



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0039138

(51)⁷ A24D 3/14

(13) B

(21) 1-2018-05273

(22) 25/04/2016

(86) PCT/HU2016/000023 25/04/2016

(87) WO 2017/187210 02/11/2017

(45) 25/03/2024 432

(43) 27/07/2020 388

(73) OPTIFILTER RESEARCH ZRT. (HU)

Finn u. 1/1., 7630 Pécs, Hungary

(72) SZARVAS, Tibor (HU).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) ĐẦU LỌC THUỐC LÁ ĐIỀU CHỨA ALGINIT

(57) Sáng chế đề cập đến đầu lọc thuốc lá điều. Cụ thể, sáng chế đề cập đến đầu lọc thuốc lá điều mới, trong đó các nguyên liệu có nguồn gốc tự nhiên được sử dụng, các nguyên liệu này trước đây chưa được áp dụng vào lĩnh vực đặc biệt này. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến đầu lọc thuốc lá điều, đầu lọc này có thể được sử dụng để hấp phụ các thành phần độc của khói thuốc lá, và làm giảm sự phá hủy mô gây ra bởi khói thuốc lá điều trên các cơ quan hô hấp, hệ tim mạch và niêm mạc. Đặc biệt, sáng chế đề cập đến đầu lọc thuốc lá điều chứa alginit.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến đầu lọc thuốc lá điều. Cụ thể, sáng chế đề cập đến đầu lọc thuốc lá điều mới, trong đó sử dụng nguyên liệu có nguồn gốc tự nhiên mà nguyên liệu này trước đây không được dùng trong lĩnh vực đặc biệt. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến đầu lọc thuốc lá điều, mà có thể được sử dụng để hút các thành phần độc hại của khói thuốc lá, và làm giảm tổn thương mô tác động bởi khói thuốc lá lên các cơ quan hô hấp, hệ thống tim mạch và niêm mạc. Đặc biệt, sáng chế đề cập đến đầu lọc thuốc lá điều chứa alginit.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hút thuốc lá là thói quen phổ biến, có hại của con người, đó là nguyên nhân gây tổn hại sức khỏe nghiêm trọng và thường không thể phục hồi. Hiện nay, hút thuốc lá là một trong số các nguyên nhân gây bệnh cao nhất đã được chứng minh bằng tư liệu góp phần vào sự phát triển ung thư phổi và bệnh tắc nghẽn phổi mãn tính (COPD). Tổn hại sức khỏe do hút thuốc lá gây ra làm phát sinh các vấn đề xã hội và tài chính nghiêm trọng trên thế giới. Ví dụ, ở các nước EU, riêng số lượng hơn 500,000 người chết sớm là do tác hại của việc hút thuốc.

Khoảng 50 năm trước, Văn phòng Tổng Y sỹ Hoa Kỳ (the office of the U.S. Surgeon General) đã phát hành báo cáo đầu tiên của họ về hút thuốc lá và sức khỏe (Bộ Y tế, Giáo dục và Phúc lợi Hoa Kỳ - U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1964). Báo cáo này đánh giá rằng người hút thuốc lá trung bình có cơ hội phát bệnh ung thư phổi gấp 9-10 lần so với người không hút thuốc, nhưng ngược lại người hút thuốc lá nặng có nguy cơ tăng khoảng 20 lần. Ngoài ra, báo cáo chỉ ra rằng hút thuốc lá là nguyên nhân chính của viêm phế quản mãn tính và có mối liên hệ giữa hút thuốc lá và tràn khí cũng như với bệnh tim mạch. Cần lưu ý rằng viêm phế quản mãn tính và tràn khí hiện nay được xem là hai mặt của bệnh tắc nghẽn phổi mãn tính (COPD). Trong 50 năm qua, Văn phòng Tổng Y sỹ Hoa Kỳ đã phát hành nhiều báo cáo về hút thuốc lá và sức khỏe, một số chủ đề chuyên môn, như chấm dứt hút thuốc lá, hút thuốc lá trong thời kỳ mang thai, và khói thuốc lá trong môi trường. Báo cáo gần nhất được phát hành vào năm 2014 – đúng 50 năm sau báo cáo thứ nhất (Bộ Y tế và Dịch vụ nhân sinh Hoa Kỳ - U.S. Department of Health and Human Services, 2014). Trong 50

năm qua, danh sách các bệnh liên quan đến hút thuốc lá đã mở rộng đáng kể. Chỉ tập trung vào bệnh ung thư, hiện nay có nhiều loại ung thư liên quan đến hút thuốc lá ngoài ung thư phổi, bao gồm các ung thư đường hô hấp trên (họng miệng, họng, khí quản, và phế quản), ung thư dạ dày, ung thư gan, ung thư thận, ung thư tụy, ung thư bàng quang, ung thư cổ tử cung, ung thư ruột kết và ruột thẳng, và ung thư bạch cầu dạng tủy cấp tính. Hơn nữa, Tổng Y sỹ Hoa Kỳ cho rằng có lẽ có nhiều đến 20 triệu người Mỹ đã chết sớm trong 50 năm qua do ảnh hưởng của việc hút thuốc lá. Đối với các ảnh hưởng có hại rõ ràng của việc hút thuốc lá, việc làm giảm các tác động này là vấn đề sức khỏe cực lớn, và biện pháp bất kỳ mà có thể được thực hiện để làm giảm vấn đề này là điều tra đánh giá rõ ràng. Không có nghi ngờ, hành động tốt nhất là dừng hút thuốc lá. Lợi ích của việc chấm dứt hút thuốc lá đã được biết rõ (xem, ví dụ, Fagerström, 2002). Tuy nhiên, có nhiều người hút thuốc chọn bỏ hút thuốc hoặc nhận thấy thật khó để bỏ hút thuốc. Mặc dù việc bỏ hút thuốc lá là biện pháp hiệu quả nhất, nhưng việc sử dụng công nghệ mới, như các đầu lọc mới mà loại bỏ hiệu quả các thành phần khói thuốc có hại có thể giảm đáng kể bệnh liên quan đến thuốc lá. Kết quả là, biện pháp bất kỳ mà có thể được thực hiện để làm giảm tác hại của việc hút thuốc lá đến sức khỏe sẽ có lợi ích đáng kể. Không có nghi ngờ, sự cố gắng rõ ràng nhất để làm giảm tác hại của việc hút thuốc lá đến sức khỏe thông qua sự thay đổi thuốc lá điều là nhờ sự bổ sung đầu lọc thuốc lá điều. Tuy nhiên, việc sử dụng các đầu lọc này chưa đạt kết quả đặc biệt.

Một trong số các đề xuất sớm nhất để bổ sung đầu lọc vào các thuốc lá điều chắc chắn là của Ernst Wynder, nhà dịch tễ học, là một trong những nhà khoa học tiên phong chứng minh mối liên hệ của việc hút thuốc lá điều với bệnh ung thư phổi. Đồng tác giả với Wynder trong nghiên cứu gần đây được công bố năm 1988 đánh giá sự khác nhau về nguy cơ ung thư phổi giữa khói thuốc lá đã được lọc và khói thuốc lá không được lọc (Wynder and Kabat, 1988). Nghiên cứu này xem xét sự khác nhau giữa hai kiểu người hút thuốc lá này với các bệnh ung thư Kreyberg I (KI) và Kreyberg II (KII). (Cách đặt tên Kreyberg đang sử dụng tại thời điểm đó, với các bệnh ung thư phổi KI bao gồm ung thư biểu mô tế bào phổi có vảy, ung thư phổi tế bào lớn, và ung thư phổi tế bào nhỏ, trong đó các bệnh ung thư phổi KI chỉ bao gồm ung thư tuyến phổi.) Đã phát hiện thấy giảm khoảng 45-50% các khối u KI đối với cả nam và nữ, mặc dù không đáng kể về mặt thống kê, trong khi chỉ quan sát thấy sự khác biệt nhỏ ở nam và không thấy sự khác biệt ở nữ đối với các khối u KII. Đầu lọc thuốc lá điều trở nên cực kỳ phổ

biến vào nửa cuối thế kỷ 20, với xấp xỉ 0,5% các thuốc lá điếu đã bán có các đầu lọc vào năm 1950 tăng lên đến 88,5% vào năm 1976 ở Mỹ (National Institute on Drug Abuse, 1977). Hiện nay là gần 100% các thuốc lá điếu bán trên thế giới là thuốc lá điếu có đầu lọc. Cũng trong khoảng thời gian này, khi việc sử dụng đầu lọc tăng với tốc độ nhanh chóng ở Mỹ (1950-1976), sự phân phối nhựa thuốc lá điếu làm tăng doanh số đo được bằng máy giảm từ 37 mg xuống 16 mg (Hoffmann D et al., 1996). Việc giảm sự phân phối nhựa thuốc lá trong giai đoạn này là do hai xu hướng. Thứ nhất, như đã lưu ý ở trên, đơn giản là tăng nhanh việc sử dụng các thuốc lá điếu đã lọc. Tuy nhiên, thứ hai là do tăng hiệu suất của các đầu lọc theo thời gian. Đầu lọc thuốc lá điếu là khá đơn giản, gồm đầu rỗng chứa chất đã nêu mà có thể hấp thụ cả nhựa thuốc lá điếu và pha khí. Mặc dù một số các đầu lọc gần đây sử dụng sợi giấy làm chất hấp thụ, nhưng hiện nay phần lớn các đầu lọc sử dụng sợi xenluloza axetat. Do đó, đầu lọc đơn giản là ống bằng giấy được nạp đầy xenluloza axetat được gắn với thuốc lá điếu bằng cách cuộn lại. Việc tăng hiệu quả có thể đạt được bằng cách tăng khối lượng xenluloza axetat trong đầu lọc và bằng cách giảm đường kính sợi. Tuy nhiên, từ trước đến nay chỉ có thể thực hiện được cả hai cách này, bởi vì cuối cùng việc chống lại sự hấp dẫn của thuốc lá điếu đủ lớn để sản phẩm không được người dùng chấp nhận. Phương pháp được gần như tất cả các công ty thuốc lá công nhận để giải quyết vấn đề này là đưa các lỗ châm kim vào phần cuộn đầu lọc. Nhờ đó, người hút thuốc hít hỗn hợp không khí và khói thuốc. Các lỗ thông hơi làm giảm việc chống lại sự hấp dẫn, và bằng cách lấy không khí cũng như khói thuốc, khói thuốc được pha loãng và sự phân phối các thành phần của khói thuốc giảm đi. Kích thước lỗ thông hơi càng lớn, thì lượng không khí càng nhiều và lượng khói thuốc càng ít bị hút bởi người hút thuốc. Mặc dù hầu hết các chuyên gia đồng ý rằng thuốc lá điếu có đầu lọc làm giảm nguy cơ của việc hút thuốc lá ít nhất là đến một số chừng mực nhất định so với thuốc lá điếu không có đầu lọc, các thuốc lá điếu có nhựa thuốc lá ít, thì chúng được gọi là, mà làm giảm sự phân phối nhựa thậm chí thấp hơn mức có thể đạt được bằng đầu lọc thuốc lá điếu bình thường có vẻ không dẫn đến lợi ích sức khỏe. Kết luận này được dựa trên cả số liệu dân số và các nghiên cứu dịch tễ học. Dữ liệu quan trọng được trình bày dạng văn bản trong thực tế là người hút thuốc phải bù đáng kể khi hút thuốc lá “thuốc lá điếu có lượng nhựa thấp” để duy trì mức nicotin hoặc mức độ vị giác, do đó làm tăng sự phân phối khói thuốc thực tế trên hiệu suất đo được bằng máy. Ngoài ra, một số nhà nghiên cứu khoa học nhấn mạnh rằng

người hút thuốc có thể cố ý hoặc vô ý bịt các lỗ thông hơi, do đó cũng làm tăng đáng kể sự phân phối khói thuốc (U.S. Department of Health and Human Services, 2001). Một kết quả rõ ràng là các gói thuốc lá điều không cho phép kéo dài tình trạng hiệu suất nhựa và nicotin đo được bằng máy ít nhất là ở Mỹ và liên minh châu Âu. Không kể các vấn đề này, có thể vẫn có khả năng phát triển các đầu lọc mới mà có thể làm giảm tác hại của việc hút thuốc lá đến sức khỏe, đặc biệt là nếu các đầu lọc này có thể được phát triển mà không cần sự thông hơi đầu lọc. Các đầu lọc này có thể được thiết kế để loại bỏ chọn lọc pha khí cụ thể và các thành phần khói thuốc bay hơi một phần. Quan trọng là cần lưu ý rằng khói thuốc gồm pha khí, chất bay hơi một phần, và pha pha hạt. Các thành phần chứng minh ảnh hưởng đến sức khỏe có thể được tìm thấy trong tất cả ba pha. Không tồn tại công nghệ hiện tại nào cho phép lọc chọn lọc các thành phần pha hạt; tuy nhiên, cả các thành phần pha khí và các thành phần bay hơi một phần có thể được lọc chọn lọc. Ví dụ rất tốt về đầu lọc hiện nay sử dụng trong thương mại là đầu lọc cacbon. Thực sự là toàn bộ thị trường Nhật Bản đều có các thuốc lá điều đầu lọc cacbon, trong khi khoảng 50% người hút thuốc ở Hàn Quốc sử dụng sản phẩm này. Một số ưu điểm công nghệ khác được áp dụng trong sự phát triển các đầu lọc, nhưng không ưu điểm nào trong số đó hiện nay được sử dụng thương mại. Hiện nay, đầu lọc là đoạn được tích hợp trực tiếp vào thuốc lá điều ở phần miệng hút, sao cho khói thuốc lá phải đi qua đầu lọc trước khi đi vào khí đạo và phổi. Hiện nay, chỉ có 3% trong số tất cả các thuốc lá điều trên thế giới đã được bán mà không có đầu lọc. Mặc dù lượng chất có hại đối với người hút thuốc có thể giảm đi nhờ đầu lọc thuốc lá điều, nhưng thường được thực hiện một cách đơn giản bằng cách làm giảm lượng khói thuốc đến phần thuốc lá điều đưa vào miệng người hút. Trong hầu hết các trường hợp đều có ít hoặc không có phần lọc chọn lọc. Do đó, các nhà nghiên cứu rất quan tâm đến cấu tạo của đầu lọc thuốc lá điều, mà có thể loại bỏ chọn lọc một số thành phần khói thuốc có hại nhất định để giảm hậu quả ảnh hưởng đến sức khỏe của việc hút thuốc lá.

Khói thuốc lá chứa nhiều hạt phản ứng như các hợp chất carbonyl phân tử lượng thấp, các gốc tự do, quinon, hydro xyanua, nitro oxit, và các amin thơm, rất độc, gây đột biến và gây ung thư. Do đó, việc hạ thấp có chọn lọc lượng chất này trong khói thuốc lá có thể làm giảm nguy cơ ảnh hưởng đến sức khỏe do hút thuốc lá gây ra.

Ngày càng tăng, các quy định của chính phủ yêu cầu hiệu quả lọc tốt hơn để giảm lượng khói thuốc lá phân phối đến người hút thuốc. Bằng cách sử dụng các đầu lọc

xenluloza axetat hiện có sẵn, một số độ chọn lọc có thể đạt được bằng cách pha đầu lọc với các nồng độ hạt tăng dần như than hoạt tính hoặc chất có trong tự nhiên khác. Tuy nhiên, sự thay đổi nồng độ hạt tăng lên đưa đến các đặc điểm đối với người hút thuốc. Hơn nữa, các hạt than hoạt tính trong đầu lọc góp phần hạ thấp lượng chất dễ bay hơi có hại trong khói thuốc lá nhưng do thiếu điện tử không ghép cặp nên chúng không thể tạo ra điện tử cộng yêu cầu để bù các điện tử không ghép cặp của các gốc tự do. Do đó, cacbon không phù hợp để chống lại tác động của gốc tự do trên các mô khác nhau, góp phần gây viêm và các quá trình có hại khác trong cơ thể gây ra do khói thuốc lá.

Một đặc điểm quan trọng của thuốc lá điều là sự chênh áp lực bao kín. Thuật ngữ “chênh áp lực bao kín” hoặc “EPD” đề cập đến sự chênh lệch áp suất tĩnh giữa hai đầu của thuốc lá điều khi đi qua dòng khí trong điều kiện không đổi. Các giá trị EPD cao hơn chuyển đến người hút thuốc để kéo dụng cụ hút thuốc lá với lực lớn hơn.

Bởi vì việc tăng hiệu quả lọc thông thường làm tăng EPD của các đầu lọc, nên các nhà sản xuất công khai đã trì hoãn thông qua các sản phẩm này. Do đó, vẫn phải quan tâm đến sự phát triển các đầu lọc cải thiện và hiệu quả hơn mà giảm thiểu tác động đặc trưng hấp dẫn của thuốc lá điều trong khi loại bỏ được lượng lớn một số thành phần nhất định trong khói thuốc như các thành phần nêu trên cũng như cacbon monoxit và phenol.

Chất độn thông thường nhất được sử dụng trong việc sản xuất đầu lọc thuốc lá điều là xenluloza axetat có độ thay thế khoảng 2,5 nhóm axetat đối với mỗi đơn vị anhydroglucoza. Trong khi sản xuất, axetat polyme thường được ép đùn làm xơ sợi và được trộn với một hoặc nhiều chất dẻo hóa (ví dụ, triaxetin, polyetylen glycol, glyxerin). Các quá trình xơ xenluloza axetat được mô tả, ví dụ, trong Patent Mỹ số 2,953,838 của Crawford et al. và Patent Mỹ số 2,794,239 của Crawford et al. Các dịch lỏng khác nhau có thể được phun vào xơ sợi tơ kép được sử dụng trong sản xuất các đầu lọc thuốc lá. Các dịch lỏng này, mà có thể được sử dụng trong sợi riêng hoặc kết hợp với vật mang dạng lỏng hoặc khí, có thể là chất tạo hương, chất phủ xơ, chất bôi trơn, dung dịch định cỡ, chế phẩm hoàn thiện, chất dẻo hóa, hoặc tương tự. Các dịch lỏng này được dự định truyền các tính chất vật lý hoặc đặc trưng mùi vào khói thuốc lá qua xơ đã được xử lý bằng dịch lỏng. Các quy trình phun dịch lỏng được nêu, ví dụ, trong Patent Mỹ số 5,387,285 của Rivers.

Sợi xenluloza axetat mà tạo ra bộ phận đầu lọc thường được phủ chế phẩm hoàn thiện sợi. Nói chung, chế phẩm này là nhũ tương gốc nước bao gồm nhiều thành phần. Mỗi thành phần có thể phù hợp với chức năng cụ thể trong khi xử lý sợi hoặc trong khi sử dụng tiếp đầu lọc tạo thành từ sợi này. Các thành phần thông thường của chế phẩm hoàn thiện sợi bao gồm dầu bôi trơn làm giảm ma sát sao cho sợi có thể được xử lý mà không đứt gãy, chất chống tĩnh điện làm giảm sự tích điện trên sợi, và chất nhũ hóa làm ức chế sự tách pha ở dạng sợi trong khi xử lý. Các thành phần phụ trợ khác có thể bao gồm chất chống vi khuẩn, chất ức nước, hoặc các hợp chất hoạt tính khác. Sau khi lắp xơ dạng sợi vào nguyên liệu đã có đầu lọc, các chất dẻo hóa có thể được áp dụng để làm mềm sợi và cho phép sợi liên kết để làm cứng đầu lọc đến độ cứng/độ chặt mong muốn. Hóa học bề mặt của xenluloza axetat và chất dẻo hóa có thể tạo ra đối với mùi thuốc được mong muốn rộng rãi và được người hút thuốc chấp nhận. Một số kiểu dáng/cách trình bày đầu lọc khác nhất định có thể tạo ra mùi thuốc khác nhau. Đến nay, các đầu lọc không chứa sợi xenluloza axetat thường không được chấp nhận mà cũng không đáp ứng tiêu chuẩn thương mại.

Tình trạng kỹ thuật bao gồm một vài công bố liên quan đến đầu lọc thuốc lá điều và một số cải tiến khác nhau được áp dụng.

WO2013/1869838 bộc lộ đầu lọc thuốc lá điều bao gồm đệm lọc chứa sợi móc xenluloza este, bột giấy, và muối kim loại kiềm của polyme anion tan trong nước. Đệm lọc có hàm lượng kim loại kiềm là từ 2 đến 100 μmol mỗi gam đệm lọc. Polyme anion tan trong nước có thể chứa ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm gồm axit polyacrylic và polysacarit có nhóm carboxyl.

Patent Nhật Bản số 3677309 bộc lộ nguyên liệu của đầu lọc thuốc lá điều ở dạng tấm có kết cấu giấy và bao gồm sợi móc xenluloza este không quấn và bột giấy đã đánh toi, trong đó bột giấy đã đánh toi có độ toi xét theo độ nghiền nhỏ Schopper-Riegler là từ 20 đến 90°SR, và sợi móc xenluloza este không quấn là sợi móc có độ dài sợi trung bình bằng từ 1 đến 10 mm và độ mịn là từ 1 đến 10 denie. Tài liệu này cho thấy có chất gắn kết trong quá trình điều chế nguyên liệu tấm (ví dụ, chất dính tan trong nước), chất gắn kết này có thể được dùng với điều kiện nó không có tác động tiêu cực đến sức khỏe, không làm giảm vị giác và vị ngon của khói thuốc lá, mà cũng không thể dẫn đến sự phân hủy nguyên liệu đầu lọc. Nói chung, lượng chất gắn kết tốt hơn là nhỏ nhất có thể (ví dụ, không lớn hơn 10% trọng lượng trong tổng trọng lượng nguyên liệu). Một ví

dụ trong tài liệu này mô tả nguyên liệu tấm tạo thành từ sợi mốt xenluloza axetat không quần và bột giấy đã đánh toi bằng quy trình sản xuất giấy ướt, sau đó phun dung dịch nước chứa carboxymetyl xenluloza (3% trọng lượng dựa trên trọng lượng khô).

Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 7-75542 bộc lộ đầu lọc thuốc lá điều bao gồm xơ chứa sợi xenluloza este và polyme tan trong nước có trong xơ và liên kết với sợi, sợi được xử lý thành thanh đầu lọc sử dụng không nhiều hơn 25 phần trọng lượng nước ứng với 100 phần trọng lượng sợi. Các ví dụ trong tài liệu này bao gồm đầu lọc thuốc lá điều đầu ngâm điều thuốc thu được bằng cách bổ sung 5% trọng lượng muối natri carboxymetyl xenluloza ở dạng polyme tan trong nước vào xơ sợi xenluloza axetat quần hờ và đưa xơ hờ vào máy cuộn để cuộn xơ hờ bằng cách bọc đầu lọc.

Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 8-322539 (tài liệu Patent 3, JP-8-322539A) bộc lộ đầu lọc thuốc lá điều chứa vải không dệt gồm chế phẩm xenluloza este và chất gắn kết có độ phân tán trong nước tốt, vải không dệt được cuộn thành dạng thanh. Các ví dụ trong tài liệu này bao gồm đệm lọc được tạo ra bằng cách thổi lưới chắn có sợi mốt xenluloza axetat bằng dòng khí để cán mỏng hoặc tích tụ, và phun chất cán mỏng trên dây với 10% trọng lượng dung dịch nước 5% chứa carboxymetyl xenluloza, ép và làm khô lớp mỏng ẩm, đưa vải không dệt thu được vào xử lý lăn tròn làm biến dạng, và sau đó cuộn sợi.

WO 2014/164492 đề cập đến các đầu lọc thuốc lá làm giảm nồng độ cacbon monoxit và phenol trong làn khói thuốc. Các đầu lọc này bao gồm phần chất xốp chứa nhiều hạt có hoạt tính, nhiều hạt chất gắn kết, và lớp hoạt tính được đặt trên ít nhất một phần hạt hoạt tính và hạt chất gắn kết, trong đó các hạt có hoạt tính và các hạt chất gắn kết được liên kết với nhau ở nhiều điểm tiếp xúc; và phần đầu lọc. Trong một số trường hợp, đầu lọc có thể bao gồm phần chất xốp chứa nhiều các hạt có hoạt tính và nhiều các hạt chất gắn kết, trong đó các hạt có hoạt tính và các hạt chất gắn kết được liên kết với nhau ở nhiều điểm tiếp xúc mà không có chất dính; và phần đầu lọc chứa chất kích thích hoạt tính. Mặc dù đầu lọc thuốc lá này có thể cho các kết quả tăng cường, nhưng việc điều chế nó khá phức tạp và nguyên liệu sử dụng để đạt hiệu quả lọc mong muốn lại đắt.

Đầu lọc thuốc lá điều có hiệu quả cao được mô tả trong WO 2010/125412. Ngoài các thành phần thông thường của đầu lọc thuốc lá điều, đầu lọc thuốc lá điều bao gồm

chất giống bomit ($\text{AlOOH.H}_2\text{O}$), và các thành phần của nho, astaxanthin và cây nam việt quất cranberry làm chất chống oxy hóa. Tác dụng có lợi của đầu lọc thuốc lá điều còn do sử dụng các thành phần chứa nho ở dạng mạch nha của vỏ và hạt nho và. Toàn bộ nội dung của WO 2010/125412 được kết hợp ở đây để tham khảo.

Như nêu trên, đã biết rằng hút thuốc lá ảnh hưởng nghiêm trọng đến vấn đề sức khỏe cộng đồng và yếu tố gây bệnh quan trọng góp phần vào sự phát triển ung thư phổi và bệnh tắc nghẽn phổi mãn tính. Do đó, việc nhận biết các kỹ thuật mới để làm giảm bệnh phổi do thuốc lá điều gây ra là lợi ích đáng kể.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất đầu lọc thuốc lá điều, có các ưu điểm của các giải pháp thuộc tình trạng kỹ thuật đã biết, nhưng đồng thời loại trừ được các nhược điểm của các giải pháp này đến mức tốt nhất có thể. Mục đích khác của sáng chế là đề xuất đầu lọc thuốc lá điều làm giảm tiếp hàm lượng có hại của khói thuốc lá so với đầu lọc thuốc lá điều đã biết.

Đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng, mục đích của sáng chế có thể đạt được thành công, nếu chất tự nhiên, alginat, không được sử dụng trước đó cho mục đích này, được áp dụng vào đầu lọc thuốc lá điều.

Kinh nghiệm của các tác giả cho thấy việc giảm đáng kể lượng chất có hại trong khói thuốc lá, so với các đầu lọc hiện tại, có thể được thấy rõ nếu alginat được sử dụng trong các đầu lọc.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ hộp thể hiện sự thay đổi về trạng thái chống oxy hóa.

Fig.2 là biểu đồ hộp thể hiện nhiều biến số theo một phương án của sáng chế.

Fig.3 là biểu đồ cột thể hiện khả năng chống oxy hóa theo một phương án của sáng chế.

Fig.4 là biểu đồ cột thể hiện sự cải thiện so với đối chứng theo một phương án của sáng chế.

Fig.5 là biểu đồ cột thể hiện khả năng chống oxy hóa theo một phương án khác của sáng chế.

Fig.6 là biểu đồ cột thể hiện sự cải thiện so với đối chứng theo một phương án khác của sáng chế.

Fig.7 là biểu đồ cột thể hiện khả năng chống oxy hóa theo một phương án khác nữa của sáng chế.

Fig.8 thể hiện sự thay đổi khả năng chống oxy hóa đối với huyết thanh đối chứng.

Fig.9 thể hiện sự thay đổi khả năng chống oxy hóa đối với thuốc lá điều Kentucky.

Fig.10 thể hiện sự thay đổi khả năng chống oxy hóa trong huyết thanh của 38 tình nguyện viên.

Fig.11 là biểu đồ hộp thể hiện nhiều biến số theo một phương án khác của sáng chế.

Fig.12 thể hiện hiệu quả của thành phần đầu lọc thuốc lá điều trên khối thuốc lá gây ra sự chết tế bào trong dòng tế bào biểu mô ung thư phổi A549 khối thuốc MTT 2015 09 03.

Fig.13 thể hiện ảnh hưởng của các cấu phần đầu lọc khác nhau trên sự chết tế bào gây ra do khối thuốc của Các tế bào nội mô động mạch dây rốn người sơ cấp (HUVEC).

Fig.14 thể hiện protein IL-của người trong các dịch nổi của đại thực bào chứa các khối phỏng cầu phổi sau 48 giờ ở các khối kết tụ 3 loại tế bào (SAEC, sợi nguyên bào và đại thực bào).

Fig.15 thể hiện protein IL-6 của người trong các dịch nổi của đại thực bào chứa các khối phỏng cầu phổi sau 48 giờ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến đầu lọc thuốc lá điều, đầu lọc này làm giảm hơn nữa thành phần có hại của khói thuốc lá so với đầu lọc thuốc lá điều đã biết. Các đặc tính có lợi nói trên là do việc sử dụng alginit trong đầu lọc thuốc lá điều. Alginit có thể được sử dụng riêng hoặc kết hợp với các chất khác, đã được sử dụng trong đầu lọc thuốc lá điều.

Alginit là đá kết tủa gồm có sinh khối tảo và túp, bụi núi lửa tách khỏi đất sét. Trong các hồ có hoạt động núi lửa mạnh thuộc lưu vực dãy núi Carpat xảy ra ở thế

Plioxen cách đây khoảng 3-5 triệu năm. Hoạt động này tạo ra các núi bazan đã được biết rõ, đồng thời cũng tạo ra các vòng túp đặc biệt. Sau khi núi lửa tắt, các vòng túp này bị chìm xuống nước theo đó tạo ra các hồ hồ miệng núi lửa (hồ núi lửa). Nước của hồ miệng núi lửa được gia nhiệt bởi các dòng nhiệt, và các dung dịch nóng chứa trong đó làm giàu nước bằng các nguyên tố vi lượng, muối khoáng và chất dinh dưỡng khác. Các nguyên tố trong các keo khoáng tạo thành từ sự phân hủy vật liệu thủy tinh của túp núi lửa còn làm giàu thành phần dinh dưỡng cho hồ miệng núi lửa. Trong dòng nước tĩnh lặng của hồ miệng núi lửa, tích tụ lượng lớn tảo (đặc biệt là tảo xanh *Botriococcus braunii*) và các động thực vật phù du khác. Các động thực vật tích tụ này chết và trộn với cặn của lá và phần hoa rữa trôi khỏi thực vật bờ dày đặc và lắng đọng ở đáy hồ miệng núi lửa. Trong môi trường thiếu oxy cùng với túp phân rã và các sinh vật phù du chết khác, chúng tích tụ dưới dạng bùn phân rã (bùn thối). Trong pha lắng bùn của hồ miệng núi lửa, cơ thể của các động vật lớn hơn được đưa vào bùn ẩm, và kết quả là bùn này giàu vật liệu phospho. Sinh khối bị tiêu hủy và cứng lại này trải qua các thay đổi lý hóa đặc biệt trong vài triệu năm và tạo thành dạng hiện tại của nó: đá alginit.

Alginit là loại đá đất có cấu trúc sét gồm có các phiến tách biệt kiểu lá ngẫu nhiên. Alginit không có độc tính (xem Dr. Solti Gabor: Az Alginit. Ismertető tanulmány. Az Alginit a Mezőgazdasáért és Környezetvédelemért Alapítvány tevékenysége (1993-2013) 2014). Màu của nó là xanh ngọc (xanh lá cây) hoặc màu xám đôi khi chuyển thành màu son. Cấu trúc phiến của nó có thể thấy rõ hơn sau khi sấy khô, và thường tìm thấy vết tích thực vật hoặc cặn thực vật giữa các phiến.

Đặc tính vật lý quan trọng nhất của nó là ở chỗ nó có thể liên kết với 0,5-1,0 l nước/kg. Alginit gồm có 80-90 % đất sét và các phân đoạn bùn, với phần trầm tích chứa các hạt thô hơn gần bờ. Trong pha cuối của các miệng núi lửa lắng bùn (phá), hàm lượng chất hữu cơ giảm và hàm lượng bentonit tăng. Thành phần alginit có độ lệch cao ở các mẫu lấy từ cùng vị trí. Hàm lượng mùn trung bình là 30%, đôi khi đạt tới 45%. Hàm lượng vôi trung bình (ở dạng CaCO_3) là 33%, đôi khi đạt tới 40%. Sinh khối hóa thạch được chứng minh là chứa 64 nguyên tố. Điều này có nghĩa là alginit đặc biệt giàu các nguyên tố đa lượng và vi lượng, với các nguyên tố quan trọng nhất như sau: nitơ (N): 0,5%, phospho (ở dạng P_2O_5): 0,6%, kali (ở dạng K_2O): 0,9%, magie (Mg): 1,0%. Các thành phần chất khoáng thông thường là montmorilonit, illit, dolomit, canxit, aragonit, thạch anh, thạch cao, plagiocla, siderit, magnesit, pyrit và orthocla. Ngoài các

nguyên tố trên, các nguyên tố vi lượng quan trọng hơn là sắt (Fe), mangan (Mn), đồng (Cu), kẽm (Zn), coban (Co), niken (Ni), lithi (Li), titan (Ti), crom (Cr) và cadmi (Cd). Một trong số các đặc tính của các thành phần mùn là tác dụng tăng cường sinh trưởng thực vật sinh hóa của nó. Khi alginat được sử dụng trong nông nghiệp, các axit humic tạo ra tác dụng tăng cường kiểu enzym cũng như kiểu hoóc môn, và thông qua việc điều hòa khả năng hấp thu nước của rễ – cũng tạo ra tác dụng tăng cường gián tiếp đối với sự sinh trưởng của thực vật.

Alginat có ứng dụng rộng rãi nhằm nhiều mục đích. Trong trồng cây và cây ăn quả, alginat có thể được sử dụng để cải thiện. Việc sử dụng nó đơn thuần làm gia tăng độ phì nhiêu của đất 20-30 % trong năm đầu. Do có khoáng vật sét, các phân bón nhân tạo phải được sử dụng ở mức cao hơn, do đó gia tăng sự chuyển phospho, nitơ và kali từ đất vào nước ngầm, sông và hồ. Tác dụng của nó kéo dài trong 4-6 năm. Alginat là vật liệu tự nhiên, giữ được chất lượng của nó vô hạn định, không thể bị lạm dụng và ngay cả mức sử dụng cao hơn không có tác dụng bất lợi bất kỳ. Alginat cũng có thể được sử dụng làm đất vườn ở dạng hỗn hợp. Bằng cách trộn với các vật liệu tự nhiên khác như zeolit, peclit, than bùn hoặc bazan, các hỗn hợp đất không chứa hóa chất, hiệu quả cao đã được sản xuất. Việc sử dụng alginat dẫn đến gia tăng năng suất và chất lượng trong trồng rau và cây trang trí trong vườn hoặc trong nhà ống (polytunnel) khi thu hoạch. Alginat cũng có thể được sử dụng làm chất môi trong các lỗ trồng các loài cây rừng. Việc sử dụng alginat dẫn đến gia tăng về lượng 6-13 % và sinh trưởng nhanh hơn 20 %. Huyền phù phun với alginat vào mùa thu có tác dụng bảo vệ cây và giúp cây ngủ đông, trong khi phun vào mùa xuân giúp chống sinh vật gây hại. Nhờ việc phun alginat, hàm lượng mangan, sắt, kẽm và đồng của cây gia tăng, trong khi hàm lượng canxi trong quả tạo ra vị ngon hơn và thời hạn sử dụng dài hơn. Trong chăn nuôi, alginat kết hợp với phân bón lỏng tạo ra sản phẩm có hiệu quả cao được sử dụng dưới dạng xử lý bổ sung cho phân bón hữu cơ, hoặc để thay thế phân bón hữu cơ. Alginat làm giảm giai đoạn phân hủy của phân bón và có thể được kết hợp với các chất dinh dưỡng khác. Việc trộn alginat với phân chuồng tạo ra phân bón thực chất hơn và tăng cường sự sinh trưởng của động vật nuôi và gia cầm. Alginat cũng tạo ra các tác dụng bảo vệ môi trường. Do có ái lực hấp phụ cao, nó liên kết hữu hiệu với các mùi của chuồng nuôi động vật và làm giảm nồng độ SO₂ và NH₃ trong không khí (ví dụ, xem Hungarian Patent No. 189.383: "Process for binding of gases with unpleasant smell produced by dissolving organic

materials and for production of organic manure with high efficiency").

Việc sử dụng alginat cho người bao gồm sử dụng nó dưới dạng bùn đối với các vấn đề về khớp, thấp khớp và thể thao, cũng như có lợi trong việc tạo ra thuốc mỡ trị bệnh thấp khớp. Alginat cũng hữu ích để trị chứng giãn tĩnh mạch và bệnh vẩy nến và cũng có thể được sử dụng để tái tạo da và tăng cường chung trạng thái của da. Ngoài ra, alginat cũng có thể được sử dụng làm nền cho các thuốc thơm.

Alginat có thể được tìm thấy ở Hungary và có bán trên thị trường bởi các công ty của Hungary, ví dụ, từ Gércé-Alginat Kft, (Gércé, Hungary)

Ngạc nhiên là, alginat hiện được coi là hữu hiệu trong lĩnh vực kỹ thuật mới. Các nghiên cứu của chúng tôi chứng minh rằng alginat đặc biệt hữu hiệu khi được sử dụng trong đầu lọc thuốc lá điều riêng hoặc kết hợp với các thành phần đã biết khác như được bàn luận ở dưới. Ngạc nhiên là, đã phát hiện ra rằng việc sử dụng alginat trong đầu lọc thuốc lá điều tạo ra loại oxy phản ứng (Reactive Oxygen Specie, ROS) thấp hơn đáng kể trong nước bọt, tạo ra ROS thấp hơn đáng kể trong huyết thanh, tổn thương nội mô ít hơn, tổn thương biểu mô phổi ít hơn, mức glutathion cao hơn đáng kể, giảm tổn thương đối với các mô phổi và giảm viêm trong các mô phổi, các đặc tính có lợi nói trên sẽ được bộc lộ chi tiết ở dưới.

Việc sử dụng alginat làm cho loại oxy phản ứng (ROS) thấp hơn đáng kể trong nước bọt. Mặc dù bản thân nước bọt có nồng độ xác định các gốc tự do, khói thuốc lá làm gia tăng mức độ của các gốc tự do. Ước tính rằng có nhiều hơn 10^{14} gốc tự do cho mỗi hơi của khói thuốc lá (Church and Pryor, 1985; Church DF, Pryor WA, "Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications," Environ Health Perspect, 1985, 64:111-26). Do gốc tự do có thể tương tác với nhiều chất hữu cơ để tạo ra ROS, không ngạc nhiên rằng khói thuốc lá làm gia tăng mức ROS trong nước bọt. Tuy nhiên, ngoài các gốc chứa trong khói thuốc lá, sự tạo gốc đáng kể cũng như sự sản sinh trực tiếp ROS có thể phát sinh từ đáp ứng viêm do khói thuốc lá gây ra, dẫn đến gia tăng các mức bạch cầu trung tính và đại thực bào (Messner and Bernhard, 2014; Messner B, Bernhard D, "Smoking and cardiovascular disease. Mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis," Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34:509-15). Chúng tôi đã đo khả năng chống oxy hóa của nước bọt không được xử lý của những người tự nguyện, tiếp theo những người này hút một điếu thuốc lá, sau đó

nước bọt của họ lại được lấy. Chúng tôi đã đo sự thay đổi mức độ khả năng chống oxy hóa trong nước bọt bằng cách sử dụng khối thuốc lá từ điều thuốc lá đối chứng. Chúng tôi lặp lại thí nghiệm này với các đầu lọc khác nhau chứa cả mono alginat duy nhất và trong bốn tổ hợp khác nhau của alginat với – vỏ và hạt nho (GSS), alginat – Al oxit đặc biệt, alginat - zeolit alginat – cacbon của các đầu lọc giống nhau trong hỗn hợp 50-50%. Tất cả các đầu lọc tổ hợp với alginat làm giảm khả năng chống oxy hóa trong nước bọt ít hơn đáng kể so với đầu lọc đối chứng. Alginat riêng tạo ra sự khác biệt đáng kể về khả năng chống oxy hóa so với đối chứng, song tất cả các thuốc lá điều tổ hợp tốt hơn đáng kể so với alginat riêng, rõ ràng rằng alginat và các thành phần tổ hợp tác động một cách hiệp đồng.

Việc sử dụng đầu lọc alginat khiến cho sự tạo ROS thấp hơn đáng kể trong huyết thanh. Thí nghiệm chứng minh điều này là giống với thí nghiệm nước bọt, song nó được thực hiện với huyết thanh. Bản thân huyết thanh có nồng độ xác định gốc tự do. Mặc dù bản thân huyết thanh có nồng độ xác định gốc tự do, khối thuốc lá làm gia tăng mức gốc tự do. Ước tính rằng có nhiều hơn 10^{14} gốc tự do cho mỗi hơi của khối thuốc lá (Church and Pryor, 1985). Do gốc tự do có thể tương tác với nhiều chất hữu cơ để tạo ra ROS, không ngạc nhiên rằng khối thuốc lá làm giảm khả năng chống oxy hóa của huyết thanh. Tuy nhiên, ngoài các gốc chứa trong khối thuốc lá, sự tạo gốc đáng kể cũng như sự sản sinh trực tiếp ROS có thể phát sinh từ đáp ứng viêm do khối thuốc lá gây ra dẫn đến gia tăng các mức bạch cầu trung tính và đại thực bào (Messner and Bernhard, 2013). Chúng tôi đã đo khả năng chống oxy hóa của huyết thanh không được xử lý. Tiếp theo, chúng tôi sử dụng máy hút thuốc lá của chúng tôi dẫn khối thuốc lá nguyên vẹn qua ống huyết thanh. Chúng tôi đã đo sự thay đổi khả năng chống oxy hóa trong huyết thanh bằng cách sử dụng khối thuốc lá từ thuốc lá điều đối chứng. Chúng tôi lặp lại thí nghiệm này với các đầu lọc khác nhau chứa cả mono alginat duy nhất và tổ hợp của alginat với bốn vật liệu lọc khác nhau, tức là alginat – vỏ và hạt nho (GSS), alginat – Al oxit đặc biệt, alginat – zeolit, alginat – cacbon của các đầu lọc giống nhau. Tất cả các đầu lọc chứa alginat làm giảm khả năng chống oxy hóa trong huyết thanh ít hơn đáng kể so với đầu lọc đối chứng.

Việc sử dụng alginat tạo ra khối thuốc lá gây tổn thương nội mô ít hơn. Các tế bào lót bề mặt trong của các mạch máu được gọi là các tế bào nội mô. Các tế bào này đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ các mạch máu này. Khi nội mô bị tổn thương,

thường được gọi là loạn chức năng nội mô, nguy cơ mắc bệnh tim mạch gia tăng. Do khói thuốc lá, khi rời phổi qua các phế nang, đi vào máu, sự tiếp xúc của nội mô với khói thuốc lá xảy ra và ban đầu dẫn đến loạn chức năng nội mô, được biết rõ là bước đầu tiên quan trọng trong phát triển bệnh tim mạch liên quan đến hút thuốc lá (Ambrose and Barua, 2004; Ambrose JA, Barua RS, “The pathophysiology of cigarette and cardiovascular disease. An update,” *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43:1731-7; Messner and Bernhard, 2014). Chúng tôi đo sự tổn thương tế bào nội mô xảy ra khi các tế bào nội mô tiếp xúc với khói thuốc lá nguyên vẹn so với các tế bào không được xử lý. Sự tổn thương tế bào ít hơn đáng kể xảy ra khi dòng tế bào này tiếp xúc với khói thuốc lá được lọc bằng alginat hoặc khói thuốc lá được lọc bằng tổ hợp chứa alginat.

Việc sử dụng alginat cũng dẫn đến tạo ra khói thuốc lá gây tổn thương biểu mô phổi ít hơn. Biểu mô phổi là lớp phòng thủ đầu tiên đối với các chất độc được hít vào. Các tế bào biểu mô phế nang trong phổi được biết là bị tổn thương bởi việc tiếp xúc với khói thuốc lá đến mức và bao gồm sự chết tế bào (Kosmider et al., 2011; Kosmider B, Messier EM, Chu HW, Mason RJ, “Human alveolar epithelial cell injury induced by cigarette smoke,” *PLoS One*, 2011, 6:e26059), được chứng minh bằng sự giảm số lượng tế bào khỏe mạnh so với các tế bào không được xử lý. Alginat chứa khói được lọc làm giảm số lượng tế bào khỏe mạnh thấp hơn so với thuốc lá điều đối chứng. Do các tế bào biểu mô hoại tử tiết ra các protein vào phổi gây viêm, cuối cùng có thể dẫn đến ung thư phổi hoặc COPD, việc bảo vệ biểu mô này bằng các đầu lọc chứa alginat và tổ hợp của bốn vật liệu lọc khác nhau ghép cặp với tức là alginat với – vỏ và hạt nho (GSS), alginat – Al oxit đặc biệt, alginat – cacbon của các đầu lọc giống nhau rõ ràng là có lợi cho sức khỏe đối với người hút thuốc.

Mức glutathion cũng cao hơn đáng kể với khói thuốc lá được lọc bằng alginat so với thuốc lá điều đối chứng. Cả hai dòng tế bào biểu mô và nội mô đều được tiếp xúc với thuốc lá điều đối chứng và alginat và tổ hợp của alginat với – vỏ và hạt nho (GSS), alginat – Al oxit đặc biệt, alginat – cacbon của các đầu lọc giống nhau, như khói thuốc lá điều nguyên vẹn được lọc bằng alginat. Việc xác định mức glutathion chỉ ra mức glutathion trong các tế bào tiếp xúc với khói từ các thuốc lá điều được lọc bằng alginat là cao hơn nhiều so với thuốc lá điều đối chứng. Do đã biết rằng glutathion bảo vệ chống lại áp lực oxy hóa (Rahman and MacNee, 2000; Rahman I, MacNee W, “Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation,” *Eur Respir J*,

2000, 16:534-54), điều này có nghĩa là các đầu lọc chứa alginat bảo vệ cơ chế phòng thủ nội tại của phổi chống lại tổn thương mô phổi do áp lực oxy hóa gây ra tốt hơn so với thuốc lá điều trị chứng.

Khối thuốc lá được lọc bằng alginat gây tổn thương ít hơn trong các mô phổi và gây viêm ít hơn so với khối thuốc lá điều trị chứng. Mô phổi ba chiều – được thiết kế dưới dạng hình phỏng cầu – đã được cấu trúc từ các tế bào người có profin đã biết, cụ thể là các tế bào biểu mô phổi, các nguyên bào sợi, các tế bào nội mô và các đại thực bào. Cấu trúc ba chiều này cho phép các tế bào phát triển cơ quan chức năng, giống với cơ quan chức năng được tìm thấy trong các bản sao trong cơ thể của chúng. Các mô hình 3D tạo ra mô hình thực nghiệm mô phỏng môi trường trong cơ thể tốt hơn nhiều so với các hệ thống một giống nuôi cấy-một lớp (2D) thông thường. Profin sinh hóa của nuôi cấy mô 3D là rất giống với profin sinh hóa của sinh vật sống. Hình phỏng cầu 3D phản ứng với các chất kích thích bên ngoài giống như mô phổi ngoại vi sống. Đáp ứng viêm của chúng là hầu như giống hệt, và chúng cũng tạo ra chất hoạt động bề mặt. Khi các hình phỏng cầu 3D này tiếp xúc với khối thuốc lá được lọc qua đầu lọc thuốc lá điều trị chứa alginat mới, mức cytokin IL-8 và IL-6, các chất trung gian gây viêm đã biết, biểu hiện ở mức thấp hơn đáng kể so với các thuốc lá điều trị chứng.

Như đề cập ở trên, alginat có thể được sử dụng trong các đầu lọc theo sáng chế riêng hoặc kết hợp với các chất khác được sử dụng trong đầu lọc thuốc lá điều trị trước ngày nộp đơn. Các vật liệu này cũng như việc sản xuất và sử dụng chúng là được chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ.

Ví dụ, khi nói đến đầu lọc thuốc lá điều trị "cacbon" hoặc "nhỏ" hoặc "thành phần nhỏ" thì chúng có nghĩa là than hoạt tính và hạt nhỏ và bột malt vỏ, mặc dù, từ tình trạng kỹ thuật hiển nhiên đối với chuyên gia trong lĩnh vực này rằng các thành phần nhỏ cũng có thể ở các dạng khác. Các thành phần này, cũng như độ khả dụng của chúng cũng được chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ.

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua phần Ví dụ thực hiện sáng chế sau. Các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa. Từ phần Ví dụ thực hiện sáng chế chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ dễ dàng hiểu rằng chỉ riêng alginat đã cải thiện đáng kể các đặc tính lọc so với các vật liệu lọc đã biết. Hơn nữa, phần Ví dụ thực hiện sáng chế chứa số liệu về các tổ hợp chứa alginat và các vật liệu lọc xác định thuộc tình trạng kỹ

thuật đã biết sẽ giúp chuyên gia trong lĩnh vực này hiểu rõ rằng alginit tác dụng một cách hiệp đồng với các vật liệu lọc khác. Liên quan đến các vật liệu này, chúng tôi cũng đề cập đến, ví dụ, chất dọn dẹp gốc tự do được bộc lộ trong WO 2010/125412 đã đề cập ở trên và được đưa vào trong bản mô tả này theo cách viện dẫn. Do đó, mặc dù không phải tất cả các tổ hợp chứa alginit đều được nêu trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, chuyên gia trong lĩnh vực này hiểu rằng các thành phần tổ hợp của alginit có thể được trao đổi tùy ý với các vật liệu lọc thích hợp khác và rằng tất cả các tổ hợp này đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Việc sử dụng alginit làm gia tăng tình trạng chống oxy hóa trong nước bọt và huyết thanh ít hơn đáng kể – Thí nghiệm của Đại học Công nghệ Budapest (Budapest University of Technology: BUT)

Mục đích của nghiên cứu này là nghiên cứu các tác dụng của các đầu lọc khác nhau đối với khả năng khổi thuốc lá làm biến đổi tình trạng chống oxy hóa của các mẫu (huyết thanh và nước bọt). Việc đo các mẫu huyết thanh được thực hiện bằng thử nghiệm RANDOX® TAS. Các mẫu huyết thanh được điều chế bằng cách hoàn nguyên huyết thanh được làm đông khô nhanh, được đo sau khi hoàn nguyên (trống) hoặc sau khi khổi thuốc lá đã lọc được sục qua nó. Tổng tình trạng chống oxy hóa của nước bọt được đo trước và sau khi hút các điều thuốc lá thông thường và thực nghiệm có trang bị các đầu lọc theo sáng chế. Số liệu thu được bằng các phép đo của chúng tôi có thể phản ánh khả năng liên kết với gốc tự do và ROS của các đầu lọc.

Vật liệu và phương pháp

Các phép đo trạng thái chống oxy hóa bằng thử nghiệm benzidin và bộ kit trạng thái chống oxy hóa toàn phần (Total Antioxidant Status - TAS) Randox®

Các phép đo trạng thái chống oxy hóa được tiến hành bằng thử nghiệm benzidin được chấp nhận rộng rãi và bộ kit trạng thái chống oxy hóa toàn phần (TAS) Randox® có bán trên thị trường. Thử nghiệm benzidin sử dụng hệ thống tạo ra peroxit (hydro peroxit và peroxidaza) và nhóm sinh màu nhạy peroxit (benzidin). Các peroxit được tạo ra tại chỗ phản ứng với nhóm sinh màu để tạo ra hợp chất trung gian với hệ số hấp thụ cực đại ở 620 nm có thể phát hiện được bằng quang phổ kế. Các chất chống oxy hóa có mặt trong mẫu cạnh tranh với nhóm sinh màu trong các phản ứng của nó với các peroxit

và cản trở sự tạo ra tín hiệu có thể phát hiện được. Bằng cách so sánh sự tạo thành nhóm sinh màu có thể phát hiện được của các mẫu với đối chứng âm không có các chất chống oxy hóa và với đối chứng dương có nồng độ chất chống oxy hóa đã biết, trạng thái chống oxy hóa của các mẫu có thể được đánh giá.

Các chất phản ứng và thiết bị được sử dụng

Chất phản ứng A (được hòa tan trong nước tinh khiết loại II)

- natri clorua 155 mM (Reanal, danh mục số 24640-1-08-38)
- peroxidaza củ cải ngựa 25 mU/ml (Sigma®, danh mục số 77332)
- benzidin dihydroclorua 233 μ M (Sigma®, danh mục số B3383)

Chất phản ứng B (được hòa tan trong nước tinh khiết loại II)

- ure-hydro peroxit 250 μ M (Sigma®, danh mục số 289132)

Các mẫu

Các mẫu nước bọt được lấy từ 17 đối tượng trước và sau khi hút thuốc lá. Những người tình nguyện được lựa chọn bởi các phòng thí nghiệm OF (OF Laboratories) của trường đại học kỹ thuật và kinh tế Budapest (Budapest University of Technology and Economics). Mỗi người tình nguyện được thông cáo trong khoảng từ 8 đến 9 giờ sáng để lấy nước bọt, hút thuốc lá và lấy nước bọt lại. Mỗi sáng, hút một điếu thuốc lá thử nghiệm và nước bọt được thu. Mỗi người tình nguyện hút 4 điếu thuốc lá khác nhau (được phân biệt bằng đầu lọc); hai điếu giữa 4-7, tháng 12 năm 2015 và hai điếu giữa 5-8, tháng 1 năm 2016. Người hút thuốc được yêu cầu báo cáo việc hút thuốc lá khi không ăn bất cứ loại thức ăn hoặc chất lỏng nào vào buổi sáng và chưa đánh răng. Nước bọt được làm bảo quản lạnh và tiến hành đánh giá theo các giả thuyết của phòng thí nghiệm BUT.

Nam giới		Nữ giới	
14 người		3 người	
Hút thuốc	Không hút thuốc	Hút thuốc	Không hút thuốc
12	2	2	1
Tuổi		Tuổi	
18-24 tuổi	6 người	18-24 tuổi	2 người
25-40 tuổi	4 người	25-40 tuổi	0 người
41-59 tuổi	3 người	41-59 tuổi	1 người
60+ tuổi	1 người	60+ tuổi	0 người

Các mẫu huyết thanh được hoàn nguyên từ huyết thanh được làm khô lạnh (Analyticon Contronorm® PLUS), theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất, trong nước tinh khiết loại II. Các mẫu huyết thanh được đo trực tiếp (trống) hoặc sau đó khói thuốc lá đã lọc được thổi qua huyết thanh bằng OptiFilter. Các điều thuốc lá được hút bằng cách sử dụng máy hút thuốc lá bằng Filtrona SM302 8-lỗ thông. Các điều thuốc lá được hút theo ISO 3308 với 100% các lỗ thông đầu lọc đều bị chặn. Khói thuốc đi qua đầu lọc Cambridge (Đầu lọc sợi thủy tinh 44mm, sản phẩm số: 80202851, Borgwaldt KC), và pha khí tạo thành được xoáy qua ống silicon và được thổi vào vật chứa Glad (vật va chạm) chứa 1,5 ml dung dịch huyết thanh. Sau mỗi điều thuốc lá, đệm lọc Cambridge được thay bằng một đệm lọc mới, sau mỗi điều thuốc lá, ống silicon được thay bằng một ống silicon mới. Các đầu lọc được dán nhãn từ 1 đến 3.

Các đối chứng và dụng cụ đo

- đối chứng âm (Nước tinh khiết loại II)
- đối chứng dương (Tiêu chuẩn bộ định chuẩn từ bộ kit trạng thái chống oxy hóa toàn phần Randox® danh mục số NX 2332)
- bộ kit trạng thái chống oxy hóa toàn phần Randox®
- Quang phổ kế (Quang phổ kế vi đĩa nhiệt Scientific™ Multiskan™ GO (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate))

Phương pháp thử nghiệm benzidin

Các phép đo được tiến hành bằng quang phổ kế vi đĩa được mô tả ở trên, các tế bào được ủ ở nhiệt độ 37°C trên đĩa 96 lỗ. Hỗn hợp phản ứng trên vi đĩa được chuẩn bị như sau: 5 µl mẫu hoặc đối chứng và 250 µl chất phản ứng A được hút bằng pipet vào các lỗ. Hỗn hợp này sau đó được làm đồng nhất hóa và được đọc bằng máy đọc vi đĩa. Hệ số hấp thụ ban đầu đọc ở $\lambda=620$ nm được xác định trước khi bổ sung 50 µl chất phản ứng B để khởi đầu sự tạo ra peroxit, sau khi các trị số đọc của hệ số hấp thụ được xác định ở $\lambda=620$ nm từ 0 đến 3 phút. Các kết quả hệ số hấp thụ được xem là các trị số hệ số hấp thụ được đo ở 2,5 phút. Tất cả các mẫu và đối chứng được bảo quản trên đá, và mỗi mẫu được đo trong 3 lỗ song song đối với phân tích thống kê.

Phương pháp bộ kit trạng thái chống oxy hóa (TAS) Randox®

Các phép đo được tiến hành theo sổ tay cung cấp bằng cách sử dụng quang phổ

kể vi đĩa được mô tả ở trên. Bằng cách sử dụng vi đĩa thay vì ống cuvet, tất cả thể tích chất phản ứng cần thiết được làm giảm bằng yếu tố 4. Điều này làm cho thể tích phản ứng cuối cùng bằng 305 μ l do việc bổ sung 5 μ l mẫu hoặc đối chứng, 250 μ l chất phản ứng A và 50 μ l chất phản ứng B là như được mô tả trong sổ tay.

Vật liệu thuốc lá

Các điều thuốc lá được sử dụng trong thử nghiệm được cung cấp bởi OptiFilter Zrt. Các thông số và việc chế tạo các điều thuốc lá như sau. Các điều thuốc lá tham chiếu Kentucky 3R4F được sản xuất và được cuốn bởi trường đại học ở Kentucky, KY US. Các điều thuốc lá tham chiếu được cung cấp cho OptiFilter Zrt của Hungary bởi Celanese Corporation, Narrows, VA, US. Đầu lọc thuốc lá được cuốn, và các điều thuốc lá thử nghiệm được sản xuất bởi OptiFilter Zrt. Tẩu lọc CellFx được chuẩn bị và được cung cấp bởi Celanese Corporation. Các tẩu lọc này chứa các vật liệu lọc khác nhau, đôi khi được pha trộn. Các vật liệu lọc axetat bổ sung với các đặc tính dẹt khác nhau, nhờ đó tạo ra các trị số giảm áp lực khác nhau, được sản xuất và cung cấp bởi Celanese Corporation. Các phần axetat 27mm của đầu lọc 3R4F trong điều thuốc lá tham chiếu Kentucky (KRC) (2,9/41.000) được tháo ra và loại bỏ. Tẩu lọc, được sản xuất bởi công nghệ CellFx của Celanese, chứa các vật liệu lọc khác nhau. Một tẩu lọc đã lựa chọn được đưa vào đối diện với bề mặt cháy của thuốc lá điếu, và phần axetat bổ sung được lựa chọn và đưa vào đầu lọc, đảm bảo rằng trị số giảm áp suất (trở lực để hít vào) của điều thuốc lá (sự thông đầu lọc được đóng kín) là giống với trị số giảm áp suất của KRC (trở lực để hít vào 170 mm H₂O +/- 2%). Các tẩu Celanese dài là 12 mm. Các phần axetat dài là 15 mm. Tổng chiều dài đầu lọc là 27mm.

Tóm tắt các đầu lọc được sử dụng trong thử nghiệm

<i>Nước bọt</i>	Mô tả đầu lọc	Chữ viết tắt
Đầu lọc 1	Điều thuốc lá tham chiếu đối chứng Kentucky	Kent. Ref.
Đầu lọc 2	Tẩu Celanese 12 mm: Cacbon	CelRod-12-C
Đầu lọc 3	Tẩu Celanese 12 mm: 50% Alginit & 50% Nho	CelRod-12-AG
<i>Serum</i>	Mô tả đầu lọc	Chữ viết tắt
Đầu lọc 1	Điều thuốc lá tham chiếu đối chứng Kentucky	Kent. Ref.
Đầu lọc 2	Tẩu Celanese 12 mm: Cacbon	CelRod-12-C
Đầu lọc 3	Tẩu Celanese 12 mm: 50% Alginit & 50% Nho	CelRod-12-AG

Các kết quả

Trong khi thử nghiệm được tiến hành trên nước bọt và huyết thanh, thu được các

kết quả thử nghiệm sau đây.

Thí nghiệm huyết thanh

Mẫu		Tình trạng ROS	Khả năng chống oxy hóa	Sự thay đổi trạng thái chống oxy hóa
Huyết thanh 1	Trống	33%	67%	
	Đầu lọc 1	44%	56%	-16%
	Đầu lọc 2	47%	53%	-21%
Huyết thanh 2	Trống	21%	79%	
	Đầu lọc 3	30%	70%	-11%

Sự thay đổi về trạng thái chống oxy hóa được thể hiện trên Fig.1.

Các phép đo được thực hiện trong năm lần lặp. Các kết quả chỉ ra rằng đầu lọc 3 là tốt hơn so với thuốc lá điều đối chứng (đầu lọc 1).

Các kết quả đo mẫu nước bọt bằng thử nghiệm benzidin

Phép đo được thực hiện với 17 đối tượng. Từng mẫu được thu từ các đối tượng được đo 3 lần.

		Độ giảm trung bình ở trạng thái chống oxy hóa
Đầu lọc 1	Độ giảm ở trạng thái chống oxy hóa	29%
Đầu lọc 2	Độ giảm ở trạng thái chống oxy hóa	33%
Đầu lọc	Độ giảm ở trạng thái chống oxy hóa	12%

Phân tích thống kê của thí nghiệm trong nước bọt

- Việc đánh giá về ý nghĩa thống kê của các sự thay đổi về trạng thái chống oxy hóa trước và sau khi hút thuốc lá điều được thực hiện sử dụng Kiểm định ghép cặp Wilcoxon (StatSoft–STATISTICA10). Các kết quả được xem là đáng kể ở $p < 0,05$.

Cặp biến số	Kiểm định ghép cặp Wilcoxon Các kiểm định được đánh dấu là đáng kể ở $p < 0,05000$			
	N có giá trị	T	Z	Giá trị p
Trước và sau khi hút thuốc lá của Đầu lọc 1	17	15,5000	2,8876	0,0038

Sự thay đổi về trạng thái chống oxy hóa trước và sau khi hút thuốc lá của Đầu lọc

1 là đáng kể. Các kết quả thu được từ thử nghiệm chỉ ra sự khác biệt về thống kê lớn.

Cặp biến số	Kiểm định ghép cặp Wilcoxon Các kiểm định được đánh dấu là đáng kể ở $p < 0,05000$			
	N có giá trị	T	Z	Giá trị p
Trước và sau khi hút thuốc lá của Đầu lọc 2	17	8,0000	3,2426	0,0011

Sự thay đổi về trạng thái chống oxy hóa trước và sau khi hút thuốc lá của Đầu lọc 2 là đáng kể. Các kết quả thu được từ thử nghiệm chỉ ra sự khác biệt về thống kê lớn.

Cặp biến số	Kiểm định ghép cặp Wilcoxon Các kiểm định được đánh dấu là đáng kể ở $p < 0,05000$			
	N có giá trị	T	Z	Giá trị p
Trước và sau khi hút thuốc lá của Đầu lọc 3	17	37,5000	1,8461	0,0648

Không có sự thay đổi đáng kể về thống kê ở trạng thái chống oxy hóa trước và sau khi hút thuốc lá của Đầu lọc 3; mặc dù có sự sai khác quan sát được ($p=0,065$) nhưng nó không đạt đến ngưỡng đối với ý nghĩa thống kê.

- Việc đánh giá về ý nghĩa thống kê của các sự thay đổi về trạng thái chống oxy hóa gây ra do hút các thuốc lá điều khác nhau được thực hiện sử dụng Kiểm định ghép cặp Wilcoxon (StatSoft – STATISTICA10). Các kết quả được xem là đáng kể ở $p < 0,05$.

Cặp biến số	Kiểm định ghép cặp Wilcoxon Các kiểm định được đánh dấu là đáng kể ở $p < 0,05000$			
	N có giá trị	T	Z	Giá trị p
Đầu lọc 1 & Đầu lọc 2	17	66,0000	0,4970	0,6191

Sự thay đổi về trạng thái chống oxy hóa giữa đầu lọc 1 và 2 là không đáng kể.

Cặp biến số	Kiểm định ghép cặp Wilcoxon Các kiểm định được đánh dấu là đáng kể ở $p < 0,05000$			
	N có giá trị	T	Z	Giá trị p
Đầu lọc 1 & Đầu lọc 3	17	29,0000	2,2485	0,0245

Sự thay đổi về trạng thái chống oxy hóa giữa đầu lọc 1 và 3 là đáng kể.

Biểu diễn các kết quả của việc giảm trạng thái chống oxy hóa nhờ sử dụng biểu đồ hộp

Biểu đồ hộp liên quan của nhiều biến số được thể hiện trên Fig.2. Các điểm dữ liệu ở xa được thể hiện riêng rẽ (StatSoft - STATISTICA10).

Kết luận

Các kết quả thể hiện rằng khối thuốc lá mà được cho đi qua đầu lọc 1 hoặc đầu lọc 2 đã làm giảm tình trạng chống oxy hóa của huyết thanh 15-20%. Đầu lọc 3 gây ra sự giảm khả năng chống oxy hóa ít đáng kể, so với đầu lọc đối chứng.

Các giá trị đọc độ hấp thụ của các mẫu nước bọt được so sánh với các đối chứng dương và âm để đánh giá tình trạng chống oxy hóa. Các kết quả chỉ ra rằng khối thuốc lá mà đã đi qua đầu lọc 1 và 2 làm giảm trạng thái chống oxy hóa trong nước bọt khoảng 30%, điều này được thấy là có ý nghĩa thống kê, trong khi đầu lọc 3 đã thể hiện việc giảm 12%, có ý nghĩa thống kê so với thuốc lá điều đối chứng. Các kết quả này phù hợp với các kết quả của các phép đo trên huyết thanh. Các kết quả thể hiện rằng các thành phần của các đầu lọc theo sáng chế có hiệu quả đáng kể trên khả năng của khối thuốc lá làm thay đổi trạng thái chống oxy hóa của các mẫu dưới các điều kiện thử nghiệm được mô tả.

Ví dụ 2: Sử dụng alginit gây ra sự tăng đáng kể hơn tình trạng chống oxy hóa trong nước bọt và huyết thanh – các thí nghiệm bởi Prof. Tibor Szarvas

Hiệu quả trên nước bọt và huyết thanh của khối thuốc lá được lọc bởi các đầu lọc theo sáng chế cũng được kiểm tra trong thí nghiệm khác như dưới đây.

Vật liệu và phương pháp

Các thuốc lá điều được sử dụng trong thí nghiệm là các thuốc lá điều tham khảo Kentucky 3R4F, được sản xuất và lắp ghép bởi Đại học Kentucky, KY, US. Các thuốc lá điều thử nghiệm được cung cấp đến OptiFilter Zrt của Hungary bởi Celanese Corporation, Narrows, VA, US. Đầu lọc thuốc lá điều được lắp ghép, và các thuốc lá điều thử nghiệm được sản xuất bởi OptiFilter Zrt. Thanh đầu lọc CellFx được chuẩn bị và được cung cấp bởi Celanese Corporation. Thỉnh thoảng, các thanh đầu lọc này chứa các vật liệu lọc khác nhau được trộn. Vật liệu đầu lọc axetat bổ sung có các đặc tính dẹt khác nhau, nhờ đó tạo ra các giá trị giảm áp lực khác nhau, được sản xuất và được cung cấp bởi Celanese Corporation. Các phần axetat 27 mm của đầu lọc của thuốc lá điều tham khảo Kentucky 3R4F (2,9/41.000) được bóc và loại bỏ. Thanh đầu lọc, được sản

xuất bởi công nghệ CellFx của Celanese, chứa các vật liệu làm đầy khác nhau. Một thanh đầu lọc được chọn được đưa vào đối mặt với bề mặt cuối đang cháy của thuốc lá điều, phần axetat khác được chọn và được đưa vào đầu lọc, đảm bảo rằng giá trị giảm áp lực (tổng lực chống lại sự hút vào) của thuốc lá điều (lỗ thông hơi đầu lọc đã đóng) là giống như giá trị giảm áp suất của KRC (lực chống lại sự hút vào 170 mm H₂O +/- 2%). Các thanh Celanese dài 10mm hoặc 12 mm hoặc 15mm. Các phần axetat dài 17mm hoặc 15 mm hoặc 12mm. Tổng chiều dài đầu lọc bằng 27mm. Các thuốc lá điều được trang bị thanh đầu lọc CellFx chứa các vật liệu làm đầy khác nhau được đo và được so sánh với đối chứng trong đánh giá sinh học này.

Các đầu lọc dưới đây được sử dụng trong các thí nghiệm:

Mô tả đầu lọc	Viết tắt
Khoang: 100 mg, (33-67) Al-O-Nho	Cav-100-AIOG
Khoang: 150 mg, 50-50%, Alginit & Nho	Cav-150-AG
Khoang: 150 mg, 50-50%, Zeolit & Nho	Cav-150-ZG
Khoang: 160 mg, 50-50%, Al-O & Nho	Cav-160-AIOG
Khoang: 160 mg, (20% mỗi chất), Al-O + Grap + Alg + Zeol + Carb	Cav-160-AIOGAZC
Khoang: 200 mg: (120-80mg), Alginit-Nho	Cav-200-AG
Thanh Celanese 10 mm, 50-50%, Alginit-Thanh cacbon	CelRod-10-AC
Thanh Celanese 10 mm: Thanh cacbon mono	CelRod-10-C
Thanh Celanese 12 mm: 50-50%, Alginit & Nho	CelRod-12-AG
Thanh Celanese 12 mm: Cacbon	CelRod-12-C
Thanh Celanese 15 mm: 50-50%, Alginit & Cacbon	CelRod-15-AC
Thanh Celanese 15 mm: 50-50%, Alginit & Nho	CelRod-15-AG
Thuốc lá điều tham khảo đối chứng Kentucky	KRC.

Thiết lập thí nghiệm

Các thuốc lá điều được hút trong phòng thí nghiệm OF ở Đại học công nghệ và kinh tế (University of Technology and Economics), Budapest, trong Filtrona SM302 8 công, máy hút thuốc lá theo chiều dài theo quy trình ISO 3308. Các thuốc lá điều được hút bằng lỗ thông hơi của đầu lọc bị chặn. Khói thuốc lá được cho đi qua đầu lọc Cambridge (Đầu lọc sợi thủy tinh 44mm, sản phẩm số: 80202851, Borgwaldt KC), và pha khí tạo thành được chuyển qua ống silicon và được súc vào vật chứa bằng thủy tinh (ống lấy mẫu khí) chứa 1,5 ml dung dịch huyết thanh. Sau mỗi thuốc lá điều, miếng lót đầu lọc Cambridge được thay bằng cái mới, và sau mỗi thuốc lá điều ống silicon được thay bằng cái mới.

Đo khả năng chống oxy hóa trong huyết thanh

Để đánh giá khả năng liên kết gốc tự do của đầu lọc thuốc lá điều thử nghiệm hai phương pháp được sử dụng:

1.) Randox – bộ kit đo tổng số chất chống oxy hóa (mua được từ Randox Lab. Ltd., Crumlin, UK)

2.) HRP – thử nghiệm peroxit – benzidin

Huyết thanh đối chứng Contronorm Plus được cung cấp bởi Analyticon Biotechnologies AG, Germany. Việc hút thuốc lá điều và việc xử lý huyết thanh với khói thuốc lá được thực hiện ở phòng thí nghiệm OF ở Đại học công nghệ và kinh tế, Budapest, và các thử nghiệm đọc được thực hiện bởi Dr. Szarvas ở Viện nghiên cứu trung tâm khu vật lý (Central Research Institute for Physics Campus), ở Trung tâm năng lượng (Energy Center) của Viện hàn lâm khoa học Hungary (Hungarian Academy of Sciences), Budapest. Các chất phản ứng mới điều chế được sử dụng. Huyết thanh đối chứng được hòa tan trong 5 ml nước cất hai lần. Sau khi khói thuốc lá điều (1 thuốc lá điều) được cho đi qua đầu lọc Cambridge, pha khí tạo thành được sục vào 1,5 ml huyết thanh hòa tan theo quy trình ISO 3308 với lỗ thông hơi của đầu lọc bị chặn. Sau đó, 20 µl huyết thanh đã xử lý được trộn với 1 ml chất phản ứng 1 (thành phần được nêu dưới đây), được làm đồng nhất và phản ứng bắt đầu bằng 200 µl chất phản ứng 2 (thành phần được nêu dưới đây). Sự thay đổi độ hấp thụ được đo sau 3 phút. Độ hấp thụ của huyết thanh được sục được so sánh với độ hấp thụ của huyết thanh đối chứng không được phản ứng. Giá trị đối chứng được xác định mà không có huyết thanh đối chứng bằng cách sử dụng 20 µl nước cất hai lần. Các phép đo cũng được thực hiện trên bộ đọc tám (thông số: 5 µl huyết thanh, 250 µl R1, 50 µl chất phản ứng R2).

Thử nghiệm Randox để xác định tình trạng chống oxy hóa tổng trong huyết thanh

Nguyên tắc của thử nghiệm: ABTS (2,2,'-azino-bis(3-etylbenzthiazolin-6-sulphonat) được ủ với peroxidaza (metmyoglobin) và H_2O_2 để tạo ra cation gốc ABTS⁺. Chất này có màu xanh da trời-xanh lá cây tương đối bền, được đo ở bước sóng 600 nm. Các chất chống oxy hóa trong mẫu được bổ sung làm ức chế màu này, đến mức độ tỷ lệ với nồng độ của chúng.

Mẫu: Huyết thanh đối chứng Contronorm.

Chất phản	Thành phần	Nồng độ trong thử nghiệm
-----------	------------	--------------------------

ứng		
R1	Đệm Nước muối đệm phosphat	80 mmol/L, pH 7,4
R2	Chất sinh màu Metmyoglobin	6,1 $\mu\text{mol/L}$
R3	Cơ chất Hydro peroxit (ở dạng ổn định)	250 $\mu\text{mol/L}$
CAL	Axit 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic chuẩn	Rất cụ thể

Quy trình

Bước sóng: 600 nm

Cuvet: đường truyền ánh sáng 1 cm

Nhiệt độ: +37°C

Đo: dựa vào khí

Nước cất hai lần được trộn với 1mL chất phản ứng R2. Chất chuẩn được trộn với 1 mL chất phản ứng R2. Mẫu được trộn với 1 mL chất phản ứng R2. Từng dung dịch được trộn kỹ, được ủ để đạt được nhiệt độ cần thiết, và độ hấp thụ ban đầu (A1) được đọc. 200 μL R3 được bổ sung vào từng dung dịch. Việc trộn và bấm giờ được bắt đầu đồng thời. Độ hấp thụ được đọc sau chính xác 3 phút (A2). Tình trạng chống oxy hóa tổng được biểu thị là % được thiết lập khi so sánh giá trị chất phản ứng – giá trị huyết thanh.

Thử nghiệm HRP peroxit-benzidin

Chất phản ứng 1: HRP (peroxidaza của cây cải ngựa) 9000 U/L, benzidin hydroclorua 233 $\mu\text{mol/L}$, natri clorua 155 mmol/L,

Chất phản ứng 2: Carbamit peroxit 0,36 mmol/L

Dung môi: Nước cất hai lần

Công cụ: Quang phổ kế UV-VIS, nhiệt độ 25°C

Các chất phản ứng mới điều chế được sử dụng. Huyết thanh đối chứng được hòa tan trong 5 ml nước cất hai lần. Sau khi khói thuốc lá điều được lọc bằng cách sử dụng đầu lọc Cambridge (1 thuốc lá điều), pha khí tạo thành được sục vào 1,5ml lượng dung dịch huyết thanh theo quy trình ISO 3308. Lỗ thông hơi của đầu lọc bị chặn. Sau đó 20

µl dung dịch huyết thanh đã xử lý được trộn với 1 ml chất phản ứng 1 và được làm đồng nhất, và phản ứng được bắt đầu bằng 200 µl chất phản ứng 2. Sự thay đổi độ hấp thụ ở bước sóng 620 nm được đo ngay sau 3 phút. Độ hấp thụ của huyết thanh được so sánh với độ hấp thụ của huyết thanh đối chứng không được phản ứng. Kết quả đối chứng thu được mà không có huyết thanh đối chứng sử dụng 20 µl nước cất hai lần. Các kết quả của thí nghiệm được tổng kết trong các bảng. Các phép đo cũng được thực hiện trên bộ đọc tấm (thông số: 5 µl huyết thanh, 250 µl R1, 50 µl chất phản ứng R2).

Các kết quả

1. Thử nghiệm HRP peroxit-benzidin

Loại	Viết tắt	Sự sản xuất gốc O có phản ứng (%)	Khả năng chống oxy hóa đối với chất phản ứng (%)	Sự cải thiện so với đối chứng (%)
Thuốc lá điều tham khảo đối chứng Kentucky	KRC	64,7	35,3	
Thanh Cacbon Mono (chiều dài 10 mm)	CelRod-10-C	56	44	25
Celanese: Thanh Alginit-Cacbon (chiều dài 10 mm)	CelRod-10-AC	37,3	62,7	78
Khoang 200 mg: Alginit-Nho (120-80 mg)	Cav-200-AG	38,2	61,8	75
Khoang: Al-O-Nho (33-66 mg)	Cav-100-AIOG	59,1	40,9	16
Thanh Celanese: Alginit-Nho (chiều dài 15 mm)	CelRod-15-AG	35,2	64,8	84
Khoang: Alginit-Nho (75-75 mg)	Cav-150-AG	44,7	55,3	57

Khả năng chống oxy hóa và sự cải thiện so với đối chứng được thể hiện lần lượt trên Fig.3 và Fig.4.

2. So sánh khoang và các đầu lọc CelFx theo sáng chế trong huyết thanh

Thử nghiệm HRP peroxit-benzidin

Loại	Viết tắt	Sự sản xuất gốc O có phản ứng (%)	Khả năng chống oxy hóa đối với chất	Sự cải thiện so với đối chứng (%)
------	----------	-----------------------------------	-------------------------------------	-----------------------------------

			phản ứng (%)	
Thuốc lá điều tham khảo đối chứng Kentucky	KRC	76	24	
Khoang: 160 mg, Al-O + Nho + Alginit + Zeolit + Cacbon	Cav-160-AIOGAZC	60	40	64
Khoang: 160 mg, 50% Al-O & 50% Nho	Cav-160-AIOG	65	36	47
Khoang: 150 mg, 50% Zeolit & 50% Nho	Cav-150-ZG	74	26	7
Khoang: 150 mg, 50% Alginit + 50% Nho	Cav-150-AG	45	55	129
Thanh Celanese 15 mm: 50% Alginit & 50% Nho	CelRod-15-AG	69	31	27
Thanh Celanese 15 mm: 50% Alginit & 50% Cacbon	CelRod-15-AC	45	55	126

Khả năng chống oxy hóa và sự cải thiện so với đối chứng được thể hiện lần lượt trên Fig.5 và Fig.6.

3. Thử nghiệm Randox

Thí nghiệm huyết thanh được lặp lại bằng phương pháp học bộ kit chất chống oxy hóa Randox. Các kết quả được thể hiện dưới đây.

Mẫu	Viết tắt	Độ hấp thụ	Sự sản xuất gốc O có phản ứng (%)	Khả năng chống oxy hóa (%)	Sự giảm khả năng chống oxy hóa đối với huyết thanh (%)	Sự cải thiện so với đối chứng (%)
Chất phản ứng (Randox)		0,256	100			
Tiêu chuẩn đối chiếu		0,005	1,9	98,1		
Huyết thanh	Huyết thanh	0,136	53,1	46,9		
Thuốc lá điều	KRC	0,151	58,9	41,1	12	

tham khảo đối chứng Kentucky						
Thanh Celanese 12 mm: 50% Alginit & 50% Nho	CelRod- 12-AG	0,123	48,04	51,96	-11	187
Thanh Celanese 12 m: Cacbon	CelRod- 12-C	0,154	60,1	39,9	15	-21
Khoang 200 mg: Alginit- Nho (120-80 mg)	Cav-200- AG	0,145	53,9	46,1	2	86

Khả năng chống oxy hóa, sự thay đổi khả năng chống oxy hóa đối với huyết thanh đối chứng và sự thay đổi khả năng chống oxy hóa đối với thuốc lá điều Kentucky được thể hiện lần lượt trong Fig.7, Fig.8 và Fig.9.

Các kết quả huyết thanh thu được bằng phương pháp học Randox xác nhận rằng các đầu lọc theo sáng chế, cả ở cấu trúc CellFx và ở khoang, cải thiện đáng kể tình trạng chống oxy hóa gây ra do khói thuốc lá ở pha khí. Thấy rằng khói thuốc lá đi vào dòng máu vài giây sau khi được hít vào, việc sử dụng đầu lọc theo sáng chế có thể làm cho tình trạng nội mô khỏe hơn ở người hút thuốc.

Do khả năng chống oxy hóa trong nước bọt

Để đánh giá sự thay đổi tình trạng gốc tự do trong nước bọt sau khi hút thuốc lá và so sánh sự thay đổi gây ra do các thuốc lá điều được lọc khác nhau trong nước bọt của người hút thuốc được đo và so sánh.

Vật liệu và phương pháp

Các thuốc lá điều được sử dụng trong thí nghiệm là các thuốc lá điều tham khảo Kentucky 3R4F, được sản xuất và lắp ghép bởi Đại học Kentucky, KY, US. Các thuốc lá điều thử nghiệm được cung cấp đến OptiFilter Zrt của Hungary bởi Celanese Corporation, Narrows, VA, US. Đầu lọc thuốc lá điều được lắp ghép, và các thuốc lá điều thử nghiệm được sản xuất bởi OptiFilter Zrt. Thanh đầu lọc CellFx được chuẩn bị và được cung cấp bởi Celanese Corporation. Thỉnh thoảng, các thanh đầu lọc này chứa các vật liệu lọc khác nhau được trộn. Vật liệu đầu lọc axetat bổ sung có các đặc tính rệt khác nhau, nhờ đó tạo ra các giá trị giảm áp lực khác nhau, được sản xuất và được cung

cấp bởi Celanese Corporation. Các phần axetat 27 mm của đầu lọc của thuốc lá điều tham khảo Kentucky 3R4F (2,9/41.000) được bóc và loại bỏ. Thanh đầu lọc, được sản xuất bởi công nghệ CellFx của Celanese, chứa các vật liệu làm đầy khác nhau. Một thanh đầu lọc được chọn được đưa vào đối mặt với bề mặt cuối đang cháy của thuốc lá điều, phần axetat khác được chọn và được đưa vào đầu lọc, đảm bảo rằng giá trị giảm áp lực (tổng lực chống lại sự hút vào) của thuốc lá điều (lỗ thông hơi đầu lọc đã đóng) là giống như giá trị giảm áp suất của KRC (lực chống lại sự hút vào 170 mm H₂O +/- 2%). Các thanh Celanese dài 10mm hoặc 12 mm hoặc 15mm. Các phần axetat dài 17mm hoặc 15 mm hoặc 12mm. Tổng chiều dài đầu lọc bằng 27mm. Các thuốc lá điều được trang bị thanh đầu lọc CellFx chứa các vật liệu làm đầy khác nhau được đo và được so sánh với đối chứng trong đánh giá sinh học này.

Thiết lập thí nghiệm

Các mẫu nước bọt được lấy từ 38 đối tượng trước và sau khi hút thuốc lá điều. Các tình nguyện viên được tuyển chọn bởi phòng thí nghiệm OF ở Đại học công nghệ và kinh tế Budapest. Mỗi tình nguyện viên báo cáo từ 8 – 9 giờ buổi sáng để thu nước bọt, việc hút thuốc lá điều và thu nước bọt lần nữa. Mỗi buổi sáng, một thuốc lá điều thử nghiệm được hút và nước bọt được thu từ thuốc lá điều này. Mỗi tình nguyện viên hút 6 thuốc lá điều khác nhau (khác ở đầu lọc) từ 19 tháng mười – 20 tháng mười một 2015. Người hút thuốc được yêu cầu báo cáo việc hút thuốc lá mà không sử dụng bất kỳ thức ăn hoặc chất lỏng nào vào buổi sáng và không đánh răng. Nước bọt được làm đông đá và được mang đến phòng thí nghiệm KFKI để đánh giá.

Thử nghiệm HRP peroxit-benzidin

Chất phản ứng 1: HRP (peroxidaza của cây cải ngựa) 9000 U/L, benzidin hydroclorua 233 μ mol/L, natri clorua 155 mmol/L,

Chất phản ứng 2: Carbamit peroxit 0,36 mmol/L

Dung môi: Nước cất hai lần

Công cụ: Quang phổ kế UV-VIS, nhiệt độ 25°C

Các chất phản ứng mới điều chế được sử dụng. Đối chứng được hòa tan trong 5 ml nước cất hai lần. Nước bọt thu được từ các tình nguyện viên được thu. Sau đó 20 μ l dung dịch nước bọt được xử lý được trộn với 1 ml chất phản ứng 1 và được làm đồng

nhất, và phản ứng được bắt đầu bằng 200 μ l chất phản ứng 2. Sự thay đổi độ hấp thụ ở bước sóng 620 nm được đo ngay sau 3 phút. Độ hấp thụ của nước bọt được thu sau khi hút thuốc lá được so sánh với độ hấp thụ của nước bọt đối chứng không được phản ứng. Kết quả đối chứng thu được mà không có nước bọt đối chứng sử dụng 20 μ l nước cất hai lần. Các kết quả của thí nghiệm được tổng kết trong các bảng.

Nghiên cứu này liên quan đến 38 tình nguyện viên như dưới đây:

Nam giới		Nữ giới	
29 người		9 người	
Người hút thuốc lá	Người không hút thuốc lá	Người hút thuốc lá	Người không hút thuốc lá
26	3	4	5
Độ tuổi		Độ tuổi	
18-24 tuổi	4 người	18-24 tuổi	2 người
25-40 tuổi	14 người	25-40 tuổi	5 người
41-59 tuổi	10 người	41-59 tuổi	2 người
60+ tuổi	1 người	60+ tuổi	0 người

Kết quả

Các kết quả của thử nghiệm được thể hiện trên Fig.10 và Fig.11 trong đó trên Fig.11. Thuốc lá điều 1 = Kentucky tham khảo, thuốc lá điều 2 = thanh cacbon, thuốc lá điều 3 = thanh Alg-Nho, và thuốc lá điều 4 = khoang Alg-Nho

Tổng kết các đầu lọc được sử dụng trong thí nghiệm

Nước bọt	Mô tả đầu lọc	Viết tắt
Đầu lọc 1	Thuốc lá điều tham khảo đối chứng Kentucky	Kent. Ref.
Đầu lọc 2	Thanh Celanese 12 mm: Cacbon	CelRod-12-C
Đầu lọc 3	Thanh Celanese 12 mm: 50% Alginit & 50% Nho	CelRod-12-AG

Các kết quả

Sự thay đổi khả năng chống oxy hóa			
KRC	CELROD-12-C	CELROD-12-AG	CAV-200-AG
41,7	42,2	16,9	11,9

Kết luận

Các thí nghiệm huyết thanh xác nhận rằng các đầu lọc theo sáng chế, cả ở cấu trúc CellFx và ở khoang, cải thiện đáng kể khả năng chống oxy hóa gây ra do khói thuốc lá. Thấy rằng khói thuốc lá đi vào dòng máu vài giây sau khi nó được hít vào, các tác giả sáng chế cho rằng các số liệu này gợi ý rằng các đầu lọc theo sáng chế có thể

góp phần vào tình trạng nội mô khỏe hơn ở người hút thuốc. Các thí nghiệm nước bọt xác nhận rằng các đầu lọc theo sáng chế, cả ở cấu trúc CellFx và ở khoang, cải thiện đáng kể khả năng chống oxy hóa trong miệng. Các tác giả sáng chế cho rằng điều này có thể góp phần vào niêm mạc khỏe hơn ở người hút thuốc.

Ví dụ 3: Hiệu quả của thành phần đầu lọc thuốc lá điều trên khối thuốc lá gây ra sự chết các tế bào nội mô và các tế bào biểu mô.

Khối thuốc lá là sự kết hợp phức tạp của các hóa chất được đặc trưng bởi mức chất oxy hóa cao. Việc tăng số trang thể hiện rằng khối thuốc lá gây ra sự hoạt hóa các tế bào nội mô mạch máu phổi, liên quan đến sự mất chức năng hàng rào nội mô. Sự mất chức năng này là dấu hiệu của rối loạn nội mô. Trong quá trình này, khối thuốc lá điều gây ra sự mất cân bằng oxy hóa dẫn đến phá hủy tế bào nội mô, có thể thâm nhập bạch cầu đơn nhân và đại thực bào đã hoạt hóa. Sự phá hủy hàng rào nội mô thậm chí có thể cấu thành yếu tố đầu tiên của tổn thương phổi trong đáp ứng khi tiếp xúc với khối thuốc lá.

Khối thuốc lá cũng biểu hiện là gây ra sự chết tế bào theo chương trình của mô phế nang phổi thông qua sự chết tế bào theo chương trình của các tế bào biểu mô của chúng, mà góp phần phát triển bệnh phổi mạn tính như tràn khí. Mặc dù tất cả các loại tế bào trong phổi có thể bị phá hủy bởi sự phá hủy oxy hóa, các tế bào biểu mô là đích chính để làm tổn thất chất oxy hóa mà chúng cấu thành đường bảo vệ thứ nhất trong phổi. Do đó, không ngạc nhiên khi sự tổn thất biểu mô bởi khối thuốc lá là quá trình quan trọng trong sự phát sinh bệnh của bệnh phổi liên quan đến việc hút thuốc lá.

Một số nghiên cứu thể hiện rằng các thành phần của khối thuốc lá có tính phản ứng cao, tác nhân gây ung thư dễ bay hơi, và gốc tự do oxy hóa (Reactive Oxygen Species, ROS) thu được từ khối thuốc lá và các tế bào bị phá hủy bởi khối thuốc lá góp phần làm tổn thương phổi liên quan đến tổn thương biểu mô thông qua sự chết tế bào và sự sản xuất ROS trong các tế bào biểu mô đã hoạt hóa. Do đó, sự bảo vệ biểu mô khỏi tổn thương bởi khối thuốc lá được xem là quan trọng đối với sự quản lý nhiều bệnh phổi liên quan đến việc hút thuốc lá. Các cuộc điều tra thể hiện rằng thành phần của đầu lọc thuốc lá điều có thể là quan trọng trong việc cải biến tác động của khối thuốc lá đến sự chết tế bào biểu mô được cảm ứng, là dòng tế bào thứ nhất gặp khối thuốc lá, cũng như phá hủy các tế bào nội mô. Các đầu lọc có thể loại bỏ hiệu quả hơn các thành phần

của khói thuốc lá mà có khả năng phá hủy cao nhất các tế bào biểu mô, cũng như các tế bào nội mô, có thể làm giảm sự phá hủy phổi gây ra do khói thuốc lá.

Vật liệu, đối tượng và phương pháp

Các thuốc lá điều được sử dụng trong thí nghiệm là các thuốc lá điều tham khảo Kentucky 3R4F, được sản xuất và lắp ghép bởi Đại học Kentucky, KY US. Các thuốc lá điều được cung cấp đến OptiFilter Zrt của Hungary bởi Celanese Corporation, Narrows, VA, US. Đầu lọc thuốc lá điều được lắp ghép và các thuốc lá điều thử nghiệm được sản xuất bởi OptiFilter Zrt., thanh đầu lọc CellFx được chuẩn bị và được cung cấp bởi Celanese Corporation. Thỉnh thoảng, các thanh đầu lọc này chứa vật liệu lọc khác nhau được trộn. Vật liệu đầu lọc axetat khác có các đặc tính dẹt khác nhau, nhờ đó tạo ra các giá trị giảm áp lực khác nhau, được sản xuất và được cung cấp bởi Celanese Corporation. Các phần axetat 27 mm của đầu lọc thuốc lá điều tham khảo Kentucky 3R4F (2,9/41.000) được bóc và loại bỏ. Thanh đầu lọc, được sản xuất bởi công nghệ CellFx của Celanese, chứa các vật liệu làm đầy khác nhau. Một thanh đầu lọc được chọn được đưa vào thuốc lá điều đối mặt với bề mặt cuối đang cháy của thuốc lá điều, phần axetat bổ sung được chọn và được đưa vào đầu lọc, đảm bảo rằng sự giảm áp suất (tổng lực chống lại sự hít vào) của thuốc lá điều (lỗ thông hơi đầu lọc đã đóng) là giống như giá trị giảm áp suất của KRC (lực chống lại sự hít vào 170 mm H₂O +/- 2%). Các thanh Celanese dài 10mm hoặc 12 mm hoặc 15mm. Các phần axetat dài 17mm hoặc 15 mm hoặc 12mm. Tổng chiều dài đầu lọc bằng 27mm. Các thuốc lá điều được trang bị thanh đầu lọc CellFx chứa vật liệu làm đầy khác nhau được đo và được so sánh với đối chứng trong đánh giá sinh học này.

Các tế bào nội mô giữ vai trò quyết định trong sự phát triển của COPD, bởi vì chức năng hàng rào của các tế bào nội mô là thiết yếu để chức năng phổi khỏe mạnh; do đó, sự mất chức năng hàng rào nội mô có thể góp phần làm tín hiệu đặc trưng của sự xâm nhập bạch cầu của bệnh phổi bao gồm COPD. Khói thuốc lá gây ra sự chết tế bào và viêm trong các tế bào nội mô góp phần vào sự phát triển của COPD. Ở đây thể hiện rằng việc sử dụng các thành phần đầu lọc thuốc lá điều khác nhau có thể cải biến thành phần khói thuốc lá và có thể làm suy giảm tác động sinh học phá hủy. Fig.2 thể hiện rằng khói thuốc từ các đầu lọc chứa hỗn hợp Alginit / Zeolit / Cacbon / Nho ít phá hủy các tế bào nội mô.

Các tế bào biểu mô là thành phần quan trọng của mô phổi và có vai trò đáng kể trong ung thư phổi và sự phát triển COPD. Bằng cách sử dụng dòng tế bào biểu mô phổi A549 thể hiện rằng các đầu lọc chứa hỗn hợp Alginit / Zeolit / Cacbon / Nho làm giảm đáng kể sự chết tế bào biểu mô do đó có thể dẫn đến nguy cơ COPD giảm. Các kết quả này thể hiện rằng các đầu lọc theo sáng chế chứa hỗn hợp Alginit / Zeolit / Cacbon và Nho loại trừ một số thành phần của khói thuốc, và vì vậy ít phá hủy các tế bào biểu mô và các tế bào nội mô phổi. Việc bảo vệ các tế bào biểu mô và các tế bào nội mô có thể góp phần vào sự suy giảm COPD gây ra do khói thuốc lá và sự phát triển các bệnh hô hấp khác.

Điều chế chiết xuất khói thuốc lá

Việc điều chế chiết xuất khói thuốc lá được thực hiện như được mô tả trước đó (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. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Nov 2; 107(44):18880-5). Để điều chế chiết xuất của khói thuốc lá, các thuốc lá điều được lọc tham khảo nghiên cứu Kentucky 3R4F (Viện nghiên cứu thuốc lá, Đại học Kentucky, Lexington, KY) được hút bằng cách sử dụng bơm nhu động (VWR International) sử dụng các loại đầu lọc khác nhau. Toàn bộ khói thuốc được thu. Mỗi thuốc lá điều được hút trong 4 phút với mẫu thuốc lá còn lại là 15 mm và được sục qua 7,5 mL môi trường sinh trưởng tế bào nhờ ống silicon. Dung dịch này, được xem là chiết xuất khói thuốc lá chắc chắn 100%, được điều chỉnh đến pH bằng 7,45 và được sử dụng trong 15 phút sau khi điều chế. Sau khi mỗi thuốc lá điều được hút, ống silicon được thay thế bằng ống mới.

Nuôi cấy và xử lý tế bào HUVEC và A549

Các tế bào HUVEC (các tế bào nội mô tĩnh mạch rốn ở người – human umbilical vein endothelial cells) thu được từ Lonza (Anaheim, CA, USA) danh mục số: C2519A, và được nuôi cấy trong môi trường phát triển nội mô (Lonza, Anaheim, CA, USA) trong không khí ẩm chứa 5% CO₂. Để phân tích sự chết tế bào, 5×10^3 /lỗ HUVEC mỗi lỗ được nuôi vào tấm 96 lỗ trong môi trường phát triển nội mô chứa yếu tố sinh trưởng và 2% huyết thanh. Trước mỗi thí nghiệm, môi trường được thay thế bằng môi trường mới không chứa yếu tố sinh trưởng và chứa 1% huyết thanh và được ủ 10% chiết xuất

khối thuốc trong 24 giờ.

Các tế bào biểu mô nền phế nang ung thư tuyến ở người A549 (A549-human adenocarcinoma alveolar basal epithelial cells) thu được từ Bộ sưu tập các giống nuôi cấy tế bào hợp pháp ở châu Âu (European Collection of Authenticated Cell Cultures) (ECACC) (Dòng tế bào: A549 Danh mục số: 86012804). Các tế bào A549 được nuôi cấy trong môi trường DMEM chứa 10% FCS trong không khí ẩm chứa 5% CO₂. Để phân tích sự chết tế bào, 5×10^3 /lỗ tế bào A549 được nuôi vào tấm 96 lỗ trong môi trường DMEM chứa 10% FCS và được xử lý bằng 10% chiết xuất CS trong 24 giờ.

Phân tích khả năng sống của tế bào

Phân tích MTT

Các tế bào được cấy vào trong các đĩa 96 giếng ở mật độ bắt đầu là được đưa ra trong các FIG.và được nuôi cấy qua đêm trước khi được xử lý bằng khối thuốc lá. Sau thời gian ủ, các môi trường được loại bỏ và được thay thế trong 4 giờ bằng RPMI chứa lượng dung dịch MTT thích hợp (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazol bromua) (Chemicon Inc., El Segundo, CA) (14). Phản ứng MTT được giới hạn bằng cách bổ sung HCl vào môi trường ở nồng độ cuối là 10 mM. Lượng thuốc nhuộm formasan màu xanh không hòa tan trong nước được hình thành từ MTT cân xứng với số lượng các tế bào sống và được xác định bằng máy đọc phân tích hấp thụ miễn dịch liên kết enzym Anthos Labtech 200 ở bước sóng 550 nm sau khi hòa tan chất kết tủa formasan xanh trong SDS 10%. Tất cả các thí nghiệm được tiến hành ít nhất 6 lần lặp và nhắc lại ba lần.

Phân tích sulforhodamin B (SRB).

Các tế bào được ủ trong các đĩa 96 giếng trong 24 giờ như mô tả ở trên. Môi trường nuôi cấy sau đó được loại bỏ và các tế bào được cố định tại chỗ bằng cách bổ sung 100 µl axit trichloroaxetic lạnh 10% (w/v) và được ủ trong 30 phút ở 4°C. Dịch nổi được loại bỏ, các đĩa được rửa năm lần bằng nước máy và làm khô bằng không khí trong 24 giờ. Dung dịch SRB (100 µl) ở 0,4% (w/v) trong axit axetic 1% được bổ sung, và đĩa được ủ trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Sau khi nhuộm, thuốc nhuộm không liên kết được loại bằng cách rửa năm lần với axit axetic 1%, và đĩa được làm khô bằng không khí. Nhuộm được liên kết tiếp theo được tạo hòa tan bằng (200 µl) Tris 10 mM (pH 10,5), và sự hấp thụ được đọc trong máy đọc đĩa 96 giếng ở 560 nm trừ đi phép đo

nền ở 600 nm sử dụng hệ thống dò đa chế độ Promega Glomax.

Kết quả: ảnh hưởng của khói thuốc trên các tế bào nội mô của người và biểu mô phổi

Chú ý là, các tế bào biểu mô phổi đóng vai trò then chốt trong sự phát triển bệnh tắc nghẽn phổi mãn tính (COPD). Các thay đổi ở cấu phần đầu lọc thuốc lá điều có thể có tiềm năng tạo ra khói thuốc mà giảm sự chết tế bào biểu mô so với khói thuốc từ thuốc lá điều thông thường. Do đó, chúng tôi phân tích vai trò của cấu phần đầu lọc khác nhau trên sự chết tế bào biểu mô gây ra do khói thuốc. FIG.1 thể hiện các ảnh hưởng của các cấu phần đầu lọc khác nhau trên sự chết tế bào ở các tế bào A549. Kết quả được trình bày trong FIG.1 thu được sử dụng phân tách khói thuốc 10 % sử dụng cho nuôi cấy tế bào. Tuy nhiên, có khả năng là các kết quả sử dụng nồng độ khói thuốc 10 % là hợp lý hơn vì làm tăng nồng độ khói thuốc thể hiện ảnh hưởng tăng sinh của khói thuốc lá. Số liệu trong FIG.12 chỉ ra rằng ba đầu lọc theo sáng chế bao gồm các đầu lọc Alginit/Zeolit/mạch nha của vỏ và hạt nho (Grape Skin and Seed Grist - GSSG), alginit/GSSG và alginit/carbon làm giảm đáng kể sự chết tế bào biểu mô A549 gây ra do khói thuốc.

FIG.13 thể hiện ảnh hưởng của các cấu phần đầu lọc khác nhau trên sự chết tế bào gây ra do khói thuốc của Các tế bào nội mô động mạch dây rốn người sơ cấp (HUVEC). Ở đây chúng tôi sử dụng 4 thuốc lá điều cho mỗi phép đo cho mỗi đầu lọc và tiến hành 6 lần lặp, và các số liệu này thể hiện là các đầu lọc theo sáng chế theo sáng chế chứa các nguyên liệu lọc khác nhau trong đầu lọc làm giảm đáng kể sự chết tế bào nội mô do khói thuốc gây ra.

Các thí nghiệm thể hiện là đầu lọc thuốc lá điều theo sáng chế thay đổi đáng kể mô hình sống sót của cả các mô biểu mô và nội mô tiếp được xúc với khói thuốc lá. Điều này có thể hữu dụng trong trận chiến với các bệnh đường hô hấp và bệnh tim mạch khởi nguồn do khói thuốc lá.

Ví dụ 4: Sản xuất xytokin viêm theo sự tiếp xúc khói thuốc lá ở mẫu mô phổi 3D của người

Hút thuốc lá điều là yếu tố chính liên quan đến nhiều bệnh phức tạp ở phổi. Tiếp xúc khói thuốc có thể gây ra đáp ứng viêm qua sự giải phóng xytokin viêm. Đại thực bào đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng viêm và là nguồn cụ thể của interleukin-8

(IL-8) và interleukin-6 (IL-6). IL-8 là xytokin đa chức năng, tác động chính là chất hóa ứng động bạch cầu trung tính, trong khi IL-6 liên quan đến sự trao đổi chất bị suy yếu ở bệnh nhân COPD. Vì cả hai xytokin đóng vai trò quan trọng ở nhiều loại bệnh phổi, như là COPD, xơ hóa phổi hoặc hen suyễn; dường như hợp lý để điều tra ảnh hưởng của đầu lọc thuốc lá điều mới trên các mức xytokin này trong hệ thống mẫu phổi phức tạp được phát triển gần đây. Quá trình đáp ứng viêm ở phổi liên quan đến việc sản xuất một số xytokin và sự bổ sung bạch cầu trung tính vào trong đường khí. IL-6 và IL-8 đóng vai trò then chốt trong sự bắt đầu và sự kéo dài các phản ứng viêm. Tiếp xúc khói thuốc lá có thể hoạt hóa viêm qua việc tăng cường tiết xytokin xu hướng gây viêm, dẫn đến viêm mãn tính. Khói thuốc lá có thể cũng gây ra sự thay đổi ở mức độ cơ quan, như là suy giảm đường khí và mất các bề mặt trao đổi khí, có thể dẫn đến suy giảm chức năng của phổi. Tất cả các ảnh hưởng tiêu cực này có thể đóng góp vào sự xuất hiện các bệnh nghiêm trọng, bao gồm COPD hoặc ung thư. Bằng cách sử dụng nuôi cấy mô 3D là phương pháp thử nghiệm, sự kết hợp của các tế bào hoạt động là đơn vị mô chức năng có thể được đánh giá so sánh với các tế bào đơn. Mô phổi bao gồm các tế bào biểu mô có kiến trúc tế bào được phân biệt. Các tế bào này có các kết nối tế bào – tế bào đặc trưng, hình thái học phân cực và được gắn với màng nền phía dưới. Việc duy trì các đặc tính này là cần thiết cho chức năng bình thường của mô, bao gồm sự tăng sinh, sự phân hóa, sự sống sót và tiết. Các tế bào tăng trưởng bình thường trong môi trường 3D. Sự bố trí không gian này của các tế bào bên trong môi trường này tác động theo cách chúng tương tác với nhau và vi môi trường của chúng. Tuần tự, các tín hiệu nội bào này ảnh hưởng đến hình thái và phạm vi chức năng tế bào. Do đó, khi các ứng viên thuốc hay tác nhân động đang được kiểm tra sử dụng các phân tích dựa trên tế bào, các phương pháp nuôi cấy sử dụng nên bắt chước tự nhiên nhất dạng biểu hiện trong cơ thể có thể. Phương pháp bắt chước mô tự nhiên nhất của sự sinh trưởng tế bào đối với các ứng dụng khám phá thuốc lá, có thể cho rằng, 3D. Thử nghiệm in vitro về khói thuốc lá là phức tạp. Số lượng lớn các dòng tế bào đã được đánh giá, nhưng tất cả có hạn chế riêng của chúng. IL-8 và IL-6 có thể được tạo ra bằng các tế bào phổi và viêm nghiêm trọng, nhưng điều tra về một loại tế bào cụ thể có thể miêu tả sai ảnh hưởng chung của sự tiếp xúc khói thuốc. Các tế bào sinh trưởng trong các nuôi cấy tế bào không gian 2 chiều thường được sử dụng trong nhiều loại thử nghiệm dược học, nhưng các hoàn cảnh in vitro này ít liên quan đến trạng thái trong cơ thể hơn là trường hợp đối với hệ thống

mẫu không gian 3 chiều. các nuôi cấy tế bào phổi không gian ba chiều thể hiện nhiều hơn những gì xảy ra trong cơ thể, có mẫu kiến trúc và biểu hiện khớp gần nhất với phổi người. Vì phổi là cơ quan phức tạp, cần thiết phải điều tra các quá trình sinh học trong hệ thống mẫu phức tạp, dẫn đến sự sắp xếp tế bào có thể ảnh hưởng đáp ứng thu được của nhân tố kích thích cụ thể. Mô phổi 3D Humeltis kết hợp nhiều loại tế bào, đại diện cho các tế bào chính của ống đường khí.

Phương pháp

Tế bào biểu mô đường khí nhỏ (SAEC) của người sơ cấp bình thường và nguyên bào sợi của phổi người bình thường (NHLF) được đặt từ Lonza. Các tế bào này được phân lập từ người hiến tặng dấu tên với giới tính và tuổi khác nhau. Các tế bào bạch cầu đơn nhân ngoại biên của người được phân lập bằng kit phân lập MicroBead dương tính với CD14 (Miltyni Biotec). Đối với các tế bào SAEC và NHLF nuôi cấy 3D được trộn theo tỉ lệ 1:1 (các khối phỏng cầu SN), và các tế bào bạch cầu đơn nhân của người cũng được trộn với các tế bào sơ cấp của người này (các khối phỏng cầu SNM). Các tế bào được cấy bên trên các đĩa đáy chữ U 96 giếng gắn thấp. Các khối phỏng cầu được xử lý với dịch chiết khối thuốc lá (CSE) trong 48 giờ trước khi đo. Các thuốc lá điều được sử dụng trong thí nghiệm là thuốc lá điều Kentucky Reference 3R4F, được sản xuất và được đánh giá bởi Trường đại học Kentucky, KY, US. Các thuốc lá điều được cung cấp đến OptiFilter Zrt của Hungary bởi Celanese Corporation, Narrows, VA US. Đầu lọc thuốc lá điều được đánh giá, và các thuốc lá điều thử nghiệm được sản xuất bởi OptiFilter Zrt. Các que đầu lọc CellFx được sản xuất và được cung cấp bởi Celanese Corporation. Các nguyên liệu đầu lọc axetat bổ sung với các đặc điểm đan kết khác nhau, bằng cách này tạo ra các giá trị giọt áp suất khác nhau, được sản xuất và được cung cấp bởi Celanese Corporation. Các phần axetat 27mm của đầu lọc thuốc lá điều Kentucky Reference (KRC) 3R4F (2,9/41.000) được loại ra và vất bỏ. Các que đầu lọc, được sản xuất bởi công nghệ CellFx của Celanese và chứa các nguyên liệu lọc khác nhau được đưa đối mặt với bề mặt cháy của thuốc lá điều. Phần axetat bổ sung được lựa chọn và được đưa vào đầu lọc, đảm bảo là giá trị giọt áp suất (toàn bộ kháng lại lực hút vào) của thuốc lá điều (các lỗ thông hơi của đầu lọc bị đóng) là bằng với giá trị giọt áp suất của KRC (kháng với lực hút vào 170 mmH₂O +/- 2%). Các que Celanese dài 12 mm. Các phần axetat dài 15 mm. Tổng chiều dài đầu lọc là 27mm. Tổng của hai đầu lọc khác nhau được tạo ra, và các KRC được trang bị chúng. Khói từ các thuốc lá điều được

trang bị các đầu lọc theo sáng chế, Các đầu lọc CellFx chứa các nguyên liệu lọc khác nhau, được đo và được so sánh với đối chứng trong đánh giá sinh học. Sự phân loại thuốc lá điều như sau:

Thuốc lá điều 1: Thuốc lá điều Kentucky Reference KRC

Thuốc lá điều 2: CelRod-12-C que đơn đầu lọc cacbon

Thuốc lá điều 3: CelRod-12-AG que nhỏ/đầu lọc Alginat

CSE được tạo ra bằng cách làm sủi bọt khói thuốc từ 2 thuốc lá điều qua 10 ml môi trường nuôi cấy tế bào ở dòng khí cân bằng được cung cấp bởi Bơm chân không Hydrotech (BioRad) trong tổng thời gian hai phút. Môi trường được lọc ra được lọc dưới các điều kiện tinh khiết với hai đầu lọc ống 0,22 μ m. Sự tán sắc ánh sáng của các hạt được hòa tan thể hiện sự khác biệt không đáng kể trong ngưỡng 320-350 nm. Dung dịch này được coi là 100% E. CSE được tạo ra trong vòng 30 phút cho mỗi thí nghiệm. CSE (0,5%) được sử dụng cho các nuôi cấy mô không gian ba chiều trong 48 giờ. Sau 48 giờ xytokin viêm được tạo ra bởi các vi mô 3D được đo trong các môi trường dịch nổi bằng Kit xytokin viêm của người phân tích đo tế bào BD (BD Biosciences). Kit này cung cấp phép đo định lượng của mức protein IL-8 và IL-6 trong dịch nổi nuôi cấy mô. Phương pháp này dựa trên vi hạt được liên hợp huỳnh quang với kích thước đã biết và thuốc thử dò, cung cấp tín hiệu cân xứng với lượng xytokin được liên kết. Trong thời gian ủ 3 giờ, các hạt bắt hình thành phức hợp với xytokin từ dịch nổi cùng vi thuốc thử dò. Cường độ phát huỳnh quang được phân tích bằng máy đo tế bào dòng chảy FACS Canto II (BD Immunocytometry Systems, Erembodegem, Belgium) với phần mềm BD FACS DIVA V6, và số liệu được phân tích bằng phần mềm FCS Express V3. Các kết quả thể hiện cường độ phát huỳnh quang trung bình của các vi hạt được liên hợp theo liên kết của IL-6 và IL-8.

Kết quả

Để điều tra việc sản xuất xytokin viêm là chức năng của loại đầu lọc, các khối phỏng cầu được xử lý bằng CSE từ các thuốc lá điều chuẩn và các thuốc lá điều chứa hai đầu lọc khác nhau trong 48 giờ. Số liệu thể hiện là cả IL-8 và IL-6 được làm giảm trong đại thực bào chứa khối kết tụ theo xử lý CSE từ thuốc lá điều được lọc số 3, chỉ ra khả năng được làm giảm đối với bắt đầu phản ứng viêm. Sự khác nhau chứng minh là đáng kể về mặt thống kê cho cả hai xytokin.

FIG.14. thể hiện protein IL-của người trong các dịch nổi của đại thực bào chứa các khối phồng cầu phổi sau 48 giờ ở các khối kết tụ 3 loại tế bào (SAEC, sợi nguyên bào và đại thực bào).

FIG.15. thể hiện protein IL-6 của người trong các dịch nổi của đại thực bào chứa các khối phồng cầu phổi sau 48 giờ.

Việc giảm các mức xytokin là đáng kể về mặt thống kê chỉ ở các khối kết tụ chứa các đại thực bào và chỉ sau 48 giờ. Trong các khối kết tụ được hình thành bởi sợi nguyên bào và chỉ các tế bào biểu mô sơ cấp (không có các đại thực bào), việc giảm các mức xytokin là không đáng kể sau hoặc 24 hoặc 48 giờ. Thuốc lá điều số 3 giảm mức cả hai xytokin đến mức được xác định trong môi trường đối chứng.

Kết luận

IL-6 và IL-8 đóng vai trò then chốt trong sự bắt đầu và lan truyền các phản ứng viêm. Tiếp xúc khói thuốc lá có thể hoạt hóa viêm qua việc gây tổn thương mô, do đó tăng cường tiết xytokin gây viêm, có thể dẫn đến viêm mãn tính. Có thể cho rằng, các nuôi cấy mô người 3D thể hiện gần giống với các quá trình hóa sinh và bệnh lý học của các mô người trong cơ thể. Ở cái nhìn này, có thể hợp lý để giả định rằng sự giảm đáng kể về mặt thống kê của các xytokin được điều tra trong các khối tích cực về mặt miễn dịch học (chứa các đại thực bào), khi khói thuốc được lọc bằng Đầu lọc#3 có thể có lợi trong sắp đặt trong cơ thể là tốt. Số liệu được tổng hợp sau đây (SN thay cho các khối kết tụ chứa tế bào biểu mô sơ cấp và sợi nguyên bào, trong khi SNM thay cho các khối kết tụ chứa các tế bào biểu mô, sợi nguyên bào và các đại thực bào):

SN 24 giờ								
	IL-8				IL-6			
	2x đối chứng	2x chuẩn	2x Đầu lọc #2	2x Đầu lọc thứ 3	2x đối chứng	2x chuẩn	2x Đầu lọc #2	2x Đầu lọc thứ 3
Thử nghiệm thứ nhất	886,62	657,85	888,18	879,57	363,82	230,33	301,38	308,87
Thử nghiệm thứ hai	814,29	1049,64	900,68	862,21	1487,67	1739,00	1504,89	1652,68
Thử nghiệm thứ ba	445,43	429,94	432,01	419,63	325,13	295,79	354,72	393,75
Thử	804,46	944,75	881,06	916,04	1177,79	1449,24	1406,54	1413,61

nghiệm thứ tư								
Trung bình	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
giá trị p								
SN 48 giờ								
	IL-8				IL-6			
	2x đối chứng	2x chuẩn	2x Đầu lọc #2	2x Đầu lọc thứ 3	2x đối chứng	2x chuẩn	2x Đầu lọc #2	2x Đầu lọc thứ 3
Thử nghiệm thứ nhất	1038,28	1102,19	1239,07	702,67	237,54	245,87	257,64	150,8
Thử nghiệm thứ hai	883,37	1043,7	963,84	1076,88	1196,19	1263,68	1115,51	1244,01
Thử nghiệm thứ ba	1266,76	1466,5	1346,42	1151,4	376,76	561,09	458,94	429,92
Thử nghiệm thứ tư	966,41	1169,47	897,17	692,11	646,31	884,26	808,28	709,4
Trung bình	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
giá trị p	0,04				0,02			

Tổng kết

Các ví dụ ở trên minh chứng rõ ràng là alginat đặc biệt hiệu quả khi được sử dụng trong dầu lọc thuốc lá điều một mình hoặc kết hợp với các thành phần đã biết khác như được mô tả ở trên. Các đặc tính mới và không mong đợi theo sáng chế là việc sử dụng alginat trong dầu lọc thuốc lá điều tạo ra dẫn đến ít các loài oxy phản ứng (ROS) đáng kể ở nước bọt, ít sự hình thành ROS đáng kể trong huyết thanh máu, ít tổn thương nội mô, ít tổn thương biểu mô phổi, mức glutathion cao hơn đáng kể, giảm tổn thương đối với các mô phổi và giảm viêm trong các mô phổi.

Các thử nghiệm sinh học *in vitro* được lựa chọn là lựa chọn tốt trong đó chúng có liên kết được thiết lập tốt và rõ ràng với các con đường sinh học *trong cơ thể* mà đã được lập thành tư liệu cho nguyên nhân của các bệnh liên quan đến hút thuốc lá chính. Thêm nữa, trong tất cả các trường hợp, các đầu lọc theo sáng chế được thể hiện là tạo khói thuốc thể khí rất ít gây tổn hại trong các thử nghiệm *in vitro* hơn khói thuốc được tạo ra từ đầu lọc Kentucky tham chiếu. Các kết quả này do đó đưa ra bằng chứng bắt buộc là các thuốc lá điều được trang bị các đầu lọc này có thể giảm tốt các ảnh hưởng sức khỏe hiện nay của việc hút thuốc lá điều.

Các ví dụ minh họa thêm là thậm chí chỉ một mình alginat có các đặc tính lọc được cải thiện đáng kể qua các nguyên liệu lọc đã biết, và alginat và các nguyên liệu lọc thuộc nghiên cứu trước tác động hiệp lực. Do đó, mặc dù không phải tất cả các kết hợp chứa các nguyên liệu được đề cập trong phần ví dụ, là rõ ràng đối với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật về sự kết hợp bất kỳ của alginat và các nguyên liệu lọc đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật cụ thể sẽ có cùng đặc điểm. Do đó, sáng chế bao hàm một cách rõ ràng tất cả các kết hợp này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Đầu lọc thuốc lá điều chứa alginat.
2. Đầu lọc thuốc lá điều theo điểm 1, trong đó alginat được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các chất khác được sử dụng trong các đầu lọc thuốc lá để giảm các tác dụng có hại của khói thuốc lá.
3. Đầu lọc thuốc lá điều theo điểm 2, trong đó các chất khác nêu trên được chọn từ nhóm bao gồm các thành phần than hoạt tính hoặc từ nho.
4. Đầu lọc thuốc lá điều theo điểm 3, trong đó chất khác nêu trên là than hoạt tính.
5. Đầu lọc thuốc lá điều theo điểm 3, trong đó chất khác nêu trên là các thành phần từ nho.
6. Đầu lọc thuốc lá điều theo điểm 5, trong đó các thành phần từ nho ở dạng hạt vỏ và hoa nho.

FIG. 1.

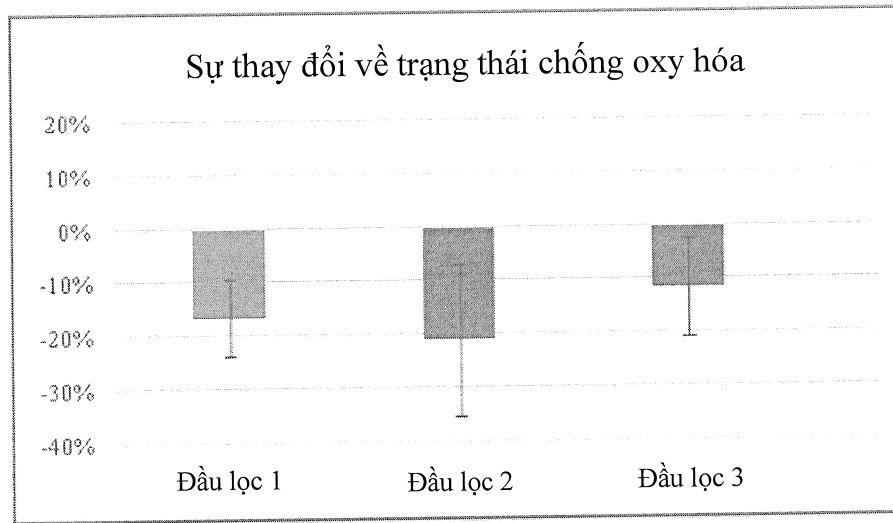


FIG. 2.

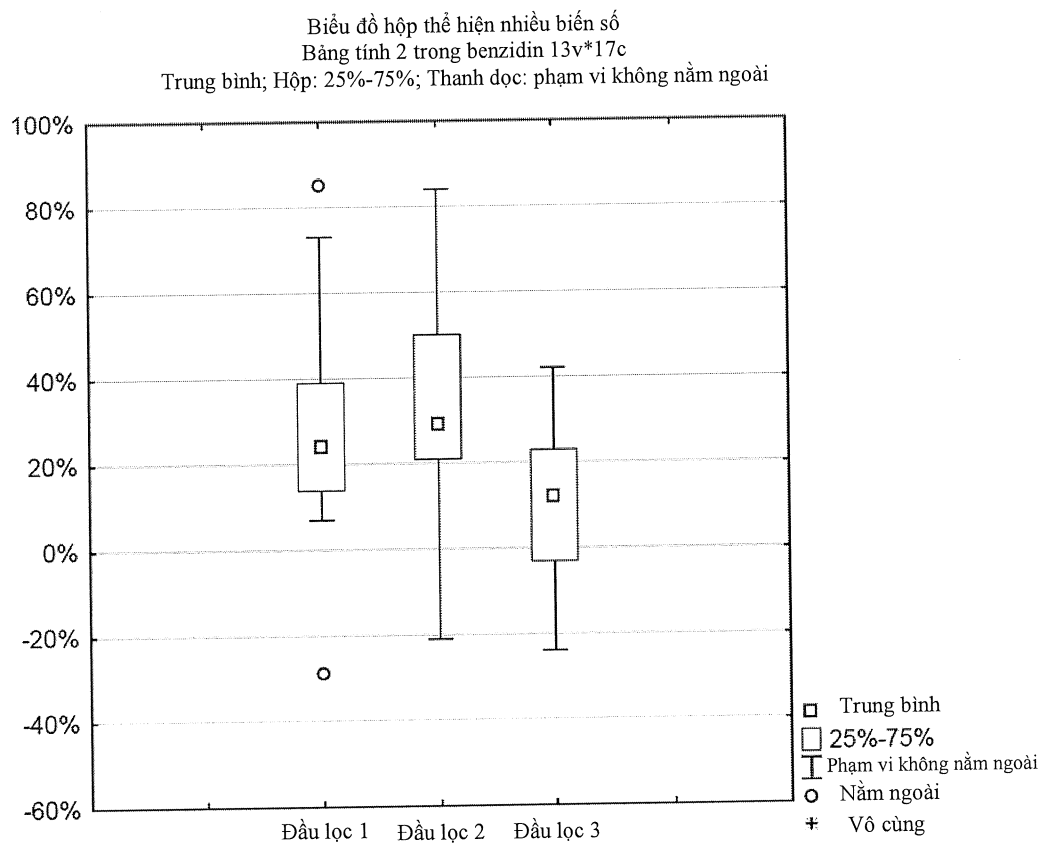


FIG. 3.

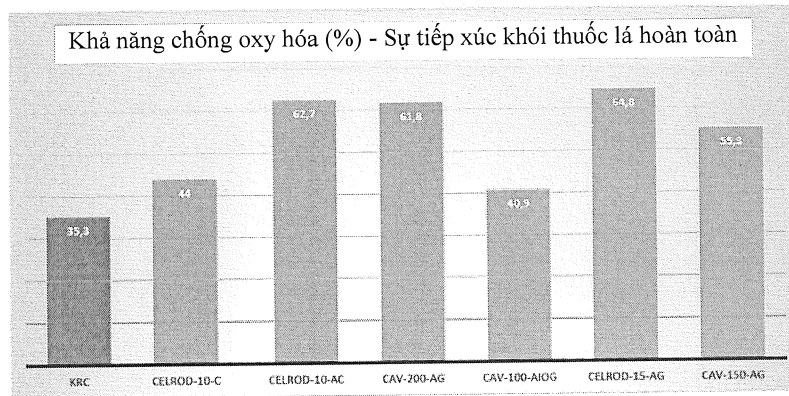


FIG. 4.

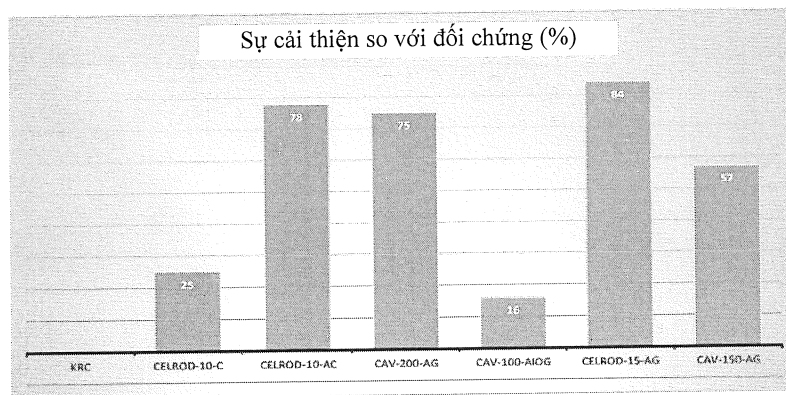


FIG. 5.

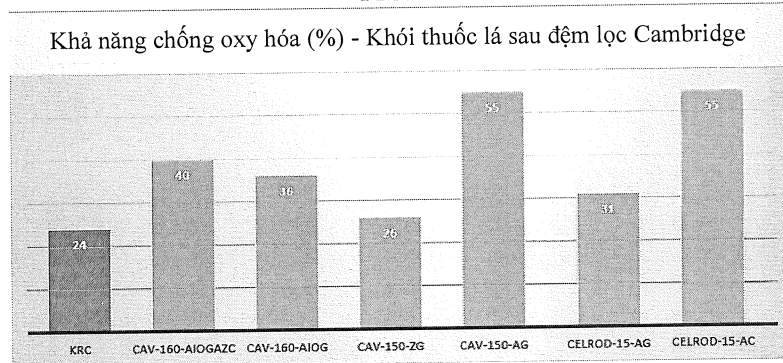


FIG. 6.

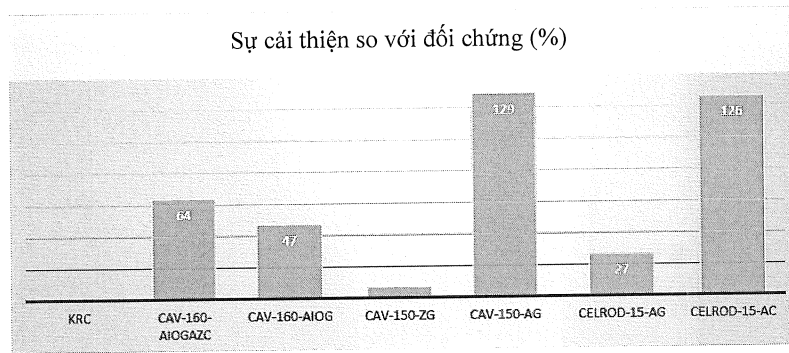


FIG. 7.

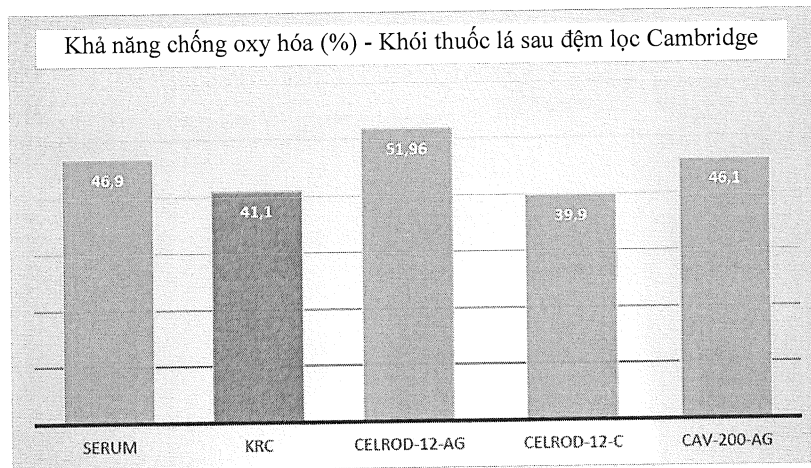


FIG. 8.

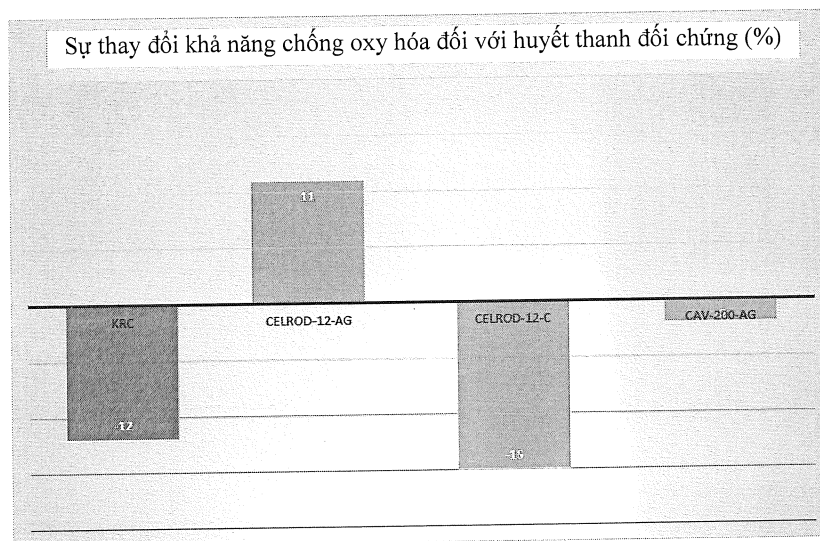


FIG. 9.

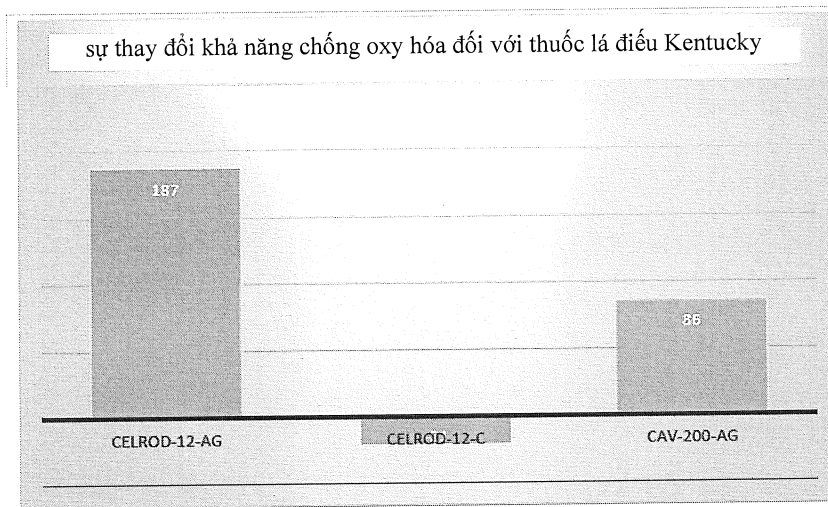


FIG. 10.

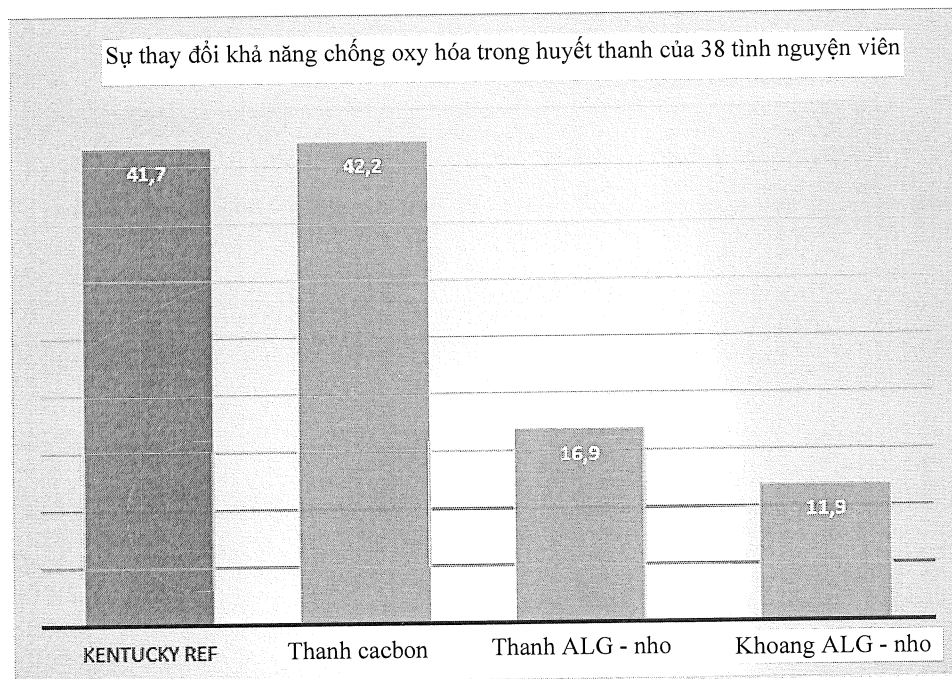


FIG. 11.

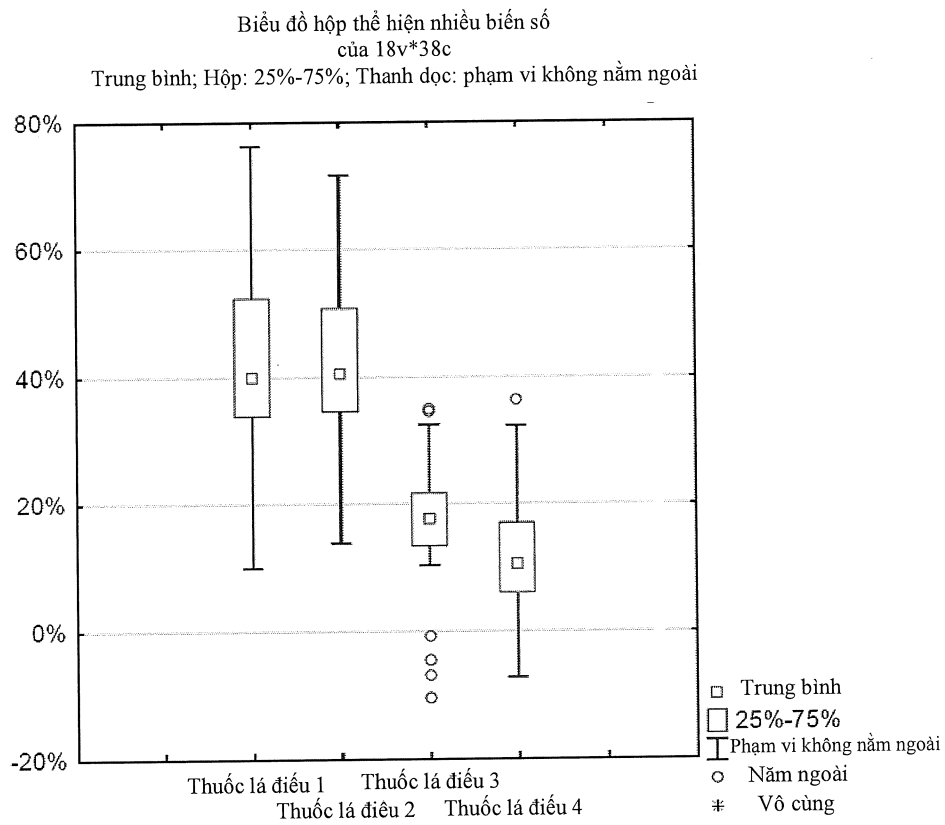
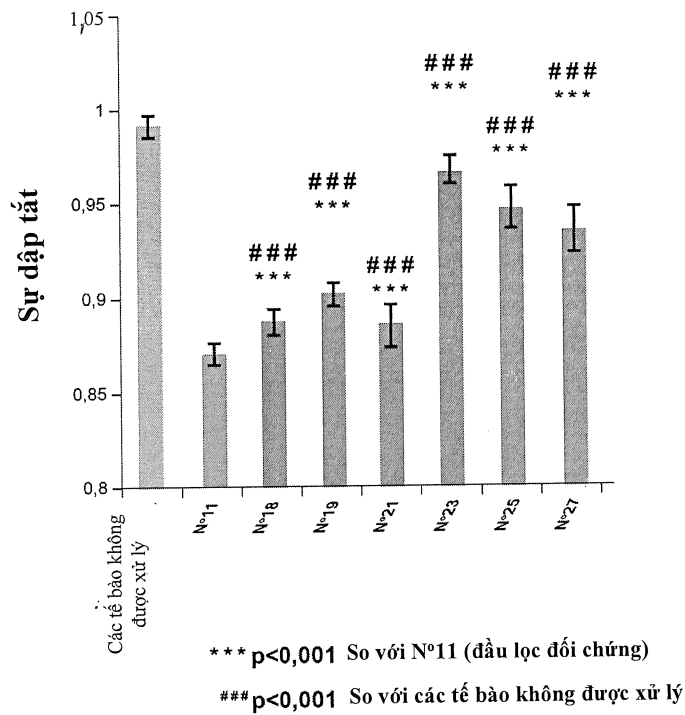


FIG 12.

Hiệu quả của thành phần đầu lọc thuốc lá điều trên khối thuốc lá gây ra sự chết tế bào trong dòng tế bào biểu mô ung thư phổi A549 khối thuốc MTT 2015 09 03



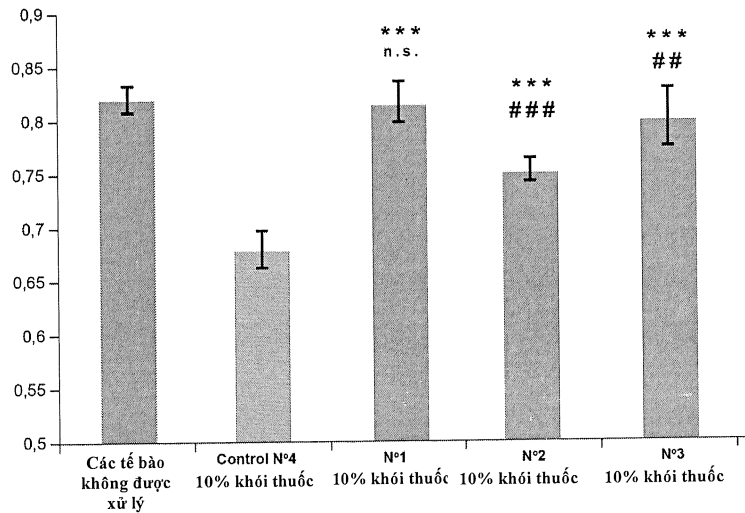
Các tế bào: A549x10³ tế bào/giếng
 Chưa được số lượng là 64 bản sao, còn lại là 32 bản sao

No 11: Đối chứng	KRC
No 18: Thanh cacbon mono 10mm	CelRod-10-C
No 19: Thanh alginit mono 10mm	CelRod-10-A
No 21: Thanh zeolit mono 10mm	CelRod-10-Z
No 23: Thanh alginit/GSSG 50-50% 10mm	CelRod-10-AG
No 25: Thanh cacbon/alginit 50-50% 10mm	CelRod-10-CA
No 27: GSSG 5mm/Zeolit 5mm/Alginit 5mm	CelRod-15-GZA

FIG. 13.

**Ảnh hưởng của các cấu phần đầu lọc khác nhau
trên sự chết tế bào gây ra do khói thuốc của Các tế
bào nội mô HUVEC**

SRB 10% khói thuốc HUVEC 5×10^3 tế bào/giếng 2016 01 05



1. CAV 150 mg AG
2. CelRod-12-C
3. CelRod-12-AG
4. Đối chứng

*** $p < 0,001$ So với N°6 (đầu lọc đối chứng)

$p < 0,01$, ### $p < 0,001$ So với các tế bào không được xử lý

n.s. Không khác với các tế bào không được xử lý

FIG. 14.

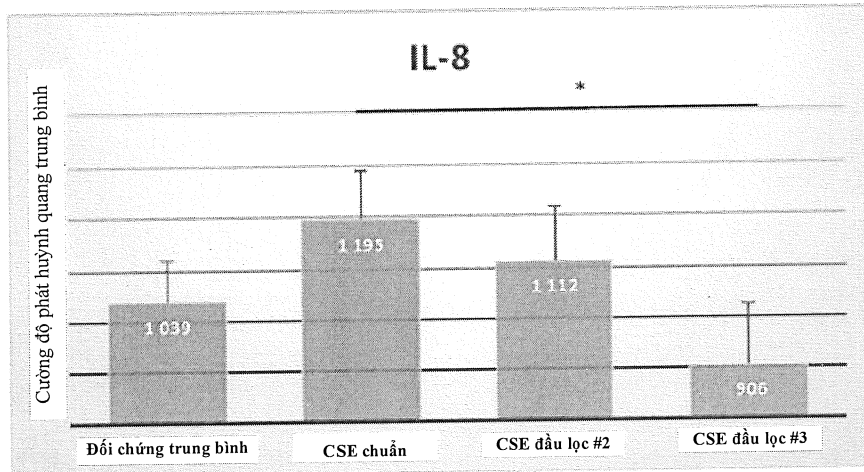


FIG. 15.

