laurilo galato (C12-LG) poveikis *S. mutans* biologinės plėvelės acidogeniškumui. Tyrimas parodė, kad *S. mutans* THB terpėje su 1 proc. sacharozės aktyviai vykdė fermentaciją, todėl išsiskyrė organinės rūgštys, kurios sumažino terpės pH reikšmę nuo 4,28 iki 4,12 (**9–12 lentelės**). Tačiau į THB terpę su 1 proc. sacharozės įdėjus C1-MG, C2-EG ir C12-LG, terpės rūgštėjimas buvo slopinamas apytiksliai 1,8 karto, o įdėjus C8-OG – apytiksliai 1,7 karto, palyginti su kontroline nepaveiktų bakterijų grupe.

Gauti duomenys parodė, kad C1-MG slopina *S. mutans* biologinės plėvelės acidogeniškumą ir šis poveikis priklauso nuo dozės (**9 lentelė**). C1-MG koncentracija nuo 700 µg/ml iki 1000 µg/ml slopino mitybinės terpės, kurioje buvo kultivuojama *S. mutans* bakterijų kultūra, pH rodiklio mažėjimą 96–97 proc. Taigi, C1-MG beveik visiškai užslopino *S. mutans* biologinės plėvelės acidogeniškumą.

**9 lentelė.** Mitybinės terpės su 1 proc. sacharozės ir skirtingomis metilo galato (C1-MG) koncentracijomis, pH vertės po *S. mutans* 24 val. inkubacijos. Duomenys (n=3, THB; n=9, kontrolė ir C1-MG) yra trijų nepriklausomų eksperimentų vidurkiai ± standartinė paklaida. Duomenys, pažymėti žvaigždute (\*), reikšmingai skiriasi nuo kontrolinės nepaveiktų bakterijų grupės ( $p<0,05$ ).

Tiriamoji grupė	pH
THB	7,47 ± 0,02*
Kontrolė (THB ir <i>S. mutans</i> )	4,28 ± 0,02
C1-MG (550 µg/ml)	6,14 ± 0,17*
C1-MG (700 µg/ml)	7,17 ± 0,03*
C1-MG (850 µg/ml)	7,27 ± 0,01*
C1-MG (1000 µg/ml)	7,28 ± 0,02*

Tiriant C2-EG poveikį *S. mutans* biologinės plėvelės acidogeniškumui, buvo nustatyta, kad šis GR esteris taip pat statistiškai reikšmingai užkirto kelią pH rodiklio mažėjimui, priešingai nei nepaveiktos bakterijos, kurios buvo kultivuojamos THB su 1 proc. sacharozės be C2-EG ( $p<0,05$ ). Šis apsauginis C2-EG poveikis priklausė nuo koncentracijos (**10 lentelė**). C2-EG koncentracija nuo 670 µg/ml iki 700 µg/ml slopino mitybinės terpės pH

rodiklio mažėjimą 95–96 proc. C2-EG panašiai kaip ir C1-MG beveik visiškai slopino *S. mutans* biologinės plėvelės acidogeniškumą, tačiau šis poveikis pasireiškė esant mažesnei C2-EG koncentracijai, palyginti su C1-MG.

**10 lentelė.** Mitybinės terpės su 1 proc. sacharozės ir skirtingomis etilo galato (C2-EG) koncentracijomis, pH vertės po *S. mutans* 24 val. inkubacijos. Duomenys (n=3, THB; n=9, kontrolė ir C2-EG) yra trijų nepriklausomų eksperimentų vidurkiai ± standartinė paklaida. Duomenys, pažymėti žvaigždute (\*), reikšmingai skiriasi nuo kontrolinės nepaveiktų bakterijų grupės ( $p < 0,05$ ).

Tiriamoji grupė	pH
THB	7,35 ± 0,01*
Kontrolė (THB ir <i>S. mutans</i> )	4,12 ± 0,01
C2-EG (550 µg/ml)	6,10 ± 0,17*
C2-EG (580 µg/ml)	6,54 ± 0,09*
C2-EG (610 µg/ml)	6,77 ± 0,04*
C2-EG (640 µg/ml)	6,89 ± 0,02*
C2-EG (670 µg/ml)	6,97 ± 0,01*
C2-EG (700 µg/ml)	7,02 ± 0,01*

Tačiau tiriant C8-OG ir C12-LG poveikį *S. mutans* biologinės plėvelės acidogeniškumui buvo įvertintas ir tirpiklio dimetilo sulfoksido (DMSO) poveikis. Iš **11** ir **12 lentelėse** pateiktų duomenų matyti, kad 0,57 proc. ir 0,67 proc. DMSO tirpalas neturėjo įtakos *S. mutans* biologinės plėvelės acidogeniškumui.

Sprendžiant iš **11 lentelėje** pateiktų duomenų C8-OG statistiškai reikšmingai užslopino *S. mutans* biologinės plėvelės acidogeniškumą ir užkirto kelią THB terpės pH rodiklio mažėjimui, palyginti su kontroline nepaveiktų bakterijų grupe ( $p < 0,05$ ). Taip pat iš pateiktų duomenų matyti, kad C8-OG poveikis priklauso nuo dozės. Svarbu pažymėti, kad C8-OG koncentracija nuo 27,9 µg/ml iki 28,3 µg/ml užkirto kelią pH sumažėjimui 98–99 proc. Vadinasi, C8-OG visiškai užslopino *S. mutans* biologinės plėvelės acidogeniškumą. Šis tyrimas parodė, kad toks pat panašus biologinės plėvelės acidogeniškumą slopinantis poveikis buvo pasiektas naudojant ir kitus GR esterius, tačiau nustatytos C8-OG koncentracijos buvo daug mažesnes nei C1-MG ar C2-EG atveju.

**11 lentelė.** Mitybinės terpės su 1 proc. sacharozės ir dimetilo sulfoksidu (DMSO) arba skirtingomis oktilo galato (C8-OG) koncentracijomis, pH vertės po *S. mutans* 24 val. inkubacijos. Duomenys (n=3, THB; n=9, kontrolė, DMSO ir C8-OG) yra trijų nepriklausomų eksperimentų vidurkiai ± standartinė paklaida. Duomenys, pažymėti žvaigždute (\*), reikšmingai skiriasi nuo kontrolinės nepaveiktų bakterijų grupės ( $p < 0,05$ ).

Tiriamoji grupė	pH
THB	7,37 ± 0,02*
Kontrolė (THB ir <i>S. mutans</i> )	4,23 ± 0,01
DMSO (0,57 proc.)	4,22 ± 0,01
C8-OG (27,5 µg/ml)	6,27 ± 0,38*
C8-OG (27,7 µg/ml)	6,83 ± 0,23*
C8-OG (27,9 µg/ml)	7,19 ± 0,04*
C8-OG (28,1 µg/ml)	7,23 ± 0,03*
C8-OG (28,3 µg/ml)	7,28 ± 0,03*

**12 lentelė.** Mitybinės terpės su 1 proc. sacharozės ir dimetilo sulfoksidu (DMSO) arba skirtingomis laurilo galato (C12-LG) koncentracijomis, pH vertės po *S. mutans* 24 val. inkubacijos. Duomenys (n=3, THB; n=9, kontrolė, DMSO ir C12-LG) yra trijų nepriklausomų eksperimentų vidurkiai ± standartinė paklaida. Duomenys, pažymėti žvaigždute (\*), reikšmingai skiriasi nuo kontrolinės nepaveiktų bakterijų grupės ( $p < 0,05$ ).

Tiriamoji grupė	pH
THB	7,36 ± 0,03*
Kontrolė (THB ir <i>S. mutans</i> )	4,16 ± 0,01
DMSO (0,67 proc.)	4,18 ± 0,03
C12-LG (29,5 µg/ml)	4,55 ± 0,04*
C12-LG (30,5 µg/ml)	4,75 ± 0,11*
C12-LG (31,5 µg/ml)	5,94 ± 0,35*
C12-LG (32,5 µg/ml)	6,32 ± 0,3*
C12-LG (33,5 µg/ml)	7,23 ± 0,03*

Kaip matyti iš **12 lentelėje** pateiktų duomenų, C12-LG nuo 29,5 µg/ml iki 33,5 µg/ml koncentracijų poveikis slopinant *S. mutans* biologinės plėvelės acidogeniškumą taip pat priklausė nuo koncentracijos. Be to, reikia pažymėti, kad visos C12-LG koncentracijos labai sumažino paveiktų *S. mutans* bakterijų biologinės plėvelės acidogeniškumą, palyginti su kontroline nepaveiktų bakterijų grupe ( $p < 0,05$ ). Stipriausias C12-LG poveikis pasireiškė esant 33,5 µg/ml koncentracijai ir slopino pH reikšmės mažėjimą 98 proc. Taigi,

C12-LG visiškai užslopinė organinių rūgščių gamybą *S. mutans* biologinėje plėvelėje. Nustatytas poveikis panašus į C1-MG, C2-EG ir C8-OG, tačiau C12-LG slopinė *S. mutans* biologinės plėvelės acidogeniškumą esant mažesnėms koncentracijoms.

#### 4.5. Galo rūgšties esterių poveikio *S. mutans* genams, atsakingiems už biologinės plėvelės susidarymą ir acidogeniškumą, raiškos analizė

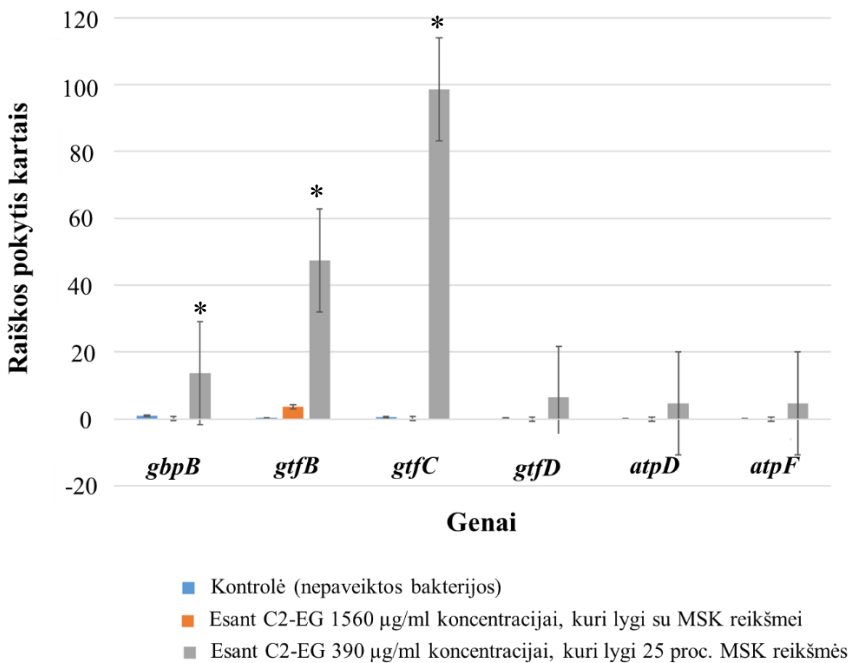
Genų, atsakingų už *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą ir jos ekstraląstelinės polimerinės matricos (EMP) gamybą bei acidogeniškumą esant GR esterių – etilo galato (C2-EG), oktilo galato (C8-OG) ir laurilo galato (C12-LG) poveikiui, kiekybinė raiška buvo įvertinta taikant kiekybinės tikrojo laiko atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininės reakcijos (AT-PGR) metodą.

Siekiant ištirti C2-EG poveikį *S. mutans* biologinėje plėvelėje esančių ląstelių šešių genų: *gbpB*, *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *atpD* ir *atpF*, santykinę raiškos pokytį buvo naudotos dvi koncentracijos – 1560 µg/ml ir 390 µg/ml, kurios lygintos su kontroline nepaveiktų bakterijų grupe.

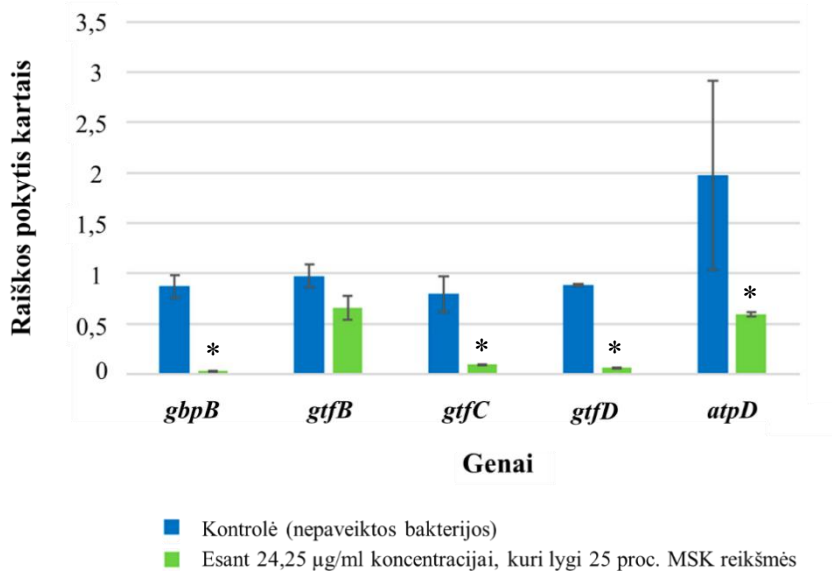
Iš **29 paveikslo** matyti, kad biologinėje plėvelėje esančios ląstelės, veikiamos C2-EG 390 µg/ml koncentracijos, kuri lygi 25 proc. minimalios slopinamosios koncentracijos (MSK) vertės, turėjo statistiškai reikšmingą genų raiškos pokytį tam tikruose genuose: *gtfC* geno raiška padidėjo 98,6 karto, *gtfB* – 47,5 karto ir *gbpB* – 13,8 karto ( $p < 0,05$ ). Kalbant apie kitus tirtus genus (*gtfD*, *atpD* ir *atpF*), C2-EG poveikis nesukėlė biologinėje plėvelėje esančių ląstelių genų statistiškai reikšmingo raiškos pokyčio, palyginti su kontroline nepaveiktų bakterijų grupe.

Nustatant C8-OG poveikį *S. mutans* biologinėje plėvelėje esančių ląstelių penkių genų *gbpB*, *gtfB*, *gtfC*, *gtfD* ir *atpD* santykiniam raiškos pokyčiui, buvo naudotos trys koncentracijos – 97 µg/ml, 48,5 µg/ml ir 24,25 µg/ml, kurios lygintos su kontroline nepaveiktų bakterijų grupe. Kadangi mėginiuose su C8-OG koncentracija, kuri lygi 100 proc. ir 50 proc. MSK reikšmės, nebuvo *S. mutans* augimo arba jis buvo nereikšmingas, genų raiškos analizei buvo naudojamas tik mėginys su C8-OG koncentracija, kuri lygi 25 proc. MSK reikšmės. Iš **30 paveikslo** matyti, kad biologinėje plėvelėje esančios ląstelės, paveiktos C8-OG 24,25 µg/ml koncentracija, kuri lygi 25 proc. MSK vertės, turėjo statistiškai reikšmingą keturių iš penkių tirtų genų raiškos sumažėjimą ( $p < 0,05$ ). Pavyzdžiui, buvo nustatytas didelis raiškos pokytis genuose *gbpB* (98,6 karto), *gtfC* (47,5 karto), *gtfD* (13,8 karto), taip pat pastebėtas *atpD* geno raiškos sumažėjimas ir nereikšmingas *gtfB* geno raiškos sumažėjimas.

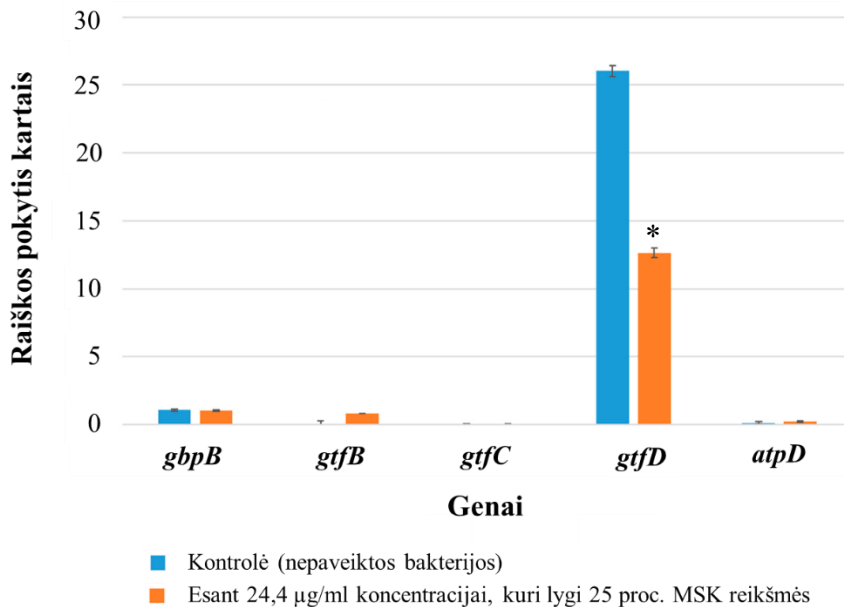
Siekiant įvertinti C12-LG poveikį *S. mutans* biologinėje plėvelėje esančioms ląstelėms, pastarosios buvo veikiamos trimis C12-LG koncentracijomis – 97,6 µg/ml, 48,8 µg/ml ir 24,4 µg/ml, kurios lygintos su kontroline nepaveiktų bakterijų grupe. Kadangi mėginiuose su C12-LG koncentracija, kuri lygi 100 proc. ir 50 proc. MSK reikšmės, nebuvo *S. mutans* augimo arba jis buvo nereikšmingas, genų raiškos analizei buvo naudojamas tik mėginys su C12-LG koncentracija, kuri lygi 25 proc. MSK reikšmės. Tyrimo metu nustatytas genų raiškos pokytis kartais grafiškai vaizduojamas **31 paveiksle**, kuriame matyti, kad biologinėje plėvelėje esančios ląstelės paveiktos C12-LG 24,4 µg/ml koncentracija, kuri lygi 25 proc. MSK vertės, sukėlė didelį tik vieno *gtfD* geno raiškos pokytį, kuris yra statistiškai reikšmingas (48 proc.), bei nedidelius nereikšmingus keturių genų (*gpbB*, *gtfB*, *gtfC* ir *atpD*) pokyčius.



**29 pav.** *S. mutans* bakterijų kultūros biologinėje plėvelėje esančių ląstelių šešių genų, atsakingų už biologinės plėvelės susidarymą ir acidogeniškumą, raiškos pokytis esant skirtingoms etilo galato (C2-EG) koncentracijoms. Duomenys (n=6) yra trijų nepriklausomų eksperimentų, kurie atlikti su dviem pakartojimais vidurkiai ± standartinė paklaida. Duomenys, pažymėti žvaigždute (\*), reikšmingai skiriasi nuo kontrolinės nepaveiktų bakterijų grupės (p<0,05).



**30 pav.** *S. mutans* kultūros biologinėje plėvelėje esančių ląstelių penkių genų, atsakingų už biologinės plėvelės susidarymą ir acidogeniškumą, raiškos pokytis esant oktilo galato (C8-OG) 24,25 µg/ml koncentracijai. Duomenys (n=6) yra trijų nepriklausomų eksperimentų, kurie atlikti su dviem pakartojimais, vidurkiai ± standartinė paklaida. Duomenys, pažymėti žvaigždute (\*), statistiškai reikšmingai skiriasi nuo kontrolinės nepaveiktų bakterijų grupės ( $p < 0,05$ ).



**31 pav.** *S. mutans* bakterijų kultūros biologinėje plėvelėje esančių penkių genų, atsakingų už biologinės plėvelės susidarymą ir acidogeniškumą, raiškos pokytis esant laurilo galato (C12-LG) 24,4 µg/ml koncentracijai. Duomenys (n=6) yra trijų nepriklausomų eksperimentų, kurie atlikti su dviem pakartojimais, vidurkiai ± standartinė paklaida. Duomenys, pažymėti žvaigždute (\*), statistškai reikšmingai skiriasi nuo kontrolinės nepaveiktų bakterijų grupės ( $p < 0,05$ ).

## 5. REZULTATŲ APITARIMAS

Atliekant eksperimentinį tyrimą su sicilinio žagrenio (*Rhus coriaria*) vaisių ekstraktu buvo nustatyta, kad šis ekstraktas slopina *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą. Detalesnis *R. coriaria* vaisių ekstrakto frakcijų tyrimas parodė, kad didžiausiu poveikiu pasižymėjo frakcija, kurioje vėliau buvo nustatytas metilo galatas (C1-MG) (Kacergius ir kt. 2017). Panašius rezultatus gavo mokslininkų grupė, kuri efektyviosios didelio slėgio skysčių chromatografijos (angl. *High-performance liquid chromatography*, HPLC) metodu *Rhus javanica* galų ekstrakto aptiko galotaninus, GR ir C1-MG (Kim ir kt. 2016). Remiantis atliktų tyrimų rezultatais šiame disertaciniame darbe siekta iširti ne tik C1-MG, bet ir kitų GR esterių – etilo galato (C2-EG), oktilo galato (C8-OG) bei laurilo galato (C12-LG) poveikį *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymui *in vitro* sąlygomis.

Tyrimo duomenimis, GR esterių antimikrobinis poveikis *S. mutans* gyvybingumui nėra vienodas. C1-MG ir C2-EG MSK atitinkamai buvo 780 µg/ml ir 1560 µg/ml, o C8-OG ir C12-LG atveju – atitinkamai 97 µg/ml ir 97,6 µg/ml. Viena tyrėjų grupė, nagrinėjusi GR ir C1-MG poveikį burnos kariesogeninėms ir periodonto ligas sukeliančioms bakterijoms, nustatė, kad *S. mutans* augimą ir dauginimąsi veikia didesnė MSK – nuo 2 mg/ml iki 4 mg/ml (Kang ir kt. 2008). Literatūroje trūksta duomenų apie eksperimentiniuose tyrimuose naudotų kitų GR alkilo esterių antibakterinį poveikį *S. mutans* gyvybingumui arba tie duomenys yra fragmentiški. Tyrimas parodė, kad trumpos alkilo grandinės GR esteriai – C1-MG ir C2-EG pasižymėjo silpnesniu poveikiu, palyginti su ilgos alkilo grandinės (C8-OG ir C12-LG) esteriais. Taigi, paaiškėjo, kad trumpos ir ilgos alkilo grandinių GR esterių antimikrobinis slopinamasis poveikis skiriasi santykiu 1 : 16. Panašius rezultatus gavo mokslininkų grupė, kuri nustatė, kad ilgą alkilo grandinę turintis C8-OG stipriau veikė *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ir *Pseudomonas fluorescens* padermes, palyginti su trumpesnę alkilo grandinę turinčiu propilo galatu (C3-PG) (Gutierrez-Larrainzar ir kt. 2013).

*S. mutans* turi keletą virulentiškumo veiksnių, kurie leidžia sėkmingai kolonizuoti žmogaus burnoje esančius paviršius. Literatūros duomenimis, virulentiškumą lemia adhezinių baltymų gamyba ir gebėjimas formuoti biologinę plėvelę bei acidogeniškumas ir tolerancija rūgštims (Kidd ir kt. 2019). *S. mutans* adhezija glaudžiai susijusi su biologinės plėvelės susidarymu, nes *S. mutans*, padedamas gliukoziltransferazių gamina gliukaną, kuris sukelia bakterijų adheziją prie paviršiaus, kartu ir agregaciją tarpusavyje, kas inicijuoja biologinės plėvelės vystymąsi (Jeong ir kt. 2013).



Disertaciniame darbe pristatomi eksperimentiniais tyrimais analizuoto GR esterių slopinamojo poveikio *S. mutans* biologinės plėvelės biomasės tankiui ir profiliui ant skirtingos kilmės standžių paviršių – polistireno ir stiklo rezultatai. Nustatytas nuo koncentracijos priklausantis slopinamasis poveikis tiek biomasės tankiui, tiek biologinės plėvelės profiliui, t. y. storiui ir šiurkštumui. Tyrimo duomenimis, metilo galato (C1-MG) slopinamasis poveikis stipriausiai pasireiškė esant 700 µg/ml, 850 µg/ml ir 1000 µg/ml koncentracijoms. Panašius rezultatus gavo ir kiti tyrėjai (Kang ir kt. 2008), kurie atliko stiklinės vielos testą su C1-MG ir nustatė, kad šios medžiagos 1000 µg/ml koncentracija labai sumažino *S. mutans* Ingbritt padermės, kuri buvo kultivuota 24 val. mitybinėje terpėje su 5 proc. sacharozės, biologinės plėvelės biomasės tankį, palyginti su nepaveiktomis bakterijomis. Nustatyta, kad C2-EG koncentracijos slopinamojo poveikio intervalas panašus kaip ir C1-MG – nuo 550 µg/ml iki 700 µg/ml. Literatūroje nepavyko rasti duomenų apie C2-EG poveikį *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymui, išskyrus R. O. Bakr ir jo kolegų (2016) atliktą tyrimą su *Staphylococcus aureus* biologinėmis plėvelėmis. Ši mokslininkų grupė iš paprastosios vandens lelijos (*Nymphaea alba*) šakniastiebių išskyrė C2-EG ir nustatė, kad šis GR esteris sumažino *S. aureus* biologinėmis plėvelės formavimąsi *in vitro* sąlygomis. Šis tyrimas atskleidė, kad C8-OG daug mažesnės 28,1 µg/ml ir 28,3 µg/ml koncentracijos statistiškai reikšmingai ir visiškai (100 proc.) užslopino *S. mutans* biologinės plėvelės vystymąsi ant polistireno paviršių, palyginti su nepaveiktomis bakterijomis. Šis atradimas gali būti pagrįstai siejamas su ilgesne alkilo grandine C8-OG cheminėje struktūroje, kuri lemia šios medžiagos stipresnį antibakterinį ir bioplėvelės raidą slopinantį poveikį. Gautus rezultatus patvirtina ir kitų mokslininkų atlikti tyrimai, kuriais nustatytas panašus C8-OG slopinamas poveikis *Bacillus subtilis* augimui ir dauginimuisi (Kubo ir kt. 2004) bei *Staphylococcus aureus* biologinės plėvelės susidarymui (Oh ir kt. 2018). Kalbant apie C12-LG, šis GR esteris taip pat kaip ir C8-OG pasižymėjo stipresniu poveikiu. C12-LG 33,5 µg/ml koncentracija statistiškai reikšmingai visiškai (100 proc.) užslopino biologinės plėvelės gamybą, palyginti su kontroline nepaveiktų bakterijų grupe. Rezultatai aiškiai rodo, kad *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą slopinantis poveikis priklauso nuo alkilo grandinės ilgio GR esteriuose. Šias išvadas pagrindžia C12-LG slopinamąjį poveikį aprašę S. Zhang'as su kolegomis (2015), kurie dirbo su *Streptococcus pneumoniae* biologinėmis plėvelėmis. Be to, biologinę plėvelę slopinančios C8-OG ir C12-LG koncentracijos, kaip ir trumpesnę alkilo grandinę turinčių GR esterių (C2-MG, C2-EG) atveju buvo mažesnės už nustatytą MSK ir pateko į labai siaurų ribų intervalą. Tai rodo, kad šis C8-OG slopinamasis aktyvumas nesusijęs su

baktericidiniu poveikiu. Tirtų GR esterių *S. mutans* biologinę plėvelę slopinantį poveikį patvirtina ir optinės profilometrijos duomenys.

Dar vienas labai svarbus *S. mutans* virulentiškumo veiksnys yra acidogeniškumas (Bedonya-Correa ir kt. 2019), nes būtent ilgą laiką trunkantis rūgščių poveikis lemia dantų ėduonies išsivystymą (Friuli ir kt. 2020). Šiame disertaciniame tyrime buvo iškeltas uždavinys ištirti, kokią poveikį GR esteriai daro mitybinės terpės, kurioje kultivuojamos *S. mutans* biologinės plėvelės, rūgštingumui. Gauti duomenys parodė, kad GR alkilo esterių koncentracijos, kurios slopina *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą, taip pat slopina ir terpės, kurioje kultivuojama bakterijų kultūra, pH rodiklio mažėjimą. Tyrimo duomenimis, C1-MG 700–1000  $\mu\text{g/ml}$ , C2-EG 700  $\mu\text{g/ml}$ , C8-OG 27,9–28,3  $\mu\text{g/ml}$  ir C12-LG 33,5  $\mu\text{g/ml}$  koncentracijos beveik visiškai užslopinė terpės pH rodiklio mažėjimą, palyginti su kontroline nepaveiktų bakterijų grupe, šis nustatytas skirtumas yra statistiškai reikšmingas ( $p < 0,05$ ). Tai netiesiogiai atspindi biologinės plėvelės acidogeniškumo mažėjimą.

Be to, tyrimas parodė, kad GR alkilo esterių tirpinimui naudotas 0,56 proc. ir 0,57 proc. dimetilo sulfoksido (DMSO) tirpalas neslopino *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymo ir nesukėlė mitybinės terpės, kurioje kultivuojama bakterijų kultūra, pH rodiklio pokyčių.

Šiame disertaciniame darbe pristatoma ir genų, kurie koduoja *S. mutans* virulentiškumo veiksnius, raiškos analizė, esant GR esterių – C2-EG, C8-OG ir C12-LG poveikiui. Literatūros duomenimis, sėslios biologinėje plėvelėje esančios *S. mutans* ląstelės, palyginti su planktoninėmis, pasižymi didesne tolerancija rūgštims, efektyviau panaudoja sacharozę (kas lemia stipresnę adheziją) bei skiriasi genų raiška (Liu ir kt. 2013, Silva ir kt. 2014). Tyrimo metu veikiant biologinėje plėvelėje esančias ląsteles C2-EG, nustatyta gana didelė genų *gtfC*, *gtfB* ir *gpbB* raiška, kuri gali būti siejama su šio GR esterio sukeltu stresu. Siekdamas sumažinti stresą, bakterijos reaguoja padidindamos genų koduojančių fermentų, kurie gamina vandenyje netirpius gliukanus, raišką. Šie fermentai būtini siekiant sukurti ekstraląstelinę polimerinę medžiagą (EPM), kuri padidina bakterinių ląstelių adheziją prie paviršių ir tarpusavyje. Kartu turėtų padidėti *gtfD*, *atpD* ir *atpF* genų raiška. Tačiau gauti rezultatai šio padidėjimo nerodo. Tai gali būti aiškinama biologinės plėvelės gamybai reikalingos pusiausvyros sutrikdymu. Kita galima priežastis ta, kad buvo sutrikdyta valdymo baltymų, kvorumo jutimo komponentų genų, tokių kaip *VicK*, ir jų produktų, raiška. M. D. Senadheera ir kt. (2005) pastebėjo, kad valdymo genų *vicRKX* raiškos padidėjimas turėjo įtakos *gpbB*, *gtfB* ir *gtfC* genų raiškos padidėjimui. Šių tyrėjų gauti rezultatai sutampa ir su vienos mokslininkų grupės (Decker ir kt. 2014) gautais duomenimis, kad *gtfC* ir *gtfB*

genų raiška padidėjo kultivuojant *S. mutans* bakterijų kultūrą terpėje su ksilitoliu. Disertacinio darbo metu buvo nustatytas didesnis raiškos koeficientas nei veikiant ksilitoliui. Genų raiškos rezultatai ne visai sutampa su kolorimetrijos, profilometrijos ir pH matavimų duomenimis. Gautų rezultatų neatitiktis gali būti paaiškinama tuo, kad C2-EG sukeltas *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymo ant polistireno ir stiklo paviršių ir acidogeniškumo slopinimas galbūt atsiranda baltymų lygmenyje ir neturi įtakos genų raiškai. Todėl norint išsiaiškinti tiesioginį C2-EG poveikį biologinę plėvelę gaminančių *S. mutans* ląstelių genų raiškai, ateityje būtina atlikti papildomus tyrimus, kad būtų galima išanalizuoti daugiau genų, kurie yra atsakingi už biologinės plėvelės vystymąsi.

Ekperimentinis tyrimas taip pat parodė, kad C8-OG poveikis biologinėje plėvelėje esančioms ląstelėms skyrėsi nuo C2-MG poveikio. Rezultatai sutampa su kolorimetrijos, profilometrijos ir pH matavimų duomenimis. Toks rezultatas gali būti paaiškinamas tuo, kad C8-OG slopina biologinių plėvelių susidarymą ant polistireno ir stiklo paviršių bei acidogeniškumą penkių genų raiškos lygmenyje. C8-OG poveikis valdymo genams, kurie reikalingi biologinės plėvelės gamybos koordinacijai, gali paaiškinti šios medžiagos poveikį gliukano sintezei ir matricos stabilumui, biologinės plėvelės gamybai. Gauti rezultatai taip pat rodo, kad sutrikus visų trijų gliukoziltransferazių veiklai, buvo slopinamas nuo sacharozės priklausomas *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymas. Todėl galima daryti prielaidą, kad C8-OG prasiskverbė į biologinės plėvelės EPM, pasiekė biologinės plėvelės gamyboje dalyvaujančias ląsteles ir sukėlė stiprų poveikį. Šiame kontekste toks genų raiškos pokytis gali paaiškinti, kodėl C2-EG neslopino gliukano sintezę koduojančių genų. Nors tyrimas su C8-OG parodė, kad ši medžiaga sukėlė penkių genų pokytį, įdomu tai, kad C12-LG poveikis genų raiškai apsiribojo tik *gtfD* genu. Taip pat svarbu pažymėti, kad *gtfD* genas koduoja GtfD, kuri gamina tirpius gliukano polimerus, kuriuos kaip pradmenis panaudoja GtfB. Tokį patį rezultatą gavo Y. Deng'as ir kt. (2021). Ateityje bus atlikta daugiau tyrimų, siekiant iširti C12-LG poveikį papildomiems genams, dalyvaujantiems biologinės plėvelės gamyboje, taip pat jų gaminamų baltymų kiekiui.

Per pastaruosius keturis dešimtmečius buvo iširta daugybė augalų ekstraktų, kurie pasižymėjo *S. mutans* biologinę plėvelę slopinančiu poveikiu (Yanagida ir kt. 2000, Nosarati ir kt. 2018, Banavar ir kt. 2017, Yabuta ir kt. 2018, Lee ir kt. 2019). Kai kurie autoriai tiria virulentiškumo genų raiškos pokyčius, tačiau šie duomenys yra gana fragmentiški. Disertacinio darbo rezultatai dar kartą patvirtina *S. mutans* formuojamų biologinių plėvelių tyrimų svarbą. *S. mutans* biologine plėvelė yra sudėtinga ir koordinuotai

valdoma struktūra. Biologinės plėvelės EPM nuolatos pertvarkoma, jos mikroaplinkai būdingi dinamiški pokyčiai, todėl tolesni ateities tyrimai turėtų būti sutelkti į EPM gamybos, struktūrinio organizavimo ir persitvarkymo valdymą genų lygmenyje, nes suteiktų naujų žinių, kurias būtų galima panaudoti kuriant naujas dantų ėduonies prevencijos priemones.

Apibendrinant galima teigti, kad GR esteriai ne tik slopina *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą, bet ir užkerta kelią terpės pH rūgštingumo didėjimui. Taip pat nustatyta, kad ilgą alkilo grandinę turintys GR esteriai pasižymi stipresniu poveikiu negu tie, kurių grandinė yra trumpa. Ilgą alkilo grandinę turintis C8-OG maisto pramonėje yra naudojamas kaip antioksidantas (Gutierrez-Larrainzar ir kt. 2013). Atsižvelgiant į tyrimo metu gautus duomenis ir ES teisės aktus, kur nurodyta C8-OG leidžiama koncentracija yra 200 mg/kg pagal maisto produkto riebalų ar aliejaus kiekį, atitinkantį 200 µg/ml, (Hurtado ir kt. 2008, Valle ir kt. 2018, 2008 m. gruodžio 16 d. ES parlamento ir tarybos reglamentas (EB) Nr. 1333/2008 dėl maisto priedų), šis junginys turi potencialą veiksmingai slopinti *S. mutans* biologinę plėvelę, kartu jis nekenkia žmogaus organizmui. Dantų ėduonis yra labai pasaulyje paplitusi įvairaus amžiaus žmonių liga (FDI, World Dental Federation 2015), todėl poreikis ieškoti efektyvių ligos prevencijos priemonių išlieka didelis. Be to, medicinoje vis dažniau keliami biologinės terapijos idėja, todėl mokslininkai aktyviai ieško ir tiria biologiškai aktyvius junginius, kurie užkirstų kelią ligos vystymuisi nedarydami žalos burnos mikroorganizmų bendrijai (Jeon ir kt. 2011, Chen ir kt. 2021). Šio disertacinio darbo rezultatai rodo, kad GR esteriai – C1-MG, C2-EG, C8-OG ir C12-LG, galėtų būti naudingi praktiniu požiūriu, t. y. naudojami gaminant dantų pastą, burnos skalavimo skysčius ir odontologijos gaminių priemones šių gaminių antikariesogeninėms savybėms pagerinti.

## 6. IŠVADOS

1. Oktilo ir laurilo galatai, turintys ilgą alkilo grandinę, efektyviau slopina *S. mutans* gyvybingumą dėl mažesnių minimalių slopinamųjų koncentracijų, palyginti su metilo ir etilo galatais, kurių alkilo grandinė yra trumpa.
2. Ilgos alkilo grandinės oktilo ir laurilo galatai veiksmingiau slopina *S. mutans* biologinės plėvelės susidarymą ant standžių paviršių (polistireno, stiklo) mažesnėmis koncentracijomis, palyginti su trumpos alkilo grandinės metilo ir etilo galatais. Šio poveikio stiprumas pasireiškia priklausomu nuo koncentracijos būdu, naudojant mažesnes už minimalias slopinamąsias galo rūgšties esterių koncentracijas.
3. Metilo, etilo, oktilo ir laurilo galatai labai sumažina rūgščių susidarymą (acidogeniškumą) *S. mutans* biologinėje plėvelėje. Šis poveikis stiprėja didėjant galo rūgšties esterių koncentracijai ir ilgėjant struktūrinei alkilo grandinei.
4. Oktilo galatas slopina visų *S. mutans* biologinės plėvelės formavimąsi lemiančių genų (*gbpB*, *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*) raišką, tačiau etilo ir laurilo galatai tokiu poveikiu nepasižymi.
5. Oktilo galatas slopina *S. mutans* biologinės plėvelės acidogeniškumą lemiančio *atpD* geno raišką, bet etilo ir laurilo galatai tokio efekto nesukelia, įskaitant etilo galato poveikį *atpF* geno raiškai.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abachi S, Lee S, Rupasinghe HP. Molecular mechanisms of inhibition of *Streptococcus* species by phytochemicals. *Molecules*. 2016; 21(2): 215.
2. Abu Bakar M, McKimm J, Haque SZ, Majumder MAA, Haque M. Chronic tonsillitis and biofilms: a brief overview of treatment modalities. *J Inflamm Res*. 2018; 11: 329–337.
3. Abu-Lafi S, Rayan M, Masalha M, Abu-Farich B, Al-Jaas H, et al. Phytochemical composition and biological activities of wild *Scolymus maculatus* L. *Medicines (Basel)*. 2019 Apr 30; 6(2): 53.
4. Abu-Reidah IM, Ali-Shtayeh MS, Jamous RM, Arráez-Román D, Segura-Carretero A. HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. *Food Chem*. 2015; 166: 179–191.
5. Achtman M, Zhou Z. Metagenomics of the modern and historical human oral microbiome with phylogenetic studies on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2020 Nov 23; 375(1812): 20190573.
6. Ajdić D, McShan WM, McLaughlin RE, Savić G, Chang J, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(22): 14434–9.
7. Ali-Shtayeh MS, Al-Assali AA, Jamous RM. Antimicrobial activity of Palestinian medicinal plants against acne-inducing bacteria. *African Journal of Microbiology Research*. 2013; 7(21): 2560–2573.
8. Almonaitis V. Klinikinė odontologija (burnos ligos). *Vaistų žinios*. Vilnius, 2008.
9. Andruskienė J. Burnos ligų epidemiologija ir profilaktika. Klaipėda, 2012.
10. Askari F, Davoodi M, Ghelichli M, Asadi I, Jazideh F. The preventive effects of silymarine extract against *Streptococcus mutans* virulence and caries development in rat model and *in vitro* condition. *Eurasian Chemical Communications*. 2020; 2(12): 1164–1171.
11. Avilés-Reyes A, Miller JH, Lemos JA, Abranches J. Collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* and related streptococci. *Mol Oral Microbiol*. 2017; 32(2): 89–106.
12. Badhani B, Sharma N, Kakkar R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Adv* 2015; 5(35): 27540–27557.
13. Banavar RS, Nirupad S, Chippagiri P, Pandurangappa R. Antibacterial effects of natural herbal extracts on *Streptococcus mutans*: can they be potential additives in dentifrices? *Int J Dent*. 2017; 2017: 4921614.

14. Baker JL, Faustoferra RC, Quivey RG Jr. Acid-adaptive mechanisms of *Streptococcus mutans* – the more we know, the more we don't. *Mol Oral Microbiol.* 2017; 32(2): 107–117.
15. Bakr RO, Wasfi R, Swilam N, Sellam IE. Characterization of the bioactive constituents of *Nymphaea alba* rhizomes and evaluation of anti-biofilm as well as antioxidant and cytotoxic properties. *J Med Plants Res.* 2016; 10: 390–401.
16. Balčiūnienė I, Kelbauskienė N. Dantų kariesas. Vilnius, 1992.
17. Bassler BL, Losick R. Bacterially speaking. *Cell.* 2006;125(2):237–46.
18. Bedoya-Correa CM, Rincón Rodríguez RJ, Parada-Sanchez MT. Genomic and phenotypic diversity of *Streptococcus mutans*. *J Oral Biosci.* 2019; 61(1): 22–31.
19. Beliaivičiūtė E. Mikroorganizmai burnoje. *Stominfo.* 2007; 5: 64–72.
20. Bescos R, Ashworth A, Cutler C, Brookes ZL, Belfield L, Rodiles A, Casas-Agustench P, Farnham G, Liddle L, Burleigh M, White D, Easton C, Hickson M. Effects of chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. *Sci Rep.* 2020 Mar 24; 10(1): 5254.
21. Besingi RN, Wenderska IB, Senadheera DB, Cvitkovitch DG, Long JR, et al. Functional amyloids in *Streptococcus mutans*, their use as targets of biofilm inhibition and initial characterization of SMU\_63c. *Microbiology (Reading).* 2017 Apr; 163(4): 488–501.
22. Bikash CR, Hamry SR, Tal-Gan Y. Structure-activity relationships of the competence stimulating peptide in *Streptococcus mutans* reveal motifs critical for membrane protease SepM recognition and ComD receptor activation. *ACS Infect Dis.* 2018 Sep 14; 4(9): 1385–1394.
23. Biswas S, Biswas I. Complete genome sequence of *Streptococcus mutans* GS-5, a serotype c strain. *J Bacteriol.* 2012; 194(17): 4787–4788.
24. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011; 45(1): 69–86.
25. Bowen H, Burne R A, Wu H, Koo H. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. *Trends Microbiol.* 2018; 26(3): 229–242.
26. Cecchi L, Innocenti M, Urciuoli S, Arlorio M, Paoli P, Mulinacci N. In depth study of phenolic profile and PTP-1B inhibitory power of cold-pressed grape seed oils of different varieties. *Food Chem.* 2019 Jan 15; 271: 380–387.
27. Chamat-Hedemand S, Dahl A, Østergaard L, Arpi M, Fosbøl E, et al. Prevalence of infective endocarditis in streptococcal bloodstream infections is dependent on streptococcal species. *Circulation.* 2020; 142: 720–730.

28. Chen X, Daliri EB, Kim N, Kim JR, Yoo D, et al. Microbial etiology and prevention of dental caries: exploiting natural products to inhibit cariogenic biofilms. *Pathogens*. 2020; 9(7): 569.
29. Chen X, Daliri EB, Tyagi A, Oh DH. Cariogenic biofilm: pathology-related phenotypes and targeted therapy. *Microorganisms*. 2021; 9(6): 1311.
30. Clarke JK. On the bacterial factor in the etiology of dental caries. *Brit J Exp Pathol*. 1924; 5: 141–147.
31. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am*. 1978; 238(1): 86–95.
32. Choubey S, Varughese LR, Kumar V, Beniwal V. Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: a patent review. *Pharm Pat Anal*. 2015; 4(4): 305–15.
33. Colby SM, Russell RRB. Sugar metabolism by mutans streptococci. *J Appl Microbiol*. 1997 Oct; 83(S1): 80S–88S.
34. Crowley PJ, Brady LJ, Michalek SM, Bleiweis AS. Virulence of a *spaP* mutant of *Streptococcus mutans* in a gnotobiotic rat model. *Infect Immun*. 1999; 67(3): 1201–6.
35. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010; 15(10): 7313–7352.
36. Daglia M, Di Lorenzo A, Nabavi SF, Talas ZS, Nabavi SM. Polyphenols: well beyond the antioxidant capacity: gallic acid and related compounds as neuroprotective agents: you are what you eat! *Curr Pharm Biotechnol*. 2014; 15(4): 362–72.
37. Davis PH. (ed.) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands 4*: Edinburgh University Press, Edinburgh, 1972, p. 1–657.
38. Daukšas K, Barkauskas J, Daukšas V, Daumantas E, Kabailienė M, et al. *Chemijos terminų aiškinamasis žodynas*. Vilnius, 2003.
39. Decker EM, Klein C, Schwindt D, von Ohle C. Metabolic activity of *Streptococcus mutans* biofilms and gene expression during exposure to xylitol and sucrose. *Int J Oral Sci*. 2014 Dec; 6(4): 195–204.
40. Deng Y, Yang Y, Zhang B, Chen H, Lu Y, et al. The *vicK* gene of *Streptococcus mutans* mediates its cariogenicity via exopolysaccharides metabolism. *Int J Oral Sci*. 2021; 13(1): 45.
41. Dwivedi D, Singh V. Effects of the natural compounds embelin and piperine on the biofilm-producing property of *Streptococcus mutans*. *J Tradit Complement Med*. 2015; 6(1): 57–61.
42. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002; Sep 8 (9): 881–890.
43. Dharmaratne MPJ, Manoraj A, Thevanesam V, Ekanayake A, Kumar NS, et al. *Terminalia bellirica* fruit extracts: *in vitro* antibacterial



- activity against selected multidrug-resistant bacteria, radical scavenging activity and cytotoxicity study on BHK–21 cells. *BMC Complementary Altern Med.* 2018; 18: 325.
44. FDI, World Dental Federation. The challenge of oral disease – a call for global action. The oral health atlas. 2nd ed. Geneva. 2015.
  45. Filoche SK, Soma D, Bekkum M, Sissons CH. Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral-antiseptic treatment. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 54: 27–36.
  46. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8: 623–633.
  47. Fleming D, Rumbaugh KP. Approaches to dispersing medical biofilms. *Microorganisms.* 2017 Apr 1; 5(2): 15.
  48. Freires IA, Lemos JA, Abranches J. A new perspective of an old villain: revisiting biomarkers of caries development. *E Bio Medicine.* 2017; 25: 14–15.
  49. Freudenberg K. The vegetable tannins. *Nature.* 1929; 124: 697–699.
  50. Friuli S, Colombo S, De Giorgio S, Paglia M. Added sugar intake: carious disease in children and systemic implications in adults. *Italian Journal of Dental Medicine.* 2020; 5(1).
  51. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc.* 2018;81(1):7–11.
  52. Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res.* 2011; 45(3): 243–63.
  53. Jeong SI, Kim BS, Keum KS, Lee KH, Kang SY, et al. Kaurenoic acid from *Aralia continentalis* inhibits biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013: 160592.
  54. Jordan-Thaden IE, Chanderbali AS, Gitzendanner MA, Soltis DE. Modified CTAB and TRIzol protocols improve RNA extraction from chemically complex Embryophyta. *Appl Plant Sci.* 2015 May 13; 3(5).
  55. Hollmann B, Perkins M, Walsh D. Biofilms and their role in pathogenesis. *British Society for Immunology.* Prieiga internete: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/pathogens-and-disease/biofilms-and-their-role-in>.
  56. Hong Q, Dong X, Chen M, Xu Y, Sun H, et al. Disinfection of *Streptococcus mutans* biofilm by a non-thermal atmospheric plasma brush. *Jpn J Appl Phys.* 2016; 55 (07LG02).
  57. Høiby N. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. *Pathog Dis.* 2014; 70(3): 205–11.

58. Hubková B, Veliká B, Birková A, Guzy J, Mareková M. Hydroxybenzoic acids and their derivatives as peroxydinitrite scavengers. *Free Radic Biol Med.* 2014; 75(1): S33–4.
59. Hurtado C, Bustos MJ, Sabina P, Nogal ML, Granja AG, González ME, et al. Antiviral activity of lauryl gallate against animal viruses. *Antivir Ther.* 2008; 13(7): 909–17.
60. Gabe V, Kacergius T, Abu-Lafi S, Kalesinskas P, Masalha M, et al. Inhibitory effects of ethyl gallate on *Streptococcus mutans* biofilm formation by optical profilometry and gene expression analysis. *Molecules.* 2019; 24(3): 529.
61. Gabe V, Kacergius T, Abu-Lafi S, Zeidan M, Abu-Farich B, et al. Suppressive effects of octyl gallate on *Streptococcus mutans* biofilm formation, acidogenicity, and gene expression. *Molecules.* 2019; 24(17): 3170.
62. Gabe V, Zeidan M, Kacergius T, Bratchikov M, Falah M, Rayan A. Lauryl gallate activity and *Streptococcus mutans*: its effects on biofilm formation, acidogenicity and gene expression. *Molecules.* 2020 Aug 13; 25(16): 3685.
63. Gong Y, Tian XL, Sutherland T, Sisson G, Mai J, et al. Global transcriptional analysis of acid-inducible genes in *Streptococcus mutans*: multiple two-component systems involved in acid adaptation. *Microbiology (Reading).* 2009 Oct; 155(Pt 10): 3322–3332.
64. Grabauskas V ir kt. *Medicinos enciklopedija*, 1 tomas: A–M. Vilnius, 1991; 544 p.
65. Grigalauskiene R, Slabšinskiene E, Vasiliauskiene I. Biological approach of dental caries management. *Stomatologija.* 2015; 17(4): 107–12.
66. Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, Firestone ND, Leys EJ, et al. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PLoS One.* 2012; 7(10): e47722.
67. Guideline: Sugars intake for adults and children. Geneva: World Health Organization, 2015.
68. Guo L, McLean JS, Lux R, He X, Shi W. The well-coordinated linkage between acidogenicity and aciduricity via insoluble glucans on the surface of *Streptococcus mutans*. *Sci Rep.* 2015 Dec 10; 5: 18015.
69. Gutierrez ASA, Guo J, Feng J, Tan L, Kong L. Inhibition of starch digestion by gallic acid and alkyl gallates. *Food Hydrocolloids.* 2020; 108(4): 106009.
70. Gutierrez-Larrainzar M, Rúa J, de Arriaga D, del Valle P, García-Armesto MR. *In vitro* assessment of synthetic phenolic antioxidants for

- inhibition of foodborne *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens*. Food Control, 2013; 30: 393–399.
71. Kacergius T, Abu Lafi S, Kirkliauskiene A, Gabe V, Adawi A, et al. Inhibitory capacity of *Rhus coriaria* L. extract and its major component methyl gallate on *Streptococcus mutans* biofilm formation by optical profilometry: potential applications for oral health. Mol Med Rep. 2017; 16(1): 949–956.
  72. Kačergius T, Kiverytė S. Mikrobiologija odontologijoje. Vilnius, 2008.
  73. Kang MS, Oh JS, Kang IC, Hong SJ, Choi CH. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. J Microbiol. 2008; 46(6): 744–50.
  74. Kalesinskas P, Kačergius T, Ambrozaitis A, Jimbo R, Ericson D. *Streptococcus mutans* biofilm inhibition using antisense oligonucleotide to glucosyltransferases B and C. Acta medica Lituanica. 2015; 22(2): 85–92.
  75. Kalesinskas P, Kačergius T, Ambrozaitis A, Pečiulienė V, Ericson D. Reducing dental plaque formation and caries development. A review of current methods and implications for novel pharmaceuticals. Stomatologija. 2014; 16(2): 44–52.
  76. Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. Trends Microbiol. 2020 Aug; 28(8): 668–681.
  77. Kaspar JR, Godwin MJ, Velsko IM, Richards VP, Burne RA. Spontaneously arising *Streptococcus mutans* variants with reduced susceptibility to chlorhexidine display genetic defects and diminished fitness. Antimicrob Agents Chemother. 2019 Jun 24; 63(7): e00161–19.
  78. Kidd E, Fejerskov O. Dantų eduonies pagrindai. Kaunas, 2019.
  79. Kim B, Park JS, Choi HY, Kwak JH, Kim WG. Differential effects of alkyl gallates on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Sci Rep. 2019 May 23; 9(1): 7741.
  80. Kim D, Sengupta A, Niepa TH, Lee BH, Weljie A, et al. *Candida albicans* stimulates *Streptococcus mutans* microcolony development via cross-kingdom biofilm-derived metabolites. Sci Rep. 2017 Jan 30; 7: 41332.
  81. Kim JE, Go J, Koh EK, Song SH, Sung JE, et al. Gallotannin-enriched extract isolated from *Galla Rhois* may be a functional candidate with laxative effects for treatment of loperamide-induced constipation of SD rats. PLoS One. 2016 Sep 12; 11(9): e0161144.
  82. Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. Nat Rev Microbiol. 2017 Dec; 15(12): 740–755.

83. Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2017 Dec; 15(12): 740–755.
84. Kratz JM, Andrighetti-Fröhner CR, Leal PC, Nunes RJ, Yunes RA, et al. Evaluation of anti-HSV-2 activity of gallic acid and pentyl gallate. *Biol Pharm Bull.* 2008 May; 31(5): 903–7.
85. Krishnan K, Chen T, Paster BJ. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Dis.* 2017; 23(3): 276–286.
86. Krzyściak W, Jurczak A, Koscielniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33(4): 499–515.
87. Kubo I, Fujita K, Nihei K, Nihei A. Antibacterial activity of akyl gallates against *Bacillus subtilis*. *J Agric Food Chem.* 2004 Mar 10; 52(5): 1072–6.
88. Kumar G, Jalaluddin M, Rout P, Mohanty R, Dileep CL. Emerging trends of herbal care in dentistry. *J Clin Diagn Res.* 2013; 7(8): 1827–1829.
89. Lamont RJ, Hajishengallis GN, Jenkinson HF. Oral microbiology and immunology. (2 ed.) ASM Press, 2013.
90. Liao S, Klein MI, Heim KP, Fan Y, Bitoun JP, et al. *Streptococcus mutans* extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. *J Bacteriol.* 2014; 196: 2355–2366.
91. Liu J, Ling J-Q, Zhang K, Wu DC. Physiological properties of *Streptococcus mutans* UA159 biofilm-detached cells. *FEMS Microbiology Letters.* 2013; 340(1): 11–18.
92. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4): 402–8.
93. Lee JH, Jo YW. Antimicrobial effect of a lauric acid on *Streptococcus mutans* biofilm. *Annals of International medical and Dental Research.* 2016; 2.
94. Lee SG, Pancholi V, Fischetti VA. Characterization of a unique glycosylated anchor endopeptidase that cleaves the LPXTG sequence motif of cell surface proteins of Gram-positive bacteria. *J Biol Chem.* 2002 Dec 6; 277(49): 46912–22.
95. Lee YC, Cho SG, Kim SW, Kim JN. Anticariogenic potential of Korean native plant extracts against *Streptococcus mutans*. *Planta Med.* 2019; 85(16): 1242–1252.

96. Lemos JA, Brown TA Jr, Burne RA. Effects of RelA on key virulence properties of planktonic and biofilm populations of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*. 2004 Mar; 72(3): 1431–40.
97. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, et al. The biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr*. 2019; 7(1): 10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018.
98. Leung V, Dufour D, Lévesque CM. Death and survival in *Streptococcus mutans*: differing outcomes of a quorum-sensing signaling peptide. *Front Microbiol*. 2015 Oct 23; 6: 1176.
99. Luo R, Zhang B, Zhang H, Yang L, Wang Y. Tannic and gallic acid conversion coatings. In: Saji VS, Sankara Narayanan TSN, Chen X. (eds) *Conversion coatings for magnesium and its alloys*. Springer. Cham, 2022; p. 261–276.
100. Lynch DJ, Fountain TL, Mazurkiewicz JE, Banas JA. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. *FEMS Microbiol Lett*. 2007 Mar; 268(2): 158–65.
101. Mačiulskienė V. Dantų eduonis: šiuolaikinis požiūris į ligos gydymą ir kontrolę. *Odontologų rūmų žinios*. 2014; 1: 18–19.
102. Mandal SM, Chakraborty D, Dey S. Phenolic acids act as signaling molecules in plant–microbe symbioses. *Plant Signal Behav*. 2010; 5: 59–368.
103. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. 2015; 3: 31.
104. Martins S, Mussatto SI, Martínez-Avila G, Montañez-Saenz J, Aguilar CN, et al. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnol Adv*. 2011; 29(3): 365–73.
105. Masalha M, Rayan M, Adawi A, Abdallah Z, Rayan A. Capturing antibacterial natural products with in silico techniques. *Mol Med Rep*. 2018 Jul; 18(1): 763-770.
106. Mattos-Graner RO, Jin S, King WF, Chen T, Smith DJ, et al. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. *Infect Immun*. 2001 Nov; 69(11): 6931–41.
107. Matsumoto-Nakano M. Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation. *Jpn Dent Sci Rev*. 2018; 54(1): 22–29.
108. Mieher JL, Larson MR, Schormann N, Purushotham S, Wu R, et al. Glucan binding protein C of *Streptococcus mutans* mediates both sucrose-independent and sucrose-dependent adherence. *Infect Immun*. 2018 Jun 21; 86(7): e00146–18.
109. Mitchell TJ. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol*. 2003; 1(3): 219–30.

110. Mohan S, Thiagarajan K, Chandrasekaran R. Evaluation of ethyl gallate for its antioxidant and anticancer properties against chemical-induced tongue carcinogenesis in mice. *Biochem. J.* 2017; 474: 3011–3025.
111. Montvilaitė G, Jurkevičiūtė J, Ružienė N. Polifenolinių junginių ir antocianų kiekio nustatymas skirtingų rūšių uogose. *Įžvalgos. Jaunųjų tyrėjų darbai*, 2016. 2019; 1(12).
112. Moynihan P, Petersen PE. Diet, nutrition and the prevention of dental diseases. *Public Health Nutr.* 2004; 7(1A): 201–26.
113. Mukherjee S, Bassler BL. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nat Rev Microbiol.* 2019; 17(6): 371–382.
114. Nagasawa R, Sato T, Senpuku H. Raffinose induces biofilm formation by *Streptococcus mutans* in low concentrations of sucrose by increasing production of extracellular DNA and fructan. *Appl Environ Microbiol.* 2017 Jul 17; 83(15): e00869–17.
115. Naka S, Wato K, Misaki T, Ito S, Nagasawa Y, et al. Intravenous administration of *Streptococcus mutans* induces IgA nephropathy-like lesions. *Clin Exp Nephrol.* 2020; 24(12): 1122–1131.
116. Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res.* 2009; 19(4): 636–43.
117. Nayeem N, Asdaq SMB, Salem H, AHEI-Alfay S. Gallic acid: a promising lead molecule for drug development. *J App Pharm.* 2016; 8: 213.
118. Nima G, Harth-Chu E, Hiers RD, Pecorari VGA, Dyer DW, et al. Antibacterial efficacy of non-thermal atmospheric plasma against *Streptococcus mutans* biofilm grown on the surfaces of restorative resin composites. *Sci Rep.* 2021; 11: 23800.
119. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009 Sep; 73(3): 407–50, Table of Contents.
120. Nowak AJ, Christensen JR, Mabry TR, Townsend JA, Wells MH. *Pediatric dentistry: infancy through adolescence expert consult*, 6th Edition. 2019; p. 169–179.
121. Oh E, Bae J, Kumar A, Choi HJ, Jeon B. Antioxidant-based synergistic eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms with bacitracin. *Int J Antimicrob Agents.* 2018; 52(1): 96–99.
122. Olmo JA-D, Ruiz-Rubio L, Pérez-Alvarez L, Sáez-Martínez V, Vilas-Vilela JL. Antibacterial coatings for improving the performance of biomaterials. *Coatings.* 2020; 10(2): 139.
123. Ortega E, Sadaba MC, Ortiz AI, Cespon C, Rocamora A, et al. Tumoricidal activity of lauryl gallate towards chemically induced skin tumours in mice. *Br J Cancer.* 2003; 88(6): 940–3.

124. Pan Y, An H, Fu T, Zhao S, Zhang C, Xiao G, et al. Characterization of *Streptococcus plurimalium* from a cattle with mastitis by whole genome sequencing and functional validation. *BMC Microbiol.* 2018; 18(1): 182.
125. Paaver U, Matto V, Raal A. Total tannin content in distinct *Quercus robur* L. galls. *Journal of Medicinal Plants Research.* 2010; 4(8): 702–705.
126. Pengelly A. An introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine. The constituents of medicinal plants (2nd ed.). Allen&Unwin. 2004; p. 29–30.
127. Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, et al. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet.* 2019; 394(10194): 249–260.
128. Pitts NB, Zero D T, Marsh P D, Ekstrand K, Weintraub J A, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers.* 2017; 3: 17030.
129. Praškevičius A, Burneckienė J. Kaulų, dantų ir seilių biochemija. Kaunas, 2000.
130. Póntigo F, Moraga M, Flores SV. Molecular phylogeny and a taxonomic proposal for the genus *Streptococcus*. *Genet Mol Res.* 2015; 14(3): 10905–18.
131. Pūrienė A. Burnos higienisto veikla: teorija ir praktika. Vilnius, 2008.
132. Rais J, Jafri A, Siddiqui S, Tripathi M, Arshad M. Phytochemicals in the treatment of ovarian cancer. *Frontiers in Bioscience-Elite.* 2017; 9(1); 67–75.
133. Rendeková K, Fialová S, Jánošová L, Mučaji P, Slobodníková L. The activity of *Cotinus coggygria* Scop. leaves on *Staphylococcus aureus* strains in planktonic and biofilm growth forms. *Molecules.* 2015; 21(1): E50.
134. Rossiter SE, Fletcher MH, Wuest WM. Natural products as platforms to overcome antibiotic resistance. *Chem Rev.* 2017 Oct 11; 117(19): 12415–12474.
135. Ruby JD, Cox CF, Akimoto N, Meada N, Momoi Y. The caries phenomenon: a timeline from witchcraft and superstition to opinions of the 1500s to today's science. *Int J Dent.* 2010; 2010: 432767.
136. Rutherford ST, Bassler BL. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2(11): a012427.
137. Sales MS, Roy A, Antony L, Banu SK, Jeyaraman S, Manikkam R. Octyl gallate and gallic acid isolated from *Terminalia bellarica* regulates normal cell cycle in human breast cancer cell lines. *Biomed. Pharm.* 2018; 103: 1577–1584.

138. Saxena M, Saxena J, Nema R, Singh D, Gupta A. Phytochemistry of medicinal plants. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*. 2013; 1(6): 168–182.
139. Seminario A, Broukal Z, Ivančáková R. Mutans streptococci and the development of dental plaque. *Prague medical report*. 2005; 106(4): 349–58.
140. Silva A, Stipp R, Mattos-Graner R, Sampaio F, Araújo D. Influence of sub-lethal and lethal concentrations of chlorhexidine on morphology and glucosyltransferase genes expression in *Streptococcus mutans* UA159. *Advances in Microbiology*. 2014; 4: 945–954.
141. Silverstone LM, Johnson NW, Hardie JM, Williams RAD. The microbiology of dental caries. *Dental Caries*. Palgrave, London. 1981.
142. Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019; 8: 76.
143. Shavandi A, Bekhit AEA, Saeedi P, Izadifar Z, Bekhit AA, et al. Polyphenol uses in biomaterials engineering. *Biomaterials*. 2018 Jun; 167: 91–106.
144. Scharnow AM, Solinski AE, Wuest WM. Targeting *S. mutans* biofilms: a perspective on preventing dental caries. *Med chem comm*. 2019; 10(7): 1057–1067.
145. Shemesh M, Tam A, Feldman M, Steinberg D. Differential expression profiles of *Streptococcus mutans* *fff*, *gtf* and *vicR* genes in the presence of dietary carbohydrates at early and late exponential growth phases. *Carbohydr Res*. 2006 Sep 4; 341(12): 2090–7.
146. Senadheera MD, Guggenheim B, Spatafora GA, Huang YC, Choi J, et al. A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects *gtfBCD*, *gbpB*, and *fff* expression, biofilm formation, and genetic competence development. *J Bacteriol*. 2005; 187 (12): 4064–4076.
147. Slobodníková L, Fialová S, Rendeková K, Kováč J, Mučaji P. Antibiofilm activity of plant polyphenols. *Molecules*. 2016; 21(12): 1717.
148. Smullen J, Koutsou GA, Foster HA, Zumbe A, Storey DM. The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Res*. 2007; 41: 342–349.
149. Spellerberg B, Brandt C. *Streptococcus*. *Manual of clinical microbiology*. Washington, DC, 2015: p. 383–402.
150. Struzycka I. The oral microbiome in dental caries. *Pol J Microbiol*. 2014; 63(2): 127–35.
151. Thakur A, Sharma R. Health promoting phytochemicals in vegetables: A Mini Review. *Intl J Food Ferment Technol*. 2018; 8(2): 107–117.



152. Thomas R, Butler E, Macchi, Williams M. Phytochemicals in cancer prevention and management? BJMP. 2015; 8(2): a815.
153. Tonomura S, Ihara M, Kawano T, Tanaka T, Okuno Y, et al. Intracerebral hemorrhage and deep microbleeds associated with cnm-positive *Streptococcus mutans*; a hospital cohort study. Sci Rep. 2016; 6: 20074.
154. Turner CG, Machado LMC. A new dental wear pattern and evidence for high carbohydrate consumption in a brazilian archaic skeletal population. American Journal of Physical Anthropology. 1983: 61: 125–30.
155. Zaman SB, Hussain MA, Nye R, Mehta V, Mamun KT, Hossain N. A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. Cureus. 2017; 9(6): e1403.
156. Zhang G, Lu M, Liu R, Tian Y, Vu VH, Li Y, Liu B, Kushmaro A, Li Y, Sun Q. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation and virulence by *Lactobacillus plantarum* K41 isolated from traditional Sichuan Pickles. Front Microbiol. 2020 Apr 30; 11: 774.
157. Zhang S, Wang J, Xu W, Liu Y, Wang W, Wu K, et al. Antibacterial effects of traditional chinese medicine monomers against *Streptococcus pneumoniae* via inhibiting pneumococcal histidine kinase (VicK). Front Microbiol. 2015; 6: 479.
158. Zhu L, Kreth J, Cross SE, Gimzewski JK, Shi W, Qi F. Functional characterization of cell-wall-associated protein WapA in *Streptococcus mutans*. Microbiology (Reading). 2006 Aug; 152(Pt 8): 2395–2404.
159. Zhuang PL, Yu LX, Tao Y, Zhou Y, Zhi QH, Lin HC. Effects of missense mutations in sortase A gene on enzyme activity in *Streptococcus mutans*. BMC Oral Health. 2016 Apr 11; 16: 47.
160. Valle P, Rosario Garcia-Armesto M, Campos J, Posado-Fernandez A, et al. Antimicrobial effects of gallic acid, octyl gallate and propyl gallate on *Carnobacterium divergens* and *Leuconostoc carnosum* originating from meat. J Food Nutr Res. 2018; 57: 76–86.
161. Vasudevan R. Biofilms: microbial cities of scientific significance. J Microbiol Exp. 2014; 1(3): 84–98.
162. Vert M, Doi Y, Hellwich K-H, Hess M, Hodge P, et al. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC recommendations 2012). Pure Appl. Chem. 2012; 84(2): 377–410.
163. Vestby LK, Grønseth T, Simm R, Nesse LL. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. Antibiotics (Basel). 2020; 9(2): 59.
164. Visuotinė lietuvių enciklopedija. Prieiga internete: <https://www.vle.lt>.

165. Wang X, Zhai W, Wu C, Ma B, Zhang J, et al. Procyanidins-crosslinked aortic elastin scaffolds with distinctive anti-calcification and biological properties. *Acta Biomater.* 2015 Apr; 16: 81–93.
166. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc.* 2008; 3(2): 163–75.
167. Willis JR, Gabaldón T. The human oral microbiome in health and disease: from sequences to ecosystems. *Microorganisms.* 2020 Feb 23; 8(2): 308.
168. Whaley RA, Hardie JM. *Streptococcus*. *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria.* 2015.
169. Yabuta Y, Mukoyama H, Kaneda Y, Kimura N, Bito T, et al. A lemon myrtle extract inhibits glucosyltransferases activity of *Streptococcus mutans*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2018; 82(9): 1584–1590.
170. Yanagida A, Kanda T, Tanabe M, Matsudaira F, Oliveira Cordeiro JG. Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors of mutans streptococci. *J Agric Food Chem.* 2000; 48(11): 5666–71.
171. Yang K, Zhang L, Liao P, Xiao Z, Zhang F, et al. Impact of gallic acid on gut health: focus on the gut microbiome, immune response, and mechanisms of action. *Front Immunol.* 2020 Sep 16; 11: 580208.
172. Yon MJY, Gao SS, Chen KJ, Duangthip D, Lo ECM, et al. Medical model in caries management. *Dent J.* 2019; 7(2): 37.
173. You Y-O. Virulence genes of *Streptococcus mutans* and dental caries. *International Journal of Oral Biology.* 2019; 44(2): 31–36.
174. Yu OY, Zhao IS, Mei ML, Lo EC, Chu CH. Dental biofilm and laboratory microbial culture models for cariology research. *Dent J.* 2017; 5(2): 21.
175. Yumoto H, Hirota K, Hirao K, Ninomiya M, Murakami K, et al. The pathogenic factors from oral streptococci for systemic diseases. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(18): 4571.

## SANTRAUKA

### SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

*„The scientific man does not aim at an immediate result. He does not expect that his advanced ideas will be readily taken up. His work is like that of the planter – for the future. His duty is to lay the foundation for those who are to come, and point the way.“*

Nikola Tesla

## ABBREVIATIONS

ATCC	American Type Culture Collection
<i>atpD</i>	The gene encoding the $\beta$ subunit of the $F_1F_0$ -ATPase $F_1$ protein complex
<i>atpF</i>	The gene encoding the b subunit of the $F_1F_0$ -ATPase $F_0$ protein complex
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFU	Colony forming units
CHX	Chlorhexidine
C1-MG	Methyl gallate
C2-EG	Ethyl gallate
C8-OG	Octyl gallate
C12-LG	Lauryl gallate
dH <sub>2</sub> O	Distilled water
ddH <sub>2</sub> O	Deionized water
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EPS	Extracellular polymeric substance
ERY	Erythromycin
Ftf	Fructosyltransferase
GA	Gallic acid
GbpB	Glucan-binding protein B
<i>gbpB</i>	The gene encoding glucan-binding protein B
Gtf	Glucosyltransferase
GtfB	Glucosyltransferase B
<i>gtfB</i>	The gene encoding glucosyltransferase B
GtfC	Glucosyltransferase C
<i>gtfC</i>	The gene encoding glucosyltransferase C
GtfD	Glucosyltransferase D
<i>gtfD</i>	The gene encoding glucosyltransferase D
$\mu$ m	Micrometer
MIC	Minimum inhibitory concentration
OD	Optical density
<i>p</i>	Level of statistical significance
pH	Hydrogen ion concentration indicator
qRT-PCR	Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction

RNA	Ribonucleic acid
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
THB	Todd Hewitt broth
USA	United States of America
WHO	World Health Organization

# 1. INTRODUCTION

## 1.1. Importance of the Work

A biofilm is a collection of microorganisms, in which the cells of microorganisms are surrounded by their own extracellular polymeric substance (EPS), which helps them not only to connect with each other, but also to connect to a rigid surface (Vert et al. 2012). It is known that EPS provides protection from adverse environmental conditions to the cells of microorganisms in the biological film and enables them to communicate with each other with the help of chemical signals. As a result, biofilm-forming microorganisms acquire resistance and cause chronic and difficult-to-treat diseases (Dwivedi et al. 2015, Sharma et al. 2019, Yu et al. 2017, Yumoto et al. 2019).

*Streptococcus mutans* is a commensal species of bacteria found in human oral biofilms that continuously form on the surface of the teeth, gums and tongue (Bedoya-Correa et al. 2019, Hong et al. 2016). Normally, relatively low levels of *S. mutans* bacteria are found in the mouths of healthy individuals (Gross et al. 2012). However, various changes in the human body and the local environment, which occur, for example, by consuming a lot of refined sugar and other carbohydrates, can lead to the invasion of this bacterium in the biofilm of the teeth and then its homeostasis is disturbed, because sugar and other carbohydrates in food are fermented by *S. mutans* very quickly to organic acids that accumulate on the tooth surface and cause demineralization of the hard tissues (enamel, dentin, cementum), thus tooth decay develops (Chen et al. 2021, Kiid et al. 2019). Mutant streptococcus is often identified as the causative agent of primary and recurrent dental caries, so the problem of inhibition of cariogenic films is relevant throughout a person's life (FDI, World Dental Federation 2015, Nima et al. 2021). Unfortunately, despite the abundant supply of preventive measures, dental caries still remains one of the most common diseases in the world (Bowen et al. 2018, Peres et al. 2019). This is because, of all the microorganisms found in the mouth, *S. mutans* is the best adapted to survive in the mouth and colonize its surfaces.

One of the main determinants of *S. mutans* cariogenicity is the ability of this bacterium to form a biofilm (Matsumoto-Nakano 2018). Structurally, the EPS of *S. mutans* biofilm is composed of glucan polymers, the production of which is carried out by three isoforms of the enzyme glucosyltransferase (Gtf) – GtfB, GtfC and GtfD encoded by the *gtfB*, *gtfC* and *gtfD* genes, respectively (Jeong et al. 2013). GtfB and GtfC are involved in the production of insoluble glucans, which make up the majority of the EPS, while GtfD is only involved

in the production of soluble glucans (Kidd et al. 2019). It is believed that glucans increase the porosity of the biofilm, allowing sugar and other carbohydrates to penetrate into its deeper layers, and also trap acids and thus contribute to the demineralization process of the hard dental tissues (Guo et al. 2015). Glucans are not involved in the initial adhesion to the tooth surface, they can connect only if the pellicle contains glucan-binding proteins (Mieher et al. 2018). *S. mutans* produces four structurally distinct variants of Gbp, GbpA, GbpB, GbpC and GbpD, produced by the *gbpA*, *gbpB*, *gbpC*, *gbpD* genes, respectively (Lemos et al. 2019, Mieher et al. 2018, You 2019).

Another important virulence factor of *S. mutans* biofilm is the production of acids (acidogenicity), which is directly related to the demineralization process of dental tissue and the formation of carious cavities (Guo et al. 2015). The acidogenicity of the cariogenic film is supported by F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-H/ATPase, which works in an acidic environment – it transports hydrogen protons (H<sup>+</sup>) from the inside of the bacterial cell to the outside (Lamont et al. 2013). F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-H/ATPase composed of a membrane-embedded F<sub>0</sub> protein complex and a peripheral F<sub>1</sub> protein complex, the major subunits b and β of which are encoded by the *atpF* and *atpD* genes, respectively (Gong et al. 2009).

As the increasing resistance of *S. mutans* to the chemical substances commonly used in clinical practice has recently been observed, and their frequent use has a negative effect on the oral microbiome and often has side effects, there is a search for antimicrobial substances that selectively inhibit the formation of cariogenic films (Chen et al. 2021, Lee et al. 2019). Currently, phytochemicals are receiving a lot of attention, i.e., biologically active chemical compounds found in plants that, unlike synthetic antimicrobials, usually do not cause side effects and help create healthy ecosystems (Abu-Lafi et al. 2019, Chen et al. 2020, Masalha et al. 2018, Rossiter et al. 2017). Plants and their fruits are rich in phytochemicals such as polyphenols – gallic acid (GA) and its derivatives, which have many beneficial properties. GA alkyl esters such as methyl, propyl, octyl, and lauryl gallates have been widely used in food, pharmaceutical and cosmetic products as antioxidants for many years (Kim et al. 2019). According to various authors, alkyl esters of GA have antibacterial (Badhani et al. 2015, Valle et al. 2018), antiviral (Hurtado et al. 2008), anticancer (Sales et al. 2018) and neuroprotective (Nayeem et al. 2016) properties. However, there is a lack of data in the literature on the use of GA alkyl esters with different structural chains to inhibit *S. mutans* biofilm formation and acidogenicity.

## 1.2. Aim of the Study

To investigate the effectiveness of gallic acid esters – methyl, ethyl, octyl and lauryl gallates in inhibiting *S. mutans* biofilm formation and its dependence on the length of the structural alkyl chain.

## 1.3. Objectives of the Study

1. To evaluate the effects of methyl, ethyl, octyl and lauryl gallates on the viability of *S. mutans* by determining their minimum inhibitory concentrations.
2. To determine the efficacy of the impact of methyl, ethyl, octyl and lauryl gallates on the quantitative formation of *S. mutans* biofilm on rigid surfaces (polystyrene, glass) and the dependence on the length of the structural alkyl chain.
3. To investigate the ability of methyl, ethyl, octyl and lauryl gallates to inhibit acid formation (acidogenicity) in *S. mutans* biofilm.
4. To determine the effects of ethyl, octyl and lauryl gallates on the quantitative expression of genes (*gbpB*, *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*) determining the formation of *S. mutans* biofilm.
5. To evaluate the effects of ethyl, octyl and lauryl gallates on the quantitative expression of genes determining the acidogenicity of *S. mutans* biofilm:
  - 5.1. ethyl gallate – *atpD* and *atpF* gene expressions;
  - 5.2. octyl and lauryl gallates – *atpD* gene expressions.

## 1.4. Novelty of the Study

The increasing resistance of *S. mutans* to antimicrobial agents makes it necessary to search for new dental caries prevention measures (Chen et al. 2021), which would help to selectively inhibit the formation of cariogenic biofilms and, at the same time, have a favorable effect on the oral microbiome; therefore, biologically active compounds found in plants – GA esters (gallates) – were chosen for the study. Although methyl and ethyl gallates with a short alkyl chain and octyl and lauryl gallates with a long chain are widely studied and have been used in industry for a long time, there is no data in the literature about the effect of these compounds on the formation of *S. mutans* biofilm and acidogenicity.

The present work introduces the established inhibitory effect of GA esters – methyl, ethyl, octyl and lauryl gallates – on the formation of *S. mutans*



biofilm on rigid surfaces (polystyrene, glass) *in vitro*, the strength of which depends on the length of the structural alkyl chain. The efficacy of GA esters with different alkyl chain lengths against cariogenic biofilm formation has been investigated using colorimetry, profilometry methods and gene expression analysis for the first time. In addition, this work presents the results of the hitherto unexplored effects of GA esters on acidogenicity, which show that alkyl gallates reduce the acidogenicity of *S. mutans* biofilm.

### 1.5. Practical Value of the Study

The data presented in the work extends the knowledge of the expression of *S. mutans* virulence factors at the gene level, the important communication mechanisms of these bacteria during the formation of a biofilm under the influence of GA esters. The data presented can serve in further studies into cariogenic biofilms.

The results obtained are significant not only from a scientific, but also from practical point of view. Long alkyl gallic acid esters with lower active concentrations can be used to treat streptococcal and other infections. Furthermore, at low doses, they can be combined with antibiotics to produce a synergistic antimicrobial effect, reducing antibiotic doses and thus addressing the problem of bacterial resistance to antimicrobial agents in medicine.

The applied value of the work is really high. Gallic acid esters could be used to inhibit the formation of *S. mutans* biofilms *in vivo* in order to reduce bacterial aggregation and adhesion to rigid surfaces as well as acidogenicity. Research data can be used in the development of new pharmaceutical means for the prevention of dental caries.

### 1.6. Defensive Statements

1. Gallic acid esters – methyl, ethyl, octyl and lauryl gallates inhibit the formation of *S. mutans* biofilm at concentrations lower than the minimum that inhibit *S. mutans* bacteria.
2. Gallic acid esters – methyl, ethyl, octyl and lauryl gallates are effective in reducing *S. mutans* biofilm formation on rigid surfaces and this effect depends on the length of the structural alkyl chain.
3. Gallic acid esters – methyl, ethyl, octyl and lauryl gallates reduce the acidogenicity of *S. mutans* biofilm.

## 2. METHODS

### 2.1. Investigation Progress and Execution Stages

The research was carried out at the Laboratory of the Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine (FBMLM) of the Institute of Biomedical Sciences of the Faculty of Medicine of Vilnius University (VU MF) in cooperation with the researchers of the Scientific Research Center of the Al-Qasemi Academy (SRC, Israel) between 2015 and 2017.

Al-Qasemi Academy SRC researchers prepared extracts from Sicilian sumac (*Rhus coriaria* L.), baheda (*Terminalia bellirica*) fruits, and grapevine (*Vitis vinifera*) seeds using solvents of different polarity and extracted individual fractions by chromatography, where they found a high level of methyl gallate, respectively (C1-MG), ethyl (C2-EG) and octyl (C8-OG) gallates (Kacergius et al. 2017, Gabe et al. 2019, 2020).

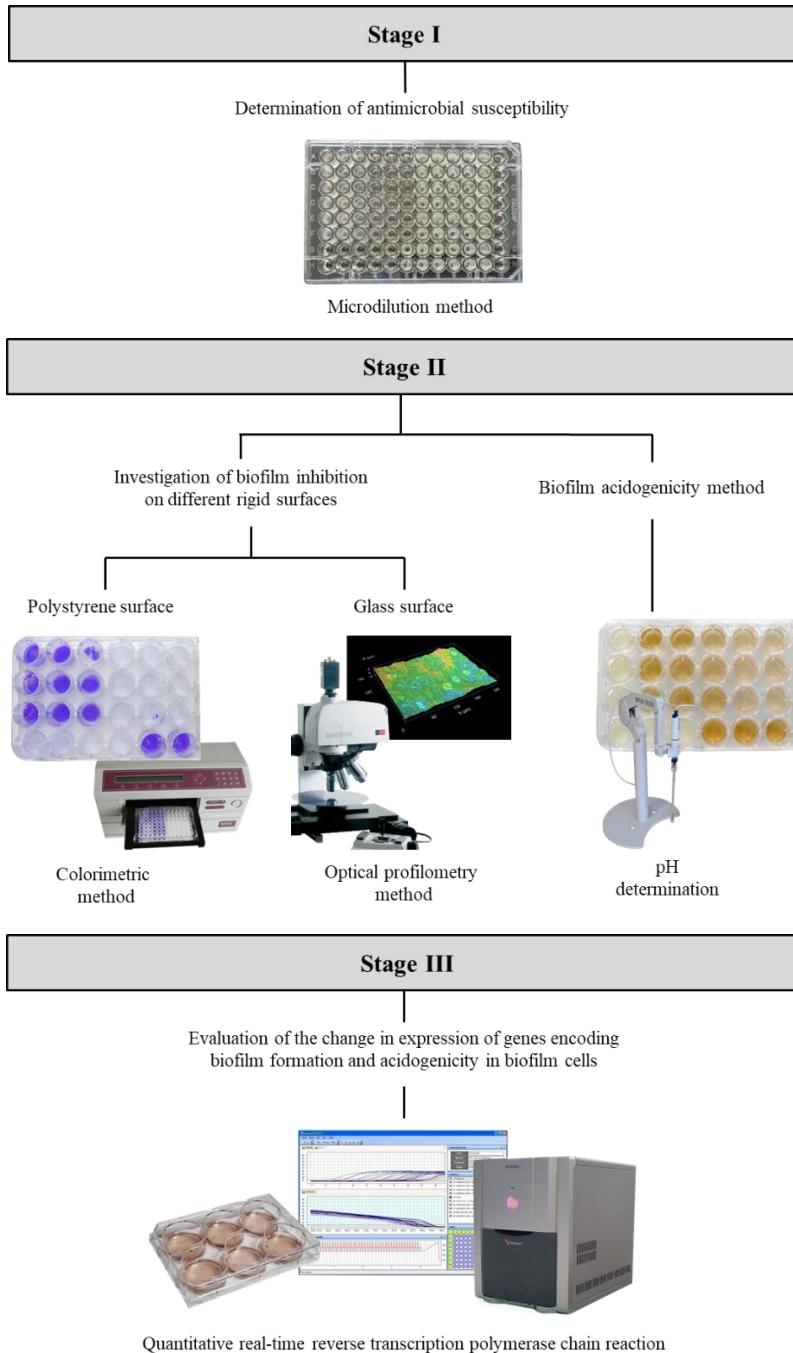
It is known that polyphenols found in plants have antimicrobial effects against *Streptococcus* bacteria (Abachi et al. 2016), therefore, based on this literature data, the research on the effect of alkyl gallates on the formation of *S. mutans* biofilms on rigid surfaces (polystyrene, glass) *in vitro* conditions was initiated. The study was conducted in three stages (**Figure 1**). The first and second stages of research were carried out at the FBMLM department of VU MF, and the third stage at the SRC of Al-Qasemi Academy.

At the first stage, the method of microdilution in liquid medium was applied to investigate the effects of C1-MG (isolated from *R. coriaria* fruits), synthetic C2-EG, C8-OG and C12-LG gallates on the viability of *S. mutans*. After evaluating the antimicrobial effect of gallates on *S. mutans* viability, further experiments were planned.

At the second stage, the effect of C1-MG (isolated from *R. coriaria* fruits), synthetic C2-EG, C8-OG and C12-LG gallates on the formation of *S. mutans* biofilm on a rigid surface was investigated. The effect of alkyl gallates on *S. mutans* biofilm formation was studied by colorimetry, determining the biomass density of the formed biofilm, and by optical profilometry, determining the thickness and surface roughness of the formed biofilm. At this stage, the effect of GA esters on the acidogenicity of the *S. mutans* biofilm was also evaluated. A total of 41 experiments were performed.

At the third stage, the quantitative expression studies of the genes responsible for the formation of a biofilm and the synthesis of its polymer matrix were carried out.

The doctoral student independently conducted the first and second stage research and the statistical analysis of the obtained data.



**Figure 1.** General scheme of research.

## 2.2. Research Material and Its Preparation

Four different GA esters were used in the study – methyl gallate (C1-MG), ethyl gallate (C2-EG), octyl gallate (C8-OG) and lauryl gallate (C12-LG). (**Figure 2**).



**Figure 2.** Gallic acid (GA) esters: **1** – methyl (C1-MG), **2** – ethyl (C2-EG), **3** – octyl (C8-OG) and **4** – lauryl (C12-LG) gallate.

C1-MG was extracted from Sicilian sumac (*Rhus coriaria* L.) plant material, which was purchased from Al Alim Ltd. (Medicinal Herb Center, Zippori, Israel). The methodology for the preparation of Sicilian sumac plant extract and the isolation of C1-MG is described in the article of 2017 (Kacergius et al. 2017). The qualitative and quantitative analysis of the active compounds of Sicilian sumac extracts was performed in Israel using *high-performance liquid chromatography* (HPLC) and *ultra-high-performance liquid chromatography* (UHPLC) methods. Other GA esters used in the experiments were synthetic, C2-EG (purity  $\geq 96\%$ ), C8-OG (purity  $\geq 99\%$ ), and C12-LG (purity  $\geq 99\%$ ), purchased from the manufacturer Sigma (Rehovot, Israel).

The precision scale Kern EG 420-3NM (KERN & Sohn GmbH, Germany) was used to weigh the test substances. Since C8-OG and C12-LG from alkyl gallates have the highest hydrophobicity (Ortega 2003), dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich chemie GmbH, France) was used for their dissolution. The tested GA esters were dissolved to obtain an initial concentration of 100 mg/ml, from which the final concentrations of the test substances were obtained. Working solutions of final concentration were prepared using deionized water (ddH<sub>2</sub>O), which was prepared using the

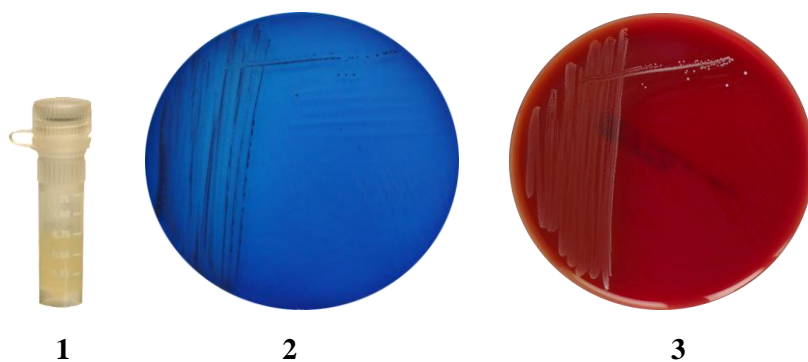
ultrapure water machine EMD Millipore Synergy (Merck, USA). Final concentrations of GA esters that were used in the experiments are presented in **Table 1**.

**Table 1.** Final concentrations of gallic acid (GA) esters used in the study

Name of substance	Concentration, µg/ml					
Methyl gallate (C1-MG)	550	700	850	1000		
Ethyl gallate (C2-EG)	550	580	610	640	670	700
Octyl gallate (C8-OG)	27.5	27.7	27.9	28.1	28.3	
Lauryl gallate (C12-LG)	29.5	30.5	31.5	32.5	33.5	

### 2.3. Bacterial Strain and Culture Conditions

*Streptococcus mutans* strain UA159 (ATCC 700610, USA), which was isolated in 1982 from a child with tooth decay, was used in the research. The prepared bacterial culture concentrates were stored in 10% skim milk (Difco, BD BioSciences, USA) at  $-70^{\circ}\text{C}$ . Before each experiment, bacteria were cultured in liquid Bacto™ *Todd Hewitt Broth* medium (THB, BD BioSciences, USA) (**Figure 3.1**) for 18 h at  $37^{\circ}\text{C}$ , under anaerobic conditions (95%  $\text{N}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Evaluation of the culture purity was carried out using *Mitis Salivarius* agar (MSA, Difco, BD BioSciences, USA) (**Figure 3.2**) and Columbia agar with 7% of sheep blood supplement (E&O Laboratories, United Kingdom) (**Figure 3.3**).



**Figure 3.** *S. mutans* UA159 pure culture on: **1** – *Todd Hewitt Broth* (THB) medium, **2** – *Mitis salivarius* agar and **3** – Columbia agar with 7% of sheep blood supplement.

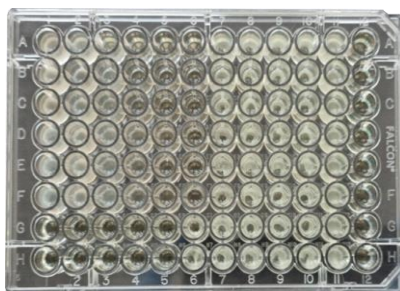
## 2.4. Microdilution Method for Determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The minimum inhibitory concentration (MIC) of the studied GA esters, erythromycin (ERY), chlorhexidine (CHX) and dimethyl sulfoxide (DMSO) was determined using the method of double serial microdilution in liquid medium (Wiegand et al. 2008). A flat-bottomed 96-well plate (Falcon, Corning Incorporated, USA) was used for the study. *S. mutans* bacterial culture suspension with an optical density of 0.5 McFarland standard (Liofilchem, Italy) was prepared in liquid Bacto™ *Todd Hewitt Broth* medium (THB, BD BioSciences, USA).

Initially, the wells of the plate were filled with nutrient medium. Next, a two-fold dilution of the test substances was carried out in the wells. 100 µl of the test substance was transferred to the first well of the plate and mixed with the nutrient medium. The steps were repeated by transferring 100 µl from the former well to the next one until a double serial dilution of the test substance was obtained in the row of wells. A two-fold serial dilution of each test substance was repeated three times. Finally, the wells were inoculated with *S. mutans* bacterial culture (100 µl) to reach a concentration of 10<sup>6</sup> CFU/ml. The filled plates were incubated for 18 h at 37 °C, under anaerobic conditions (95% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>).

Negative (THB) and positive (THB inoculated *S. mutans* culture) controls were used in the study. Additionally, a serial duplicate dilution of erythromycin (ERY, Sigma-Aldrich, Germany) and 0.12% of chlorhexidine solution (CHX) (BENU Pharmacy, Lithuania) was used as positive control. ERY was dissolved in DMSO to obtain an initial test solution concentration of 10 mg/ml.

The MIC is defined as the lowest concentration of the test substance at which inhibition of bacterial growth is visible to the naked eye (**Figure 4**).



**Figure 4.** The image in plates illustrating the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of a gallic acid (GA) ester.

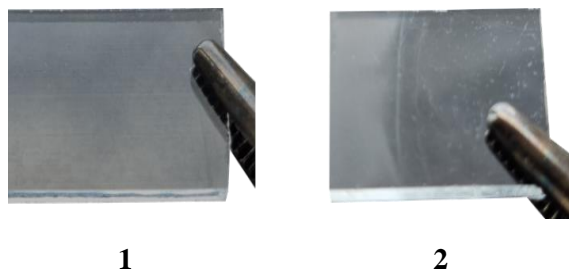
## 2.5. The Progress of the Preparation of the Experimental Plate for the Study of Biofilm Inhibition on Different Rigid Surfaces

To assess the effect of GA esters on *S. mutans* biofilm formation on rigid surfaces, biofilm formation on polystyrene and glass was investigated in separate experiments. Before each experiment, the optical density (OD) of the bacterial culture was adjusted to a value of 0.2 using a microplate reader (Dynex MRX Microplate Reader, USA) at a wavelength of 630 nm to obtain the concentration of the bacterial culture –  $1.6 \times 10^8$  CFU/ml.

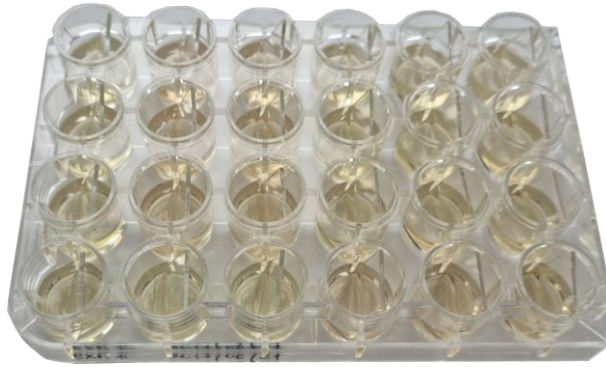
To evaluate the effect of GA esters on biofilm formation on the polystyrene surface, polystyrene 24-well plates (Sarstedt, Germany) intended for cell cultures were used; they were initially filled with THB medium containing 1% of sucrose (Sigma-Aldrich, USA), followed by different concentrations of C1-MG, C2-EG, C8-OG and C12-LG solutions (**Table 1**). Negative (THB) and positive (THB inoculated *S. mutans* culture) controls were used in the course of every experiment.

Next, each well was inoculated with the 1 : 100 bacterial culture of *S. mutans*. The prepared plates were cultured for 24 h at 37 °C, under anaerobic conditions (95% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). After incubation, the biomass density of the biofilm that formed on the polystyrene surface was evaluated by means of the colorimetric method.

The same experimental steps were followed to evaluate the effect of GA esters on biofilm formation on the glass surface. 1.2 × 26 mm glass slides, cut from standard 1 mm thick microscope objective slides (76 × 26 mm; Thermo Fisher Scientific, USA) were used (**Figure 5.1**). Finally, after filling the wells of the plate with the test substance and the bacterial culture, sterile glass slides (in a vertical position) were placed inside them (**Figure 6**). The amount of biofilm formed on the surface of the glass slide (**Figure 5.2**) was evaluated by optical profilometry.



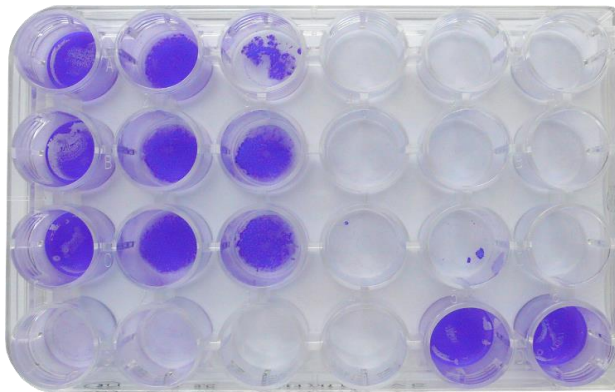
**Figure 5.** Image of the glass slide: **1** – before placing in the well (sterile), **2** – following the exposure.



**Figure 6.** Pre-cultivation image of a prepared plate for optical profilometry to estimate the amount of biofilm formed.

## 2.6. Colorimetric Method

Initially, after the 24-hour incubation period was over, the THB medium was removed from the plate. The wells were rinsed with distilled water to remove bacterial cells loosely bound to the biofilm. The remaining bacteria attached to the bottom of the well were fixed by 95% ethanol (Honeywell, Germany). Next, *S. mutans* biofilm fixed at the bottom of the well was dried at room temperature and then stained with 0.01% crystal violet solution (Merck KGaA, Germany) for 15 min, after which the dye was removed from the wells and the plate was dried at room temperature (**Figure 7**).



**Figure 7.** Image of an experimental plate after 24 h of *S. mutans* biofilm cultivation in Todd Hewitt broth (THB) medium at different concentrations of gallic acid (GR) esters and staining 0.01% crystal violet solution.



Further, the dye was extracted by means of 33% acetic acid solution (Merck KGaA, Germany), adding 1 ml to each well and storing it for 30 min at room temperature. Then, the extracted dye solution (200  $\mu$ l) was transferred from each well to a 96-flat-bottom well plate (Falcon, Corning Incorporated, USA), respectively. Finally, the optical density (OD) of the samples was measured using a microplate reader at a wavelength of 595 nm. To rule out staining of the well walls, the OD values of the samples were corrected by subtracting the OD value of the negative control.

## 2.7. Optical Profilometry Method

Following a 24-hour incubation period, the glass slides were removed from the wells and dried at room temperature. The amount of biofilm formed on the surface of the glass slides (**Figure 5.2**) was measured using the optical profilometer *Plu 2300* (Sensofar, Terrassa, Spain) with a built-in confocal lens (50 $\times$  magnification) with a field of view covering an area of 253  $\times$  190  $\mu$ m.

First, to measure the roughness of the biofilm formed, the surface of each glass slide was scanned from bottom to top. To measure the thickness of the biofilm, a vertical scratch was made in the middle of each glass slide with a scalpel, and then five areas of the glass were scanned from bottom to top. All images were captured in a vertical scan mode and data collected from the images were further analyzed using *Gwyddion 2.40* and *Gwyddion 2.50* software (<http://gwyddion.net>) to calculate the surface roughness and biofilm thickness parameters. A median filter (10 pixels or 3  $\mu$ m) was chosen to remove shape and waviness errors.

In order to quantify the surface roughness of the biofilm, one of the most important surface parameters was determined –  $R_q$  (the mean square error of roughness), which defines the average of the measured height deviations.  $R_q$  was calculated on the basis of the ISO 4287/1-1997 standard according to the following formula:

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{j=1}^N r_j^2},$$

where  $N$  is the number of points in the sampling length and  $r_j$  is the height value at point  $j$ . The height of an artificially produced vertical scratch on each slide with attached bacteria was used to measure the biofilm thickness, which indicated the degree of biofilm development. The biofilm thickness was calculated by creating a height distribution curve based on the total area

of the scanned area containing the scratch, and then fitting the Gaussian function defined by:

$$f(x) = y_0 + a \exp[-(x - x_0)^2/b^2],$$

where  $y_0$  is the peak height,  $a$  is the amplitude (height) distribution,  $x_0$  is the peak position, and  $b$  is the standard deviation. The background of the surface roughness and biofilm thickness parameters were corrected by subtracting the  $Rq$  and thickness values of the negative control (THB) glass slide.

In carrying out the experimental procedures, wells without *S. mutans* bacteria were used as blank controls, and un treated *S. mutans* bacteria were used as experimental controls. The percentage inhibitory effect of GA esters on *S. mutans* biofilm formation was calculated using OD, the surface roughness ( $Rq$ ) and the biofilm thickness parameters according to the equation:

$$\text{Inhibitory effect of GR ester in \%} = \left( \frac{\text{Parameter}_{\text{unexposed control}} - \text{Parameter}_{\text{exposure}}}{\text{Parameter}_{\text{unexposed control}}} \right) \times 100 \%$$

## 2.8. Biofilm Acidogenicity Assay

To evaluate the effect of GA esters on the acidogenicity of *S. mutans* biofilm, pH (hydrogen ion concentration indicator) of the nutritional media, in which bacterial culture was grown for 24 h, was measured. For that purpose, the experiments were carried out in accordance with the methodology described in detail in Section 2.5. During each experiment, after 24 h cultivation, the THB medium was aspirated from the culture wells with a pipette without damaging the formed biofilm and transferred to 1.5 ml test tubes. The pH of the nutrient medium was measured using the microelectrode *InLab<sup>®</sup> Micro Pro ISM<sup>®</sup>*, which was connected to the stationary pH meter *SevenCompact<sup>™</sup> S210-Bio* (Mettler-Toledo GmbH, Switzerland) or *Knick 766 Calimatic* (Elektronische Meßgeräte GmbH & Co., Germany). Before performing the measurement, the microelectrode was calibrated using standard pH buffer solutions (pH 4.01 and 7.00).

## 2.9. Analysis of Gene Expression

*S. mutans* culture was grown in the liquid Luria-Bertani (LB) medium. Following cultivation, the bacterial culture was diluted with the fresh LB medium containing 1% sucrose to obtain a final concentration of  $0.5 \times 10^5$  CFU/ml and distributed evenly into 50 ml tubes (30 ml/tube). GA ester of certain concentration was added to each test tube. Further, the

bacteria were cultured on six-well plates – 5 ml per well, three iterations were made (15 ml in total). *S. mutans* bacterial culture in the THB medium was used as a positive control. The filled plates were cultured for 24 h at 37 °C, under anaerobic conditions (95% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). After cultivation, the planktonic cells were sucked out with a pipette, and then the biofilm was scraped from the bottom. The collected test substance was stored at –4 °C until RNA isolation.

## 2.10. RNA Isolation

Initially, the bacterial culture of *S. mutans* was centrifuged at 4800× *g* for 10 min at room temperature using the Eppendorf Centrifuge 5415R (Germany). The sediment was then mixed with phosphate-buffered saline (500 µl) and centrifuged again at 500× *g* at 4 °C for 10 min. The procedure was repeated twice.

To investigate the effect of C2-EG on the expression of *S. mutans* genes responsible for biofilm production, the obtained sediments were treated with 700 µl of RNA purification solution GENEzol™ TriRNA (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) and then frozen three times at –80 °C and thawed at room temperature to allow cell lysis. The final preparation of the test substance was carried out according to recommendations provided by the manufacturer.

In the case of C8-OG and C12-LG, total RNA was purified using CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) and QIAGEN RNeasy Mini Kit methods. Sediments were first exposed to CTAB/PVP/BME solution, then frozen three times at –80 °C and thawed at room temperature for cell lysis. Next, the research material was prepared on the basis of the methodology presented by Jordon-Thaden (2015). The lysate was treated with DNA nuclease from the TURBO DNA kit, then extracted with two rounds of chloroform/IAA solution. 1/20 volume of 5 M NaCl and two volumes of ethanol were used for precipitation, and the resulting solution was then incubated for 20 min at –20 °C. RNA purification was performed using Qiagen binding columns, wash buffer Qiagen, and RNA nuclease-free water (50 µl).

The total RNA content and purity of all samples were evaluated applying the ultraviolet spectroscopy methods, with the help of the spectrophotometer DS-11 (DeNovix, Inc., USA).

## 2.11. Quantitative Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

The effects of ethyl gallate (C2-EG), octyl gallate (C8-OG) and lauryl gallate (C12-LG) on gene expression levels of *S. mutans* were investigated using a quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). 1 µg of RNA was reverse transcribed using the modified reverse transcriptase (M-MLV) of the qPCRBIO cDNA Synthesis Kit (PCR Biosystems Ltd, England) and random hexamer primers.

To evaluate the effect of ethyl gallate (C2-EG) on the expression level of *S. mutans* genes *gbpB*, *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *atpD* and *atpF*, qRT-PCR was performed using the DNA amplifier Exicycler™ 96 Quantitative Thermal Block (Bioneer, Korea). The kit qPCRBIO SyGreen Mix (PCR Biosystems Ltd, England) was used to determine the synthesis kinetics of DNA synthesis copies. Meanwhile, to investigate the effect of octyl gallate (C8-OG) and lauryl gallate (C12-LG) on the expression level of *S. mutans* genes *gbpB*, *gtfB*, *gtfC*, *gtfD* and *atpD*, qRT-PCR was performed using the DNA amplifier Biorad CT030008 (Biorad Ltd., England), and the kit SSo SyGreen Mix (Biorad Ltd., England) was used to determine the synthesis kinetics of DNA synthesis copies. Following the manufacturer's description, the total reaction volume was 20 µl, the amount of complementary DNA template was 100 ng, and the final total concentration of forward and reverse primers was 400 nM. qRT-PCR conditions are shown in **Tables 2** and **3**.

**Table 2.** Ethyl gallate (C2-EG) quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) conditions

Stage	Temperature, °C	Time	Number of cycles
Initial denaturation	95	5 min	1
Soldering primers	95	15 s	40
Chain extension	60	1 min	40
Final synthesis	72		1

PCR primers for this study were selected on the basis of the analysis of literature review. Sequences of primers used and references are indicated in **Table 4**.

**Table 3.** Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) conditions for octyl gallate (C8-OG) and lauryl gallate (C12-LG)

Stage	Temperature, °C	Time	Number of cycles
Initial denaturation	95	30 s	1
Soldering primers	96	30 s	40
Chain extension	60	30 s	40
Final synthesis	72		1

**Table 4.** Nucleotide sequences of *S. mutans* specific primers and literature sources used in the study

Gene	Sequence of primer (5' -3')	Direction	Source
<i>gbpB</i>	ATGGCGGTTATGGACACGTT	Forward	Cecchi et al. 2019
	TTTGGCCACCTTGAACACCT	Reverse	
<i>gtfB</i>	AGCAATGCAGCCAATCTACAAAT	Forward	Shemesh et al. 2006
	ACGAACTTTGCCGTTATTGTCA	Reverse	
<i>gtfC</i>	GGTTAACGTCAAAATTAGCTGTATTAGC	Forward	
	CTCAACCAACCGCCACTGTT	Reverse	
<i>gtfD</i>	ACAGCAGACAGCAGCCAAGA	Forward	
	ACTGGGTTTGCTGCGTTTG	Reverse	
<i>atpD</i>	CCAGGCGGTTTCATTCATCTGAC	Forward	Gong et al. 2009
	GGCGGGATTTCCGGTATTTACTG	Reverse	
<i>atpF</i>	CGGCTAAAAGAACAATAAG	Forward	
	CGGTCGTCTAAAAGATAAG	Reverse	

\*Forward primers, reverse primers

Seeking to check genomic DNA contamination, total RNA, which was not reverse transcribed, and non-template control were used. For quantitative evaluation of PCR data, the comparative Livak  $\Delta\Delta CT$  method (Livak et al. 2001) was applied as a standard procedure for the analysis of relative gene expression data.  $C_T$  values obtained from experimental RNA samples were normalized to the reference gene 16S rRNA, and the difference in  $\Delta CT$  values ( $\Delta\Delta CT$ ) between test and control samples was calculated.

## 2.12. Statistical Data Analysis

The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 23.0 (IBM Cop., Armonk, NY, USA) was used for data collection and a statistical analysis of colorimetry, profilometry, and pH measurements. Differences between control (untreated) and treated groups were assessed by one-way ANOVA with LSD *post-hoc* test. The data presented are expressed as means  $\pm$  standard error.  $p < 0.05$  was considered to show a statistically significant

difference. To assess gene expression, three independent experiments with two replicates were performed in each case (n=6). The statistical analysis of the obtained data were performed using a one-way analysis of variance with the *Tukey-Kramer* test selected at a significance level of 0.05. The data presented are expressed as means  $\pm$  a standard error.

### 3. RESULTS

#### 3.1. Effect of Gallic Acid Esters on the Viability of *S. mutans*

The effect of gallic acid (GA) esters – methyl gallate (C1-MG), ethyl gallate (C2-EG), octyl gallate (C8-OG) and lauryl gallate (C12-LG) on the viability of *S. mutans* was investigated by the method of microdilution in the liquid medium. For that purpose, the minimum inhibitory concentration (MIC) of these substances was determined. The obtained data are presented in **Table 5**.

**Table 5.** MIC of gallic acid (GA) esters (C1-MG, C2-EG, C8-OG, C12-LG), chlorhexidine (CHX, positive control), erythromycin (ERY, positive control) and dimethyl sulfoxide (DMSO, solvent) was determined for *S. mutans* bacteria.

Research substances	MIC, µg/ml
C1-MG	780
C2-EG	1560
C8-OG	97
C12-LG	97.6
CHX	2.25
ERY	4.8
DMSO	$25 \times 10^3$

Although the main goal of the study was to find the concentrations of GA esters that inhibited the formation of *S. mutans* biofilm, the awareness of the antibacterial effect of GA esters allowed us to justify the results of the experiments carried out. The concentration inhibiting biofilm formation should be lower than the established MIC, which is reflected in the obtained results that are discussed in detail in the following sections of this work (3.2 and 3.3).

It was established that the antimicrobial effect of the studied GA esters on *S. mutans* bacteria is not the same. Short alkyl chain GA esters – C1-MG and C2-EG showed a weaker effect as compared to the long alkyl chain (C8-OG and C12-LG) esters. The MIC of C1-MG and C2-EG were 780 µg/ml and 1560 µg/ml, respectively, whereas those of C8-OG and C12-LG were 97 µg/ml and 97.6 µg/ml, respectively. Hence, it turned out that the antimicrobial inhibitory effect of GA esters of short and long alkyl chains differed in the ratio of 1 : 16.

The study also evaluated the antimicrobial effect of dimethyl sulfoxide (DMSO), which we used to dissolve GA esters, on the culture of *S. mutans* bacteria. A very high MIC value of this solvent was determined, i.e.,  $25 \times 10^3$   $\mu\text{g/ml}$ . The data obtained confirmed that the DMSO used in the investigations as a solvent for C8-OG and C12-LG did not affect the results of our experiments with these GA esters.

### 3.2. Inhibitory Effect of Gallic Acid Esters on *S. mutans* Biofilm Formation on Polystyrene Surface

The way in which different concentrations of GA esters – methyl (C1-MG), ethyl (C2-EG), octyl (C8-OG) and lauryl (C12-LG) gallates affected the formation of *S. mutans* biofilm on the polystyrene surface was investigated using the colorimetric method.

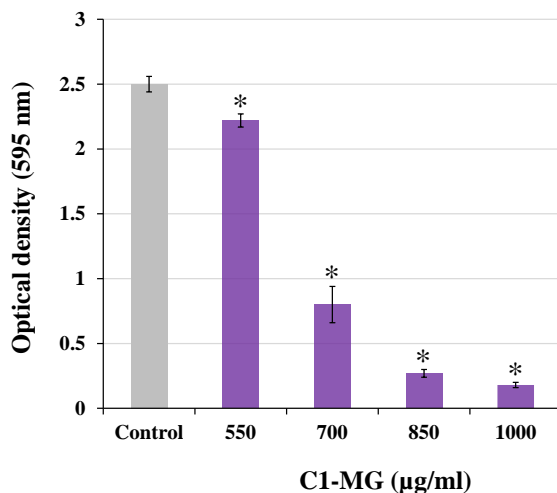
During the study, it was found that the following four C1-MG concentrations – 550  $\mu\text{g/ml}$ , 700  $\mu\text{g/ml}$ , 850  $\mu\text{g/ml}$  and 1000  $\mu\text{g/ml}$  – had an inhibitory effect on the biomass density of *S. mutans* biofilm on the polystyrene surface. 550  $\mu\text{g/ml}$  and 700  $\mu\text{g/ml}$  concentrations of C1-EG used for biofilm inhibition were below the established MIC (i.e., 780  $\mu\text{g/ml}$ , **Table 5**).

As can be seen in **Figure 8**, all concentrations of C1-MG we used, statistically significantly reduced the biofilm of *S. mutans* that was cultured in the THB medium containing 1% sucrose, comparing biomass density on the surface of polystyrene to untreated bacteria ( $p < 0.05$ ). The inhibitory effect of C1-MG was dose-dependent and was strongest at concentrations of 700  $\mu\text{g/ml}$ , 850  $\mu\text{g/ml}$  and 1000  $\mu\text{g/ml}$  and biofilm formation was inhibited by 68%, 89% and 93%, respectively.

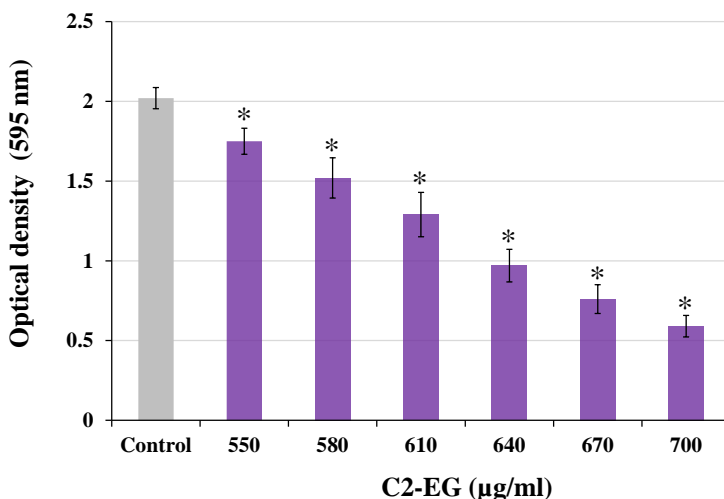
In the case of ethyl gallate (C2-EG), six concentrations were found to have inhibitory effects on *S. mutans* biofilm biomass density, i.e., 550  $\mu\text{g/ml}$ , 580  $\mu\text{g/ml}$ , 610  $\mu\text{g/ml}$ , 640  $\mu\text{g/ml}$ , 670  $\mu\text{g/ml}$  and 700  $\mu\text{g/ml}$  (**Figure 9**). All concentrations of C2-EG used for biofilm inhibition were below the established MIC (i.e., 1560  $\mu\text{g/ml}$ , **Table 5**). **Figure 9** shows that C2-EG concentrations of 580  $\mu\text{g/ml}$ , 610  $\mu\text{g/ml}$ , 640  $\mu\text{g/ml}$ , 670  $\mu\text{g/ml}$  and 700  $\mu\text{g/ml}$  significantly reduced *S. mutans* biofilm cultured in the THB medium containing 1% sucrose, comparing biomass density on the polystyrene surface to that of the control group of untreated bacteria. The difference identified is statistically significant ( $p < 0.05$ ). The bar graph (**Figure 9**) shows the dose-dependent inhibitory effect of C2-EG on *S. mutans* biofilm formation. The most effective concentration was 700  $\mu\text{g/ml}$ , which reduced *S. mutans* biofilm formation by 68% as compared to that of the control group. Whereas, the latter



concentration of C2-EG was not able to completely suppress the development of *S. mutans* biofilm on the polystyrene surface.



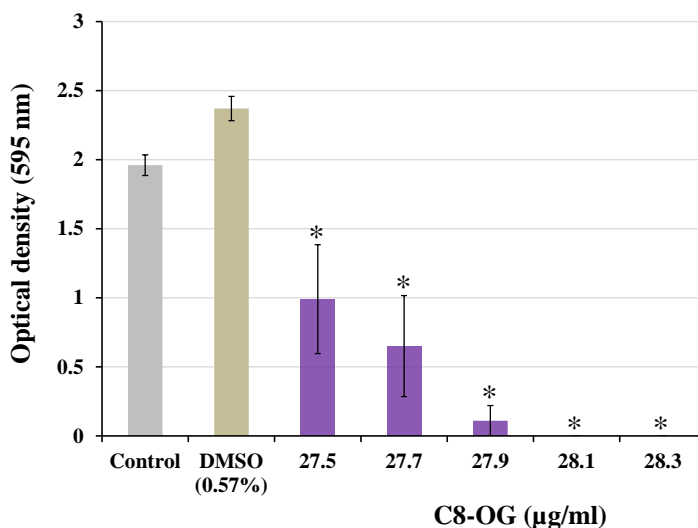
**Figure 8.** Biomass density of *S. mutans* biofilm on polystyrene surface after 24-hour cultivation in the THB medium containing 1% sucrose and different concentrations of methyl gallate (C1-MG). The data presented (n=9) are means  $\pm$  standard error of three independent experiments. Data marked with an asterisk (\*) are significantly different from those of the control group of untreated bacteria ( $p < 0.05$ ).



**Figure 9.** Biomass density of *S. mutans* biofilm on the polystyrene surface after 24-hour cultivation in the THB medium containing 1% sucrose and different concentrations of ethyl gallate (C2-EG). Data (n=9) are means  $\pm$

standard error of three independent experiments. Data marked with an asterisk (\*) are significantly different from those of the control group of untreated bacteria ( $p < 0.05$ ).

As to octyl gallate (C8-OG), the study found 27.5  $\mu\text{g/ml}$ , 27.7  $\mu\text{g/ml}$ , 27.9  $\mu\text{g/ml}$ , 28.1  $\mu\text{g/ml}$  and 28.3  $\mu\text{g/ml}$  of this GA ester concentrations to be effective against *S. mutans* biofilm formation on the polystyrene surface (**Figure 10**).

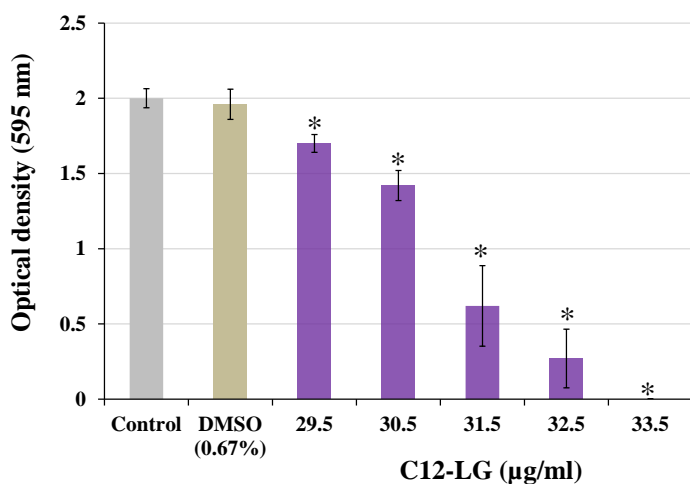


**Figure 10.** Biomass density of *S. mutans* biofilm on the polystyrene surface after 24-hour cultivation in the THB medium containing 1% sucrose and different concentrations of octyl gallate (C8-OG). Data ( $n=9$ ) are means  $\pm$  standard error of three independent experiments. Data marked with an asterisk (\*) are significantly different from those of the control group of untreated bacteria ( $p < 0.05$ ).

Biofilm-inhibiting concentrations of C8-OG were below the established MIC (i.e., 97  $\mu\text{g/ml}$ , **Table 5**) and within a very narrow concentration range. This shows that this inhibitory activity of C8-OG is not related to the bactericidal effect. The colorimetry study revealed that all tested C8-OG concentrations statistically significantly reduced the biomass density of *S. mutans* biofilm on the polystyrene surface as compared to that of the control group of untreated bacteria ( $p < 0.05$ ). This biofilm inhibitory effect of C8-OG was concentration-dependent. The important thing is that 28.1  $\mu\text{g/ml}$  and 28.3  $\mu\text{g/ml}$  C8-OG concentrations inhibited the development of *S. mutans*

biofilm on the polystyrene surface by 100% as compared to those of the control group of untreated bacteria. In addition, it is important to note that 0.57% DMSO (solvent) had no statistically significant effect on the formation of a biological film on the polystyrene surface as compared to that of untreated bacteria ( $p>0.05$ ). It is noteworthy that the inhibitory effect of C8-OG on the formation of *S. mutans* biofilms on the polystyrene surface was significantly stronger than that of C2-EG and C1-MG. In this regard, the range of the inhibitory effect of C2-EG and C1-MG concentrations was 550–700 µg/ml and 550–1000 µg/ml, respectively.

The evaluation of the biofilm content by colorimetric method showed that 29.5 µg/ml, 30.5 µg/ml, 31.5 µg/ml, 32.5 µg/ml and 33.5 µg/ml of lauryl gallate (C12-LG) concentrations also inhibited the formation of *S. mutans* biofilm on the polystyrene surface when cultured in the THB medium containing 1% sucrose (**Figure 11**). It is noteworthy that these biofilm-inhibiting concentrations were lower than the MIC (i.e., 97.6 µg/ml, **Table 5**), which shows that the effect of the tested concentrations of C12-LG is not bactericidal. The inhibitory effect of C12-LG on biofilm formation on the polystyrene surface was dose-dependent. **Figure 11** shows that the concentration of C12-LG from 30.5 µg/ml to 33.5 µg/ml statistically significantly reduced the biomass of *S. mutans* biofilm on the polystyrene surface as compared to the biomass density of the control group of untreated bacteria ( $p<0.05$ ). It should be emphasized that the concentration of 33.5 µg/ml C12-LG completely (100%) suppressed the production of the biofilm biomass as compared to that of the control group of untreated bacteria. It is determined that 0.67% DMSO (solvent) had no statistically significant effect on the formation of *S. mutans* biofilm on the polystyrene surface as compared to that of the control group of untreated bacteria ( $p>0.05$ ). Interestingly, as in the case of C8-OG, the biofilm inhibitory concentrations of C12-LG also fell within a fairly narrow range of 29.5 µg/ml to 33.5 µg/ml. However, the biofilm was inhibited by lower concentrations of C12-LG as compared to C8-OG, but significantly higher than C2-EG and C1-MG, whose previously determined inhibitory concentrations were within the range of 550–700 µg/ml and 550–1000 µg/ml, respectively.

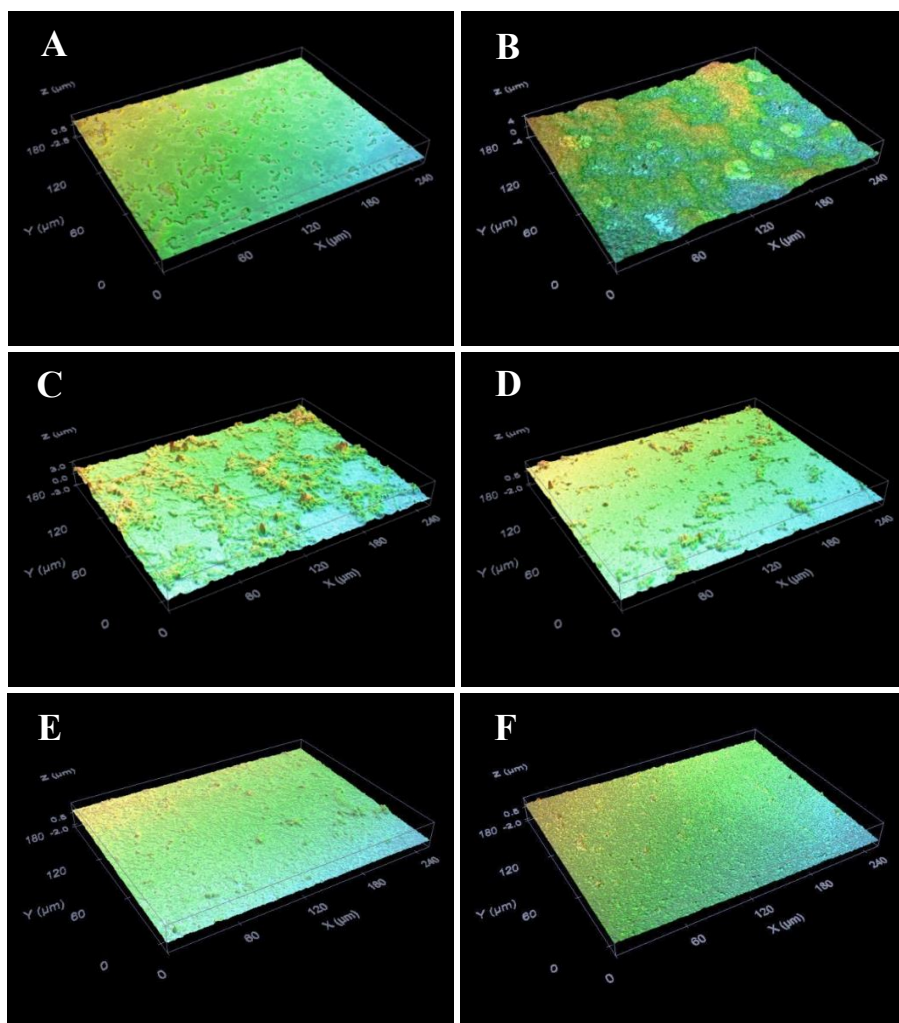


**Figure 11.** Biomass density of *S. mutans* biofilm on the polystyrene surface after 24-hour cultivation in the THB medium containing 1% sucrose and different concentrations of lauryl gallate (C12-LG). Data (n=9) are means  $\pm$  standard error of three independent experiments. Data marked with an asterisk (\*) are significantly different from those of the control group of untreated bacteria ( $p < 0.05$ ).

### 3.3. Inhibitory Effect of Gallic Acid Esters on *S. mutans* Biofilm Formation on Glass Surface

The formation of *S. mutans* biofilm on the glass surface under the influence of different concentrations of GR esters – methyl gallate (C1-MG), ethyl gallate (C2-EG), octyl gallate (C8-OG) and lauryl gallate (C12-LG) – was investigated using the optical profilometry method. Quantitative parameters of *S. mutans* biofilm – surface roughness ( $Rq$ ) and thickness – were calculated using this method.

During the study, parameters of *S. mutans* bacterial culture, which was cultured for 24 h in the THB medium without sucrose and C1-MG surface roughness ( $Rq$ ) and thickness parameters, which were  $0.04 \pm 0.01$  and  $0.02 \pm 0.01$   $\mu\text{m}$ , respectively, were determined (**Figure 12A**). In the nutrient medium containing 1% sucrose and without C1-MG *S. mutans* biofilm formation was observed (**Figure 12B**). Having added 1% sucrose and different concentrations of 550  $\mu\text{g/ml}$ , 700  $\mu\text{g/ml}$ , 850  $\mu\text{g/ml}$  and 1000  $\mu\text{g/ml}$  C1-MG (**Figures 12C–F**) to the nutrient medium, a concentration-dependent decreasing biofilm formation on the glass surface was recorded.

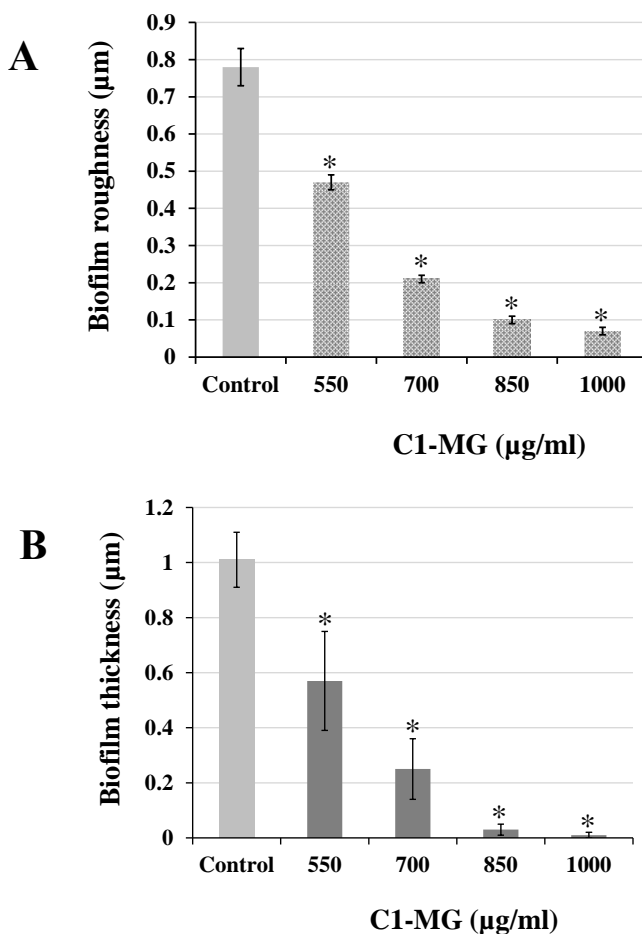


**Figure 12 (A–F).** The surface optical profiles of glass slides with *S. mutans* biofilm after 24-hour cultivation in the THB medium. The surface profile of glass slides that were incubated with bacterial culture in the medium without methyl gallate (C1-MG): **A** – in the absence of 1% sucrose, **B** – in the presence of 1% sucrose, and in the medium containing 1% sucrose and different C1-MG concentrations: **C** – 550  $\mu\text{g/ml}$ , **D** – 700  $\mu\text{g/ml}$ , **E** – 850  $\mu\text{g/ml}$ , **F** – 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Image magnified 50 $\times$ .

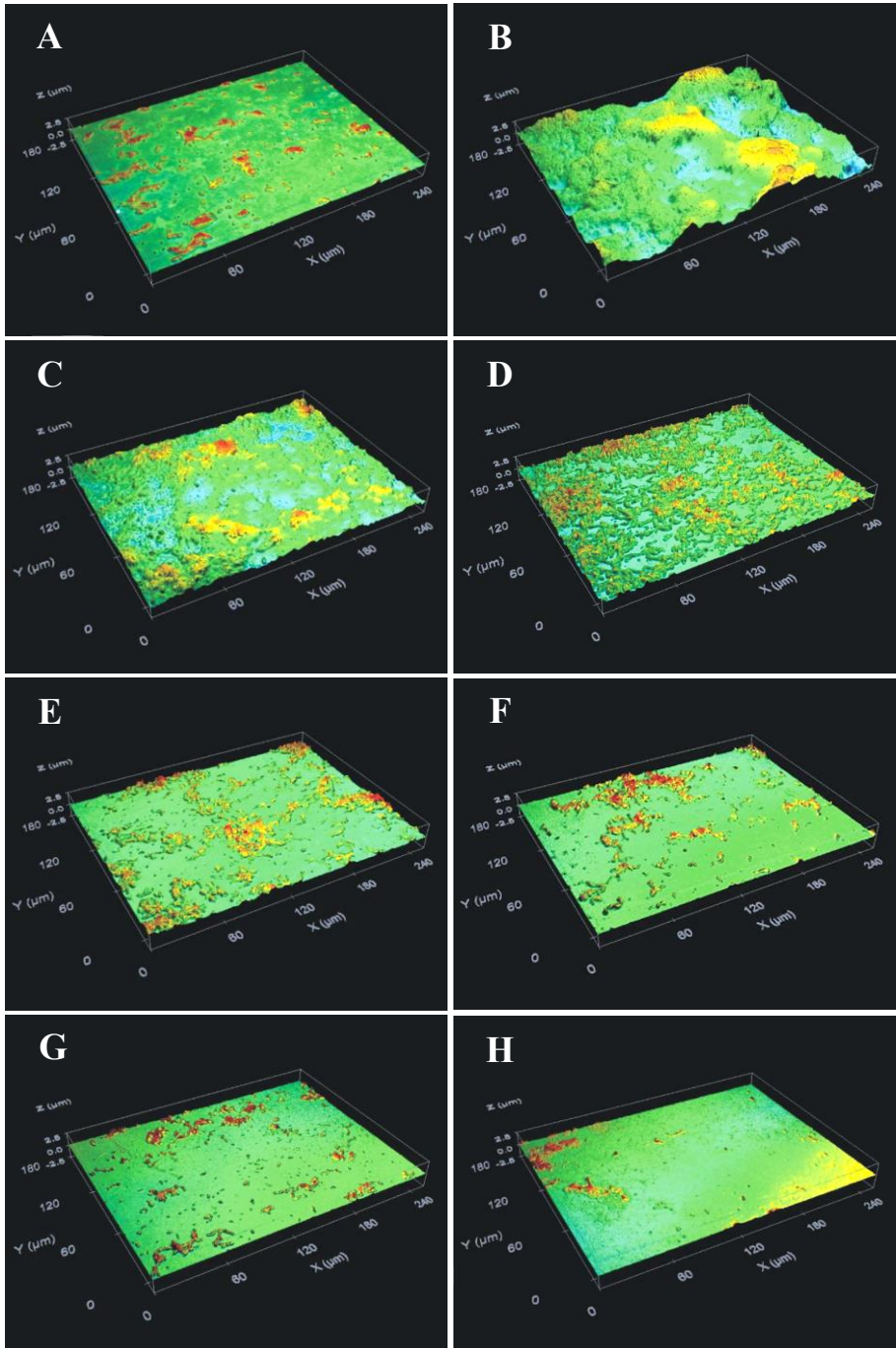
The biofilm quantification is schematically depicted in **Figure 13**, which shows that biofilm surface roughness ( $Rq$ ) (**Figure 13A**) and biofilm thickness (**Figure 13B**) increased in the control group of untreated bacteria, whereas C1-MG inhibiting effect was concentration-dependent ( $p < 0.05$ ). In this regard, C1-MG concentrations of 850  $\mu\text{g/ml}$  and 1000  $\mu\text{g/ml}$  effectively

reduced roughness ( $Rq$ ) of the biofilm surface by 94% and 99%, respectively (**Figure 13A**). Furthermore, these C1-MG concentrations reduced thickness of *S. mutans* biofilm by 97% and 99%, respectively (**Figure 13B**).

The roughness and thickness of the biofilm were  $0.07 \pm 0.01$  and  $0.1 \pm 0.01 \mu\text{m}$ , respectively, when culturing *S. mutans* bacterial culture in the THB medium without sucrose and C2-EG (**Figure 14A**).



**Figure 13.** Amounts of *S. mutans* biological film on the glass surface after 24-hour cultivation in the THB medium containing 1% sucrose and different concentrations of methyl gallate (C1-MG): **A** – parameter of biofilm surface roughness ( $Rq$ ), **B** – biofilm thickness. Data are presented as means  $\pm$  standard error of three independent experiments ( $n=18$ , biofilm roughness;  $n=15$ , biofilm thickness). Data marked with an asterisk (\*) are statistically significantly different from those of the control group of untreated bacteria ( $p < 0.05$ ).



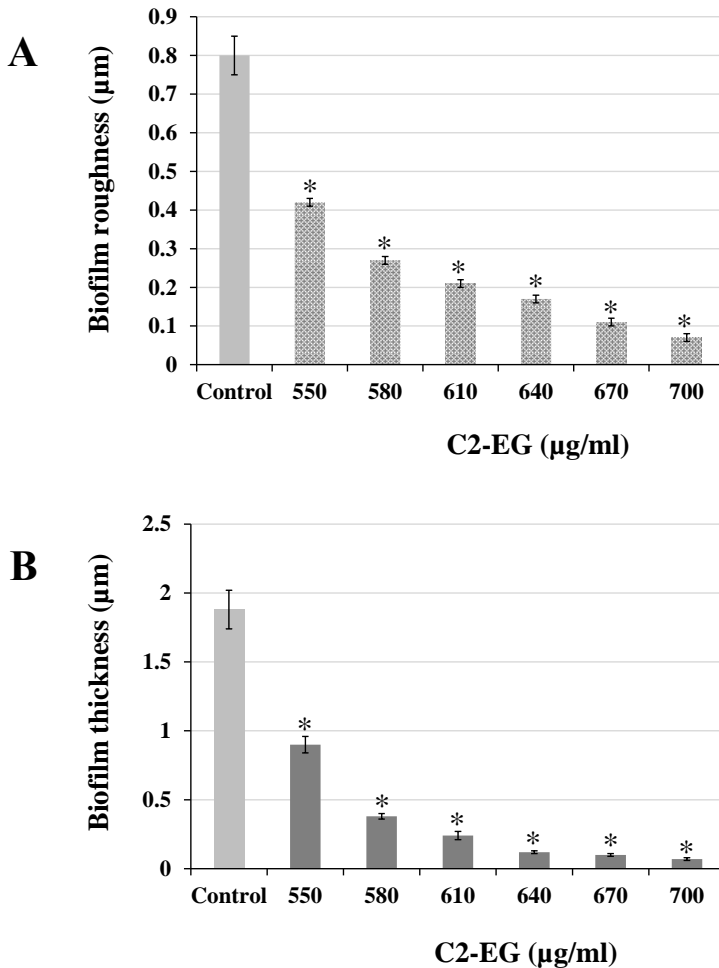
**Figure 14 (A–F).** The surface optical profiles of glass slides with *S. mutans* biofilm following 24 h cultivation in the THB medium. The surface profile of glass slides that were incubated with bacterial culture in the medium without methyl gallate (C2-EG): **A** – in the absence of 1% sucrose, **B** – in the presence

of 1% sucrose, and in the medium containing 1% sucrose and different C2-EG concentrations: **C** – 550 µg/ml, **D** – 580 µg/ml, **E** – 610 µg/ml, **F** – 640 µg/ml, **G** – 670 µg/ml, **H** – 700 µg/ml. Image magnified 50×.

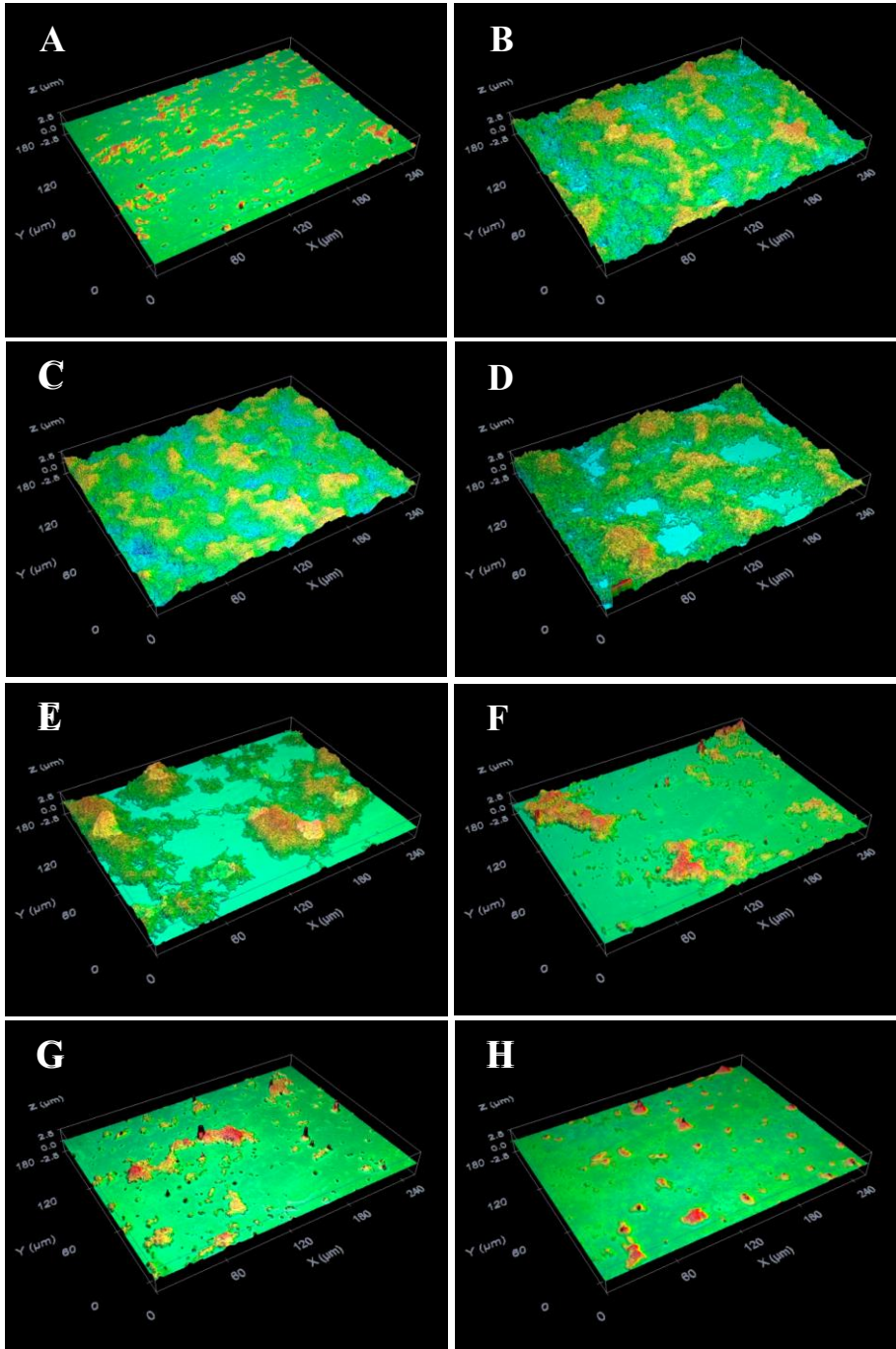
1% sucrose contained in the THB medium also caused attachment of *S. mutans* bacteria to the glass slide surface and led to biofilm formation (**Figure 14B**). As in the case of C1-MG, in the THB medium containing 1% sucrose and different concentrations of 550 µg/ml, 580 µg/ml, 610 µg/ml, 640 µg/ml, 670 µg/ml and 700 µg/ml C2-EG (**Figures 14C–H**) a concentration-dependent *S. mutans* biofilm formation inhibitory effect on the glass surface was also determined. Quantification of the surface of *S. mutans* biofilm formed on the glass slide revealed that the surface roughness (*Rq*) (**Figure 15A**) and thickness (**Figure 15B**) of the biofilm of the control group of untreated bacteria were higher, however, C2-EG had an inhibitory effect and the effect was also concentration-dependent ( $p < 0.05$ ; **Figure 15**). C2-EG concentrations of 640 µg/ml, 670 µg/ml, and 700 µg/ml were determined effectively reduce the biofilm surface roughness (*Rq*) by 79%, 86% and 91%, respectively (**Figure 15A**). Also, these C2-EG concentrations reduced *S. mutans* biofilm thickness by 94%, 95% and 96%, respectively (**Figure 15B**). C2-EG concentration of 700 µg/ml almost completely inhibited the biofilm formation of *S. mutans* on the glass surface contrary to the biofilm formation on the polystyrene surface. The results of optical profilometry of C2-EG are similar to those of C1-MG. However, it is important to note that in this study, a lower concentration of C2-EG as compared to that of C1-MG was required to completely inhibit *S. mutans* biofilm formation on the glass surface, i.e., 700 µg/ml as compared to 1000 µg/ml. Hence, C2-EG inhibited the biofilm formation of *S. mutans* more effectively.

In carrying out the optical profilometry study with C8-OG, the analysis of the surfaces of the glass slides showed that 1% sucrose contained in the THB medium affected the biofilm formation of *S. mutans* (**Figure 16B** and **17**) as compared to the bacterial culture that was cultured in the medium without C8-OG and 1% of sucrose (**Figure 16A**). When investigating the effect of C8-OG on *S. mutans* biofilm formation, it was determined that roughness (*Rq*) and thickness of the biofilm in the THB medium without sucrose and C8-OG were  $0.1 \pm 0.01$  and  $0.16 \pm 0.01$  µm, respectively. Moreover, it is noteworthy that 0.57% DMSO (solvent) had no significant effect on biofilm formation (**Figure 16C** and **17**).



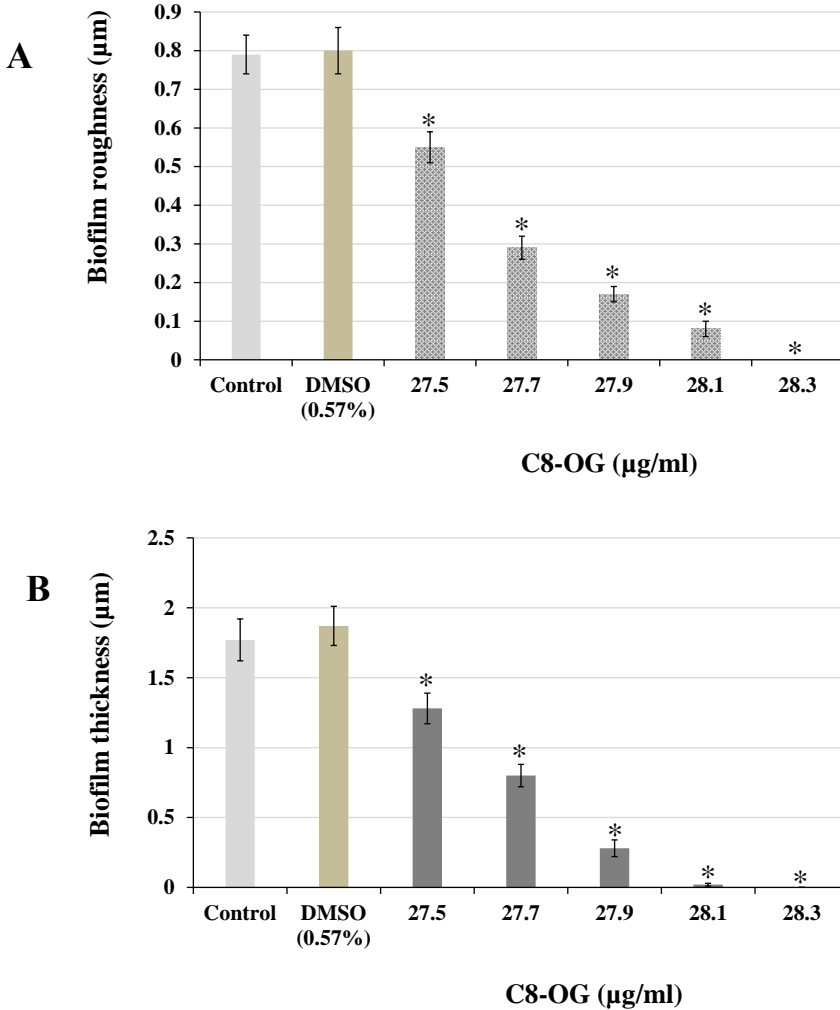


**Figure 15.** Amounts of *S. mutans* biofilm on the glass surface following 24-hour cultivation in the THB medium containing 1% sucrose and different concentrations of ethyl gallate (C2-EG): **A** – parameter of biofilm surface roughness ( $Rq$ ), **B** – biofilm thickness. Data are presented as means  $\pm$  standard error of three independent experiments ( $n=18$ , biofilm roughness;  $n=15$ , biofilm thickness). Data marked with an asterisk (\*) are statistically significantly different from those of the control group of untreated bacteria ( $p<0.05$ ).



**Figure 16 (A–H).** The surface optical profiles of glass slides with *S. mutans* biofilm following 24-hour cultivation in the THB medium. The surface profile of glass slides that were incubated together with bacterial culture in the medium without octyl gallate (C8-OG): **A** – in the absence of 1% sucrose, **B**

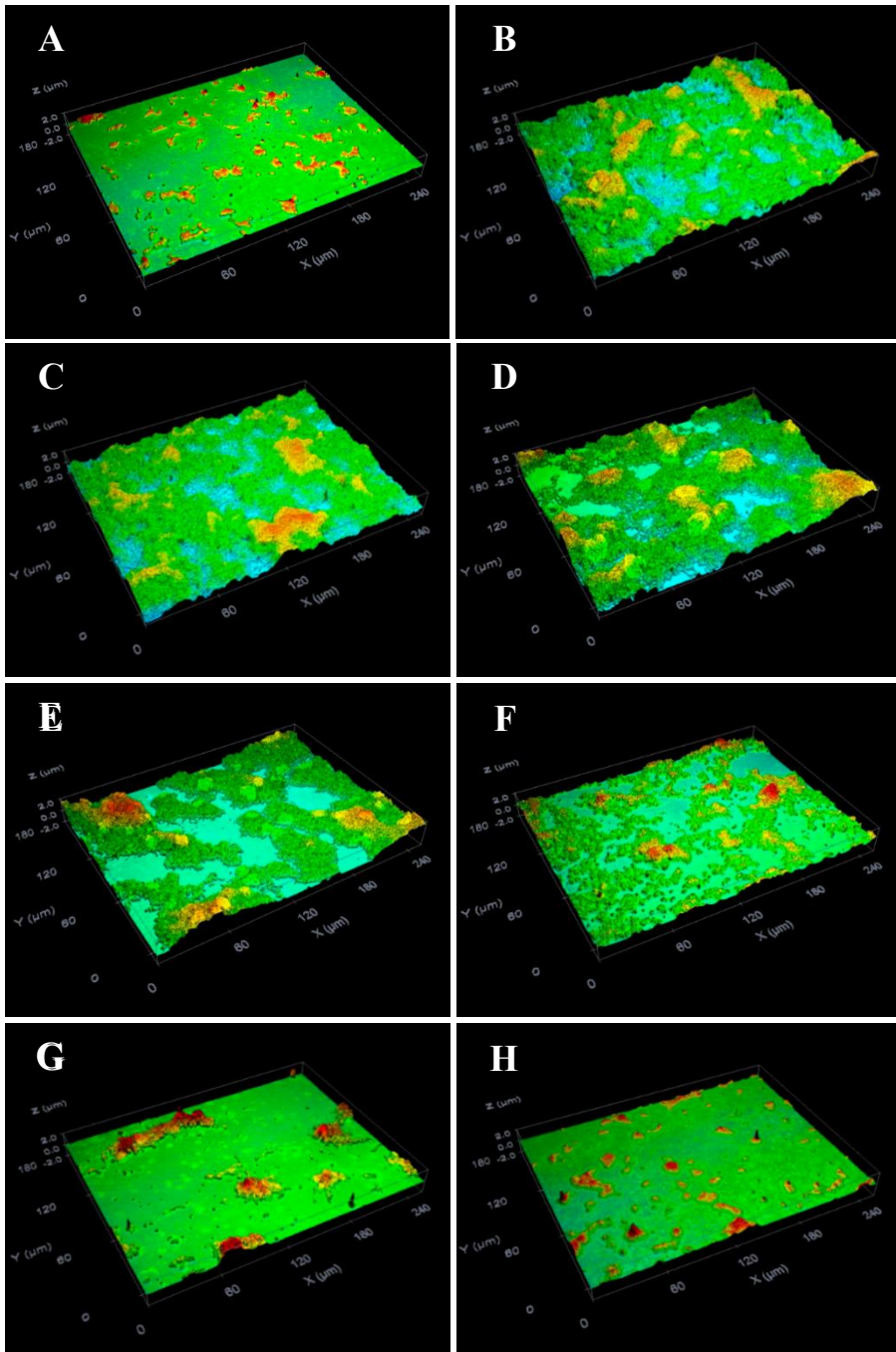
– in the presence of 1% sucrose, **C** – with 1% sucrose and 0.57% dimethyl sulfoxide (DMSO), and in the medium containing 1% sucrose and different concentrations of C8-OG: **D** – 27.5  $\mu\text{g/ml}$ , **E** – 27.7  $\mu\text{g/ml}$ , **F** – 27.9  $\mu\text{g/ml}$ , **G** – 28.1  $\mu\text{g/ml}$ , **H** – 28.3  $\mu\text{g/ml}$ . Image magnified 50 $\times$ .



**Figure 17.** Effect of different concentrations of octyl gallate (C8-OG) and dimethyl sulfoxide (DMSO) on the amount of *S. mutans* biofilm on the glass surface cultured for 24 h in the THB medium containing 1% sucrose. **A** – parameter of biofilm surface roughness ( $Rq$ ), **B** – biofilm thickness. Data are presented as means  $\pm$  standard error of three independent experiments (n=18, biofilm roughness; n=15, biofilm thickness). Data marked with an asterisk (\*) are statistically significantly different from those of the control group of untreated bacteria ( $p < 0.05$ ).

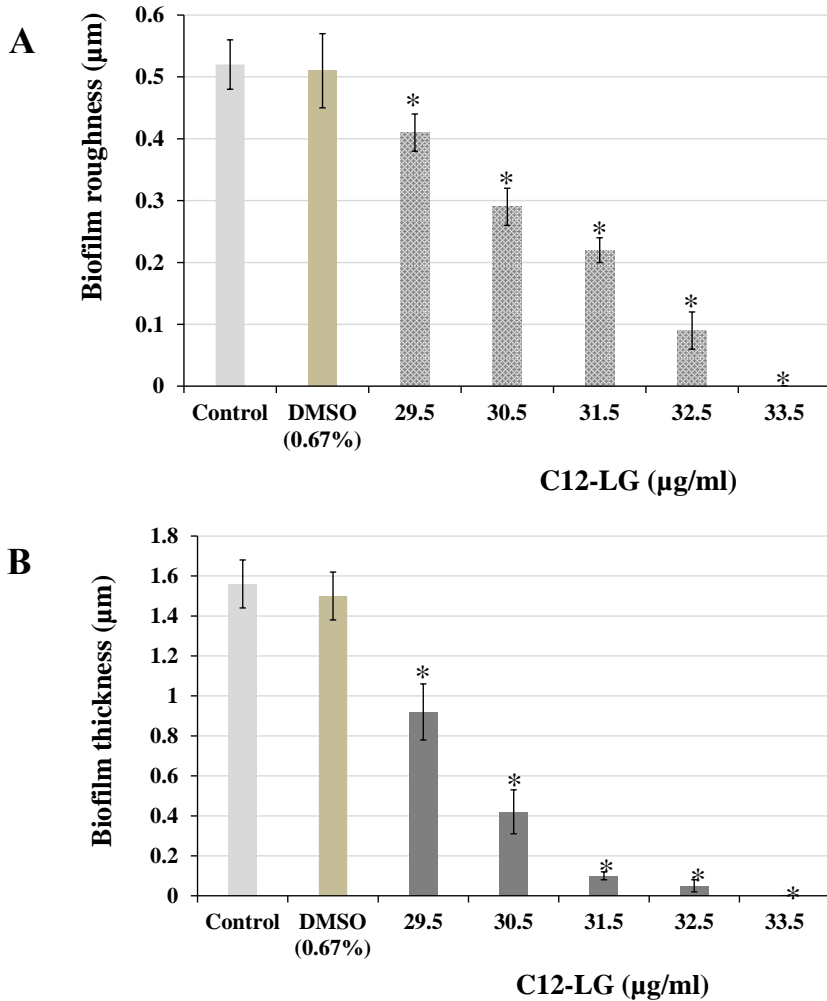
*S. mutans* biofilm formation on the glass surface in the THB medium containing 1% sucrose and C8-OG was inhibited in a concentration-dependent manner (**Figures 16D–H** and **17**). C8-OG concentrations of 27.5 µg/ml, 27.7 µg/ml, 27.9 µg/ml, 28.1 µg/ml, 28.3 µg/ml significantly reduced the surface roughness ( $Rq$ ) of the biofilm (**Figure 17A**) and its thickness (**Figure 17B**) as compared to those of the control group of untreated bacteria ( $p < 0.05$ ). It is important to emphasize that C8-OG concentration of 28.3 µg/ml completely (i.e., 100%) suppressed the development of *S. mutans* biofilm on the glass surface. As compared to the previous results obtained using C1-MG and C2-EG, a significantly lower concentration of C8-OG was required to inhibit *S. mutans* biofilm formation on the glass surface.

Finally, when examining the effect of C12-LG on the biofilm formation of *S. mutans* on the glass surface, it was also determined, as seen in **Figures 18B** and **19**, that bacterial attachment and biofilm formation on the glass surface were conditioned by aggregation of 1% sucrose in the THB medium rather than bacteria that were cultured in a well without C12-LG and 1% sucrose (**Figure 18A**). When cultivating *S. mutans* in the THB medium without sucrose and C12-LG, surface roughness ( $Rq$ ) and thickness of biofilm was  $0.1 \pm 0.01$  and  $0.15 \pm 0.01$  µm, respectively. It was also determined that 0.67% DMSO (solvent) slightly reduced the biofilm formation as compared to that of the control group of untreated bacteria ( $p > 0.05$ ) (**Figures 18C** and **19**). When cultivating *S. mutans* bacteria in the THB medium containing 1% sucrose and with C12-LG concentrations of 29.5 µg/ml, 30.5 µg/ml, 31.5 µg/ml, 32.5 µg/ml and 33.5 µg/ml, inhibition of *S. mutans* biofilm formation on the glass surface was determined and this effect depended on concentration (**Figures 18D–H** and **19**). All concentrations of C12-LG were determined to statistically significantly reduce roughness ( $Rq$ ) (**Figure 19A**) and thickness (**Figure 19B**) of the biofilm surface as compared to those of the control group of untreated bacteria ( $p < 0.05$ ). The important thing is that the formation of *S. mutans* biofilm on the glass surface was completely (100%) inhibited by the concentration of C12-LG 33.5 µg/ml.



**Figure 18 (A–H).** The surface optical profiles of glass slides with *S. mutans* biofilm following 24-hour cultivation in the THB medium. The surface profile of glass slides that were incubated together with bacterial culture in the medium without lauryl gallate (C12-LG): A – in the absence of 1% sucrose,

**B** – with 1% sucrose, **C** – with 1% sucrose and 0.67% dimethyl sulfoxide (DMSO), and in the medium containing 1% sucrose and with different C12-LG concentrations: **D** – 29.5 µg/ml, **E** – 30.5 µg/ml, **F** – 31.5 µg/ml, **G** – 32.5 µg/ml, **H** – 33.5 µg/ml. Image magnified 50×.



**Figure 19.** Effect of different concentrations of lauryl gallate (C12-LG) and dimethyl sulfoxide (DMSO) on the amount of *S. mutans* biofilm on the glass surface cultured for 24 h in the THB medium containing 1% sucrose. **A** – parameter of roughness of the biofilm on the glass surface ( $Rq$ ), **B** – biofilm thickness. Data are presented as means  $\pm$  standard error of three independent experiments ( $n=18$ , biofilm roughness;  $n=15$ , biofilm thickness). Data marked with an asterisk (\*) are statistically significantly different from those of the control group of untreated bacteria ( $p < 0.05$ ).

### 3.4. Effect of Gallic Acid Esters in Inhibiting Acidogenicity of *S. mutans* Biofilm

During the study, the effect of GA esters – methyl gallate (C1-MG), ethyl gallate (C2-EG), octyl gallate (C8-OG) and lauryl gallate (C12-LG) – on the acidogenicity of *S. mutans* biofilm was evaluated. The study showed that *S. mutans* in the THB medium containing 1% sucrose actively carried out fermentation, which led to release of organic acids that reduced the pH value of the medium within the range from 4.28 to 4.12 (**Tables 6–9**). Meanwhile, having added C1-MG, C2-EG and C12-LG to the THB medium containing 1% sucrose, the acidification of the medium was inhibited by approximately 1.8 times, and having added C8-OG – by approximately 1.7 times as compared to that of the control group of untreated bacteria.

**Table 6.** pH values of the nutrient media containing 1% sucrose and different concentrations of methyl gallate (C1-MG), following 24-hour incubation of *S. mutans*. Data (n=3, THB; n=9, control and C1-MG) are means ± standard error of three independent experiments. Data marked with an asterisk (\*) are significantly different from those of the control group of untreated bacteria ( $p < 0.05$ ).

Group under study	pH
THB	7.47 ± 0.02*
Control (THB and <i>S. mutans</i> )	4.28 ± 0.02
C1-MG (550 µg/ml)	6.14 ± 0.17*
C1-MG (700 µg/ml)	7.17 ± 0.03*
C1-MG (850 µg/ml)	7.27 ± 0.01*
C1-MG (1000 µg/ml)	7.28 ± 0.02*

The data obtained showed that C1-MG inhibited the acidogenicity of *S. mutans* biofilm and this effect was dose-dependent (**Table 6**). Concentration of C1-MG from 700 µg/ml to 1000 µg/ml inhibited a decrease in the pH of the nutrient medium in which the culture of *S. mutans* bacteria was cultivated, by 96–97%. Thus, C1-MG almost completely suppressed the acidogenicity of *S. mutans* biofilm.

When examining the effect of C2-EG on the acidogenicity of *S. mutans* biofilm, it was found that this GA ester also prevented a statistically significant decrease in pH, in contrast to the untreated bacteria that were cultured in the THB medium containing 1% sucrose without C2-EG ( $p < 0.05$ ). This protective effect of C2-EG was concentration-dependent (**Table 7**).

Concentration of C2-EG ranging from 670  $\mu\text{g/ml}$  to 700  $\mu\text{g/ml}$  inhibited a decrease in the pH of the nutrient medium by 95–96%. C2-EG, similarly to C1-MG, almost completely inhibited the acidogenicity of *S. mutans* biofilm, however, this effect occurred at a lower concentration of C2-EG as compared to C1-MG.

**Table 7.** pH values of the nutrient media containing 1% sucrose and different concentrations of ethyl gallate (C2-EG), following 24-hour incubation of *S. mutans*. Data (n=3, THB; n=9, control and C2-EG) are means  $\pm$  standard error of three independent experiments. Data marked with an asterisk (\*) are significantly different from those of the control group of untreated bacteria ( $p < 0.05$ ).

Group under study	pH
THB	7.35 $\pm$ 0.01*
Control (THB and <i>S. mutans</i> )	4.12 $\pm$ 0.01
C2-EG (550 $\mu\text{g/ml}$ )	6.10 $\pm$ 0.17*
C2-EG (580 $\mu\text{g/ml}$ )	6.54 $\pm$ 0.09*
C2-EG (610 $\mu\text{g/ml}$ )	6.77 $\pm$ 0.04*
C2-EG (640 $\mu\text{g/ml}$ )	6.89 $\pm$ 0.02*
C2-EG (670 $\mu\text{g/ml}$ )	6.97 $\pm$ 0.01*
C2-EG (700 $\mu\text{g/ml}$ )	7.02 $\pm$ 0.01*

Meanwhile, the effects of the solvent dimethyl sulfoxide (DMSO) were also evaluated while investigating the effects of C8-OG and C12-LG on the acidogenicity of *S. mutans* biofilm. The data presented in **Tables 8** and **9**, show that 0.57% and 0.671% DMSO solution had no effect on the acidogenicity of the *S. mutans* biofilm.

The data presented in **Table 8** leads to the conclusion that C8-OG statistically significantly suppressed the acidogenicity of *S. mutans* biofilm and prevented a decrease in the pH indicator of the THB medium as compared to that of the control group of untreated bacteria ( $p < 0.05$ ). The data presented also show that the effect of C8-OG is dose-dependent. It is noteworthy that C8-OG concentration from 27.9  $\mu\text{g/ml}$  to 28.3  $\mu\text{g/ml}$  prevented a decrease in pH by 98–99%. Hence, C8-OG completely suppressed the acidogenicity of *S. mutans* biofilm. This study showed that similar biofilm acidogenicity inhibitory effects were achieved with other GA esters; however, the concentrations of C8-OG were significantly lower than those of C1-MG or C2-EG.



**Table 8.** Nutrient media containing 1% sucrose and dimethyl sulfoxide (DMSO) or different concentrations of octyl gallate (C8-OG), pH values following 24-hour incubation of *S. mutans*. Data (n=3, THB; n=9, control, DMSO and C8-OG) are means  $\pm$  standard error of three independent experiments. Data marked with an asterisk (\*) are significantly different from those of the control group of untreated bacteria ( $p < 0.05$ ).

Group under study	pH
THB	7.37 $\pm$ 0.02*
Control (THB and <i>S. mutans</i> )	4.23 $\pm$ 0.01
DMSO (0.57%)	4.22 $\pm$ 0.01
C8-OG (27.5 $\mu$ g/ml)	6.27 $\pm$ 0.38*
C8-OG (27.7 $\mu$ g/ml)	6.83 $\pm$ 0.23*
C8-OG (27.9 $\mu$ g/ml)	7.19 $\pm$ 0.04*
C8-OG (28.1 $\mu$ g/ml)	7.23 $\pm$ 0.03*
C8-OG (28.3 $\mu$ g/ml)	7.28 $\pm$ 0.03*

As can be seen from the data presented in **Table 9**, the acidogenic effect of C12-LG concentrations ranging from 29.5  $\mu$ g/ml to 33.5  $\mu$ g/ml on *S. mutans* biofilm was also concentration-dependent.

**Table 9.** Nutrient media containing 1% sucrose and dimethyl sulfoxide (DMSO) or different concentrations of lauryl gallate (C12-LG), pH values following 24-hour incubation of *S. mutans*. Data (n=3, THB; n=9, control, DMSO and C12-LG) are means  $\pm$  standard error of three independent experiments. The data marked with an asterisk (\*) are significantly different from those of the control group of untreated bacteria ( $p < 0.05$ ).

Group under study	pH
THB	7.36 $\pm$ 0.03*
Control (THB and <i>S. mutans</i> )	4.16 $\pm$ 0.01
DMSO (0.67%)	4.18 $\pm$ 0.03
C12-LG (29.5 $\mu$ g/ml)	4.55 $\pm$ 0.04*
C12-LG (30.5 $\mu$ g/ml)	4.75 $\pm$ 0.11*
C12-LG (31.5 $\mu$ g/ml)	5.94 $\pm$ 0.35*
C12-LG (32.5 $\mu$ g/ml)	6.32 $\pm$ 0.3*
C12-LG (33.5 $\mu$ g/ml)	7.23 $\pm$ 0.03*

Furthermore, it should be noted that all C12-LG concentrations significantly reduced the acidogenicity of the biofilm of treated *S. mutans* bacteria as compared to that of the control group of untreated bacteria

( $p < 0.05$ ). The strongest effect of C12-LG occurred at the concentration of 33.5  $\mu\text{g/ml}$  and inhibited a decrease in pH value by 98%. Thus, C12-LG completely inhibited the production of organic acids in *S. mutans* biofilm. The effect determined is similar to that of C1-MG, C2-EG and C8-OG, however, C12-LG inhibited the acidogenicity of *S. mutans* biofilm at lower concentrations.

### 3.5. Expression Analysis of the Effect of Gallic Acid Esters on *S. mutans* Genes Responsible for Biofilm Formation and Acidogenicity

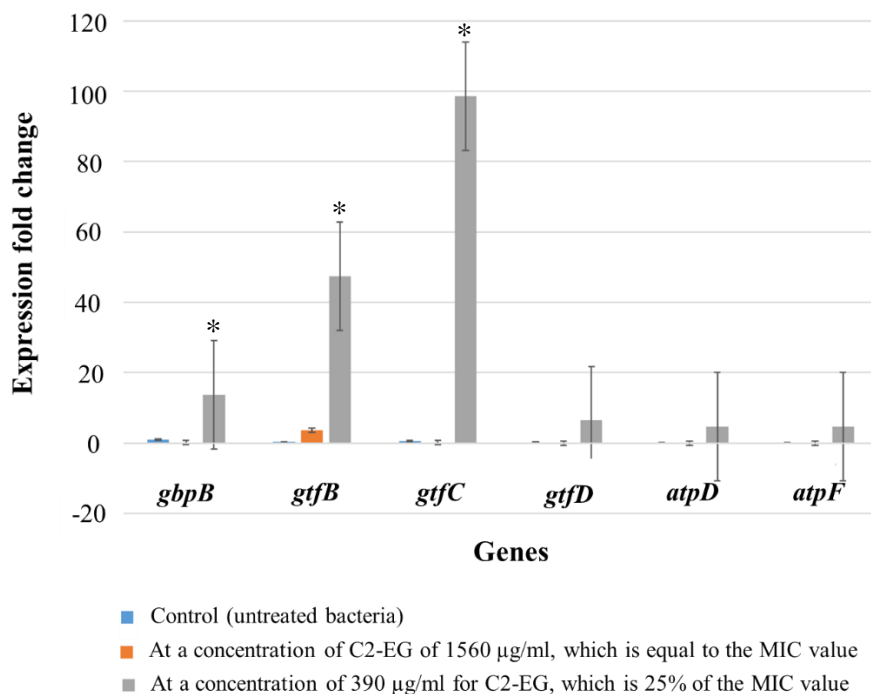
The quantitative expression of genes responsible for *S. mutans* biofilm formation and production of its extracellular polymeric substance (EPS) and acidogenicity under the influence of GA esters – ethyl gallate (C2-EG), octyl gallate (C8-OG) and lauryl gallate (C12-LG) – was assessed by the quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR).

To investigate the effect of C2-EG on a relative change in expression in six genes: *gbpB*, *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *atpD* and *atpF* in *S. mutans* biofilm cells, two concentrations – 1560  $\mu\text{g/ml}$  and 390  $\mu\text{g/ml}$  were used and as compared with those of the control group of untreated bacteria. **Figure 20** shows that the cells in the biofilm under the influence of C2-EG at a concentration of 390  $\mu\text{g/ml}$ , equated to 25% of minimum inhibitory concentration (MIC) values, had a statistically significant change in gene expression in certain genes – 98.6-fold increase in *gtfC* gene expression, 47.5-fold increase in *gtfB* and 13.8-fold increase in *gbpB* ( $p < 0.05$ ). As to the other tested genes (*gtfD*, *atpD* and *atpF*), exposure to C2-EG did not cause any statistically significant change in the expression of genes of cells present in the biofilm as compared to that of the control group of untreated bacteria.

Three concentrations of 97  $\mu\text{g/ml}$ , 48.5  $\mu\text{g/ml}$  and 24.25  $\mu\text{g/ml}$ , which are compared to those of the control group of untreated bacteria, were used to determine the effect of C8-OG on a relative change in the expression of five genes *gbpB*, *gtfB*, *gtfC*, *gtfD* and *atpD* in *S. mutans* biofilm cells.

Since there was either no growth of *S. mutans* or it was insignificant in the samples with C8-OG concentration equal to 100% and 50% of MIC values, only the sample with C8-OG concentration equal to 25% of the MIC value was used for the gene expression analysis. **Figure 21** shows that the cells present in the biofilm under the influence of C8-OG concentration of 24.25  $\mu\text{g/ml}$ , which is equal to 25% of MIC value, had a statistically significant decrease in the expression of four out of five tested genes ( $p < 0.05$ ). For example, a significant change in gene expression was determined – *gbpB*

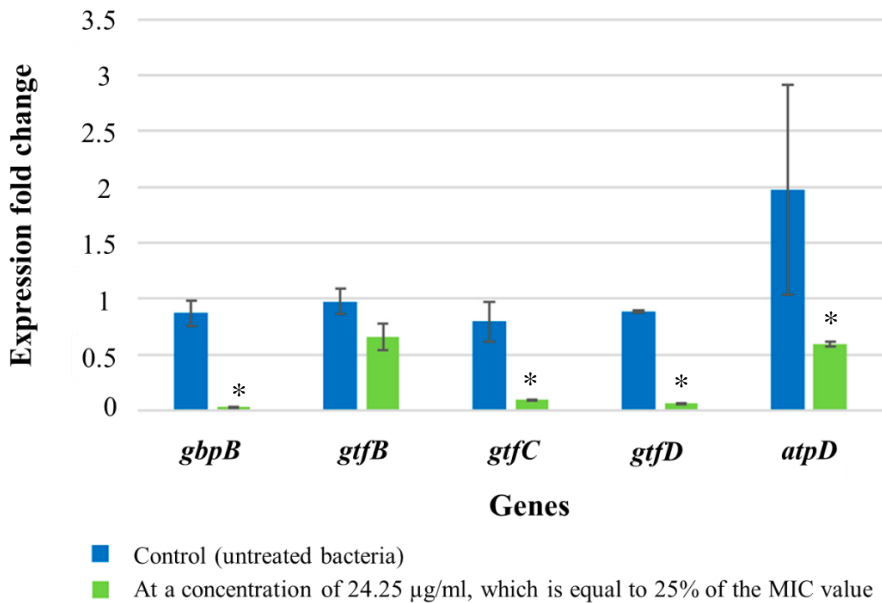
(98.6 times), *gtfC* (47.5 times), *gtfD* (13.8 times); moreover, both a decrease in the expression of the *atpD* gene, and an insignificant decrease in the expression of the *gtfB* gene were observed.



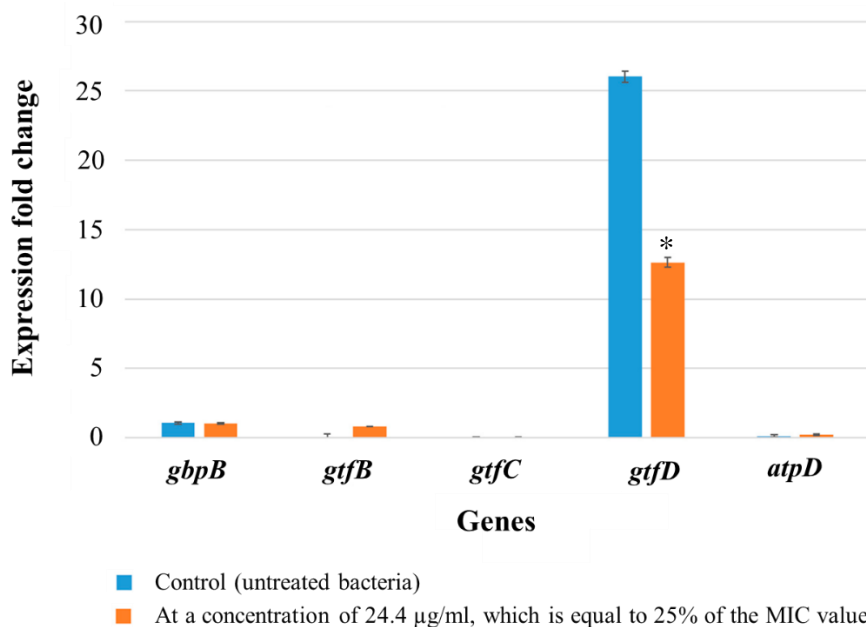
**Figure 20.** A change in the expression of six genes present in the cells in the biofilm of *S. mutans* bacterial culture involved in biofilm production and acidogenicity at different concentrations of ethyl gallate (C2-EG). Data (n=6) are means  $\pm$  standard error of three independent experiments performed in duplicate. The data marked with an asterisk (\*) are significantly different from those of the control group of untreated bacteria ( $p < 0.05$ ).

To evaluate the effect of C12-LG on the cells in *S. mutans* biofilm, the latter were exposed to three concentrations of C12-LG – 97.6 µg/ml, 48.8 µg/ml and 24.4 µg/ml, as compared to those of the control of non-exposed bacteria group. Since there was either no growth of *S. mutans* or it was insignificant in the samples with C12-LG concentration equal to 100% and 50% of MIC value, only the sample with C12-LG concentration equal to 25% of the MIC value was used for the gene expression analysis. The change in gene expression found in the course of the study is sometimes graphically represented in **Figure 22**, which shows that cells present in the biofilm exposed to C12-LG concentration of 24.4 µg/ml, equal to 25% of MIC value,

caused a pronounced change in the expression of only one *gtfD* gene, which is statistically significant (48%) and small insignificant changes in four genes (*gbpB*, *gtfB*, *gtfC* and *atpD*).



**Figure 21.** A change in the expression of five genes present in the cells in the biofilm of *S. mutans* bacterial culture involved in biofilm production and acidogenicity at octyl gallate (C8-EG) concentration of 24.25 µg/ml. Data (n=6) are means ± standard error of three independent experiments performed in duplicate. The data marked with an asterisk (\*) are statistically significantly different from those of the control group of untreated bacteria ( $p < 0.05$ ).



**Figure 22.** A change in the expression of five genes present in the cells in the biofilm of *S. mutans* bacterial culture involved in biofilm production and acidogenicity at lauryl gallate (C12-LG) concentration of 24.4 µg/ml. Data (n=6) are means ± standard error of three independent experiments performed in duplicate. Data marked with an asterisk (\*) are statistically significantly different from those of the control group of untreated bacteria ( $p < 0.05$ ).

#### 4. DISCUSSION OF THE RESULTS

In an experimental study with the fruit extract of Sicilian sumac (*Rhus coriaria*), it was found that this extract inhibited the biofilm formation of *S. mutans*. A more detailed examination of the fractions of the *R. coriaria* fruit extract showed that the fraction with the highest effect was the fraction in which methyl gallate (C1-MG) was subsequently identified (Kacergius et al. 2017). Similar results were obtained by a team of researchers who used high-performance liquid chromatography (HPLC) to detect gallotannins, GR and C1-MG in *Rhus javanica* gal extract (Kim et al. 2016). Based on the results of these studies, this thesis aims to investigate the effect of not only C1-MG but also other GR esters, such as ethyl gallate (C2-EG), octyl gallate (C8-OG) and lauryl gallate (C12-LG), on the formation of *S. mutans* biofilm *in vitro*.

The study shows that the antimicrobial effect of GR esters on the viability of *S. mutans* is not uniform. The minimum inhibitory concentrations (MICs) for C1-MG and C2-EG were 780 µg/ml and 1560 µg/ml, respectively, and for C8-OG and C12-LG 97 µg/ml and 97.6 µg/ml, respectively. One group of researchers who investigated the effect of GR and C1-MG on oral cariogenic and periodontal disease causing bacteria found that the growth and multiplication of *S. mutans* was treated by higher MICs, ranging from 2 mg/ml to 4 mg/ml (Kang et al. 2008). The literature is either lacking or fragmentary with regard to the antibacterial effect of other GR alkyl esters used in experimental studies on the viability of *S. mutans*. The study showed that the short alkyl chain GR esters C1-MG and C2-EG had a weaker effect compared to the long alkyl chain esters (C8-OG and C12-LG). Thus, the antimicrobial inhibitory effect of short and long alkyl chain GR esters appeared to differ by a ratio of 1 : 16. Similar results were obtained by a team of researchers who found that C8-OG with a long alkyl chain was more potent against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* strains as compared to propyl gallate (C3-PG) with a shorter alkyl chain (Gutiérrez-Larrainzar et al. 2013).

*S. mutans* have several virulence factors that allow them to successfully colonize surfaces in the human mouth. According to the literature, virulence is determined by the production of adhesive proteins and the ability to form biofilms, as well as acidogenicity and acid tolerance (Kidd et al. 2019). *S. mutans* adhesion is closely linked to biofilm formation, as *S. mutans*, with the help of glycosyltransferases, produces glucan, which induces bacterial adhesion to the surface, and thus aggregation with each other, which initiates biofilm development (Jeong et al. 2013).

This dissertation presents the results of an experimental study on the inhibitory effect of GR esters on the density and profile of *S. mutans* biofilm biomass on rigid surfaces of different origins, such as polystyrene and glass. A concentration-dependent inhibitory effect on both biomass density and biofilm profile, i.e. thickness and roughness, was found. The inhibitory effect of methyl gallate (C1-MG) was most pronounced at concentrations of 700 µg/ml, 850 µg/ml and 1000 µg/ml. Similar results were obtained by other researchers (Kang et al. 2008), who performed a glass wire test with C1-MG and found that a concentration of 1000 µg/ml significantly reduced the biofilm biomass density of an *S. mutans* Ingbritt strain cultured for 24 h in a nutrient medium containing 5% sucrose compared to untreated bacteria. The inhibitory effect of C2-EG was found to be similar to that of C1-MG, ranging from 550 µg/ml to 700 µg/ml. No data on the effect of C2-EG on biofilm formation in *S. mutans* could be found in the literature, with the exception of R. O. Bakr and colleagues (2016) study on *Staphylococcus aureus* biofilms. This group of researchers isolated C2-EG from the rhizomes of water lily (*Nymphaea alba*) and found that this GR ester reduced biofilm formation by *S. aureus* under *in vitro* conditions. Our study showed that C8-OG at much lower concentrations of 28.1 µg/ml and 28.3 µg/ml completely inhibited the biofilm development of *S. mutans* on polystyrene surfaces by a statistically significant amount (100%), compared to the untreated bacteria. This finding can be reasonably attributed to the longer alkyl chain in the chemical structure of C8-OG, which leads to its stronger antibacterial and biofilm inhibitory effect. These results are supported by other studies that have shown similar inhibitory effects of C8-OG on the growth and proliferation of *Bacillus subtilis* (Kubo et al. 2004) and on biofilm formation of *Staphylococcus aureus* (Oh et al. 2018). As for C12-LG, this GR ester also showed a stronger effect than C8-OG. C12-LG at a concentration of 33.5 µg/ml resulted in a statistically significant complete inhibition of biofilm production (100 %) compared to the control group of untreated bacteria. The results clearly show that the biofilm inhibitory effect of *S. mutans* depends on the alkyl chain length of the GR esters. These findings are supported by the inhibitory effect of C12-LG described by S. Zhang and colleagues (2015), who worked with *Streptococcus pneumoniae* biofilms. Furthermore, the biofilm inhibitory concentrations of C8-OG and C12-LG, as well as those of the shorter alkyl graded GR esters (C2-MG, C2-EG), were lower than the established MICs and fell within a very narrow range. This suggests that this inhibitory activity of C8-OG is not related to bactericidal activity. The biofilm inhibitory effect on *S. mutans* of the GR esters tested is also supported by optical profilometry data.

Acidogenicity is another very important virulence factor in *S. mutans* (Bedonya-Correa et al. 2019), as it is the prolonged exposure to acids that leads to the development of dental caries (Friuli et al. 2020). In this thesis study, it was set out to investigate the effect of GR esters on the acidity of the nutrient medium in which *S. mutans* biofilms are cultured. The data obtained showed that the concentrations of GR alkyl esters which inhibit the formation of *S. mutans* biofilms also inhibit the decrease in the pH of the medium where the bacterial culture is grown. The study showed that concentrations of C1-MG 700–1000 µg/ml, C2-EG 700 µg/ml, C8-OG 27.9–28.3 µg/ml and C12-LG 33.5 µg/ml almost completely suppressed the decrease in the pH of the culture medium as compared with the control group of untreated bacteria, a difference that was found to be statistically significant ( $p < 0,05$ ). This indirectly reflects a decrease in biofilm acidogenicity.

In addition, the study showed that a solution of 0.56% and 0.57% dimethyl sulfoxide (DMSO) used to dissolve the alkyl esters of GR did not inhibit the biofilm formation of *S. mutans* and did not lead to any change in the pH of the nutrient medium where the bacterial culture was maintained.

This dissertation also presents an analysis of the expression of genes encoding virulence factors in *S. mutans* in the presence of GR esters C2-EG, C8-OG and C12-LG. Literature shows that *S. mutans* cells in sedentary biofilms, compared to planktonic cells, have a higher acid tolerance, a more efficient use of sucrose (leading to stronger adhesion) and a different gene expression (Liu et al. 2013, Silva et al. 2014). In a study of cells exposed to C2-EG in the biofilm, relatively high gene expression of *gtfC*, *gtfB* and *gbpB* was found, which may be associated with stress induced by this GR ester. In order to relieve the stress, the bacteria react by increasing the expression of genes encoding enzymes that produce water-insoluble glucans. These enzymes are essential for the production of extracellular polymeric substance (EPS), which increases the adhesion of bacterial cells to surfaces and each other. This should be accompanied by an increase in the expression of the *gtfD*, *atpD* and *atpF* genes. However, the results obtained do not show this increase. This could be explained by an imbalance in the production of the biofilm. Another possible reason is that the expression of control proteins, quorum sensing component genes such as *VicK*, and their products has been disturbed. M.D. Senadheera et al. (2005) observed that an increase in the expression of the control gene *vicRKX* was associated with an increase in the expression of the *gbpB*, *gtfB* and *gtfC* genes. The results obtained by these researchers are in agreement with the findings of one group of researchers (Decker et al. 2014) that the expression of *gtfC* and *gtfB* was increased when *S. mutans* was cultured in xylitol-containing medium. In the course of the



this work, a higher expression coefficient was found than when exposed to xylitol. The gene expression results do not fully agree with the colorimetric, profilometric and pH measurements. The discrepancy in the results may be explained by the fact that the inhibition of *S. mutans* biofilm formation on polystyrene and glass surfaces and acidogenicity induced by C2-EG is probably at the protein level and does not affect gene expression. Therefore, to clarify the direct effect of C2-EG on the gene expression of biofilm-producing *S. mutans* cells, further studies are needed in the future to analyze more genes responsible for biofilm development.

The experimental study also showed that C8-OG had a different effect on biofilm cells than C2-MG. The results are in agreement with colorimetry, profilometry and pH measurements. This result can be explained by the fact that C8-OG inhibits biofilm formation on polystyrene and glass surfaces and acidogenicity at the level of expression of five genes. The effect of C8-OG on the control genes required for the coordination of biofilm production may explain the effect of this substance on glucan synthesis and matrix stability and biofilm production. The results also show that impaired activity of all three glycosyltransferases inhibited sucrose-dependent biofilm formation in *S. mutans*. Therefore, it can be assumed that C8-OG penetrated the EPS of the biofilm, reached the cells involved in biofilm production and induced strong effects. In this context, such a change in gene expression may explain why C2-EG did not repress the genes encoding glucan synthesis. Although the study with C8-OG showed that it induced changes in five genes, it is interesting to note that the effect of C12-LG on gene expression was limited to the *gtfD* gene. It is also important to note that the *gtfD* gene encodes GtfD, which produces soluble glucan polymers that are used as primers by GtfB. The same result was obtained by Y. Deng et al. (2021). More studies will be carried out in the future to investigate the effect of C12-LG on additional genes involved in biofilm production, as well as the amount of protein they produce.

Over the past four decades, a large number of plant extracts have been investigated for their biofilm inhibitory effects on *S. mutans* (Yanagida et al. 2000, Banavar et al. 2017, Yabuta et al. 2018, Lee et al. 2019). Some authors have investigated changes in virulence gene expression, but the data is rather fragmentary. The results of this thesis reaffirm the importance of studies on biofilms formed by *S. mutans*. The *S. mutans* biofilm is a complex and coordinately controlled structure. The EPS of the biofilm is continuously remodeled and its microenvironment is subject to dynamic changes, and future research should therefore focus on the control of EPS production, structural organization and rearrangement at the gene level, as it would provide new

knowledge that could be used to develop new tools for the prevention of tooth decay.

In conclusion, GR esters not only inhibit the biofilm formation of *S. mutans*, but also suppress acidogenicity. It was also found that GR esters with a long alkyl chain have a stronger effect than those with a short chain. The long alkyl chain C8-OG is used as an antioxidant in the food industry (Gutiérrez-Larrainzar et al. 2013). Considering the data obtained in the study and the EU legislation, which specifies an allowable concentration of C8-OG of 200 mg/kg based on the fat or oil content of the foodstuff, corresponding to 200 µg/ml (Hurtado et al. 2008, Valle et al. 2018, Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives), this compound has the potential to inhibit the *S. mutans* biofilm effectively, while being safe for the human body. Dental caries is a highly prevalent disease in the world at all ages (FDI, World Dental Federation 2015), and the need to find effective means of preventing the disease remains high. In addition, the idea of biological therapies is increasingly being raised in the medical field, and researchers are actively searching for and studying biologically active compounds that prevent the development of the disease without harming the oral microbial community (Jeon et al. 2011, Chen et al. 2021). The results of this thesis show that the GR esters C1-MG, C2-EG, C8-OG and C12-LG could be of practical use in the formulation of toothpastes, mouthwashes and dental products to improve the anticariogenic properties of these products.

## 5. CONCLUSIONS

1. Octyl and lauryl gallates with a long alkyl chain are more effective in inhibiting the viability of *S. mutans* due to lower minimum inhibitory concentrations as compared to methyl and ethyl gallates with a short alkyl chain.
2. Long alkyl chain octyl and lauryl gallates more effectively inhibit *S. mutans* biofilm formation on rigid surfaces (polystyrene, glass) at lower concentrations as compared to short alkyl chain methyl and ethyl gallates. The strength of this effect manifests itself in a concentration-dependent manner with lower than minimal inhibitory concentrations of gallic acid esters.
3. Methyl, ethyl, octyl and lauryl gallates significantly reduce acid formation (acidogenicity) in *S. mutans* biofilm. This effect strengthens with an increase in concentration of gallic acid esters and lengthening of the structural alkyl chain.
4. Octyl gallate inhibits the expression of all genes (*gbpB*, *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*) that determine the formation of the biofilm of *S. mutans*, however, ethyl and lauryl gallates do not have this effect.
5. Octyl gallate suppresses the expression of the *atpD* gene, which determines the acidogenicity of *S. mutans* biofilm; however, ethyl and lauryl gallates fail to bring about this effect, including the effect of ethyl gallate on the expression of the *atpF* gene.

## REFERENCES

176. Abachi S, Lee S, Rupasinghe HP. Molecular mechanisms of inhibition of *Streptococcus* species by phytochemicals. *Molecules*. 2016; 21(2): 215.
177. Abu-Lafi S, Rayan M, Masalha M, Abu-Farich B, Al-Jaas H, et al. Phytochemical composition and biological activities of wild *Scolymus maculatus* L. *Medicines (Basel)*. 2019 Apr 30; 6(2): 53.
178. Badhani B, Sharma N, Kakkar R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Adv* 2015; 5(35): 27540–27557.
179. Banavar RS, Nirupad S, Chippagiri P, Pandurangappa R. Antibacterial effects of natural herbal extracts on *Streptococcus mutans*: can they be potential additives in dentifrices? *Int J Dent*. 2017; 2017: 4921614.
180. Bakr RO, Wasfi R, Swilam N, Sellam IE. Characterization of the bioactive constituents of *Nymphaea alba* rhizomes and evaluation of anti-biofilm as well as antioxidant and cytotoxic properties. *J Med Plants Res*. 2016; 10: 390–401.
181. Bedoya-Correa CM, Rincón Rodríguez RJ, Parada-Sanchez MT. Genomic and phenotypic diversity of *Streptococcus mutans*. *J Oral Biosci*. 2019; 61(1): 22–31.
182. Bowen H, Burne R A, Wu H, Koo H. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. *Trends Microbiol*. 2018; 26(3): 229–242.
183. Cecchi L, Innocenti M, Urciuoli S, Arlorio M, Paoli P, Mulinacci N. In depth study of phenolic profile and PTP-1B inhibitory power of cold-pressed grape seed oils of different varieties. *Food Chem*. 2019 Jan 15; 271: 380–387.
184. Chen X, Daliri EB, Kim N, Kim JR, Yoo D, et al. Microbial etiology and prevention of dental caries: exploiting natural products to inhibit cariogenic biofilms. *Pathogens*. 2020; 9(7): 569.
185. Chen X, Daliri EB, Tyagi A, Oh DH. Cariogenic biofilm: pathology-related phenotypes and targeted therapy. *Microorganisms*. 2021; 9(6): 1311.
186. Decker EM, Klein C, Schwindt D, von Ohle C. Metabolic activity of *Streptococcus mutans* biofilms and gene expression during exposure to xylitol and sucrose. *Int J Oral Sci*. 2014 Dec; 6(4): 195–204.
187. Deng Y, Yang Y, Zhang B, Chen H, Lu Y, et al. The *vicK* gene of *Streptococcus mutans* mediates its cariogenicity via exopolysaccharides metabolism. *Int J Oral Sci*. 2021; 13(1): 45.

188. Dwivedi D, Singh V. Effects of the natural compounds embelin and piperine on the biofilm-producing property of *Streptococcus mutans*. *J Tradit Complement Med*. 2015; 6(1): 57–61.
189. FDI, World Dental Federation. The challenge of oral disease – a call for global action. The oral health atlas. 2nd ed. Geneva. 2015.
190. Friuli S, Colombo S, De Giorgio S, Paglia M. Added sugar intake: carious disease in children and systemic implications in adults. *Italian Journal of Dental Medicine*. 2020; 5(1).
191. Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res*. 2011; 45(3): 243–63.
192. Jeong SI, Kim BS, Keum KS, Lee KH, Kang SY, et al. Kaurenoic acid from *Aralia continentalis* inhibits biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013; 2013: 160592.
193. Jordon-Thaden IE, Chanderbali AS, Gitzendanner MA, Soltis DE. Modified CTAB and TRIzol protocols improve RNA extraction from chemically complex Embryophyta. *Appl Plant Sci*. 2015 May 13; 3(5).
194. Hong Q, Dong X, Chen M, Xu Y, Sun H, et al. Disinfection of *Streptococcus mutans* biofilm by a non-thermal atmospheric plasma brush. *Jpn J Appl Phys*. 2016; 55 (07LG02).
195. Hurtado C, Bustos MJ, Sabina P, Nogal ML, Granja AG, González ME, et al. Antiviral activity of lauryl gallate against animal viruses. *Antivir Ther*. 2008; 13(7): 909–17.
196. Gabe V, Kacergius T, Abu-Lafi S, Kalesinskas P, Masalha M, et al. Inhibitory effects of ethyl gallate on *Streptococcus mutans* biofilm formation by optical profilometry and gene expression analysis. *Molecules*. 2019; 24(3): 529.
197. Gabe V, Kacergius T, Abu-Lafi S, Zeidan M, Abu-Farich B, et al. Suppressive effects of octyl gallate on *Streptococcus mutans* biofilm formation, acidogenicity, and gene expression. *Molecules*. 2019; 24(17): 3170.
198. Gabe V, Zeidan M, Kacergius T, Bratchikov M, Falah M, Rayan A. Lauryl gallate activity and *Streptococcus mutans*: its effects on biofilm formation, acidogenicity and gene expression. *Molecules*. 2020 Aug 13; 25(16): 3685.
199. Gong Y, Tian XL, Sutherland T, Sisson G, Mai J, et al. Global transcriptional analysis of acid-inducible genes in *Streptococcus mutans*: multiple two-component systems involved in acid adaptation. *Microbiology (Reading)*. 2009 Oct; 155(Pt 10): 3322–3332.

200. Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, Firestone ND, Leys EJ, et al. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. PLoS One. 2012; 7(10): e47722.
201. Guo L, McLean JS, Lux R, He X, Shi W. The well-coordinated linkage between acidogenicity and aciduricity via insoluble glucans on the surface of *Streptococcus mutans*. Sci Rep. 2015 Dec 10; 5: 18015.
202. Gutiérrez-Larrainzar M, Rúa J, de Arriaga D, del Valle P, García-Armesto MR. *In vitro* assessment of synthetic phenolic antioxidants for inhibition of foodborne *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens*. Food Control, 2013; 30: 393–399.
203. Kacergius T, Abu Lafi S, Kirkliauskiene A, Gabe V, Adawi A, et al. Inhibitory capacity of *Rhus coriaria* L. extract and its major component methyl gallate on *Streptococcus mutans* biofilm formation by optical profilometry: potential applications for oral health. Mol Med Rep. 2017; 16(1): 949–956.
204. Kang MS, Oh JS, Kang IC, Hong SJ, Choi CH. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. J Microbiol. 2008; 46(6): 744–50.
205. Kidd E, Fejerskov O. Dantų ėduonies pagrindai. Kaunas, 2019.
206. Kim D, Sengupta A, Niepa TH, Lee BH, Weljie A, et al. *Candida albicans* stimulates *Streptococcus mutans* microcolony development via cross-kingdom biofilm-derived metabolites. Sci Rep. 2017 Jan 30; 7: 41332.
207. Kim B, ParK JS, Choi HY, Kwak JH, Kim WG. Differential effects of alkyl gallates on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Sci Rep. 2019 May 23; 9(1): 7741.
208. Kubo I, Fujita K, Nihei K, Nihei A. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Bacillus subtilis*. J Agric Food Chem. 2004 Mar 10; 52(5): 1072–6.
209. Lamont RJ, Hajishengallis GN, Jenkinson HF. Oral microbiology and immunology. (2 ed.) ASM Press, 2013.
210. Liu J, Ling J-Q, Zhang K, Wu DC. Physiological properties of *Streptococcus mutans* UA159 biofilm-detached cells. FEMS Microbiology Letters. 2013; 340(1): 11–18.
211. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001; 25(4): 402–8.
212. Lee YC, Cho SG, Kim SW, Kim JN. Anticariogenic potential of Korean native plant extracts against *Streptococcus mutans*. Planta Med. 2019; 85(16): 1242–1252.

213. Masalha M, Rayan M, Adawi A, Abdallah Z, Rayan A. Capturing antibacterial natural products with in silico techniques. *Mol Med Rep.* 2018 Jul; 18(1): 763-770.
214. Matsumoto-Nakano M. Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation. *Jpn Dent Sci Rev.* 2018; 54(1): 22–29.
215. Mieher JL, Larson MR, Schormann N, Purushotham S, Wu R, et al. Glucan binding protein C of *Streptococcus mutans* mediates both sucrose-independent and sucrose-dependent adherence. *Infect Immun.* 2018 Jun 21; 86(7): e00146–18.
216. Nayeem N, Asdaq SMB, Salem H, AHEI-Alfayyaz S. Gallic acid: a promising lead molecule for drug development. *J App Pharm.* 2016; 8: 213.
217. Nima G, Harth-Chu E, Hiers RD, Pecorari VGA, Dyer DW, et al. Antibacterial efficacy of non-thermal atmospheric plasma against *Streptococcus mutans* biofilm grown on the surfaces of restorative resin composites. *Sci Rep.* 2021; 11: 23800.
218. Oh E, Bae J, Kumar A, Choi HJ, Jeon B. Antioxidant-based synergistic eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms with bacitracin. *Int J Antimicrob Agents.* 2018; 52(1): 96–99.
219. Ortega E, Sadaba MC, Ortiz AI, Cespon C, Rocamora A, et al. Tumoricidal activity of lauryl gallate towards chemically induced skin tumours in mice. *Br J Cancer.* 2003; 88(6): 940–3.
220. Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, et al. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet.* 2019; 394(10194): 249–260.
221. Rossiter SE, Fletcher MH, Wuest WM. Natural products as platforms to overcome antibiotic resistance. *Chem Rev.* 2017 Oct 11; 117(19): 12415–12474.
222. Sales MS, Roy A, Antony L, Banu SK, Jeyaraman S, Manikkam R. Octyl gallate and gallic acid isolated from *Terminalia bellarica* regulates normal cell cycle in human breast cancer cell lines. *Biomed. Pharm.* 2018; 103: 1577–1584.
223. Silva A, Stipp R, Mattos-Graner R, Sampaio F, Araújo D. Influence of sub-lethal and lethal concentrations of chlorhexidine on morphology and glucosyltransferase genes expression in *Streptococcus mutans* UA159. *Advances in Microbiology.* 2014; 4: 945–954.
224. Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019; 8: 76.
225. Shemesh M, Tam A, Feldman M, Steinberg D. Differential expression profiles of *Streptococcus mutans* *fff*, *gtf* and *vicR* genes in the presence

- of dietary carbohydrates at early and late exponential growth phases. *Carbohydr Res.* 2006 Sep 4; 341(12): 2090–7.
226. Senadheera MD, Guggenheim B, Spatafora GA, Huang YC, Choi J, et al. A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects *gtfBCD*, *gbpB*, and *fff* expression, biofilm formation, and genetic competence development. *J Bacteriol.* 2005; 187 (12): 4064–4076.
227. Zhang S, Wang J, Xu W, Liu Y, Wang W, Wu K, et al. Antibacterial effects of traditional chinese medicine monomers against *Streptococcus pneumoniae* via inhibiting pneumococcal histidine kinase (VicK). *Front Microbiol.* 2015; 6: 479.
228. Valle del P, García-Armesto MR, Campos J, Posado-Fernández A, Arriaga de D et al. Antimicrobial effects of gallic acid, octyl gallate and propyl gallate on *Carnobacterium divergens* and *Leuconostoc carnosum* originating from meat. *J Food Nutr Res.* 2018; 57: 76–86.
229. Vert M, Doi Y, Hellwich K-H, Hess M, Hodge P, et al. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC recommendations 2012). *Pure Appl. Chem.* 2012;84(2):377–410.
230. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc.* 2008; 3(2): 163–75.
231. Yabuta Y, Mukoyama H, Kaneda Y, Kimura N, Bito T, et al. A lemon myrtle extract inhibits glucosyltransferases activity of *Streptococcus mutans*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2018; 82(9): 1584–1590.
232. Yanagida A, Kanda T, Tanabe M, Matsudaira F, Oliveira Cordeiro JG. Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors of mutans streptococci. *J Agric Food Chem.* 2000; 48(11): 5666–71.
233. You Y-O. Virulence genes of *Streptococcus mutans* and dental caries. *International Journal of Oral Biology.* 2019;44(2):31–36.
234. Yu OY, Zhao IS, Mei ML, Lo EC, Chu CH. Dental biofilm and laboratory microbial culture models for cariology research. *Dent J.* 2017; 5(2): 21.
235. Yumoto H, Hirota K, Hirao K, Ninomiya M, Murakami K, et al. The pathogenic factors from oral streptococci for systemic diseases. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(18): 4571.



## STUDY APPROBATION

### Publications

1. Rayan M, Abu-Lafi S, Falah M, Kacergius T, Kirkliauskiene A, **Gabe V**, Rayan A. Alkyl gallates as potential antibiofilm agents: a review. *Molecules*. **2023**; 28(4): 1751.
2. **Gabe V**, Zeidan M, Kacergius T, Bratchikov M, Falah M, Rayan A. Lauryl gallate activity and *Streptococcus mutans*: its effects on biofilm formation, acidogenicity and gene expression. *Molecules*. **2020** Aug 13; 25(16): 3685.
3. **Gabe V**, Kacergius T, Abu-Lafi S, Zeidan M, Abu-Farich B, Austys D, Masalha M, Rayan A. Suppressive effects of octyl gallate on *Streptococcus mutans* biofilm formation, acidogenicity, and gene expression. *Molecules*. **2019** Aug 31; 24(17): 3170.
4. **Gabe V**, Kacergius T, Abu-Lafi S, Kalesinskas P, Masalha M, Falah M, Abu-Farich B, Melninkaitis A, Zeidan M, Rayan A. Inhibitory effects of ethyl gallate on *Streptococcus mutans* biofilm formation by optical profilometry and gene expression analysis. *Molecules*. **2019** Feb 1; 24(3): 529.
5. Kacergius T, Abu-Lafi S, Kirkliauskiene A, **Gabe V**, Adawi A, Rayan M, Qutob M, Stukas R, Utkus A, Zeidan M, Rayan A. Inhibitory capacity of *Rhus coriaria* L. extract and its major component methyl gallate on *Streptococcus mutans* biofilm formation by optical profilometry: potential applications for oral health. *Mol Med Rep*. **2017** Jul; 16(1): 949-956.

### Oral presentations

1. **Gabe V** (presenter), Kačergius T, Ryan A. Comparison of the effect of different gallic acid esters on the ability to inhibit *Streptococcus mutans* biofilm formation and acidogenicity. Oral e-poster presentation with abstract publication at the 5th International conference on evolutionary medicine: an interdisciplinary approach to understanding the diversity of human health and disease in Vilnius, Lithuania, August 24–27, 2022. Abstract book, p. 165.
2. **Gabe V** (presenter). Activity of ethyl, lauryl and octyl gallates against *Streptococcus mutans* biofilm formation on polystyrene surface and acidogenicity. Oral presentation at the international seminar „The first QV workshop for developing new microbial eradication formulations

and methods“ in Faculty of Medicine, Vilnius University, Lithuania, July 10–11, 2018.

3. Kacergius T (presenter), **Gabe V** (presenter). Evaluation of the effect of gallic acid esters on *Streptococcus mutans* biofilm formation. Oral presentation at the III Scientific Seminar of the Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Vilnius University, April 10, 2017, Vilnius, dedicated to the review of scientific work of young scientists and researchers.

#### Scientific project

Member of the working group (researcher) of the EU EUREKA research and innovation project "Application of Peptide Nucleic Acids for the Inhibition of Streptococcal Biofilms (PAISBI)", 2013–2015.

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to my thesis advisor, Assoc. Prof. Dr. **Tomas Kačergius**, for the opportunity to carry out my research work in the laboratory of the Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine of the Institute of Biomedical Sciences at the Faculty of Medicine, Vilnius University, for excellent guidance, practical skills and knowledge provided.

I am grateful to Prof. Dr. **Saleh Abu-Lafi**, Dr. **Mahmud Masalha**, Dr. **Mouhammad Zeidan**, Dr. **Mizied Falah**, **Mahmoud Rayan** and **Basheer Abu-Farich**, researchers at the Al-Qasemi Academy Research Centre in Israel, for their collaboration in the study of the effects of gallic acid esters on biofilm formation and the quantification of genes involved in the expression of acidogenicity in *S. mutans*. I am particularly grateful to Prof. Dr. Anwar Rayan for the trust and the opportunity to participate in the research, warm communication, professional advice and insights.

I would like to thank the reviewers of the dissertation, Assoc. Prof. Dr. **Silvija Kiverytė**, Dr. **Algimantas Paškevičius** and Assoc. Prof. Dr. **Birutė Zablockienė** for their valuable and constructive comments on the improvement of the work.

I am also grateful to my colleagues who directly or indirectly contributed to the preparation of the thesis.

Finally, I would like to thank my family for their unconditional love, understanding and patience.

## ABOUT THE AUTHOR

**Name** Vika  
**Surname** Gabė  
**Date of Birth** 1983 January 17  
**Nationality** Lithuanian  
**Marital Status** Married  
**Email** [vika.gabe@mf.vu.lt](mailto:vika.gabe@mf.vu.lt)  
**Phone Number** 8 (5) 239 87 41

### Education

- 2007  
Master's Degree in Biology, Vilnius University.
- 2005  
Bachelor's Degree in Biology, Vilnius University.

### Professional Experience

- 2021 – present  
Teaching assistant, Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Vilnius University.
- 2013 – 2021  
Lecturer, Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Vilnius University.
- 2009 – 2013  
Senior specialist, Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Vilnius University.

### Membership in Societies

- Lithuanian Society for Infectious Diseases
- Lithuanian Microbiological Society
- Lithuanian Society of Laboratory Medicine

## PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju mokslinio darbo konsultantui doc. dr. **Tomui Kačergiui** už suteiktą galimybę atlikti mokslinį tiriamąjį darbą Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedros laboratorijoje, puikų vadovavimą, suformuotus praktinius įgūdžius ir suteiktas žinias.

Esu dėkinga Izraelio Al-Qasemi akademijos Mokslinių tyrimų centro mokslininkams: prof. dr. **Saleh Abu-Lafi**, dr. **Mahmud Masalha**, dr. **Mouhammad Zeidan**, dr. **Mizied Falah**, **Mahmoud Rayan** ir **Basheer Abu-Farich**, – už bendradarbiavimą nustatant galo rūgšties esterių poveikį *S. mutans* biologinės plėvelės formavimąsi ir acidogeniškumą lemiančių genų kiekybinei raiškai. Ypatingai esu dėkinga prof. dr. **Anwar Rayan** už pasitikėjimą ir suteiktą galimybę dalyvauti moksliniame tyrime, šiltą bendravimą, dalykinius patarimus ir profesionalias išvalgas.

Dėkoju disertacijos recenzentams doc. dr. **Silvijai Kiverytei**, dr. **Algimantui Paškevičiui** ir doc. dr. **Birutei Zablockienei** už vertingas ir konstruktyvias pastabas tobulinant darbą.

Taip pat esu dėkinga kolegoms, kurie tiesiogiai ar netiesiogiai prisidėjo prie disertacijos rengimo.

Galiausiai, dėkoju savo šeimai už besąlygišką meilę, supratimą ir kantrybę.

## DARBO APROBACIJA

### Straipsniai recenzuojamuose žurnaluose

6. Rayan M, Abu-Lafi S, Falah M, Kacergius T, Kirkliauskiene A, **Gabe V**, Rayan A. Alkyl gallates as potential antibiofilm agents: a review. *Molecules*. **2023**; 28(4): 1751.
7. **Gabe V**, Zeidan M, Kacergius T, Bratchikov M, Falah M, Rayan A. Lauryl gallate activity and *Streptococcus mutans*: its effects on biofilm formation, acidogenicity and gene expression. *Molecules*. **2020** Aug 13; 25(16): 3685.
8. **Gabe V**, Kacergius T, Abu-Lafi S, Zeidan M, Abu-Farich B, Austys D, Masalha M, Rayan A. Suppressive effects of octyl gallate on *Streptococcus mutans* biofilm formation, acidogenicity, and gene expression. *Molecules*. **2019** Aug 31; 24(17): 3170.
9. **Gabe V**, Kacergius T, Abu-Lafi S, Kalesinskas P, Masalha M, Falah M, Abu-Farich B, Melninkaitis A, Zeidan M, Rayan A. Inhibitory effects of ethyl gallate on *Streptococcus mutans* biofilm formation by optical profilometry and gene expression analysis. *Molecules*. **2019** Feb 1; 24(3): 529.
10. Kacergius T, Abu-Lafi S, Kirkliauskiene A, **Gabe V**, Adawi A, Rayan M, Qutob M, Stukas R, Utkus A, Zeidan M, Rayan A. Inhibitory capacity of *Rhus coriaria* L. extract and its major component methyl gallate on *Streptococcus mutans* biofilm formation by optical profilometry: potential applications for oral health. *Mol Med Rep*. **2017** Jul; 16(1): 949-956.

### Pranešimų mokslinėse konferencijose tezės

4. **Gabe V** (pranešėja), Kacergius T, Ryan A. Comparison of the effect of different gallic acid esters on the ability to inhibit *Streptococcus mutans* biofilm formation and acidogenicity. Oral e-poster presentation with abstract publication at the 5th International conference on evolutionary medicine: an interdisciplinary approach to understanding the diversity of human health and disease in Vilnius, Lithuania, August 24–27, 2022. Abstract book, p. 165.
5. **Gabe V** (pranešėja). Activity of ethyl, lauryl and octyl gallates against *Streptococcus mutans* biofilm formation on polystyrene surface and acidogenicity. Oral presentation at the international

seminar „The first QV workshop for developing new microbial eradication formulations and methods“ in Faculty of Medicine, Vilnius University, Lithuania, July 10–11, 2018.

6. Kačergius T (pranešėjas), **Gabė V** (pranešėja). Galo rūgšties esterių poveikio *Streptococcus mutans* bioplėvelės susidarymui įvertinimas. Žodinis pranešimas Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedros III mokslo seminare, skirtame jaunųjų mokslininkų ir tyrėjų mokslo darbų apžvalgai, 2017 m. balandžio 10 d., Vilnius.

#### Dalyvavimas projektinėje veikloje

2013–2015 m. ES programos EUREKA mokslinių tyrimų ir inovacijų projekto „Peptidinių nukleorūgščių taikymas streptokokų bioplėvelių slopinimui (PAISBI)“ darbo grupės narys (tyrėja).

## APIE AUTORE

<b>Vardas</b>	Vika
<b>Pavardė</b>	Gabė
<b>Gimimo data</b>	1983 m. sausio 17 d.
<b>Tautybė</b>	Lietuvė
<b>Šeimyninė padėtis</b>	Ištekėjusi
<b>El. paštas</b>	<a href="mailto:vika.gabe@mf.vu.lt">vika.gabe@mf.vu.lt</a>
<b>Tel.</b>	8 (5) 239 87 41

### Išsilavinimas

- 2007  
Biologijos magistro diplomą, Vilniaus universitetas.
- 2005  
Biologijos bakalauro diplomą, Vilniaus universitetas.

### Profesinė patirtis

- 2021 – dabar  
Jaunesnioji asistentė, Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedra, Medicinos fakultetas, Vilniaus universitetas.
- 2013 – 2021  
Lektorė, Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedra, Medicinos fakultetas, Vilniaus universitetas.
- 2009 – 2013  
Vyresnioji specialistė, Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedra, Medicinos fakultetas, Vilniaus universitetas.

### Narystė

- Lietuvos infektologų draugija
- Lietuvos mikrobiologų draugija
- Lietuvos laboratorinės medicinos draugija



# UŽRAŠAMS

# UŽRAŠAMS

# UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla  
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius  
El. p. [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt), [www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
[bookshop.vu.lt](http://bookshop.vu.lt), [journals.vu.lt](http://journals.vu.lt)  
Tiražas 25 egz.