

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO  
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR  
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**BISMUTO GALATO POVEIKIS *STREPTOCOCCUS MUTANS* BIOPLĖVELĖS  
SUSIDARYMUI**

Magistrantė ANA NEMČIONOK \_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo vadovas  
doc. dr. T. Kačergius

\_\_\_\_\_  
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir  
laboratorinės medicinos katedros vedėja  
doc.dr. D. Karčiauskaitė leidžiama ginti

\_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo įteikimo data \_\_\_\_\_  
Registracijos Nr. \_\_\_\_\_

2019 m., Vilnius

## TURINYS

SANTRUMPOS .....	4
ĮVADAS .....	5
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI .....	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	8
1.1. Žmogaus mikrobiota .....	8
1.2. Dantų bioplėvelės formavimasis .....	8
1.2.1. Dantų bioplėvelė .....	8
1.2.2. Adhezijos mechanizmai .....	9
1.2.3. Dantų bioplėvelės formavimosi etapai .....	9
1.3. Bioplėvelės atsparumas įvairiems poveikiams .....	11
1.4. <i>Streptococcus mutans</i> įtaka dantų ėduonies raidai .....	12
1.4.1. <i>S. mutans</i> bakterijos savybės ir genetinė sandara .....	12
1.4.2. <i>S. mutans</i> virulentiškumo veiksniai .....	13
1.4.3. <i>S. mutans</i> įtaka bioplėvelės susidarymui .....	13
1.4.4. <i>S. mutans</i> atsparumas rūgštinei aplinkai .....	14
1.5. Medžiagos slopinančios bioplėvelės formavimąsi .....	15
1.6. Galo rūgštis ir bismuto galatas .....	17
1.6.1. Galo rūgšties fizinės bei cheminės savybės .....	17
1.6.2. Galo rūgšties bei jos esterų antibakterinis bei bioplėvelės susidarymą slopinantis poveikis .....	18
1.6.3. Bismuto galato savybės .....	18
1.6.4. Bismuto galato poveikis bakterijoms .....	19
2. TYRIMO METODIKA .....	20
2.1. Eksperimente naudotos priemonės, reagentai ir prietaisai .....	20
2.2. Bakterijų padermė ir kultivavimo sąlygos .....	21
2.3. Bismuto galato paruošimas .....	21
2.4. Eksperimentinio tyrimo eiga .....	21
2.5. Kolorimetrijos metodika .....	22
2.6. Optinės profilometrijos metodika .....	22
2.7. <i>S. mutans</i> bioplėvelės augimo terpės pH nustatymas .....	23
2.8. Statistinė duomenų analizė .....	23
3. DARBO REZULTATAI .....	24
3.1. Bismuto galato poveikis <i>S. mutans</i> bioplėvelės biomasės susidarymui .....	24
3.2. Bismuto galato poveikis <i>S. mutans</i> bioplėvelės storiui bei paviršiaus šiurkštumui .....	26

3.3. Bismuto galato poveikis <i>S. mutans</i> bioplėvelės augimo terpės pH.....	29
4. REZULTATŲ APTARIMAS .....	30
IŠVADOS IR PASIŪLYMAI.....	33
SUMMARY .....	34
SANTRAUKA .....	35
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	36

## SANTRUMPOS

PSO - Pasaulio sveikatos organizacija

KPI - ėduonies pažeistų, plombuotų ir išrautų dantų skaičius

SK – seilių komponentai

GPS – gliukanų polisacharidai

Gtf – gliukoziltransferazė

Ftf - fruktoziltransferazė

F-ATPazė - F tipo adenzino trifosfazė

GBPs – gliukanus prisijungiantys baltymai (*angl. glucan-binding proteins*)

Ag I/II – antigenas I/II

gp-340 – glikoproteinas 340

ATP – adenzintrifosfatas

NAD<sup>+</sup> - nikotinamido adenino dinukleotidas (oksiduotas)

S-IgA - sekretinis imunoglobulinas A

DNR – deoksiribonukleorūgštis

OT – optinis tankis

BG – bismuto galatas

## IVADAS

Dantų ėduonis, dar kitaip vadinamas kariesas - yra labiausiai paplitusi burnos liga tiek išsivysčiusiose, tiek besivystančiose pasaulio šalyse. Ši liga yra didelė visuomenės sveikatos problema. Tyrimais nustatyta kad 2,5 milijardų žmonių visame pasaulyje serga kariesu [1]. Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis dantų ėduonį turi 60-90% mokyklinio amžiaus vaikų bei didžioji dauguma suaugusiųjų [2]. Ėduonies intensyvumas, atliekant epidemiologinius tyrimus, dažniausiai išreiškiamas naudojant PSO rekomenduojamą KPI indeksą, t. y. ėduonies pažeistų, plombuotų ir išrautų dantų skaičius, tenkantis vienam individui. Dantų ėduonies intensyvumas ir paplitimas įvairiose pasaulio šalyse skiriasi. Remiantis duomenimis, gautais atlikus tyrimus laikotarpyje nuo 1973 iki 2008 metų, ėduonies intensyvumo indeksas (KPI) pasaulyje siekė 2,11 ( $\pm$  1,32). Pastebėta, kad Amerikos bei Europos regionų rodikliai viršijo pasaulio vidurkį. Išskiriamos buvo 24 Europos šalys, iš kurių labiausiai pasaulio vidurkį viršijo: Serbija, Ukraina, Slovakija, Bosnija bei Hercegovina, o taip pat ir Lietuva [3]. Kitų autorių duomenimis 2010 metais dantų ėduonies paplitimas pasaulyje siekė 35%, didžiausias sergamumas buvo stebimas Centrinės Europos (47%) bei Pietų Amerikos šalyse, (45%), tuo tarpu mažiausias – Australijos bei Šiaurės Amerikos šalyse (apie 20%) [4]. 2015 metais didžiausias dantų ėduonies paplitimas buvo stebimas Lotynų Amerikoje (54.9 %) [1]. Atlikus tyrimus Europos regione nustatyta, kad  $\geq$ 92% suaugusiųjų turi kariesą [5]. Lietuvoje atlikti tyrimai parodė, kad dantų ėduonies paplitimas 2016 metais tarp 18 metų asmenų siekė 78,3%, o KPI – 2,93 [6]. Taigi, atsižvelgiant į epidemiologinius rodiklius galima teigti, kad dantų ėduonies problema išlieka aktuali ir reikalauja prevencinių veiksmų.

Dantų ėduonis arba kariesas - tai liga, kurios metu vyksta dantų irimas ir susiformuoja kariozinė ertmė [11]. Kietųjų audinių pažeidimas vyksta dėl dantų demineralizacijos, t. y. mineralinių medžiagų tirpimo veikiant rūgštims, kurias gamina bakterijos metabolizuodamos angliavandenius. Dantų ėduonies klinikinę eigą lemia tam tikrų mikroorganizmų aktyvumas, maisto, turinčio daug angliavandenių vartojimas, o taip pat ir burnos higiena [22, 23]. Tačiau šios ligos atsiradimą labiausiai įtakoja tam tikros burnos bakterijos, rūšys, vadinamos kariesogeninėmis bakterijomis. Svarbiausiu veiksnium karieso etiologijoje laikomos *Streptococcus mutans* bakterijos [24, 25]. Dauguma burnos bakterijų geba formuoti bioplėveles. Dantų bioplėvelė – tai įvairių rūšių bakterijų agregatas, besitvirtinantis prie dantų kietųjų paviršių ir užtikrinantis bakterijoms idealias augimo sąlygas [13, 14]. *S. mutans* bakterijos vadinamos pirminiais kariesogenais, pasižyminčiais virulentiškumu, nes inicijuoja bioplėvelių formavimąsi. Taigi, *S. mutans* bakterijos laikomos svarbiausiu veiksnium karieso etiologijoje ir patogenezėje, kurios, sąveikoję su kitomis burnos bakterijomis, įtakoja šios ligos raidą [24, 25].

Šiuo metu karieso profilaktikai naudojamos priemonės, turinčios fluoro junginių bei sintetinių cheminių medžiagų: chlorheksidino, triklozano [38]. Tokios medžiagos įeina į burnos higienos priemones: dantų pastas, burnos skalavimo skysčius. Fluoras skatina dantų remineralizaciją, o chlorheksidinas bei triklozanas pasižymi antibakteriniu poveikiu. Tačiau, esant ilgam ir nepertraukiamam minėtų medžiagų vartojimui, kai kurios bakterijos įgyja joms atsparumą. Todėl, siekiant išvengti pastarojo efekto bei pagerinti burnos sveikatą ir sumažinti eduoones atsiradimo riziką, turi būti ieškoma naujų prevencinių priemonių. Tyrimų, kuriuose būtų įvertintas bismuto galato efektas bakterinėms bioplėvelėms, nėra atlikta. Todėl šiame darbe buvo siekiama nustatyti bismuto galato poveikį *S. mutans* bioplėvelės susidarymui.

## DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

### DARBO TIKSLAS:

Nustatyti bismuto galato poveikį *Streptococcus mutans* bioplėvelės susidarymui *in vitro*.

### DARBO UŽDAVINIAI:

1. Įvertinti bismuto galato poveikį *S. mutans* bioplėvelės biomasei, naudojant kolorimetrijos metodą.
2. Nustatyti bismuto galato poveikį *S. mutans* bioplėvelės storiui bei šiurkštumui, taikant optinės profilometrijos metodą.
3. Įvertinti bismuto galato poveikį *S. mutans* bioplėvelės pH pokyčiams.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Žmogaus mikrobiota

Mikroorganizmai yra labai paplitę visame pasaulyje. Žmonės evoliucionavo apsupti mikroorganizmų, todėl šie tapo žmonių neatsiejama dalimi. Tai pagrindžia atlikti tyrimai. Apskaičiuota, kad mikroorganizmų kiekis žmogaus kūne siekia  $3,8 \cdot 10^{13}$ , o žmogaus organizmo ląstelių skaičius lygus  $3,0 \cdot 10^{13}$  [7]. Taigi mikroorganizmų kiekis žmogaus organizme yra tikrai didelis ir sudaro apie 0,2 kg kūno masės.

Kiekvienoje kūno dalyje yra unikali mikrobiota, besiskirianti tarp individų. Mikroorganizmų daugiausiai randama žarnyne, burnos bei nosies ertmėje, ant odos, urogenitalinėje sistemoje. Burnos ertmė yra labiausiai kolonizuota mikroorganizmais, po žarnyno [8]. Remiantis Žmogaus burnos mikrobiomo duomenų baze (angl. *Human Oral Microbiome Database*), burnoje identifikuota apie 770 mikroorganizmų rūšių, iš kurių 70% kultivuojamos, o 30% priklauso nekultivuojamiems mikroorganizmams, kurių nepavyksta išauginti *in vitro* tam, kad galima būtų juos ištirti [9]. Burnos ertmėje yra daugelis paviršių, kurie gali būti kolonizuoti mikroorganizmais. Jos mikroflorą daugiausiai sudaro bakterijos, taip pat grybai, pirmuonys, rečiau – virusai [10]. Iš visų mikroorganizmų grupių, bakterijos turi didžiausią įtaką burnos ligų raidai. Burnos ertmę kolonizuoja daugelis bakterijų: *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* ir kitų genčių atstovai. Dominuojančios bakterijos yra *Streptococcus* genties rūšys, pavyzdžiui: *S. mitis*, *S. oralis*, *S. salivarius*. Jos priklauso nepatogeninei burnos mikroflorai, kuri gamindama įvairius toksinius metabolitus konkuruoja su kitų rūšių bakterijomis bei slopina nepageidaujamų patogenų kolonizaciją [10, 11].

## 1.2. Dantų bioplėvelės formavimasis

### 1.2.1. Dantų bioplėvelė

Bakterijos retai gyvena izoliuotose, vienos rūšies kolonijose arba kaip vienaląsčiai organizmai. Joms būdingas gyvenimas „bendrijose“. Tokios „bendrijos“ vadinamos bioplėvelėmis. Bioplėvelė – tai įvairių rūšių bakterijų agregatas, stipriai besitvirtinantis prie kieto paviršiaus, kurį gaubia šeimininko bei bakterijų polimerų matrica [11-14]. Tarpbakterinę matricą sudaro: daugiausia polisacharidai (gliukanai, fruktanai) ir baltymai, o taip pat nukleorūgštys ir lipidai [13]. Šis sudėtingas darinys pasižymi griežta struktūra, kurioje skirtingos bakterijos pasiskirsto nevienodai pagal metabolinį aktyvumą. Toks pasiskirstymas paremtas skirtingu gebėjimu metabolizuoti maisto medžiagas [15]. Bioplėvelėje bakterijų rūšys egzistuoja labai



glaudžioje sąveikoje, sudaro koordinuotą ir funkcionalią biocenozę, kuri užtikrina idealias augimo sąlygas, efektyvų trūkstamų maisto medžiagų panaudojimą bei padidina atsparumą egzogeniniams veiksniams [14].

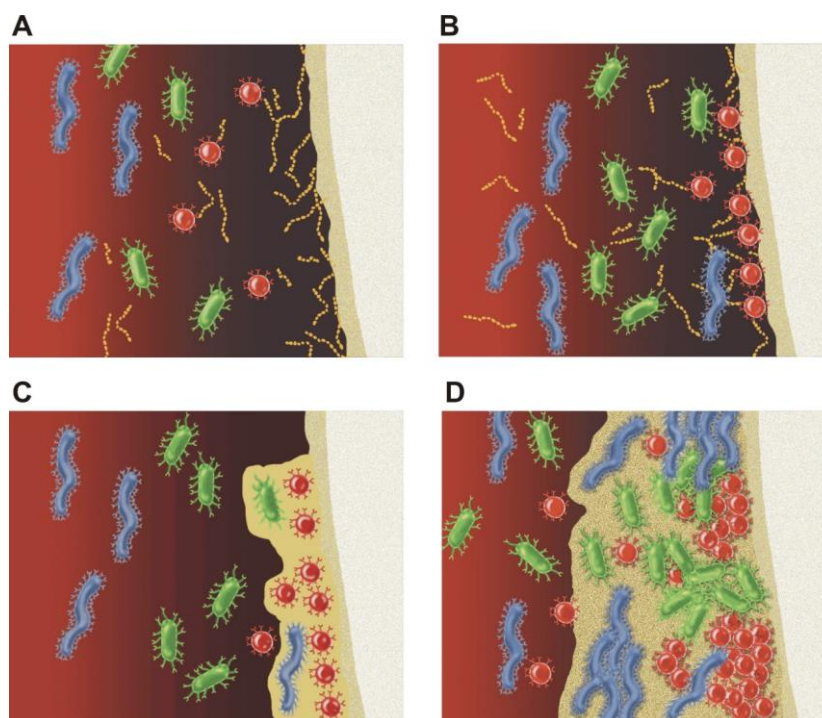
### **1.2.2. Adhezijos mechanizmai**

Svarbiausias veiksnys bioplėvelei susiformuoti yra adhezija, t. y. bakterijų gebėjimas prisitvirtinti prie paviršiaus. Adheziją lemia nespecifinės jėgos ir specifinės sąveikos atsirandančios tarp mikroorganizmo ir šeimininko paviršiaus. Veikiant nespecifinėms jėgoms, pavyzdžiui: joninėms, vandenilinėms bei hidrofobinėms jungtims, Van der Valso jėgoms, įvyksta pirminė bakterijų adhezija, kuri yra nestipri. Ilgalaikiai adhezijai reikia didesnio afiniteto jungčių, kurios atsiranda dėl specifinių sąveikų tarp adhezinų, esančių ant bakterijų paviršiaus ir šeimininko dantų emalį dengiančios pelikulės receptorių. Veikiant specifinėms sąveikoms susidaro stiprios ir negrižtamos jungtys (pvz.: baltymas-angliavandenis, baltymas-baltymas), pasižyminčios specifiškumu, kuri sąlygoja adhezinų komplementarumas substrato receptoriams [11, 14, 16].

### **1.2.3. Dantų bioplėvelės formavimosi etapai**

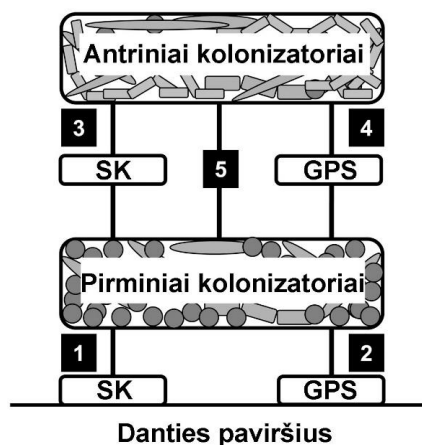
Dantų bioplėvelės susidarymo modelis paremtas bakterijų adhezija prie kieto paviršiaus bei tarpusavio sąveika. Pagrindinės dantų bioplėvelės formavimosi stadijos yra pateiktos 1 paveiksle [14]:

1. Dantų bioplėvelės formavimasis prasideda nuo dantų paviršinio kietojo audinio - emalio padengimo plona plėvele, vadinama pelikule, kuri sudaryta iš seilių baltymų ir glikoproteinų (1A pav.).
2. Dėka receptorių sąlygotos adhezijos prie susidariusios pelikulės prisitvirtina bakterijos (1B pav.).
3. Įvairių rūšių bakterijos sintezuodamos polimerines medžiagas suformuoja bioplėvelės matricą (1C pav.).
4. Besidauginančios bakterijos sudaro mikrokolonijas ir suformuoja dantų bakterinę plėvelę. (1D pav.).



**1 pav.** Dantų bakterinės plėvelės formavimasis. Adaptuota iš R. J. Lamont, R. A. Burne, M. S. Lantz ir D. J. LeBlanc vadovėlio „Oral Microbiology and Immunology“ (ASM Press, Washington, DC, 2006).

Prie susidariusios pelikulės ant dantų paviršiaus prisijungia pirmosios bakterijos, vadinamos pirminiais kolonizatoriais. Dažniausiai tai būna *Streptococcus* arba *Actinomyces* genties atstovai, kurie prisijungia prie pelikulės per seilių komponentus (SK) (2 pav. 1, 3) ir gliukano polisacharidus (GPS) (2 pav. 2, 4) [11]. SK – tai seilėse esančios medžiagos, pavyzdžiui: prolinu turtingi baltymai, įvairūs glikoproteinai, seilių fermentai, o GPS – tai netirpūs komponentai, sintetinami veikiant bakterijų fermentams gliukoziltransferazėms (Gtf). Pirminiai kolonizatoriai tampa substratu antriniams kolonizatoriams, t. y. laisvame būvyje esančios bakterijos jungiasi prie jau prisitvirtinusių bakterijų paviršiuje esančių SK ir GPS. Toks procesas vadinamas koadhezija. Antriniams kolonizatoriams yra būdinga ir tiesioginė adhezija prie pirminių kolonizatorių, kuri vyksta baltymų-angliavandenių ryšių pagalba (2 pav. 5) [11].



**2 pav.** Pirminiai ir antriniai dantų paviršiaus kolonizatoriai. Adaptuota iš R. J. Lamont, R. A. Burne, M. S. Lantz ir D. J. LeBlanc vadovėlio „Oral Microbiology and Immunology“ (ASM Press, Washington, DC, 2006).

### 1.3. Bioplėvelės atsparumas įvairiems poveikiams

Bakterijos sudarančios bioplėvelę yra labiau atsparios nepalankioms aplinkos sąlygoms, biocidinėms medžiagoms, antibiotikams bei šeimininko gynybiniais mechanizmais [17]. Išskiriami keli veiksniai, lemiantys bakterijų, sudarančių bioplėvelę, atsparumą. Egzopolisacharidinė matrica, gaubianti visą bioplėvelės struktūrą, pasižymi ribota difuzija, todėl sumažėja antibiotikų patekimas [18]. Kai kurios bakterijų rūšys sintetina fermentus, gebančius baktericidinių poveikiu pasižyminčias medžiagas transformuoti į netoksišką formą [19]. Taip pat atsparumą lemia bioplėvelėje esančių bakterijų heterogeniškumas. Dėl ribotos difuzijos, maistinės medžiagos ir deguonies kiekis bioplėvelėje pasiskirsto nevienodai. Išoriniame sluoksnyje jų kiekis didesnis, o tuo tarpu vidiniame – mažesnis. Dėl to įvairiuose bioplėvelės sluoksniuose skiriasi bakterijų metabolinis aktyvumas bei augimo greitis: išoriniuose sluoksniuose stebimas aukštas aktyvumas, vidiniuose - žemas. Baktericidiniu poveikiu pasižyminčios medžiagos veikia metaboliškai aktyvias, greitai augančias bakterijas, o tuo tarpu neaktyvios ir lėtai augančios bakterijos yra mažiau jautrios. Toks bioplėvelės „išsisluoksniavimas“ pagal metabolinį aktyvumą lemia didesnę atsparumą antibiotikams [18-20]. Be to, bioplėvelės atsparumui turi įtakos kvorumo jutimas (angl. *quorum sensing*) – tai yra tarpbakterinė komunikacija. Bakterijos sekretuoja signalines molekules, kurių dėka reguliuojama jų genų raiška. Tokiu būdu yra koordinuojama bakterijų veikla, jų virulentiškumas, judrumas, konjugacija bei bakterinės plėvelės formavimasis [19, 20]. Išskiriami ir kiti bakterijų atsparumą didinantys veiksniai, pavyzdžiui, genų mutacijos, dėl kurių pasikeičia bakterijų išorinės membranos struktūra bei ekspresuojamos molekulės [18, 19]. Įtakos turi ir horizontali genų pernaša. Tarpbakterinės sąveikos metu, pavyzdžiui konjugacijos, yra perduodami genai, atsakingi už atsparumą [18]. Didelę įtaką taip pat turi išmetimo pumpų ekspresija bakterinių

ląstelių paviršiuje. Šios struktūros leidžia bakterijoms reguliuoti vidinę homeostazę šalindamos tokias toksines medžiagas, kaip antibiotikai, ir toksiški metabolitai [21]. Taigi bioplėvelės struktūra, jos ypatumai bei egzistuojantys glaudūs tarpbakteriniai ryšiai leidžia bakterijoms išlikti gyvybingoms nepalankiomis sąlygomis ir lemia jų atsparumą. Dėl aukščiau minėtų priežasčių, bakterinių bioplėvelių sukeltos ligos yra sunkiai gydomos.

#### **1.4. *Streptococcus mutans* įtaka dantų ėduonies raidai**

Viena dažniausių burnos ligų, kurios etiologijoje svarbų vaidmenį vaidina tam tikri mikroorganizmai, gebantys formuoti bioplėveles, yra dantų ėduonis. Ši liga, kitaip dar vadinama kariesu – tai sutrikimas, kuriuo metu vyksta danties kietųjų audinių irimas. Kariesas atsiranda, kai dantų emalyje pradeda mažėti mineralinių medžiagų ir susidaro kariozinė ertmė. Nustatyta, kad karieso raidoje svarbų vaidmenį vaidina maisto, turinčio daug angliavandenių, vartojimas [22]. Tačiau šios ligos atsiradimą labiausiai įtakoja tam tikros burnos bakterijų rūšys, t. y. kariesogeninės bakterijos, kurios metabolizuodamos maisto angliavandenius išskiria organines rūgštis, lemiančias danties kietųjų audinių demineralizaciją [23]. Išskiriami kariesogenai: pirminiai (*S. mutans* bakterijos) bei antriniai (*Lactobacillus*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Actinomyces* ir *Fusobacterium*) [11]. Svarbiausiu veiksmu karieso etiologijoje ir patogenezėje yra laikomos *S. mutans* bakterijos, kurios, sąveikoje su kitomis burnos bakterijomis, įtakoja šios ligos raidą [24, 25].

##### **1.4.1. *S. mutans* bakterijos savybės ir genetinė sandara**

Pirmasis *S. mutans* bakterijas apibūdino J. Kilian Clarke 1924 metais [26]. Tai žmogaus burnos ertmės mikrofloros atstovas, kolonizuojantis dantų kietųjų audinių paviršius [14]. Pagal tarptautinę J. Bergey klasifikaciją šios bakterijos yra priskiriamos *Bacteria* domeniui, *Eubacteria* karalystei, *Firmicutes* tipui, *Bacilli* klasei, *Lactobacillales* eilei, *Streptococcaceae* šeimai, *Streptococcus* genčiai, *Streptococcus mutans* rūšiai. Tai apvalios ar ovalios formos, 0,5-0,75 µm diametro, nejudrūs, nesudarantys sporų ir kapsulių mikroorganizmai, priklausantys fakultatyviniams anaerobams. *S. mutans* pagal nusidažymą Gramo metodu priskiriami granteigiamoms bakterijoms, kurios nusidažo violetine spalva. Tepinėliuose išsidėsto įvairaus ilgio grandinėmis. Ši bakterija geriausiai auga selektyviose mitybinėse terpėse su padidintu sacharozės kiekiu. Kolonijos mažos, plokščios, nelygiais kraštais ir matiniu paviršiumi, 0,5-1 mm diametro. Kolonijų paviršiuje gali būti matomi skysčio lašeliai, tai yra egzopolisacharidai, kuriuos sintetina bakterijos. *S. mutans* pasižymi dideliu biocheminiu aktyvumu, skaido daugumą angliavandenių (laktozę, maltozę, manitolį, melibiozę, sacharozę, sorbitolį, inuliną, rafinozę, N-acetil-gliukozaminą) iki rūgščių. Be to sintetina α-D-gliukozidazę, β-D-gliukozidazę, α-D-galaktozidazę, acetoiną iš gliukozės (teigiamas Voges-Proskauer testas). Taip pat ši bakterija

hidrolizuoja eskuliną, bet ne argininą. Neturi katalazės aktyvumo, negamina ureazės, yra atspari bacitracinui [11].

Pagal antigeninę sandarą yra skiriami septyni *S. mutans* serovariai: a, b, c, d, e, f ir g [11]. Daugiausiai su karieso raida yra siejama *S. mutans* UA159 padermės c serovaras. *S. mutans* UA159 padermės genomą sudaro žiedinė chromosoma, kurios dydis siekia 2,03293 Mb (2 032 925 bp), turinti 2040 genų, koduojančių 1958 baltymus [27]. *S. mutans* priskiriamos prie bakterijų, turinčių mažą G+C (guanino + citozino) porų kiekį (<60%), kuris lygus 36,8%. G+C sąstatas yra vertinamas pagal DNR lydymosi temperatūrą, kuo didesnis G+C kiekis, tuo aukštesnė lydymosi temperatūra [27, 28].

#### **1.4.2. *S. mutans* virulentiškumo veiksniai**

*S. mutans* pasižymi specifiniais virulentiškumo veiksniais, kurie lemia burnos ligų (dantų ėduonies) išsivystymą [14, 29, 31]. Svarbiausiais veiksniais laikomi bakterijų egzofermentai: gliukoziltransferazė (Gtf) ir fruktoziltransferazė (Ftf). Veikiant šiems fermentams iš angliavandenių sintetinami gliukozės bei fruktozės polimerai: gliukanai bei fruktanai, kurie lemia ilgalaikę adheziją prie paviršiaus ir skatina bioplėvelės susidarymą [14, 30, 31]. Taip pat didelę reikšmę turi baltymas adhezinas - antigenas I/II (Ag I/II), kurį koduoja *spaP* genas [14, 34]. Antigenas I/II yra ekspresuojamas bakterijų paviršiuje ir turi aukštą afiniškumą seilių glikoproteinui – agliutininui (gp-340). Prisijungimas prie pelikulėje esančių agliutininių skatina bakterijų adheziją prie dantų paviršiaus. *S. mutans* virulentiškumą taip pat lemia F tipo adenozintrifosfazė (F-ATPazė), kuri užtikrina bakterijų atsparumą rūgščių poveikiui bei efektyvų augimą žemo pH sąlygomis [14, 29].

#### **1.4.3. *S. mutans* įtaka bioplėvelės susidarymui**

*S. mutans* bakterijos laikomos pirminiais kariesogenais, kurie inicijuoja bioplėvelės formavimąsi. Egzistuoja du mechanizmai, kuriais *S. mutans* bakterijos jungiasi prie susiformavusios dantų emalio pelikulės [29]. Vienas iš būdų yra nuo angliavandenių priklausoma adhezija. Šio mechanizmo pagrindiniai veiksniai yra bakterijų sintetinami egzofermentai (Gtf, Ftf) bei gliukanus prisijungiantys baltymai (angl. *glucan-binding proteins* [*GBPs*]) [14, 29-31]. Gtf fermentus sudaro du domenai: gliukanų sintezės bei gliukanų prisijungimo domenai. Gliukanų sintezės domene vyksta angliavandenių hidrolizė, o susidariusios gliukozės molekulės yra sujungiamos gliukanų prisijungimo domene suformuojant gliukozės polimerus (gliukanus) [14]. Išskiriami trys gliukoziltransferazių tipai: GtfB, GtfC ir GtfD. GtfB užtikrina vandenyje netirpių gliukanų sintezę, kuriuose tarp gliukozės monomerų dominuoja  $\alpha$ -1,3 jungtys. GtfC sintetina netirpius bei tirpius gliukanus, kuriuose dominuoja  $\alpha$ -1,6

jungtys, o GtfD – tirpius gliukanus. Kitą *S. mutans* egzofermentą Ftf taip pat sudaro du domenai: fruktanų sintezės bei fruktanų prisijungimo domenai. Šiuo atveju, fruktanų sintezės domene vyksta angliavandenių hidrolizė, o susidariusios fruktozės molekulės yra sujungiamos fruktanų prisijungimo domene suformuojant fruktozės polimerus (fruktanus). Ftf sintetina vandenyje tirpius fruktanus. [14, 29-31]. Taigi, egzofermentų funkcija yra ekstraląstelinių polisacharidų sintezė: tirpūs fruktanai yra kaip ekstraląstelinės angliavandenių saugyklos, kurios naudojamos energijai gaminti esant nepalankioms sąlygoms, o tuo tarpu gliukanai dalyvauja bakterijų adhezijoje bei formuoja bioplėvelės matricą [14].

Dar vienas svarbus nuo angliavandenių priklausomos adhezijos mechanizmo komponentas yra gliukanus prisijungiantys baltymai (Gbp). Išskiriami keturi jų tipai: GbpA, GbpB, GbpC ir GbpD. Šie baltymai yra ant bakterijų sienelės paviršiaus ir atlieka receptorių funkciją susintetintiems gliukanams bei tokiu būdu dalyvauja adhezijoje bei bioplėvelės susidaryme [32, 33]. Taigi, nuo angliavandenių priklausomo adhezijos mechanizmo metu susidariusios sąveikos tarp Gtf susintetintų gliukanų ir bakterijų ekspresuojamų gliukanus prisijungiančių baltymų užtikrina stiprų bioplėvelės prisitvirtinimą prie dantų paviršiaus [14, 29, 30].

Kitas mechanizmas, būdingas *S. mutans* bakterijoms, yra nuo angliavandenių nepriklausoma adhezija. Nustatyta, kad šiuo atveju sąveika vyksta tarp bakterijų paviršiuje esančių adhezijos molekulių bei dantų emalio pelikulės. Vienas iš adhezijos baltymų, esančių bakterijų sienelės paviršiuje, yra antigenas I/II (Ag I/II). Šis baltymas specifiškai jungiasi su pelikulėje esančiais seilių glikoproteinais – agliutininais (gp-340), taip užtikrindamas bakterijų prisitvirtinimą prie danties kietųjų paviršių [14, 34].

#### **1.4.4. *S. mutans* atsparumas rūgštinei aplinkai**

Visos bakterijos energiją gauna adenzintrifosfato (ATP) pavidalu, skaidant organines medžiagas: angliavandenius, baltymus, lipidus [11]. *S. mutans* metabolizuodamas angliavandenius (gliukozę, fruktozę) glikolizės metu gauna energiją ATP pavidalu, o susidaręs piruvatas, katalizuojant fermentui laktatdehidrogenazei, verčiamas į pieno rūgštį (laktatą), redukuojantis nikotinamido adenino dinukleotidui ( $\text{NAD}^+$ ) [14]. Taigi, *S. mutans* bakterijos, naudodamos angliavandenius kaip energijos šaltinį, gamina ir išskiria į aplinką pieno rūgštį kaip galutinį metabolizmo produktą.

Bakterijų gaminamos rūgštys sumažina bioplėvelės pH iki 5,5 ir mažiau. Rūgštinės aplinkos sąlygos bioplėvelėje slopina rūgštims neatsparių, „neutrofilinių“ bakterijų augimą ir lemia jų žūtį, nes šių bakterijų optimali aplinkos pH vertė yra artima neutraliai. Todėl esant pastoviai žemam pH vyksta acidofilinių bakterijų selekcija. Šios bakterijos geba funkcionuoti

rūgštinėje aplinkoje, labiausiai išskiriami *S. mutans* bei *Lactobacillus* genties atstovai [14]. Toleranciją rūgštims lemia F-ATPazė. Tai fermentas esantis citoplazminėje membranoje. Vykstant ATP hidrolizei F-ATPazė per membraną šalina protonus ( $H^+$  jonus), dėl to palaikomas didesnis citoplazmos pH negu išorinės aplinkos pH. Tokiu būdu bakterijos apsisaugo nuo rūgščių poveikio ir palaiko savo fermentų funkcionavimą.

Bakterijų išskirtos rūgštys lemia aplinkos pH sumažėjimą. Rūgštinė aplinka skatina dantų kietųjų audinių demineralizaciją ir karieso išsivystymą. Taigi apibendrinant galima teigti, kad atsparumas rūgštinei aplinkai padidina *S. mutans* virulentiškumą bei tuo pačiu ir gebėjimą nulemti dantų ėduonies raidą.

### 1.5. Medžiagos slopinančios bioplėvelės formavimąsi

Egzistuoja natūralūs apsaugos veiksniai, kurių dėka žmogaus organizmas geba apsisaugoti nuo daugumos bakterijų. Burnoje tokiais veiksniais yra seilėse esantys agliutinai, pavyzdžiui: mucinas, S-IgA (sekrecinis imunoglobulinas A), parotidinis agliutinas, kurie prisijungdami prie bakterijų paviršiaus jas agliutina ir tokiu būdu slopina burnos ertmės paviršių kolonizaciją [14]. Taip pat seilėse yra medžiagos pasižyminčios antibakteriniu poveikiu. Viena iš tokių medžiagų yra lizocimas – hidrolazių klasės fermentas, ardantis bakterijų sienelės, t. y. hidrolizuojantis  $\beta$ -1,4 glikozidinius ryšius tarp N-acetilmuramo rūgšties ir N-acetil-D-glukozamino peptidoglikanuose [35]. Kitos antibakterinį poveikį turinčios medžiagos: seilių laktoperoksidazės fermentai, histatinas bei laktoferinas taip pat slopina dantų bioplėvelės susidarymą [14, 36, 37]. Seilių komponentų apsauginė funkcija yra nepakankama, kada vartojama daug angliavandenių turinčio maisto. Be to, kai kurios bakterijos įgyja atsparumą, gamina įvairias fermentus inhibuojančias medžiagas ir tokiu būdu geba išlikti bei stimuliuoti bioplėvelės formavimąsi.

Šiuo metu karieso profilaktikai naudojamos priemonės, turinčios fluoro junginių (natrio fluoridas, alavo fluoridas) bei sintetinių cheminių medžiagų: chlorheksidino, triklozano [38]. Tokios medžiagos įeina į burnos higienos priemones: dantų pastas, burnos skalavimo skysčius. Fluoras skatina dantų remineralizaciją bei pasižymi antibakteriniu poveikiu [39]. Remineralizacijos metu fluoras dalyvauja kaip katalizatorius dantų emalio įsotinime kalcio bei fosforo jonais. Fluoro antibakterinis poveikis pasireiškia jo gebėjimu slopinti bakterijų fermentus: angliavandenių metabolizme dalyvaujančią enolazę bei pH palaikančią ATP-azę, todėl sutrinka glikolizės procesas, ATP gamyba bei intraląstelinio pH reguliacija [40]. Chlorheksidinas ardo bakterijų sienelės vientisumą ir lemia bakteriolizę [41, 42]. Triklozanas slopina bakterijų fermentus, dalyvaujančius rūgščių sintezėje (enoil-ACP reduktazę), glikolizėje (piruvatkinazę, laktatdehidrogenazę, aldolazę) bei atsparumą rūgštims lemiančius fermentus (F-

ATPazę) [43]. Tačiau, nors aukščiau minėtos veikliosios medžiagos yra patvirtintos klinikinėje praktikoje bei naudojamos kaip burnos higienos priemonių sudedamosios dalys, esant ilgalaikiam arba netinkamam jų vartojimui, jos gali būti toksiškos ir sukelti šalutinius poveikius. Ilgalaikis fluoro poveikis gali sukelti dantų bei skeleto fluorozę [44]. Eksperimentiškai nustatyta, kad chlorheksidinas gali toksiškai veikti osteoblastus, o triklozanas gali turėti poveikį endokrininei sistemai [45, 46]. Be to, esant ilgam ir nepertraukiamam minėtų medžiagų vartojimui, kai kurios bakterijos įgyja joms atsparumą. Todėl, norint pagerinti burnos sveikatą ir sumažinti ęduonies atsiradimo riziką, turi būti ieškoma naujų prevencinių priemonių.

Kuriant naujas prevencines priemones dantų ęduonies profilaktikai, dėmesys kreipiamas į mutans grupės streptokokus, ypač *S. mutans* bakterijas, kurios laikomos pirminiais kariesogenais. Būtent šios bakterijos inicijuoja dantų bakterinės plėvelės susidarymą ir lemia karieso raidą. *S. mutans* išskiriami egzofermentai (Gtf) sintetina gliukanus, kurie stiprina bakterijų adheziją ir stimuliuoja bioplėvelės susidarymą. Todėl glukoziltransferazės (Gtf) yra pasirinktos, kaip taikiniai, dantų ęduonies profilaktikos priemonių kūrimui. Atrastos sintetinės bei natūralios medžiagos slopinančios šių fermentų aktyvumą bei raišką. Tačiau dauguma medžiagų efektyvios tik eksperimentinėmis sąlygomis [38].

*S. mutans* Gtf fermentai turi katalizinį N ir C domenų. C galas yra gliukanus prijungiantis domenų, kur formuojami gliukanų polimerai. Tuo tarpu, N domeną sudaro gliukozės ir fruktozės aktyvieji centrai kur vyksta sacharozės hidrolizė [47]. Būtent, N ir C domenų aktyvieji centrai identifikuoti kaip Gtf inhibitorių taikiniai [38]. Eksperimentiškai nustatyta, kad sintetiniai junginiai: deoksinojirimicinas, tris (hidroksimetil) aminometanas, trichlorogalaktosacharozė, cetilpiridinio chloridas, aleksidino dihidrochloridas slopina Gtf fermentų aktyvumą [38]. Aukščiau minėtos medžiagos jungiasi prie Gtf katalizinio domeno N galo gliukozės aktyviojo centro ir tokiu būdu neleidžia prisijungti sacharozei, todėl nevyksta jos hidrolizė ir nėra sintetinami gliukanai [38]. Tokiu pat poveikiu pasižymi ir natūralūs junginiai gauti iš augalinių ekstraktų: benzofenonas ir flavonoidai [48]. Panašiu principu veikia ir neorganiniai cinko junginiai (cinko oksidas), kurie slopina Gtf funkcijas jungdamiesi prie N domeno fruktozės aktyviojo centro [38]. Pastebėta, kad natūralios, augalinės kilmės medžiagos – katechino polifenoliai: epikatechinas, epigalokatechinas ir epigalokatechino galatas, o taip pat ir proantocianidinai, galotaninai slopina bioplėvelės formavimąsi prisijungdami prie Gtf C domeno ir sutrikdydami gliukanų polimerų sintezę [48].

Kitas būdas bioplėvelės formavimuisi slopinti rastas Gtf genų raiškos lygmenyje. Sintetinės medžiagos: metakriloksietilcetilo dimetilo amonio chloridas ir amonio dimetakrilatas *in vitro* slopina *S. mutans* *gftB*, *gftC* genų raišką [49, 50]. Tokiu pačiu principu veikia ir polifenolis – epigalokatechinogalatas bei vario junginiai [51, 52]. Natūralūs junginiai, tokie kaip



antrakvinonai (resveratrolis, emodinas) bei terpenoidai (timolis, kaurenoinė ir pimarinė rūgštys), inaktyvuoja Gtf veiklą ir raišką bei F-ATP-azių aktyvumą ir tokiu būdu sutrikdo rūgščių pusiausvyrą bei gliukanų sintezę bakterijų ląstelėse [53-56].

Be to, naujais biotechnologiniais metodais kuriamos DNR vakcinos dantų ėduonies profilaktikai. Gyvūnų modeliuose nustatyta, kad tokios vakcinos stimuliuoja specifinių S-IgA sintezę ir tokiu būdu mažina bakterijų adheziją, gliukanų sintezę ir dantų bioplėvelės susidarymą [57, 58].

Nors visos minėtos medžiagos pasižymi teigiamu veikimu eksperimentinėmis sąlygomis, tačiau jų veiksmingumas nėra kliniškai patvirtintas. Be to, visada yra tikimybė, kad esant nepertraukiamam bet kokių cheminių junginių vartojimui bakterijos gali įgyti atsparumą. Todėl nuolat turi būti kuriamos naujos prieškariozinės medžiagos, pasižyminčios alternatyviais poveikio mechanizmais.

## **1.6. Galo rūgštis ir bismuto galatas**

### **1.6.1. Galo rūgšties fizinės bei cheminės savybės**

Bismuto galatas yra galo rūgšties darinys. Galo rūgštis (3,4,5-trihidroksibenzenkarboksirūgštis, cheminė formulė  $C_7H_6O_5$ ) yra organinė rūgštis, priklausanti polifenoliams, kurie sudaro didžiausią grupę antrinių augalinės kilmės metabolitų. Galo rūgštis randama visuose augalų dalyse: šaknyse, žievėje, medienoje, lapuose, sėklose bei vaisiuose (mėlynėse, gervuogėse, braškėse, vynuogėse) [59]. Šios rūgštis yra gausu arbatžolių, kakavmedžių, žagrenių ir miglinių lapuose, ažuolo žievėje bei kituose augaluose. Tai gelsvai baltos spalvos kristalas, kurio molinė masė siekia 170,12 g/mol, tankis 1,69 g/cm<sup>3</sup>, lydymosi temperatūra svyruoja 258 - 265 °C [60]. Galo rūgštis pasižymi mažu tirpumu vandenyje – 1,1% 20 °C temperatūroje, tačiau gerai tirpsta etanolyje, acetone, glicerolyje [60]. Rūgštį sudaro vienas aromatinis žiedas, trys hidroksilo grupės bei viena karboksilo grupė [60]. Galo rūgšties druskos ir esteriai vadinami galatais.

Galo rūgštis pasižymi: antioksidaciniu, antimutageniniu, antikancerogeniniu, antialerginiu, priešuždegiminiu, antibakteriniu bei antiateroskleroziniu poveikiais [61]. Dėl savo didelio veiksmingumo, galo rūgštis bei jos esteriai yra plačiai naudojami medicinos ir chemijos srityse bei kitose pramonės šakose: farmacijos, kosmetikos ir maisto gamybos pramonėse.

### 1.6.2. Galo rūgštis bei jos esterių antibakterinis bei bioplėvelės susidarymą slopinantis poveikis

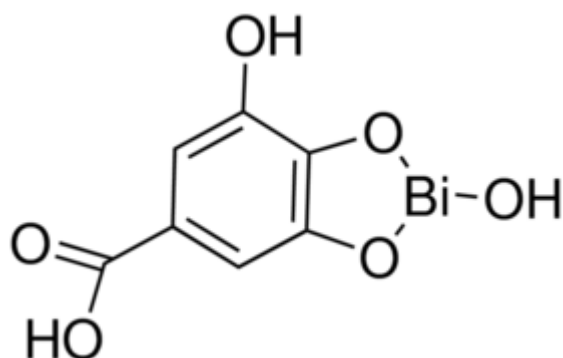
D. Shao ir kt. tyrimais nustatytas galo rūgštis slopinantis poveikis *E. coli* bei *S. mutans* augimui bei bioplėvelės formavimui [62]. Taip pat pastebėta, kad galo rūgštis sukelia negrįžtamus *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, ir *Listeria monocytogenes* bakterijų membranų pokyčius [63]. Antibakterinis poveikis pasireiškia todėl, kad galo rūgštis pažeidžia ląstelių stabilumą dėl membranos hidrofobiškumo ir krūvio pokyčių, sukeldama bakterijų sienelės plyšimą. Galo rūgščiai būdinga savaiminė oksidacija tam tikromis sąlygomis. Vykstant šiai oksidacijai susidaro tokie laisvieji radikalai, kaip pavyzdžiui: hidroksilo radikalas, vandenilio peroksidas, superoksido anijonas. Q. Wang ir kt. tyrimais nustatyta, kad UV-A spinduliai padidina galo rūgštis antibakterinį poveikį *Escherichia coli* bakterijoms [64]. Veikimo principas paremtas tuo, kad dėl UV-A spindulių šios medžiagos greičiau patenka į bakterijų ląsteles ir lemia laisvųjų radikalų susidarymą, o tai sukelia oksidacinį stresą bei ląstelių žūtį.

Galo rūgštis esteriai taip pat pasižymi antibakteriniu poveikiu. Pavyzdžiui, *in vitro* atlikto eksperimento rezultatai parodė, kad metilo galatas turi įtakos burnos bakterijų augimui ir slopina *S. mutans* bioplėvelės susidarymą inhibuodamas Gtf fermentus [65]. Be to, E. Vahid-Dastjerdi ir kt. nustatė *Rhus coriaria* L. ekstrakto, kurio pagrindinis komponentas yra metilo galatas, slopinančią įtaką *S. mutans* *gtfB*, *gtfC*, *gtfD* genų raiškai [66]. Taip pat T. Kačergiaus ir kt. atlikti tyrimai rodo, jog metilo galatas, išskirtas iš *Rhus coriaria* L. ekstrakto, slopina *S. mutans* bioplėvelės susidarymą ir rūgščių gamybą joje [67]. Kito galo rūgštis esterio – etilo galato antibakterinį poveikį nustatė K. Li ir kt. [68]. *In vitro* bei *in vivo* atliktų eksperimentų rezultatai rodo, kad *Fructus Chebulae Immaturus* komponentai, įskaitant etilo galatą, pasižymi baktericidiniu poveikiu *Klebsiella pneumoniae* ir *Staphylococcus aureus* bakterijoms. Be to, V. Gabe ir kt. nustatė, kad etilo galatas taip pat slopina *S. mutans* bioplėvelės susidarymą bei rūgščių gamybą joje [69]. Dar vienas galo rūgštis esteris – oktilo galatas taip pat pasižymi antibakteriniu poveikiu *Helicobacter pylori* bakterijoms [70].

### 1.6.3. Bismuto galato savybės

Bismuto galatas ( $C_7H_5BiO_6$ ) – sunkiojo metalo (bismuto) ir galo rūgštis druska. Tai geltonos spalvos bekvapiai, beskoniai milteliai [71]. Bismuto galato struktūra pavaizduota 3 paveiksle [72]. Y. Wang ir kt. tyrimais nustatė, kad bismuto galatas – tai koordinacinių jungčių polimeras, kuriam būdinga kristalinė struktūra [73]. Galo rūgštis hidroksilo grupių deguonies atomai jungiasi su  $Bi^{3+}$ . Kiekviena  $Bi^{3+}$  molekulė yra sujungta su dviem galo rūgštimis per  $[-Bi-O-]_{\infty}$  jungtis ir sudaro zigzago formos struktūrą. Tokios daugybinės struktūros jungiasi

tarpusavyje per laisvas galo rūgšties karboksilo grupes sudarant vandenilines jungtis. Papildomai struktūrą stabilizuoja prisijungusios vandens molekulės. Pastebėta, kad dalinė kristalinės struktūros degradacija vyksta esant 150 °C temperatūrai, dėl vandens molekulių pašalinimo. Pridėjus kelis lašus vandens struktūra atsinaujina. Be to pridėjus vandeninį HCl tirpalą bismuto galato struktūra, esant 37 °C temperatūrai, lieka stabili. Menką tirpumą bei stabilumą esant rūgštinei aplinkai užtikrina stiprios Bi<sup>3+</sup>-O jungtys [73]. Y. Wang ir kt. tyrimais nustatė, kad bismuto galatas geba absorbuoti dujas, pavyzdžiui N<sub>2</sub> bei CO<sub>2</sub>, priklausomai nuo esamos temperatūros. Skirtingo dujų kiekio absorbcija esant skirtingai temperatūrai leidžia daryti prielaidą, kad ši medžiaga gali lengvai keisti savo struktūrą priklausomai nuo temperatūros [73].



**3 pav.** Bismuto galato struktūra (prieiga per internetą:

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/s765007?lang=en&region=IL>)

#### 1.6.4. Bismuto galato poveikis bakterijoms

Tyrimais nustatyta, kad bismuto druskos, sąveikaudamos su bakterijų sienelėje esančiu glikokaliksu, išstumia divalenčius katijonus ir tokiu būdu pažeidžia sienelės vientisumą, jos pralaidumą bei lemia bakterinių ląstelių žūtį. Tokį antibakterinį bismuto druskų poveikio mechanizmą *Helicobacter pylori* bakterijoms nustatė C. W. Stratton ir kt. [74]. Be to, W. Baer ir kt. tyrimais nustatė kitą baktericidinį mechanizmą, kuriuo bismuto galatas slopina *Helicobacter pylori* bakterijų kvėpavimo grandinės (fosforilimo) reakcijas [75]. Tačiau iki šiol nėra duomenų apie bismuto galato slopinantį poveikį *S. mutans* bioplėvelės susidarymui.

## 2. TYRIMO METODIKA

Siekiant nustatyti bismuto galato poveikį *Streptococcus mutans* bioplėvelės susidarymui *in vitro* buvo atlikti trys atskiri eksperimentai. Tyrimo duomenų imtis bioplėvelės biomasei įvertinti buvo n=9-11, paviršiaus šiurkštumui n=12, storiui n=9. Tyrimas buvo atliekamas Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Infekcinių ligų ir dermatovenerologijos klinikos Virusologijos laboratorijoje. Bioplėvelės paviršiaus šiurkštumo bei storio vertinimas, taikant optinės profilometrijos metodą, buvo atliekamas Vilniaus universiteto Lazerinių tyrimų centre.

### 2.1. Eksperimente naudotos priemonės, reagentai ir prietaisai

#### Naudotos priemonės

- 24 šulinėlių plokščiadugnės plokštelės (Sarstedt)
- 96 šulinėlių plokščiadugnės plokštelės (Anicrin)
- Kintamo tūrio vienkanalės mechaninės pipetės su vienkartiniais antgaliais
- Eppendorf tipo mėgintuvėliai (1,5 ml)
- Kriomėgintuvėliai (1,5 ml)
- Vienkartinės mikrobiologinės kilpelės (1 µl)
- Mikroskopo objektiniai stikliukai (76 x 26 mm; Thermo Fisher Scientific)

#### Naudotos medžiagos ir reagentai

- *Todd Hewitt* buljonas (THB; BD BioSciences)
- Sacharozė (Sigma-Aldrich)
- Milli-Q distiliuotas vanduo
- Bismuto galato milteliai (Sigma-Aldrich)
- 96% etilo alkoholis
- Kolumbijos agaras su 7% avies krauju (E&O Laboratories)
- 10% liesas pienas (BD BioSciences)
- Kristalvioletas (Merck)

- Ledinė acto rūgštis (Merck)

### **Naudoti prietaisai**

- Termostatas
- Vorteksas
- Kratiklis
- Mikroploštelių skaitytuvas-spektrofotometras (Dynex MRX)
- Sensofar PLμ 2300 optinis profilometras su 50X konfokalinio objektyvu
- SevenCompact™ S210-Bio pH matuoklis su prijungtu InLab® Micro Pro ISM® mikroelektrodu (Mettler-Toledo)

## **2.2. Bakterijų padermė ir kultivavimo sąlygos**

*S. mutans* UA159 (Nr. 700610) padermė, gauta iš Amerikietiško tipo kultūrų kolekcijos, buvo pasirinkta šiai eksperimentinei studijai, nes ji kolonizuoja žmogaus burną. Šios padermės bakterijų kultūros buvo saugomos liesame 10% piene  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  sąlygomis. Prieš eksperimentus bakterijos buvo 18 val.  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  kultivuojamos *Todd Hewitt* buljone (THB) anaerobinėmis sąlygomis (95%  $\text{N}_2$  ir 5%  $\text{CO}_2$ ). Kultūrų grynumas buvo tikrinamas Kolumbijos agare su 7% avies krauju.

## **2.3. Bismuto galato paruošimas**

Bismuto galato tirpalas buvo paruoštas sterilioje THB terpėje, pasiekiant 100 mg/ml koncentraciją. Bismuto galato koncentruotas tirpalas toliau buvo laikomas šaldytuve  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje iki panaudojimo.

## **2.4. Eksperimentinio tyrimo eiga**

Eksperimentų atlikimo tikslais bakterijų kultūrų optinis tankis (OT) buvo pakoreguotas iki 0,2 naudojant mikroplokštelių skaitytuvą-spektrofotometrą ir parinkus 630 nm bangos ilgį. *Streptococcus mutans* UA159 bakterijos išsėtos praskiedimu 1:100 į 24-ių šulinėlių plokščiadugnes ląstelių kultūrų polistireno plokšteles, užpildytas THB mitybine terpe su 1% sacharoze. Prieš išsėjant bakterijas į atitinkamus plokštelės šulinėlius buvo pridėtas bismuto galato tirpalas, gaunant tokias galutines koncentracijas: 2 mg/ml, 4 mg/ml, 6 mg/ml, 8 mg/ml ir 10 mg/ml. *S. mutans* bakterijos, nepaveiktos bismuto galatu, panaudotos kaip eksperimentinė kontrolė. THB terpė be bakterijų buvo panaudota kaip tuščia kontrolė, o *S. mutans* bakterijos

augintos THB terpėje be sacharozės – įvertinti angliavandenių įtaką bioplėvelių susidarymui. Taip pat į plokštelės šulinėlius vertikaliai įdėtos sterilios stiklo plokštelės, išpjautos iš mikroskopo objektinių stikliukų. Plokštelės su bakterijomis, paveiktomis bismuto galatu, inkubuotos 24 val. 37 °C temperatūroje anaerobinėmis sąlygomis (95% N<sub>2</sub> ir 5% CO<sub>2</sub>) inkubatoriuje. Praėjus nurodytam inkubacijos laikotarpiui, plokštelės šulinėliuose susidarę bioplėvelės kiekiai (biomasė) nustatyti naudojant kolorimetrijos metodiką, o stikliukai ištraukti, išdžiovinti ore ir toliau panaudoti kiekybiniam streptokokų bioplėvelės storio bei šiurkštumo įvertinimui taikant optinės profilometrijos metodiką. Po 24 val. inkubacijos, *S. mutans* bioplėvelės augimo terpės pH buvo išmatuotas kiekviename plokštelės šulinėlyje.

## 2.5. Kolorimetrijos metodika

Po 24 val. inkubacijos, plokštelės šulinėliai buvo praskalauti distiliuotu vandeniu siekiant pašalinti planktonines ir silpnai prisitvirtinusias bakterijas. Šulinėlių dugne susidariusi bioplėvelė užfiksuota 96% etanoliumi (1 ml į kiekvieną šulinėlį). Po 15 min. fiksacijos, etanolis buvo išpiltas ir plokštelė buvo išdžiovinta ore. Užfiksuota bioplėvelė buvo nudažyta 0,01% kristalvioleto tirpalu (1 ml į kiekvieną šulinėlį). Praėjus 15 min., dažai buvo išpilti, plokštelė praskalauta distiliuotu vandeniu bei išdžiovinta ore. Paskutiniame etape atlikta susikaupusio dažo ekstrakcija naudojant 33% ledinę acto rūgštį (1 ml į kiekvieną šulinėlį). Po 30 min., 200 µl ekstrakcijos tirpalo perkelta į 96 šulinėlių plokštelę. Biomasė buvo nustatyta išmatavus gauto ekstrakcijos tirpalo optinį tankį 595 nm bangos ilgyje naudojant mikroplokštelių skaitytuvą-spektrofotometrą.

## 2.6. Optinės profilometrijos metodika

Panaudojant Sensofar PLµ 2300 optinį profilometrą su 50X konfokaliu objektyvu, buvo atlikti keturi matavimai *S. mutans* bioplėvelės paviršiaus šiurkštumui įvertinti bei trys matavimai bioplėvelės storiui nustatyti per stiklo plokštelės vidurį nuo matomos bioplėvelės apačios iki viršaus. Nuskaitytų ir išmatuotų bandinių duomenys buvo toliau apdoroti su *Gwyddion* programos 2,50 versija (<http://gwyddion.net>) tam, kad būtų galima kiekybiškai apskaičiuoti bioplėvelės paviršiaus šiurkštumo parametrus ir jos storį, atspindinčius bioplėvelės išsivystymo laipsnį. Papildomai medianinis filtras, kurio dydis 10 pikselių, arba 3 µm, buvo pasirinktas ir pritaikytas paviršiaus formos klaidoms ir banguotumui pašalinti. Siekiant kiekybiškai įvertinti bioplėvelės paviršiaus šiurkštumą, buvo apskaičiuotas vienas iš svarbiausių paviršiaus parametru –  $R_q$  (šiurkštumo vidutinė kvadratinė paklaida), apibrėžiantis išmatuotų aukščio nuokrypių vidurkį. Vertikalaus įbrėžimo, dirbtinai padaryto ant kiekvienos bakterijomis padengtos stiklo plokštelės paviršiaus, aukštis buvo panaudotas bioplėvelės storiui matuoti ir apskaičiuoti.

## **2.7. *S. mutans* bioplėvelės augimo terpės pH nustatymas**

Po 24 val. inkubacijos, *S. mutans* bioplėvelės augimo terpė iš kiekvieno plokštelės šulinėlio buvo perkelta į Eppendorf tipo mėgintuvėlius ir nustatytas terpės pH vertės naudojant InLab<sup>®</sup> Micro Pro ISM<sup>®</sup> mikroelektrodą, prijungtą prie SevenCompact<sup>™</sup> S210-Bio pH matuoklio.

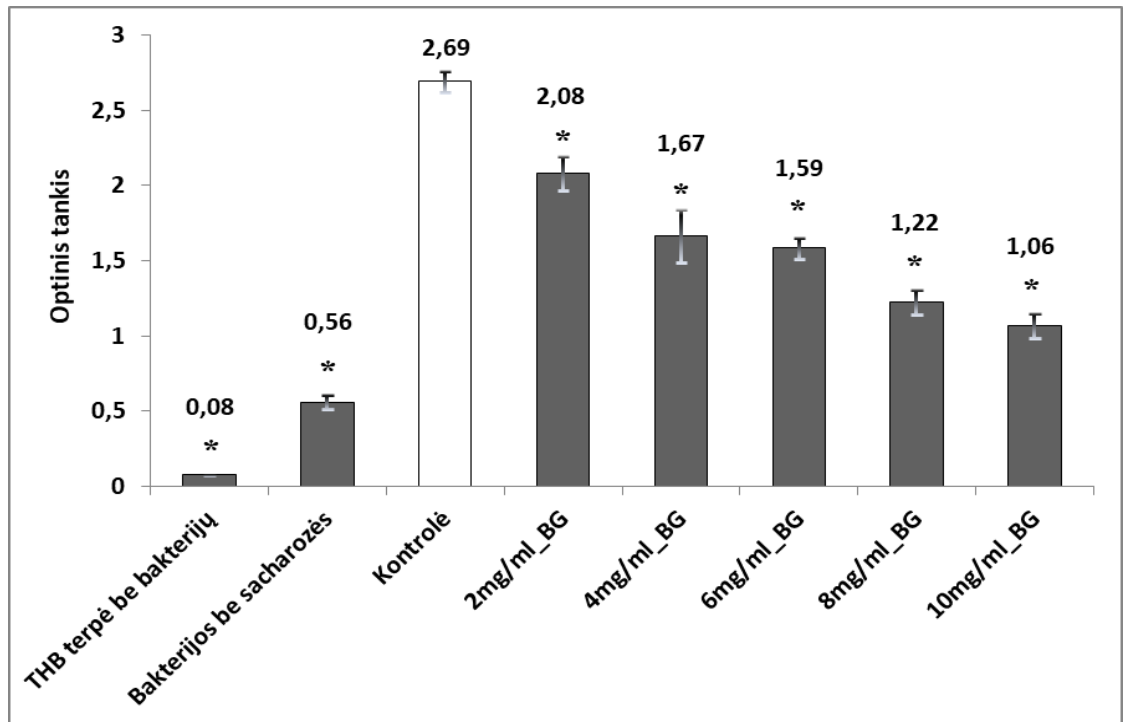
## **2.8. Statistinė duomenų analizė**

Duomenų statistinis reikšmingumas įvertintas pritaikant SPSS programos (23.0 versija) One-Way ANOVA metodą su LSD Post Hoc testu. Mažesnės už 0,05 *p* reikšmės buvo laikomos statistiškai reikšmingomis.

### 3. DARBO REZULTATAI

#### 3.1. Bismuto galato poveikis *S. mutans* bioplėvelės biomasės susidarymui

Naudojant kolorimetrijos metodą, buvo nustatyta, kad visos bismuto galato koncentracijos reikšmingai sumažino *S. mutans* bioplėvelių biomasę palyginti su kontrole ( $p < 0,05$ ) (4 pav.). Pabrėžtina, kad šis efektas pasireiškė priklausomu nuo koncentracijos būdu. Didžiausias slopinantis poveikis buvo pasiektas su 10 mg/ml bismuto galato koncentracija, kuri sumažino *S. mutans* bioplėvelės formavimąsi 60,5% palyginti su kontrole ( $p < 0,05$ ). Taip pat rezultatai rodo, kad sacharozės buvimas *S. mutans* bakterijų augimo terpėje padidina formuojamų bioplėvelių biomasę. *S. mutans* bakterijų, augintų THB terpėje be sacharozės, suformuotos bioplėvelės biomasė ~4,8 kartus mažesnė palyginti su bakterijomis augintomis THB terpėje su sacharoze ( $p < 0,05$ ).

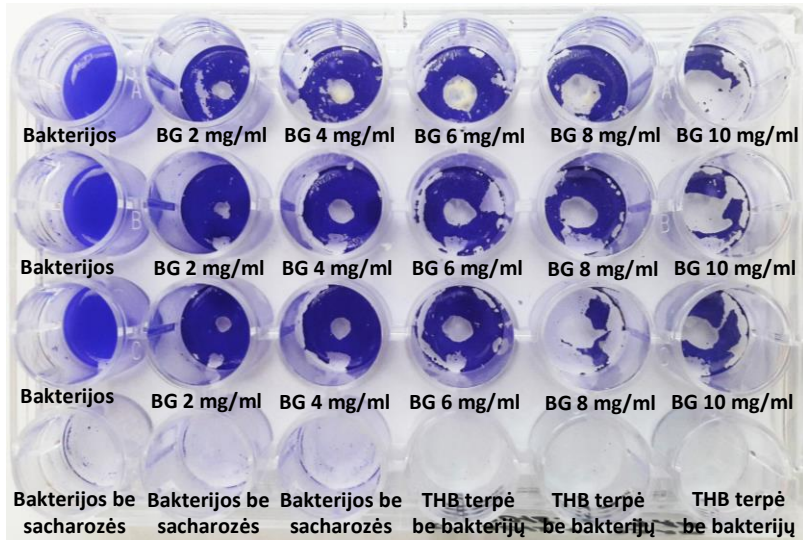


**4 pav.** *S. mutans* bioplėvelės biomasės kiekiai, susidarę po 24 val. inkubacijos THB mitybinėje terpėje su 1% sacharoze ir skirtingos koncentracijos bismuto galato (BG) tirpalais. Duomenys ( $n=9-11$ ), gauti iš trijų atskirų eksperimentų, yra išreikšti kaip vidurkiai  $\pm$  standartinė paklaida. \*  $p < 0,05$ , palyginti su kontrole.

5 paveiksle pateiktos trijų eksperimentų 24 šulinėlių plokščiadugnės plokštelės, kuriuose yra *S. mutans* bakterijų po 24 val. inkubacijos suformuotos bioplėvelės, nudažytos 0,01% kristalvioleto tirpalu.



**A**



**B**



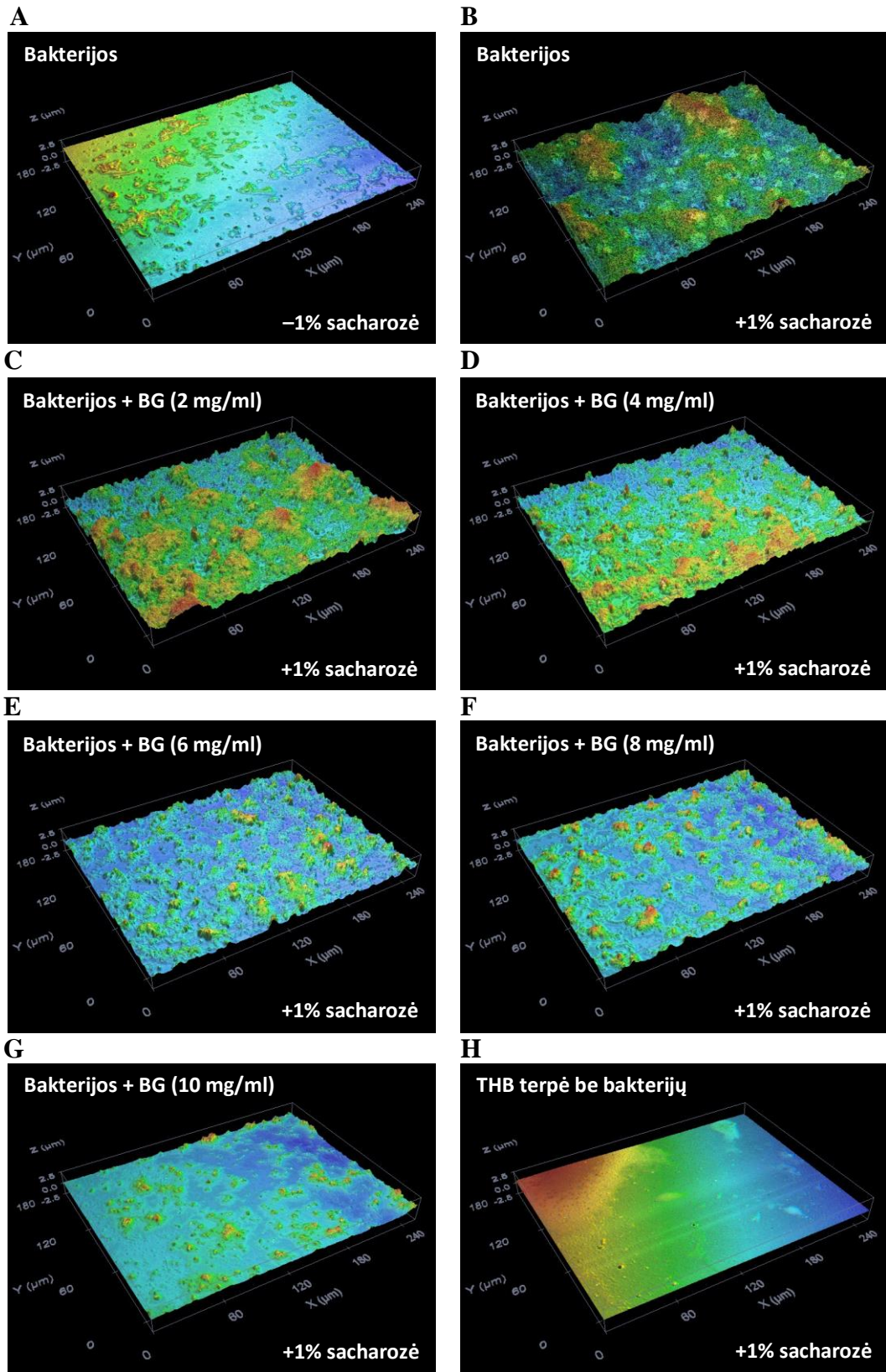
**C**



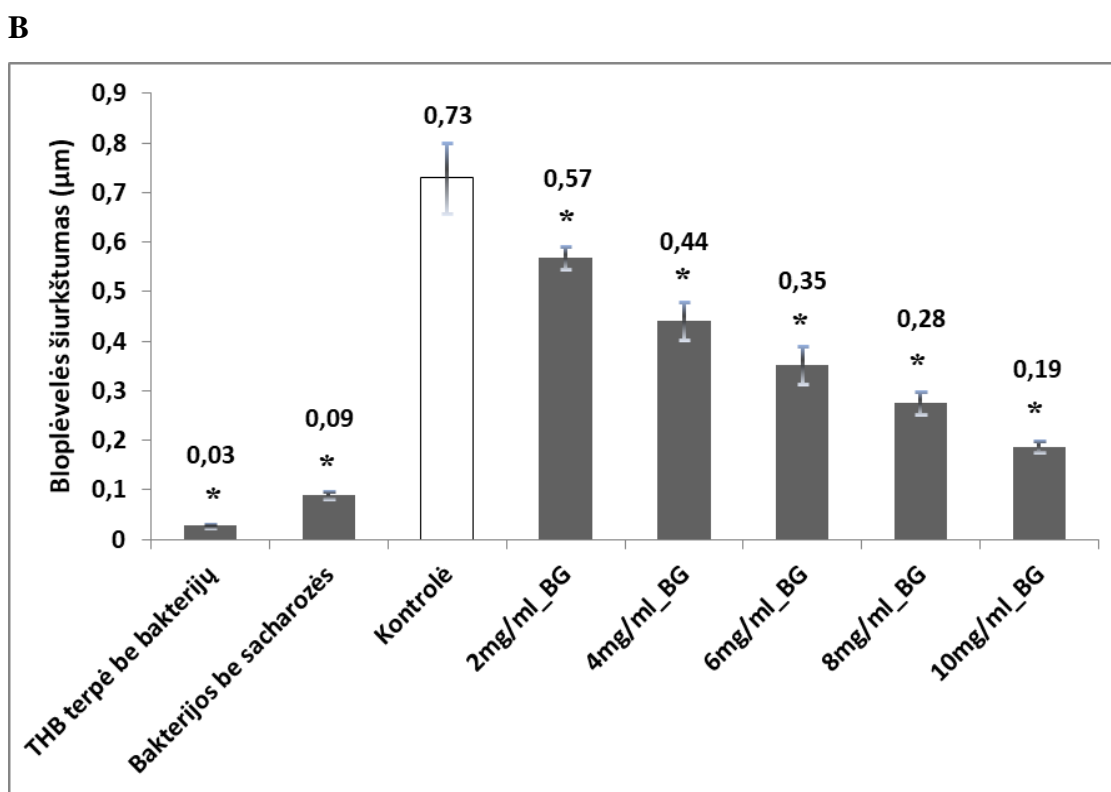
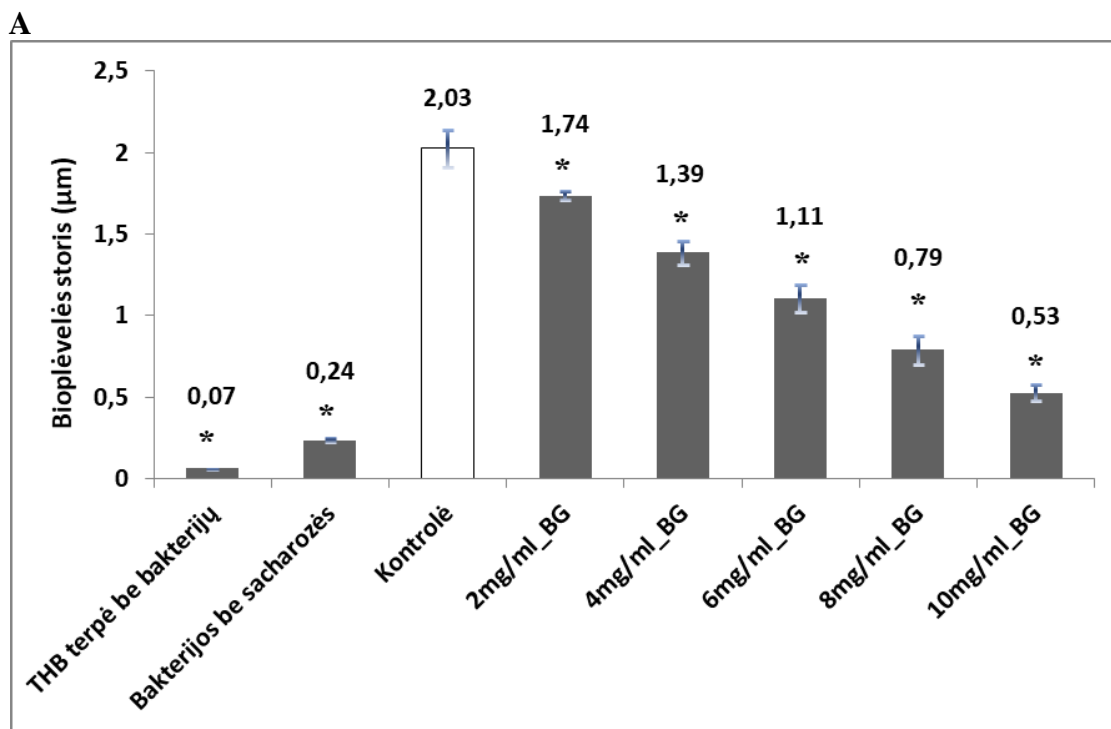
**5 pav.** *S. mutans* bakterijų bioplėvelės, nudažytos 0,01% kristalvioleto tirpalu. A – pirmojo eksperimento 24 šulinėlių plokštelė, B – antrojo eksperimento 24 šulinėlių plokštelė, C – trečiojo eksperimento 24 šulinėlių plokštelė.

### 3.2. Bismuto galato poveikis *S. mutans* bioplėvelės storiui bei paviršiaus šiurkštumui

Optinės profilometrijos metodas buvo taikomas kolorimetrijos rezultatams patvirtinti. Palyginti su bakterijomis augintomis be sacharozės ir nepaveiktomis bismuto galatu (6A pav.), kur bioplėvelės šiurkštumo bei storio parametrai buvo lygūs  $0,09 \pm 0,00$  ir  $0,24 \pm 0,01$   $\mu\text{m}$ , sacharozės buvimas *S. mutans* bakterijų augimo terpėje paskatino bakterijų adheziją prie stiklo plokštelių paviršiaus bei bioplėvelių formavimąsi (6B pav.). 2, 4, 6, 8 ir 10 mg/ml bismuto galato koncentracijos reikšmingai sumažino bioplėvelių formavimąsi ant stiklo plokštelių paviršiaus (6C-G pav.). Šis efektas pasireiškė priklausomu nuo koncentracijos būdu. Remiantis gautais duomenimis 10 mg/ml BG sumažino *S. mutans* bioplėvelės storį 74 % (7A pav.) bei bioplėvelės paviršiaus šiurkštumo parametą ( $R_q$ ) 74,4 % (7B pav.), palyginti su kontrole ( $p < 0,05$ ).



**6 pav.** Stiklo plokštelių su *S. mutans* bioplėvele optinis vaizdas po 24 val. inkubacijos su skirtingos koncentracijos bismuto galato (BG) tirpalais. Stiklo plokštelių paviršius, kai bakterijos inkubuotos terpėje (A) be sacharozės ir nepaveiktos BG, (B) su sacharozė ir nepaveiktos BG, bei paveiktos (C) 2, (D) 4, (E) 6, (F) 8 ir (G) 10 mg/ml BG. (H) tuščia kontrolė. Padidinimas, x50.



**7 pav.** *S. mutans* bioplėvelės storio (A) bei šiurkštumo (B) parametrai, po 24 val. inkubacijos THB mitybinėje terpėje su 1% sacharozė ir skirtingos koncentracijos bismuto galato (BG) tirpalais. Duomenys ( $n = 12$ , bioplėvelės šiurkštumas;  $n = 9$ , bioplėvelės storis), gauti iš trijų atskirų eksperimentų, yra išreikšti kaip vidurkiai  $\pm$  standartinė paklaida. \*  $p < 0,05$ , palyginti su kontrole.

### 3.3. Bismuto galato poveikis *S. mutans* bioplėvelės augimo terpės pH

*S. mutans* bioplėvelės augimo terpės pH matavimai parodė, kad bakterijos, augdamos THB mitybinėje terpėje su 1% sacharozė, pagamino organines rūgštis, kurios nulėmė pH sumažėjimą ~1,8 kartų palyginti su pH reikšme THB terpėje be bakterijų (1 lentelė). Šis žymus pH sumažėjimas rodo padidėjusį rūgštingumą *S. mutans* bioplėvelėje. Taip pat rezultatai rodo, kad sacharozės buvimas *S. mutans* bakterijų augimo terpėje lemia padidėjusį jos rūgštingumą. Bakterijų, augintų be sacharozės, terpės pH 1,2 kartų didesnis palyginti su bakterijų, augintų su sacharozė, terpės pH ( $p < 0,05$ ). Remiantis pH matavimais, bismuto galatas neapsaugo nuo organinių rūgščių susidarymo *S. mutans* bioplėvelėje (1 lentelė). Nepaisant to, kad nustatytas statistinis pH verčių reikšmingumas, kiekybiškai nėra užfiksuotas pH atstatymas iki neutralaus lygio (pH=7,21) bismuto galato poveikyje (1 lentelė).

**1 lentelė.** *S. mutans* bioplėvelės augimo terpės pH reikšmės, išmatuotos po 24 val. inkubacijos THB mitybinėje terpėje su 1% sacharozė ir skirtingos koncentracijos bismuto galato (BG) tirpalais.

Ekperimentinė grupė	pH
THB terpė be bakterijų	7,21 ± 0,01 *
Bakterijos be sacharozės	4,8 ± 0,01 *
Kontrolė	3,91 ± 0,02
BG (2 mg/ml)	3,95 ± 0,00 *
BG (4 mg/ml)	3,95 ± 0,07 *
BG (6 mg/ml)	3,97 ± 0,01 *
BG (8 mg/ml)	3,96 ± 0,00 *
BG (10 mg/ml)	3,96 ± 0,00 *

Duomenys (n=9–11), gauti iš trijų atskirų eksperimentų, yra išreikšti kaip vidurkiai ± standartinė paklaida. \*  $p < 0,05$ , palyginti su kontrole.

#### 4. REZULTATŲ APITARIMAS

Atlikto eksperimentinio tyrimo rezultatai parodė, kad bismuto galatas slopina *S. mutans* bioplėvelių formavimąsi priklausomu nuo koncentracijos būdu, tačiau neapsaugo nuo organinių rūgščių susidarymo bioplėvelėje.

Iki šiol nėra atlikta jokių tyrimų, kuriuose būtų vertinamas bismuto galato slopinantis poveikis *S. mutans* bioplėvelės susidarymui. Panašūs tyrimai buvo atlikti T. Kačergiaus ir kt., kur buvo vertinamas kito galo rūgšties esterio, metilo galato, poveikis *S. mutans* formuojamoms bioplėvelėms [67]. Naudojant kolorimetrijos metodą, buvo nustatyta, kad 0,7 mg/ml metilo galato sumažino *S. mutans* bioplėvelės formavimąsi 68%, 0,85 mg/ml – 89% ir 1 mg/ml - 93%. Tokį slopinantį metilo galato efektą nustatė ir M. S. Kang ir kt., kurių tyrimo rezultatai nurodė, kad 1 mg/ml šios medžiagos reikšmingai sumažina *S. mutans* bioplėvelės biomasę po 24 valandų inkubacijos terpėje su 5 % sacharozė, palyginti su bakterijomis nepaveiktomis metilo galatu [65]. V. Gabės ir kt. tyrimais nustatytas kito galo rūgšties esterio – etilo galato poveikis *S. mutans* formuojamoms bioplėvelėms. Didžiausias slopinantis poveikis buvo pasiektas su 3,53 mM (0,7 mg/ml) etilo galato koncentracija, kuri sumažino *S. mutans* bioplėvelės formavimąsi 68% [69]. Abu galo rūgšties esteriai, tiek metilo galatas, tiek etilo galatas vienodai reikšmingai mažina *S. mutans* bakterijų bioplėvelių biomasės susidarymą. Nors šio eksperimentinio tyrimo rezultatai rodo, kad bismuto galatas taip pat reikšmingai sumažina *S. mutans* bioplėvelių biomasę, tačiau tokiam poveikiui pasiekti prireikė didesnės medžiagos koncentracijos, palyginti su minėtais galo rūgšties esteriais. Didžiausias slopinantis poveikis buvo pasiektas su 10 mg/ml bismuto galato koncentracija, kuri sumažino *S. mutans* bioplėvelės formavimąsi 60,5%. Taigi, metilo galatas bei etilo galatas yra efektyvesnės medžiagos slopinant *S. mutans* bioplėvelių susidarymą, palyginti su bismuto galatu.

Naudojant optinės profilometrijos metodą buvo nustatyti bioplėvelės paviršiaus šiurkštumo parametrai ir jos storis, atspindintys bioplėvelės išsivystymo laipsnį. Atlikto eksperimento rezultatai parodė, kad 10 mg/ml bismuto galato poveikyje bioplėvelės paviršiaus šiurkštumas bei jos storis 3,9 kartų mažesnis, palyginti su kontrole. Taigi, ši medžiaga reikšmingai slopina *S. mutans* bioplėvelės formavimąsi. Panašūs tyrimai buvo atlikti V. Gabės ir kt., kur buvo vertinamas kito galo rūgšties esterio - etilo galato poveikis *S. mutans* bioplėvelės storiui bei šiurkštumui, taikant optinės profilometrijos metodą [69]. Nustatyta, kad 0,7 mg/ml etilo galato koncentracija sumažina bioplėvelės paviršiaus šiurkštumo parametą 91%, o bioplėvelės storį 96%. T. Kačergiaus ir kt., tyrimais buvo vertinamas metilo galato poveikis taikant tą patį metodą, kur 1 mg/ml metilo galato koncentracija sumažino *S. mutans* bioplėvelės paviršiaus šiurkštumą bei storį 99% [67]. Bismuto galato slopinantis efektas yra mažesnis, palyginti su etilo

bei metilo galatu, nes 10 mg/ml šios medžiagos sumažina bioplėvelės paviršiaus šiurkštumo parametą 74,4%, o bioplėvelės storį 74%. Be to, šiam efektui pasiekti prireikė didesnės bismuto galato koncentracijos.

Yra nustatyta, kad *S. mutans* bakterijos, naudojamos angliavandenius kaip energijos šaltinį, gamina ir išskiria į aplinką pieno rūgštį kaip galutinį metabolizmo produktą [22]. Tai patvirtino ir šio atlikto eksperimento rezultatai. *S. mutans* bakterijų pagamintos rūgštys sumažino bioplėvelės pH iki 3,91. Tuo tarpu kai THB terpėje be bakterijų pH buvo lygus 7,21. Taigi, *S. mutans* bakterijos nulėmė pH sumažėjimą ~1,8 kartų. Toks žymus rūgštingumo padidėjimas skatina dantų demineralizaciją bei lemia karieso išsivystymą. Todėl ieškoma medžiagų, gebančių apsaugoti nuo rūgščių susidarymo. T. Kačergiaus ir kt. tyrimais buvo nustatytas slopinantis metilo galato poveikis rūgščių gamybai *S. mutans* bioplėvelėje [67]. Metilo galato koncentracijos ribose nuo 0,7 mg/ml iki 1 mg/ml padidino augimo terpės pH 96–97%. Panašų poveikį nustatė ir V. Gabė ir kt. tiriant kitą galo rūgšties esterį - etilo galatą [69]. Tyrimais nustatyta, kad 0,7 mg/ml etilo galato padidina *S. mutans* augimo terpės pH 96%. Aukščiau minėti galo rūgšties esteriai reikšmingai apsaugo nuo *S. mutans* augimo terpės pH sumažėjimo ir geba beveik visiškai nuslopinti rūgščių gamybą bioplėvelėje. Remiantis šio atlikto eksperimentinio tyrimo rezultatais nenustatytas *S. mutans* bioplėvelės augimo terpės pH atstatymas iki neutralaus lygio (pH=7,21) bismuto galato poveikyje. Tai reiškia, kad ši medžiaga neapsaugo nuo organinių rūgščių susidarymo *S. mutans* bioplėvelėje. Taigi, vertinant bismuto galato gebėjimą apsaugoti nuo rūgščių susidarymo ši medžiaga, šiuo atveju, yra neefektyvi.

Nustatyta, kad karieso raidoje svarbų vaidmenį vaidina maisto, turinčio daug angliavandenių, vartojimas [22]. Svarbiausiu kariesogeniniu angliavandeniu yra laikoma sacharozė. Šiuos teiginius patvirtina eksperimento rezultatai. Sacharozės buvimas *S. mutans* bakterijų augimo terpėje padidina formuojamų bioplėvelių biomasę. *S. mutans* bakterijų, augintų THB terpėje su sacharozė, suformuotos bioplėvelės biomasė ~4,8 kartus didesnė palyginti su bakterijomis augintomis THB terpėje be sacharozės. Taip pat rezultatų duomenimis sacharozės buvimas *S. mutans* bakterijų augimo terpėje lemia padidėjusį jos rūgštingumą. Bakterijų, augintų be sacharozės, terpės pH siekė 4,8, tuo tarpu bakterijų, augintų su sacharozė – 3,91. Reiškia, esant šiam angliavandeniui *S. mutans* augimo terpės pH reikšmės sumažėjo 1,2 kartų. Taigi, sacharozė panaudojama kaip substratas bioplėvelės sintezėje ir lemia padidėjusią rūgščių gamybą joje.

E. Vahid-Dastjerdi ir kt. nustatė, kad *Rhus coriaria L.* ekstraktas turi slopinančią įtaką *S. mutans* *gtfB*, *gtfC*, *gtfD* genų raiškai [66]. Atsižvelgiant į tai, kad *Rhus coriaria L.* ekstrakto pagrindinis komponentas yra metilo galatas, galima būtų iškelti hipotezę, kad metilo galato

slopinantis poveikis *S. mutans* bioplėvelėms pasireiškė dėl gliukoziltransferazių, gaminančių netirpius gliukanus, kurie įeina į bioplėvelės matricą, gamybos inhibicijos. Aukščiau minėti etilo bei metilo galatai, skirtingai negu bismuto galatas, apsaugo nuo organinių rūgščių susidarymo bioplėvelėje. Toks slopinantis poveikis rūgščių gamybai *S. mutans* bioplėvelėje galėtų pasireikšti, galimai, dėl F-ATP-azių aktyvumo slopinimo. Tačiau tai yra tik hipotezė, kurią reikėtų patikrinti tyrimais. Kokiu veikimo mechanizmu pasireiškia bismuto galato slopinantis poveikis *S. mutans* formuojamoms bioplėvelėms nėra žinoma. Viena iš hipotezių galėtų būti tokia, kad bismuto galatas galimai slopina genų (*gtfB*, *gtfC*, *gtfD*), atsakingų už bakterijų adheziją ir bioplėvelės matricos formavimą, raišką. Taip pat slopinantis poveikis galėtų pasireikšti ne tik genų bet ir baltymų lygmenyje. Bismuto galatas galėtų slopinti *S. mutans* bioplėvelės formavimąsi jungiantis prie Gtf aktyviųjų centrų, taip sutrikdydamas gliukanų polimerų sintezę, arba prie gliukanus prisijungiančių baltymų (GbpA, GbpB, GbpC, GbpD) sutrikdydamas bakterijų adheziją. Tačiau, atsižvelgiant į tai, kad bismuto galatas pasižymi mažu tirpumu ir eksperimento metu ši medžiaga iškrito į nuosėdas, antibakterinis poveikis gali būti abejotinas. Tikėtina, jog bismuto galato slopinantis poveikis *S. mutans* bioplėvelėms pasireiškė dėl mechaninio poveikio. Bismuto galatas nusėdęs ant plokštelių ar stiklelių paviršiaus trukdė bakterijoms prisitvirtinti. Kuo didesnė buvo naudojama koncentracija, tuo didesnis bismuto galato kiekis iškrito į nuosėdas, tuo labiau buvo trikdoma *S. mutans* bakterijų adhezija ir tuo silpnesnis buvo bioplėvelės formavimasis. Todėl ir buvo stebima, kad bismuto galato slopinantis efektas pasireiškė priklausomu nuo koncentracijos būdu. Tam, kad nustatyti tikrąjį bismuto galato veikimo mechanizmą reikėtų atlikti tolimesnius tyrimus.

Taigi, bismuto galatas slopina *S. mutans* bakterijų adheziją bei bioplėvelių formavimąsi. Nors ši medžiaga neapsaugo nuo organinių rūgščių susidarymo bioplėvelėje, tačiau gali būti naudojama karieso profilaktikoje kaip priemonių, skirtų dengti dantų paviršių, sudėtinė dalis.



## IŠVADOS IR PASIŪLYMAI

1. Bismuto galatas priklausomu nuo koncentracijos būdu ir ženkliai slopina *S. mutans* biomasės susidarymą ant standaus (polistireno) paviršiaus.
2. Bismuto galatas priklausomu nuo koncentracijos būdu ir žymiai sumažina *S. mutans* bioplėvelės, susidariusios ant standaus (stiklo) paviršiaus, storį bei jos šiurkštumą.
3. Bismuto galatas neslopina organinių rūgščių susidarymo *S. mutans* bioplėvelėje.

Remiantis atlikto tyrimo rezultatais galima teigti, kad bismuto galatas pasižymi slopinančiu poveikiu *S. mutans* bioplėvelės susidarymui. Tačiau šios medžiagos veikimo mechanizmas vis dar nėra žinomas. Todėl norint patvirtinti bismuto galato klinikinį reikšmingumą reikėtų atlikti išsamesnius, daugiau informacijos apie šios medžiagos veikimo mechanizmą, suteikiančius tyrimus. Rekomenduojama atlikti tolesnius tyrimus siekiant įvertinti *gtfB*, *gtfC* ir *gtfD* iRNR kiekius, fermentinį GtfB, GtfC ir GtfD baltymų aktyvumą bei vandenyje netirpaus gliukano koncentraciją *S. mutans* bakterijų kultūrose, esant bismuto galato poveikiui. Bismuto galatas galėtų būti taikomas odontologijos srityje, o būtent karieso profilaktikoje kaip priemonių, skirtų dengti dantų paviršių, sudėtinė dalis.

## SUMMARY

### Effect of bismuth gallate on *Streptococcus mutans* biofilm formation

*Streptococcus mutans* bacteria are considered to be the most important factor in the development of dental caries. Virulence of these bacteria is determined by their ability to form biofilm on solid surfaces and produce organic acids leading to tooth decay and cavitation. The discovery of new substances capable to suppress the formation of biofilm has a great importance for the prevention of dental caries.

**Aim of the research.** To determine the effect of bismuth gallate on the formation of *S. mutans* biofilm *in vitro*. The following tasks were set for the research: to determine the effect of bismuth gallate on the biomass, thickness and roughness of *S. mutans* biofilm as well as to evaluate the effect of this substance on pH changes of the biofilm.

**Methods.** The colorimetric assay was applied to the evaluation of the biomass formed by *S. mutans* and the optical profilometry assay – for the thickness and roughness. The pH of the growth medium of *S. mutans* biofilm was measured using a microelectrode.

**Results.** Bismuth gallate exhibits the inhibitory effect on the formation of *S. mutans* biofilm. 10 mg/ml bismuth gallate concentration reduced the biomass of biofilm by 60.5% compared to the control ( $p < 0.05$ ). Moreover, this substance also significantly reduced the thickness of *S. mutans* biofilm by 74% and the roughness parameter of the surface by 74.4%, compared to the control ( $p < 0.05$ ). However, according to the pH measurements, bismuth gallate does not protect from the formation of acids in *S. mutans* biofilm.

**Conclusions.** Bismuth gallate suppresses the formation of *S. mutans* biofilm on solid (polystyrene, glass) surfaces. Although this substance does not protect from the formation of acids in the biofilm, it can be used in the prevention of dental caries as an ingredient of the products designed to cover the tooth surfaces.

**Keywords:** *Streptococcus mutans*, biofilm, dental caries, bismuth gallate.

## SANTRAUKA

### Bismuto galato poveikis *Streptococcus mutans* bioplėvelės susidarymui

*Streptococcus mutans* bakterijos laikomos svarbiausiu veiksniumi dantų ėduonies raidoje. Šių bakterijų virulentiškumą sąlygoja gebėjimas formuoti bioplėveles ant dantų kietųjų paviršių bei gaminti organines rūgštis, kurios lemia dantų irimą bei kariozinių ertmių susidarymą. Naujų medžiagų, gebančių slopinti bioplėvelių susidarymą, atradimas turi svarbią reikšmę dantų ėduonies prevencijai.

**Tyrimo tikslas.** Nustatyti bismuto galato poveikį *S. mutans* bioplėvelės susidarymui *in vitro*. Tyrimui pasiekti iškelti uždaviniai: nustatyti bismuto galato poveikį *S. mutans* bioplėvelės biomasei, storiui bei šiurkštumui ir įvertinti šios medžiagos poveikį bioplėvelės pH pokyčiams.

**Metodai.** *S. mutans* formuojamos bioplėvelės biomasei įvertinti buvo taikomas kolorimetrijos metodas, tuo tarpu storiui bei šiurkštumui – optinės profilometrijos metodas. *S. mutans* formuojamos bioplėvelės augimo terpės pH išmatuoti buvo naudojamas mikroelektrodas.

**Rezultatai.** Bismuto galatas pasižymi slopinančiu poveikiu *S. mutans* bioplėvelės susidarymui. 10 mg/ml bismuto galato koncentracija sumažino bioplėvelės biomasę 60,5%, palyginti su kontrole ( $p < 0,05$ ). Be to ši medžiaga taip pat reikšmingai sumažino *S. mutans* bioplėvelės storį 74% bei paviršiaus šiurkštumo parametą 74,4%, palyginti su kontrole ( $p < 0,05$ ). Tačiau, remiantis pH matavimais, bismuto galatas neapsaugo nuo organinių rūgščių susidarymo *S. mutans* bioplėvelėje.

**Išvados.** Bismuto galatas slopina *S. mutans* bioplėvelės formavimąsi ant standžių (polistireno, stiklo) paviršių. Nors ši medžiaga neapsaugo nuo organinių rūgščių susidarymo bioplėvelėje, tačiau gali būti naudojama karieso profilaktikoje kaip priemonių, skirtų dengti dantų paviršių, sudėtinė dalis.

**Raktažodžiai:** *Streptococcus mutans*, bioplėvelė, dantų ėduonis, bismuto galatas.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabe E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, *et al.* Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease, injuries, and risk factors. *Journal of Dental Research* 2017 vol.96(4) 380-387. DOI: 10.1177/0022034517693566.
2. Pasaulio sveikatos organizacijos duomenų bazė. Interneto prieiga: [https://www.who.int/oral\\_health/disease\\_burden/global/en/](https://www.who.int/oral_health/disease_burden/global/en/).
3. Moreira RS. Epidemiology of dental caries in the world. *Oral health care – pediatric, research, epidemiology and clinical practices*. Prof. Mandeep Viridi (Ed.) ISBN: 978-953-51-0133-8, 2012.
4. Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Lavery D, Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and Severe periodontitis – a comprehensive review. *J Clin Periodontol* 2017; 44 Suppl 18:S94-S105. DOI: 10.1111/jcpe.12677.
5. Carvalho JC, Schiffner U. Dental caries in European adults and senior citizens 1996-2016: ORCA Saturday afternoon symposium in Greifswald, Germany – Part II. *Caries Res* 2018; 53(3): 242-252. DOI: 10.1159/000492676.
6. Žemaitienė M, Grigalaušienė R, Vasiliauskiene I, Saldūnaitė K, Razmienė J, Slabšinskiene E. Prevalence and severity of dental caries among 18-year-old Lithuanian adolescents. *Medicina* 2016, 52(1), 54-60.
7. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol* 2016; 14(8): e1002533.
8. Verma D, Garg PK, Dubey AK. Insights into the human oral microbiome. *Arch Microbiol* 2018; 200(4):525-540. DOI: 10.1007/s00203-018-1505-3.
9. Duomenų bazė: *Human Oral Microbiome Database*. Interneto prieiga: <http://www.homd.org/>.
10. Sowmya Y. A review on the human oral microflora. *RRJDS* 2016; 4:3.
11. Kačergius T, Kiverytė S. *Mikrobiologija odontologijoje*. Vilnius, UAB „Progretus“, 2008.

12. Marsh PD, Moter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol* 2000, 2011;55:16-35.
13. Fleming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010, 8(9):623-33.
14. Lamont RJ, Hajishengallis GN, Jenkinson HF. *Oral Microbiology and Immunology.* ASM Press, Washington, DC, 2014.
15. Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2008; 6(3): 199–210.
16. Persat A, Nadell CD, Kim MK, Ingremeau F, Siryaporn A, Drescher K, *et. al.* The mechanical World of Bacteria. *Cell* 2015;161(5):998-997.
17. Venkatesan N, Perumal G, Doble M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiol* 2015;10(11):1743-50.
18. Paraje MG. Antimicrobial resistance in biofilms. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* A. Mendez-Vilas (Ed.) 2011.
19. Singh S, SinghSK, Chowdhury I, Singh R. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *Open Microbiol J.* 2017;11:53-62.
20. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35(4):322-32.
21. Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* 2013;4(3):223-9.
22. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation—new insight. *J. Dent. Res.* 2006 85(10): 878–87.
23. Featherstone JD. Dental caries: a dynamic disease process. *Aust. Dent. J.* 2008; 53(3): 286-91.
24. Ahn SJ, Ahn SJ, Wen ZT, Brady LJ, Burne RA. Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. *Infect Immun.* 2008;76(9):4259–4268. DOI: 10.1128/IAI.00422-08.
25. Wen ZT, Yates D, Ahn SJ, Burne RA. Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model. *BMC Microbiol.* 2010;10:111. DOI: 10.1186/1471-2180-10-111.

26. Clarke JK. On the Bacterial Factor in the etiology of dental caries. Br. J. Exp. Pathol. 1924;5(3): 141-7.
27. Duomenų bazė: *NCBI*. Interneto prieiga: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/856?genome\\_assembly\\_id=169364](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/856?genome_assembly_id=169364).
28. Ajdic D, McShan WM, McLaughlin RE, Savic G, Chang J, Carson MB, *et al.* Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2002; 99(22): 14434-14439.
29. Krzysciak W, Jurczak A, Koscielniak D, Bystroeska 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.
30. 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.
31. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. J Dent Res 2013;92:1065-73.
32. Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 2003;14(2): 89–99.
33. Lynch DJ, Fountain TL, Mazurkiewicz JE, Banas JA. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. FEMS Microbiol. Lett. 2007; 268(2): 158–65.
34. Brady LJ, Maddocks SE, Larson MR, Forsgren N, Persson K, Deivanayagam CC, Jenkinson HF. The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesins. Mol Microbiol. 2010;77(2):276–286. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07212.x.
35. Primo ED, Otero LH, Ruiz F, KLinke S, Giordano W. The disruptive effect of lysozyme on the bacterial cell wall explored by an in-silico structural Outlook. Biochem. Mol. Biol. Educ. 2018; 46(1):83-90. DOI: 10.1002/bmb.21092.
36. Bafort F, Parisi O, Perraudin JP, Jijakli MH. Mode of action of lactoperoxidase as related to its antimicrobial activity: a review. Enzyme Research Vol. 2014, article ID 517164.

37. Sinha M, Kaushik S, Kaur P, Sharma S, Singh TP. Antimicrobial lactoferrin peptides: the hidden players in the protective function of a multifunctional protein. *International Journal of Peptides* 2013(12):390230. DOI: 10.1155/2013/390230.
38. 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, Baltic Dental and Maxillofacial Journal*, 2014;16(2):44-52.
39. Nouri MR, Titley KC. Paediatrics – a review of the antibacterial effect of fluoride. *Oral health*, 2003; 93:8-12.
40. Buzalaf MA, Pessan JP, Honório HM, ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci* 2011;22:97-114.
41. Varoni E, Tarce M, Lodi G, Carrassi A. Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatol* 2012;61:399-419.
42. Borges FM, de Melo MA, Lima JP, Zanin IC, Rodrigues LK. Antimicrobial effect of chlorhexidine digluconate in dentin: in vitro and in situ study. *J Conserv Dent* 2012;15:22-6.
43. Phan TN, Marguis RE. Triclosan inhibition of membrane enzymes and glycolysis of *Streptococcus mutans* in suspensions and biofilms. *Can J Microbiol*. 2006; 52(10):977-83.
44. Jha SK, Mishra VK, Sharma DK, Damodaran T. Fluoride in the environment and its metabolism in humans. *Rev Environ Contam Toxicol* 2011;211:121-42.
45. Lessa FC, Aranha AM, Nogueira I, Giro EM, Hebling J, Costa CA. Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. *J Appl Oral Sci* 2010;18:50-8.
46. Fang JL, Stingley RL, Beland FA, Harrouk W, Lumpkins DL, Howard P. Occurrence, efficacy, metabolism, and toxicity of triclosan. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2010;28:147-71.
47. Tsai YW, Chia JS, Shiau YY, Chou HC, Liaw YC, Lou KL. Three-dimensional modeling of the catalytic domain of *Streptococcus mutans* glucosyltransferase GtfB. *FEMS Microbiol Lett* 2000;188:75-9.
48. Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res* 2011;45:243-63.

49. Li F, Chai ZG, Sun MN, Wang F, Ma S, Zhang L, et al. Anti-biofilm effect of dental adhesive with cationic monomer. *J Dent Res* 2009;88:372-6.
50. Li F, Weir MD, Chen J, Xu HH. Comparison of quaternary ammonium-containing with nano-silver-containing adhesive in antibacterial properties and cytotoxicity. *Dent Mater* 2013;29:450-61.
51. Xu X, Zhou XD, Wu CD. Tea catechin epigallocatechin gallate inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation by suppressing gtf genes. *Arch Oral Biol* 2012;57:678-83.
52. Chen PM, Chen JY, Chia JS. Different regulation of *Streptococcus mutans* gtfBCD genes in response to copper ions. *Arch Microbiol* 2006;185:127-35.
53. Pandit S, Kim HJ, Park SH, Jeon JG. Enhancement of fluoride activity against *Streptococcus mutans* biofilms by a substance separated from *Polygonum cuspidatum*. *Biofouling* 2012;28:279-87.
54. Khan R, Adil M, Danishuddin M, Verma PK, Khan AU. *In vitro* and *in vivo* inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm by *Trachyspermum ammi* seeds: an approach to alternative medicine. *Phytomedicine* 2012;19:747-55.
55. Ali F, Sangwan PL, Koul S, Pandey A, Bani S, Abdullah ST, et al. 4-epi-Pimaric acid: a phyto molecule as a potent antibacterial and anti-biofilm agent for oral cavity pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:149-59.
56. Jeong SI, Kim BS, Keum KS, Lee KH, Kang SY, Park BI, et al. Kaurenoic acid from *Aralia continentalis* inhibits biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:160592.
57. Huang L, Xu QA, Liu C, Fan MW, Li YH. Anti-caries DNA vaccine-induced secretory immunoglobulin A antibodies inhibit formation of *Streptococcus mutans* biofilms in vitro. *Acta Pharmacol Sin*. 2013; 34(2):239-46. DOI: 10.1038/aps.2012.145.
58. Arora B, Setia V, Kaur A, Mahajan M, Sekhon HK, Singh H. Dental caries vaccine: an overview. *Indian Journal of Dental Sciences* 2018; 10(2):121-125.
59. 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): 362-372.



60. Duomenų bazė: PubChem. Interneto prieiga: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic\\_acid#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic_acid#section=Top).
61. 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. DOI: 10.4155/ppa.15.14.
62. Shao D, Li J, Li J, Tang R, Liu L, Shi J, *et al.* Inhibition of gallic acid on the growth and biofilm formation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans* J. *Food Sci.* 2015; 80 (6): M1299-M1305.
63. Borges A, Ferreira C, Saavedra MJ, Simoes M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microb Drug Resist.* 2013; (4):256-65.
64. Wang Q, Oliveira EF, Alborzi S, Bastarrachea LJ, Tikekar RV. On mechanism behind UV-A light enhanced antibacterial activity of gallic acid and propyl gallate against *Escherichia coli* O157:H7. *Sci Rep.* 2017; 7(1):8325.
65. 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):744–750. DOI: 10.1007/s12275-008-0235-7.
66. Vahid-Dastjerdi E, Monadi E, Khalighi HR, Torshabi M. Down-regulation of glycosyl transferase genes in *Streptococcus mutans* by *Punica granatum* L. flower and *Rhus coriaria* L. fruit water extracts. *Iran J Pharm Res* 2016; 15(2): 513-9.
67. Kacergius T, Abu-Lafi S, Kirkliauskiene A, Gabe V, Adawi A, Rayan M, *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.
68. Li K, Lin Y, Li B, Pan T, Wang F, Yuan R *et al.* Antibacterial constituents of *Fructus Chebulae Immaturus* and their mechanisms of action. *BMC Complement Altern Med.* 2016; 16: 183. DOI: 10.1186/s12906-016-1162-5.
69. Gabe V, Kacergius T, Abu-Lafi S, Kalesinskas P, Masalha M, Falah 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. DOI:10.3390/molecules24030529.

70. Wolf VG, Bonacorsi C, Raddi MSG, da Fonseca LM, Ximenes VF. Octyl gallate, a food additive with potential beneficial properties to treat *Helicobacter pylori* infection. Food Funct. 2017; 8(7):2500-2511. DOI: 10.1039/c7fo00707h.
71. Duomenų bazė: PubChem. Interneto prieiga: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/bismuth\\_subgallate#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/bismuth_subgallate#section=Top).
72. Interneto prieiga: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/s765007?lang=en&region=IL>.
73. Wang Y, Takki S, Cheung O, Xu H, Wan W, Ohrstrom L, *et al.* Elucidation of the elusive structure and formula of the active pharmaceutical ingredient bismuth subgallate by continuous rotation electron diffraction. Chem. Commun. 2017; 53(52). DOI:10.1039/c7cc03180g.
74. Stratton CW, Warner RR, Coudron PE, Lilly NA. Bismuth-mediated disruption of the glycocalyx-cell wall of *Helicobacter pylori*: ultrastructural evidence for a mechanism of action for bismuth salts. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1999; 43(5):659-666.
75. Baer W, Koopmann H, Wagner S. Effects of substances inhibiting or uncoupling respiratory-chain phosphorylation of *Helicobacter pylori*. Zentralbl Bakteriol. 1993; 280(1-2):253-258.