

Influence of polymorphism of the MUC7 gene on oral hygiene, gingival status and dental plaque formation

Wpływ polimorfizmu genu MUC7 na higienę jamy ustnej, stan dziąseł i szybkość odkładania płytki nazębnej

Monika Szmidt, Justyna Pol, Jadwiga Buczkowska-Radlińska

Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej i Endodoncji, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Polska
Chair and Department of Conservative Dentistry and Endodontics, Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland
Head: prof. dr hab. J. Buczkowska-Radlińska

Abstract

Aim of the study. To analyze polymorphism of the MUC7 gene and its connection with dental plaque accumulation (24h Plaque Formation Rate Index), dental hygiene as described by API and gingival status (GBI and SBI). **Material and methods.** A total of 47 volunteers from among students of the second year of the Faculty of Dentistry participated in the study. Students were aged between 20 and 22 years. The procedure was performed under standard conditions in the dental chair with adequate light, by means of a mirror and a probe. The status of dental hygiene was determined with API. The condition of periodontium was determined using modified SBI and GBI. In all patients the dentist carried out professional teeth cleaning with "clean polish" paste and a brush, using slow handpiece. After this treatment all volunteers were asked to abstain from performing any form of oral hygiene practices for a period of 24 hours. Dental plaque accumulation was assessed by inspecting the presence of dental plaque using a dental probe. Quantification of dental plaque accumulation was carried out after 24h using PFRI – Plaque Formation Rate Index, modified for needs of this study. Genetic research was performed to isolate DNA, which was obtained by means of a Sherlock AX universal set (A&A BIOTECHNOLOGY). DNA identification of polymorphism of MUC 7 gene was performed using PCR – RFLP method. **Results.** Patients with MUC7*5/*6 genotype were statistically six times more susceptible to accumulate dental plaque when the PFRI was over 14. There was a significant correlation between PFRI and API. There was no

Streszczenie

Cel pracy. Celem pracy była ocena zależności pomiędzy polimorfizmem genu MUC 7 a higieną jamy ustnej (API), stanem dziąseł (GBI, SBI) oraz szybkością odkładania płytki nazębnej (PFRI). **Material i metody.** Badanie przeprowadzono wśród 47 ochotników, studentów Wydziału Stomatologii PUM. Wiek badanych to 20-21 lat. Badanie kliniczne jamy ustnej przeprowadzono za pomocą zgłębnika i lusterka w oświetleniu sztucznym, w warunkach standardowego gabinetu dentystycznego. Stan higieny jamy ustnej oceniono za pomocą wskaźnika API. Stan dziąseł oceniono przy użyciu wskaźników: zmodyfikowanego wskaźnika SBI oraz GBI. Następnie u pacjentów przeprowadzono profesjonalne oczyszczenie zębów z użyciem pasty „clean polish” i szczoteczki na mikrosilnik. Pacjentów poinformowano o odstąpieniu od zabiegów higienicznych przez 24h. Obecność płytki nazębnej po 24h oceniono za pomocą wskaźnika PFRI – Plaque Formation Rate Index, zmodyfikowanego na potrzeby niniejszej pracy. Do izolacji DNA ze śladów biologicznych użyto zestawu uniwersalnego Sherlock AX (A&A BIOTECHNOLOGY), VNTR polimorfizm genu MUC 7 został zbadany przy użyciu Polymerase Chain Reaction (PCR). **Wyniki.** Badania wykazały, iż pacjenci z genotypem MUC7*5/*6 statystycznie częściej narażeni byli na akumulację płytki bakteryjnej, gdy wskaźnik PFRI był większy od 14. Stwierdzono również, statystycznie istotną zależność pomiędzy wskaźnikami PFR a API. Badania nie wykazały istotnej statystycznie korelacji pomiędzy wskaźnikami PFRI oraz SBI, GBI. Wykazano zależność statystyczną

KEYWORDS:

PFRI, MUC7 gene polymorphism, GBI, SBI, API

HASŁA INDEKSOWE:

PFRI, polimorfizm genu MUC7, GBI, SBI, API

significant difference between either PFRI or SBI, GBI. A statistically important correlation between the MUC7 gene, API and PFRI was revealed. Significantly higher value of GBI was correlated with PFRI, when the mean value of PFRI was over 15. **Conclusions.** This study showed that genetic polymorphism of the MUC7 gene is present in the examined group. A statistically significant correlation between MUC7 gene and the PFRI index was obtained. Higher API values corresponded with more rapid accumulation of dental plaque. The study showed no correlation between polymorphism of the MUC7 gene and API, SBI and GBI indices.

Introduction

Dental plaque is the most important factor which influences the development of tooth caries and gingivitis. It is a bacterial biofilm, consisting of a wide variety of over 400 species of bacteria growing on the mineralised and soft tissues of the oral cavity. Dental plaque is not a uniform structure but in fact it varies from tooth to tooth and from location to location on each tooth. Supragingival plaque appears to be different from subgingival plaque both morphologically and bacteriologically. Plaque present on molars and incisors is not the same. The difference in plaque levels is also observed on buccal, lingual and interproximal surfaces.^{1,2}

Dental plaque is a structure made of bacteria which are immersed in an extracellular matrix. On the cleaned surface of a tooth acquired pellicle, made of glycoproteins from saliva grows first. At the beginning, acquired pellicle is free from bacteria but gradually bacteria attach to this structure by electrostatic adsorption.^{1,3} Dental plaque has ca. 0.5 mm thickness and after 7 days 100–400 microbes per 1 g of dental plaque accumulation. When plaque calcifies, it becomes calculus which can be sub- or supragingival. Even a relatively small proportion of the bacteria present in the plaque are implicated in dental conditions such as caries and periodontal disease.¹ There are sites where dental plaque is found most often such as interproximal regions, carious lesions, crowded lower incisal regions, poor gingival contours (frequently caused by plaque accumulation itself),

pomiędzy genotypem MUC 7 a wskaźnikami API i PFRI. U pacjentów ze średnią wartością wskaźnika PFRI powyżej 15, stwierdzono statystycznie wyższe wartości wskaźnika GBI. **Wnioski.** Badania wykazały istnienie polimorfizmu genu MUC 7 u badanej grupy pacjentów. Uzyskano statystycznie istotną zależność pomiędzy genem MUC 7 a wskaźnikiem PFRI. Wyższe wartości API korespondowały z większą szybkością akumulacji płytki nazębnej. Badania nie wykazały zależności pomiędzy polimorfizmem genu MUC 7 a wskaźnikami API, SBI i GBI.

Wstęp

Płytką nazębną stanowi jeden z najważniejszych czynników, wpływających na rozwój próchnicy i zapalen dziąseł. Stanowi bakteryjny biofilm zawierający 400 gatunków bakterii, pokrywający zmineralizowane oraz miękkie tkanki jamy ustnej. Płytką nazębną nie jest strukturą jednolitą w całej jamie ustnej, różni się w obrębie zębów oraz lokalizacją w obrębie każdego zęba. Płytką nazębną naddziąsłową różni się od poddziąsłowej zarówno morfologicznie, jak i bakteriologicznie. Inna jest płytka w obrębie siekaczy, a inna w obrębie zębów trzonowych. Różnice występują także pomiędzy płytką na powierzchniach wargowych, językowych i międzyzębowych.^{1,2}

Płytką nazębną jest strukturą, składającą się z bakterii zatopionych w zewnątrzkomórkowej substancji, tzw. matrix. Na początku, bezpośrednio po umyciu zębów, na ich powierzchni pojawia się błonka nabyta (acquired pellicle) zbudowana z glikoprotein pochodzących ze śliny. Błonka nabyta jest początkowo wolna od bakterii, a następnie stopniowo przez nie kolonizowana na skutek elektrostatycznej adsorpcji.^{1,3} Płytką nazębną ma grubość 0,5 mm, a już po 7 dniach zawiera od 100 do 400 mikrobów na 1 gram płytki. Po czasie płytka nazębna ulega mineralizacji i powstaje kamień nazębny nad- i poddziąsłowy. Nawet względnie mała liczba bakterii obecnej w płytce nazębną, implikuje rozwój choroby próchnicowej lub choroby przyzębia.¹ W jamie ustnej istnieją miejsca szczególnej akumulacji płytki nazębnej, takie jak: powierzchnie międzyzębowe, ubytki próchnicowe,

partial prosthesis components, deep occlusal fissures, margins of restorations and orthodontic appliances.^{3,4}

One of the major functions of human saliva is to protect the oral cavity, including the dentition, from microbial overgrowth and extensive microbial production of noxious agents that may lead to oral disease, such as dental caries. The protective mechanisms include proper salivary flow, buffer effect and a number of both immune and non-immune antimicrobial factors. The examination of salivary proteins has showed that several salivary proteins (like the proline-rich proteins) exhibit genetic polymorphism, which can be an important factor in the etiology of dental caries.^{1,5,6}

Mucins are the main glycoproteins in salivary proteins. Salivary mucins constitute one of the major factors, which influence teeth and oral mucosa protecting from mechanical, chemical and microbial damage. These large glycosylated glycoproteins take part in formation of protective pellicle covering tooth enamel and soft oral mucosa, promote bacterial aggregation and clearance from the oral cavity, and are responsible for the maintenance of viscoelastic, hydrophobic and lubricative properties of saliva.⁷⁻⁹ Two kinds of mucins are recognized in the oral cavity. MG1 mucin which is encoded by gene MUC5B, located on chromosome 11, and MG2 encoded by gene MUC7 located on the long arm of chromosome 4.^{1,10,11} Most of the mucin genes exhibit a high degree of polymorphism determined by Variation in Number of Tandem Repeats (VNTR) in the TR domain. MUC7 contains unique 5 and 3 regions (with five potential sites for N-glycosylation) and a central tandem repeat domain, which in the most common allele comprises six tandem repeats each of 69 nucleotides (23 amino acids) with many potential sites for O-glycosylation and makes up 18% of the coding region.¹¹⁻¹³ MG2 has the ability to interfere with many different microbial species existing in the oral cavity. This mucin is responsible for agglutination of species like *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*. MG2 has more influence on mouth microflora than MG1, but both play an essential role in the process of making heterotypic complex with other saliva proteins.^{7,10,14}

stłoczone zęby sieczne, niekorzystny układ girlandy dziąsłowej, głębokie bruzdy na powierzchni żującej, protezy częściowe, brzegi wypełnień oraz aparaty ortodontyczne.^{3,4}

Jedną z głównych funkcji śliny ludzkiej jest ochrona jamy ustnej, a szczególnie uzębienia przed czynnikami bakteryjnymi i wydzielanymi przez nich substancjami, które mogą prowadzić do chorób jamy ustnej, a w szczególności do próchnicy. Mechanizmy ochronne śliny to: właściwy przepływ śliny, efekt buforujący oraz liczne czynniki obronne i antybakteryjne. Badanie białek pochodzących ze śliny (m.in. białka bogate w prolinę) wykazało, że kilka z nich wykazuje genetyczny polimorfizm, co może stanowić istotny czynnik w etiologii choroby próchnicowej.^{1,5,6}

Głównymi glikoproteinami w ślinie są mucyny. Są one jednym z istotnych czynników, wpływających na zęby i błonę śluzową jamy ustnej, chroniącymi przed mechanicznymi, chemicznymi oraz bakteryjnymi uszkodzeniami. Te duże glikozylowane cząsteczki odpowiedzialne są za formowanie błonki nabytej, powlekającej tkanki zmineralizowane i miękkie jamy ustnej, sprzyjanie agregacji i usuwaniu bakterii oraz za utrzymanie lepkości oraz hydrofobowych i powlekających właściwości śliny.⁷⁻⁹ W obrębie jamy ustnej wyróżnia się dwa zasadnicze typy mucyn: MG1 i MG2. Mucyna MG1 kodowana jest przez gen MUC5B, który znajduje się na chromosomie 11, natomiast mucynę MG2 koduje gen MUC7 zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 4.^{1,10,11} Wiele genów MUC wykazuje wysoki stopień polimorfizmu determinowanego przez zmienną liczbę jednostek tandemowych tego regionu (VNTR – ang. Variable Number of Tandem Repeats). MUC 7 zawiera unikalny 5 i 3 region (z 5 potencjalnymi miejscami dla N – glikozylacji) oraz region tandemowych powtórzeń, w którym w najbardziej powszechnym allelu zawartych jest sześć powtórzeń tandemowych, każdego z 69 nukleotydów (23 aminokwasy) z wieloma potencjalnymi miejscami dla O – glikozylacji, co stanowi 18% regionu kodującego.¹¹⁻¹³ Mucyna MG2 oddziałuje na wiele szczepów bakteryjnych obecnych w jamie ustnej. Jest odpowiedzialna za aglutynację gatunków *Streptococcus sanguis* i *Streptococcus*

Material and methods

Clinical Examination

The study was conducted in the Department of Conservative Dentistry, Pomeranian Medical University of Szczecin. Protocol approval no. BN-001/64/06 was obtained from the Bioethics Committee of the Pomeranian Medical University in Szczecin (24 May 2006).

A total of 47 volunteers from students of the second year of the Faculty of Dentistry participated in the study. The patients were medically fit with no observable dental conditions, which would require treatment. They were fully informed on the experimental procedure and gave written consent to the protocol. Students were aged between 20 and 22 years.

The procedure of the study was performed under standard conditions in the dental chair with adequate light, using standard dental instruments. In all patients the dentist carried out professional teeth cleaning with "clean polish" paste and a brush on slow handpiece. After this treatment all volunteers were requested not to brush their teeth for 24 hours. During this time patients were allowed only to rinse the mouth after eating, nor could they use chewing gum. Dental plaque accumulation was assessed by inspecting the presence of dental plaque using a dental probe. Buccal and lingual surface of each tooth was examined, but on each surface three sites were assessed: lower, central and upper. Quantification of dental plaque accumulation was carried out by means of PFRI – 24h Plaque Formation Rate Index by Axelsson,^{15,16} modified for the needs of this study. Values of PFRI range from 0 to 40.

$$\text{PFRI} = \frac{\text{all surfaces with plaque}}{\text{all examined teeth} \times 6} \times 100\%$$

The status of dental hygiene was determined using Aproximal Plaque Index by Lange, which was obtained by examination of all approximal teeth surfaces. According to the results of API, the patients were divided into three groups on the basis of presence of dental plaque in the approximal area of the teeth. Criteria used for API: 0 – ≤ 24% approximal surfaces with dental plaque, 1 – 25%-74% approximal surfaces with

mutans. MG2 wpływa w większym stopniu na mikroflorę jamy ustnej, ale oba typy mucyn MG1 i MG2 odgrywają istotną rolę w procesie tworzenia kompleksów heterogenicznych z innymi białkami śliny.^{7,10,14}

Materiał i metody

Badanie zostało przeprowadzone w Zakładzie Stomatologii Zachowawczej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej PUM o numerze BN – 001/64/06 z dnia 24.05.2006 r.

W badaniu wzięło udział 47 ochotników, studentów II roku Wydziału Stomatologii. Pacjenci byli ogólnie zdrowi, nie wymagający jakiegokolwiek leczenia. Zostali poinformowani o metodzie badania i wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu. Wiek uczestników badania wyniósł 20-21 lat.

Studenci poddani zostali standardowemu badaniu jamy ustnej przy użyciu zgłębnika i lusterka stomatologicznego w oświetleniu sztucznym. Następnie u pacjentów przeprowadzono profesjonalne oczyszczanie zębów z użyciem pasty „clean polish” i szczoteczki na mikrosilnik. Pacjentów poinformowano o odstąpieniu od zabiegów higienicznych przez 24 godziny. Po spożyciu posiłków pacjenci mogli jedynie wypłukać jamę ustną. Przez ten czas pacjenci poproszeni byli również o niestosowanie gumy do żucia. Akumulację płytki nazębnej po 24 godzinach oceniono za pomocą wskaźnika PFRI. Obecność płytki nazębnej oceniono za pomocą zgłębnika dentystycznego. Zbadane zostały powierzchnie policzkowe i językowe każdego zęba, a na każdej z tych powierzchni jej część górna, środkowa i dolna, czyli przydziąsłowa. Obecność płytki nazębnej po 24 godz. oceniono za pomocą 24-godzinnego wskaźnika PFRI wg Axelssona,^{15,16} zmodyfikowanego na potrzeby niniejszej pracy. Wartości wskaźnika PFRI zawarte były w zakresie 0-40.

$$\text{PFRI} = \frac{\text{suma wszystkich powierzchni z płytką}}{\text{wszystkie zbadane zęby} \times 6} \times 100\%$$

Do oceny stanu higieny jamy ustnej wykorzystano wskaźnik API wg Lange (Aproximal Plaque Index), za pomocą którego oceniono obecność lub

dental plaque, 2 – $\geq 75\%$ approximal surfaces with dental plaque.

The condition of periodontium was determined using modified Sulcus Bleeding Index by Mühlemann and Son (1971) and Gingival Bleeding Index by Ainamo and Bay (1975).¹⁷ Four surfaces of each tooth were examined using WHO 621 dental probe. The following evaluation criteria were used for GBI: 0 – no bleeding, 1 $\leq 15\%$ – bleeding gingival units, 2 $>15\%$ – bleeding gingival units. Due to results obtained after examination with SBI the patients were divided for three groups with following the SBI criteria: 0 $\leq 10\%$ of bleeding units, 1-11 – 50% of bleeding units, 2 – $\geq 51\%$ of bleeding units.

Genetic examination

The material for DNA isolation of the examined group (E) was obtained from the epithelial layer of the mucosa from the inside of the cheek. DNA was essential for the identification of polymorphism of the insertion/deletion type of MUC5B gene and SNP-type polymorphism of the MUC7 gene. The identification of both mucins was performed by means of the PCR-RLFP method. A swab test was carried out using microbiological swabs. The material for the genetic procedure was obtained from students who were not allowed to eat, drink or use chewing gum for 0.5h – 1h before the examination due to thinning of the material that was used for the examination. A swab test was carried out by rubbing the mucosa of the inside of both cheeks “back and forth” ten times. The swabs were then left for 24 hours at room temperature (ca. 20°C) to dry without direct sunlight. After this period, the probes could be stored for about three months. Sherlock AX – a universal kit for DNA isolation from biological tracks (A&A BIOTECHNOLOGY) – was used to isolate the DNA. DNA identification of polymorphism of MUC 7 gene was performed using PCR – RLFP method.

Identification of VNTR polymorphism in the exon 3 of the MUC7 gene

VNTR polymorphism in the MUC7 gene was examined by PCR with a pair of primers (sense

brak płytki nazębnej na powierzchniach stycznych wszystkich zębów. Badaniu zostały poddane wszystkie przestrzenie międzyzębowe. Uzyskane wartości wskaźnika, pozwoliły na podział badanych osób na trzy grupy: 0 – $\leq 24\%$ przestrzeni międzyzębowych z płytką nazębną, 1 – 25-74% przestrzeni międzyzębowych z płytką nazębną, 2 – $\geq 75\%$ przestrzeni międzyzębowych, w obrębie których stwierdzono obecność płytki nazębnej. Stan dziąseł oceniono za pomocą wskaźników: Gingival Bleeding Index (GBI) Mühlemanna i Sona (1971) oraz Sulcus Bleeding Index (SBI) Ainamo i Baya (1975).¹⁷ Wskaźnik GBI oceniono po delikatnym wprowadzeniu zgłębnika WHO 621 pod dziąsło. Przyjęto następujące kryteria oceny: 0 – brak krwawienia, zdrowe przyzębie, 1 – $\leq 15\%$ krwawiących jednostek dziąsłowych, 2 – $> 15\%$ krwawiących jednostek dziąsłowych. Na podstawie danych uzyskanych podczas oceny wskaźnika SBI przyjęto następujące kryteria: 0 – $\leq 10\%$ krwawiących jednostek dziąsłowych, 1 – 11-50% krwawiących jednostek dziąsłowych, 2 – $\geq 51\%$ krwawiących jednostek dziąsłowych.

Badanie genetyczne

Do badania genetycznego został pobrany wymaz z błony śluzowej policzka, z którego wyizolowano DNA. Uzyskany genomowy DNA posłużył do identyfikacji polimorfizmu typu insercja/delecja genu MUC5B i polimorfizmu typu SNP genu MUC7. Identyfikacja genotypów genów obu mucyn została zbadana metodą PCR-RLFP. Wymaz pobrano przy użyciu wymazówek mikrobiologicznych (bez podłoża). Około 0,5-1 godziny przed pobraniem materiału osoba badana nie spożywała posiłków ani napojów, w tym także nie żuła gumy, ze względu na rozcieńczenie materiału, który posłużył do badania. Do badania został wykorzystany nabłonek z wewnętrznej strony policzka. Wymaz pobrano poprzez dziesięciokrotne pocieranie tam i z powrotem wymazówką po błonie śluzowej obydwu policzków. W celu wysuszenia wymazy pozostawiono w temperaturze pokojowej na okres około 24 godzin bez dostępu słońca. Po tym okresie mogły być przechowywane przez okres około 3 miesięcy. Do izolacji DNA ze śladów biolo-

primer: 5'-GTAGCTACATTAGCACCAGTG-3' and antisense primer: 5'-TTCAGAAGTGTGTCAGGTGCAAG-3'), previously described by Kirkbride et al.¹¹ Two common alleles (MUC7*5 and MUC7*6) containing five and six tandem repeats in the VNTR region MUC7 should yield a PCR product of 521 and 590 bp, respectively.

The PCR reaction was carried out in a total volume of 10 µL containing: 20 ng of template DNA, 4 pM of each primer and 1x PCR Master Mix (Fermentas) with *Taq* DNA polymerase. The amplification was performed with initial denaturation at 94°C for 5 min, and then 36 cycles: denaturation at 94°C for 20 seconds, annealing at 64°C for 40s, and an extension at 72°C for 40s. The final 72°C incubation was extended by 8 minutes. The fragments were separated by electrophoresis on 2% agarose gel, stained with ethidium bromide.¹⁸

Statistical analysis

For the estimated indices, the basic statistical parameters were calculated: arithmetic mean, standard deviation and medians. Statistical analysis of variables was performed by means of χ^2 Pearson's and Fisher's test. Spearman's rank correlation and Pearson's correlation was used for evaluation of variables. To compare two separate groups, U Mann-Whitney test was used. Stepwise and multivariate logistic regression was accomplished assessing probability and odds ratio with 95% confidence interval. Statistical significance was inferred if $p \leq 0.05$.

Results

The results of the study are shown in Tables 1-5. After analyzing PFRI values, in this study borderline value was marked at 14. Patients with MUC7*5/*6 genotype were statistically six times more susceptible to dental plaque accumulation when PFRI was over 14 and assessed after 24 h. These results are presented in Table 1.

Table 2 shows the correlation between PFRI values and all hygiene-related indices. It can be observed that there is a significant correlation between PFRI and API. Both groups of patients

gicznych użyto zestawu uniwersalnego Sherlock AX (A&A BIOTECHNOLOGY), VNTR polimorfizm genu MUC 7 został zbadany przy użyciu Polymerase Chain Reaction (PCR).

Identyfikacja polimorfizmu VNTR w eksonie 3 genu MUC7

Polimorfizm VNTR w eksonie 3 genu *MUC7* identyfikowano metodą PCR. Do amplifikacji DNA w PCR stosowano parę oligonukleotydów: 5'-GTAGCTACATTAGCACCAGTG-3', jako starter sensowny i 5'-TTCAGAAGTGTGTCAGGTGCAAG-3', jako starter antysensowny na podstawie opisu Kirkbride i wsp.¹¹ Warianty VNTR genu *MUC7* identyfikowano na podstawie długości amplikonów: 521 pz – allel MUC7*5 posiadający pięć powtórzeń tandemowych, 590 pz – allel MUC7*6 posiadający sześć powtórzeń tandemowych.

Wszystkie amplifikacje wykonywano w objętości 10 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej 20 ng genomowego DNA, 4 pmole startera sensownego i antysensownego, bufor PCR Fermentas i polimerazę *Taq*. W PCR stosowano następujący profil temperaturowo-czasowy: denaturacja wstępna 94°C – 5 min.; II faza (36 cykli), denaturacja: 94°C – 20 sek., hybrydyzacja primerów: 64°C – 40 sek., elongacja: 72°C – 40 sek. oraz III faza: elongacja końcowa 72°C – 8 min. Produkty PCR rozdzielano poprzez elektroforezę w 2% żelu agarozowym wybarwianym bromkiem etydyny.¹⁸

Analiza statystyczna

Dla ocenionych wskaźników obliczono podstawowe parametry statystyczne: średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe i mediany. Uzyskane dane poddano analizie statystycznej za pomocą testów: Chi-kwadrat Pearsona oraz Fishera. Do badania korelacji między zmiennymi zastosowano korelację rang Spearmana i korelację Pearsona. Do porównania dwóch grup niezależnych użyto testu U Manna-Whitney'a. Dalszą analizę statystyczną wykonano, stosując model logistycznej regresji, gdzie podano prawdopodobieństwo i względne ryzyko (odds ratio – OR) wraz z 95% przedziałem ufności. Przyjęto poziom istotności $p \leq 0,05$.

Table 1. Correlation between PFRI, SBI, GBI, API and MUC7 genotype

PFRI	MUC7*5/*6		MUC7*6/*6		Total	p
	n	%	n	%		
<=14	5	50	32	86.49	37	0.02
>14	5	50	5	13.51	10	
Total	10		37		47	
SBI						
0	10	100	36	97.3	46	
1	0	0	1	2.7	1	1.00
Total	10		37		47	
GBI						
0	9	90	25	67.57	34	
1	1	10	12	32.43	13	0.2
Total	10		37		47	
API						
0	0	0	3	8.11	3	
1	6	60	23	62.16	29	0.6
2	4	40	11	29.73	15	
Total	10		37		47	
API01_2						
0	6	60	26	70.27	32	
1	4	40	11	29.73	15	0.7
Total	10		37		47	

API01_2 – patients with API = 0+1 and patients with API=2; API01_2 – pacjenci z API = 0+1 i pacjenci z API = 2.

with PFRI<14 and PFRI> 14 had API values 1 or 2. There was no significant difference between PFRI and SBI, GBI.

Multivariate logistic regression was used to analyze the influence of all three factors: MUC7 gene, GBI and API on PFRI. These data are presented in Table 3. There was statistically important correlation between MUC7 gene, API and PFRI. Patients, who had API=2 had significantly higher values of PFRI. This was confirmed by the “step wise” analysis, which is

Wyniki

Wyniki badań przedstawiono w tabelach 1-5. Na podstawie wyników PFRI, w niniejszej pracy przyjęto wartość graniczną równą 14. Pacjenci z genotypem MUC7*5/*6, u których odnotowano PFRI > 14, byli sześciokrotnie częściej narażeni na akumulację płytki nazębnej ocenianej po 24h. Wyniki przedstawiono w tabeli 1.

W tabeli 2 przedstawiono zależność pomiędzy uzyskaną wartością PFRI a wskaźnikami higieny jamy ustnej. Można zaobserwować istnienie kore-

Table 2. Correlation between PFRI and SBI, GBI, API

SBI	PFRI≤14		PFRI>14		Total	p
	n	%	n	%		
0	36	97.3	10	100	46	1.00
1	1	2.7	0	0	1	
Total	37		10		47	
GBI						
0	28	75.68	6	60	34	
1	9	24.32	4	40	13	0.42
Total	37		10		47	
API						
0	3	8.11	0	0	3	
1	25	67.57	4	40	29	0.03
2	9	24.32	6	60	15	
Total	37		10		47	
API01_2						
0	28	75.68	4	40	32	
1	9	24.32	6	60	15	0.05
Total	37		10		47	

Table 3. Multivariate logistic regression for correlation between all three factors: MUC7 gene, GBI, API and PFRI

PFRI	OR	[95% CI]	p
MUC7	11.56	1.57 – 85.2	0.016
GBI	4.29	0.61 – 30.3	0.145
API01_2	4.59	0.87 – 24.12	0.048

OR – odds ratio, CI – confidence interval.

shown in Table 4. In this case, factors like: MUC7 gene, GBI and API were analyzed separately according to PFRI.

Also results obtained in this study were analyzed using U Mann-Whitney test. These results are shown in Table 5. It can be observed that significantly higher value of GBI was correlated

lacji statystycznie znamiennej pomiędzy wskaźnikami PFRI a API. Obie grupy pacjentów, zarówno z PFRI < 14, jak i PFRI > 14 uzyskali w badaniu wartości wskaźnika API = 1 lub 2. Nie zanotowano istotnej zależności pomiędzy wskaźnikami PFRI a SBI i GBI.

Metoda wielowymiarowej regresji logistycznej,

Table 4. Step-wise analysis for correlation between MUC7 gene, API and PFRI

PFRI	OR	[95% CI]	p	
MUC7	6.78	1.26	36.52	0.026
API01_2	4.95	1.01	24.7	0.05

OR – odds ratio, CI – confidence interval.

Table 5. General analysis of PFRI and SBI, GBI, API

MUC7	n	PFRI		
		\bar{x}	SD	P
*5/*6	10	11.4	5.1	0.98
*6/*6	37	11.35	5.79	
SBI				
0	46	11.41	5.65	0.67
1	1	9	0	
GBI				
0	34	9.82	3.99	0.0015
1	13	15.38	7.22	
API0_12				
0	3		1	0.9
1	44	11.39	5.78	
API01_2				
0	32	10.19	3.8	0.0341
1	15	13.87	7.82	

API0_12 – patients with API=0; patients with API=1+2; API0_12 – pacjenci API = 0; pacjenci API = 1+2.

with PFRI, when the mean value of PFRI was over 15. There was also statistically important correlation between higher API values and PFRI, which confirmed results described above.

Discussion

Dental plaque already comes into existence a few minutes after the teeth cleaning. The first stage

została zastosowana do analizy wpływu wszystkich trzech czynników, tj.: genu MUC 7, GBI i API na PFRI. Wyniki przedstawiono w tabeli 3. Zaobserwowano statystycznie istotną korelację pomiędzy genem MUC 7, API a PFRI. Pacjenci z API=2, uzyskiwali statystycznie częściej wyższe wartości wskaźnika PFRI. Zostało to potwierdzone, przy użyciu metody analizy krokowej, co zo-

is a thin membrane without bacteria, covering surfaces of all teeth composed of glycoproteins from saliva. In this process, salivary mucins take part. Mucins play an important role in the forming of dental pellicle which lubricates the dental surface. Two types of genetically different mucins can be distinguished in the oral cavity. Mucin MG1 – high molecular weight mucin (1000 kDa) and low molecular weight mucin MG2 (200-300 kDa).^{6,7,10,19-21} Salivary mucins are recognized as a major factor in the defence of teeth and oral mucosa against mechanical, chemical and microbial damage.

Dental plaque accumulation is assessed with PFRI – 24h Plaque Formation Rate Index, which was used in this study. In our study, also two genotypes of MUC7 have been marked. It was MUC7*6/*6 and MUC7*5/*6. Polymorphism of the MUC 7 gene is determined by a variable number of tandem units in the central exon. The most often occurring allele of MUC 7 gene is MUC7*6/*6 and MUC7*5/*6.¹¹ *Banderas-Tarabay* proved that polymorphism of all glycoproteins of saliva including mucin MG2 is correlated with the oral health status.²² General description of investigated group showed that among 47 patients, most of them had MUC7 *6/*6 genotype, but only 10 patients had MUC7*5/*6. The prevalence of the MUC7*6/*6 genotype was definitely higher in the study carried out by *Buczkowska-Radlińska et al.*¹⁸ *Kirkbride et al.* reported that of three different genotypes, namely MUC7*5, MUC7*6 and MUC7*8, MUC7 *6 was the most common one.¹¹ These data show that there is slight tendency to higher dental plaque accumulation in patients with MUC7*5/*6. However, the study population with MUC7*5/*6 was too small to confirm this finding. The statistically important correlation between PFRI and MUC7*5/*6 was obtained when the value of PFRI was higher than 14. We can assume that polymorphism of MUC 7 gene somehow influences mucin properties, like their viscosity, which contributes to higher dental plaque accumulation. In fact, both types of mucins are involved in the formation of dental plaque and in the adhesion process of bacterial cells. MG2 mucin has the ability to connect with many microorganism species existing in

stało przedstawione w tabeli 4. Tą metodą analizowano osobno wpływ każdego z czynników, tj.: genu MUC7, GBI i API na PFRI.

Uzyskane wyniki poddano analizie przy użyciu testu U Manna-Whitney'a. Wyniki przedstawiono w tabeli 5. Jak można zauważyć, wyższe wartości wskaźnika GBI statystycznie istotnie korelowały z PFRI, kiedy jego średnia wartość wyniosła ponad 15. Statystycznie istotną zależność zaobserwowano również pomiędzy wyższymi wartościami wskaźnika API a wskaźnikiem PFRI, co potwierdzają przedstawione wyniki.

Dyskusja

Płytką nazębna pojawia się w jamie ustnej już w kilka minut po szczotkowaniu zębów. Pierwszy etap w rozwoju płytki nazębnej stanowi cienka błonka wolna od bakterii, pokrywająca powierzchnie zębów zbudowana z glikoprotein pochodzących ze śliny. W procesie tym biorą udział mucyny, które odgrywają istotną rolę w formowaniu błonki nabytej powlekającej powierzchnie zębów. W obrębie jamy ustnej wyróżnia się dwa zasadnicze typy mucyn: MG1 – wielkocząsteczkową mucynę o masie powyżej 1000 kDa oraz drobnocząsteczkową mucynę MG2 (200-300 kDa).^{6,7,10,19-21} Są one jednym z istotnych czynników, wpływających na zęby i błonę śluzową jamy ustnej, chroniącymi przed mechanicznymi, chemicznymi oraz bakteryjnymi uszkodzeniami.

W niniejszej pracy, akumulację płytki nazębnej oceniono przy użyciu wskaźnika PFRI, który służy do badania nagromadzenia płytki nazębnej po 24 godzinach. W badaniach oznaczono również polimorfizm genu MUC7, występującego w allelach MUC7*6/*6 i MUC7*5/*6. Polimorfizm genu MUC7 determinowany jest zmienną liczbą jednostek tandemowych w centralnym eksonie. Najpopularniejszym allelem tego genu jest właśnie MUC7*6/*6 i MUC7*5/*6.¹¹ W swoich badaniach, *Banderas-Tarabay* dowiódł, iż polimorfizm wszystkich glikoprotein śliny, a szczególnie mucyny MG2 jest skorelowany ze zdrowiem jamy ustnej. W badanej grupie 47 osób, stwierdzono, iż allel MUC7 *6/*6 obecny był częściej, a jedynie 10 osób posiadało allel MUC7*5/*6. Częstsze występowanie allelu MUC7 *6/*6 w swoich ba-

the mouth. It is responsible for agglutination of bacterial species like *Streptococcus sanguins* and *Streptococcus mutans*.^{10,23,24} It is well known that dental plaque formation in time depends on many factors including the total amount of bacteria in the oral cavity and the composition of microflora.^{15,16} Unfortunately, there are not too many studies of PFRI, which necessitates further studies.

The analysis of all hygiene factors together, such as SBI, GBI and API showed that there is no important relationship between them and polymorphism of MUC7 gene. The same results were obtained by *Pol et al.*,²⁵ but on a larger population. Similarly, *Buczowska-Radlińska et al.*¹⁸ examined the connection between another hygiene factor PCR on polymorphism of MUC7 gene and the result was not statistically significant.

In our study, the association between API and PFRI was observed. In patients with high API values (API=2) dental plaque accumulation was increasing, which was statistically confirmed. It is probably connected with worse oral hygiene, where teeth, which have a rough surface, are more susceptible to adhesion of new dental plaque. Consequently, it leads to dental caries and gingivitis, which was confirmed by many authors. The presence of polymorphism of all glycoproteins of saliva is correlated with oral hygiene status and the value of the DMFT index. Individuals with high DMFT index had lower contents of MG1 and MG2 mucins.²² MUC7*6/*6 genotype predisposed to higher value of DMFT.¹⁸ Results of this research showed that the distribution of patients, which was made by *Slomiany et al.*⁸ based on their resistance and susceptibility to caries is correct.

The analysis of correlation between GBI and mean values of PFRI showed that high values of PFRI are significantly related to GBI. These results can confirm a well-known fact that increasing dental plaque accumulation on teeth leads to gingivitis. There are some areas in the oral cavity where dental plaque appears more frequently than in other places. Dental plaque was observed more often in gingival margin area of lingual and buccal surfaces. Plaque accumulation in these regions may lead to high GBI values. In the study of *Thomas Helm* the lingual surfaces in the mandible

daniach uzyskała także *Buczowska-Radlińska i wsp.*¹⁸ *Kirkbride i wsp.*, przedstawił w swoich badaniach występowanie trzech alleli MUC7*5, MUC7*6, MUC7*8, ale MUC7 *6 występował najczęściej.¹¹ Prezentowane badania wykazały, iż istnieje pewna tendencja do zwiększonego odkładania płytki nazębnej u pacjentów z MUC7*5/*6. Niestety, zbyt mała liczebność grupy nie pozwoliła na potwierdzenie tej sugestii. Statystycznie istotną zależność zanotowano pomiędzy MUC7*5/*6 a PFRI, kiedy wartość tego wskaźnika przekroczyła 14. Można zatem przypuszczać, iż istnieje związek pomiędzy polimorfizmem genu MUC7 a jego wpływem na właściwości mucyn śliny, ich lepkość, co może przyczyniać się do zwiększonego odkładania płytki nazębnej. Jak wiadomo, oba typy mucyn biorą udział w powstawaniu płytki nazębnej oraz w procesie adhezji komórek bakteryjnych. Mucyna MG2 posiada właściwości łączenia z wieloma mikroorganizmami obecnymi w jamie ustnej. Jest odpowiedzialna za aglutynację szczepów bakteryjnych *Streptococcus sanguins* i *Streptococcus mutans*.^{10,23,24} Powszechnie znanym jest fakt, iż formowanie płytki nazębnej w czasie zależy od wielu czynników, od całkowitej liczby bakterii obecnych w jamie ustnej, jak i składu mikroflory.^{15,16} Niestety, istnieje zbyt mało doniesień naukowych dotyczących PFRI, co wymusza konieczność dalszych badań.

Analiza wszystkich wskaźników higieny jamy ustnej, takich jak SBI, GBI oraz API wykazała, iż nie stwierdzono istotnego związku pomiędzy nimi a polimorfizmem genu MUC7. Te same wyniki uzyskała *Pol i wsp.*,²⁵ jednakże liczebność grupy była większa. Podobnie, *Buczowska-Radlińska i wsp.*¹⁸ badała zależność innego wskaźnika higieny PCR na polimorfizm genu MUC7 i uzyskane wyniki nie były statystycznie istotne.

W badaniach zaobserwowano także związek pomiędzy API a PFRI. Wyższe wartości wskaźnika API (API=2) predysponowały do zwiększonego odkładania płytki nazębnej, co zostało potwierdzone statystycznie. Prawdopodobnie, wiąże się to z gorszą higieną jamy ustnej i łatwością pojawiania się nowej płytki nazębnej na szorstkiej powierzchni zęba. W konsekwencji prowadzi to do rozwoju choroby próchnicowej i zapalenia dzią-

were also more often covered by plaque. He used PFRI in his study, too but the methodology was different.¹⁶

Conclusions

This study showed that the genetic polymorphism of the MUC7 gene is present in the examined group. The study demonstrated a statistically significant correlation between MUC7 gene and PFRI. Higher API values were related to increased dental plaque accumulation. The study did not confirm any dependence of MUC7 polymorphism and API, SBI and GBI.

seł, co zostało potwierdzone przez wielu autorów. Obecność polimorfizmu wszystkich glikoprotein śliny, ma związek ze stanem higieny jamy ustnej oraz stanem uzębienia wyrażonego liczbą PUW. Pacjenci z wysoką liczbą PUW, posiadali mniejszą zawartość w ślinie mucyn MG1 i MG2.²²

Obecność allelu MUC7*6/*6 predysponowała do wyższych wartości liczby PUW.¹⁸ Wydaje się właściwym podział dokonany przez *Słomiany* i wsp.⁸ na pacjentów odpornych na chorobę próchnicową i wrażliwych na nią.

Analiza zależności pomiędzy GBI a średnimi wartościami PFRI wykazała, iż istnieje statystycznie istotny związek pomiędzy wyższymi wartościami obu wskaźników. Wyniki te, mogą potwierdzać powszechnie wiadomy fakt, iż zwiększone odkładanie płytki nazębnej prowadzi do zapalenia dziąseł. Istnieją w jamie ustnej miejsca szczególnie sprzyjające gromadzeniu płytki nazębnej, takie jak przydziąsłowe obszary powierzchni policzkowych i językowych. Akumulacja płytki nazębnej w tych rejonach naturalnie może sprzyjać wyższym wartościom wskaźnika GBI. W badaniach *Thomasa Helma*, również językowe powierzchnie w zuchwie częściej były pokryte płytką nazębną. Autor również zastosował w swoich badaniach wskaźnik PFRI, lecz metodyka badania była inna.¹⁶

Wnioski

Badania wykazały istnienie polimorfizmu genu MUC 7 u badanej grupy pacjentów. Uzyskano statystycznie istotną zależność pomiędzy genem MUC 7 a wskaźnikiem PFRI. Wyższe wartości API korespondowały z większą szybkością akumulacji płytki nazębnej. Badania nie wykazały zależności pomiędzy polimorfizmem genu MUC 7 a wskaźnikami API, SBI i GBI.

References

1. *Rosan B, Lamont RJ*: Dental plaque formation. *Microbes Infec* 2000; 2: 1599-1607.
2. *Wood SR, Kirkham J, Shore RC, Brookes SJ, Robinson C*: Changes in the structure and density of oral plaque biofilms with increasing plaque age. *FEMS Microbiol Ecol* 2002; 39: 239 -240.
3. *Pretty IA, Edgar WM, Smith PW, Higham SM*: Quantification of dental plaque in the research

- environment. *J Dent* 2005; 33: 193-207.
4. Wong L, Sissions CH: A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Biol* 2001; 46: 477-486.
 5. Anderson LC, Mandel ID: Salivary protein polymorphism in caries-resistant adults. *J Dent Res* 1982; 61: 1167-1168.
 6. Gururaja TL, Levine JH, Tran DT, Naganagowda GA, Ramalingan K, Ramasubbu N et al.: Candidacidal activity prompted by N-terminus histatin-like domain of human salivary mucin (MUC7). *Biochem Biophys Acta* 1999; 1431: 107-1019.
 7. Laskowska A, Ugorki M: Mucyny – budowa, właściwości i rola w progresywnym wzroście nowotworowym. *Współcz Onkol* 1999; 6: 244-248.
 8. Slomiany BL, Piotrowski J, Czajkowski A, Slomiany A: Control of mucin molecular forms expression by salivary protease: Differences with caries. *Int J Biochem* 1993; 25: 681-687.
 9. Slomiany BL, Piotrowski J, Czajkowski A, Shovlin FE, Slomiany A: Differential expression of salivary mucin bacterial aggregating activity with caries status. *Int J Biochem* 1993; 25: 935-940.
 10. Dziemiańczyk D, Marcinkiewicz M, Grabowska SZ, Czyżewska E: Salivary mucins – biochemical composition and their influence on biological functions of saliva in the environment-literature review. *Czas Stomatol* 2000; 53: 715-720.
 11. Kirkbride HJ, Bolscher JG, Nazmi J, Vinall LE, Nash MW, Moss FM et al.: Genetic polymorphism of MUC7: allele frequencies and association with asthma. *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 47-54.
 12. Thomsson KA, Prakobphol A, Leffler H, Reddy MS, Levine MJ, Fisher GJ et al.: The salivary mucin MG1 (MUC5B) carries a repertoire of unique oligosaccharides that is large and diverse. *Glycobiology* 2002; 12: 1-14.
 13. Thornton DJ, Khan N, Mehrotra R, Howard M, Veerman E, Packer NH et al.: Salivary mucin MG1 is comprised almost entirely of different glycosylated forms of the MUC5B gene product. *Glycobiology* 1999; 3: 293-302.
 14. Biesbrock AR, Bobek LA, Levine MJ: MUC7 gene expression and genetic polymorphism. *Glycoconj J* 1997; 4: 415-422.
 15. Heidemann D, editor: *Kariologia, próchnica zębów, leczenie i wypełnienia*. Wrocław: Urban & Partner; 2001.
 16. Helm T: *Der Plaque Formation Rate Index (PFRI)* nach Axelsson. *Phillip J Restaur Zahnmed* 1986; 5: 203-205.
 17. Large DE: Wskaźniki stanu przyzębia. In: Ketterl EW, editor. *Parodontologia*. Wrocław: Urban & Partner; 1995. p. 65-81.
 18. Buczkowska-Radlińska J, Pol J, Szmidi M, Bińczak-Kuleta A: The influence of polymorphism of the MUC7 gene on the teeth and dental hygiene of students at a faculty of dentistry in Poland. *Postępy Hig Med Dośw* 2012; 66: 204-209.
 19. Bobek LA, Tsai H, Biesbrock AR, Levine MJ: Molecular cloning, sequence and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin (MUC7). *J Biol Chem* 1998; 268: 20563-20569.
 20. Mehrotra R, Thorntorn DJ, Sheehan JK: Isolation and physical characterization of the MUC7 (MG2) mucin from saliva: evidence for self-association. *Biochem J* 1998; 334: 415-422.
 21. Piotrowski J, Czajkowski A, Slomiany A, Shovlin FE, Murty VL, Slomiany BL: Expression of salivary mucin bacterial aggregating activity: difference with caries. *Biochem Int* 1992; 28: 1021-1028.
 22. Banderas-Tarabay JA, Zacarias-D'Oleire IG, Garduño-Estrada R, Aceves-Luna E, González-Begné M: Electrophoretic analysis of whole saliva and prevalence of dental caries. A study in Mexican dental students. *Arch Med Res* 2002; 33: 499-505.
 23. Veerman ECJ, Ligtenberg AJM, Schenkels LCPM, Walgreen-Waterings E, Nieuw Amerogen AV: Binding of human high-molecular – weight salivary mucins MG1 to *Haemophilus parainfluenzae*. *J Dent Res* 1995; 74: 351-357.
 24. Murray PA, Prakobphol A, Lee T, Hoover CI, Fisher SJ: Adherence of oral streptococci to salivary glycoproteins. *Infect Immun* 1992; 60: 31-38.
 25. Pol J, Buczkowska-Radlińska J, Binczak-Kuleta A, Trusewicz M: Mucins of saliva – their role and meaning. *Ann Acad Med Stetin* 2007; 53: 87-91.

Address: 70-111 Szczecin, ul. Powst. Wlkp 72

Tel.: +4891 4661648

e-mail: zstzach@pum.edu.pl

Received: 28th August 2014

Accepted: 1st January 2015