

6. Сеитбурханов А.Г. Научно-методические основы сохранения водных, земельных и биологических ресурсов Кыргызстана // Синергия. 2015. № 2. С. 53-62.
7. Шароховская И.М. Система управления отходами // Рециклинг отходов. 2008. № 1 (13). С. 54-61.
8. Шаталов М.А., Мычка С.Ю. Механизм управления бытовыми отходами в рамках системы экологически безопасных технологий утилизации // Экономика. Инновации. Управление качеством. 2015. № 3 (12). С. 181.
9. Шаталов М.А., Мычка С.Ю. Формирование системы глубокой переработки отходов пищевых производств АПК // Проблемы рекультивации отходов быта, промышленного и сельскохозяйственного производства. IV Международная научная экологическая конференция (с участием экологов Азербайджана, Армении, Беларуси, Германии, Грузии, Казахстана, Киргизии, Латвии, Литвы, Молдовы, Приднестровья, России, Словакии, Узбекистана и Украины). 2015. С. 402-404.
10. Шубов Л.Я. Концепция управления муниципальными отходами мегаполиса // Научные и технологические аспекты охраны окружающей среды.- М.: ВИНТИ, 2001.- № 6.- 117 с.

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ РАНЕВОЙ АБСОРБИРУЮЩЕЙ ПОВЯЗКИ НА ОСНОВЕ ИНТЕРКАЛИРОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ФТОРИРОВАННОГО ГРАФИТА

*** А.В. Штейнле, к.м.н., доцент, * О.А. Антонец, к.б.н., доцент,

*** Л.А. Штейнле, врач клинической лабораторной диагностики

* Национальный исследовательский Томский политехнический университет,

634050, г.Томск, пр. Ленина, 30, тел. (3822)-60-64-85

** Сибирский государственный медицинский университет, Томск

634050, г.Томск, ул.Московский тракт 2, 30, тел. (3822)-53-04-23

*** Медсанчасть № 2, Томск

634040, г.Томск, ул.Бела Куна 3, тел. (3822)-64-48-01

E-mail: steinle@mail.tomsknet.ru

Аннотация. Исследование посвящено вопросам экологической безопасности раневой абсорбирующей повязки на основе интеркалированных соединений фторированного графита. Исследованы жизнеспособность мононуклеарных лейкоцитов, их программированная гибель, изменения трансмембранного потенциала митохондрий, содержание белков-регуляторов апоптоза и транскрипционных факторов. Результаты исследований подтвердили её экологическую безопасность предложенной раневой абсорбирующей повязки.

Abstract. Research is devoted to issues of environmental security absorbent wound dressings based on fluorinated graphite intercalation compounds. We studied the viability of mononuclear leukocytes, their programmed death, changes in mitochondrial transmembrane potential, the content-regulators of apoptosis proteins and transcription factors. Research results confirmed its ecological safety of the proposed absorbent wound dressings.

Перевязочное средство для лечения ран с обильной экссудацией должно не только эффективно удалять избыток раневого экссудата и его токсических компонентов, способствовать созданию оптимальной влажности раневой поверхности, обеспечивать адекватный газообмен между раной и атмосферой, препятствовать потере тепла, предотвращать вторичное инфицирование раны, обладать минимальными адгезивными свойствами по отношению к раневой поверхности, иметь адекватную механическую прочность и не терять вышеперечисленных свойств при длительном хранении, но и не содержать токсических соединений [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 21, 23, 24].

Проведённые нами экспериментальные исследования показали высокую сорбционную способность и минимальные адгезивные свойства раневой абсорбирующей повязки [11 на основе интеркалированных соединений фторированного графита (ИСФГ) [9, 12, 15, 16, 17, 22].

Для оценки токсичности сорбционного слоя повязки ИСФГ была изучена жизнеспособность мононуклеарных лейкоцитов при их культивировании с частицами расширенного фторграфита с использованием трипанового синего. Исследовали также программированную гибель мононуклеарных лейкоцитов с использованием аннексина V и пропидия йодида, изменения трансмембранного потенциала митохондрий методом проточной лазерной цитофлуориметрии. Кроме того, определяли содержание белков-регуляторов апоптоза (Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bad) и транскрипционных факторов (p53, NFkB) с помощью вестерн-блоттинга [18, 19, 20].

Применена методика оценки цитотоксических и/или цитопротективных свойств ИСФГ *in vitro*. Жизнеспособность мононуклеарных лейкоцитов при их культивировании с частицами НСГ исследовали с использованием трипанового синего [18, 19, 20].

Мононуклеарные лейкоциты здоровых доноров выделяли в стерильных условиях из цельной венозной крови методом градиентного центрифугирования. В эксперименте *in vitro* использовали клетки, полученные у 12 здоровых доноров (5 мужчин и 7 женщин в возрасте 22 – 30 лет). Выделенные из венозной крови стандартным методом на градиенте плотности Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция) ($\rho=1,077$ г/см³) клетки культивировали в течение 18 ч при 37 °С и 5 % CO₂ в среде RPMI-1640, содержащей 10 % ЭТС и 0,03 мг/мл L-глутамина в количестве $2 \cdot 10^5$ на лунку планшета, либо $2 \cdot 10^6$ на культуральный флакон. Для оценки цитотоксических и/или цитопротективных свойств частиц терморасширенного фторида графита (ТРФГ) *in vitro* на клетки в параллельные пробы добавляли частицы ИСФГ в концентрациях: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 и 5,0 мг/мл. Максимальная доза составила $5 \pm 0,25$ мг/мл. После инкубации мононуклеарные лейкоциты трижды отмывали охлажденным фосфатно-солевым буфером (pH=7,2) [18, 19, 20].

Оценку жизнеспособности мононуклеаров проводили с помощью красителя трипанового синего («Serva», США). Для этого 0,1 мл клеточной взвеси смешивали с равным объемом 0,5 % раствора трипанового синего. Подсчёт выполняли в камере Горяева на микроскопе «PrimoStar» («Carl Zeiss», Германия). Концентрацию клеток рассчитывали по формуле: $X = A \cdot K \cdot 10^4$ (клеток/мл), где А – количество клеток в 20-ти больших квадратах камеры Горяева; К – коэффициент разведения. Результаты оценивали по содержанию живых клеток, не окрашенных в синий цвет [18, 19, 20].

Исследование программированной гибели мононуклеарных лейкоцитов проводили в аннексиновом тесте. Для этого отмывые клетки суспендировали в аннексиновом буфере, содержащем аннексин V, меченный изотиоцианатом флуоресцеин, а также пропилий йодид («Beckman Coulter», Франция), инкубировали 15 мин в темноте при комнатной температуре. Апоптотические клетки идентифицировали на проточном цитофлуориметре Epics XL («Beckman Coulter», Франция) по окрашиванию аннексином V, но не пропилий йодидом, потому что некротизированные лимфоциты воспринимали оба красителя [18, 19, 20].

Изменение трансмембранного потенциала митохондрий определяли цитофлуориметрически с помощью набора «MitoScreen» («BD Pharmingen», США), ключевой реагент которого JC-1 в жизнеспособных клетках существует в виде мономеров и агрегатов, обладающих зелёным и красным свечением. При нарушении целостности митохондриальной мембраны JC-1 не способен агрегировать и окрашивает клетки в зелёный цвет. Для постановки реакции в чистую полистериновую пробирку переносили 200 мкл суспензии лимфоцитов, содержащей $2 \cdot 10^5$ клеток, и центрифугировали 5 мин при 400 g. К клеточному осадку добавляли 125 мкл свежеприготовленного раствора JC-1. Клетки ресуспендировали, инкубировали в течение 10–15 мин при температуре 37 °С, после чего дважды отмывали фосфатно-солевым буфером. Анализ образцов клеток проводили по оценке интенсивности свечения красителя с помощью проточной цитометрии, определяя процентное содержание клеток с нормальным уровнем митохондриального трансмембранного потенциала и процент клеток со сниженным его значением [18, 19, 20].

В настоящее время считается общепризнанным, что белки семейства Bcl-2 играют одну из ключевых ролей в регуляции апоптоза. Определение содержания субъединицы RelA NF- κ B (P65), нефосфорилированного P53 и белков семейства Bcl-2 (Bax, Bad, Bcl-2 и Bcl-xL) в лизатах лимфоцитов проводили методом вестерн-блоттинга. К отмывым ФСБ клеткам добавляли лизирующий буферный раствор (50 мМ Трис-HCl (pH=6,5), 100 мМ дитиотреитол («Helicon», США), 0,1 % бромфеноловый синий («Helicon», США), 15 % глицерол («Helicon», США), 0,02 % β -меркаптоэтанол («Helicon», США), смесь протеиназных ингибиторов («Sigma Aldrich», США)). Методом электрофореза белки разделяли в 5 и 10 % ДСН (додецилсульфат натрия)-ПААГ в электрофоретической камере («Bio-Rad», США), затем в камере для трансфера («Bio-Rad», США) их переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США). Далее мембраны последовательно инкубировали в TTBS (0,05 % Tween-20 в ФСБ) с 5 % обезжиренным сухим молоком, с первичными антителами к NF- κ B (RelA P65), нефосфорилированному P53 («Sigma Aldrich», США). Затем на мембрану наносили вторичные антитела с пероксидазной меткой («Biosource», Бельгия) и субстрат для пероксидазы хрена на основе тетраметилбензидина. Полученные блотты оцифровывали с помощью сканера («Epson», Япония). Вывод о содержании исследуемого антигена в клетке делали по отношению величины сигнала искомого белка к величине сигнала с фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (G3PDH) («Che-

micon», США) с использованием программного обеспечения («Carl Zeiss», Германия). Результаты выражали в условных единицах (усл. ед.) [18, 19, 20].

При воздействии на культуру лимфоцитов здоровых доноров частиц ИСФГ в конечной концентрации $5,00 \pm 0,25$ мг/мл уровень клеток, имеющих неповрежденную клеточную мембрану, составил $97,5 \pm 0,5$ %, что достоверно не отличалось от соответствующих значений в контроле ($97,5 \pm 0,5$ %, $p > 0,05$). Полученные данные позволяют утверждать, что данный материал не оказывает влияния на жизнеспособность клеток.

В данном исследовании было установлено, что относительное число аннексин-V-меченных мононуклеарных лейкоцитов здоровых лиц после их инкубации с частицами ИСГ в концентрации 5 мг/мл оказалось равным $3,5$ ($3,0-4,0$) % ($n=5$), что было достоверно ниже ($p=0,041$) величины данного параметра в интактной культуре $5,0$ ($4,0-5,0$) %.

Таким образом, проведенное исследование показало, что уровень программированной гибели клеток при воздействии ИСФГ оказался ниже такового в исходном состоянии клеток. С практической точки зрения это означает, что ИСФГ в изученных концентрациях не оказывает цитотоксического действия на мононуклеарные лейкоциты человека.

Оценка уровня клеток со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий ($\Delta\psi$), проведенная методом проточной лазерной цитометрии с использованием красителя JC-1 показала, что их количество в интактной культуре лимфоцитов, полученных у здоровых доноров, составило $3,62$ ($3,23-3,74$) %. При культивировании лимфоцитов, полученных у здоровых лиц, с частицами ИСФГ в концентрации $5,00 \pm 0,25$ мг/мл и в меньших концентрациях, относительное количество лимфоцитов с пермеабелизованной наружной митохондриальной мембраной достигало $2,69$ ($2,35-3,63$) %, что статистически значимо не отличалось от их содержания в интактной культуре ($p > 0,05$).

Таким образом, ИСФГ не оказывает модулирующего влияния на трансмембранный потенциал митохондриальной мембраны. Кроме того, полученные результаты, на наш взгляд, свидетельствуют, что частицы ИСФГ проявляют цитопротективные свойства, сохраняя жизнеспособность клеток на высоком уровне и подавляя процесс программированной клеточной гибели лимфоцитов крови.

Исследование, выполненное методом иммуноблоттинга, показало, что при действии частиц ИСФГ в концентрации $5,00 \pm 0,25$ мг/мл значительного снижения внутрилимфоцитарного содержания антисуицидальных белков Bcl-2 и Bcl-X_L по сравнению с величиной данных показателей в интактных клетках не отмечалось. Аналогичные изменения были характерны для проапоптотических белков Bax и Bad. Как известно, регуляция активности белков семейства Bcl-2 осуществляется транскрипционными факторами NFκB и P53, которые управляют экспрессией генов этих белков на транскрипционном уровне.

При добавлении в инкубационную среду порошка ИСГФ в количестве $5,00 \pm 0,25$ мг/мл было зарегистрировано статистически значимое увеличение содержания несвязанного со своим ингибитором фактора транскрипции NF-κB $0,71$ ($0,56-0,88$) усл.ед., ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем в интактной культуре мононуклеарных лейкоцитов крови $0,48$ ($0,36-0,52$) усл.ед.). Полученные результаты согласуются с нашими данными по исследованию реализации апоптотической гибели мононуклеаров крови, выявившей снижение количества аннексинположительных клеток при их инкубации с порошком ИСФГ. Ряд авторов связывают участие NF-κB в отмене программы апоптоза с зависимой от него экспрессией таких антиапоптотических протеинов, как белки семейства ингибиторов апоптоза (IAP) IAP-1 и IAP-2 и FLIP (Fas-associated death domain-like interleukin-1β-converting enzyme-inhibitory protein), угнетающего активность каспазы-8.

Анализ внутриклеточного уровня транскрипционного фактора P53, проведенный с помощью метода вестерн-блоттинга, показал, что в ответ на присутствие в культуральной среде порошка ИСФГ в концентрации ($5 \pm 0,25$) мг/мл количество нефосфорилированной формы данного белка, в мононуклеарах не изменялось ($p > 0,05$).

Таким образом, проведенное исследование может свидетельствовать о способности ИСФГ оказывать цитопротективное влияние за счёт способности активировать транскрипционный фактор NF-κB, обладающий антиапоптотической направленностью.

В заключение следует отметить, что в рамках проведенного исследования была решена техническая задача в комплексной проблеме лечения экссудирующих ран. Создана раневая абсорбирующая повязка на основе ИСФГ (Патент РФ на изобретение № 2411960; 20.02.2011 г.) [11], предназначенная для лечения ран в первой фазе раневого процесса, когда необходима длительная (до нескольких суток) и активная эвакуация раневого отделяемого, обеспечивающая только «вертикальный

дренаж» и способная длительно фиксировать раневое отделяемое в сорбционном слое без проникновения на кожные покровы для исключения мацерации.

Раневая абсорбирующая повязка по своим способностям (погложительной, абсорбционной и адгезивной) превосходит применяемые и предлагаемые к применению высокоэффективные зарубежные аналоги [12]. Исследование цитотоксических свойств подтвердило её экологическую безопасность. Данная раневая абсорбирующая повязка на основе ИСФГ перспективна для лечения ран с обильной экссудацией, в том числе и огнестрельных.

Литература.

1. Абаев, Ю.К. Справочник хирурга. Раны и раневая инфекция / Ю.К. Абаев. – Ростов-на-Дону : Феникс, 2006. – 427 с.
2. Абаев, Ю.К. Хирургическая повязка / Ю.К. Абаев. – Минск : Беларусь, 2005. – 150 с.
3. Курбангалеев, С.М. Повреждения кровеносных сосудов при огнестрельных переломах костей конечностей / С.М. Курбангалеев // Опыт советской медицины в Великой Отечественной войне 1941-1945 гг. / ред. Е.И. Смирнов. – Москва : Медгиз, 1954. – Т. 16. – С. 15–94.
4. Военная и экстремальная медицина : пособие для студентов медико-диагностического факультета / А.В. Дрокин, В.Н. Коробач, И.А. Полуян, С.В. Флюрик. – Гродно, 2011. – 265 с.
5. Военно-полевая хирургия : руководство / под ред. П.Г. Брюсова, Э.А.Нечаева. – Москва : ГЭОТАР, 1996. – 414 с.
6. Военно-полевая хирургия : руководство к практическим занятиям : учебное пособие / под ред. М.В. Лысенко. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 572 с.
7. Военно-полевая хирургия : учебник / под ред. Е.К. Гуманенко. – 2-е изд., изм. и доп. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 768 с.
8. Военно-полевая хирургия : учебник / под ред. Е.К. Гуманенко. – Санкт-Петербург : Фолиант, 2004. – 464 с.
9. Нанографит в инженерной экологии и хирургии повреждений / В.Г. Макотченко, А.С. Назаров, В.Е. Фёдоров, Ф.А. Кузнецов, Г.П. Хандорин, Г.И. Дубов, В.И. Мазин, А.В. Штейнле // Фторидные технологии : тезисы докладов. – Томск, 2009. – С. 57.
10. Назаренко, Г.И. Рана, повязка, больной. Современные медицинские технологии : руководство для врачей и медсестер / Г.И. Назаренко, И.Ю. Сугурова, С.П. Глянцев. – Москва : Медицина. – 2002. – 472 с.
11. Пат. 2411960 Российская Федерация, МПК А 61 L 15/18 A61F 13/00. Раневая повязка / Г.И. Дубов, Е.В. Гаврилин, Л.А. Евтеев, В.И. Мазин, Е.В. Мартынов, Н.В. Рязанцева, Е.С. Цепляев, А.В. Штейнле). – № 2009117067/15 ; заявл. 04.05.2009 ; опубл. 20.02.2011, Бюл. № 5. – 11 с.
12. Раневая повязка на основе наноструктурированного графита – пример оптимального соотношения сорбционных и адгезивных свойств / А.В. Штейнле, П.С. Постников, К.В. Кутонова, Л.А. Штейнле // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – Т. 27, № 2. – С. 131–136.
13. Раны и раневая инфекция : руководство для врачей / под ред. М.И. Кузина, Б.М. Костюченко. – Москва : Медицина, 1990. – 592 с.
14. Ревской, А.К. Сохранение жизнеспособности конечности при остром нарушении кровоснабжения / А.К. Ревской. – Томск, 1978. – 246 с.
15. Синтез и применение наноструктурированного графита / Г.П. Хандорин, Г.И. Дубов, В.И. Мазин, В.Г. Макотченко, А.С. Назаров, В.Е. Фёдоров, О.Л. Хасанов, Н.В. Рязанцева, А.В. Штейнле и др. // Известия Томского политехнического университета. – 2010. – Т. 316, № 3. – С. 5–11.
16. Чрекастый остеосинтез и нанотехнологии в лечении сочетанных огнестрельных костно-артериальных повреждений / А.В. Штейнле, Г.П. Хандорин, Е.В. Гаврилин и др. // Сибирский медицинский журнал. – 2009. – Т. 24, № 2–1. – С. 45–54.
17. Чрекастый остеосинтез и нанотехнологии в лечении сочетанных огнестрельных костно-венозных повреждений / А.В. Штейнле, Н.В. Рязанцева, Г.П. Хандорин и др. // Сибирский медицинский журнал. – 2009. – Т. 24, № 3–1. – С. 89–98.
18. Gross, A. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis / A. Gross, J.M. McDonnell, S.J. Korsmeyer // Genes Dev. – 1999. – Vol. 13, N 15. – P. 1899–1911.
19. Adams, J.M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis / J.M. Adams // Genes. Dev. – 2003. – Vol. 17. – P. 2481–2495.
20. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases / Q.L. Deveraux, N. Roy, H.R. Stennicke et al. // EMBO J. – 1998. – Vol. 17, N 8. – P. 2215–2223.
21. Bishop, W.J. A history of surgical dressings / W.J. Bishop. – Chesterfield : Robinson, 1959. – 90 p.

22. Shteynle, A. Clinical efficiency of absorbing wound dressing consisting of nanostructured graphite in comparison with other modern dressings / A. Shteynle // The 7th international forum on strategic technology IFOST 2012. – Tomsk, 2012. – Vol. 1. – P. 477–481.
23. Thomas, S. Wound management and dressings / S. Thomas. – London : Pharmaceutical Press, 1990. – 226 p.
24. Vascular injuries associated with fractures of the femur / J.J. Rosental, M.R. Gaspar, T.C. Gjerdrum, J. Newman // Arch. Surg. – 1975. – Vol. 110, N 5. – P. 494–499.

ОТХОДЫ АГРОПРОМЫШЛЕННОГО КОМПЛЕКСА И ИХ ПЕРЕРАБОТКА

А.Д. Емишанов, студент бакалавр

*Ижевский государственный технический университет имени М.Т. Калашиникова
426069, Ижевск, ул. 30 лет Победы, 2 к. 5, тел. (341) 259-45-15*

E-mail: Sanchez-yoo@mail.ru

Аннотация. Проблема отходов является острой проблемой современности. Отходы становятся источником загрязнения окружающей среды, ухудшают санитарно-эпидемиологические и эстетические качества природы. Между тем, некоторые отходы обладают свойствами, обуславливающими возможность их использования, что предопределяет интерес к ним как к вторичному материальному ресурсу.

Abstract. The problem of waste is the burning issue of the present. Waste becomes a source of environmental pollution, worsens sanitary and epidemiologic and esthetic qualities of the nature. Meanwhile, some waste has the properties causing a possibility of their use that predetermines interest in them as to a secondary material resource.

Агропромышленный комплекс (АПК)- это совокупность отраслей экономики страны, включающая сельское хозяйство и отрасли промышленности, тесно связанные с сельскохозяйственным производством, осуществляющие перевозку, хранение, переработку сельскохозяйственной продукции. Наиболее распространенная модель агропромышленного комплекса обычно включает три основные сферы: Первая сфера включает отрасли промышленности, производящие средства производства для сельского хозяйства и отраслей промышленности, перерабатывающих сельскохозяйственное сырье: тракторное и сельскохозяйственное машиностроение, производство оборудования для животноводства, пищевой и легкой промышленности, выпуск минеральных удобрений, комбикормовая и микробиологическая промышленность, сельское производственное строительство. Вторая сфера – собственно сельское хозяйство (земледелие и животноводство). Третья сфера – система отраслей по промышленной переработке и сбыту сельскохозяйственного сырья и продовольствия: пищевая, легкая промышленность, система заготовок, транспортировка, хранение и реализация продукции АПК. [2]

Агропромышленный сектор экономики является отходоёмкой отраслью. Производство сельскохозяйственной продукции связано с образованием большого количества отходов. Примерное общее количество сельскохозяйственных отходов достигает 630-650 млн т. На рис. 1 представлена диаграмма объемов образования отходов в АПК. Наибольшая часть отходов приходится на отрасль животноводства (56%), второе место занимают отходы растениеводства (35,6%). На долю перерабатывающих отраслей приходится 4,7% отходов. [1]



Рис. 1. Объемы образования отходов в АПК