

mondo

odontostomatologico

ESTRATTO

86

LAVORO ORIGINALE

**PRODUZIONE DI H₂ e CH₄ COME ESPRESSIONE
DINAMICA DEL METABOLISMO BATTERICO
NELL'ECOSISTEMA ORALE**

E. ZUCCATO - M. ANDREOLETTI - E. MUSSINI - R. CONCA*
- A. FERRARA* - A. PECCHIONI*

Istituto di Ricerche Farmacologiche «Mario Negri» - Milano
*Gruppo Universitario Studi in Odontoiatria

ABSTRACT

The production of H₂ and CH₄ is a dynamic expression of bacteric metabolism in the oral ecosystem. In the oral cavity there is an effective autonomous production of H₂. It was also possible to notice a minimal production of CH₄. The experiment was made on healthy subjects by evaluating the gases in the various experimental conditions in the oral cavity of each subject and by using gascromatography.

key words: H₂, CH₄, oral cavity gascromatography

1. INTRODUZIONE

La produzione di H₂ e CH₄ da parte dei batteri del tratto gastroenterico è stata ampiamente dimostrata, mentre lo stesso fenomeno non è stato mai indagato a livello della cavità orale (2, 4, 6, 7, 12, 13).

Data l'appartenenza del cavo orale allo stesso ecosistema, la produzione di tali gas in loco ha ragione di essere indagata.

2. SCOPO DELLA RICERCA

Scopo del presente lavoro è quello di:

- accertare l'eventuale produzione di H₂ e CH₄ nella cavità orale;
- indagare sull'origine e sul comportamento di H₂ e CH₄ in loco;
- verificare se sussistono variazioni quantitative e correlazioni tra la produzione di tali gas e l'attività metabolica della popolazione bat-

terica in relazione alla disponibilità di substrato (stage 1);

- verificare le concentrazioni di H₂ e CH₄ in relazione alla somministrazione di substrati fermentabili esogeni di tipo diverso (idrati di carbonio) (stage 2).

3. METODI DI RICERCA

3.1. Stage 1

20 adulti di ambo i sessi, di età compresa tra i 20 e i 35 anni, sono stati selezionati dopo il controllo delle loro condizioni di salute orale.

I requisiti dei soggetti da esaminare dovevano essere:

- assenza di patologia cariosa in atto;
- assenza di lesioni parodontali;
- assenza di lesioni pulpari attive (necrosi, fistole);
- assenza di patologia delle cavità nasali e paranasali;
- assenza di manufatti protesici.

a) Prova campione. Ai soggetti scelti con le suddette caratteristiche veniva somministrato un pasto standard privo di amidi e idrati di carbonio. I volontari eseguivano un'igiene orale spontanea. Dopo 2 ore si effettuava la prima campionatura in apnea di aria presente nel cavo orale. Si rilevava inoltre il pH orale per mezzo di cartine tornasole di precisione, onde accertare una omogeneità dell'ambiente acido-basico nei vari soggetti.

b) Ripetizione prova campione. A distanza di 24 ore veniva ripetuta una seconda campionatura nelle stesse condizioni sperimentali.

c) Il gruppo veniva invitato ad astenersi da ogni pratica di igiene orale per 24 ore. Veniva inoltre fissata una dieta standard da osservare in tale intervallo di tempo. Al termine di tale periodo, si eseguiva una terza campionatura nelle stesse condizioni sperimentali.

d) Tutti i soggetti venivano sottoposti ad igiene orale professionale (scaling, root-planing) e immediatamente dopo si eseguiva una quarta ed ultima campionatura.

I campioni venivano raccolti come segue. Si invitava il soggetto a compiere due atti respiratori a bocca aperta, in modo da allontanare l'aria residua stagnante nel cavo orale poiché poteva contenere quantità di H₂ e CH₄ provenienti dallo scambio lume intestinale-sangue-aria polmonare (3,8).

Eseguiti gli atti respiratori, nel soggetto sottoposto ad esame:

- si posizionava nella bocca un boccaglio con due tubi: uno di entrata ed uno di uscita;
- veniva eseguito un lavaggio del cavo orale con N₂ purissimo, per analisi gascromatografica. Al termine di questo lavaggio, il soggetto era invitato ad entrare in apnea per 30". La tecnica di prelievo in apnea garantiva di escludere una eventuale contaminazione dell'azoto orale da parte dell'aria polmonare;
- durante questo periodo si applicava al tubo di uscita un reservoir da 20 cc a tenuta gas;
- si introducevano nel cavo orale al termine dei 30" di apnea 100 cc. di N₂, volume superiore al volume medio di aria del cavo orale, che garantiva il riempimento del reservoir con i gas che si volevano analizzare.

I campioni così prelevati venivano sottoposti ad analisi gascromatografica (D.A.N.I.).

Per confermare la validità di questo metodo di prelievo, la presenza di tali gas era indagata anche su campioni di aria polmonare prelevati durante la normale espirazione (*breath test*) (10, 17, 18).

La presenza e l'estensione della placca batterica erano misurate col metodo colorimetrico. I depositi duri vengono quantificati con l'indice di *Green* (19) e i depositi molli con valori da 0 a 4. La placca accumulata sulle superfici dentarie e sui tessuti molli circostanti veniva classificata nel suo insieme attribuendo un valore medio comune.

3.2. Stage 2

Prima di eseguire la seconda parte della sperimentazione, si rendevano necessarie una serie di prove preliminari.

3.2.1. 1° Prova preliminare. - Per valutare se la somministrazione di un substrato esterno modificasse o meno la produzione di H₂ e CH₄, agli stessi soggetti dello Stage 1, con la stessa tecnica di prelievo ed in condizioni sperimentali identiche alla prova campione dello Stage 1, si faceva compiere un risciacquo della bocca per 30'' con 50 ml di soluzione acquosa al 10% di saccarosio a 37°. Il contenuto di H₂ e CH₄ nell'aria del cavo orale veniva analizzato, sempre con metodo gascromatografico, a distanza di 5' dal risciacquo (tab. I).

Tabella I - Concentrazione orale di H₂ prima e 5 minuti dopo risciacquo con una soluzione acquosa di saccarosio (50 ml al 10%).

	Valori in condizione di base (parti 10 ⁶ ± S.E.M.)	5' dopo risciacquo con soluzione acquosa di saccarosio al 10% (parti 10 ⁶ + S.E.M.)
Concentrazione H ₂	6.41 ± 0.92	52.66 ± 6.21

p < 0.001 (da Student's test)

3.2.2. 2° Prova preliminare - Per stabilire l'eventuale incremento di produzione di H₂ e CH₄, ma soprattutto per identificare il momento di massima produzione del gas, su quattro soggetti, con le stesse caratteristiche di quelle precedenti e sempre con gli stessi metodi e tecniche, furono prelevati campioni dopo che avevano sciacquato la bocca per 30'' con due diverse soluzioni al 10%, una di saccarosio ed un'altra di sorbitolo, prelevando i campioni stessi prima e dopo il risciacquo a vari intervalli di tempo, da 2' a 120' (grafico 1, 2).

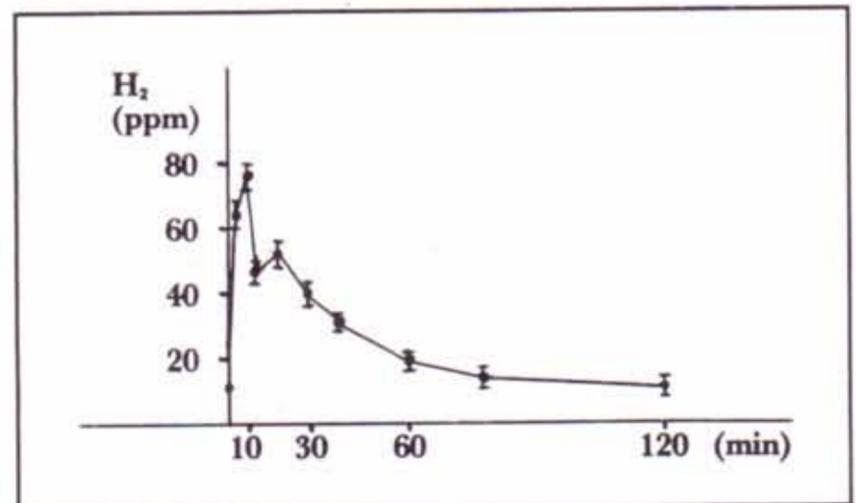


Grafico 1 - Concentrazione di H₂ inf.f.m. su soggetti in apnea per 30'' controllati prima e dopo (da 2' a 120') il risciacquo della bocca con soluzione al 10% di saccarosio.

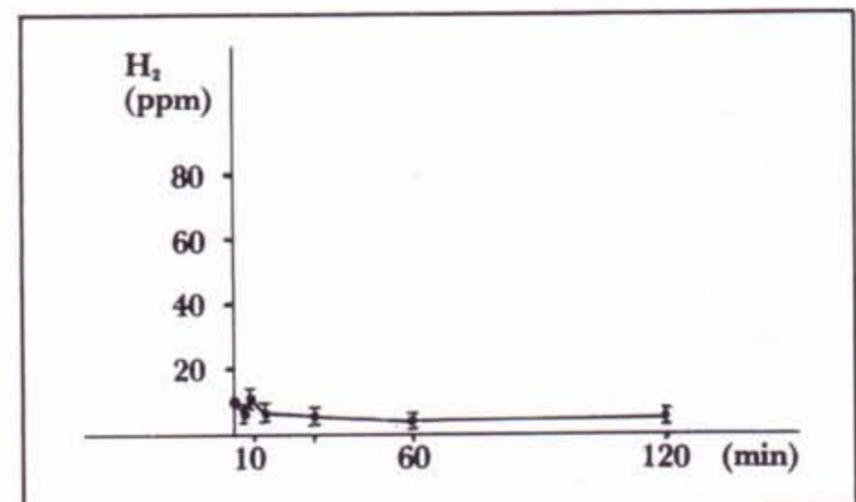


Grafico 2 - Concentrazione di H₂ in p.p.m. su soggetti in apnea per 30'' controllati prima e dopo (da 20' a 120') il risciacquo della bocca con soluzione al 10% di sorbitolo. (Nessuna apprezzabile modifica del contenuto di H₂).

3.2.3. Per stabilire la diluizione ottimale, agli stessi quattro soggetti in tempi diversi e sempre con le medesime condizioni sperimentali, vennero fatti eseguire risciacqui per 30'' con soluzioni contenenti quantità diverse di saccarosio (2, 5, 10 gr. in 50 ml di H₂O), le variazioni di quantità di gas prodotto vennero ricercate a distanza di 5' dal risciacquo (grafico 3).

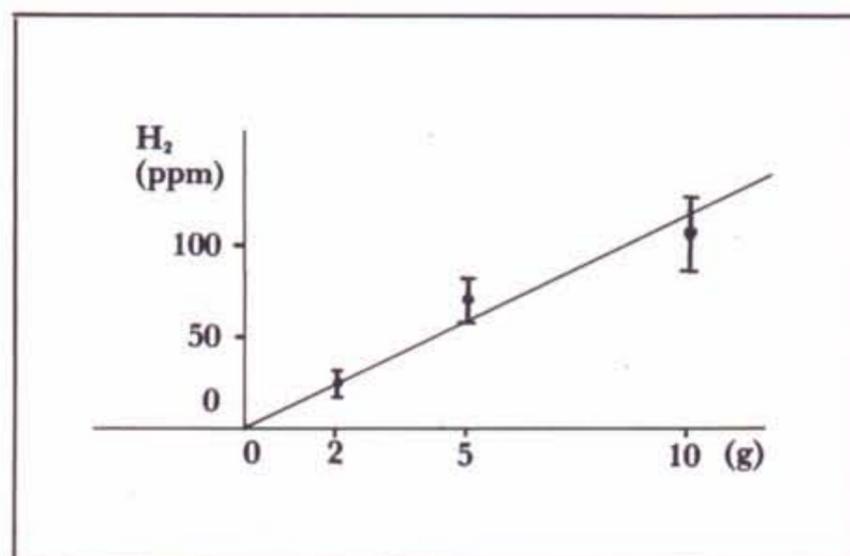


Grafico 3 - Progressivo aumento della concentrazione di H₂ orale, nei medesimi soggetti e nelle stesse condizioni sperimentali dopo il risciacquo con una soluzione di saccarosio di 2.5, 10 gr in 50 ml di H₂O.

3.2.4. Sperimentazione finale - Dopo questi studi preliminari, per la sperimentazione finale dello Stage 2 furono scelti 30 soggetti sani con i medesimi criteri e con le stesse condizioni sperimentali definiti per lo Stage 1.

Vennero fatti eseguire risciacqui con soluzioni diverse al 10% di vari substrati potenzialmente trasformabili dalla flora batterica orale per studiare se essi influenzavano in modo diverso la produzione di H₂ e CH₄. La produzione di H₂ e CH₄ fu misurata in un primo tempo in

condizioni di base e poi a distanza di 5' da un risciacquo eseguito per 30'' con una soluzione di 5 gr. in 50 ml di H₂O a 37° con differenti substrati (saccarosio, glucosio xylitolo, sorbitolo, mannitolo, glicerolo e 20 mg di saccarina equivalenti a 5 gr di saccarosio) (1, 11, 15, 16).

Gli esperimenti vennero effettuati in 8 giorni e la concentrazione di H₂ e CH₄ nei 30 soggetti venne nuovamente misurata 2 settimane più tardi per controllo.

4. RISULTATI

I risultati della presente ricerca sono esposti nelle tabelle che seguono (tabb. II e III).

La prima colonna mostra il valore medio \pm S.E.M. della intensità della placca batterica orale nei primi 20 soggetti e la seconda e la terza colonna la media della concentrazione di H₂ e CH₄ prelevati con tecnica in apnea dal cavo orale, espresse in parti per milione. Nella quarta e quinta colonna è riportata la media \pm S.E.M. dell'H₂ e CH₄ respiratori rilevata mediante breath test, calcolata col metodo di Zuccato e Mussini (18). Le concentrazioni di H₂ risultano significativamente più alte dopo 24 ore senza igiene orale, se comparate

Tabella II - Intensità della placca orale, concentrazioni di H₂ e CH₄ orali, emissione di H₂ e CH₄ respiratori: a) in condizioni di controllo, b) dopo 24 ore di sospensione dell'igiene orale, c) dopo che l'igiene orale è stata ristabilita.

	Intensità placca score medio \pm S.E.M.	H ₂ orale p.p.m. \pm S.E.M.	CH ₄ orale p.p.m. \pm S.E.M.	H ₂ resp. p.p.m. \pm S.E.M.	CH ₄ resp. p.p.m. \pm S.E.M.
Controllo N° 1	4.40 \pm 0.10	1.09 \pm 0.26	0.150.003	5.0 \pm 0.8	8.9 \pm 2.1
Controllo N° 2	1.45 \pm 0.14	1.23 \pm 0.21	0.13 \pm 0.01		
Dopo 24h senza igiene	2.15 \pm 0.10	2.61 \pm 0.54	0.22 \pm 0.04	5.1 \pm 0.6	9.1 \pm 1.7
Dopo igiene	1.00 \pm 0.15	1.07 \pm 0.19	0.16 \pm 0.04		

p<0.001 versus controlli e dopo igiene (test di Duncan).

con quelle esaminate dopo il ritorno all'igiene orale ($p < 0,001$ test di *Duncan*); ovviamente anche l'estensione della placca aumenta significativamente dopo la sospensione dell'igiene orale ($p < 0,001$ test di *Duncan*).

Una interrelazione statistica può essere osservata tra l'H₂ di produzione orale e l'estensione della placca batterica ($p = 0,83$, $p < 0,001$). La concentrazione di CH₄ non subisce invece mutamenti con la sospensione dell'igiene orale ed il conseguente incremento della placca batterica, né viceversa con il ritorno all'igiene orale e con la scomparsa della placca batterica. Dato che fino a questo punto dell'esperimento non era stato somministrato alcun substrato esogeno, si poteva ritenere che l'H₂ del cavo orale fosse il risultato del metabolismo dei batteri sulle sostanze endogene come i polisaccaridi della placca e delle glicoproteine salivari.

Per quanto riguarda invece la verifica delle concentrazioni di H₂ e CH₄ in relazione alla somministrazione di substrati fermentabili esogeni (idrati di carbonio), è interessante osservare la tabella III.

Come si può facilmente osservare, risulta una differenza significativa tra la concentrazione di H₂ orale prima e dopo lo sciacquo con

soluzioni di saccarosio e glucosio, mentre solo una marginale diversità di concentrazione dopo lo sciacquo con soluzione di sorbitolo e mannitolo, e nessuna differenza dopo xylitolo, glicerolo e saccarina.

In tutti gli esperimenti descritti, la concentrazione di CH₄ non è variata, rimanendo stabile intorno ai valori di 2-4 p.p.m.

A differenza del saccarosio e del glucosio, che aumentano di circa 10 volte il valore basale dell'H₂ orale, il sorbitolo, il mannitolo e lo xylitolo inducono solo un minimo cambiamento nei livelli di H₂ basale dalla cavità orale.

È interessante notare come i nostri dati corrispondono alle osservazioni cliniche e di laboratorio che dimostrano che sorbitolo, mannitolo e xylitolo non sono idrati di carbonio cariogeni e che lo xylitolo non viene metabolizzato dalla flora batterica orale.

Il sorbitolo invece in vitro è metabolizzato dai microorganismi orali, ma molto lentamente durante la prima ora, in vivo quindi non è un buon substrato per i batteri orali, poiché viene eliminato dal flusso salivare prima della sua utilizzazione. Osservazioni cliniche e di laboratorio sul mannitolo sono simili a quelle sul sorbitolo.

È stata ricercata la produzione di H₂ dopo l'uso di glicerolo e saccarina. Ambedue non hanno dimostrato di non influenzare il fenomeno; le quantità di saccarina usata furono minime e non si può quindi avere la certezza che l'assenza di effetto sull'H₂ orale sia in realtà dovuta ad una assenza di catabolizzazione da parte dei batteri orali.

Tabella III - Media \pm S.E.M. della concentrazione di H₂ orale (p.p.m.) in 30 soggetti in condizione di base e 5' dopo risciacquo con 5 gr di differenti substrati e 20 mg di saccarina in 50 ml di acqua. (I valori di p sono calcolati secondo Student's test).

Substrato	H ₂ orale (p.p.m.) prima risciacquo	H ₂ orale (p.p.m.) dopo risciacquo	«p» (t test)
Saccarosio	6.34 \pm 8.46	50.56 \pm 5.08	<0.001
Glucosio	6.45 \pm 0.58	45.41 \pm 4.66	<0.001
Sorbitolo	5.97 \pm 0.55	8.95 \pm 1.02	=0.05
Mannitolo	7.08 \pm 0.64	10.35 \pm 1.43	>0.05 (=0.08)
Xilitolo	6.79 \pm 0.61	7.09 \pm 0.70	>0.05
Glicerolo	6.24 \pm 0.85	7.44 \pm 0.95	>0.05
Saccarina	6.05 \pm 0.59	5.28 \pm 0.54	>0.05

5. CONCLUSIONI

I risultati sembrano dimostrare che nel cavo orale vi è una effettiva produzione di H₂.

È stato possibile rilevare solo una minima presenza di CH₄ per lo meno nelle nostre condizioni sperimentali. I tempi disponibili per

un'eventuale sintesi di CH_4 potrebbero essere stati insufficienti.

Sembra dimostrata invece l'esistenza di una correlazione tra la produzione di H_2 e l'attività metabolica della flora batterica e della sua disponibilità di substrato (placca batterica).

È inoltre dimostrato che l'assunzione di substrati esogeni, quali alcuni idrati di carbonio, determinano un notevole aumento della produzione di H_2 , mentre non variano quello di CH_4 .

Gli idrati di carbonio che maggiormente influenzano il fenomeno sono glucosio e saccarosio, fattori notoriamente cariogeni, mentre xylitolo, sorbitolo e mannitolo non danno variazioni statisticamente significative. La misurazione di H_2 orale dopo ingestione di carboidrati può essere un indice valido del metabolismo fermentativo dei carboidrati da parte dei batteri orali. Potrebbe essere interessante l'ipotesi di usare l' H_2 come indicatore di cariogenicità.

RIASSUNTO

È stato possibile rilevare un'autonoma produzione di H_2 nella cavità orale ed anche una minima produzione di CH_4 . La concentrazione di H_2 prodotto nel cavo orale è proporzionale alla contaminazione batterica (sospensione delle pratiche di igiene orale).

Quando viene somministrata una sostanza esogena fermentabile (glucosio, saccarosio), la quantità di H_2 aumenta sensibilmente; la somministrazione di altri substrati non fermentabili (xylitolo) o difficilmente fermentabili (sorbitolo e mannitolo) determina invece una variazione di H_2 statisticamente non significativa. La concentrazione di CH_4 , che nelle nostre condizioni sperimentali risulta essere di circa 1/10 di quelle di H_2 , non è modificabile da quelle che influenzano invece la produzione di H_2 .

BIBLIOGRAFIA

1. AYRES C.: Dental caries and sugar substitutes. Dent. Hyg. 54, 170-177, 1980.
2. BOND J.R., LEVITT M.D.: Fate of soluble carbohydrate in the colon of rats and man. J.Clin. Invest. 57, 1158-1164, 1976.
3. BOND J.H. Jr., LEVITT M.D.: Use of Pulmonary hydrogen (H_2) measurements to quantitative carbohydrate absorption. J. Clin. Invest. 51, 1219-25, 1972.
4. BOND J.H. Jr., LEVITT M.D.: Investigation of small bowel transit time in man utilizing pulmonary hydrogen (H_2) measurements. J. Lab. Clin. Med., 85 (4), 546-555, 1975.
5. GALLAGHER I.H., PEARCE E.I.F.: The sugar alcohols. Non-cariogenic sweeteners. New Zealand Dent. J. 73, 200-206, 1977.
6. LEVITT M.D., INGELFINGER F.J.: Hydrogen and methane production in man. Ann. N.Y. Acad. Sci. 150, 75-81, 1968.
7. LEVITT M.D.: Production and excretion of hydrogen gas in man. New Eng. J. Med., 281 (3), 122-127, 1969.
8. LEVITT M.D., DONALDSON R.M.: Use of respiratory excretion to detect carbohydrate malabsorption. J. Lab. Clin. Med., 75 (6), 937-45, 1970.
9. MCKAY L.F., HOLBROOK W.P., EASTWOOD M.A.: Methane and hydrogen production by human intestinal anaerobe bacteria. Acta Pathol. Microbiol. Immun. B 90 (3), 257-260, 1982.
10. METZ G., GASSUL M.A., DRASAR B.S., JENKINS D.J.A., BLENDIS L.M.: Breath-hydrogen test for small-intestinal bacterial colonization. Lancet (1), 668-69, 1976.
11. MUHLEMANN H.R., DE BOEVER J.: Radiotelemetry of the pH of interdental areas exposed to various carbohydrates. In McHugh, W.D. (Editor). Dental plaque. Edimburg Livingstone, pag. 179-186, 1970.
12. PERMAN J.A., MODLER S., OLSON A.C.: Role of ph in production of hydrogen from carbohydrates by colonic bacterial flora. J. Clin. Invest., 67, 643-650, 1981.
13. PERMAN J.A., MODLER S.: Glycoproteins as substrates for production of hydrogen and methane by colonic bacterial flora. Gastroenterology, 83 (2), 388-393, 1982.
14. SAHOTA S.S., BRAMLEY P.M., MENZIES I.S.: The fermentation of lactulose by colonic bacteria. J. Gen. Microbiology 128, 319-325, 1982.
15. SAUNDRES D.R., WIGGINS H.S.: Conservation of mannitol, lactulose and raffinose by the human colon. Am. J. Physiol. 241 (5), G 397-402, 1981.
16. SCHEININ A., MAKINEN K.K., YLITALO K.: Turku sugar studies v. Final report on the effect of sucrose, fructose and xylitol diets on the caries incidence in man. Acta Odont. Scand. 34, 179-216, 1976.
17. SCIARRETTA G.: Diagnosis of blind-loop syndrome by X-ray/breath hydrogen test. Lancet 1, 310-311, 1977.
18. ZUCCATO E., ANDREOLETTI M., BOZZANI A., MARCUCCI F., VELIO P., BIANCHI P., MUSSINI E.: Respiratory excretion of hydrogen and methane in Italian subjects after ingestion of lactose and milk. Eur. J. Clin. Invest., 13, 261-266, 1983.
19. GREENE J.C.: The Oral Hygiene Index: a method for Vermillon J.B. classifying oral hygiene status. J. Am. Dent. Assoc., 61, 172, 1960.