

Текуцкая Елена Евгеньевна

МЕХАНИЗМЫ СОЧЕТАННОГО ДЕЙСТВИЯ АКТИВНЫХ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ИНГРЕДИЕНТОВ И АДИАБАТИЧЕСКИХ
ФАКТОРОВ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОЙ ПРИРОДЫ

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук» в лаборатории проблем распределения стабильных изотопов в живых системах

Научный консультант:

Барышев Михаил Геннадьевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории проблем распределения стабильных изотопов в живых системах Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук», главный научный сотрудник лаборатории физико-химических исследований Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии»

Официальные оппоненты:

Шорманов Владимир Камбулатович, доктор фармацевтических наук, профессор, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» МЗ РФ

Гармонов Сергей Юрьевич, доктор химических наук, профессор, профессор кафедры аналитической химии, сертификации и менеджмента качества Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет»

Новиков Вадим Викторович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биофизики воды и физико-химических воздействий на биосистемы Института биофизики клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «16» «декабря» 2026 г. в 16 часов 00 минут на заседании диссертационного совета ПДС 0300.021 на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Электронная версия диссертации, автореферат и объявление о защите размещены на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки РФ (<http://vak.gisnauka.ru/>) и на сайте <https://www.rudn.ru/science/dissovet>.

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ПДС 300.021
кандидат химических наук, доцент

Левицкая Ольга Валерьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Электромагнитное загрязнение окружающей среды электромагнитным полем (ЭМП) антропогенного происхождения, обусловленное технологическим развитием, постоянно растет (*Lingvay D. et al., 2018, Sarimov R.M. et al., 2023, Greenebaum, B., 2019, Колесник, А.Г., 2007*). Расширяется использование сложномодулированного ЭМП в промышленности, навигации и коммуникациях, связанных с системами мобильной связи, базовыми станциями беспроводных телефонов, точками доступа Wi-Fi, в навигации (*Рубцова Н.Б., et al., 2019, Schuermann, D., Mevissen, M., 2021, Perov, S.Y., 2022*). Появились данные о том, что мобильные телефоны могут генерировать ЭМП в диапазоне частот 5 – 200 Гц с магнитной индукцией во время излучения, соизмеримой или больше геомагнитного поля, до 0,01 – 0,07 мТл (*Misek J., et al., 2023*). Сверхвысокочастотное (СВЧ) и крайне высокочастотное (КВЧ) ЭМП широко применяется в здравоохранении в клинических устройствах для физиотерапии и диагностики (*Бецкий О.В., 2015, Gopalakrishnan K., Adhikari A., et al., 2023, Gartshore, A., 2021, Origlia C., et al., 2024*).

Вода, будучи структурно неоднородной многокомпонентной открытой системой, активно взаимодействующей с окружающей средой, является объектом электромагнитного воздействия (*Lobyshev, V.I., 2023*). Роль воды критически важна при отборе перспективных лекарственных средств (ЛС), поэтому исследование влияния факторов электромагнитной природы на процессы, происходящие в водных растворах активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) является актуальным направлением в фармацевтической химии. Известно, что гомогенные водные растворы, находящиеся в крайне неравновесных условиях по энергомассообмену с атмосферой, демонстрируют коллоидные свойства по причине формирования плотностных неоднородностей, в том числе бабстонов, состоящих по известной физической модели из нанопузырьков (*Бункин Н.Ф., Бункин Ф.В., 2016*). Как одно из последствий протекания неравновесных процессов тепло- и массопереноса в гетерогенной водной среде описана спонтанная генерация активных форм кислорода (АФК) (*Беловолова Л.В., 2020*). Особую роль при этом играют электроны, захваченные в растворителе - гидратированные (сольватированные), e^-_{aq} , которые отличаются от свободных электронов меньшей подвижностью, большей локализацией и значительным временем жизни (*Харт, Э.Д., 1973, Herbert, J. M., 2019*).

Изучение механизмов сочетанного действия водных растворов важнейших АФИ - дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), входящей в состав иммунобиологических и биотехнологических лекарственных препаратов (ЛП), включая ДНК-вакцины (ОФС.1.7.1.0013.18), и альбумина, который входит в состав более 25 ЛП,

зарегистрированных в Государственном реестре лекарственных средств России (ГРЛС) (например, № ЛП-№(014244)-(РГ-RU), ЛП-№(011514)-(РГ-RU), ЛП-№(006730)-(РГ-RU)), включенных в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП) (*Greenebaum B., Barnes F., 2019, Sarimov R.M., Matveyeva T.A., 2018*), и факторов электромагнитной природы обусловлено необходимостью разработки основ теории, объясняющей изменение структуры и свойств АФИ при электромагнитном воздействии.

Результаты исследования механизмов сочетанного действия АФИ и факторов электромагнитной природы перспективны для использования в направлениях восстановительной медицины, применяющей СВЧ и КВЧ ЭМП, в магнитотерапии, а также при разработке профилактических и смягчающих неблагоприятные последствия электромагнитного воздействия для здоровья человека мер, что является практическим вкладом фармацевтической химии в защиту населения от техногенного ЭМП.

В диссертационном исследовании разработана физико-химическая модель образования АФК с участием e^-_{aq} и растворенного кислорода в водных растворах АФИ, описывающая колебания концентрации пероксида водорода и перекисных соединений в водной среде в зависимости от параметров воздействующего ЭМП; установлено, что электромагнитное воздействие влияет на перестройку водородных связей динамической гидратной оболочки АФИ, приводит к окислительному структурному повреждению ДНК; обоснована модель образования ассоциатов между АФИ и наночастицами при действии ЭМП.

Степень разработанности темы. Интерес к изучению воды и ее роли в фармации не ослабевает, о чем свидетельствуют проводимые при поддержке медицинского отделения и физического отделения РАН в течение последних 8 лет секции «Водные растворы в фармации» в рамках конференции «Физика водных растворов» (<https://physwatsol.ru>). Несмотря на накопленный ранее отечественными и зарубежными учеными большой экспериментальный и теоретический материал, посвященный изучению действия ЭМП на воду и живые организмы (*Sarimov R.M., et al., 2023, Binhi V.N., Rubin A.B., 2022, Villarini M., et al., 2013, Budziosz J., et al., 2018*), до сих пор не существует общепризнанного механизма электромагнитного воздействия на водные растворы АФИ.

При исследовании воздействия СВЧ и КВЧ ЭМП на водные растворы используется наследие работ ИРЭ РАН (акад. Н.Д. Девятков, проф. О.В. Бецкий), при этом значительная часть исследований посвящена нетепловым эффектам действия ЭМП с распространенными частотами 1,8 и 2,45 ГГц (*Schuermann D., Mevissen, M., 2021, Megha K., et al., 2015*). Между тем, СВЧ и КВЧ ЭМП широко применяется для различных целей на частотах, отличных от 2,45 ГГц в терапевтических аппаратах для лечения миллиметровым ЭМП совместно с

традиционными методами (*Jimenez H., et al., 2018*), хотя параметры электромагнитного воздействия выбираются разработчиками аппаратов эмпирически. СВЧ и КВЧ ЭМП используется в фармацевтической химии для лизиса клеток и выделения ДНК (*Gartshore A., et al., 2021*), а также контроля качества нанопрепаратов (*Petrov, G. V., et al., 2024*); в здравоохранении для приложений визуализации и зондирования (*Gopalakrishnan K., et al., 2023*). Вода с пониженным содержанием дейтерия (ddw – *deuterium depleted water*) оказывает стимулирующее действие на клетки, существенно повышает их активность, переключает метаболические пути (*Haseli R., et al., 2023, Basov A., et al., 2019, Zlatska A. V., et al., 2020*) и может быть перспективным протекторным средством при электромагнитном воздействии. Модификация изотопного соотношения дейтерий/протий (D/H) водных растворов приводит к возникновению аномального кинетического изотопного эффекта (КИЭ), который влияет на скорость и пути катаболизма фармацевтических субстанций (*Сыроешкин А.В., и др., 2020, Syroeshkin A. V., et al., 2019, Makarova M. P., 2019*). Биологически активные наночастицы серебра (AgNPs) служат основой для разработки биоактивных материалов (*Станишевская И.С., и др., 2016, Shenashen M.A., et al., 2014*), но при их применении необходимо учитывать дозозависимые цитотоксические свойства наночастиц (*Tran S., et al., 2017*). Частью стратегии снижения цитотоксичности и эффективного преодоления тканевых барьеров является создание на поверхности наночастиц защитных оболочек из АФИ (*Liu J., et al., 2010, Miclaus T., Beer C., et al., 2016*), поэтому не менее актуальным является исследование сочетанного влияния АФИ и ЭМП на модификацию поверхности AgNPs для улучшения биосовместимости, эффективности и безопасности последних, что является одним из требований фармацевтики и перспективным направлением в разработке современных систем доставки АФИ (*Drug Delivery Systems*).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия по следующим областям исследования (п.1, 3 и 4):

п.1. Исследование и получение биологически активных веществ на основе направленного изменения структуры синтетического и природного происхождения и выявление связей и закономерностей между строением и свойствами веществ.

п.3. Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

п.4. Разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы.

Объект исследования. В рамках диссертационной работы *объектами* исследования являлись водные растворы АФИ, а именно – растворы ДНК и человеческого сывороточного альбумина, а также моноклеарные клетки и крысы линии Wistar.

Предмет диссертационного исследования – механизмы сочетанного действия АФИ и факторов электромагнитной природы, выявления связей и закономерностей между строением и физико-химическими свойствами водных растворов АФИ при электромагнитном воздействии.

Цель диссертационной работы заключается в разработке современных научно-методологических подходов к исследованию закономерностей изменения свойств активных фармацевтических ингредиентов в водно-солевой среде в сочетании с адиабатическими факторами электромагнитной природы.

В ходе выполнения работы были поставлены и решены следующие основные **задачи**:

1. Разработать аппаратно-программный комплекс автоматизированной электромагнитной обработки водных растворов АФИ для изучения их физико-химических характеристик в зависимости от параметров воздействующего поля.
2. Обосновать роль воды в механизмах образования активных форм кислорода и разработать физико-химическую модель образования пероксида водорода в водно-солевых растворах АФИ при действии факторов электромагнитной природы.
3. Провести верификацию разработанной модели с помощью изучения процессов образования перекисных соединений в водных растворах АФИ при электромагнитном воздействии.
4. Выявить закономерности конформационной и структурной динамики АФИ в водно-солевых средах при действии ЭМП.
5. Разработать способ расчета сечения рассеяния ЭМП на сферической наночастице определенного радиуса с адсорбированным АФИ.
6. Обосновать снижение концентрации дейтерия во внеклеточной среде для уменьшения структурных и окислительных изменений ДНК при действии СВЧ и КВЧ ЭМП на живые клетки.
7. Изучить возможность применения методики определения концентрации дейтерия с использованием ЯМР спектроскопии для воды, водных растворов АФИ и биологических сред.

8. Применить разработанную физико-химическую модель образования активных форм кислорода в растворах АФИ для экспериментального исследования эффектов действия ЭМП на геномный материал, иммунокомпетентные клетки и животных.

Научная новизна диссертационной работы определяется основными результатами, приведенными ниже:

Изучены физико-химические свойства водно-солевых растворов АФИ, входящих в состав различных ЛП, при действии факторов электромагнитной природы. **Обоснован** механизм и **разработана** физико-химическая модель образования активных форм кислорода в водно-солевых растворах АФИ, объясняющие изменение структуры и свойств АФИ перестроением их гидратных оболочек, которое связано с колебаниями концентрации пероксида водорода и перекисных соединений в водной среде при действии ЭМП с величиной напряженности, на порядок превышающей напряженность геомагнитного поля. **Впервые** с помощью предложенной модели разработаны Программы для ЭВМ расчета зависимости содержания перекисных соединений в водно-солевых растворах АФИ от частоты воздействующего ЭМП. **Впервые** обнаружено, что конформационное состояние альбумина в воде зависит от частоты воздействующего ЭМП и приводит к обратимому разворачиванию домена II, который входит в центр связывания I, что облегчает обратимое связывание альбумина с лигандами. **Показано**, что сформированная при электромагнитном воздействии структура из молекул альбумина на поверхности наночастиц изменяет фармакокинетику AgNPs и улучшает их биодоступность. **Впервые** изучен характер окислительных повреждений азотистых оснований ДНК при электромагнитном воздействии на геномный материал. Для снижения структурных и окислительных изменений геномного материала при действии СВЧ и КВЧ ЭМП на клетки **обосновано** применение воды, обедненной дейтерием ddw (*deuterium depleted water*). **Впервые** изучено влияние полиморфизма ключевого гена системы эксцизионной репарации ДНК при окислительных повреждениях на восприимчивость генома к электромагнитному воздействию. **Впервые** с помощью предложенной физико-химической модели обнаружено, что электромагнитное воздействие может приводить – в зависимости от частоты поля – как к увеличению, так и к уменьшению секреции межклеточных медиаторов иммунокомпетентными клетками.

Теоретическая и практическая значимость работы. Изучение эффектов сочетанного действия АФИ и факторов электромагнитной природы направлено на решение важной научной проблемы, связанной с исследованием изменения фармакодинамики и физико-химических свойств АФИ при внешних физических воздействиях. Теоретическая значимость для фармацевтической химии и фармакогнозии обусловлена созданием физико-

химической модели воздействия ЭМП с величиной магнитной индукции, на порядок превышающей магнитную индукцию геомагнитного поля, на водные растворы важнейших АФИ, входящих в состав различных ЛП. Способ расчета размеров и спектральных характеристик ассоциатов сферических наночастиц с АФИ может использоваться для изучения процессов взаимодействия наночастиц с биологически активными или фармацевтическими ингредиентами в направлениях медицинской химии, связанных с разработкой функциональных наноструктур, как для таргетной доставки ЛС, так и в фототермической терапии, активируемой наночастицами. Полученные результаты определения содержания одонитовых разрывов и окислительных повреждений в ДНК служат дополнительными диагностическими критериями при исследовании действия повреждающих генетический материал факторов на организм человека для предотвращения последствий воздействия СВЧ и КВЧ ЭМП на население. Результаты работы положены в основу разработки проекта ОФС «Определение дейтерия в водных растворах методом ЯМР», что расширит возможности контроля качества воды и водных растворов природного происхождения, лабораторного и промышленного производства. Результаты изучения влияния полиморфизма гена *8-oxoguanin DNA glycosylase hOGG1* на чувствительность геномного материала к ЭМП могут быть использованы в магнитотерапии. Продемонстрирована высокая восприимчивость иммунной системы к электромагнитному воздействию в отношении профиля межклеточных медиаторов, что может быть применено для положительного влияния на определенные аспекты иммунного ответа. Разработан аппаратно-программный комплекс автоматизированной обработки ЭМП и исследования физико-химических характеристик водных растворов АФИ в зависимости от параметров ЭМП. Разработаны программы для ЭВМ расчета зависимости содержания перекисных соединений в водно-солевых растворах АФИ от частоты воздействующего электромагнитного поля и база данных окислительных и структурных повреждений геномного материала при электромагнитном воздействии.

Методология и методы исследования. В диссертационном исследовании использованы современные физико-химические и биофармацевтические методы анализа. Эффекты низкочастотного ЭМП исследовали на различных моделях: водных растворах АФИ *in vitro* и на крысах *in vivo*, сверхвысокочастотного и крайне высокочастотного ЭМП на живых клетках *in vitro*.

Экспериментальный материал использован для верификации физико-химической модели генерации свободно радикальных форм кислорода в водных растворах.

Определена прецизионность методики определения содержания дейтерия в водных растворах с использованием метода ЯМР и применением в качестве внешнего стандарта

лантаноидного сдвигающего реагента в условиях повторяемости (при $P=95\%$), включающая вычисление значений стандартного отклонения, относительного доверительного интервала среднего значения и относительной ошибки среднего (ϵ , %). Проведена валидация методики по показателям специфичность, предел обнаружения, предел количественного определения.

Положения, выносимые на защиту:

1. Физико-химическая модель и механизмы генерации активных форм кислорода в водной среде с участием гидратированного электрона, связанные с образованием в водных растворах АФИ активных форм кислорода, позволяющие учитывать внешнее электромагнитное воздействие.

2. В рамках верифицированной физико-химической модели установлено 2 – 5 - кратное увеличение ($p < 0,05$) содержания пероксида водорода и перекисных соединений в растворах ДНК по сравнению с контролем, которое немонотонно зависит от частоты поля и концентрации растворенного кислорода. Рассчитанные концентрации перекисных соединений в растворах ДНК после электромагнитного воздействия близки к экспериментально измеренным.

3. Электромагнитное воздействие на спиновые состояния молекул воды гидратной оболочки приводит к увеличению доступности для молекул растворителя нуклеофильных центров связывания альбумина при рН, отличных от изоэлектрической точки, которое обусловлено обратимым разворачиванием третичной структуры альбумина, вызванным индуктивно-резонансным фёрстеровским переносом энергии и динамическим неадиабатическим взаимодействием аминокислотных остатков альбумина с растворителем.

4. С помощью разработанного способа расчета сечения рассеяния света на сферической наночастице по типу «ядро-оболочка» рассчитаны резонансная длина волны ассоциатов сферических наночастиц с альбумином, которые образуются в водных растворах при электромагнитном воздействии, равная (354 ± 4) нм, и количество молекул альбумина, входящих в состав ассоциатов, до 20.

5. С увеличением частоты сверхвысокочастотного и крайне высокочастотного электромагнитного поля с плотностью мощности 6 мВт/см^2 и временем воздействия 60 сек в ДНК лимфоцитов достоверно увеличивается ($p < 0,05$) содержание окисленных сайтов 8-oxodG с $(4,1 \pm 0,9)$ нг/мл до $(12,4 \pm 1,1)$ нг/мл и однонитевых разрывов ДНК на 30–45 % по сравнению с исходными уровнями в необлученных образцах.

6. Снижение относительно природного уровня содержания дейтерия (150 ppm) в среде инкубации лимфоцитов после воздействия сверхвысокочастотного и крайне высокочастотного электромагнитного поля приводит к сокращению повреждений

геномного материала клеток, что сопровождается уменьшением уровня одонитевых разрывов ДНК в среднем в 3 – 6 раз по сравнению с контролем.

7. В рамках практического использования разработанной физико-химической модели рассчитаны и экспериментально определены частоты ЭМП, при которых происходит ингибирование или стимулирование продукции провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками: воздействие электромагнитным полем частотами 7,0–7,8 Гц и 8,6–9,0 Гц приводит к нивелированию гиперпродукции интерлейкина-6, а полем частотами 8,2–9 Гц - к уменьшению выработки фактора некроза опухоли.

Степень достоверности полученных результатов. Диссертационная работа выполнена на современном научно-методическом уровне в объеме, достаточном для приведенных в работе обобщений и обоснования выводов, представленные научные результаты подтверждаются воспроизводимостью экспериментальных и расчетных данных. Результаты прошли оценку независимых экспертов с последующим опубликованием в рецензируемых журналах, индексируемых в российских и международных библиографических системах, и согласуются с имеющимися литературными данными. Достоверность результатов обеспечена использованием инструментальных методов фармацевтического анализа – флуоресцентной и ИК-спектроскопии, ЯМР-спектроскопии, электронной микроскопии, иммуноферментного анализа с помощью оборудования, включенного в Государственный реестр средств измерений, с применением метрологически аттестованных в установленном Росстандартом порядке методик. *Статистический анализ* результатов проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна — Уитни.

Апробация результатов диссертационной работы. Основные результаты диссертации были доложены автором на международных и всероссийских научных конференциях и семинарах, включая устные доклады и постерные сессии, в том числе: XI Международном форуме «Медико-экологическая безопасность, реабилитация и соцзащита населения» (Italy, 2004); XVI - XXX International conference New Information Technology in Medicine, biology, pharmacology and Ecology (Gurzuf, 2008 - 2022); VII International Congress Low and Superlow Fields and Radiations in Biology and Medicine (Санкт-Петербург, РФ, 2015); V International Conference «Man and Electromagnetic Fields» (Sarov, РФ, 2016); Научно-практической конференции с международным участием «Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность» (Севастополь, РФ, 2017); Всероссийской научно-практической конференции «Физика и экология ЭМИ» (Агой, РФ, 2017); VIII Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика»

(Ялта, РФ, 2020); XV и XVI Международных научных конференциях «Актуальные вопросы биологической физики и химии» БФФХ (Севастополь, РФ, 2020, 2022); Международной научной конференции «Scientific research of the SCO countries: synergy and integration» (Пекин, Китай, 2022); XIV и XV International Crimean conference «Cosmos and biosphere» (Симферополь, РФ, 2021, 2023); VII и IX Международных конгрессах «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине» (Санкт-Петербург, РФ, 2018, 2024); 8-й всероссийской конференции «Физика водных растворов» (Москва, РФ, 2025) и на других конференциях.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 73 научные работы, в том числе 15 научных статей в журналах, индексируемых в библиографических базах Scopus, Web of Science, 5 статей в журналах RSCI, 2 статьи в журналах из перечня ВАК, получено 3 патента РФ, зарегистрировано 1 свидетельство о государственной регистрации базы данных и 2 свидетельства о государственной регистрации программ ЭВМ, результаты отражены в 7 учебно-методических пособиях, в 6 статьях в рецензируемых периодических изданиях, а также в 32 тезисах докладов в материалах всероссийских и международных научных конференций.

Личный вклад автора в формулировку проблемы, постановку цели и основных задач исследования, выбор методов и экспериментальных подходов для осуществления исследования, анализ экспериментальных данных, интерпретацию и обобщение результатов является определяющим. Оригинальность диссертационного исследования составляет 95,69 %. Отсутствует конфликт интересов с коллегами и соавторами. Разработана модель, описывающая влияние ЭМП на количественный выход перекисных соединений в водных растворах АФИ. Изучены эффекты, индуцированные действием НЧ, КВЧ и СВЧ ЭМП на растворы АФИ и живые клетки с учетом генерацией АФК в воде. Предложен способ расчета размеров ассоциатов сферических наночастиц с АФИ по типу «ядро-оболочка». Разработан аппаратно-программный комплекс автоматизированной электромагнитной обработки и исследования физико-химических характеристик растворов АФИ. **Работа выполнена** с использованием оборудования лаборатории проблем распределения стабильных изотопов в живых системах ЮНЦ РАН в рамках выполнения государственных заданий ЮНЦ РАН на 2024 год № 122020100351-9 и на 2025 год № 125011700394-5.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, списка сокращений, списка цитируемой литературы (421 источник), приложений. Материал изложен на 299 страницах, иллюстрирован 64 рисунками и содержит 16 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **Главе 1** рассмотрено современное состояние исследований биомедицинских эффектов НЧ, СВЧ и КВЧ ЭМП на водные растворы АФИ и клетки и использование ЭМП в медицине. Изложены современные механизмы электромагнитного воздействия на водные растворы АФИ. Рассмотрено влияние АФК на процессы повреждения АФИ. Описано применение воды, обедненной дейтерием, в фармации и медицине.

В **Главе 2** приводится описание объектов, методов исследования и разработанного аппаратно-программного комплекса, который позволяет проводить автоматизированную электромагнитную обработку водных растворов АФИ и исследование их физико-химических характеристик после электромагнитного воздействия.

Объекты исследования. В работе исследовали водно-солевые растворы ДНК («Sigma», США), образцы геномного материала и моноклеарные клетки. Для приготовления раствора белка лиофилизированный препарат человеческого сывороточного альбумина («Sigma-Aldrich», США) растворяли физиологическим раствором до концентрации 50 мМ. Концентрацию контролировали спектрофотометрически, $\epsilon_{279} = 43824 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Квазисферические AgNPs заданного размера получали боргидридным методом, в качестве стабилизатора использовали поливинилпирролидон. Размеры и форму AgNPs верифицировали с помощью электронного растрового микроскопа JEOL JSM-7500F. В исследованиях воздействия НЧ ЭМП *in vivo* использовали крыс-самцов линии Wistar массой 220–240 г в возрасте 2–2,5 мес. Эксперименты проводили в соответствии с требованиями Директивы Европейского Сообщества 2010/63. /ЕВРОСОЮЗ; «Руководство по работе с лабораторными животными, включающее этические принципы тестирования на животных (принцип 3R) Института им. В.М. Горбатова РАН», приказа Минздравсоцразвития России «Об утверждении правил лабораторной работы» (№708н от 23.08.2019).

Методы исследования. *Обработку образцов ЭМП* заданных параметров проводили с помощью разработанного комплекса [Пат. РФ№156339, 2015; Пат. РФ№163735, 2016]. *Регистрацию ИК-спектров* проводили на ИК-Фурье спектрометре Tensor 27 (Bruker) в спектральном диапазоне 4000–500 см^{-1} с помощью приставки для спектроскопии Platinum ATR unit A225. *Регистрацию спектров флуоресценции* осуществляли на флуоресцентном спектрофотометре Hitachi F-2700 (Hitachi High-Tech Science Corporation, Токио, Япония) в диапазоне от 220 до 800 нм с шагом в 0,5 нм и разными длинами волны возбуждения. *Спектры поглощения* получали с использованием спектрофотометров U-2900 (Япония) и Shimadzu UV-1800. *Электронную микроскопию полученных AgNPs* проводили на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-7500F

(Япония) в режиме детектирования обратно отраженных и вторичных электронов с ускоряющим напряжением до 10 кВ и увеличением в 30 000 раз. Для определения содержания дейтерия в воде использовали ЯМР Фурье-спектрометр 400 МГц (FT NMR SYSTEM модели JNM-ECA 400 Ltd., Япония) с датчиком 40TH5AT/FG2. Выделение моноклеарных клеток проводили в градиенте плотности фиколл-урографин (плотность 1,077 г/мл). Для верификации и определения содержания клеток в полученных взвешках использовали счетчик клеток крови «Пикоскель ПС-4М» (ООО «Лабовей», Санкт-Петербург, Россия). Концентрация клеток во взвешках составляла $0,87 \cdot 10^6$ клеток/см³. Выделение ДНК из биологического материала осуществляли с помощью реактивов готовых коммерческих наборов «ДНК-Экстран-1» (Кат. EX-509, ФГУН ВНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, Россия) сорбционным способом. Типирование полиморфного варианта rs1052133 гена *8-oxoguanin DNA glycosylase OGG1* осуществляли в режиме «real time» методом ПЦР на Qiagen Rotor-Gene (Дюссельдорф, Германия) с помощью наборов реагентов для определения полиморфизма гена *8-oxoguanin DNA glycosylase* (rs1052133) (Кат. №NP-465-100, ООО «Синтол», Москва, Россия). Результаты исследования анализировали с помощью программы Rotor-Gene Q software 2.3.5, установив значение пороговой линии 0,1 и выделив области соответствующих генотипов. Определение уровня 8-оксигуанозина (8-oxodG) в ДНК проводили, используя набор реагентов DNA Damage (Кат. EKS-360, Immundiagnostic, Берлин, Германия) на микропланшетном фотометре Multiskan FC (Thermo Scientific, США). Определение количества однонитевых разрывов в ДНК лизатов клеток осуществляли с помощью флуоресцентной спектроскопии. Определение содержания пероксида водорода проводили спектрофотометрическим методом, используя набор «PerOx» (Immun Diagnostic AG, Германия) на микропланшетном ридере Multiskan FC (Thermo Scientific, США). Определение уровня цитокинов *TNF-α*, *IL-1β* и *IL-6* до и после обработки ЭМП биообразцов проводили методом иммуноферментного анализа с помощью наборов ООО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия). Калибровочные графики для *IL-1β* и *IL-6* линейны в интервале 0 – 250 пг/мл, их уравнения имели вид: для *IL-1β* $y = 0,008x + 0,051$, для *IL-6* $y = 0,0023x + 0,0928$. Для *TNF-α* график линейен в интервале 0 – 100 пг/мл, уравнение имело вид $y = 0,0073x + 0,0923$. Регистрацию хемилюминесценции осуществляли с помощью хемилюминометра Lum-5773 (ООО Дисофт, Москва) в кварцевой кювете, $1 \text{ мВ} \approx 1$ фотон/сек. Статистический анализ результатов проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна — Уитни. Различия по всем изучаемым параметрам считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Использовали пакеты программ «Microsoft Excel» (Microsoft, США), «Statistica» (StatSoft Inc., США). Последовательность обработки результатов прямых измерений в условиях повторяемости и воспроизводимости состояла в

вычисление значений стандартного отклонения ($x \pm SD$), относительного доверительного интервала среднего значения ($x \pm \Delta x$) и относительной ошибки среднего ($\varepsilon, \%$).

**Аппаратно-программный комплекс автоматизированной обработки
электромагнитным полем и исследования физико-химических характеристик
водных растворов АФИ**

Схема разработанного аппаратно-программного комплекса, который позволяет проводить автоматизированную электромагнитную обработку водных растворов АФИ и исследование их физико-химических характеристик после электромагнитного воздействия, приведена на рисунке 1.

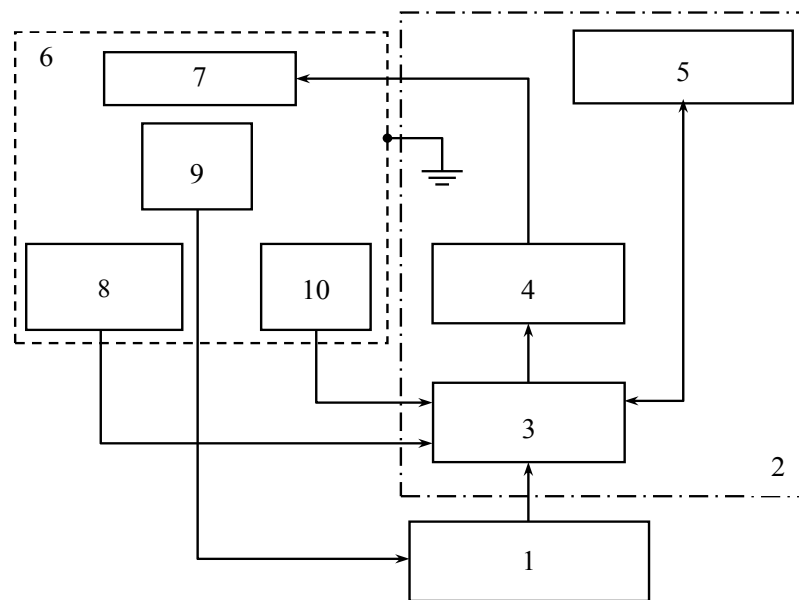


Рисунок 1 – Структурная схема аппаратно-программного комплекса автоматизированной обработки ЭМП и исследования физико-химических характеристик водных растворов АФИ: 1 – персональный компьютер; 2 – генераторный блок; 3 – микроконтроллер; 4 – усилитель мощности; 5 – блок управления и индикации; 6 – заземленная экранированная камера; 7 – излучатель; 8 – анализатор спектра Экофизика-110А с антенной П6-70; 9 – измерительный модуль с образцом; 10 – датчик температуры.

Источник: составлено автором

Излучателем служила катушка индуктивности с сопротивлением 20 Ом, которая была помещена в экранированную камеру, изготовленную из конструкционной стали толщиной 3 мм. Камера ослабляла внешнее ЭМП в диапазоне частот от 3 Гц до 300 кГц в 100 раз. Измерение геомагнитного поля производили при помощи измерителя магнитной индукции Актаком АТТ-8701 (Россия). Измерение напряженности ЭМП осуществляли с помощью анализатора спектра Экофизика-110А (ООО ПКФ Цифровые приборы, Москва) с антенной П6-70 (8). С помощью датчика (10) автоматически измеряли температуру образца. В качестве измерительного модуля использовали хемилуминометр Lum-5773 или флуоресцентный спектрофотометр Hitachi F-2700. Поле в месте расположения образцов

было однородным, поскольку размеры катушки в 50 раз больше размера образцов. Образцы обрабатывали синусоидальным полем напряженностью от 40 до 550 А/м и частотами от 1 до 100 Гц в течение заданного времени. Направления векторов постоянного геомагнитного поля и воздействующего поля были взаимно перпендикулярны. На выбранной частоте поля обрабатывали одновременно 5 образцов проб, определяли физико-химические параметры, затем изменяли частоту поля и обрабатывали следующую партию образцов. Определение физико-химических показателей до и после обработки образцов ЭМП проводили в «слепых» условиях эксперимента, без информирования оператора о принадлежности содержимого каждой пробирки к конкретному воздействию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1 Механизм образования активных форм кислорода в водно-солевых растворах активных фармацевтических ингредиентов при электромагнитном воздействии

1.1 Образование пероксида водорода в водных растворах активных фармацевтических ингредиентов в зависимости от частоты воздействующего электромагнитного поля.

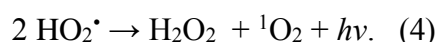
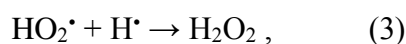
Ниже приведены ключевые уравнения образования АФК в водных растворах АФИ. На поверхности газовых нанопузырьков, стабилизированных адсорбированными ионами, происходит восстановление протонов с участием гидратированного электрона (*Харт, Э.Д., 1973*) и образование свободных радикалов $H^\bullet$:



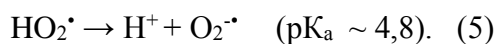
Образующийся радикал водорода, обладающий неспаренным электроном, взаимодействует с молекулами растворенного кислорода, концентрация которых на 3 порядка выше, чем суммарная концентрация протонов и гидроксид-ионов (10^{17} против 10^{14} молекул/см³), образуя гидропероксидный радикал:



Из гидропероксидного радикала возможно образование H_2O_2 :



При нейтральном и щелочном pH водной среды гидропероксидный радикал распадается с образованием супероксид-иона:

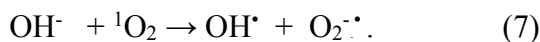


Последовательное протекание реакций (1 – 5) приводит к накоплению пероксида водорода, синглетного кислорода и супероксид-иона в водной среде. Супероксид-ион,

являясь хорошим восстановителем, способствует разложению пероксида водорода с образованием гидроксильного радикала:



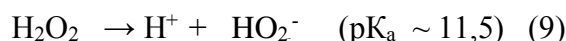
В нейтральной и слабощелочной среде синглетный кислород взаимодействует с гидроксид-ионом с образованием супероксид-иона:



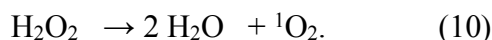
К образованию пероксида водорода также приводит дисмутация гидроксильного радикала:



С уменьшением содержания протонов пероксид водорода самопроизвольно распадается с подкислением среды



или с образованием синглетного кислорода



Введя обозначение k_i для констант скоростей реакций (1) – (10), запишем соответствующие кинетические уравнения для скорости образования в водных растворах разных АФК в общем виде:

$$\frac{d}{dt} [\text{H}^{\cdot}] = k_1[\text{H}^+][\text{e}^-_{\text{aq}}] - k_2[\text{H}^{\cdot}][\text{O}_2] - k_3[\text{H}^{\cdot}][\text{HO}_2^{\cdot}], \quad (11)$$

$$\frac{d}{dt} [\text{HO}_2^{\cdot}] = k_2[\text{H}^{\cdot}][\text{HO}_2^{\cdot}] - k_4[\text{HO}_2^{\cdot}]^2 - k_3[\text{HO}_2^{\cdot}][\text{H}^{\cdot}] - k_5[\text{HO}_2^{\cdot}], \quad (12)$$

$$\frac{d}{dt} [{}^1\text{O}_2] = k_4[\text{HO}_2^{\cdot}]^2 - k_7[{}^1\text{O}_2][\text{OH}^-] + k_{10}[\text{H}_2\text{O}_2], \quad (13)$$

$$\frac{d}{dt} [\text{O}_2^{\cdot-}] = k_5[\text{HO}_2^{\cdot}] - k_6[\text{H}_2\text{O}_2][\text{O}_2^{\cdot-}] + k_7[\text{OH}^-], \quad (14)$$

$$\frac{d}{dt} [\text{OH}^{\cdot}] = k_6[\text{H}_2\text{O}_2][\text{O}_2^{\cdot-}] + k_7[\text{OH}^-][{}^1\text{O}_2] - k_8[\text{OH}^{\cdot}], \quad (15)$$

$$\frac{d}{dt} [\text{H}_2\text{O}_2] = k_3[\text{H}^{\cdot}][\text{HO}_2^{\cdot}] + k_4[\text{HO}_2^{\cdot}]^2 + k_8[\text{OH}^{\cdot}]^2 - k_6[\text{H}_2\text{O}_2][\text{O}_2^{\cdot-}] - k_9[\text{H}_2\text{O}_2] - k_{10}[\text{H}_2\text{O}_2]. \quad (16)$$

Используем условие постоянства промежуточных продуктов в реакциях (1–10) и упрощение кинетической модели производства и убыли пероксида водорода. В результате решения системы уравнений (11–16) получаем выражение для скорости образования наиболее устойчивой и долгоживущей АФК – пероксида водорода:

$$\frac{d}{dt} [\text{H}_2\text{O}_2] = \frac{k_1}{2} [\text{OH}^-][\text{e}^-_{\text{aq}}] + \frac{k_4}{2} \left(\frac{k_2}{k_3}\right)^2 [\text{O}_2]^2 - k_{10}[\text{H}_2\text{O}_2]. \quad (17)$$

Из уравнения (17) следует, что скорость накопления пероксида водорода зависит от pH, концентрации электронов e^-_{aq} и концентрации растворенного кислорода. Накопление и разложение пероксида водорода определяет периодичность в цикле взаимопревращений АФК в водно-солевой среде. Для незатухающих колебаний концентрации пероксида водорода справедливо уравнение:

$$\frac{d^2}{dt^2} [H_2O_2] + \delta \frac{d}{dt} [H_2O_2] + \omega_0^2 [H_2O_2] = 0, \quad (18)$$

которое является дифференциальным уравнением свободных колебаний, возникающих в гармоническом осцилляторе. В этом уравнении выражение перед $[H_2O_2]$ есть квадрат частоты собственных колебаний концентрации пероксида водорода в осцилляторе ω_0^2 , а выражение перед $\frac{d}{dt} [H_2O_2]$ — показатель затухания колебаний концентраций пероксида водорода δ .

Рассмотрим влияние НЧ ЭМП, в котором преобладает магнитная составляющая, на выход пероксида водорода в водно-солевой среде. ЭМП воздействует на магнитные моменты электронов и радикальные пары с различными g-факторами ($H^\bullet$, $HO_2^\bullet$, $OH^\bullet$), а также на магнитные моменты молекул воды, входящих в гидратные оболочки АФИ. Имея пренебрежимо малую энергию, поле снимает спиновые запреты, переключая реакции в радикальных парах со спин-запрещенных каналов на спин-разрешенные. Таким образом, возможно преобразование физического сигнала ЭМП вначале в химический, а затем и в биохимический отклик системы. ЭМП с большой магнитной составляющей, изменяющееся синусоидально, описывается уравнением $H = H_m \sin \omega t$. Пренебрегая в первом приближении нелинейными процессами, происходящими в водно-солевом растворе под действием ЭМП, можно предположить, что приращение концентрации пероксида водорода изменяется пропорционально напряженности в исследуемом интервале значений напряженности поля согласно выражению $\Delta[H_2O_2] = \alpha H_m \sin \omega t$, где α — коэффициент пропорциональности. В результате колебания, возникающие в химическом осцилляторе станут вынужденными и для них будет справедливо уравнение:

$$\frac{d^2}{dt^2} [H_2O_2] + \delta \frac{d}{dt} [H_2O_2] + \omega_0^2 [H_2O_2] = \alpha H_m \sin \omega t. \quad (19)$$

Решение такого неоднородного уравнения равно сумме общего решения однородного уравнения, характеризующего затухающий процесс образования пероксида водорода, возникающий после скачкообразного приложения внешнего воздействия, и частного решения, которое описывает установившийся колебательный процесс под действием приложенной вынуждающей силы.

Общее решение записывается в виде:

$$[H_2O_2] = [H_2O_2]_{m0} e^{-\delta t} \sin(\omega_0 t + \varphi_0), \quad (20)$$

где $[H_2O_2]_{m0}$ — амплитуда свободных колебаний концентрации пероксида водорода.

Частное решение имеет вид:

$$[H_2O_2] = [H_2O_2]_m \sin(\omega t + \varphi), \quad (21)$$

где $[H_2O_2]_m$ — амплитуда вынужденных колебаний концентрации пероксида водорода под воздействием ЭМП.

Для определения амплитуды вынужденных колебаний $[H_2O_2]_m$ в уравнение (19) подставим значения первой и второй производной уравнения (21). Получим значение амплитуды вынужденного колебания концентрации пероксида водорода под действием ЭМП.

$$[H_2O_2]_m = \alpha H_m ((\omega_0^2 - \delta^2)^2 + 4\delta^2 \omega^2)^{-1/2}. \quad (22)$$

Предположим, что потери в осцилляторе АФК невелики, а частота внешней силы незначительно отличается от собственной частоты колебаний концентрации пероксида водорода в растворе, тогда получим решение уравнения (19) в следующем виде:

$$[H_2O_2] = [H_2O_2]_{m0} e^{-\delta t} \sin(\omega_0 t + \varphi) + [H_2O_2]_m \sin(\omega t + \varphi), \quad (23)$$

$$[H_2O_2]_m = \alpha H_m ((\omega_0^2 - \omega^2)^2 + 4\delta^2 \omega^2)^{-1/2}, \quad (24)$$

где φ — начальная фаза колебаний концентрации пероксида водорода, которая при сделанных допущениях одинакова как для затухающих, так и для незатухающих колебаний.

В выражении (23) первое слагаемое стремится к нулю. Другими словами, со временем собственные колебания концентрации пероксида водорода в растворе затухают и проявляются только вынужденные колебания, амплитуда которых зависит от частоты воздействующего ЭМП.

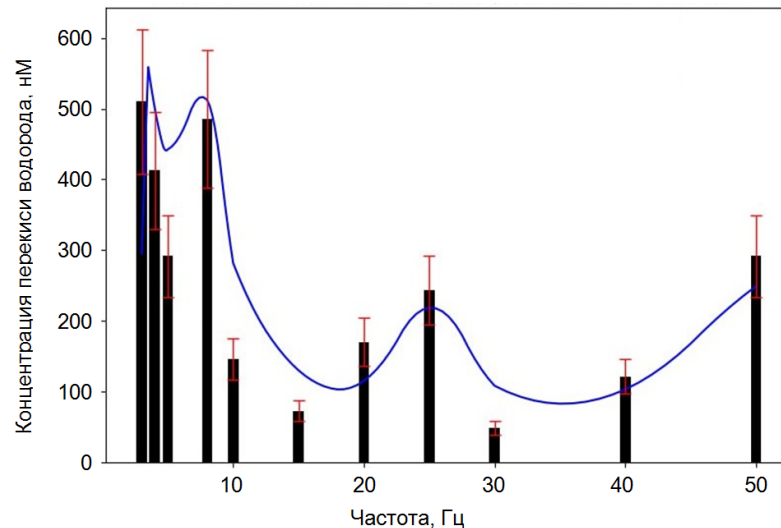


Рисунок 2 – Аппроксимированная зависимость содержания пероксида водорода (синяя линия) и экспериментально определенное суммарное количество перекисных соединений в растворах ДНК с концентрацией 2,5 мкг/мл (черные столбики) от частоты ЭМП. Напряженность поля 450 А/м, время воздействия 30 мин.

Источник: составлено автором

На рисунке 2 приведена аппроксимированная зависимость содержания пероксида водорода от частоты ЭМП в водных растворах ДНК, полученная с помощью разработанных на основе предложенной модели программ для ЭВМ (Свидетельства о государственной регистрации программ для ЭВМ № 2023661816 и № 2024680989), которая имеет четыре

максимума концентраций пероксида водорода в растворах ДНК при частотах поля 3, 8, 25 и 50 Гц. Экспериментально определенные значения концентрации перекисных соединений в растворах ДНК после воздействия полем разной частоты совпадают с расчетными максимумами аппроксимированной зависимости.

1.2 Эффекты генерации перекисных соединений в водно-солевой среде при сочетанном действии активных фармацевтических ингредиентов и факторов электромагнитной природы.

На рисунке 3 приведен усредненный график зависимости интенсивности хемилюминесценции растворов ДНК с концентрацией 2,5 мкг/мл от частоты ЭМП с напряженностью (550 ± 20) А/м в диапазоне частот от 7,5 до 16,5 Гц. Средний разброс полученных значений интенсивности хемилюминесценции составлял ± 5 мВ. Растворы ДНК без электромагнитного воздействия не имели фотонного отклика, интенсивность их хемилюминесценции была соизмерима с контрольными образцами (30 ± 2) мВ. После обработки растворов полем частотами от 8,7 до 9,0 Гц интенсивность хемилюминесценции увеличивалась в 2,5–2,8 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

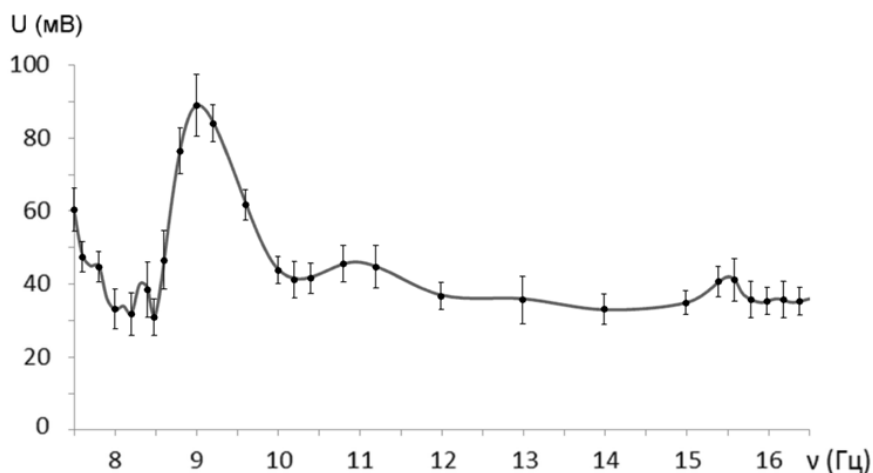


Рисунок 3 – Зависимость интенсивности хемилюминесценции водно-солевых растворов дезоксирибонуклеиновой кислоты с концентрацией 2,5 мкг/мл от частоты электромагнитного поля, 22 °С, время воздействия 10 мин.

Примечание: Контрольные образцы выдерживали в экранированной камере в условиях, максимально приближенных к эксперименту, но без электромагнитного воздействия.

Источник: составлено автором

Одной из причин изменения хемилюминесценции растворов ДНК является воздействие поля на колебательные процессы переноса электронов в осцилляторе взаимопревращений АФК. Для проверки данного предположения определили суммарное содержание перекисных соединений в данных растворах после электромагнитного воздействия. Получена немонотонная зависимость концентрации перекисных соединений в растворах ДНК от частоты поля. Гистограмма приведена на рисунке 4.

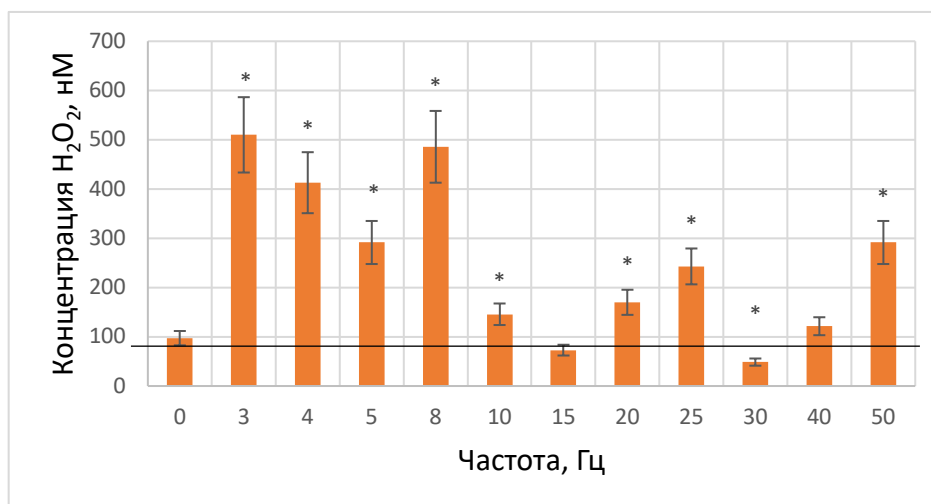


Рисунок 4 – Суммарное содержание перекисных соединений в водно-солевых растворах дезоксирибонуклеиновой кислоты с концентрацией 2,5 мкг/мл после электромагнитной обработки полем напряженностью (550 ± 20) А/м с разной частотой, 22°C, время обработки каждой серии образцов 30 мин.

Примечание: * - статистически значимые различия по сравнению с контролем при $p < 0,05$. Контрольные образцы выдерживали в экранированной камере в течение 30 минут без обработки ЭМП.

Источник: составлено автором

Содержание пероксида водорода в воде без электромагнитного воздействия составляло $(7,4 \pm 0,3)$ нМ. В растворах ДНК содержание перекисных соединений увеличивалось до $(93,5 \pm 8,3)$ нМ ($p < 0,05$), еще более значительное увеличение величины этого параметра наблюдалось после воздействия полем частотами 3; 4; 5; 8 или 50 Гц.

В водной среде процессы образования АФК происходят на границе раздела воздух/вода на поверхности нанопузырьков растворенных газов (*Mehrgard M.A., et al., 2022*), стабилизированных оболочкой преимущественно из отрицательных ионов (*Бункин Н.Ф., Бункин Ф.В., 2016*). Гидрофобность газов обуславливает большое поверхностное натяжение и давление Лапласа, а адсорбция АФИ создает противоположное давление, стабилизирующее нанопузырьки, тем самым, площадь поверхности раздела фаз вода/воздух, на которой протекают реакции образования АФК, суммарно увеличивается, последнее приводит к увеличению концентрации пероксида водорода в растворе ($p < 0,05$). На границе раздела вода/воздух нанопузырьков формируется двойной электрический слой. НЧ ЭМП вызывает изменение магнитных моментов радикалов, входящих в состав двойного слоя, и приводит к его лавинообразному распаду. Выделение накопленной энергии проявляется в повышении интенсивности хемилюминесценции растворов ДНК под действием ЭМП с частотой 9 Гц и в значительном увеличении в них концентрации перекисных соединений после электромагнитного воздействия.

1.3 Влияние растворенных газов на образование активных форм кислорода в растворах активных фармацевтических ингредиентов при действии низкочастотного электромагнитного поля.

Для выяснения участия кислорода в образовании пероксида водорода растворы ДНК насыщали с помощью барботирования кислородом или аргоном и воздействовали ЭМП с разной частотой. Содержание кислорода в воде и растворах ДНК при температуре 21 °С и атмосферном давлении без барботирования составляло $(9,2 \pm 1,1)$ мл/дм³, а после продувки кислородом или аргоном в течение 30 мин со скоростью 2 л/мин содержание кислорода изменилось до $(25,4 \pm 3,0)$ мл/дм³ и $(5,2 \pm 1,5)$ мл/дм³ соответственно. При электромагнитной обработке все образцы после насыщения газами находились в герметичной упаковке. В таблице 1 приведено содержание пероксида водорода в чистой воде и перекисных соединений в растворах ДНК, насыщенных газами, после электромагнитного воздействия.

Таблица 1 – Содержание пероксида водорода в воде и перекисных соединений в растворах ДНК с концентрацией 2,5 мкг/мл, насыщенных газами, после воздействия электромагнитным полем напряженностью (550 ± 20) А/м и разной частотой, 21 °С.

Частота, Гц	[H ₂ O ₂] в воде, нМ			Содержание перекисных соединений в растворах ДНК, нМ		
	А	O ₂	Ar	А	O ₂	Ar
0, Гц (контроль)	7,4±0,3	8,3±0,5	< ПО	70,5±9,3	118,8±9,6	44,8±3,9
5	7,8±0,3	12,4±0,9*	< ПО	140,4±8,5*	215,7±9,3*	73,5±9,6*
8	7,9±0,3	15,1±1,3*	< ПО	302,7±11,3*	329,2±15,3*	100,4±9,1*
10	< ПО*	14,1±1,6*	< ПО	105,7±7,3*	162,1±9,8*	83,1±5,8*
15	< ПО*	< ПО*	< ПО	65,5±5,5	80,2±5,9*	60,7±5,0*
20	< ПО*	15,5±0,8*	< ПО	120,0±10,3*	170,7±10,5*	80,3±10,3*
25	7,5±0,3	9,3±0,8	< ПО	122,9±9,5*	205,1±12,3*	63,1±13,7*
30	< ПО*	< ПО*	< ПО	48,6±4,9*	70,1±6,2*	39,5±4,6
40	< ПО*	< ПО*	< ПО	82,5±8,4	120,4±9,0	94,3±2,0*
50	7,6±0,3	10,0±0,9*	< ПО	141,4±10,5*	160,7±11,3*	85,7±5,1*

Примечание: * - $p < 0,05$ статистически значимые различия в сравнении с контролем, необработанными электромагнитным полем образцы, ПО - предел обнаружения методики определения содержания пероксида водорода, А - растворы без дополнительного насыщения газами, O₂ и Ar - растворы насыщали кислородом или аргоном соответственно в течение 30 мин перед электромагнитным воздействием.

Насыщение кислородом растворов ДНК увеличивало содержание пероксида водорода до $(118,8 \pm 9,6)$ нМ, еще значительно оно увеличивалось при обработке ЭМП

частотами 5 и 8 Гц. Продувка аргоном снижала уровень содержания пероксида водорода в чистой воде ниже предела обнаружения методики определения и перекисных соединений в растворах ДНК до $(44,8 \pm 0,9)$ нМ по сравнению с контрольными образцами ($p < 0,05$). Электромагнитное воздействие на растворы ДНК при всех используемых частотах поля приводило к разнонаправленному изменению содержания перекисных соединений. Таким образом, экспериментально показано, что количественное образование перекисных соединений в растворах ДНК зависит от содержания растворенного кислорода, что согласуется с уравнением (17), и частоты воздействующего поля.

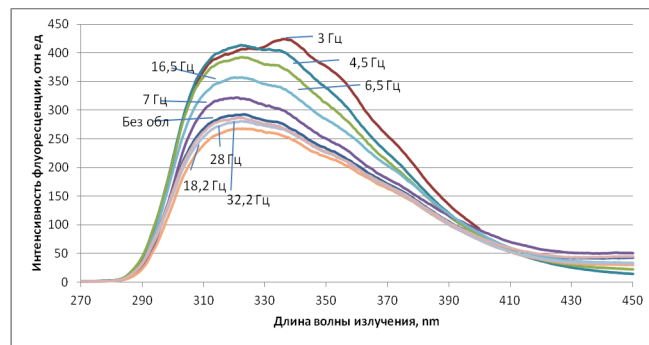
2 Чувствительность водных растворов активных фармацевтических ингредиентов и биологически активных наночастиц к электромагнитному воздействию

2.1 Конформационные изменения альбумина при действии низкочастотного электромагнитного поля.

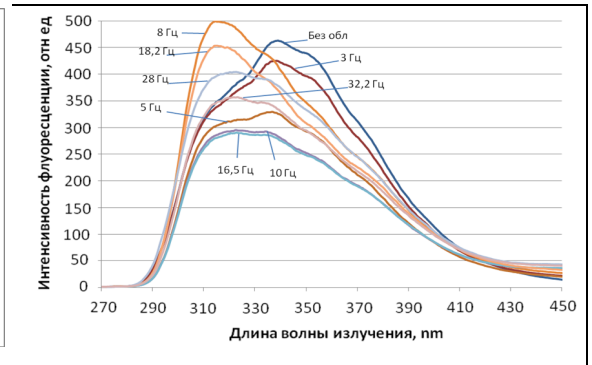
На динамику состояния человеческого сывороточного альбумина существенное влияние оказывают окружающие его молекулы воды, которые создают локальный поверхностный слой, служащий стабилизатором конформационных мод. В водных средах известно о существовании нескольких устойчивых конформеров альбумина в зависимости от pH. Исследование спектров кругового дихроизма водно-солевых растворов альбумина показало, что в УФ-области имеется два минимума в диапазоне 207 – 224 нм, что характерно для глобулярных белков с высокоупорядоченной вторичной структурой. После электромагнитного воздействия полем частотами 4 – 8 Гц наблюдалось незначительное увеличения амплитуды спектров, что указывало на некоторое изменение во взаимном расположении флуорофоров триптофона (Trp) и тирозина (Tyr). Методом флуоресцентной спектроскопии изучено влияние ЭМП с частотами от 3 до 50 Гц и напряженностью (500 ± 3) А/м на конформационные изменения альбумина в водных растворах. На рисунках 5 (а, б, в, г) приведены спектры флуоресценции растворов альбумина при разных pH после обработки ЭМП разными частотами.

Обработка растворов альбумина полем частотами от 3 до 16,5 Гц увеличивала интенсивность триптофановой флуоресценции, но положение максимума флуоресценции, которое определяется релаксационными характеристиками полярного окружения возбужденного Trp*, оставалось постоянным. При pH 4,7, близком к изоэлектрической точке, молекула альбумина находится в нативном неполяризованном состоянии. В окружении возбужденного остатка Trp* образуется стабильный цвиттер-ионный комплекс и система частично упорядоченных водородных связей. Согласно модели переходов между состояниями триптофана, использующей стабильную конфигурацию возбужденного

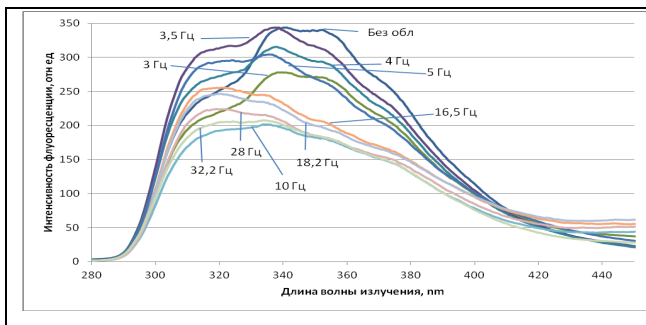
состояния с переносом заряда Trp^+R^- , дезактивация Trp^* происходит либо непосредственно в основное состояние (медленное затухание флуоресценции, время 5 нс), либо через промежуточное состояние Trp^+R^- (быстрое затухание, время 1 нс). ЭМП, действуя на спиновые и орбитальные магнитные моменты электронов, увеличивает заселенность верхних колебательных подуровней триптофана, в результате в возбужденном состоянии оказывается большее количество Trp^* , что приводит к увеличению интенсивности флуоресценции при их дезактивации. Таким образом, при pH раствора 4,7 электромагнитное воздействие не изменяет микроокружение флуорофоров и конформацию альбумина.



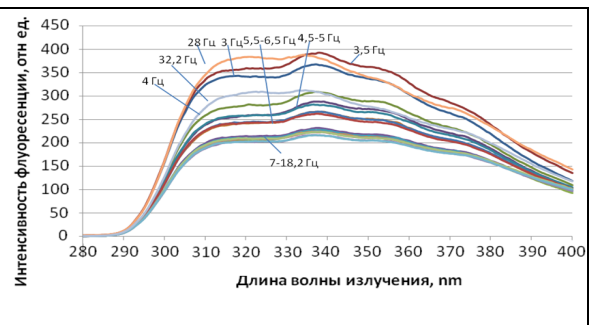
(a) pH 4,7



(б) pH 5,5



(v) pH 6,5



(г) pH 7,3

Рисунок 5 – Спектры флуоресценции водно-солевых растворов человеческого сывороточного альбумина при разном pH после электромагнитного воздействия полем напряженностью (500 ± 3) А/м разными частотами, время обработки 15 мин., 22 °С, $\lambda_{\text{возб}}$ 295 нм. *Источник: составлено автором*

Модификации во внутримолекулярной динамике альбумина, происходящие при увеличении pH растворов до 5,5, реализуются в пределах нативной структуры белка и приводят к появлению поляризованных участков. После обработки растворов альбумина полем частотами 8 и 18 Гц на спектрах флуоресценции появлялись полосы в коротковолновой области, максимумы которых соответствовали флуоресценции Туг (рис. 5 б). Появление данных полос связано с сенсibilизированным безизлучательным переносом энергии от Trp^* к Туг. Условия для миграции энергии в молекуле альбумина

благоприятны: большое перекрывание первой полосы поглощения Туг с полосой испускания Тгр* и высокий выход его флуоресценции. Размеры молекулы альбумина, составляющие около $80 \times 80 \times 30$ Å, соответствуют небольшим расстояниям переноса энергии по механизму обменного процесса, расчетные значения которого лежат в диапазоне 10–15 Å. При других частотах поля максимумы спектра флуоресценции альбумина составляли (325 ± 2) нм, их положение не изменялось с изменением частоты поля, а интенсивность флуоресценции снижалась. Это обусловлено динамическим неадиабатическим тушением флуоресценции в результате взаимодействия возбужденного Тгр* с молекулами тушителя (воды).

При рН 6,5 без электромагнитного воздействия наблюдалось тушение флуоресценции растворов альбумина и появление более длинноволновой флуоресценции акцептора (рисунок 5в). Это характерно для индуктивно-резонансного фёрстеровского переноса энергии от донора к акцептору. Рассчитанный фёрстеровский радиус для переноса Тгр – Туг составляет 50 Å. Электромагнитное воздействие приводило к смещению максимума в коротковолновую область и одновременному тушению флуоресценции, что свидетельствовало об увеличении подвижности микроокружения аминокислотных остатков флуорофоров в альбумине и усилении процессов тушения за счет изменений в третичной структуре белка. Повышение рН растворов вызывало увеличение полярности молекул альбумина, изменение энергии и частичную разупорядочность системы водородных связей, связанную с депротонированием карбоксильных групп аминокислотных остатков. После электромагнитного воздействия на спектрах флуоресценции наблюдали три уширенные полосы, интенсивность флуоресценции уменьшалась (рисунок 5 г).

В основе аллостерических свойств альбумина лежит структурная организация глобулярных доменов, которая определяется состоянием динамической гидратной оболочки. В отличие от более стабильного домена I домен II, в котором находится Тгр, менее стабилен. ЭМП влияет на спиновые состояния протонов молекул воды и перестройку водородных связей гидратной оболочки альбумина, что приводит к обратимому разворачиванию домена II при рН растворов, отличных от изоэлектрической точки.

На рисунках 6 (а, б) приведены спектры флуоресценции водно-солевых смесей природных белков плазмы крови при рН 7,3. Электромагнитное воздействие изменяло вид спектров флуоресценции смесей белков в интервале длин волн от 330 до 380 нм. Значительное увеличение интенсивности флуоресценции свидетельствовало об изменении состояния основных флуорофоров в белках плазмы, в основном, в альбумине, который вносит наибольший вклад в флуоресценцию при длине волны возбуждения 295 нм.

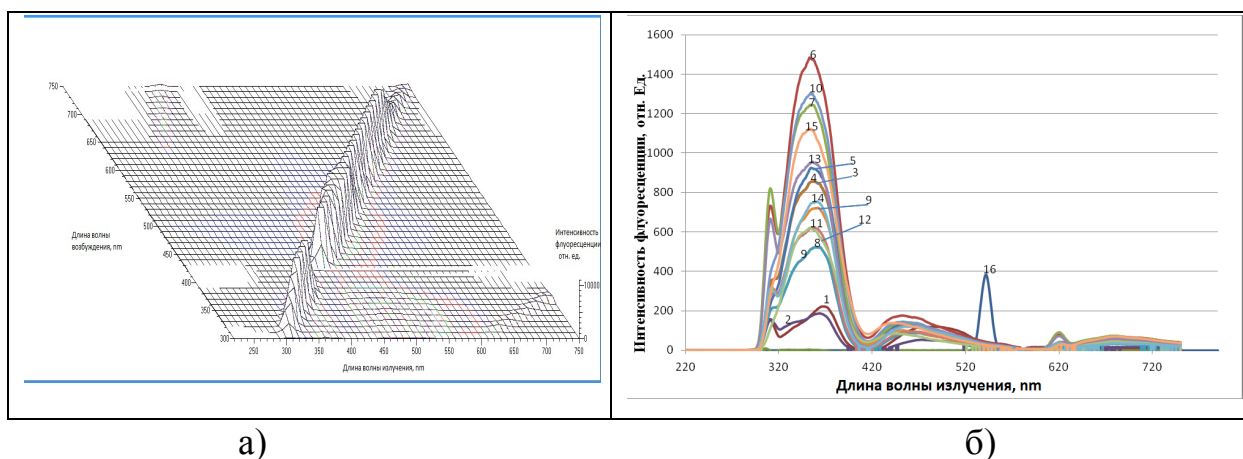


Рисунок 6 – 3-D спектр зависимости флуоресценции 2 % водно-солевых растворов плазмы крови от длины волны возбуждения (а) и спектры флуоресценции 2 % водно-солевых растворов плазмы крови после обработки ЭМП напряженностью (500 ± 3) А/м с разной частотой, Гц: 3 (1), 3,5 (2), 4 (3), 4,5 (4), 5 (5), 5,5 (6), 6 (7), 6,5 (8), 7 (9), 7,5 (10), 8 (11), 8,5 (12), 9 (13), 9,5 (14), 10 (15), без обработки ЭМП (16). Время обработки 15 мин., $\lambda_{\text{возб}}$ 295 нм, 22 °С (б).

Источник: составлено автором

Таким образом, изменение конформации альбумина, индуцированное электромагнитным воздействием, локализуется в основном в третичной структуре и сопровождается увеличением доступности нуклеофильных центров, что изменяет его фармакокинетику и облегчает обратимое связывание лигандов различного химического строения с молекулой альбумина.

2.2 Образование оболочки из активных фармацевтических ингредиентов на поверхности наночастиц серебра под влиянием электромагнитного поля.

Цитотоксичность AgNPs связана с неконтролируемой диффузией ионов серебра с поверхности частицы с образованием оксидов. АФИ, адсорбирующиеся на AgNPs, изменяют поверхностные свойства наночастиц. С помощью рентгенофлуоресцентного анализа обнаружено, что при формировании на поверхности AgNPs оболочки из молекул альбумина происходит взаимодействие высвобождающихся ионов серебра с цистеиновыми остатками белка с образованием сульфида серебра, который остается внутри оболочки. Спектры флуоресценции взвесей AgNPs в присутствии альбумина имели выраженный пик почти гауссовой формы в области длин волн от 300 до 400 нм (рисунок 7). Наличие данного пика объясняется резонансным рассеянием света на наночастице. Добавление во взвесь AgNPs эквимольных количеств альбумина приводило к значительному увеличению интенсивности флуоресценции с 450 отн. ед. до 3900 отн. ед.

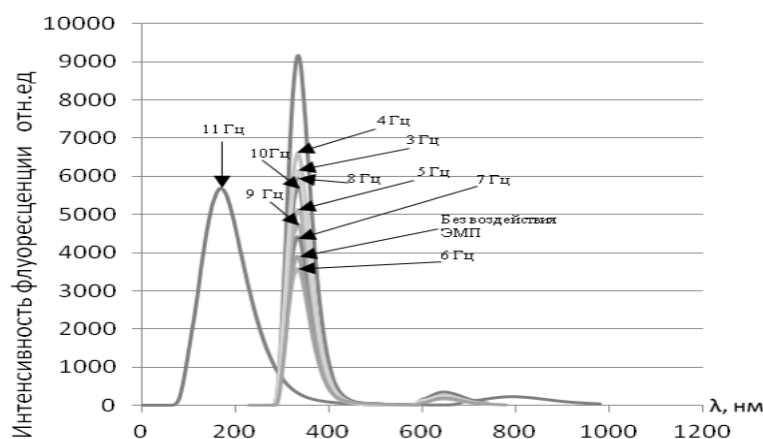


Рисунок 7 – Спектры флуоресценции взвесей наночастиц серебра диаметром (12 ± 2) нм с концентрацией $0,33$ мг/л в присутствии сывороточного альбумина (1 мкМ) при pH $7,0$ после воздействия ЭМП напряженностью (500 ± 3) А/м разной частоты в течение 10 мин, при $\lambda_{\text{возб.}}$ 290 нм. *Источник: составлено автором*

На рисунке 8 приведены зависимости интенсивности флуоресценции при $\lambda_{\text{исп.}}$ 354 нм взвесей AgNPs, растворов альбумина, а также взвесей AgNPs в присутствии альбумина от частоты воздействующего ЭМП.

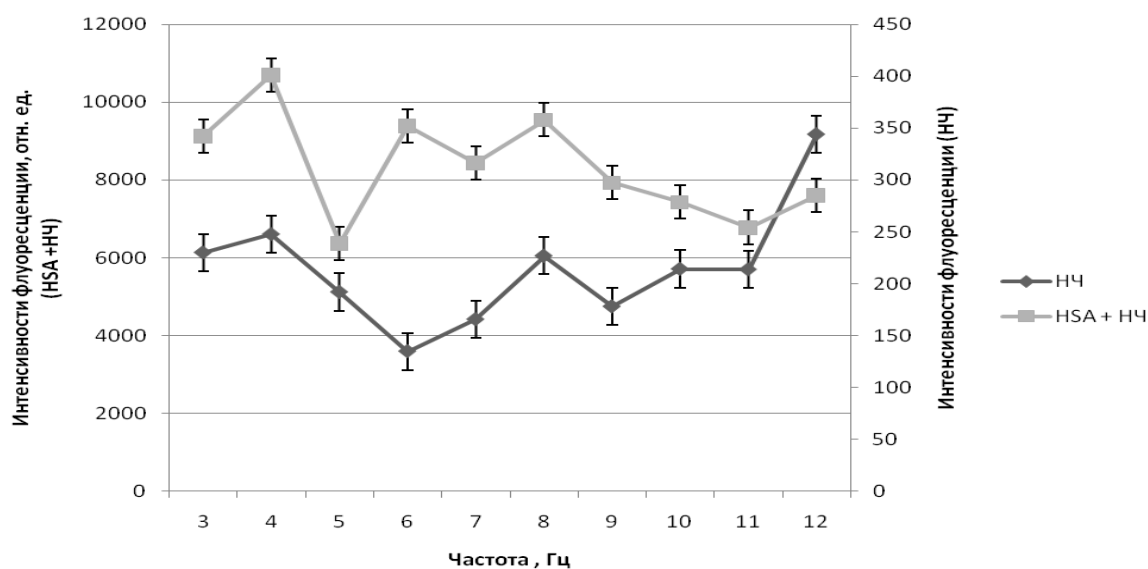


Рисунок 8 – Зависимости интенсивности флуоресценции взвесей наночастиц серебра диаметром (12 ± 2) нм с концентрацией $0,33$ мг/л – правая шкала (темные точки) и взвесей наночастиц серебра в присутствии альбумина (1 мкМ) – левая шкала (серые точки) при pH $7,0$ после воздействия ЭМП напряженностью (500 ± 3) А/м различной частоты. Время экспозиции 10 мин, $\lambda_{\text{возб.}}$ 290 нм, $\lambda_{\text{исп.}}$ 354 нм, 22 °С.

Источник: составлено автором

При взаимодействии электронных уровней AgNPs с молекулой адсорбированного альбумина по диполь-дипольному механизму образуется система связанных резонаторов и

облегчается процесс перехода между возбужденным и основным состояниями флуоресцирующей молекулы, а также сокращается время жизни возбужденного состояния. Электромагнитное воздействие на ассоциаты приводит к увеличению интенсивности флуоресценции и обусловлено индуктивно-резонансным переносом энергии молекул альбумина на плазмонные колебания AgNPs.

Для подтверждения высказанной гипотезы проведен теоретический анализ процесса резонансного рассеяния на сферической наночастице серебра заданного размера. В отличие от теории Ми анализ опирался на разложение падающей плоской электромагнитной волны по сферическим волнам для всех мультипольностей $l \geq 1$.

Получена следующая формула для сечения рассеяния электромагнитной волны на сферической наночастице радиуса r

$$\frac{\sigma}{\pi r^2} = 2 \sum_{l=1}^{\infty} \left(\frac{2l+1}{l(l+1)} \right)^2 \frac{2l+1}{3l+2} \operatorname{Im} \left(\frac{l(\varepsilon_m - \varepsilon_r)}{l\varepsilon_m + (l+1)\varepsilon_r} \right) \quad (26),$$

где ε_r – комплексная диэлектрическая проницаемость материала наночастицы (в нашем случае серебра), ε_m – диэлектрическая проницаемость окружающей среды, и символом Im обозначено взятие мнимой части. При $l = 1$ уравнение (26) переходит в соответствующую формулу теории Ми.

Вклад квадруполь в спектр флуоресценции становится заметным, когда размер наночастиц превышает 50 нм. В растворах альбумина с AgNPs, имеющими размеры до 90 нм, наблюдали сдвиги максимумов полосы поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Влияние размеров AgNPs на положение и ширину ППР связано в том числе и с тем, что диэлектрическая проницаемость AgNPs зависит от размера частиц (*Wei L., et al., 2015*). Рассчитали резонансную длину волны возрастания интенсивности флуоресценции для AgNPs диаметром 12 нм, окруженную оболочкой из альбумина, которая оказалась равной (354 ± 2) нм, что хорошо согласуется с экспериментом. Расчеты, проведенные для пары альбумин + AgNPs показали, что возрастание сечения рассеяния света происходит при образовании ассоциатов, в состав которых входит до 20 молекул альбумина, связанных с наночастицей. Сенсibilизация люминесценции наночастиц серебра приводит к увеличению интенсивности свечения более, чем в 20 раз, следовательно, сечение поглощения молекул альбумина превышает сечение поглощения на AgNPs более, чем в 20 раз. Таким образом, добротность системы составляет около 20, при этом часть энергии электронного возбуждения молекул альбумина теряется при внутрицентральной релаксации.

2.3 Сенсibilизированная генерация активных форм кислорода в водно-солевых растворах, инициируемая действием СВЧ и КВЧ ЭМП.

Эффекты неионизирующего микроволнового излучения, при которых интегральный нагрев облучаемой поверхности не превосходит физиологически значимого приращения температуры, равного $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, относят к нетепловым. Расчеты показали, что за 60 сек воздействия СВЧ ЭМП частотой 3 ГГц и плотностью мощности (ПМ) 6 мВт/см^2 температура водного раствора увеличивается на $0,02\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Исследована генерация АФК, инициируемая действием СВЧ ЭМП частотой 3 ГГц на водные растворы, содержащие ионы железа Fe^{2+} . На спектрах флуоресценции, помимо спектра светорассеяния в области $(340\pm 5)\text{ нм}$, отмечали наличие полос флуоресценции в диапазонах от 430 до 530 нм и от 620 до 660 нм (рисунок 9 а).

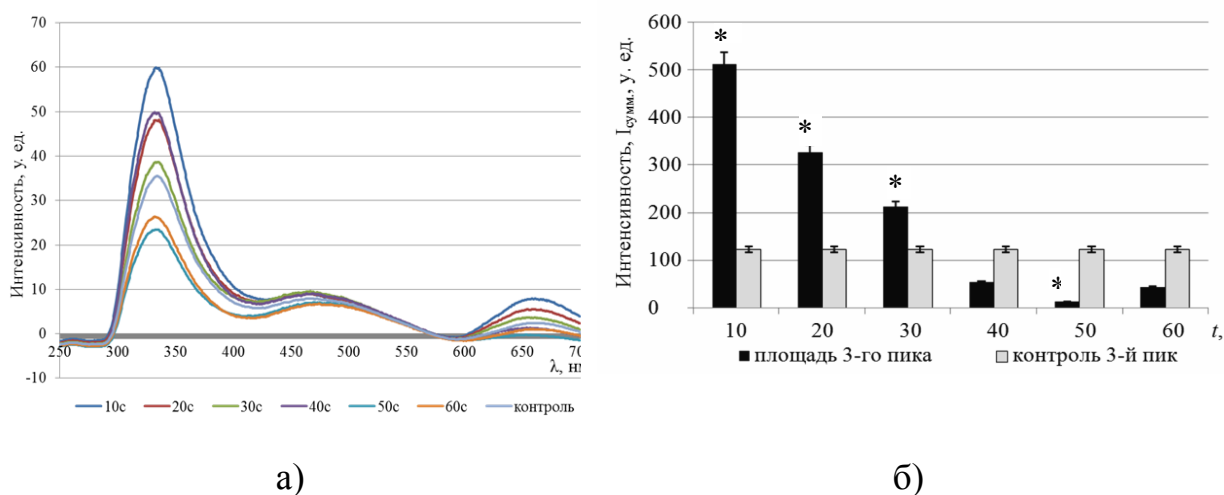


Рисунок 9 – Спектры флуоресценции водных растворов сульфата железа (II) с концентрацией $1 \cdot 10^{-6}\text{ М}$, полученные после обработки СВЧ ЭМП частотой 3 ГГц и ПМ 6 мВт/см^2 при разном времени воздействия, $\lambda_{\text{возб}} 260\text{ нм}$ (контроль – растворы без облучения) (а) и площади под кривой спектров флуоресценции в области от 620 до 660 нм, полученные до – контроль (светлые столбики) и после обработки указанных растворов (темные столбики) СВЧ ЭМП, (б). Примечание: * - статистически значимые различия при $p < 0,05$.

Источник: составлено автором

Для уточнения природы этих полос в растворы добавляли пероксид водорода, что приводило к исчезновению спектра светорассеяния и появлению уширенной полосы флуоресценции в области от 400 до 600 нм. Это отражает процесс разложения пероксида водорода с образованием гидроксильных радикалов $\cdot\text{OH}$ по реакции Фентона, катализируемый катионами железа. С увеличением времени облучения в диапазоне от 620 до 660 нм на спектрах наблюдали увеличение интенсивности флуоресценции растворов, содержащих ионы железа, по сравнению со спектрами, полученными для контроля (рисунок 9 б). Появление пика в данной области указывает на переходы в столкновительных комплексах (димольх) кислорода и протекание синглет-кислородных

реакций с образованием в растворах некоторого количества кислорода в синглетном состоянии, поскольку молекулы синглетного кислорода при повышенных концентрациях образуют возбужденные димеры ($^1\text{O}_2$)₂, которые переходят в основное состояние с испусканием света в видимом диапазоне при 634 нм (Krasnovsky A.A., et al., 2017).

3 Действие электромагнитного поля и воды, обедненной дейтерием, на клетки

3.1 Структурные повреждения геномного материала при действии СВЧ и КВЧ ЭМП на иммунокомпетентные клетки *in vitro*.

Для исследования действия СВЧ и КВЧ ЭМП на живые клетки были выбраны частоты ЭМП, применяемые в системах мобильной связи, и наиболее часто рекомендуемые в профильных медицинских методичках параметры воздействия (Москвин С.Д., et al., 2016, Origlia C., et al., 2024). Рассмотрено влияние СВЧ и КВЧ ЭМП разными частотами и ПМ 6 мВт/см² на появление окислительных повреждений (8-oxodG) и однонитевых разрывов (ОР) ДНК после облучения взвесей лимфоцитов в течение 60 с. Первоначальное содержание окисленных сайтов 8-oxodG составляло (4,1±0,9) нг/мл. После обработки взвесей лимфоцитов ЭМП частотой 3 ГГц содержание 8-oxodG достоверно увеличилось до (10,5±1,6) нг/мл, а частотой 50 ГГц до (12,4±1,1) нг/мл по сравнению с необлученными образцами ($p < 0,05$). С увеличением частоты излучения увеличивалось и процентное содержание ОР по сравнению с исходными уровнями в необлученных образцах ($p < 0,05$): при воздействии излучения с частотой 3 ГГц на (29,3±0,9) %, с частотой 50 ГГц на (38,1±1,1) %, с частотой 70 ГГц на (47,1±0,9) %. Результаты определения содержания ОР ДНК приведены на рисунке 10.

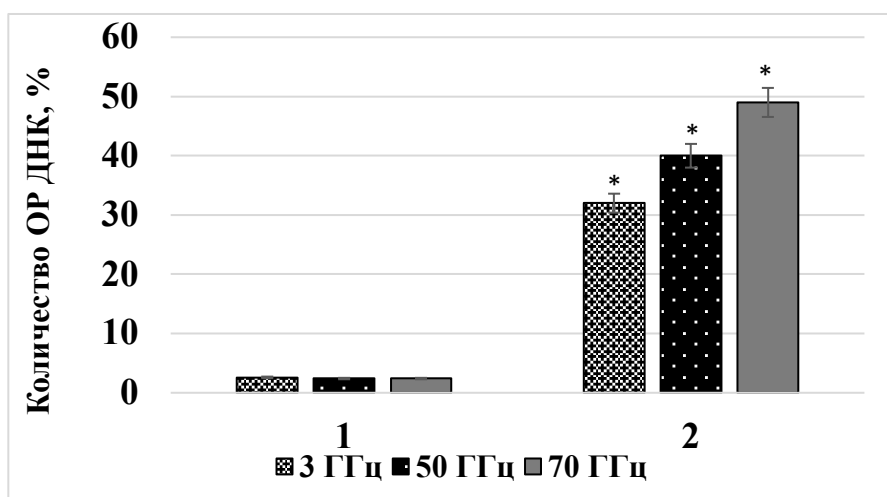


Рисунок 10 – Содержание ОР ДНК после воздействия ЭМП с частотами 3 ГГц, 50 ГГц и 70 ГГц и ПМ 6 мВт/см² в течение 60 сек на взвеси лимфоцитов.

Примечание: * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

Источник: составлено автором

Нетепловой эффект СВЧ и КВЧ ЭМП связан с тем, что часть поглощенной водой энергии излучения расходуется на образование высокоактивных радикалов и перекисных соединений в водной среде. Несмотря на то, что порог ионизации ДНК составляет несколько десятков эВ, разрыв нитей может идти эффективно и ниже порога ионизации, а сам механизм, с помощью которого низкоэнергетическая частица порождает такие разрывы, включает в себя короткоживущие промежуточные состояния, связанные с образованием АФК в водной среде.

Теоретически изучено влияние СВЧ ЭМП при частотах 0,4 – 50 ГГц на динамику молекулы ДНК и показано, что под действием внешней периодической силы в ДНК возникают колебания с характерной частотой, отличающейся от частоты внешнего воздействия, которые увеличивают вероятность появления в молекуле ДНК участков с разъединенными водородными связями между азотистыми основаниями. Это способствует доступности азотистых оснований для АФК. Образованию ОР под действием СВЧ ЭМП предшествует увеличение числа окисленных сайтов в молекуле ДНК, обусловленное селективным окислением dG-оснований синглетным кислородом. Энергия связи АТ-пары составляет 12,97 ккал/моль, а GC-пары 20,95 ккал/моль. Появление 8-oxodG уменьшает энергию водородных связей в паре 8-oxodGC и упорядоченность укладки азотистых оснований в двухцепочной молекуле ДНК, что способствует последующему структурному изменению последней. Кроме того, появление большого количества 8-oxodG и увеличение нагрузки на систему эксцизионной репарации, приводит к накоплению ОР ДНК, которые остаются после удаления окисленных сайтов гликозилазами.

3.2 Сочетанное действие воды, обедненной дейтерием *ddw* (*deuterium depleted water*), и СВЧ и КВЧ ЭМП на иммунокомпетентные клетки *in vitro*.

Состояние $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) имеет энергию активации 0,98 эВ, его время жизни составляет 3,1 μs в обычной воде и 68 μs в тяжелой воде (Krasnovsky A.A., et al., 2017). Мы предположили, что уменьшение времени жизни синглетного кислорода $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) в *ddw* может снизить генерацию АФК, которые повреждают молекулу ДНК. Лимфоциты инкубировали в физрастворах, приготовленных на воде с природным содержанием дейтерия (150 ppm) и на воде с пониженным относительно природного содержанием дейтерия (40 ppm). Через 16 часов инкубации определяли содержание ОР. Уровень содержания ОР ДНК лимфоцитов увеличивался незначительно, на $(2,5 \pm 0,2) \%$ ($p < 0,05$) от первоначального содержания до инкубирования (рисунок 11, столбцы 1).

На лимфоциты, инкубированные в средах с разным содержанием дейтерия, воздействовали ЭМП с частотами 3 ГГц или 50 ГГц. После инкубации в обычной воде количество ОР ДНК, которые обрабатывали ЭМП частотой 3 ГГц, увеличилось по

сравнению с контрольными образцами на $(21,3 \pm 3,1) \%$ (рисунок 11, столбцы 2), а частотой 50 ГГц на $(60,7 \pm 5,2) \%$ (рисунок 11, столбцы 3) ($p < 0,05$). В воде с пониженным содержанием дейтерия этот показатель был ниже – $(3,5 \pm 1,1) \%$ и $(38,1 \pm 2,3) \%$ соответственно ($p < 0,05$).

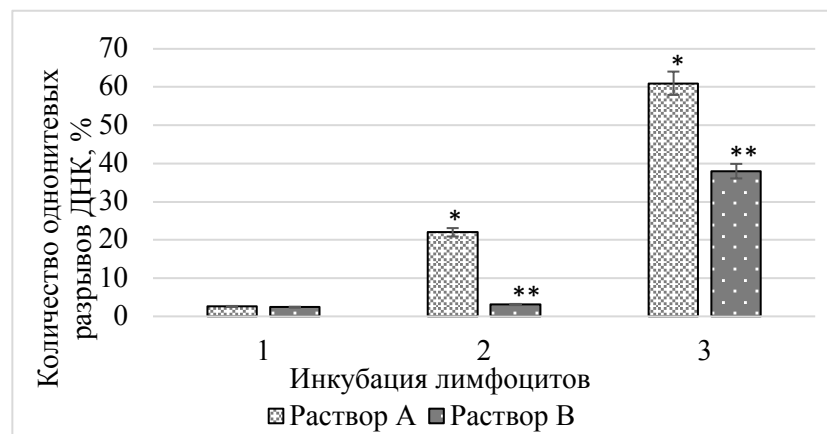


Рисунок 11 – Содержание одностранных разрывов ДНК лимфоцитов, инкубированных в средах с разным содержанием дейтерия, после воздействия на лимфоциты СВЧ и КВЧ ЭМП.

Примечание: * - $p < 0,05$ в сравнении с необработанными СВЧ и КВЧ ЭМП взвесями лимфоцитов в среде с концентрацией дейтерия 150 ppm; ** - $p < 0,05$ в сравнении с необработанными взвесями лимфоцитов в среде с концентрацией дейтерия 40 ppm. Количество ОР изучено при инкубации в растворах с содержанием дейтерия 150 ppm (А) и 40 ppm (В): исходной взвеси лимфоцитов (1), после воздействия на лимфоциты СВЧ и КВЧ ЭМП с ПМ 6 мВт/см² частотой 3 ГГц (2) и частотой 50 ГГц (3) в течение 60 сек. Время инкубации 16 часов.

Источник: составлено автором

Уменьшение генерирования АФК, связанное с сокращением времени жизни синглетного кислорода в такой воде, снижает их повреждающего действия на молекулу ДНК. Кроме того, вследствие КИЭ происходит повышение функциональной активности клеток за счет активации антиоксидантных ферментов Nrf2/ARE-пути, ответственных за восстановление ОР и окисленных оснований. Воду, обедненную дейтерием, использовали в протоколах децеллюризации в тканевой инженерии с целью предотвращения неконтролируемой гибели клеток и при создании биосорбента на основе природных АФИ.

3.3 Возможности методики количественного определения содержания дейтерия методом ЯМР спектроскопии для контроля качества воды, водных растворов АФИ и биологических объектов.

Составлен комплекс правил и требований при проведении измерений и проведена оценка погрешностей измерений методики измерения содержания дейтерия в воде методом ядерного магнитного резонанса на приборе JEOL Delta ECA 400 с использованием зонда 40TH5AT/FG2. В качестве лантаноидного сдвигающего реагента (ЛСР) применяли $(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3\text{Eu}$ - соединение с парамагнитным в возбужденном состоянии ионом Eu^{3+} , создающим локальное магнитное поле в месте нахождения ядра, резонанс которого

наблюдали. Использование лиганда трифторметансульфоната связано с проявлением им свойств кислоты Льюиса и способностью образовывать аддукты с субстратами, содержащими атомы с не поделёнными парами электронов. На ЯМР-спектрах наблюдали два сигнала – от дейтерия воды с растворённым в ней ЛСР, которая находилась во внутреннем стандарте, и от дейтерия исследуемого образца, находящегося во внешней ампуле. Величину относительного химического сдвига (δ), обусловленного окружением ядра в аддукте и возникающего из-за экранирования постоянного магнитного поля на ядре электронами, участвующими в химической связи, определяли согласно ОФС. 1.2.1.1.0007 «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса». Для количественного определения дейтерия использовали калибровочные образцы воды (с содержанием примесей не более 0.01 % по массе) с известным содержанием дейтерия, стандартизированные в соответствии с международным стандартом МАГАТЭ VSMOW – 155 ppm и SLAP – 89 ppm. Используя калибровочную зависимость $y = kx + b$, где y – интегральная интенсивность (ИИ), (площадь под кривой сигнала ЯМР); x – содержание дейтерия в ppm; k , b – коэффициенты линейной аппроксимации, коэффициент корреляции $R^2=0.9995$, определяли содержание дейтерия в измеряемых образцах.

Специфичность (specificity) методики определяли по соответствию изотопных соотношений $^2\text{H}/^1\text{H}$ в разных объектах исследования и внутрилабораторного стандартного образца в идентичных условиях на одном и том же приборе. Результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты расчета относительного стандартного отклонения изотопного соотношения $^2\text{H}/^1\text{H}$ в объектах исследования и внутрилабораторном стандарте ($n=3$).

Объект исследования	Изотопное соотношение $^2\text{H}/^1\text{H}$, ppm			Среднее значение изотопного соотношения $^2\text{H}/^1\text{H}$, ppm	RSD, %
Минеральная вода «Ессентуки 17»	152,2	154,0	156,3	154,2	1,1
Вода, полученная на электролизной установке КубГУ	38,5	40,6	41,1	40,1	1,4
Вода с пониженным содержанием дейтерия «Лангвей»	42,1	44,5	46,7	44,4	1,1
Минеральная вода «Aqua minerale»	146	148,5	150	148,2	1,5
Вода из ручья, вытекающего из урановой штольни №5 возле ст. Даховская Краснодарского края	157	160	163	160	1,6
Внутрилабораторный стандарт $^2\text{H}/^1\text{H}$	59,0	58,3	58,1	58,5	0,5

Относительное стандартное отклонение (RSD) отдельного результата не превышало 2,0%. В образцах воды с пониженным содержанием дейтерия, которые были получены в

НОЦ ЦКП «ПРИМА» РУДН им. Патриса Лумумбы, определили содержание дейтерия с помощью методики с использованием ЛСР и с применением независимого метода масс-спектрометрии изотопных отношений (IRMS) на изотопном масс-спектрометре Delta 5 Advantage (ИМБП РАН) (таблица 3). Сравнение результатов, полученных разными методами, подтвердило специфичность определения содержания дейтерия в воде с помощью разработанной методики.

Таблица 3 – Результаты определения изотопного соотношения $^2\text{H}/^1\text{H}$ в образцах воды с пониженным содержанием дейтерия, $P=0,95$; $n=5$; $t(P=0,95, f=8)$ 2,31.

Объект анализа	Методика с использованием ЛСР (I)		IRMS * (II)		Сравнение результатов (I и II) t-критерий, расч.
	$(x \pm \Delta x)$, ppm	ε , %	$(x \pm \Delta x)$, ppm	ε , %	
Образец 1	$9,0 \pm 0,9$	10	$10,0 \pm 0,2$	2	0,75
Образец 2	$40,3 \pm 0,9$	2,2	$40,0 \pm 0,3$	0,8	0,39
Образец 3	$51,1 \pm 1,0$	2,0	$51,0 \pm 0,3$	0,5	0,31

IRMS * - масс-спектрометрия изотопных отношений

Минимальная концентрация дейтерия в водном образце (предел количественного определения, quantitation limit), при которой величина отношения аналитического сигнала к уровню шума достигала около 10:1, составляла 30 ppm. Диапазон определяемых концентраций дейтерия составил от 30 до 300 ppm.

Проведена валидация методики по показателю повторяемость согласно ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» При определении повторяемости проводили измерения изотопного соотношения $^2\text{H}/^1\text{H}$ (x) в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории (один и тот же исполнитель, одно и то же оборудование, один и тот же набор реактивов) в пределах короткого промежутка времени. Последовательность обработки результатов прямых измерений в условиях повторяемости и воспроизводимости состояла в вычисление значений стандартного отклонения ($x \pm SD$), относительного доверительного интервала среднего значения ($x \pm \Delta x$) и относительной ошибки среднего (ε , %), полученные результаты приведены в таблице 4.

Физико-химические свойства водных растворов зависят от свойств растворенных ионов (заряда, ионного радиуса, электронного строения и др.). Ионы в водной матрице могут изменять степень её упорядоченности, что влияет на структуру и параметры ЯМР-сигнала. В нашей методике используется $(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3\text{Eu}$, образующий аддукт с дейтерием, в концентрации (6 г/дм^3), соизмеримой с показателями общей минерализации для столовых и лечебно-столовых вод согласно ГОСТ Р 54316-2020. Это позволяет использовать методику для определения содержания дейтерия в минеральных и природных водах.

Таблица 4 – Экспериментальные данные, полученные при оценке повторяемости методики.

x , ppm	Δx , ppm	$(x \pm \Delta x)$, ppm $t_{p,f} = 2,78$ при $P=0,95$, $n=5$, $f=4$	ε , %
Вода с содержанием дейтерия 163 ppm			
163,5	2,4	$163,5 \pm 2,4$	1,5
Вода с содержанием дейтерия 144 ppm			
144,2	2,1	$144,2 \pm 2,1$	1,4
Вода с содержанием дейтерия 40 ppm			
40,1	0,9	$40,1 \pm 0,9$	2,2

На основе результатов исследований разработан проект ОФС «Определение дейтерия в водных растворах методом ЯМР».

Рассмотрена возможность применения метода количественной ЯМР спектроскопии $^2\text{H}/^1\text{H}$ для решения задач эколого-фармацевтического мониторинга, в частности, для определения содержания дейтерия в плазме крови крыс после длительного употребления ими воды, обедненной дейтерием. Результаты, приведенные в таблице 5, использовали для сравнительной оценки содержания дейтерия в плазме крови крыс разных групп.

Таблица 5 – Результаты определения изотопного соотношения $^2\text{H}/^1\text{H}$ в плазме крови крыс исследуемых групп с использованием разных методик ЯМР-спектроскопии, $P=0,95$.

Объект анализа	Методика с использованием ЛСР		Методика сравнения *	
	$(x \pm \Delta x)$, ppm	ε , %	$(x \pm \Delta x)$, ppm	ε , %
Группа 1 (n=40)	$152,3 \pm 2,1$	1,4	$151,3 \pm 3,8$	2,5
Группа 2 (n=40)	$157,5 \pm 2,6$	1,7	$155,3 \pm 3,1$	2,0
Группа 3 (n=40)	$99,1 \pm 2,3$	2,3	$101,7 \pm 3,0$	2,9

Примечание: * - согласно ФР.1.31.1999.00073 «Методика выполнения измерений содержания дейтерия в воде, водно-органических и органических растворах методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса».

Полученные разными методиками ЯМР-спектроскопии результаты содержания дейтерия в плазме крови следует отнести, на наш взгляд, к оценочным, поскольку вопрос о влиянии на ЯМР-сигнал дейтерия органических веществ (белков, липидов, углеводов и др.), находящихся в плазме, которые могут вносить существенные изменения в ЯМР-спектры, требует отдельного изучения. Удаление органических веществ из биологических образцов в ходе предварительной пробоподготовки с использованием минеральных кислот будет вносить дополнительное количество дейтерия в образцы с реагентами и приводить к завышению конечных результатов определения дейтерия. Использование твердофазной экстракции также не принесет желаемого результата, поскольку вместе с органическими веществами будет адсорбироваться дейтерий, включенный в состав этих веществ, что

приведет к занижению результатов. Пробоподготовка биологических образцов или учет влияния водной матрицы на ЯМР-сигнал является предметом дальнейших исследований. Таким образом, для биологических сред и растворов, содержащих АФИ, методика измерения содержания дейтерия с помощью ЯМР спектроскопии являются полуколичественной, поскольку не позволяет учесть или свести к минимуму влияние на ЯМР-сигнал органических веществ, растворенных в водной матрице. В этом случае границы ее применения устанавливаются с учётом факторов, связанных с требованиями к точности, типом задачи и области использования. Преимуществом разработанной методики является сравнительная дешевизна (по сравнению с IRMS) и экспрессность, поэтому она подходит для ситуаций, когда достаточно установить приблизительные значения содержания дейтерия, а не получить высокоточные данные, а также для сравнения содержания дейтерия в биообразцах в ходе биологических экспериментов и массового экспресс-анализа проб.

3.4 Изменение продукции межклеточных медиаторов при воздействии низкочастотного ЭМП *in vitro* на иммунокомпетентные клетки.

Клетки иммунной системы работают в согласованном между собой взаимодействии, которое осуществляется регуляторами иммунных реакций – цитокинами. С помощью физико-химической модели определили, что при частотах поля от 7 до 9 Гц в водной среде образуется повышенное содержание пероксида водорода, что может влиять на выработку межклеточных медиаторов – провоспалительных цитокинов. Содержание провоспалительных сывороточных цитокинов до и после электромагнитного воздействия полем в диапазоне частот от 7 до 9 Гц в течение 15 мин на биопробы доноров с разным полиморфизмом гена 8-oxoguanin DNA glycosylase hOGG1 (1 и 2 группа) приведены на рисунках 12 – 14. Концентрация интерлейкина-1 в интактных образцах находилась в границах нормы (на рисунке 12 обозначена горизонтальной линией). Изменение частоты поля оказывало, скорее супрессивный эффект на выработку этого цитокина у доноров 1 группы, а действие полем частотами 8,2 и 9 Гц приводило к достоверному увеличению его концентрации ($p < 0,05$) у доноров 2 группы. Нормой для интерлейкина-6 является диапазон 0–300 пг/мл. Полученные значения его концентрации в группе 1 ($6,6 \pm 4,9$) пг/мл находились в пределах данных значений как в интактных пробах, так и после воздействия ЭМП разной частоты. Выявлена гиперпродукция интерлейкина-6 у доноров 2 группы, содержание этого цитокина было увеличено до ($666,1 \pm 10,0$) пг/мл ($p < 0,05$). Действие ЭМП частотами от 7 до 7,8 Гц и от 8,6 до 9 Гц на образцы приводило к регрессии выработки интерлейкина-6 до уровня нормы.

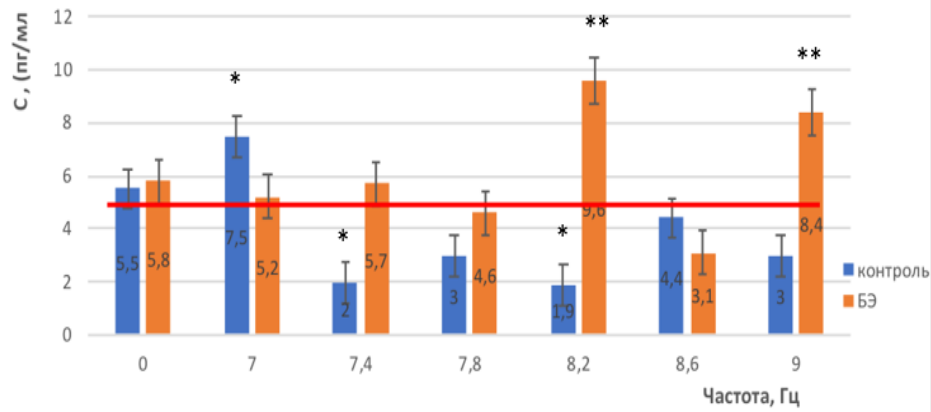


Рисунок 12 – Содержание интерлейкина-1 (C) в биопробах доноров 1 группы (синие столбики) и 2 группы (красные столбики) после воздействия ЭМП разными частотами на биообразцы. Напряженность поля (550 ± 20) А/м, время экспозиции 15 мин.

Данные представлены: * - $p < 0,05$ в сравнении с контролем (на графике обозначено 0 Гц) – необработанными ЭМП образцами крови доноров 1 группы; ** - $p < 0,05$ в сравнении с контролем – необработанными ЭМП образцами крови доноров 2 группы.

Источник: составлено автором

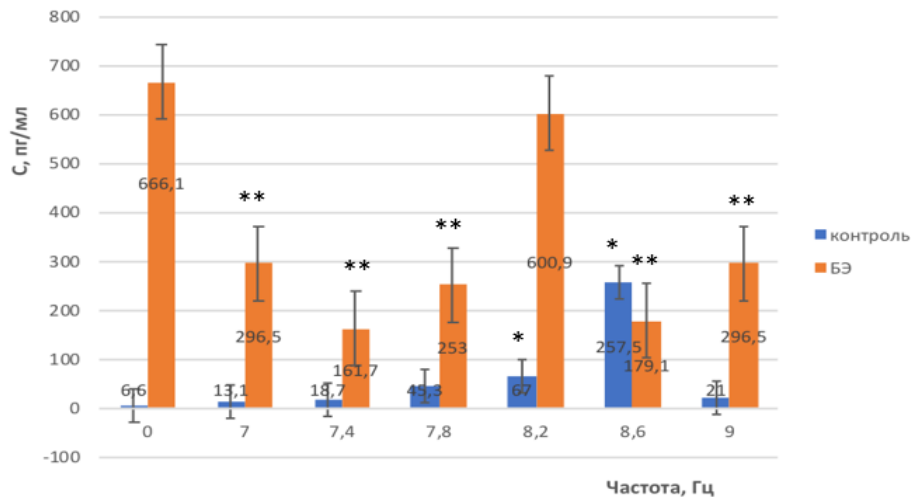


Рисунок 13 – Содержание интерлейкина-6 (C) в биопробах 1 группы (синие столбики) и 2 группы (красные столбики) доноров после воздействия ЭМП разными частотами на биообразцы. Напряженность поля (550 ± 20) А/м, время экспозиции 15 мин.

Данные представлены: * - $p < 0,05$ в сравнении с контролем (на графике обозначено 0 Гц) – необработанными ЭМП образцами доноров 1-й группы; ** - $p < 0,05$ в сравнении с контролем - необработанными ЭМП образцами доноров 2 группы.

Источник: составлено автором

Норма для фактора некроза опухолей находится в пределах от 0 до 12 пг/мл. Исходные содержания фактора некроза опухолей в нативных образцах обеих групп оставались в пределах нормы: ($5,20 \pm 0,51$) нг/мл у доноров 1 группы и ($4,30 \pm 0,18$) нг/мл у доноров 2-й группы.

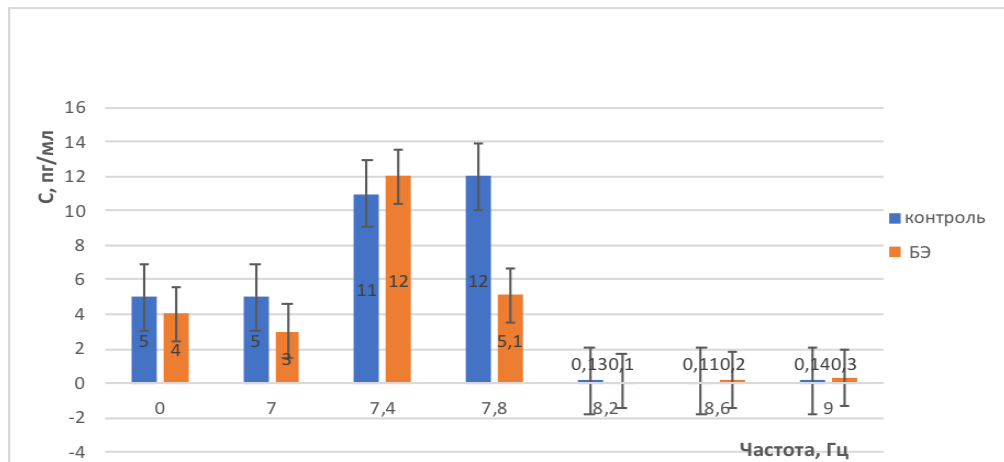


Рисунок 14 – Содержание фактора некроза опухоли в биопробах 1 группы (синие столбики) и 2 группы (красные столбик) доноров после воздействия ЭМП разными частотами на биообразцы. Напряженность поля (550 ± 20) А/м, время экспозиции 15 мин.

Источник: составлено автором

Электромагнитное воздействие влияет на процессы переноса электронов электрон-переносящими комплексами и на образование АФК в клетках и внеклеточном пространстве. Механизмы, связанные с окислительно-восстановительными процессами, модулируют метаболическое перепрограммирование иммунных клеток и продукцию синтезируемых ими медиаторов. Таким образом, иммунная система проявляет высокую восприимчивость к электромагнитному воздействию в отношении профиля провоспалительных цитокинов, что может быть использовано для положительного влияния на определенные аспекты иммунного ответа для терапевтических применений.

4 Практическое применение модели образования активных форм кислорода в водных растворах АФИ при электромагнитном воздействии на живые организмы

4.1 Чувствительность геномного материала к электромагнитному воздействию.

Повышение уровней содержания окисленных сайтов 8-oxodG связывают с мутагенезом и старением. Среди гликозилаз, удаляющих данное поврежденное азотистое основание и часть фосфатного остова, особое внимание заслуживает фермент hOGG1. Проведен анализ полиморфизма гена 8-oxoguanin DNA glycosylase hOGG1. Установлено, что у доноров в основном преобладает генотип C/C – 73%, на долю генотипа C/G приходится 25%, генотипа G/G – 2%. По результатам ПЦР-анализа сформировали две группы: с C/C генотипом hOGG1 (68 человек) – 1 группа и с C/G- и G/G генотипами (25 человек) – 2 группа. Содержание окисленных сайтов 8-oxodG в геномном материале 1-й и 2-й группы до и после обработки биообразцов ЭМП напряженностью (550 ± 20) А/м и частотами 3, 30 или 50 Гц приведены на рисунке 15.

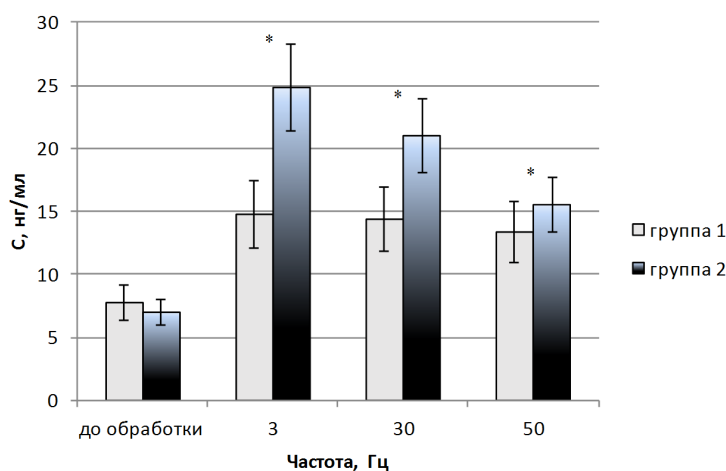


Рисунок 15 – Содержание окисленных сайтов 8-oxodG в геномном материале доноров 1 группы и 2-й группы после электромагнитного воздействия на биообразцы полем напряженностью (550 ± 30) А/м частотами 3, 30 и 50 Гц, время экспозиции – 30 мин. Примечание: * - статистически значимые различия в сравнении с контрольными образцами при $p < 0,05$. Источник: составлено автором

Обработка образцов полем частотой 3 Гц приводила к достоверному ($p < 0,05$) повышению содержания окисленных сайтов 8-oxodG в до $(15,0 \pm 2,5)$ нг/мл, а частотой 30 Гц до $(21,2 \pm 2,5)$ нг/мл. Накопление 8-oxodG в ДНК, происходящее при действии ЭМП, способствует изменению энергии связи между комплементарными основаниями и появлению новых мутаций. Окисленный гуанин может комплементарно соединяться как с цитозином, так и с аденином, при этом формируется стабильная неканоническая Хогстинова пара ohoG-A. В следующем цикле репликации происходит мутация по типу трансверсии G/C $\rightarrow$ T/A. Выявленная чувствительность геномного материала к электромагнитному воздействию связана с появлением C/G- и G/G-полиморфизмов гена 8-oxoguanin DNA glycosylase hOGG1, что способствует образованию разных форм ферментов репарации ДНК. Замена аминокислотного остатка глицина на остаток аланина в форме hOGG1 G42A создает стехиометрические трудности при связывании 8-охоG в области контакта, поэтому различия между способностями hOGG1 G42A и hOGG1 Gly42 по удалению 8-oxodG приводят к накоплению окислительных сайтов в геномном материале доноров с C/G- и G/G полиморфизмами при электромагнитном воздействии.

4.2 Изменение содержания перекисей липидов и активностей антиоксидантных ферментов в организме крыс при электромагнитном воздействии *in vivo*.

Для изучения интенсивности свободнорадикального окисления при электромагнитном воздействии с помощью физико-химической модели выбраны частоты и напряженность ЭМП, воздействующего на крыс *in vivo*. Крысы линии Wistar случайным образом были распределены на отдельные группы: № 1 (контрольная, не подвергнутая

электромагнитному воздействию, 10 особей) и 10 групп крыс, по 5 особей каждая, на которые воздействовали ЭМП с напряженностью (550 ± 20) А/м и разной частотой: № 2 (3 Гц); № 3 (5 Гц); № 4 (8 Гц); № 5 (16 Гц); № 6 (20 Гц); № 7 (24 Гц); № 8 (30 Гц); № 9 (48 Гц); № 10 (50 Гц); № 11 (60 Гц). На рисунке 16 приведена гистограмма, показывающая зависимость содержания перекисей липидов от частоты воздействующего на крыс ЭМП.

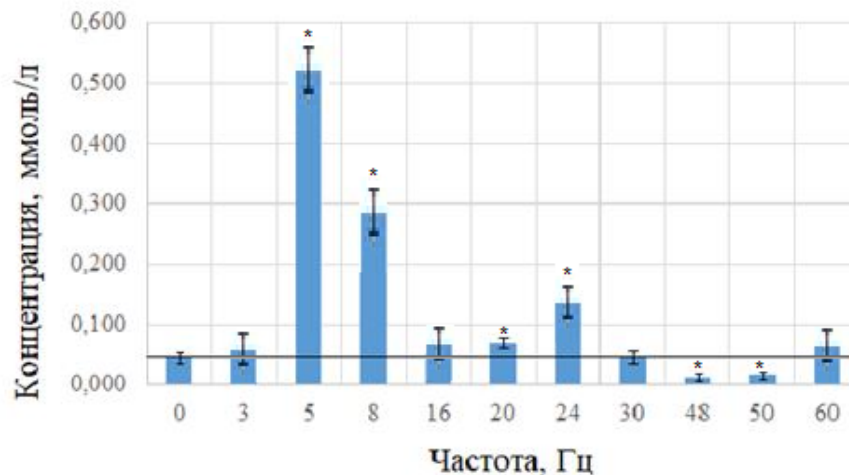


Рисунок 16 – Содержание перекисей липидов в плазме крови крыс после электромагнитной обработки *in vivo* полем напряженностью (550 ± 20) А/м разной частоты.

Примечание. * - различия достоверны при $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой крыс без электромагнитного воздействия (критерий Манна-Уитни) – на рисунке обозначено 0 Гц. На каждой частоте поля обрабатывали группу из 5 крыс. Время экспозиции 15 мин.

Источник: составлено автором

Наиболее существенные увеличения содержания перекисей липидов ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой наблюдались у групп, которых обрабатывали ЭМП частотами 5, 8 и 24 Гц соответственно. Активности антиоксидантных ферментов и содержание перекисей липидов в крови крыс нелинейно зависели от частоты ЭМП, их максимумы частично совпадали с максимумами аппроксимационной зависимости, приведенной на рисунке 2. Воздействие полем частотами 3, 16, 30 и 60 Гц не приводило к достоверному изменению концентрации перекисей липидов в плазме крови крыс. Действие ЭМП частотой 48 Гц достоверно снижало уровень этого показателя по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Полученные результаты согласуются с выводами авторов экспериментальных работ, в которых отмечается наличие немонотонных амплитудно-частотных зависимостей биоэффектов НЧ ЭМП (Greenebaum B., Barnes F., 2019)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вода – неоднородная по химическому составу открытая система, чувствительная к действию факторов электромагнитной природы. Показано, что роль воды при электромагнитном воздействии не ограничивается функцией растворителя АФИ, а значительно расширяется: вода выступает как ключевой регулятор структурных и конформационных изменений АФИ. Термодинамически стабильный гидратированный электрон e^-_{aq} , запускает каскад длительных химических преобразований одних форм АФК в другие, имеющий циклический характер. Вектор ЭМП ориентирует магнитные моменты радикалов, ускоряя или замедляя скорости протекающих между ними химических реакций в объеме раствора и на поверхности нанопузырьков растворенных газов. На примере образования самой долгоживущей АФК - пероксида водорода показано, что со временем собственные колебания концентрации пероксида водорода в растворах АФИ затухают и проявляются только вынужденные колебания, амплитуда которых зависит от частоты воздействующего поля. Электромагнитное воздействие не вызывает прямого повреждения молекул ДНК и альбумина, поскольку энергии поля недостаточно для разрыва ковалентных связей, а опосредовано изменяет их фармакодинамику через увеличение содержания АФК в водных растворах, внеклеточной среде и/или живых клетках и изменение состояния гидратной оболочки. Экспериментальным подтверждением этого является увеличение выхода перекисных соединений после действия ЭМП определенными частотами на водные растворы ДНК, насыщенные кислородом; изменение конформации молекулы альбумина и накопление окислительных и структурных повреждений ДНК после электромагнитного воздействия; изменение продукции межклеточных медиаторов при действии ЭМП на клетки *in vitro* и интенсивности свободнорадикального окисления при действии поля на крыс *in vivo*. СВЧ ЭМП, кроме генерации АФК в водных растворах, вызывает колебания с характерной для молекулы ДНК частотой, отличающейся от частоты внешнего воздействия, что приводит к возникновению областей с разъединенными водородными связями между азотистыми основаниями, способствует окислению оснований с образованием 8-oxodG и накоплению одонитевых разрывов ДНК, содержание которых снижается при применении воды, обедненной дейтерием (*deuterium depleted water*). Изменение структуры и свойств АФИ при электромагнитном воздействии, с нашей точки зрения, необходимо учитывать при лизисе клеток, выделении ДНК и других АФИ в фармацевтической химии, а также при использовании СВЧ и КВЧ ЭМП в терапевтических процедурах. Действие ЭМП также вносит изменения в фармакокинетику тераностических систем на основе плазмонных наночастиц, что можно использовать при разработке невирусных средств доставки АФИ (*Drug Delivery Systems*). Результаты изучения

некоторых аспектов иммунного ответа и влияния полиморфизма гена *8-oxoguanin DNA glycosylase hOGG1* на чувствительность геномного материала к электромагнитному воздействию могут быть востребованы в восстановительной медицине, а также при разработке профилактических и смягчающих неблагоприятные последствия и экологические риски для здоровья человека мер.

ВЫВОДЫ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

1. Разработан комплекс научно-методологических подходов (включая физическую модель и аппаратно-программный комплекс автоматизированной обработки водных растворов электромагнитным полем) к исследованию закономерностей динамики состояния и изменения свойств активных фармацевтических ингредиентов в зависимости от условий нахождения в водно-солевой среде с учетом воздействия низкочастотного, сверхвысокочастотного или крайне высокочастотного электромагнитного поля и изменения изотопного состава ($^2\text{H}/^1\text{H}$) растворителя.

2. Разработан аппаратно-программный комплекс автоматизированной обработки водных растворов АФИ электромагнитным полем, позволяющий исследовать их физико-химические характеристики при сочетанном действии адиабатических факторов электромагнитной природы в диапазоне частот от 1 до 100 Гц при вариациях напряженности магнитного поля от 40 до 550 А/м.

3. Описана физико-химическая модель с программой расчетов ЭВМ и обоснованы механизмы образования активных форм кислорода в водно-солевых растворах АФИ, которые учитывают изменение соотношения отдельных активных форм кислорода в химическом осцилляторе образования АФК и варьирование количества перекисных соединений в водной среде при воздействии электромагнитного поля, с величиной магнитной индукции, на порядок превышающей среднюю магнитную индукции геомагнитного поля.

4. Проведена верификация физико-химической модели: показано, что электромагнитное действие на растворы ДНК, насыщенные кислородом, вызывает значительное увеличение ($p < 0,05$) содержания перекисных соединений, которое немонотонно зависит от частоты поля и связано с процессами образования АФК на границе раздела фаз вода/воздух нанопузырьков растворенных газов.

5. Установлено, что низкочастотное электромагнитное поле изменяет конформационную динамику находящегося в водном растворе человеческого сывороточного альбумина (входящего в состав более 20 ЖНВЛП). Показано, что электромагнитное воздействие влияет на перестройку водородных связей динамической гидратной оболочки альбумина, что приводит к обратимому разворачиванию домена II и сопровождается увеличением доступности его нуклеофильных центров в диапазоне pH от 3 до 7.

6. Разработан способ расчета сечения рассеяния ЭМП на сферической наночастице определенного радиуса, с помощью которого рассчитаны размеры и длина волны флуоресценции ассоциатов квазисферических наночастиц серебра (AgNPs) с альбумином по типу «ядро-оболочка», образующихся в водных средах при воздействии низкочастотного электромагнитного поля.

7. Описан эффект влияния сверхвысокочастотного и крайне высокочастотного электромагнитного поля на вероятность возникновения в молекуле ДНК областей с разъединенными водородными связями между комплементарными основаниями, что способствует взаимодействию оснований с активными формами кислорода, образующимися в водной среде, и приводит к достоверному увеличению количества окисленных сайтов 8-oxodG в 2,2 – 3 раза и односторонних разрывов на 30 – 45 % в ДНК иммунокомпетентных клеток по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Показано, что применение воды, обедненной по содержанию дейтерия (ddw, *deuterium depleted water*) снижает структурные и окислительные повреждения геномного материала при действии сверхвысокочастотного и крайне высокочастотного электромагнитного поля, уменьшая на 35 % уровень односторонних разрывов ДНК.

8. Определена прецизионность методики определения содержания дейтерия в водных растворах с использованием метода ЯМР и применением в качестве внешнего стандарта лантаноидного сдвигающего реагента в условиях повторяемости. Проведена валидация методики по показателям специфичность, предел обнаружения, предел количественного определения. Полученные результаты положены в основу разработки проекта ОФС «Определение дейтерия в водных растворах методом ЯМР».

9. С помощью разработанной физико-химической модели образования активных форм кислорода в водно-солевых растворах АФИ рассчитаны параметры электромагнитного поля (до 1 мТл с частотой до 10 Гц), воздействующего на иммунокомпетентные клетки, и впервые установлено, что в зависимости от частоты электромагнитного поля в выбранном диапазоне частот может происходить как достоверное увеличение ($p < 0,05$) продукции сывороточных провоспалительных цитокинов, сравнимое с действием патологического процесса, так и уменьшение их выработки, и нивелирование гиперпродукции до нормального уровня.

10. В рамках практического применения разработанной модели показано, что чувствительность геномного материала к электромагнитному воздействию связана с появлением C/G- и G/G-полиморфизмов гена эксцизионной репарации 8-oxoguanin DNA glycosylase hOGG1, что необходимо учитывать в магнитотерапии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФИ – активные фармацевтические ингредиенты

АФК – активные формы кислорода

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖНВЛП – жизненно необходимые и важнейшие лекарственные препараты
 КВЧ – крайне высокочастотное
 ЛС – лекарственное средство
 ЛСР – лантаноидный сдвигающий реагент
 НЧ – низкочастотное
 СВЧ – сверхвысокочастотное
 ОР – односторонние разрывы
 ОФС – общая фармакопейная статья
 ПМ – плотность мощности
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 ЭМП – электромагнитное поле
 ЯМР – ядерно-магнитный резонанс
 AgNPs – наночастицы серебра
 ddw deuterium depleted water – вода, обедненная дейтерием
 Trp – триптофон
 Тир – тирозин
 8-oxodG – 8-оксигуанозина
 8-oxoguanin DNA glycosylase hOGG1 - 8-оксигуанозин – ДНК гликозилаза

ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты проведенных исследований в области изучения свойств водных растворов активных фармацевтических ингредиентов и живых клеток при внешнем электромагнитном воздействии и изменении изотопного состава растворителя внедрены:

В практику научно-исследовательской работы лаборатории проблем распределения стабильных изотопов в живых системах Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук» (ЮНЦ РАН) и используются при решении задач темы НИР ГЗ ЮНЦ РАН № 125011700394-5 в виде: 1) Практического применения разработанной методики количественного определения содержания дейтерия (^2H) в воде, водных растворах природного происхождения, лабораторного и промышленного производства; 2) Программ для ЭВМ расчета параметров электромагнитного поля, генерирующего активные формы кислорода в водных растворах АФИ; 3) Использования аппаратно-программного комплекса автоматизированной электромагнитной обработки и исследования физико-химических характеристик водных растворов АФИ.

В учебный процесс кафедры биологии с курсом медицинской генетики ФГБОУ ВО Кубанского государственного медицинского университета Минздрава РФ, а также в научно-производственную деятельность в виде: 1) Проведения целевых фундаментальных исследований динамики состояния прооксидантно-антиокислительной системы организма лабораторных животных при потреблении воды с модифицированным изотопным составом (номера проектов РФФИ 08-03-99034-р_офи, 09-03-99032-р_офи, 09-04-96600-р_юг_а, 11-04-96523-р_юг_ц); 2) Проведения целевых фундаментальных исследований денатурационных и конформационных переходов активных фармацевтических ингредиентов при действии электромагнитного поля (номер проекта РФФИ р_а № 16-42-230187); 3) Проведения исследований по изучению степени окислительного повреждения ДНК *in vivo* и *in vitro*, как молекулярного предиктора нарушений, вызванных эндогенными и экзогенными факторами, и созданию базы данных степени повреждений

геномного материала в популяции жителей отдельного региона при внешнем электромагнитном воздействии (номер проекта МФИ-20.1/119).

В практику научно-исследовательской работы лаборатории биологически активных веществ животного происхождения ФГБУН «Федеральный научный центр Пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН в виде использования методики количественного определения содержания дейтерия в водных растворах с применением ЯМР-спектроскопии и программы для ЭВМ расчета параметров электромагнитного поля, генерирующего перекисные соединения в водных растворах белков и нуклеиновых кислот.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

Статьи в журналах, индексируемых в международных библиографических системах

1. Artsybasheva, O. Changes of oxidation during use the food diet with deuterium depleted water in laboratory animals with purulent inflammation / O. Artsybasheva, E. Barysheva, D. Shashkov, R. Vlasov, **E. Tekutskaya** // Russian Open Medical Journal. – 2014. – V. 3, № 2. – P. 201.

2. **Tekutskaya, E.E.** Estimation of the influence of medium with different isotopic D/H composition on DNA lymphocytes repair / **E.E. Tekutskaya**, S.S. Dzhimak, E.V. Barysheva, A.A. Basov, S.R. Fedosov, O.M. Artsybasheva // Medical news of north Caucasus. – 2015. – V. 10, № 3. – P. 287 – 292.

3. **Текуцкая, Е.Е.** Действие электромагнитного поля низкой частоты на белки плазмы крови / **Е.Е. Текуцкая**, К.В. Чебочинов, А.С. Прокофьев // Международный научно-исследовательский журнал. – 2016. – Т.2, №44. – С. 38-40.

4. **Текуцкая, Е.Е.** Скрининг одонитевых разрывов ДНК лимфоцитов периферической крови человека при действии внешних факторов / **Е.Е. Текуцкая**, Р.В. Василяди // Экология Человека. – 2017. №12. – С. 9 – 14.

5. Il'chenko, G.P. A Device for Searching for Optimal Alternating Magnetic Field Parameters for the Treatment of Biological Objects / G.P. Il'chenko, M.G. Baryshev, **E.E. Tekutskaya**, V.S. Shelistov, A.V. Nikitin // Measurement Techniques. – 2017. – V. 60, №6. – P. 632 – 637.

6. **Текуцкая, Е.Е.** Генерация активных форм кислорода под влиянием СВЧ-излучения и их генотоксическое действие / **Е.Е. Текуцкая**, М.Г. Барышев, Г.П. Ильченко // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2018. – Т.52, №1. – С. 56 – 61.

7. **Tekutskaya, E.E.** Conformational changes in natural biopolymers induced by electromagnetic field and cadmium ion exposure / **E.E. Tekutskaya** // Russian Open Medical Journal. – 2019. – V.8, №2. – P. 202.

8. **Tekutskaya, E.E.** Reactive oxygen species, DNA damage and Solar-Earth Communications / **E.E. Tekutskaya**, I.S. Ryabova // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2021. – V. 853, №10. – P. 012007.

9. **Tekutskaya, E.E.** Changes in free radical processes under the influence of low-frequency electromagnetic field in rats / **E.E. Tekutskaya**, I.S. Ryabova, S.V. Kozin, K.A. Popov, V.V. Malysenko // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2022. – V. 172. № 5. – P. 566 – 570.

10. **Tekutskaya, E.E.** 8-Oxoguanine-DNA-Glycosylase Gene Polymorphism and the Effects of an Alternating Magnetic Field on the Sensitivity of Peripheral Blood / **E.E. Tekutskaya**, G.P. Il'chenko, A.S. Dorohova, V.V. Malysenko, M.G. Baryshev, S.S. Dzhimak // Frontiers in Bioscience – Landmark. – 2023. – V. 28, № 10. – P. 252.

11. Kozin, S. Study of the Magnesium Comenante Structure, Its Neuroprotective and Stress-Protective Activity / S. Kozin, A. Kravtsov, L. Ivashchenko, V. Dotsenko, L. Vasilyeva, A. Vasilyev, **E. Tekutskaya**, N. Aksenov, M. Baryshev, A. Dorohova, L. Fedulova, S. Dzhimak // International Journal of Molecular Science. – 2023. – V.24, № 9. – P. 8046.

12. Lyasota, O. Stability of the CAG tract in the ATXN2 gene depends on the localization of CAA interruptions / O. Lyasota, A. Dorohova, J. L. Hernandez-Caceres, A. Svidlov, **E. Tekutskaya**, M. Drobotenko, S. Dzhimak // Biomedicines MDPI. – 2024. – V. 12, № 8, – P. 1648.

13. Gureev, A.P. Role of the Nrf2/ARE pathway in the mtDNA reparation / A.P. Gureev, E.V. Chernyshova, E. P. Krutskikh, I. S. Sadovnikova, **E. E. Tekutskaya**, A. S. Dorohova // Frontiers in Bioscience - Landmark. – 2024. – V. 29, № 6. – P. 218

14. Dorohova, A. Ratio of AT and GC pairs in the zones of open states genesis in DNA molecule / A. Dorohova, O. Lyasota, A. Svidlov, A. Anashkina, **E. Tekutskaya**, S. Dzhimak, M. Drobotenko // Frontiers in Bioscience – Landmark. – 2024. – V. 29, № 11. – P. 381.

15. **Текуцкая, Е.Е.** Структурные повреждения ДНК лимфоцитов при воздействии неионизирующего микроволнового излучения в среде с модифицированным изотопным составом / **Е.Е. Текуцкая**, Л.Р. Гусарук, И.И. Павлюченко, Г.П. Ильченко // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2025. – Т.59, №4. – С. 74 – 82.

Статьи в журналах, входящих в перечень ВАК

16. **Текуцкая, Е.Е.** Упреждение экзогенных и эндогенных воздействий на организм – залог повышения качества жизни / **Е.Е. Текуцкая**, В.И. Шульженко, Ю.А. Васильев // Вестник новых медицинских технологий. – 2009. – Т. XVI, №1. – С. 57–60

17. **Текуцкая, Е.Е.** Влияние воды с пониженным содержанием дейтерия на состояние ДНК лимфоцитов человека в норме и патологии / **Е.Е. Текуцкая**, Е.В. Барышева,

А.Х. Каде // Современные проблемы науки и образования. – 2014, №6. www.science-education.ru/120-15441 eISSN: 2070-7428

Статьи в журналах RSCI

18. **Текуцкая, Е.Е.** Исследование воздействия электромагнитного излучения низкой частоты на активность лимфоцитов / **Е.Е. Текуцкая**, Ю.А. Васильев, А.А. Храмцова // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т.8(17), №3. – С. 466 – 469.

19. **Текуцкая, Е.Е.** Влияние внешних факторов на повреждение и репарацию ДНК лимфоцитов периферической крови человека / **Е.Е. Текуцкая**, Р.А. Василиади, А.А. Храмцова // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т.9 (18), №3 (1). – С. 223 – 225.

20. Павлюченко, И.И. Распространенность и молекулярно-генетические особенности буллезного эпидермолиза в популяции жителей Краснодарского края / И.И. Павлюченко, Л.Р. Гусарук, **Е.Е. Текуцкая**, И.Т. Рубцова // Кубанский научный медицинский вестник. – 2020. – Т.27, №5. – С. 88 – 99.

21. Павлюченко, И.И. Полиморфизм rs652438 гена *MMP-12* и степень окислительного повреждения геномной ДНК при бронхиальной астме: экспериментальное нерандомизированное исследование / И.И. Павлюченко, Л.Р. Гусарук, **Е.Е. Текуцкая**, Ю.И. Прозоровская, Э.А. Почешкова // Кубанский научный медицинский вестник. – 2022. – Т. 29, №3. – С. 62 – 75.

22. **Текуцкая, Е.Е.** Генотоксическое действие ионизирующих излучений и переменного магнитного поля / **Е.Е. Текуцкая**, Г.Ф. Копытов, М.Г. Барышев // Известия вузов. Физика. – 2023. – Т.66, №6. – С. 22 – 28.

Другие рецензируемые журналы

23. **Текуцкая, Е.Е.** Окислительные повреждения ДНК, ионизирующие излучения и магнитные поля / **Е.Е. Текуцкая**, М.Г. Барышев // Актуальная биотехнология. – 2020. – №3 (34). – С. 518 – 522.

24. **Текуцкая, Е.Е.** Степень окислительного повреждения ДНК и полиморфизм rs652438 гена *MMP-12* при мультифакториальных заболеваниях в условиях оксидативного стресса / **Е.Е. Текуцкая**, Л.Р. Гусарук, И.И. Павлюченко // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2022. – Т.7. №1. – С. 147 – 152.

25. **Текуцкая, Е.Е.** Скрининг повреждений ДНК лимфоцитов периферической крови человека при воздействии излучений / **Е.Е. Текуцкая**, Г.П. Ильченко, К.А. Чебочинов // Психосоматические и интегративные исследования. – 2017. – Т.3. 0305. – С. 1 – 6.

26. **Текуцкая, Е.Е.** Совместное действие электромагнитного поля низкой частоты и кадмия на природные биополимеры / **Е.Е. Текуцкая**, М.Г. Барышев, Г.П. Ильченко // Психосоматические и интегративные исследования. – 2018. – Т.4. 0201. – С. 1 – 7.

27. **Текуцкая, Е.Е.** Влияние электромагнитного поля низкой частоты на триптофановую флуоресценцию человеческого сывороточного альбумина / **Е.Е. Текуцкая** // Психосоматические и интегративные исследования. – 2019. – Т.5. 0404. – С. 1 – 6.

28. Ильченко, Г.П. Устройство для поиска оптимальных параметров обработки переменным магнитным полем биологических объектов методом фликкер-шумовой спектрометрии / Г.П. Ильченко, **Е.Е. Текуцкая** // Психосоматические и интегративные исследования. – 2017. – Т.3. – 0304. – С. 1 – 5.

Полученные патенты и свидетельства о государственной регистрации РИД

29. **Текуцкая Е.Е.**, Барышев М.Г., Ломакина Л.В. Способ исследования биологических жидкостей в переменном магнитном поле / Патент РФ № 2621157. Опубликовано 31.05.2017, бюл. № 16.

30. Барышев М. Г., Ильченко Г.П., **Текуцкая Е.Е.**, Ломакина Л.В. Устройство для автоматизированного исследования биологических жидкостей в переменном магнитном поле / Патент РФ на полезную модель №156339. Опубликовано 10.11.2015, бюл. № 31.

31. **Текуцкая Е.Е.**, Барышев М.Г., Ильченко Г.П., Ломакина Л.В. Устройство для исследования биологических жидкостей в переменном магнитном поле / Патент РФ на полезную модель №163735. Опубликовано 10.08.2016, бюл. № 22.

32. Павлюченко И.И., Гусарук Л.Р., **Текуцкая Е.Е.** База данных результатов исследования полиморфных вариантов генов и степени окислительных повреждений ДНК в популяции жителей отдельного региона / Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022621020. Опубликовано 05.05.2022, бюл. №5.

33. **Текуцкая Е.Е.**, Ильченко Г.П., Значко В.Н., Беженар М.В. Программа расчета зависимости содержания перекиси водорода в водных растворах ДНК от частоты магнитного поля / Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2023661816. Опубликовано 02.06.2023, бюл. №6.

34. **Текуцкая Е.Е.**, Значко В.Н., Ильченко Г.П., Ломакина Л.В. Программа расчета параметров электромагнитного поля, генерирующего активные формы кислорода в водных растворах биополимеров / Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2024680989. Опубликовано 04.09.2024, бюл. №9.

Текуцкая Елена Евгеньевна

(Российская Федерация)

**МЕХАНИЗМЫ СОЧЕТАННОГО ДЕЙСТВИЯ АКТИВНЫХ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ИНГРЕДИЕНТОВ И АДИАБАТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ
ЭЛЕКТРОМАГНИТНОЙ ПРИРОДЫ**

В диссертационной работе обоснованы научно-методологические подходы к исследованию закономерностей изменения свойств водных растворов активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) с учетом воздействия низкочастотного, сверхвысокочастотного и крайне высокочастотного электромагнитного поля. Обоснованы механизмы сочетанного действия АФИ и факторов электромагнитной природы с учетом роли воды. Разработана и верифицирована физико-химическая модель образования активных форм кислорода (АФК) в водно-солевых растворах АФИ, которая учитывает изменение соотношения АФК, в частности, пероксида водорода в химическом осцилляторе в водной среде при электромагнитном воздействии. Продemonстрировано влияние ЭМП на изменение структуры и свойств водных растворов АФИ и биологически активных наночастиц. Предложен способ расчета размеров ассоциатов сферических наночастиц с АФИ в водных средах по типу «ядро-оболочка» с учетом электромагнитного воздействия. Для снижения структурных и окислительных изменений геномного материала при действии СВЧ и КВЧ ЭМП на живые клетки обосновано применение воды, обедненной дейтерием. Доказана прецизионность методики определения содержания дейтерия в водных растворах с использованием метода ЯМР и применением в качестве внешнего стандарта лантаноидного сдвигающего реагента в условиях повторяемости. Полученные результаты могут быть использованы в восстановительной медицине, а также при разработке профилактических и смягчающих неблагоприятные последствия и экологические риски для здоровья человека мер, что является практическим вкладом фармацевтической химии в защиту населения от техногенного ЭМП.

Tekutskaya Elena Evgenievna

(Russian Federation)

**MECHANISMS OF COMBINED ACTION OF ACTIVE PHARMACEUTICAL
INGREDIENTS AND ADIABATIC FACTORS OF ELECTROMAGNETIC NATURE**

This dissertation substantiates scientific and methodological approaches to studying the property changes in aqueous solutions of active pharmaceutical ingredients, taking into account the effects of low-frequency, microwave, and extremely high-frequency electromagnetic fields. The mechanisms of the combined action of APIs and electromagnetic factors are substantiated, taking into account the role of water. A physicochemical model of reactive oxygen species (ROS) formation in aqueous-salt solutions of APIs has been developed and verified. This model takes into account changes in the ratio of ROS, in particular, hydrogen peroxide, in a chemical oscillator in an aqueous medium under electromagnetic influence. The influence of EMF on changes in the structure and properties of aqueous solutions of APIs and biologically active nanoparticles is demonstrated. A method for calculating the size of core-shell associates of spherical nanoparticles with APIs in aqueous media, taking into account electromagnetic influences, is proposed. To reduce structural and oxidative changes in genomic material caused by exposure of living cells to microwave and ultra-high-frequency electromagnetic fields, the use of deuterium-depleted water has been validated. The precision of the method for determining deuterium content in aqueous solutions using NMR and a lanthanide shift reagent as an external standard under repeatable conditions has been demonstrated. The obtained results can be used in restorative medicine, as well as in the development of preventive measures and measures to mitigate adverse effects and environmental risks to human health, representing a practical contribution of pharmaceutical chemistry to protecting the population from man-made electromagnetic field