

Ocena bakteryjnych procesów fermentacyjnych zachodzących w jelicie grubym dzieci z wybranymi schorzeniami przewodu pokarmowego

An assessment of large bowel bacterial fermentation processes in children bowel diseases

Piotr Landowski, Barbara Kamińska, Małgorzata Szumera, Jacek Brodzicki, Wojciech Radys, Maria Korzon

Klinika Pediatrii, Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej, Akademia Medyczna, Gdańsk

Przegląd Gastroenterologiczny 2007; 2 (1): 38–41

Słowa kluczowe: mikroflora jelitowa, zużywanie wodoru, wodorowy test oddechowy, bakterie redukujące siarczany, metan.

Key words: human colon microflora, hydrogen consumption, hydrogen breath test, sulphate-reducing bacteria, methane.

Adres do korespondencji: dr n. med. Piotr Landowski, Klinika Pediatrii, Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej Akademii Medycznej w Gdańsku, ul. Nowe Ogrody 1/6, 80-803 Gdańsk, tel./faks +48 58 302 25 91, e-mail: pland@amg.gda.pl

Streszczenie

Poznaniem składu mikroflory jelitowej i jej metabolizmu zajmuje się wielu badaczy na świecie. Coraz powszechniejsze jest przekonanie, że bakterie występujące w świetle jelita mają udział w etiopatogenezie chorób zapalnych i nowotworowych przewodu pokarmowego.

Cel pracy: Ocena bakteryjnych procesów fermentacyjnych dominujących u dzieci obserwowanych z powodu podejrzenia zespołu jelita drażliwego – ZJD (IBS – *irritable bowel syndrome*), nieswoistych zapaleń jelit – NZJ (IBD – *inflammatory bowel disease*) i zaparcie stolca.

Materiał i metody: Badaniom poddano 40 dzieci hospitalizowanych z podanych wyżej powodów. Za pomocą wodorowego testu oddechowego – WTO (HBT – *hydrogen breath test*) sprawdzano, czy w wydychanym z płuc powietrzu znajduje się wodór i metan. Określano dominujący proces utylizacji wolnego wodoru oraz czas pasażu jelitowego.

Wyniki: Stwierdzono, że wydłużenie czasu pasażu jelitowego sprzyja rozwojowi bakterii syntetyzujących metan, co obserwowano u większości dzieci z IBS i zaparciem stolca. Metanogeneza jelitowa narasta wraz z wiekiem i nie zależy od płci. U dzieci z nieswoistym zapaleniem jelit i postacią biegunkową zespołu jelita drażliwego początkowo wzrastało stężenie wodoru, a następnie się normalizowało, przy prawie całkowitym braku metanogenezy. Jednak u tych pacjentów po WTO nasilały się objawy kliniczne choroby, co można wiązać z rozwojem bakterii redukujących siarczany (SRB – *sulphate-reducing bacteria*), które mają największe powinowactwo do wodoru. Siarkowodór, będący końcowym produktem ich metabolizmu, odpowiada za wystąpienie biegunki i prawdopodobnie wpływa na przebieg kliniczny nieswoistych zapaleń jelit. Wyniki przemawiają za koniecznością dalszych badań nad mikroflorą jelitową, czemu może służyć nieinwazyjny, wodorowy test oddechowy.

Abstract

An intestinal microflora and its metabolism is the object of interest in number of investigations worldwide. Microflora presents in bowels is suspected to have a role in ethio-pathogenesis of inflammatory and neoplasm bowel diseases. The assessment of bacterial fermentation processes in 40 children with inflammatory bowel syndrome (IBS), irritable bowel disease (IBD) and constipation (C) was introduced in paper. The hydrogen breath test (HBT) was used to assess the presence of hydrogen and methane in expired air. The utilisation process of free hydrogen and time of intestinal passage were determined. The prolongation of intestinal passage enhances a development of methane synthesising microflora what was observed in most of the patients with IBD and C. Methanogenesis increases with age independent to gender. In IBD and IBS with predominating diarrhoea patients the increase of hydrogen was observed in the beginning, then its normalisation occurred with no methanogenesis at all. However the HBT enhanced the clinical symptoms of the disease what can be combined with the development of sulphate-reducing bacteria (SRB). They have affinity to hydrogen, and hydrogen sulphide, the end product of their metabolism is responsible for the occurrence and clinical course of IBD. The obtained results suggests that further research on bowel microflora should be continued.

Wstęp

Mikroflorze jelitowej poświęca się coraz więcej badań zarówno eksperymentalnych, jak i klinicznych [1–3]. Obecność w świetle przewodu pokarmowego tak licznej populacji drobnoustrojów o potencjalnym działaniu chorobotwórczym jest wiązana z występowaniem wielu schorzeń układu trawiennego. Procesy fermentacyjne zachodzące w świetle jelita mogą stanowić pierwotny czynnik patogenetyczny lub być konsekwencją innego schorzenia, zwłaszcza zaburzeń motoryki przewodu pokarmowego [4–6]. Najwięcej doniesień w literaturze dotyczy badań nad składem i metabolizmem bakteryjnej flory jelitowej u chorych na nieswoiste zapalenia jelit, zespół jelita drażliwego oraz raka okrężnicy [7–9]. Dynamika fermentacji bakteryjnej zachodzącej w świetle okrężnicy zależy od składu mikroflory jelitowej, ilości i składu resztek pokarmowych oraz czasu pasażu jelitowego. Wszelkie zaburzenia trawienia i wchłaniania prowadzą do nasilenia przemian bakteryjnych, a ich rodzaj zależy od rodzaju bakterii dominujących w okrężnicy [10, 11]. Produktem wspomnianych procesów fermentacyjnych jest wolny wodór. Około 20% tego gazu wydalane jest z wraz z wydychanym powietrzem z płuc i drogą naturalną. Reszta podlega kolejnym przemianom i jest wykorzystywana głównie przez trzy rodzaje bakterii: acetogenne, metanogenne i redukujące siarczan [12, 13]. Przypuszcza się, że te dwa ostatnie rodzaje mają swój udział w etiopatogenezie niektórych schorzeń przewodu pokarmowego. Bakterie redukujące siarkę (SRB – *sulphate-reducing bacteria*) należą do grupy *Desulfovibrio* i wykorzystują siarczany jako akceptory elektronowe w procesie oddychania, w efekcie syntetyzując toksyczny siarkowodór [14]. Dotychczas niewielu badaczom udało się stwierdzić podwyższone stężenie tego gazu u chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego (UC – *ulcertive colitis*) [15]. Produkcja metanu jest natomiast procesem dominującym, wykorzystującym ok. 75% wodoru i pozwala na pięciokrotną redukcję jego objętości. Metan stwierdza się w wydychanym powietrzu u 50% zdrowych dorosłych, których określa się mianem wydzielaczy metanu lub metanododatnich. Obecność metanu jest wiązana z występowaniem raka odbytnicy u dorosłych. Wśród najczęściej izolowanych gatunków bakterii wytwarzających ten gaz wymienia się *Methanobacterium* i *Methanobrevibacter* [16]. Do analizy procesów fermentacyjnych zachodzących w jelicie grubym wykorzystuje się wodorowy test oddechowy (WTO). Jest to badanie proste i łatwe do wykonania, nieobciążające chorego, a przede wszystkim nieinwazyjne. Między innymi dlatego technika ta znalazła powszechne zastosowanie w diagnostyce schorzeń przewodu pokarmowego u dzieci [17, 18].

Cel pracy

Celem pracy była ocena bakteryjnych procesów fermentacyjnych zachodzących w jelicie grubym u dzieci z wybranymi, przewlekłymi schorzeniami przewodu pokarmowego i porównanie tych chorych z grupą kontrolną.

Materiał i metody

W badaniach uczestniczyło 40 dzieci hospitalizowanych w 2006 r. w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej AM w Gdańsku z powodu przewlekłych bólów brzucha, z podejrzeniem zespołu jelita drażliwego, manifestującego się zaparciami lub biegunką i z powodu brudzenia bielizny. Grupę kontrolną stanowiło 20 dzieci hospitalizowanych z innych powodów niż schorzenia przewodu pokarmowego. Na udział w badaniu uzyskano zgodę pacjentów i ich opiekunów. W badanej grupie było 26 chłopców i 34 dziewczęta w wieku od 5,2 do 17,1 lat (średnia wieku 10,1; mediana 10,2). Wszystkich poddano badaniu podmiotowemu, które poszerzono o wypełnienie formularza dotyczącego ewentualnego występowania objawów ze strony przewodu pokarmowego i nawyków żywieniowych, ze szczególnym uwzględnieniem spożycia mleka i jego przetworów. Następnie wszystkim dzieciom wykonano wodorowy test oddechowy po doustnym obciążeniu laktozą. Do testu użyto laktozy (1,75 g/kg masy ciała, maksymalnie 50 g) rozpuszczonej w 250 ml wody. Próbkę powietrza pobierano na czczo, a następnie trzykrotnie w odstępach godzinnych, licząc od momentu wypicia roztworu. Analizę powietrza wydechowego przeprowadzono za pomocą aparatu MicroLyzer SC firmy QuinTron z USA. Specjalny system gwarantował eliminację gazów zawartych w tzw. przestrzeni martwej dróg oddechowych. Za patologiczny wynik testu przyjęto taki, w którym obserwowano przyrost minimum 20 cząsteczek wodoru na milion cząsteczek powietrza (PPM) między maksymalnym odczytem a wartością na czczo. Ponadto sprawdzano, czy w powietrzu znajduje się metan. Za wynik patologiczny testu przyjęto, zgodnie z zaleceniami producenta urządzenia, wykrycie metanu we wszystkich próbkach. Następnie grupie badanych wykonywano wodorowy test oddechowy, po doustnym podaniu 15 ml laktulozy, w celu określenia czasu pasażu jelitowego. Powietrze pobierano na czczo, po 30 minutach i następnie dziesięciokrotnie w 15-minutowych odstępach. Czas pasażu jelitowego ustalano, oceniając minimalny przyrost wodoru lub metanu o 3 PPM w trzech kolejnych próbkach. Interpretację wyników wodorowego testu oddechowego porównywano z oceną kliniczną chorych w ciągu doby po wykonaniu badania. Wszystkich pytano, czy wystąpiły u nich jakiegokolwiek objawy kliniczne nietolerancji laktozy lub laktulozy użytej do testu (ból

Tabela I. Zestawienie wyników w grupach badanej i kontrolnej**Table I.** Results concerning studied and control groups

Jednostka chorobowa		Zaparcia stolca (n=20)		IBS (n=10)		NZJ (n=10)		Grupa kontrolna (n=20)	
płeć		M (n=8)	K (n=12)	M (n=3)	K (n=7)	M (n=4)	K (n=6)	M (n=8)	K (n=12)
WTO	P	7	8	2	3	1	2	7	11
	NP	1	4	1	4	3	4	1	1
czas pasażu jelitowego	P	1	2	0	2	4	6	8	11
	NP	7	10	3	5	0	0	0	1
metanogeneza	O	8	11	2	6	0	1	2	3
	NO	0	1	1	1	4	5	6	9
objawy kliniczne	O	0	1	1	2	4	5	0	0
	NO	7	11	2	5	0	1	8	12

M – mężczyźni, K – kobiety, P – prawidłowy, NP – nieprawidłowy, O – obecne, NO – nieobecne.

brzucha, gazy, biegunka). Wszystkim dzieciom dwukrotnie wykonano ogólne badanie kału (przed i po WTO), ze szczególnym uwzględnieniem jego pH i obecności ciał redukujących. Z badania wykluczono dzieci poddawane antybiotykoterapii w ostatnich 6 tygodniach poprzedzających hospitalizację. Analizę statystyczną wyników dokonano z wykorzystaniem programu *Statistica*. Analiza wariancji ANOVA posłużyła do oceny porównawczej, a za wynik istotny uznano wartość $p < 0,05$.

Wyniki

Analizą objęto 40 dzieci chorych i 20 dzieci z grupy kontrolnej. Na podstawie danych z wywiadu, badania przedmiotowego i wyników badań dodatkowych postawiono ostateczne rozpoznania. W 20 wypadkach rozpoznano zaparcia stolca o charakterze nawykowym, w 10 zespół jelita drażliwego i w pozostałych 10 nieswoiste zapalenie jelit o umiarkowanym stopniu aktywności. Zbiórce zestawienie danych przedstawiono w tabeli I.

Ze względu na niewielką liczbę uczestniczących w badaniu porównywano zbiorczo całą grupę badaną z grupą kontrolną. Analiza statystyczna danych dzieci z zaparciami stolca wykazała znamiennej istotnie zależność między wydłużeniem czasu pasażu jelitowego a obecnością metanogenezy. Towarzyszyła ona również wydłużonemu czasowi pasażu jelitowego w grupie dzieci z zespołem jelita drażliwego z przewagą zaparć, ale bez statystycznej znamienności. Tylko u jednego badanego z grupy z rozpoznaniem nieswoistym zapaleniem jelit stwierdzono metanogenezę. Natomiast w tej grupie chorych stwierdzano statystycznie istotnie zależność między nieprawidłowym wynikiem wodorowego testu oddechowego a wystąpieniem objawów klinicznych po jego wykonaniu. W grupie kontrolnej występowanie metanogenezy stwierdzono u 5 (25%) chorych, a wykonaniu wodorowego testu oddechowego nie towarzyszyły żadne objawy niepożądane.

Omówienie

Jelito grube skolonizowane jest przez wiele szczepów bakterii. Rutynowe badanie mikrobiologiczne pozwala na identyfikację zaledwie 30% z nich. Pozostałe są niesklasyfikowane, nawet u ludzi zdrowych. By dokładniej ocenić mikroflorę jelitową, wykorzystuje się coraz nowocześniejsze techniki laboratoryjne, chociażby PCR, cytometrię przepływową czy analizę DNA i rybosomów [19, 20]. Niezbędny jest do tego specjalistyczny sprzęt, a co za tym idzie, kosztowne inwestycje. Dlatego technika wodorowego testu oddechowego, wsparta wywiadem lekarskim, oceną kliniczną badanych po wykonaniu testu i badaniem ogólnym kału (pH, ciała redukujące), wydaje się wystarczająca do analizy procesów fermentacyjnych zachodzących w jelicie. Wiemy, że rodzaje bakterii zasiedlających przewód pokarmowy i ich wzajemne korelacje mogą odpowiadać za wystąpienie stanów zapalnych. Nadal nie wiadomo, czy zmiany składu mikroflory jelitowej powodują wystąpienie nieswoistego stanu zapalnego czy dochodzi do niej jako do zjawiska wtórnego w przebiegu tego zapalenia [21]. Dane z literatury dowodzą, że czynniki środowiskowe i predyspozycje genetyczne gospodarza wpływają na jego relacje z mikroflorą jelitową. Szczegółów tej relacji i tego, który z czynników odgrywa rolę inicjującą, nie udało się jeszcze poznać [22, 23]. Wstępne dane przemawiają za tym, że mikroflora jelitowa odgrywa rolę w procesach inicjacji i utrzymywaniu procesu zapalnego w jelicie [24]. Na podstawie wyników naszej pracy można z dużym prawdopodobieństwem wypowiadać się na temat dominującego szlaku metabolicznego w okrężnicy. Nasze wyniki dotyczące częstości występowania bakteryjnej metanogenezy i czasu pasażu jelitowego są zgodne z innymi doniesieniami. Wydaje się, że występowanie metanogenezy jest sprzężone z wydłużeniem czasu pasażu. Obserwowaliśmy to zarówno u dzieci z zaparciem stolca, jak i w grupie z zespołem jelita drażliwego

z dominacją zapań. Drugim ciekawym spostrzeżeniem jest to, że prawie nie występuje wspomniana metanogeneza u dzieci ze skróconym czasem pasażu jelitowego, co obserwowaliśmy u dwóch pacjentów z postacią biegunkową zespołu jelita drażliwego oraz u dziewczynki z nieswoistym zapaleniem jelit o niewielkim stopniu aktywności. W tej grupie obserwowano trudny do interpretacji przebieg wodorowego testu oddechowego. Polegał on na znacznym wzroście stężenia cząsteczek wodoru w wydychanym powietrzu w pierwszej i/lub drugiej godzinie po spożyciu laktozy. Później następowała jego szybka normalizacja. U dzieci tych w ciągu 24 godzin od wykonania WTO wystąpiło wiele niezależnych od stopnia aktywności zapalenia jelit objawów klinicznych: złe samopoczucie, bóle brzucha, wzdęcia i biegunka. Wynika to najprawdopodobniej z szybkiego namnożenia bakterii redukujących siarczan, spowodowanego dużą podażą wodoru [18]. Bakterie te mają bowiem największe powinowactwo do wodoru i w wypadku jego nadmiaru mogą szybko zdominować mikroflorę jelitową. Jak wspomniano wcześniej, ich obecność sprzyja nasileniu procesu zapalnego. Dlatego należy szczególnie rozważyć wykonanie wodorowego testu oddechowego u chorych na nieswoiste zapalenia jelit, zwłaszcza o umiarkowanym i ciężkim stopniu aktywności. Uzasadnione wydaje się poprowadzenie go badaniem ogólnym kału w celu ewentualnego wykrycia zaburzeń trawienia węglowodanów. Dokładne poznanie opisanych relacji zachodzących w jelicie grubym wymaga dalszych badań na większych grupach chorych. Zasadnym wydaje się również poszerzenie panelu badań o analizę składu chemicznego kału, ze szczególnym uwzględnieniem obecności związków siarki.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można wnioskować, że:

- metanogeneza jelitowa stwierdzana metodą wodorowego testu oddechowego może sugerować wydłużenie czasu pasażu jelitowego,
- wykonanie wodorowego testu oddechowego u dzieci chorych na nieswoiste zapalenia jelit może być pomocne w poszukiwaniu czynnika etiopatogenetycznego pierwotnie lub wtórnie wpływającego na przebieg tego schorzenia,
- podając laktozę dzieciom z nieswoistym zapaleniem jelit, należy zachować szczególną ostrożność ze względu na możliwe nasilenie biegunki.

Piśmiennictwo

1. Guarner F. Enteric flora in health and disease. *Digestion* 2006; 73 S1: 5-12.
2. Christl SU, Gibson GR, Cummings JH. Role of dietary sulphate in the regulation of methanogenesis in the human large intestine. *Gut* 1992; 33: 1234-8.
3. Yang SC, Chen JY, Shang HF i wsp. Effect of synbiotics on intestinal microflora and digestive enzyme activities in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7413-7.
4. Christl SU, Murgatroyd PR, Gibson GR i wsp. Production, metabolism, and excretion of hydrogen in the large intestine. *Gastroenterology* 1992; 102: 1269-77.
5. Fiedorek SC, Pumphrey CL, Casteel HB. Breath methane production in children with constipation and encopresis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990; 10: 473-7.
6. Soares AC, Lederman HM, Fagundes-Neto U i wsp. Breath methane associated with slow colonic transit time in children with chronic constipation. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 512-5.
7. Pimentel M, Mayer AG, Park S i wsp. Methane production during lactulose breath test is associated with gastrointestinal disease presentation. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 86-92.
8. Levine J, Ellis CJ, Furne JK i wsp. Fecal hydrogen sulfide production in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 83-7.
9. McGarr SE, Ridlon JM, Hylemon PB. Diet, anaerobic bacterial metabolism, and colon cancer: a review of the literature. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 98-109.
10. Montes RG, Saavedra JM, Perman JA. Relationship between methane production and breath hydrogen excretion in lactose-malabsorbing individuals. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 445-8.
11. Strocchi A, Furne JK, Ellis CJ i wsp. Competition for hydrogen by human faecal bacteria: evidence for the predominance of methane producing bacteria. *Gut* 1991; 32: 1498-501.
12. Peyrin-Biroulet L, Bigard MA. Digestive gas, EMC-Hépatogastroentérologie 2005; 2: 370-87.
13. Kamińska B, Landowski P, Szarszewski A i wsp. Udział beztlenowej flory bakteryjnej w patogenezie wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. *Przeegl Pediat* 2002; 32: 275-9.
14. Roediger WE, Moore J, Babidge W. Colonic Sulfide in Pathogenesis and Treatment of Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1571-9.
15. Jorgensen J, Mortensen PB. Hydrogen sulfide and colonic epithelial metabolism: Implications for ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 1722-6.
16. Perman JA. Methane and colorectal cancer. *Gastroenterology* 1984; 87: 728-30.
17. Veligati LN, Treem WR, Sullivan B i wsp. Delta 10 ppm versus delta 20 ppm: a reappraisal of diagnostic criteria for breath hydrogen testing in children. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 758-61.
18. Di Stefano M, Missanelli A, Miceli E i wsp. Hydrogen breath test in the diagnosis of lactose malabsorption: accuracy of new versus conventional criteria. *J Lab Clin Med* 2004; 144: 313-8.
19. Andus T, Gross V. Etiology and pathophysiology of inflammatory bowel disease-environmental factors. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 29-43.
20. Cummings JH, Macfarlane GT, Macfarlane S. Intestinal bacteria and ulcerative colitis. *Curr Issues Intest Microbiol* 2003; 4: 9-20.
21. Marteau P, Lepage P, Mangin I i wsp. Gut flora and inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2004; 20: 4-18.
22. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical Aspects and Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Microbiology* 2002; 15: 79-94.
23. Kamińska B, Landowski P, Korzon M, i wsp. Zależność pomiędzy składem beztlenowej flory bakteryjnej jelita grubego a stopniem aktywności nieswoistych zapaleń jelit u dzieci. *Pediatrics Współczesna* 2003; 5: 113-9.
24. Blumberg RS, Strober W. Prospects for research in inflammatory bowel disease. *JAMA* 2001; 285: 643-7.