

# ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ — НОВОЕ БИОЛОГИЧЕСКОЕ СВОЙСТВО ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОДУКТОВ ТАБАЧНОГО ДЫМА

УДК 613.84:616—002.5—093/—098

Поступила 5.07.2010 г.



**А.С. Шпрыков**, к.м.н., доцент, зав. кафедрой туберкулеза

Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород

**Цель исследования** — изучение возможного влияния продуктов табачного дыма на жизнеспособность возбудителя туберкулеза.

**Материалы и методы.** В экспериментальной части работы использовали два штамма микобактерий туберкулеза (МБТ) — H37Ra, 4688 — и конденсат табачного дыма (международный эквивалент курения). МБТ высевали на среду Левенштейна—Йенсена с пятью разведениями конденсата (от  $10^{-3}$  до  $10^0$  мг/см<sup>3</sup>). Определяли жизнеспособность — низкую, среднюю и высокую (рост менее 20 колоний МБТ за срок более 30 сут, от 20 до 100 колоний или более 100 колоний менее чем за 30 сут соответственно).

Материалом для клинических обобщений послужили 140 штаммов МБТ, выделенных от 102 табакокурльщиков и 38 некурящих больных с инфильтративным туберкулезом легких.

**Результаты.** Установлено увеличение массивности и скорости роста культур, выращенных на средах с разведением конденсата табачного дыма 0,1—0,01 мг/см<sup>2</sup>, что соответствовало критерию «высокая жизнеспособность МБТ» (high viability). Выявлены клинико-экспериментальные параллели: у 52,8% штаммов, выделенных от многокурящих больных, отмечается высокая степень жизнеспособности (против 17,5% у некурящих больных из группы сравнения).

**Заключение.** Рост жизнеспособности МБТ под влиянием продуктов табачного дыма — еще одно объяснение неблагоприятного течения туберкулеза легких у табакокурльщиков, особенно злостных.

**Ключевые слова:** продукты курения табака, микобактерии туберкулеза, биологические свойства МБТ, жизнеспособность МБТ.

## English

## Viability — a new biological property of a tuberculosis agent in conditions of the tobacco smoke product effect

**A.S. Shpryckov**, c.m.s, assistant professor, head of a tuberculosis chair

Nizhny Novgorod state medical academy, N. Novgorod

**Aim of investigation** is a study of the tobacco smoke product possible influence on the tuberculosis agent viability.

**Materials and methods.** Two strains of the Mycobacterium tuberculosis (MBT) — H37Ra, 4688 — and a tobacco smoke condensate (international equivalent of smoking) were used in experimental part of work. The MBT were sown in the Levenstein-lensen medium with five dilutions of a condensate (from  $10^{-3}$  to  $10^0$  mg/cm<sup>3</sup>). The low, average and high values of viability were detected (a growth of less than 20 MBT colonies for more than 30 days, from 20 to 100 colonies or more than 100 colonies for less than 30 days, respectively).

140 strains of MBT released from 102 smokers and 38 nonsmoking patients with the infiltrative tuberculosis of lungs were a material for clinical generalizations.

**Results.** An increase of the culture mass and growth rate, grown in the media with a tobacco smoke condensate dilution of 0.1—0.01 mg/cm<sup>2</sup>, is established, which corresponded to the «MBT high viability» criterion. The clinicoexperimental parallels are revealed: a high degree of viability is marked in 52.8% of strains, released from multismoking patients (compared to 17.5% in the nonsmoking patients from a comparison group).

**Conclusion.** A growth of the MBT viability under an influence of the tobacco smoke products is one more explanation of the lung tuberculosis unfavorable flow in the smokers, especially malicious ones.

**Key words:** products of tobacco smoking, mycobacterium tuberculosis, biological properties of the MBT, viability of the MBT.

Для контактов: Шпрыков Александр Сергеевич, тел. раб. 8(831)432-85-92, тел. моб. +7 905-195-81-87.

В 90-е годы прошлого века после периода относительного благополучия во многих странах мира ситуация с туберкулезом ухудшилась. Особую тревогу вызывает рост лекарственной устойчивости у микобактерий туберкулеза (МБТ), что представляет собой глобальную проблему и обуславливает дальнейшее изучение характеристик возбудителя туберкулеза [1].

По мнению многих авторов, в патогенезе современного туберкулеза все большую роль играют биологические свойства МБТ [2, 3]. Среди этих свойств большой интерес представляет так называемая жизнеспособность МБТ. В отечественной литературе жизнеспособность чаще оценивают по критериям скорости и массивности роста [4]. Выявлена корреляция жизнеспособности с характером течения туберкулеза легких, его динамикой [5].

Как известно, туберкулез является заболеванием с выраженным социальным компонентом, что побуждает дальнейшее изучение влияния различных внешних факторов на свойства его возбудителя. Внимание автора привлекла проблема воздействия на жизнеспособность МБТ табакокурения. Остроту этой проблеме придает продолжающаяся эпидемия курения (число курильщиков в мире растет) и чрезвычайная распространенность его среди больных туберкулезом, превышающая в 1,5—2 раза средние показатели среди населения [6, 7].

**Цель исследования** — изучение возможного влияния продуктов табачного дыма на жизнеспособность возбудителя туберкулеза.

**Материалы и методы.** Выполнена комплексная экспериментально-клиническая работа. В экспериментальной части использовали два штамма МБТ: штамм 4688, полученный от больного, и штамм H37Ra — референс-культура из коллекции США. Все культуры были медленно растущими, росли на среде Левенштейна—Йенсена при температуре 37°C.

Для моделирования воздействия продуктов табачного дыма на МБТ использовали конденсат табачного дыма (КТД), являющийся общепринятым международным показателем кумулятивного действия курения на организм человека или лабораторного животного [8].

Штаммы МБТ высевали на среду Левенштейна—Йенсена с пятью различными разведениями КТД (от 10<sup>-3</sup> до

10 мг/см<sup>3</sup>). Проводили контроль растворителя КТД и культуры (патент РФ №2083001 от 27.06.1997 г.).

Жизнеспособность МБТ считали низкой, средней и высокой. При массивности роста культур менее 20 колоний за время более 30 сут жизнеспособность оценивали как низкую, при росте более 100 колоний со скоростью роста менее 30 сут — как высокую, при росте от 20 до 100 колоний менее чем за 30 сут — как среднюю. Обилие выросших культур подсчитывалось в баллах: 1 балл — единичные колонии, 2 балла — число колоний менее 20, 3 балла — число колоний 20—100, 4 балла — число колоний более 100.

Материалом для клинических обобщений послужили 140 штаммов МБТ, выделенных от 140 больных с впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких, закончивших лечение в стационаре Нижегородского областного противотуберкулезного диспансера. Среди них были табакокурельщики (102 пациента) — основная группа и некурящие (38 пациентов) — группа сравнения. Кроме того, среди курящих выделены лица с максимальной интенсивностью курения (36 человек) — подгруппа «злостных» курильщиков — эти больные выкуривали в день пачку и более сигарет.

По возрастно-половому составу обе группы больных были сравнимы: преобладали мужчины работоспособного возраста.

Полученные данные, если это было возможно, обрабатывали статистически с вычислением средней ошибки *m* и доверительного коэффициента *t* по общепринятым формулам. Разность показателей считалась достоверной при *t*>2, *p*<0,05.

**Результаты и обсуждение.** Всего выполнено по 5 серий посевов в трех повторностях для каждого штамма.

Анализ усредненных результатов для штамма №4688 (табл. 1) показал, что на средах с 3-м и 5-м разведением КТД четко отмечается увеличение массивности и скорости роста культур, т.е. стимулирующий эффект некоторых концентраций продуктов табачного дыма. Однако только культура МБТ, выросшая на среде с 3-м разведением КТД, соответствует критерию «высокая жизнеспособность», так как рост более 100 колоний был получен за 21 сут, при этом увеличение биомассы составило около 40%.

Таблица 1

**Жизнеспособность экспериментального штамма №4688 *M. tuberculosis* во время роста на средах с различной концентрацией конденсата табачного дыма, баллы (M±m)**

Время культивирования, сут	Разведения конденсата табачного дыма/мг/см <sup>3</sup>					Контроль культуры
	1-е/10	2-е/1	3-и/0,1	4-е/0,01	5-е/0,001	
До 14	0,20±0,30	0,30±0,28	3,10±0,56*	1,20±0,62	1,80±0,38	1,00±0,55
21	0,80±0,67	2,00±0,65*	7,00±1,24**	3,40±0,40	3,90±0,60	3,60±0,41
30	1,90±0,60+	2,900±0,818*	10,30±0,78+	5,40±1,10	6,70±0,77*	5,00±0,55
Более 30	2,80±0,84+	3,22±0,68**	11,90±0,86+	8,70±0,58	9,80±1,36	8,60±0,56

Примечание: \* — статистически значимое различие с контролем, *p*<0,05; \*\* — *p*<0,01; + — *p*<0,001.

На среде с 4-м разведением КТД рост соответствовал контролю, на средах с 1-м и 2-м — отставал от контроля, т.е. отмечалось ингибирующее действие данных разведений КТД и низкая жизнеспособность МБТ.

У штамма H37Ra (табл. 2) вместо баллов была определена степень жизнеспособности. Как следует из таблицы, у культур данного штамма, выросших на средах с 3-м и 4-м разведением КТД, отмечена высокая степень жизнеспособности, на средах с 1, 2 и 5-м разведением — низкая. Следует отметить, что 3-е (0,1 мг/см<sup>3</sup>) и 4-е (0,01 мг/см<sup>3</sup>) разведения КТД по нашей модели примерно соответствуют дозе продуктов табачного дыма, остающихся в организме злостного табакокурильщика. Таким образом, экспериментальные данные показывают, что продукты табачного дыма в виде КТД в некоторых концентрациях, сопоставимых с дозами, поглощаемыми многокурящими больными, формируют высокую жизнеспособность у исследованных культур МБТ.

В таблицу сведены средние результаты 5 серий посевов в трех поверхностях.

С целью установления экспериментально-клинических параллелей была изучена жизнеспособность 140 клинических штаммов МБТ (табл. 3). Как видно из таблицы, фактор табакокурения достоверно увеличивает жизнеспособность возбудителя туберкулеза с четким дозозависимым эффектом: высокая степень жизнеспособности МБТ отмечена у 39,2% табакокурильщиков, у 52,8% злостных курильщиков против 17,5% некурящих больных из группы сравнения. Следовательно, клинические данные полностью подтверждают результаты экспериментов.

Ухудшение эпидемиологической ситуации по туберкулезу, учащение появления тяжелых и лекарственно-устойчивых форм поставили перед медициной задачу анализа причин этого явления [5]. Изучение особенностей биологических свойств МБТ, в том числе жизнеспособности, как мы уже говорили, является одним из важных направлений исследований по этой проблеме. В зарубежной литературе применяется близкий термин «фитнес», который включает в себя способность микроорганизма к трансмиссии, репродукции, вирулентности и сохранению вида [9—11]. Считается, что характеристики роста МБТ на питательных средах могут служить индикатором фитнеса.

Выявлена связь жизнеспособности с иммунным ответом у больных туберкулезом [4], с тяжестью течения специфического процесса [3], клинической характеристикой и эффективностью лечения туберкулеза, в том числе с частотой абациллирования [5, 12], с прогнозом заболевания у конкретного больного [13]. Все эти авторы утверждают, что выделение МБТ с высокой жизнеспособностью усугубляет и утяжеляет туберкулезный процесс.

Однако мнение о связи степени жизнеспособности возбудителя туберкулеза с лекарственной устойчивостью и вирулентностью в ученом мире неоднозначно. Одни авторы отрицают этот факт, утверждая, что частота высокой жизнеспособности МБТ достоверно не различается у лекарственно-чувствительных и резистентных форм микобактерий с разной степенью вирулентности [2, 3]. Другие, наоборот, считают, что высокая жизнеспособность (обычно вместе с иммуно-

Таблица 2

**Жизнеспособность экспериментального штамма H37Ra M. tuberculosis во время роста на средах с различной концентрацией конденсата табачного дыма, баллы (M±m)**

Время культивирования, сут	Разведения конденсата табачного дыма/мг/см <sup>3</sup>					Контроль культуры
	1-е/10	2-е/1	3-и/0,1	4-е/0,01	5-е/0,001	
До 14	Низкая	Низкая	Средняя	Низкая	Низкая	Низкая
21	Низкая	Низкая	Высокая	Средняя	Низкая	Средняя
30	Низкая	Низкая	Высокая	Высокая	Низкая	Средняя
Более 30	Низкая	Низкая	—	—	—	—

Таблица 3

**Жизнеспособность клинических штаммов M. tuberculosis в зависимости от факторов табакокурения (M±m)**

Виды жизнеспособности	Группы больных с МБТ					
	Некурящие		Курящие		В т.ч. злостные	
	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%
Высокая	7	17,50±4,79	40	39,20±4,83*	19	52,80±8,32**
Средняя	17	44,40±6,26	33	32,40±4,63	10	27,80±7,47
Низкая	14	38,10±6,12	29	28,40±4,46	7	19,40±6,59+
Всего	38	100	102	100	36	100

\* — статистически значимые различия с группой некурящих, p<0,01; \*\* — p<0,001; + — p<0,05.

супрессией) часто сочетается с высокой вирулентностью и лекарственной устойчивостью МБТ, причем для больных с низкой жизнеспособностью возбудителя характерна монорезистентность, а при высокой степени жизнеспособности — полирезистентность и множественная лекарственная устойчивость [4, 5, 11]. Утверждается также, что корреляция высокого фитнеса (жизнеспособности) с лекарственной устойчивостью характерна только для МБТ семейства W-Beijing, являющихся общепризнанными возбудителями туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью в мире [9].

Таким образом, взаимоотношения жизнеспособности МБТ с клиникой, патогенезом, лекарственной резистентностью туберкулеза активно изучаются, однако влияние такого чрезвычайно распространенного и агрессивного артефакта, как хроническая табачная интоксикация, на это биологическое свойство остается неисследованным. В литературе встречаются единичные упоминания о связи фитнеса МБТ с социальными особенностями больных туберкулезом [11] или о большом числе злоупотребляющих алкоголем лиц в группе больных, выделяющих МБТ с высокой жизнеспособностью [5].

Механизм влияния продуктов табачного дыма на жизнеспособность МБТ может быть следующим. В табачном дыме содержится более 4000 различных соединений, в конденсат из них переходят более 3500. Среди них имеются ангидриды, карбоновые кислоты, спирты, амины, сернистые соединения, углеводы, углеводороды и т.д. [8]. Многие из этих веществ небезразличны для микробных клеток, а некоторые близки к различным ростовым факторам, проникают внутрь клетки и могут стимулировать рост и размножение МБТ. В организме курильщиков возможен также механизм усиления жизнеспособности микроорганизмов через иммуносупрессивное действие на макроорганизм продуктов курения.

**Заключение.** Продукты табачного дыма, как в виде конденсата в эксперименте, так и в результате табакокурения в клинике, в определенных концентрациях способствуют увеличению жизнеспособности возбудителя туберкулеза. При сопоставлении с группой сравнения число штаммов с высокой степенью жизнеспособности увеличивается от 40% в экспериментах до 2—3 раз для многокурящих больных в клинике ( $p \leq 0,01$  и  $p \leq 0,001$ ). Рост жизнеспособности микобактерий туберкулеза, часто сочетающийся с иммуносупрессией, лекарственной устойчивостью и повышенной вирулентностью — еще одно объяснение большей тяжести и менее благоприятного прогноза туберкулеза легких у табакокурльщиков, особенно злостных.

## Литература

1. Мишин В.Ю. Актуальные вопросы туберкулеза органов дыхания. М: Медицина; 2003; 87 с.
2. Корнеев А.А., Гольшевская В.И., Севастьянова Э.В. и др. Биологические свойства лабораторных штаммов и клинических изолятов микобактерий, полирезистентных к противотуберкулезным препаратам. Пробл туб 1999; 2: 44—47.
3. Маничева О.А., Ласунская Е.Б., Журавлев В.Ю. и др. Лекарственная чувствительность *Mycobacterium tuberculosis* в сопоставлении с их жизнеспособностью, цитотоксичностью, генотипом и течением процесса у больных туберкулезом органов дыхания. Пробл туб 2008; 12: 18—21.
4. Сахарова И.Я., Ариэль Б.М., Кноринг Б.Е. и др. Некоторые закономерности иммунного ответа у больных туберкулезом легких с лекарственноустойчивыми штаммами микобактерий. Пробл туб 2008; 12: 22—26.
5. Корецкая Н.М., Ярыгина И.В. Сравнительная характеристика диссеминированного туберкулеза легких у больных, выделяющих микобактерии туберкулеза с высокой и низкой жизнеспособностью. Пробл туб 2007; 2: 17—20.
6. Лебедева Н.О., Сухова Е.В. Формирование мотивации к лечению у больных туберкулезом легких. Пробл туб 2006; 12: 13—16.
7. Чучалин А.Г. Табакокурение и болезни органов дыхания. РМЖ 2008; 16(22): 1477—1481.
8. Dube M.F., Green C.R. Methods of collection of smoke for analytical purposes. Recent Adv Tob Sci 1982; 8: 42—102.
9. Тунгусова О.С., Марьяндышев А.Ю., Каугант Д.А. и др. Влияние лекарственной устойчивости на фитнес микобактерий генотипа W-Beijing. Пробл туб 2005; 8: 46—50.
10. Ritchie S.R., Harrison A.S., Vaughan R.H. et al. New recommendations for duration of respiratory isolation based on time to detect *Mycobacterium tuberculosis* in liquid culture. Eur Respir J 2007; 30: 501—507.
11. Gagneux S. Fitness cost of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Infect 2009, Jan; 15 (Suppl 1): 66—68.
12. Вишневский Б.И., Васильев А.В., Голубева Т.М. и др. Эпидемиологическое значение жизнедеятельности и лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза. В кн.: Материалы 5-го Национального конгресса по болезням органов дыхания. М; 1995; с. 1747.
13. Вишневский Б.И., Нарвская О.В., Васильева С.Н. и др. Вирулентность микобактерий туберкулеза. Пробл туб 2002; 10: 33—36.