

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037893**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.02

(51) Int. Cl. *A24D 3/06* (2006.01)
A24D 3/16 (2006.01)

(21) Номер заявки
201892421

(22) Дата подачи заявки
2016.04.25

(54) **НОВЫЙ СИГАРЕТНЫЙ ФИЛЬТР, СОДЕРЖАЩИЙ АЛЬГИНИТ**

(43) **2019.04.30**

(56) US-A1-2003168071
HU-B-189383

(86) **РСТ/HU2016/000023**

(87) **WO 2017/187210 2017.11.02**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ОПТИФИЛЬТЕР РИСЕРЧ ЗРТ. (HU)

(72) Изобретатель:
Сарваш Тибор (HU)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении описан сигаретный фильтр. В частности, настоящее изобретение относится к новому сигаретному фильтру, в котором используются натуральные материалы, которые не применялись ранее в этой области. Более конкретно настоящее изобретение относится к сигаретному фильтру, который может быть использован для адсорбции токсичных компонентов сигаретного дыма и для уменьшения повреждения тканей, вызываемого сигаретным дымом в органах дыхания, сердечно-сосудистой системе и слизистой оболочке. В особенности настоящее изобретение относится к сигаретному фильтру, содержащему альгинит.

B1

037893

037893

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к сигаретному фильтру. В частности, настоящее изобретение относится к новому сигаретному фильтру, в котором используются натуральные материалы, которые не применялись ранее в этой области. Более конкретно настоящее изобретение относится к сигаретному фильтру, который может быть использован для адсорбции токсичных компонентов сигаретного дыма и для уменьшения повреждения тканей, вызываемого сигаретным дымом в органах дыхания, сердечно-сосудистой системе и слизистой оболочке. В частности, настоящее изобретение относится к сигаретному фильтру, содержащему альгинит.

Уровень техники

Курение табака является широко распространенной вредной привычкой у людей, которая, как известно, приводит к серьезному и часто необратимому ущербу для здоровья. В настоящее время курение является одним из наиболее документально подтвержденных этиологических факторов, дающих вклад в развитие рака легких и хронического обструктивного заболевания легких (СОРД). Ущерб здоровью, вызванный курением, создает серьезные социальные и финансовые проблемы по всему миру. Например, только в странах ЕС преждевременная смерть более 500000 человек вызвана пагубными последствиями курения.

Примерно 50 лет назад управление начальника медицинской службы США выпустило свой первый отчет по курению и здоровью (U.S. Department of Health, Education and Welfare (Департамент здравоохранения, образования и социального обеспечения США), 1964). В этом отчете приводится оценка того, что для среднего курильщика вероятность развития рака легких в 9-10 выше по сравнению с некурящими, в то время как для заядлых курильщиков риск возрастает примерно двадцатикратно. Кроме того, в отчете указывается, что курение было основной причиной хронического бронхита и что существует связь между курением и эмфиземой, а также заболеваниями сердечно-сосудистой системы. Следует отметить, что хронический бронхит и эмфизема рассматриваются как два аспекта хронического обструктивного заболевания легких (СОРД). За последние 50 лет управление начальника медицинской службы США выпустило множество отчетов по курению и здоровью, часть из которых относится к специальным темам, таким как прекращение курения, курение при беременности и табачный дым во внешней среде. Последний отчет был выпущен в 2014 г. - ровно через 50 лет после первого отчета (U.S. Department of Health and Human Services (Департамент здравоохранения США), 2014). За последние 50 лет список заболеваний, связанных с курением, значительно расширился. Если сосредоточиться только на раке, в настоящее время имеются многочисленные типы рака, связанные с курением, помимо рака легких, включая раки верхних дыхательных путей (ротоглотки, глотки, трахеи и бронхов), рак желудка, рак печени, рак почек, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак ободочной и прямой кишки и острую миелоцитарную лейкемию. Кроме того, начальник медицинской службы США указывает, что, возможно, примерно 20 млн американцев скончались преждевременно за последние 50 лет из-за воздействия курения. Принимая во внимание тот факт, что пагубное влияние курения очевидно, ослабление этого воздействия является колоссальной проблемой здравоохранения, и явно целесообразно исследовать все меры, которые можно принять для снижения этой проблемы. Без сомнения, лучше всего перестать курить. Преимущества прекращения курения хорошо известны (см., например, Fagerstrom, 2002). Однако существует множество курящих, которые либо решают не бросать, либо которые считают, что бросить курить очень трудно. Хотя бросить курить было бы наиболее эффективным, использование новой технологии, такой как новые фильтры, которые эффективно удаляют вредные компоненты дыма, могут значительно сократить заболеваемость, связанную с курением табака. Вследствие этого любые меры, которые могут быть приняты для уменьшения влияния курения, должны приносить значительную пользу. Безусловно, наиболее очевидной попыткой смягчить воздействие курения на здоровье посредством модификации сигареты является добавление сигаретного фильтра. Однако использование фильтров было не слишком успешным.

Одним из самых первых предложений добавления фильтра к сигаретам без сомнений было сделано Ernst Wynder, эпидемиологом, который был одним из первых ученых, продемонстрировавших связь курения сигарет с раком легких. В ранних исследованиях Wynder с соавторами, опубликованных в 1988 г., оценивалось различие риска рака легких у курящих сигареты с фильтром и курящих сигареты без фильтра (Wynder and Rabat, 1988). В этом исследовании рассматривалось различие между этими двумя типами курящих в отношении раков по Крейбергу (Kreyberg) I (KI) и (Kreyberg) II (KII). (Номенклатура по Крейбергу использовалась в то время, при этом раки легких типа KI включали плоскоклеточную карциному легких, крупноклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких, в то время как раки легких типа KII включают только аденокарциному легких). Снижение примерно 45-50% было обнаружено и для мужчин, и для женщин относительно опухолей типа KI, хотя ни одно из них не было статистически значимым, в то время как лишь незначительное различие наблюдалось у мужчин, и вообще не было различия у женщин для опухолей типа KII. Сигаретные фильтры стали особенно популярны во второй половине 20-го столетия, причем число приблизительно 0,5% сигарет, проданных с фильтрами в 1950 г., возросло до 88,5% в 1976 г. В США (по данным Национального института по проблемам злоупотребления наркотиками (National Institute on Drug Abuse), 1977 г.). В настоящее время почти 100% сигарет, продаваемых во

всем мире, являются сигаретами с фильтром. За тот же самый период времени, когда использование фильтров резко возросло в США (1950-1976 гг.), измеренные машинным способом подачи смол при взвешивании для продаваемых сигарет снизились от 37 мг до 16 мг (Hoffmann D et al., 1996 г.). Снижение подачи смол за этот период было следствием двух тенденций. Первой, как упомянуто выше, было быстрое расширение использования сигарет с фильтром. Однако второй было следствие повышения эффективности фильтров со временем. Сигаретный фильтр по существу очень прост и состоит из пористого тампона данного материала, который может абсорбировать и смолы сигареты, и газообразную фазу. Хотя в некоторых из первых фильтров в качестве абсорбирующего материала использовалось бумажное волокно, в настоящее время в подавляющем большинстве фильтров используется волокно ацетата целлюлозы. Поэтому фильтр представляет собой просто бумажную трубку, заполненную ацетатом целлюлозы, которая присоединена к сигарете за счет использования внешней обертки. Повышение эффективности может быть достигнуто и путем увеличения массы ацетата целлюлозы в фильтре, и путем уменьшения диаметра нити. Оба эти способа могут быть осуществлены только к настоящему времени, однако, поскольку в конечном итоге сопротивление затяжке сигареты становится значительно больше, это изделие неприемлемо для потребителя. Способ, принятый практически всеми табачными компаниями для решения этой проблемы, состоит во введении перфораций во внешней обертке фильтра. Таким образом, курящий вдыхает смесь воздуха и дыма. Вентиляционные отверстия уменьшают сопротивление затяжке, и за счет втягивания воздуха, а также дыма дым разбавляется, и подача компонентов дыма снижается. Чем больше степень вентиляции, тем больше количество воздуха и меньше количество дыма, который вдыхается курящим. Хотя большинство экспертов соглашаются, что сигареты с фильтром снижают риск от курения, по меньшей мере, до некоторой степени по сравнению с сигаретой без фильтра, сигареты с низким содержанием смол, как они были названы, в которых подача смол снижена даже ниже, чем можно было бы достигнуть с помощью обычного сигаретного фильтра, по-видимому, не приводят к пользе для здоровья. Этот вывод был основан и на данных по населению, и на эпидемиологических исследованиях. Были представлены существенные данные, документально подтверждающие тот факт, что курящие значительно компенсируют курение "сигареты с низким содержанием смол" либо для поддержания уровня никотина, либо уровня вкуса, таким образом, увеличивая фактическую подачу дыма выше выхода при машинном курении. Кроме того, большое число ученых выражают мнение, что курящий может преднамеренно или нечаянно блокировать вентиляционные отверстия, таким образом, также значительно увеличивая подачу дыма (Департамент здравоохранения США (U.S. Department of Health and Human Services), 2001). Одним из осязаемых результатов этих рассмотрений является то, что для сигаретных пачек больше не допускается измерение выхода смол и никотина машинным способом, по меньшей мере, в США и ЕС. Несмотря на эти ограничения, еще можно разработать новые фильтры, которые позволяют снизить влияние курения на здоровье, в частности, если такие фильтры могут быть разработаны без необходимости вентиляции фильтров. Такие фильтры могут быть предназначены для селективного удаления специфической газовой фазы и рассматриваемых полуволетучих компонентов дыма. Важно отметить, что дым состоит из газовой фазы, полуволетучих компонентов и аэрозольной фазы. Составляющие, для которых очевидно воздействие на здоровье, могут быть обнаружены во всех трех фазах. В настоящее время нет технологии, которая обеспечивает селективную фильтрацию компонентов аэрозольной фазы; однако и компоненты газовой фазы, и полуволетучие компоненты могут селективно отфильтровываться. Превосходным примером такого фильтра, используемого в настоящее время в промышленных масштабах, является угольный фильтр. Практически весь рынок Японии состоит из сигарет с угольным фильтром, в то время как в Южной Корее такие изделия используют примерно 50% курящих. Большое число других технологических достижений были получены при разработке фильтров, но ни одно из них не используется в настоящее время в значительной степени промышленно. В настоящее время фильтр - это сегмент, встроенный непосредственно в сигарету на мундштучном конце, чтобы дым сигареты проходил через фильтр до попадания в дыхательные пути и легкие. В настоящее время только 3% всех сигарет в мире продаются без фильтра. Хотя количество вредных веществ, доходящих до курящего, может быть снижено за счет сигаретных фильтров, это в основном выполняется за счет простого снижения количества дыма, который достигает мундштучного конца сигареты. В большинстве случаев селективная фильтрация отсутствует или мала. Таким образом, исследователи сильно заинтересованы в создании сигаретного фильтра, который позволяет селективно удалять некоторые вредные составляющие дыма, чтобы уменьшить последствия курения.

Сигаретный дым содержит множество химически активных частиц, таких как карбонильные соединения с низким молекулярным весом, свободные радикалы, хиноны, цианистый водород, оксиды азота и ароматические амины, которые являются высокотоксичными, мутагенными и канцерогенными. Поэтому селективное снижение количества этих веществ в сигаретном дыме позволяет снизить риски для здоровья, вызванные курением.

Все в большей степени государственное регулирование требует более высокой эффективности фильтрации для снижения количества табачного дыма, подаваемого курящему. При использовании имеющихся в настоящее время фильтров из ацетата целлюлозы можно достичь некоторой селективности путем пропитки фильтра повышенными концентрациями частиц, аналогичных активированному углю,

или других натуральных веществ. Однако увеличение концентрации частиц меняет характеристики затяжки для курящих. Более того, частицы активированного угля в фильтре дают вклад в снижение количества вредных летучих веществ в сигаретном дыме, но из-за отсутствия непарных электронов они не могут обеспечивать требуемый дополнительный электрон для дополнения непарных электронов свободных радикалов. Поэтому углерод не подходит для борьбы с воздействием свободных радикалов на различные ткани, которое дает вклад в воспаление и другие вредные процессы в организме, запускаемые сигаретным дымом.

Одним важным свойством сигареты является защищенный от внешнего воздействия перепад давлений. Термин "защищенный от внешнего воздействия перепад давлений" или "EPD" относится к перепаду статического давления между двумя концами сигареты, когда ее пересекает поток воздуха при установленных условиях. Более высокие значения EPD передаются курящему, который делает затяжку на курительном устройстве с большим усилием.

Поскольку увеличение эффективности обычных фильтров увеличивается EPD фильтров, общество, и, следовательно, изготовители не спешат принимать эти изделия. Поэтому остается интерес к разработке улучшенных и более эффективных фильтров, которые минимально влияют на характеристики затяжки сигарет, при этом устраняя более высокие уровни некоторых составляющих в основном потоке табачного дыма, такие как перечисленные составляющие, а также окись углерода и фенолы.

Большинство наполнителей, используемых при изготовлении сигаретных фильтров - это ацетат целлюлозы, который обладает степенью замещения примерно 2,5 группы ацетата на одно ангидроглюкозное звено. При изготовлении ацетатный полимер обычно экструдирован в виде жгута волокна и смешивается с одним или более пластификаторами (например, триацетин, полиэтиленгликоль, глицерин). Обработка жгута ацетата целлюлозы предложена, например, в патентной публикации США № 2953838, Crawford et al., и патентной публикации США № 2794239, Crawford et al. Различные текучие среды могут быть впрыснуты в жгут волокна из множества нитей, используемый при изготовлении фильтров для табачного дыма. Этими текучими средами, которые могут быть использованы в жгутах отдельно или в комбинации с жидкими или газообразными носителями, могут быть ароматизаторы, средства для создания налета на жгутах, смазки, растворы для проклейки, составы для обработки, пластификаторы или подобное. Такие текучие среды предназначены, чтобы придавать требуемые физические или вкусовые характеристики сигаретному дыму посредством обработанного текучей средой жгута. Способы впрыскивания текучей среды описаны, например, в патентной публикации США № 5387285, Rivers.

Волокна ацетата целлюлозы, которые формируют элемент фильтра, обычно покрыты составом для покрытия волокон. Такие составы обычно представляют собой водные эмульсии, состоящие из нескольких компонентов. Каждый компонент может выполнять конкретную функцию либо при обработке волокон, либо при последующем использовании фильтра, сформированного из этих волокон. Типичные компоненты состава для обработки волокон включают смазочные масла для снижения трения, чтобы волокна можно было обрабатывать без разрыва, антистатические средства для снижения накопления заряда статического электричества на волокнах, и эмульгаторы для подавления разделения фаз в составе волокон при обработке. Другие вспомогательные компоненты могут включать противомикробные вещества, гидрофильные вещества или другие химически активные соединения. После сборки волокнистого жгута в материал готового фильтра, могут быть применены пластификаторы для смягчения волокна и обеспечения связей между волокнами для формирования фильтра, упрочненного до нужной степени прочности/плотности. Химический состав поверхности ацетата целлюлозы и пластификатора может обеспечивать аромат дыма, который в значительной степени нужен и принят курящими. Некоторые другие конструкции/составы фильтра могут обеспечивать другой аромат дыма. В настоящее время фильтры не из жгута ацетата целлюлозы в основном не приняты или не имеют коммерческого успеха.

Уровень техники включает несколько публикаций, относящихся к сигаретным фильтрам и различным усовершенствованиям, применяемым в них.

В публикации WO 2013/186938 предлагается сигаретный фильтр, содержащий тампон фильтра, содержащий штапельное волокно сложного эфира целлюлозы, техническую целлюлозу и соль щелочного металла водорастворимого анионного полимера. Тампон фильтра обладает содержанием щелочного металла от 2 до 100 мкмоль на грамм тампона фильтра. Водорастворимый анионный полимер может содержать по меньшей мере один элемент, выбранный из группы, состоящей из полиакриловой кислоты и полисахарида с карбоксильной группой.

В патентной публикации Японии № 3677309 предлагается материал сигаретного фильтра в форме листа с бумажной структурой и содержащий неизвитое штапельное волокно сложного эфира целлюлозы и рафинированную целлюлозу, причем рафинированная целлюлоза обладает степенью помола древесной массы в градусах Шоппер-Риглера от 20 до 90°SR, и неизвитое штапельное волокно ацетата целлюлозы является штапельным волокном со средней длиной волокон от 1 до 10 мм и толщиной от 1 до 10 денне. В этом документе описано, что при подготовке листового материала имеется связующее вещество (например, водорастворимый адгезив), связующее вещество может быть применено при условии, что оно не оказывает пагубного воздействия на здоровье, не ухудшает вкус и привлекательность табачного дыма, не может приводить к разрушению фильтрующего материала. В основном количество связующего вещества

предпочтительно минимально (например, не более 10% по весу от общего веса материала). В примере этого документа предлагается листовый материал, сформированный из неизвитого штапельного волокна ацетата целлюлозы и рафинированной целлюлозы по мокрому способу изготовления бумаги, который затем распыляется с водным раствором карбоксиметилцеллюлозы (3% по весу на основе сухого веса).

В публикации патентной заявки Японии № 7-75542 предлагается сигаретный фильтр, содержащий жгут волокна сложного эфира целлюлозы и водорастворимого полимера, который заключен в жгуте и связан с волокном, жгут при обработке имеет форму фильтрующего стержня с использованием не более 25 частей по весу воды по отношению к 100 частям веса жгута. Примеры в этом документе включают кончик сигаретного фильтра, полученный добавлением 5% по весу соли натрия карбоксиметилцеллюлозы в качестве водорастворимого полимера к открытому жгуту извитого волокна ацетата целлюлозы и подачей открытого жгута в оберточную машину для обертывания открытого жгута оберткой фильтра.

В публикации заявки на патент Японии № 8-322539 (Patent Document 3, JP-8-322539 A) предлагается сигаретный фильтр, содержащий нетканое полотно, состоящее из состава сложного эфира целлюлозы и связующего вещества с высокой дисперсностью воды, нетканое полотно обернуто в форме стержня. Примеры в этом документе включают тампон фильтра, полученный путем продувки проволочной сетки со штапельным волокном ацетата целлюлозы потоком воздуха для нанесения слоями или осаждения, и распыления напластованного слоями материала на проволоку с 10% по весу 5% водного раствора карбоксиметилцеллюлозы, спрессовывания и сушки мокрого многослойного материала, с последующей обработкой раскатыванием до плоского состояния полученного нетканого полотна, а затем обертывания полотна.

Международная публикация № WO 2014/164492 относится к противодымным фильтрам, которые уменьшают концентрацию окиси углерода и фенолов в потоке дыма. Указанные фильтры включают секцию пористой массы, содержащую множество активных частиц, множество частиц связующего вещества и активное покрытие, осажденное по меньшей мере на части активных частиц и частиц связующего вещества, причем активные частицы и частицы связующего вещества связываются вместе во множестве точек контакта; и фильтрующую секцию. В некоторых случаях фильтр может включать секцию пористой массы, содержащую множество активных частиц и множество частиц связующего вещества, причем активные частицы и частицы связующего вещества связываются вместе во множестве точек контакта без адгезива; и фильтрующую секцию, содержащую активную добавку. Хотя этот противодымный фильтр может давать улучшенные результаты, его изготовление скорее сложное, и используемые для достижения нужного эффекта фильтрации материалы дороги.

Высокоэффективный сигаретный фильтр предлагается в публикации WO 2010/125412. Сигаретный фильтр содержит, помимо обычных компонентов сигаретных фильтров, псевдобемит ($Al(OH)_3 \cdot H_2O$) и компоненты винограда, астаксантин и клюкву в качестве антиоксиданта. Предпочтительное действие сигаретного фильтра также обусловлено использованием компонентов винограда в виноградных косточках и в виде размолотой кожицы. Публикация WO 2010/125412 включена в настоящий документ во всей полноте в качестве ссылки.

Как упомянуто выше, хорошо известно, что курение является основной проблемой для здоровья людей и важным этиологическим фактором, дающим вклад в развитие рака легких и хронического обструктивного заболевания легких. Поэтому определение новых способов снижения вызванных сигаретами заболеваний легких принесло бы существенную пользу.

Соответственно целью настоящего изобретения является обеспечение сигаретного фильтра, который обладает преимуществами решений, уже существующих в этой области, но в то же самое время не имеет их недостатков в возможно большей степени. Другой целью настоящего изобретения является обеспечение сигаретного фильтра, который дополнительно снижает содержание вредных веществ сигаретного дыма по сравнению с известными сигаретными фильтрами.

К удивлению было обнаружено, что цели настоящего изобретения могут быть успешно достигнуты, если натуральное вещество, альгинит, не использовавшееся ранее для этой цели, применить в сигаретном фильтре.

В экспериментах показано, что значительное снижение количества вредных веществ в сигаретном дыме, по сравнению с имеющимися в настоящее время фильтрами, может быть достигнуто при использовании в фильтрах альгинита.

Подробное описание

Настоящее изобретение относится к сигаретному фильтру, который дополнительно снижает содержание вредных веществ сигаретного дыма по сравнению с известными сигаретными фильтрами. Указанные предпочтительные свойства также обусловлены использованием альгинита в сигаретных фильтрах. Альгинит может быть использован отдельно или в сочетании с другими веществами, уже используемыми в сигаретных фильтрах.

Альгинит - это осажденная горная порода, состоящая из биомассы микроскопических водорослей и туфа, вулканическая пыль, разукрупненная до отбеленной глины. В озерах прикарпатского бассейна интенсивная вулканическая активность имела место в плиоценовый период примерно 3-5 млн лет назад. Эта активность привела к созданию хорошо известных базальтовых гор, в то же самое время сформиро-

вав также особые кольца туфа. После прекращения вулканической активности кольца туфа были заполнены водой, тем самым формируя кратерные озера (маары). Вода кратерных озер была нагрета горячими источниками, и горячие растворы содержали воду, обогащенную микроэлементами, минеральными солями и другими питательными веществами. Элементы в минеральных коллоидах приводили к разрушению материала стекла вулканического туфа, дополнительно обогащенного питательными веществами кратерных озер. В спокойных водах кратерных озер скапливаются большие количества водорослей (особенно зеленой водоросли *Botriococcus braunii*) и других плавающих животных или растительных организмов. Скопившиеся растительные и животные организмы умирают и смешиваются с остатками листьев и пыльцы, вымываемой с плотной прибрежной растительности и осаждаемой на дно кратерных озер. В бескислородной среде вместе с измельченным туфом и мертвыми организмами планктона они скапливаются в виде разлагающегося ила (сапропель). В фазе заиливания кратерных озер тела более крупных животных вводились в теплый ил, в результате чего ил обогащался содержащими фосфор материалами. Эта обедненная и затвердевшая биомасса претерпевала особые физические и химические изменения в течение нескольких миллионов лет и сформировалась в виде ее современной формы: скального альгинита.

Альгинит представляет собой земную породу с глинистой структурой, состоящей из наблюдающихся местами отсоединяющихся пластинок, подобных листьям. Альгинит не оказывает токсичного воздействия (см. Др. Solti Gabor: *Az Alginit. Ismerteto tanulmany. Az Alginit a Mezogazdasagert es Kornyezvetvedelemert Alapitvany tevekennysege* (1993-2013) 2014). Он имеет серовато-зеленый (зеленый) или серый цвет, иногда переходящий в коричневато-желтый. Его пластинчатая структура может быть лучше видна при высыхании, и часто между пластинками можно обнаружить отпечатки растений или растительных остатков.

Его наиболее важным физическим свойством является то, что он может удерживать от 0,5 до 1,0 л воды на килограмм. Альгинит состоит на 80-90% из глины и илистых фракций с осадком, содержащим более грубые частицы около берега. В последней фазе заиливания кратеров (лагунах) содержание органического материала снижено, а содержание бентонита возрастает. Состав альгинита показывает сильное отклонение в образцах, взятых в одном и том же месте. Среднее содержание гумуса составляет 30%, иногда достигая 45%. Среднее содержание извести (в форме CaCO_3) составляет 33%, иногда достигая 40%. Доказано, что биомасса ископаемых остатков содержит 64 элемента. Это означает, что альгинит особенно богат макро- и микроэлементами, причем наиболее важными являются следующие: азот (N) - 0,5%, фосфор (в форме P_2O_5) - 0,6%, калий (в форме K_2O) - 0,9%, магний (Mg) - 1,0%. Типичными минеральными компонентами являются монтмориллонит, иллит, доломит, кальцит, арагонит, диоксид кремния, плагоклаз, сидерит, магнезит, пирит и ортоклаз. Помимо упомянутых выше более важными микроэлементами являются железо (Fe), магний (Mn), медь (Cu), цинк (Zn), кобальт (Co), никель (Ni), литий (Li), титан (Ti), хром (Cr) и кадмий (Cd). Одной из особых характеристик ингредиентов гумуса является биохимический эффект усиления роста растений. Когда альгинит используется в сельском хозяйстве, гуминовые кислоты оказывают ферментоподобное, а также гормоноподобное усиливающее воздействие, и посредством регуляции влагопоглощательной способности корней также опосредованное усиливающее воздействие на рост растения.

Альгинит находит широкое использование для различных целей. При разведении растений и фруктов альгинит может быть использован для мелиорации. Его однократное использование повышает плодородность почвы на 20-30% в первый год. Из-за его глинистых минералов искусственные удобрения должны быть использованы на более высоком уровне, поэтому повышается перенос фосфора, азота и калия из почвы в подпочвенные воды, реки и озера. Его действие длится в течение 4-6 лет. Альгинит является натуральным веществом, сохраняет свое количество бесконечно долго, он не может быть использован в избытке, и даже более высокие уровни использования не обладают каким-либо вредным воздействием. Альгинит также может быть использован в качестве садовой почвы в виде смесей. В смеси с другими натуральными веществами, аналогичными цеолиту, перлиту, торфу или базальту, без активных добавок, были подготовлены эффективные почвенные смеси. Использование альгинита приводит к увеличению величины урожая при разведении овощей и декоративных растений либо в саду, либо в пленочных теплицах во время сбора урожая. Альгинит также может быть использован в качестве заквасочной культуры в посадочных лунках для высокоствольных деревьев. Использование альгинита приводит к количественному увеличению на 6-13% и 20% более быстрому росту. Распыление суспензии с альгинитом осенью обладает эффектом защиты растений и помогает деревьям перезимовать, в то время как распыление весной обеспечивает защиту от насекомых вредителей. В результате распыления альгинита содержание марганца, железа, цинка и меди в растениях возрастает, причем содержание кальция во фруктах обеспечивает более выраженный вкус и более длительный срок годности. В животноводстве альгинит в сочетании с жидкими органическими удобрениями обеспечивает высокоэффективный продукт для использования в качестве дополнительной обработки органических удобрений или для их замены. Альгинит сокращает период разложения удобрения и может быть скомбинирован с другими питательными веществами. Смешивание альгинита с соломой дает более питательное удобрение и усиливает рост домашних животных и птицы. Альгинит также способствует защите окружающей среды. За счет его высокой адсорбирующей способности он эффективно связывает запахи стойла животных и уменьшает кон-

центрацию SO_2 и NH_3 в воздушном пространстве, см., например, патентную публикацию Венгрии № 189383: "Process for binding of gases with unpleasant smell produced by dissolving organic materials and for production of organic manure with high efficiency" ("Способ связывания газов с неприятным запахом, создаваемым растворением органических материалов, и получения органических удобрений с высокой эффективностью").

Использование альгинита человеком включает его использование в качестве грязей при проблемах с суставами, ревматизме и спортивных травмах, а также обладает преимуществом создания из него мази против ревматизма. Альгинит также полезен при лечении варикозного расширения вен и псориазе, а также используется для регенерации кожи и общего улучшения состояния кожи. Кроме того, альгинит также может быть использован в качестве основы для санитарного освежителя.

Альгинит можно найти в Венгрии, и он продается множеством венгерских компаний, например компанией Gerce-Alginit Kft, (Gerce, Hungary)

К удивлению, альгинит оказался эффективным в новой технической области. Наши исследования показали, что альгинит особенно эффективен при использовании с сигаретными фильтрами отдельно или в комбинации с другими известными компонентами, как указано далее. Неожиданно обнаружено, что использование альгинита в сигаретных фильтрах приводит к значительно менее реактивным соединениям кислорода (ROS) в слюне, значительно меньшему образованию ROS в сыворотке крови, меньшему повреждению эндотелия, меньшему повреждению эпителия легких, значительно более высокому уровню глутатиона, меньшему повреждению тканей легких и меньшему воспалению в тканях легких, указанные предпочтительные свойства подробно описаны далее.

Использование альгинита приводит к значительно менее реактивным соединениям кислорода (ROS) в слюне. Хотя слюна сама обладает некоторой концентрацией свободных радикалов, сигаретный дым вызывает повышение уровня свободных радикалов. По оценке имеется более 10^{14} свободных радикалов в одной затяжке сигаретного дыма (Church and Pryor, 1985; Church DF, Pryor WA, "Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications" (Химический анализ свободных радикалов сигаретного дыма и его токсикологические осложнения), Environ Health Perspect, 1985, 64:111-26). При условии, что эти свободные радикалы могут взаимодействовать с различными органическими веществами для создания ROS, неудивительно, что сигаретный дым повышает уровень ROS в слюне. Однако помимо радикалов, содержащихся в сигаретном дыме, значительное формирование радикалов, а также непосредственное возникновение ROS может быть результатом воспалительной реакции, вызванной сигаретным дымом, приводящей к повышению уровней нейтрофилов и макрофагов. (Messner and Bernhard, 2014; Messner B, Bernhard D, "Smoking and cardiovascular disease. Mechanisms of endothelial dysfunction and early atherosclerosis" ("Курение и сердечно-сосудистые заболевания. Механизмы эндотелиальной дисфункции и раннего атеросклероза"), Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34:509-15.) Была измерена антиокислительная способность необработанной слюны добровольцев, которые затем выкуривали по одной сигарете, после чего их слюну собирали повторно. Было измерено изменение уровня антиокислительной способности в слюне с использованием дыма от сигареты контроля. То же самое повторяли с разными фильтрами, содержащими только моноальгинит и четыре различные комбинации альгинита с кожей и косточками винограда (GSS), альгинита с особым оксидом Al, альгинита с цеолитом, альгинита с углеродом тех же самых фильтров в смеси 50-50%. Все комбинированные фильтры с альгинитом показали значительно меньшее снижение антиокислительной способности в слюне по сравнению с фильтром контроля. Присутствие только альгинита создавало значительное различие антиокислительной способности по сравнению с контролем, но все комбинированные сигареты были значительно лучше, чем только с одним альгинитом, явное доказательство того, что альгинит и комбинированные с ним вещества действуют синергически.

Использование фильтра с альгинитом вызывало значительно меньшее формирование ROS в сыворотке крови. Эксперимент, демонстрирующий это, был аналогичен эксперименту со слюной, но он проводился с сывороткой крови. Сама сыворотка обладает некоторой концентрацией свободных радикалов. Хотя сама сыворотка обладает некоторой концентрацией свободных радикалов, сигаретный дым вызывает повышение уровня свободных радикалов. По оценкам имеется более 10^{14} свободных радикалов в затяжке сигаретного дыма (Church and Pryor, 1985). Если учитывать, что свободные радикалы могут взаимодействовать с различными органическими субстратами для получения ROS, неудивительно, что сигаретный дым снижает антиокислительную способность сыворотки. Однако, помимо радикалов, содержащихся в сигаретном дыме, значительное формирование радикалов, а также непосредственное создание ROS могут возникнуть из-за воспалительной реакции, вызванной сигаретным дымом, приводящей к повышенным уровням нейтрофилов и макрофагов. (Messner and Bernhard, 2013). Была измерена антиокислительная способность необработанной сыворотки. Затем использовали курительную машину, чтобы направить весь сигаретный дым через трубочку сыворотки. Было измерено изменение антиокислительной способности в сыворотке с использованием дыма относительно сигареты контроля. То же самое повторяли с различными фильтрами, содержащими только моноальгинит и комбинацию альгинита с четырьмя различными фильтрующими материалами, т.е. альгинит - кожа и косточки винограда (GSS), альгинит - особый оксид Al, альгинит - цеолит, альгинит - уголь одних и тех же фильтров. Все фильтры,

содержащие альгинит, обнаружили значительно меньшее снижение антиокислительной способности в сыворотке по сравнению с фильтром контроля.

Использование альгинита создавало дым, который вызывал меньшее повреждение эндотелия. Клетки, которые выстилают внутреннюю поверхность кровеносных сосудов, называются эндотелиальными клетками. Эти клетки играют важную роль в защите сосудов. Когда эндотелий поврежден, что часто называется эндотелиальной дисфункцией, риски сердечно-сосудистых заболеваний возрастают. Поскольку дым, когда он покидает легкие через альвеолы, попадает в кровоток, происходит воздействие дыма на эндотелий, что приводит сначала к дисфункции эндотелия, хорошо известной, как критический первый этап в развитии связанного с курением сердечно-сосудистого заболевания (Ambrose and Barua, 2004; Ambrose JA, Barua RS, "The pathophysiology of cigarette и cardiovascular disease. An update" ("Патофизиология сигареты и сердечно-сосудистые заболевания. До настоящего времени"), J Am Coll Cardiol, 2004, 43:1731-7; Messner and Bernhard, 2014.) Было измерено повреждение эндотелиальных клеток, которое возникало при воздействии на эндотелиальные клетки всего дыма, по сравнению с необработанными клетками. Значительно меньшее повреждение клеток возникало, когда ту же самую клеточную линию подвергали воздействию дыма, отфильтрованного альгинитом, или дыма, отфильтрованного с комбинацией, содержащей альгинит.

Использование альгинита также давало дым, который вызывал меньшее повреждение эпителия легких. Эпителий легких представляет собой первую линию защиты по отношению к вдыхаемым токсичным веществам. Альвеолярные эпителиальные клетки в легких повреждаются при воздействии дыма вплоть до гибели клеток (Kosmider et al., 2011; Kosmider B, Messier EM, Chu HW, Mason RJ, "Human alveolar epithelial cell injury induced by cigarette smoke" ("Повреждение альвеолярных эпителиальных клеток человека, вызванное сигаретным дымом"), PLoS One, 2011, 6:e26059), что подтверждает снижение числа здоровых клеток по сравнению с необработанными клетками. Дым, отфильтрованный с альгинитом, вызывает значительно меньшее снижение числа здоровых клеток по сравнению с сигаретой контроля. Поскольку некротические эпителиальные клетки выделяют белки в легкие, что вызывает воспаление, которое в конечном итоге может привести к раку легких или COPD, защита эпителия фильтрами, содержащими альгинит и комбинацию четырех различных фильтрующих материалов в сочетании с ним (т.е. альгинит с кожицей и косточками винограда (GSS), альгинит - особый оксид Al, альгинит - уголь из тех же самых фильтров) явно приносит пользу здоровью курящих.

Уровни глутатиона были также значительно выше с отфильтрованным альгинитом сигаретным дымом по сравнению с сигаретой контроля. И линии эпителиальных клеток, и линии эндотелиальных клеток подвергали воздействию сигареты контроля и альгинита и комбинации альгинита с кожицей и косточками винограда (GSS), альгинита - особого оксида Al, альгинита - угля тех же самых фильтров, всего дыма такой сигареты с фильтром, содержащим альгинит. Определение уровней глутатиона указывало на значительно большие уровни глутатиона в клетках, подвергавшихся воздействию дыма от сигарет с фильтром с альгинитом по сравнению с сигаретой контроля. С учетом того, что хорошо известно, что глутатион защищает от окислительного стресса (Rahman and MacNee, 2000; Rahman I, MacNee W, "Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation" ("Окислительный стресс и регуляция глутатиона при воспалении легких"), Eur Respir J, 2000, 16:534-54), это означает, что содержащие альгинит фильтры лучше защищают природный защитный механизм легких от вызванного окислительным стрессом повреждения тканей легкого, чем сигарета контроля.

Дым при фильтрации альгинитом вызывает меньшее повреждение в тканях легких и меньшее воспаление по сравнению с дымом сигареты контроля. Трехмерная ткань легких, обозначенная как сфероиды, сконструирована из клеток человека с известным профилем, а именно эпителиальных клеток легких, фибробластов, эндотелиальных клеток и макрофагов. Трехмерная конструкция позволяет клеткам развивать функциональную организацию, аналогичную найденной в их эквивалентах в условиях *in vivo*. 3D модель обеспечивает гораздо лучшую экспериментальную модель для моделирования условий *in vivo*, чем обычные (2D) системы из монокультуры-монослоя. Биохимический профиль культуры 3D ткани поразительно похож на профиль живого организма. 3D сфероиды реагируют на внешние стимулы аналогично живой периферической ткани легких. Их воспалительная реакция почти идентична, и они также создают сурфактант. Когда эти 3D сфероиды подвергаются воздействию сигаретного дыма, отфильтрованного через новые сигаретные фильтры с альгинитом, уровень цитокинов IL-8 и IL-6, известных как медиаторы воспаления, выражен в значительно меньшей степени по сравнению с сигаретами контроля.

Как упомянуто выше, альгинит может быть использован в фильтрах по настоящему изобретению отдельно или в комбинации с другими веществами, используемыми в сигаретных фильтрах до даты регистрации заявки на настоящее изобретение. Такие материалы, а также их изготовление и использование известны специалистам в этой области.

Например, когда в отношении сигаретных фильтров упомянуты "уголь", или "виноград", или "компоненты винограда", они означают активированный уголь и виноградные косточки и протертую или молотую кожицу, хотя по предшествующему уровню техники для специалистов очевидно, что компоненты винограда могут присутствовать также в других формах. Эти компоненты, а также их пригодность хорошо известны специалистам в этой области.

В настоящем документе данное изобретение изложено более подробно посредством следующих примеров. Примеры приводятся только для целей иллюстрации. По этим примерам специалисту будет легко понять, что альгинит, даже используемый отдельно, обладает значительно лучшими характеристиками фильтрации по сравнению с известными фильтрующими материалами. Кроме того, примеры, содержащие данные в отношении комбинаций альгинита и некоторых фильтрующих материалов, относящихся к предшествующему уровню техники, поясняют для специалистов в этой области, что альгинит действует синергически с другими фильтрующими материалами. В отношении указанных материалов приводится ссылка, например, также на ловушки свободных радикалов, предложенные в публикации WO 2010/125412, упомянутой выше и включенной в настоящий документ в качестве ссылки. Поэтому, хотя не все комбинации, содержащие альгинит, перечислены в этих примерах, для специалиста очевидно, что комбинации добавок к альгиниту могут быть заменены произвольным образом другими фильтрующими материалами, и что все такие комбинации охватываются объемом настоящего изобретения.

Пример 1. Использование альгинита вызывает значительно меньшее повышение антиокислительного состояния в слюне и сыворотке, эксперименты Технологического университета Бухареста (BUT).

Целью настоящего исследования было исследование влияния различных фильтров на способность сигаретного дыма менять антиокислительное состояние образцов (сыворотка и слюна). Измерения образцов сыворотки проводили с пробами TAS компании RANDOX®. Образцы сыворотки подготавливали восстановлением лиофилированной сыворотки, которые затем измеряли либо после восстановления (пустая проба), либо после пропускания через них пузырьков отфильтрованного сигаретного дыма. Общее антиокислительное состояние слюны измеряли до и после курения обычных или исследуемых сигарет, снабженных фильтрами по настоящему изобретению. Данные, полученные в этих экспериментах, могут отражать способность связывания свободных радикалов и ROS фильтров.

Материалы и способы

Измерения антиокислительного состояния с бензидиновой пробой и комплектом для общего антиокислительного состояния (TAS) компании Randox®.

Измерения антиокислительного состояния проводили с помощью широко принятой бензидиновой пробы и имеющегося в продаже комплекта для общего антиокислительного состояния (TAS) компании Randox®. В бензидиновой пробе используется система генерирования перекиси водорода (перекись водорода и пероксидаза) и чувствительный к перекиси водорода хромоген (бензидин). Генерируемые в натуральных условиях испытаний пероксидазы реагируют с хромогеном для получения промежуточного соединения с пиком поглощения при 620 нм, регистрируемым спектрофотометром.

Антиоксиданты, присутствующие в образце, конкурируют с хромогеном в его реакциях с пероксидами и препятствуют генерированию регистрируемого сигнала. Путем сравнения формирования регистрируемого хромогена образцов с отрицательным контролем без антиоксидантов и с положительным контролем с известной концентрацией антиоксидантов, можно оценить антиокислительное состояние образцов.

Используемые реагенты и инструменты

Реагент А (растворен в дистиллированной воде II типа):

155 ммоль хлорида натрия (компания Reanal, № по каталогу 24640-1-08-38);

25 мЕд/мл пероксидазы из хрена (компания Sigma®, № по каталогу 77332);

233 мкмоль дигидрохлорида бензидина (компания Sigma®, № по каталогу B3383).

Реагент В (растворен в дистиллированной воде II типа):

250 мкмоль перекиси мочевины (компания Sigma®, № по каталогу 289132).

Образцы

Образцы слюны брали у 17 человек до и после курения сигарет. Добровольцы были приглашены лабораторией OF Laboratories в Университете технологии и экономики Будапешта. Каждый доброволец был приглашен в 8-9 ч утра для сбора слюны, курения сигареты и повторного сбора слюны. Каждое утро выкуривалась одна пробная сигарета и собиралась слюна. Каждый доброволец выкуривал 4 различные сигареты (различавшиеся фильтрами); две между 4 и 7 декабря 2015 г. и две между 5 и 8 января 2016 г. Курящим было указано сообщать о курении без приема какой-либо пищи или жидкости в это утро, а также без чистки зубов. Слюну замораживали и передавали для оценки в лабораторию BUT laboratories.

Мужчины		Женщины	
14 человек		3 человека	
Курящий	Некурящий	Курящий	Некурящий
12	2	2	1

Возраст		Возраст	
18-24 года	6 человек	18-24 года	2 человека
25-40 лет	4 человека	25-40 лет	0 человек
41-59 лет	3 человека	41-59 лет	1 человек
60+ лет	1 человек	60+ лет	0 человек

Образцы сыворотки восстанавливали из лиофилированной сыворотки (компания Analyticon Controlm® PLUS) в соответствии с указаниями изготовителя в дистиллированной воде II типа. Образцы сыворотки либо измеряли непосредственно (пустая проба), либо после пропускания пузырьков отфильтрованного сигаретного дыма через сыворотку компании OptiFilter. Сигареты выкуривали с использованием линейной курительной машины с 8 портами SM302 компании Filtrona. Сигареты выкуривали в соответствии со стандартом ISO 3308 со 100% блокировкой вентиляционных отверстий фильтра. Дым пропускали через кембриджский фильтр (фильтр из стекловолокна 44 мм, номер артикула: 80202851, компания Borgwaldt KC), и полученную газообразную фазу пропускали через силиконовую трубку и в виде пузырьков в стеклянную емкость (поглотительный прибор), содержащий 1,5 мл раствора сыворотки. После каждой сигареты набивку кембриджского фильтра заменяли новой, после каждой сигареты силиконовую трубку заменяли новой. Фильтры были помечены 1-3.

Контроль и измерительные инструменты:

отрицательный контроль (дистиллированная вода II типа);

положительный контроль (Стандарт калибровочного устройства из комплекта общего антиокислительного состояния компании Randox® № по каталогу NX 2332);

комплект общего антиокислительного состояния компании Randox®;

спектрофотометр (спектрофотометр с микропластинками Thermo Scientific™ Multiskan™ GO).

Способ бензидиновой пробы

Измерения проводили со спектрофотометром с микропластинками, описанным выше, клетки термостатировали при температуре 37°C на пластинке с 96 лунками. Реакционная смесь на микропластинке была подготовлена следующим образом: 5 мкл образца или контроля и 250 мкл реагента А переливали пипеткой в лунки. Смесь затем гомогенизировали и считывали показания по считывающему устройству с микропластинок. Исходное показание коэффициента поглощения при длине волны $\lambda=620$ нм определяли до добавления 50 мкл реагента В, чтобы инициировать генерирование перекиси, после чего показания коэффициента поглощения определяли при длине волны $\lambda=620$ нм в течение от 0 до 3 мин. Результатами по коэффициенту поглощения были приняты измеренные значения коэффициента поглощения при времени 2,5 мин. Все образцы и контроль хранили на льду, и каждый образец измеряли в 3 параллельных лунках для статистического анализа.

Способ комплекта для общего антиокислительного состояния (TAS) компании Randox®

Измерения проводили в соответствии с предоставленным руководством, используя описанный выше спектрофотометр с микропластинами. За счет использования микропластинки вместо кюветы все требуемые объемы реагентов были уменьшены в 4 раза. Это привело к окончательному объему реакции 305 мкл, который был получен добавлением 5 мкл образца или контроля, 250 мкл реагента А и 50 мкл реагента В, как указано в руководстве.

Материал сигареты

Использованные в эксперименте сигареты были предоставлены компанией OptiFilter Zrt. Характеристики и изготовление сигарет были следующими. Референтные сигареты 3R4F из Кентукки были изготовлены и собраны в Университете Кентукки, штат Кентукки, США. Референтные сигареты были предоставлены компании OptiFilter Zrt венгерской корпорацией Celanese Corporation, Narrows, VA, US. Сигаретные фильтры были собраны и пробные сигареты были изготовлены компанией OptiFilter Zrt. Сигаретные фильтры компании CellFx были изготовлены и предоставлены компанией Celanese Corporation. Они содержали различные фильтрующие материалы, иногда в смеси. Дополнительные материалы ацетатного фильтра с другими характеристиками плетения, чтобы получить другие значения перепада давлений, были изготовлены и предоставлены компанией Celanese Corporation. Ацетатные части (2,9/41,000) 27 мм фильтров референтных сигарет 3R4F из Кентукки (KRC) вынимали и выбрасывали. Стержни фильтров, изготовленные по технологии CellFx компании Celanese, содержали различные материалы наполнителей. Один выбранный стержень фильтра был введен обращенным к горячей поверхности сигареты, и дополнительная ацетатная часть была выбрана и введена в фильтр, обеспечивая, чтобы значение перепада давлений (общее сопротивление затяжке) сигареты (вентиляция фильтра закрыта) было тем же самым, что и значение перепада давлений KRC (сопротивление затяжке 170 мм H₂O±2%). Стержни компании Celanese были длиной 12 мм. Ацетатные части были длиной 15 мм.

Общая длина фильтра составляла 27 мм.

Описание фильтров, использованных в эксперименте

Слюна	Описание фильтра	Аббревиатура
Фильтр 1	Референтная сигарета контроля из Кентукки	Kent. Ref.
Фильтр 2	Стержень Celanese 12 мм: уголь	CelRod-12-C
Фильтр 3	Стержень Celanese 12 мм: 50% альгинита и 50% винограда	CelRod-12-AG
Сыворотка	Описание фильтра	Аббревиатура
а		
Фильтр 1	Референтная сигарета контроля из Кентукки	Kent. Ref.
Фильтр 2	Стержень Celanese 12 мм: уголь	CelRod-12-C
Фильтр 3	Стержень Celanese 12 мм: 50% альгинита и 50% винограда	CelRod-12-AG

Результаты

Во время испытаний, проводимых на слюне и сыворотке, были получены следующие результаты.

Эксперименты с сывороткой

Образец		Состояние ROS	Антиокислительная способность	Изменение антиокислительного состояния
Сыворотка 1	Пустая	33%	67%	
	Фильтр 1	44%	56%	-16%
	Фильтр 2	47%	53%	-21%
Сыворотка 2	Пустая	21%	79%	
	Фильтр 3	30%	70%	-11%

Изменение антиокислительного состояния показано на фиг. 1.

Измерения проводили в пяти повторяющихся опытах. Результаты указывают, что фильтр 3 лучше сигареты контроля (фильтр 1).

Результаты измерений образца слюны с бензидиновой пробой

Измерения выполняли для 17 человек. Каждый образец, полученный от испытуемых, измеряли 3 раза.

		Среднее снижение антиокислительного состояния
Фильтр 1	Снижение антиокислительного состояния	29%
Фильтр 2	Снижение антиокислительного состояния	33%
Фильтр 3	Снижение антиокислительного состояния	12%

Статистический анализ эксперимента со слюной

Оценка статистической значимости изменений антиокислительного состояния до и после курения сигареты проводили с использованием испытаний подобранной пары Wilcoxon (StatSoft-STATISTICA10). Результаты считались значимыми при $p < 0,05$.

Пара переменных	Испытание подобранной пары Wilcoxon Помеченные испытания были значимы при $p < 0,05000$			
	Достоверное N	T	Z	Значение-p
До фильтра 1 и после фильтра 1	17	15,5000	2,8876	0,0038

Изменение антиокислительного состояния до и после курения фильтра 1 является значительным. Результаты, полученные по испытаниям, указывают большую статистическую разницу.

Пара переменных	Испытание подобранной пары Wilcoxon Помеченные испытания были значимы при $p < 0,05000$			
	Достоверное N	T	Z	Значение-p
До фильтра 2 и после фильтра 2	17	8,0000	3,2426	0,0011

Изменение антиокислительного состояния до и после курения фильтра 2 является значительным. Результаты, полученные по испытаниям, указывают большую статистическую разницу.

Пара переменных	Испытание подобранной пары Wilcoxon Помеченные испытания были значимы при $p < 0,05000$			
	Достоверное N	T	Z	Значение-p
До фильтра 3 и после фильтра 3	17	37,5000	1,8461	0,0648

Нет статистически значимого изменения антиокислительного состояния до и после курения фильтра 3; хотя имеется заметное различие ($p = 0,065$), оно не достигает порогового значения для статистической значимости.

Оценка статистической значимости изменений антиокислительного состояния, вызванных курением различных сигарет, проводилась с использованием испытаний подобранных пар Wilcoxon (StatSoft - STATISTICA10). Результаты считались значимыми при $p < 0,05$.

Пара переменных	Испытание подобранной пары Wilcoxon Помеченные испытания были значимы при $p < 0,05000$			
	Достоверное N	T	Z	Значение-p
Фильтр 1 и фильтр 2	17	66,0000	0,4970	0,6191

Изменение антиокислительного состояния между фильтрами 1 и 2 было незначимым.

Пара переменных	Испытание подобранной пары Wilcoxon			
	Помеченные испытания были значимы при $p < 0,05000$			
	Достоверное N	T	Z	Значение-p
Фильтр 1 и фильтр 3	17	29,0000	2,2485	0,0245

Изменение антиокислительного состояния между фильтрами 1 и 3 было значимым.

Представление результатов снижения антиокислительного состояния с использованием коробчатой диаграммы

Соответствующая коробчатая диаграмма для нескольких переменных показана на фиг. 2. Точки выброса данных показаны отдельно (StatSoft - STATISTICA10).

Выводы

Результаты показывают, что сигаретный дым, который прошел либо через фильтр 1, либо через фильтр 2, снижал антиокислительное состояние сыворотки на 15-20%. Фильтр 3 задавал значительно меньшее снижение антиокислительной способности по сравнению с контролем.

Показания коэффициента поглощения образцов слюны сравнивали с положительным и отрицательным контролем для оценки антиокислительного статуса. Результаты указывают, что сигаретный дым, который прошел через фильтр 1 и 2, снижал антиокислительное состояние слюны примерно на 30%, что было принято как статистически значимое, в то время как фильтр 3 обнаружил снижение на 12%, статистически значимое по сравнению с сигаретой контроля. Эти результаты согласуются с результатами измерений сыворотки. Результаты показывают, что компоненты фильтров по настоящему изобретению обладают значительным воздействием на способность дыма сигареты менять антиокислительное состояние образцов при описанных условиях испытаний.

Пример 2. Использование альгината вызывает значительно меньшее повышение антиокислительного состояния в слюне и сыворотке, эксперименты проф. Tibor Szarvas (Тибор Зарваса).

Воздействие на слюну и сыворотку сигаретного дыма, прошедшего через фильтры по настоящему изобретению, также проверено в дополнительном эксперименте следующим образом.

Материалы и способы

Использованными в эксперименте сигаретами были референтные сигареты 3R4F из Кентукки, изготовленные и собранные в Университете Кентукки, Кентукки, США. Испытуемые сигареты были предоставлены компании OptiFilter Zrt венгерской компанией Celanese Corporation, Narrows, VA, US. Сигаретные фильтры были собраны, и пробные сигареты были изготовлены компанией OptiFilter Zrt. Стержни фильтров CellFx были подготовлены и предоставлены компанией Celanese Corporation. Они содержали различные фильтрующие материалы, иногда в смеси. Дополнительные материалы ацетатного фильтра с другими характеристиками плетения, чтобы получить другие значения перепада давлений, были изготовлены и предоставлены компанией Celanese Corporation Kentucky Reference. Ацетатные части (2,9/41,000) 27 мм фильтров 3R4F референтных сигарет из Кентукки (KRC) вынимали и выбрасывали. Стержни фильтров, изготовленные по технологии CellFx компании Celanese, содержали различные материалы наполнителей. Один выбранный стержень фильтра был введен обращенным к горячей поверхности сигареты, и дополнительная ацетатная часть была выбрана и введена в фильтр, обеспечивая, чтобы значение перепада давлений (общее сопротивление затяжке) сигареты (вентиляция фильтра закрыта) было тем же самым, что и значение перепада давлений KRC (сопротивление затяжке 170 мм H₂O±2%). Стержни Celanese были длиной 10, 12 или 15 мм. Ацетатные части были длиной 17, 15 или 12 мм. Общая длина фильтров составляла 27 мм. Сигареты, снабженные стержнями фильтров CellFx, содержащими различные материала наполнителей, измеряли и сравнивали с контролем при их биологической оценке.

В экспериментах использовали следующие фильтры.

Описание фильтра	Аббревиатура
Лунки: 100 мг, (33-67) Al-O-Виноград	Cav-100-ALOG
Лунки: 150 мг, 50-50%, альгинит и виноград	Cav-150-AG
Лунки: 150 мг, 50-50%, цеолит и виноград	Cav-150-ZG
Лунки: 160 мг, 50-50%, Al-O и виноград	Cav-160-ALOG
Лунки: 160 мг, (20% каждый), Al-O+виноград+альгинит+цеолит+уголь	Cav-160-ALOGAZC
Лунки: 200 мг: (120-80 мг), Альгинит-виноград	Cav-200-AG
Стержень Celanese 10 мм, 50-50%, стержень из альгинита-угля	CelRod-10-AC
Стержень Celanese 10 мм: стержень только из угля	CelRod-10-C
Стержень Celanese 12 мм: 50-50%, альгинит и виноград	CelRod-12-AG
Стержень Celanese 12 мм: уголь	CelRod-12-C
Стержень Celanese 15 мм: 50-50%, альгинит и уголь	CelRod-15-AC
Стержень Celanese 15 мм: 50-50%, альгинит и виноград	CelRod-15-AG
Референтная сигарета контроля из Кентукки	KRC

Экспериментальная модель

Сигареты выкуривали в лаборатории OF Университета технологии и экономики, Будапешт, в линейной курительной машине с 8 портами Filtrona SM302 в соответствии с протоколом ISO 3308. Сигареты выкуривали с заблокированными вентиляционными отверстиями фильтра. Сигаретный дым пропускали через кембриджский фильтр (фильтр из стекловолокна 44 мм, артикул № 80202851, компании Borgwaldt KC), и полученную газообразную фазу направляли через силиконовую трубку и собирали в виде пузырьков в стеклянную емкость (поглотительный прибор), содержащий 1,5 мл раствора сыворотки. После каждой сигареты набивку кембриджского фильтра заменяли новой и после каждой сигареты силиконовую трубку заменяли новой.

Измерение антиокислительной способности сыворотки

Для оценки способности связывания свободных радикалов новых экспериментальных сигаретных фильтров использовали два способа.

1) Randox - полный комплект антиоксидантов (продается компанией Randox Lab. Ltd., Crumlin, Великобритания).

2) HRP - пероксид-бензидиновая проба.

Контрольную сыворотку Controponm Plus поставляла компания Analyticon Biotechnologies AG, Германия. Курение сигарет и обработку сыворотки дымом выполняли в лаборатории OF Университета технологии и экономики Будапешта, и считываемые испытания проводил д-р Царвас (Szarvas) в Центральном исследовательском институте физического студгородка (Physics Campus), в энергетическом центре Академии наук Венгрии, Будапешт. Использовали свежеприготовленные реагенты. Сыворотку контроля растворяли в 5 мл дважды дистиллированной воды. После пропускания сигаретного дыма (1 сигарета) через кембриджский фильтр полученную газовую фазу в виде пузырьков собирали в 1,5 мл растворенной сыворотки в соответствии с протоколом ISO 3308 при заблокированных вентиляционных отверстиях фильтра. Затем 20 мкл обработанной сыворотки смешивали, и реакция начиналась с 200 мкл реагента 2 (состав представлен далее). Изменение коэффициента поглощения измеряли через 3 мин. Коэффициент поглощения пузырьков сыворотки сравнивали с коэффициентом поглощения необработанной контрольной сыворотки. Значение пустой пробы определяли без контрольной сыворотки с использованием 20 мкл дважды дистиллированной воды. Измерения также были выполнены на устройстве считывания пластинок (параметры: 5 мкл сыворотки, 250 мкл реагента R1, 50 мкл реагента R2).

Анализ по Randox для определения общего антиокислительного состояния сыворотки

Принцип анализа: ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфонат) термостатировали с пероксидазой (метмиоглобин) и H₂O₂ для получения радикал-катиона ABTS⁺. Это дает относительно ста-

бильный сине-зеленый цвет, который измеряется при 600 нм. Антиоксиданты в добавленном образце вызывают подавление этого цвета до степени, пропорциональной их концентрации.

Образец: контрольная сыворотка Contronorm

Реагент	Состав	Конц. при испытаниях
R1	Буфер Фосфорно-солевой буферный раствор	80 ммоль/л, рН 7,4
R2	Хромоген Метмиоглобин	6,1 мкмоль/л
R3	Субстрат Перекись водорода (в стабилизированной форме)	250 мкмоль/л
CAL	Стандарт 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота	Зависит от партии

Процедура

Длина волны: 600 нм.

Кювета: световой путь 1 см.

Температура: +37°C.

Измерение: против воздуха.

Дважды дистиллированную воду смешивали с 1 мл реагента R2. Стандарт смешивали с 1 мл реагента R2. Образец смешивали с 1 мл реагента R2. Каждый раствор хорошо перемешивали, термостатировали для достижения необходимой температуры и считывали исходный коэффициент поглощения (A1). К каждому раствору добавляли 200 мкл реагента R3. Перемешивание и таймер запускали одновременно. Коэффициент поглощения считывали точно через каждые 3 мин (A2). Общее антиокислительное состояние, выраженное в %, устанавливали по сравнению со значением "реагент - сыворотка".

Анализ пероксидазы из хрена - бензидиновая проба

Реагент 1: HRP (пероксидаза из хрена) 9000 Ед/л, бензидингидрохлорид 233 мкмоль/л.

Хлорид натрия: 155 ммоль/л.

Реагент 2: перекись мочевины 0,36 ммоль/л.

Растворитель: дважды дистиллированная вода.

Прибор: спектрофотометр UV-VIS (УФ-видимый свет), температура 25°C.

Использовали свежеприготовленные реагенты. Сыворотку контроля растворяли в 5 мл дважды дистиллированной воды. После пропускания сигаретного дыма (1 сигарета) через кембриджский фильтр полученную газовую фазу в виде пузырьков собирали в 1,5 мл растворенной сыворотки в соответствии с протоколом ISO 3308. Вентиляционные отверстия фильтра были заблокированы. Затем 20 мкл раствора обработанной сыворотки смешивали с 1 мл реагента 1 и гомогенизировали, и реакция начиналась с 200 мкл реагента 2. Изменение коэффициента поглощения при длине волны 620 нм измеряли через 3 мин. Изменение коэффициента поглощения измеряли через 3 мин. Коэффициент поглощения пузырьков сыворотки сравнивали с коэффициентом поглощения контрольной сыворотки до реакции. Значение пустой пробы определяли без контрольной сыворотки с использованием 20 мкл дважды дистиллированной воды. Результаты экспериментов представлены в таблицах. Измерения также были выполнены на устройстве считывания пластинок (параметры: 5 мкл сыворотки, 250 мкл реагента R1, 50 мкл реагента R2).

Результаты

I. Анализ пероксидазы из хрена - бензидиновая проба

ТИП	АББРЕВИАТУРА	Выработка радикала реактивного О (%)	Антиокислительная способность для реагента (%)	Улучшение по сравнению с контролем (%)
Референтная сигарета контроля из Кентукки	KRC	64,7	35,3	
Celanese: Угольный моно стержень (длиной 10 мм)	CelRod-10-C	56	44	25
Celanese: стержень альгинит-уголь	CelRod-10-AC	37,3	62,7	78
Cavity 200 мг: Альгинит-виноград	Cav-200-AG	38,2	61,8	75
((120-80 мг)				
Cavity: Al-O-виноград	Cav-100-ALOG	59,1	40,9	16
Стержень Celanese: Альгинит-виноград (длиной 15 мм)	CelRod-15-AG	35,2	64,8	84
Cavity: Альгинит-виноград	Cav-150-AG	44,7	55,3	57

Антиокислительная способность и улучшение по сравнению с контролем показаны на фиг. 3 и 4 соответственно.

2. Сравнение фильтров cavity и CelFх по настоящему изобретению в сыворотке
Анализ пероксидазы из хрена - бензидиновая проба

ТИП	АББРЕВИАТУР А	Выработка радикала реактивного о (%)	Антиокислительна я способность для реагента (%)	Улучшение по сравнению с контролем (%)
Референтная сигарета контроля из Кентукки	KRC	76	24	
Cavity:160 мг, Al- O+виноград+Аль гинит+Цеолит+У голь	Cav-160- ALOGZC	60	40	64
Cavity:160 мг, 50% Al-O и 50% виноград	Cav-160- ALOG	65	36	47
Cavity 150 мг: 50% Цеолит и 50% виноград	Cav-150-ZG	74	26	7
Cavity: 150 мг, 50% Альгинит и 50% виноград	Cav-150-AG	45	55	129
Стержень Celanese 15 мм: 50% Альгинит и 50% виноград	CelRod-15- AG	69	31	27
Стержень Celanese 15 мм: 50% Альгинит и 50% уголь	CelRod-10- AC	45	55	126

Антиокислительная способность и улучшение по сравнению с контролем показаны на фиг. 5 и 6 соответственно.

3. Анализ Radox

Эксперимент с сывороткой повторяли по методологии комплекта антиоксидантов Radox. Результаты показаны далее.

Образцы	Аббревиатура	Кэфф. поглощения	Выработка радикала реактивного (%)	Антиокислительная способность (%)	Снижение антиокислительной способности для сыворотки (%)	Улучшение по сравнению с контролем (%)
Реагент (Radox)		0,256	100			
Калибровочный стандарт		0,005	1,9	98,1		
Сыворотка	Serum	0,136	53,1	46,9		
Контрольная референтная сигарета из Кентукки	KRC	0,151	58,9	41,1	12	
Стержень Celanese 12 мм: 50% альгинита и 50% винограда	CelRod-12-AG	0,123	48,04	51,96	-11	187
Стержень Celanese 12 мм: Уголь	CelRod-12-AC	0,154	60,1	39,9	15	-21
Cavity: 200 мг, Альгинит-виноград (120-80 мг)	Cav-200-AG	0,145	53,9	46,1	2	86

Антиокислительная способность, изменение антиокислительной способности для контрольной сыворотки и изменение антиокислительной способности для сигареты из Кентукки показаны на фиг. 7, 8 и 9 соответственно.

Результаты для сыворотки с методологией Radox подтвердили, что фильтры по настоящему изобретению и в структурах CellFx, и в лунках значительно улучшают антиокислительное состояние, запускаемое сигаретным дымом в газообразной фазе. Учитывая, что сигаретный дым попадает в кровоток че-

рез считанные секунды после вдыхания, использование фильтра по настоящему изобретению может обеспечивать более здоровое состояние эндотелия у курящих.

Измерение антиокислительной способности слюны

Чтобы оценить изменение состояния свободных радикалов слюны после курения и сравнить изменения, запускаемые сигаретами с различными фильтрами, измеряли и сравнивали слюну курящих.

Материалы и способы

Использованными в эксперименте сигаретами были референтные сигареты 3R4F из Кентукки, изготовленные и собранные в Университете Кентукки, Кентукки, США. Испытуемые сигареты были предоставлены компании OptiFilter Zrt венгерской корпорацией Celanese Corporation, Narrows, VA, US. Сигаретные фильтры были собраны, и пробные сигареты были изготовлены компанией OptiFilter Zrt. Стержни фильтров компании CellFх были изготовлены и предоставлены компанией Celanese Corporation. Они содержали различные фильтрующие материалы, иногда в смеси. Дополнительные материалы ацетатного фильтра с другими характеристиками плетения, чтобы получить другие значения перепада давлений, были изготовлены и предоставлены компанией Celanese Corporation. Ацетатные части (2,9/41,000) 27 мм фильтров 3R4F референтных сигарет из Кентукки вынимали и выбрасывали. Стержни фильтров, изготовленные по технологии CellFх компании Celanese, содержали различные материалы наполнителей. Один выбранный стержень фильтра был введен обращенным к горячей поверхности сигареты, и дополнительная ацетатная часть была выбрана и введена в фильтр, обеспечивая, чтобы значение перепада давлений (общее сопротивление затяжке) сигареты (вентиляция фильтра закрыта) было тем же самым, что и значение перепада давлений KRC (сопротивление затяжке 170 мм H₂O ±2%). Стержни Celanese были длиной 10, 12 или 15 мм. Ацетатные части были длиной 17, 15 или 12 мм. Общая длина фильтра составляла 27 мм. Сигареты, снабженные стержнями фильтров CellFх, содержащими различные материалы наполнителей, измеряли и сравнивали с контролем в этой биологической оценке.

Экспериментальная модель

Образцы слюны брали у 38 человек до и после курения сигареты. Добровольцев набирала лаборатория OF Laboratories при Университете технологии и экономики Будапешта. Каждый доброволец был приглашен в 8-9 ч утра для сбора слюны, курения сигареты и повторного сбора слюны. Каждое утро выкуривалась одна пробная сигарета, и была собрана слюна. Каждый доброволец выкуривал 4 различные сигареты (различавшиеся фильтрами) между 19 октября и 20 ноября 2015 г. Курящим было указано сообщать о курении без приема какой-либо пищи или жидкости в это утро, а также без чистки зубов. Слюну замораживали и передавали для оценки в лабораторию KFKI laboratories.

Анализ пероксидазы из хрена - бензидиновой пробы

Реагент 1: HRP (пероксидаза из хрена) 9000 Ед/л, бензидингидрохлорид 233 мкмоль/л.

Хлорид натрия: 155 ммоль/л.

Реагент 2: перекись мочевины 0,36 ммоль/л.

Растворитель: дважды дистиллированная вода.

Прибор: спектрофотометр UV-VIS (УФ-видимый свет), температура 25°C.

Использовали свежеприготовленные реагенты. Контроль растворяли в 5 мл дважды дистиллированной воды. У добровольцев собирали слюну. Затем 20 мкл раствора обработанной слюны смешивали с 1 мл реагента 1 и гомогенизировали, и реакция запускалась с 200 мкл реагента 2. Изменение коэффициента поглощения при длине волны 620 нм измеряли по прошествии 3 мин. Коэффициент поглощения слюны, собранной после курения, сравнивали с коэффициентом поглощения слюны контроля без реакции. Результат пустого измерения получали без слюны контроля с использованием 20 мкл дважды дистиллированной воды. Результаты экспериментов представлены в таблицах.

В исследовании участвовали 38 добровольцев в соответствии со следующим.

Мужчины		Женщины	
29 человек		9 человек	
Курящий	Некурящий	Курящий	Некурящий
26	3	4	5
Возраст		Возраст	
18-24 лет	4 человека	18-24 лет	2 человека
25-40 лет	14 человек	25-40 лет	5 человек
41-59 лет	10 человек	41-59 лет	2 человека
60+ лет	1 человек	60+ лет	0 человек

Результаты

Результаты анализа показаны на фиг. 10 и 11, где на фиг. 11 сигарета 1=референтная сигарета Кентукки (Kentucky Ref.), сигарета 2=угольный стержень, сигарета 3=стержень из альгинита-винограда и сигарета 4=лунка с альгинитом-виноградом.

Перечень фильтров, использованных в эксперименте

Слюна	Описание фильтра	Аббревиатура
Фильтр 1	Референтная сигарета контроля Кентукки	Kent. Ref.
Фильтр 2	Стержень Celanese 12 мм: уголь	CelRod-12-C
Фильтр 3	Стержень Celanese 12 мм: 50% альгинита и 50% винограда	CelRod-12-AG
Фильтр 4	Лунка Альгинит виноград 200 мг 50-50%	CAV-200-AG

Результаты

Изменение антиокислительной способности			
KRC	CELROD-12-C	CELROD-12-AG	CAV-200-AG
41,7	42,2	16,9	11,9

Вывод

Эксперименты с сывороткой подтвердили, что фильтры по настоящему изобретению, и в структурах CellFx, и в лунках, значительно улучшали антиокислительную способность, запускаемую сигаретным дымом. С учетом того, что сигаретный дым попадает в кровоток через несколько секунд после его вдыхания, эти данные предполагают, что фильтры по настоящему изобретению могут давать вклад с более здоровое состояние эндотелия у курящих. Эксперименты со слюной подтвердили, что фильтры по настоящему изобретению, и в структурах CellFx, и в лунках, значительно улучшали антиокислительную способность во рту. Это может давать вклад в более здоровое состояние слизистой у курящих.

Пример 3. Влияние состава сигаретного фильтра на вызываемую дымом гибель клеток эндотелия и эпителия.

Сигаретный дым представляет собой сложную комбинацию химических веществ, отличающуюся высокими уровнями окислителей. Возрастающее число публикаций показывает, что сигаретный дым вызывает активизацию клеток эндотелия сосудов легких, которая связана с потерей функции эндотелиального барьера. Эта потеря является признаком эндотелиальной дисфункции. В этом процессе сигаретный дым вызывает окислительный стресс, приводящий к повреждению клеток эндотелия, которое дает возможность проникновения моноцитов и активированных макрофагов. Нарушение эндотелиального барьера может даже составлять ранний элемент поражения легких в ответ на воздействие сигаретного дыма.

Также показано, что сигаретный дым вызывает апоптоз альвеолярной ткани легких посредством апоптоза их эндотелиальных клеток, что дает вклад в развитие хронического заболевания легких, такого как эмфизема. Хотя все типы клеток в легких могут быть повреждены окислительным воздействием, эпителиальные клетки являются основной мишенью поражения окислителями, поскольку они составляют первую линию защиты в легких. Поэтому неудивительно, что поражение эпителия сигаретным дымом является важным процессом в патогенезе связанных с курением болезней легких.

В большом числе исследований показано, что составляющие дыма с высокой реакционной способностью, летучие канцерогены и активные формы кислорода (ROS), полученные из сигаретного дыма, и поврежденные сигаретным дымом клетки дают вклад в поражение легких, включающее поражение эпителия, за счет гибели клеток и дополнительной выработки ROS в активированных эпителиальных клетках. Поэтому защита эпителия от поражения сигаретным дымом критична для управления многими заболеваниями легких, связанными с курением сигарет. Исследования показали, что состав сигаретных фильтров может быть важен при модификации воздействия сигаретного дыма на вызванную гибель клеток эпителия, которые представляют собой первую линию, сталкивающуюся с сигаретным дымом, а также повреждение клеток эндотелия. Фильтры, которые могли бы более эффективно удалять компоненты сигаретного дыма, которые обладают наивысшим потенциалом повреждения эпителиальных клеток, а также клеток эндотелия, могут уменьшить вызванное сигаретным дымом поражение легких.

Материалы, объекты и способы

Использованными в эксперименте сигаретами были референтные сигареты 3R4F из Кентукки, изготовленные и собранные в Университете Кентукки, Кентукки, США. Сигареты были предоставлены венгерской компании OptiFilter Zrt корпорацией Celanese Corporation, Narrows, VA, США. Сигаретные фильтры были собраны, и пробные сигареты были изготовлены компанией OptiFilter Zrt., стержни фильтров компании CellFx были изготовлены и предоставлены компанией Celanese Corporation. Они содержали различные фильтрующие материалы, иногда в смеси. Дополнительные материалы ацетатного фильтра с другими характеристиками плетения, чтобы получить другие значения перепада давлений, были изго-

товлены и предоставлены компанией Celanese Corporation. Ацетатные части (2.9/41,000) 27 мм фильтров 3R4F референтных сигарет из Кентукки вынимали и выбрасывали. Стержни фильтров, изготовленные по технологии CellFx компании Celanese, содержали различные материалы наполнителей. Один выбранный стержень фильтра был введен обращенным к горячей поверхности сигареты, и дополнительная ацетатная часть была выбрана и введена в фильтр, обеспечивая, чтобы значение перепада давлений (общее сопротивление затяжке) сигареты (вентиляция фильтра закрыта) было тем же самым, что и значение перепада давлений KRC (сопротивление затяжке 170 мм H₂O ±2%). Стержни Celanese были длиной 10, 12 или 15 мм. Ацетатные части были длиной 17, 15 или 12 мм. Общая длина фильтра составляла 27 мм. Сигареты, снабженные стержнями фильтров CellFx, содержащими различные материалы наполнителей, измеряли и сравнивали с контролем в этой биологической оценке.

Клетки эндотелия критичны при развитии ХНЗЛ (COPD), поскольку барьерная функция эндотелиальных клеток важна для здорового функционирования легких; поэтому утрата барьерной функции эндотелия может давать вклад в показатель инфильтрации лейкоцитов болезней легких, включая ХНЗЛ. Вызванная дымом гибель клеток и воспаление в эндотелиальных клетках дают вклад в развитие ХНЗЛ. В настоящем документе показано, что, используя различные составы сигаретных фильтров, можно модифицировать состав дыма и можно ослаблять поражающие биологические воздействия. На фиг. 2 показано, что дым от фильтров, содержащих смеси альгинит/цеолит/уголь/виноград был менее пагубным для клеток эндотелия.

Эпителиальные клетки являются важными компонентами ткани легких и играют значительную роль в развитии рака легких и ХНЗЛ. С использованием линии A549 эпителиальных клеток легких показано, что фильтры, содержащие смесь альгинит/цеолит/уголь/виноград, значительно снижали гибель эпителиальных клеток, таким образом, возможно, обеспечивая снижение риска ХНЗЛ. Результаты показывают, что фильтры по настоящему изобретению, содержащие смесь альгинит/цеолит/уголь и виноград удаляют некоторые компоненты дыма и, таким образом, вызывают меньшее повреждение эпителиальных и эндотелиальных клеток легких. Защита эпителиальных и эндотелиальных клеток может давать вклад в ослабление развития вызванного сигаретным дымом ХНЗЛ и других респираторных заболеваний.

Приготовление экстракта сигаретного дыма

Приготовление экстракта сигаретного дыма выполняли, как указано выше (Chen et al.; Chen ZH, Lam HC, Jin Y, Kim HP, Cao J, Lee SJ, Ifedigbo E, Parameswaran H, Ryter SW, Choi AM. Autophagy protein microtubule-associated protein 1 light chain-3B (LC3B) activates extrinsic apoptosis during cigarette smoke-induced emphysema ("Аэрофагия легкой цепи белка 1, связанного с белковыми микротрубочками (LC3B) запускает присущий апоптоз при вызванной курением сигарет эмфиземе"), Proc Natl Acad Sci USA. 2010 Nov 2; 107(44):18880-5). Для подготовки экстракта сигаретного дыма референтные исследуемые сигареты 3R4F из Кентукки с фильтром (Институт исследования табака, Университет Кентукки, Лексингтон, Кентукки) выкуривали с использованием перистальтического насоса (компании VWR International) с различными типами фильтров. Собирали весь дым. Каждую сигарету выкуривали в течение 4 мин, оставляя 15-мм кончик, и пузырьки пропускали через 7,5 мл среды для роста клеток посредством силиконовой трубки. Этот раствор, рассматриваемый как 100% экстракт сигаретного дыма, регулировали до pH 7,45 и использовали в течение 15 мин после приготовления. После каждой выкуренной сигареты силиконовую трубку заменяли новой.

Клеточная культура HUVEC и A549 и обработка

Клетки HUVEC (эндотелиальные клетки пупочной вены человека) получали от компании Lonza (Anaheim, Калифорния, США) № по каталогу: C2519A и культивировали в среде для роста эндотелиальных клеток (Lonza, Anaheim, Калифорния, США) во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Для анализа гибели клеток было посеяно 5×10³ клеток HUVECs на одну лунку в 96-луночных пластинках в среде для роста эндотелиальных клеток, содержащей факторы роста и 2% сыворотку. Перед каждым экспериментом среду заменяли свежей, не содержащей факторов роста и содержащей 1% сыворотку, и термостатировали 10% экстракт дыма в течение 24 ч.

A549 - альвеолярные базальные эпителиальные клетки аденокарциномы человека получали в Европейской коллекции культивируемых клеток животных (ECACC), клеточная линия A549, № по каталогу 86012804. A549-клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% FCS во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Для анализа гибели клеток 5×10³ клеток A549 на одну лунку высевали на пластинки с 96 лунками в среде DMEM, содержащей 10% FCS, и обрабатывали 10% экстрактом CS в течение 24 ч.

Анализ жизнеспособности клеток

Анализ МТТ

Клетки высевали на пластинки с 96 лунками при начальной плотности, заданной на чертежах, и культивировали всю ночь до обработки дымом. После периода термостатирования среду удаляли и заменяли в течение 4 ч RPMI, содержащим соответствующее количество раствора МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолинбромид), Chemicon Inc., El Segundo, Калифорния (14). Реакцию МТТ завершали добавлением HCl к среде при заключительной концентрации 10 ммоль. Количество нерастворимого в воде синего окрашивающего вещества формазана, сформированного по МТТ, было

пропорционально числу живых клеток и было определено по устройству считывания Anthos Labtech 200 методом твердофазного иммуносорбентного анализа с длиной волны 550 нм после растворения осадка синего формазана в 10% SDS. Все эксперименты проводили по меньшей мере с 6 образцами и повторяли три раза.

Анализ сульфородамина В (SRB)

Клетки термостатировали на пластинках с 96 лунками в течение 24 ч, как указано выше. Питательная среда для культур затем выбрасывалась, и клетки фиксировали путем добавления 100 мкл холодной 10% (мас./об.) трихлоруксусной кислоты и термостатировали в течение 30 мин при температуре 4°C. Кондиционированную среду выбрасывали, и пластинки промывали пять раз водопроводной водой и сушили на воздухе в течение 24 ч. Добавляли SRB раствор (100 мкл) при 0,4% (мас./об.) в 1% уксусной кислоте, и пластинки термостатировали в течение 20 мин при комнатной температуре. После окрашивания несвязанный краситель удаляли промыванием пять раз 1% уксусной кислотой, и пластинки сушили на воздухе. Связанное окрашивающее вещество впоследствии растворяли с (200 мкл) 10 ммоль Tris (pH 10,5) и считывали коэффициент поглощения в устройстве считывания 96-луночных пластинок при длине волны 560 нм за вычетом измерений фона при длине волны 600 нм с использованием мультимодальной системы регистрации Promega Glomax.

Результаты: влияние дыма на эпителиальные клетки легких и эндотелиальные клетки человека

Как указано, эпителиальные клетки легких играют критическую роль в развитии хронической обструктивной болезни легких (ХНЗЛ). Изменения состава сигаретного фильтра могут потенциально создавать дым, который снижал бы гибель эпителиальных клеток по сравнению с дымом от обычной сигареты. Поэтому было проанализировано влияние разного состава фильтров на вызванную дымом гибель эпителиальных клеток. На фиг. 1 показано влияние разных составов фильтров на гибель клеток в клетках A549. Результаты, показанные на фиг. 1, были получены с использованием 10% экстракта дыма, примененного для клеточных культур. Однако, по всей вероятности, результаты с использованием 10% концентрации дыма более разумны, поскольку увеличение концентрации дыма обнаружило пролиферативное действие сигаретного дыма. Данные на фиг. 12 указывают, что три фильтра по настоящему изобретению, содержащие фильтры альгинит/цеолит/кожицу и косточки винограда (GSSG), альгинит/GSSG и альгинит/уголь значительно снижали вызванную дымом гибель эпителиальных клеток A549.

На фиг. 13 показано действие различных составов фильтров на вызванную дымом гибель эпителиальных клеток главной пупочной вены человека (HUVEC). Использовались 4 сигареты для каждого измерения для каждого фильтра и выполнялось 6 повторов, и эти данные показывают, что фильтры по настоящему изобретению, содержащие различные фильтрующие материалы в фильтре, значительно снижают вызванную дымом гибель эпителиальных клеток.

Эти эксперименты показывают, что сигаретные фильтры по настоящему изобретению значительно меняют паттерн жизнедеятельности и ткани эпителия, и ткани эндотелия, подвергшихся воздействию сигаретного дыма. Это может быть полезно в борьбе с сигаретным дымом, запускающим респираторные и сердечно-сосудистые заболевания.

Пример 4. Выработка воспалительных цитокинов после воздействия сигаретного дыма в 3D модели легочной ткани человека.

Курение сигарет является основным фактором, связанным со многими сложными заболеваниями легких. Воздействие дыма может вызвать воспалительную реакцию посредством выброса воспалительных цитокинов. Важную роль с воспалительным отклике играют макрофаги, которые являются особым источником интерлейкина-8 (IL-8) и интерлейкина-6 (IL-6). IL-8 является многофункциональным цитокином, главным образом действующим, как хемоаттрактант нейтрофилов, в то время как IL-6 связан с нарушением метаболизма у пациентов с ХНЗЛ. Поскольку оба цитокина играют важную роль во многих заболеваниях легких, таких как ХНЗЛ, легочный фиброз или астма, кажется разумным исследовать влияние новых сигаретных фильтров на уровни этих цитокинов в недавно разработанной системе сложной модели легких. Воспалительные процессы в легких связаны с выработкой нескольких наборов цитокинов и нейтрофилов в дыхательных путях. IL-6 и IL-8 играют критическую роль в инициации и распространении воспалительных реакций. Воздействие сигаретного дыма может запускать воспаление посредством усиления выделения противовоспалительных цитокинов, приводящее к хроническому воспалению. Сигаретный дым также может вызывать изменение уровня органа, такое как поражение дыхательных путей и утрата поверхностей газообмена, которые могут привести к нарушению функции легких. Все эти отрицательные воздействия могут давать вклад в возникновение тяжелого заболевания, включая ХНЗЛ или рак. Путем использования культуры 3D ткани в качестве способа испытаний можно оценить комбинацию клеток, действующих в качестве соединения функциональных тканей, по сравнению с одиночными клетками. Легочная ткань содержит эпителиальные клетки, которые обладают различным строением клеток. Эти клетки имеют особые контакты клетка-клетка, поляризованную морфологию и присоединены к лежащей под ними базальной мембране. Сохранение этих свойств важно для нормального функционирования ткани, включая пролиферацию, дифференциацию, выживание и секрецию. Клетки естественным образом растут в 3D среде. Пространственное расположение клеток в пределах этой среды влия-

ет на то, как они взаимодействуют друг с другом и их микроокружением. В свою очередь, эти межклеточные сигналы влияют на морфологию и диапазон клеточных функций. Поэтому, когда потенциальные лекарства или токсичные вещества испытывают с помощью анализов на базе клеток, способы используемых культур должны воспроизводить возможную наиболее естественную репрезентативную форму в условиях *in vivo*. Наиболее естественным, воспроизводящим ткань способом роста клеток для применений по поиску новых лекарств является, вероятно, 3D. Испытания сигаретного дыма в условиях *in vitro* сложны. Должно быть оценено большое число клеточных линий, но все они обладают своими ограничениями. IL-8 и IL-6 могут быть созданы несколькими воспалительными и легочными клетками, но исследование одного конкретного типа клеток может неправильно представлять общий результат от воздействия дыма. Выращивание клеток в 2-мерных клеточных культурах обычно используется в нескольких типах фармакологических испытаний, но они в условиях *in vitro* меньше соответствуют ситуации *in vivo*, чем в случае для системы 3-мерной модели. Клеточные культуры трехмерных легких более репрезентативны для встречающихся в условиях *in vivo*, обладая структурой и паттерном экспрессии, близко совпадающими с легкими человека. Поскольку легкие представляют собой сложный орган, необходимо исследовать биологические процессы в системе сложной модели при условии, что расположение клеток может влиять на заданный отклик конкретного стимула. 3D ткань легких от компании Humeltis сочетает несколько типов клеток, которые представляют основные клетки дыхательных путей.

Методы

Нормальные основные малые эпителиальные клетки дыхательных путей человека (SAEC) и нормальные фибробласты легких человека (NHLF) предлагает компания Lonza. Эти клетки выделены у анонимных доноров разного пола и возраста. Периферийные моноциты человека были выделены с помощью комплекта для выделения CD14 положительного MicroBead (компания Miltenyi Biotec). Для 3D выращивания культур SAEC и NHLF клетки смешивали в соотношении 1:1 (SN сфероиды) и моноциты человека также смешивали с этими первичными клетками человека (SNM сфероиды). Клетки высевали на изогнутые подковообразно пластинки с 96 лунками с низким присоединением. Сфероиды обрабатывали экстрактами сигаретного дыма (CSE) в течение 48 ч перед измерением. Используемыми в эксперименте сигаретами были референтные сигареты 3R4F из Кентукки, изготовленные и собранные Университетом Кентукки, Кентукки, США. Сигареты были предоставлены компании OptiFilter Zrt Венгрии компанией Celanese Corporation, Narrows, VA США. Сигаретные фильтры были собраны, и пробные сигареты были получены в компании OptiFilter Zrt. Стержни фильтров CellFх были изготовлены и обеспечены компанией Celanese Corporation. Дополнительные материалы ацетатных фильтров с различными характеристиками плетения, тем самым создавая различные значения перепада давлений, были изготовлены и обеспечены компанией Celanese Corporation. Ацетатные части (2,9/41,000) 27 мм фильтра референтной сигареты (KRC) 3R4F Кентукки удаляют и выбрасывают. Стержни фильтров, изготовленные по технологии CellFх компании Celanese и содержащие различные наполнители, вводились встык с горячей поверхностью сигареты. Дополнительная ацетатная часть была выбрана и введена в фильтр, обеспечивая, чтобы значение перепада давлений (общее сопротивление затяжке) сигареты (вентиляционные отверстия фильтра закрыты) было тем же самым, что и значение перепада давлений KRC (сопротивление затяжке 170 мм H₂O ±2%). Стержни Celanese обладали длиной 12 мм. Ацетатные части обладали длиной 15 мм. Общая длина фильтров составляла 27 мм. Делали общую массу из двух различных фильтров, и KRC снабжали этими фильтрами. Дым от сигарет, снабженных фильтрами по настоящему изобретению, фильтры CellFх, содержащие различные материалы наполнителей, измеряли и сравнивали с контролем в биологической оценке. Категории сигарет были следующими.

Сигарета 1: референтная сигарета KRC из Кентукки.

Сигарета 2: моностержень фильтра из активированного угля CelRod-12-C.

Сигарета 3: стержень фильтра из альгинита/винограда CelRod-12-AG.

CSE был изготовлен пропусканием пузырьков дыма от 2 сигарет через 10 мл среды клеточной культуры при постоянном потоке воздуха, подаваемом вакуумным насосом Hydrotech (компания BioRad) в течение полного периода 2 мин. После воздействия среду фильтровали в стерильных условиях с фильтром шприца 0,22 мкм. Рассеяние света растворенными частицами не обнаружило значительного различия в пределах диапазонов 320-350 нм. Этот раствор считали 100% E (экстрактом). CSE готовили в течение 30 мин для каждого эксперимента. CSE (0,5%) применяли для трехмерных культур ткани в течение 48 ч. Через 48 ч воспалительные цитокины, полученные посредством 3D микротканей, измеряли в кондиционированной среде с использованием набора воспалительных цитокинов человека на основе цитометрического изучения цепочек гранул BD (компания BD Biosciences). Этот комплект предусматривал количественное измерение уровня белков IL-8 и IL-6 в ткани кондиционированной культуры ткани. Способ основан на флуоресцентных соединенных микрогранулах известного размера и проявляющем реагенте, который обеспечивает сигнал, пропорциональный количеству связанного цитокина. Во время 3-часового термостатирования микрогранулы захвата формируют агрегат с цитокином из кондиционированной среды вместе с проявляющим реагентом. Интенсивность флуоресценции была проанализирована с помощью проточного цитомера FACS Canto II (компания BD Immunocytometry Systems, Erembodegem, Бельгия) с программным обеспечением BD FACS DIVA версии V6, и данные были проанализированы с

использованием программы FCS Express версии V3. Результаты представляют собой среднюю интенсивность флуоресценции соединенных микрогранул после связывания IL-6 и IL-8.

Результаты

Для исследования выработки воспалительных цитокинов в зависимости от типа фильтра сфероиды обрабатывали CSE от стандартных сигарет и двух различных сигарет, содержащих фильтры, в течение 48 ч. Данные показывают, что и IL-8, и IL-6 уменьшились в содержащих макрофаги агрегатах после обработки CSE от сигарет с фильтром под номером 3, указывая на сниженную способность инициировать воспалительную реакцию. Различие оказалось статистически значимым для обоих цитокинов.

На фиг. 14 показан белок IL-8 человека в проявляющем реагенте макрофага, содержащего сфероиды легких после 48 ч в агрегатах 3 типов клеток (SAEC, фибробласты и макрофаги).

На фиг. 15 показан белок IL-6 человека в проявляющем реагенте макрофага, содержащего сфероиды легких после 48 ч.

Снижение уровней цитокинов было статистически значимым только в агрегатах, содержащих макрофаги, и только через 48 ч. В агрегатах, сформированных только фибробластами и первичными эпителиальными клетками (без макрофагов), снижение уровней цитокинов не было значимым ни через 24, ни через 48 ч. Сигарета под номером 3 снижала уровни обоих цитокинов до уровня, определенного в среде контроля.

Выводы

IL-6 и IL-8 играют критическую роль в инициации и распространении воспалительных реакций. Воздействие сигаретного дыма может вызывать воспаление посредством повреждения ткани, таким образом, усиливая выделение провоспалительных цитокинов, что может привести к хроническому воспалению. Вероятно, 3D культуры тканей человека показывают близкое сходство с биохимическими и патологическими процессами тканей человека в условиях *in vivo*. В этой связи может быть разумным предположить, что статистически значимое снижение исследуемых цитокинов в иммунологически активных агрегатах (содержащих макрофаги), когда дым фильтруется фильтром №3, может быть полезно также в условиях *in vivo*. Данные представлены в таблице следующим образом (SN обозначает агрегаты, содержащие первичные эпителиальные клетки и фибробласты, в то время как SNM обозначает агрегаты, содержащие эпителиальные клетки, фибробласты и макрофаги).

SN 24 часа									
	IL-8					IL-6			
	Контроль 2X	Стандарт 2X	Фильтр № 2 2X	Фильтр а №3 2X		Контроль 2X	Стандарт 2X	Фильтр № 2 2X	Фильтр а №3 2X
1 тест	886,62	657,85	888,18	879,57		363,82	230,33	301,38	308,87
2 тест	814,29	1049,64	900,68	862,21		1487,67	1739,00	1504,89	1652,68
3 тест	445,43	429,94	432,01	419,63		325,13	295,79	354,72	393,75
4 тест	804,46	944,75	881,06	916,04		1177,79	1449,24	1406,54	1413,61
Среднее	737,70	770,55	775,48	769,36		838,60	928,59	891,88	942,23
STDEV	198,26	281,04	229,13	234,23		584,64	778,00	652,66	690,15
SE	99,13	140,52	114,56	117,12		292,32	389,00	326,33	345,07
n	4	4	4	4		4	4	4	4
Значение p									
SNM 48 час									
	IL-8					IL-6			
	Контроль 2X	Стандарт 2X	Фильтр № 2 2X	Фильтр а №3 2X		Контроль 2X	Стандарт 2X	Фильтр № 2 2X	Фильтр а №3 2X
1 тест	1038,28	1102,19	1239,07	702,67		237,54	245,87	257,64	150,80
2 тест	883,37	1043,70	963,84	1076,88		1196,19	1263,68	1115,51	1244,01
3 тест	1266,76	1466,50	1346,42	1151,40		376,76	561,09	458,94	429,92
4 тест	966,41	1169,47	897,17	692,11		646,31	884,26	808,28	709,40

Средне	1038,71	1195,47	1111,63	905,77	614,20	738,73	660,09	633,53
STDEV	164,69	187,86	215,41	242,56	423,48	436,36	379,38	466,52
SE	82,34	93,93	107,70	121,28	211,74	218,18	189,69	233,26
n	4	4	4	4	4	4	4	4
Значение p				0,04				0,02

Выводы

В приведенных выше примерах явно показано, что альгинит особенно эффективен при использовании в сигаретных фильтрах отдельно или в комбинации с другими известными компонентами, как указано выше. Неожиданной и новой особенностью настоящего изобретения является то, что использование альгинита в сигаретных фильтрах приводит к значительно менее химически активным видам кислорода (ROS) в слюне, значительно меньшему формированию ROS в сыворотке крови, меньшему повреждению эндотелия, меньшему повреждению эпителия легких, значительно более высокому уровню глутатиона, меньшему повреждению ткани легких и меньшему воспалению в тканях легких.

Выбранные биологические испытания в условиях *in vitro*, которые были также выбраны по той причине, что они имеют четкую и хорошо установленную связь с биологическими направлениями в условиях *in vivo*, которые, как документально подтверждено, являются причиной основных связанных с курением заболеваний. Кроме того, в каждом случае было показано, что фильтры по настоящему изобретению создают газообразную фазу дыма, которая вызывала гораздо меньшее повреждение при испытаниях в условиях *in vitro*, чем дым, создаваемый фильтром референтной сигареты Кентукки. Поэтому эти результаты обеспечивают убедительное свидетельство того, что сигареты, снабженные этими фильтрами, могут надежно уменьшать текущее воздействие курения сигарет на здоровье.

Эти примеры также показывают, что даже в отдельности альгинит обладает значительно улучшенными характеристиками, чем известные фильтрующие материалы, и что альгинит и фильтрующие материалы, относящиеся к предшествующему уровню техники, действуют синергически. Поэтому, хотя не все содержащиеся комбинации упомянуты в примерах, для специалиста очевидно, что любая комбинация альгинита и известных фильтрующих материалов в конкретной технической области будет обладать теми же самыми свойствами. Таким образом, настоящая заявка явно охватывает все такие комбинации.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

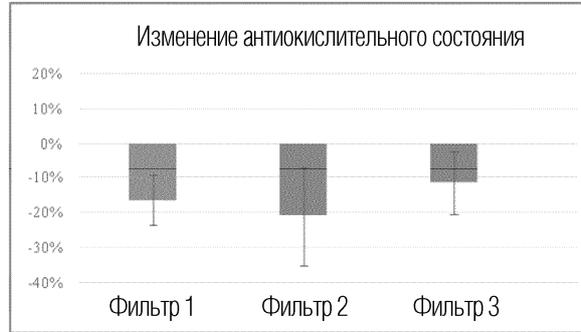
1. Применение альгинита для фильтрации сигаретного дыма.
2. Применение по п.1, при котором альгинит используется в сигаретных фильтрах.
3. Применение альгинита для изготовления сигаретных фильтров.
4. Применение по п.2, при котором альгинит используется отдельно или в комбинации с другими компонентами, используемыми в сигаретных фильтрах для уменьшения вредного воздействия сигаретного дыма.
5. Применение по п.4, при котором другие компоненты выбраны из группы, состоящей из активированного угля или компонентов винограда.
6. Применение по п.5, при котором другим компонентом является активированный уголь.
7. Применение по п.5, при котором другим компонентом является/являются компонент(ы) винограда.
8. Применение по п.7, при котором компоненты винограда представляют собой виноградные косточки и молотую кожуру.
9. Применение альгинита для снижения риска для здоровья от сигаретного дыма у человека.
10. Применение по п.9, при котором альгинит применяется в форме сигаретных фильтров, содержащих альгинит.
11. Применение по п.9, причем снижение риска для здоровья означает меньшее количество реактивных соединений кислорода (ROS) в слюне.
12. Применение по п.9, причем снижение риска для здоровья означает меньшее количество реактивных соединений кислорода (ROS) в сыворотке крови.
13. Применение по п.9, причем снижение риска для здоровья означает меньшее повреждение эпителиальных клеток.
14. Применение по п.9, причем снижение риска для здоровья означает меньшее повреждение эндо-

телиальных клеток.

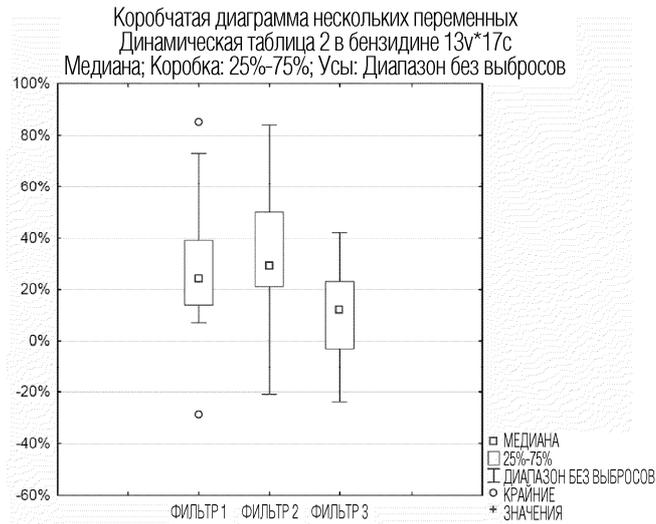
15. Применение по п.9, причем снижение риска для здоровья означает более высокий уровень глутатиона.

16. Применение по п.9, причем снижение риска для здоровья означает меньшее поражение тканей легких.

17. Применение по п.9, причем снижение риска для здоровья означает меньшее воспаление в тканях легких.

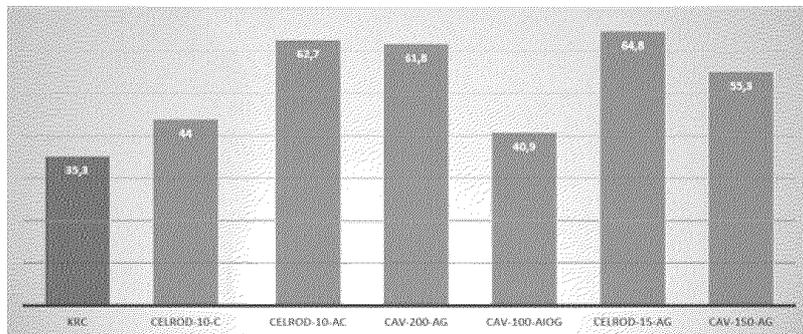


Фиг. 1



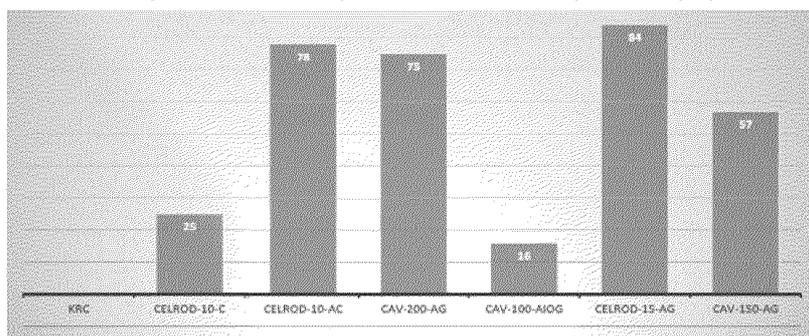
Фиг. 2

Антиокислительная способность (%) - Полное воздействие дыма



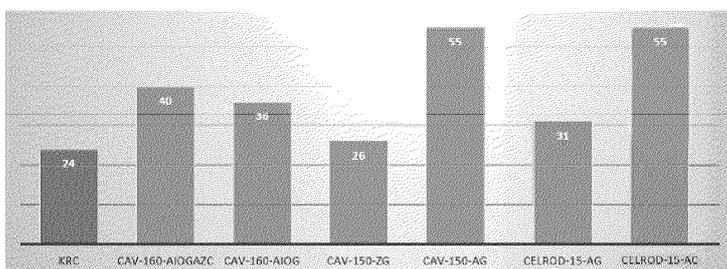
Фиг. 3

Улучшение по сравнению с контролем (%)



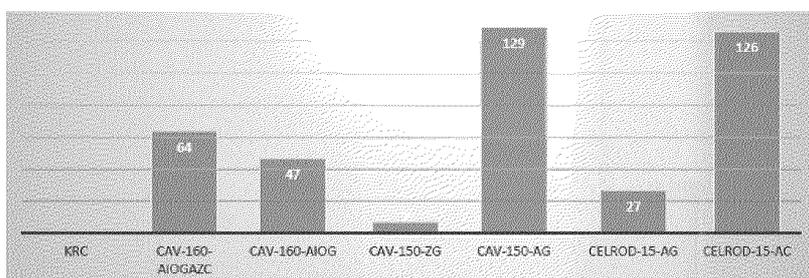
Фиг. 4

Антиокислительная способность (%) - Дым после тампона фильтра Кембридж



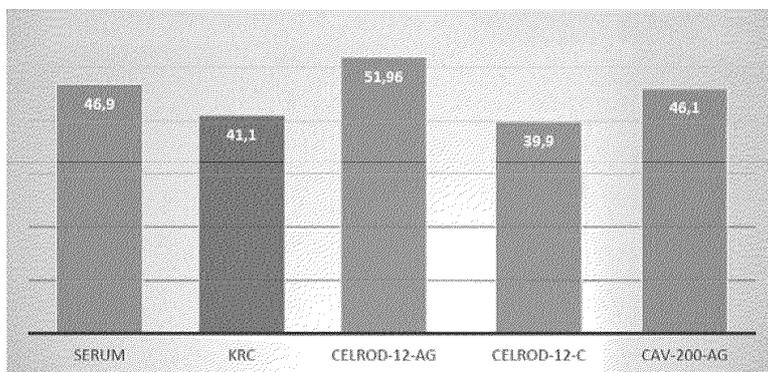
Фиг. 5

Улучшения по сравнению с контролем (%)



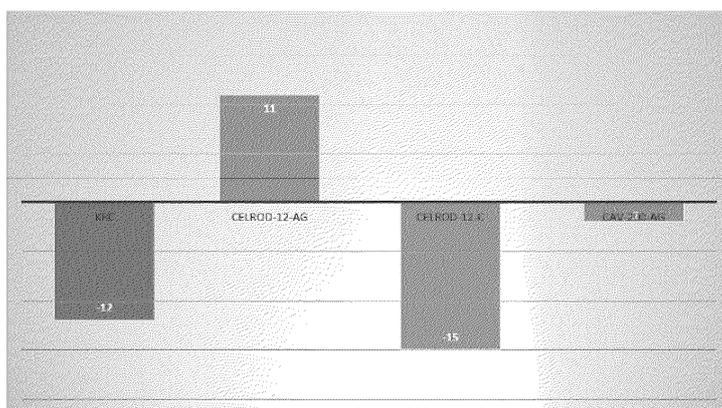
Фиг. 6

Антиокислительная способность (%) - Дым после тампона фильтра Кембридж



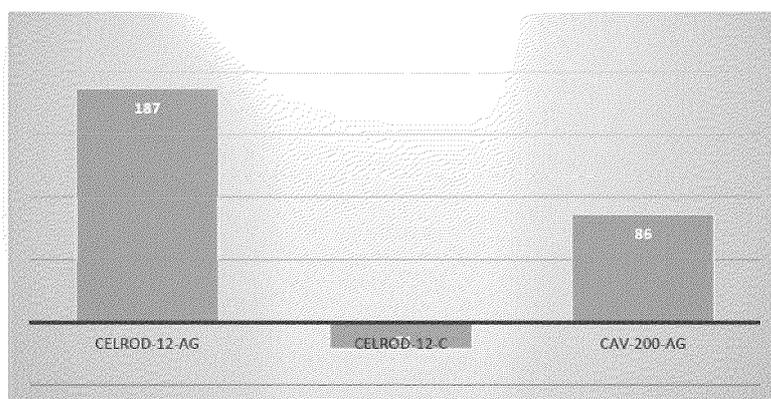
Фиг. 7

Изменение антиокислительной способности для сыворотки контроля (%)



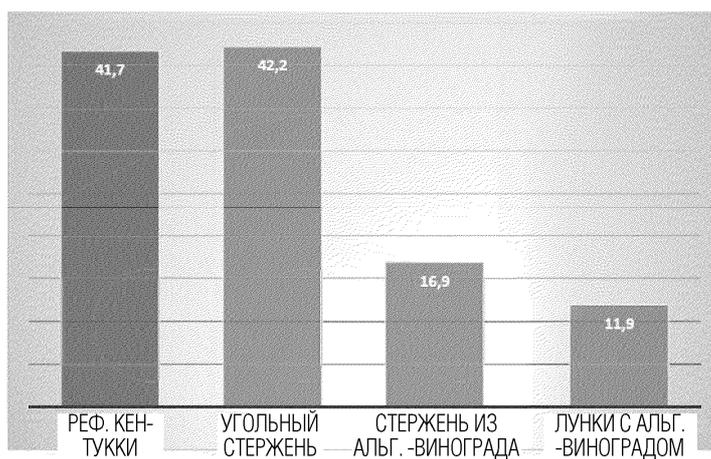
Фиг. 8

Изменение антиокислительной способности для сигареты Кентукки

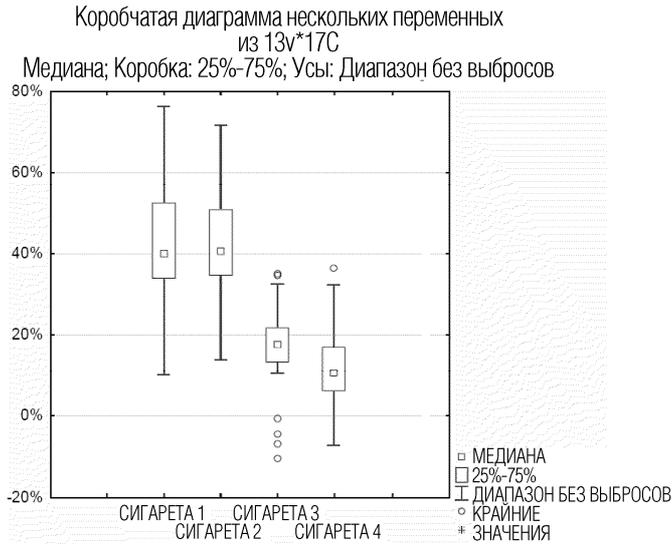


Фиг. 9

Изменение антиокислительной способности слюны у 38 добровольцев

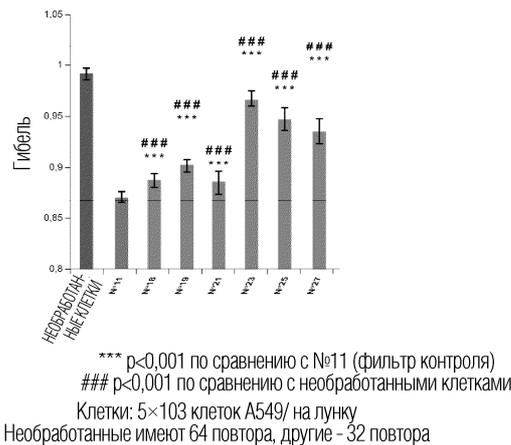


Фиг. 10



Фиг. 11

Влияние состава фильтра на вызванную дымом гибель клеток в клеточной линии эпителия человека A549
Дым МТТ 2015 09 03

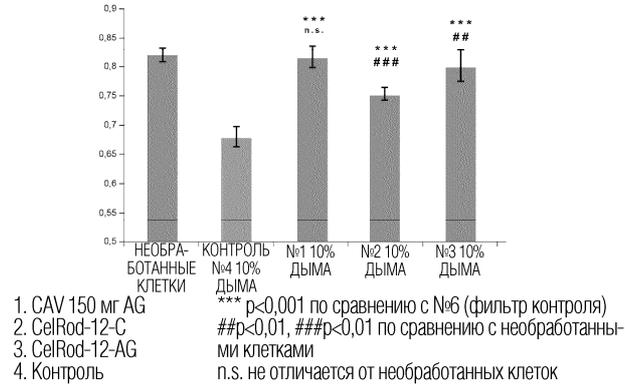


№11: Контроль	KRC
№18: Угольный моностержень 10 мм	CelRod-10-C
№19: Моностержень из альгинита 10 мм	CelRod-10-A
№21: Моностержень из цеолита 10 мм	CelRod-10-Z
№23: Стержень из альгинита/GSSG 50-50% 10 мм	CelRod-10-AG
№25: Стержень из угля/альгинита 50-50% 10 мм	CelRod-10-CA
№27: Стержень из GSSG 5 мм/Цеолита 5 мм/Альгинита 5 мм	CelRod-10-GZA

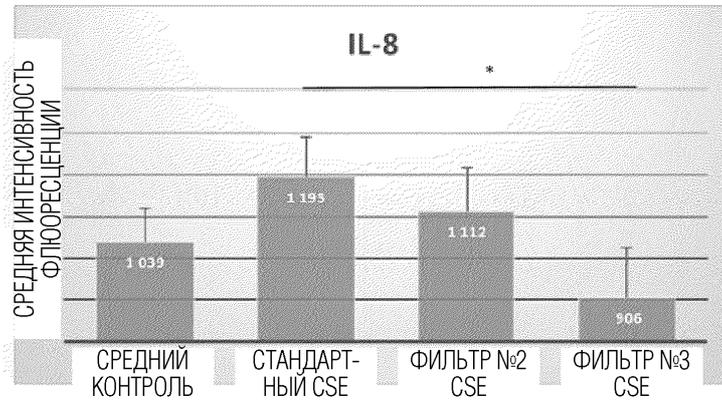
Фиг. 12

Влияние состава фильтра на вызванную дымом гибель эндотелиальных клеток пупочной вены человека

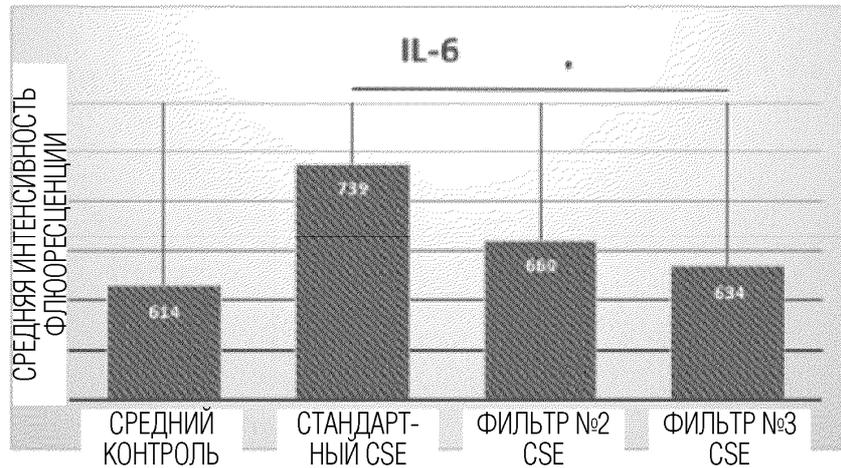
SRB 10% дыма 5×10^3 эндотелиальных клеток пупочной вены человека/ на лунку
2016 01 05



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2