

# Stężenie anhidrazy węglanowej VI w ślinie a stan zdrowia jamy ustnej

Salivary carbonic anhydrase VI concentration and the state of the oral cavity

Department of Pediatric Dentistry, Medical University of Warsaw, Poland

Head of Department: Professor Dorota Olczak-Kowalczyk, MD, PhD

## SŁOWA KLUCZOWE

ślina, anhidraza węglanowa VI, próchnica zębów, zapalenie dziąseł

## STRESZCZENIE

**Wstęp.** Anhidrazy węglanowe to enzymy, które uczestniczą w regulacji pH oraz równowagi jonowej i kwasowo-zasadowej w różnych tkankach organizmu. Anhidraza węglanowa VI jest wydzielana przez ślinianki przyuszne i podżuchwowe. Może wpływać na właściwości śliny, takie jak regulacja pH i buforowość, choć jej rola nie jest wciąż do końca poznana.

**Cel pracy.** Określenie związku stężenia ślinowego anhidrazy węglanowej VI z różnymi stanami w jamie ustnej (próchnica zębów, stan higieny i dziąseł) oraz właściwościami fizykochemicznymi śliny i mianem bakterii kariogennych.

**Materiał i metody.** Zbadano 87 pacjentów, oceniając wskaźnik PUWz oraz PUWp, liczbę aktywnych plam próchnicowych oraz stan higieny jamy ustnej oraz dziąseł. Pobrano próbki śliny do analizy właściwości fizykochemicznych, miana bakterii kariogennych oraz ślinowego stężenia anhidrazy węglanowej VI.

**Wyniki.** Ślinowe stężenie anhidrazy węglanowej VI wahało się od 0,165 do 8,477 µg/ml, wynosząc średnio  $1,268 \pm 1,493$  µg/ml. Analiza statystyczna danych wykazała różnice stężenia ślinowego CA6 w zależności od obecności aktywnej próchnicy zębów, stanu higieny i dziąseł, parametrów fizykochemicznych oraz miana bakterii kariogennych.

**Wnioski.** Ślinowe stężenie anhidrazy węglanowej VI różni się w zależności od stanu w jamie ustnej. U pacjentów z aktywną próchnicą zębów stężenie jest niższe.

## KEYWORDS

saliva, carbonic anhydrase VI, dental caries, gingivitis

## SUMMARY

**Introduction.** Carbonic anhydrases are enzymes that participate in the regulation of pH and the ionic and acid-base balance in various tissues of the body. Carbonic anhydrase VI is secreted by the parotid and submandibular glands. It can affect salivary properties, such as pH regulation and buffering, although its role is still not fully understood.

**Aim.** To determine the relationship between the concentration of salivary carbonic anhydrase VI and various conditions in the oral cavity (dental caries, hygiene and gingiva), the physicochemical properties of saliva and cariogenic bacteria count.

**Material and methods.** 87 patients were examined, assessing DMFT and DMFT index, the number of active white spot lesions, hygiene level and state of gingiva. Saliva samples were collected for the analysis of physicochemical properties, level of cariogenic bacteria and salivary concentration of carbonic anhydrase VI.

**Results.** Salivary carbonic anhydrase VI concentration ranged from 0.165 to 8.477 µg/ml, average  $1.268 \pm 1.493$  µg/ml. Statistical analysis of the data showed differences in the concentration of salivary CA6 depending on the presence of active tooth decay, hygiene and gingival conditions, physicochemical parameters and the level of cariogenic bacteria.

**Conclusions.** Salivary carbonic anhydrase VI concentration differs depending on the condition in the oral cavity. In patients with active tooth decay, the concentration is lower.

## WSTĘP

Jama ustna człowieka stanowi unikalne środowisko, w kształtowaniu którego kluczową rolę mają funkcja błony śluzowej oraz ślina. Właściwości i składniki śliny mają duże znaczenie dla utrzymania zdrowia jamy ustnej i ochrony zębów. Badania śliny są nieinwazyjne i mają duży potencjał w zastosowaniu klinicznym. Mogą służyć odkrywaniu biomarkerów stanów chorobowych w jamie ustnej, ale także w chorobach ogólnoustrojowych (1, 2). Anhidrazy węglanowe stanowią grupę metaloenzymów, z atomem cynku jako centrum aktywne, które są odpowiedzialne za katalizację odwracalnej reakcji uwodnienia dwutlenku węgla ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ ). Jak podają Lindskog i Nyman (3), obecnie znanych jest 16 różnych anhidraz węglanowych występujących u ssaków, zróżnicowanych pod względem właściwości enzymatycznych, miejsca ekspresji oraz sekwencji aminokwasów (4). Anhidrazy biorą udział w regulacji pH oraz równowagi jonowej i kwasowo-zasadowej w różnych tkankach organizmu. Ich jedyną wydzielaną formą jest anhidraza węglanowa VI (CA6), wydzielana głównie przez ślinianki przyuszne i podżuchowe (5). CA6 jest enzymem ślinowym i może wpływać na jej właściwości, takie jak regulacja pH i buforowość, choć jej rola nie jest wciąż do końca poznana. Badanie Kivela et al. (6) podważyło związek regulacji pH i pojemności buforowej z wysokim poziomem CA6 w ślinie. Z drugiej jednak strony, Kimoto i wsp. (7) udowodnili zdolność anhidrazy do penetracji płytki nazębnej i neutralizacji kwasów za pośrednictwem buforów wodorowęglanowych. Dušan i wsp. (8) sugeruje użyteczność oznaczania aktywności CA6 w ślinie jako biomarkera choroby próchnicowej. Potwierdzenie tych doniesień wymaga jednak przeprowadzenia dalszych badań.

## CEL PRACY

Celem poniższego badania było określenie związku stężenia ślinowego anhidrazy węglanowej VI z różnymi stanami w jamie ustnej (próchnica zębów, stan higieny i dziąseł) oraz właściwościami fizykochemicznymi śliny i mianem bakterii kariogennych.

## MATERIAŁ I METODY

Badanie przygotowano w oparciu o wytyczne STROBE (STrengthening the Reporting of OBservational studies in Epidemiology). Uzyskano pozytywną opinię Komisji Bioetycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (KB/194/2015).

### Grupa badana

W badaniu wzięło udział 87 pacjentów w wieku 12-16 lat z uzębieniem stałym. Uczestników rekrutowano wśród pacjentów odbywających wizyty w Zakładzie Stomatologii Dziecięcej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Kryteria włączenia: brak chorób przewlekłych oraz przyjmowania leków na stałe, brak defektów rozwojowych szkliwa i zębiny, uznanie pisemnej zgody na udział w badaniu. Pacjentów niespełniających kryteriów wykluczano z udziału w badaniu.

## INTRODUCTION

The oral cavity constitutes a unique environment in which the saliva and mucosa play a key role. The properties and components of saliva are important for maintaining oral health and protecting teeth. Saliva analysis is non-invasive and has a great potential for clinical use. It can be used to detect biomarkers of disease states in the oral cavity, but also in systemic diseases (1, 2). Carbonic anhydrases are a group of metalloenzymes, with a zinc atom as the active center, which are responsible for catalyzing the reversible reaction of carbon dioxide hydration ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ ). According to Lindskog and Nyman (3), 16 different carbonic anhydrases occurring in mammals are currently known, differing in terms of enzymatic properties, place of expression and amino-acid sequence (4). Anhydrases are involved in the regulation of pH and the ionic and acid-base balance in various tissues of the body. The only secreted form is carbonic anhydrase VI (CA6), secreted mainly by the parotid and submandibular glands (5). CA6 is a salivary enzyme and may influence its properties such as pH regulation and buffering capacity, although its role is still not fully understood. A study by Kivela et al. (6) challenged the association of pH regulation and buffering capacity with high levels of CA6 in saliva. On the other hand, Kimoto et al. (7) demonstrated the ability of anhydrase to penetrate dental plaque and neutralize acids through bicarbonate buffers. Dušan et al. (8) suggests the usefulness of CA6 activity in saliva as a biomarker of caries disease. However, further research is required to confirm these reports.

## AIM

The aim of the following study was to determine the relationship between the concentration of salivary carbonic anhydrase VI and various conditions in the oral cavity (tooth decay, hygiene status and gingivitis), physicochemical properties of saliva and the cariogenic bacteria count.

## MATERIAL AND METHODS

The study conformed to the STROBE guidelines (STrengthening the Reporting of OBservational studies in Epidemiology). The approval of the Bioethical Commission of Warsaw Medical University (No. KB/194/2015) was obtained.

### Study population

Eighty-seven patients aged 12-16 years with permanent dentition took part in the investigation. The participants were recruited from Department of Pediatric Dentistry, Medical University of Warsaw. The inclusion criteria included no systemic diseases, no chronic medication intake, no developmental defects of tooth hard tissues. Patients representing those features were eliminated from the study.

## Badanie kliniczne

Badanie pacjentów przeprowadzono w warunkach gabinetu stomatologicznego na podstawie standaryzowanych kryteriów WHO (9) przez jednego badacza. Oceniono obecność próchnicy zębów na podstawie wskaźnika PUWz/PUWp oraz obecność białych plam próchnicowych. Oceny stanu higieny jamy dokonano w oparciu o wskaźnik złogów miękkich ODI-S (składowa wskaźnika OHI-S według Greene'a i Vermilliona) (10) oraz aproksymalny wskaźnik płytki (API%) według Lange'a (11). Stan dziąseł określono na czterech powierzchniach zębów stałych 16, 12, 24, 36, 32, 44, używając wskaźnika GI (Gingival Index) według Löe (12).

## Pobieranie próbek śliny do analiz

Próbki śliny pobierano od wszystkich uczestników badania w godzinach porannych (8.00-10.00), na czczo, używając komercyjnych zestawów Salivette (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy). Waciki wprowadzano do jamy ustnej i pozostawiano w niej przez 5 minut, pozwalając na wsiąkanie zbierającej się śliny. Po pobraniu, próbki natychmiast deponowano w lodówce, w temperaturze +4°C i odwirowywano w ciągu 2 godzin od pobrania. Wirowanie odbywało się według parametrów wskazanych przez producenta (1000 x g, w temperaturze +4°C, przez 15 min). Przepływ śliny niestymulowanej kalkulowano, dzieląc objętość śliny uzyskanej od pacjenta po wirowaniu przez czas pobierania. Następnie próbki mrożono w temperaturze -80°C do czasu dalszych analiz.

Do oceny właściwości fizykochemicznych śliny (pH, pojemność buforowa, wydzielanie śliny stymulowanej, konsystencja) zastosowano komercyjny zestaw GC Saliva Check Buffer (GC Europe), zgodnie z instrukcją producenta. Ślinowy poziom bakterii próchnicotwórczych – *Streptococcus mutans* (SM) i *Lactobacillus* spp. (LB) – został oceniony komercyjnym testem CRT Bacteria (Ivoclar Vivadent), zgodnie z instrukcją. Wartości wyrażono jako jednostki tworzące kolonie na mililitr śliny (CFU/ml).

## Ocena stężenia anhidrazy węglanowej VI w ślinie

Przed badaniem próbki doprowadzono do temperatury pokojowej. Unikano cykli zamrażania/rozmrężania. Badanie laboratoryjne przeprowadzono zgodnie z protokołem przedstawionym w zestawie ELISA dla anhidrazy węglanowej VI (Cloud-Cone Corp.) i odczytano przy 450 nm na czytniku mikropłytek BioTek Synergy™ Mx (BioSPX B.V.).

## Analiza statystyczna

Analizę przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 12.0 pakietem R. Dla zmiennych ilościowych obliczono statystyki opisowe charakteryzujące ich zmienność. Dla zmiennych dwumianowych obliczono proporcje (%) z podziałem na grupy. Porównanie zmiennych ilościowych między dwiema grupami przeprowadzono za pomocą testu U Manna-Whitneya i chi-kwadrat, natomiast porównanie trzech lub więcej grup – za pomocą testu ANOVA. W przypadku

## Clinical examination

Patients were examined in a dental office on the basis of standardized WHO criteria (9), by one researcher. The presence of dental caries was assessed as DMFT/DMFT index and the presence of white spot lesions (WSL) was evaluated. The assessment of the hygiene status was based on the ODI-S soft deposit index (component of the OHI-S index according to Greene and Vermillion) (10) and the approximate plaque index (API%) according to Lange (11). The gingival condition was determined on four surfaces of permanent teeth 16, 12, 24, 36, 32, 44 using the GI (Gingival Index) according to Löe (12).

## Collection of saliva samples for analysis

Saliva samples were collected from all participants in the morning (8.00-10.00), on an empty stomach, using commercial Salivette kits (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). The swabs were inserted into the mouth and left there for 5 minutes, allowing the accumulating saliva to soak in. After collection, the samples were immediately placed in a refrigerator at +4°C and centrifuged within 2 hours after collection. Centrifugation was performed according to the parameters indicated by the manufacturer (1000 x g, at a temperature of +4°C, for 15 min). The unstimulated saliva flow was calculated by dividing the volume of saliva obtained from the patient after centrifugation by the sampling time. Then the samples were frozen at -80°C until further analysis.

The commercial GC Saliva Check Buffer (GC Europe) kit was used to assess the physicochemical properties of saliva (pH, buffer capacity, stimulated saliva flow, consistency), according to the manufacturer's instructions. Salivary levels of cariogenic bacteria – *Streptococcus mutans* (SM) and *Lactobacillus* spp. (LB) were assessed with the commercial CRT Bacteria test (Ivoclar Vivadent), according to the instructions. Values were expressed as colony forming units per milliliter of saliva (CFU/ml).

## Assessment of salivary carbonic anhydrase VI concentration

Prior to testing, the samples were brought to room temperature. Freeze/thaw cycles were avoided. Laboratory testing was performed according to the protocol outlined in the ELISA kit for Carbonic Anhydrase VI (Cloud-Cone Corp.) and read at 450 nm on a BioTek Synergy™ Mx microplate reader (BioSPX B.V.).

## Statistical analysis

The analysis was carried out with the use of the Statistica 12.0 program and the R package. Descriptive statistics characterizing their variability were calculated for quantitative variables. Proportions (%) with division into groups were calculated for binomial variables. The comparison of quantitative variables between the two groups was performed using the Mann-Whitney test and the chi-square

zmiennych kategoriycznych (w tym zmiennych dwumianowych) do porównania grup zastosowano test chi-kwadrat. Obliczono współczynnik korelacji rang Spearmana. We wszystkich analizach poziom istotności statystycznej ustalono na 0,05. Brakujące dane zostały wyłączone z analizy.

## WYNIKI

Zbadano 87 pacjentów, w tym 46 (52,9%) chłopców. Średnia wieku  $\pm$  SD wynosiła  $13 \pm 1$  rok. Próchnica zębów (wskaźnik PUWz > 0) była obecna u 81 pacjentów (93,1%), aktywna próchnica (składowa Pz > 0) u 47 pacjentów (54,3%), a białe plamy próchnicowe (WSL > 0; ang. *white spot lesions*) u 41 pacjentów (47,1%). Wyniki dla całej grupy oraz w zależności od płci przedstawia tabela 1.

Średnia wartość wskaźnika ODI-S wyniosła ogółem  $1,01 \pm 0,56$  (odpowiednio  $1,06 \pm 0,49$  i  $0,95 \pm 0,63$  w grupie chłopców i dziewcząt). Średnia wartość wskaźnika API% wyniosła ogółem  $67,5 \pm 29,1$  ( $72,4 \pm 26,8$  i  $61,9 \pm 30,9$  odpowiednio w grupie chłopców i dziewcząt). Zapalenie dziąseł (GI > 0) wystąpiło u 60 pacjentów (69%). Przepływ śliny niestymulowanej wahał się od 0,4 do 2,1 ml/5 min (średnia  $1,31 \pm 0,45$  ml/5 min). Oceniono go jako niski u 44 pacjentów (50,6%), średni – 34 (39,1%), wysoki – 9 (10,3%). Wyniki oceny właściwości fizykochemicznych śliny oraz liczebności bakterii kariogennych zawarto w tabeli 2.

Stężenie anhydryzy węglanowej VI w ślinie wahało się od 0,165 do 8,477  $\mu$ g/ml, wynosząc średnio  $1,268 \pm 1,493$   $\mu$ g/ml.

test, while the comparison of three or more groups was performed using the ANOVA test. In the case of categorical variables (including binomial variables), the chi-square test was used to compare the groups. Spearman's rank correlation coefficient was calculated. In all analyzes, the level of statistical significance was set at 0.05. Missing data was excluded from the analysis.

## RESULTS

Study involved 87 patients, including 46 (52.9%) boys. The mean  $\pm$  SD age was  $13 \pm 1$  years. Caries (DMFT > 0) was present in 81 patients (93.1%), active caries (DT > 0) in 47 patients (54.3%), and white caries spots (WSL > 0) in 41 patients (47.1%). The details are described in table 1.

The mean value of the ODI-S index was  $1.01 \pm 0.56$  in total ( $1.06 \pm 0.49$  and  $0.95 \pm 0.63$ , respectively, in the group of boys and girls). The mean value of the API% index was a total of  $67.5 \pm 29.1$  ( $72.4 \pm 26.8$  and  $61.9 \pm 30.9$  in the group of boys and girls, respectively). Gingivitis (GI > 0) occurred in 60 patients (69%). The flow of unstimulated saliva ranged from 0.4 to 2.1 ml/5 min (mean  $1.31 \pm 0.45$  ml/5 min). It was assessed as low in 44 patients (50.6%), medium – 34 (39.1%), high – 9 (10.3%). The results which describe the physicochemical properties of saliva and the cariogenic bacteria count are presented in table 2.

The concentration of carbonic anhydrase VI in saliva ranged from 0.165 to 8.477  $\mu$ g/ml, average  $1.268 \pm 1.493$   $\mu$ g/ml.

Tab. 1. Występowanie próchnicy zębów w badanej grupie

| Parametr              | Ogółem           | Chłopcy         | Dziewczęta      | p     |
|-----------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------|
|                       |                  | [%]             |                 |       |
| PUWz <sup>a</sup> > 0 | 93,2             | 93,6            | 92,7            | 0,868 |
| Pz <sup>b</sup> > 0   | 54,3             | 57,4            | 51,2            | 0,562 |
| WSL <sup>c</sup> > 0  | 47,1             | 41,3            | 53,6            | 0,251 |
|                       | Średnia $\pm$ SD |                 |                 |       |
| PUWz <sup>a</sup>     | 6,30 $\pm$ 4,98  | 6,30 $\pm$ 5,09 | 6,37 $\pm$ 4,92 | 0,948 |
| Pz <sup>b</sup>       | 2,09 $\pm$ 2,81  | 2,30 $\pm$ 3,02 | 1,85 $\pm$ 2,56 | 0,458 |
| Uz <sup>d</sup>       | 0,06 $\pm$ 0,28  | 0,02 $\pm$ 0,15 | 0,10 $\pm$ 0,37 | 0,181 |
| Wz <sup>e</sup>       | 4,18 $\pm$ 3,78  | 3,98 $\pm$ 3,78 | 4,41 $\pm$ 3,81 | 0,599 |
| PUWp <sup>f</sup>     | 8,93 $\pm$ 8,82  | 9,02 $\pm$ 9,73 | 8,83 $\pm$ 7,78 | 0,921 |
| WSL <sup>c</sup>      | 3,47 $\pm$ 5,60  | 3,96 $\pm$ 6,30 | 2,93 $\pm$ 4,71 | 0,395 |

<sup>a</sup> zęby próchnicowe, usunięte/wypełnione z powodu próchnicy

<sup>b</sup> zęby próchnicowe

<sup>c</sup> białe plamy próchnicowe

<sup>d</sup> zęby usunięte z powodu próchnicy

<sup>e</sup> zęby wypełnione

<sup>f</sup> powierzchnie próchnicowe, usunięte/wypełnione z powodu próchnicy

**Tab. 1.** Caries prevalence in the study group

| Parameter             | Total       | Boys        | Girls       | p     |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| [%]                   |             |             |             |       |
| DMFT <sup>a</sup> > 0 | 93.2        | 93.6        | 92.7        | 0.868 |
| DT <sup>b</sup> > 0   | 54.3        | 57.4        | 51.2        | 0.562 |
| WSL <sup>c</sup> > 0  | 47.1        | 41.3        | 53.6        | 0.251 |
| Mean ± SD             |             |             |             |       |
| DMFT <sup>a</sup>     | 6.30 ± 4.98 | 6.30 ± 5.09 | 6.37 ± 4.92 | 0.948 |
| DT <sup>b</sup>       | 2.09 ± 2.81 | 2.30 ± 3.02 | 1.85 ± 2.56 | 0.458 |
| MT <sup>d</sup>       | 0.06 ± 0.28 | 0.02 ± 0.15 | 0.10 ± 0.37 | 0.181 |
| FT <sup>e</sup>       | 4.18 ± 3.78 | 3.98 ± 3.78 | 4.41 ± 3.81 | 0.599 |
| DMFS <sup>f</sup>     | 8.93 ± 8.82 | 9.02 ± 9.73 | 8.83 ± 7.78 | 0.921 |
| WSL <sup>c</sup>      | 3.47 ± 5.60 | 3.96 ± 6.30 | 2.93 ± 4.71 | 0.395 |

<sup>a</sup> decayed, missing, filled teeth

<sup>b</sup> decayed teeth

<sup>c</sup> white spot lesions

<sup>d</sup> missing teeth

<sup>e</sup> filled teeth

<sup>f</sup> decayed, missing, filled surfaces

**Tab. 2.** Właściwości fizykochemiczne śliny i liczebność bakterii kariogennych

|                                        |                          | Średnia ± SD |
|----------------------------------------|--------------------------|--------------|
| pH śliny niestymulowanej               |                          | 6,66 ± 0,62  |
| Pojemność buforowa                     |                          | 6,90 ± 2,21  |
| Przepływ śliny stymulowanej [ml/5 min] |                          | 4,8 ± 2,4    |
|                                        |                          | N/%          |
| Kwasowość                              | niska                    | 37/42,5      |
|                                        | umiarkowana              | 41/47,2      |
|                                        | wysoka                   | 9/10,3       |
| Buforowość                             | niska                    | 24/27,6      |
|                                        | średnia                  | 50/57,5      |
|                                        | wysoka                   | 13/14,9      |
| Konsystencja                           | wodnista                 | 47/54        |
|                                        | pienista                 | 27/31        |
|                                        | lepka                    | 13/15        |
| Miano <i>S. mutans</i>                 | > 10 <sup>5</sup> CFU/ml | 43/49,4      |
|                                        | < 10 <sup>5</sup> CFU/ml | 44/50,6      |
| Miano <i>Lactobacillus</i> spp.        | > 10 <sup>5</sup> CFU/ml | 63/72,4      |
|                                        | < 10 <sup>5</sup> CFU/ml | 24/27,6      |

**Tab. 2.** Physicochemical properties of saliva and cariogenic bacteria count

|                                   |                          | Mean ± SD   |
|-----------------------------------|--------------------------|-------------|
| Salivary pH                       |                          | 6.66 ± 0.62 |
| Buffering capacity                |                          | 6.90 ± 2.21 |
| Stimulated saliva flow [ml/5 min] |                          | 4.80 ± 2.40 |
|                                   |                          | N/%         |
| Acidity                           | low                      | 37/42.5     |
|                                   | average                  | 41/47.2     |
|                                   | high                     | 9/10.3      |
| Buffering                         | low                      | 24/27.6     |
|                                   | average                  | 50/57.5     |
|                                   | high                     | 13/14.9     |
| Consistency                       | watery                   | 47/54       |
|                                   | foamy                    | 27/31       |
|                                   | sticky                   | 13/15       |
| <i>S. mutans</i> level            | > 10 <sup>5</sup> CFU/ml | 43/49.4     |
|                                   | < 10 <sup>5</sup> CFU/ml | 44/50.6     |
| <i>Lactobacillus</i> spp. level   | > 10 <sup>5</sup> CFU/ml | 63/72.4     |
|                                   | < 10 <sup>5</sup> CFU/ml | 24/27.6     |

Analiza statystyczna danych wykazała różnice stężenia CA6 w ślinie, w zależności od obecności aktywnej próchnicy zębów, stanu higieny i dziąseł, parametrów fizykochemicznych oraz miana bakterii kariogennych. Dane te przedstawiono w tabeli 3.

Statistical analysis of the data showed differences in CA6 concentration in saliva depending on the presence of active tooth decay, hygiene and gingival conditions, physicochemical parameters and the level of cariogenic bacteria. These data are presented in table 3.

**Tab. 3.** Stężenie anhidrazy węglanowej VI w ślinie w zależności od stanu w jamie ustnej

|  | Obecna aktywna próchnica zębów  |                   | p      |
|--|---------------------------------|-------------------|--------|
|  | Tak                             | Nie               |        |
|  | 1076                            | 1970              | 0,014* |
|  | Obecna próchnica ubytkowa       |                   |        |
|  | Tak                             | Nie               | 0,239  |
|  | 1176                            | 1585              |        |
|  | Stan higieny wg wskaźnika ODI-S |                   |        |
|  | Dobra                           | Dostateczna i zła |        |
|  | 1939                            | 1182              | 0,059  |
|  | Stan higieny wg wskaźnika API%  |                   |        |
|  | Optymalna i dobra               | Przeciętna i zła  | 0,059  |
|  | 1939                            | 1182              |        |
|  | Zapalenie dziąseł               |                   |        |
|  | Tak                             | Nie               |        |
|  | 1161                            | 1815              | 0,079  |
|  | pH śliny niestymulowanej        |                   |        |
|  | Niskie                          | Wysokie           |        |
|  | 1537                            | 1236              | 0,391  |
|  | Pojemność buforowa              |                   |        |
|  | Niska                           | Wysoka            |        |
|  | 1066                            | 1478              | 0,287  |
|  | Przepływ śliny stymulowanej     |                   |        |
|  | Niski                           | Wysoki            |        |
|  | 1949                            | 1201              | 0,072  |
|  | Miano <i>S. mutans</i>          |                   |        |
|  | Wysokie                         | Niskie            |        |
|  | 1065                            | 1656              | 0,086  |
|  | Miano <i>Lactobacillus</i> spp. |                   |        |
|  | Wysokie                         | Niskie            |        |
|  | 1118                            | 2010              | 0,020* |

\* różnica istotna statystycznie

**Tab. 3.** Concentration of carbonic anhydrase VI in saliva depending on the condition in the oral cavity

|  | Active caries                   |                | p      |
|--|---------------------------------|----------------|--------|
|  | Yes                             | No             |        |
|  | 1076                            | 1970           | 0.014* |
|  | Cavities present                |                | p      |
|  | Yes                             | No             |        |
|  | 1176                            | 1585           | 0.239  |
|  | Hygiene level based on ODI-S    |                | p      |
|  | Good                            | Average or bad |        |
|  | 1939                            | 1182           | 0.059  |
|  | Hygiene level based on API%     |                | p      |
|  | Optimal or good                 | Average or bad |        |
|  | 1939                            | 1182           | 0.059  |
|  | Gingivitis                      |                | p      |
|  | Yes                             | No             |        |
|  | 1161                            | 1815           | 0.079  |
|  | Salivary pH                     |                | p      |
|  | Low                             | High           |        |
|  | 1537                            | 1236           | 0.391  |
|  | Buffering capacity              |                | p      |
|  | Low                             | High           |        |
|  | 1066                            | 1478           | 0.287  |
|  | Stimulated saliva flow          |                | p      |
|  | Low                             | High           |        |
|  | 1949                            | 1201           | 0.072  |
|  | <i>S. mutans</i> level          |                | p      |
|  | High                            | Low            |        |
|  | 1065                            | 1656           | 0.086  |
|  | <i>Lactobacillus</i> spp. level |                | p      |
|  | High                            | Low            |        |
|  | 1118                            | 2010           | 0.020* |

\*statistically significant difference

Istotne statystycznie korelacje zostały potwierdzone pomiędzy obecnością aktywnej próchnicy zębów (ubytki lub białe plamy próchnicowe) a właściwościami fizykochemicznymi śliny (pH ślinowe  $r = -0,384$ ,  $p < 0,05$ ; pojemność buforowa  $r = -0,367$ ,  $p < 0,05$ ; konsystencja  $r = -0,290$ ,  $p < 0,05$ ; przepływ śliny stymulowanej  $r = -0,072$ ,  $p < 0,05$ )

Statistically significant correlations were confirmed between the presence of active tooth decay (cavities or white spot lesions) and the physicochemical properties of saliva (salivary pH:  $r = -0.384$ ,  $p < 0.05$ ; buffer capacity:  $r = -0.367$ ,  $p < 0.05$ ; consistency:  $r = -0.290$ ,  $p < 0.05$ ; stimulated saliva flow:  $r = -0.072$ ,  $p < 0.05$ ) and the level of



oraz liczebnością bakterii *S. mutans* ( $r = 0,435$ ;  $p < 0,05$ ) i *Lactobacillus* spp. ( $r = 0,566$ ;  $p < 0,05$ ).

Analiza korelacji Spearmana wykazała również istotną ujemną zależność pomiędzy stężeniem CA6 w ślinie a przepływem śliny stymulowanej ( $r = -0,292$ ;  $p < 0,05$ ).

## DYSKUSJA

Powyższe badanie wskazuje, że próchnica zębów wciąż pozostaje powszechnie występującym problemem. Określona intensywność próchnicy zębów, wyrażona wskaźnikami PUWz, PUWp i ich składowymi, oraz frekwencja próchnicy są wysokie. Niedostateczny jest również stan higieny jamy ustnej, a konsekwencją tego jest wysoka, wynosząca prawie 70%, frekwencja zapalenia dziąseł wywołanego obecnością płytki nazębnej. Powyższe obserwacje są niejako potwierdzeniem wyników innych badań o zasięgu światowym, które ukazały się w ostatnich latach (13-16). W 2020 roku Kazemini i wsp. (17) opublikowali obszerną metaanalizę z ostatnich 25 lat badań dotyczących tematyki występowania próchnicy zębów u dzieci i nastolatków. Frekwencja próchnicy w grupie z uzębieniem stałym (1 454 871 badanych) wynosiła prawie 60%. Co ciekawe, wraz z biegiem lat oraz ze wzrostem liczebności grupy w badaniach dotyczących zębów stałych poziom ten wykazywał tendencję do obniżania.

W prezentowanym badaniu uzyskaliśmy istotne różnice stężenia CA6 w ślinie w zależności od aktywności próchnicy zębów. U pacjentów z aktywną próchnicą zębów to stężenie było niższe. Wyniki te potwierdzają obserwacje odnotowane przez Makawi i wsp. (2), którzy stężenie anhidrazy węglanowej VI porównywali zarówno w uzębieniu mlecznym, jak i stałym, w próbkach śliny niestymulowanej i stymulowanej. Każdorazowo uzyskiwane stężenie było najwyższe w przypadku niskiego ryzyka choroby próchnicowej badanych. Wyższą aktywność ślinową CA6 przy braku aktywnych ognisk próchnicy także otrzymali Surdilović i wsp. (18). Z drugiej strony, niektóre badania prezentują odmienne do uzyskanych przez nas wyniki, jednak były to badania dotyczące uzębienia mlecznego (19-21). Frassetto i wsp. (19) odnotowali wysoką aktywność anhidrazy w ślinie pacjentów z aktywną próchnicą zębów. W dwóch pracach prezentowanych przez grupę brazylijskich badaczy, aktywność CA6 rosła u pacjentów z ECC (ang. *early childhood caries*) (20, 21). Różnice mogą wynikać z różnic w stosowanej metodocy, ponieważ w powyższej pracy stężenie CA6 oznaczano za pomocą metody ELISA, natomiast oznaczenie aktywności enzymu wymaga innych technik laboratoryjnych.

W przedstawionym przez nas badaniu wyższe stężenia CA6 odnotowywano również u pacjentów z niską kwasowością i wysoką pojemnością buforową śliny, jednakże różnice nie były istotne statystycznie. Obserwacje te są zgodne z uzyskanymi przez Makawi i wsp. (2). Anhidraza węglanowa VI może chronić powierzchnię szkliwa, katalizując bufor wodorowęglanowy, co może przyspieszać neutralizację kwasów bakteryjnych. Może również gromadzić się w błonie nabytej i pełnić w niej rolę lokalnego regulatora pH

*S. mutans* bacteria ( $r = 0.435$ ;  $p < 0.05$ ) and *Lactobacillus* spp. ( $r = 0.566$ ;  $p < 0.05$ ).

The analysis of Spearman correlation also showed a significant negative correlation between the concentration of CA6 in saliva and the flow of stimulated saliva ( $r = -0.292$ ;  $p < 0.05$ ).

## DISCUSSION

The presented study shows that tooth decay still remains a common problem. The determined intensity of dental caries, expressed by DMFT and DMFT indices and their components, as well as the caries frequency are high. Oral hygiene is also inadequate, and the consequence of this is a high, almost 70% frequency of gingivitis caused by the presence of dental plaque. The above observations confirm the results of other worldwide studies that have been published in recent years (13-16). In 2020, Kazemini et al. (17) published an extensive meta-analysis of the last 25 years of research on the subject of dental caries in children and adolescents. Caries incidence in the group with permanent dentition (1,454,871 subjects) was almost 60%. Interestingly, over the years and with the increase in the size of the group in studies on permanent teeth, this level tended to decline.

In our study, we obtained significant differences in the concentration of CA6 in saliva depending on the activity of tooth decay. In patients with active caries, this concentration was lower. These results confirm the observations by Makawi et al. (2), who compared the concentration of carbonic anhydrase VI in both deciduous and permanent dentition, in samples of unstimulated and stimulated saliva. In each case, the obtained concentration was the highest in the case of a low risk of caries disease in the examined patients. Higher CA6 salivary activity in the absence of active caries was also reported by Surdilović et al. (18). On the other hand, some studies present results different from those obtained by us, but these were studies on primary dentition (19-21). Frassetto et al. (19) noted high activity of anhydrase in the saliva of patients with active tooth decay. In two studies presented by a group of Brazilian researchers, the activity of CA6 increased in patients with ECC (Early Childhood Caries) (20, 21). The differences may result from differences in the applied methodology, because in the study above, the concentration of CA6 was determined using the ELISA method, while the determination of the enzyme activity requires different laboratory techniques.

In the presented study, higher CA6 concentrations were also noted in patients with low salivary acidity and high buffer capacity, but the differences were not statistically significant. These observations are in line with those obtained by Makawi et al. (2). Carbonic Anhydrase VI can protect the enamel surface by catalyzing the bicarbonate buffer, which can accelerate the neutralization of bacterial acids. It can also accumulate in the acquired pellicle and act as a local



na powierzchni szkliwa, przyczyniając się do zapobiegania próchnicy zębów (2, 22).

Odnutowano również istotnie wyższe stężenie CA6 przy niskiej liczebności bakterii *Lactobacillus* spp. w ślinie. Wyniku nie możemy jednak porównać do cytowanej literatury, ponieważ miano bakterii, jeśli było badane, zestawiano raczej z intensywnością próchnicy niż z poziomem CA6.

## WNIOSKI

1. Ślinowe stężenie anhidrazy węglanowej VI różni się w zależności od stanu w jamie ustnej. Jest niższe u pacjentów z aktywną próchnicą zębów.

2. Prowadzenie badań śliny jest niezwykle ciekawą alternatywą dla pracy naukowej lekarzy dentystów. Badania właściwości śliny i jej składników mogą przynieść interesujące wyniki, które w przyszłości mogą udoskonalić proces wykrywania, monitorowania i zapobiegania chorobie próchnicowej.

3. Wyniki badań parametrów ślinowych mogą różnić się w zależności od zastosowanych metod służących pobieraniu próbek i ich późniejszej analizie. Ustandaryzowanie tych metod może usprawnić badanie składników śliny, które mogą być biomarkerami stanów chorobowych jamy ustnej.

pH regulator on the enamel surface, contributing to the prevention of tooth decay (2, 22).

Significantly higher CA6 concentration was also noted with a low level of *Lactobacillus* spp. bacteria in saliva. The result, however, cannot be compared to the cited literature, because the bacteria count, if tested, was compared with the intensity of caries rather than the level of CA6.

## CONCLUSIONS

1. The salivary concentration of carbonic anhydrase VI varies depending on the condition in the oral cavity. It is lower in patients with active caries.

2. Salivary testing is an interesting alternative to the scientific work of dental professionals. The study of the salivary properties and its components may yield interesting results that may improve the process of detecting, monitoring and preventing caries in the future.

3. Salivary parameters results may vary depending on the methods used for sampling and subsequent analysis. Standardization of these methods could improve the study of salivary components that may be biomarkers of oral diseases.

## KONFLIKT INTERESÓW CONFLICT OF INTEREST

Brak konfliktu interesów  
None

## ADRES DO KORESPONDENCJI CORRESPONDENCE

\*Dorota Olczak-Kowalczyk  
Zakład Stomatologii Dziecięcej  
Warszawski Uniwersytet Medyczny  
ul. Binieckiego 6  
02-097 Warszawa  
tel.: +48 (22) 116-64-24  
pedodoncja@wum.edu.pl

## PIŚMIENNICTWO/REFERENCES

1. Szydłarska D, Grzesiuk W, Kupstas A, Bar-Andziak E: Ślina jako materiał diagnostyczny. *Forum Medycyny Rodzinnej* 2008; 2(6): 454-464.
2. Makawi Y, El-Masry E, El-Din HM: Salivary carbonic anhydrase, pH and phosphate buffer concentrations as potential biomarkers of caries risk in children. *Journal of Unexplored Medical Data* 2017; 2: 9-15.
3. Lindskog S, Nyman PO: Metal-binding properties of human erythrocyte carbonic anhydrases. *Biochim Biophys Acta* 1964; 85: 462-474.
4. Imtaiyaz Hassan M, Shajee B, Waheed A et al.: Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorg Med Chem* 2013; 21(6): 1570-1582.
5. Parkkila S, Kaunisto K, Rajaniemi L et al.: Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes VI, II, and I in human parotid and submandibular glands. *J Histochem Cytochem* 1990; 38(7): 941-947.
6. Kivela J, Parkkila S, Metteri J et al.: Salivary carbonic anhydrase VI concentration and its relation to basic characteristics of saliva in young men. *Acta Physiol Scand* 1997; 161: 221-225.
7. Kimoto M, Kishino M, Yura Y, Ogawa Y: A role of salivary carbonic anhydrase VI in dental plaque. *Arch Oral Biol* 2006; 51: 117-122.
8. Dušan S, Ivana S, Mirjana, A, Smarija I: The role of carbon anhydrase in the occurrence of caries. *Acta Stomatologica Naissi* 2008; 24: 789-792.
9. WHO: Oral Health Surveys – basic methods. 5<sup>th</sup> edition. 2013: 47, 73-74.
10. Greene JC, Vermillion JR: The simplified oral hygiene index. *J Am Dent Assoc* 1964; 68: 7-13.
11. Lange DE, Plagmann HC, Eenboom A, Promsberger A: Klinische Bewertungsverfahren zur Objektivierung der Mundhygiene. *Dtsch Zahnärztl Z* 1977; 32: 44-47.
12. Löe H: The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J Periodontol* 1967; 38(suppl.): 610.
13. Diaz-Nicolas J, Silva-Vetri MG, Rivas-Tumanyan S et al.: Prevalence of Dental Caries in 12-Year-Olds in San Pedro de Macoris, DR. *P R Health Sci J* 2020; 39(2): 210-215.
14. Onov MP, Beltcheva AB: Caries Prevalence in 12-year-old Children from Plovdiv – a Multifactorial Regression Analysis. *Folia Med (Plovdiv)* 2020; 62(1): 159-164.

15. AlGhamdi AS, Almarghlani AA, Alyafi RA et al.: Gingival health and oral hygiene practices among high school children in Saudi Arabia. *Ann Saudi Med* 2020; 40(2): 126-135.
16. Lock NC, Susin C, Damé-Teixeira N et al.: Sex differences in the association between obesity and gingivitis among 12-year-old South Brazilian schoolchildren. *J Periodontal Res* 2020; 55(4): 559-566.
17. Kazemina M, Abdi A, Shohaimi S et al.: Dental caries in primary and permanent teeth in children's worldwide, 1995 to 2019: a systematic review and meta-analysis. *Head Face Med* 2020; 16(1): 22.
18. Surdilović D, Stojanović I, Apostolović M: Caries risk estimation in children regarding values of saliva buffer system components and carbon hydrase activity. *Vojnosanit Pregl* 2008; 65: 676-680.
19. Frassetto F, Parisotto TM, Peres RC et al.: Relationship among salivary carbonic anhydrase VI activity and flow rate, biofilm pH and caries in primary dentition. *Caries Res* 2012; 46(3): 194-200.
20. de Sousa ET, Lima-Holanda AT, Nobre-Dos-Santos M: Carbonic anhydrase VI activity in saliva and biofilm can predict early childhood caries: A preliminary study. *Int J Paediatr Dent* 2021; 31(3): 361-371.
21. de Sousa ET, Lima-Holanda AT, Sales LS, Nobre-Dos-Santos M: Combined effect of starch and sucrose on carbonic anhydrase VI activity in saliva and biofilm of children with early childhood caries. Exposure to starch and sucrose alters carbonic anhydrase VI activity in saliva and biofilm. *Clin Oral Investig* 2021; 25(5): 2555-2568.
22. Leinonen J, Kivelä J, Parkkila S et al.: Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI is located in the human enamel pellicle. *Caries Res* 1999; 33: 185-190.

**nadesłano/submitted:**

3.11.2021

**zaakceptowano do druku/accepted:**

24.11.2021