

Fumo di tabacco e crescita del *Mycobacterium Tuberculosis*

Tobacco smoking and the Mycobacterium Tuberculosis's growth

Alexander S. Shprykov, Vyacheslav V. Shkarin, Olga N. Shprykova

Riassunto

Introduzione. Lo scopo di questo studio era di studiare le relazioni tra fumo di tabacco e l'agente eziologico della tubercolosi (TB).

Metodi. Gli strani di *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) H37Ra e 4688 sono stati coltivati su terreno solido in presenza o in assenza di condensato di fumo di tabacco (TSC), e i tassi di crescita sono stati osservati. Le colonie sono state anche esaminate utilizzando la microscopia elettronica (EM). La gascromatografia è stata utilizzata per evidenziare variazioni quantitative nella composizione degli acidi grassi.

Risultati. Rispetto alle colonie con coltivate in presenza di TSC, quest'ultimo alle diluizioni da 2 µg/cm³ a 20 µg/cm³ ha determinato una accelerazione della crescita delle colonie pari a 7-8 giorni, un aumento di 1.5-2 volte della massa batterica ed un aumento dell'attività enzimatica. L'analisi mediante EM ha evidenziato colonie di maggiori dimensioni, ispessimento della capsula lipidica, aumentato numero dei polisomi e dei granuli polimetatfosfati in presenza del TSC. La gas cromatografia ha evidenziato un aumento degli acidi grassi con un numero di atomi di carbonio di 25 e 14 in presenza del TSC.

Risultati. Questi risultati suggeriscono un effetto stimolante del TSC sulla crescita e le attività biologiche del MTB.

Parole chiave: fumo di tabacco, condensato di fumo di tabacco, *Mycobacterium tuberculosis*, modificazioni strutturali

INTRODUZIONE

Il fumo di tabacco rappresenta il principale o uno dei maggiori fattori eziologici di bronchite cronica, malattie cardiovascolari e cancro del polmone. I tassi di mortalità per i fumatori sono maggiori del 60-80% rispetto ai non fumatori^{1,2}.

L'effetto del fumo di tabacco sul *Mycobacterium Tuberculosis* (MTB) è largamente sconosciuto. Oltre a questo, i dati e le opinioni presenti in Letteratura sono contrastanti; da un lato, alcuni autori negano il ruolo del fumo sulle manifestazioni cliniche e la prognosi della tubercolosi (TB)^{3,4}, mentre altri ne

Abstract

Introduction. The aim of this study was to investigate the relationship between tobacco smoke and the etiological agent of tuberculosis (TB).

Methods. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) strains H37Ra and 4688 cultured on solid medium with or without tobacco smoke condensate (TSC) and growth rates were observed. Colonies were also examined by electron microscopy (EM). Gas chromatography was used to evaluate quantitative changes in the structure of fatty acids.

Results. In comparison with non-treated colonies, MTB strains cultured in presence of TSC with dilution 2 µg/cm³ to 20 µg/cm³ showed a 7-8 days growth acceleration, 1.5-2 fold increase of bacterial mass and increase of enzymatic activity. EM analysis showed larger sizes of microcolonies, thickened lipid capsular cover, increased number of polysomes and polymethaphosphate granules in TSC-treated MTB strains. Gas chromatography detected an increase of fatty acids with a number of Carbon atoms of 25 and 14.

Conclusions. These findings suggest that TSC stimulates the growth and the biological activities of MTB.

Keywords: tobacco smoking, tobacco smoke condensate, *Mycobacterium tuberculosis*, structural changes.

INTRODUCTION

Tobacco smoking is the main risk factor for the development of chronic bronchitis, cardiovascular pathology and lung tumors. Lungs and other lesions for cigarette smokers is well established. Overall mortality rates for cigarette smokers are 60% to 80% higher than for non-smokers^{1,2}.

The effect of tobacco smoking on lung tuberculosis and especially on *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) is not well known. Furthermore, the available data in the literature are contrasting. On one side, some authors deny the role of smoking in the cli-

Alexander S. Shprykov
Nizhny Novgorod state Medical Academy Department
of Tuberculosis and Lung diseases (Russia)

Vyacheslav V. Shkarin
Nizhny Novgorod state Medical Academy Department of
Epidemiology (Russia)

Olga N. Shprykova
(olgachpr@aport.ru)
Clinic of Infections 2 Nizhny Novgorod, bacteriological
laboratory (Russia)

sostengono l'effetto diretto o indiretto sul processo tubercolare⁵. La combinazione delle due epidemie tubercolare e tabagica è stata osservata in vari paesi. A partire dagli anni Novanta circa 10 milioni di persone si ammalano di TB e 3 milioni ne muoiono ogni anno. Un terzo della popolazione mondiale è affetta da TB, ed il numero dei fumatori nel mondo aumenta ad un ritmo del 2-3% annuo, e soprattutto tra le donne e gli adolescenti.

Lo scopo di questo studio era di investigare l'effetto del fumo di tabacco sulla crescita e la struttura del MTB *in vitro*.

METODI

Per studiare gli effetti del fumo sul MTB, è stato utilizzato il condensato di fumo di tabacco (TSC), che viene internazionalmente accettato come indice di esposizione al fumo⁶. Il TSC è stato ottenuto utilizzando l'apparecchio Borgwaldt RM 20/CS e filtri Cambridge sotto le seguenti condizioni standard (International Standard ISO 3308 - 1986):

Volume del puff	35 ml
Durata del puff	2 secondi
Intervallo puff (frequenza della inalazione)	1 al minuto
Smoke catcher	filtri Cambridge
Velocità dell'aria attraverso la sigaretta	17,5 ml/s
Scarto di peso delle sigarette	10%
Velocità dell'aria nel laboratorio	200 ± 30mm/s
Lunghezza delle sigarette	23 mm per le non filtrate e 3 mm sopra il filtro per le filtrate

Un nuovo metodo di studio degli effetti del fumo di sigaretta sul MTB è stato sviluppato e patentato dalla nostra équipe (patente della Federazione Russa n.2083001). Il terreno solido Lowenstein-Yensen è stato inoculato con MTB, aggiungendo poi differenti concentrazioni di TSC (da $2 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{cm}^3$ fino a $2 \times 10^3 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, per es. dalla 1^a alla 6^a diluizione). 294 esperimenti sono stati condotti utilizzando gli MTB strain H 37 Ra e n.4688. La valutazione colturale del MTB era basata sulla tempo di comparsa della crescita visibile del MTB (in giorni) e quantità della massa batterica, valutata in punti secondo la seguente scala:

1 punto	comparsa di colonie singole
2 punto	n° di colonie < 20
3 punto	la crescita copre metà della provetta
4 punto	crescita abbondante

nica manifestazioni and prognosis of tuberculosis (TB)^{3,4}, while on the other a number of scientists acknowledges the direct or indirect effect of smoking on the tuberculosis process⁵. The combination of both tobacco smoking and tuberculosis epidemics has been observed in several countries. Starting from the 90s, about 10 million people develop tuberculosis and about 3 million people die annually. One-third of the world's population is infected with MTB. The number of smokers in the world increases about 2-3 percent each year. Especially among women and teenagers. The aim of this study was to investigate the effect of tobacco smoking on the structure and growth of MTB *in vitro*.

METHODS

To simulate the effect of tobacco smoke products on the causative agent of TB, we used cigarette smoke condensate (TSC), which is a commonly accepted international standard indicating smoke exposure⁶. TSC was obtained by smoking cigarettes using a special smoking machine, model "Borgwaldt RM 20/CS" (Germany), through Cambridge filters under standardized conditions (International Standard ISO 3308, 1986). Standard conditions for obtaining Cigarette Smoking Condensate were as follows:

puff volume	35 ml
puff duration	2 second
puff interval (frequency of smoke inhalation)	1 per minute
smoke catcher	Cambridge filter
velocity of air being pulled through the cigarette	17.5 ml/s
cigarettes weight scatter	10%
velocity of air movement in the laboratory	200 mm/s ± 30mm/s
cigarette butt length	23 mm for non-filte-red and 3 mm above filter over-lap for filter tipped cigarettes.

A new method of investigation of cigarette smoke effects on MTB has been developed and patented by our research team (patent of the Russian Federation n.2083001).

The solid Lowenstein-Yensen media has been inoculated with MTB strains, adding different cigarette condensate concentrations (from $2 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{cm}^3$ to $2 \times 10^3 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, i.e. from the 1st to 6th delution).

294 experiments have been conducted on cultures of two MTB strains: H 37 Ra and n.4688. The evaluation of cultural properties was performed according to the two main criteria: time of appearance of MTB visible growth (in days) and quantity of bacterial mass, expressed in points according to the following scale:

Ogni esperimento è stato ripetuto 3 volte. Se la massa batterica era sufficiente, l'esame delle proprietà biochimiche è stata eseguita mediante test standard (riduzione dei nitrati, utilizzazione del sodio citrato, test di beta-galattosidasi, ossidazione/fermentazione di glucosio, arabinosio, ramnosio ed altri glucidi). Lo spettro degli acidi micolici è stato studiato mediante gas-cromatografia nell'MTB intatto e nelle colonie cresciute nel mezzo con l'aggiunta del TSC. In tutto 12 cromatogrammi sono stati eseguiti utilizzando il sistema "Tsvet 800" (Russia). I cromatogrammi degli strain di MTB sperimentali e di controllo sono stati confrontati visivamente.

Le 9 colture di MTB che hanno mostrato la crescita maggiore sono state anche analizzate mediante microscopia elettronica (EM). Sono stati utilizzati un microscopio elettronico di trasmissione JEM - 100 B e uno di scansione Hitachi S-405 (Giappone) con voltaggio di accelerazione di 80 kw. Le sezioni ultrasottili sono state ottenute utilizzando un ultratome device L kb - 8800 (Svezia).

RISULTATI

Il TSC ha determinato un effetto stimolante sulle colonie di MTB alle diluizioni di 2 fino a 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (per es. la 3^a e 4^a diluizione), tale per cui la crescita batterica è stata accelerata di 7- 8 giorni, con aumento di due volte della massa batterica (Figura 1) e moderato aumento dell'attività enzimatica in confronto alle colonie non trattate, in particolare la riduzione dei nitrati e dei test di beta-galattosidasi.

La gascromatografia ha individuato variazioni quantitative nella composizione degli acidi grassi in seguito al trattamento con TSC. Come può essere visto sui cromatogrammi (Figura 2), il picco di acido micolico con 25 atomi di carbonio è aumentato ed ha raggiunto il picco dell'acido con 24 atomi di carbonio. Un doppio pic-

1 point	appearance of single colonies
2 point	the number of colonies does not exceed 20
3 point	the culture covers half of the medium slope in the tube
4 point	abundant growth over the whole medium slope

Each experiment was repeated 3 times with controls performed. If the amount of MTB bacterial mass was sufficient, the examination of biochemical properties of mycobacteria was performed

using standard tests (reduction of nitrates, sodium citrate utilization, beta-galactosidase test, oxidation/fermentation of glucose, arabinose, rhamnose and others). The spectra of mycolic acids by gas-chromatography in untreated and TSC-treated MTB colonies was evaluated. 12 chromatograms using the chromatographic system model "Tsvet 800" (Russia), according to the commonly accepted recommendations. The assessment of obtained data was carried on by visual comparison of the chromatograms of the experimental and control MTB strains. Nine cultures of MTB, showing the richest growth were investigated by electron microscopy (EM). For this purpose a transmission electron microscope JEM - 100 B and a scanning electron microscope Hitachi S-405 (Japan) under accelerating voltage of 80 kw were used. Ultrathin sections were obtained using ultratome device, model L kb - 8800 (Sweden).

RESULTS

TSC showed a stimulating effect on MTB growth at dilutions of 2 to 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, (i.e. the 3^d and 4th dilution), which resulted in 7- 8 days acceleration of MTB colony growth, a 2 - fold enlargement of bacterial mass (Figure 1), and moderate increase of enzyme biochemical activity - in particular the reduction of nitrates and beta-

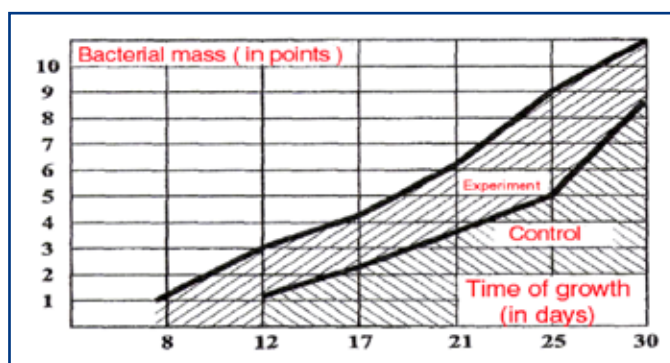


Figura 1. Dynamics of growth of MTB strain N°4688 in the medium with the 4-th dilution of smoke condensate/

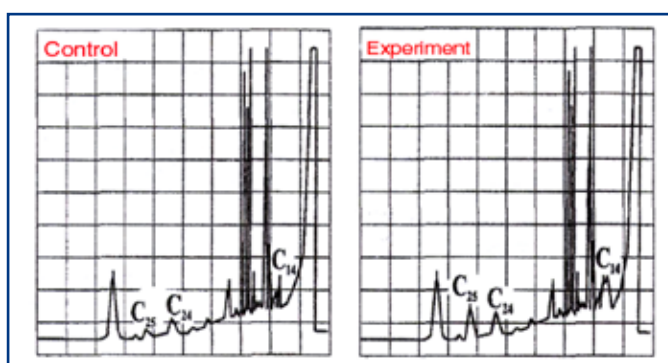


Figura 2. Gas chromatograms of control H37Ra MTB strain and the experimental strain grown in the medium with the 3-d dilution of smoke condensate.

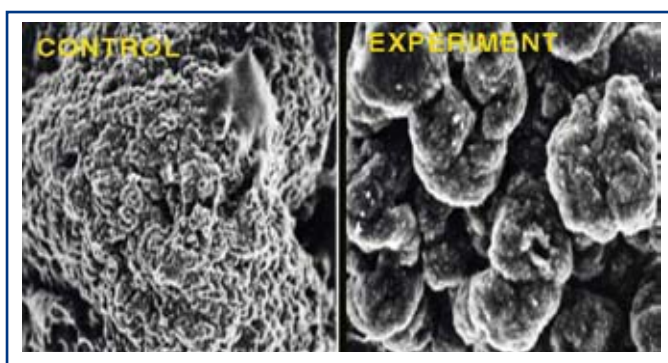


Figura 3. Electronic micrograms of colonies of control strain MTB 4688 and those grown in the medium with the 3-d dilution of smoke condensate (magnified $\times 2500$).

co dell'acido con 14 atomi di carbonio è stato anche notato. Queste variazioni non sono tipiche dell'MTB e sono assenti nei controlli.

L'EM ha evidenziato microcolonie di maggiori dimensioni e capiseli lipidiche ispessite nelle microcolonie trattate con TSC (Figura 3). La EM di trasmissione ha mostrato un aumentato numero di polisomi e di granuli semimetafosfati nelle colonie di MTB trattate con TSC (Figura 4), suggerendo l'attivazione di processi biochimici nelle cellule batteriche.

DISCUSSIONE

Questi risultati sono coerenti con i dati clinici che hanno mostrato che i MTB ottenuti da pazienti con MTB fumatori crescono più rapidamente *in vitro* rispetto a quelli ottenuti da soggetti non fumatori⁷. I ceppi di MTB farmaco-resistenti sono stati isolati più spesso nei fumatori che non nei non fumatori (43,4% vs. 19,4%, $p < 0,01$).

Gli effetti del fumo sulla crescita e sui cambiamenti strutturali del MTB si possono spiegare in due modi. In primo luogo, il fumo di tabacco rappresenta un aerosol altamente concentrato contenente circa 3900 sostanze; a causa della elevata liposolubilità della parete batterica del MTB, alcune di queste sostanze, tra cui molte mutagene e carcinogene, possono penetrarvi e stimolare la crescita.

In alternativa, molte delle sostanze presenti nel fumo di tabacco vengono direttamente utilizzate dai batteri per la loro crescita e il metabolismo; tra di esse vi sono gli acidi carbonici, aminoacidi, amidi, carboidrati⁸.

Lo studio di Kotian e coll.⁹ conferma i presenti dati; l'aggiunta di estratto di tabacco 50 µg/ml al mezzo standard Levenstein-Yensen accelerava significativamente la crescita di MTB, anticipandola di almeno 15 giorni. Tale concentrazione corrisponde approssimativamente ad una diluizione di 3 volte di TSC.

CONCLUSIONI

Il presente studio ha dimostrato la molteplicità degli effetti del condensato di fumo di tabacco sull'agente eziologico del-

galattosidase test - in comparsa con i controlli non trattati. La gascromatografia ha rilevato cambiamenti quantitativi nella composizione degli acidi grassi. Come si può vedere nei cromatogrammi (Figura 2), il picco dell'acido mioico con 25 atomi di carbonio è aumentato e si è uguale al picco dell'acido con 24 atomi di carbonio. Un doppio picco dell'acido con 14 atomi di carbonio è stato anche notato. Questi cambiamenti non sono tipici per MTB e sono assenti nei controlli. L'analisi EM ha rivelato dimensioni maggiori delle microcolonie di MTB e ispessimento della capsula lipidica nelle microcolonie trattate con TSC (Figura 3). L'EM di trasmissione ha mostrato un aumento del numero di polisomi e di granuli semimetafosfati nelle colonie di MTB sperimentali (Figura 4), che suggerisce l'attivazione di processi biochimici nelle cellule MTB.



Figura 4. *Electronic micrograms of ultrathin section of control MTB strain 4688 and the strain grown in the medium with the 3-d dilution of smoke condensate (magnified × 120 000).*

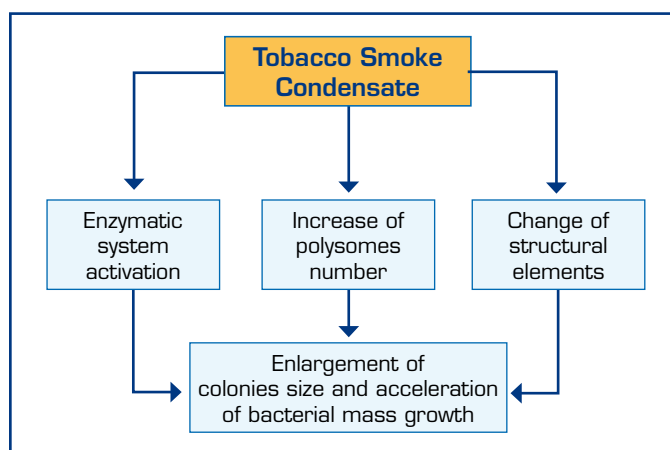


Figura 5. *The Effect of tobacco smoke condensate on the TB causative agent.*

DISCUSSION

The results of these experiments correlate with clinical data showing that MTBs obtained from TB smoking patients give more rapid and abundant growth on solid media in comparison to nonsmokers⁷. Drug-resistant MTB strains have been found to be isolated more often in smokers -43.4% vs. 19.4% in nonsmokers, $p < 0.01$. Two possible hypotheses may explain the effect of tobacco smoke condensate on the growth and structural changes of MTB. First, tobacco smoke is a highly concentrated aerosol containing about 3900 different substances; some of them, having mutagenic and cancerogenic properties, may penetrate through the lipophilic cellular wall of MTB and stimulate growth. Alternatively, a number of substances present in tobacco smoke are directly used by the microbial cells for their growth and metabolism, these substances include carbonic acids, amines, amides, carbohydrates⁸.

Our findings are confirmed by the work of Kotian et al.⁹; adding tobacco extract 50 µg/ml to the standard Levenstein-Yensen medium significantly accelerated MTB growth by at least 15 days. A concentration of 50 µg/ml corresponds approximately to our 3-d dilution of TSC.

CONCLUSIONI

The present study demonstrated multiple effects of tobacco smoke condensate on the etiologic agent of TB, including ac-

la TB, accelerandone la crescita, incrementandone la massa batterica e determinando modificazioni strutturali e variazioni biochimiche rilevanti (Figura 5).

Pertanto il fumo di tabacco potrebbe aggravare il decorso clinico della tubercolosi. ■

celeration of growth, increase in bacterial mass, and relevant biochemical and structural changes (Figure 5).

Thus, tobacco smoke may aggravate the clinical course of tuberculosis. ■

Disclosure: gli autori non dichiarano alcun conflitto di interessi.

Fonte di finanziamento: Nizhny Novgorod State Medical Academy.

Disclosure: the authors declare no conflict of interest.

Source of funding: Nizhny Novgorod State Medical Academy

Traduzione a cura di Marco Mura

Bibliografia

1. Doll R., Peto R., Boreham J., Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 50 years observations on male British doctors. *BMJ* 2004; 328: 1519-1528.
2. Hill C., Laplanche A. Tabagisme et mortalite: aspects pidemiologiques. *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire*, 2003; 22: 98 – 100.
3. US Surgeon-General. Reducing the health consequences of smoking: 25 years of progress. Washington, DC: US Department of Health and Human Services; 1989.
4. Lewis J.G., Chamberlain D.A. Alcohol consumption and smoking habits in male patients with pulmonary tuberculosis. *Brit.J. prev. soc. Med.* 1991;-17: 149 -155.
5. Gajalakshmi V., Peto R., Santhanakrishna Kanaka T., Jha P. Smoking and mortality from tuberculosis and other diseases in India: Retrospective study of 43,000 adult male deaths and 35,000 controls. *Lancet* 2003; 362: 507 -515.
6. Dube M.F., Green C.R. Methods of collection of smoke for analytical purposes. *Recent Adv. Tob. Sci.* 1982; 8: p.42-102.
7. Shprykov A.S., Zhadnov V.Z., Shkaryn V.V. The effect of tobacco smoking on drug sensitivity and microbiological characteristics of *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and experimental study. Abstracts. 13-th ERS Annual Congress. 2003, Vienna, September 27-October 1. *ERJ* 2003; 22: ps 158.
8. Minnikin D.E. The biology of mycobacteria. London – New York., Acad. Press, 1982, p.95-184.
9. Kotian M., Shivananda P.G., Rao K.N.A. Modified medium for the rapid growth of *Mycobacterium tuberculosis*-*J.roy.Soc. Med.*- 1983.-76, 6, p.530-531.



Ricerca, innovazione, creatività: alcuni degli ingredienti utilizzati per elevare le intuizioni in comunicazione integrata, laddove i progetti sfociano in concreta visibilità. Graph-x offre proficua collaborazione su graphic design, editorial service, web design e multimedia.

www.graph-x.it

Graph-x studio grafico - Bologna infomail: graph-x@fastwebnet.it