

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Федеральный исследовательский центр Южный научный центр
Российской академии наук»

На правах рукописи

Текуцкая Елена Евгеньевна

МЕХАНИЗМЫ СОЧЕТАННОГО ДЕЙСТВИЯ АКТИВНЫХ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ИНГРЕДИЕНТОВ И АДИАБАТИЧЕСКИХ
ФАКТОРОВ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОЙ ПРИРОДЫ

Специальность

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук

Научный консультант:
доктор биологических наук,
профессор М.Г. Барышев

Ростов-на-Дону – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1 СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОМЕДИЦИНСКИХ ЭФФЕКТОВ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ И ВОДЫ С ПОНИЖЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ДЕЙТЕРИЯ.....	19
1.1 Особенности биологических эффектов низкочастотного, сверхвысокочастотного и крайне высокочастотного электромагнитного поля.....	19
1.1.1 Действие электромагнитного поля на водные растворы активных фармацевтических ингредиентов.....	29
1.1.2 Использование эффектов электромагнитного воздействия в медицинских исследованиях и медицине.....	35
1.2 Современные механизмы действия электромагнитного поля на воду и водные растворы активных фармацевтических ингредиентов.....	44
1.3 Активные формы кислорода в клетках и водных растворах активных фармацевтических ингредиентов.....	60
1.4 Медико-биологические эффекты воды с пониженным содержанием дейтерия.....	71
Выводы к главе 1.....	74
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ, ОБОРУДОВАНИЕ, МЕТОДЫ И МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	76
2.1 Объекты и методы исследования.....	76
2.2 Аппаратно-программный комплекс автоматизированной обработки электромагнитным полем и исследования физико-химических характеристик водных растворов активных фармацевтических ингредиентов	78
2.3 Методики выделения моноклеарных клеток и ДНК, режимы проведения полимеразной цепной реакции.....	89

2.4 Методики определения биохимических показателей крови и повреждений ДНК: содержания 8-оксигуанина, количества одонитовых разрывов.....	95
---	----

2.5 Физико-химические методы, используемые при выполнении работы.....	99
---	----

ГЛАВА 3 МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ВОДНО-СОЛЕВЫХ РАСТВОРАХ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ИНГРЕДИЕНТОВ ПРИ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ	103
--	-----

3.1 Образование пероксида водорода в растворах активных фармацевтических ингредиентов в зависимости от частоты воздействующего электромагнитного поля	103
---	-----

3.2 Эффекты генерации перекисных соединений в водно-солевой среде при сочетанном действии активных фармацевтических ингредиентов и факторов электромагнитной природы	109
--	-----

3.3 Влияние растворенных газов на образование активных форм кислорода в растворах активных фармацевтических ингредиентов при действии низкочастотного электромагнитного поля.....	117
---	-----

Выводы к главе 3.....	123
-----------------------	-----

ГЛАВА 4 ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ИНГРЕДИЕНТОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ НАНОЧАСТИЦ К ЭЛЕКТРОМАГНИТНОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ.....	124
--	-----

4.1 Конформационные изменения альбумина при действии низкочастотного электромагнитного поля	124
---	-----

4.2 Образование оболочки из активных фармацевтических ингредиентов на поверхности наночастиц серебра под влиянием электромагнитного поля	144
--	-----

4.3 Сенсibilизированная генерация активных форм кислорода в водно-солевых средах, инициируемая действием сверхвысокочастотного электромагнитного поля	155
---	-----

Выводы к главе 4.....	163
-----------------------	-----

ГЛАВА 5 ДЕЙСТВИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ И ВОДЫ, ОБЕДНЕННОЙ ДЕЙТЕРИЕМ, НА КЛЕТКИ.....	165
5.1 Структурные повреждения геномного материала при действии сверхвысокочастотного и крайне высокочастотного электромагнитного поля на иммунокомпетентные клетки <i>in vitro</i>	165
5.2 Сочетанное действие воды, обедненной дейтерием ddw (<i>deuterium depleted water</i>), и сверхвысокочастотного и крайне высокочастотного электромагнитного поля на иммунокомпетентные клетки <i>in vitro</i>	171
5.3 Возможности методики количественного определения содержания дейтерия методом ЯМР спектроскопии для контроля качества воды, водных растворов АФИ и биологических объектов	176
5.4 Влияние низкочастотного электромагнитного поля на хемилюминесценцию мононуклеарных клеток периферической крови.....	183
5.5 Изменение продукции межклеточных медиаторов при воздействии низкочастотного электромагнитного поля на кровь <i>in vitro</i>	191
Выводы к главе 5.....	202
ГЛАВА 6 ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МОДЕЛИ ОБРАЗОВАНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ АФИ ПРИ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ НА ЖИВЫЕ ОРГАНИЗМЫ.....	204
6.1 Чувствительность геномного материала к электромагнитному воздействию	204
6.2 Изменение содержания перекисей липидов и активностей антиоксидантных ферментов в организме крыс при электромагнитном воздействии <i>in vivo</i>	217
Выводы к главе 6.....	223
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	225
ВЫВОДЫ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ДИССЕРТАЦИИ.....	227
Список сокращений и условных обозначений.....	230
Список литературы.....	241
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	291

Приложение 1. Программа для ЭВМ расчета содержания перекисных соединений в водных растворах ДНК от частоты ЭМП.....291

Приложение 2. Проект ОФС. 1.2.3.00XX Определение дейтерия в водных растворах методом ЯМР..... 297

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Электромагнитное загрязнение окружающей среды электромагнитным полем (ЭМП) антропогенного происхождения, обусловленное технологическим развитием, постоянно растет [1 – 4]. Расширяется использование сложномодулированного ЭМП в промышленности, навигации и коммуникациях, связанных с системами мобильной связи, базовыми станциями беспроводных телефонов, точками доступа Wi-Fi, в навигации [5 – 7]. 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 [8]. Сверхвысокочастотное (СВЧ) и крайне высокочастотное (КВЧ) ЭМП широко применяется в здравоохранении в клинических устройствах для физиотерапии и диагностики [9 – 12].

Вода, будучи структурно неоднородной многокомпонентной открытой системой, активно взаимодействующей с окружающей средой, является объектом электромагнитного воздействия [13]. 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 энергомассобмену с атмосферой, демонстрируют коллоидные свойства по причине формирования плотностных неоднородностей, в том числе бабстонов, состоящих по известной физической модели из нанопузырьков [14 – 16]. Как одно из последствий протекания неравновесных процессов тепло- и массопереноса в гетерогенной водной среде описана спонтанная генерация активных форм кислорода (АФК) [17 – 19]. 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 [20 – 21].

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) [3, 22], 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 альбумина, 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 [2 – 3, 22 – 25], 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 [6, 26]. Между тем, СВЧ и КВЧ ЭМП широко применяется для различных целей на частотах, отличных от 2,45 ГГц: в фармацевтической химии для лизиса клеток и выделения ДНК [11], а также контроля качества нанопрепаратов [27]; в здравоохранении для приложений визуализации и зондирования [10]; в терапевтических аппаратах для лечения миллиметровым ЭМП совместно с традиционными методами [28], хотя параметры электромагнитного воздействия выбираются разработчиками аппаратов эмпирически.

Вода с пониженным содержанием дейтерия (ddw – *deuterium depleted water*) оказывает стимулирующее действие на клетки, существенно повышает их активность, переключает метаболические пути [29 – 31] 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 [32 – 34].

Биологически активные наночастицы серебра (AgNPs) служат основой для разработки биоактивных материалов [35 – 41], но при их применении необходимо учитывать дозозависимые цитотоксические свойства наночастиц [37]. Частью стратегии снижения цитотоксичности и эффективного преодоления тканевых

барьеров является создание на поверхности наночастиц защитных оболочек из АФИ [38 – 39], 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.

Объекты исследования. В рамках диссертационной работы *объектами* исследования являлись водные растворы активных фармацевтических ингредиентов, а именно – растворы ДНК и альбумина, а также моонуклеарные 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:

1. **Изучены** физико-химические свойства водно-солевых растворов АФИ, входящих в состав различных ЛП, при действии факторов электромагнитной природы.

2. **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.

3. **Впервые** с помощью предложенной модели разработаны программы для ЭВМ расчета зависимости содержания перекисных соединений в водно-солевых растворах АФИ от частоты воздействующего ЭМП.

4. **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.

5. **Показано**, что сформированная при электромагнитном воздействии структура из молекул альбумина на поверхности наночастиц изменяет фармакокинетику AgNPs и улучшает их биодоступность.

6. **Предложен** способ расчета сечения рассеяния света на сферической наночастице определенного радиуса, который позволяет рассчитывать размеры и спектральные характеристики микроструктур на основе наночастиц и АФИ по типу «ядро-оболочка».

7. **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*).

8. **Впервые** изучено влияние полиморфизма ключевого гена системы эксцизионной репарации ДНК при окислительных повреждениях на

восприимчивость генома к электромагнитному воздействию.

9. **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 низкочастотного ЭМП с величиной магнитной индукции, на порядок превышающей магнитную индукцию геомагнитного поля, на водно-солевые 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 одонитевых 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 НЧ ЭМП могут быть использованы в магнитотерапии. Продemonстрирована высокая восприимчивость иммунной системы к электромагнитному воздействию в отношении профиля межклеточных медиаторов, полученные результаты могут быть применены 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 НЧ ЭМП исследовали на различных моделях: водных растворах АФИ *in vitro* и на крысах *in vivo*, СВЧ и КВЧ ЭМП на клеточных взвешах *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.

Основные 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 односторонних 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 одностранных 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 опухолей.

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 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 социальная защита 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 Man and Electromagnetic Fields. V International Conference (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 conferences «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. Материалы конференций опубликованы в виде статей и тезисов.

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 НЧ 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 обработки ЭМП и исследования физико-химических характеристик растворов АФИ. **Работа выполнена** с использованием оборудования лаборатории проблем распределения стабильных изотопов в живых системах ЮНЦ РАН.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы стратегического развития ВУЗов 2.1.2. Исследования в области альтернативной энергии и экотехнологий на 2012-2015 гг. проект №12/4 с-1.2; государственного задания Минобразования и науки РФ (проект 6.5882.2017/БЧ, проект № 4.1744.2011); государственного задания ЮНЦ РАН № 125011700394-5; проектов РФФИ (08-03-99034-р_офи, 09-03-99032-р_офи, 09-04-96600-р_юг_a, 14-02-90424_a, 11-04-96523-р_юг_ц Исследование динамики состояния прооксидантно-антиокислительной системы организма лабораторных животных при потреблении воды с модифицированным изотопным составом, 16-42-230187-р_a Денатурационные и конформационные переходы природных биополимеров при действии переменного магнитного поля, МФИ-2021/119 Степень окислительного повреждения ДНК *in vivo* и *in vitro*, как молекулярный предиктор нарушений, вызванных эндогенными (генетическими) и экзогенными факторами; 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.

ГЛАВА 1 СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОМЕДИЦИНСКИХ ЭФФЕКТОВ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ И ВОДЫ С ПОНИЖЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ДЕЙТЕРИЯ

1.1 Особенности биологических эффектов низкочастотного, сверхвысокочастотного и крайне высокочастотного электромагнитного поля

В настоящее время ведутся интенсивные дискуссии о том, имеет ли воздействие электромагнитного поля (ЭМП) от приборов, которые излучают в диапазоне низких и крайне низких частот электромагнитного спектра, а также излучений, исходящих от устройств связи, использующих микроволновую часть спектра, последствия для здоровья человека [1 – 8, 24 – 26], поскольку уровень загрязнения окружающей среды ЭМП резко увеличился. Так, в работе [6] авторами приводятся данные по измерению параметров ЭМП на передней и задней сторонах сотовых телефонов в режимах ожидания, разговора и прослушивания для стандартов 2G и 3G в двух частотных диапазонах - LF1: 5 Гц–200 Гц и LF2: 120 Гц–10 кГц. Значения магнитной индукции ЭМП достигали 70,03 мкТл (2G, режим прослушивания, передняя сторона) и 12,67 мкТл (LF2, 2G, режим разговора, передняя сторона) соответственно, что соизмеримо или больше значения магнитной индукции геомагнитного поля [6, 8].

Накоплен большой экспериментальный и теоретический материал, посвященный изучению биологических эффектов низкочастотного (НЧ) ЭМП [2, 3, 23 – 25, 43 – 51]. Большинство исследований посвящены изучению влияния ЭМП на общую и специфическую экспрессию генов клеток человека и животных, состояние клеточных мембран, на пролиферацию и дифференциацию клеток,

регуляцию клеточного цикла, на метаболизм клеток и их биохимические характеристики. М. Бланк и Р. Гудман, изучая чувствительность живых организмов к действию ЭМП, в статье [43] отмечают, что ЭМП в НЧ диапазоне активирует клеточный ответ на стресс и запускает защитный механизм, индуцирующий экспрессию генов, например, HSP70. Авторы показали, что при действии НЧ ЭМП процессы переноса электронов ускоряются на уровне цитохромоксидаз и гидролиза АТФ с помощью Na, K-АТФ, при этом ход окислительно-восстановительных реакций, как утверждают авторы, изменяется в зависимости от частоты поля.

Исследования, проведенные А. Теста и Э. Коделли, результаты которых приведены в работе [47], показали, что к воздействию НЧ ЭМП чувствительны отдельные участки ДНК, обогащенные nCTCTn-последовательностями. Эти последовательности входят в состав промоторных участков генов ряда белков, в том числе, белков теплового шока. Авторы отмечают, что биологическая эффективность действия ЭМП на ДНК в определенной степени зависит как от особенностей нуклеотидной последовательности, так и от характера взаимодействия белков с ДНК. Показано, что ЭМП в некоторых частотных диапазонах могут активировать через ДНК-синтез защитные белки теплового шока. Так, обработка клеточных культур фибробластов человека НЧ ЭМП приводила к появлению данных белков в цитоплазме и ядре клеток, что свидетельствовало об активации неспецифических механизмов клеточной защиты. Наблюдаемые эффекты активации синтеза белков HSP70 зависели от величины магнитной индукции воздействующего ЭМП: повышение индукции поля с 0,8 мкТл до 800 мкТл было эквивалентно эффекту разогрева клеточных культур с 20 °С до 45 °С. Последовательности в ДНК, чувствительные к действию ЭМП, близки в гене промотора к кодам для HSP70.

В 1990–2015 гг. проведено большое количество исследований с использованием лабораторных животных, культивированных клеток грызунов и человека, а также лимфоцитов крови человека для определения генотоксического потенциала воздействия низкоинтенсивного ЭМП. М. Виджаялакшми и Г. Обе в

обзоре [50] обобщили результаты цитогенетических наблюдений изменений в соматических клетках млекопитающих, подвергшихся электромагнитному воздействию. Как отмечают авторы, среди 63 рецензируемых научных отчетов выводы 29 исследований (46%) не указали на увеличение повреждения генетического материала, оцененного по разрывам нитей ДНК, частоте хромосомных aberrаций, микроядер и обменов сестринскими хроматидами в клетках, подвергшихся воздействию ЭМП, по сравнению с клетками, ложно подвергнутыми воздействию. В то же время выводы остальных исследований предполагают увеличение таких повреждений в клетках после действия полей.

Объясняя биологический эффект НЧ ЭМП, Р.Х. Фанк и соавт. [51] предположили, что ЭМП способно свободно проникать в клетку, напрямую взаимодействуя с ДНК в ядре и другими компонентами, и влиять на многие механизмы, включая экспрессию генов без последующего клеточного апоптоза. М. Симко и М.О. Матссон, напротив, считают маловероятным факт, что ЭМП может напрямую вызывать повреждение ДНК [49]. Известно, что НЧ ЭМП не обладает достаточной энергией, чтобы вызвать такие повреждения, поскольку на частотах 50 Гц энергия фотонов мала и составляет около 10–12 части энергии, необходимой для разрыва самой слабой химической связи.

Результаты, опубликованные Норденсоном И. и соавт. в работе [52], подтверждают факт вмешательства ЭМП частотой 50 Гц в процессы восстановления ДНК клеток, которое приводит к образованию хромосомных aberrаций и разрывов нитей ДНК в амниотических клетках человека. Данный эффект авторы объяснили активацией свободно-радикальных процессов в клетках и внеклеточной среде. Исследователи, наблюдавшие повреждение ДНК после воздействия ЭМП, утверждают, что этот эффект был вызван косвенными или вторичными биохимическими изменениями в клетках, причем наиболее вероятной причиной эффектов авторы считают образование свободных радикалов, опосредованных протеканием реакций Фентона.

Изучению повреждений ДНК, вызванных воздействием НЧ ЭМП на клетки человека посвящены работы [53 – 56], а на клетки крыс и мышей - статьи [57 – 60].

Ф. Фок с соавт. [56] обнаружили, что периодическое (5 минут включения/10 минут перерыва) воздействие на первичные фибробласты человека ЭМП частотой 50 Гц и напряженностью 1 мТл вызывает увеличение фрагментации ДНК в Comet-анализе. Авторы привели доказательства того, что эффект вызван магнитной, а не электрической составляющей поля. Они также показали, что реакции, вызванные ЭМП, зависят от пролиферации клеток, это позволило им предположить, что затрагиваются процессы репликации ДНК, а не сама ДНК. Эффекты Comet-анализа коррелировали с уменьшением количества активно реплицирующихся клеток и сопутствующим увеличением количества апоптотических клеток в культурах, подвергшихся воздействию.

Проведено большое количество исследований по изучению влияния НЧ ЭМП на индукцию окислительного стресса в клетках и клеточных линиях [60 - 66]. Большая часть авторов этих работ пришли к выводу, что повышенный уровень образования АФК, опосредованный физическими, химическими или биологическими факторами, оказывает наибольшее влияние на молекулу ДНК и на клеточные процессы [62 – 64]. Во многих работах [65 – 73] авторы отмечают увеличение количества повреждений ДНК в клетках, опосредованное образованием АФК, изменение экспрессии генов, а также появление геномной нестабильности под влиянием переменного ЭМП *in vitro*. Предполагается, что ЭМП нарушает окислительно-восстановительную внутриклеточную сигнализацию [69], хотя, как отмечает М. Симко в статье [67], различные типы клеток со специфическим окислительно-восстановительным статусом могут иметь разные клеточные реакции на действие ЭМП. М.

Рагк и соавт. [78] подвергали 10-дневных крыс непрерывному воздействию *in vivo* ЭМП напряженностью 398 А/м и частотой 50 Гц в течение 30 дней. Они обнаружили, что электромагнитное воздействие увеличивает концентрацию малонового диальдегида, активность супероксиддисмутазы и скорость окислительного повреждения клеточной ДНК. М. Вилларини и Г. Мариуччи с соавт. в работе [79] привели результаты исследования *in vivo* на мышах, подвергавшихся воздействию ЭМП с величинами магнитной индукции 0,1, 0,2, 1

или 2 мТ при частоте 50 Гц в течение 7 дней по 15 часов в день. Они показали, что уровень повреждения ДНК (разрывы нитей) увеличился в клетках головного мозга мышей CD1, подвергшихся воздействию ЭМП с индукцией 1 и 2 мТ. Однако, в более позднем своем исследовании М. Вилларини и соавт. [80] не обнаружили повреждений ДНК в клетках нейробластомы человека, подвергнутых воздействию переменным ЭМП частотой 50 Гц (0,01, 0,1 или 1 мТл) в течение 1 часа непрерывно или 5 часов с перерывами (15 минут включения/15 минут перерыва).

Имеются сообщения, в которых отмечается отсутствие влияния ЭМП на молекулу ДНК [81 – 86]. С.Г. Хавлер и соавт. [81] изучали транскрипцию *Escherichia coli* K-12 MG1655 в ответ на действие ЭМП, генерируемое тремя типами сигналов (непрерывный синусоидальный, прерывистый синусоидальный и прерывистый силовой сигнал). Экспрессию генов контролировали с помощью полногеномного микрочипа Affymetrix. Бактериальные клетки выращивали в инкубаторе с постоянной температурой в среде с ограничением глюкозы и подвергали воздействию ЭМП частотой 50 Гц с магнитной индукцией 1 мТл. Для всех трех типов используемого ЭМП не изменились ни рост бактерий (определяемый по величине оптической плотности суспензии), ни количество культивируемых клеток. Также не было обнаружено статистически значимого изменения в экспрессии 4358 генов и 714 межгенных областей, представленных на чипе гена, после воздействия ЭМП в течение 2,5 ч (1,4 поколения) или 15 ч (8,7 поколения). Кратковременное воздействие в течение 8 мин синусоидального непрерывного сигнала и прерывистого сигнала также не влияло на рост бактерий и не показало достоверных изменений в транскрипции.

В исследованиях авторов статьи [82] не было выявлено повышения общего внутриклеточного уровня АФК в кардиомиоцитах AC16 после воздействия ЭМП частотой 50 Гц с магнитной индукцией 100 мкТл как *in vitro*, так и *in vivo*. Дж. П. МакНейм и др. также не выявили значимого увеличения повреждений ДНК в клетках головного мозга крыс и мышей после 2-часового воздействия ЭМП *in vivo* с параметрами 0 – 2 мТл и частотой 60 Гц [83]. Никаких эффектов повреждения ДНК не наблюдалось и в исследованиях *in vitro*, проведенных Л. Су с соавт.,

которые изучали линии нейрогенных опухолевых клеток крыс, подвергнутых воздействию ЭМП частотой 50 Гц в течение 24 часов [84], а также и в работах других групп исследователей [85 – 86].

Большое количество публикаций посвящено эпидемиологическим исследованиям генетических повреждений у людей, подвергающихся воздействию ЭМП и сравнению генотоксического действия ЭМП разных частот [87 – 92]. В монографии [3] отмечается, что косвенное воздействие на ДНК может быть обусловлено нерегулярным высвобождением в клетках окислительных свободных радикалов или гидролитических ферментов, например ДНКаз, которое может происходить после действия ЭМП на ионные каналы клеточных мембран.

В исследование авторов работы [93] были включены 32 пациента с гиперчувствительностью к действию ЭМП для оценки окислительного стресса и ответа на антиоксидантный стресс. 30–50% пациентов продемонстрировали статистически значимое повышение средних значений малонового диальдегида, окисленного глутатиона GSSG в плазме по сравнению с нормальными значениями, полученными у здоровых лиц контрольной группы ($P < 0,0001$). Кроме того, в эритроцитах наблюдалось статистически значимое повышение средней активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы: у 60% и 19% ($P < 0,0001$) пациентов соответственно. В исследовании впервые сообщается, что у 80% пациентов с синдромом гиперчувствительности в периферической крови обнаруживается несколько определяемых биомаркеров окислительного стресса.

Повреждения ДНК часто коррелируют с онкотрансформацией [94 - 96]. В связи с этим Юутилайнен Й. и соавт. в статье [95] обсуждают проблему «магнитокарциногенеза» и вопрос о существовании механизма канцерогенного действия НЧ ЭМП. Авторы отмечают, что НЧ ЭМП было классифицировано как потенциально канцерогенное в основном на основе эпидемиологических выводов, предполагающих связь между детской лейкемией и ЭМП частотой 50/60 Гц от линий электропередач.

Таким образом, хотя во многих исследованиях отмечается генотоксичность низкочастотного ЭМП, приведенные результаты и полученные выводы

исследовательских групп довольно противоречивы. Это может быть связано с использованием различного оборудования для генерации ЭМП, условий воздействия, протоколов экспериментов и биологических материалов, принятых исследовательскими группами. Д. Панагополус в серии статей [97 – 100], анализируя результаты подобных исследований, задается вопросом: в чем разница между естественным магнитным полем (МП) в земной среде, физиологическим МП клеточных мембран и искусственным МП, которые используются в исследованиях? По его мнению, поле земных и клеточных мембран статично и значительно поляризовано. Обычно оно не сильно различается по интенсивности, а колебания в 20–30% вызывают клеточные эффекты. Используемое в исследованиях искусственное МП полностью поляризовано и при этом (особенно микроволновое и телекоммуникационное поле) сильно изменяется во времени, превышая до 100% нормальную среднюю интенсивность.

В последние годы накоплен большой массив данных по воздействию ЭМП с частотами от 300 МГц до 300 ГГц на АФИ, а также по влиянию данного излучения на живые организмы и связанной с этим опасности для здоровья человека [3, 6, 26, 101 – 109]. Из-за постоянно расширяющегося использования электроприборов и систем мобильной связи, воздействие ЭМП на рабочих местах и в общественных пространствах стало широко обсуждаемым фактором риска для здоровья. В бытовых, промышленных, научных радиодиапазонах наиболее распространенной частотой является 2,45 ГГц, хотя в здравоохранении используется ЭМП и на частотах, отличных от 2,45 ГГц [10 – 12]. Спрос на исследования нетепловых эффектов СВЧ и КВЧ ЭМП обусловлен быстрым развитием новых электронных беспроводных устройств связи. Уже в первых экспериментальных исследованиях было показано, что биологические эффекты СВЧ и КВЧ ЭМП проявляются при малых значениях мощности излучения - нетепловых, при которых интегральный нагрев облучаемой поверхности не превосходит физиологически значимого приращения температуры, равного примерно 0,1°C [9]. Несмотря на то, что стандартизованные характеристики ЭМП, применяемого в промышленности, медицине, в компьютерных и коммуникационных технологиях, не должны

превышать допустимых нормативных пределов, реальное воздействие на биологические системы излучений, обусловленное современными промышленными и технологическими процессами, до сих пор является предметом активного изучения [109 – 120] и совершенствования современных методов контроля [5 – 7].

Группа японских исследователей И. Зотансиама и соавт. в работе [110] изучали влияние ЭМП частотой 1,8 ГГц (стандарт GSM) на антиоксидантный статус и накопление повреждений ДНК в лимфоцитах периферической крови людей, проживающих в непосредственной близости от базовых станций мобильной связи, и сравнение со здоровыми донорами, проживающими в радиусе более 500 м от базовых станций (контрольная группа). Исследуемые группы были сопоставлены по различным демографическим данным, включая возраст, пол, режим питания, привычку курения, употребление алкоголя, продолжительность и среднесуточное использование мобильного телефона. Плотность мощности ЭМП у подвергшихся воздействию людей была значительно выше ($p < 0,0001$) по сравнению с контрольной группой. Анализ данных группы ($n = 40$), проживающей в радиусе 80 м от базовых станций, показал значительно ($p < 0,0001$) более высокую частоту микроядер по сравнению с контрольной группой. Было выявлено снижение концентрации глутатиона (GSH) ($p < 0,01$), активности каталазы (CAT) ($p < 0,001$) и супероксиддисмутазы (SOD) ($p < 0,001$) и повышение перекисного окисления липидов (LOO) в лимфоцитах крови по сравнению с контрольной группой. Множественный линейный регрессионный анализ выявил значительную связь между снижением концентрации GSH ($p < 0,05$), активности CAT ($p < 0,001$) и SOD ($p < 0,001$) и повышением частоты микроядер ($p < 0,001$) и LOO ($p < 0,001$) с увеличением плотности мощности ЭМП.

Особое внимание в литературе уделено анализу сообщений о роли КВЧ и СВЧ ЭМП в индукции окислительного стресса и появлении повреждений молекулы ДНК. В обзоре [109] авторы, рассматривая экспериментальные данные об окислительных эффектах КВЧ и СВЧ ЭМП в живых клетках, отмечают значительную активацию ключевых путей, генерирующих АФК, увеличение

перекисного окисления, окислительное повреждение ДНК и изменения в активности антиоксидантных ферментов. Обзор публикаций показал, что из 100 рецензируемых исследований, посвященных окислительным эффектам ЭМП миллиметрового диапазона, в 93 приводятся данные, подтверждающие, что это излучение вызывает окислительные эффекты в биологических системах. Широкий патогенный потенциал индуцированных АФК и их участие в сигнальных путях клеток объясняет ряд биомедицинских эффектов КВЧ и СВЧ ЭМП [109].

К. Мегха и др. в работе [26] приводят результаты воздействия ЭМП частотами 900, 1800 и 2450 МГц на крыс линии Fischer. Авторы пришли к выводу, что хроническое действие данного излучения приводит к частотно-зависимому значительному увеличению маркеров окислительного стресса, а именно малонового диальдегида, карбонила белка (PCO) и каталазы, в группах, подвергнутых воздействию микроволн, по сравнению с группой, ложно подвергнутой воздействию ($p < 0,05$). Также отмечалось достоверное увеличение уровней провоспалительных цитокинов (IL-2, IL-6, TNF- α и IFN- γ) у животных, подвергшихся воздействию неионизирующего микроволнового излучения ($p < 0,05$).

Генерацией АФК в водной среде под действием ЭМП могут быть опосредовано и появление структурных повреждений ДНК, связанных с образованием одно- и двухнитевых разрывов [111 – 112]. Однонитевые разрывы (ОР) являются одним из наиболее частых видов повреждений ДНК и, как и двухцепочечные разрывы, возникают в физиологических условиях, при патологических процессах [113], окислительном стрессе [114] или воздействии ионизирующего излучения [115].

В статьях [116 – 118] обобщены результаты обследования ликвидаторов Чернобыльской аварии спустя несколько лет после катастрофы. Через 24 года после аварии оказалось, что в лимфоцитах крови ликвидаторов уровни ОР и двухцепочечных разрывов ДНК увеличены в несколько раз, также повышена частота клеток с хромосомными aberrациями. ОР ДНК сопровождают действие многих агентов и являются вторичными, промежуточными дефектами при

репарации. Повсеместность этих структурных повреждений ДНК сочетается с устойчивым представлением об их нелетальности [110], но в ряде клеток ОР ДНК способны индуцировать апоптоз [104]. ОР репарируются на всех стадиях клеточного цикла. Т. Хелледей и др. [111] выделяют две основные системы репарации ОР ДНК: гомологичную рекомбинацию и нехомологичное соединение концов.

Проведены исследования влияния КВЧ и СВЧ ЭМП на ДНК с целью оценки способности этого воздействия вызывать ОР и двухцепочечные разрывы ДНК и, следовательно, иметь мутагенный потенциал [102, 104]. Авторы работы [102] изучали влияние непрерывного ЭМП частотой 2,45 ГГц на появление разрывов цепей ДНК в клетках мозга крыс. Усредненная плотность мощности ЭМП составила 2 мВт/см^2 , что дало среднюю удельную скорость поглощения для всего тела $1,2 \text{ Вт/кг}$. ОР и двухцепочечные разрывы ДНК в отдельных клетках мозга измеряли через 4 часа после воздействия с помощью анализа микрогель-электрофореза. Наблюдалось увеличение обоих типов разрывов цепей ДНК после воздействия ЭМП указанных параметров. Авторы предположили, что эти эффекты могут быть результатом прямого действия электромагнитной энергии на молекулы ДНК и/или нарушения механизмов восстановления повреждений ДНК в клетках мозга.

Дж. Бехари и др. [104] изучали зависимость уровня ОР ДНК в клетках мозга крыс от продолжительности облучения животных *in vivo* неионизирующим микроволновым излучением на частотах 2,45 и 16,5 ГГц, 1,0 и 2,01 Вт/кг с помощью кометного анализа. Клетка размером $13 \times 9,8 \text{ см}$ с крысами была размещена симметрично по средней линии пирамидальной рупорной антенны. Воздействие осуществляли в течение 2 ч/день в течение 35 дней при плотности мощности $0,344 \text{ мВт/см}^2$. Исследование показало, что воздействие КВЧ и СВЧ ЭМП вызывает статистически значимое увеличение ($p < 0,001$) количества ОР ДНК в клетках головного мозга крыс. Авторы отмечают, что, различные ткани или типы клеток различаются по своей восприимчивости к действию КВЧ и СВЧ ЭМП,

именно поэтому в литературе сообщаются, как они полагают, противоречивые результаты для разных типов клеток млекопитающих.

М.В. Чжан и др. [103] изучали сочетанное действие *in vitro* КВЧ и СВЧ ЭМП на частоте 2,45 ГГц (5,0 мВт/см²) и митомицина С на лимфоциты человека с использованием анализа гель-электрофореза отдельных клеток с помощью кометного анализа и теста микроядер с блокировкой цитокинеза. Они обнаружили генотоксические эффекты и ОР ДНК и пришли к выводу, что действие КВЧ и СВЧ ЭМП вызывает усиление эффектов повреждения ДНК лимфоцитов, вызванных митомицином С.

1.1.1 Действие электромагнитного поля на водные растворы активных фармацевтических ингредиентов

В последнее время уникальные физико-химические и фармакологические свойства нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), позволяющие воздействовать непосредственно на молекулярные мишени по принципиально иным механизмам, нежели при применении используемых в настоящее время лекарственных препаратов (ЛП) другой природы, активно используются в фармации. Такие ЛП разрабатываются на основе фрагментов природных нуклеиновых кислот или искусственно созданных генетических конструкций – олигонуклеотидов, которые избирательно воздействуют на генетические программы, ответственные за развитие ряда патологических процессов. Как отмечают авторы обзорной статьи [121], особые механизмы действия синтетических олигонуклеотидов определяют высочайшую специфичность их взаимодействия с мишенями, абсолютно недостижимую при использовании многих ЛП.

ЛП на основе нуклеиновых кислот используются для лечения различных заболеваний: онкологических и сердечно-сосудистых; неврологических (болезни

Паркинсона и Альцгеймера); тяжёлых наследственных нарушений развития; вирусных инфекций, входят в состав иммунобиологических и биотехнологических ЛП, включая ДНК-вакцины (ОФС.1.7.1.0013.18). Некоторые примеры ЛП на основе нуклеиновых кислот: «Деринат» — натриевая соль низкомолекулярной нативной ДНК, полученной из молок осетровых рыб; «Нуклеинат натрия» — препарат микробного происхождения, смесь натриевых солей нуклеиновых кислот, получаемая гидролизом дрожжей с последующей очисткой; «Ридостин» — препарат рибонуклеиновых кислот, полученный из лизата дрожжей, используется в качестве иммуномодулятора, интерфероногена, противовирусного, противомикробного и противоопухолевого средства.

Показано, что природные активные фармацевтические ингредиенты (АФИ), такие, как ДНК и некоторые белковые молекулы, могут изменять свою структуру при воздействии ЭМП разных частотных диапазонов [3]. Изучено влияние КВЧ и СВЧ ЭМП на водные растворы бесклеточной ДНК. Так, Ю. С. Бабаян и соавт. в работах [122 – 124] привели результаты исследования плотности и термостабильности водно-солевых растворов ДНК, облученных КВЧ и СВЧ ЭМП. Авторы показали, что термостабильность молекул ДНК связана с их дегидратацией и увеличивается на «резонансной» (термин авторов) частоте поля. Важную роль в стабилизации двойной спирали играет гидратация азотистых оснований ДНК. Доказательством этого являются расчеты минимальной энергии взаимодействия оснований ДНК с молекулами воды, приведенные Э. Гонсалесом и соавт. в статье [125]. Расчеты показали, что даже одной молекулы воды достаточно, чтобы изменить геометрию гидратного комплекса ДНК, образующаяся при этом структура очень чувствительна к внешним воздействиям.

Действие низкоинтенсивного НЧ ЭМП на бесклеточную ДНК изучали Л. Монтанье и соавт. в работах [126 – 128]. Авторы использовали водные растворы бактериальных и вирусных ДНК высокой степени разведения от 10^{-2} до 10^{-14} М. Авторы указали на способность коротких фрагментов ДНК длиной 487 нуклеотидных пар «испускать» электромагнитные волны, предположив, что это явление запускается фоновым ЭМП «сверхнизкой» частоты. Растворы помещали

внутри обмотки соленоида, через который в течение 18 часов протекал ток малой интенсивности с частотой 7 Гц. Затем для каждого раствора регистрировали электромагнитный сигнал с помощью детектора, который представлял собой соленоид, реагирующий на магнитную составляющую излучения ДНК и преобразующий ее в электрические сигналы. Такой процесс трансдукции также наблюдался и в живых клетках человека, подвергнутых обработке ЭМП. Полученные эффекты Л. Монтанье и соавт. объяснили изменением структуры воды, окружающей короткие фрагменты ДНК, считая, что молекулы воды в жидком среде взаимодействуют друг с другом не только статически через водородные связи и электрические диполь-диполи, но и, что их взаимовлияние индуцируется зависящей от времени когерентной молекулярной согласованностью на большие расстояния. В работе [128] представлен анализ данного явления с точки зрения квантовой теории поля.

Геномный материал считался основным носителем информации, определяющим все процессы, происходящие в клетках. Между тем, как обсуждается в работах [129 – 131], в клетке существуют негенетические механизмы формирования и передачи информации, связанный с динамикой белковых молекул. В.Я. Александров в монографии [129] отмечает, что физико-химические свойства белков изменяются фазовым образом при внешних воздействиях. Эти идеи получили современное развитие в виде формулировки концепции протореакций, которые, согласно взглядам, изложенным в работе [130], являются обратимыми фазовыми переходами белков, возникающими в результате изменения зарядовых и гидрофильно-гидрофобных свойств белковых молекул. Предполагается, что специфический ответ клетки, вызванный действием раздражителей, связан с изменением конформации рецепторных белков и ферментов, расположенных как в цитоплазме, так и в клеточной мембране, при этом конформация макромолекулы зависит от взаимодействия отдельных частей молекулы как между собой, так и с компонентами водной фазы.

Известны два термодинамически стабильных состояния белка: состояние плотной упаковки и, так называемое, состояние «расплавленной глобулы» (термин

автора [129]). В промежуточном состоянии «расплавленной глобулы», как правило, гидрофобная фракция поверхности уменьшается, степень гидратации возрастает [130], а число ионогенных реакционноспособных групп увеличивается. Триггерами перехода белка из нативного состояния в промежуточное являются различные факторы: изменение pH, воздействие ЭМП, изменение уровня АФК или ионной силы раствора [132 – 134]. Изучено влияние сочетанного действия постоянного и переменного ЭМП на водные растворы аминокислот и белков. Показано, что ЭМП может влиять на конформацию макромолекул белков, в результате чего изменяются их функции [134].

Особый интерес представляют работы, посвященные изучению влияния ЭМП на конформационные характеристики альбуминов. Альбумин 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) [135].

Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) - негликозилированный белок, первичная последовательность которого была независимо определена Дж. К. Брауном и Б. Мелонном. Глобулярный белок семейства альбуминов, изоэлектрическая точка pI 4,7, молекулярная масса 66,4 кДа. Структурная подвижность обеспечивается петлевой укладкой полипептидной цепи, состоящей из 585 аминокислотных остатков. За синтез ЧСА отвечает единственный ген, расположенный на длинном плече хромосомы 4. Центр молекулы содержит гидрофобные радикалы, позволяющие ей связываться со многими лигандами, а внешняя часть содержит гидрофильные радикалы, что обеспечивает полифункциональность действия [136 – 138].

Вещества, токсичные в свободном состоянии, становятся нетоксичными при связывании с альбумином [139 – 140]. Антиоксидантная активность ЧСА в плазме крови обусловлена окислительно-восстановительными свойствами аминокислотного остатка Cys-34. Сульфгидрильные группы занимают особое

место в регуляции конформационных переходов молекулы. ЧСА в плазме преимущественно находится в форме меркаптоальбумина.

Помимо поддержания осмотического давления крови и белкового резерва организма, ЧСА выполняет важную функцию, осуществляя транспорт разнообразных эндогенных и экзогенных низкомолекулярных веществ гидрофобной и амфифильной природы [140 – 142]. Транспортная функция ЧСА базируется на способности обратимо связывать лиганды различного химического строения: биологически активные вещества [141], жирные кислоты [140], неорганические ионы [143], а также ЛП и их метаболиты [141 – 142].

В терапии широко применяется его способность к разворачиванию/рефолдингу и связыванию экзогенных/эндогенных лигандов [135]. По выражению авторов обзора [142], ЧСА является потенциальным претендентом на роль молекулярного «нанотранспортного средства» для клинических, фармацевтических и промышленных целей, структура и функции которого в значительной степени регулируются различными химическими и физическими факторами.

С помощью кристаллографического анализа показано, что молекула ЧСА и рекомбинантная форма рЧСА представляет собой асимметричную сердцевидную глобулу размерами около $80 \times 80 \times 30$ Å. Полипептидная цепь белка на 67% свернута в α -спираль [138]. В молекуле ЧСА существует ограниченное число мест связывания лигандов, по идентификации которых работа Г. Садлоу и соавт. [144] считается основной. В ней авторы выделили в белковой молекуле 2 лиганд-связывающих центра, которые назвали центрами связывания (областями) I и II. В центр связывания I в домене II входит единственный остаток триптофана в молекуле альбумина человека – Trp-214.

Рентгеноструктурный анализ подтвердил, что ЧСА состоит из трех однотипных доменов (на рисунке 1.1 обозначены I – III), каждый из которых включает два субдомена (на рисунке 1.1 обозначены А и В). Центр I представляет собой область в субдомене IIА, причем гидрофобные участки белковой цепи этой

области вывернуты во внутреннюю полость, а вход в область окружен положительно заряженными аминокислотными остатками.

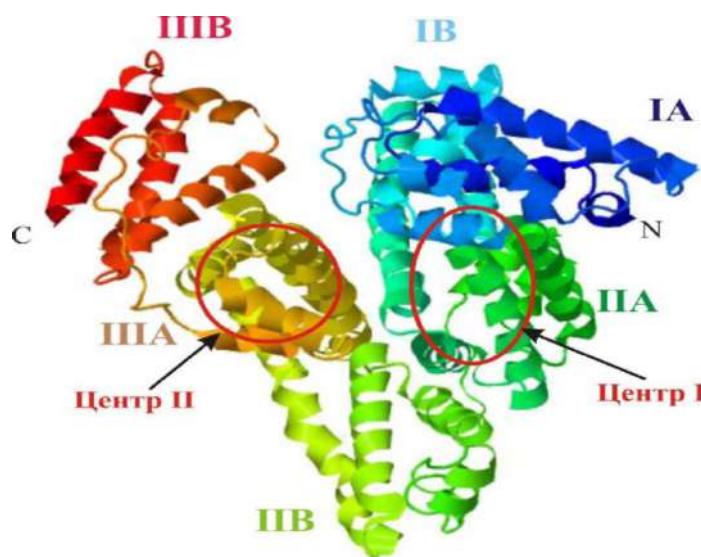


Рисунок 1.1 – Структура человеческого сывороточного альбумина согласно статье [144]. Обозначено разделение альбумина на домены (I – III) и субдомены (A и B) и локализация центров связывания.

В водных растворах известно о существовании нескольких конформеров ЧСА в зависимости от pH:

1. При кислых pH 2,5 – 3,7 существует развернутая E-форма (необратимая) с разрушенным спиральным центром связывания I, который содержит аминокислотный остаток Trp-214.

2. При pH 3,7 – 4,5 образуются две формы - F и F'. За счет обратимого перехода из нативного состояния происходит потеря спиральности до 44% и открытие гидрофобных областей, при этом повышается доступность остатков имидазола, скрытых в N-форме.

3. При pH 4,7 – 6,0 наблюдается нативная N-форма.

4. При pH > 6,0 образуется B-форма, в которой изменяется микроокружение аминокислотных остатков Trp, Tyr, His.

Влияние ЭМП с магнитной индукцией < 50 мкТ на структурные перестройки альбуминов изучали авторы работ [145 – 146]. Ю.В. Цейслер и соавт. показали, что

40-минутное электромагнитное воздействие (частота варьировалась от 0 до 100 Гц, магнитная индукция составила 25 мкТл) изменяло флуоресцентные свойства сывороточного альбумина человека, причем характер этих изменений зависел от частоты ЭМП: воздействие полем с частотами 46 Гц, 56–68 Гц, 72–74 Гц и 85 Гц увеличивало максимальную интенсивность флуоресценции, а полем частотами 2 Гц, 12–26 Гц, 36 Гц, 52–56 Гц, 76 Гц, 80 Гц приводили к ее снижению [145].

Е.Е. Фесенко и соавт. [146] обнаружили, что вода различного ионного состава, предварительно обработанная постоянным (40 мкТл) и переменным ЭМП (0,06 мкТл), изменяет собственную флуоресценцию сывороточного альбумина. Авторы предположили, что ЭМП влияет на структурную организацию водной среды вокруг белковых молекул и, тем самым, изменяется конформация альбумина. С помощью гель-хроматографии с использованием Sephadex G-25 Superfine и Toyopearl HW-20 в качестве матриц и очищенной воды в качестве элюента они показали наличие в растворе после электромагнитной обработки стабильного молекулярного ассоциата с молекулярной массой 700 - 900 Да. Это позволило авторам утверждать, что инициатором процесса образования таких ассоциатов является воздействие ЭМП на водный раствор альбумина.

1.1.2 Использование эффектов электромагнитного воздействия в медицинских исследованиях и медицине

ЭМП различных частотных диапазонов широко используется в медицинской практике. Первое использование микроволн в медицине в области лечения онкологии посредством абляционной терапии относится к 1980-м годам [9]. С тех пор использование КВЧ ЭМП в здравоохранении значительно расширилось, особенно в области создания и использования терапевтических устройств, а также

для приложений визуализации и зондирования [10 – 12]. Создано большое количество разнообразных приборов («Порог», «Явь», «Электроника КВЧ», «Стелла-2» и др.), активно разрабатываются и совершенствуются соответствующие методические рекомендации и пособия для врачей в области КВЧ-терапии в сочетании с другими методами [147]. Например, прибор «Явь-1», как указано в инструкции, предназначен для лечения язвенных и онкологических заболеваний, регенерации костных и мягких тканей [148]. Между тем, Бецкий О.В. сформулировал основные проблемы КВЧ-терапии, которые до сих пор не разрешены: недостаточность знаний о механизмах действия и объективизации эффектов, вызываемых КВЧ ЭМП, и отсутствие достоверных клинических исследований [9, 147]. Этот вывод поддерживают Москвин С.В. и Хадарцев А.А. в книге [147], в которой приводится сводная таблица эффектов биологического действия СВЧ и КВЧ ЭМП. Биологические эффекты наблюдаются в очень широком диапазоне, от 428,3 ГГц до 6,38 ГГц, причем на одинаковых частотах поля получены прямо противоположные результаты [147].

В то время как большинство исследователей сосредоточили внимание на изучении негативного действия НЧ ЭМП на живые организмы, имеется большое количество данных о том, что использование ЭМП с магнитной индукцией мкТ- и мТ-диапазонов в клинической практике ускоряет заживление ран, увеличивает восстановление опорно-двигательного аппарата и скорость восстановления костной ткани при переломах. Иногда магнитотерапия является одним из незаменимых методов неинвазивного лечения ряда патологий: остеопороза, несрастающихся переломов или травм костей и др. [149 – 150].

НЧ ЭМП применяется для лечения заболеваний костей в течение многих лет, хотя используемые при этом параметры поля подбираются разработчиками эмпирически. Авторы обзора [149] суммировали общие терапевтические параметры (частоту и интенсивность) основных типов ЭМП, используемых для лечения костных клеток, взятые из 32 статей, опубликованных с 1991 по 2018 год, и пришли к выводу, что импульсное ЭМП способствует пролиферации остеобластов, когда его частота составляет 7,5–15 Гц или 50–75 Гц, а магнитная

индукция составляет 0,40–1,55 мТл или 3,8–4 мТл. Синусоидальное ЭМП с 0,9–4,8 мТл и 45–60 Гц и статическое ЭМП с магнитной индукцией 0,1–0,4 мТл или 400 мТл могут способствовать дифференциации и созреванию остеобластов.

Авторы статьи [151] изучали влияние длительного воздействия ЭМП с магнитной индукцией 1,5 мТл по 4 часа в день в течение 6 месяцев на костеобразование у крыс с овариэктомией. Минеральную плотность кости, костеобразование и резорбцию оценивали с использованием костно-специфической щелочной фосфатазы, остеокальцина, остеопротогерина и N-телопептида. Через 6 месяцев терапии с использованием ЭМП минеральная плотность костной ткани и определяемые показатели были достоверно выше, чем в контрольной группе и до терапии. На основе этого авторы работы [151] пришли к выводу, что остеопороз можно подавить путем электромагнитной стимуляции.

Внимание многих исследователей сосредоточено на способности ЭМП (<300 Гц, синусоидальная форма) влиять на скорость протекания клеточных процессов [152 – 164]. Результаты исследований, опубликованные в работах [156, 159 – 160, 163, 165], показали, что воздействие ЭМП может способствовать пролиферации клеток, в частности, амниотических клеток человека [159] и лимфоцитов [158, 165 – 166]. В то же время другие исследователи утверждают, что воздействие ЭМП, наоборот, ингибирует пролиферацию [152, 164].

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются мультипотентными, способными дифференцироваться в различные клеточные линии. Изменение дифференциации МСК с помощью ЭМП является важной областью исследования таких клеток. Основываясь на влиянии ЭМП на различные клеточные процессы, авторы в статье [161] пришли к заключению, что электромагнитное воздействие с «контролируемым сигналом» можно использовать для обеспечения наибольшего воздействия на МСК и обсуждают механизмы, лежащие в основе этого явления.

Дж. Ян и др. в работе [163] приводят результаты изучения влияния переменного ЭМП на пролиферацию эпидермальных стволовых клеток (чЭСК). Последние выделяли, размножали *ex vivo*, а затем с экспозицией 30 мин/сут подвергали воздействию синусоидальным ЭМП с магнитной индукцией 5 мТл и

частотами 1, 10 и 50 Гц в течение 3, 5 или 7 дней. Были исследованы пролиферация клеток, клеточный цикл и фенотип. Действие ЭМП достоверно увеличивало пролиферацию чЭСК в культуральной среде частотно-зависимым образом с наибольшей скоростью пролиферации клеток при 50 Гц ($p < 0,05$), а также увеличивало процент клеток в S-фазе клеточного цикла, сочетая со снижением доли клеток в фазе G1 ($p < 0,05$), но последний эффект не зависел от частоты.

Авторы работы [152] высказали гипотезу, что действие ЭМП *in vivo* оказывает ингибирующее влияние на ожирение: мыши с ожирением теряли вес и жир при воздействии поля. Авторы предположили, что ингибирующее действие ЭМП на ожирение может быть связано с влиянием поля на дифференциацию МСК в адипоциты. Они исследовали действие ЭМП частотой 7,5 Гц и магнитной индукцией 0,4 мТл на дифференциацию МСК, выделенных из пуповины человека, и обнаружили, что данное воздействие ингибировало адипогенную дифференциацию МСК (действие 2 ч/день в течение 15 дней), но не влияло на остеогенную дифференциацию. Полученные данные подтвердили предположение авторов, что ингибирующее действие ЭМП на ожирение может быть связано с ингибированием дифференцировки МСК в адипоциты. Авторы полагают, что это является потенциальным подходом к лечению ожирения.

В последние десятилетия ЭМП с магнитной индукцией в мк- и мТл диапазоне заняло особое место в области изучения лечения рака [162, 167 – 174]. Лечение рака и возможности его терапии ограничены в таких случаях, как неоперабельность опухоли, рак головного мозга, когда лекарства не могут проникнуть через гематоэнцефалический барьер, или отсутствует специфическая мишень для генерации эффективных терапевтических антител [28]. Несмотря на то, что ЭМП в медицине достаточно долго используется в терапевтических или диагностических целях, применение ЭМП для лечения рака является новой, развивающейся концепцией.

Авторы работы [164] исследовали различные линии раковых клеток человека (BGC-823, MKN-45, MKN-28, A549, SPC-A1 и LOVO) после воздействия НЧ ЭМП *in vitro*. Была оценена способность поля влиять на рост клеток посредством

экспрессии мидкинов. Пролиферацию клеток и клеточный цикл определяли с помощью проточной цитометрии, ультраструктуру клеток наблюдали с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Результаты показали, что воздействие переменного ЭМП (0,4 мТл, частота 7,5 Гц) ингибировало пролиферацию клеток линий BGC-823, MKN-28, A549 и LOVO, но не влияло на клетки MKN-45 и SPC-A1. Анализ клеточного цикла показал, что действие ЭМП приводило к значительному увеличению S-фазы и модификации органелл в клетках BGC-823. Авторы предположили, что ЭМП может подавлять пролиферацию опухолевых клеток и нарушать клеточный цикл.

Китайские ученые в своих исследованиях [170 – 171] сосредоточились на изучении мышинной модели метастатической меланомы легких и на механизме регуляции дифференцировки Treg-клеток и гепатокарциномы H22 под воздействием НЧ ЭМП *in vivo*. Мыши с опухолями подвергались воздействию ЭМП (0,4 мТл, 7,5 Гц) по 2 часа в день в течение 27 дней. По сравнению с контрольной группой, экспрессия матриксных металлопротеиназ, фактора транскрипции Foxp3 (forkhead box P3) и скорость дифференцировки Treg-клеток в легочных узлах значительно снизилась в группе, подвергавшейся воздействию ЭМП. Авторы полагают, что полученные данные показывают, что воздействие НЧ ЭМП усиливало ингибирующее действие АФК на путь АКТ и снижало экспрессию Foxp3, что объясняет, почему данное воздействие может усиливать противоопухолевый эффект в изучаемой модели.

Ф.П. Коста и соавт. в статье [172], на основании полученных ими результатов лечения 41 пациента с запущенной гепатоцеллюлярной карциномой и ограниченными терапевтическими возможностями, пришли к выводу, что лечение с помощью внутривенного введения амплитудно-модулированных ЭМП является безопасным, хорошо переносимым и демонстрирует признаки противоопухолевого эффекта.

Исследователи также используют ЭМП с магнитной индукцией равной и более 20 мТл [165, 173]. В работе [165] авторами исследовалось влияние синусоидального ЭМП с индукцией 20 мТл частотой 50 Гц на пролиферацию

клеток, концентрацию ионов и осмолярность в двух линиях человеческих раковых клеток (HL-60 и SK-Nep-1). Отмечено ингибирование роста клеток в среднем на 20% через 4 дня воздействия и увеличение концентрации ионов Na^+ , K^+ и осмолярности в супернатанте клеток по сравнению с контрольной группой. Ингибирование роста клеток ЭМП *in vitro* авторы связывали с изменениями концентрации ионов в клетках и осмолярности.

М. Радева и Г. Берг [173] измеряли летальный ответ культивируемых раковых клеток линий K-562, U-937 и HL-60 непосредственно после 4-часового воздействия пульсирующим ЭМП (синусоидальная форма, 35 мТл, 50 Гц) и спустя 24 часа после воздействия для определения эффекта. Они обнаружили, что на результаты влияли среда, значение pH, проводимость и температура. Из результатов этих экспериментов выбраны условия для сравнения жизнеспособности клеток K-562 (лимфобласты, хроническая миелоидная лейкемия) и нормальных человеческих лимфоцитов после обработки ЭМП и фотодинамического воздействия. Действие ЭМП усиливало некроз как больных, так и здоровых клеток, но лимфоциты были более устойчивыми.

Отмечается, что стрессовая реакция, вызванная действием ЭМП, сопровождается активацией специфических сигнальных трансдукций и каскадов, участвующих в регуляции пролиферации, дифференцировки и метаболизма раковых клеток. Некоторые из сигнальных путей играют значительную роль в синтезе белков через РНК-полимеразу III и ферменты онкогенных путей [174] и, таким образом, могут обеспечивать связь между развитием рака и воздействием ЭМП.

Во многих исследованиях обсуждается сочетанное воздействие ЭМП и противоопухолевых лекарственных средств для защиты нецелевых тканей от повреждения [73 – 75, 167 – 169, 175]. Иранские учёные в серии своих статей [73 – 75] опубликовали данные о том, что синусоидальное НЧ ЭМП (0,50 мТл, частота 50 Гц) влияет на экспрессию генов эксцизионной репарации NER и NHEJ. Они обнаружили значительное подавление генов репарации опухолевой ДНК при обработке ЭМП суспензии клеточных линий карциномы молочной железы

человека и эпителиальных нейробластов в присутствии цисплатина и морфина, чем без обработки полем. Как отмечают М.С. Джойнер и О. Дж. ван дер Когель в монографии [176], под влиянием цисплатина наблюдается увеличение числа ОР ДНК, индуцированных ЭМП, а также происходит влияние на ферменты, участвующие в восстановлении целостности структуры ДНК и хромосом.

Аналогичные параметры ЭМП использовали авторы работы [175] в сочетании с β -лапахоном и морфином для ингибирования роста клеток нейробластомы человека SH-SY5Y и экспрессии ряда антиоксидантных генов. Действие ЭМП приводило к генерации АФК, поскольку реакция клеток на обработку полем зависела от присутствия кислорода и образования АФК. Из приведенных литературных данных видно, что влияние ЭМП на раковые клетки и клеточные линии зависит от типа клеток и условий воздействия.

В исследовании, проведенном группой Т. Ласальвия и соавт. [166], изучено возникновение биохимических/биологических изменений в лимфомоноцитах, выделенных из периферической крови человека. Клетки подвергали воздействию СВЧ ЭМП частотой 1,8 ГГц в реверберационной камере от 1 до 20 часов. Морфологический анализ адгезивных клеток выявил в некоторых из них появление увеличенной и деформированной формы после воздействия ЭМП. Рамановские спектры ядерного компартмента клеток, подвергшихся воздействию ЭМП, выявили биохимические изменения, в основном заключающиеся в уменьшении колебательных мод, связанных с остовом ДНК. Респирометрические измерения митохондриальной активности в интактных лимфомоноцитах привели к увеличению скорости потребления кислорода в состоянии покоя после 20 ч воздействия, что было сопряжено со значительным увеличением потребления кислорода. В лимфомоноцитах, подвергшихся воздействию ЭМП, показан измененный окислительно-восстановительный гомеостаз, который прогрессировал по-разному в ядродержащих клеточных субпопуляциях. Авторы [166] предполагают возникновение адаптивных механизмов, задействованных, вероятно, через окислительно-восстановительную сигнализацию, для компенсации

ранних нарушений системы окислительного фосфорилирования, вызванных воздействием ЭМП.

СВЧ и КВЧ ЭМП применяют для лизиса и выделения ДНК в диагностических лабораториях, специализирующихся на геномных исследованиях с использованием микроволнового ЭМП [177 – 178]. Отмечается, что [178] Lyse-It является быстрым и недорогим методом подготовки образцов клеток, фрагментации ДНК и РНК, а также высвобождения и расщепления белков за один этап. Уровень фрагментации зависит от мощности и времени облучения, увеличение этих параметров воздействия приводит к усилению фрагментации ДНК.

ЭМП активно используются в медицине совместно с плазмонно-резонансными наночастицами серебра (AgNP) из-за удачного сочетания бактерицидных и оптических свойств последних [35 – 42, 179 – 190].

Наночастицы - коллоидные образования с размером менее 100 нм, обладают высокими значениями удельной площади поверхности, значительно большими по сравнению с суспензиями. В настоящее время существует потребность в разработке новых форм фармацевтических объектов с использованием наноматериалов, включая плазмонные наночастицы. Однако применение таких материалов в биомедицине требует направленного проектирования, обеспечивающего их эффективность и стабильность. Кроме того, в настоящее время активно исследуются новые методы лечения, основанные на таргетной доставке лекарственных средств и фототермической терапии, активируемой наночастицами.

AgNP являются многообещающими кандидатами для нетрадиционного и эффективного применения в области фармацевтических наук. Особый интерес к AgNP в биомедицинских приложениях основан на их обширных антибактериальных, антимикотических и противовирусных свойствах, биосовместимости и эффективностью против микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью. AgNP могут: высвобождать ионы серебра; взаимодействовать с мембранными белками, влияя на их функции; накапливаться

в клеточной мембране, изменяя ее проницаемость; проникать в клетку; генерировать АФК.

В обзоре [184] рассмотрены перспективы применения AgNP в лечении онкологических заболеваний в качестве носителя лекарственных средств, а также непосредственного проявления ими цитотоксического эффекта на раковые клетки. Различные виды наночастиц серебра и материалов на их основе могут применяться в противоопухолевой терапии в качестве цитостатиков или для адресной доставки терапевтических агентов к опухоли.

Проанализированы области применения наночастиц серебра для придания или усиления антибактериальных эффектов перевязочных и стоматологических материалов. Авторами работ [186 – 187] отмечено, что антимикробные свойства AgNP проявляются за счет повреждения клеточной мембраны, а также проникновения внутрь клетки. Ингибируя ферменты дыхательной цепи, AgNP способствуют накоплению АФК, вызывая оксидативный стресс и гибель клетки.

Золотым стандартом в местном лечении ожогов является сульфадиазин серебра, полезный антибактериальный агент для лечения ожоговых ран. Однако, как отмечается в обзоре [184], недавние открытия указывают на то, что это соединение задерживает процесс заживления ран и что серебро может оказывать серьезное цитотоксическое действие на различные здоровые клетки. В значительных концентрациях наночастицы серебра вызывают денатурацию белков, повреждение мембран и молекул ДНК [37].

Одним из центральных параметров токсичности наночастиц серебра является выделение ионов серебра с последующим образованием оксидов. АФИ, главным образом белки, адсорбированные на наночастицах, изменяют свойства наночастиц и используются в качестве модуляторов их поверхности [39]. Так, авторы исследования [180] предположили, что богатые полисахаридами экзополимерные вещества морской водоросли *Thalassiosira weissflogii* могут участвовать в детоксикации Ag^+ .

Наночастицы серебра используют в качестве противовирусных агентов из-за их ингибирующей активности против множества вирусов, включая определенные

штаммы коронавируса [188 – 189], гепатита, гриппа, герпеса и вируса иммунодефицита человека на разных этапах жизненного цикла [190].

1.2 Современные механизмы действия электромагнитного поля на воду и водные растворы активных фармацевтических ингредиентов

Несмотря на большое количество накопленного экспериментального материала (см., например, монографии и обзоры [2 – 3, 23, 44, 46, 191 – 196]), природа изменения структуры и свойств природных АФИ под действием ЭМП остается до конца не выясненной.

По мнению В.Н. Бинги и А.Б. Рубина [23] убедительные механизмы воздействия ЭМП со значительной магнитной составляющей на природные АФИ должны опираться на динамику магнитных моментов, поскольку конечная угловая скорость прецессии магнитных моментов пропорциональна приложенному ЭМП и не зависит от времени явно. Кроме того, динамика магнитных моментов должна быть квантовой, так как в магнитные эффекты вовлечены спины. Поэтому к наиболее вероятным авторы относятся механизмы влияния ЭМП на спиновые магнитные моменты электронов радикальных пар, на магнитные моменты ядер и орбитального движения молекулярных групп внутри АФИ (нуклеофильных кислот, белков и в других структурах).

В.Н. Бинги и соавт. в статье [46] предположили, что первичный акт магниторецепции происходит не на молекулярном, а на субмолекулярном уровне. Для описания состояния молекулярной мишени, которая взаимодействует с ЭМП, используют полуклассическое приближение, в рамках которого рассматривается квантовая динамика частиц в классическом поле. В используемом уравнении Шредингера, записанном для частицы, ЭМП входит в виде векторного $\mathbf{A}$ и

скалярного A_0 потенциалов классического ЭМП. В квантовой электродинамике классические состояния ЭМП описываются с помощью когерентных состояний, которые соответствуют многоквантовым возбуждения поля. Авторы предположили, что ЭМП взаимодействует с мишенью многоквантово, а неравновесные состояния мишени являются основой магниторецепции.

Для характеристики чувствительности приемника используется поток энергии p , который соответствует количеству квантов $\hbar\Omega$, поглощенных мишенью за интервал времени t ее взаимодействия с полем:

$$p = n\hbar\Omega/t. \quad (1.1)$$

Предельная чувствительность мишени приемника к низкочастотному ЭМП соответствует

$$p \sim \hbar/t^2 \quad (1.2)$$

и определяется временем жизни квантового состояния мишени приемника.

При условии, что за время t регистрируется n квантов ЭМП частотой Ω и $n > 1/\Omega t > 1$, то плотность потока энергии через мишень приемника размером a будет равна:

$$S \sim p/a^2 \sim \hbar \left(\frac{n\Omega}{a} \right)^2. \quad (1.3)$$

Вероятность поглощения квантов ЭМП определяется природой мишени. От этого зависит также и то, какие из параметров молекулярной мишени и насколько изменяются за время взаимодействия поля с системой. Авторы [46] полагают, что ЭМП может играть роль управляющего сигнала, а не энергетического фактора и управлять не процессами, а вероятностями развития процессов в том или ином направлении. Таким образом, механизм трансформации ЭМП в водных растворах природных АФИ связан с контролем вероятности реакции и стабильность трансформации связана с метастабильностью мишени [46].

В работе [192] В.Н. Бинги отмечает, что в эффектах ЭМП во многих случаях наблюдаются, так называемые, «частотные окна». Линейные резонансные физические процессы не объясняют появление таких немонотонных зависимостей биоэффектов от частоты поля. Предложен нелинейный механизм для объяснения

подобных зависимостей, который рассматривает эффекты квантовой интерференции на ионах, связанных с белком. В. Н. Бинги предложил математическую модель магниторецепции, в которой рассматривается прецессия магнитного момента. В работе сделано предположение, что эффект является следствием действия ЭМП на магнитные моменты и возникает, если за время релаксации удастся внести в динамику магнитного момента заметное возмущение. Мерой возмущения является отклонение вектора магнитного момента от его невозмущенного положения. Рассмотрена динамика магнитного момента в переменном ЭМП с использованием уравнений классической динамики. Магнитный момент связан с угловым через гиромагнитное соотношение. Рассчитана зависимость угла поворота магнитного момента от времени при разных параметрах ЭМП. Показано, что наблюдаемые нетепловые эффекты ЭМП обладают частотной селективностью и нелинейной амплитудной зависимостью, когда биологический эффект падает с ростом амплитуды поля [192].

Предложенный в статье [194] механизм использует принципы гироскопического движения, устраняет необходимость постулировать большие времена жизни квантовых состояний ионов внутри полости белка и рассматривает динамику матрицы плотности молекулярных групп, которые прикреплены к стенкам полостей белка двумя ковалентными связями, так называемых, молекулярных гироскопов. Численные расчеты авторов статьи [194] показали почти свободное вращение молекулярных гироскопов при действии ЭМП.

Главным структурным элементом концепции, предложенной А.Л. Бучаченко [195] является ион-радикальная пара – приемник ЭМП и источник электромагнитных эффектов. Существование таких пар обнаружено в двух главных жизнеобеспечивающих биохимических процессах – в ферментативном синтезе АТФ и синтезе ДНК. Обе реакции обеспечивают функционирование живых организмов, обе катализируются ионами металлов (магния, цинка) и для обеих обнаружено сильное различие каталитических активностей ионов с магнитными ядрами [195]. Первой стадией синтеза является перенос электрона от фосфатной группы АДФ к Mg^{2+} , вследствие которого создается ион-радикальная

пара из окси-радикала АДФ и катион-радикала магния. Именно на эту пару воздействует ЭМП (внутреннее поле магнитного ядра ^{25}Mg и внешнее ЭМП). Магнитный изотопный эффект магния в синтезе АТФ основан на том, что в результате магнитного взаимодействия неспаренного электрона катион-радикала Mg^+ с магнитным ядром изменяется электронный спин пары окси-радикала АДФ и катион-радикала магния. Вследствие этого происходит ее спиновая конверсия из синглетного в триплетное состояние. Изменение спина открывает новый реакционный канал в радикальной паре. Таким образом, автор [195] считает, что магнитное ядро управляет электронным спином радикальной пары и ее реакционной способностью. Такое управление может производить и внешнее ЭМП. Ион-радикальная пара служит приемником ЭМП, количественная теория такого приема рассмотрена в работе [195]. На примере механизма ядерно-спинового селективного фосфорилирования с помощью креатинкиназы в присутствии изотопа ^{25}Mg показано, что увеличение выхода АТФ зависит от времени жизни ион-радикальной пары и от напряженности (Н) магнитной компоненты ЭМП. Если Н меньше магнитных взаимодействий в ион-радикальной паре, то для стационарного поля константа k_{mw} (прирост выхода АТФ по триплетному каналу) прямо пропорциональна средней мощности источника ЭМП.

Однако, если механизм радикальных пар справляется с объяснением специфической чувствительности на уровне величины магнитной индукции порядка десятков нТл, то его трудно применить при изменении величины магнитной индукции и полярности поля. Это связано с тем, что коррелированное состояние пары, чувствительное к ЭМП, сохраняется в условиях тепловых возмущений недолго, в течение 10^{-9} , в редких случаях 10^{-7} с. В то же время механизм, при котором ЭМП меняет динамику одиночного магнитного момента относительно локально выбранного направления, предложенный в работах [193 – 194], лишен этих недостатков, но достаточно абстрактен.

Существуют и другие гипотезы, объясняющие эффекты ЭМП. В.В. Ледневым в ранней работе [196] предложена модель взаимодействия ЭМП, соизмеримого или ниже уровня напряженности геомагнитного поля, с живыми

системами и водными растворами АФИ для случая импульсного и непрерывного возбуждения осцилляторов. В качестве таких осцилляторов рассматривались ионы Ca^{2+} -зависимых ферментов или ионы, находящиеся в комплексах белок-фермент. Постулировано [196], что величина эффекта, вызванного ЭМП, пропорциональна степени поляризации колебания иона. Выведены выражения для степени поляризации колебаний осцилляторов в комбинированном, статическом и переменном ЭМП. Эффект наблюдался только при ЭМП с магнитной индукцией равной или менее 50 нТл, исчезал с ростом индукции и проявлялся только на определенных частотах поля, связанных с циклотронной частотой для конкретного иона (например, кальция) формулой:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \frac{qB_0}{m}, \quad (1.4)$$

где ν – циклотронная частота иона,

q – заряд иона кальция,

m – масса иона кальция,

B_0 – величина магнитной индукции ЭМП.

Основываясь на гипотезе, предложенной В.В. Ледневым, В.В. Новиков и соавт. [197], показали, что совместное воздействие постоянного и переменного ЭМП с магнитной индукцией в нТ-диапазоне способствует образованию стабильных продуктов поликонденсации аминокислот (аспарагина, глутаминовой кислоты, аргинина и тирозина), содержащих пептидные связи, если частота переменного ЭМП соответствуют циклотронным частотам остатков аминокислот. Авторы объяснили данный эффект образованием в водной среде кластеров – полиионных образований аминокислот, взаимодействующих с ЭМП как отдельная структура. При этом, авторы полагали, что циклотронная частота кластера равна циклотронной частоте отдельного иона и с возрастанием числа ионов в кластере его полная энергия будет превышать уровень кТ, необходимый для стабилизации структуры. Как считают авторы, эффект ЭМП проявляется за счет накопления энергии в механических колебаниях ионов или кластеров из ионов. Однако, реализация механизма затруднена ввиду инерционности механических движений.

Хотя описанная гипотеза, названная «ионно-параметрическим резонансом», подтверждала наличие частотных и амплитудных «окон» действия ЭМП, но, как отмечал А.Б. Узденский в своей статье [198], не объясняла многочисленные эффекты ЭМП частотами 50/60 Гц и влияние вариаций геомагнитного поля на биологические эффекты.

Э. Гавоси и соавт. в работе [199] приводят результаты изучения влияния различных комбинаций статического и переменного ЭМП, настроенного на резонансные потенциал-зависимые внешние K^+ -токи, на клеточную линию нейробластомы человека. Токи через клеточную мембрану измеряли с помощью цельноклеточного зажима до, во время и после воздействия ЭМП. Авторы статьи не обнаружили существенных изменений плотности тока иона K^+ . Данное исследование не подтвердило гипотезу ионного резонанса на уровне потенциал-зависимых внешних K^+ -токов в условиях эксперимента, хотя и не опровергло ее напрямую.

Гипотеза об определяющей роли водной среды как основного объекта воздействия ЭМП на АФИ подтверждается исследованиями фундаментальных свойств водных растворов и их повышенной чувствительности к электромагнитному воздействию [13]. На сегодняшний день хорошо известно, что заметное влияние на воду оказывают нанопузырьки воздуха, всегда присутствующие в водных средах [14 – 16]. Эти коллапсирующие паровоздушные нанопузырьки являются центрами кавитации; их количество, размер, газовый состав и свойства поверхности существенно влияют на сонолюминесценцию воды [200]. Барботирование воды газообразным кислородом резко изменяет ее свойства при электромагнитных воздействиях: увеличивается электролитический потенциал, уменьшается угол смачивания, тормозится коррозия металла [201].

Изменение равновесия между водой и атмосферой приводит к нетривиальному поведению растворенных газов и находящихся в равновесии с внешней газовой средой, стабильных газовых нанопузырьков [14 – 16]. Н.Ф. Бункиным и А.В. Шкириным в работе [15] разработаны теоретические основы существования в чистой воде и водных растворах электролитов, находящихся в

равновесии с внешней газовой средой, стабильных газовых нанопузырьков, которые авторы называли бабстонами. В условиях равновесия нанопузырька внутреннее давление на его поверхность не может определяться только давлением содержащихся в нем частиц газа $P_g = n_g kT$, где n_g - концентрация частиц газа, так как при P_g больше атмосферного давления пузырек нестабилен и схлопывается. Стабильность газовых нанопузырьков в воде или водных растворах авторы объяснили возникновением дополнительного по сравнению с P_g давления, которое компенсирует давление Лапласа. В присутствии в воде примесей в виде ионов это пондеромоторное давление, в котором учитывается электрическая энергия, возникающая в результате адсорбции на поверхности пузырька ионов с образованием двойного электрического слоя.

С использованием трех независимых методов лазерной диагностики (лазерной интерференционной фазовой микроскопии, динамического рассеяния света, лазерной поляризационной скаттерометрии) авторы статьи [15] показали наличие частиц микронного размера, спонтанно образующихся в водных растворах NaCl. С помощью фазовой микроскопии было определено, что показатель преломления таких микрочастиц меньше, чем для окружающей жидкости, но немного выше, чем для газовой среды. Поляризационным скаттерометром измерены угловые профили элементов матрицы рассеяния света, которые имели вид, характерный для кластеров микронных размеров, состоящих из наноразмерных мономеров. Авторы пришли к заключению, что кластер является частицей Ми, а мономеры – частицами рэлеевского типа. С помощью метода динамического рассеяния света определены размеры спонтанно образующихся наночастиц, они составили от 60 до 1000 нм. Это позволило авторам сделать предположение, что наблюдаемые частицы микронных размеров возникли в результате коагуляции стабильных нанопузырьков растворенного газа.

В водных 1 М растворах NaCl оценена концентрация нанопузырьковых кластеров, равная $\approx 4 \cdot 10^5 \text{ см}^{-3}$. Концентрация этих кластеров возрастала с увеличением содержания хлорид-ионов до эффекта насыщения при концентрации ионов $> 1,5 \text{ М}$. Определено, что в водном 1 М растворе NaCl среднее число

нанопузырьков в одном кластере равно 300–700, эффективный радиус нанопузырьков составляет 40–70 нм. Внутри нанопузырьков газов могут находиться свободные электроны, возникшие в результате поверхностной ионизации [14 – 15]. Длина свободного пробега электрона в газе при н.у. составляет $\sim 10^{-4}$ см, радиусы нанопузырьков на порядок меньше этой величины. Авторы предположили, что за счет упругих столкновений (антитормозной эффект) электронов с отрицательно заряженными стенками внутри газовых нанопузырьков происходит кавитация. Полученные авторами экспериментальные результаты показали, что кавитация нанопузырьков может быть вызвана даже при амплитудах звуковой волны ~ 1 атм. В.М.

В.М. Шаталов. в работах [16, 202] объяснил эффекты электромагнитного воздействия ростом нанопузырьков газов, присутствующих в воде и биологических жидкостях (плазме крови), и диффузией газов при пульсации пузырька под действием переменного давления, создаваемого полем. При сжатии пузырька концентрация газа в нем увеличивается и газ диффундирует из пузырька в жидкость, а при расширении возникает диффузионный поток в обратном направлении [202].

Высказываются гипотезы о том, что протонный обмен и метастабильные состояния в жидкой воде могли бы отвечать за неспецифическое воздействие ЭМП. Л.Н. Галль предложила концепцию молекулярного механизма передачи энергии и восприятия сверхслабых воздействий живыми организмами, основанную на квантово-механических представлениях о формировании сигналов в анизотропных средах [203]. Рассмотрено понятие «молекулярной клетки», включающей биополимеры (молекулярный каркас клетки), межмолекулярную водную среду с ионами и примесями, а также структурированные слои воды вблизи макромолекул биополимеров [203].

Свойства воды в гидратном слое макромолекул природных АФИ существенно отличаются от свойств воды в объеме раствора. Среднее время жизни водородных связей в гидратном слое в 5 – 10 раз больше, чем в объеме воды. В серии работ [204 – 209] предложены различные модели «упорядочения» молекул воды вблизи макромолекул природных АФИ. Так, Дж. Поллак рассматривает

представление о цитоплазме клетки в виде «связанной» воды, представляющей собой гель, при этом степень связности геля определяется величиной физической адсорбции на поверхности белков, а изменения конформации белков происходят за счет изменения физико-химических свойств этого геля [204].

Э. Дель Гжудичи с соавт. предложили теорию «связанной» воды, как совокупности «когерентных областей» [205 – 209]. Авторы работы [209] отмечают, что межмолекулярные взаимодействия в живых организмах не являются отдельными самостоятельными событиями, а включены в сеть взаимосвязанных. Внешний колебательный сигнал, действующий на такую динамическую систему, вызывает реакцию, которая определяется не только структурой сигнала, но и зависит от среды, принимающей этот сигнал. Экспериментальные данные, полученные Л. Монтанье с соавт., представленные в работе [128], также объясняются авторами когерентным молекулярным взаимодействием. Они утверждают, что энергия может перемещаться в когерентной среде в виде солитонов без потерь.

Предложена модель жидкой воды, которая предполагает наличие в ней линейно упорядоченных цепочек и кластеров, возникающих при воздействии на воду ЭМП [210 – 211]. Кинетика линейно упорядоченных цепей описывается линейными возбуждениями (солитонами). На основе солитонной модели оценены размеры кластеров, рассчитаны значения диэлектрической проницаемости в низкочастотной области и показано, что релаксационные процессы хорошо аппроксимируются броуновским движением солитона синус-Гордона, который движется вдоль цепочки водородных связей, вызывая ее вращение.

Особый интерес представляют подходы к описанию «связанной воды», изложенные в работах [212 – 218]. Н. А. Бульенков при рассмотрении принципов кристаллизации воды ввел понятие «кристаллического модуля» — структуры, с помощью которой достигается «связность» составляющих ее молекул и атомов в системе, что позволило разработать принципы модульного проектирования и соответствующие алгоритмы расчета кристаллических структур, образующихся в воде с использованием компьютерных технологий [213]. Показано, что такие

структуры не могут быть надежно изучены в рамках классической кристаллографии, основанной на представлениях о «решетке» и «минимуме свободной энергии» [214].

Алгоритм, предложенный в работах [213 – 214], предполагал наличие только тетраэдрических частиц и не рассматривал реальные молекулы воды с учетом положения атомов водорода. А.О. Марченко и соавт. в работе [215] учли возможные расположения протонов в гексациклах «стул», «ванна» и «твист-ванна», а также в приповерхностной воде и разработали алгоритм расположения атомов водорода в связанных твист-гексациклах любого размера, как модель структуры связанной воды. Были рассчитаны их энергетические характеристики в потенциалах Полтева–Маленкова с учетом оптимизации энергии структур.

Основным элементом самоорганизации воды во фрактальные кристаллы является структура, получившая название «спираль 30/11» (рисунок 1.2) – энергоемкие нитевидные кристаллы с периодически повторяющимися элементами.

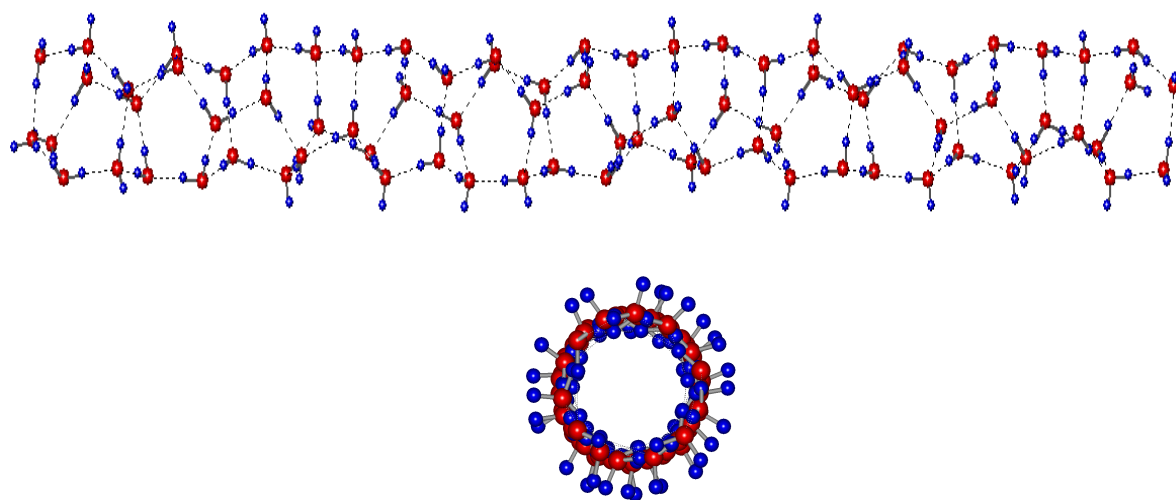


Рисунок 1.2 – Компьютерная модель «спирали 30/11», представленная в работе [215]. Продольный и поперечный вид.

Компьютерная модель такой спирали, предложенная А.О. Марченко и соавт. в работе [215], представляет собой трубку с внутренним диаметром около 3,2 нм вдоль кислородного каркаса, выложенную протонами снаружи и внутри.

Поскольку протоны обладают магнитными моментами, эти структуры являются парамагнитными и способны взаимодействовать с внешним ЭМП.

Э.А. Желиговская и Н.А. Бульенков в работе [216] привели расчетные данные и примеры построения ассоциатов - кластерно-стержневых структур с характерным торсионным углом с межатомными связями $\sim 38^\circ$ из тетраэдрических атомов воды. Данные структуры связанной воды играют роль системообразующей матрицы биологических систем, и именно эта матрица определяет метрический отбор всех остальных структурных компонентов подобных систем. Такие структуры связанной воды не являются сплошными и поэтому содержат место для биомакромолекул и растворенных газов. Важным моментом является то, что рассматриваемая структура является напряженной и способна высвободить запасенную упругую энергию в результате кооперативного перехода во фрагмент ледяной структуры, который, в свою очередь, может легко распасться и перейти в жидкую воду. Отмечается, что эта основная ячейка важна не только как компонент структуры связанной воды, но и как энерго-аккумулирующее звено для бездиссипативной передачи энергии [216].

Водородные связи, объединяющие структурные единицы фрактального кристалла, позволяют ему реагировать на внешние воздействия, в том числе на ЭМП, без существенного изменения структуры частей системы. Н.А. Бульенков в статье [218] подчеркивает, что инициатором процесса кластерообразования в воде и водных растворах служит ЭМП.

Работы группы академика А.Н. Коновалова также посвящены изучению процессов кластерообразования в воде и влиянию на этот процесс внешнего электромагнитного воздействия [219 – 224]. В этих работах сообщается о том, что в водных растворах очень низких концентраций от 10^{-20} до 10^{-6} М происходит образование наноразмерных частиц, которые названы авторами наноассоциатами. Размеры частиц составляют около 400 нм, ζ - потенциал от -2 до -20 мВ. Появление таких частиц инициируется растворенным веществом, присутствующем в исходном растворе, из которого путем последовательных разбавлений готовят растворы сверхнизкой концентрации. Одним из обязательных условий образования

наноассоциатов является воздействие внешнего геомагнитного поля [220, 221]. Установлена связь между ζ -потенциалом наноассоциатов и электропроводностью, рН, поверхностным натяжением, а также биоэффектами растворов [223].

В нормальной и гипoeлектромагнитной среде при ослаблении внешнего ЭМП от 53 000 нТл до 10 нТл изучены самоорганизация и физико-химические свойства разбавленных водных растворов мембранотропного амфифильного производного каликс[4]резорцинарена с трис(гидроксиметил)метиламидными фрагментами, структура и свойства которого сходна с полипептидными природными кластерами-гликоконъюгатами [222]. С помощью метода динамического светорассеяния и атомно-силовой микроскопии установлено образование стабильных во времени наноассоциатов. Получены типичные изображения рельефных дискретных частиц с поперечными размерами от 100 до 600 нм и высотой 35 нм (концентрация амфифильного производного 10^{-6} М) и 80 нм и высотой 1,3 - 1,7 нм (концентрация 10^{-7} М). Отмечено, что в аналогичных растворах, хранившихся в защитном от геомагнитного поля контейнере, образования каких-либо частиц не обнаружено, при этом электропроводность таких растворов была значительно ниже электропроводности растворов, подвергшихся воздействию геомагнитного поля.

Н.П. Пальмина и соавт. [225] изучали изменения физико-химических свойств биологических мембран (плазменных и микросомальных) под влиянием АФИ: природных и синтетических антиоксидантов, тиреотропин-рилизинг-гормона, эфиров форболов в широком диапазоне концентраций (от 10^{-20} до 10^{-3} М). Рассматривались результирующие эффекты действия перечисленных веществ на свойства мембран (активность мембраносвязывающих ферментов, перекисное окисление липидов, структурное состояние липидного бислоя). Авторы отмечают, что при экранировании растворов от геомагнитного поля исчезали эффекты воздействия АФИ на мембраны.

В водных средах особое внимание привлекает гидратированный электрон (особое стабилизированное состояние электрона), захваченный в растворителе, который отличается от свободного электрона меньшей подвижностью и большей

локализацией. Кроме того, захваченный электрон характеризуется отрицательной свободной энергией образования, т. е. он является термодинамически более стабильным [20 – 21]. Интерес к изучению гидратированного (сольватированного) электрона связан, прежде всего, с тем, что с его участием происходит огромное число реакций как в неорганической, так и в органической химии. Большое время жизни позволяет гидратированному электрону диффундировать на значительные расстояния от трека первичной ионизирующей частицы и взаимодействовать с растворёнными молекулами.

Образование гидратированного (сольватированного) состояния электрона происходит при его захвате уже существующей ловушкой в жидкости, созданной группой соответствующим образом распределенных молекул среды. Захваченный ловушкой электрон затем углубляет своим полем эту ловушку, изменяя ориентацию окружающих его молекул среды, не образуя при этом с ними химических связей. Согласно общепринятой картине, этот вид занимает полость или исключенный объем в структуре жидкой воды, с характерным спектром поглощения, который можно отнести к $s \rightarrow p$ возбуждениям частицы в квазисферическом ящике [226 – 227]. В биологических системах гидратированный электрон играет большую роль в процессах переноса заряда на большое расстояние [20, 227].

В макромолекулах белковых соединений также возможен перенос заряда. Решение вопроса о механизме переноса энергии в атомных цепочках белковых макромолекул было предложено А.С. Давыдовым в монографии [228] и развито Э. Скоттом [229]. В качестве «жесткой» модели биополимера А.С. Давыдов выбрал полипептидную левозакрученную α -спираль белковой молекулы, так называемую, α -спираль Полинга–Кори, имеющую минимальную потенциальную энергию (рисунок 1.3).

Энергия, передаваемая белку молекулой АТФ, вызывает возбуждение и вибрацию его цепи. Инфракрасные колебания групп $C=O$ пептида имеют частоту около 1650 см^{-1} и дипольный момент $d \sim 0,3\text{ Д}$. Они названы Амид I. Группы Амид I (на рисунке 1.3 заштрихованы) за счет жесткости двойной связи $C=O$, способной только к продольным колебаниям, искажают структуру молекулы вблизи этой

связи. Это искажение приводит к захвату энергии группой Амид I и предотвращает ее рассеивание. Гибкие С – N и С - С связи пептидных групп определяют малые значения его продольной упругости, а большие χ предполагают значительные взаимодействия между колебаниями Амида I и фононами.

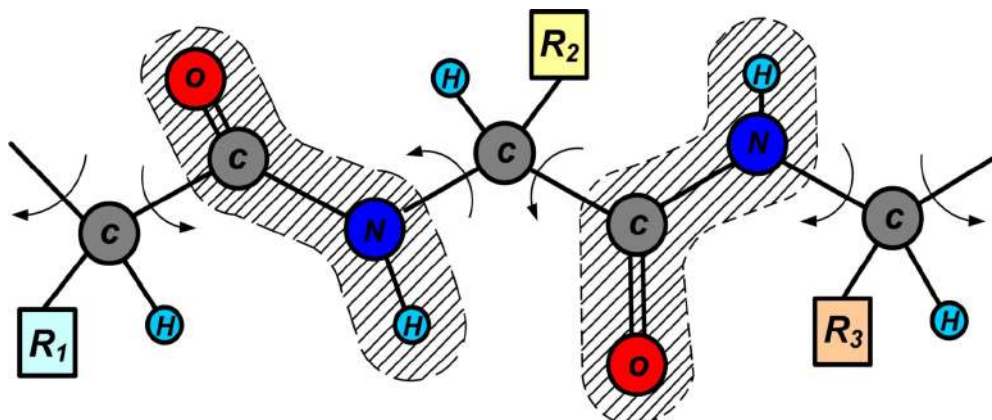


Рисунок 1.3 – Участок α -белковой макромолекулы с двумя пептидными группами согласно [228]. R_1 , R_2 , R_3 - аминокислотные остатки, стрелками обозначены направления возможных вращений.

Для описания подобных взаимодействий А.С. Давыдов использовал оператор энергии:

$$H = H_{ex} + H_{ph} + H_{int}, \quad (1.5)$$

где $H_{ex} = \sum B_n^+ [E_0 B_n - J (B_{n+1} + B_{n-1})]$ – оператор возбуждения колебаний амидных групп (экситонов);

$H_{ph} = \sum [M^{-1} p_n^2 - \infty (u_n - u_{n-1})^2]$ – оператор продольных колебаний пептидной цепи (энергия фононов);

$H_{int} = \chi \sum B_n^+ B_n (u_n - u_{n-1})$ – оператор экситон-фононных взаимодействий.

В выражении (1.6) $n = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$; B_n^+ и B_n – операторы возникновения и исчезновения возбуждения пептидной группы n ; u_n – оператор продольного смещения равновесного положения $n\alpha$ пептидной группы; p_n – оператор, сопряженный u_n ; ∞ – продольная упругость цепочки; χ – параметр связи между экситоном и фононом; $J = 2d^2 a^{-3}$ – энергия резонансного взаимодействия

пептидных групп. При $\chi \gg 1$ все три оператора, входящие в функцию Гамильтона, рассматриваются на равных основаниях.

Уравнения локализации колебательной энергии имеют следующий вид:

$$i \cdot d\Psi_n / dt - \omega_0 \phi_n + J(\phi_{n+1} + \phi_{n-1}) = (\beta_{n+1} - \beta_n) \cdot \phi_n,$$

$$3M \cdot d^2 \beta_n / dt^2 - 3\omega(\beta_{n+1} - 2\beta_n + \beta_{n-1}) = \chi(|\phi_n|^2 - |\phi_{n-1}|^2), \quad (1.6)$$

где величина ϕ_n - комплексная амплитуда C=O - осциллятора; ω_0 - частота колебаний осциллятора и J - диполь-дипольная связь между соседними C=O - осцилляторами; β_n - продольное смещение осциллятора; M - масса аминокислоты; ω - жесткость пружины, моделирующей $\propto$ продольную упругость цепочки.

Величина χ характеризует поперечную жесткость и соответствует изменению частоты ω_0 колебания осциллятора C=O при изменении длины $(\beta_{n+1} - \beta_n)$, связанной с ним водородной связи. Таким образом,

$$\chi = d\omega_0 / d(\beta_{n+1} - \beta_n). \quad (1.7)$$

В адиабатической аппроксимации, пренебрегая продольным смещением осциллятора ($d^2 \beta_n / dt^2 = 0$), из уравнения (1.7) получают выражение:

$$(\beta_{n+1} - \beta_n) = -\chi / (3\omega) |\phi_n|^2. \quad (1.8)$$

При подстановке выражения (1.8) в первое из уравнений (1.6) оно приобретает вид дискретного нелинейного уравнения Шредингера для стационарных коллективных возбуждений, перемещающихся с постоянной скоростью V , меньшей скорости звука V_0 :

$$i \cdot d\Psi_n / dt - \omega_0 \phi_n + \chi^2 / (3\omega) |\phi_n|^2 \phi_n + J(\phi_{n+1} + \phi_{n-1}) = 0. \quad (1.9)$$

Уравнение (1.9) получено для движущейся системы координат $\zeta = x - Vt$.

Частным решением дискретного нелинейного уравнения Шредингера при скорости возбуждения, меньшей скорости звука, служит выражение, описываемое амплитудной функцией, представляющей собой солитон:

$$\Psi_c(\zeta, t) = (\sqrt{\alpha} Q/2) \text{sech}(Q\zeta). \quad (1.10)$$

Решение уравнения (1.10), исследованное А.С. Давыдовым, имеет место при спектральном параметре

$$\Lambda = -\hbar^2 Q^2 / 2m, \quad (1.11)$$

где $Q = MaG / 2\hbar^2 = Ma\chi^2 / 2k\hbar^2 (1-s^2)$, а параметр нелинейности составляет

$$G = \chi^2 / \alpha (1 - s^2), \quad (1.12)$$

где $s = V/V_0$.

В свою очередь спектральный параметр Λ характеризует энергетические свойства молекулярной цепочки и имеет вид:

$$\Lambda = E - \epsilon_0 - W + 2J \cos k, \quad (1.13)$$

где E – полная энергия возбуждения (энергия, переданная полимеру от внешнего источника, например от АТФ или низкочастотного магнитного поля), ϵ_0 – энергия колебаний дипольных групп (экситонов), W – энергия деформации полимерной цепи, $J = 2d^2/\alpha^3 \approx 7,8 \text{ см}^{-1}$ – энергия экситон-фононного резонансного взаимодействия, $\alpha \approx 19 \text{ н/м}$, $a = 4,5 \text{ \AA}$ – период пептидных групп.

Волна $\Psi_c(\zeta, t)$ стационарна, ее профиль не меняется:

$$\partial \Psi_c / \partial t = -v \partial \Psi_c / \partial x. \quad (1.14)$$

Возбужденные внешними воздействиями колебательные солитоны $\Psi_c(\zeta, t)$ являются переносчиками дальнедействующей энергии вдоль одномерных молекулярных цепочек в (1 + 1) - мерном случае и, поскольку они движутся со скоростью, меньшей скорости продольного звука, их энергии не преобразуются в энергию теплового движения [228].

Если учесть нелинейное взаимодействие между группами атомов в самой молекулярной цепи, по которой движется электрон, в виде смещений равновесных положений групп атомов, то проблема переноса энергии с участием электрона решается. В этом случае α -спиральные участки белковых молекул являются идеальными путями движения электронов в виде электросолитона от донорного участка к акцепторному. Квантово-механический анализ этого процесса показал, что солитон — это энергетический квант, передающий по молекулярной цепочке количество энергии, равное энергии продольного колебания связи C=O. Эта энергия транспортируется по молекулярной цепи без потерь, не выходя за пределы

биополимера и обеспечивая возможность всех биохимических процессов живой клетки.

А.С. Давыдов теоретически решил задачу преобразования некогерентной внешней энергии любого вида: химической (вносимой молекулой АТФ), а также электромагнитной, тепловой, механической, акустической и других, способных вызвать вибрацию любого участка молекулярной цепи, в когерентную и квантовую форму в диапазоне частот 10^{13} Гц и ниже.

Теоретические концепции, предложенные А.С. Давыдовым, были разработаны как для белковых молекул, так и для полинуклеотидов. В частности, В. Д. Лахно и А.Н. Коршунова в статье [230] описывают полисолитонные состояния в синтетических гомогенных полинуклеотидных цепях. Однако вопрос об устойчивости солитона Давыдова при физиологических температурах до сих пор теоретически не решен; кроме того, отсутствуют надежные методы его спектроскопической регистрации.

1.3 Активные формы кислорода в клетках и водных растворах активных фармацевтических ингредиентов

Активные формы кислорода (АФК) постоянно образуются в аэробных клетках в результате нормального метаболизма и под влиянием внешних физических факторов [17 – 19, 231 – 269]. Они принимают участие в регуляции основных процессов в биологических системах на разных уровнях организации, проявляя свои физиологические и патологические эффекты в тесном взаимодействии с другими клеточными регуляторными факторами [232 – 234], модулируя их активность [235 – 237]. АФК могут оказывать как прямое разрушительное воздействие на клеточные структуры, так и инициировать

свободнорадикальное окисление природных АФИ: липидов, белков и нуклеиновых кислот.

Повышенный уровень образования АФК, влияет на структуру природных АФИ [241 – 243], при этом электрофильные соединения усиливают и пролонгируют биологические эффекты образующихся сверхнизких доз АФК [240]. При воздействии на клетку различных экзогенных факторов физической, химической или биологической природы образующиеся АФК могут служить либо индукторами адаптационных процессов и являться сигнальными агентами, либо индукторами апоптоза и быть повреждающими мессенджерами. В живых организмах содержание АФК поддерживается на определенном значении при регуляции таких важных процессов, как рецепторная регуляция клеток, поддержание уровня самообновления мембран клеток, тонуса сосудов, сохранение системы апоптоза клеток, уровня неспецифического и специфического иммунитета.

Живые организмы также очень чувствительны к изменению эндо- и экзогенного уровня АФК [246, 256, 265 – 269]. Принципы функционирования АФК в живых организмах подробно описаны в статьях [232 – 234] и монографиях [237, 240, 265]. Основными генераторами АФК в клетке являются дыхательные цепи митохондрий [246 – 247], а также пероксисомы. В пероксисомах локализован ряд ферментов, связанных с метаболизмом пероксида водорода, который используется клеткой для детоксикации ксенобиотиков. АФК активно участвуют в передаче внутриклеточных сигналов от факторов роста, активируют ядерные факторы транскрипции и экспрессию генов при иммунном ответе [241].

Формы АФК и последовательность их перехода из одной в другую приведены на рисунке 1.4.

АФК окисляя сульфгидрильные группы белков, модифицируют их и снижают ферментативную активность и способность к связыванию с ДНК транскрипционных факторов. Окислительно-восстановительные модификации белков защищают клетки от повреждающего действия АФК при внешних воздействиях. В ответ на окислительно-восстановительный сигнал адаптирующего

фактора синтезируется ряд неспецифических молекул: ферменты антиоксидантной защиты, белки семейства hsp и другие белки [237].

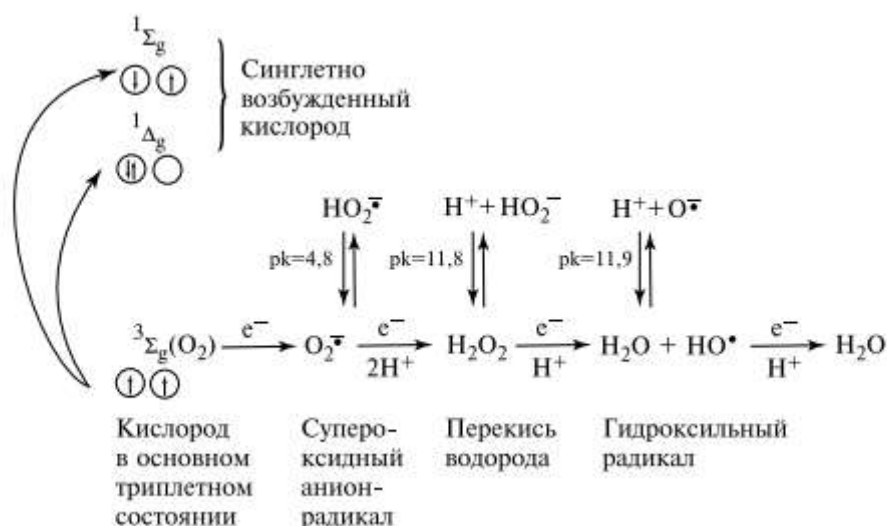


Рисунок 1.4 – Образование разных АФК в процессах одноэлектронного восстановления и возбуждения.

При избыточном образовании АФК выполняют преимущественно деструктивные функции в отношении компонентов клетки и АФИ: повреждают мембранные структуры вследствие перекисного окисления липидов, окисляют белки по остаткам тирозина, цистеина и серина, повреждают молекулы ДНК. За счет окисления глутатиона и НАД(Ф)Н происходит сдвиг окислительно-восстановительного потенциала клетки [246]. Высокая концентрация АФК в митохондриях и слабая система репарации этих органелл повышают частоту мутаций митохондриальной ДНК (мтДНК) по сравнению с ядерной. Например, гидроксильный радикал оказывает повреждающее действие на ДНК за счет окисления оснований, их модификации и повреждения хромосом. Повреждение мтДНК особенно опасно из-за постепенного накопления мутаций, которые легли в основу митохондриальной теории старения [234].

В.И. Брусков и С.В. Гудков с соавт. полагают, что триггером появления АФК в водных растворах при внешнем воздействии является синглетный кислород [238 – 239, 258 – 260]. Синглетный кислород (1O_2) – общее название двух метастабильных состояний молекулярного кислорода с более высокой энергией,

чем основное триплетное состояние. Молекула $^1\text{O}_2$ может существовать в двух возбужденных состояниях, различающихся локализацией внешних электронов. На двух изознергетических орбиталях $^1\pi_g$ -энергетического уровня два электрона могут находиться в трех разных конфигурациях:

- (1) по одному электрону с параллельными спинами на каждой $^1\pi_g$ -орбитали. Эта конфигурация соответствует триплетному состоянию кислорода (O_2 , $^1\Sigma_g^-$);
- (2) оба спаренных электрона с противоположными спинами на одной и той же $^1\pi_g$ -орбитали (синглетное состояние $^1\text{O}_2$, $^1\Delta_g$);
- (3) электроны с противоположными спинами, но расположенные на двух разных $^1\pi_g$ -орбиталях (синглетное состояние $^1\text{O}_2$, $^1\Sigma_g^+$).

В обоих синглетных состояниях кислорода требуется обращение спина, но у $^1\Delta_g$ более низкая энергия активации. Разность энергий основного состояния O_2 и $^1\text{O}_2$ составляет 94,2 кДж/моль (0,98 эВ на молекулу) и соответствует переходу в ближнем ИК-диапазоне (около 1261 – 1268 нм) [252]. Первое возбужденное состояние с высоким энергетическим уровнем $^1\text{O}_2$ ($^1\Sigma_g$) характеризуется настолько малым временем жизни, равным 0,1 - 0,01 нс, что его участие в реакциях маловероятно [255]. Второе состояние $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) имеет низкую энергию, его время жизни значительно больше и в природной воде составляет примерно 2 – 4 мкс. По этой причине это состояние является основной формой $^1\text{O}_2$. При высоких значениях энергии триплетного состояния фотосенсибилизатора образование синглетного кислорода в форме $^1\text{O}_2$ ($^1\Sigma_g$) энергетически более выгодно, чем в форме $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), так как в этом случае наименьшее количество электронной энергии преобразуется в колебательную энергию.

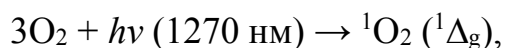
Согласно методу молекулярных орбиталей, в триплетном состоянии неспаренные электроны молекулы O_2 располагаются на разрыхляющей орбитали. В изолированной молекуле переход запрещен по правилам отбора: спину, симметрии и чётности, поэтому прямое возбуждение светом кислорода в основном состоянии с образованием $^1\text{O}_2$ крайне маловероятно. Запрет снимается при столкновении с другими молекулами с поглощением фотона, сопровождаемое

переворотом спина электрона. Прямое обнаружение $^1\text{O}_2$ возможно по его очень слабой флуоресценции при 1270 нм, поскольку при переходе в основное триплетное состояние он излучает фотон в ИК-диапазоне [253]. Подробное исследование образования и состояния синглетного кислорода в разных средах дано в работах А.А. Красновского и соавт. [251 – 254] и обсуждается в работах [255 – 256].

Молекулы синглетного кислорода способны образовывать возбужденные димеры или эксимеры кислорода $(^1\text{O}_2)_2$. Димеры синглетного кислорода переходят в основное состояние с испусканием света при 535, 580 и 635 нм. В зарегистрированных спектрах флуоресценции полосы длин волн 535, 580, 635 и 1270 нм соответствуют наличию синглетного кислорода [251, 257]. При высоких концентрациях $^1\text{O}_2$ флуоресценцию димолей синглетного кислорода (одновременное испускание двух молекул синглетного кислорода при столкновениях) можно наблюдать в виде красного свечения при 634 нм.

В основном (триплетном) состоянии кислород обладает бирадикальными свойствами, обуславливающими его способность вступать в реакции окисления, а также принимать электроны с переходом в химически активный супероксидный анион-радикал $\text{O}_2^{\bullet-}$ с низкой энергией активации (0,16 эВ).

А.А. Красновским и соавт. в работах [252 – 254] показано, что ИК-излучение с длиной волны 1270 нм, интенсивность которого близка к солнечному свету, вызывает возбуждение молекул кислорода, растворенного в органических средах и насыщенной воздухом воде, при нормальном атмосферном давлении, что приводит к заселению состояния $^1\Delta_g$ с последующей наблюдаемой оксигенацией органических соединений:

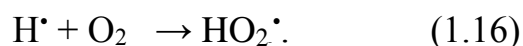


Д.Н. Буторина и соавт. статьи [255] определили время образования и дезактивации $^1\text{O}_2$ в воде и водных растворах порфиринов в присутствии и отсутствии азиды натрия. Показано, что в отсутствие азиды натрия кинетика роста

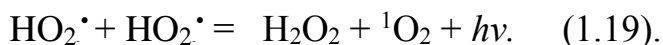
фосфоресценции после лазерной вспышки соответствует кинетике переноса энергии от триплетных молекул порфирина к кислороду, а затухание соответствует кинетике дезактивации $^1\text{O}_2$. В присутствии детергентов время жизни $^1\text{O}_2$ существенно увеличивается за счет его локализации в липофильной мишени, а не в водной среде. На основании этого авторы полагают, что в клетках и живых организмах $^1\text{O}_2$ локализуется преимущественно в липофильных структурах.

АФК могут образовываться в воде за счет энергии, поступающей из внешней среды по различным каналам, при этом колебания концентрации АФК пропорциональны колебаниям внешнего излучения, а взаимопревращение форм носит циклический характер [258 – 260]. В работе [258] показано, что образование АФК в воде и водных растворах возможно под действием УФ-излучения или He-Ne-лазера с длиной волны 632,8 нм с поглощением фотонов молекулярным кислородом. К появлению АФК в воде приводят такие низкоинтенсивные воздействия, как механическое встряхивание, ультразвук докавитационной интенсивности, продавливание воды через капилляры и мембраны, выдерживание воды при температуре 40 °С в течение часа, освещение воды видимым, а также квазимонохроматическим светом небольшой интенсивности в полосах поглощения молекулярного кислорода в видимом и ИК-диапазонах спектра [17].

Л.В. Беловолова и соавт. [17 – 18] предложили эвристическую модель организации водно-газовой системы с повышенным содержанием АФК. Согласно этой модели энергия выделяется при кавитационном схлопывании газовых микропузырьков, находящихся в воде, под действием тепла [259 – 260] или при электрохимической активации [19]. Авторы полагают, что в чистой воде процессы происходят преимущественно на границах фаз (поверхности электродов, стенках сосуда, поверхности микропузырьков растворенных газов). При этом атом водорода, возникающий в результате восстановления протона, реагирует с молекулой растворенного O_2 , в результате образуется гидропероксидный радикал:



При столкновении двух таких радикалов образуется H_2O_2 и синглетный кислород:



Авторы статьи [17] также отмечают, что важную роль в реакциях с участием АФК играют карбонильные соединения, растворенный CO_2 и активные формы азота (АФА) [240, 262 – 264]. В присутствии последних окислители лавинообразно накапливаются, а восстановители исчезают.

В присутствии металлов переменной валентности происходят преобразования АФК, схема которых приведена на рисунке 1.5.

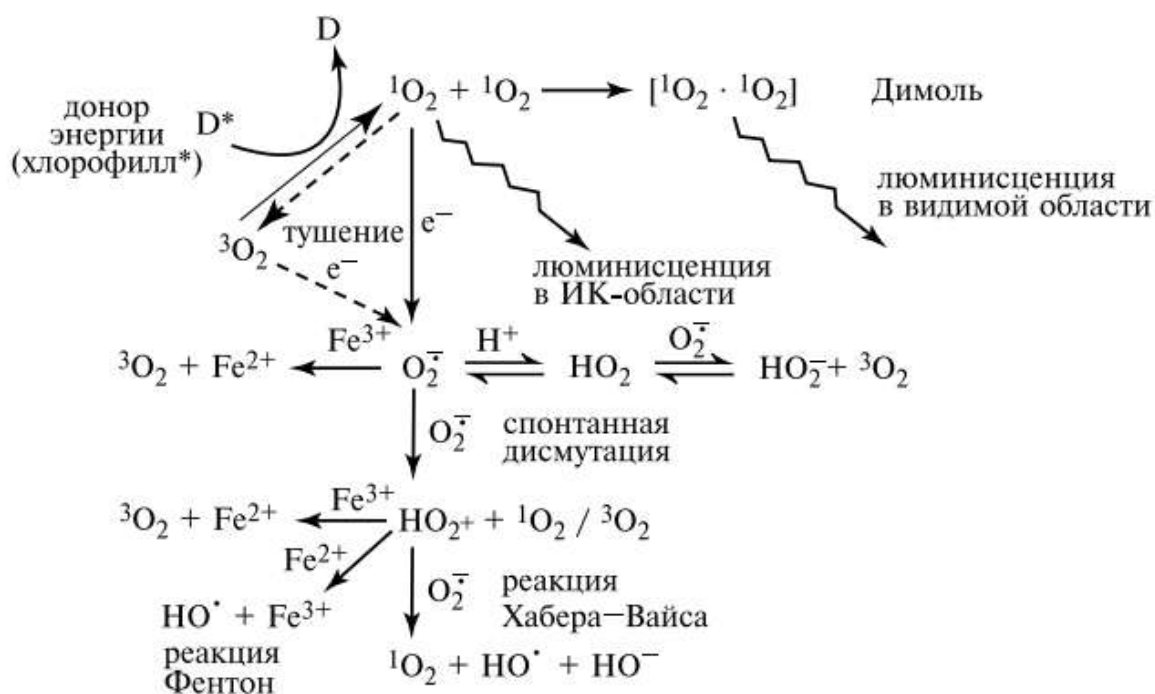


Рисунок 1.5 – Основные реакции преобразования АФК в присутствии ионов Fe^{3+} .

Пероксид водорода в отсутствие каталазы является наиболее стабильным соединением из возможных восстановленных АФК, но в то же время обладает наименьшей реакционной способностью, чем другие АФК [239], легко проникает через мембраны и достаточно стабилен во внеклеточном пространстве [266]. При взаимодействии пероксида водорода и супероксид-иона в присутствии металлов переменной валентности, которые входят в активные центры ферментов, образуется гидроксильный радикал $\text{HO}^\bullet$. Среди всех АФК гидроксильный радикал

наиболее реакционноспособен, имеет очень короткое время жизни, около 2 – 5 нс, и не может диффундировать от места образования на далекие расстояния [248].

Большая часть всех АФК вырабатывается в митохондриях [246 – 247, 269]. Особое значение в клетке имеет митохондриальная ДНК (мтДНК), которая расположена в митохондриальном матриксе, т. е. в непосредственной близости от основных источников АФК в клетке. Ферменты, генерирующие АФК во внутренней митохондриальной мембране и митохондриальном матриксе, включают аконитазу, которая содержит железо-серные кластеры, ответственные за продукцию O_2 [270], дигидрооротатдегидрогеназу, комплекс α -кетоглутаратдегидрогеназы [271] и пируватдегидрогеназный комплекс. Примечательно, что оба последних комплекса опосредованы ферментом дигидролипоилдегидрогеназой для генерации H_2O_2 и супероксид-аниона $O_2^{\cdot-}$ [272 – 273].

Появляется все большее количество работ, подтверждающих важную роль окислительно-индуцированного повреждения ДНК и его клеточного восстановления в этиологии рака [274 – 276]. В статье [275] отмечается, что возникающие нарушения ДНК обладают мутагенным и цитотоксическим действием и, если их не корректировать, могут вызвать генетическую нестабильность, которая в дальнейшем может привести к заболеваниям, в том числе канцерогенезу [276]. Окислительные повреждения ДНК в живых организмах вызываются как эндогенными, так и экзогенными факторами [277 – 279]. Раковые ткани сверхэкспрессируют белки восстановления и, таким образом, развивают большую способность к восстановлению ДНК, чем нормальные ткани. Сообщается, что усиленная репарация ДНК в опухолях, устраняющая повреждения ДНК до того, как они станут токсичными, является основным механизмом развития резистентности в терапии, влияющей на выживаемость пациентов.

Экцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER) является одним из основных способов защиты клеток от структурных и химических повреждений ДНК. Эти поражения с химической точки зрения представляют собой объемные ковалентные аддукты, которые образуют азотистые

основания в результате воздействия УФ-излучения, ионизирующего излучения, электрофильных химических мутагенов, некоторых лекарственных препаратов, а также химически активных эндогенных метаболитов, в том числе реактивных АФК и АФА. NER обеспечивает коррекцию наиболее многочисленных повреждений ДНК - модифицированных оснований, апуриновых/апиримидиновых сайтов и ОР [279 – 280] и является основным механизмом устранения окислительных повреждений ДНК.

В молекуле ДНК окислительным повреждениям подвергаются преимущественно азотистые основания. Продуктом окислительной модификации азотистых оснований и одним из ключевых биомаркеров повреждения ДНК, опосредованного генерацией АФК, является образование 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина (8-OHdG) или 8-оксо-7,8-дигидрогуанина (8-oxodG) [277, 281 – 291]. Появление данного повреждения в генетическом материале клетки приводит к дестабилизации генома. Мутагенез, старение и воспаление опосредованы повышением уровня 8-oxodG ДНК и его аналогов 8-гидроксигуанозина и 8-гидроксигуанина [282]. Увеличение окисленных оснований в ДНК (8-oxodG и 8-OHdG) и карбоксилирование белков служат суррогатными маркерами повышенного содержания АФК. По данным ESCODD (Европейского комитета по стандартизации окислительных повреждений ДНК), уровень эндогенного 8-oxodG в ДНК составляет около 1 повреждения на 10^6 гуанинов (dG). При генотоксическом стрессе этот показатель может значительно увеличиваться [284].

Спектры мутаций, индуцированных в клеточной ДНК, включают трансверсии G→T, связанные, вероятно, с появлением 8-oxodG. Трансверсии возникают в процессе репликации в результате спаривания окисленного гуанина не с цитозином, а с аденином. В следующем цикле репликации напротив аденина располагается тимин, что приводит к замене гуанина на тимин в нуклеотидной цепи. Подробный анализ повреждений ДНК и путей их репарации дан в работе М.В. Рогачевой и С.А. Кузнецовой [283].

Отмечается, что влияние эндогенных оксидантов, в том числе АФК, приводит к модификации оснований и образованию ОР ДНК [288], действие УФ-излучения

приводит к образованию пиримидиновых димеров, а рентгеновского облучения - к появлению двухцепочечных разрывов.

Начальный этап процесса восстановления осуществляется ДНК-гликозилазами. Существует два основных функциональных класса гликозилаз: монофункциональные и бифункциональные. Монофункциональные гликозилазы обладают только гликозилазной активностью, в то время как бифункциональные гликозилазы также обладают лиазной активностью АР (апуриновый/апиримидиновый сайт), что позволяет им расщеплять фосфодиэфирную связь ДНК, создавая одноцепочечный разрыв без необходимости использования эндонуклеазы. Ключевые белки репарации нуклеотидов связывают поли(ADP-рибозу) и являются мишенями для ее ковалентного присоединения [286].

Бифункциональные гликозилазы способны полностью удалять из ДНК как поврежденное основание, так и фосфатный остов. Среди них следует отметить hOGG1, который удаляет 8-oxodG, наиболее распространенный тип окислительного повреждения ДНК, возникающий в результате окислительного стресса или воздействия лекарств и ксенобиотиков [291]. Ген hOGG1 содержит ARE. Продемонстрирована положительная корреляция между экспрессией Nrf2 и hOGG1 [290].

В обзорах [290 – 291] авторами подробно рассмотрены структурные закономерности взаимодействия фермента эксцизионной репарации *8-oxoguanin DNA glycosylase hOGG1* человека с молекулой ДНК.

На рисунке 1.6 приведена последовательность реакций удаления окисленных азотистых оснований из ДНК, которые катализируются hOGG1 [290].

На первой стадии в результате атаки ε-аминогруппой Lys249 по атому c1' дезоксирибозы происходит разрыв гликозидной связи и образование аниона азотистого основания 8-oxoG⁻.

На второй стадии анион отрывает протон от группы Lys249 и образуется аминаль. Далее протонированный 8-oxoGH отдает протон на атом O4' остатка

рибозы и, в результате этого, аминаль преобразуется в основание Шиффа с раскрытием фуранозного цикла.

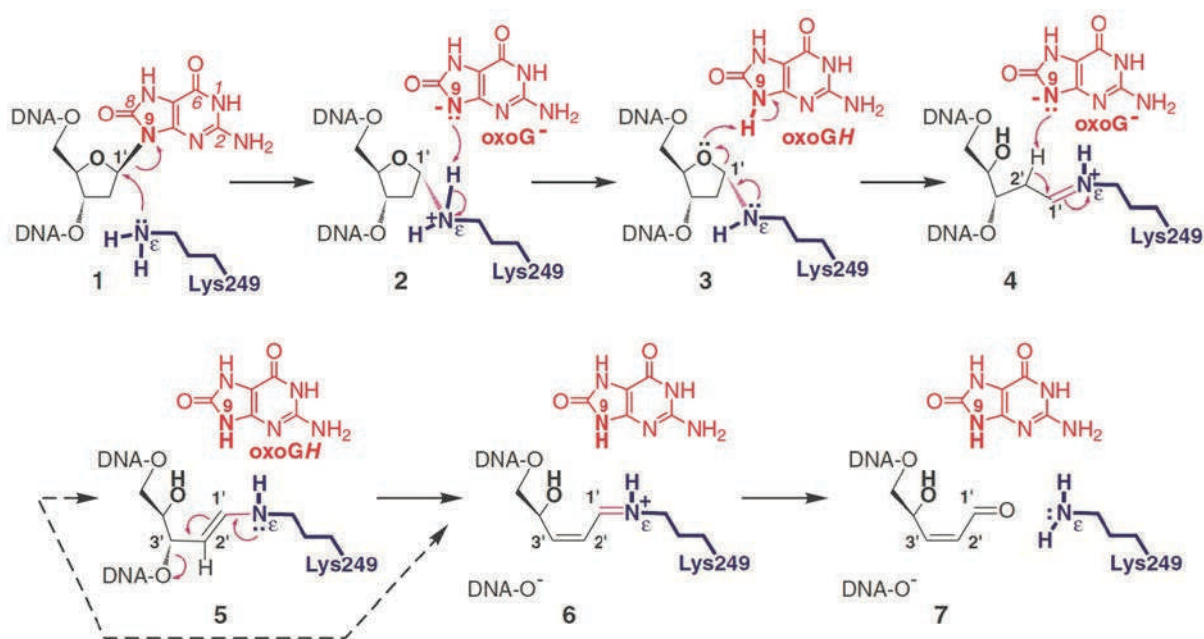


Рисунок 1.6 – Последовательность реакций удаления окисленных азотистых оснований ДНК путем катализа hOGG1 согласно [290].

Основание Шиффа несет дополнительный протон на атоме Lys249, который передается снова на 8-охоG⁻. Образуется 8-охоGH и незаряженное основание Шиффа, в котором протекает реакция β-элиминирования. Последняя приводит к разрыву 3'-фосфодиэфирной связи. Апиримидиновая эндонуклеаза 1 (APE1) обрабатывает одноцепочечный разрыв, удаляя 3'-фосфо-α, β-ненасыщенный альдегидный остаток с образованием 3'-ОН-конца. ДНК-полимераза β вставляет гуанин, закрепляющийся с помощью лигазы III XRCC1 (перекрестно дополняющий белок).

В клетках человека около $5 \cdot 10^5$ молекул hOGG1 защищают $6 \cdot 10^9$ оснований его генома от накопления продуктов окисления пуринов. Этот фермент обладает особенностью отличать окисленный 8-oxodG от четырех нормальных азотистых оснований и эффективно его удалять.

1.4 Медико-биологические эффекты воды с пониженным содержанием дейтерия

Известно, что вода с пониженным содержанием дейтерия (*ddw* – *deuterium depleted water*; вода, обедненная по дейтерию) приводит к значительным биохимическим эффектам и оказывает стимулирующее действие на живые организмы, существенно повышая их активность, увеличивая жизнестойкость к различным негативным факторам, репродуктивную деятельность, улучшает и ускоряет обмен веществ [30 – 31, 292 – 304].

Изменение концентрации дейтерия в организме оказывает влияние на выработку гормонов щитовидной железы и функциональную активность гипофиза [296]. Модификация изотопного состава среды обитания *C. elegans* позволяла авторам статьи [298] восстанавливать активность СОД (на фоне интоксикации марганцем) и продолжительность жизни до контрольных значений. Как описывается в работе [299], снижение содержания дейтерия во внеклеточной среде стимулирует пролиферацию лимфобластов в тимусе. Сообщается, что применение *ddw* в онкологии в качестве адьювантного средства сопровождается улучшением состояния пациентов [300].

Наличие атомов дейтерия в среде, окружающей молекулу ДНК, обуславливает изотопный D/H обмен в водородных связях между парами азотистых оснований. Это приводит к изменению частоты возникновения открытых состояний, наличие которых, в свою очередь, являются важным условием для специфических межмолекулярных ДНК-белковых взаимодействий [305 – 309].

Установлено, что многие организмы по-разному реагируют как на высокие, так и на низкие концентрации дейтерия в воде, что приводит к снижению или усилению активности метаболических процессов. Однако у большинства тест-

организмов оптимальные показатели находятся в пределах естественного изотопного соотношения D/H в воде [310].

Содержание дейтерия в организме «условного» человека (массой 70 кг) составляет около 1 г, что при ранжировании необходимых микроэлементов соответствует его положению между медью (100 мг) и цинком (2 г) и на 2–3 порядка выше по сравнению с содержанием Co, Mn, Mo. Это позволяет прогнозировать его вовлеченность в биохимические процессы в организме. Дефицит и избыток этого изотопа водорода может нарушать гомеостаз и смещать равновесие обратимых процессов в организме.

Обнаружено возрастание кинетического изотопного эффекта (КИЭ) в процессах с участием известных фармацевтических субстанций в водных растворах с соотношением дейтерий/протий (D/H) ниже природного [32]. Так, установлено, что в интервале содержания дейтерия от 0,5 до 16 ммоль/л в «легкой» воде (ddw) возрастает КИЭ биологически активных соединений. Авторами работ [33 – 34] на диаграмме «доза – ответ» показана идентичность дейтерия эссенциальным микроэлементам, когда недостаток и избыток элемента снижает жизнеспособность организма. Показано, что снижение концентрации дейтерия в водной среде приводит к снижению способности к рассеянию света препаратами белковых наночастиц и водой [311].

С учетом многочисленных сведений о КИЭ фармацевтических субстанций в водах с разным соотношением D/H авторы [34] прогнозируют, что дейтерий может стать медико-химическим инструментом, когда прояснятся механизмы влияния дейтерия на биохимические превращения фармацевтических субстанций в организме. Как отмечают авторы работы [34], использование дейтерия в разработке лекарств неуклонно растет, но при этом число проблематичных моментов по его использованию не уменьшается. Кроме существующего мнения о возможной токсичности дейтерия, это - неопределенности в отношении затрат для производства дейтерированных ЛП, невыясненные механизмы увеличения КИЭ для отдельных субстанций, а также отсутствие относительно недорогого и быстрого метода определения содержания дейтерия в различных объектах.

Для определения изотопного состава веществ используются современные инструментальные методы анализа: масс-спектрометрия, ИК-спектрометрия. Широко применяется ядерный магнитный резонанс (ЯМР) с методологическим подходом SNIF-NMR (Site-specific Natural Isotope Fractionation Nuclear Magnetic Resonance) [312]. Разработана методика ФР.1.31.1999.00073 «Методика выполнения измерений содержания дейтерия в воде, водно-органических и органических растворах методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса».

Необходимо отметить, что определение изотопного состава веществ связано с рядом сложностей, в частности, с трудоёмкостью и дорогостоящей реализацией методов определения содержания ядерных изотопов в химических веществах. При выполнении методик определения изотопов методами ЯМР спектроскопии наиболее проблематичным является выбор оптимальных специфических зондов с соответствующими магнитно-релаксационными характеристиками. При определении содержания дейтерия наибольшие трудности связаны с длительностью съемки спектра ЯМР и учетом влияния водной матрицы на сигнал ЯМР.

1. Загрязнение окружающей среды электромагнитным полем антропогенного происхождения постоянно растет. Расширяется использование ЭМП в промышленности, средствах коммуникации и навигации. КВЧ ЭМП применяется в фармацевтической химии для лизиса клеток и выделения ДНК, а также для лечения в терапевтических аппаратах восстановительной медицины в сочетании с другими средствами. ЭМП с величиной магнитной индукции 0,20–20 мТл в сочетании с противоопухолевыми лекарственными препаратами используется в онкологии, а также при лечении заболеваний костей и ускорения заживления ран, хотя используемые при этом параметры поля, как правило, подбираются разработчиками эмпирически.

2. В последнее время в фармацевтической химии активно используются АФИ на основе природных нуклеиновых кислот, выделенных из биологических объектов или искусственно созданных олигонуклеотидов, которые входят в состав иммунобиологических и биотехнологических лекарственных препаратов, ДНК-вакцин. Широко используется альбумин, который входит в состав более 25 лекарственных препаратов, зарегистрированных в Государственном реестре лекарственных средств России (ГРЛС). В литературе имеются данные о том, что при воздействии ЭМП различных частотных диапазонов могут изменяться физико-химические свойства растворов важнейших АФИ.

3. В работах отечественных и зарубежных ученых накоплен большой экспериментальный и теоретический материал, посвященный электромагнитному воздействию на водные растворы и живые организмы. Существует несколько современных гипотез, объясняющих эффекты действия ЭМП на водные растворы: теория ионного циклотронного резонанса; концепция образования кластеров в водных растворах и действия на них ЭМП; теория циркуляции солитонов по атомным цепочкам молекул; механизм магнитного резонанса; теория спин-

коррелированных радикалов относительно друг друга; теория триплет-синглетных пар и др. Однако, остается неясным вопрос об электромагнитном влиянии на процессы, происходящие в водных растворах АФИ. Для выявления связей и закономерностей между строением и физико-химическими свойствами АФИ при электромагнитном воздействии необходимо разработать подход, объясняющий изменение динамики их состояния в водных растворах.

4. Наночастицы серебра являются многообещающими кандидатами для нетрадиционного и эффективного применения в области фармацевтических и медицинских наук: для диагностики и лечения различного рода заболеваний и инфекций, в том числе вирусных; в противоопухолевой фототермической терапии; для таргетной доставки АФИ. Особый интерес к наночастицам серебра в биомедицинских приложениях основан на их обширных антибактериальных, антимикотических, противовирусных свойствах и проявляемой эффективности против микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью. Для уменьшения цитотоксичности наночастиц серебра необходимо создание на поверхности наночастиц защитных оболочек из АФИ.

5. Вода с пониженным содержанием дейтерия (ddw – deuterium depleted water; вода, обедненная по дейтерию) оказывает стимулирующее действие на живые организмы и клетки, существенно повышает их активность, что обуславливает ее потенциальные возможности применения в качестве протекторного средства при электромагнитном воздействии. Для расширения ее использования необходим контроль за количественным содержанием дейтерия в водных средах, который сочетал бы в себе экспрессность, дешевизну и точность.

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ, ОБОРУДОВАНИЕ, МЕТОДЫ И МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты и методы исследования

В работе исследовали водные растворы ДНК («Sigma», США); растворы человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) («Sigma-Aldrich», США); образцы геномной ДНК и моноклеарные клетки; водные растворы солей металлов переменной валентности.

Материалом для молекулярно-генетических исследований служила ДНК цельной крови доноров. В исследовании приняли участие мужчины в возрасте 19–24 года, студенты ВУЗа, по данным анкетирования не имеющие патологий и заболеваний. Данное исследование было проведено с письменного согласия доноров совместно с ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет». Кровь собирали в пластиковые пробирки емкостью 2,5 мл с добавлением динатриевой соли этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл в качестве антикоагулянта. Стабилизированную ЭДТА плазму крови готовили по стандартной методике центрифугированием в течение 10 минут при 2000 об/мин. Использовали плазму крови со сроком хранения не более 72 часов при температуре 5 °С. Лабораторно-диагностическое исследование проводили в соответствии с этическими нормами, установленными Хельсинкской декларацией 1975 г. с поправками, внесенными в 1983 г. Проведенное исследование одобрено Независимым этическим комитетом ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ (ул. им. Митрофана Седина, 4, Краснодар, Россия), протокол № 89 от 24 июня 2022 г.

При изучении состояния антиоксидантной системы и уровня перекисного окисления липидов в крови лабораторных животных после воздействия НЧ ЭМП *in vivo* использовали крыс-самцов линии Wistar массой 220–240 г в возрасте 2–2,5 мес. Крысы содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище, в пластиковых клетках ТЕКНИПЛАСТ IV типа, по 3 - 5 крыс в одной клетке в соответствии с правилами содержания животных. Условия содержания животных были стандартизированы: температура (20 ± 3) °C, влажность: (48 ± 2) %, режим освещения день/ночь (с 6.00 до 18.00 / с 18.00 до 6.00). В качестве подстилки использовали березовую щепу. В течение всего эксперимента животные потребляли стандартные концентрированные корма по ГОСТ Р 50258. Эксперименты проводили в соответствии с требованиями «Руководства по уходу и использованию лабораторных животных» [313], 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 Российской академии наук», приказа Минздравсоцразвития России «Об утверждении правил лабораторной работы» (№708н от 23.08.2019).

Для приготовления основного раствора ЧСА лиофилизированный препарат белка сывороточного альбумина («Sigma-Aldrich», США) растворяли физиологическим раствором до концентрации 50 мМ. Рабочие растворы ЧСА готовили с использованием дистиллированной воды с концентрацией NaCl 0,1 М и соответствующими добавками HCl или NaOH. При приготовлении проб не использовались буферные растворы для фиксации pH среды. Для стабилизации раствора образцы перед измерением хранили при температуре 4 °C. Концентрацию ЧСА в растворе контролировали спектрофотометрически, $\epsilon_{279} = 43824 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Растворы сульфата железа (II) и сульфата меди (II) готовили растворением твердых солей марки «ос.ч.» в бидистиллированной воде, их конечная концентрация составляла 1 мкМ/л.

Воду с содержанием дейтерия 40 ppm получали на разработанной в ФБГОУ ВО «Кубанский государственный университет» установке ЛВ-1 [314 – 315].

Концентрации дейтерия в полученной воде контролировали с помощью ЯМР спектроскопии с использованием фурье-спектрометра 400 МГц (марка FT NMR JEOL ECA 400, серия JNM-ECA с датчиком 40TH5AT/FG2) (JEOL Ltd., Япония).

Квазисферические наночастицы серебра (AgNPs) заданных размеров, диаметром (12 ± 2) нм, (25 ± 3) нм или (90 ± 7) нм получали боргидридным методом, используя в качестве стабилизатора поливинилпирролидон, согласно рекомендациям, изложенным в работе [179]. Размер и форму AgNPs верифицировали с помощью сканирующего электронного микроскопа JEOL JSM-7500F.

2.2 Аппаратно-программный комплекс автоматизированной обработки электромагнитным полем и исследования физико-химических характеристик водных растворов активных фармацевтических ингредиентов

Эффекты ЭМП проявляются при определенных частотных и амплитудных параметрах. Методы поиска таких параметров, связанные с влиянием ЭМП на физико-химические характеристики растворов АФИ достаточно длительны, трудоемки и требуют постоянного присутствия оператора [316]. Автоматизирование последовательных этапов, а именно: электромагнитная обработка растворов АФИ или биообразцов, измерение физико-химических характеристик образцов и анализ результатов, привело к значительному сокращению общего времени экспериментов с помощью разработанного нами аппаратно-программного комплекса [317 – 318], блок-схема которого приведена на рисунке 2.1.

Описание комплекса и анализ его работы. Аппаратно-программный комплекс состоит из следующих частей: персонального компьютера (ПК); генераторного блока, в который входят микроконтроллер (МК), усилитель мощности (УМ) и модуль управления и индикации для работы в автономном (без ПК) режиме; заземленной экранированной камеры для магнитной обработки, в которой находятся излучатель, измерительный модуль с исследуемым образцом, датчики напряженности ЭМП и температуры.

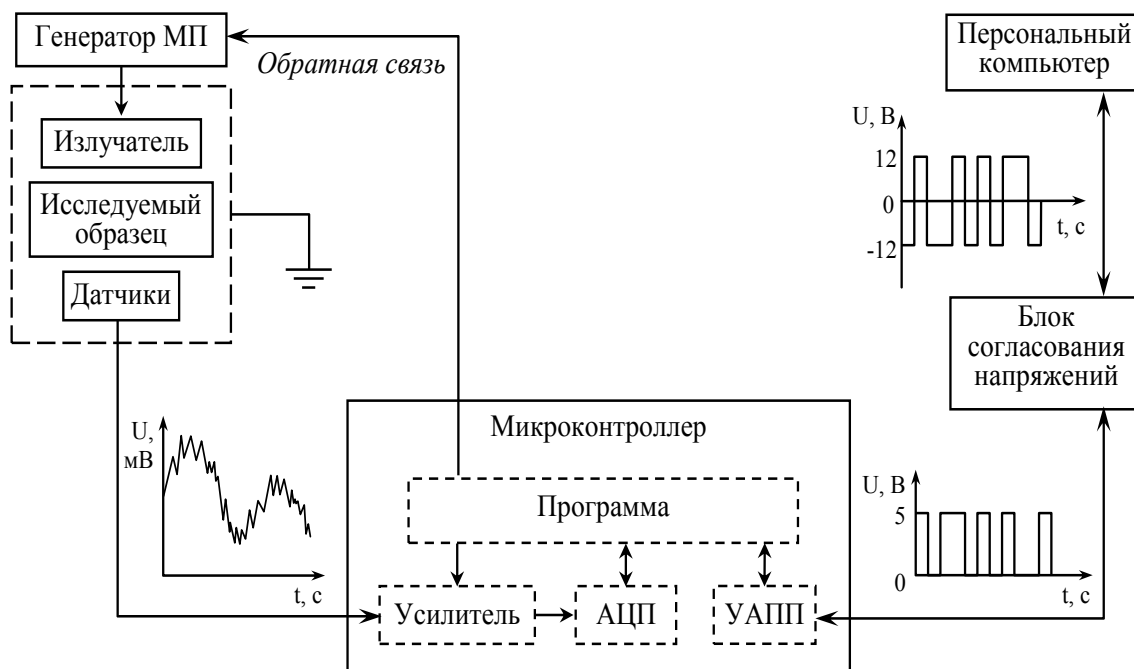


Рисунок 2.1 – Блок-схема аппаратно-программного комплекса.

Структурная схема разработанного аппаратно-программного комплекса, основанная на использовании микроконтроллера AVR среднего класса [319 – 321], приведена на рисунке 2.2.

Катушка помещена в экранированную камеру, которая была изготовлена из конструкционной стали толщиной 3 мм. Камера ослабляла действие внешних полей в диапазоне частот от 3 Гц до 300 кГц в 100 раз. Как известно, экранирование ЭМП достигается в результате действия двух физических явлений:

- экран из ферромагнитных материалов «втягивает» силовые линии ЭМП из-за меньшего, чем окружающая среда магнитного сопротивления материала, из которого он изготовлен;

- создание индуктивных вихревых токов в проводящем материале экрана и вторичного ЭМП, которое имеет силовые магнитные линии, компенсирующие воздействующее переменное ЭМП.

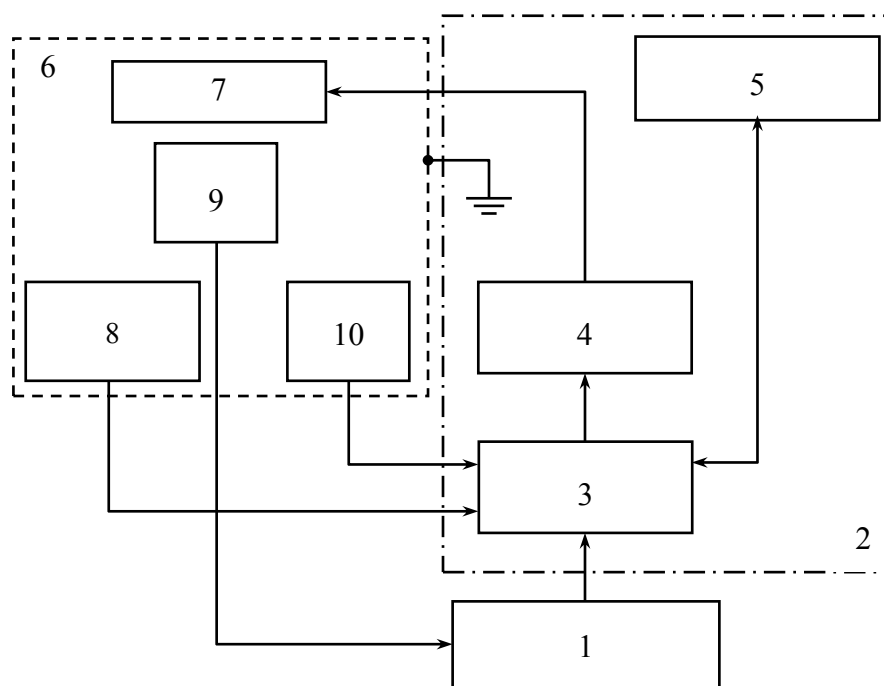


Рисунок 2.2 – Структурная схема аппаратно-программного комплекса автоматизированной обработки электромагнитным полем и исследования физико-химических характеристик водных растворов АФИ: 1 – персональный компьютер; 2 – генераторный блок; 3 – микроконтроллер; 4 – усилитель мощности; 5 – блок управления 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.

При низких частотах ЭМП в основном преобладает первое явление. В этом случае эффективность экранирования увеличивается при увеличении таких параметров экранирования, как толщины экрана и магнитная проницаемость материала, из которого он изготовлен.

Для экрана в форме куба, а именно такую форму защитной камеры мы использовали в наших исследованиях, эффективность магнитного экрана можно оценить по формуле:

$$S_0 \approx 1 - \frac{\mu d}{D}, \quad (2.1)$$

где d – толщина стенок экрана; D – размер стороны экрана кубической формы.

На высоких частотах ЭМП (десятки килогерц) проявляется поверхностный или скин-эффект. При высоких частотах глубина проникновения может быть настолько мала, а сопротивление настолько велико, что использование материалов с высокой магнитной проницаемостью, например пермаллоя, становится нецелесообразным.

При $f > 10$ МГц значительный экранирующий эффект обеспечивает медный экран толщиной всего 0,1 мм. Поэтому для повышения эффективности экранирования на высоких частотах стальную экранирующую конструкцию дополнили медным экраном из листов фольгированного стеклотекстолита. Листы стеклотекстолита покрывали внутреннюю поверхность стенок стальной камеры таким образом, что слой стеклоткани был обращен к стальным стенкам, а слой медной фольги – внутрь камеры. Для обеспечения надежного электрического контакта между слоями фольги, расположенными на разных листах стеклотекстолита, места их контакта были пропаяны. Слой фольги, расположенный на дверце камеры, соединялся в нескольких точках с одним из слоев на стенках гибкими проводниками с помощью пайки.

Геомагнитное поле измеряли с помощью измерителя магнитной индукции «Актаком АТТ-8701» (Россия). Напряженность геомагнитного поля на открытом пространстве составляла в среднем $(40,00 \pm 8,00)$ А/м, внутри защитной камеры достигала $(0,41 \pm 0,05)$ А/м.

Конформационное состояние многих макромолекул природных АФИ изменяется при увеличении температуры, что вызывает изменение их физико-химических свойств. Обработку водных растворов АФИ и биологических образцов ЭМП осуществляли при строго заданных температурных режимах. С помощью

датчика (10), который представлял собой медный термометр сопротивления, автоматически измеряли температуру водного раствора АФИ или биологической жидкости [322]. В качестве измерительного модуля (9) использовали хемилуминометр Lum-5773, флуоресцентный спектрофотометр Hitachi F-2700 или ИК-Фурье-спектрометр Tensor 27 (Bruker).

По результатам анализа элементной базы и наличия программного обеспечения для устройства был выбран микроконтроллер серии AT90PWM фирмы Atmel [323]. Для формирования низкочастотного сигнала использовался встроенный в микроконтроллер цифро-аналоговый преобразователь (ЦАП). Подключенный к ПК микроконтроллер осуществлял следующие задачи: формировал низкочастотный сигнал, который затем усиливался усилителем мощности и подавался на излучатель (7), создающий ЭМП, и проводил аппаратно-программный интерфейс между ПК и аналоговыми датчиками. Разработанная схема позволяет формировать синусоидальные сигналы в диапазоне частот от 0,01 до 1000 Гц с шагом 0,01 Гц. Выбрана 255-ступенчатая синусоидальная аппроксимация, допускающая погрешность установки амплитуды 0,4% от действующего значения напряжения. Частота дискретизации ограничена точностью приближения синусоиды (не менее 10 кГц) и производительностью алгоритма (не более 1/64 тактовой частоты) и составляет 62,5 кГц.

Разработанный комплекс работает по заданному алгоритму. В измерительный модуль помещали термостатированную кювету с раствором АФИ или биопробой и запускали программу для изучения соответствующих физико-химических параметров образцов. Если использовался ИК-спектрометр Bruker, то его программное обеспечение регистрировало спектр поглощения образца в диапазоне 4000 - 400 см⁻¹ без воздействия ЭМП. Далее программа задавала начальные значения частоты и напряженности ЭМП, подавала напряжение на излучатель, создающий поле, и при этих параметрах поля в течение заданного интервала времени происходила обработка образца ЭМП. После обработки ЭМП комплекс регистрировал ИК-спектр поглощения образца. В течении паузы продолжительностью 30 с образец в измеряемом модуле автоматически заменялся

на следующий. Затем при фиксированной напряженности изменялась частота ЭМП с заданным шагом в выбранном диапазоне. После каждой обработки полем очередного образца регистрировался спектр поглощения и формировалось семейство ИК-спектров, полученных при разных частотах ЭМП. Аналогичные семейство спектров формировалось при других значений напряженности поля.

После этого программа анализировала сформированные семейства спектров и находила длину волны ИК-излучения, при которой наблюдалось наибольшее изменение исследуемого физико-химического параметра (например, коэффициента поглощения) раствора АФИ после его обработки ЭМП. Программа анализировала зависимости коэффициента поглощения на заданной длине волны ИК-излучения от частоты ЭМП при различных напряженностях и находила значения частоты и напряженности ЭМП, соответствующие максимуму коэффициента поглощения.

С помощью измерительного комплекса изучали изменение физико-биохимических характеристик различных растворов и жидких биологических объектов: водные растворы природных АФИ (ДНК, белков), водные растительные экстракты, суспензии клеток, плазму крови.

Разработка аналоговой части аппаратно-программного комплекса.

С целью увеличения однородности ЭМП, которое использовалось для обработки биологических объектов, рассчитан и изготовлен излучатель ЭМП в виде соленоида диаметром 4,7 см и толщиной обмотки 9,8 мм, тип провода ПЭВ-1. Через фильтр нижних частот аналоговый сигнал с выхода ЦАП, подавался на блок управления и индикации (5), к которому подключен излучатель. Для изготовления соленоида был взят каркас длиной $l_c = 190$ мм и диаметром $D_{кар} = 47$ мм.

Величина магнитной индукции B на оси тонкого соленоида (однослойного или малослойного, т.е. там, где толщина обмотки мала по сравнению с диаметром) вычисляется по формуле:

$$B = 0,5 \mu_0 I n (\cos \alpha_1 + \cos \alpha_2), \quad (2.2)$$

где $n = N / l_c$ — число витков на единицу длины соленоида, I — ток, протекающий по соленоиду, α_1 и α_2 — углы, под которыми видны концы соленоида из точки на его оси, к которой относится величина B .

ЭМП максимально в центре соленоида и уменьшается к его концам. В случае достаточно длинного соленоида, когда углы α_1 и α_2 близки к нулю, поле в середине соленоида можно вычислить по формуле:

$$B = \mu_0 I N / l_c. \quad (2.3)$$

Ток, протекающий через соленоид, зависит от его импеданса Z :

$$I = U / Z, \quad (2.4)$$

где U — напряжение, приложенное к соленоиду.

Импеданс соленоида рассчитывается по формуле:

$$Z = [R_a^2 + (2\pi f L)^2]^{1/2}, \quad (2.5)$$

где R_a — активное сопротивление соленоида, L — индуктивность соленоида, f — частота электромагнитных колебаний.

На низких частотах индуктивным сопротивлением соленоида можно пренебречь и тогда его импеданс равен активному сопротивлению: $Z = R_a$, т.е.

$$I = U / R_a. \quad (2.6)$$

Активное сопротивление зависит от удельного сопротивления материала провода ρ , его длины l_{np} и площади поперечного сечения S :

$$R_a = \rho l_{np} / S. \quad (2.7)$$

Длина провода в соленоиде определяется средним диаметром обмотки D_{cp} и числом витков N : $l_{np} = \pi D_{cp} N$. Учитывая, что площадь поперечного сечения провода $S = \pi d_{np}^2 / 4$, где d_{np} — диаметр провода, а $D_{cp} = D_{кар} + k d_{np} / 2$, где k — число слоев провода в обмотке, получим:

$$R_a = 4\rho (D_{кар} + k d_{np} / 2) N / d_{np}^2. \quad (2.8)$$

Число витков соленоида можно представить как

$$N = k l_c / d_{np}. \quad (2.9)$$

Выражения (2.3), (2.8), (2.9) составляют систему уравнений, решив которую, можно найти параметры соленоида — число витков N , число слоев провода k , диаметр провода d_{np} . Для её решения должны быть известны оптимальное активное

сопротивление соленоида и максимальные величины магнитной индукции B и тока, протекающего через соленоид. Величина магнитной индукции B приведена в техническом задании.

Максимальный ток, определяется максимальным выходным напряжением усилителя мощности, которое в свою очередь зависит от напряжения питания, и активным сопротивлением соленоида. Так максимальное выходное напряжение интегрального усилителя TDA2030 при максимальном напряжении питания равном 36 В, сопротивлении нагрузки 20 Ом и коэффициенте гармоник 0,1 % (приемлемой для разрабатываемого устройства величине) составляет 15 В.

Для достижения запаса по выходному напряжению, обусловленного увеличением импеданса соленоида при увеличении частоты, в качестве номинального напряжения возьмем 10 В. Ток, протекающий через соленоид, составит при этом 0,5 А.

Из формулы (2.3) выразим число витков соленоида:

$$N = B l_c / \mu_0 I. \quad (2.10)$$

Подставив значения магнитной индукции и тока, получим $N = 3000$.

Из выражения (2.9) выразим диаметр провода d_{np}

$$d_{np} = k l_c / N. \quad (2.11)$$

Подставив (2.10) и (2.11) в (2.8), найдем число слоев провода — $k = 12$, и наконец, подставив найденные N и k в (2.11), найдем диаметр провода $d_{np} = 0,76$ мм.

Индуктивность L соленоида связана с числом витков N , площадью поперечного сечения S катушки:

$$L = \mu_0 N^2 S / l. \quad (2.12)$$

Расчет по формуле (2.11) дает значение индуктивности $L = 100$ мГн.

В приведенном расчете не учитывались конечные размеры соленоида — длина и толщина обмотки, а также толщина изоляции провода. Поэтому полученные значения имеют лишь оценочный характер. Для более точного расчета соленоида была использована программа Coil32. В качестве исходных данных были взяты следующие: длина намотки 0,19 м; толщина катушки 9 мм;

сопротивление катушки 20 Ом; тип провода ПЭВ-1. Были получены следующие результаты: диаметр провода 0,75 мм; диаметр провода с изоляцией 0,81 мм; число витков катушки 2735; число слоев 12; длина провода 485,309 м; индуктивность катушки 84 мГн. Протекающий через соленоид ток и импеданс зависят от частоты ЭМП. Для обеспечения постоянства частот в широком диапазоне величины магнитной индукции, создаваемой соленоидом, стабилизировали ток с помощью усилителя мощности, построенного по принципу источника тока. Для дополнительного подавления пульсаций тока с частотой дискретизации ограничили верхнюю частоту $f_{\text{с}}$ полосы пропускания УМ верхней частотой генератора, равной 1 кГц. Это возможно, если выходное сопротивление $R_{\text{вых}}$ усилителя будет больше импеданса соленоида на этой частоте: $R_{\text{вых}} > 2\pi f_{\text{с}} L$. Схема, удовлетворяющая этим требованиям, представляет собой УМ с комбинированной (отрицательной по напряжению и положительной по напряжению и току) обратной связью (рисунок 2.3). Необходимое выходное сопротивление усилителя можно получить путем подстройки с помощью резистора R_2 .

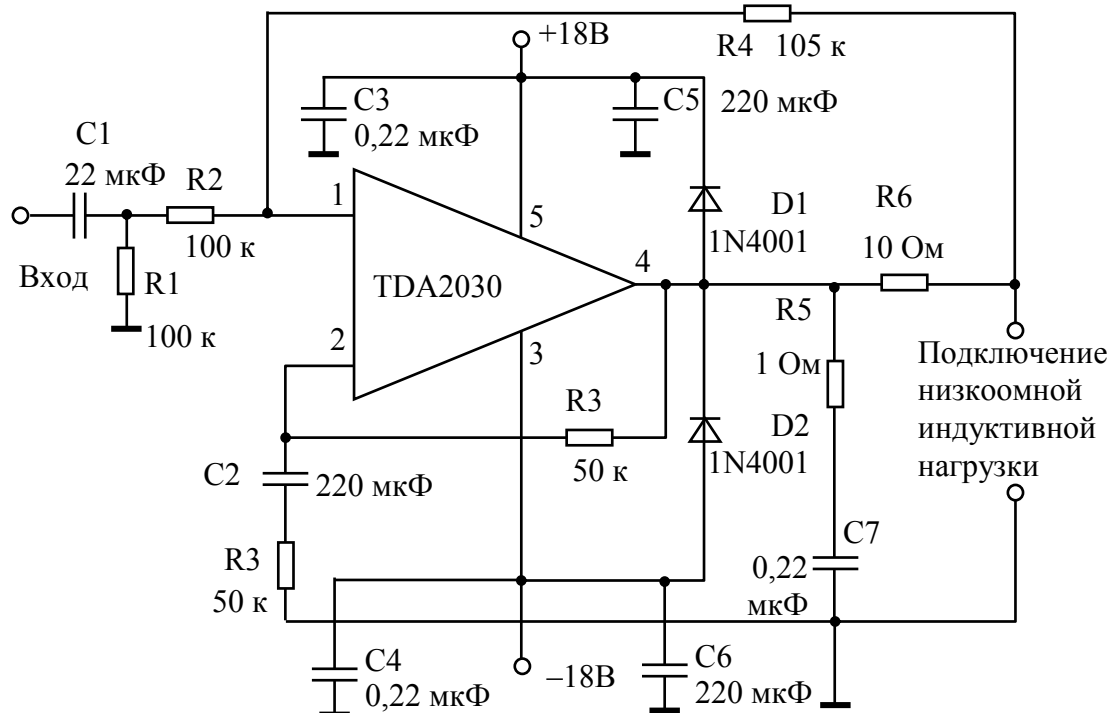


Рисунок 2.3 – Схема усилителя мощности по принципу источника тока с комбинированной обратной связью

Управление комплексом возможно одним из следующих способов: в автоматическом режиме через приёмопередающий интерфейс с помощью ПК или в ручном режиме с помощью клавиатуры на лицевой панели генераторного блока. Сокращение числа задействованных выводов микроконтроллера осуществлялось с помощью подключения кнопочной клавиатуры по одному проводу к встроенному аналого-цифровому преобразователю (АЦП). К нему подключается источник опорных напряжений, выдающий напряжения разного уровня при нажатии соответствующих клавиш, которые измеряются и сравниваются с таблицей значений. Проводится несколько таких измерений с паузами 15 мс и последующим усреднением.

Для отображения названия вводимой величины, единиц измерения и численных значений использовался алфавитно-цифровой ЖК-дисплей. Во время работы на экране периодически отображаются генерируемая частота, амплитуда и время до окончания эксперимента.

Интерфейс устройства условно делится на две части – программную и аппаратную. Органы управления, расположенные на генераторном блоке, позволяют задать основные параметры работы, а для программного управления устройством, как и для приёма данных, используется последовательный канал RS-232. Обмен данными осуществляется в полнодуплексном режиме. С целью наблюдения за ходом эксперимента и отображения результатов измерений в реальном времени, накопление и визуализация принятых данных велась на ПК. Для упрощения программного кода МК глубина дискретизации ограничивалась 8 битами, поэтому от модуля UART/RS-232 требовалась скорость передачи данных с учётом накладных расходов протокола не более 115,2 кбит/с.

Для создания, отладки, компиляции программы и записи кода в память микроконтроллера, а также для программирования fuse-битов использовались следующие программы: Code Vision AVR C Compiler, Visual Micro Lab, Pony Prog 2000, Uniprof. Проверка устойчивости работы МК проводилась в диалоговом режиме программными средствами HyperTerminal и COMPort. При

необходимости принимаемая информация может быть сохранена в текстовом виде или импортирована в Microsoft Office Excel.

Работа разработанного комплекса продемонстрирована на примере выбора параметров ЭМП для обработки суспензии клеток *Saccharomyces cerevisiae* с целью увеличения выхода биомассы.

Биологическая жидкость представляла собой водный раствор ДНК, выделенной из лизированных клеток *Saccharomyces cerevisiae*. Концентрация ДНК в растворе составляла 25 мкг/мл. Частоту ЭМП изменяли с шагом 0,2 Гц в диапазоне от 7 до 20 Гц. Растворы ДНК обрабатывали ЭМП в течение 15 мин при каждой частоте и фиксированной напряженности. После каждой обработки полем регистрировали ИК-спектры поглощения растворов ДНК.

Наибольшее изменение коэффициента поглощения исследуемой биологической жидкости после ее обработки НЧ ЭМП наблюдалось при длине волны ИК-излучения 1088 см^{-1} . Зависимость коэффициента поглощения от частоты имела максимум при частоте поля 8,0 Гц и напряженности 50 А/м. Общее время исследования при помощи разработанного аппаратно-программного комплекса сокращалось с 8 до 1,5 часов по сравнению с устройством, описанным в [316].

Суспензии клеток *Saccharomyces cerevisiae* подвергали воздействию ЭМП частотой 8,0 Гц и напряженностью 50 А/м в течение 15 минут. При фиксированной частоте поля 8,0 Гц изменяли напряженность ЭМП, которым воздействовали на исследуемые растворы ДНК и на суспензии клеток *Saccharomyces cerevisiae* в диапазоне от 30 до 550 А/м с шагом 10 А/м. Выявлено достоверное ($p < 0,05$) увеличение количества клеточной биомассы на $3 \cdot 10^5$ клеток/мл по сравнению с образцами, не обработанными ЭМП, которые служили контролем.

В качестве детекторов измерения физическо-химических параметров растворов АФИ и биологических проб после воздействия на них ЭМП также использовали флуоресцентный спектрофотометр Hitachi F-2700 или хемилюминометр Lum-5773 [324].

С помощью разработанного комплекса проводили обработку образцов синусоидальным ЭМП соответствующей частоты и напряженности при выбранной

температуре в течении заданного времени в пятикратной повторности. Образцы в закрытых стерильных пластиковых пробирках Эппендорфа в количестве 5 штук помещали в центр соленоида, толщина каждого образца составляла 2 мм. ЭМП в месте расположения образцов можно считать однородным, поскольку размеры соленоида в 50 раз превышали размеры пробирок Эппендорфа.

Напряженность поля в месте расположения образцов изменяли от 40 до 550 А/м, частоту – от 1 до 100 Гц. Нестабильность частоты в диапазоне от 3 Гц до 100 Гц составляла 0,2 %. Направления векторов постоянного геомагнитного поля и ЭМП были взаимно перпендикулярны. После обработки образцов ЭМП заданных параметров измеряли их физико-химические или биохимические характеристики.

Одинаковость условий для растворов АФИ и биопроб в контроле и опыте достигалась тем, что контрольные образцы перед регистрацией физико-химических параметров выдерживали в экранированной камере в течение времени воздействия ЭМП на опытные образцы, но обработку контрольных образцов ЭМП не проводили.

Величину напряженности воздействующего поля контролировали прямым измерением с помощью анализатора спектра «Экофизика-110А» (ООО ПКФ «Цифровые инструменты», Москва) с цифровым измерительным преобразователем для измерения переменного электрического и магнитного поля ПЗ-80-ЭН500 и антенной П6-70.

Временные режимы воздействия подбирали экспериментально. Протестированы три основные продолжительности: 15 минут, 30 минут и 1 час. 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.

2.3 Методики выделения моноклеарных клеток и ДНК, режимы проведения полимеразной цепной реакции

Для экспериментального исследования были отобраны образцы крови здоровых доноров. В образцах крови определяли содержание некоторых провоспалительных цитокинов и степень окислительного повреждения ДНК до и после электромагнитного воздействия. Из образцов также выделяли геномную ДНК с целью генотипирования и моноклеарные клетки. Критерием включения в исследуемую группу служил возраст участников от 19 до 24 лет. Критерий исключения: в исследовании не использовались образцы крови, в которых наблюдались признаки коагуляции.

Получение моноклеарных клеток. Выделение чистой суспензии моноклеарных клеток (МНК) из периферической крови доноров проводили в градиенте плотности фиколл-урографина (плотность 1,077 г/мл) согласно рекомендациям, изложенным в работах [325 – 326]. Полученные клетки трижды промывали и инкубировали в физиологическом растворе (0,9% NaCl). Для верификации и определения содержания МНК в пробах крови и полученной суспензии использовали счетчик клеток крови «Пикоскель ПС-4М» (ООО «Лабовей», Санкт-Петербург, Россия). Прибор предназначен для определения количества клеток крови в единице объема электропроводящей жидкости. Определяемая концентрация клеток крови находилась в пределах от $2 \cdot 10^3$ до $1 \cdot 10^7$ клеток/см³; обнаруживаемые размеры форменных элементов от 2 до 20 мкм; систематическая погрешность составляла не более 15%; время измерения одного образца не более 40 с. Общее содержание моноклеаров в полученной суспензии составила в среднем $8,7 \cdot 10^6$ клеток/см³. Морфологический контроль клеточной суспензии показал клеточный состав: содержание лимфоцитов - 71–72%, моноцитов - 26–28%.

Выделение ДНК из биологических образцов. ДНК из биообразцов выделяли с использованием реагентов готовых коммерческих наборов «ДНК-Экстран-1» (кат. ЕХ-509, ФГУН ВНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, Россия) сорбционным

методом. Кровь собирали в пластиковые пробирки объемом 2,5 мл с добавлением ЭДТА в качестве антикоагулянта в конечной концентрации 2,0 мг/мл. Содержимое пробирки перемешивали переворачиванием 2–3 раза, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре. Верхнюю фракцию собирали и переносили в отдельную пластиковую пробирку. Экстракцию ДНК из крови проводили в стерильном ламинарном боксе «БАВп-01-Ламинар», оснащенном термостатом для пробирок Эппендорфа, вакуумным отсасывателем для удаления надосадочной жидкости и вортексом.

В качестве тестового материала для выделения ДНК были выбраны следующие образцы: положительный контроль выделения (ВКО), отрицательный контроль выделения (ОКО) и внутренний контроль выделения (ВКО), которые представляли собой образцы крови здорового человека. Объем каждого образца составлял 0,1 мл. Отличительной особенностью ВКО является то, что это не плазмидная ДНК, а модифицированный посредством генно-инженерных манипуляций фаг лямбда. Использование фага лямбда позволяет снизить требования к условиям хранения препарата по сравнению с плазмидной ДНК. После отбора необходимого материала для исследования в пробирки добавляли раствор лизирующего гуанидина. Отобранные и приготовленные описанным выше способом образцы подвергали тщательному ресуспендированию на вортексе для удаления фрагментов клеточных органелл и мембран. После этого во все образцы добавляли универсальный сорбент по 25 мкл на пробирку. Процедуру ресуспендирования проводили несколько раз с последующим центрифугированием при 5000 об/мин. После этого надосадочную жидкость удаляли с помощью вакуумного отсасывающего устройства.

Образцы, содержащие сорбент, неоднократно и тщательно промывали и сушили при температуре 65 °С в течение 5 - 10 минут. Затем в пробирки для элюирования ДНК добавляли по 50 мкл ТЕ-буфера. Полученную жидкость ресуспендировали на вортексе и сушили в термостате около 5 минут при температуре 65 °С, затем снова центрифугировали при 12000 об/мин в течение 1 минуты. После этих процедур супернатант содержал очищенную ДНК, которую

отделяли от осадка с помощью вакуум-аспиратора и помещали в отдельные пробирки.

Данный метод выделения позволяет получить концентрацию ДНК в конечном растворе до 30 мкг/мл. Концентрацию ДНК в конечном растворе определяли спектрофотометрически с использованием коэффициента экстинкции $\epsilon_{260\text{нм}} = 0,020 \text{ (мкг/мл)}^{-1}\text{см}^{-1}$. Дальнейшие исследования проводили с разбавленными растворами ДНК с концентрацией 2,5 мкг/мл.

Чистоту растворов ДНК (содержание белков и других органических примесей) контролировали путем определения соотношения оптической плотности при длинах волн 260 и 280 нм.

Режимы проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для получения ампликонов ДНК использовали ПЦР в режиме «real time». При проведении ПЦР использовали готовые реактивы из набора «Амплисенс», включающие в себя полимеразу (TagF), ТМ-ревертазы (MMIv) и буферные растворы. Реакционные смеси готовили из расчета 10-ти исследуемых образцов. ПЦР проводили на приборе для проведения полимеразной цепной реакции роторного типа Rotor-Gene Q (S/N: R0812156, Qiagen, Германия). Режимы работы Rotor-Gene Q, используемые при проведении эксперимента, приведены в таблице 2.1.

Для осуществления ПЦР с помощью Rotor-Gene Q software 2.3.5 задавали определенные температурные режимы, специально подобранные для каждого этапа реакции. Детекция флуоресценции происходила на последних циклах амплификации на детекторах Green и Yellow. Программа амплификации включала в себя расплетение двойных спиралей ДНК, отжиг праймеров, циклирование и элонгацию цепи для накопления коротких отрезков ДНК. Длина полученных ампликонов составляла около 410 нуклеотидных пар. При проведении всех экспериментов использовали дистиллированную воду с удельным сопротивлением 300 кОм/см. Полученные растворы ампликонов очищали от примесей с помощью ультра-микрофльтрации. Использовали нанофльтрационную мембрану на основе полиамида ОПМН-П с размером пор 2 нм производства ЗАО НТЦ «Владипор» (Владимир, Россия).

Таблица 2.1 – Режимы работы Rotor-Gene Q при проведении ПЦР для получения ампликонов ДНК

Этапы ПЦР	Температура, °C	Продолжительность	Количество циклов
Плавление	50	15 мин	1
	95	15 мин	1
Отжиг праймеров	95	5 с	5
Циклирование	60	20 с	
	75	15 с	
Наращивание числа ампликонов	95	5 с	40
	60	20 с	
	72	15 с	

Типирование полиморфного варианта rs1052133 гена *8-oxoguanin DNA glycosylase OGG1* осуществляли методом ПЦР в режиме «real time», используя TaqMan-зонды, на амплификаторе Rotor-Gene Q. В качестве реагентов применяли готовые наборы для определения полиморфизма гена *8-oxoguanin DNA glycosylase* (rs1052133) (Кат. №NP-465-100, ООО «Синтол», Москва, Россия). Смесь для определения полиморфизма Pro332Ala гена *8-oxoguanin DNA glycosylase hOGG1* (rs1052133) готовили согласно прилагаемому протоколу из расчета 32-ти исследуемых образцов плюс четыре (три положительных и один отрицательный образец). С помощью программного обеспечения Rotor-Gene Q software 2.3.5 задавали температурные режимы, длительность каждого цикла и количество повторов каждой стадии. Параметры используемых режимов работы приведены в таблице 2.2.

После завершения амплификации анализировали результаты исследования с помощью программного обеспечения Rotor-Gene Q, установив значение пороговой линии 0,1 и выделив области соответствующих генотипов (Define Genotype, Wild Type, Heterozygous, Mutant).

Таблица 2.2 – Параметры режимов работы Rotor-Gene Q при проведении ПЦР для определения полиморфных вариантов rs1052133 Pro332Ala гена *8-oxoguanin DNA glycosylase hOGG1*

Этапы ПЦР	Температура, °C	Продолжительность	Количество циклов
Плавление	94	3 мин	1
Циклирование 1	94	20 с	10
	58	20 с	
	61	30 с	
Циклирование 2	94	20 с	30
	58	20 с	
	61	30 с	

Интерпретацию полученных результатов проводили согласно данным, представленным в таблице 2.3. Учитывали фланкирующую последовательность, частоту минорного аллеля G принимали равным 30,21 %, что соответствовало 1000 Genomes. С помощью on-line сервиса WpCalc (<https://wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg/>) оценили соответствие распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга.

Таблица 2.3 – Интерпретация результатов проведения ПЦР для определения полиморфизма Pro332Ala гена OGG1

Allele 1 (Green)	Аллель C	Генотип C/C
Heterozygote (Green + Yellow)	Аллель C + аллель G	Генотип C/ G
Allele 2 (Yellow)	Аллель G	Генотип G / G

2.4 Методики определения биохимических показателей крови и повреждений ДНК: содержания 8-оксигуанина, количества одонитевых разрывов

Определение содержания окислительных повреждений 8-оксигуанина (8-oxodG) в ДНК проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием моноклональных антител к 8-oxodG с помощью набора реагентов DNA Damage (Кат. EKS-360, Immun Diagnostic, Берлин, Германия) на микропланшетном фотометре Multiskan FC (тип: 357; S/N: 357-902375, Thermo Scientific, Массачусеттс, США) согласно протоколу. Растворы антител к 8-oxodG в разведении 1:250 и конъюгата мышиных антител IgG в разведении 1:500 готовились заранее. В 96-луночный микропланшет добавляли точные количества стандартных растворов, контрольных и тестируемых образцов. В лунки добавляли по 50 мкл антител 8-oxodG, инкубировали в течение 60 минут и тщательно 6 раз промывали промывочным буфером. Затем добавляли 50 мкл конъюгата мышиного IgG-антитела, снова инкубировали аналогичным образом и промывали. Вносили 50 мкл тетраметилбензидинового субстрата. Смесь мгновенного окрашивалась, ее инкубировали в течение 15 мин в темноте, после чего останавливали реакцию добавлением стоп-раствора. После добавления стоп-растворов измеряли оптическую плотность образцов при длине волны 450 нм на микропланшетном фотометре Multiskan FC (Thermo Scientific, США). В каждом эксперименте измерения проводили не менее трех раз, определяя среднее значение. Используя стандартный раствор с известной концентрацией 8-oxodG, путем серийного разведения строили калибровочную кривую зависимости значений оптической плотности от концентрации 8-oxodG. Количественную оценку содержания 8-oxodG в ДНК проводили с использованием предварительно построенной калибровочной кривой, которая имела линейный характер в диапазоне концентраций 8-oxodG 0,94 – 60,00 нг/мл. Чувствительность метода составила 0,59 нг/мл.

Количество однонитевых разрывов (ОР) ДНК в лимфоцитах определяли до и после их обработки ЭМП согласно рекомендациям, изложенным в монографии [326]. Клетки лизировали 4,5 М раствором мочевины в течение 10 мин при 24 °С. Клеточные лизаты экспериментальных образцов подвергали щелочной обработке в течение 30 мин при 0 °С, а затем встряхивали на вортексе в течение 15 с, при этом достигалось раскручивание молекул ДНК. После этого ко всем образцам добавляли раствор бромистого этидия с концентрацией 2 мкг/см² в фосфатно-буферном растворе (3,8-диамино-6-этил-5-фенилфенантридия бромида) - интеркалирующий агент, вещество, способное встраиваться между азотистыми основаниями ДНК. Регистрировали спектры флуоресценции лизатов лимфоцитов с бромистым этидием на флуоресцентном спектрофотометре Hitachi F-2700 (Hitachi High-Tech Science Corporation, Токио, Япония) при длине волны возбуждения 540 нм в диапазоне от 500 до 740 нм, максимум интенсивности флуоресценции составлял (610±5) нм. Интенсивность флуоресценции полученных образцов измеряли в кварцевой кювете под прямым углом к направлению возбуждающего света. Нормировали данные по концентрации ДНК. Оценивали отношение количества щелочнолабильных сайтов ДНК к общему количеству ДНК. Сравнивали полученные значения содержания ОР ДНК в контрольных (без воздействия ЭМП) и экспериментальных образцах и полученные результаты выражали в процентах.

Для регистрации фоновой флуоресценции готовили пробу, содержащую все компоненты, как в экспериментальных пробах, и в той же концентрации, но без добавления ДНК. Количество ОР ДНК лимфоцитов определяли после каждого воздействия ЭМП на биологические образцы.

Определение общего содержания перекисей липидов в плазме крови и перекисных соединений в водных растворах ДНК проводили с помощью спектрофотометрического метода, используя набор «PerOx Метод определения перекисей в образцах ЭДТА плазмы» (Immun Diagnostic AG, Германия) на микропланшетном фотометре Multiskan FC (тип: 357; S/N: 357-902375, Thermo Scientific, Массачусеттс, США). Калибровочный график линеен в диапазоне $1 \cdot 10^{-8} \div 5 \cdot 10^{-2}$ М.

Определение активности каталазы осуществляли по методике, основанной на оценке скорости разрушения пероксида водорода с помощью спектрофотометрического метода в УФ области при длине волны 260 нм, как описано в работе [327].

Определение уровня содержания тиоловых групп проводили с помощью способа, основанного на реакции SH-групп тиолсодержащих соединений в плазме крови, в основном, остатков цистеина белков с 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной) кислотой. Высвобождаемый при этом тионитрофенильный анион имеет интенсивно желтую окраску и максимум поглощения при 412 нм. Концентрация данного аниона была прямо пропорциональна содержанию тиоловых групп в исследуемой биожидкости, как описано в работах [328 – 329].

Определение активности супероксиддисмутазы осуществляли по методике, основанной на оценке степени ингибирования автоокисления кверцетина в тест-системе с генерацией супероксидного анион-радикала в присутствии плазмы крови, согласно работе [330].

Активность глутатионпероксидазы определяли по методике, основанной на оценке скорости расходования восстановленной формы глутатиона в реакции с гидроперекисью трет-бутила. Об изменениях концентрации глутатиона судили по реакции с 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной) кислотой, как это указано в работе [330].

Определение уровней провоспалительных цитокинов интерлейкина-1 ($IL-1\beta$), интерлейкина-6 ($IL-6$), фактора некроза опухолей ($TNF\alpha$) в сыворотке крови до и после обработки НЧ ЭМП образцов крови доноров проводили с помощью наборов ООО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия) на микропланшетном фотометре Multiskan FC (Thermo Scientific, США) согласно протоколу. Метод основан на «сэндвич» варианте твердофазного ИФА с применением моно- и поликлональных антител к соответствующему цитокину. Так, при определении концентрации $TNF\alpha$ использовали планшет с иммобилизованными моноклональными антителами к $TNF\alpha$, калибровочные образцы, аттестованные относительно стандарта $TNF\alpha$ (RnD Systems, Inc., США), фосфатно-солевой

буферный раствор с твином (ФСБ-Т), субстратный буферный раствор, раствор тетраметилбензидина, конъюгаты.

На первом этапе при проведении ИФА в планшет-стрипы добавляли разбавленные образцы сыворотки крови человека и необходимые реагенты в расчетных концентрациях. Стрипы запечатывали пленкой и инкубировали при температуре 37 °С в течение 120 минут в термостатическом шейкере со скоростью 700 об/мин. Далее с помощью Wellwasher лунки планшета 5 раз промывали раствором ФСБ-Т, чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку во время каждого цикла промывки добавляли не менее 350 мкл жидкости. Время между заполнением и опорожнением лунок составляло не менее 30 секунд. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалили. Затем в лунки добавляли раствор конъюгата 1 (антитела к α -ФНО человека с биотином), снова закрывали пленкой и инкубировали 60 минут при температуре 37 °С в шейкере. После инкубации планшет еще раз промывали 5 раз. Добавляли конъюгат 2 (стрептавидин с пероксидазой хрена) и снова инкубировали в течение 60 мин. После всех промывок, добавления стоп-растворов и повторной инкубации измеряли оптическую плотность (ОП) с помощью Multiscan в двухволновом режиме: при 450 нм и 620-655 нм. По результатам измерений рассчитывали среднее арифметическое значение ОП в лунках с анализируемыми пробами. Таким образом, общее время инкубации составило 4 часа. Воспроизводимость методики составляет 8%. Перекрестной реакции использованных в наборе антител к TNF α с другими цитокинами и, в частности, с *IL-1 β* и *IL-6* не выявлено.

Набор «Интерлейкин-1бета-ИФА-БЕСТ» содержал планшет с иммобилизованными моноклональными антителами к *IL-1 β* , растворы, аналогичные перечисленным выше, и конъюгат 1, содержащий биотинилированные антитела к *IL-1 β* . Порядок выполнения методики аналогичен предыдущему. Набор «Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ» содержал планшет с иммобилизованными моноклональными антителами к *IL-6*, растворы, аналогичные

перечисленным выше, и конъюгат 1, содержащий биотинилированные антитела к *IL-6*.

Градуировочные графики для *IL-1β* и *IL-6* линейны в диапазоне 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 *TNFα* график линейен в диапазоне 0–100 пг/мл, уравнение имело вид $y = 0,0073x + 0,0923$.

Все растворы готовили на бидистиллированной воде, при необходимости использовали кислоты марки «ос.ч.». Стандартные растворы хранили в холодильнике при температуре 5 °С. Все работы проводились в химически чистых, стерильных емкостях. Растворы с наименьшей концентрацией готовили последовательными разведениями непосредственно перед экспериментом.

Определение физико-химических и биохимических показателей, уровней цитокинов, уровней окислительных и структурных повреждений ДНК до и после обработки ЭМП проводили без информирования оператора о принадлежности содержимого каждой пробирки к конкретному воздействию.

2.5 Физико-химические методы, используемые при выполнении работы

Регистрация хемилюминесценции водных растворов ДНК, взвеси моноклеарных клеток, биопроб. Интенсивности хемилюминесценции образцов до (контроль) и после обработки ЭМП измеряли с помощью хемилюминометра Lum-5773 (ООО «ДИСофт», Москва). В ряде экспериментов при регистрации хемилюминесценции в качестве стимулятора совместно с ЭМП использовали раствор пероксида водорода. Спектральный диапазон ФЭУ хемилюминометра Lum-5773 составляет 300–650 нм, значения интенсивности свечения соответствуют общему количеству фотонов, подсчитанных за период измерений, при этом 1 мВ ≈

1 фотон/сек. Чувствительность прибора определяла разрешающую способность измерений. Использовали диапазон до 10000 импульсов с разрешением 1 импульс. При измерениях использовали термостат, встроенный в хемилюминометр. Измеряемые образцы находились в кварцевой кювете, расположенной перпендикулярно направлению возбуждающего света.

Для определения содержания дейтерия в воде использовался ЯМР фурье-спектрометр 400 МГц (марка FT NMR JEOL ECA 400, серия JNM-ECA с использованием зонда (датчика) 40TH5AT/FG2) со следующими характеристиками: индукция постоянного магнитного поля 9,389766 Тл; диапазон частот от 10 до 400 МГц, с шагом 0,01 Гц; резонансная частота ядер резонансная частота ядер ^2H равна 61,37 МГц); чувствительность для ^1H : ≥ 220 (для 0,1 % раствора этилбензола в дейтерохлороформе); дрейф постоянного магнитного поля: менее 4 Гц/час; ширина ^1H ЯМР сигнала на полувысоте: не более 0,45 Гц (для 0,1 % раствора этилбензола в дейтерохлороформе).

Регистрация ИК спектров водных растворов. ИК-спектры водных растворов регистрировали на ИК-фурье-спектрометре Tensor 27 (Bruker) методом ослабленного полного внутреннего отражения (НПВО) в спектральном диапазоне 4000–500 см^{-1} с использованием приставки НПВО для спектроскопии Platinum ATR unit A 225, которая имеет спектральный диапазон 10 000 – 10 см^{-1} и размер поверхности кристалла $2 \times 2 \text{ мм}^2$. Толщина исследуемого слоя водного раствора определяется глубиной проникновения ИК-излучения из кристалла в жидкий раствор и составляла 0,005–0,05 мм. Отношение сигнал/шум за 1 мин сканирования с разрешением 4 см^{-1} составило 45 000:1, минимальное спектральное разрешение не более 0,9 см^{-1} .

Спектры флуоресценции регистрировали с помощью флуоресцентного спектрофотометра Hitachi F-2700 (Япония). Излучаемый световой поток измерялся в диапазоне длин волн от 220 до 800 нм с шагом 0,5 нм и различными длинами волн возбуждения $\lambda_{\text{возб}}$. Скорость сканирования – 1500 нм/мин, без задержек. Ширина полосы возбуждающего и излучаемого светового потока составляла 10 нм, напряжение на фотоумножителе составляло 400 В, время отклика 0,4 с.

Спектры поглощения получали с помощью двухлучевого спектрофотометра U-2900 (Япония) и Shimadzu UV-1800 (Япония). Спектры поглощения в УФ области спектра записывали в кварцевой кювете толщиной 10 мм. Полученные данные обрабатывали с помощью программы UV-Solutions. Методика и режимы записи описаны в работе [315].

Спектры кругового дихроизма регистрировали на спектрополяриметре J-810 (Jasco Inc., США), спектральный диапазон составил 167 – 900 нм, чувствительность – 100 мград.

При изучении воздействия СВЧ и КВЧ ЭМП на суспензии клеток использовали генератор сигналов Agilent E4437B (Agilent Technologies, США, диапазон 250 кГц – 4 ГГц), а также генераторы P2-68, P2-69. С выхода генератора синусоидальные колебания неионизирующего микроволнового излучения поступали на излучающее устройство (волновод), помещенное внутри экранирующей камеры для облучения исследуемых образцов. Плотность мощности (ПМ) на расстоянии 10 см от открытого конца волновода составляла 6 мВт/см². Каждый образец помещали в стандартное положение относительно излучателя в экранирующей камере. Время облучения образцов изменяли в интервале от 30 до 60 сек.

Электронную микроскопию полученных наночастиц серебра проводили на растровом 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. Размеры наночастиц серебра оценивали относительно стандартного маркера длиной 10 или 100 нм.

Элементный состав ассоциатов наночастиц серебра с альбумином определяли методом количественного рентгенофлуоресцентного анализа с энергетической дисперсией на приборе EDX-8000 (Shimadzu, Япония) на базе кремниевого дрейфового детектора с термоэлектрическим охлаждением. Условия анализа: в качестве источника возбуждающего излучения использовалась рентгеновская трубка с родиевым анодом, время экспозиции 500 с, диаметр облучаемой зоны 10 мм, угол падения на образец 45°, угол рассеяния на детекторе

составлял 45°, процессы рассеяния и отражения излучения происходили в вакуумной среде.

Концентрацию растворенного кислорода в водных растворах природных АФИ измеряли с помощью анализатора HI 9146 (Hanna Instruments, Германия).

Методы статистического анализа данных. Соответствие распределения генотипов равновесию Харди — Вайнберга оценивали в online-сервисе WpCalc Equilibrium Hardy-Weinberg.Calculator of Hardy-Weinberg equilibrium. Available: <https://wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg>. Для сравнения частот аллелей и генотипов между анализируемыми группами использовали критерий χ^2 .

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна — Уитни [331]. 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 ($\varepsilon, \%$).

ГЛАВА 3 МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ВОДНО-СОЛЕВЫХ РАСТВОРАХ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ИНГРЕДИЕНТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ

3.1 Образование пероксида водорода в растворах активных фармацевтических ингредиентов в зависимости от частоты воздействующего электромагнитного поля

Вода – структурно неоднородная по химическому составу и физическим параметрам многокомпонентная открытая система, чувствительная к воздействию окружающей среды, в том числе факторов электромагнитной природы. При изучении процессов, происходящих в воде, особый интерес представляет термодинамически стабильный гидратированный электрон e^-_{aq} , являющийся в воде самым сильным восстановителем [20 – 21], с участием которого происходит большое число реакций как в неорганической, так и в органической химии.

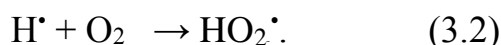
В водной среде всегда имеется некоторое количество АФК и происходят обратимые реакции перехода одних форм АФК в другие, как это обсуждается в работах Л.С. Беловоловой [17 – 18], С.В. Гудкова [238 – 239], В.И. Брускова с соавт. [259 – 260] и других исследователей [332 – 334].

Появление АФК в нано- и микромолярных концентрациях вызывает каскад сопряженных электрон-радикальных реакций (известно более 30 реакций) и приводит к изменению окислительно - восстановительного потенциала среды. Среди таких реакций есть как очень быстрые, так и медленные, что приводит к длительным колебаниям физико-химических свойств водных систем. Ниже приведены некоторые ключевые уравнения образования пероксида водорода, самой долгоживущей АФК, в водных растворах природных АФИ – ДНК или белков.

На поверхности имеющихся в воде газовых нанопузырьков, стабилизированных адсорбированными ионами, происходит восстановление протонов с участием гидратированного электрона e^-_{aq} и образование свободных радикалов $H^\bullet$ [20]:



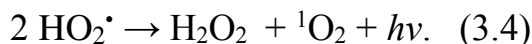
Образующийся радикал водорода, обладающий неспаренным электроном, взаимодействует с молекулами растворенного кислорода, концентрация которых на 3 порядка выше, чем суммарная концентрация протонов и гидроксид-ионов (10^{17} против 10^{14} молекул/см³), образуя гидропероксидный радикал:



Из гидропероксидного радикала возможно образование H_2O_2 несколькими способами:



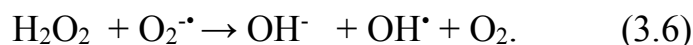
или



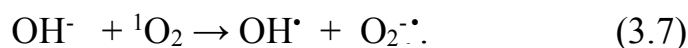
С увеличением концентрации пероксида водорода рН раствора увеличивается, поскольку в молекуле H_2O_2 связываются два протона. При нейтральном и щелочном рН водной среды гидропероксидный радикал распадается с образованием супероксид-иона:



Последовательное протекание реакций (3.1 – 3.5) приводит к накоплению пероксида водорода, синглетного кислорода и супероксид-иона в водном растворе. 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:



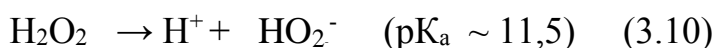
К образованию пероксида водорода также приводит дисмутация гидроксильного радикала:



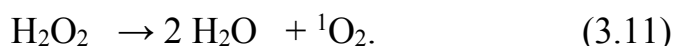
который может взаимодействовать с образующимся пероксидом водорода:



С ростом pH раствора пероксид водорода самопроизвольно распадается с подкислением среды



или с образованием синглетного кислорода



Самораспад пероксида по уравнению реакции (3.11) имеет порядок от 1 до 2 и приводит к образованию синглетного кислорода ${}^1\text{O}_2$, который вновь участвует в образовании АФК.

Вектор ЭМП ориентирует магнитные моменты радикалов, ускоряя или замедляя скорости протекающих химических реакций как на поверхности нанопузырьков, так и в объеме раствора. ЭМП действует также на магнитные моменты молекул АФИ и на молекулы воды, входящие в их гидратные оболочки. Гидратные оболочки белков составляют в среднем 1 – 2 нм, а молекул ДНК – 1,5 – 2 нм [335]. Имея пренебрежимо малую энергию, поле снимает спиновые запреты, переключая реакции в радикальных парах со спин-запрещенных каналов на спин-разрешенные [336]. Такое влияние может проявляться в изменении скоростей реакций (3.2) – (3.8) и увеличении суммарного выхода пероксида водорода.

Введя обозначение k_i для констант скоростей реакций (3.1) – (3.10), запишем соответствующие кинетические уравнения для скорости образования в водных растворах разных АФК в общем виде:

$$\frac{d}{dt} [\text{H}^\bullet] = k_1[\text{H}^+][\text{e}^-_{\text{aq}}] - k_2[\text{H}^\bullet][\text{O}_2] - k_3[\text{H}^\bullet][\text{HO}_2^\bullet], \quad (3.12)$$

$$\frac{d}{dt} [\text{HO}_2^\bullet] = k_2[\text{H}^\bullet][\text{HO}_2^\bullet] - k_4[\text{HO}_2^\bullet]^2 - k_3[\text{HO}_2^\bullet][\text{H}^\bullet] - k_5[\text{HO}_2^\bullet], \quad (3.13)$$

$$\frac{d}{dt} [{}^1\text{O}_2] = k_4[\text{HO}_2^\bullet]^2 - k_7[{}^1\text{O}_2][\text{OH}^-] + k_{10}[\text{H}_2\text{O}_2], \quad (3.14)$$

$$\frac{d}{dt} [\text{O}_2^{\cdot-}] = k_5[\text{HO}_2^{\cdot}] - k_6[\text{H}_2\text{O}_2][\text{O}_2^{\cdot-}] + k_7[\text{OH}^{\cdot}], \quad (3.15)$$

$$\frac{d}{dt} [\text{OH}^{\cdot}] = k_6[\text{H}_2\text{O}_2][\text{O}_2^{\cdot-}] + k_7[\text{OH}^{\cdot}][^1\text{O}_2] - k_8[\text{OH}^{\cdot}], \quad (3.16)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} [\text{H}_2\text{O}_2] = & k_3[\text{H}^{\cdot}][\text{HO}_2^{\cdot}] + k_4[\text{HO}_2^{\cdot}]^2 + k_8[\text{OH}^{\cdot}]^2 - k_6[\text{H}_2\text{O}_2][\text{O}_2^{\cdot-}] - k_9[\text{H}_2\text{O}_2] - \\ & - k_{10}[\text{H}_2\text{O}_2]. \end{aligned} \quad (3.17)$$

Используем условие постоянства промежуточных продуктов в реакциях (3.1) – (3.10) и упрощение кинетической модели производства и убыли пероксида водорода. В результате решения системы уравнений (3.12) – (3.17) получаем выражение для скорости образования наиболее устойчивой и долгоживущей АФК – пероксида водорода:

$$\frac{d}{dt} [\text{H}_2\text{O}_2] = \frac{k_1}{2} [\text{OH}^{\cdot}][e^-_{\text{aq}}] + \frac{k_4}{2} \left(\frac{k_2}{k_3}\right)^2 [\text{O}_2]^2 - k_{10}[\text{H}_2\text{O}_2]. \quad (3.18)$$

Из уравнения (3.18) следует, что скорость накопления пероксида водорода зависит от рН, концентрации гидратированных электронов e^-_{aq} и концентрации растворенного кислорода.

Образование АФК в водном растворе под влиянием ЭМП приводит к появлению длительных химических преобразований одних форм в другие, имеющих циклический характер. Процессы с участием АФК характеризуются наличием положительных и отрицательных обратных связей, а также относительно медленным накоплением пероксида водорода и его лавинообразным распадом. Для возникновения колебаний система должна иметь не менее двух инерционных звеньев и одного звена, инвертирующего фазу воздействия, а также должны выполняться условия баланса амплитуд и баланса фаз. Тогда при замыкании входа и выхода в системе возникают незатухающие колебания концентрации пероксида водорода, для которых справедливо уравнение [337]:

$$\frac{d^2}{dt^2} [\text{H}_2\text{O}_2] + \delta \frac{d}{dt} [\text{H}_2\text{O}_2] + \omega_0^2 [\text{H}_2\text{O}_2] = 0. \quad (3.19)$$

Уравнение (3.19) является дифференциальным уравнением свободных колебаний концентрации пероксида водорода, возникающих в гармоническом осцилляторе. В этом уравнении выражение, стоящее перед $[\text{H}_2\text{O}_2]$, есть квадрат частоты собственных колебаний концентрации пероксида водорода в химическом

осцилляторе ω_0^2 , а выражение, стоящее перед $\frac{d}{dt}[H_2O_2]$, — показатель затухания этих колебаний. Его обозначим δ .

НЧ ЭМП с большой магнитной составляющей, изменяющееся синусоидально, описывается уравнением $H = H_m \sin \omega t$. Если пренебречь в первом приближении нелинейными процессами, происходящими в растворе АФИ под действием ЭМП, и предположить, что приращение концентрации пероксида водорода в растворе изменяется пропорционально напряженности в исследуемом интервале значений напряженности согласно выражению

$$\Delta[H_2O_2] = \alpha H_m \sin \omega t,$$

где α — коэффициент пропорциональности,

то колебания концентрации пероксида водорода станут вынужденными и для них будет справедливо уравнение:

$$\frac{d^2}{dt^2}[H_2O_2] + \delta \frac{d}{dt}[H_2O_2] + \omega_0^2[H_2O_2] = \alpha H_m \sin \omega t. \quad (3.20)$$

Решение такого неоднородного уравнения равно сумме общего решения однородного уравнения, характеризующего затухающий процесс образования пероксида водорода, происходящего после резкого приложения внешнего воздействия, и частного решения, описывающего уже установившийся колебательный процесс.

Общее решение записывается в виде:

$$[H_2O_2] = [H_2O_2]_{m0} e^{-\delta t} \sin(\omega_0 t + \varphi_0), \quad (3.21)$$

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

Частное решение имеет вид:

$$[H_2O_2] = [H_2O_2]_m \sin(\omega t + \varphi), \quad (3.22)$$

где $[H_2O_2]_m$ — амплитуда вынужденных колебаний концентрации пероксида водорода при воздействии ЭМП с большой магнитной составляющей.

Для определения амплитуды вынужденных колебаний $[H_2O_2]_m$ в уравнении (3.20) найдем значения первой и второй производной уравнения (3.22):

$$\frac{d}{dt}[H_2O_2] = [H_2O_2]_m \cos(\omega t + \varphi), \quad (3.23)$$

$$\frac{d^2}{dt^2}[H_2O_2] = \omega^2 [H_2O_2]_m \sin(\omega t + \varphi). \quad (3.24)$$

Подставив полученные выражения в уравнение (3.20), получим значение амплитуды вынужденного колебания концентрации пероксида водорода при действии ЭМП:

$$[H_2O_2]_m = \alpha H_m ((\omega_0^2 - \delta^2)^2 + 4\delta^2 \omega^2)^{-1/2}. \quad (3.25)$$

Предположим, что потери в химическом осцилляторе АФК невелики, а частота внешней силы незначительно отличается от собственной частоты колебаний концентрации H_2O_2 в растворе, тогда получим решение уравнения (3.20) в следующем виде:

$$[H_2O_2] = [H_2O_2]_{m0} e^{-\delta t} \sin(\omega_0 t + \varphi) + [H_2O_2]_m \sin(\omega t + \varphi), \quad (3.26)$$

$$[H_2O_2]_m = \alpha H_m ((\omega_0^2 - \omega^2)^2 + 4\delta^2 \omega^2)^{-1/2}, \quad (3.27)$$

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

В выражении (3.26) первое слагаемое стремится к нулю. Другими словами, со временем собственные колебания концентрации пероксида водорода в растворе затухают и проявляются только вынужденные колебания $[H_2O_2]_m$, амплитуда которых зависит от частоты воздействующего поля.

С помощью предложенной модели, учитывающей колебания концентрации пероксида водорода в воде под действием синусоидального НЧ ЭМП, и разработанных программ для ЭВМ (Свидетельства о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2023661816 и № 2024680989), получили аппроксимированную зависимость содержания пероксида водорода от частоты ЭМП в водном растворе ДНК, приведенную на рисунке 3.1.

Значение напряженности ЭМП при расчете зависимости принимали равным 450 А/м. Скорость затухания собственных колебаний концентрации пероксида водорода определили из экспериментальных данных, она составила 0,7–2,5 с.

Циклические частоты собственных колебаний концентрации пероксида водорода определяли по положениям локальных максимумов экспериментальных зависимостей содержания пероксида водорода в водных растворах ДНК.

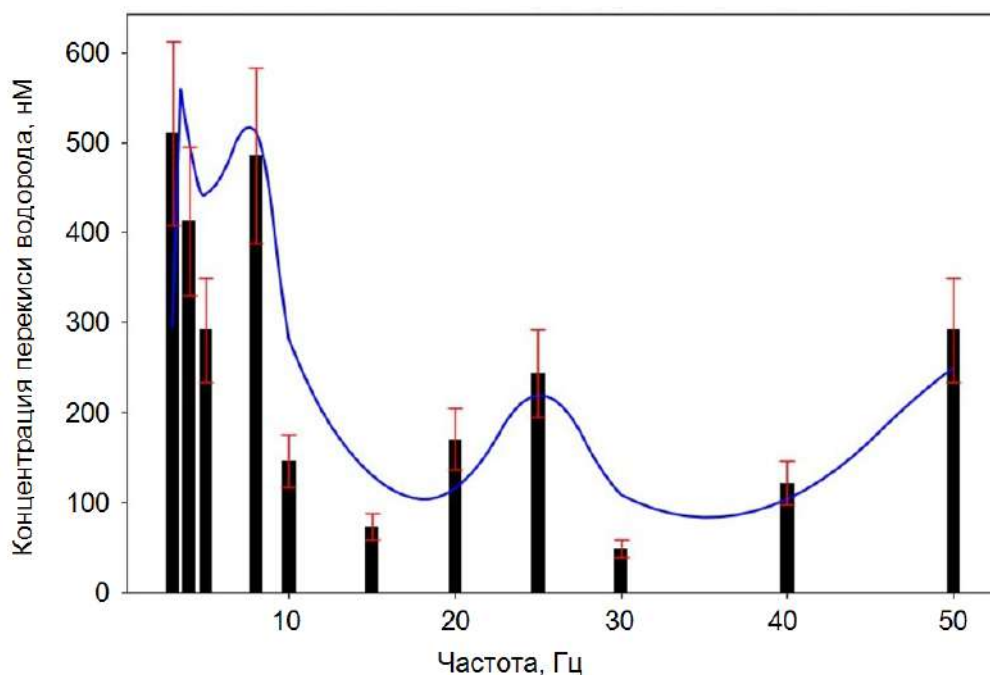


Рисунок 3.1 – Аппроксимированная зависимость содержания пероксида водорода (синяя линия) и экспериментально определенное суммарное количество перекисных соединений в растворах ДНК с концентрацией 2,5 мкг/мл (черные столбики) от частоты ЭМП. Напряженность поля 450 А/м, время воздействия 30 мин.

Аппроксимированная зависимость имеет четыре максимума концентраций пероксида водорода в растворе ДНК при частотах поля 3, 8, 25 и 50 Гц. Экспериментально определенные значения концентрации перекисных соединений в растворах ДНК после воздействия ЭМП разной частоты совпадают с рассчитанными максимумами аппроксимированной зависимости. Одна из разработанных Программ расчета содержания перекисных соединений в водных растворах ДНК в зависимости от частоты ЭМП приведена в приложении 1 (Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2023661816).

Колебания концентрации пероксида водорода в водных растворах АФИ (процессы ее накопления и разложения) при электромагнитном воздействии связаны с поглощением и выделением протонов [338 – 339]. В результате происходят колебания рН растворов и окислительно-восстановительного потенциала, что влияет на динамику гидратных оболочек макромолекул АФИ и приводит к изменению их конформационного или структурного состояния.

В нормальных физиологических условиях в живых клетках продукция АФК и протекание биохимических циклов превращений АФК в клетках и внеклеточном пространстве происходят ритмично, все клеточные процессы сбалансированы и синхронизированы. Синхронизация частоты ЭМП с частотой химических или биохимических колебаний в живых организмах обеспечивает усиление биологического эффекта поля. Немонотонность биологического эффекта при увеличении частоты ЭМП (частотная селективность) приводит к появлению, так называемых, «частотных окон» – магнитобиологических эффектов, которые описаны во многих экспериментальных работах и обзорах [см., например, 2, 3] и теоретически объяснены в статьях [192 – 194].

На основе разработанных нами программ для ЭВМ возможен расчет параметров НЧ ЭМП, генерирующего АФК в водных растворах АФИ, а также в водных вытяжках, лизатах клеток, клеточных взвешах и др. объектах. Предварительная оценка параметров НЧ ЭМП, при которых в водных растворах АФИ увеличивается количество АФК, является дополнением к разработанному комплексу автоматизированной обработки ЭМП, описанному в главе 2, и значительно сокращает общее время исследования изменения физико-химических свойств растворов АФИ при электромагнитном воздействии.

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

Изучено влияние синусоидального низкочастотного ЭМП с напряженностью (550 ± 20) А/м на водные растворы ДНК. Получили макромолекулы одинакового размера - ампликоны ДНК. В ходе этой части исследования решали следующие задачи: выделение ДНК из крови доноров; проведение ПЦР для получения коротких ампликонов (длиной 410 н.п.) с одинаковым нуклеотидным составом; очистка полученных ампликонов от примесей с помощью ультра-микрофльтрации с использованием нанофльтрационной мембраны ОПМН-П с размером пор 2 – 3 нм (ЗАО НТЦ «Владипор», Владимир, Россия); обработка водных растворов ампликонов ДНК ЭМП разной частоты; регистрация спектров хемилюминесценции растворов ампликонов ДНК; оценка влияния ЭМП на водные растворы ДНК.

Обработку растворов ДНК ЭМП проводили при температуре 22 °С и толщине слоя 2 мм с помощью устройства, описанного в главе 2. Частоту поля изменяли в диапазоне от 7,5 до 17,0 Гц. На каждой частоте поля обрабатывали серии из 5 образцов.

Получена зависимость интенсивности хемилюминесценции (ХЛ) водных растворов ДНК от частоты ЭМП. Результаты приведены на рисунке 3.2.

Для наглядности представлен усредненный график зависимости интенсивности ХЛ растворов ДНК от частоты приложенного поля. Средний разброс полученных значений интенсивности ХЛ составил ± 5 мВ ($n = 5$).

Без обработки ЭМП растворы ДНК не имели фотонного отклика, среднее напряжение ФЭУ было достаточно низким, интенсивность ХЛ составляла (30 ± 2) мВ. Наибольшее увеличение интенсивности ХЛ растворов ДНК по сравнению с контрольными растворами наблюдалось после обработки полем с частотами от 8,7 до 9,0 Гц, интенсивность ХЛ увеличивалась в 2,5 – 2,8 раза ($p < 0,05$).

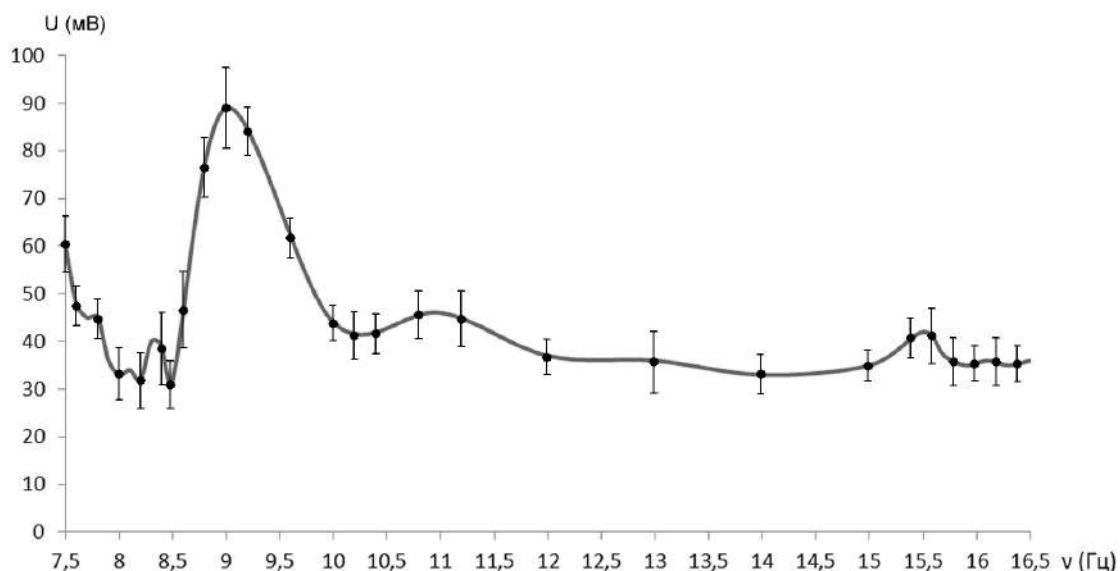


Рисунок 3.2 – Зависимость интенсивности хемилюминесценции водных растворов ДНК от частоты ЭМП напряженностью (550 ± 20) А/м, 21 °С, время воздействия на каждый раствор 15 мин.

Примечание: Контрольные образцы выдерживали в экранированной камере в течение 15 минут в условиях, максимально приближенных к эксперименту, без обработки ЭМП.

В отличие от работ Л. Монтанье и соавт. [126 – 128], в которых приводятся результаты электромагнитного воздействия на водные растворы ампликонов ДНК длиной 487 н.п. ЭМП частотой 7 Гц в течении длительного времени (18 часов), мы воздействовали низкочастотным ЭМП на растворы ДНК кратковременно. Объяснение полученных эффектов ЭМП Монтанье Л. состояло в том, что молекулы воды в жидкой среде взаимодействуют друг с другом не только статически через водородные связи и электрические диполь-дипольные взаимодействия, но и когерентно на большие расстояния и это взаимодействие зависит от времени. Мы полагаем, что одной из причин изменения ХЛ водных растворов ДНК под действием ЭМП является повышенное образование АФК в водной среде. В результате электромагнитного воздействия на колебательные процессы переноса электронов в окислительно-восстановительных реакциях АФК

в растворе изменяются концентрации радикалов. Свойства воды в гидратном слое молекул ДНК существенно отличаются от свойств воды в объеме раствора. Увеличение интенсивности ХЛ растворов ДНК после электромагнитного воздействия может быть связано с влиянием поля на колебательные процессы переноса протонов по цепочкам водородных связей как в жидкой воде, так и в гидратном слое, окружающем молекулы ДНК. Изменение состояния гидратного слоя приводит к изменению конформации спирали ДНК. Взаимозависимый процесс образования АФК в водной среде и конформационные изменения молекул ДНК при изменении их гидратного слоя под влиянием ЭМП могут носить циклический характер и способствовать изменению ХЛ раствора.

Для проверки данного предположения провели прямое определение концентрации перекисных соединений в водных растворах ДНК с концентрацией 2,5 мкг/мл после воздействия на них НЧ ЭМП. Напряженность поля в месте расположения образцов составляла (550 ± 20) А/м, частоту поля изменяли в пределах от 3 до 50 Гц. Содержание перекисных соединений в растворах ДНК определяли сразу после обработки растворов ЭМП.

Время обработки ЭМП каждой серии растворов ДНК, состоящей из 5 образцов, подбирали экспериментально. Концентрация перекисных соединений в растворах ДНК увеличивалась ($p < 0,05$) при увеличении времени обработки с 15 до 30 мин, и в среднем была равна концентрации после обработки в течение 60 мин. Выбрано время воздействия 30 мин.

Получена немонотонная зависимость концентрации перекисных соединений в растворах ДНК от частоты воздействующего ЭМП. Гистограмма приведена на рисунке 3.3. Содержание пероксида водорода в бидистиллированной воде без обработки ЭМП составляло $(7,4 \pm 0,3)$ нМ. В растворах ДНК с концентрацией 2,5 мкг/мл без обработки полем содержание перекисных соединений достигало $(93,5 \pm 8,3)$ нМ.

Таким образом, в чистой воде эффекты образования АФК выражены слабо, но резко возрастают даже при небольших добавках макромолекул АФИ, о чем свидетельствует увеличение концентрации перекисных соединений в растворах

ДНК. Еще более значительное увеличение концентрации перекисных соединений в растворах ДНК наблюдалось после их обработки ЭМП частотами $f = 3; 4; 5; 8; 50$ Гц (рисунок 3.3).

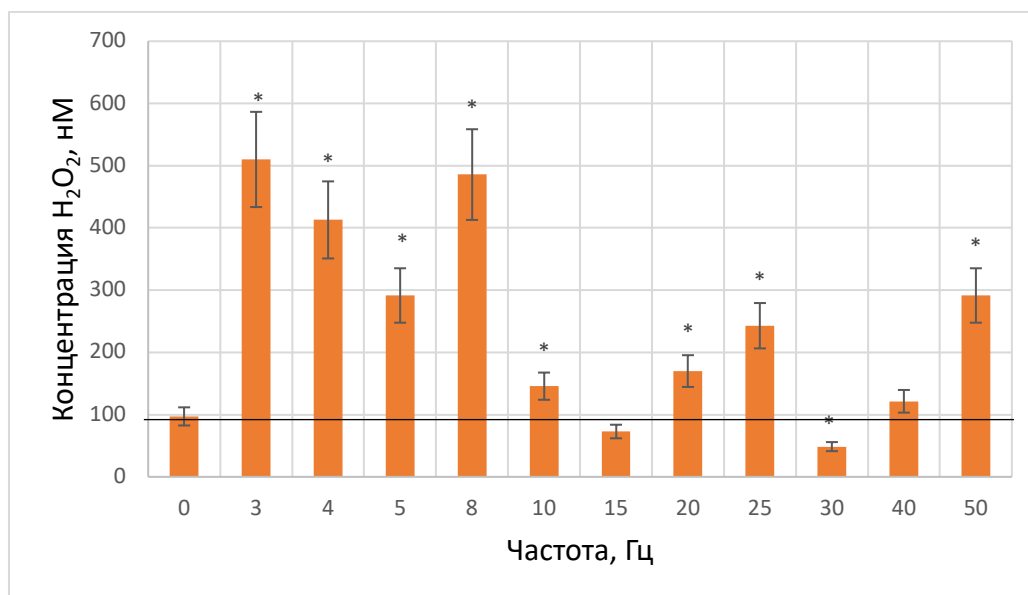


Рисунок 3.3 – Содержание перекисных соединений в водных растворах ДНК с концентрацией 2,5 мкг/мл после обработки ЭМП напряженностью (550 ± 20) А/м с разной частотой, 22 °С, время обработки каждой серии образцов 30 мин.

Примечание: * - статистически значимые различия в сравнении с контрольными образцами (обозначено 0 Гц) при $p < 0,05$. Контрольные образцы растворов ДНК выдерживали в экранированной камере в течение 30 минут в условиях, максимально приближенных к эксперименту, без обработки ЭМП.

Авторы работ [338 – 339] показали, что ЭМП может влиять на скорость образования наиболее стабильной формы АФК в воде - пероксида водорода и, тем самым, изменять интенсивность ХЛ. К тому же, как известно, пероксид водорода используется для стимуляции ХЛ многих биологических объектов [340].

В водной среде, контактирующей с воздухом и газами, процессы образования АФК происходят на границе раздела воздух/вода на поверхности нанопузырьков растворенных газов (бабстонов) [14 – 15]. Ф. Валле с соавт. в статье [341] привели результаты изучения фотолюминесценции очищенной дегазированной воды с

эффективностью дегазации $\approx 97\%$. Они показали, что практически полное удаление газов снижает интенсивность фотолюминесценции воды на 70% по сравнению с контрольными недегазированными образцами. Авторы связывают полученный эффект с образованием/удалением микропузырьков газов из воды.

Состояния нанопузырьков метастабильны, поэтому в разных работах приводятся разные оценки их размеров [14, 341 – 343]. Так, Н.Ф. Бункин и соавт. в статье [14] с помощью модуляционной интерференционной микроскопии показали, что в очищенной дистиллированной воде при нормальных условиях присутствуют кластеры микронного масштаба от 30 до 1000 нм, которые образованы полидисперсными воздушными нанопузырьками с эффективными радиусами 70 – 90 нм. В.М. Шаталов в статье [343] указывает более широкий разброс величин радиусов нанопузырьков – от 20 до 180 нм.

Ключевую роль в образовании нанопузырьков, их стабилизации и образовании из них микрокластеров играют примеси ионов. Гидрофобность газов обуславливает большое поверхностное натяжение и давление Лапласа, а адсорбция ионов создает противоположное давление, стабилизирующее нанопузырьки. Н.Ф. Бункин с соавт., работавшие над изучением кавитации газовых нанопузырьков в жидкостях, в работах [14, 342] высказали предположение, что нанопузырьки возникают и стабилизируются оболочкой преимущественно из отрицательных ионов, присутствующих в воде, что подтвердилось их экспериментальными данными по электрофорезу газовых пузырьков.

С учетом поверхностного натяжения условие механического равновесия газового нанопузырька можно записать в виде

$$P_b = (P_{atm} + 2\sigma R) > P_{atm}, \quad (3.28)$$

где R — радиус пузырька, P_b — давление внутри пузырька, P_{atm} — атмосферное давление.

Из уравнения (3.28) следует, что в условиях равновесия внутреннее давление на поверхность нанопузырька P_b определяется не только давлением содержащихся в нем газовых частиц, поскольку пузырек нестабилен и схлопывается. При наличии

в воде примесей в виде ионов возникает дополнительное давление, которое создается пондеромоторной нелинейной силой, действующей на заряженную частицу в неоднородном осциллирующем ЭМП.

Депротонированные молекулы ДНК, адсорбируясь на поверхности, стабилизируют нанопузырьки, как это, по-видимому, происходит при адсорбции амфифильного производного каликс[4]резорцинарена с трис(гидроксиметил)метиламидными фрагментами, рассмотренного в работе [222]. Тем самым, площадь поверхности раздела фаз вода/воздух, на которой протекают реакции образования АФК, суммарно увеличивается.

Возникающие на поверхности нанопузырьков молекулы пероксида водорода и другие АФК диффундируют в раствор. Появляющиеся радикалы водорода $H^\bullet$ с неспаренными электронами реагируют с молекулами растворенного O_2 с образованием гидропероксидных радикалов $HO_2^\bullet$. При столкновении двух таких радикалов в водной среде образуются пероксид водорода и синглетный кислород. Это приводит к значительному достоверному ($p < 0,05$) увеличению концентрации перекисных соединений в растворах ДНК после обработки ЭМП отдельными частотами по сравнению с содержанием в чистой воде.

Вместе с ДНК на границе раздела вода/воздух нанопузырьков адсорбируются, в частности, отрицательно заряженные супероксидные анионные радикалы. К отрицательно заряженной поверхности притягивается плотность протонов из окружающего объема воды. Таким образом, вблизи границы раздела фаз нанопузырьков формируется двойной заряженный слой, стабилизированный водной средой. Электромагнитное воздействие полем определенной частоты вызывает изменение магнитных моментов радикалов, входящих в состав двойного слоя, что может вызвать лавинообразное нарушение порядка и быстрый распад ионов и радикалов, адсорбированных на поверхности нанопузырьков. При этом выделяется накопленная в двойном слое энергия, что проявляется в повышении интенсивности ХЛ растворов ДНК под действием ЭМП с частотой 9 Гц, как это показано в разделе 3.1.

Таким образом, взаимодействия, происходящие в двойном слое на поверхности нанопузырьков, создают коллективные электронные эффекты, которые лежат в основе наблюдаемого явления изменения концентрации перекисных соединений при действии НЧ ЭМП на водные растворы ДНК.

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

Даже те небольшие количества газов, которые всегда присутствуют в воде, оказывают большое влияние на ее свойства. Так, при дегазации дистиллированной воды резко снижается ее фотолюминесценция, электропроводность [343], изменяется дисперсия электромагнитных и акустических волн [344].

Одним из важных условий образования АФК в водной среде является наличие растворенного кислорода. Для выяснения участия кислорода в образовании пероксида водорода под действием НЧ ЭМП напряженностью (550 ± 20) А/м воду и водные растворы ДНК с концентрацией 2,5 мкг/мл насыщали с помощью барботирования кислородом или аргоном, воздействовали на них полем с разной частотой в течении 15 минут, после этого в них определяли концентрацию пероксида водорода или перекисных соединений соответственно.

Среднее содержание кислорода в воде и растворах ДНК при атмосферном давлении и температуре 21 °С без барботирования составило $(9,2 \pm 1,1)$ мл/дм³. После продувки О₂ или Аг в течение 30 мин со скоростью 2 л/мин содержание кислорода в воде и растворах ДНК составила $(25,4 \pm 3,0)$ мл/дм³ и $(5,2 \pm 1,5)$ мл/дм³ соответственно. При электромагнитной обработке все образцы после насыщения газами находились в герметичной упаковке.

В качестве контрольных образцов в каждой серии использовали бидистиллированную воду и растворы ДНК, насыщенные и ненасыщенные газами, без обработки ЭМП. Контрольные образцы растворов ДНК выдерживали в течение 15 минут в измерительном модуле установки, описанной в главе 2, без обработки полем.

Результаты определения содержания пероксида водорода в чистой воде и перекисных соединений в растворах ДНК, насыщенных газами, после воздействия полем в зависимости от частоты ЭМП приведены на гистограммах на рисунках 3.4 и 3.5.

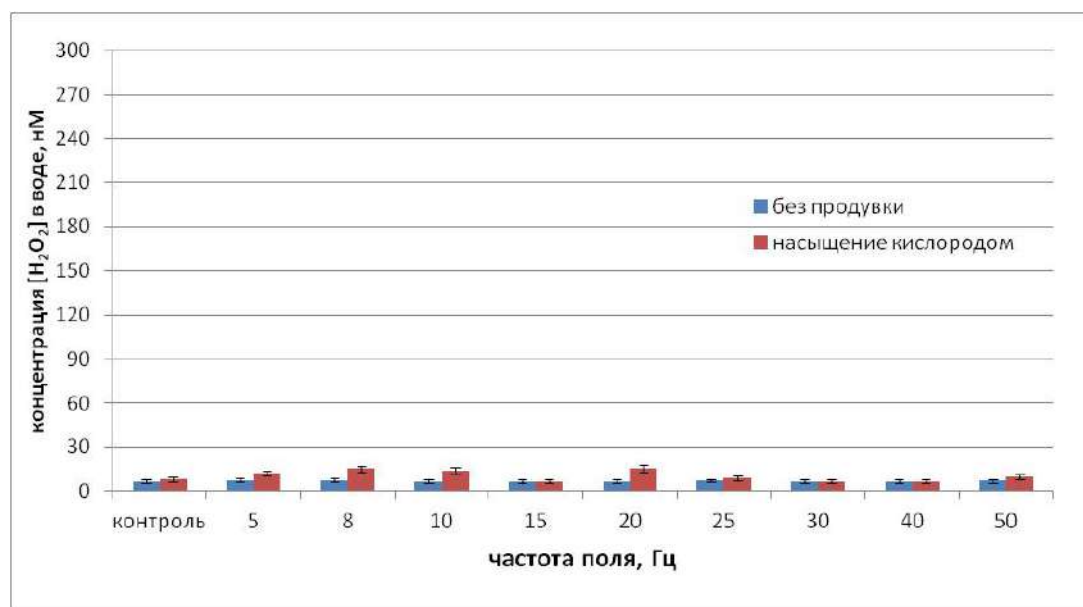


Рисунок 3.4 – Содержание пероксида водорода в дистиллированной воде, насыщенной кислородом (красные столбики), после воздействия ЭМП напряженностью (550 ± 20 А/м) с различной частотой, 21 °С.

Насыщение кислородом чистой воды достоверно ($p < 0,05$) увеличивало содержание пероксида водорода, до $(8,3 \pm 0,5)$ нМ, обработка воды полем частотой 8 Гц еще больше увеличивало это значение, до $(15,1 \pm 1,3)$ нМ. Проведено сравнение содержания перекисных соединений в растворах ДНК, насыщенных и ненасыщенных газами, обработанных ЭМП с разными частотами.

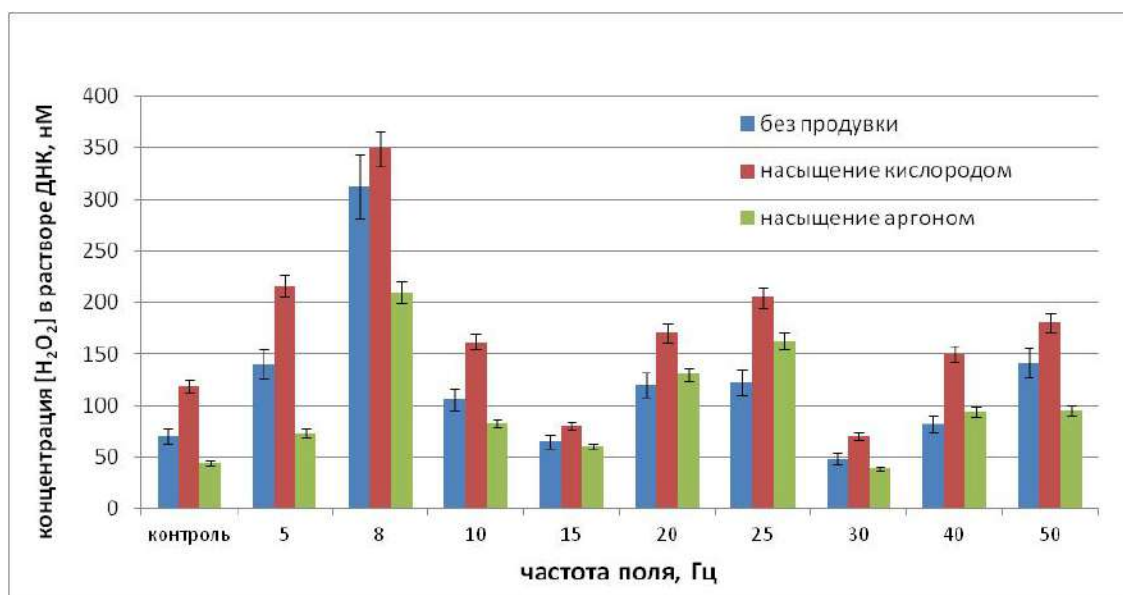


Рисунок 3.5 – Содержание перекисных соединений в растворах ДНК (2,5 мкг/мл), насыщенных газами, после воздействия ЭМП напряженностью (550 ± 20 А/м) с различной частотой, 21 °С.

Примечание: статистически значимые различия в сравнении с контролем, необработанными электромагнитным полем растворами ($p < 0,05$), обозначено: синии столбики - без дополнительной продувки растворов, красные - насыщенные кислородом, зеленые - насыщенные аргоном.

Насыщение кислородом растворов ДНК приводило к увеличению ($p < 0,05$) содержания перекисных соединений до ($118,8 \pm 9,6$) нМ без обработки ЭМП (таблица 3.1).

При продувке образцов воды и растворов ДНК кислородом происходит дополнительное образование наноразмерных пузырьков газа в водной среде, что способствует значительному проявлению эффектов генерации АФК и накоплению пероксида водорода в процессе последующего воздействия ЭМП, особенно на частотах поля 5 и 8 Гц. Содержание перекисных соединений после воздействия поля данными частотами составляло ($215,7 \pm 9,3$) нМ и ($329,2 \pm 15,3$) нМ соответственно и были достоверно ($p < 0,05$) выше, чем в контрольных образцах. Барботирование аргоном снижало уровень содержания пероксида водорода в

чистой воде ниже предела обнаружения методики определения, который составляет 7 нМ.

Таблица 3.1 – 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 (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	7,4±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 ЭМП растворами, подробное описание в тексте; ПО - предел обнаружения методики определения содержания перекиси водорода; на каждый раствор, находящийся в герметичной упаковке, воздействовали ЭМП с указанной в таблице частотой; А - растворы без насыщения газами; O₂ и Ar - растворы насыщали кислородом или аргоном соответственно с помощью барботирования в течение 30 мин перед воздействием ЭМП.

После воздействия ЭМП величина этого показателя в чистой воде не увеличивалось. Насыщение растворов ДНК аргоном приводило к достоверному ($p < 0,05$) снижению концентрации кислорода в исследуемых растворах по сравнению с растворами ДНК с первоначальным содержанием кислорода, без продувки. После насыщения растворов ДНК аргоном содержание перекисных соединений также

снижалось до $(44,8 \pm 0,9)$ нМ по сравнению с контрольными растворами ДНК ($p < 0,05$). Воздействие ЭМП на растворы ДНК при всех используемых частотах поля приводило к разнонаправленному изменению содержания перекисных соединений.

Таким образом, количественное образование пероксида водорода в воде и растворах ДНК зависит от содержания растворенного кислорода и частоты воздействующего ЭМП. Это свидетельствует о том, что в образование АФК вовлечены нанопузырьки газов и кислорода, образующиеся в воде при барботировании.

Процессы, происходящие на поверхности нанопузырьков под действием ЭМП, приводят к изменению содержания АФК во всем объеме раствора. Так же, как и В.М. Шаталов и соавт. [16, 202], мы рассматриваем нанопузырьки газов, образующиеся в жидких средах, в качестве мишеней воздействия ЭМП. При этом, действие НЧ ЭМП на водные растворы В.М. Шаталов и соавт. сводят к процессам роста нанопузырьков и дегазации жидкостей. Изменение размеров нанопузырьков авторы объясняют диффузией газов при пульсации пузырька под действием переменного давления, создаваемого полем. При сжатии пузырька концентрация газа в нем увеличивается и газ диффундирует из пузырька в жидкость, а при расширении возникает диффузионный поток в обратном направлении. По мнению В.М. Шаталова воздействие ЭМП происходит путем роста, слияния и удаления нанопузырьков в водных средах [202].

В отличие от предложенного В.М. Шаталовым подхода, сводящего биологические эффекты ЭМП к дегазации жидкости и не объясняющего зависимость эффекта от частоты поля, мы полагаем, что в основе действия ЭМП на водные растворы лежит влияние поля на взаимодействия, происходящие в двойном электрическом слое на границе раздела вода/воздух нанопузырьков. НЧ ЭМП изменяет динамику магнитных моментов радикалов, адсорбированных на поверхности нанопузырьков и, тем самым, изменяется скорость окислительно-восстановительных реакций с участием АФК при разной частоте воздействующего поля. Образующиеся АФК диффундируют в раствор. Экспериментальным подтверждением этого является увеличение содержания перекисных соединений

после действия ЭМП определенными частотами на водные растворы ДНК, насыщенные кислородом.

1. Для выявления связей и закономерностей сочетанного действия АФИ и факторов электромагнитной природы обоснован механизм с участием гидратированного электрона e^-_{aq} и разработана физико-химическая модель образования активных форм кислорода в водно-солевых растворах, объясняющие изменение физико-химических свойств АФИ трансформацией 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.

2. В ходе верификации модели показано, что образование пероксида водорода в воде и перекисных соединений в водных растворах АФИ при электромагнитном воздействием немонотонно зависит от концентрации растворенного кислорода и частоты ЭМП. Экспериментально определенные значения концентрации перекисных соединений в растворах ДНК после действия на них ЭМП разной частоты совпадают с рассчитанными максимумами аппроксимированной зависимости содержания пероксида водорода в растворах ДНК от частоты поля.

3. Изменение динамики магнитных моментов радикалов, адсорбированных на границе раздела вода/воздух нанопузырьков растворенных газов, влияет на взаимодействия, происходящие в сформированном на поверхности нанопузырьков двойном электрическом слое, и на окислительно-восстановительные реакции с участием активных форм кислорода в растворе. Данные процессы изменяют состояние гидратного слоя молекул ДНК и приводят, в частности, к изменению интенсивности хемилюминисценции растворов ДНК под действием ЭМП разной частоты.

ГЛАВА 4 ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ИНГРЕДИЕНТОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ НАНОЧАСТИЦ К ЭЛЕКТРОМАГНИТНОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ

4.1 Конформационные изменения альбумина при действии низкочастотного электромагнитного поля

Выбор человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) в качестве модельного белка для изучения сочетанного действия АФИ и факторов электромагнитной природы обусловлен его важной ролью в организме человека, связанной с широким спектром функций [138 – 140].

Альбумин – раствор с одноименным действующим веществом для восстановления и поддержания объема крови в организме, коррекции ее состава при острой кровопотере, шоке, нарушениях микроциркуляции и других состояниях. С медицинской точки зрения, альбумин оказывает плазмозамещающее действие. Альбумин входит в состав более 25 ЛП, зарегистрированных в Государственном реестре лекарственных средств России (ГРЛС) (таблица 4.1). Медикамент также входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП).

Гибкость молекулы ЧСА, ее чрезвычайная стерическая лабильность, легкость конформационных переходов, способность молекулы скручиваться и разворачиваться (сворачиваться/разворачиваться), а также подверженность различным регуляторным воздействиям [345 – 347] создают предпосылки для осуществления аллостерических влияний со стороны внешних факторов. Тот факт, что лиганды разного химического строения связываются с доменами I и II с

высоким сродством, указывает на значительную гибкость этих участков белка [347 – 348].

Таблица 4.1 – Лекарственные препараты, содержащие альбумин.

№ п/п	Торговое наименование	Международное непатентованное наименование или группировочное (химическое) наименование	Форма выпуска	Наименование держателя или владельца регистрационного удостоверения лекарственного препарата	Страна держателя или владельца РУ лекарственного препарата	Регистрационный номер	Дата государственной регистрации	Дата окончания действия РУ	Дата переоформления РУ	Состояние	Дата решения
1	АЛЬБУР ЕКС®	Альбумин человека	раствор для инфузий;	СиЭсЭл Беринг АГ	Швейцария	ЛП-№(014244)-(РГ-RU)	01.04.2026			Д	01.04.2026
2	Альбумин	Альбумин человека	раствор для инфузий;	Государственное автономное учреждение здравоохранения Свердловской области "Областная станция переливания крови" (ГАУЗ СО "ОСПК")	Россия	ЛП-№(013358)-(РГ-RU)	27.01.2026			Д	27.01.2026
3	Уман альбумин	Альбумин человека	раствор для инфузий;	Кедрион С.п.А.	Италия	ЛП-№(011757)-(РГ-RU)	19.09.2025			Д	19.09.2025
4	Альбуфарм	Альбумин человека	раствор для инфузий;	Общество с ограниченной ответственностью "Далиомфарма" (ООО "Далиомфарма")	Республика Беларусь	ЛП-№(011514)-(РГ-RU)	02.09.2025	02.09.2030		Д	02.09.2025
5	Альбумин человеческий	Альбумин человека	раствор для инфузий;	Октафарма Фармацевтика Продуктионсгес м.б.Х.	Австрия	ЛП-№(010404)-(РГ-RU)	02.06.2025		02.06.2025	Д	02.06.2025
6	Альбумин Сигардис	Альбумин человека	раствор для инфузий;	ООО «Сигардис Рус»	Россия	ЛП-№(008617)-(РГ-RU)	29.01.2025	29.01.2030	10.11.2025	Д	10.11.2025
7	Альбумин человека	Альбумин человека	раствор для инфузий;	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения "Самарская областная клиническая станция переливания крови"	Россия	ЛП-№(008505)-(РГ-RU)	17.01.2025		17.01.2025	Д	17.01.2025

8	АОСТА®	Альбумин человека	раствор для инфузий;	Далита С.А.	Швейцария	ЛП-008858	04.09.2024	17.12.2028	03.06.2025	Д	09.12.2025
9	Альбумин	Альбумин человека	раствор для инфузий;	Акционерное общество "Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам "Микроген" (АО "НПО "Микроген")	Россия	ЛП-№(006730)-(PG-RU)	02.09.2024			Д	02.09.2024
10	Рекомбинантный альбумин человека	Альбумин человека рекомбинантный	раствор для инфузий;	Тунхуа Анрат Биофармасьютикал Ко., Лтд.	Китай	ЛП-№(005106)-(PG-RU)	08.04.2024	08.04.2029		Д	10.09.2024
11	Альбумин	Альбумин человека	раствор для инфузий;	Общество с ограниченной ответственностью "Иммуно-Гем" (ООО "Иммуно-Гем")	Россия	ЛП-008842	14.03.2024	15.12.2028		Д	14.03.2024
12	Альбумин	Альбумин человека	раствор для инфузий;	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения "Челябинская областная станция переливания крови" (ГБУЗ "ЧОСПК")	Россия	ЛС-001269	06.10.2011	19.11.2028	21.09.2023	Д	21.09.2023
13	Альбумин человеческого	Альбумин человека	раствор для инфузий;	Такеда Мануфекчуринг Австрия АГ	Австрия	П N015003/01	29.06.2011	31.12.2027	13.05.2022	Д	05.04.2024
14	Альбумин	Альбумин человека	раствор для инфузий;	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения "Челябинская областная станция переливания крови" (ГБУЗ "ЧОСПК")	Россия	ЛП-000482	01.03.2011	01.12.2028	25.12.2023	Д	25.12.2023
15	Альбумин	Альбумин человека	раствор для инфузий;	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения "Тамбовская областная станция переливания крови"	Россия	ЛП-000332	22.02.2011	23.12.2028	22.03.2019	Д	20.06.2022
16	Абраксан®	ПАКЛИТАК СЕЛ+АЛЬБУМИН	лиофилизат для приготовления суспензии для инфузий;	Бристол-Майерс Сквибб Компани	США	ЛСП-009047/10	31.08.2010	03.12.2028	27.03.2024	Д	03.12.2024

17	Альбумин человека	Альбумин человека	раствор для инфузий;	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения "Самарская областная клиническая станция переливания крови"	Россия	ЛС-000118	12.05.2010	16.12.2028	29.04.2022	Д	29.04.2022
18	Альбумин	Альбумин человека	раствор для инфузий;	Государственное учреждение здравоохранения "Липецкая областная станция переливания крови"	Россия	P N003840/01	15.12.2009	01.01.2027	01.12.2022	Д	01.12.2022
19	Альбумин 10%	Альбумин человека	раствор для инфузий;	Областное бюджетное учреждение здравоохранения "Ивановская областная станция переливания крови"	Россия	P N003367/01	17.09.2009	25.12.2028	17.10.2012	Д	16.03.2023
20	Альбумин	Альбумин	раствор для инфузий;	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Тюменской области "Областная станция переливания крови" (ГБУЗ ТО "ОСПК")	Россия	P N002860/01	21.05.2009	29.12.2028	15.05.2013	Д	06.10.2021
21	Альбумин	Альбумин человека	раствор для инфузий;	Областное бюджетное учреждение здравоохранения "Ивановская областная станция переливания крови"	Россия	ЛСР-001951/09	16.03.2009	25.12.2028	19.07.2016	Д	21.03.2023
22	Альбумин	Альбумин человека	раствор для инфузий;	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения "Тамбовская областная станция переливания крови"	Россия	P N003077/01	03.12.2008	23.12.2028	22.03.2019	Д	20.06.2022
23	Альбионин 20%	Альбумин человека	раствор для инфузий;	Биотест Фарма ГмбХ	Германия	ЛСР-007947/08	08.10.2008	22.12.2028	10.04.2017	Д	05.02.2021
24	Альбумин	Альбумин человека	раствор для инфузий;	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения "Брянская областная станция переливания крови"	Россия	ЛСР-005894/08	23.07.2008	18.12.2028	27.08.2018	Д	11.05.2022
25	Альбумин	Альбумин человека	раствор для инфузий;	Бюджетное учреждение здравоохранения Вологодской области	Россия	ЛСР-000790/08	15.02.2008	23.12.2028	16.04.2019	Д	16.04.2019

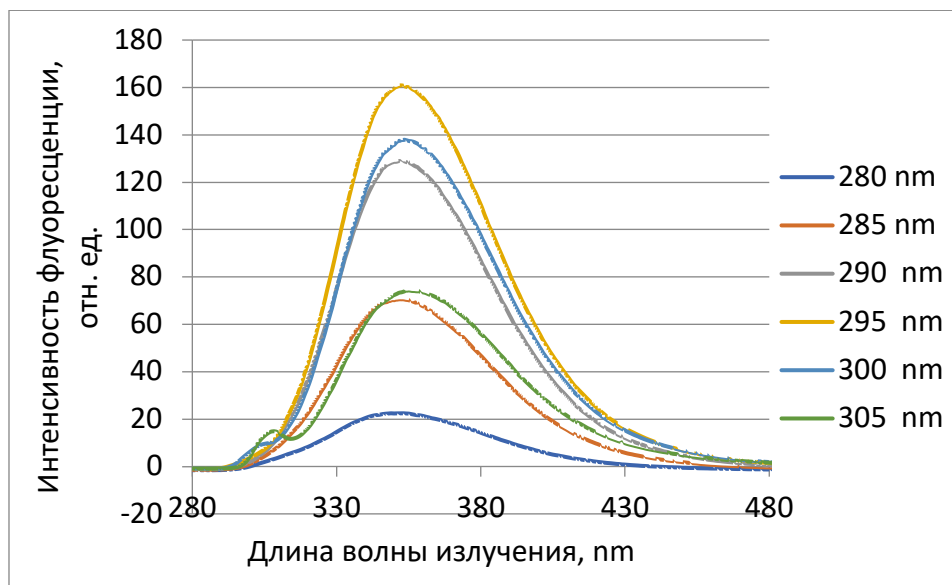
				"Вологодская областная станция переливания крови №1" (БУЗ ВО "ВОСПК № 1")							
26	Альбумин	Альбумин человека	раствор для инфузий;	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Нижегородской области "Нижегородский областной центр крови им. Н.Я. Климовой"	Россия	ЛСР-003721/07	09.11.2007	01.01.2027	14.06.2022	Д	30.10.2024

Методом флуоресцентной спектроскопии изучено влияние ЭМП в диапазоне частот от 3 до 50 Гц с шагом 0,5 Гц на конформационные изменения ЧСА при разных pH растворов и белков плазмы крови. Обработку растворов ЧСА и растворов плазмы крови ЭМП напряженностью (500 ± 10) А/м проводили с помощью устройства, описанного в главе 2, в стерильных пробирках Эппендорфа при толщине облучаемого слоя 2 мм в течение 15 мин. Рабочие растворы ЧСА имели концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М.

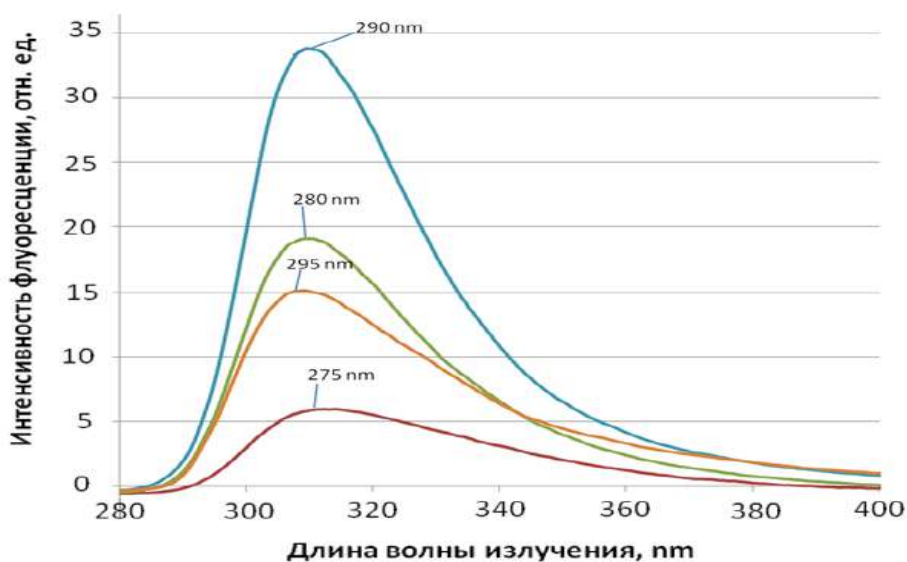
Выбор оптимальной длины волны возбуждения флуоресценции растворов сывороточного альбумина человека.

Аминокислотные остатки тирозина (Tyr) и триптофана (Trp) обладают заметным поглощением в ультрафиолетовой области. С целью уточнения оптимального значения длины волны возбуждения флуоресценции растворов сывороточного альбумина человека получены спектры флуоресценции растворов Tyr и Trp с разными длинами волн возбуждения $\lambda_{\text{возб}}$. Спектры приведены на рисунках 4.1 а), б). Максимум флуоресценции тирозина в водном растворе соответствует длине волны λ_{max} (307 ± 4) нм, его величина мало чувствительна к полярности растворителя. Максимальная флуоресценция Trp в воде находится при λ_{max} (348 ± 3) нм и сильно зависит от полярности среды. При длине возбуждения $\lambda_{\text{возб}}$ 295 нм интенсивность флуоресценции триптофана значительно, в 10 раз, выше, чем у тирозина. Эту длину возбуждения использовали в дальнейших экспериментах.

Время жизни возбужденного состояния триптофана обусловлено процессом переноса электрона с индольного кольца возбужденной молекулы Trp* на амидные группы основного скелета молекулы или в систему водородных связей, образованную между молекулами триптофана и их окружением.



а)



б)

Рисунок 4.1 – Спектры флуоресценции водных растворов триптофана (а) и тирозина (б) при разных длинах волн возбуждения (указаны соответствующим цветом), pH 7,0, 21 °C.

В последнем случае перенос электрона сопровождается образованием состояния с переносом заряда Trp^+R^- (Charge Transition State, CTS) [349]. Дезактивация возбужденного состояния триптофана происходит двумя способами: с испусканием флуоресценции и путем безызлучательной релаксации в основное состояние $S^* \rightarrow S_0$. Возможен переход в промежуточное состояние с переносом заряда Trp^+R^- со скоростью k_{12} , которое затем рекомбинирует со скоростью k_{21} обратно в состояние S^* . Двухкомпонентное излучение возбужденного триптофана Trp^* характеризуется двумя спектральными формами S_1 и S_2 , присутствующими в разложении спектра флуоресценции с различными временами жизни [349].

Исследование спектров кругового дихроизма растворов ЧСА, полученные на дихрографе J-810 (Jasco Inc., США), показало, что при pH раствора альбумина, равном 7,5 (калий-фосфатный буфер), в УФ-области имеется два минимума в диапазоне 207 – 224 нм (рисунок 4.2). Спектры такой амплитуды и формы характерны для глобулярных белков с высокоупорядоченной вторичной структурой [350].

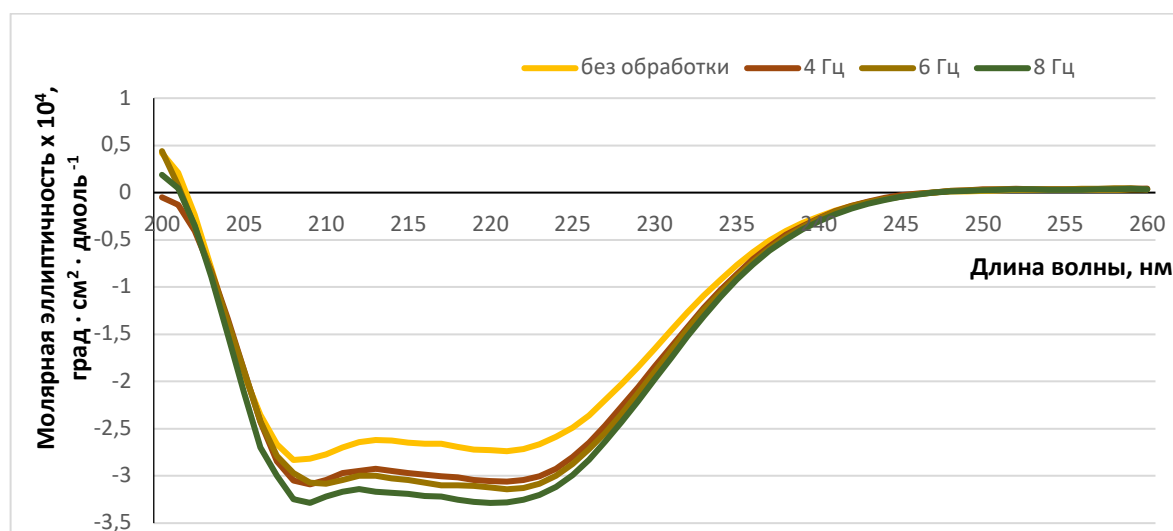


Рисунок 4.2 – Спектры кругового дихроизма растворов человеческого сывороточного альбумина с концентрацией $1 \cdot 10^{-6}$ М и pH 7,5 после обработки ЭМП разной частоты. Время обработки образцов 30 мин., 22 °С.

После обработки растворов сывороточного альбумина ЭМП частотами от 4,0 до 8,0 Гц амплитуда спектров при 210 нм и 223 нм была незначительно больше,

чем у спектров, полученных для растворов альбумина без обработки полем. Это свидетельствует о некотором уменьшении содержания β -слоев во вторичной структуре молекулы альбумина после обработки ЭМП. В целом, обработка растворов ЧСА полем приводила к незначительным изменениям амплитуды спектров, что указывает на небольшие изменения во взаимном расположении флуорофоров в молекуле альбумина при данном pH.

Флуоресценция триптофана в исследовании конформационных переходов сывороточного альбумина человека при изменении pH раствора в диапазоне 3,0 – 7,0.

На динамику состояния ЧСА существенное влияние оказывают окружающие его молекулы растворителя. Последние создают локальный поверхностный слой, который служит стабилизатором конформационных мод, облегчая или затрудняя переходы между конформациями белка. В молекуле сывороточного альбумина человека при длинах волн возбуждения более 295 нм поглощает в основном аминокислотный остаток Trp. Флуоресцентные свойства этого флуорофора очень чувствительны к перестройкам белковой макромолекулы, поэтому для изучения влияния внешних воздействий на домен II и на молекулу ЧСА удобно использовать испускание аминокислотного остатка Trp - 214 [351].

Спектр излучения раствора ЧСА претерпевает коротковолновой сдвиг по сравнению со спектром излучения свободного триптофана. Это обусловлено экранированием Trp-214 от водной фазы гидрофобной средой. Кинетика затухания флуоресценции Trp* в альбумине многокомпонентна, что связано с различной скоростью переноса электронов от ротамеров индольного кольца к пептидным связям при возбуждении триптофана. В зависимости от pH наблюдаются 2–3 компоненты кинетики затухания флуоресценции триптофана с временами от сотен пикосекунд до ~10 нс.

Зависимости интенсивности флуоресценции I_{max} и длины волны в максимуме спектра флуоресценции альбумина от pH растворов приведены на рисунке 4.3. Локальные гидрофобные взаимодействия стабилизируют вторичную структуру белка, что особенно важно для сохранения постоянства свойств спиральных

участков. Изменения внутримолекулярной динамики ЧСА, возникающие при изменении pH растворов от 3,0 до 4,5, происходят в пределах нативной структуры белка.

При $\text{pH} < 3,5$ объем молекулы сывороточного альбумина увеличивается из-за связывания протонов и кулоновского отталкивания, а спиральность снижается до 35%. При низких значениях pH в растворе существует изомерная F-форма ЧСА, для которой характерна структура с разупорядоченными гидрофобными участками. Переход белка из нативной формы N в форму F сопровождается раскрытием гидрофобных зон белка. Флуоресценция возбужденного триптофана Trp* гасится за счет взаимодействия растворителя с индольным кольцом [352].

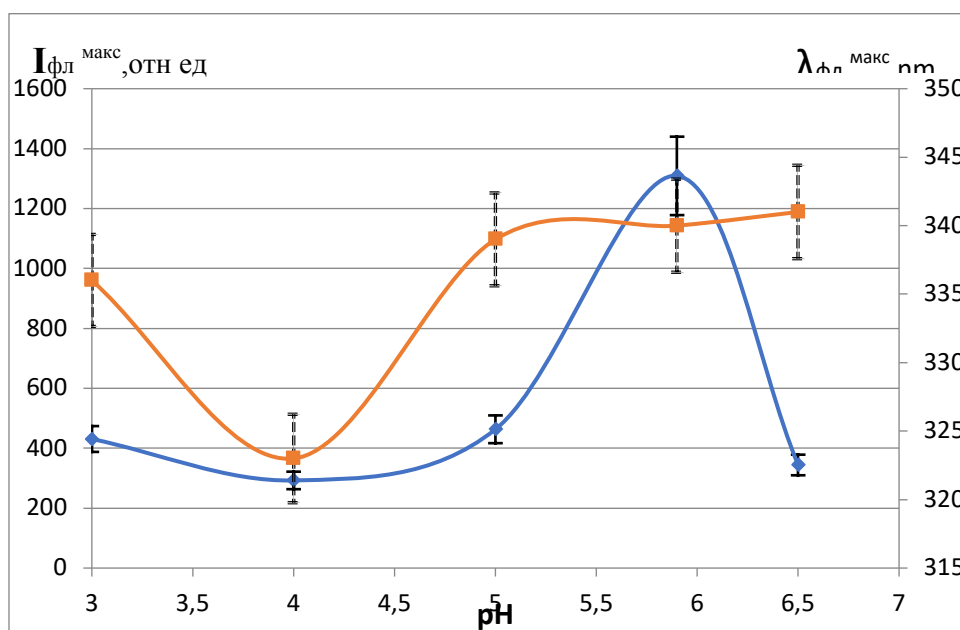


Рисунок 4.3 – Влияние pH на интенсивности флуоресценции (красная кривая – левая шкала) и длины волн максимумов флуоресценции (синяя кривая – правая шкала) растворов сывороточного альбумина человека с концентрацией $5 \cdot 10^{-6}$ М, $\lambda_{\text{возб}} 295$ нм, 22 °С.

В изоэлектрической точке при pH 4,7 поляризация сывороточного альбумина человека отсутствует, но по мере увеличения pH до 6,0 в молекуле ЧСА появляются поляризованные участки, максимальная интенсивность флуоресценции альбумина увеличивается. Вместе с этим максимум спектра флуоресценции смещается на 17

нм в длинноволновую область, что связано с депротонированием карбоксильных групп белка.

При $pH > 6,0$ конформационный переход N - В альбумина сопровождается изменением микроокружения аминокислотных остатков Trp, Tyr, His, в результате чего увеличивается доступность имидазольных остатков, скрытых в нативном состоянии. На спектрах флуоресценции происходит сдвиг максимума интенсивности флуоресценции альбумина λ_{max} коротковолновую область.

Флуоресценция сывороточного альбумина под действием НЧ ЭМП при различных значениях pH

Изучено влияние НЧ ЭМП на растворы сывороточного альбумина человека при pH от 3,0 до 7,0. Растворы ЧСА с разными значениями pH, обрабатывали полем и регистрировали спектры флуоресценции при длине волны возбуждения $\lambda_{возб}$ 295 нм. На рисунках 4.4 – 4.9 приведены спектры флуоресценции водных растворов ЧСА при различных значениях pH после обработки ЭМП частотами от 3 до 32 Гц.

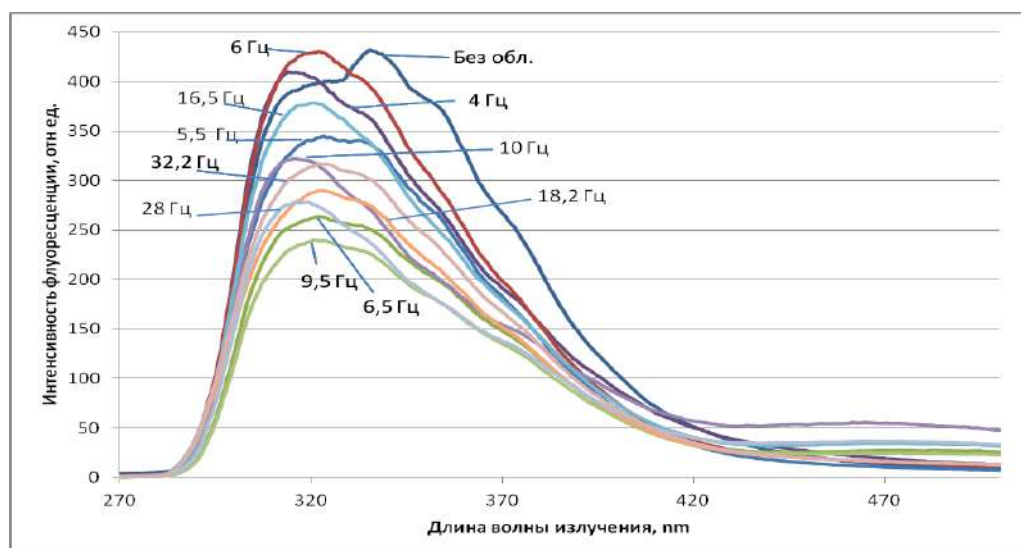


Рисунок 4.4 – Спектры флуоресценции растворов человеческого сывороточного альбумина с концентрацией $1 \cdot 10^{-6}$ М после воздействия ЭМП разной частоты при pH 3,0. Время обработки образцов 15 мин., 22 °С, $\lambda_{возб}$ 295 нм.

Характер изменения спектров флуоресценции аминокислотного остатка триптофана в молекуле альбумина после обработки ЭМП различался при разных

pH: интенсивность флуоресценции триптофана увеличивалась от 230 до 500 отн. ед. в зависимости от используемой частоты поля; полосы спектров флуоресценции флуорофоров смещались в коротковолновую или длинноволновую области; помимо основной полосы флуоресценции триптофана появлялись или исчезали дополнительные полосы флуоресценции.

Положении максимума флуоресценции альбумина определяется релаксационными характеристиками полярного окружения возбужденного Trp*. При pH >3,0 интенсивность флуоресценции раствора ЧСА после обработки ЭМП снижалась с 440 до 230 отн. ед., а максимум флуоресценции $\lambda_{\max}$ смещался на 15–20 нм в коротковолновую область (рисунки 4.4 и 4.5), как это происходит в присутствии тушителя [353 – 355].

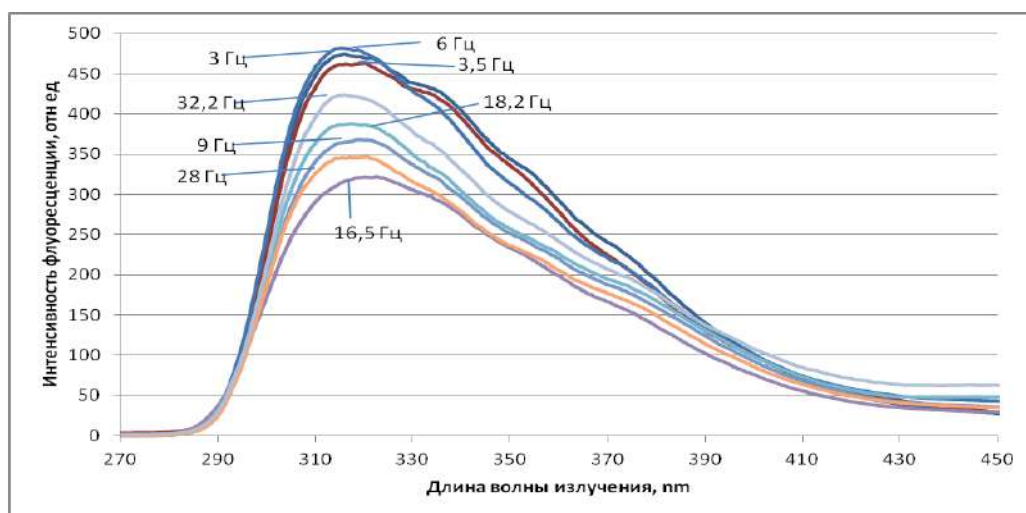


Рисунок 4.5 – Спектры триптофановой флуоресценции растворов человеческого сывороточного альбумина после воздействия ЭМП разной частоты, pH 3,5, остальные параметры такие же, как на рисунке 4.4.

Это свидетельствует о том, что действие ЭМП приводило к изменениям в гидратном окружении альбумина, которое отразилось на состоянии гидрофобных кластеров альбумина в центре 1 домена II и способствовало взаимодействию молекул тушителя (воды) с индольным кольцом триптофана.

Обработка растворов альбумина с pH 4,7 ЭМП с частотами от 3 до 16,5 Гц увеличивала интенсивность триптофановой флуоресценции (рисунок 4.6). При

значении pH раствора 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 за счет их взаимодействия с полярными группами пептидных связей белка [138]. При возбуждении флуоресценции Trp в молекуле альбумина переходит на один из колебательных подуровней возбужденного электронного состояния, теряет избыток энергии за счет колебательной релаксации и затем происходит дезактивация возбужденного триптофана Trp* за счет испускания из нижнего колебательного подуровня электронно-возбужденного состояния.

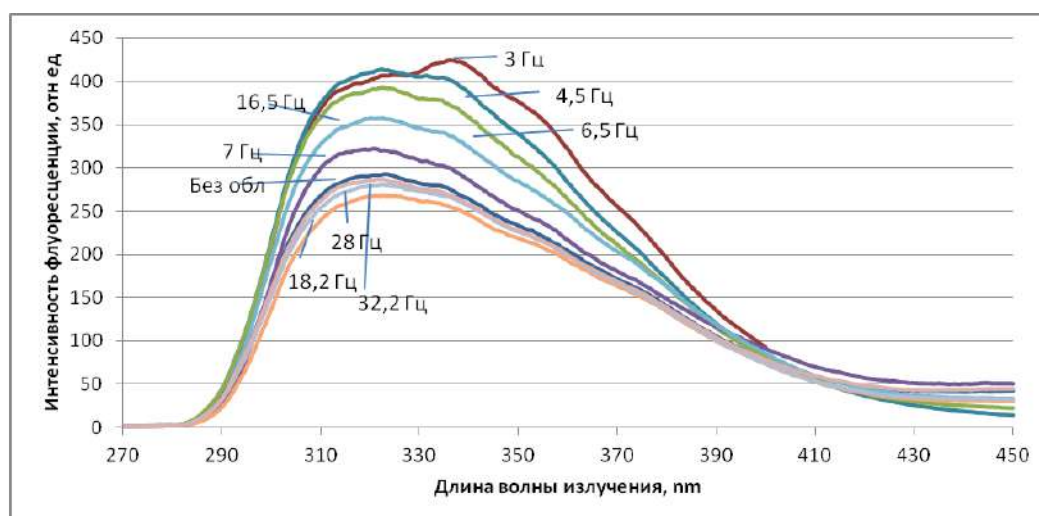


Рисунок 4.6 – Спектры флуоресценции растворов человеческого сывороточного альбумина после воздействия ЭМП разной частоты, pH 4,7, остальные параметры такие же, как на рисунке 4.4.

В литературе обсуждается механизм двухкомпонентной природы кинетики затухания флуоресценции триптофана, основанный на возможности переноса электрона с индольного кольца Trp* на амидные остатки или пептидные группы его ближайшего окружения [356]. Предложена физическая модель переходов между возбужденным и основным состояниями Trp в молекуле альбумина, использующая стабильную конфигурацию возбужденного состояния с переносом

заряда Trp^+R^- [357]. Константа скорости перехода в состояние Trp^+R^- в альбумине достигает $0,6 \text{ нс}^{-1}$. 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 действует на спиновые и орбитальные магнитные моменты электронов и увеличивает заселенность верхних колебательных подуровней Trp . В результате в возбужденном состоянии оказывается большее количество аминокислотных остатков триптофанов, чем без воздействия поля. Это приводит к увеличению интенсивности флуоресценции при дезактивации Trp^* . Длина волны максимума флуоресценции альбумина составляла 325 нм и оставалась практически постоянной после воздействия полем разными частотами. Это свидетельствует о том, что при рН 4,7 и действии ЭМП сохраняется постоянное микроокружение флуорофоров и устойчивая N-форма альбумина.

Особенно заметно изменялся вид спектров флуоресценции после воздействия ЭМП на растворы альбумина, которые имели рН 5,5, (рисунок 4.7).

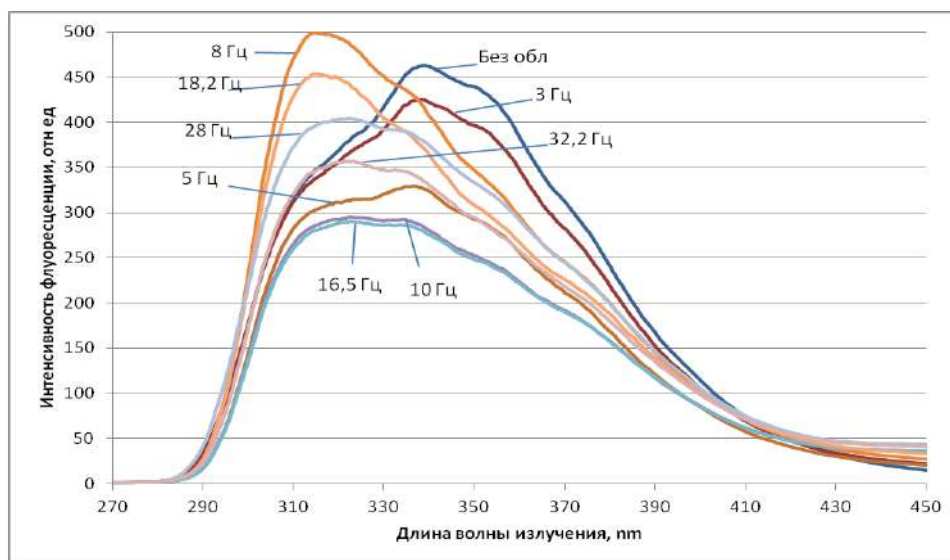


Рисунок 4.7 – Спектры триптофановой флуоресценции растворов человеческого сывороточного альбумина после воздействия ЭМП разной частоты, рН 5,5, остальные параметры такие же, как на рисунке 4.4.

После обработки растворов ЭМП с частотами поля 8 и 18 Гц в спектрах появлялись полосы флуоресценции с максимумом 310 нм, который соответствует флуоресценции тирозина. После обработки растворов полем частотами 3, 5, 10 и 16,5 Гц эти полосы смещались в длинноволновую область. Это свидетельствует об изменениях в гидрофобных кластерах молекулы альбумина, содержащих тирозиновые и триптофановые остатки, под влиянием ЭМП. Появление данных полос флуоресценции на спектрах, возможно, связано с сенсibilизированным безизлучательным переносом энергии от Tyr^* к акцептору Tyr внутри молекулы белка. Условия для миграции энергии в альбумине благоприятны: большое перекрывание первой полосы поглощения Tyr с полосой испускания Tyr^* ; высокий выход флуоресценции Tyr^* . Размеры молекулы альбумина, составляющие примерно $80 \times 80 \times 30 \text{ \AA}$, соответствуют небольшим расстояниям переноса энергии по механизму обменного процесса, расчетные значения которого лежат в диапазоне 10 – 15 $\text{\AA}$ [358].

При других частотах ЭМП максимум спектра флуоресценции альбумина составлял 325 нм и не изменялся с изменением частоты поля, а интенсивность флуоресценции снижалась. Это обусловлено динамическим неадиабатическим тушением флуоресценции, которое происходит в результате взаимодействия возбужденного Tyr^* с молекулами тушителя (воды), и образованием невозбужденной молекулы [359 – 360].

На спектрах флуоресценции растворов альбумина при pH 6.5 без обработки ЭМП наблюдалось уменьшение интенсивности флуоресценции аминокислотного остатка Tyr и возникновение более длинноволновой флуоресценции акцептора (рисунок 4.8). Это характерно для индуктивно-резонансного фёрстеровского переноса энергии от донора к акцептору. Рассчитанный согласно [361 – 362] фёрстеровский радиус для переноса $\text{Tyr} - \text{Tyr}$ составляет 50 $\text{\AA}$.

Повышение pH раствора до 7.0 приводило к увеличению полярности молекул сывороточного альбумина человека и нарушению системы водородных связей за счет депротонирования карбоксильных групп аминокислотных остатков. При pH 7.0 после электромагнитного воздействия на спектрах флуоресценции альбумина

наблюдались три уширенные полосы, интенсивность флуоресценции уменьшалась (рисунок 4.9).

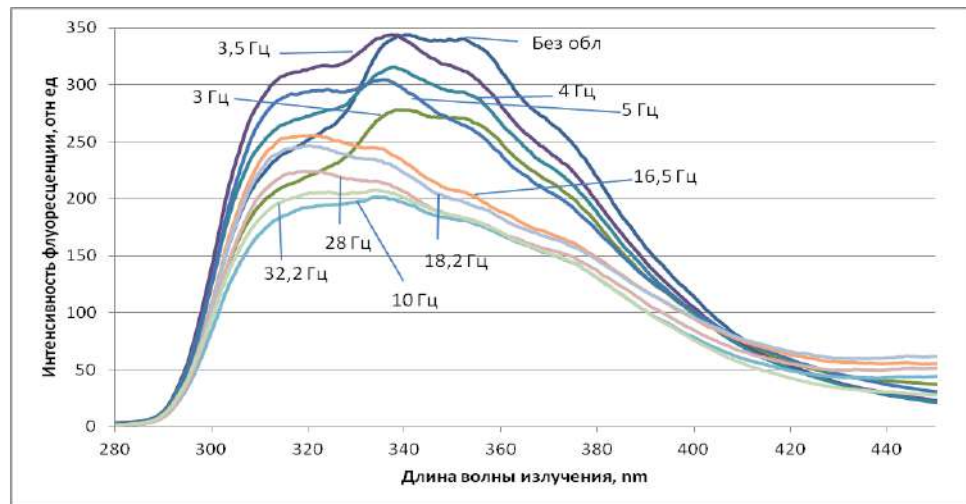


Рисунок 4.8 – Спектры триптофановой флуоресценции растворов человеческого сывороточного альбумина после воздействия ЭМП разной частоты, рН 6,5, остальные параметры такие же, как на рисунке 4.4.

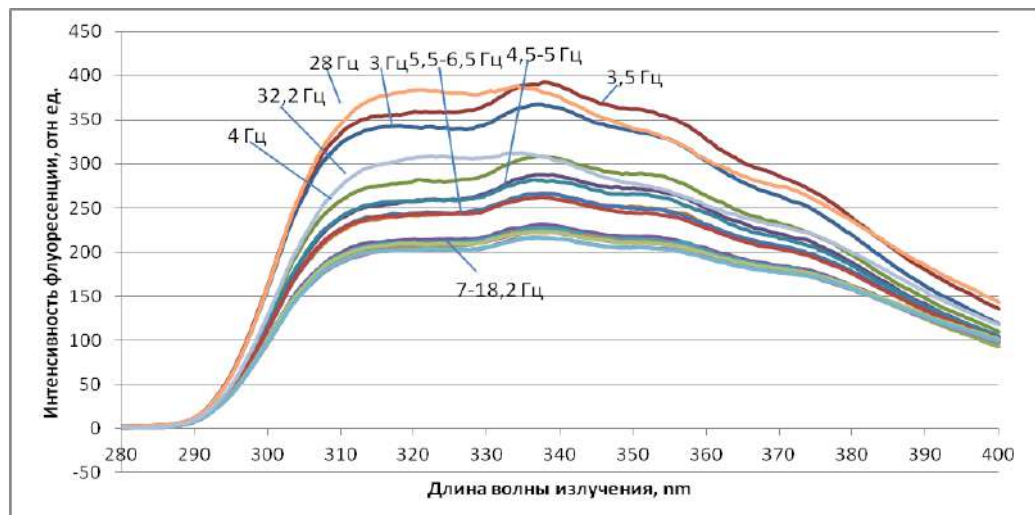
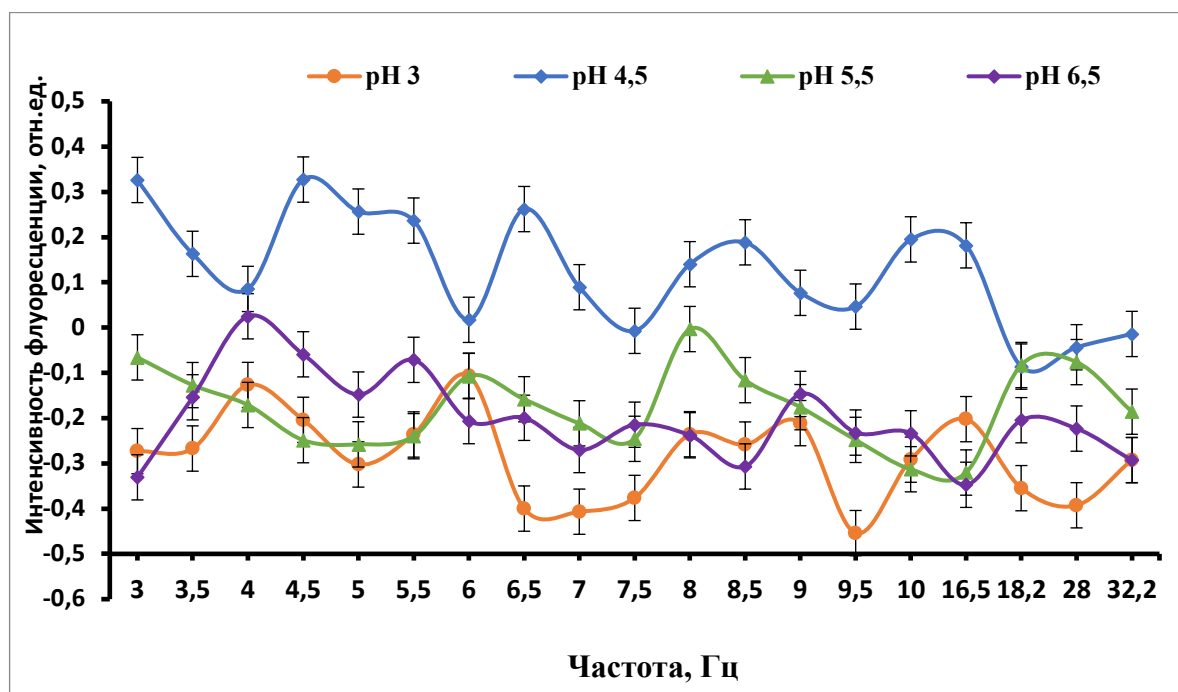


Рисунок 4.9 – Спектры триптофановой флуоресценции растворов человеческого сывороточного альбумина после обработки ЭМП разной частоты, рН 7,0, остальные параметры такие же, как на рисунке 4.4.

Последнее связано с усилением процессов тушения флуорофоров за счет изменений в третичной структуре альбумина, обусловленных увеличением

подвижности микроокружения аминокислотных остатков белка [363 – 364]. Более существенные структурные изменения альбумина при воздействии ЭМП предотвращаются системой S-S-связей, защищающих молекулу от дальнейшего разворачивания.

На рисунке 4.10 приведены зависимости площадей под кривой спектров флуоресценции в области от 270 до 440 нм растворов ЧСА от частоты ЭМП при значениях pH растворов ниже и выше изоэлектрической точки альбумина.



Рисунке 4.10 – Зависимости значений площадей под кривой спектров флуоресценции в области от 270 до 440 нм растворов человеческого сывороточного альбумина ($1 \cdot 10^{-6}$ М) от частоты ЭМП при разных значениях pH.

Сравнение площадей под кривой спектров флуоресценции в диапазоне от 270 до 440 нм растворов ЧСА, полученные для разных частот ЭМП, показало, что интенсивность флуоресценции альбумина увеличивается при pH 4,5, а при pH 5,5 и 6,5 уменьшается для всех изученных частот поля.

Оценены квантовые выходы триптофановой флуоресценции растворов ЧСА, имеющих pH от 3,0 до 7,0, после обработки ЭМП частотой 8 Гц. Данные приведены в таблице 4.2.

Таблица 4.2 – Квантовый выход триптофановой флуоресценции водных растворов сывороточного альбумина ($1 \cdot 10^{-6}$ М) с различными значениями pH после обработки ЭМП частотой 8 Гц в течение 15 мин., 22 °С.

pH	Квантовый выход до обработки ЭМП	Квантовый выход после обработки ЭМП, $B_{\min}$
3.0	$0,069 \pm 0,004$	$0,072 \pm 0,004$
3.5	$0,065 \pm 0,003$	$0,068 \pm 0,003$
4.5	$0,041 \pm 0,003$	$0,057 \pm 0,03 *$
5.5	$0,058 \pm 0,004$	$0,060 \pm 0,004$
6.5	$0,035 \pm 0,002$	$0,035 \pm 0,003$
7.0	$0,040 \pm 0,003$	$0,048 \pm 0,002 *$

Примечание: * - $p < 0,05$ статистически значимые различия в сравнении с растворами ЧСА с соответствующим pH, не обработанными ЭМП.

Достоверные увеличения ($p < 0,05$) значений квантовых выходов наблюдались для растворов ЧСА с pH 4,7 (значение близко к изоэлектрической точке белка) и pH 7,0 (значение близко к физиологическому значению).

Изменения спектров флуоресценции растворов ЧСА при pH, отличных от изоэлектрической точки, после воздействия ЭМП указывают на то, что перестройки происходят в подвижном домене II, в который входит триптофан, и затрагивают третичную структуру белка. Действие ЭМП на спиновые состояния протонов молекул воды гидратной оболочки белка влияет на перестройки водородных связей водной матрицы, окружающей альбумин, и приводит к обратимому разворачиванию домена II.

В основе аллостерических свойств ЧСА лежит структурная организация глобулярных доменов, которая определяется состоянием гидратной оболочки. Изменение конформации ЧСА, индуцированное ЭМП, сопровождается увеличением доступности нуклеофильных центров в альбумине, которые являются потенциальными мишенями для окислительно-восстановительных реакций АФК,

и приводит к изменениям физико-химических свойств белка. В отличие от более динамически подвижного домена I, домен II, в котором находится Trp - 214, менее стабилен. Так, авторы работы [346] исследовали динамику разворачивания и сверхбыстрой гидратации сывороточного альбумина человека и получили временную шкалу динамически упорядоченной воды, она составила 57 пс для домена I и 32 пс для домена II, в отличие от 0,8 пс для объемной воды.

АФК, образующиеся в растворе под действием ЭМП, окисляют аминокислотные остатки белка. Из аминокислот, входящих в состав белков, эффективно окисляются гистидин, метионин, триптофан и цистеин. Так, константа скорости тушения синглетного кислорода гистидином составляет $7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Триптофан также является эффективным тушителем синглетного кислорода, об этом свидетельствует высокое значение константы скорости тушения $^1\text{O}_2$ триптофаном, равное $(4,6 \pm 0,6) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Аминокислоты, входящие в состав ЧСА, активно снижают выход пероксида водорода: Trp (на 70%), Tyr (на 80%) и His (на 36%), являясь эффективными поглотителями гидроксильных радикалов. Образующиеся в результате окисления аминокислотных остатков пероксиды ингибируют активность альбумина.

Воздействие НЧ ЭМП на водные растворы плазмы крови изменяло их спектры флуоресценции. Для подбора оптимальной длины волны возбуждения флуоресценции белков, входящих в состав плазмы крови, сняты 3-D спектры флуоресценции 2% раствора (по объёму) плазмы крови, приведенные на рисунке 4.11. Длина волны возбуждения белков плазмы, равная 295 нм, соответствовала возбуждению триптофановой флуоресценции ЧСА.

На спектрах флуоресценции 2% растворов плазмы крови, приведенных на рисунке 4.12, в интервале от 310 до 400 нм наблюдали два максимума интенсивности флуоресценции (I_{max1} и I_{max2} соответственно). Первый максимум интенсивности флуоресценции (I_{max1}) при длине волны, равной (310 ± 2) нм, совпадал с флуоресценцией аминокислотных остатков Tyr в ЧСА. Второй максимум интенсивности флуоресценции (I_{max2}) в области (345 ± 3) нм был близок к максимуму флуоресценции аминокислотного остатка Trp.

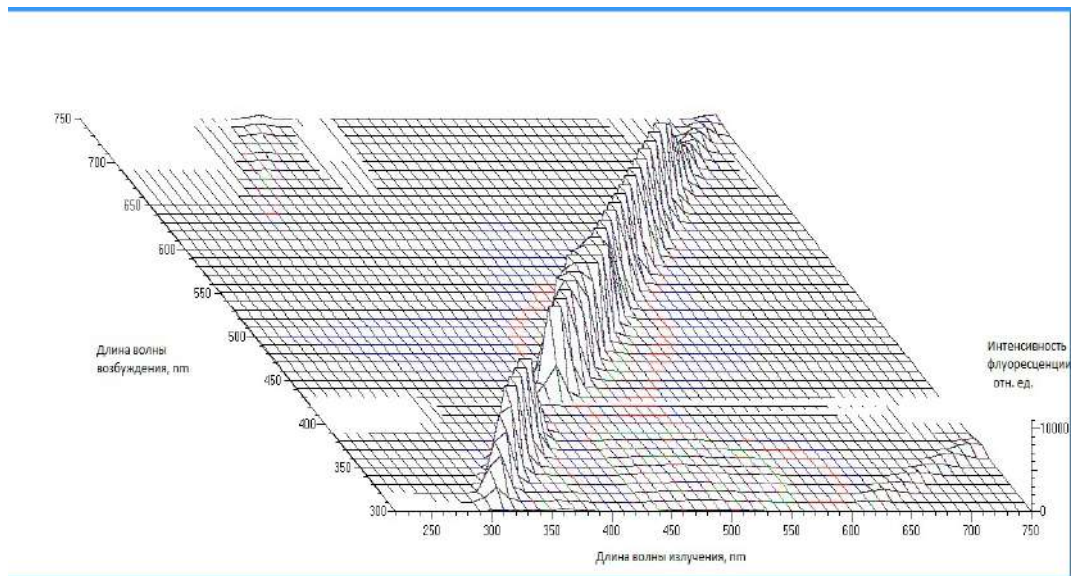


Рисунок 4.11 – 3-D спектр зависимости собственной флуоресценции 2% раствора плазмы крови от длины волн возбуждения, 22 °С.

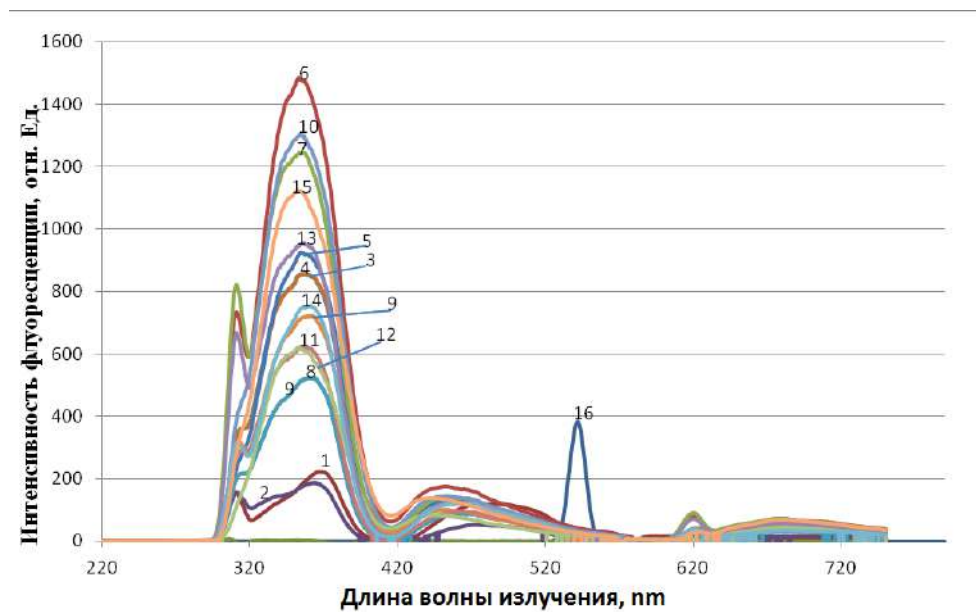


Рисунок 4.12 – Спектры флуоресценции 2 % водно-солевых растворов плазмы крови после обработки ЭМП напряженностью (500 ± 3) А/м с разной частотой, Гц: 3 (1), 3,5 (2), 4 (3), 4,5 (4), 5 (5), 5,5 (6), 6 (7), 6,5 (8), 7 (9), 7,5 (10), 8 (11), 8,5 (12), 9 (13), 9,5 (14), 10 (15), без обработки полем (16). Время обработки каждого образца 15 мин., 22 °С, $\lambda_{\text{возб}}$ 295 нм. Примечание: контрольные растворы 2 % водных растворов плазмы крови выдерживали в экранированной камере в течение 15 минут без обработки ЭМП.

Получена зависимость интенсивности флуоресценции в максимумах первого I_{max1} и второго (I_{max2}) пиков 2 % растворов плазмы крови от частоты ЭМП, гистограммы приведены на рисунке 4.13. Увеличение интенсивности флуоресценции в максимуме второго пика (I_{max2}) после обработки растворов плазмы крови ЭМП частотами 5 или 8 Гц свидетельствовало об изменении состояния основных флуорофоров в белках плазмы, в основном, в сывороточном альбумине, который вносит наибольший вклад в флуоресценцию растворов плазмы крови при длине волны возбуждения 295 нм.

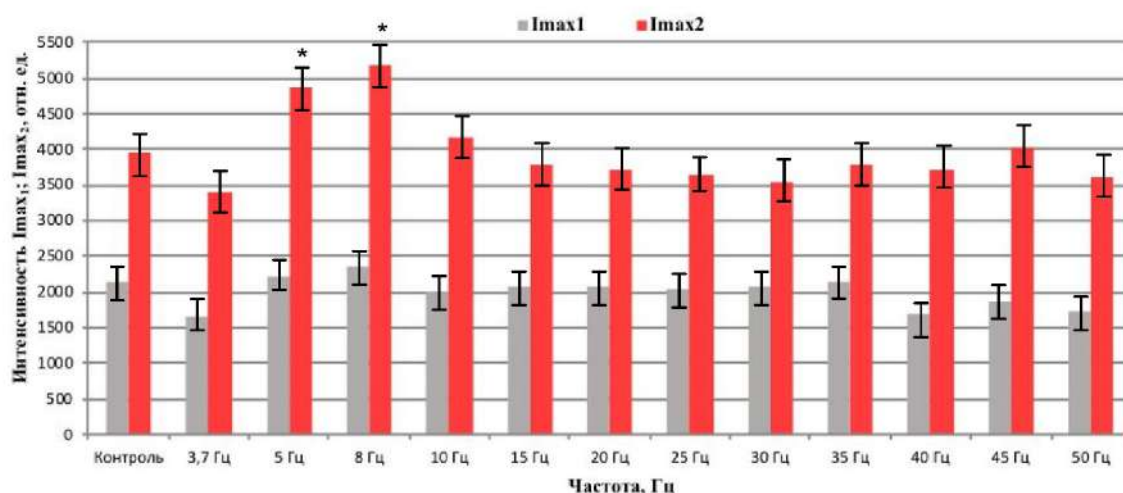


Рисунок 4.13 – Интенсивности флуоресценции 2 % растворов плазмы крови в максимумах флуоресценции (310 ± 2) нм (серые столбики) и (345 ± 3) нм (красные столбики) после обработки ЭМП с разной частотой. Время обработки образцов 15 мин., 22 °С. Примечание: * - $p < 0,05$ статистически значимые различия в сравнении с контролем (контрольные растворы выдерживали в экранированной камере в течение 15 минут без обработки ЭМП).

При воздействии ЭМП изменяется гидратная оболочка [364] и конформационное состояние белков, что отражается на спектрах флуоресценции водных растворов плазмы крови. Физиологические уровни АФК приводят к образованию обратимых модификаций белков, но при значительном содержании АФК образуются долгоживущие белковые радикалы, которые могут быть источниками пролонгированного образования АФК и способствовать развитию

окислительного стресса, повреждая молекулы АФИ, в частности ДНК, как это обсуждается в работах [365 – 366].

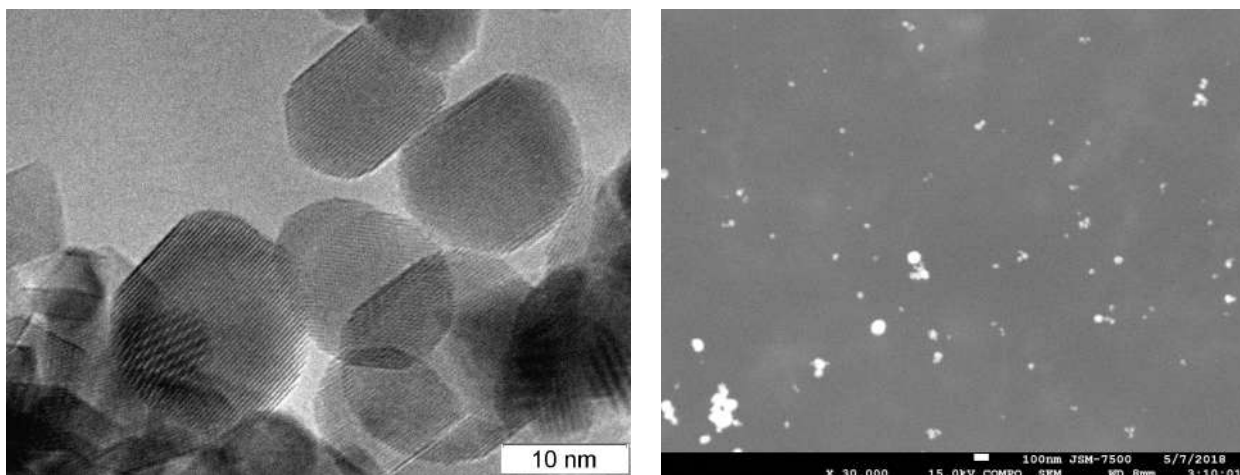
4.2 Образование оболочки из активных фармацевтических ингредиентов на поверхности наночастиц серебра под влиянием электромагнитного поля

Перспективным направлением в разработке современных систем доставки ЛС (*Drug Delivery Systems*) с эффективным преодолением тканевых барьеров является использование наночастиц серебра (AgNPs). Цитотоксичность AgNPs связана с неконтролируемой диффузией ионов серебра с поверхности частиц [37 – 39].

Изучено образование на поверхности наночастиц AgNPs оболочки из молекул сывороточного альбумина, которая связывает высвобождающиеся ионы серебра. Для повышения эффективности связывания наночастиц с альбумином и снижения токсичности наночастиц на взвеси, содержащие квазисферические AgNPs и молекулы ЧСА, воздействовали ЭМП разной частоты. Использовали коллоидные взвеси AgNPs, стабилизированные поливинилпирролидоном. Наночастицы имели диаметры (12 ± 2) нм, (25 ± 3) нм или (90 ± 7) нм. Начальная концентрация взвесей была 630 мкг/мл. Рабочие среды смешивали таким образом, чтобы концентрации ЧСА и AgNPs составляли $1 \cdot 10^{-6}$ М и 0,34 мг/л соответственно.

На рисунке 4.14 а), б) приведены фото AgNPs в водной среде, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа JEOL JSM-7500F.

На спектрах флуоресценции взвесей квазисферических наночастиц серебра наблюдали два максимума интенсивности флуоресценции в области длин волн (320 ± 5) нм и (640 ± 5) нм после обработки ЭМП разной частоты (рисунок 4.15).



а)

б)

Рисунок 4.14 – Фото наночастиц серебра диаметром (12 ± 2) нм (а – масштаб 10 нм) и (90 ± 7) нм (б – масштаб 100 нм) в водной среде, полученные с помощью JEOL JSM-7500F.

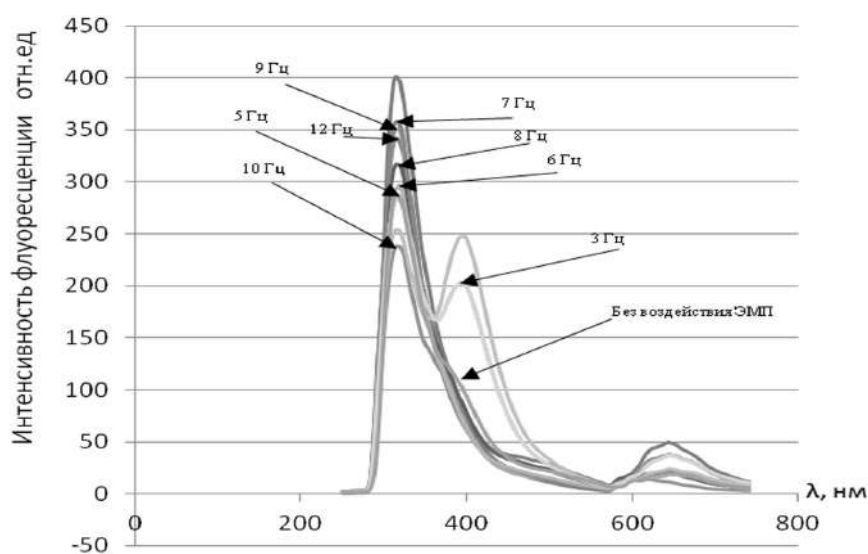


Рисунок 4.15 – Спектры флуоресценции взвесей наночастиц серебра концентрацией 0,34 мг/л и диаметром (12 ± 2) нм после обработки ЭМП разной частоты, 22 °С, $\lambda_{\text{возб}}$ 290 нм.

Первый максимум интенсивности флуоресценции на спектрах при длине волны 320 ± 5 нм соответствует флуоресценцию поверхностного плазмона наночастиц серебра и согласуется с результатами работы [179]. После обработки взвесей наночастиц ЭМП разными частотами интенсивность флуоресценции в

области первого максимума возрастала с 250 до 400 отн. ед. Возможно, это обусловлено изменением состояния водного окружения AgNPs. После воздействия на взвесь AgNPs полем частотой 3 или 11 Гц на спектрах флуоресценции наблюдалось раздвоение первого пика, связанное с морфологией наночастиц и их различной ориентацией к падающей электромагнитной волне.

При добавлении к взвеси AgNPs раствора ЧСА в концентрации, на порядок превышающей концентрацию наночастиц, происходит образование на поверхности наночастиц структуры из адсорбированных молекул альбумина, так называемой, «жесткой короны» (термин Т. Маклауса [39]), как это видно на фото (рисунок 4.16).

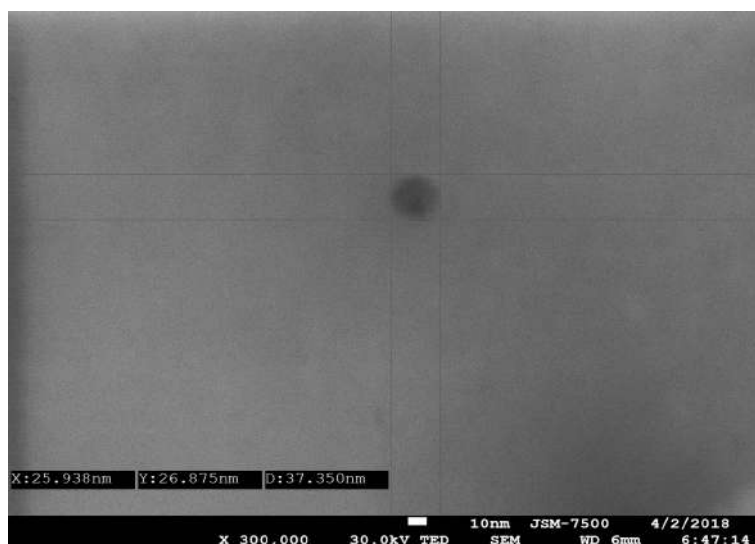


Рисунок 4.16 – Фото наночастицы серебра (12 ± 2) нм, окруженной молекулами человеческого сывороточного альбумина, полученное с помощью JEON JSM – 7500F. Масштаб 10 нм.

Для обеспечения более полного формирования оболочки из альбумина взвеси AgNPs в присутствии ЧСА выдерживали в течение 24 часов при комнатной температуре. За это время молекулы поливинилпирролидона заменялись на поверхности наночастиц прочно адсорбированными молекулами альбумина.

На рисунке 4.17 приведены спектры флуоресценции, полученные после обработки ЭМП разной частоты взвесей AgNPs диаметром (12 ± 2) нм в присутствии ЧСА при pH 7,0.

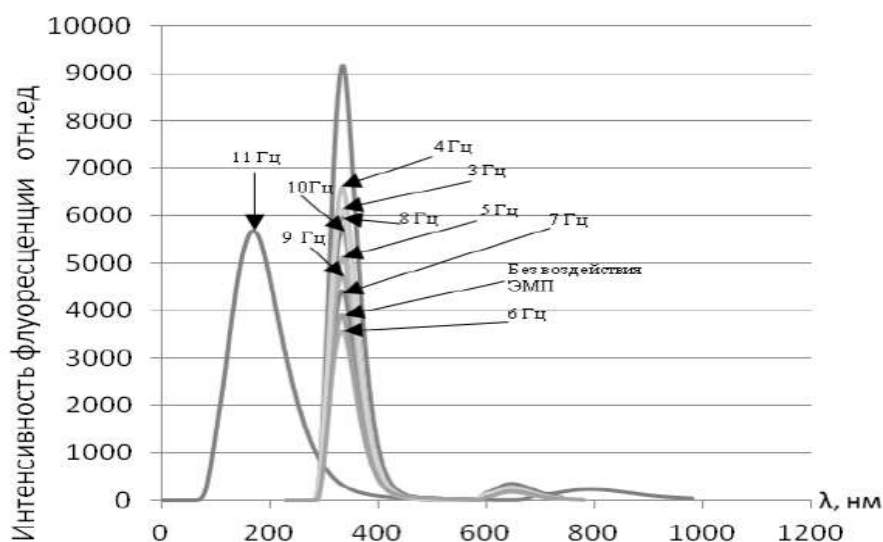


Рисунок 4.17 – Спектры флуоресценции взвесей наночастиц серебра диаметром (12 ± 2) нм с концентрацией 0,33 мг/л в присутствии человеческого сывороточного альбумина (1 мкМ) при pH 7,0, после воздействия ЭМП напряженностью (500 ± 3) А/м разной частоты в течение 10 мин, $\lambda_{\text{возб}}$ 290 нм.

На спектрах флуоресценции AgNPs в присутствии молекул альбумина наблюдали выраженный пик в области от 300 до 400 нм, имеющий почти гауссову форму, появление которого было связано с резонансным рассеянием света на наночастице. Добавление во взвеси AgNPs избыточных количеств альбумина приводило к резкому увеличению интенсивности флуоресценции с 450 отн. ед. до 3900 отн. ед. Усиление флуоресценции связано с совпадением длины волны поверхностного плазмонного резонанса AgNPs и длины волны возбуждения флуоресценции молекул сывороточного альбумина, адсорбированных на поверхности наночастицы.

При взаимодействии электронных уровней AgNPs с молекулой адсорбированного на нем альбумина облегчается процесс перехода между возбужденным и основным состояниями флуоресцирующей молекулы, а также сокращается время жизни возбужденного состояния, что приводит к увеличению квантового выхода возбуждения ассоциата. Адсорбированные на поверхности AgNPs молекулы ЧСА увеличивают интенсивность флуоресценции ассоциатов,

что свидетельствует о наличии взаимодействия между молекулами альбумина и AgNPs. Обработка НЧ ЭМП изучаемых взвесей приводило к еще более значительному увеличению интенсивности флуоресценции в этой области.

На рисунке 4.18 приведены зависимости интенсивности флуоресценции в максимуме полосы флуоресценции при длине волны 354 нм AgNPs и ассоциатов AgNPs с альбумином при pH 7,0 от частоты воздействующего ЭМП.

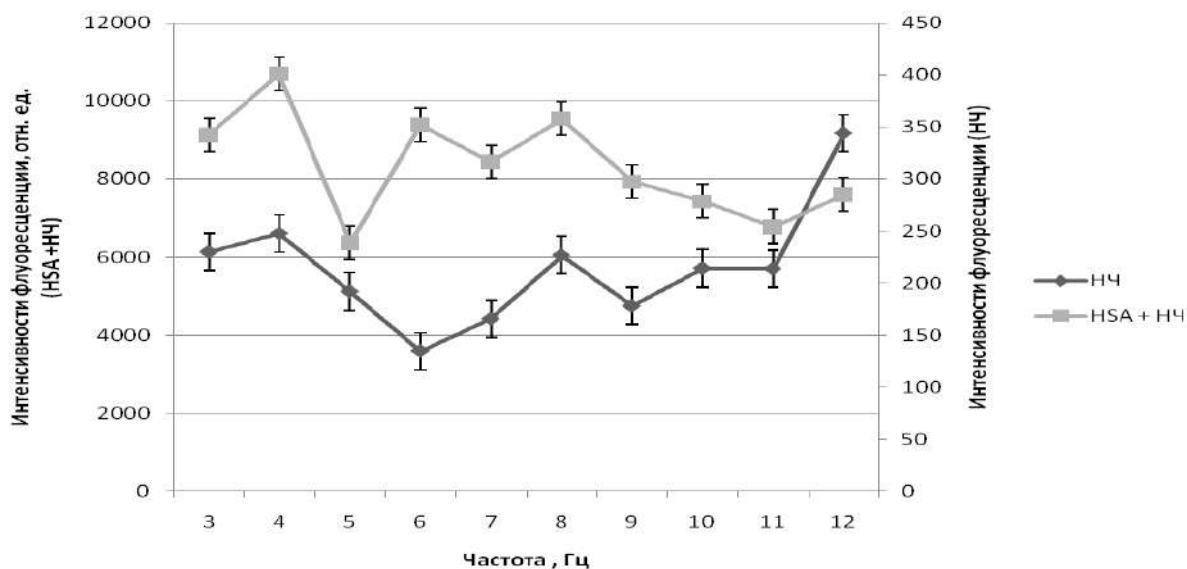


Рисунок 4.18 – Зависимости интенсивности флуоресценции при $\lambda_{\text{исп.}} 354$ нм взвесей наночастиц серебра диаметром (12 ± 2) нм с концентрацией 0,33 мг/л – темные точки (правая шкала) и взвесей наночастиц серебра в присутствии альбумина (1 мкМ) – серые точки (левая шкала) при pH 7,0 после воздействия ЭМП напряженностью (500 ± 3) А/м различной частоты. Время воздействия 10 мин, $\lambda_{\text{возб}} 290$ нм.

Максимальные значения интенсивностей флуоресценции наблюдалось после воздействия на взвеси ЭМП частотами 4 и 8 Гц, при этом интенсивности флуоресценции взвесей AgNPs в присутствии альбумина возрастали ($p < 0,05$) в 15–20 раз по сравнению с интенсивностями флуоресценции растворов, содержащих только AgNPs.

AgNPs в водной среде взаимодействуют с альбумином по диполь-дипольному механизму, образуя ассоциаты, о наличии которых свидетельствовало

увеличение интенсивности флуоресценции AgNPs в присутствии ЧСА. После электромагнитной обработки растворов ассоциатов наблюдалось дальнейшее значительное увеличение интенсивности флуоресценции, что объясняется индуктивно-резонансной передачей энергии молекул альбумина на плазмонные колебания наночастиц.

Для подтверждения этого предположения проведен теоретический анализ процесса резонансного рассеяния электромагнитной волны на сферической наночастице заданного размера. Вокруг наночастиц AgNPs образуются области положительных и отрицательных зарядов из-за смещения электронов проводимости, что вызывает поляризацию среды. Данные эффекты зависят от диэлектрической проницаемости среды и тем более выражены, чем она больше. Для расчета положения максимума поглощения AgNPs учитывали диэлектрическую проницаемость серебра (ϵ). Для изотропного материала показатель диэлектрической проницаемости ϵ является комплексной величиной и зависит от частоты ЭМП (ω):

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_1(\omega) + i \epsilon_2(\omega), \quad (4.1)$$

где $\epsilon_1(\omega)$ – вещественная часть диэлектрической проницаемости, $\epsilon_2(\omega)$ – мнимая часть диэлектрической проницаемости, связанная с электрическим сопротивлением среды, приводит к фазовому сдвигу между частотой ЭМП и колебаниями диполя.

В отличие от металлов, в которых возможно возбуждение плазмонных колебаний, у серебра мнимая часть диэлектрической проницаемости, ответственная за диссипацию энергии поля, невелика. Вследствие этого эффективность возбуждения поверхностного плазмона у AgNPs наибольшая.

По теории Ми суммарное сечение поглощения и рассеяния света частицей AgNPs (C_{ext}) можно определить по уравнению согласно [367]:

$$C_{ext} = \frac{24\pi^2 R \epsilon_M^{3/2}}{\lambda} \cdot \frac{\epsilon_2}{(\epsilon_1 + 2\epsilon_M)^2 + \epsilon_2^2}, \quad (4.2)$$

где R – радиус частицы, ϵ_M – диэлектрическая проницаемость среды (вещественная часть), λ – длина волны падающего света.

Задачу расчета спектра поглощения и рассеяния AgNPs можно разделить на две независимые составляющие: электродинамическую, которая может быть в случае частицы правильной сферической формы решена довольно точно, и задачу нахождения зависимости диэлектрической проницаемости AgNPs от частоты ЭМП. Уравнение (4.1) и вышеприведенные рассуждения относятся к простому случаю, когда падающая электромагнитная волна индуцирует образование только диполя. При увеличении размера частицы и изменении ее формы увеличивается вероятность образования систем разделенных зарядов более высокого порядка – квадруполь и других мультиполей. При этом в спектрах возникают дополнительные полосы плазмонного резонанса или раздваиваться уже имеющиеся, как это наблюдалось на спектрах, приведенных на рис. 4.15.

В отличие от теории Ми наш анализ опирался на разложение падающей плоской электромагнитной волны по сферическим волнам для всех мультипольностей $l \geq 1$. Была получена формула расчета сечения рассеяния электромагнитной волны на сферической наночастице радиуса r :

$$\frac{\sigma}{\pi r^2} = 2 \sum_{l=1}^{\infty} \left(\frac{2l+1}{l(l+1)} \right)^2 \frac{2l+1}{3l+2} \operatorname{Im} \left(\frac{l(\varepsilon_m - \varepsilon_r)}{l\varepsilon_m + (l+1)\varepsilon_r} \right), \quad (4.3)$$

где ε_r – комплексная диэлектрическая проницаемость материала наночастицы, ε_m – диэлектрическая проницаемость окружающей среды, символом Im обозначено взятие мнимой части.

При $l = 1$ формула (4.3) переходит в соответствующую формулу теории Ми [367].

Учитывая экспериментальные данные диэлектрической проницаемости серебра, рассчитали резонансную длину волны для наночастицы диаметром (12 ± 2) нм, окруженной молекулами альбумина, которая оказалась равной (354 ± 4) нм, что хорошо согласуется с экспериментом. Высота пика резонансного рассеяния составляла около 400 отн. ед. для взвеси, содержащей только AgNP, и более 8000 отн. ед. для взвеси AgNP с молекулами альбумина. Полученные результаты объясняются предположением, что молекулы альбумина, взаимодействующие с

наночастицами серебра по диполь-дипольному механизму, образуют систему связанных резонаторов. Расчеты, проведенные для пары ЧСА + AgNPs позволили подтвердить это предположение, показав, что сечение светорассеяния значительно увеличивается при образовании ассоциатов. Поскольку присутствие ЧСА во взвеси AgNPs приводит к увеличению интенсивности флуоресценции более чем в 20 раз, размер молекул альбумина при pH 7,0 составляет около 4 нм, а размер AgNPs 12 нм, в водной среде образуются сложные ассоциаты, содержащие несколько белковых молекул, до 20, которые жестко связаны с наночастицей. Образование таких ассоциатов приводит как к существенному изменению поверхностных свойств AgNPs, так и перестройке структуры адсорбированного белка.

Как известно, токсичность наночастиц серебра связана с высвобождением ионов серебра, чему способствует окисление серебра до AgO_2 на поверхности частиц и последующее растворение оксида [37, 39]. С помощью сульфидирования наночастиц серебра можно улавливать диффундирующие с поверхности AgNPs ионы серебра, поскольку образующийся сульфид серебра нерастворим в воде, что снижает биодоступность ионов и уменьшает токсичность наночастиц серебра.

На спектрах флуоресценции растворов альбумина, содержащих AgNPs размером (12 ± 2) нм в концентрации, двукратно превышающей концентрацию сывороточного альбумина, максимум флуоресценции смещался в коротковолновую область и составлял (338 ± 4) нм (рисунок 4.19). Это свидетельствует о наличии на поверхности AgNPs материала с высоким показателем преломления, например, сульфида серебра. Количественный энергодисперсионный рентгенофлуоресцентный анализ выявил наличие серы и сульфида серебра на поверхности квазисферических AgNPs после инкубации в растворе ЧСА с концентрацией 0,4 мг/мл в течение 24 часов, что косвенно указывает на взаимодействие ионов серебра с цистеиновыми остатками белка.

Таким образом, сформированная плотная оболочка из молекул альбумина модулирует поверхность наночастиц и связывает свободные ионы серебра. Электромагнитное воздействие на ассоциаты позволяет изменять как взаимодействия AgNPs с сывороточным альбумином, так и белок-белковые

взаимодействия в адсорбированном слое, возможно, структурируя молекулярный ассоциат, о чем свидетельствовало увеличение интенсивности флуоресценции на спектрах, полученных после обработки ЭМП взвесей наночастиц серебра в присутствии ЧСА.

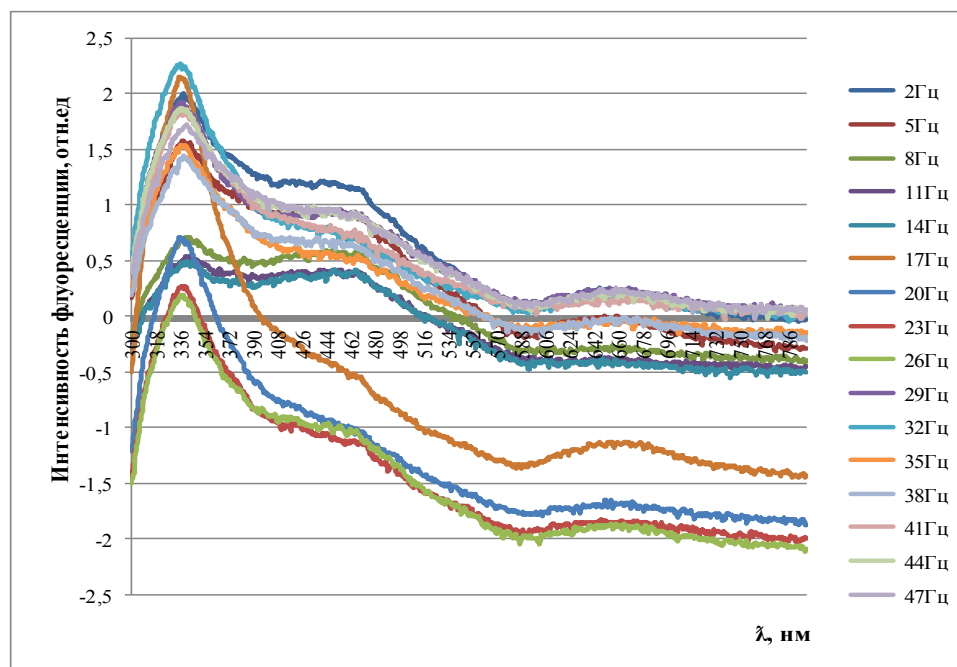


Рисунок 4.19 – Спектры флуоресценции взвесей наночастиц серебра диаметром (12 ± 2) нм с концентрацией 8,5 мкг/ в присутствии человеческого сывороточного альбумина (4 мкг/мл) при рН 7,0 после воздействия ЭМП различной частоты в течении 10 мин, $\lambda_{\text{возб}}$ 290 нм.

Вклад квадруполь в спектр флуоресценции становился заметным, когда размеры наночастиц серебра увеличиваются. При увеличении размеров AgNPs с 12 до 90 нм на спектрах флуоресценции, полученных после обработки ЭМП взвесей наночастиц с альбумином, наблюдались сдвиги максимумов. Так, на спектрах флуоресценции взвесей AgNPs диаметром (25 ± 3) нм, содержащих ЧСА, полученных после воздействия полем разной частоты, максимум смещался в длинноволновую область и находился около 344 нм (рисунок 4.20).

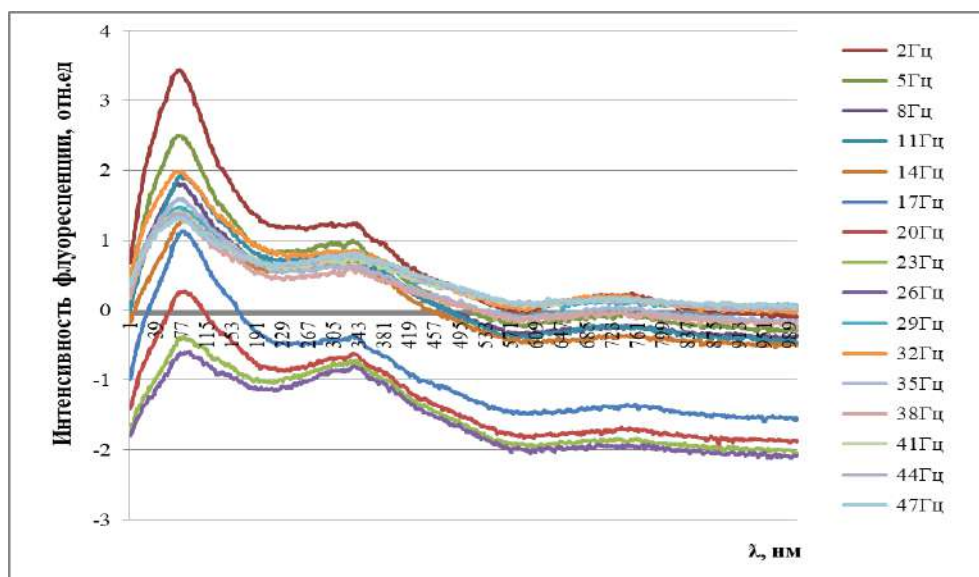


Рисунок 4.20 – Спектры флуоресценции растворов человеческого сывороточного альбумина (4 мкг/мл) в присутствии наночастиц серебра диаметром (25 ± 3) нм с концентрацией 8,5 мкг/л при pH 7,0, 22 °С после воздействия ЭМП в течении 10 мин, $\lambda_{\text{возб}}$ 290 нм.

При размерах наночастиц серебра более 75 нм вклады квадрупольного и дипольного резонансов становятся равными, поэтому на спектрах флуоресценции взвесей AgNPs диаметром (90 ± 7) нм, содержащих ЧСА, наблюдали более выраженные две полосы флуоресценции: в области (337 ± 5) нм и (460 ± 5) нм (рисунок 4.21).

Эффект усиления флуоресценции AgNPs в присутствии молекул ЧСА также объясняется сенсбилизацией люминесценции. Это явление, хорошо изученное для неорганических материалов [367], характеризуется значительным увеличением интенсивности люминесценции при дополнительном введении примеси в люминофор, который сам либо вообще не светится, либо обладает незначительными люминесцентными свойствами. При этом центры сенсбилизатора при поглощении света переходят из основного состояния в возбужденное, после чего передают свою электронную энергию возбуждения акцепторам - люминесцентным центрам с последующим испусканием. Механизм

передачи энергии электронного возбуждения резонансный, взаимодействие в паре сенситизатор-акцептор, как правило, диполь-дипольное.

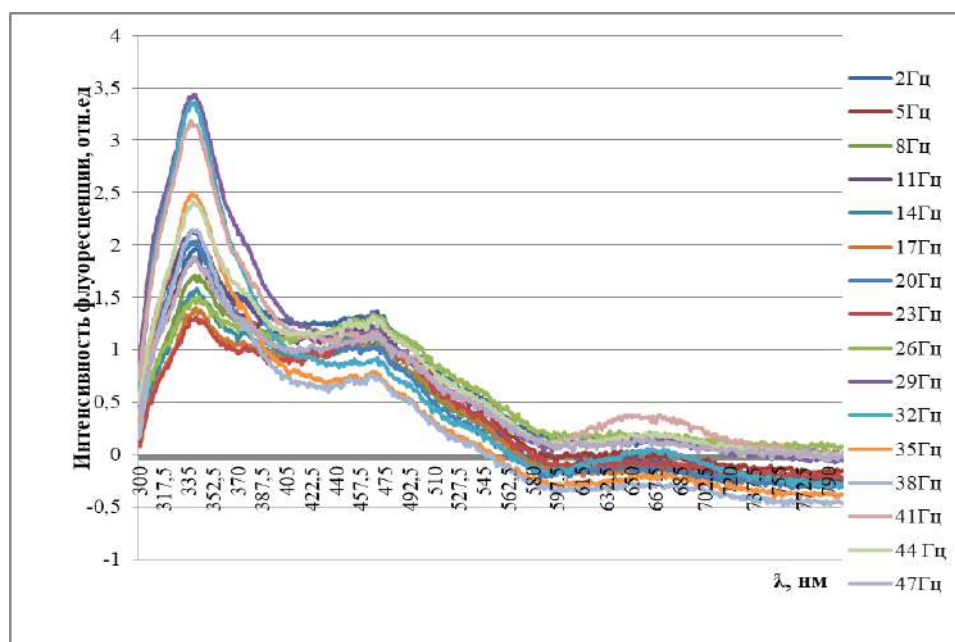


Рисунок 4.21 – Спектры флуоресценции растворов человеческого сывороточного альбумина (4 мкг/мл) в присутствии наночастиц серебра диаметром (90 ± 7) нм с концентрацией 8,5 мг/л при pH 7,0, 22 °C после воздействия ЭМП в течении 10 мин, $\lambda_{\text{возб}}$ 290 нм.

В наших системах сенситизация люминесценции AgNPs приводит к увеличению интенсивности люминесценции более чем в 20 раз, поэтому сечение поглощения молекул сывороточного альбумина человека превышает сечение поглощения наночастиц серебра более чем в 20 раз. Добротность системы составляет около 20, так как часть энергии электронного возбуждения молекул альбумина теряется при внутрицентральной релаксации, то есть, в конечном итоге, переходит в тепло.

Таким образом, в растворе происходит образование ассоциатов наночастиц серебра с альбумином. Образование ассоциатов приводит к модификации поверхности квазисферических наночастиц серебра и снижает их токсичность за счет сульфидирования ионов серебра. Под действием НЧ ЭМП изменяется

конформация альбумина, что способствует уплотнению оболочки. Энергия возбуждения сенситизаторов - флуорофоров ЧСА (в основном Trp и Tyr) передается акцепторам - AgNPs и проявляется на спектрах флуоресценции в виде увеличения интенсивности флуоресценции. Интенсивность флуоресценции изменяется в зависимости от конформационного состояния молекул ЧСА. Последнее, в свою очередь, может зависеть от количества АФК, генерируемых во взвеси наночастиц серебра при обработке ЭМП разной частоты.

С помощью данного подхода возможна оценка размеров и расчет длины волны флуоресценции ассоциатов наночастица - АФИ. Полученные результаты могут быть использованы в медицине для внутриклеточных исследований и/или последующего воздействия на образующиеся микроструктуры наночастица - АФИ оптическим излучением.

4.3 Сенситизированная генерация активных форм кислорода в водно-солевых растворах, инициируемая действием сверхвысокочастотного электромагнитного поля

С помощью флуоресцентной спектроскопии исследована сенситизированная генерация АФК, инициируемая действием СВЧ ЭМП частотой 3 ГГц и потоком мощности (ПМ) 6 мВт/см² в модельных системах - водных растворах, содержащих ионы железа Fe²⁺ или меди Cu²⁺. Время облучения растворов варьировали от 10 до 60 с. От открытого конца волновода максимум излучения был ориентирован в направлении оси, перпендикулярной поверхности раствора.

Предположим, что вся мощность излучается почти равномерно в пределах полусферы. Тогда плотность потока излучения на расстоянии R от открытого конца волновода определяется формулой:

$$I = P / (2 \pi R^2), \quad (4.4)$$

где I – плотность потока излучения (Вт/м^2), P – мощность излучения (Вт), R – расстояние от открытого конца волновода (м).

Мощность, поглощаемая объектом, равна произведению плотности потока излучения, площади поверхности объекта S , обращенной к излучателю и коэффициента поглощения α объекта:

$$P_{\text{погл}} = I \cdot S \cdot \alpha. \quad (4.5)$$

Используя значение коэффициента поглощения воды α , приведенное в работе [368], получили величину $P_{\text{погл}}$, равную 6 мВт. Если предположить, что вся поглощенная водой энергия за время воздействия излучения идет на нагрев раствора, то по уравнению

$$\Delta T = P_{\text{погл}} \cdot \Delta t / C \cdot m, \quad (4.6)$$

где ΔT – разность температур, $^{\circ}\text{C}$; Δt – время воздействия излучения, с; C – удельная теплоемкость раствора; m — масса, кг, можно рассчитать повышение температуры. Расчет по уравнению (4.6) показал, что за 60 сек воздействия СВЧ излучения частотой 3 ГГц температура водного раствора увеличивается на 0,02 $^{\circ}\text{C}$.

Получены спектры флуоресценции при длине волны возбуждения 260 нм после обработки СВЧ ЭМП частотой 3 ГГц и плотностью мощности (ПМ) 6 мВт/см^2 1·10⁻⁶ М растворов сульфата железа (II). Диапазон регистрации - от 250 до 700 нм. Спектры флуоресценции приведены на рисунке 4.22.

На спектрах флуоресценции водных растворов сульфата железа помимо спектра светорассеяния в области (340±3) нм отмечали наличие полосы флуоресценции в диапазоне от 430 до 540 нм после воздействия СВЧ ЭМП. Для выяснения природы этой полосы зарегистрированы спектры флуоресценции водных растворов, содержащих ионы Fe^{2+} , до и после добавления в них 1 мкМ пероксида водорода.

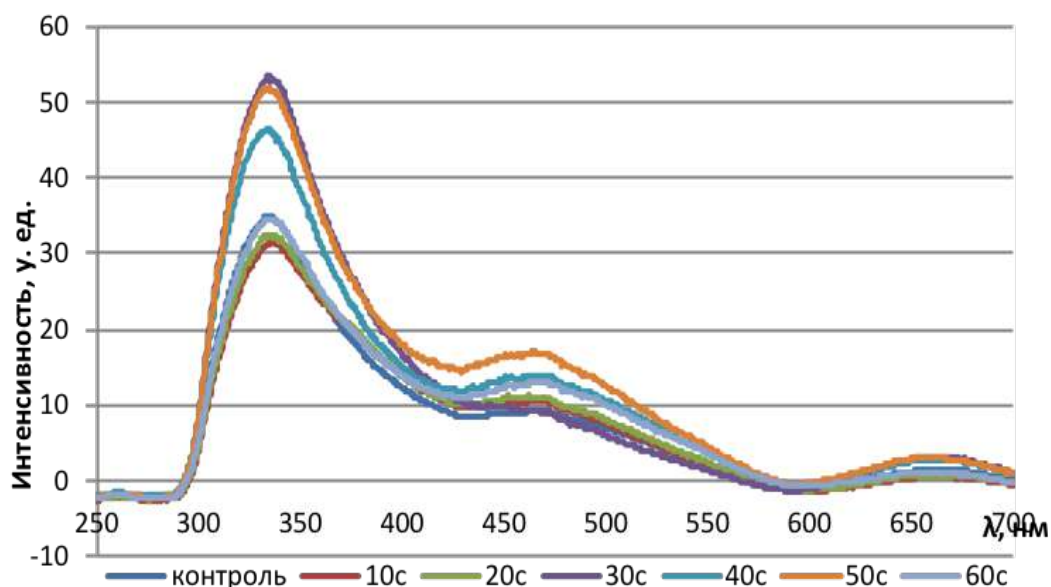
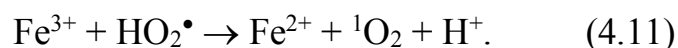
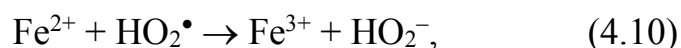
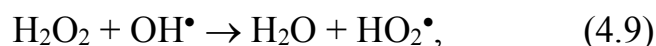
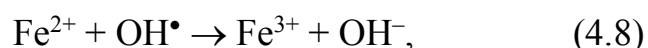
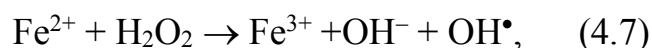


Рисунок 4.22 – Спектры флуоресценции водных растворов сульфата железа (II) с концентрацией $1 \cdot 10^{-6}$ М, полученные после обработки образцов СВЧ ЭМП частотой 3 ГГц и ПМ 6 мВт/см² при разном времени воздействия, $\lambda_{\text{возб}}$ 260 нм, 22 °С. Контроль – растворы сульфата железа (II) без воздействия.

Добавление пероксида водорода к исследуемому раствору приводило к исчезновению спектра светорассеяния и появлению уширенной полосы флуоресценции в области от 400 до 600 нм (рисунок 4.23, пунктир). Появление данной полосы флуоресценции отражает катализ катионами железа процесса разложения перекиси водорода с образованием гидроксильных и гидроперекисных радикалов и синглетного кислорода, согласно уравнениям реакций Фентона:



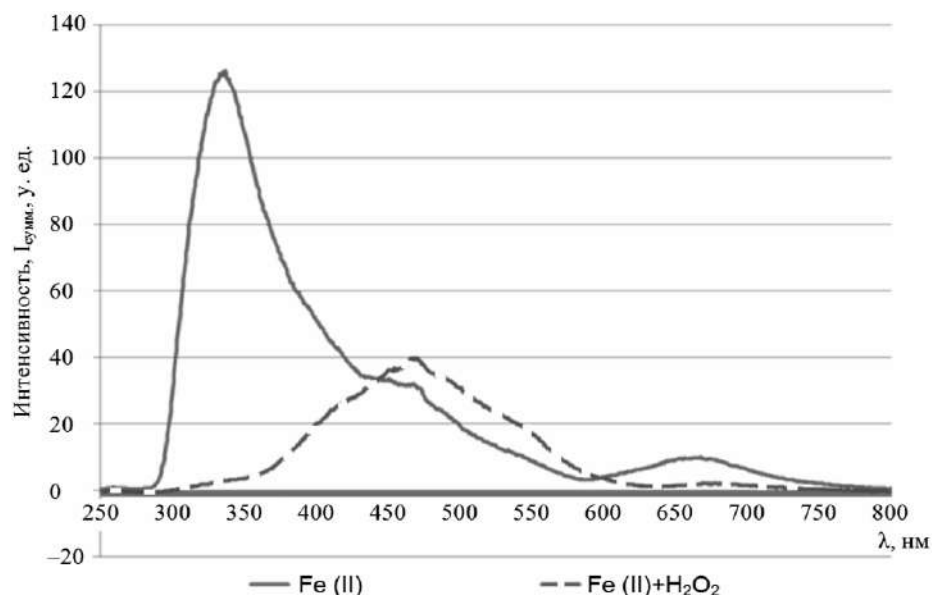


Рисунок 4.23 – Спектры флуоресценции водных растворов сульфата железа (II) с концентрацией $1 \cdot 10^{-6}$ М исходно (сплошная линия) и после добавления 1 мкМ пероксида водорода (показано пунктиром), $\lambda_{\text{возб}}$ 260 нм, 22 °С.

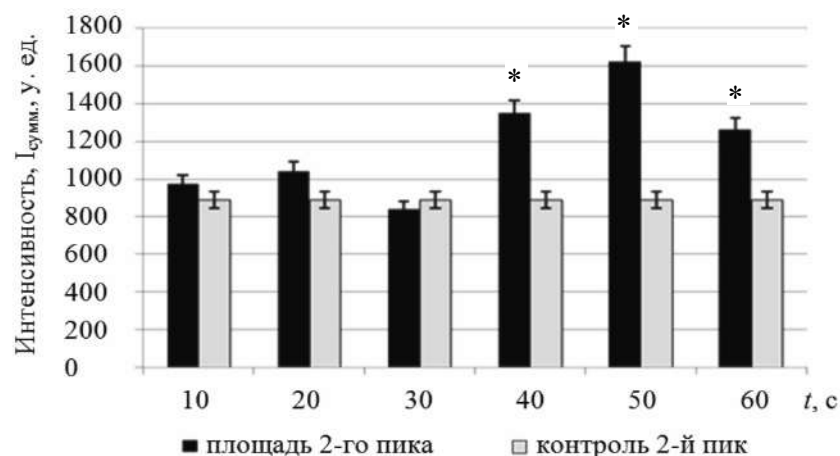


Рисунок 4.24 – Значения площадей под кривой спектров флуоресценции в области от 420 до 550 нм, полученные до (светлые столбики) и после (темные столбики) обработки СВЧ ЭМП частотой 3 ГГц и ПМ 6 мВт/см² в течение разного времени растворов сульфата железа (II) с концентрацией $1 \cdot 10^{-6}$ М нм.

Примечание: * - $p < 0,05$ статистически значимые различия по сравнению с контролем - необработанными СВЧ ЭМП растворами.

На рисунке 4.24 приведены значения площадей под кривой спектров флуоресценции в области от 420 до 550 нм, полученные до (светлые столбики) и после (темные столбики) обработки СВЧ ЭМП водных растворов сульфата железа (II) в течение разного времени. Увеличение времени воздействия излучения на растворы сульфата железа приводило к увеличению интенсивности флуоресценции в данной области, что свидетельствовало об увеличении количества продуктов разложения пероксида водорода в водном растворе.

С увеличением времени облучения с 10 до 30 сек на спектрах в диапазоне от 620 до 660 нм наблюдали достоверное ($p < 0,05$) увеличение интенсивности флуоресценции исследуемых растворов по сравнению со спектрами, полученными для необлученных растворов (рисунок 4.25).

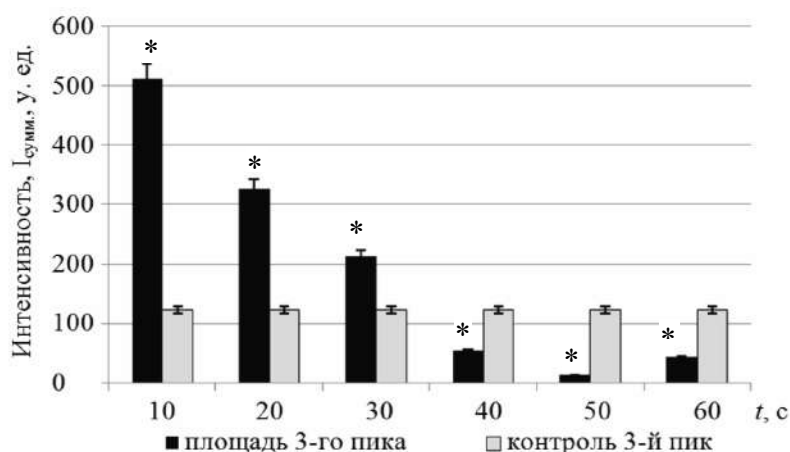


Рисунок 4.25 – Значения площадей под кривой спектров флуоресценции в области от 620 до 660 нм, полученные до (светлые столбики) и после (темные столбики) обработки СВЧ ЭМП частотой 3 ГГц и ПМ 6 мВт/см² в течение разного времени растворов сульфата железа (II) с концентрацией $1 \cdot 10^{-6}$ М.

Примечание: * - $p < 0,05$ статистически значимые различия в сравнении с контролем, необработанными СВЧ ЭМП растворами.

Молекулы синглетного кислорода при повышенных концентрациях образуют возбужденные димеры (¹O₂)₂, которые переходят в основное состояние с испусканием света в видимом диапазоне – 634 нм [255 – 256]. Появление пика в области спектров от 620 до 660 нм указывает на переходы в столкновительных

комплексах (димолях) в триплетном состоянии $^3\Sigma_g^-$ ($^3\Sigma_g^- + ^3\Sigma_g^- \rightarrow ^1\Delta_g + ^1\Delta_g$) и протекание синглет-кислородных реакций с образованием в растворах некоторого количества кислорода в синглетном состоянии ($^1\Delta_g$).

На спектрах флуоресценции водных растворов сульфата меди (II) с концентрацией $1 \cdot 10^{-6}$ М после воздействия СВЧ ЭМП разной длительности также наблюдали две полосы флуоресценции: в области длин волн от 420 до 550 нм и от 620 до 660 нм. Спектры приведены на рисунке 4.26.

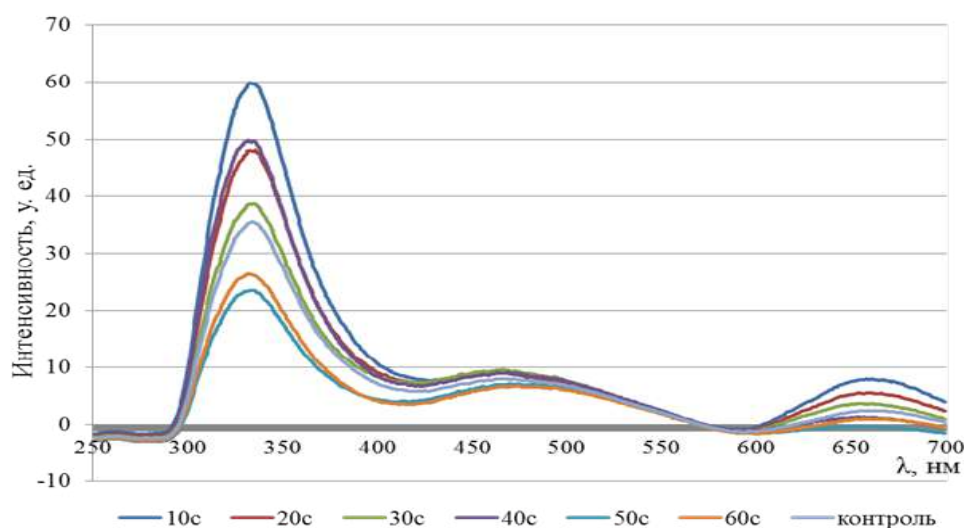


Рисунок 4.26 – Спектры флуоресценции водных растворов сульфата меди (II) $1 \cdot 10^{-6}$ М, полученные при разном времени обработки образцов СВЧ ЭМП частотой 3 ГГц и ПМ 6 мВт/см², 22 °С, $\lambda_{\text{возб}}$ 260 нм. Контроль – растворы сульфата меди без обработки СВЧ ЭМП.

После облучения СВЧ ЭМП в течении 10, 20 и 40 сек интенсивность флуоресценции $1 \cdot 10^{-6}$ М растворов сульфата меди (II) в диапазоне 620 до 660 нм была достоверно выше, чем в контрольных растворах без облучения ($p < 0,05$), соответствующие гистограммы приведены на рисунке 4.27.

Для растворов сульфата железа (II) и сульфата меди (II) рассчитаны квантовые выходы флуоресценции. Квантовый выход рассчитывали из спектров поглощения и флуоресценции растворов триптофана-L, сульфата железа и сульфата меди. В качестве эталонного образца использовали водный раствор

триптофана-L в предположении, что длины волн возбуждающего света одинаковы для исследуемых образцов и эталона. Квантовый выход раствора сульфата железа (II) достигал $0,26 \pm 0,04$, а для раствора сульфата меди (II) он был значительно ниже и составил $0,14 \pm 0,02$ ($p < 0,05$).

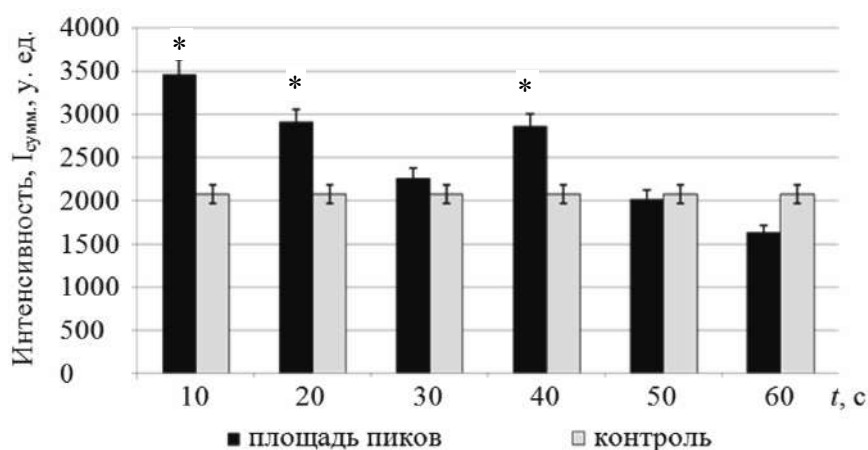


Рисунок 4.27 – Значения площадей под кривой спектров флуоресценции в области от 620 до 660 нм, полученные до (светлые столбики) и после (темные столбики) обработки СВЧ ЭМП частотой 3 ГГц и ПМ 6 мВт/см² в течение разного времени $1 \cdot 10^{-6}$ М растворов сульфата меди (II). Примечание: * - $p < 0,05$ статистически значимые различия в сравнении с контролем, необработанными СВЧ ЭМП растворами.

Поглощенная водными растворами энергия СВЧ ЭМП идет на незначительный разогрев раствора и образование АФК (нетепловой эффект). Эффекты образования сверхмалых доз АФК усиливаются с помощью доноров электронов – катионов металлов переменной валентности и других электрофильных соединений.

Таким образом, в водных растворах сульфата железа и сульфата меди при действии СВЧ ЭМП образуется некоторое количество АФК, в частности, синглетный кислород. Оба синглетных состояния ($^1\text{O}_2$, $^1\Delta_g$ и $^1\text{O}_2$, $^1\Sigma_g^+$) генерируются посредством переноса энергии и инверсии спина, а не путем оптических переходов из триплетного состояния, которые в обоих случаях запрещены. Образующиеся в

водной среде под действием СВЧ ЭМП частотой 3 ГГц АФК (высокоактивные гидроксильные радикалы, гидроперекисные радикалы, синглетный кислород) могут индуцировать деградацию АФИ, а также взаимодействовать с мембранами и органеллами клеток.

1. Показано, что изменение конформации важнейшего АФИ – человеческого сывороточного альбумина, индуцированное электромагнитным воздействием, локализуется в основном в третичной структуре и приводит к обратимому разворачиванию домена II, который входит в центр связывания I. Изменение аллостерических свойств альбумина при электромагнитном действии может изменить связывание лигандов различного химического строения гидрофобной и амфифильной природы с активными центрами молекулы альбумина и повлиять на его фармакодинамику.

2. На поверхности наночастиц серебра реализуются специфические физические процессы, в частности, поверхностный плазмонный резонанс, что приводит к изменению фармакокинетики наночастиц серебра при действии ЭМП. Сформированная при электромагнитном воздействии структура из молекул альбумина на поверхности наночастиц улучшает биодоступность наночастиц серебра. Образующиеся между АФИ и наночастицами ассоциаты могут служить невирусными средствами доставки, что является одним из направлений в разработке современных систем доставки АФИ (*Drug Delivery Systems*).

3. Способ расчета сечения рассеяния света на сферической наночастице определенного радиуса позволяет рассчитывать размеры ассоциатов на основе наночастиц и АФИ по типу «ядро-оболочка» и длину волны их флуоресценции и может быть использован как для таргетной доставки АФИ, так и в фототермической терапии, активируемой наночастицами. Предложенная модель образования в растворе ассоциатов белок-наночастица по диполь-дипольному механизму согласуется с экспериментальными данными.

4. Показано, что воздействие СВЧ ЭМП на водно-солевые растворы вызывает образование в них активных форм кислорода. Последние могут

взаимодействовать с молекулами АФИ, а также с клетками, как это описано в следующей главе.

ГЛАВА 5 ДЕЙСТВИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ И ВОДЫ, ОБЕДНЕННОЙ ДЕЙТЕРИЕМ, НА КЛЕТКИ

5.1 Структурные повреждения геномного материала при действии сверхвысокочастотного и крайне высокочастотного электромагнитного поля на иммунокомпетентные клетки *in vitro*

В литературе обсуждается расширяющееся использованием систем мобильной связи, увеличение воздействия ЭМП на рабочих и общественных местах [см., например, работы 1, 3, 6 – 8, 71, 107, 369], а также использование СВЧ и КВЧ ЭМП в медицине [9 – 10, 370 – 371]. В микроволновых диапазонах частот работают метеорологические радары, системы мобильной связи (1,8–3 ГГц), радары спутниковой связи (26,5–40 ГГц), терапевтические аппараты с применением СВЧ и КВЧ ЭМП, в частности для лечения язв желудка и двенадцатиперстной кишки, онкологии (совместно с традиционными методами) и других заболеваний [10 – 12, 147 – 148]. В обзоре [12] приводятся последние достижения в области медицинского применения СВЧ ЭМП частотами 1–15 ГГц, и отмечаются значительные успехи в разработке клинических устройств с помощью микроволн для диагностики и классификации инсульта мозга, скрининга рака молочной железы и непрерывного мониторинга уровня глюкозы в крови.

В медицинской практике чаще всего используется ЭМП с частотами 61,18 и 53,53 ГГц. Такое ЭМП практически полностью поглощается кожей уже на глубине 0,5–1 мм. Так, терапевтическая установка «ЯВБ-1-5,6» имеет рабочую длину волны 5,60 мм (53,33 ГГц) и ПМ облучения на раскрытии рупора 10 мВт/см² [148]. Москвин С.В. и Хадарцев А.А. на основе полученных ими результатов пришли к выводу, что для КВЧ-терапии достаточно использовать ПМ 1 мВт/см², время

воздействия на одну зону не должно превышать 5 мин при суммарной экспозиции на все зоны 30 мин (наиболее часто рекомендуемые в профильных методичках параметры). При ПМ 10 мВт/см² большее время воздействия может оказаться не безвредным для организма человека [147].

Высокая синхронизированность популяции клеток и многочисленные данные по изучению функционального статуса системы лимфоцитов, оснащенной микробицидными и цитотоксическими механизмами, является основанием для изучения влияния ионизирующих и неионизирующих излучений на данные клетки [53, 113, 116, 372].

В нормальных лимфоцитах человека определено количество окисленных сайтов 8-oxodG и уровень одонитевых разрывов (ОР) ДНК до и после воздействия СВЧ и КВЧ ЭМП. Лимфоциты выделяли из периферической крови здоровых доноров (20 человек), некурящих, в возрасте от 20 до 23 лет, проживающих в Краснодарском крае. Выделение лимфоцитов из донорской крови, режимы обработки суспензий лимфоцитов СВЧ и КВЧ ЭМП, методики определения содержания 8-oxodG и ОР ДНК описаны в главе 2.

Рассмотрено влияние СВЧ и КВЧ ЭМП частотами 3 ГГц, 50 ГГц и 70 ГГц и ПМ 6 мВт/см² на появление 8-oxodG и ОР ДНК после облучения суспензий лимфоцитов в течение 60 с. Первоначальное содержание окисленных сайтов 8-oxodG в ДНК лимфоцитов составило в среднем $(4,1 \pm 0,9)$ нг/мл. После обработки лимфоцитов ЭМП частотой 3 ГГц содержание 8-oxodG достоверно увеличилось по сравнению с содержанием 8-oxodG в необлученных лимфоцитах до $(10,5 \pm 1,6)$ нг/мл, а после обработки излучением частотой 50 ГГц до $(12,4 \pm 1,1)$ нг/мл ($p < 0,05$).

Для определения количества ОР ДНК регистрировали спектры поглощения и спектры флуоресценции при длине волны возбуждения 540 нм растворов лизатов лимфоцитов с бромистым этидием. На рисунке 5.1 приведены спектры поглощения раствора бромистого этидия в растворах лизатов лимфоцитов крови, обработанных СВЧ и КВЧ ЭМП. Из спектров флуоресценции лизатов лимфоцитов с бромистым этидием определено количество ОР ДНК при длине волны возбуждения $\lambda_{\text{возб}}$ 540 нм и максимуме интенсивности (610 ± 5) нм, полученных после обработки

лимфоцитов СВЧ и КВЧ ЭМП соответствующей частоты. Полученные результаты приведены на рисунке 5.2.

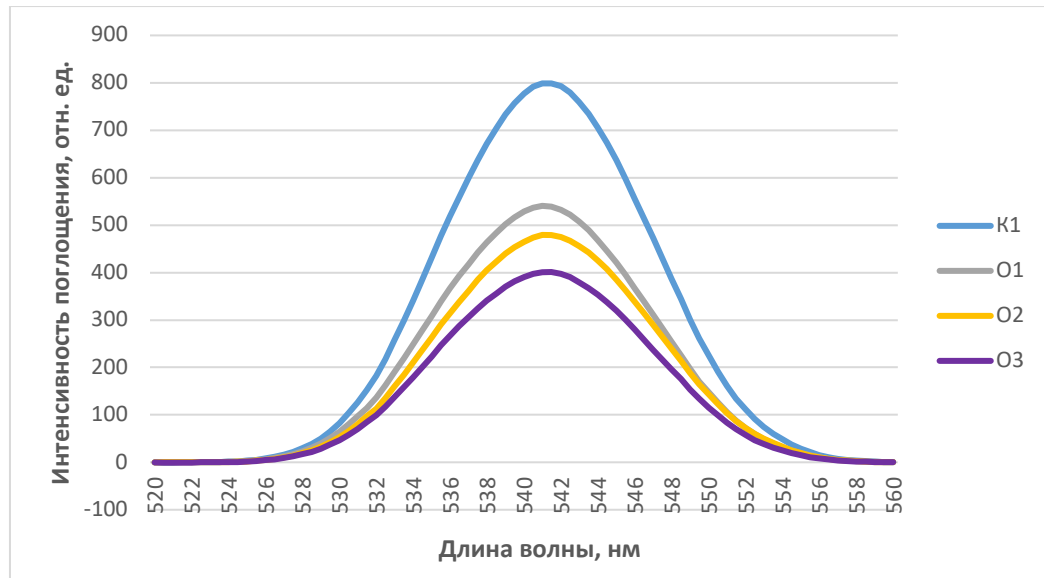


Рисунок 5.1 – Спектры поглощения бромистого этидия в растворах лизатов лимфоцитов крови, обработанных СВЧ и КВЧ ЭМП с ПМ 6 мВт/см² и частотами 3 ГГц (O1), 50 ГГц (O2), 70 ГГц (O3) в течение 60 сек. K1 – контроль, образец без облучения.

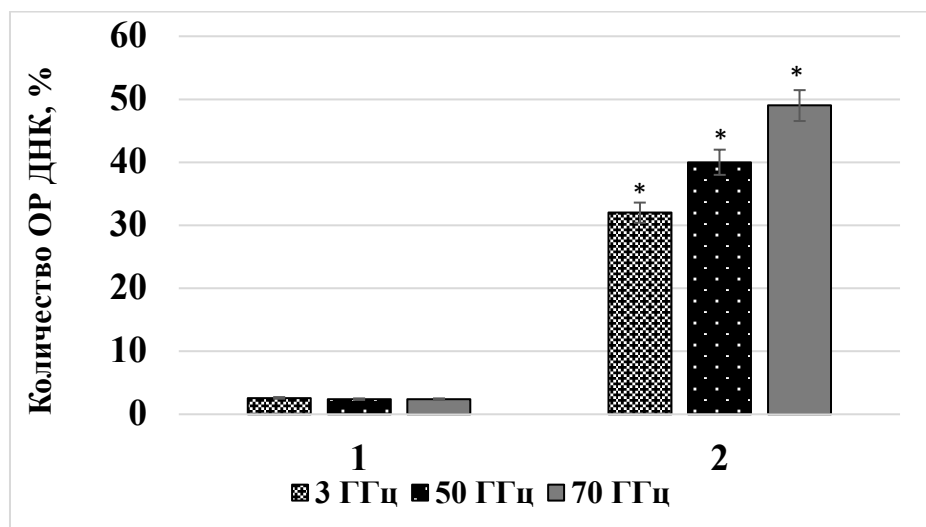


Рисунок 5.2 – Содержание односторонних разрывов ДНК после воздействия *in vitro* СВЧ и КВЧ ЭМП частотами 3 ГГц, 50 ГГц и 70 ГГц с ПМ 6 мВт/см² в течение 60 сек на взвесь лимфоцитов, (1) – контроль, (2) – эксперимент. Примечание. * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем (1).

С увеличением частоты излучения достоверно увеличивалось количество ОР в ДНК лимфоцитов ($p < 0,05$): при воздействии излучения с частотой 3 ГГц на $(29,3 \pm 0,9) \%$, с частотой 50 ГГц на $(38,1 \pm 1,1) \%$, с частотой 70 ГГц на $(47,1 \pm 0,9) \%$ по сравнению с исходными уровнями в необлученных образцах суспензий лимфоцитов.

Между биологическими эффектами НЧ, СВЧ и КВЧ ЭМП авторы работы [2] отмечают сходство. Наблюдаемые сходства дают основания предположить о существовании общего механизма процессов, лежащего в основе данных явлений. В частности, нетепловой эффект СВЧ и КВЧ ЭМП может быть связан с тем, что часть поглощенной энергии ЭМП расходуется на образование большого количества высокоактивных радикалов и перекисей в водной среде, которые взаимодействуют с ДНК лимфоцитов. Порог ионизации ДНК составляет несколько десятков эВ, но, несмотря на это, разрыв нитей может быть эффективен ниже порога ионизации, а сам механизм, с помощью которого низкоэнергетическая частица порождает такие разрывы, включает в себя короткоживущие промежуточные стадии, связанные с образованием в водной среде гидроксильных радикалов или синглетного кислорода.

При окислении ДНК и повышении содержания окисленных сайтов происходит изменение конформации молекулы ДНК за счет изменения торсионных углов сахаро-фосфатного остова из-за увеличения массы окисленных азотистых оснований или нарушения их стэкинга. Это способствует дальнейшему структурному повреждению ДНК. В работе [373] авторами продемонстрирована возможность биохимических модификаций лимфоцитов периферической крови человека, подвергшихся воздействию ЭМП на частоте 1,8 ГГц, включая снижение мод колебаний, связанных с сахаро-фосфатным остовом ДНК.

Бланк М. и Гудман Р. в работе [374], а также Свидлов А. и соавт. в статье [375] высказали предположение, что электроны в водородных связях как в молекуле ДНК, так и в окружающих ее молекулах воды, колеблются с собственными частотами, лежащими в микроволновом диапазоне. С использованием механической модели ДНК теоретически изучено влияние

частоты внешнего периодического воздействия при частотах ЭМП 0,4–50 ГГц на динамику молекулы ДНК и показано, что под действием внешней периодической силы в молекуле ДНК возникают колебания с характерной для этой молекулы специфической частотой, отличающейся от частоты внешнего воздействия ω [376], которые влияют на прочность водородных связей, отвечающих за целостность и пространственную геометрию ДНК.

В нативном состоянии в молекуле ДНК имеется некоторое количество участков с разъединенными водородными связями между азотистыми основаниями, так называемые, области открытых состояний (ОС) [375]. Для исследования внутренней подвижности и образования областей ОС в молекуле ДНК использовали угловую модель, которая основана на аналогии между двухцепочечной молекулой ДНК и механической системой, позволяющей исследовать ее динамику, обусловленную вращательными движениями азотистых оснований вокруг сахара-фосфатного остова, с учетом энергии разрыва водородных связей между парами комплементарных оснований. Проведенные методом математического моделирования с помощью угловой механической модели исследования показали, что вероятность зарождения участков ОС в молекуле ДНК зависит от факторов, определяющих динамику ДНК – торсионных воздействий. Величину внешнего воздействия принимали равной

$$F_j^i(t) = -\beta_j^i \frac{d\varphi_j^i}{dt}(t) + M^i(t), \quad (5.1)$$

где слагаемое $-\beta_j^i \frac{d\varphi_j^i}{dt}(t)$ моделирует эффекты диссипации, обусловленные взаимодействием с окружающей молекулу ДНК жидкостью, слагаемое $M^i(t)$ – торсионный момент.

Гидратная оболочка молекулы ДНК неоднородна, однако, в модель вводили допущение, что вся вода вокруг молекулы одинакова и создает общую вязкость. Значение торсионного воздействия выбирали постоянным во времени и локализованным на определенном отрезке ДНК. Для ограниченного участка гена, включающего 1000 нуклеотидных пар показано, что вероятность возникновения

дополнительных участков ОС значимого размера в молекуле ДНК растет с увеличением величины торсионного момента M_0 . При внешнем периодическом воздействии СВЧ и КВЧ ЭМП в молекуле ДНК возникают дополнительные области ОС, что способствует взаимодействию азотистых оснований с АФК.

Исследование, проведенное Н.А. Чуриковым и соавт., результаты которого приведены в статье [377], показало, что точки расположения разрывов ДНК в человеческих хромосомах разграничивают домены ДНК, фланкируют координированно экспрессируемые большие домены в хромосомах человека, которые транскрибируются РНК-полимеразой II, и соответствуют наиболее хрупким областям в хромосомах, т. е. участкам ДНК, не защищенным плотной упаковкой белков. Разрывы, расположенные исключительно в некодирующих межгенных спейсерных областях, могут снижать топологический стресс в ДНК, вызванный связыванием белковых комплексов, и способствовать формированию открытых или закрытых структур хроматина. Авторы статьи [377] показали, что спонтанный разрыв ДНК увеличивается *in vivo* как за счет репликационного стресса, так и за счет изменений в транскрипции внутри единиц ДНК в клетках, подвергшихся внешнему воздействию. При внешнем периодическом воздействии возможно разрушение хрупких областей хромосом и «выворачивание» точек расположения разрывов ДНК из хроматина. Это также увеличивает уровень ОР при воздействии СВЧ и КВЧ ЭМП на лимфоциты.

Таким образом, образованию ОР под действием СВЧ и КВЧ ЭМП предшествует увеличение числа окисленных участков в клеточной ДНК, возможно, обусловленное появлением ОС и селективным окислением dG-оснований АФК. Образование большого количества 8-oxodG и увеличение нагрузки на систему эксцизионной репарации NER может приводить к накоплению ОР в молекуле ДНК, которые остаются после удаления окисленных сайтов ДНК-гликозилазами. Индуцированные СВЧ и КВЧ ЭМП окислительные и структурные повреждения ДНК в клетках вносят значительный вклад в генотоксические процессы в клетках [378].

Определение уровней ОР ДНК в иммунокомпетентных клетках может быть использовано для исследования воздействия на организм человека СВЧ и КВЧ ЭМП и должно учитываться в отечественных санитарных правилах при нормировании ПДУ неионизирующих излучений для производственного персонала и населения. Полученные результаты открывают возможность разработки профилактических и смягчающих неблагоприятные последствия и экологические риски для здоровья и качества жизни человека меры и эффективные терапевтические процедуры в направлениях восстановительной медицины, использующей СВЧ и КВЧ ЭМП.

5.2 Сочетанное действие воды, обедненной дейтерием ddw (*deuterium depleted water*), и сверхвысокочастотного и крайне высокочастотного электромагнитного поля на иммунокомпетентные клетки *in vitro*

Процессы окислительного повреждения ДНК включают возбуждённые СВЧ и КВЧ ЭМП состояния самих макромолекул и образующиеся радикалы и АФК, присутствующие в водной среде. Поэтому, даже в случае модельных гомогенных растворов, не всегда можно однозначно установить механизмы протекающих реакций, а в такой сложной системе, как живая клетка, определение конкретных механизмов окислительных процессов становится ещё более трудной задачей. Экспериментальный подход, используемый при решении данной проблемы, связан с выяснением вопроса о том, образуется ли синглетный кислород при воздействии СВЧ и КВЧ ЭМП и ответственен ли он за последующие повреждения, происходящие в клетке. Для решения этого вопроса часто используют вещества, вызывающие тушение $^1\text{O}_2$, в частности, азид натрия. Однако, это может быть

корректным только в том случае, если установлено, что азид натрия не взаимодействует с сенситизатором, поскольку это влияет на конечный эффект.

Одним из способов определения участия $^1\text{O}_2$ в реакциях, сенситизированных внешними воздействиями, является сравнение скоростей процессов в обычной, тяжелой воде или в воде, обедненной дейтерием - ddw (*deuterium depleted water*). Состояние $^1\text{O}_2$ ($^1\Sigma_g$) имеет короткое время жизни (меньше 0,1 нс), его участие в реакциях маловероятно. Состояние $^1\Delta_g$ обладает более низкой энергией, его время жизни намного больше и составляет 3,1 μs в обычной воде (H_2O) и 68 μs в тяжелой воде (D_2O) [251].

Для подтверждения возможного участия синглетного кислорода $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) в процессах, индуцируемых СВЧ и КВЧ ЭМП *in vitro* на лимфоциты, изучено влияние воды с пониженным относительно природного содержанием дейтерия на количество ОР ДНК на взвеси лимфоцитов, выделенных из крови доноров. Лимфоциты инкубировали в 0,9% растворах NaCl, приготовленных на воде с природным содержанием дейтерия (150 ppm) и на воде с содержанием дейтерия 40 ppm. Количество ОР ДНК в лимфоцитах определяли через 16 часов инкубации. Полученные результаты приведены на рисунке 5.3.

На полученные значения ОР ДНК существенно не повлияло увеличение времени инкубации до 24 часов. Результаты мало зависели от среды инкубации, уровень ОР ДНК для обеих сред составлял $(2,5 \pm 0,2) \%$ (рисунок 5.3, столбцы 1).

Сокращение времени жизни синглетного кислорода в воде с пониженным содержанием дейтерия и уменьшение количества образующихся АФК может активировать системы репарации ДНК лимфоцитов и ингибировать процессы апоптоза. Для выяснения справедливости данного предположения проведены эксперименты с использованием сочетанного воздействия СВЧ и КВЧ ЭМП частотами 3 ГГц и 50 ГГц и воды, обедненной дейтерием.

Определено, что действие СВЧ и КВЧ ЭМП приводило к накоплению структурных повреждений ДНК лимфоцитов при использовании обычной воды. По сравнению с контрольными образцами количество ОР ДНК в лимфоцитах

доноров, обработанных излучением частотой 3 ГГц, достоверно увеличилось на $(21,3 \pm 3,1) \%$ (рис. 5.3, столбцы 2), а излучением частотой 50 ГГц на $(60,7 \pm 5,2) \%$ (рис. 5.3, столбцы 3) ($p < 0,05$). В воде с пониженным содержанием дейтерия содержание ОР ДНК было значительно ниже по сравнению с контролем: на $(3,5 \pm 1,1) \%$ и $(38,1 \pm 2,3) \%$ соответственно ($p < 0,05$).

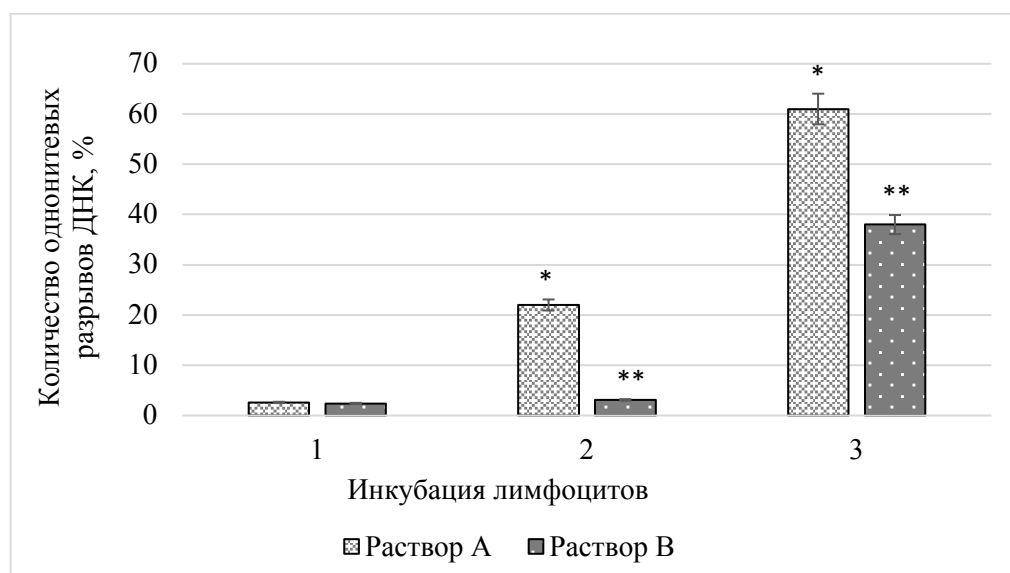


Рисунок 5.3 – Содержание ОР ДНК лимфоцитов, инкубированных в средах с разным содержанием дейтерия, после воздействия на суспензии лимфоцитов СВЧ и КВЧ ЭМП. Примечание: * - $p < 0,05$ в сравнении с контролем – необработанными СВЧ и КВЧ ЭМП взвесями лимфоцитов в среде с концентрацией дейтерия 150 ppm; ** - $p < 0,05$ в сравнении с контролем – необработанными СВЧ и КВЧ ЭМП взвесями лимфоцитов в среде с концентрацией дейтерия 40 ppm. Количество одностранных разрывов ДНК изучено при инкубации в растворах с содержанием дейтерия 150 ppm (А) и 40 ppm (В): у лимфоцитов из крови доноров (1), после воздействия на них СВЧ ЭМП с ПМ 6 мВт/см^2 частотой 3 ГГц (2) и КВЧ ЭМП частотой 50 ГГц (3) в течение 40 сек. Время инкубации 16 часов.

Определение ОР ДНК в клетках, инкубированных в воде с содержанием дейтерия 40 ppm, показало, что, уровень этого показателя достигал максимума через 2 часа инкубации, а затем резко снижался. Такое поведение клеток в воде с пониженным содержанием дейтерия, возможно, связано с тем, что наряду с

возникновением ОР в клетках активируются системы ее репарации, ликвидирующие эти разрывы, в частности, эксцизионная репарация нуклеотидов, которая обеспечивает коррекцию многочисленных повреждений ДНК – модифицированных оснований, апуриновых /апиримидиновых сайтов, одноцепочечных разрывов и является основным механизмом устранения повреждений в ядерной и митохондриальной ДНК (мтДНК) [379].

Полученные результаты отражают возрастание кинетического изотопного эффекта (КИЭ) в клеточных процессах при соотношении дейтерий/протий (D/H) в культуральной среде ниже природного, как это убедительно было показано Сыроешкиным А.В. и соавт. в работе [33] на примере увеличения константы скорости процессов необратимого перехода клеток *Stropharia ambigua* из активного состояния в иммобилизованное до 800 раз при пониженном содержании в среде дейтерия.

Высокие изотопные эффекты в реакциях переноса атомов протия (дейтерия) в жидкой среде являются результатом классических эффектов: кинетического, термодинамического и туннельного. Первый зависит от констант скорости переноса атомов, а второй обусловлен изотопными эффектами при сольватации протонных и дейтерированных реагирующих биомолекул. Эффект сопровождается увеличением/уменьшением вовлеченности биомолекул в биохимические реакции вследствие ускорения/замедления десольватации отдельных регуляторных участков молекул при их переходе в функционально активное состояние, при этом величина КИЭ зависит от внутренней динамики каталитического центра ферментов [380].

Сигнальный путь ядерный фактор E2-родственный фактор 2 / элемент антиоксидантного ответа (Nrf2/ARE) является важным цитопротекторным механизмом. Nrf2 регулирует экспрессию более сотни цитопротекторных генов, среди которых есть те, которые опосредуют антиоксидантную защиту, влияют на процессы митохондриального биогенеза, а также на пути репарации ДНК, участвует во второй линии защиты мтДНК и включает ферменты, ответственные за восстановление поврежденных оснований и нуклеотидов, включая

восстановление ОР [381]. При снижении внутриклеточной концентрации дейтерия облегчается трансмембранный градиент протонов в митохондриях, необходимый для деятельности АТФ-синтаз и других ключевых ферментов энергетического цикла [382 – 383]. Активация Nrf2/ARE пути за счет понижения концентрации дейтерия в среде оказывает благоприятный эффект на клетки путем стимуляции экспрессии антиоксидантных ферментов, что способствует уменьшению окислительных и структурных повреждений ДНК.

Проведенные исследования подтвердили, что в воде, обедненной дейтерием, замедляются процессы образования и накопления ОР ДНК лимфоцитов при действии СВЧ и КВЧ ЭМП, что связано с нейтрализацией повышенной продукции АФК, сокращением времени жизни синглетного кислорода и уменьшением повреждающего действия АФК на ДНК. Адаптация иммунокомпетентных клеток к низким концентрациям дейтерия способствует повышению функциональной активности клеточных систем, что согласуется с результатами работ [384 – 385]. Это открывает перспективы для использования воды, обедненной дейтерием, в фармакотерапии и в биомедицинских приложениях, применяющих СВЧ и КВЧ ЭМП.

Вода, обедненная дейтерием, использовалась нами в протоколах децеллюризации в тканевой инженерии с целью предотвращения неконтролируемой гибели клеток [386] и при создании биосорбента «Витабиос» для выведения токсичных элементов из организма [387].

Биосорбент «Витабиос» представляет собой натуральный продукт на основе инактивированных винных дрожжей – сахаромикетов, приготовленный с использованием воды, обедненной дейтерием, ddw. «Витабиос» отличается большим по сравнению с аналогичными сорбентами количеством функционально-активных поверхностных центров гидро-, amino- и карбоксильной природы, обладает отрицательным электрокинетическим потенциалом, развитой активной поверхностью (125-150 м²/г). «Витабиос» зарегистрирован Госстандартом РФ, ТУ 9176-001-10127285. На основании изучения сорбционно-кинетических характеристик «Витабиоса» рассчитана суточная доза его приема и разработан

способ применения биосорбента «Витабиос» для выведения из организма тяжелых металлов, апробированный в условиях стационара Краснодарского краевого центра радиационной и профессиональной патологии. Получен Патент на изобретение RU 2137399 C1 [387].

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

На основе теоретических и экспериментальных данных, полученных авторами работы [388], была разработана методика измерения количественного содержания дейтерия в воде методом ядерного магнитного резонанса на приборе JEOL Delta ECA 400 с использованием зонда 40TH5AT/FG2 и применением лантаноидного сдвигающего реагента (ЛСР), составлен комплекс правил и требований при проведении измерений и проведена оценка погрешностей измерений.

Сдвигающие реагенты взаимодействуют химически или межмолекулярно с субстратом и сдвигают линии спектров ЯМР последнего. В качестве сдвигающего реагента использовали соединение с парамагнитным в возбужденном состоянии ионом Eu^{3+} , создающим локальное магнитное поле в месте нахождения ядра, резонанс которого наблюдали. Использование в качестве лиганда трифторметансульфоната связано с проявлением им свойств кислоты Льюиса и способностью образовывать аддукты с субстратами, содержащими атомы с неподеленными парами электронов. 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». Внутренним стандартом служила ЯМР-ампула (коаксиальный внутренний стандарт) с длиной концевой капилляра 32 мм и ёмкостью 40 мкл, которая являлась вставкой в основную ЯМР-ампулу и содержала водный раствор трифторметансульфоната европия (III) с концентрацией $(0,010 \pm 0,005)$ моль/л. Содержание дейтерия в данном растворе соответствовало исследуемому диапазону концентраций дейтерия измеряемого объекта (содержание других примесей не превышало 0.01 % по массе). Основной ампулой была ЯМР-ампула диаметром $(4,97 \pm 0,01)$ мм, в которую в строго фиксированное положение вставлялся внутренний стандарт. Ампулы были откалиброваны в соответствии с ГОСТ 19908. Оптимальные параметры режима ЯМР-спектрометра для измерений на ядрах ^2H приведены в Приложении 2.

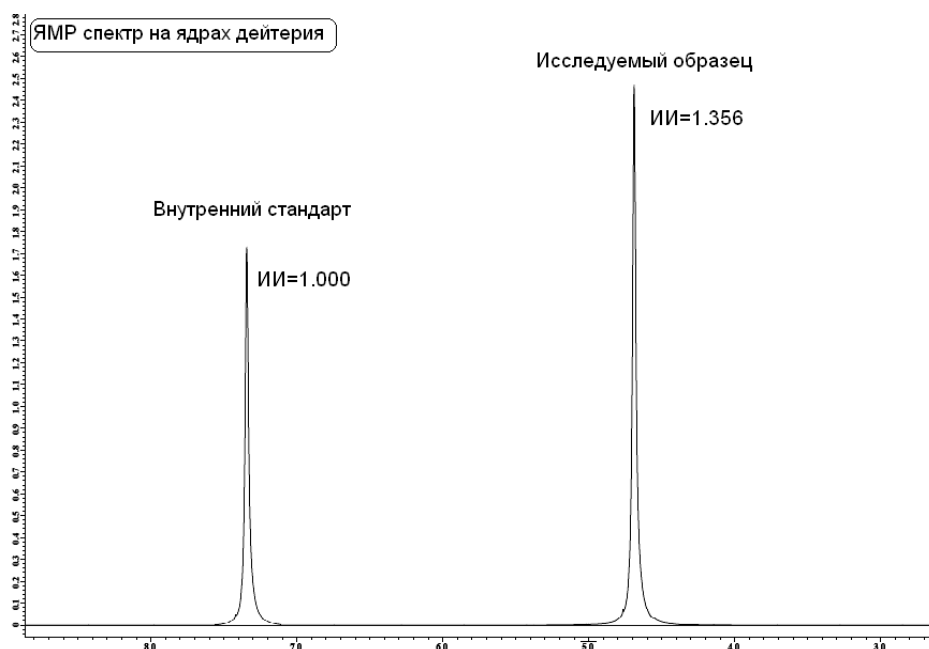


Рисунок 5.4 – ЯМР-спектр образца воды, полученный с использованием в качестве внешнего стандарта лантаноидного сдвигающего реагента трифторсульфоната европия (III).

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. На рисунке 5.4 приведен

пример ЯМР-спектра, на котором ИИ - интегральная интенсивность (площадь под кривой сигнала ЯМР).

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, введенным МАГАТЭ VSMOW – 155 ppm и SLAP – 89 ppm. С помощью встроенного программного обеспечения «Delta» измеряли интегральную интенсивность (ИИ) стандарта и относительно него ИИ каждого калибровочного образца. Строили кривую зависимости ИИ от содержания дейтерия в ppm относительно внутреннего стандарта. Методом наименьших квадратов находили линию тренда в линейных координатах $y = kx + b$, где y – ИИ, x – содержание дейтерия в ppm, k , b – коэффициенты линейной аппроксимации. Используя полученную калибровочную зависимость и, исходя из измеренных значений ИИ исследуемых образцов, определяли содержание дейтерия в измеряемых образцах, подставляя соответствующие ИИ в уравнение аппроксимации калибровочной прямой.

Специфичность (specificity) методики определяли по соответствию изотопных соотношений $^2\text{H}/^1\text{H}$ в разных объектах исследования (природных, минеральных водах, образцах воды с пониженным относительно природного содержанием дейтерия, полученных в лабораторных условиях) и внутрилабораторного стандартного образца с известной концентрацией дейтерия в идентичных условиях на одном и том же приборе. Результаты приведены в таблице 5.1. 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 разработанной методики и независимым методом масс-спектрометрии изотопных отношений (IRMS) на изотопном масс-спектрометре Delta 5 Advantage (ИМБП РАН) (таблица 5.2).

Таблица 5.1 – 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

Таблица 5.2 – 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 ЛСП (I)		IRMS * (II)		Сравнение результатов (I и II) t-критерий, расч.
		($x \pm \Delta x$), ppm	ϵ , %	($x \pm \Delta x$), ppm	ϵ , %	
1.	Образец 1	9,0 $\pm$ 0,9	10	10,0 $\pm$ 0,2	2	0,75
2.	Образец 2	40,3 $\pm$ 0,9	2,2	40,0 $\pm$ 0,3	0,8	0,39
3.	Образец 3	51,1 $\pm$ 1,0	2,0	51,0 $\pm$ 0,3	0,5	0,31

IRMS * - масс-спектрометрия изотопных отношений

Сравнение результатов, полученных разными методами, подтвердило специфичность определения содержания дейтерия в воде с помощью разработанной методики.

Предел обнаружения (detection limit) определяли по соотношению «сигнал/шум». Сравнили величины сигналов, полученных для контрольного опыта и для образцов с низкими концентрациями дейтерия. При оценке предела обнаружения приемлемой считается величина отношения «сигнал/шум» от 3:1 до 2:1, она составила 10 ppm. Как видно из таблицы 5.2, для образца 1, содержащего дейтерий в количестве на пределе обнаружения нашей методики, получено большое значение относительной ошибки среднего (ϵ , %).

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. Линейность (linearity) методики определяли для серии растворов с разным изотопным соотношением $^2\text{H}/^1\text{H}$. Зависимость аналитического сигнала от концентрации имела вид $y = kx + b$, коэффициент корреляции $R^2=0.9995$, что подтверждает линейность методики. Диапазон определяемых концентраций дейтерия (диапазон применения, аналитическая область) составил от 30 до 300 ppm.

Методики количественного определения подлежат валидации согласно ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик». Произведена валидация методики по показателю повторяемость. 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 5.3.

Таблица 5.3 – 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», представленный в Приложении 3.

Физико-химические свойства водных растворов зависят от свойств растворенных ионов (заряда, ионного радиуса, электронного строения и др.), в частности, ионы в водной матрице могут изменять степень её упорядоченности, что влияет на структуру и параметры ЯМР-сигнала. Однако, в нашей методике используется трифторметансульфонат европия (III) $(CF_3SO_3)_3Eu$, образующий аддукт с дейтерием, в значительной концентрации - 6 г/дм³, которая соизмерима с величинами общей минерализации для столовых и лечебно-столовых вод согласно ГОСТ Р 54316-2020. Это нивелирует влияние других неорганических ионов на ЯМР-сигнал и позволяет использовать методику для определения содержания дейтерия в минеральных и природных водах.

Рассмотрена возможность применения метода количественной ЯМР спектроскопии $^2H/^1H$ для решения практических задач эколого-фармацевтического мониторинга, в частности, при изучении распределения дейтерия в биологических органах и тканях лабораторных животных. Исследовали плазму крови крыс после длительного употребления ими воды, обедненной дейтерием, ddw. Определение концентрации дейтерия в плазме крови проводили с помощью разработанной методики и согласно ФР.1.31.1999.00073 «Методика выполнения измерений содержания дейтерия в воде, водно-органических и органических растворах

методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса». Полученные результаты приведены в таблице 5.4.

Таблица 5.4 – Результаты определения изотопного соотношения $^2\text{H}/^1\text{H}$ в плазме крови крыс исследуемых групп с использованием разных методик ЯМР-спектроскопии, $R=0,95$.

№	Объект анализа	Методика с использованием ЛСР		Методика сравнения *	
		($x \pm \Delta x$), ppm	ϵ , %	($x \pm \Delta x$), ppm	ϵ , %
1.	Группа 1 (n=40)	$152,3 \pm 2,1$	1,4	$151,3 \pm 3,8$	2,5
2.	Группа 2 (n=40)	$157,5 \pm 2,6$	1,7	$155,3 \pm 3,1$	2,0
3.	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».

Крысы были разделены на группы: группа № 1, которым в течение 30 дней давали дистиллированную минерализованную воду (158 ppm), n=40; группа № 2, которым давали дистиллированную минерализованную воду (158 ppm) в течение 30 дней и они страдали от гнойного воспаления мягких тканей (n=40); группа №3, которой в течение 30 дней давали дистиллированную минерализованную воду с пониженным содержанием дейтерия (40 ppm) и у них было гнойное воспаление мягких тканей, n=40. Результаты использовали для сравнительной оценки содержания дейтерия в плазме крови крыс разных групп до и после приема крысами воды с пониженным содержанием дейтерия.

Несмотря на сходимость в пределах доверительного интервала, полученные разными методиками ЯМР-спектроскопии результаты содержания дейтерия в плазме 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. Таким образом, пробоподготовка биологических образцов или учет влияния водной матрицы на ЯМР-сигнал является предметом дальнейших исследований.

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 нескольких факторов, связанных с требованиями к точности, типом задачи и области использования. Преимуществом разработанной методики является сравнительная дешевизна (по сравнению с IRMS), 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.

5.4 Влияние низкочастотного электромагнитного поля на хемилюминесценцию моноклеарных клеток периферической крови

В статьях [389 – 391] отмечается, что при электромагнитном воздействии нарушаются процессы формирования иммунитета, чаще в сторону его угнетения. Ответ иммунной системы на внешнее воздействие может быть обусловлен разной чувствительностью иммунокомпетентных клеток к действию ЭМП.

Приобретенный, или адаптивный, иммунитет, в отличие от врожденного, формируется на протяжении всей жизни организма и является результатом работы системы иммунокомпетентных клеток [392 – 393]. Лимфоциты создают первую линию защиты, и от их хемотаксической, фагоцитарной и метаболической активности во многом зависит состояние иммунной системы и организма в целом. Выделение мононуклеарных клеток (МНК) из периферической крови доноров осуществляли центрифугированием крови в градиенте плотности фиколлюрографина ($\rho = 1,077$ г/мл), как описано в главе 2. МНК периферической крови по данным работы [394] включают лимфоциты (Т-клетки и В-клетки) – от 70 до 90%, моноциты – от 10 до 30% и дендритные клетки – от 1 до 2%. Морфологический контроль клеточной взвеси показал состав суспензии выделенных клеток: содержание лимфоцитов составило 71–72%, моноцитов - 26–28%.

Электромагнитную обработку взвесей МНК полем частотами от 7,0 до 10,0 Гц с шагом 0,2 Гц проводили в закрытых стерильных термостатируемых кюветах при температуре 37 °С в экранированной камере в течение 15 минут на выбранной частоте. На каждой частоте поля обрабатывали одновременно по 5 параллельных образцов. Напряженность поля в месте нахождения образца составляла (550 ± 20) А/м. В ходе экспериментов использовали аппаратно-программный комплекс, описанный в главе 2.

Регистрацию спонтанной (нестимулированной) и стимулированной хемилюминесценции (ХЛ) осуществляли в течение 900 с на хемилюминометре Lum 5773, предел чувствительности которого составляет 10–15 мВ, поэтому ХЛ не усиливали люминолом. Максимальную интенсивность ХЛ оценивали через 300 с от начала записи согласно [395]. Одинаковость условий для клеточных взвесей в контроле и опыте достигалась тем, что контрольные образцы взвесей перед регистрацией ХЛ помещали в экранированную камеру на 15 минут и обработку

образцов ЭМП не проводили. Величина постоянной компоненты геомагнитного поля во время нахождения образцов в экранированной камере и в контроле, и в опыте была одинаковой и составляла 0,4 А/м.

Для суспензий МНК, выделенных из периферической крови доноров 1 группы (С/С-полиморфизм гена hOGG1) и 2-й группы (С/Г- и Г/Г-полиморфизмы гена hOGG1), получены временные зависимости интенсивности ХЛ, отражающие процессы экзотермических реакций окисления, которые протекают в клетках, на поверхности клеток и в среде инкубации (рисунки 5.5 – 5.6).

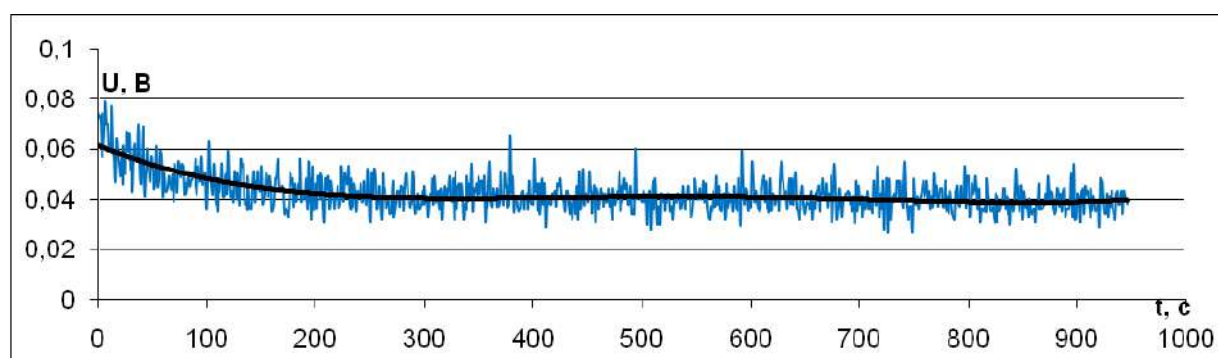


Рисунок 5.5 – Интенсивность спонтанной хемилюминесценции взвеси мононуклеарных клеток периферической крови доноров 1-й группы.

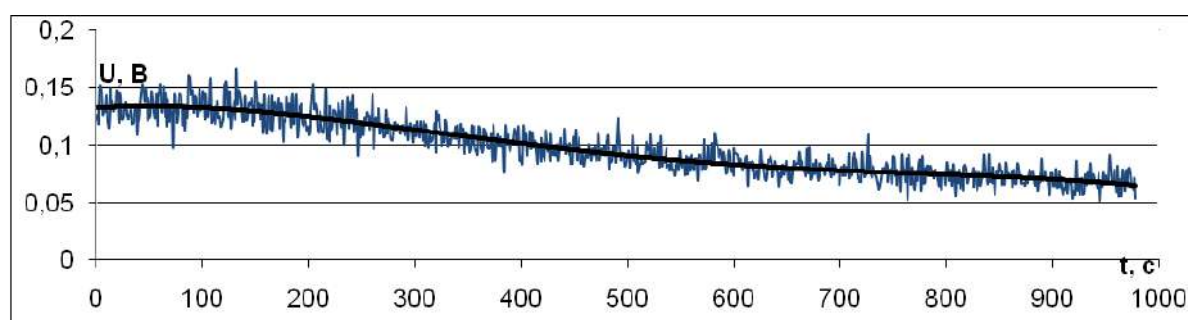


Рисунок 5.6 – Интенсивность спонтанной хемилюминесценции взвеси мононуклеарных клеток, выделенных из периферической крови доноров 2-й группы.

При сравнении графиков интенсивности хемилюминесценции нативных МНК видно, что начальный всплеск интенсивности ХЛ клеток, выделенных из крови доноров 2-й группы, превышает начальную интенсивность ХЛ суспензии

мононуклеаров доноров 2-й группы. Величины колебаний интенсивности ХЛ взвеси МНК 2-й группы составили 0,16 отн. ед., тогда как максимальная величина колебаний этого же параметра для клеток доноров 1-й группы достигала 0,07 отн. ед. Отмечены различия и в характере спада графиков интенсивности ХЛ: для клеток доноров 1-й группы она носила экспоненциальный характер, а для клеток доноров 2-й группы почти линейный.

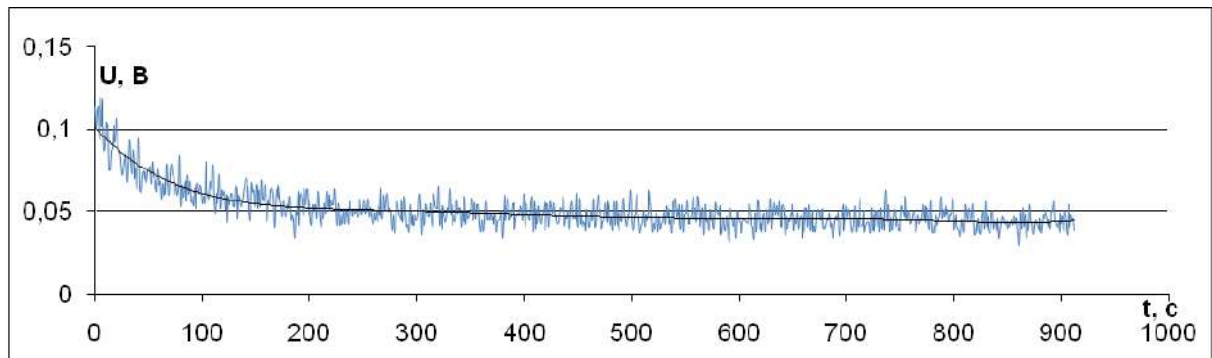


Рисунок 5.7 – Интенсивность хемилюминесценции взвеси мононуклеарных клеток, выделенных из периферической крови доноров 1-й группы, стимулированная ЭМП частотой 7,0 Гц, время экспозиции 15 мин.

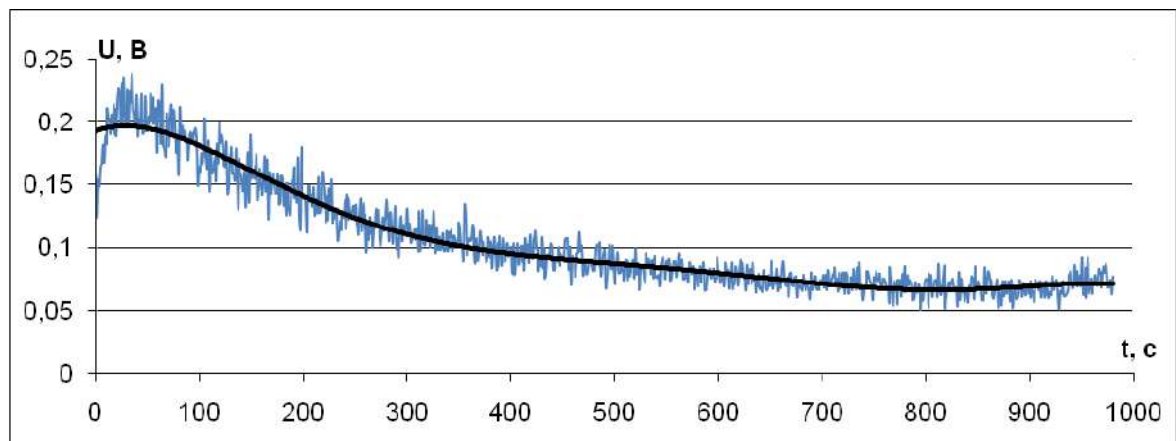


Рисунок 5.8 – Интенсивность хемилюминесценции взвеси мононуклеарных клеток, выделенной из периферической крови доноров 1-й группы, стимулированная ЭМП частотой 8,6 Гц, время экспозиции 15 мин.

На взвеси МНК периферической крови доноров воздействовали ЭМП соответствующей частоты в диапазоне от 7 до 9 Гц с последующей регистрацией интенсивностей ХЛ в течение 900 с. На рисунках 5.7 и 5.8 приведены графики

интенсивности ХЛ МНК периферической крови доноров 1-й группы после воздействия на клетки ЭМП частотой 7,0 Гц и 8,6 Гц соответственно.

Начальный всплеск интенсивности ХЛ взвеси МНК после воздействия ЭМП достигал значения 0,24 В, тогда как интенсивность ХЛ взвеси нативных МНК без обработки полем была значительно ниже и составляла 0,07 В. Наименьшее значение интенсивности ХЛ наблюдали после воздействия на МНК доноров ЭМП частотой 7,8 Гц, а наибольший всплеск зафиксирован после воздействия полем с частотой 8,6 Гц.

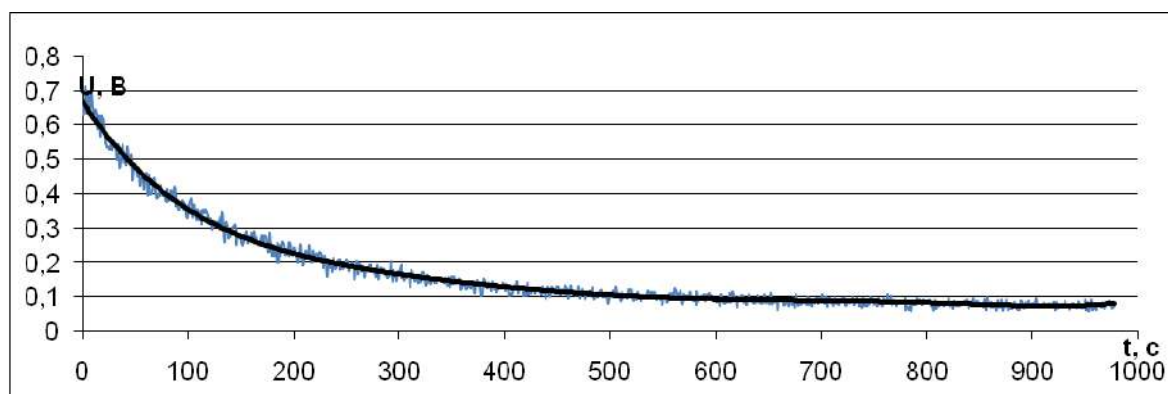


Рисунок 5.9 – Интенсивность хемилюминесценции взвеси мононуклеарных клеток, выделенных из периферической крови доноров 1-й группы, стимулированная сочетанным действием 1 мкМ H_2O_2 и ЭМП частотой 8,6 Гц, время экспозиции 15 мин.

После добавления 1 мкМ пероксида водорода к взвесям МНК и последующем электромагнитном воздействии полем частотой 8,6 Гц наблюдали значительное увеличение начальной ХЛ и наклона кривой, свидетельствующее об изменении скорости образования радикалов во внеклеточной среде (рисунок 5.9.). Учитывали, что пероксид водорода имеет собственное свечение, средняя интенсивность которого составляла 0,05 В. Пероксид водорода стимулировал дополнительное свободнорадикальное окисление, увеличивая перекисное окисление липидов мембран клеток и усиливая ХЛ.

Стимуляция ХЛ взвесей МНК доноров 2-й группы НЧ ЭМП также приводила к увеличению интенсивности первоначального всплеска по сравнению с ХЛ

нативных клеток (рисунки 5.10 и 5.11). Наибольший всплеск интенсивности ХЛ взвесей клеток 2-й группы наблюдали после воздействия полем частотами 7,8 Гц и 8,2 Гц, при этом значение интенсивностей ХЛ, индуцированных с помощью ЭМП, превышало собственную ХЛ нативных клеток почти в 10 раз.

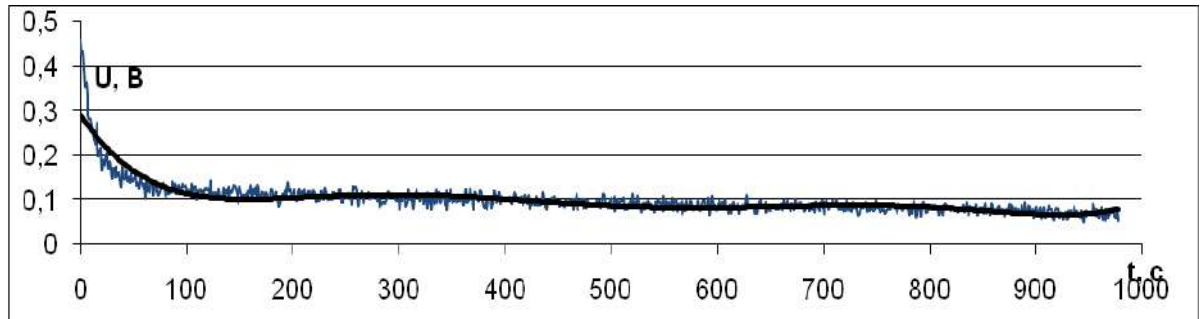


Рисунок 5.10 – Интенсивность хемилюминесценции взвеси мононуклеарных клеток, выделенных из периферической крови доноров 2-й группы, стимулированная ЭМП частотой 7,8 Гц, время экспозиции 15 мин.

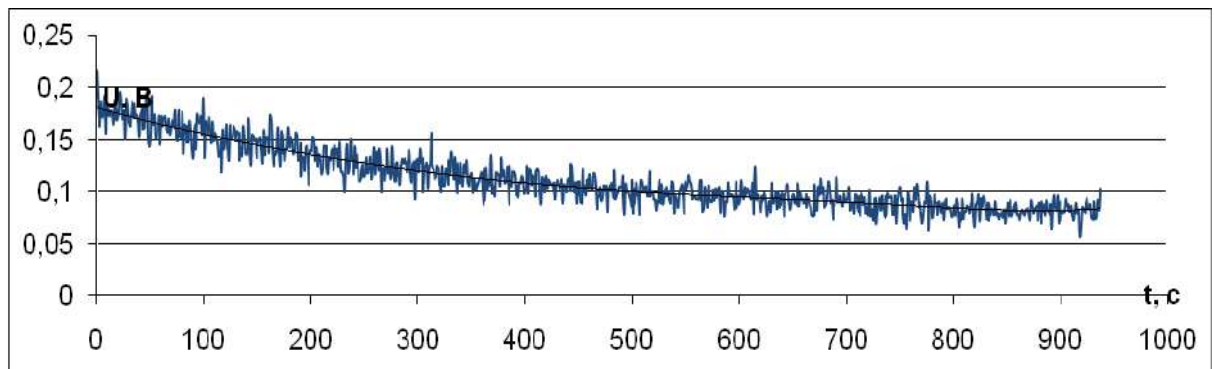
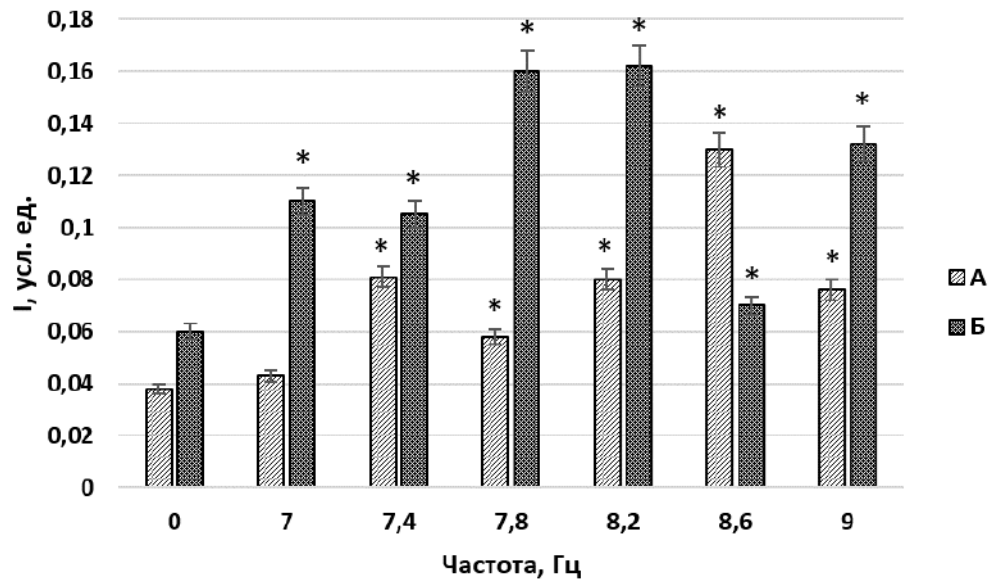
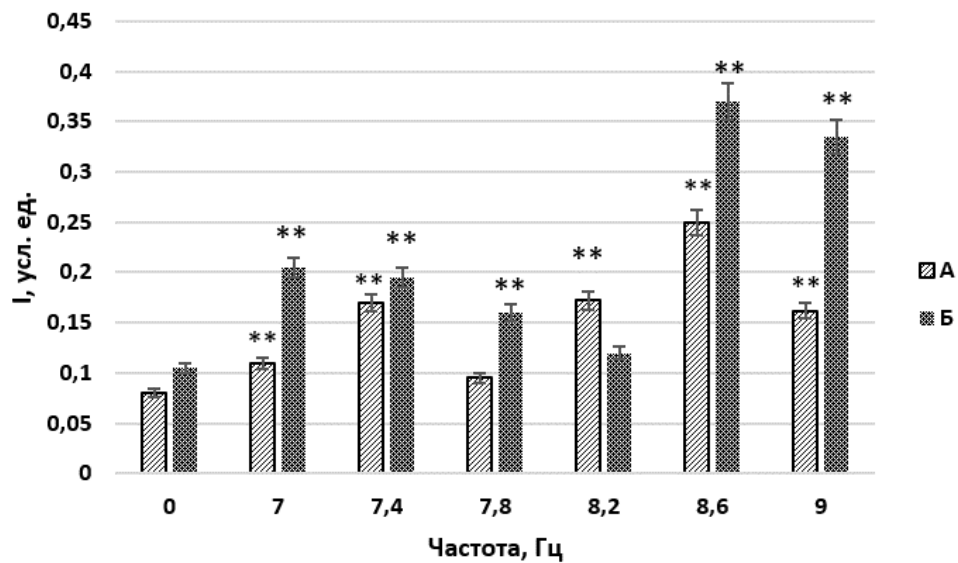


Рисунок 5.11 – Интенсивность хемилюминесценции взвеси мононуклеарных клеток, выделенных из периферической крови доноров 2-й группы, стимулированная ЭМП частотой 8,6 Гц, время экспозиции 15 мин.

Получены зависимости интенсивностей ХЛ МНК, выделенных из периферической крови доноров двух групп, от частоты воздействующего ЭМП после 300 с от начала регистрации до и после внесения во взвеси 1 мкМ пероксида водорода. Гистограммы приведены на рисунке 5.12 а) и б) соответственно.



а)



б)

Рисунок 5.12 – Влияние низкочастотного ЭМП на хемилюминесценцию мононуклеарных клеток, выделенных из крови доноров 1-й группы (светлые столбики - А) и доноров 2-й группы (темные столбики - Б)

а) в отсутствии пероксида водорода,

б) после добавления во взвеси 1 мкМ пероксида водорода.

Примечание. Взвеси МНК обрабатывали ЭМП напряженностью (550 ± 20) А/м с соответствующей частотой в течение 15 мин С. Данные представлены: * - $p < 0,05$ в сравнении с контролем – необработанными ЭМП взвесями МНК доноров; ** - $p < 0,05$ в сравнении с контролем – необработанными ЭМП взвесями МНК доноров с добавлением пероксида водорода.

Добавление пероксида водорода во взвеси приводило почти к двукратному увеличению интенсивности хемилюминесценции МНК по сравнению со стимуляцией только ЭМП ($p < 0,05$).

Одним из распространенных эффектов действия ЭМП на иммунокомпетентные клетки является изменение активности свободных радикалов, уровней концентраций АФК, АФА и ферментов-антиоксидантов, поддерживающих гомеостаз [396 – 397]. При повышенном образовании, кроме генотоксического, АФК оказывают повреждающее действие на клеточные компоненты: нарушаются мембранные структуры из-за перекисного окисления липидов, окисляются белки по остаткам тирозина, цистеина и серина, смещаются редокс-потенциал клеток из-за окисления глутатиона.

При неспецифической стимуляции ХЛ клеток с помощью НЧ ЭМП или в сочетании электромагнитного воздействия с пероксидом водорода происходит активация респираторного взрыва, связанная с образованием АФК в клетках, содержащих ферменты NAD(P)H-оксидазы семейства NOX (МКФ 1.6.3) [398 – 399]. В моноцитах имеется выраженная митохондриальная сеть и NAD(P)H-оксидазный комплекс, а в лимфоцитах по литературным источникам данные ферменты отсутствуют. Эти мембраносвязанные ферменты переносят электроны от NAD(P)H к молекулярному кислороду с образованием супероксидного анион-радикала в следующей последовательности: $\text{NAD(P)H} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow \text{гем } b$.

В результате трансмембранного переноса электронов образуются две молекулы супероксидного радикала, которые играют роль предшественников пероксида водорода и других окислителей. NOX4 – единственный представитель этого семейства, который производит пероксид водорода, а не супероксидный радикал.

Одной из гипотез, объясняющих влияние ЭМП на активность NAD(P)H-оксидазы, является предположение, что активность этого фермента может быть скоординирована с работой потенциал-зависимых селективных протонных каналов, которые были обнаружены в нейтрофильных гранулоцитах [398]. Активность NAD(P)H-оксидазы при респираторном взрыве приводит к

высвобождению протонов в цитоплазму, что вызывает быструю деполяризацию клеточной мембраны и изменение pH. Оба эти механизма регулируют открытие потенциал-зависимых протонных каналов.

Большая часть АФК вырабатываются в митохондриях клеток, поэтому особое значение в моноцитах имеет митохондриальная ДНК (мтДНК), которая расположена в митохондриальном матриксе, то есть, в непосредственной близости от основных источников АФК в клетке. Ферменты, генерирующие АФК во внутренней митохондриальной мембране и в митохондриальном матриксе, включают аконитазу, которая содержит железо-серные кластеры, ответственные за продукцию $O_2^{\bullet-}$, дигидрооротатдегидрогеназу (DHON), комплекс α -кетоглутаратдегидрогеназы (KGDHC) и пируватдегидрогеназный комплекс [399]. Оба последних комплекса опосредуются ферментом дигидролипоилдегидрогеназой (Dld) для генерации H_2O_2 и $O_2^{\bullet-}$.

Во внеклеточной водной среде также образуются АФК при действии НЧ ЭМП, как это было показано в главе 3. Вне зависимости от локализации происходит увеличение количества АФК, что способствует протеканию реакций окисления на поверхности иммунокомпетентных клеток и увеличению ХЛ.

5.5 Изменение продукции межклеточных медиаторов при воздействии низкочастотного электромагнитного поля *in vitro*

Клетки иммунной системы работают в согласованном между собой взаимодействии, которое осуществляется регуляторами иммунных реакций - цитокинами. Набор и количество цитокинов, действующих на рецепторы клеточной поверхности, представляют собой организованную систему сигналов,

взаимодействующих между собой [400 – 401]. Известно, что цитокины, контролирующие жизненный цикл и выживаемость клеток иммунной системы, их дифференцировку и функциональную активность, служат организаторами и регуляторами защитной реакции на местном и системном уровне. Накапливаясь в очаге воспаления, они оказывают как прямое, так и опосредованное влияние на работу почти всех клеток иммунной системы, включая гранулоциты, макрофаги, Т- и В-лимфоциты, фибробласты, а также клетки эпителия. Оценка цитокинового профиля является современным диагностическим подходом, который позволяет получить объективную информацию о напряженности механизмов иммунной защиты. Праймирующее действие ЭМП на иммунокомпетентные клетки изучено недостаточно.

С помощью физико-химической модели определили, что при частотах поля от 7 до 9 Гц в водно-солевой среде образуется повышенное содержание пероксида водорода, что может влиять на выработку межклеточных медиаторов – провоспалительных цитокинов.

В ходе проведенных исследований изучены изменения уровней концентрации сывороточных провоспалительных цитокинов интерлейкина-1 (*IL-1 β*), интерлейкина-6 (*IL-6*) и фактора некроза опухолей (*TNF- α*) у доноров с разным полиморфизмом гена hOGG1 после электромагнитного воздействия *in vitro*. На образцы периферической крови доноров 1 группы (С/С-полиморфизм гена hOGG1) и 2-й группы (С/Г- и Г/Г-полиморфизмы гена hOGG1) действовали НЧ ЭМП разной частоты в течение 15 мин. Выбор спектра провоспалительных цитокинов *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* позволял оценить адекватность реагирования иммунной системы на электромагнитное воздействие.

С помощью комплекса, описанного в главе 2, на определенной частоте поля обрабатывали одновременно по 5 образцов крови, затем определяли в них содержание цитокинов. Детекция цитокинового профиля осуществлялась методом иммуноферментного анализа (тест-системы ООО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Результаты содержания *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* в сыворотке крови доноров 1-й и 2-й

группы до и после воздействия ЭМП разной частоты приведены в таблицах 5.5 – 5.7 и на рисунках 5.13 – 5.15.

Таблица 5.5 – Концентрации *IL-1 β* в сыворотке крови доноров до и после воздействия ЭМП на образцы крови, n = 5.

Частота, Гц	Доноры 1-й группы		Доноры 2-й группы	
	<i>S_{IL-1β}</i> , пг/мл	Опт. пл.	<i>S_{IL-1β}</i> , пг/мл	Опт. пл.
без обработки (контроль)	5,19±0,09	0,10	5,84±0,09	0,11
7,0	7,49±0,08*	0,12	5,24±0,05	0,08
7,4	2,00±0,07*	0,07	5,74±0,05	0,10
7,8	2,99±0,07*	0,06	4,61±0,04	0,09
8,2	1,86±0,04*	0,05	9,61±0,08**	0,14
8,6	4,99±0,11	0,09	3,11±0,04**	0,08
9,0	2,99±0,05*	0,08	8,36±0,06**	0,13

Примечание. Образцы крови обрабатывали ЭМП разной частоты *in vitro* в течение 15 мин. Данные представлены: * - $p < 0,05$ в сравнении с контролем – необработанными ЭМП образцами крови доноров 1-й группы; ** - $p < 0,05$ в сравнении с контролем – необработанными ЭМП образцами крови доноров 2-й группы.

IL-1 β принадлежит к группе провоспалительных цитокинов и представляет собой полипептид, имеющий молекулярную массу 15кД. *IL-1 β* , который по большей части производят макрофаги и фагоциты, и в меньшей степени лимфоциты, провоцирует начало и регулирует иммунные реакции, запуская реакции воспалительно-регуляторного каскада, стимулирует синтез коллагена [401]. Влияя на терморегуляцию и синтез гормонов, *IL-1 β* индуцирует синтез белков острой фазы, цитокинов провоспалительного каскада, усиливает уровень экспрессии молекул адгезии на эндотелиоцитах, проявляет антикоагулянтную активность, активируя гемопозз. *IL-1 β* синтезируется кратковременно, а не постоянно, только в ответ на попадание в организм антигена, а выработка его клетками продолжается около 2 суток.

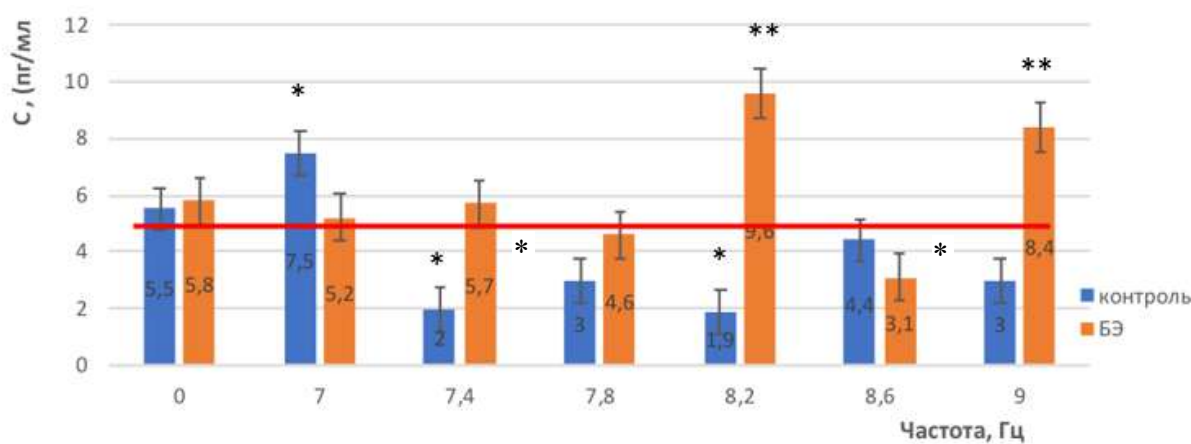


Рисунок 5.13 – Содержание интерлейкина-1 (С) в биопробах доноров 1 группы (синие столбики) и 2 группы (красные столбики) после воздействия ЭМП разными частотами на биообразцы. Напряженность поля (550 ± 20) А/м, время экспозиции 15 мин.

Данные представлены: * - $p < 0,05$ в сравнении с контролем – необработанными ЭМП образцами крови доноров 1-й группы; ** - $p < 0,05$ в сравнении с контролем – необработанными ЭМП образцами крови 2-й группы.

Концентрация *IL-1 β* в крови в норме не превышает 5 пг/мл [401], на рисунке 5.13 обозначена горизонтальной линией. В интактных образцах доноров 1-й группы этот показатель оставался в границах референсных значений и составлял в среднем 5,2 пг/мл. Незначительное превышение нормы наблюдалось лишь при воздействии ЭМП частотой 7 Гц и достигало ($7,49 \pm 0,08$) пг/мл. Изменение частоты ЭМП оказывало скорее супрессивный эффект, не приводя к превышению уровня референсного интервала. Это свидетельствует об устойчивости данного биохимического параметра доноров 1-й группы к действию НЧ ЭМП.

У доноров 2-й группы до воздействия ЭМП уровень концентрации *IL-1 β* в сыворотке крови был сопоставим с этим показателем группы здоровых лиц и находился в пределах нормы – ($5,84 \pm 0,09$) пг/мл. Воздействие поля частотой от 7 до 7,4 и 7,8 Гц не влияло на этот параметр, однако действие ЭМП частотой 8,2 и 9 Гц приводило к достоверному увеличению концентрации метаболита до ($9,61 \pm 0,08$) и ($8,36 \pm 0,06$) пг/мл соответственно ($p < 0,05$). Это свидетельствует о том, что окислительный стресс доноров 2-й группы снижает устойчивость

иммунной системы к действию ЭМП и эффект воздействия аналогичен провоспалительному. Таким образом, если исходные концентрации *IL-1 β* в двух группах доноров были сопоставимы, то действие ЭМП на кровь доноров разных групп изменяло характер его выработки.

Таблица 5.6 – Концентрации *IL-6* в сыворотке крови доноров до и после воздействия ЭМП на образцы крови, n = 5.

Частота, Гц	Доноры 1-й группы		Доноры 2-й группы	
	Сил-6, пг/мл	Опт. пл.	Сил-6, пг/мл	Опт. пл.
без обработки (контроль)	6,6 ± 4,9	0,109	666,1 ± 10,0	0,248
7,0	13,1 ± 3,1	0,124	256,5 ± 7,1**	0,162
7,4	18,8 ± 5,9	0,137	161,7 ± 6,1**	0,131
7,8	45,3 ± 2,0*	0,198	253,0 ± 8,1**	0,152
8,2	67,0 ± 4,0*	0,248	600,9 ± 9,1	0,232
8,6	257,5 ± 8,1*	0,686	179,1 ± 8,1**	0,135
9,0	21,0 ± 2,1*	0,142	296,5 ± 9,4**	0,162

Примечание. Образцы крови обрабатывали ЭМП с разными частотами *in vitro* в течение 15 мин. Данные представлены: * - $p < 0,05$ в сравнении с контролем – необработанными ЭМП образцами крови доноров 1-й группы; ** - $p < 0,05$ в сравнении с контролем – необработанными ЭМП образцами крови доноров 2-й группы.

IL-6 представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 21–28 кДа. Это плеiotропный цитокин различного биологического действия, продуцируемый как лимфоидными, так и нелимфоидными клетками, обычно классифицируется как провоспалительный цитокин, но его функции до сих пор полностью не изучены. *IL-6* синтезируется под влиянием попадающих в организм вирусов, бактерий и их продуктов, являясь ранним индуцибельным цитокином, обладает дуальной природой воздействия на направление и исход иммунного ответа. Праймируя клетки врожденного иммунитета, данный цитокин участвует в активации и пролиферации В-лимфоцитов, потенцируя таким образом антителогенез. Обладая

как про-, так и противовоспалительной функцией, *IL-6* способен переводить острое воспаление в хроническое. Хотя роль *IL-6* в противовирусной защите организма до конца не ясна, он, несомненно, играет центральную роль в неспецифическом противовирусном иммунитете наряду с *TNF- α* и *IL-1 β* [401 – 402].

Повышенный уровень *IL-6* наблюдается при многих патологических состояниях, его количественное определение имеет большое значение в оценке иммунного статуса организма. Референсным интервалом для *IL-6* является диапазон 0 - 300 пг/мл. Полученные нами значения концентрации *IL-6* в 1-й группе доноров ($6,6 \pm 4,9$) пг/мл находились в пределах референсных значений как в интактных пробах, так и при воздействии ЭМП различной частоты.

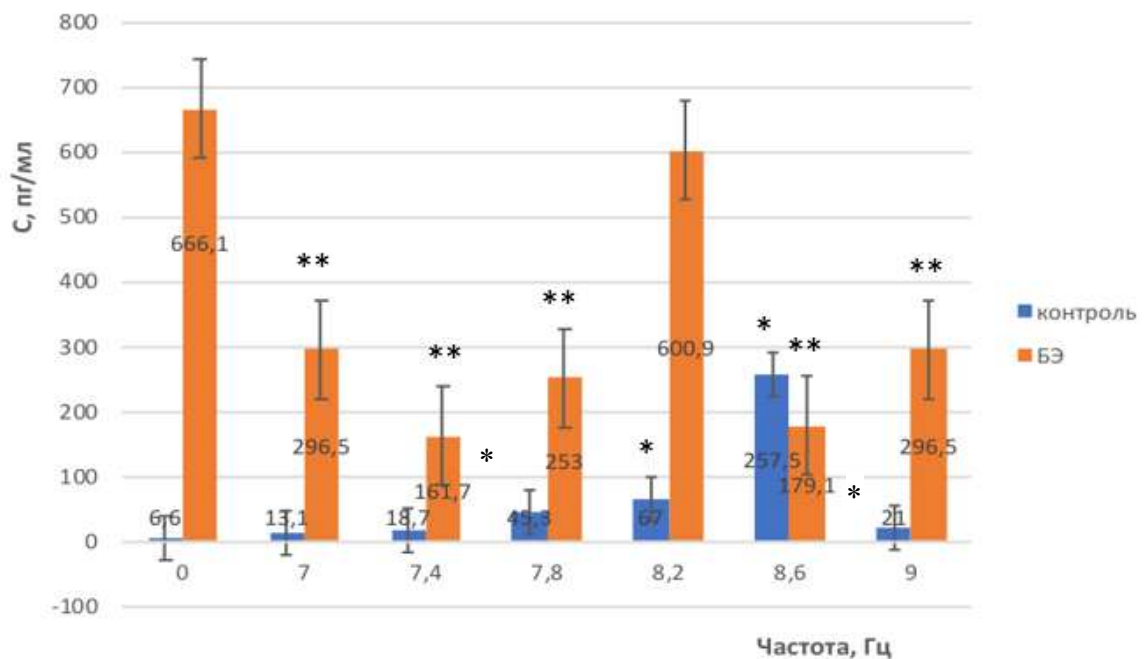


Рисунок 5.14 – Содержание интерлейкина-6 (C) в биопробах 1 группы (синие столбики) и 2 группы (красные столбики) доноров после воздействия ЭМП разными частотами на биообразцы. Напряженность поля (550 ± 20) А/м, время экспозиции 15 мин.

Данные представлены: * - $p < 0,05$ в сравнении с контролем – необработанными ЭМП образцами крови здоровых доноров 1-й группы; ** - $p < 0,05$ в сравнении с контролем - необработанными ЭМП образцами крови доноров 2-й группы.

Из данных таблицы 5.6 и рисунка 5.14 видно, что концентрации *IL-6* в сыворотке крови заметно изменялись в зависимости от частоты воздействующего

ЭМП. Максимальное увеличение этого показателя у доноров 1-й группы достигало $(257,5 \pm 8,1)$ пг/мл при воздействии поля частотой 8,6 Гц. Выявлена гиперпродукция *IL-6* в сыворотке крови доноров 2-й группы. По сравнению с донорами 1-й группы содержание этого цитокина было увеличено более чем в 100 раз и составляло $(666,1 \pm 10,0)$ пг/мл. Это согласуется с данными литературы о существенном увеличении уровня *IL-6* при многих патологических процессах и окислительном стрессе.

Изучение влияния НЧ ЭМП на данную экспериментальную модель показало, что воздействие поля определенными частотами приводит к регрессии уровня *IL-6* в крови больных до пределов нормы. Так, действие поля частотой 7,0 Гц приводило к снижению содержания *IL-6* до $(256,5 \pm 7,1)$ нг/мл; частотой 7,4 Гц до $(161,7 \pm 6,1)$ нг/мл; частотой 7,8 Гц до $(253,0 \pm 8,1)$ нг/мл; частотой 8,6 до $(179,1 \pm 8,1)$ нг/мл ($p < 0,05$). Сопоставимые с воздействием патологического процесса значения концентрации *IL-6* ($600,9 \pm 9,1$ пг/мл) сохранялись лишь при частоте поля 8,2 Гц. Полученные результаты согласуются с данными, приведенными в работе [403], в которой ЭМП сходных параметров (0,4 мТл, частота 7,5 Гц) подавляло индуцированную опухолью выработку цитокинов, включая *IL-6*.

Фактор некроза опухолей *TNF-α* относится к провоспалительным цитокинам, состоит из длинных вытянутых β-цепей, его молекулярная масса составляет 17 kDa. *TNF-α* проявляет избирательную цитотоксичность в отношении некоторых опухолевых клеток и, как и другие цитокины, является важным низкомолекулярным медиатором межклеточных взаимодействий. Количественное определение уровня *TNF-α* вносит важную составляющую в оценку иммунного ответа [401]. Референсный интервал *TNF-α* составляет от 0 до 12 пг/мл.

Как видно из рисунка 5.15 и данных таблицы 5.7, исходные показатели *TNF-α* в нативных образцах обеих групп оставались в пределах нормы: $(5,20 \pm 0,51)$ нг/мл у 1-й группы и $(4,30 \pm 0,18)$ нг/мл у 2-й группы. Наблюдалось сходство ответной реакции, при которой происходило увеличение продукции *TNF-α* иммунокомпетентными клетками, в обеих группах, хотя в целом воздействие НЧ ЭМП не приводило к выходу параметров за пороговые значения.

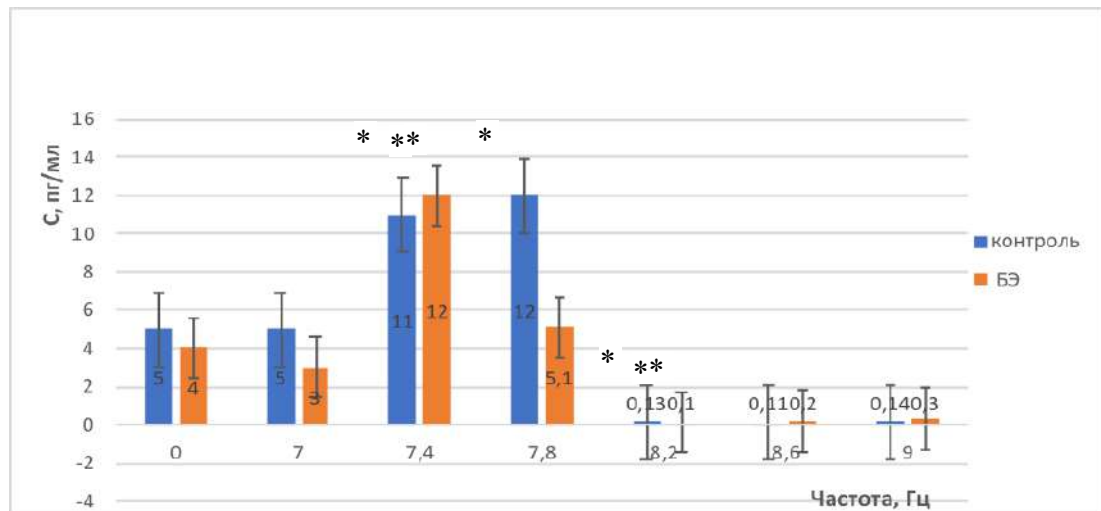


Рисунок 5.15 – Содержание фактора некроза опухоли в биопробах 1 группы (синие столбики) и 2 группы (красные столбик) доноров после воздействия ЭМП разными частотами на биообразцы. Напряженность поля (550 ± 20) А/м, время экспозиции 15 мин.

Данные представлены: * - $p < 0,05$ в сравнении с контролем – необработанными ЭМП образцами крови доноров 1-й группы; ** - $p < 0,05$ в сравнении с контролем - необработанными ЭМП образцами крови.

Таблица 5.7 – Концентрации $TNF-\alpha$ в сыворотке крови доноров до и после воздействия ЭМП на образцы крови, $n = 5$.

Частота, Гц	Доноры 1-й группы		Доноры 2-й группы	
	$C_{TNF-\alpha}$, пг/мл	Опт. пл.	$C_{TNF-\alpha}$, пг/мл	Опт. пл.
без обработки (контроль)	$5,20 \pm 0,51$	0,472	$4,30 \pm 0,48$	0,406
7,0	$4,71 \pm 0,15$	0,436	$3,00 \pm 0,27$	0,311
7,4	$10,83 \pm 0,80^*$	0,883	$11,94 \pm 0,97^{**}$	0,964
7,8	$12,06 \pm 0,90^*$	0,973	$5,09 \pm 0,80$	0,464
8,2	$0,13 \pm 0,08^*$	0,099	$0,10 \pm 0,06^{**}$	0,064
8,6	$0,11 \pm 0,07^*$	0,094	$0,20 \pm 0,09^{**}$	0,119
9,0	$0,14 \pm 0,08^*$	0,101	$0,31 \pm 0,09^{**}$	0,160

Примечание. Образцы крови обрабатывали ЭМП разной частоты *in vitro* в течение 15 мин. Данные представлены: * - $p < 0,05$ в сравнении с контролем – необработанными ЭМП образцами крови здоровых доноров; ** - $p < 0,05$ в сравнении с контролем - необработанными ЭМП образцами крови.

Так, после обработки образцов крови ЭМП частотами 7,4 и 7,8 Гц достоверно повышались ($p < 0,05$) уровни концентрации *TNF- α* в обеих группах, а воздействие полем частотами больше 7,8 Гц приводило к их резкому уменьшению.

Полученные результаты показывают, что в интактных образцах концентрации цитокинов *IL-1 β* и *TNF- α* в обеих группах доноров практически не различались, а концентрации *IL-6* в крови доноров 2-й группы значительно выше, чем у доноров 1-й группы ($p < 0,05$). *IL-6* — провоспалительный цитокин, который в больших количествах синтезируется Th-2-лимфоцитами, моноцитами и макрофагами в ответ на воспалительный процесс и опосредует развитие гуморального иммунитета. Синергически взаимодействуя с *IL-1 β* и *TNF- α* , этот цитокин вызывает гиперпродукцию эпидермального фактора роста и способствует гиперпролиферации эпидермальных клеток. У доноров 2-й группы концентрации *IL-1 β* и *TNF- α* не превышали контрольные значения.

Характер ответа выработки продукции рассматриваемых метаболитов на действие ЭМП разными частотами различен. Высокие концентрации *IL-1 β* и *IL-6*, наблюдаемые после воздействия на образцы крови ЭМП частотами 8,2 Гц и 9,0 Гц, сравнимы с действием патологического процесса, инициирующего воспалительную реакцию. В то же время, после обработки полем частотами 7,4; 7,6 или 8,6 Гц наблюдалось нивелирование гиперпродукции *IL-6* до нормального уровня, а также уменьшение выработки *TNF- α* при частотах поля от 8,2 до 9 Гц в крови доноров 2-й группы.

Авторы работы [404] воздействовали на фибробластоподобные клетки, полученные в жидкой культуре из МНК периферической крови человека, полем с магнитной индукцией 2,25 мТл и частотой 50 Гц, чтобы оценить действие протокола лечения, включающий воздействие НЧ ЭМП. Авторы пришли к выводу, что действие ЭМП выбранными ими параметров вызывает достоверное снижение продукции цитокинов воспалительного типа (*IL-1 β* , *TNF- α*) и увеличение цитокинов лимфоцитарного происхождения (*IL-10*) в супернатанте культуральной среды, не изменяя клеточный иммунофенотип популяции клеток.

Производительность и выживаемость отдельных иммунных клеток находятся под окислительно-восстановительным контролем и зависят от внутриклеточных и внеклеточных уровней АФК. Иммуновоспалительный ответ связан с повышенным оксидантным стрессом. Редокс-изменения во время иммуновоспалительных реакций организованы действиями большого комплекса факторов: ядерного фактора- κB , $\text{NIF1}\alpha$, сигнального пути фосфатидилинозитол 3-киназы/протеинкиназы В, митоген-активируемых протеинкиназ, 5' АМР-активируемой протеинкиназы и рецептора, активируемого пролифератором пероксисом [401]. НЧ ЭМП может влиять на процессы переноса электронов электрон-переносящими комплексами в окислительно-восстановительных реакциях и на образование АФК в клетках и внеклеточном пространстве.

Механизмы, связанные с окислительно-восстановительным процессом, модулируют метаболическое перепрограммирование иммунных клеток, поляризацию макрофагов и Т-хелперных клеток, фагоцитоз, продукцию про- и противовоспалительных цитокинов. Внешние воздействия могут оказывать как праймирующее, так и активирующее действие на иммунокомпетентные клетки. В качестве одного из механизмов прайминга рассматриваются Ca^{2+} -зависимые внутриклеточные реакции, которые приводят к накоплению мембраносвязанных комплексов NAD(P)H -оксидазы и экспрессии рецепторного аппарата [398, 404]. При последующей за праймингом стимуляции клетки отвечают большей продукцией цитокинов и межклеточных медиаторов. Действие ЭМП приводит к генерации малых доз АФК, играющих на клеточном уровне не только повреждающую, но и сигнально-регуляторную роль, связанную с нарушением окислительно-восстановительного гомеостаза. Так, активация сигнального пути Nrf2/ARE , который, являясь важным цитопротекторным механизмом регуляции экспрессии митохондриально-ориентированных антиоксидантных систем в клетке, может подавлять воспалительные процессы за счет блокирования экспрессии ряда провоспалительных факторов, в том числе $\text{IL-1}\beta$.

Таким образом, иммунная система проявляет высокую восприимчивость к воздействию ЭМП в отношении профиля провоспалительных цитокинов. Показана

возможность применения низкоинтенсивного (до 1 мТл) низкочастотного (до 10 Гц) ЭМП в качестве адъюванта и иммуномодулятора. Этот подход может быть использован для положительного влияния на определенные аспекты иммунного ответа и быть полезен для терапевтического применения.

1. При обработке взвеси лимфоцитов СВЧ и КВЧ ЭМП с ПМ 6 мВт/см² происходят структурные повреждения геномного материала в виде накопления окисленных сайтов и однонитевых разрывов ДНК, что необходимо учитывать при применении ЭМП для лизиса клеток и выделения ДНК и других АФИ в фармацевтической химии, а также при использовании СВЧ и КВЧ ЭМП в терапевтических аппаратах в восстановительной медицине и в клинических устройствах для обследования населения при диагностике и скрининге.

2. Использование воды, обедненной дейтерием ddw (*deuterium depleted water*), достоверно ($p < 0,05$) снижает уровень однонитевых разрывов ДНК инкубированных в такой воде лимфоцитов на 35 % по сравнению с лимфоцитами, инкубированными в обычной воде при воздействии СВЧ и КВЧ ЭМП, что связано с активацией систем репарации клеток в результате КИЭ. Вода, обедненная дейтерием ddw, является перспективным протекторным средством при электромагнитном воздействии, что может быть использовано в фармакотерапии и биомедицинских приложениях, применяющих СВЧ и КВЧ ЭМП. Имеется положительный опыт использования ddw в протоколах децеллюризации в тканевой инженерии с целью предотвращения неконтролируемой гибели клеток и при создании биосорбента «Витабиос».

3. Доказана прецизионность методики количественного 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 ($\sigma \pm SD$), относительного доверительного интервала среднего значения ($\sigma \pm \Delta\sigma$) и относительной ошибки среднего (ϵ , %). Методика применима для количественного анализа содержания дейтерия в минеральных и природных водах. Диапазон определяемых концентраций дейтерия составил от 30

до 300 ppm. 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 с требований точности, экспрессности, типом задачи и области использования.

4. При воздействии низкочастотного ЭМП на моноклеарные клетки, выделенные из крови доноров, происходит усиление хемилюминесценции клеток, связанное как с активацией респираторного взрыва за счет образования АФК в моноцитах, в которых имеется NADPH-оксидазный комплекс, так и с появлением во внеклеточной среде некоторых количеств АФК, генерируемых при действии поля.

5. Иммунная система доноров проявляет высокую восприимчивость к НЧ ЭМП в отношении профиля провоспалительных цитокинов. Характер ответа выработки продукции рассматриваемых метаболитов на действие поля разными частотами различен. Высокие концентрации *IL-1 β* и *IL-6*, наблюдаемые после воздействия на образцы крови ЭМП частотами 8,2 Гц и 9,0 Гц, сравнимы с патологическим процессом, инициирующим воспалительную реакцию. После обработки полем частотами 7,0 – 7,8 Гц и 8,6 – 9,0 Гц наблюдалось нивелирование гиперпродукции *IL-6* до нормального уровня, а также достоверное ($p < 0,05$) уменьшение выработки *TNF- α* при частотах поля от 8,2 до 9 Гц. Низкоинтенсивное ЭМП может быть использовано в качестве адъюванта и иммуномодулятора для положительного влияния на определенные аспекты иммунного ответа. Полученные результаты являются практическим вкладом фармацевтической химии в иммунотерапию.

ГЛАВА 6 ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МОДЕЛИ ОБРАЗОВАНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В РАСТВОРАХ АФИ ПРИ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ НА ЖИВЫЕ ОРГАНИЗМЫ

6.1 Чувствительность геномного материала к электромагнитному воздействию

Большое количество публикаций посвящено эпидемиологическим исследованиям генетических повреждений у людей, подвергающихся воздействию ЭМП [84 – 85, 88]. Механизм, объясняющий то, каким образом ЭМП вызывает повреждение геномного материала, предложили М. Бланк и Р. Гудман [43], основываясь на предположении, что такое поле может стимулировать транскрипцию, взаимодействуя с электронами в ДНК, дестабилизируя водородные связи, удерживающие две цепи ДНК вместе. Данный механизм согласуется с низким сродством к электрону оснований в идентифицированных авторами работы [47] последовательностях ДНК - «элементах электромагнитного отклика» (термин авторов), а также с эндогенной и *in vitro* стимуляцией биосинтеза с помощью ЭМП.

Для оценки окислительного стресса и ответа на антиоксидантный стресс авторы статьи [92] исследовали пациентов с гиперчувствительностью к действию ЭМП и определили, что у 80% пациентов с синдромом гиперчувствительности в периферической крови обнаруживается несколько определяемых биомаркеров окислительного стресса: статистически значимое повышение средних значений малонового диальдегида, окисленного глутатиона в плазме по сравнению с нормальными значениями, полученными у здоровых лиц контрольной группы ($P < 0,0001$); статистически значимое повышение средней активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы в эритроцитах.

Мы предположили, что разная чувствительность доноров к электромагнитному воздействию может быть связана с разным полиморфизмом генов системы эксцизионной репарации NER. У человека выделено и описано 11 гликозилаз. Особый путь репарации окислительных повреждений ДНК 8-оксигуанина (8-oxodG) сосредоточен на *8-oxoguanin DNA glycosylase hOGG1* (hOGG1, EC 3.2.2.23), ферменте, который распознает пары окисленный оснований 8-oxodG с цитозином и удаляет поврежденные 8-oxodG вместе с участком сахаро-фосфатного остова. На этом месте образуется одноцепочный разрыв ДНК, а затем образовавшиеся пробелы заполняются неповрежденным материалом.

С целью исследования влияния ЭМП на чувствительность геномного материала проведен анализ полиморфизма гена *8-oxoguanin DNA glycosylase hOGG1* у доноров. В исследовании приняли участие 93 условно здоровых донора, мужчины в возрасте 21–23 года, студенты ВУЗа, по данным анкетирования не имеющие патологий и заболеваний. Материалом для молекулярно-генетического исследования служила геномная ДНК, которую выделяли с использованием готовых коммерческих наборов реактивов, разработанных ООО «Синтол». Реакционную смесь для определения полиморфных вариантов rs1052133 гена *8-oxoguanin DNA glycosylase hOGG1* готовили как указано в главе 2. Режимы работы Rotor-Gene Q при проведении ПЦР для определения полиморфизма Pro332Ala гена *8-oxoguanin DNA glycosylase hOGG1* (температурные, количество циклов, повторы на каждой стадии) приведены в таблице 2.2 главы 2. Пример полученных результатов амплификации образцов из двух групп доноров приведен на рисунке 6.1.

После завершения амплификации анализировали результаты исследования с помощью программного обеспечения Rotor-Gene Q, установив значение пороговой линии 0,1 и выделив области соответствующих генотипов (Define Genotype, Wild Type, Heterozygous, Mutant). Интерпретацию результатов проводили согласно таблице 2.3 (раздел 2.2).

Учитывали фланкирующую последовательность, частоту минорного аллеля G принимали равным 30,21 %, что соответствовало 1000 Genomes.

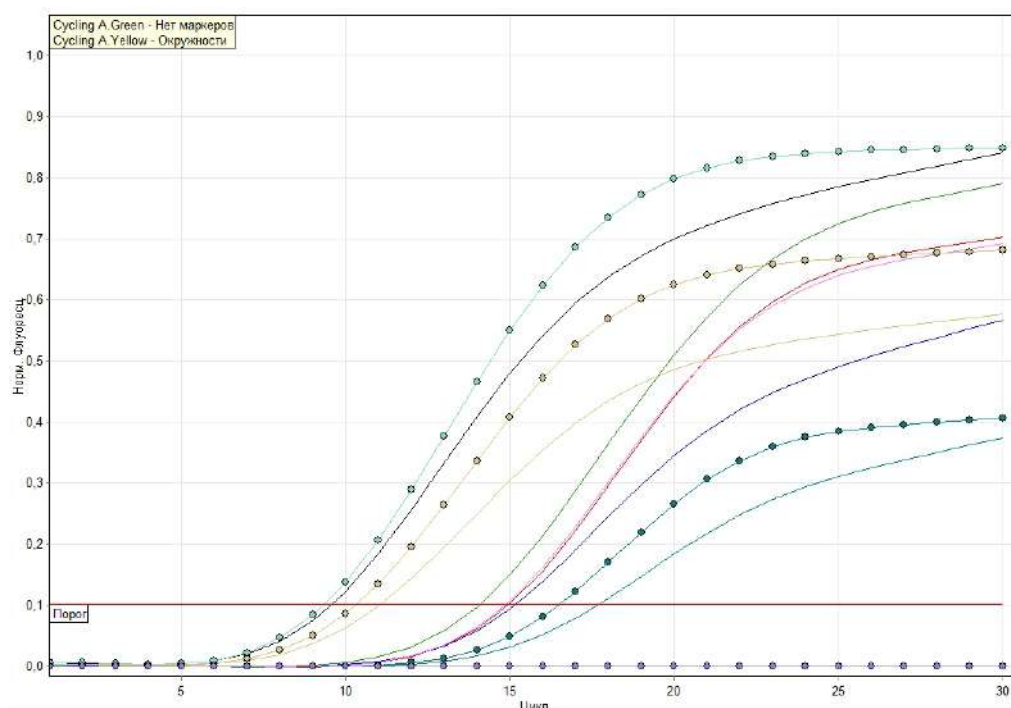


Рисунок 6.1 – Результаты проведения ПЦР геномной ДНК донора из 1-й группы при определении полиморфизма Pro332Ala гена hOGG1 (режимы ПЦР приведены в главе 2).

Распределение генотипов локуса rs1052133 гена hOGG1 приведены в таблице 6.1. Из данных, представленных в таблице 6.1, видно, что в контрольной группе условно здоровых доноров преобладающим является генотип C/C – 68 человек, что составляет 73%. На долю генотипа C/G – приходится 25% (23 человека), генотипа G/G – 2% (2 человека). По частоте аллеля C отличия между двумя группами были незначительны: этот показатель в первой группе составлял 0,94, во второй - 0,83. Частота аллеля G во второй группе доноров составляла 0,15, что было достоверно выше, чем в первой группе, у которых частота данного аллеля составила 0,05 ($p < 0,05$). Сравнения соотношения частот аллелей оценивали по уравнению Харди-Вайнберга.

По результатам ПЦР-анализа доноры были разделены на две группы: имеющие C/C генотип hOGG1 (68 человек) – 1 группа и C/G- и G/G генотипы (25 человек) – 2 группа. С помощью физико-химической модели определили частоты

ЭМП, при которых в водной среде АФИ образуется повышенное содержание пероксида водорода, что может влиять на устойчивость геномного материала.

Таблица 6.1 – Генотипы и частоты аллели полиморфного локуса rs1052133 гена hOGG1 при определении полиморфизма Pro332Ala.

Генотипы, аллели	Группа доноров, n = 93 чел абс, %
CC	68 чел.
	73%
CG	23 чел.
	25%*
GG	2 чел.
	2%
C	0,85
G	0,15

*df=2; $\chi^2=8.898$ Критическое значение χ^2 при $p=0.05$ -5.991 $p<0.05$ Уровень значимости $p=0.012$

Для оценки степени подверженности генетического материала к окислительной модификации в условиях фонового состояния системы про-/антиоксиданты проведены исследования с индукцией окислительного напряжения *in vitro* после воздействия на образцы крови, стабилизированные ЭДТА, синусоидальным ЭМП напряженностью (550±30) А/м, частотами 3, 30 или 50 Гц при температуре 37 °С в термостатируемой кювете и времени экспозиции 30 мин.

Спонтанное окисление остатков гуанина в ДНК приводит к образованию 8-oxodG. Окислительные повреждения геномного материала оценивали по уровню содержания 8-oxodG в ДНК согласно методике, описанной в главе 2.4. Уровни содержания 8-oxodG в ДНК доноров 1-й группы (n = 68) и 2-й группы (n = 25) до и

после обработки образцов крови ЭМП частотами 3, 30 и 50 Гц *in vitro* приведены на рисунке 6.2.

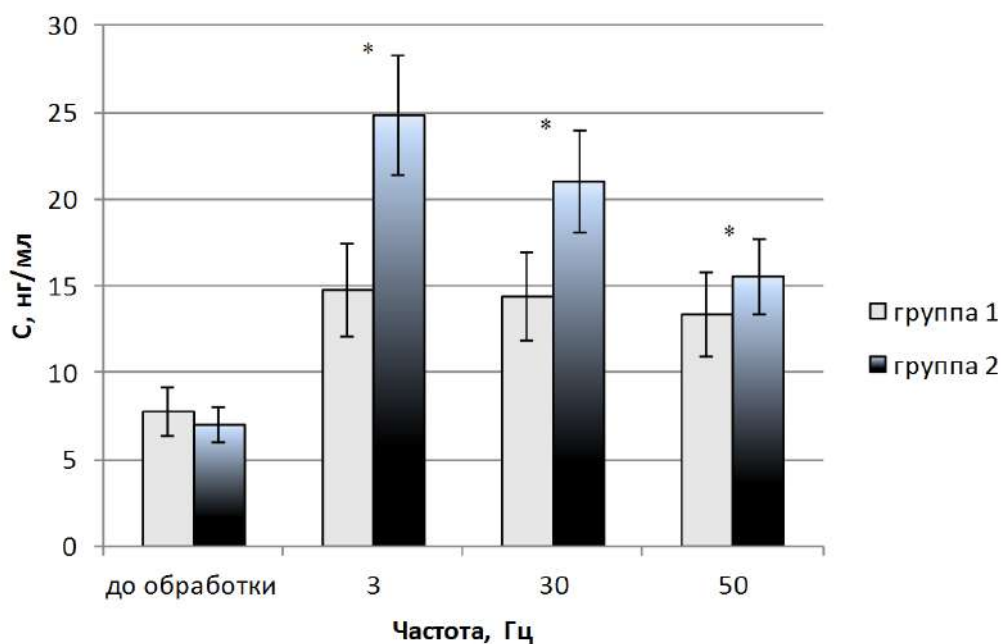


Рисунок 6.2 – Уровни содержания 8-oxodG в ДНК крови доноров 1 группы (C/C-полиморфизм гена hOGG1) (n = 68) и 2-й группы (C/G- и G/G-полиморфизмы гена hOGG1) (n = 25) после обработки образцов крови ЭМП *in vitro*. Напряженность ЭМП (550±20) А/м, частоты 3, 30 и 50 Гц, 37 °С, время экспозиции – 30 мин.

Примечание: * – статистически значимые различия в сравнении с контрольными образцами крови при $p < 0,05$. Контрольные образцы крови обеих групп выдерживали в экранированной камере в течение 30 мин в условиях, максимально приближенных к эксперименту, но без обработки ЭМП.

В контрольных образцах без воздействия НЧ ЭМП содержание 8-oxodG в ДНК составляло: для 1-й группы (7,4±1,9) нг/мл, для 2-й группы (6,3±1,5) нг/мл. После обработки образцов ЭМП с частотами 3, 30 и 50 Гц наблюдали достоверное повышение уровней содержания 8-oxodG в ДНК для обеих групп по сравнению с необработанными ЭМП образцами крови ($p < 0,05$). Так, после воздействия ЭМП частотой 3 Гц уровень 8-oxodG в 1-й группе достигал (14,8±2,2) нг/мл, а во 2-й группе - (24,9±2,8) нг/мл.

Воздействие полем частотой 30 Гц приводило к увеличению уровня данного параметра в 1-й группе до $(14,1 \pm 2,1)$ нг/мл, во 2-й группе до $(22,0 \pm 2,6)$ нг/мл. После воздействия полем частотой 50 Гц на образцы крови доноров уровень изучаемого показателя был сопоставим для обеих групп ($p < 0,05$). Полученные результаты указывают на максимальную модификационную подверженность к окислительной модификации ДНК в условиях нормально функционирующей системы антиоксидантной защиты доноров 2-й группы.

Таким образом, к воздействию НЧ ЭМП более чувствительны доноры с C/G- и G/G- полиморфизмом гена *8-oxoguanin DNA glycosylase hOGG1*, в то время как доноры с C/C-полиморфизмом данного гена проявляют меньшую восприимчивость к действию поля.

В клетках человека ген hOGG1 расположен на коротком плече хромосомы 3 (3p25/26). В процессе транскрипции из него синтезируются две формы митохондриальной РНК, кодирующие белки, α -hOGG1 и β -hOGG1, которые состоят из 345 и 424 аминокислот соответственно. При этом α -hOGG1 расположен в ядрах, а β -hOGG1 – в митохондриях, т.е. в непосредственной близости от основных источников продукции АФК. В статье [405] приводится рентгеновская структура каталитического ядра hOGG1, связанного с ДНК, которая объясняет механистическую основу для распознавания и каталитического удаления повреждений ДНК hOGG1 и другими членами суперсемейства гликозилаз.

Гликозилаза hOGG1 присоединяется к 8-oxodG-содержащей цепи ДНК достаточно крепко, чему способствуют большое количество α -спиралей, n-концы которых в образующемся комплексе направлены в сторону ДНК. В ходе репарации окисленное основание 8-oxodG «выворачивается» из спирали ДНК и помещается в карман активного центра фермента.

Обнаружение окисленного гуанина в активном центре комплекса hOGG1–ДНК происходит за счет образования контактов между азотистым основанием и аминокислотными остатками гликозилазы, при этом 8-oxodG связывается с карбонилем аминокислотного остатка Gly42 фермента с помощью водородной связи. Взаимодействие hOGG1 с фосфатными группами 8-oxodG-содержащей цепи

ДНК, поврежденным основанием 8-oxodG и цитозином создает общую площадь контакта 2,268 Å².

На рисунке 6.3 приведена структура образуемого комплекса фермента hOGG1 с молекулой ДНК согласно работе [406].

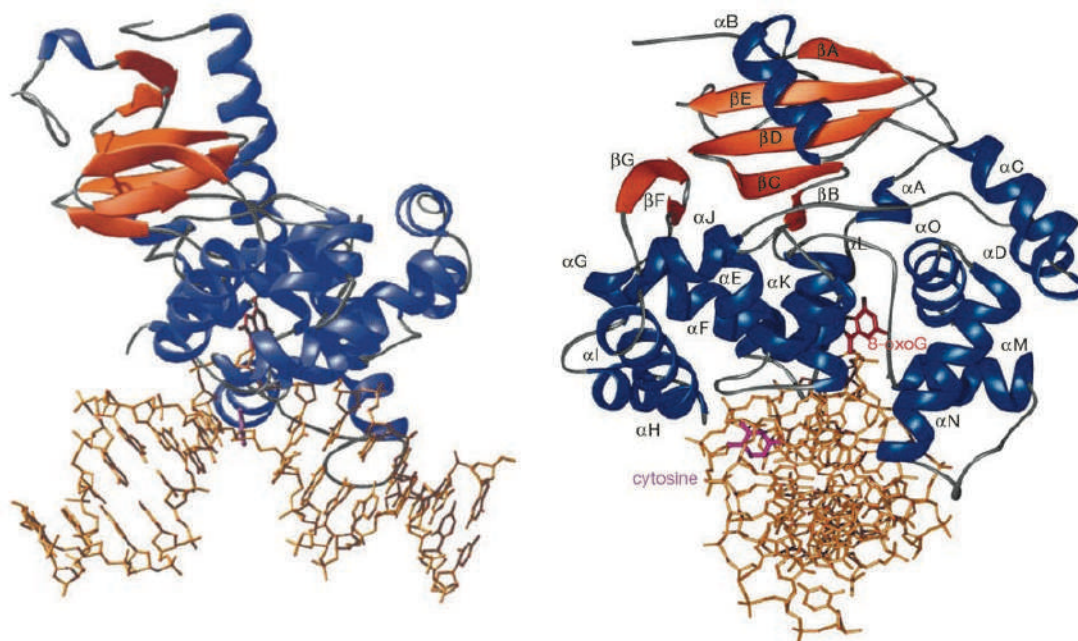


Рисунок 6.3 – Структура образуемого комплекса фермента hOGG1 с молекулой ДНК [406].

В активном центре фермента происходит образование специфических контактов между поврежденным азотистым основанием ДНК и аминокислотными остатками белка. Атомы фрагмента 8-oxodG образуют уникальную водородную связь с карбонилем аминокислотного остатка Gly42 фермента. Изменение остатка Gly42, который образует специфический контакт с 8-oxodG, на остаток аланина при образовании формы hOGG1 G42A препятствует связыванию 8-oxodG в области поверхности контакта ДНК с ферментом. Замена атома водорода при α-углеродном атоме аминокислотного остатка Gly42 на гораздо более объемную метильную группу аланина G42A приводит к значительным стерическим затруднениям при связывании 8-oxodG в активном центре фермента.

Выявленный нами C/G- и G/G-полиморфизмы *8-oxoguanin DNA glycosylase hOGG1 (rs1052133)* приводит к образованию ферментов репарации, в которых аминокислотный остаток Gly42 частично заменен остатком аланина (форма hOGG1 G42A). Это может препятствовать достижению оптимального конформационного состояния для атаки со стороны других гликозилаз при удалении окисленного гуанина, что приводит к сильному падению каталитической эффективности фермента hOGG1 и к накоплению 8-oxodG в ДНК доноров с C/G- и G/G-полиморфизмами гликозилазы hOGG1.

Действие ЭМП вызывает окислительный стресс, поэтому различия между формами hOGG1, содержащими G42A или Gly42, и их способностями удалять окисленные сайты, становятся критичными. Накопление 8-oxodG в ДНК, происходящее при воздействии ЭМП, может приводить к появлению новых мутаций, в целом ослабляющих процессы эксцизионной регенерации.

Другим критическим регулятором экспрессии ключевых генераторов и поглотителей АФК, который играет важную роль в ответе на окислительный стресс, является сигнальный путь Nrf2/ARE (ядерный фактор E2-родственный фактор 2/элемент антиоксидантного ответа). Ген фермента hOGG1 содержит ARE, показана положительная корреляция между экспрессией сигнального пути Nrf2 и hOGG1 [381].

Эндогенные повреждения ДНК, постоянно присутствующие в клетках, часто возникают в результате гидролитических реакций, а также воздействия образующихся АФК. Для изучения электромагнитного влияния на имеющийся в организме окислительный стресс в качестве эндогенного фактора выбран буллезный эпидермолиз (БЭ). БЭ – клинически и генетически гетерогенная группа орфанных заболеваний, которая характеризуется склонностью к образованию булл (волдырей) на коже и слизистых оболочках пищевода, кишечника и органов дыхания. Эрозивно-язвенные дефекты могут сохраняться на коже от одного месяца до нескольких лет, являясь предрасполагающим к онкотрансформации фактором и формированию плоскоклеточного рака кожи. Последнее является основной причиной преждевременной смерти больных [407 – 411]. Заболевание обусловлено

1500 мутациями более чем в восемнадцати различных генах структурных белков дермо-эпидермального соединения (KRT5 и KRT14, LAMB3, LAMA3, LAMC2, COL17A1 и др.), причем одна форма может быть связана сразу с несколькими генами [409]. Распространенность БЭ во всем мире оценивается в 8–10 случаев на миллион новорожденных [407]. БЭ относят к мультифакториальным орфанным заболеваниям, возникающих в результате взаимодействия неблагоприятных факторов наследственной природы факторов окружающей среды.

Окислительное повреждение ДНК оценивали по уровню содержания 8-oxodG ДНК у 6 больных БЭ, не имеющих сопутствующих заболеваний, мужчин одинакового возраста (20 – 23 года) и региона проживания (г. Краснодар) и здоровых доноров. У здоровых доноров и больных БЭ имелся С/С-полиморфизм гена *8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы hOGG1*. Определение 8-oxodG в ДНК, расчеты и статистическую обработку проводили по методике, указанной в главе 2. Уровни содержания 8-oxodG в ДНК здоровых и больных БЭ доноров приведены на рисунке 6.4.

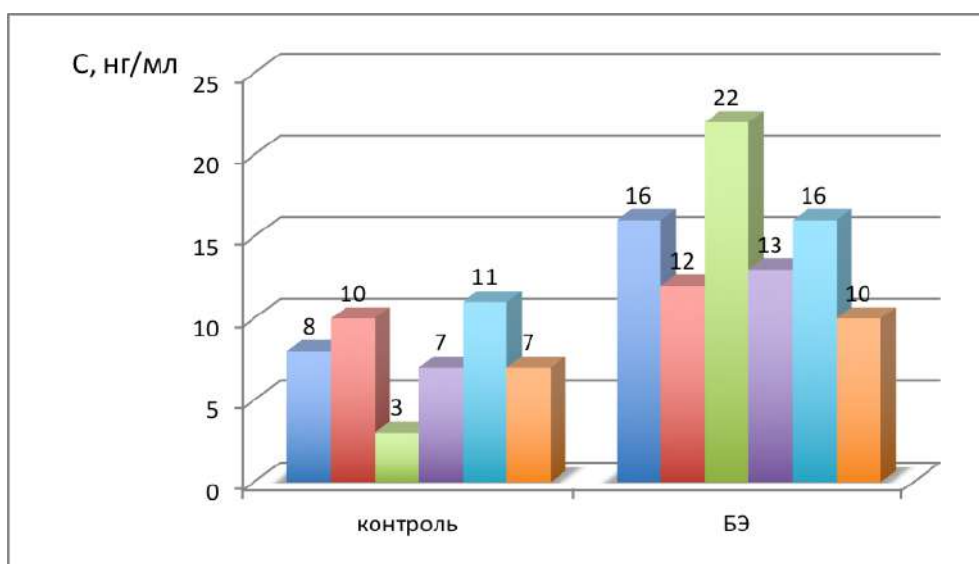


Рисунок 6.4 – Содержание 8-oxodG в ДНК здоровых (группа сравнения) и больных буллезным эпидермолизом доноров ($U_{\text{эмп}} = 1,5$; $U_{\text{критическое}} = 3$ при $p < 0,01$; $U_{\text{критическое}} = 7$ при $p < 0,05$).

В контрольной группе здоровых доноров уровень содержания 8-oxodG ДНК варьировался от 5,1 до 9,0 нг/мл, в среднем составляя $(7,5 \pm 1,9)$ нг/мл. В группе больных этот параметр изменялся от 10,0 до 22,2 нг/мл и в среднем составлял $(14,8 \pm 2,1)$ нг/мл. Это свидетельствует о том, что степень окислительного повреждения ДНК при БЭ почти в два раза выше по сравнению со здоровыми лицами. Критерий Манна-Уитни $U=1,5$ свидетельствовал о малой зоне перекрещивающихся значений между двумя выборками и достоверности выявленных отличий ($p < 0,01$).

Наблюдаемая в случае БЭ дестабилизация генома, связанная с образованием окислительных повреждений ДНК, происходит в результате оксидативного генотоксического стресса [412]. Последний может проявиться в результате активации реакций свободно-радикального окисления и сбоя систем антиоксидантной защиты. Доступность некоторых азотистых оснований для окисления АФК *in vivo* связана с упаковкой молекулы ДНК (конденсацией). Основным биологическим последствием образования 8-oxoG является мутагенез. Окисленный гуанин может комплементарно соединяться как с цитозином, так и с аденином, при этом формируется стабильная неканоническая Хогстинова пара oxoG-A. В следующем цикле репликации происходит мутация по типу трансверсии $G/C \rightarrow T/A$, частой соматической мутации человека [413].

Повышенное содержание 8-oxodG в ДНК больных является биологическим маркером физиологического неблагополучия в организме. Ретроспективное исследование выявило высокую долю больных (26,4%), у которых диагноз не включает конкретную форму заболевания. Это связано с недостаточно эффективными методами диагностики генетически детерминированного заболевания. Увеличение содержания 8-oxodG в ДНК больных БЭ свидетельствует о нарушении структуры молекулы ДНК и значительном окислительном ее повреждении при этой патологии [410 – 411].

Таким образом, обнаруженное нами повышение уровня окислительных повреждений ДНК при БЭ может внести определенный вклад в этиологию и патогенез этого социально значимого заболевания.

Для определения устойчивости геномного материала к окислительной модификации в условиях окислительной нагрузки образцы цельной крови больных БЭ обрабатывали НЧ ЭМП. Степень окислительного повреждения ДНК периферической крови здоровых доноров и больных БЭ после воздействия ЭМП в диапазоне частот от 3 до 60 Гц *in vitro* оценивали с помощью определения уровня 8-oxodG в ДНК. Эффективное значение напряженности поля в месте нахождения образцов составляло (550 ± 20) А/м. Задавали начальную частоту поля и проводили обработку образцов в течение 30 мин. Затем измеряли содержание 8-oxodG в ДНК.

Уровни концентрации 8-oxodG в ДНК крови здоровых лиц (группа сравнения) и больных БЭ до и после обработки ЭМП частотами 3, 30 и 50 Гц приведены на рисунке 6.5.

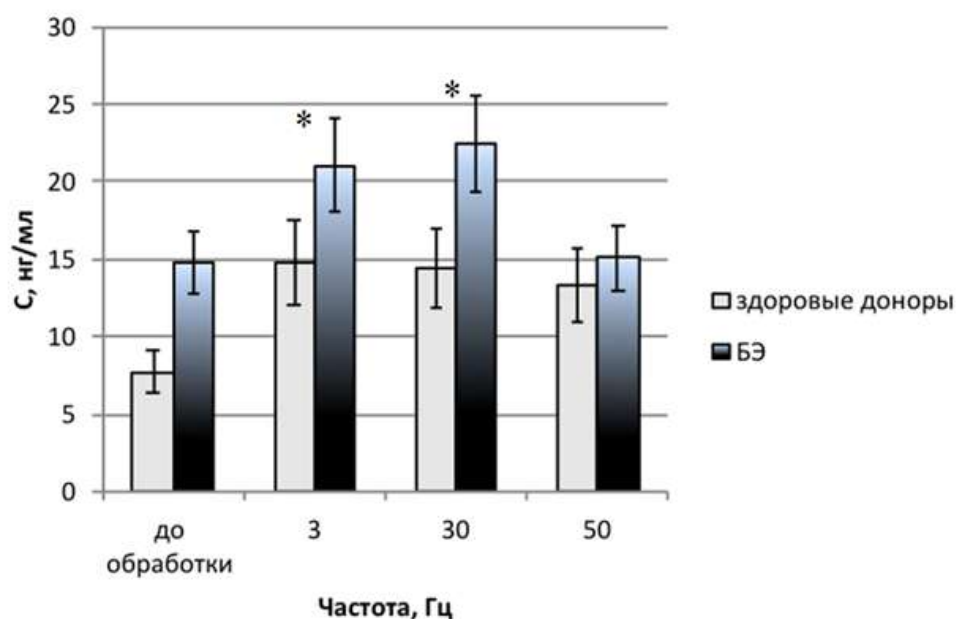


Рисунок 6.5 – Уровни концентрации 8-oxodG в ДНК крови здоровых доноров и больных буллезным эпидермолизом после обработки ЭМП. Напряженность поля (550 ± 20) А/м, частоты 3, 30 и 50 Гц, 37 °С, время экспозиции 30 мин.

Примечание: * - статистически значимые различия в сравнении с контролем при $p < 0,05$. Контрольные образцы обеих групп выдерживали в экранированной камере в течение 30 мин в условиях, максимально приближенных к эксперименту, без обработки ЭМП.

Контролем служили образцы крови обеих групп, не подвергавшиеся обработке ЭМП. В группе здоровых доноров уровень содержания 8-oxodG в ДНК составлял $(7,7 \pm 1,4)$ нг/мл, в группе больных достигал $(14,8 \pm 2,1)$ нг/мл.

После обработки образцов крови ЭМП частотами 3 и 30 Гц наблюдали достоверное повышение уровней содержания 8-oxodG в ДНК крови для обеих групп по сравнению с контролем ($p < 0,05$). После обработки ЭМП образцов крови больных БЭ частотой 50 Гц уровень изучаемого метаболита составил в среднем $(15,0 \pm 1,6)$ нг/мл, что было сопоставимо с контролем ($p < 0,05$).

Как известно [414], спаривание оснований между комплементарными цепями и укладка между соседними основаниями определяют стабильность двойной спирали ДНК. Двукратное увеличение содержания 8-oxodG в ДНК больных могло привести к структурным изменениям спирали, состоящей из практически жестких колец оснований с несколькими протон-донорными и протон-акцепторными центрами и конформационно-лабильным сахарофосфатным остовом со многими степенями свободы [414 – 415]. При увеличении содержания 8-oxodG возможно изменение конформации ДНК за счет изменения торсионных углов сахарофосфатного остова из-за увеличения массы окисленных азотистых оснований или нарушения стэкинга оснований [415], что приводит к большей уязвимости оснований к окислению. Изменения количества 8-oxodG в ДНК крови как здоровых доноров, так и больных БЭ при действии НЧ ЭМП не могут быть вызваны депуринизацией модифицированных оснований, поскольку эта модификация приводит не к ослаблению, а к увеличению стабильности гликозидная связь.

Известно, что гуанин в ДНК обладает самым низким окислительно-восстановительным потенциалом среди природных оснований [416] и наиболее подвержен окислению. Как донор электронов он способен отдавать свой электрон различным акцепторам, генерируя радикал 8-гидроксидигидрогуанил ($dG^{\bullet}$), который может превращаться в 8-oxodG через O_2 - опосредованное одноэлектронное окисление. Возможно дальнейшее окисление 8-oxodG до таких продуктов, как оксазолон и гуанидиногидантоин.

Образование 8-oxodG в ДНК может происходить и в ходе реакции окисления гуанина синглетным кислородом. $^1\text{O}_2$ как электрофил реагирует со многими богатыми электронами биомолекулами, включая ДНК, но из всех пиримидиновых и пуриновых оснований ДНК только гуанин чувствителен к синглетному кислороду, о чем свидетельствует высокая константа скорости химического тушения $^1\text{O}_2$ гуанином ($5,4 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [417]. Процесс, инициирующий формирование 8-oxodG, состоит в присоединении $^1\text{O}_2$ по реакции типа Дильса–Альдера к имидазольному кольцу гуанина с образованием 4,8-эндопероксида гуанина с его реорганизацией в 8-гидропероксигуанин и последующей конверсией этого первичного нестабильного продукта в 8-oxodG [417 – 418].

В биологических образцах время жизни синглетного кислорода невелико - от 0,2 для цитоплазмы до 1 μs для плазмы крови и 0,05 μs для мембраны эритроцитов, коэффициент диффузии колеблется от $4 \cdot 10^{-6}$ до $7 \cdot 10^{-7} \text{cm}^2\text{s}^{-1}$ по данным А. А. Красновского и Д. Н. Буториной [419]. Но этого короткого времени достаточно, чтобы инициировать быстро протекающие в водной среде процессы: восстановление синглетного кислорода до супероксидного анион-радикала, протонированная форма которого дисмутирует с образованием самой долгоживущей АФК – пероксида водорода.

Увеличение доли окисленных оснований в ДНК (8-oxodG/8-OHdG) здоровых доноров и, еще более значительное в ДНК больных БЭ, является маркером появления АФК в клетках и межклеточной жидкости и может быть связано с генерацией АФК под действием ЭМП. В работах [398, 417 – 418] утверждается, что основной мишенью воздействия ЭМП на живые клетки, является кислород, растворенный в водной среде. В частности, авторами статьи [398] показана зависимость величины эффекта действия ЭМП на суспензии нейтрофилов мышей, а именно, изменение внутриклеточной продукции АФК, от концентрации молекулярного кислорода в среде.

В хромосомах ДНК-связывающие белки защищают ее от окислительного повреждения, что обусловлено как компактной упаковкой молекулы ДНК, так и

взаимодействием белковых молекул с образующимися АФК. Однако, долгоживущие белковые радикалы являются источниками длительного образования АФК, медиаторами окислительного стресса в биологических объектах и способны переносить радикальные повреждения на ДНК. Так, образующиеся пероксид водорода и гидропероксидные радикалы гистона H1 индуцируют образование 8-oxodG в ДНК [416].

Таким образом, АФК, образующиеся при воздействии на образцы крови НЧ ЭМП, могут окислять молекулу ДНК и приводить к образованию 8-oxodG. Накопление окислительных повреждений 8-oxodG в ДНК крови доноров после воздействия ЭМП *in vitro* может свидетельствовать о генерации АФК в биологических средах при воздействии поля и об участии АФК в повреждении ДНК. Действие НЧ ЭМП усиливает уже имеющийся окислительный стресс у больных с тяжелым эпигенетическим нарушением – БЭ.

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

Гено- и цитотоксические эффекты НЧ ЭМП с магнитной индукцией 0,7 мТл могут быть следствием появления окислительного стресса. Для изучения интенсивности свободнорадикального окисления при электромагнитном воздействии с помощью физико-химической модели выбраны частоты и напряженность электромагнитного поля, воздействующего на крыс *in vivo*.

В эксперименте использовали крыс-самцов линии Wistar. Крысы случайным образом были распределены на отдельные группы: № 1 (контрольная, не подвергнутая воздействию ЭМП, 10 особей) и 10 групп крыс, по 5 особей каждая,

на которые воздействовали полем с 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). Выбор нескольких частот был сделан для того, чтобы убедиться, является ли биоэффект общим.

Для электромагнитной обработки животных использовали комплекс, описание которого приведено в главе 2. Обработку НЧ ЭМП проводили при комнатной температуре в течение 15 минут в режиме непрерывной генерации сигнала на выбранной частоте. Каждое животное помещали в определенной отсек клетки из плексигласа. Размеры клетки были сделаны в соответствии с размером животного таким образом, чтобы перемещение крыс оставалось ограниченным, и каждое животное обрабатывалось ЭМП равномерно. Напряженность поля в месте нахождения животных составляла (550 ± 20) А/м.

Кровь для биохимических исследований собирали путем декапитации крыс, после введения 1 мл водного раствора ЭДТА с концентрацией 7,5%. Биохимические измерения плазмы крови включали определение активности антиоксидантных ферментов: каталазы, супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГП); содержание сульфгидрильных групп (SH-групп) по методикам, описанным в главе 2. Уровень перекисей липидов в плазме крови крыс определяли с использованием готовых коммерческих наборов, описанных в главе 2, на микропланшетном фотометре Multiskan FC (Thermo Scientific, США).

На рисунке 6.6 приведена гистограмма, показывающая зависимость содержания перекисей липидов от частоты воздействующего на крыс ЭМП. Результаты исследований показали, что концентрация перекисей липидов в плазме крови крыс контрольной группы № 1 не превышала $(0,041 \pm 0,005)$ ммоль/л. Наиболее существенные увеличения содержания перекисей липидов по сравнению с контрольной группой наблюдались у групп крыс №3; №4 и №7, которых обрабатывали ЭМП частотами 5, 8 и 24 Гц соответственно ($p < 0,05$).

Воздействие полем частотами 3, 16, 30 и 60 Гц (группы № 2; 5; 8 и 11) не приводило к достоверному изменению концентрации перекисей липидов в плазме

крови крыс. Действие ЭМП частотами 48 и 50 Гц (группы № 9 и 10) достоверно снижало уровень этого показателя по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

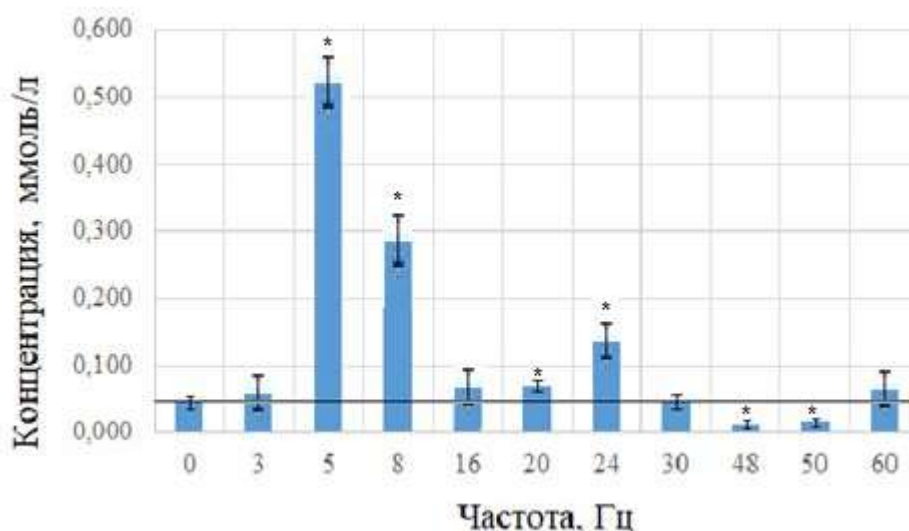


Рисунок 6.6 – Содержание перекисей липидов в плазме крови крыс после обработки ЭМП напряженностью (550 ± 20) А/м разной частоты.

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

Для оценки состояния антиоксидантной системы крыс определяли активности антиоксидантных ферментов плазмы крови: СОД, каталазы, глутатионпероксидазы. Результаты приведены в таблице 6.2.

Исследование параметров антиоксидантной системы крыс после воздействия ЭМП показало, что в плазме крови крыс групп №4; №8 и № 10, которые обрабатывали полем частотами 8, 30 и 50 Гц, наблюдалось достоверное повышение, а у крыс группы №3 угнетение активности СОД по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Это согласуется с результатами, приведенными в работе [78], в которой авторы подвергали крыс воздействию *in vivo* переменным ЭМП напряженностью 0,5 мТл и частотой 50 Гц и обнаружили, что действие поля

достоверно ($p < 0,05$) увеличило активность СОД и концентрацию малонового диальдегида.

Таблица 6.2 – Показатели активностей антиоксидантных ферментов и содержание сульфгидрильных групп в плазме крови крыс после воздействия *in vivo* ЭМП напряженностью (550 ± 20) А/м разной частоты.

№ группы	Частота ЭМП, Гц	Активность каталазы, мМоль/ мин*л	Активность глутатион-пероксидазы, мкМоль/ мин*л	Активность СОД, % инг.	Содержание SH-групп, е.о.п.
1 (n=10)	Без обработки ЭМП	258 ± 40	$2,89 \pm 0,10$	$50,0 \pm 0,9$	$0,34 \pm 0,07$
2 (n=5)	3	$365 \pm 43^*$	$2,74 \pm 0,15$	$49,8 \pm 0,9$	$0,31 \pm 0,03$
3 (n=5)	5	$411 \pm 40^*$	$2,70 \pm 0,12$	$38,5 \pm 1,3^*$	$0,35 \pm 0,06$
4 (n=5)	8	$89 \pm 25^*$	$2,69 \pm 0,10$	$56,8 \pm 0,7^*$	$0,26 \pm 0,05$
5 (n=5)	16	$373 \pm 30^*$	$2,60 \pm 0,09^*$	$50,5 \pm 0,8$	-
6 (n=5)	20	$163 \pm 20^*$	$2,80 \pm 0,10$	$51,5 \pm 3,7$	-
8 (n=5)	30	189 ± 30	$2,75 \pm 0,05$	$55,8 \pm 0,9^*$	$0,71 \pm 0,08^*$
10 (n=5)	50	$139 \pm 40^*$	$1,98 \pm 0,09^*$	$57,9 \pm 0,9^*$	-

Примечание. * - различия достоверны при $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой крыс без обработки ЭМП. Показатели измеряли после обработки групп крыс ЭМП с соответствующей частотой. Время экспозиции 15 мин.

Изменение активности антиоксидантных ферментов также может быть связано с изменением уровней экспрессии некоторых генов при воздействии ЭМП. Так, авторы работы [399] отмечают, что ЭМП аналогичного спектрального состава с частотами 8–18 Гц, напряженностью 0,5 мТл и временем воздействия 5–30 мин изменяло экспрессию некоторых генов белков антиоксидантной защита, в том числе СОД, при воздействии на клеточную линию MCF-7 человека.

Активность каталазы повышалась после обработки крыс групп № 2; № 3 и № 5 полем частотами 3, 5 и 16 Гц и снижалась в группах № 4; № 6 и № 10 после обработки полем частотами 8, 20 и 50 Гц соответственно ($p < 0,05$). Активности глутатионпероксидазы в плазме крови контрольной группы крыс и групп,

подвергшихся воздействию ЭМП, были соизмеримы по величине, их значения мало отличались друг от друга, незначительное достоверное уменьшение активности наблюдалось в плазме крови крыс групп №5 и № 10, которые обрабатывались полем частотами 16 и 50 Гц ($p < 0,05$). Содержание сульфгидрильных групп в плазме крови крыс группы № 8 достоверно увеличивался в 2 раза после обработки полем частотой 30 Гц по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Увеличение содержания перекисей липидов в крови крыс после действия НЧ ЭМП частотой 8 Гц, по-видимому, связано со значительным снижением ($p < 0,05$) активности каталазы при данной частоте поля, нейтрализующей пероксид водорода. Наибольшее увеличение концентрации перекисей липидов в плазме крови наблюдалось после обработки группы крыс ЭМП частотой 5 Гц, у этой же группы активность СОД уменьшалась по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Активности антиоксидантных ферментов и содержания перекисей липидов в крови крыс нелинейно зависели от частоты ЭМП, которым обрабатывали животных. Полученные результаты согласуются с выводами авторов многих экспериментальных работ, описывающих биологические эффекты ЭМП, в которых отмечается наличие, так называемых, «окон эффективности», связанных с немонотонными зависимостями магнитобиологических эффектов от параметров ЭМП и «частотной селективностью», проявляемую живым организмами.

Мы полагаем, что небольшие изменения в окислительно-восстановительных реакциях образования АФК, вносимые ЭМП, накапливаются и, благодаря интегрированию в биохимическую систему клетки и организма, вызывают эффекты на уровне изменения активностей антиоксидантных ферментов [420]. Повышение активности антиоксидантных ферментов при действии ЭМП определенными частотами свидетельствует об индукции окислительного стресса под влиянием ЭМП. Основываясь на литературных данных и полученных результатах, мы полагаем, что воздействие НЧ ЭМП способно вызывать такую индукцию посредством изменения уровня АФК, которые являются промежуточными звеньями в естественных процессах, таких как

митохондриальный метаболизм, а также являются ключевой особенностью фагоцитоза.

Роль антиоксидантных ферментов заключается не только в сведении к минимуму содержания АФК в клетке, но и касается более тонкой функции регулирования уровня АФК в соответствии с изменением внешних условий. В последнее время, помимо широко используемого подхода ограничения уровня АФК, стали использовать методы активной тренировки антиоксидантной системы за счет индукции умеренной генерации АФК. Так, разработчиками магнитотерапевтических комплексов – «Магнитотурботрона Алма» и «Бутон» Лобкаевой Е.П., Коноплянниковым А.Г. и др. показано, что действие НЧ ЭМП определенными частотами на лабораторных животных (крыс или мышей) приводит к снижению уровня перекисного окисления липидов и повышению пролиферативной и функциональной активности клеточных элементов кроветворной системы [421]. Воздействия ЭМП, приводящие к генерации АФК и в больших дозах вызывающие различные нарушения, в малых дозах могут оказывать стимулирующее влияние на живые организмы и приводить к активации тирозинкиназного пути клеточного ответа в процессе генерации метаболической энергии.

1. Разработанная физико-химическая модель образования АФК в водно-солевых растворах АФИ применена для экспериментального исследования эффектов электромагнитного воздействия на живые организмы с целью изучения возможности ее практического использования в биомедицинских приложениях.

2. Подобраны параметры воздействующего *in vitro* ЭМП, при которых в образцах крови доноров могут образовываться повышенные количества активных форм кислорода. Установлено, что при воздействии ЭМП частотами 3 и 30 Гц *in vitro* на образцы крови доноров с C/G- и G/G- полиморфизмом гена *8-oxoguanin DNA glycosylase hOGG1* образуется в среднем на 35 – 40 % больше окислительных повреждений азотистых оснований 8-oxodG ДНК, чем в ДНК доноров с C/C- полиморфизмом данного гена ($p < 0,05$).

3. Для выяснения закономерностей инициации повреждений геномной ДНК и оценки вклада НЧ ЭМП в поддержание уже имеющегося окислительного стресса у больных социально значимым заболеванием (буллезным эпидермолизом) определено содержание окислительных повреждений 8-oxodG в ДНК здоровых и больных доноров до и после воздействия на образцы крови ЭМП *in vitro*. Анализ характера спонтанных нарушений генома при данной патологии позволяет заключить, что эти повреждения носят эндогенный характер, т.е. индуцируются АФК, возникающими вследствие нарушения метаболических процессов. После электромагнитной обработки образцов крови наблюдается достоверное повышение ($p < 0,05$) по сравнению с образцами без воздействия поля уровня содержания 8-oxodG в ДНК доноров, зависящее от частоты поля. Показано, что действии ЭМП частотами 3 и 30 Гц способствует дополнительному образованию и накоплению окисленных сайтов 8-oxodG в ДНК больных ($p < 0,05$) и усилению окислительного стресса.

4. Установлено, что в плазме крови крыс-самцов линии Wistar при воздействии ЭМП в диапазоне частот от 3 до 60 Гц *in vivo* происходит достоверное ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (без электромагнитного воздействия) изменение содержания перекисей липидов и активностей антиоксидантных ферментов.

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 накопление окислительных и структурных повреждений ДНК; 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 односторонних 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 и 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 одонитевых 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 одонитевых 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

АОС – антиоксидантная система

АФА – активные формы азота

АФК (ROS) – активные формы кислорода (Reactive oxygen species)

АЦП – аналого-цифровой преобразователь

БЭ – буллезный эпидермолиз (Epidermolysis bullosa)

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖНВЛП - жизненно необходимые и важнейшие лекарственные препараты

ИК-диапазон – инфракрасный диапазон

ИФА – иммуноферментный анализ

КВЧ – крайне высокие частоты

КИЭ - кинетический изотопный эффект

ЛП – лекарственный препарат

ЛС – лекарственное средство

ЛСР – лантаноидный сдвигающий реагент

МП – магнитное поле

МСК - мезенхимальные стволовые клетки

МК – микроконтроллер

МНК – моноклеарные клетки

НЧ – низкие частоты

ОР – односторонние разрывы

ОС – открытые состояния

ОФС – общая фармакопейная статья

ПК – персональный компьютер

ПМ – плотность мощности

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ППР – поверхностный плазмонный резонанс
РНК - рибонуклеиновая кислота
СВЧ – сверхвысокие частоты
УМ – усилитель мощности
ЧСА - человеческий сывороточный альбумин
ХЛ – хемилюменисценция
ЦАП – цифро-аналоговый преобразователь
ЭМП – электромагнитное поле
ЭСК – эпидермальные стволовые клетки
ЯМР – ядерный магнитный резонанс
AgNPs - наночастицы серебра
ARE – элемент антиоксидантного ответа
BER – (base excision repair) – базовая эксцизионная репарация
Dld – дигидролипоилдегидрогеназа
DHON – дигидрооротатдегидрогеназа
ESCODD – European Standards Committee on Oxidative DNA Damage –
Европейский комитет стандартов по окислительным повреждениям ДНК
ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay
IL-6 – интерлейкин-6
IL-1 – интерлейкин-1
HL-60 – клеточная линия миелобластов человека
Jurkat – Т-клеточная линия белых клеток крови лейкоз человека,
KGDHC – α -кетоглутаратдегидрогеназа
K-562 – клеточная линия лимфобластов человека
MCF7 – клеточная линия инвазивной карциномы молочной железы
MCF10A - клеточная линия эпителий молочной железы,
NER – эксцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair)
Nrf2 – ядерный фактор E2-родственный фактор 2
IRMS – метод масс-спектрометрии изотопных отношений
ОН-группы – гидроксильные группы

SH-группы – сульфгидрильные группы

SLAP – Standard Light Antarctic Precipitation – стандарт введенный МАГАТЭ, соответствующий воде из Антарктики и характеризующий самую лёгкую природную воду на Земле

TNF- α – фактор некроза опухолей

Tyr – тирозин

Trp – триптофан

VSMOW – Vienna Standard Mean Ocean Water – стандарт введенный МАГАТЭ, соответствующий изотопному составу глубинной воды Мирового океана

8-oxodG – 8-оксо-7,8-дигидрогуанин

ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты проведенных исследований в области изучения свойств водных растворов активных фармацевтических ингредиентов и живых клеток при внешних электромагнитных воздействиях 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 и валидированной методики количественного определения содержания дейтерия (^2H) в воде и водных растворах природного происхождения, лабораторного и промышленного производства, содержащих биологически активные или фармацевтические ингредиенты, с использованием ЯМР-спектроскопии и применением в качестве внешнего стандарта лантаноидного сдвигающего реагента, и биологических объектах; 2) Программ для ЭВМ расчета параметров электромагнитного поля, генерирующего активные формы кислорода в водных растворах АФИ; 3) Измерительного комплекса автоматизированной обработки НЧ ЭМП и исследования физико-химических характеристик водных растворов АФИ и живых систем в зависимости от параметров ЭМП.

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_a, 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_a № 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 Федерального государственного бюджетного учреждения науки «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. doi.org/10.14300/mnnc.2015.10067

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. DOI: 10.18454/IRJ.2016.44.103

4. **Текуцкая, Е.Е.** Скрининг однонитевых разрывов ДНК лимфоцитов периферической крови человека при действии внешних факторов / **Е.Е. Текуцкая**, Р.В. Василиади // Экология Человека. – 2017. №.12. – С. 9 – 14. doi:10.33396/1728-0869-2017-12-9-14

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. doi:10.1007/s11018-017-1247-7

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. doi: 10.21687/0233-528X-2018-52-1-56-61

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. eISSN: 2304-3415
doi:10.15275/rusomj.2019.0202.

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. DOI: 10.1088/1755-1315/853/1/012007

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. Malyshko // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2022. – V. 172. № 5. – P. 566 – 570. DOI: 10.1007/s10517-022-05434-1

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. Malyshko, M.G. Baryshev, S.S. Dzhimak // Frontiers in Bioscience – Landmark. – 2023. – V. 28, № 10. – P. 252. doi.org/10.31083/j.fbl2810252

11. Kozin, S. Study of the Magnesium Comenate 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. doi: 10.3390/ijms24098046.

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. doi.org/10.3390/biomedicines12081648

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. doi.org/10.31083/j.fb12906218

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, **Е. Tekutskaya**, S. Dzhimak, M. Drobotenko // *Frontiers in Bioscience – Landmark*. – **2024**. – V. 29, № 11. – P. 381. doi.org/10.31083/j.fbl2911381

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. DOI: 10.21687/0233-528X-2025-59-4-74-82

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. ISSN: 1609-2163

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. ISSN: 1028-7221

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. ISSN: 1028-7221

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. DOI: 10.25207/1608-6228-2020-27-5-88-99

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. DOI: 10.25207/1608-6228-2022-29-3-62-75

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. DOI: 10.17223/00213411/66/6/3

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. ISSN: 2304-4691

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. DOI: 10.29039/rusjbpc.2022.0496

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. ISSN: 2499-9717

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. ISSN: 2499-9717

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 спектрометрией / 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.

Учебно-методические пособия

35. **Текуцкая Е.Е.**, Джимаков С.С., Долгов М.А. Методы исследования био- и наноструктур. Учебное пособие. Краснодар: Изд-во КубГУ. 2013. 64 с.

36. Сибирякова М.А., **Текуцкая Е.Е.**, Миронов В.Л. Химия пищевых и биологически активных добавок. Учебно-методическое пособие. Краснодар: Изд-во ИнЭП, 2008. – 190 с.

37. Джимаков С.С. Ильченко Г.П., **Текуцкая Е.Е.**, Копытов Г.Ф. Экологические аспекты взаимодействия электромагнитного поля с биологическими системами. Учебное пособие. Краснодар: Изд-во КубГУ, 2017. – 68 с.

38. Джимаков С.С. Ильченко Г.П., **Текуцкая Е.Е.**, Радиоэлектронные устройства для исследования влияния низкочастотного магнитного поля на биологические системы. Учебное пособие. Краснодар: Изд-во КубГУ, 2017. – 35 с.

39. Ильченко Г.П., **Текуцкая Е.Е.** Радиоэлектронные устройства для исследования влияния низкочастотного магнитного поля на биологические системы. Учебное пособие. Краснодар: Изд-во КубГУ, 2021. – 48 с.

40. **Текуцкая Е.Е.**, Ильченко Г.П., Бузько В.Ю., Иванин С.Н., Соколов М.Е. Влияние электромагнитного поля на биологические системы. Радиофизические методы защиты. Учебное пособие. Краснодар: Изд-во КубГУ, 2023. – 88 с.

41. **Текуцкая Е.Е.**, Корочанская Н.В., Онищенко Н.П., Бендер Л.В., Софьина Л.И. Детоксикационные аспекты реабилитации больных с патологией пищеварительной системы – ликвидаторов аварии на ЧАЭС. Пособие для врачей. Краснодар: Изд-во «Советская Кубань» – 2000. 22 с.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lingvay, D. Electromagnetic Pollution and its Effects on Living Matter / D. Lingvay, A. Gabriel Bors, A.-M. Bors // *Electrotehnică, Electronică, Automatică*. – 2018. – V. 66, №2. – С. 5 – 11
2. Sarimov, R.M. Biological Effects of Magnetic Storms and ELF Magnetic Fields / R.M. Sarimov, D.A. Serov, S.V. Gudkov // *Biology*. – 2023. – V.12. – P. 1506. <https://doi.org/10.3390/biology12121506>
3. Greenebaum, B. Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields. Bioengineering and Biophysical Aspects of Electromagnetic Fields / Edited by B. Greenebaum, F. Barnes – CRC: Press, 2019. – 465p.
4. Колесник, А.Г. Электромагнитный фон городских территорий диапазона промышленных частот / А.Г. Колесник, С.А. Колесник, А.С. Бородин, Е.Л. Шошин, М.А. Федичев // *Вестник Томского государственного университета*. – 2007. – Т. 297. – С. 161 –164
5. Рубцова Н.Б., Пальцев Ю.П., Походзей Л.В., Перов С.Ю. Современные проблемы совершенствования гигиенического нормирования и контроля электромагнитных полей // В сборнике: Современные проблемы медицины труда Материалы всероссийской научно-практической конференции, посвященной 80-летию академика РАН Н.Х. Амирова. – 2019. – С. 160–162.
6. Schuermann, D. Manmade Electromagnetic Fields and Oxidative Stress—Biological Effects and Consequences for Health / D. Schuermann, M. Mevissen, // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22. – P. 3772.
7. Perov, S.Y. The prospects for radiofrequency electromagnetic fields control approaches improvement under 5G wireless communication technologies introduction / S.Y. Perov, O.V. Belaya, N.B. Rubtsova // *Russ. J. Occup. Health Ind. Ecol.* – 2022. – V. 62. – P. 388–396. doi.org/10.31089/1026-9428-2022-62-6-388-39

8. Misek, J. Extremely low frequency magnetic fields emitted by cell phones / J. Misek, J. Jakus, H. K. Sladicekova, L. Zastko, M. Veternik, V. Jakusova, I. Belyaev // Front. In Phys. – 2023. – V. 11. – P. 47. <https://doi.org/10.3389/fphy.2023.1094921>
9. Бецкий, О.В. Биологические эффекты низкоинтенсивных миллиметровых волн / О.В. Бецкий, Н.Н. Лебедева // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2015. – Т. 1. – С. 31 – 47.
10. Gopalakrishnan, K. Applications of Microwaves in Medicine Leveraging Artificial Intelligence: Future Perspective / K. Gopalakrishnan, A. Adhikari, N. Pallipamu, et al. // Electronics. – 2023. – V.12. – P. 1101. <https://doi.org/10.3390/electronics12051101>
11. Gartshore, A. Applications of microwave energy in medicine / A. Gartshore, M. Kidd, L.T. Joshi // Biosensors. – 2021. – V. 11. – P. 96.
12. Origlia, C. Review of microwave near-field sensing and imaging devices in medical applications / C. Origlia, D.O. Rodriguez-Duarte, J.A. Tobon Vasquez, J.C. Bolomey, F. Vipiana // Sensors. – 2024. – V. 24, №14. – P.4515. doi: 10.3390/s24144515.
13. Lobyshev, V.I. Water as a sensor of weak impacts on biological systems // Biophysical Reviews. – 2023. – V. 15. – P. 819–832.
14. Бункин, Н.Ф. Бабстонная структура воды и водных растворов электролитов / Н.Ф. Бункин, Ф.В. Бункин // Успехи физических наук. – 2016. – Т. 186, №9. – С. 933 – 952.
15. Бункин, Н.Ф. Исследование бабстонно-кластерной структуры воды и водных растворов электролитов методами лазерной диагностики / Н.Ф. Бункин, А.В. Шкирин // Труды ИОФАН. – 2013. – Т. 69. – С. 3 – 57.
16. Шаталов В.М., Филиппов А.Э., Нога И.В. Пузырьковая природа флуктуаций некоторых свойств водных растворов // Биофизика. – 2012. – Т. 57, № 4. – С. 565 – 572.
17. Беловолова, Л.В. Активные формы кислорода в водных средах (обзор) / Л.В. Беловолова // Оптика и спектроскопия. – 2020. – Т. 128, №7. – С. 923 – 942.
18. Беловолова, Л.В. Влияние растворенных газов на сильно разбавленные водные среды / Л.В. Беловолова, М.В. Глушков, Е.А. Виноградов // Биофизика. – 2014. – Т.59, №4. – С. 641 – 648.

- 19.Мирошников, А.И. Механизмы образования и биологическая роль перекиси водорода в электрохимически активированных растворах / А.И. Мирошников, С.В. Гудков, В.И. Брусков // Вода. Химия и Экология. – 2008. – Т.3. – С. 31 – 35.
- 20.Харт, Э.Д. Гидратированный электрон / Пер. с англ. В.И. Быковой, С.А. Кабакчи; под ред. д-ра хим. наук, проф. А.К. Пикаева. – Москва: Атомиздат, 1973. – 280 с.
- 21.Herbert, J. M. Structure of the Aqueous Electron // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2019. – V. 21, № 37. – P. 20538 – 20565. doi: 10.1039/c9cp04222a.
- 22.Sarimov, R.M. Laser interferometry of the hydrolytic changes in protein solutions: the refractive index and hydration shell / R.M. Sarimov, T.A. Matveyeva, V.N. Binhi // *Journal of Biological Physics.* – 2018. – P. 345 – 360.
- 23.Бинги, В.Н. О квантовой природе магнитных явлений в биологии / В.Н. Бинги, А.Б. Рубин // *Физика биологии и медицины.* – 2023. – Т. 1. – С. 44 – 73.
- 24.Villarini, M. Hsp70 expression and DNA damage in mice exposed to extremely low frequency magnetic fields: a doseresponse study / M. Villarini, M. Ambrosini, M. Moretti, et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2013. – V. 89. – P. 62–570 doi:10.3109/09553002.2013.78244
- 25.Budziosz, J. Effects of low-frequency electromagnetic field on oxidative stress in selected structures of the central nervous system oxidative medicine and cellular longevity / J. Budziosz, A. Stanek, A. Sieroń, J. Witkoś, A. Cholewka, K. Sieroń // *Oxid. Med. Cell.* – 2018. – V.8. – Article ID 1427412. doi.org/10.1155/2018/1427412
- 26.Megha, K. Low intensity microwave radiation inductive stress, inflammatory response and DNA damage in rat brain / K. Megha, P.S. Deshmukh, B.D. Banerjee, A.K. Tripathi, R. Ahmed, M.P. Abegaonkar // *Neurotoxicology.* – 2015. – V.51. – P. 158-65. doi: 10.1016/j.neuro.2015.10.009.
- 27.Petrov, G.V. Controlling the Quality of Nanodrugs According to Their New Property – Radiothermal Emission / G.V. Petrov, D.A. Galkina, A.M. Koldina, T.V. Grebennikova, O.V. Eliseeva, Y.Yu. Chernoyzh, V.V. Lebedeva, A.V. Syroeshkin // *Pharmaceutics.* – 2024. – V. 16. – N 2. – P. 180. DOI: 10.3390/pharmaceutics16020180

28. Jimenez, H. Use of non-ionizing electromagnetic fields for the treatment of cancer / H. Jimenez, C. Blackman, G. Laser, W. Dubinski, M. Chen, S. Sharma, K. Watanabe, H.W. Lo, A. Thomas, D. Godwin, W. Blackstock, A. Mudry, J. Posey, R. O'Connor, I. Brezovich, K. Bonin, D. Kim-Shapiro, A. Barbault, B. Pasche // *Frontiers in Bioscience – Landmark*. – 2018. – V. 23, №2. – P. 284–297. doi: 10.2741/4591.
29. Haseli, R. Synergistic anticancer effects of crocin combined with deuterium-depleted water on HT-29 cells / R. Haseli, M. Honarvar, K. Yavari, M. Ghavami // *Anti-Cancer Drugs*. – 2023. – V.34, №10. – P. 1162 - 1170. doi: 10.1097/CAD.0000000000001512.
30. Basov, A. Possible mechanisms of biological effects observed in living systems during $^2\text{H}/^1\text{H}$ isotope fractionation and deuterium interactions with other biogenic isotopes / A. Basov, S. Dzhimak, L. Fedulova, et al. // *Molecules*. – 2019. – V. 24, №22. – P. 4101. DOI: 10.3390/molecules24224101
31. Zlatska, A.V. Effect of the deuterium on efficiency and type of adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells *in vitro* / A.V. Zlatska R.G. Vasyliiev, I.M. Gordiienko, A.E. Rodnichenko, M.A. Morozova, M.A. Vulf, D.O. Zubov, S.N. Novikova, L.S. Litvinova, T.V. Grebennikova, I.A. Zlatskiy, A.V. Syroeshkin // *Scientific Reports*. – 2020. – V. 10, №1. – P.5217. DOI: 10.1038/s41598-020-61983-3
32. Сыроешкин, А.В. Влияние дейтерия на свойства фармацевтических субстанций (обзор) / А.В. Сыроешкин, Т.Е. Елизарова, Т.В. Плетенёва, Е.В. Успенская, О.В. Левицкая, И.А. Злацкий, Т.В. Максимова // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2020. – Т. 9, №2. – С. 24 – 32.
33. Syroeshkin, A.V. D/H control of chemical kinetics in water solutions under low deuterium concentrations / A.V. Syroeshkin, T.V. Pleteneva, E.V. Uspenskaya, I.A. Zlatskiy, N.A. Antipova, T.V. Grebennikova, O.V. Levitskaya // *Chemical Engineering Journal*. – 2019. V. 377. – P. 119827. DOI: 10.1016/j.cej.2018.08.213.
34. Makarova, M. P. Features of the rapid determination of trace elements in medicinal and unofficial plants / M.P. Makarova, A.V. Syroeshkin, T.V. Maksimova, I.S. Matveeva, T.V. Pleteneva // *Development and registration of medicines*. – 2019. – V.

- 8, №2. – P. 93 – 97 (in Russ.).
35. Станишевская, И.С. Наночастицы серебра: получение и применение в медицинских целях / И.С. Станишевская, А.М. Стойнова, А.И. Марахова, Станишевский Я. М. // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – Т.1, №14. – С. 66 – 69.
 36. Shenashen, M.A. Synthesis, morphological control, and properties of silver nanoparticles in potential applications / M.A. Shenashen, S.A. El-Safty, E.A. Elshehy // Part. Part. Syst. Charact. – 2014. – V. 31. – P. 293 – 298.
 37. Tran, Q.H. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives / Q.H. Tran, V.Q. Nguyen, A.-T. Le // Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol. – 2013. – V. 4. – P. 1 – 9.
 38. Liu, J. Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces / J. Liu, D.A. Sonshine, S. Shervane, R.H. Hurt // ACS Nano. – 2010. – V. 4. – P. 6903 – 6913.
 39. Miclaus, T. Dynamic protein coronas revealed as a modulator of silver nanoparticle sulphidation in vitro / T. Miclaus, C. Beer, J. Chevallier, C. Scavenius, et al. // Nature communications. – 2016. – V.7. – P. 1 – 10. DOI 10.1038/ncomms1177
 40. Wei, L. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications / L. Wei, J. Lu, H. Xu, et al. // Drug. Discov. Today. – 2015. – V. 20. – P. 595.
 41. Marambio-Jones, C. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment / C. Marambio-Jones, E.M. Hoek // J. Nanopart Res. – 2010. – V. 12. – С. 1531–1551 DOI 10.1007/s11051-010-9900-y
 42. Agnihotri, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy / S. Agnihotri, S. Mukherji, S. Mukherji // RSC Adv. – 2014. – V. 4. – P. 3974.
 43. Blank, M. Electromagnetic fields stress living cells / M. Blank, R. Goodman // Pathophysiology. – 2009. – V.16. – P. 71–78.
 44. Кудряшов, Ю.Б. Радиационная биофизика. Сверхнизкочастотные излучения / Ю.Б. Кудряшов, А.Б. Рубин – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2014. – 217 с.
 45. Phillips, J.L. Electromagnetic fields and DNA damage / J.L. Phillips, N.P. Singh, H.

- Lay // Pathophysiology. – 2009. – V.16. – P. 79 – 88.
46. Бинги, В.Н. Парадокс магнитобиологии: анализ и перспективы решения / В.Н. Бинги, В.А. Миляев, Д.С. Чернявский, А.Б. Рубин // Биофизика. – 2006. – Т. 51, № 3. – С. 553 – 5597.
47. Testa, A. Evaluation of genitotoxic effect of low level 50 Hz magnetic fields on human blood cells using different cytogenetic assays / A. Testa, E. Codelli, L. Stronati, et al. // Bioelectromagnetics. – 2004. – V.25, № 8. – P. 613 – 619.
48. Hardell, L. Biological effects from electromagnetic field exposure and public exposure standards / L. Hardell, C. Sage // Biomed Pharmacotherapy. – 2008. – V.62. – P. 104 – 109.
49. Simkó, M. Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses *in vitro*: possible immune cell activation / M. Simkó, M.O. Mattsson // J. Cell Biochem. – 2004. – V.93, №1. – P. 83-92. doi: 10.1002/jcb.20198.
50. Vijayalaxmi, M. Controversial cytogenetic observations in mammalian somatic cells exposed to extremely low frequency electromagnetic radiation: a review and future research recommendations / M. Vijayalaxmi, G. Obe // Bioelectromagnetics. – 2005. – V.26, №5. – P.412-30. doi: 10.1002/bem.20111.
51. Funk, R.H. Electromagnetic effect – from biology to medicine / R.H. Funk, T. Monsees, N. Ozkacar // Prog Histochem Cytochem. – 2009. – V. 43. – P.177 – 264.
52. Nordenson, I. Chromosomal aberrations in human amniotic cells after intermittent exposure to fifty hertz magnetic fields / I. Nordenson, K. Mild, G. Anderson, et al. // Bioelectromagnetics. – 2004. – V.15. – P.293 – 301.
53. Delamaris, J., Effects of pulsed electric fields on DNA of human lymphocytes / J. Delamaris, S. Tsilimigaki, N. Messini-Nicole, E. Zeros, S.M. Paperaxis // Cell Biol. Toxicol. – 2006. – V. 22. – P. 409–415.
54. Ivancsits, S. Cell type-specific genotoxic effects of intermittent extremely low-frequency electromagnetic fields / S. Ivancsits, A. Pilger, E. Diem, O. Jahn, H.W. Rudiger // Mutat. Res. – 2005. – V.583. – P.184–188.
55. Winker R., Ivancsits S., Pilger A., Adlkofer F., Rudiger H.W. Chromosomal damage in human diploid fibroblasts by intermittent exposure to extremely low-frequency

- electromagnetic fields // *Mutat. Res.* – 2005. – V. 585. – P. 43–49.
56. Focke, F. DNA fragmentation in human fibroblasts under extremely low frequency electromagnetic field exposure / F. Focke, D. Schuermann, N. Kuster // *Mutat Res.* – 2010. – V. 683. – P. 74 – 83.
 57. Lai, H. Melatonin, N-tert-butyl-alpha-phenylnitron block 60-Hz magnetic field-induced DNA single and double strand breaks in rat brain cells / H. Lai, N.P. Singh // *J. Pineal. Res.* – 2007. – P.152–162.
 58. Schmitz, C. 50-Hz magnetic field exposure influences DNA repair and mitochondrial DNA synthesis of distinct cell types in brain and kidney of adult mice / C. Schmitz, B. Keller, E.T. Freuding, J. Silny, H. Korr // *Acta Neuropathol. (Berl).* – 2004. – V. 107. – P. 257–264.
 59. Yokus, B. Oxidative DNA damage in rats exposed to extremely low frequency electromagnetic fields / B. Yokus, D.U. Cakir, M.Z. Akdag, C. Sert, N. Mete // *Free Radic. Res.* - 2005. – V. 39. – P. 317–323.
 60. Yokus, B. Extremely low frequency magnetic fields of cause oxidative DNA damage in rats / B. Yokus, M.Z. Akdag, S. Dasdag, D.U. Cakir, M. Kizil // *International Journal of Radiation Biology.* – 2008. – V. 84, №10. – P. 789 –795.
 61. Chernikov, A.V. Oxygen effect at thermal damages of DNA / A.V. Chernikov, S.V. Beeps, I.N. Shtarkman // *Biofizika.* – 2007. – V.52, №2. – P. 244 – 251.
 62. Мартусевич, А.А. Молекулярные и клеточные механизмы действия синглетного кислорода на биосистемы / А.А. Мартусевич, С.П. Перетягин, А.К. Мартусевич // *Современные технологии в медицине.* – 2012. – Т 2. – С. 128 – 134.
 63. Dharmadhikari, A.K. DNA Damage by OH Radicals Produced Using Intense, Ultrashort, Long Wavelength Laser Pulses / A.K. Dharmadhikari, H. Bharambe, J.A. Dharmadhikari // *Physical Review Letters.* – 2014. – V.112. – P.138105.
 64. Barzilai, A. DNA damage responses to oxidative stress / A. Barzilai, K. Yamamoto // *DNA Repair.* – 2004. – V. 3, № 8 – 9. – P. 1109 – 15.
 65. Wolf, F.I. 50 Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance cell proliferation and DNA damage: Possible involvement of a redox mechanisms / F.I. Wolf, A. Torsello, B. Tedesco, S. Fasanella, A. Boninsegna, M. D'Ascenzo, et al. //

- Biochim. Biophys. Acta. – 2005. – V. 1743. – P. 120–129.
66. Jackson, S. P. The DNA-damage response in human biology and disease / S. P. Jackson, I. Bartek // Nature. – 2009. – V. 461, № 7267. – P. 1071 – 1078.
67. Simko, M. Cell type specific redox status is responsible for diverse electromagnetic field effects / M. Simko // Cur. Med. Chem. – 2007. – V. 14. – P. 1142 – 1152.
68. Zwirska-Korczala, K. Effect of extremely low frequency of electromagnetic fields on cell proliferation, antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in 3T3-L1 preadipocytes—an *in vitro* study / K. Zwirska-Korczala, J. Jochem, M. Adamczyk-Sowa, P. Sowa, R. Polaniak, E. Birkner, M. Latocha, K. Pilc, R. Suchanek // J. Physiol. Pharmacol. – 2005. – V. 56. – P. 101 – 108.
69. Gérard, M. Hydraulic continuity and biological effects of low strength very low frequency electromagnetic waves Case of microbial biofilm / M. Gérard, O. Noamen, G. Evelyne, V. Eric, C. Gilles, H. Marc // Water Res. – 2015. – V. 83. – P. 184-94. doi: 10.1016/j.watres.2015.06.041
70. Focanici-Ciurlica, E. Nucleic acid changes induced by microwave and radiofrequency exposure of animal tissues, Romanian / E. Focanici-Ciurlica, L. Curecheriu, D. Creanga, C. Goiceanu, F.M. Tufescu // Biophysic. – 2007. – Vol. 17, № 2. – P. 109 – 117.
71. Friedman, J. Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies / J. Friedman, S. Kraus, Y. Hauptman, Y. Schiff, R. Seger // Biochem J. – 2007. – P. 405. – P. 559 – 568.
72. Martínez-Sámano, J. Effects of acute electromagnetic field exposure and movement restraint on antioxidant system in liver, heart, kidney and plasma of Wistar rats: a preliminary report / J. Martínez-Sámano, P.V. Torres-Durán, M.A. Juárez-Oropeza, D. Eliás-Vinãs, L. Verdugo-Díaz // Int. J. Radiat. Biol. – 2010. – V. 86. – P. 1088 – 1094. doi:10.3109/ 09553002.2010.501841
73. Sanie-Jahromi, F. Effect of electromagnetic field, cisplatin and morphine on cytotoxicity and expression levels of DNA repair genes / F. Sanie-Jahromi, M. Saadat // Mol. Biol. Reports. – 2018. – <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4223-7>
74. Sanie-Jahromi, F. Effects of extremely low frequency electromagnetic field and

- cisplatin on mRNA levels of some DNA repair genes / F. Sanie-Jahromi, I. Saadat, M. Saadat // *Life Sci.* – 2016. – V. 166. – P. 41 – 45.
75. Sanie-Jahromi, F. Different profiles of the mRNA levels of DNA repair genes in MCF-7 and SH-SY5Y cells after treatment with combination of cisplatin, 50-Hz electromagnetic field and bleomycin / F. Sanie-Jahromi, M. Saadat // *Biomed. Pharmacother.* – 2017. – V. 94. – P. 564 – 568.
76. Luukkonen, J. Induction of genomic instability, oxidative processes, and mitochondrial activity by 50 Hz magnetic fields in human SH-SY5Y neuroblastoma cells / J. Luukkonen, A. Liimatainen, J. Juutilainen, J. Naarala // *Mutat. Res.* – 2014. – V. 760. – P. 33 – 41.
77. Falone, S. Extremely low-frequency magnetic fields and redox-responsive pathways linked to cancer drug resistance: Insights from coexposure-based in vitro studies / S. Falone, S. Santini, Jr. Cordone, V. Di Emidio, C. Tatone, M. Cacchio, F. Amicarelli // *Front. Public Health.* – 2018. – V. 6. – P. 33 – 47. doi:10.3389/fpubh.2018.00033
78. Rageh, M.M. Assessment of genotoxic and cytotoxic hazards in brain and bone marrow cells of newborn rats exposed to extremely low-frequency magnetic field / M.M. Rageh, R.H. el-Gebaly, N.S. el-Bialy // *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* – 2012. – V. 2012. – P. 7, Article ID 716023
79. Mariucci, G. Brain DNA damage and 70-kDa heat shock protein expression in CD1 mice exposed to extremely low frequency magnetic fields / G. Mariucci, M. Villarini, M. Moretti, E. Taha, C. Conte, A. Minelli, C. Aristei, M. V. Ambrosini // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2010. – V. 86. – P. 701 – 710.
80. Villarini, M. No evidence of DNA damage by co-exposure to extremely low frequency magnetic fields and aluminum on neuroblastoma cell lines / M. Villarini, A. Gambelunghe, D. Giustarini, M. V. Ambrosini, C. Fatigoni // *Mutat. Res.* – 2017. – V. 823. – P. 11 – 21. doi:10.1016/j.mrgentox.2017.09.001
81. Huwller, S.G. Genome-wide transcription analysis of *Escherichia coli* in response to extremely low-frequency magnetic fields / S.G. Huwller, C. Beyer, J. Frohlich, T. Eqli // *Bioelectromagnetics.* – 2012. – V. 33, №6. – P. 488 – 496.
82. Wang, Y. Exposure to a 50 Hz magnetic field at 100 μ T exerts no DNA damage in

- cardiomyocytes / Y. Wang, X. Liu, Y. Zhang, B. Wan, J. Zhang, W. He // *Biology Open*. – 2019. – V.8. – bio041293. – doi:10.1242/bio.041293
83. McNamee, J. P. Evaluating DNA damage in rodent brain after acute 60 Hz magnetic-field exposure / J.P. McNamee, P.V. Bellier, V. Chauhan, G.B. Gajda, E. Lemay, A. Thansandote // *Radiat. Res.* – 2005. – V. 164. – P. 791 – 797. doi:10.1667/RR3465.1
84. Su, L. The effects of 50 Hz magnetic field exposure on DNA damage and cellular functions in various neurogenic cells / L. Su, A. Yimaer, X. Wei, Z. Xu, G. Chen // *J. Radiat. Res.* – 2017. – V. 58. – P. 474 – 486. doi:10.1093/jrr/rrx012
85. Maes, A. Genetic damage in humans exposed to extremely low-frequency electromagnetic fields / A. Maes, L. Verschaeve // *Arch. Toxicol.* – 2016. – V. 90. – P. 2337 – 2348. DOI 10.1007/s00204-016-1769-9
86. Zhu, K. Extremely low frequency magnetic fields do not induce DNA damage in human lens epithelial cells *in vitro* / K. Zhu, Y. Li, Q. Cheng, J. Hua, Q. Zeng // *Anat. Rec.* – 2016. – V. 299. – P. 688 – 697. doi:10.1002/ar.23312
87. Fei, Y. The effects of 50 Hz magnetic field-exposed cell culture medium on cellular functions in FL cells / Y. Fei, L. Su, H. Lou, C. Zhao, Y. Wang, G. Chen // *Journal of Radiation Research.* – 2019. – V. 60, №. 4. – P. 424 – 431 doi: 10.1093/jrr/rrz020
88. Duan, W. Comparison of the genotoxic effects induced by 50 Hz extremely low-frequency electromagnetic fields and 1800 MHz radiofrequency electromagnetic fields in GC-2 Cells / W. Duan, C. Liu, L. Zhang, M. He, S. Xu, C. Chen, H. Pi, P. Gao, Y. Zhang, M. Zhong, Z. Yu, Z. Zhou // *Radiation Research.* – 2015. – V. 183, №3. – P. 305 – 314.
89. Nikolova, T. Electromagnetic fields affect transcript levels of apoptosis - elated genes in embryonic stem cell-derived neural progenitor cells / T. Nikolova // *FASEB J.* – 2005. – V. 19, №12. – P.1686 – 1698.
90. Prato, F.S. Non-thermal extremely low frequency magnetic field effects on opioid related behaviors: Snails to humans, mechanisms to therapy / F.S. Prato // *Bioelectromagnetics.* – 2015. – V. 36, №5. – P. 333 – 348.
91. Saliev, T. Biological effects of non-ionizing electromagnetic fields: Two sides of a coin / T. Saliev, D. Begimbetova, A.-R. Masoud, B. Matkarimov // *Progress in*

- Biophysics and Molecular Biology. – 2018. – V. 141. – P. 25 – 36.
doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.07.009.
- 92.Ro, M. The effects of radiofrequency electromagnetic fields exposure on tinnitus, migraine and non-specific symptoms in the general and working population: A systematic review and meta-analysis on human observational studies / M. Ro, S. Dongus, H. Jalilian, J. Eyers, E. Esu, C.M. Oringanje, M. Meremikwu, X. Bosch-Capblanch // Environment International. – 2024. – V. 183. – P. 108338
 - 93.Irigaray, P. Oxidative stress in electrohypersensitivity self-reporting patients: Results of a prospective *in vivo* investigation with comprehensive molecular analysis / P. Irigaray, D. Caccamo, D. Belpomme // International Journal of Molecular Medicine. – 2018. – V.42. – P.1885 – 1898.
 - 94.Maes, A. Genetic damage in humans exposed to extremely low-frequency electromagnetic fields / A. Maes, L. Verschaeve // Arch. Toxicol. – 2016. – V. 90. – P. 2337 – 2348. DOI 10.1007/s00204-016-1769-9
 - 95.Juutilainen, J. Magnetocarcinogenesis: is there a mechanism for carcinogenic effects of weak magnetic fields? / J. Juutilainen, M. Herrera, J. Luukkonen, J. Naarala, P.J. Hope // Proc. Biol. Sci. – 2018. – V. 285. P. 1879: 20180590. doi: 10.1098/rspb.2018.0590.
 - 96.Kocaman, A. Genotoxic and carcinogenic effects of non-ionizing electromagnetic fields / A. Kocaman, G. Altun, A.A. Kaplan, O.G. Deniz, K.K. Yurt, S. Kaplan // Environ. Res. – 2018. – V. 163, – P. 71 – 79.
 - 97.Panagopoulos, D.J. Comparing DNA Damage Induced by Mobile Telephony and Other Types of Man-Made Electromagnetic Fields / D.J. Panagopoulos // Mutation Research-Reviews in Mutation Research. – 2019. – V. 57. – P. 367 – 380, <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.03.003>
 - 98.Panagopoulos, D.J. Polarization: A Key Difference between Man-Made and Natural Electromagnetic Fields, in regard to Biological Activity / D.J. Panagopoulos, O. Johansson, G.L. Carlo // Scientific Reports. – 2015. – V. 5. – P. 14914. doi: 10.1038/srep14914
 - 99.Panagopoulos, D.J. ELF alternating magnetic field decreases reproduction by DNA

- damage induction / D.J. Panagopoulos, A. Karabarbounis, C. Lioliousis // Cell. Biochem. Biophys. – 2013. – V. 67. – P. 703 – 716.
100. Panagopoulos, D.J. On the biophysical mechanism of sensing atmospheric discharges by living organisms / D.J. Panagopoulos, A. Balmori // Science of the Total Environment. – 2017. – V. 599 – 600. – P. 2026 – 2034.
 101. Focanici–Ciurlica, E. Nucleic acid changes induced by microwave and radiofrequency exposure of animal tissues, Romanian / E. Focanici–Ciurlica, L. Curecheriu, D. Creanga, C. Goiceanu, F.M. Tufescu // Biophysic. – 2007. – V. 17, № 2. – P. 109 – 117.
 102. Lai, H. Single and double strand breaks in rats brain cells after acute exposure to radio frequency electromagnetic radiation / H. Lai, N.P. Singh // Int. J. Radiat. Biology. – 1996. – V. 69. - P. 513-521.
 103. Zhang, M.B. Study of low-intensity 2450-MHz microwave exposure enhancing the genotoxic effects of mitomycin C using micronucleus test and comet assay *in vitro* / M.B. Zhang, J.L. He, L.F. Jin, D.Q. Lu // Biomed. Environ. Sci. – 2002. – V. 15, №4. – P. 283 – 90.
 104. Behari, J. DNA Strand Breaks in Rat Brain Cells Exposed to Low level Microwave Radiation / J. Behari, R. Paulraj // School of Environmental Sciences. – 2010. – P. 45 – 47.
 105. Campisi, A. Reactive oxygen species levels and DNA fragmentation on astrocytes in primary culture after acute exposure to low intensity microwave electromagnetic field / A. Campisi // Neurosci. Lett. – 2010. – V. 473, № 1. – P. 52 – 58.
 106. Romeo, S., Genotoxicity of radiofrequency electromagnetic fields on mammalian cells *in vitro*: A systematic review with narrative synthesis / S. Romeo, A. Sannino, M. Rosaria Scarfi, S. Lagorio, O. Zeni // Environ. Int. – 2024. – V.193. – P.109104. doi: 10.1016/j.envint.2024.109104.
 107. Akdag, M. Exposure to non-ionizing electromagnetic fields emitted from mobile phones induced DNA damage in human ear canal hair follicle cells / M. Akdag, S. Dasdag, F. Canturk, M.Z. Akdag // Electromagn. Biol. Med. – 2018. – V. 37, № 2. – P. 234 – 246.

108. Yao, K. Electromagnetic noise inhibits radiofrequency radiation-induced DNA damage and reactive oxygen species increase in human lens epithelial cells / K. Yao // *Mol. Vis.* – 2008. – V. 19, №14. – P. 964 – 970.
109. Yakymenko, I. Oxidative mechanisms of biological activity of low-intensity radiofrequency radiation / I. Yakymenko, O. Tsybulin, E. Sidorik, D. Henshel, O. Kyrylenko, S. Kyrylenko // *Electromagnetic Biology and Medicine.* – 2016. – V. 35, № 2. – P. 186 – 202. DOI: [10.3109/15368378.2015.1043557](https://doi.org/10.3109/15368378.2015.1043557)
110. Zothansiam, I. Impact of radiofrequency radiation on DNA damage and antioxidants in peripheral blood lymphocytes of humans residing in the vicinity of mobile phone base station / I. Zothansiam, M. Zosangzuali, M. Lalramdinpuii, G.C. Jagetia // *Electromagn. Biol. Medicine.* – 2017. – V. 36, № 3. – P. 295 – 305.
111. Helleday, T. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment / T. Helleday, J. Lo, D. C. van Gent, B.P. Engelward // *DNA Repair.* – 2007. – V. 6. – P. 923 – 935. doi:10.1016/j.dnarep.2007.02.006
112. 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. – С. 56 – 61.
113. Воробьева Н.Ю. Особенности реакции лимфоцитов крови больных раком молочной железы на облучение *in vitro* / Н.Ю. Воробьева, А.В. Антоненко, А.Н. Осипов // *Радиационная биология. Радиозэкология.* – 2011. – Т. 51, №4. – С. 451 – 456.
114. Кашуро, В.А. Некоторые механизмы нарушения биоэнергетики и оптимизация подходов к их фармакотерапии / В.А. Кашуро, В.Б. Долго-Сабуров, В.А. Башарин, Е.Ю. Бонитенко, Н.В. Лапина // *Биомедицинский журнал.* – 2010, № 11. – С. 611 – 634.
115. Ермаков, А.В. Фрагменты внеклеточной ДНК из среды инкубирования лимфоцитов человека, облученных в малых дозах, запускают развитие окислительного стресса и адаптивного ответа в необлученных лимфоцитах / А.В. Ермаков, М.С. Конькова, С.В. Костюк, Е.С. Ершова, Н.А. Еголина, Н.Н.

- Вейко // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2008. – Т. 48, №5. – С.553 – 564.
116. Воробьева, Н.Ю. Чувствительность лимфоцитов периферической крови летчиков и космонавтов к воздействию излучения: индукция двунитевых разрывов ДНК / Н.Ю. Воробьева, А.Н. Осипов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 144, №10. – С. 404 – 407.
 117. Пелевина, И.И. Молекулярные и клеточные последствия аварии на ЧАЭС / И.И. Пелевина, Г.Г. Афанасьев, А.В. Алещенко, М.М. Антошина, В.Я. Готлиб // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2011. – Т. 51, №1. – С. 154 – 161.
 118. Серебряный, А.М. Нарушение связей между иммунным статусом и окислительным гомеостазом в лимфоцитах крови ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС / А.М. Серебряный, А.В. Алещенко, О.В. Кудряшова // Радиационная биология. Радиоэкология. -2012. – Т. 52, №4. – С.341 – 345.
 119. Барышев, М.Г. Влияние низкочастотного электромагнитного поля на биологические системы / М.Г. Барышев, Н.С. Васильев, Н.Н. Куликова, С.С. Джимаков. – Ростов н/Д: ЮНЦ РАН, 2008. – 310 с.
 120. Барышев, М.Г. Влияние низкоинтенсивных факторов на живые системы / М.Г. Барышев, А.А. Басов, С.С. Джимаков. – Краснодар: Кубанский гос. ун-т, 2013. – 183 с.
 121. Chan, J.H. Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application / J.H. Chan, S. Lim, W.S. Wong // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2006. – V.33, №5. – P. 533 – 540.
 122. Бабаян, Ю.С. Некоторые физико-химические свойства ДНК, облученной низкоэнергетическими миллиметровыми когерентными электромагнитными волнами / Ю.С. Бабаян, С.Н. Акопян, Р.С. Казарян, В.П. Калантарян, Г.С. Симонян, А.Б. Хачатрян, А.П. Антонян, П.О. Вардеванян // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2006. – Т. 11. – С. 64 – 68.
 123. Бабаян, Ю.С. Воздействие низкоэнергетического миллиметрового электромагнитного излучения на стабильность молекул ДНК в растворе / Ю.С.

- Бабаян, А.Ш. Маркарян, В.П. Калантарян, М.А. Казарин // Биофизика. – 2007. – Т. 52, № 2. – С. 382 – 384.
124. Бабаян, Ю.С. Влияние когерентного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на некоторые свойства растворов ДНК / Ю.С. Бабаян, А.А. Тадевосян, Г.Л. Канарян // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2009. – Т. 2. – С. 52–56.
125. Гонсалес, Э. Взаимодействие оснований ДНК с молекулами воды. Сравнение результатов расчетов методами молекулярной механики и квантовой механики с экспериментальными данными / Э. Гонсалес, Х. Лиино, А. Дерябина // Биофизика. – 2013. – Т. 58, №5. – С. 748 – 757.
126. Montagnier, L. *Electromagnetic Signals Are Produced by Aqueous Nanostructures Derived from Bacterial DNA Sequences* / L. Montagnier, J. Aissa, S. Ferris, et al. // *Interdiscip. Sci. Comput Life Sci.* – 2009. – V.1. – P. 81 – 90.
127. Montagnier, L. *DNA waves and water* / L. Montagnier, J. Aissa, E. Del Giudice // *Journal of Physics: Conference Series.* – 2011. – V. 306. – P. 1 – 10.
128. Montagnier, L. Transduction of DNA information through water and electromagnetic waves / L. Montagnier, E. Del Giudice, J. Aïssa, C. Lavallee, S. Motschwiller, A. Capolupo, A. Polcari, P. Romano, A. Tedeschi, G. Vitiello // *Electromagn. Biol. Med.* – 2015 – V. 34, №2. – P.106 - 12. doi: 10.3109/15368378.2015.1036072.
129. Александров, В.Я. Реактивность клеток и белки / В.Я. Александров. – Л.: Наука, 1985. – 318 с.
130. Matveev, V.V. Protoreaction of protoplasm / V.V. Matveev // *Cell. Mol. Biol.* – 2005. – V.51. – P. 715 – 723.
131. Бычкова, В.Е. Как мембранная поверхность воздействует на структуру белков / В.Е. Бычкова, А.А. Конрадов, Е.Л. Мальцева // *Успехи биологической химии.* – 2014. –Т. 54. – С. 133 – 202.
132. Матвеева, Т.А. Применение лазерной интерферометрии для оценки параметров гидратных оболочек белков / Т.А. Матвеева, Р.М. Саримов, В.Н. Бинги / В сб. докладов V Международной конференции «Человек и

- электромагнитные поля». Саров: ФГУП РФЯЦ ВНИИЭФ. – 2017. – С. 499 – 508.
133. Stadtman, E.R. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins / E.R. Stadtman, R.L. Levine // *Amino Acids*. – 2003. – V. 25. – P. 207 – 218.
 134. De Ninno, A. Influence of magnetic fields on the hydration process of amino acids: Vibrational spectroscopy study of L-phenylalanine and L-glutamine / A. De Ninno, A.C. Gasteliano // *Bioelectromagnetics*. – 2014. – V. 36, №2. – P. 129 – 136.
 135. Farrugia, A. Albumin usage in clinical medicine: tradition or therapeutic / A. Farrugia // *Transfus. Med. Rev.* – 2010. – V. 24, №1. – P. 53 – 63.
 136. Kragh-Hansen, U. Human serum albumin isoforms: genetic and molecular aspects and functional consequences / U. Kragh-Hansen, L. Minchiotti, M. Galliano, T. Peters // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2013. – V. 1830, №12. – P. 5405 – 5417.
 137. Fanali, G. Human serum albumin: from bench to bedside / G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi // *Mol. Aspects Med.* – 2012. – V. 33, №3. – P. 209 – 290.
 138. Peters, T. Jr. All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications / T. Jr. Peters. – San Diego: Academic Press. – 1996. 432 p.
 139. Ascenzi, P. Serum human albumin: an allosteric protein / P. Ascenzi, M. Fasano // *IUBMB Life*. – 2009. – V.61, №12. – P.1118 – 1122.
 140. Van der Vusse, G.J. Albumin as fatty acid transporter / G.J. Van der Vusse // *Drug Metab. Pharmacokinet.* – 2009. – V.24, №4. – P.300 – 307.
 141. Kandagal, P.B. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach / P.B. Kandagal, S. Ashoka, J. Seetharamappa, S.M. Shaikh, Y. Jadegoud, O.B. Ijare // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2006. – V.41, №2. – P.393 – 399.
 142. Varshney, A. Ligand binding strategies of human serum albumin: how can the cargo be utilized? / A. Varshney, P. Sen, E. Ahmad, M. Rehan, N. Subbarao, R.H. Khan // *Chirality*. – 2010. – V.22, №1. – P.77 – 87.
 143. Lu, J. Albumin as a zinc carrier: properties of its high-affinity zinc-binding site / J. Lu, A.J. Stewart, P.J. Sadler // *Biochem. Soc. Trans.* – 2008. – V.36, №. 6. – P.1317

– 1321.

144. Sudlow, G. Spectroscopic techniques in the study of protein binding: A fluorescence technique for the evaluation of the albumin binding and displacement of warfarin and warfarin-alcohol / G. Sudlow, D.J. Birkett, D.N. Wade // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 1975. – V.2, №2. – P.129 – 140.
145. Цейслер, Ю.В. Влияние магнитного поля разных частот на собственную флуоресценцию сывороточного альбумина / Ю.В. Цейслер, В.С. Мартынюк, А.Ю. Артеменко, Н.С. Мирошниченко // *Физика живого.* –2009. – Т. 17, № 1. – С. 94 – 97.
146. Фесенко, Е.Е. Действие обработанных слабыми магнитными полями водно-солевых растворов на собственную флуоресценцию бычьего сывороточного альбумина. Выделение из этих растворов и частичная характеристика биологически активной флуоресцирующей фракции / Е.Е. Фесенко, В.В. Новиков, В.В. Кувычкин, Е.В. Яблокова // *Биофизика.* – 2000. – Т. 45, № 5. – С. 232 – 239.
147. Москвин, С.В. КВЧ-лазерная терапия / С.В. Москвин, А.А. Хадарцев. – М.–Тверь: Издательство «Триада», 2016. – 168 с.
148. Плетнев, С.Д. Инструкция по применению терапевтической установки для лечения облучением миллиметрового диапазона длин волн нетепловой интенсивности "Явь-1"/ С.Д. Плетнев, И.М. Корочкин, М.Б. Голант и др. – М.: Минздрав СССР. – 1987. – 57с.
149. Assiotis, A. Pulsed electromagnetic fields for the treatment of tibial delayed unions and nonunions. A prospective clinical study and review of the literature / A. Assiotis, N.P. Sachinis, B.E. Chalidis // *J. Orthop Surg Res.* – 2012. – V.7. – P. 24. doi: 10.1186/1749-799X-7-24
150. Guo, L. Pulsed radio frequency energy (PRFE) use in human medical applications / L. Guo, N.J. Kubat, R.A. Isenberg // *Electromagnetic Biology and Medicine.* – 2011. – V. 30. – P. 21 – 45. doi: 10.3109/15368378.2011.566775
151. Cellik, M.S. The effects of long-term exposure to extremely low-frequency magnetic fields on bone formation in ovariectomized rats / M.S. Cellik, A. Gur, Z.

- Akdaq, V. Akpolat // Bioelectromagnetics. – 2012. – V. 33, №7. – P. 543 –549.
152. Du, L. Extremely low frequency magnetic fields inhibit adipogenesis of human mesenchymal stem cells / L. Du, H. Fan, H. Miao, G. Zhao, Y. Hou // Bioelectromagnetics. – 2014. – V. 35, №7. – P. 519 – 530.
 153. Nie, K. MAP kinase activation in cells exposed to a 60 Hz magnetic field / K. Nie, A. Henderson // J. Cell Biochem. – 2003. – V. 90. – P.1197 – 1206.
 154. Pilla, A. Electromagnetic fields as first messenger in biological signaling: Application to calmodulin-dependent signaling in tissue repair / A. Pilla, R. Fitzsimmons, D. Muehsam, J. Wu, C. Rohde, D. Casper // Biochim Biophys Acta. – 2011. – V.10. – P. 1236 – 1245.
 155. Li, X. Effects of 50 Hz pulsed electromagnetic fields on the growth and cell cycle arrest of mesenchymal stem cells: an *in vitro* study / X. Li, M. Zhang, L. Bai, W. Bai, W. Xu, H. Zhu // Electromagnetic Biology and Medicine. – 2012. – V.31. – P. 356 – 364. doi: 10.3109/15368378.2012.662194
 156. Zhang, M. Effects of low frequency electromagnetic field on proliferation of human epidermal stem cells: An *in vitro* study / M. Zhang, X. Li, L. Bai, K. Uchida, W. Bai, B. Wu, W. Xu, H. Zhu, H. Huang // Bioelectromagnetics. – 2013. – V.1. – P. 74 –80.
 157. Lai, H. Exposure to Static and Extremely-Low Frequency Electromagnetic Fields and Cellular Free Radicals / H. Lai // Electromagn. Biol. Med. – 2019. – V. 38. – P. 231 – 248.
 158. Rajendra, P. Viability of unstimulated lymphocytes exposed to extremely low frequency electromagnetic fields is dependent on intensity / P. Rajendra, H.N. Sujatha, R.B. Sashidhar, C. Subramanyam, D. Devendranath, R.S. Aradhya // Biodiscovery. – 2012. – V.2, №2. – DOI: 10.7750/BioDiscovery.2012.2.2
 159. Lange, S. Modifications in cell cycle kinetics and in expression of G1 phase-regulating proteins in human amniotic cells after exposure to electromagnetic fields and ionizing radiation / S. Lange, T. Viergutz, M. Simko // Cell Prolif. – 2004. – V. 37. – P. 337 – 349.
 160. Lee, H.C. Effect of extremely low frequency magnetic fields on cell proliferation

- and gene expression / H.C. Lee, M.-N. Hong, S.H. Jung, B.C. Kim, Y.J. Suh, Y.G. Ko, Y.S. Lee, B.Y. Lee, Y.G. Cho, S.H. Myung, J.S. Lee // *Bioelectromagnetics*. – 2015. – V. 7. – P. 506 – 516.
161. Tamrin, S.H. Electromagnetic Fields and Stem Cell Fate: When Physics Meets Biology / S.H. Tamrin, F.S. Majedi, M. Tondar, A. Sanati-Nezhad, M.M. Hasani-Sadrabadi // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* – 2016. – V. 171. – P. 63 – 97.
 162. Buckner, C.A. Inhibition of Cancer Cell Growth by Exposure to a Specific Time-Varying Electromagnetic Field Involves T-Type Calcium Channels / C.A. Buckner, A.L. Buckner, S.A. Koren, M.A. Persinger, R.M. Lafrenie // *PLOS ONE*. – 2015. – V.10, №4. e0124136. DOI:10.1371/journal.pone.0124136
 163. Yan, J. Effects of extremely low-frequency magnetic field on growth and differentiation of human mesenchymal stem cells / J. Yan, L. Dong, B. Zhang, N. Qi // *Electromagnetic Biology and Medicine*. – 2010. – V. 29. – P. 165 – 176. doi: 10.3109/ 01676830.2010.505490
 164. Wang, T. Involvement of midkine expression in the inhibitory effects of low-frequency magnetic fields on cancer cells / T. Wang, Y. Nie, S. Zhao, Y. Han, Y. Du, Y. Hou // *Bioelectromagnetics*. – 2011. – V. 32, Iss.6. – P. 443 – 452.
 165. Huang, L. Effects of sinusoidal magnetic field observed on cell proliferation, ion concentration and osmolarity in two human cancer cell lines / L. Huang, L. Dong, Y. Chen, H. Qi, D. Xiao // *Electromagnetic Biology and Medicine*. – 2006. – V.25, № 2. – P. 113 – 126.
 166. Lasalvia, M. Exposure to 1.8 GHz electromagnetic fields affects morphology, DNA-related Raman spectra and mitochondrial functions in human lymphomonocytes / M. Lasalvia, R. Scrima, G. Perna, C. Piccoli, N. Capitanio, P.F. Biagi, L. Schiavulli, T. Ligonzo, M. Centra, G. Casamassima, A. Ermini, V. Capozzi // *PLOS One* 13. – 2018. - V.13, №6. - e0198892 doi: 10.1371/journal.pone.0198892
 167. Buldak, R.J. Short-term exposure to 50 Hz ELE-EMF alters the cisplatin oxidative response in AT 478 murine squamous cell carcinoma cells / R.J. Buldak, R. Polanniak, I. Buldak, K. Zwirska-Korczala, M. Skonieczna // *Bioelectromagnetics*. – 2012. – V. 33. – P. 641 – 651.

168. Baharara, J. Extremely low frequency magnetic field sensitizes cisplatin-resistant human ovarian cell via P53 activation / J. Baharara, N. Hosseini, T.R. Farzin // *Cytotechnology*. – 2016. – V. 68. – P. 1403 – 1413.
169. El-Bialy, N.S. Extremely low-frequency magnetic field enhances the efficacy of low-dose cisplatin in the Ehrlich carcinomas / N.S. El-Bialy, M.M. Rageh // *Biomed. Res. Int.* – 2013. – V. 201. – P. 189352.
170. Tang, R. Extremely low frequency magnetic fields regulate differentiation of regulatory T cells: Potential role for ROS-mediated inhibition on AKT / R.Tang, Y. Xu, F. Ma, J. Ren, S. Shen, T. Wang // *Bioelectromagnetics*. – 2016. – V.1. – P. 51 – 59
171. Nie, Y. Low frequency magnetic fields enhance antitumor immune response against mouse H22 hepatocellular carcinoma / Y. Nie, Y. Chen, Y. Mou, L. Weng, Z. Xu, Y. Du, W. Wang, Y. Hou, T. Wang // *PLOS ONE*. – 2013. – V.8, №11. doi:10.1371/journal.pone. 0072411
172. Costa, F.P. Treatment of advanced hepatocellular carcinoma with very low levels of amplitude-modulated electromagnetic fields / F.P. Costa, A. de Oliveira, R. Meirelles, M.C. Machado, T. Zanesco, R. Surjan // *J. Cancer*. – 2011. – V.105. – P. 640 – 648. – doi: 10.1038/bjc.2011.29
173. Radeva, M. Difference in lethality between cancer cells and human lymphocytes caused by LF-electromagnetic fields / M. Radeva, H. Berg // *Bioelectromagnetics*. – 2004. – V.25, №7. – P. 503 – 507.
174. Johnson, D.L. RNA metabolism and oncogenesis / D.L. Johnson, S.A. Johnson // *Science*. – 2008. – V. 320. – P. 461.
175. Mahmoudinasab, H. Expressions of some antioxidant genes in SH-SY5Y cells treated with β -lapachone, morphine and electromagnetic field / H. Mahmoudinasab, M. Saadat // *Molecular Biology Reports*. – 2018 <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4172-1>
176. Джойнер, М.С. Основы клинической радиобиологии: пер. с англ. / М.С. Джойнер, О. Дж. ван дер Когель. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – 600 с.

177. Aslan, K. Rapid whole blood bioassays using microwave-accelerated metal-enhanced fluorescence / K. Aslan // *Nano Biomed. Eng.* – 2010. – V. 2. – P. 1 – 29.
178. Santaus, T.M. Effects of Lyse-It on endonuclease fragmentation, function and activity / T.M. Santaus, F. Zhang, S. Li, O.C. Stine, C.D. Geddes // *PLOS ONE*. – 2019. – V. 14. – P. 0223008.
179. Крутиков, Ю.А. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы / Ю.А. Крутиков, А.А. Кудринский, А.Ю. Олейник, Г.В. Лисичкин // *Успехи химии*. – 2008. – Т.77, №3. – С. 242 – 269.
180. Miao, A.-J. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances / A.-J. Miao, K.A. Schwehr, C. Xu, S.-J. Zhang, Z. Luo, A. Quigg, P.H. Santschi // *Environmental Pollution*. – 2009. – V. 157, №11. – P. 3034 – 3041.
181. Lok, C.-N. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities / C.-N. Lok, C.-M. Ho, R. Chen, Q.-Yu He, W.-Y. Yu // *J. Biol. Inorg. Chem.* – 2007. – V. 12. – P. 527 – 534. DOI 10.1007/s00775-007-0208-z
182. De Melo, L.S.A. Singlet oxygen generation enhanced by silver-pectin nanoparticles / L.S.A. De Melo, A.S.L. Gomes, S. Saska, Y. Nigoghossian, S.J.L. Messaddeg, R.E. de Araujo // *J. Fluoresc.* – 2012. DOI 10.1007/s10895-012-1107-4
183. Stranik, O. Optimization of nanoparticle size for plasmonic enhancement of fluorescence / O. Stranik, R. Nooney, C. McDonagh // *Plasmonics*. – 2007. – V. 2. – P. 15 – 22.
184. Реджепов, Д. Т. Биомедицинское применение наночастиц серебра (обзор) / Д. Т. Реджепов, А. А. Водяшкин, А. В. Сергородцева, Я. М. Станишевский // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2021. – Т. 10, №3. – С. 176 – 187.
185. Liao, S. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* / S. Liao, Y. Zhang, X. Pan, F. Zhu, C. Jiang, Q. Liu, Z. Cheng, G. Dai, G. Wu, L. Wang, L. Chen // *International Journal of Nanomedicine*. – 2019. – V.14. – P. 1469 – 1487. DOI: 10.2147/IJN.S191340.
186. Qayyum, S. Obliteration of bacterial growth and biofilm through ROS generation

- by facilely synthesized green silver nanoparticles / S. Qayyum, M. Oves, A.U. Khan // PLOS ONE. – 2017. – V.12, №8. e0181363. DOI: 10.1371/journal.pone.0181363.
187. Castellano, J.J. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs / J.J. Castellano, S.M. Shafii, F. Ko, G. Donate, T.E. Wright, R.J. Mannari, W.G. Payne, D.J. Smith, M.C. Robson // *Int. Wound J.* – 2007. – V.4, №2. – P.114– 122. doi: 10.1111/j.1742-481X.2007.00316.x.
 188. Zachar, O. Formulations for COVID-19 Early Stage Treatment via Silver Nanoparticles Inhalation Delivery at Home and Hospital / O. Zachar // *Science Open.* – 2020. – P. 1 – 14. DOI: 10.14293/S2199-1006.1.SOR-.PPHBJEO.v1.
 189. Siadati, S. A. Could silver nanoparticles control the 2019-Covid? An urgent glance to the past / S.A. Siadati, M. Afzali, M. Sayadi // *Chemical Review and Letters.* – 2020. – V.3. – P. 9 – 11. DOI: 10.22034/crl.2020.224649.1044.
 190. Wei, L. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications / L. Wei, J. Lu, H. Xu, A. Patel, Z.-S. Chen, G. Chen // *Drug Discovery Today.* – 2015. – V.20, №5. – P. 595 – 601. DOI: 10.1016/j.drudis.2014.11.014.
 191. Бучаченко, А.Л. Новые механизмы биологических эффектов электромагнитных полей / А.Л. Бучаченко, Д.А. Кузнецов, В.Л. Бердинский // *Биофизика.* – 2006. – Т.58, № 6. – С. 933 – 941.
 192. Бинги, В.Н. Первичный физический механизм биологических эффектов слабых магнитных полей / В.Н. Бинги // *Биофизика.* – 2016. – Т. 61, № 1. – С. 201 – 208.
 193. Binhi, V. A physical mechanism of magnetoreception: Extension and analysis / V. Binhi, F. Prato // *Bioelectromagnetics.* – 2017b. – V. 38, №1. – P.41 – 52.
 194. Binhi, V. Rotations of macromolecules affect nonspecific biological responses to magnetic fields / V. Binhi, F. Prato // *Scientific Report.* – 2018. – V.8, №1. – P.13495
 195. Бучаченко, А.Л. Магнитно-зависимые молекулярные и химические процессы в биохимии, генетике и медицине / А.Л. Бучаченко // *Успехи химии.* – 2014. – Т. 83, №1. – С. 1 – 12.
 196. Lednev, V.V. Bioeffects of weak combined, static and alternation magnetic fields / V.V. Lednev // *Бифизика.* –1996. –V.41, №1. – P. 231 – 235.

197. Новиков, В.В. Влияние слабых и сверхслабых магнитных полей на интенсивность бесполого размножения планарий / В.В. Новиков, И.М. Шейман, Е.Е. Фесенко // Биофизика. – 2002. – Т. 47, №1. – С. 125 – 129.
198. Узденский, А.Б. О биологическом действии сверхнизкочастотных магнитных полей: резонансные механизмы и их реализация в клетках / А.Б. Узденский // Биофизика. – 2000. – Т. 45, №5. – С. 888 – 893.
199. Gavocì, E. ELF magnetic fields tuned to ion parametric resonance conditions do not affect TEA-sensitive voltage-dependent outward K⁺ currents in a human neural cell line / E. Gavocì, I. Zironi, D. Remondini, A. Virelli, G. Castellani, B. Del Re, G. Giorgi, G. Aicardi, F. Bersani // Bioelectromagnetics. – 2013. – V. 34, №8. – P. 579 – 588.
200. Маргулис, А.М. Звукохимические реакции и сонолюминесценция воды / А.М. Маргулис. – М.: Химия, 1986.
201. Ozeki S., Otsuka I. Transient Oxygen Clathrate-like Hydrate and Water Networks Induced by Magnetic Fields // Journal of Physical Chemistry. – 2006. – V. 110. – P. 20067 – 20072
202. Шаталов, В.М. Механизм биологического действия слабых электромагнитных полей и эффекты дегазации крови *in vitro* / В.М. Шаталов // Биофизика. – 2012. – Т. 57, №6. – С. 1034 – 1040.
203. Галль, Л.Н. Материя и жизнь / Л.Н. Галль. – СПб.: ООО «Торгово-издательский дом Амфора», 2015. – 319 с.
204. Pollac, G.H. Cell, gels and the engines of life: a new, unifying approach to cell function / G.H. Pollac. – WA, Seattle: Ebner & Sons, 2001. – 305 p.
205. Del Giudice, E. Water dynamics at the root of metamorphosis in living organisms / E. Del Giudice, P.R. Spinetti, A. Tedeschi // Water. – 2010. – V.2, №3. – P.566 – 586.
206. Brizhik, L.S. The role of water in the information exchange between the components of an ecosystem / L.S. Brizhik, E. Del Giudice, A. Tedeschi, V.L. Voeikov // Water. – 2011. – V. 2, №16. – P. 2869 – 2877.
207. Bono, I. Emergence of the coherent structure of liquid water / I. Bono, E. Del Giudice, L. Gamberale, M. Henry // Water. – 2011. – V.4, №3. – P. 510 – 532.

208. Voeikov, V.L. On the relationship between exclusion zones and coherence domains in water / V.L. Voeikov, E. Del Giudice // Научные труды VII International Congress «Low and Superlow Fields and Radiations in Biology and Medicine». СПб. – 2012. – С. 9 – 10.
209. Del Giudice, E. The spontaneous development of knowledge in the living organisms. Unity of function and structure / E. Del Giudice, A. Tedeschi // Rivista di Filosofia Neo-Scolastica. – 2014. – №3. – P. 379 – 423.
210. Пономарев, О.А. Свойства жидкой воды в электрических и магнитных полях / О.А. Пономарев, Е.Е. Фесенко // Биофизика. – 2000. – Т. 45, №1. – С. 389 – 398.
211. Семинихина, Л.П. Диэлектрические и магнитные свойства воды в водных растворах и биообъектах в слабых электромагнитных полях / Л.П. Семинихина. – Тюмень: ТГУ, 2006. – 164 с.
212. Лобышев, В. И. Компьютерный модульный дизайн параметрических структур воды / В. И. Лобышев, А.Б. Соловей, Н.А. Бульенков // Биофизика. – 2003. – Т. 48, №6. – С. 1011 – 1011.
213. Бульенков, Н.А. Роль модульного дизайна в изучении процессов системной самоорганизации / Н.А. Бульенков // Биофизика. – 2005. – Т. 50, №5. – С. 620 – 664.
214. Бульенков, Н.А. Системообразующие функции связанной воды в механизме топохимических реакций образования ультратонких слоев на водной поверхности / Н.А. Бульенков, Е.А. Желиговская // Биофизика. – 2013. – Т. 58, вып. 1. – С. 8 – 26.
215. Марченко, А.О. Компьютерное моделирование параметрических структур воды / А.О. Марченко, А.Б. Соловей, В.И. Лобышев // Биофизика. – 2013. – Т. 58, №1. – С. 27 – 35.
216. Желиговская Е.А. Стержневые структуры связанной воды: их возможная роль в самоорганизации биологических систем и недиссипативной передаче энергии / Е.А. Желиговская, Н.А. Бульенков // Биофизика. – 2017. – Т. 62, № 5. – С. 836 – 845.
217. Бульенков, Н.А. Функциональная модульная динамическая модель

- поверхностного слоя воды / Н.А. Бульенков, Е.А. Желиговская // Журнал физической химии. – 2006. – V. 80, №10. – С. 1784 – 1805.
218. Бульенков, Н.А. Системно-структурное модульное обобщение кристаллографии связанной воды для изучения механизмов процессов в биосистемах на атомно-молекулярном уровне / Н.А. Бульенков // Кристаллография. – 2011. – Т.56, №4. – С. 729 – 746.
219. Рыжкина, И.С. Свойства супрамолекулярных наноассоциатов, образующихся в водных растворах низких и сверхнизких концентраций биологически активных веществ / И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, Ю.В. Киселева, А.И. Коновалов // ДАН. – 2009. – Т. 428, №4. – С. 487 – 491.
220. Рыжкина, И.С. Действие внешнего электромагнитного поля – условие образования наноассоциатов в высокоразбавленных водных растворах / И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, А.И. Коновалов // ДАН. – 2011. – Т. 440, №6. – С. 778 – 781.
221. Рыжкина, И.С. Эффект ультранизких концентраций и электромагнитных полей / И.С. Рыжкина, Ю.В. Киселева, Л.И. Муртазина, А.И. Коновалов // ДАН. – 2012. – Т. 446, №3. – С. 303 – 307.
222. Рыжкина, И.С. Водные растворы амфифильного производного каликс [4] рецорцинарена низких концентраций: самоорганизация, физико-химические свойства и биологическая активность в нормальных и гипoeлектромагнитных условиях / И.С. Рыжкина, Ю.В. Киселева, А.П. Тимошева, Р.А. Сафиуллин, М.К. Кадиров, Ю.Н. Валитова, А.И. Коновалов // ДАН. – 2012. – Т. 447, №1. – С. 1 – 7.
223. Коновалов, А.И. Образование наноразмерных молекулярных ансамблей в высокоразбавленных водных растворах / А.И. Коновалов // Вестник РАН. – 2013. – Т.83, №12. – С. 1076 – 1082.
224. Коновалов, А.И. Образование наноразмерных молекулярных ансамблей (наноассоциатов) – ключ к пониманию свойств высокоразбавленных водных растворов / А.И. Коновалов, И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, Ю.В. Киселева // Биофизика. – 2014. – Т. 59, № 3. – С. 421 – 427.

225. Пальмина, Н.П. Действие разбавленных растворов биологически активных веществ на клеточные мембраны / Н.П. Пальмина, Е.Л. Мальцева, Т.Е. Часовская // Биофизика. – 2014. – Т. 59, №4. – С. 704 – 716.
226. Лахно, В.Д. Полярная модель формирования состояний гидратированного электрона / В. Д. Лахно, А. В. Волохова, Е. В. Земляная, И. В. Амирханов, И. В. Пузынин, Т. П. Пузынина // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. – 2015. №.1. – С. 82 – 87
227. Лахно, В.Д. Динамическая модель полярона для исследования процесса гидратации электрона / В. Д. Лахно, И. В. Амирханов, А. В. Волохова, Е. В. Земляная, И. В. Пузынин, Т. П. Пузынина, В. С. Рихвицкий, М. В. Башакин // Физика элементарных частиц и атомного ядра. – 2023. – Т. 54, № 5. С. 1076 – 1105
228. Давыдов, А.С. Солитоны в молекулярных системах / А.С. Давыдов. – Киев: Наукова Думка, 1988. – 304 с.
229. Скотт, Э. Нелинейная наука. Рождение и развитие когерентных структур / Э. Скотт. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2007. – 560 с.
230. Lakhno, V.D. Formation of stationary states in finite homogeneous molecular chains / V.D. Lakhno, A.N. Korshunova // Mathematical Biology and Bioinformatics. – 2010. – Т.5, №1. – С. 1 – 29.
231. Snezhkina, A.V. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cell / A.V. Snezhkina, A.V. Kudryavtseva, O.L. Kardymon, M.V. Savvateeva, N.V. Melnikova, G.S. Krasnov, A.A. Dmitriev // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2019. – Т. 2019. – С. 6175804.
232. Новиков, В.Е. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция / В.Е. Новиков, О.С. Левченкова, Е.В. Пожилова // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. – Т. 12, № 4. – С. 13 – 21.
233. Донцов, В.И. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении / В.И. Донцов, В.Н. Крутько, Б.М. Мрикаев, С.В. Уханов // Труды ИСА РАН. – 2006. – Т. 19. – С. 50 – 69.

234. Зенков, Н.К. Старение и воспаление / Н.К. Зенков, Е.Б. Менщикова, В.А. Шкурупий // Успехи современной биологии. – 2010. – Т. 130, №1. – С. 20 – 37.
235. Воейков, Е.В. Регуляторная функция активных форм кислорода в крови и в водных модельных растворах: дисс. на соискание степени докт. биол. наук / Воейков Е.В. – М., 2003. – 304 с.
236. Минаев, Б.Ф. Электронные механизмы активации молекулярного кислорода / Б.Ф. Минаев // Успехи химии. – 2007. – Т. 76. – С. 1059 – 1083.
237. Halliwell, B. Free Radicals in Biology and Medicine / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. – Oxford University Press: Oxford, UK. – 2015. – 944 p.
238. Гудков, С.В. Образование активных форм кислорода в воде под воздействием видимого и инфракрасного излучения в полосах поглощения молекулярного кислорода / С.В. Гудков, О.Э. Карп, С.А. Гармаш и др. // Биофизика. – 2012. – Т. 57, № 1. – С.5 – 13.
239. Гудков, С.В. Образование перекиси водорода в воде при воздействии видимого света / С.В. Гудков, В.С. Смирнова, В.И. Брусков // Вода. Химия и Экология. – 2010. № 8. – С. 40 – 45.
240. Космачевская, О.В. Карбонильный стресс: от бактерий до человека / О.В. Космачевская, К.Б. Шумаев, А.Ф. Топунов. – Петрозаводск: ИП Марков Н.А, 2018. – 255 с.
241. Basudhar, D. Biological signaling by small inorganic molecules / D. Basudhar, L. Ridnour, R. Cheng, A.H. Kesarwala, J. Heinecke, D.A. Wink // Coordination Chemistry Reviews. – 2016. – V. 306. – С. 708 – 723.
242. Dizdaroglu, M. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease / M. Dizdaroglu // Cancer Letters. – 2012. – V. 327. – P. 26 – 47.
243. Tekutskaya, E.E. Oxidative damage to DNA under the action of an alternating magnetic field / E.E. Tekutskaya, M.G. Baryshev, L.R. Gusaruk, G.P. Ilchenko // Biophysics. – 2020. – V. 65, №. 4. – P. 564 – 568. DOI: 10.1134/S0006350920040
244. Nathan, C. Specificity of a third kind reaction oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling / C. Nathan // J. Clin. Invest. – 2003. – V.111. – P. 769 – 778.
245. Thomas, D.D. Breathing new life into nitric oxide signaling. A brief overview of

- the interplay between oxygen and nitric oxide / D.D. Thomas // *Redox Biol.* – 2015. – V. 5. – P. 225 – 233.
246. Гривенникова, В.Г. Генерация активных форм кислорода митохондриями / В.Г. Гривенникова, А.Д. Виноградов // *Успехи биол. химии.* – 2013. – Т. 53. – С. 245 – 296.
247. Skulachev, V.P. Mitochondria targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases / V.P. Skulachev // *Alzheimers Dis.* – 2012. – V. 28, №2. – P. 283 – 289.
248. Лаврик, Н.Л. О возможности образования в воде ОН радикала из иона гидроксила / Н.Л. Лаврик, Н.М. Бажин // *Биофизика.* – 2011. – Т.56, №3. – С.574 – 576.
249. Мальцев, Д. В. Хемилюминесценция синглетного кислорода и его димоля ($^1\text{O}_2$)₂ в реакциях пероксидов. Влияние 1,4-дiazобикарбоната [2,2,2] октана на излучательные свойства ($^1\text{O}_2$)₂: дисс. канд. хим. наук / Мальцев Д. В. – Уфа, 2007. – 142 с.
250. Смирнова, С.В. 8-оксогуанин и продукты его окисления. Образование в ДНК под действием тепла, ионов уранила и гамма-излучения / С.В. Смирнова, С.В. Гудков, В.И. Брусков. – Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2011. – 152 с.
251. Krasnovsky, A.A. Membrane and cell biology / A.A. Krasnovsky. – 1998. – Т.15. – С. 530.
252. Krasnovsky, A.A. Activation of Molecular Oxygen by Infrared Laser Radiation in Pigment Free Aerobic Systems / A.A. Krasnovsky, N.N. Drozdova, A.V. Ivanov, R.V. Ambartsumian // *Biochemistry.* – 2003. – V. 68, № 9. – P. 963 – 966.
253. Krasnovsky, A.A. Photochemical investigation of the IR absorption bands of molecular oxygen in organic and aqueous environment / A.A. Krasnovsky, A.S. Kozlov, Ya.V. Roumbal // *Photochemical and Photobiological Sciences.* – 2012. – V. 11, №6. – P. 988 – 997.
254. Krasnovsky, A.A. Tetracene oxygenation caused by infrared excitation of molecular oxygen in air-saturated solutions: the photoreaction action spectrum and spectroscopic parameters of the 1Dg 3R transition in oxygen molecules / A.A.

- Krasnovsky, R.V. Ambartzumian // Chemical Physics Letters. – 2004. – V.400. – P. 531 – 535.
255. Буторина, Д.Н. Исследование кинетических параметров синглетного молекулярного кислорода в водных растворах порфиринов. Влияние детергентов и тушителя – азида натрия / Д.Н. Буторина, А.А. Красновский мл., А.В. Приезжев // Биофизика. – 2003. – Т. 48, №2. – С. 201 – 209.
256. Ильина, А.Д. Влияние параметров возбуждающего излучения на фотосенсибилизированную генерацию синглетного кислорода в воде / А.Д. Ильина, А.Л. Глазов, О.С. Васютинский // Оптика и спектроскопия. – 2016. – Т. 120, № 6. – С. 935 – 940.
257. Капелько, В.И. Активные формы кислорода, антиоксиданты и профилактика заболеваний сердца / В.И. Капелько // РМЖ. – 2003. – №21. – С. 1185 – 1191.
258. Брусков, В.И. Автоколебательный процесс люминесценции воды, индуцированный лазерным облучением / В.И. Брусков, С.В. Гудков, С.Ф. Чалкин, Е.Г. Смирнова, Л.С. Ягужинский // ДАН. – 2009. – Т. 425, №6. – С. 827 – 829.
259. Брусков, В.И. Образование активных форм кислорода в воде под действием тепла / Брусков В.И., Масалимов Ж.К., Черников А.В. // ДАН. – 2002. – Т.3, №6. – С. 821 – 824.
260. Брусков, В.И. Активация восстановительных свойств анионов морской воды под действием тепла / Брусков В.И., Черников А.В., Гудков С.В., Ж.К. Масалимов // Биофизика. – 2003. – Т.48, №6. – С.1022 – 1029.
261. Смирнова, В.С. Образование 8-оксогуанина и его окисленных продуктов в ДНК *in vitro* под действием температуры 37 °С / В.С. Смирнова, С.В. Гудков, А.В. Черников // Биофизика. – 2005. – Т. 50. – С. 243 – 252.
262. Vanin, A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiolate ligands physico-chemistry, biochemistry and physiology / A.F. Vanin // Nitric Oxide. – 2015. – Т. 21, №1. – С. 1 – 13.
263. Шумаев, К.Б. Метаболиты оксида азота как триггеры модификации биомолекул при окислительном и карбонильном стрессе / К.Б. Шумаев, О.В.

- Космачевская, Э.И. Насыбулина, А.Ф. Топунов, А.Ф. Ванин, А.Л. Дудылина, Э.К. Рууге // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. Тезисы докладов международной научной конференции, XIV съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков. – Минск. – 2020. – С. 139.
264. Титов, В.Ю. Особенности метаболизма оксида азота в норме и при воспалении / В.Ю. Титов, А.Н. Осипов, М.В. Крейнина, А.Ф. Ванин // Биофизика. – 2013. – Т. 58, №5. – С. 857 – 870.
265. Биофизика / под ред. В. Г. Артюхова. – М.: Академический проект, Екатеринбург. – 2009. – 294 с.
266. Shakirzyanova, A. V. The Effect of hydrogen peroxide on spontaneous quantal and nonquantal acetylcholine release from rat motor Nerve Endings / A. V. Shakirzyanova, A. I. Malomouzh, N. V. Naumenko, E.E. Nicolsky // DAN. – 2009. – V. 424, №4. – P. 567 – 569.
267. Shokolenko, I. Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA / I. Shokolenko, N. Venediktova, A. Bochkareva, G.L. Wilson, M.F. Alexeyev // Nucleic Acids Research. – 2009. – V. 37. – P. 2539 – 2548.
268. Tirichen, H. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Their Contribution in Chronic Kidney Disease Progression Through Oxidative Stress / H. Tirichen, H. Yaigoub, W. Xu, C. Wu, R. Li, Y. Li // Frontiers in physiology. – 2021. – V.12. – P. 627837.
269. Maggiorani, D. / D. Maggiorani, N. Manzella, D.E. Edmondson, A. Mattevi, A. Parini, C. Binda, J. Mialet-Perez // Oxidative medicine and cellular longevity. – 2017. – V. 2017. – P. 3017947.
270. Gardner, P.R. Aconitase: sensitive target and measure of superoxide / P.R. Gardner // Methods in enzymology. – 2002. – V. 349. – P. 9 – 23.
271. Tretter, L. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase / L. Tretter, V. Adam-Vizi // The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. – 2004. – V. 24. – P. 7771–7778.

272. Starkov, A.A. Mitochondrial α -ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species / A.A. Starkov, G. Fiskum, C. Chinopoulos, B.J. Lorenzo, S.E. Browne, M.S. Patel, M.F. Beal // *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. – 2004. – V. 24. – P. 7779 – 7788.
273. Kovac, S. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase / S. Kovac, P.R. Angelova, K.M. Holmström, Y. Zhang, A.T. Dinkova-Kostova, A.Y. Abramov // *Biochimica et biophysica acta*. – 2015. – V. 1850. – P. 794 – 801.
274. Jackson, S.P. The DNA- damage response in human biology and disease / S.P. Jackson, I. Bartec // *Nature*. – 2008. – V. 461, №7267. – P. 1071–1078.
275. Tessitore, A. MicroRNAs in DNA damage. Repair Network and Cancer / A. Tessitore, G. Ciccirelli, F. Del Vecchio, A. Gaggiano, D. Verzella, M. Fischietti, D. Vecchiotti, D. Capece, F. Zazzeroni, E. Alesse // *Int. J. Genomics*. – 2014. Article ID 820248. – P. 10 – 18.
276. Dizdaroglu, M. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease / M. Dizdaroglu // *Cancer Letter*. – 2012. – V. 327. – P. 26 – 47.
277. Kasai, H. 8-Hydroxyguanine, an Oxidative DNA and RNA Modification / H. Kasai, K. Kawai // *Modified Nucleic Acids in Biology and Medicine, RNA Technologies*. – 2016. – P. 147 – 185. DOI 10.1007/978-3-319-34175-0_7
278. Abbotts, R. Coordination of DNA Single Strand Break Repair / R. Abbotts, D.M. Wilson // *Free Radic. Biol. Med.* – 2017. – V. 107. – P. 228 – 244. DOI: 10.1016/j.freerad-biomed.2016.11.039.
279. Моор, Н.А. Белок-белковые взаимодействия системы эксцизионной репарации оснований ДНК / Н.А. Моор, О.И. Лаврик // *Биохимия*. – 2018. – Т. 83, № 4. – С. 564 – 576.
280. Петрусева, И.О. Молекулярные механизмы действия системы общегеномной эксцизионной репарации нуклеотидов / И.О. Петрусева, А.Н. Евдокимов, О.И. Лаврик // *Acta Naturae*. – 2014. – Т. 6, №1. – С.24 – 36.
281. Лукина, М.В. Кинетический анализ узнавания поврежденных нуклеотидов мутантными формами 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы HOGG1 / М.В. Лукина, А.А. Кузнецова, Н.А. Кузнецов, О.С. Федорова // *Биоорганическая химия*. –

2017. – Т. 43, №1. – С. 4 – 17. doi:10.7868/S0132342317010055.
282. Ba, X. The Role of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1 in Inflammation / X. Ba, L. Aguilera-Aguirre, Q.T. Rashid, A. Bacsı, Z. Radak, S. Sur, K. Hosoki, M.L. Hegde, I. Boldogh // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – V.15. – P. 16975 doi:10.3390/ijms150916975
283. Рогачева, М.В. Репарация 8-оксогуанина в ДНК. Механизмы ферментативного катализа / М.В. Рогачева, С.А. Кузнецова // *Успехи химии.* – 2008. – Т. 77, №9. – P.289 – 296.
284. Попов, А.В. Каталитически компетентные конформации активного центра 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека / А.В. Попов, А.В. Юдкина, Ю.Н. Воробьев, Д.О. Жарков // *Биохимия.* – 2020. – Т. 85, №2. – С. 225 – 238. DOI: 10.31857/S0320972520020062
285. Moor, N.A. Quantitative Characterization of Protein-Protein Complexes Involved in Base Excision DNA Repair / N.A. Moor, I.A. Vasil'eva, R.O. Anarbaev, O.I. Lavrik, A.A. Antson // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 43. – P. 6009 – 6022. DOI: 10.1093/ nar/gkv569.
286. Maltseva, E.A. Poly (ADP-ribose) polymerase 1 modulates interaction of the nucleotide excision repair factor XPC-RAD23b with DNA via poly (ADP-ribosylation) / E.A. Maltseva, N.I. Rechkunova, M.V. Sukhanova, O.I. Lavrik // *J. Biological Chemistry.* – 2015. – Т. 290, № 36. – С. 21811 – 21820.
287. Vasil'eva, I.A. Dynamic Light Scattering Study of Base Excision DNA Repair Poteins and Their Complexes / I.A. Vasil'eva, R.O. Anarbaev, N.A. Moor // *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* – 2019. – V. 1867, №3. – P. 297 – 305. DOI: 10.1016/j.bbapap.2018.10.009.
288. Текуцкая, Е.Е. Скриннинг повреждений ДНК лимфоцитов периферической крови человека при воздействии излучений / Е.Е. Текуцкая, Г.П. Ильченко, К.А. Чебочинов // *Психосоматические и интегративные исследования.* – 2017. – № 3. – С. 1 – 6.
289. 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. Malyshko, M.G. Baryshev, S.S.

- Dzhimak // *Frontiers in Bioscience. Landmark Ed.* – 2023. – V.28, № 10. – P. 252.
<https://doi.org/10.31083/j.fbl2810252>
290. Коваль, В.В. Структурные особенности взаимодействия 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека (hOGG1) с ДНК / В.В. Коваль, Д.Г. Кнорре, О.С. Федорова // *Acta Natura.* – 2014. – Т. 6, №3. – С. 24 – 36.
291. Кузнецов, Н.А. Механизмы ферментативного катализа и узнавания поврежденных участков ДНК 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой человека hOGG1 / Н.А. Кузнецов, В.В. Коваль, О.С. Федорова // *Биохимия.* – 2011. – Т. 76, №1. – С. 142 – 156.
292. Haseli, R. Synergistic anticancer effects of crocin combined with deuterium-depleted water on HT-29 cells / R. Haseli, M. Honarvar, K. Yavari, M. Ghavami // *Anti-Cancer Drugs.* – 2023. – V. 34, №10. – P. 1162 - 1170. doi: 10.1097/CAD.0000000000001512.
293. Basov, A.A. Possible mechanisms of biological effects observed in living systems during $^2\text{H}/^1\text{H}$ isotope fractionation and deuterium interactions with other biogenic isotopes / A.A. Basov, L. Fedulova, E. Vasilevskaya, S.S. Dzhimak // *Molecules.* – 2019. – V. 24, №22. – P. 4101. DOI: 10.3390/molecules24224101
294. Lisicin, A. B. Influence of deuterium depleted water on the organism of laboratory animals in various functional conditions of nonspecific protective systems / A.B. Lisicin, M.G. Barishev, A.A. Basov, E.V. Barysheva, I.M. Bykov, A.S. Dydykin, E.E. Tekutskaia, A.A. Timakov, L.V. Fedulova, I.M. Chernukha, S.S. Dzhimak // *Biophysics.* – 2014. – V. 59, №4. – P. 620 – 627.
295. Kravtsov, A. Reduction of Deuterium Level Supports Resistance of Neurons to Glucose Deprivation and Hypoxia: Study in Cultures of Neurons and on Animals / A. Kravtsov, S. Kozin, A. Basov, E. Butina, M. Baryshev, V. Malyshko, A. Moiseev, A. Elkina, S. Dzhimak // *Molecules.* – 2022. – V. 27, № 1. – P. 243. DOI: 10.3390/molecules27010243.
296. Kozin, S. Electrophysiological Activity and Survival Rate of Rats Nervous Tissue Cells Depends on D/H Isotopic Composition of Medium / S. Kozin, V. Skrebitsky, R. Kondratenko, A. Kravtsov, E. Butina, A. Moiseev, V. Malyshko, M. Baryshev, A.

- Elkina, S. Dzhimak. *Molecules*. – 2021. – V.26, №7. – P.2036. doi: 10.3390/molecules26072036.
297. Yaglova, N.V. Emerging Role of Deuterium/Protium Disbalance in Cell Cycle and Apoptosis / N.V. Yaglova, E.P. Timokhina, S.S. Obernikhin, V.V. Yaglov // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – V.24, №4. – P.3107. doi: 10.3390/ijms24043107.
298. Avila, D.S. Anti-aging effects of deuterium depletion on Mn-induced toxicity in a *C. elegans* model / D.S. Avila, G. Somlyai, I. Somlyai, M. Aschner // *Toxicol Lett.* – 2012. – V. 211, №3. – P. 319 – 24. doi: 10.1016/j.toxlet.2012.04.014.
299. Yaglova, N.V. Impact of Reduced Deuterium Intake on Thermoregulation / N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, E.P. Timokhina, M.A. Diatropova, M.E. Diatropov, V.V. Yaglov // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2021. – V.171, №5. – P. 572 – 575. doi: 10.1007/s10517-021-05271-8.
300. Somlyai, G. Pre-clinical and clinical data confirm the anticancer effect of deuterium depletion / G. Somlyai, B. Javaheri, H. Davari, Z. Gyöngyi, I. Somlyai, K.A. Tamaddon, L.G. Boros // *Biomacromol J.* – 2016. – V.2, №1. – P. 1–7.
301. Basov, A. Deuterium - depleted water influence on the isotope $^2\text{H}/^1\text{H}$ regulation in body and individual adaptation / A. Basov, L. Fedulova, M. Baryshev, S. Dzhimak // *Nutrients*. – 2019. – V.11. – P.1903. DOI: 10.3390/nu11081903.
302. O Grady, S. P. Hydrogen and Oxygen Isotope Ratios in Body Water and Hair: Modeling Isotope Dynamics in Nonhuman Primates / S.P. O Grady, L.O. Valenzuela, C.H. Remien, L.E. Enright, M.J. Jorgensen, J.R. Kaplan, J.D. Wagner, T.E. Cerling, J.R. Ehleringer // *Am J Primatol.* – 2012. – V.74, №7. – P. 651 – 660. doi: 10.1002/ajp.22019
303. Bykov, M.I. Comparative characteristics of the isotopic D/H composition and antioxidant activity of freshly squeezed juices from fruits and vegetables grown in different geographical regions / M.I. Bykov, S.S. Dzhimak, A.A. Basov, O.M. Arcybasheva, D. Shashkov, M.G. Baryshev // *Vopr. Pitan.* – 2015. – V. 84, №4. – P. 89 – 96.
304. Ферронский. В. И. Изотопия гидросферы Земли / В.И. Ферронский, В.А. Поляков. – М.: Научный мир, 2009. – 632 с.

305. Basov, A. Inequality in the frequency of the open states occurrence depends on single $2\text{H}/1\text{H}$ replacement in DNA / A. Basov, M. Drobotenko, A. Svidlov, M. Baryshev, S. Dzhimac // *Molecules*. – 2020. – V. 25, №16. – P. 3753.
306. Svidlov, A.A. Influence of the $^2\text{H}/^1\text{H}$ Isotope Composition of the Water Environment on the Probability of Denaturation Bubble Formation in a DNA Molecule / A.A. Svidlov, M.I. Drobotenko, A.A. Basov, A.A. Elkina, E.O. Gerasimenko, V.V. Malyshko, M.G. Baryshev, S.S. Dzhimak // *Physics of Wave Phenomena*. – 2021. – V. 29. – P. 180–185. DOI: 10.3103/S1541308X2102014X
307. Basov, A. Inequality in the Frequency of the Open States Occurrence Depends on Single $^2\text{H}/^1\text{H}$ Replacement in DNA / A. Basov, M. Drobotenko, A. Svidlov, E. Gerasimenko, V. Malyshko, A. Elkina, M. Baryshev, S. Dzhimak // *Molecules*. – 2020. – V. 25, №16. – P.3753. doi: 10.3390/molecules25163753.
308. 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.
309. 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 Ed)*. – **2024**. – V. 29, № 11. – P. 381. doi.org/10.31083/j.fbl2911381
310. Goncharuk, V.V. Determination of Biological Activity of Water Having a Different Isotope Ratio of Protium and Deuterium / V.V. Goncharuk, T.V. Pleteneva, T.V. Grebennikova, A.V. Syroeshkin, E.V. Uspenskaya, N.V. Antipova, I.A. Zlatkiy // *Journal of Water Chemistry and Technology*. – 2018. – V.40, №1. – P. 27 – 34. DOI: 10.3103/s1063455x18010058.
311. Goncharuk, V.V. On the possibility of chiral structure - density submillimeter inhomogeneities existing in water / V.V. Goncharuk, A.V. Syroeshkin, T.V. Pleteneva, E.V. Uspenskaya, O.V. Levitskaya, V.A. Tverdislov // *Journal of Water Chemistry and Technology*. – 2017. – V. 39, №6. – P. 319 – 324. DOI: 10.3103/s1063455x17060029.

312. Compendium of international analysis of methods – OIV Determination of the deuterium distribution in ethanol by SNIF-NMR / Method OIV-MA-AS311-05.
313. Национальный исследовательский совет. 2011. Руководство по уходу и использованию лабораторных животных: восьмое издание. Вашингтон, округ Колумбия: Издательство национальных академий.
<https://doi.org/10.17226/12910>.
314. Фролов В. Ю., Барышев М.Г., Болотин С.Н., Джимаков С.С. Способ получения биологически активной питьевой воды с пониженным содержанием дейтерия / Патент РФ № 2438765, заявл. 25.05.2010; опубл. 10.01.2012.
315. 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.
316. Барышев М.Г. Способ определения оптимальных параметров магнитного поля для регулирования всхожести семян / Патент РФ №2342658. Заявка №2007121626 от 08.06.2007. Опубл. 27.12.2008.
317. 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. DOI: 10.1007/s11018-017-1247-7
318. 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. Заявка № 2014150523/15 от 12.12.2014. Опубликовано 10.11.2015.
319. Белов, А.В. Конструирование устройств на микроконтроллерах / А.В. Белов. – СПб.: Наука и Техника, 2005. – 256 с.
320. Баранов, В.Н. Применение микроконтроллеров AVR: схемы, алгоритмы, программы / В.Н. Баранов. – М.: Изд. дом «Додека-XXI», 2004.– 288 с.
321. Data Sheets // Atmel Microcontroller with 8K Bytes In-System Programmable Flash AT90PWM3. – 2013. – (Engl.). – URL: <http://www.atmel.com/Images/Atmel->

- 4317-8-bit-AVR-Flash_Microcontroller -AT90PWM2-3-2B-3B_summary.pdf [27 February 2015]
322. Котюк, А. Ф. Датчики в современных измерениях / А. Ф. Котюк. – М.: Радио и связь, 2006. – 96 с.
323. Хоровиц, П. Искусство схемотехники: Пер. с англ. - изд. 6-е / П. Хоровиц, У. Хилл. – М.: Мир, 2003. – 704 с.
324. Текуцкая Е.Е., Барышев М.Г., Ломакина Л.В. Способ исследования биологических жидкостей в переменном магнитном поле / Патент РФ № 2621157. Заявка № 2016104983 от 15.02.2016. Опубликовано 31.05.2017, бюл. № 16.
325. Boyum, A. Separation of leukocytes from blood and marrow / A. Boyum // Scand. J. Clin. Lab. Investig. – 2000. – V. 21. – P. 1 – 9.
326. Karpishchenko, A.I. Handbook. Medical Laboratory Technology / A.I. Karpishchenko. – Sankt-Petersburg: Intermedika, 2002. – 154 с.
327. Beers, R. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase / R. Beers, I. Sizer // J. Biol. Chem. – 1952. – V. 195, №1. – P. 133 – 140.
328. Веревкина, И.В. Колориметрический метод определения SH-групп и SS-связей в белках при помощи 5,5-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты / И.В. Веревкина, А.И. Точилкин, Н.А. Попова // Современные методы в биохимии: Сб. науч. тр. – М.: Медицина, 1977. – С. 223 – 231.
329. Bykov, I.M. Assessment of indicators of the thiol metabolism of blood plasma of patients with inflammatory diseases of the small pelvis organs at antioxidant correction / I.M. Bykov, K.A. Popov, I.A. Egorova, A.P. Storozhuk // Medical news of North Caucasus. – 2018. – V. 13, №2. – P. 402 – 406. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2018.13062> (In Russ.)
330. Kostyuk, V.A. A simple, sensitive assay for determination of superoxide dismutase activity based on reaction of quercetin oxidation / V.A. Kostyuk, A.I. Potapovich, Zn.V. Kovaleva // Problems of Medical Chemistry. – 1990. – V. 2. – P. 88 – 91.
331. Герасимов, А.Н. Медицинская статистика / А.Н. Герасимов. – М: ООО

«Медицинское информационное агентство», 2007. – 480 с.

332. Пономарев, В.О. Влияние низкочастотных переменных магнитных полей на скорость биохимических реакций, протекающих с образованием активных форм кислорода / В.О. Пономарев, В.В. Новиков // Биофизика. – 2009. – Т. 54, №2. – С.235 – 241.
333. Карп, О.Э. Генотоксическое действие *in vivo* долгоживущих радикалов, индуцируемых рентгеновским облучением / О.Э. Карп, С.В. Гудков, С.А. Гармаш, И.Н. Штаркман, А.В. Черников, В.И. Брусков // ДАН. – 2010. – Т. 434, № 3. – С. 412 – 415.
334. Штаркман, И.Н. Влияние аминокислот на образование перекиси водорода и гидроксильных радикалов в воде и 8-оксогуанина в ДНК при воздействии рентгеновского излучения / И.Н. Штаркман, С.В. Гудков, А.В. Черников, В.И. Брусков // Биофизика. – 2008. – Т.73, №4. – С. 576 – 586.
335. Samanta, N. Collective hydration dynamics of guanidinium chloride solutions and its possible role in protein denaturation: a terahertz spectroscopic study / N. Samanta, D.D. Mahanta, R.K. Mitra // J. Phys. Chem. – 2014. – V.16, №42. – P.23308 – 23315.
336. Hore, P.J. The radical-pair mechanism of magnetoreception / P.J. Hore, H. Mouritsen // Annual Review of Biophysics. - 2016. – V.45, №1. – P. 299 – 344.
337. Трофимова, Т.И. Курс физики. Учебное пособие для вузов / Т.И. Трофимова. – М.: Издательский центр «Академия», 2006. – 284 с.
338. Новиков, В.В. Эффекты и молекулярные механизмы биологического действия слабых и сверхслабых магнитных полей / В.В. Новиков, В.О. Пономарев, Г.В. Новиков, В.В. Кувычкин, Е.В. Яблокова, Е.Е. Фесенко // Биофизика. – 2010. – Т.55, №4. – С. 631 – 639.
339. Пономарев, В.О. Влияние слабого электромагнитного поля на скорость производства перекиси водорода в водных растворах / В.О. Пономарев, В.В. Новиков, А.В. Карнаухов, О.А. Пономарев // Биофизика. – 2008. – Т.53, №2. – С. 197 – 201.
340. Горошинская, И.А. Интенсивность хемилюминисценции, состояние антиоксидантной системы и окислительная модификация белков плазмы крови /

- И.А. Горошинская, Г.А. Неродо, Е.И. Сурикова // Сибирский онкологический журнал. – 2013. - Т.4, №58. – С. 45 – 49.
341. Vallée, P. Effects of pulsed low frequency electromagnetic fields on water using photoluminescence spectroscopy: role of bubble/water interface / P. Vallée, J. Lafait, P. Mentré, M. Monod, Y. Thomas // The Journal of Chemical Physics. – 2005. – V.122, №11. – P.114513.
342. Бункин, Н.Ф. Кластерная структура стабильных нанопузырей растворенного газа в глубоко очищенной воде / Н.Ф. Бункин, Н.В. Суязов, А.В. Шкирин // Журнал экспериментальной и теоретической физики. – 2009. – Т. 135, №5. – С. 917 – 937.
343. Шаталов, В.М. Влияние газовых нанопузырьков на электропроводность чистой воды / В.М. Шаталов, И.В. Нога, А.А. Зинченко, Н.Ф. Бункин // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. – 2010. – Т.1, №10. – С. 252 – 257.
344. Ким, Д.Ч. К теории акустических солитонов в жидкости с распределенными пузырьками газа / Д.Ч. Ким // Журнал технической физики. – 2007. – Т. 77, № 6. – С. 8 – 12.
345. Fanali, G. Allosteric and binding properties of Asp1-Glu382 truncated recombinant human serum albumin - an optical and NMR spectroscopic investigation / G. Fanali, G. Pariani, P. Ascenzi, M. Fasano // FEBS J. – 2009. – V.276, №8. – P. 2241 – 2250.
346. Kamal, J.K. Ultrafast hydration dynamics in protein unfolding: Human serum albumin / J.K. Kamal, L. Zhao, A.H. Zewail // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2004. – V.101, №37. – P.13411 – 13416.
347. Watanabe, H. Conformational stability and warfarin-binding properties of human serum albumin studied by recombinant mutants / H. Watanabe, U. Kragh-Hansen, S. Tanase, K. Nakajou, M. Mitarai, Y. Iwao, T. Maruyama, M. Otagiri // Biochem. J. – 2001. – V.357, №1. – P.269 – 274.
348. Fasano, M. The extraordinary ligand binding of human serum albumin / M. Fasano, S. Curry, E. Terreno, M. Galliano, G. Fanali, P. Narciso, S. Notari, P. Ascenzi // IUBMB Life. – 2005. – V. 57, №12. – P. 787 – 96. doi: 10.1080/15216540500404093.
349. Liu, H. Spectrochim. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy / H. Liu, H. Zhang, B. Jin. – 2013. – V. 106. – P. 54 – 59.
350. Kelly, S.M. How to study proteins by circular dichroism / S.M. Kelly, T.J. Jess,

- N.C. Price // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – V.1751. – P.119 – 139.
351. Lakowicz, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy / J. R. Lakowicz. – 3rd ed. – N.Y.: Springer, 2006. – 255 p.
352. Krishnakumar, S.S. Spatial relationship between the prodan site, Trp-214 and Cys-34 residues in serum albumin and loss of structure through incremental unfolding / S.S. Krishnakumar, D. Panda // *Biochemistry.* – 2002. – V.41, №23. – P. 7443 - 52. doi: 10.1021/bi025699v.
353. Noskov, B.A. Bovine serum albumin unfolding at the air/water interface as studied by dilatational surface theology / B.A. Noskov, A.A. Mikhailovskaya, S.Y. Lin, G. Loglio, R. Miller // *Langmuir.* – 2010. – V.26, №22. – P.17225 – 17231.
354. Власова, И.М. Флуоресценция триптофана при денатурации сывороточного альбумина человека под действием додецилсульфата натрия / И.М. Власова, А.М. Салецкий // *Химическая физика.* – 2009. – Т. 28, №12. – С. 66 – 71.
355. Bhattacharya, M. pH-induced conformational isomerization of bovine serum albumin studied by extrinsic and intrinsic protein fluorescence / M. Bhattacharya, N. Jain, K. Bhasne Mukhopadhyay S. // *J. Fluoresc.* – 2011. – V. 21, №3. – P. 1083-90. doi: 10.1007/s10895-010-0781-3.
356. Knox, P.P. Database of Absorption and Fluorescence Spectra of >300 Common Compounds for use in PhotochemCAD / P.P. Knox, V.V. Gorokhov, B.N. Korvatovsky // *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry.* – 2020. – V. 393. – P. 290 – 327.
357. Горохов, В.В. Температурная зависимость длительности флуоресценции триптофана как показатель динамики его микроокружения / В.В. Горохов, Б.Н. Корватовский, П.П. Нокс, Н.П. Гришанова, С.Н. Горячев, В.З. Пашенко, А.Б. Рубин // *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни.* – 2021. – Т. 498, №3. – С. 233 – 240.
358. Эммануэль, Н.М. Экспериментальные методы химической кинетики / Н.М. Эммануэль, М.Г. Кузьмин. – Москва: МГУ, 1985. – 136 с.
359. Flora, K. Unfolding of acrylodan - labeled human serum albumin probed by steady-state and time-resolved fluorescence method / K. Flora, J.D. Brennan, G.A. Baker, M.A. Doody, F.V. Bright // *Biophys. J.* – 1998. – V.75, №2. – P.1084 – 96. doi:

10.1016/S0006-3495(98)77598-8.

360. Ghuman, J. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin / J. Ghuman, P.A. Zunszain, I. Petitpas, A.A. Bhattacharya, M. Otagiri, S. Curry // *Mol. Biol.* 2005. – V. 353, № 1. – P.38 – 52.
361. Sreerama. N. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis / N. Sreerama, S.Y. Venyaminov, R.W. Woody // *Anal. Biochem.* – 2000. – V.287. – P. 243 – 251.
362. Ермолаев, В.Л. Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения / В.Л. Ермолаев, Е.Н. Бодунов, Е.Б. Свешникова. – Ленинград: Наука, 1977. – 189 с.
363. Немцева, Е.В. Сходство спектральных компонент с индивидуальным временем жизни для триптофановой флуоресценции / Е.В. Немцева, О.О. Лашук, М.А. Герасимова // *Биофизика.* – 2016. – Т.61, № 2. – С. 231 – 238.
364. Рубцова, Е. В. Статистические характеристики гидратных оболочек белков. Компьютерное моделирование / Е.В. Рубцова, А.Б. Соловей, В.И. Лобышев // *Вестник МГУ. Серия 3. Физика и астрономия.* – 2015. – Т.5. – С.33 – 38.
365. Карп, О.Э. Генотоксическое действие *in vivo* долгоживущих радикалов, индуцируемых рентгеновским облучением / О.Э. Карп, С.В. Гудков, С.А. Гармаш, И.Н. Штаркман, А.В. Черников, В.И. Брусков // *ДАН.* – 2010. – Т. 434, № 3. – С. 412 – 415.
366. Pinto, R. In Vivo Studies on Radiofrequency (100 kHz–300 GHz) Electromagnetic Field Exposure and Cancer: A Systematic Review / R. Pinto, L. Ardoino, P. Villani, C. Marino // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* – 2023. - V. 20. – P. 2071. <https://doi.org/10.3390/ijerph20032071>
367. Bohreh, C.R. Absorption and Scattering of Light by Small Particles / C.R. Bohreh, D.R. Huffman. – Wiley: VCH, 2009. – 327 p.
368. Князев, В.Ю. Проникновение микроволнового излучения в воду (эффект „самопросветления“) / В.Ю. Князев, И.А. Косый, Н.И. Малых, Е.С. Ямпольский // *Журнал технической физики.* – 2003. – Т. 73, №11. – С. 133 – 136.

369. Yakymenko, I. Oxidative and mutagenic effects of low intensity GSM 1800 MHz microwave radiation / I. Yakymenko, A. Burlaka, I. Tsybulin, I. Brieieva, L. Buchynska, I. Tsehmistrenko, F. Chekhun // *Exp. Oncol.* – 2018. – P. 282 – 287.
370. Zheng, K. Clinical guideline for microwave ablation of bone tumors in extremities / K. Zheng, X. Yu, Y. Hu, Y. Zhang, Z. Wang, S. Wu, J. Shen, Z. Ye, C. Tu // *Orthop. Surg.* – 2020. – V. 12. – P. 1036 – 1044.
371. Cazzato, R.L. Percutaneous microwave ablation of bone tumors a systematic review / R.L. Cazzato, G. de Rubeis, P. de Marini, D. Dalili, G. Koch, P. Auloge, J. Garnon, A. Gangi // *Eur. Radiol.* – 2021. – V.31, №5. – P.3530 – 3541. doi: 10.1007/s00330-020-07382-8.
372. 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, №3. – С. 466 – 469.
373. Blank, M. Initial interactions in electromagnetic field-induced biosynthesis / M. Blank, R. Goodman // *J. Cell. Physiol.* – 2004. – V.199, 33. – P. 359 – 363.
374. Blank, M. A mechanism for stimulation of biosynthesis by electromagnetic fields: charge transfer in DNA and base pair separation / M. Blank, R. Goodman // *J. Cell. Physiol.* – 2008. – V. 214. – P. 20 – 26.
375. Svidlov, A. DNA dynamics under periodic force effects / A. Svidlov, M. Drobotenko, A. Basov, E. Gerasimenko, V. Malyshko, A. Elkina, M. Baryshev, S. Dzhimak // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2021. – V. 22. №15. – P. 7873. [https:// doi.org/10.3390/ijms22157873](https://doi.org/10.3390/ijms22157873)
376. 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
377. Tchurikov, N. A. Hot spots of DNA double-strand breaks and genomic contacts of human rDNA units are involved in epigenetic regulation / N.A. Tchurikov, D.M. Fedoseeva, D.V. Sosin, A.V. Snezhkina, N.V. Melnikova, A.V. Kudryavtseva, Y.V.

- Kravatsky, O.V. Kretova // *Journal of Molecular Cell Biology*. – 2015. – V. 7, №4. – P. 366 – 382. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mju038>
378. Wust, P. Non-thermal effects of radiofrequency electromagnetic fields / P. Wust, B. Kortüm, U. Strauss, J. Nadobny, S. Zschaecck, M. Beck, U. Stein, P. Ghadjar // *Scientific Reports*. – 2020. – V. 10, №1. – P. 13488. doi: 10.1038/ s41598-020-69561-3.
379. Lieber, M.R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway / M.R. Lieber // *Annual Review Biochem.* – 2010. – V.79. – P.181 – 211.
380. Buchachenko, A.L. Hydrogen isotope effects and atom tunneling / A.L. Buchachenko, E.M. Pliss // *Russ. Chem. Rev.* – 2016. – V. 85, № 6. – P. 557–564. DOI: <https://doi.org/10.1070/RCR4625>
381. 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. <https://doi.org/10.31083/j.fb12906218>
382. Morris, G. Redox regulation of the immune response / G. Morris, M. Gevezova, V. Sarafian, M. Maes // *Cell Mol. Immunol.* – 2022. – V.19, №10. – P.1079 – 1101.
383. Resende, R. Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Contacts Modulate Reactive Oxygen Species-Mediated Signaling and Oxidative Stress in Brain Disorders: The Key Role of Sigma-1 Receptor / R. Resende, T. Fernandes, A.C. Pereira, A.P. Marques, C.F. Pereira // *Antioxid. Redox Signal.* – 2022. – V.37, №10. – P. 758 – 780.
384. Джима́к, С.С., Изменение функциональной активности митохондрий, выделенных из клеток печени крыс, прошедших преадаптацию к сверхнизким концентрациям дейтерия / С.С. Джима́к, А.А. Басов, Н.Н. Волченко, А.А. Самков, Л.В. Федулова, М.Г. Барышев // *ДАН*. – 2017. – Т. 476, №5. – С. 584 – 587. DOI: 10.7868/S0869565217290230
385. Yaglova, N.V. Effects of Deuterium Depletion on Age-Declining Thymopoiesis *In Vivo* / N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, E.P. Timokhina, D.A. Tsomartova, V.V. Yaglov, S.V. Nazimova, E.S. Tsomartova, M.Y. Ivanova, E.V. Cheresheva, T.A.

- Lomanovskaya // Biomedicines. – 2024. – V. 12. – P. 956. DOI: 10.3390/biomedicines12050956
386. Губарева Е.А. Использование воды с измененным изотопным составом в протоколах децеллюризации / Е.А. Губарева, П. Макиаррини, М.Г. Барышев, Е.Е. Текуцкая, С.С. Джимак, М.В. Долгов // IT+ME2013. Abstr. for the XXI International conferention «New Information Technology in Medicine, biology, pharmacology and Ecology». Gurzuf. – 2013. – С. 229 – 231.
387. Текуцкая Е.Е., Онищенко Н.П., Лошкарев Г.Л., Софьина Л.И., Хосроева Д.А., Широкова С.В., Бендер Л.В., Коротько Г.Г. Способ применения биосорбента для выведения из организма тяжелых металлов / Патент на изобретение RU 2137399 C1, 20.09.1999. Заявка № 98106289/13 от 07.04.1998.
388. Джимак, С.С. Применение ЯМР-спектроскопии для определения низких концентраций нерадиоактивных изотопов в жидких средах / С.С. Джимак, А.А. Басов, Г.Ф. Копытов, Д.В. Кашаев, М.Е. Соколов, О.М. Арцыбашева, К.С. Шарапов, М.Г. Барышев // Известия высших учебных заведений. – 2015. – Т. 58, №7. – С. 47 52.
389. Текуцкая, Е.Е. Влияние переменного магнитного поля на хемилюминесценцию моноклеарных клеток периферической крови человека и производство провоспалительных цитокинов / Е.Е. Текуцкая, Л.Р. Гусарук, Г.П. Ильченко // Биофизика. – 2022. – Т. 67, №1. – С. 113 – 120.
390. Khalil, A. M. Cytogenetic effects of pulsing electromagnetic field on human lymphocytes *in vitro*: Chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and cell kinetics / A.M. Khalil, W. Qassem // Mutation Research. – 2006. – V. 2, № 15. – P. 141 – 146.
391. 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, №3. – С. 223 – 225.
392. Петров Р.В. Функционирование иммунной системы / Р.В. Петров // Иммунология. – 2007. – № 5. – С. 32 – 34.

393. Авдеева, М. Г. Виды иммунокомпетентных клеток и их функции / М.Г. Авдеева, М.Г. Шубич // Иммунология. – 2006. – Т.7. – С. 824 – 829.
394. Miyakhira A. Types of immune cells present in human PBMC Bioscience blog. – 2012 <http://technical.sanguinebio.com/types-of-immune-cells-present-in-human-pbmc/>
395. Владимиров, Ю. А. Биохемилюминесценция / Ю.А. Владимиров. – М.: Наука, 2000. – 302 с.
396. Feelisch, M. Systems redox biology in health and disease / M. Feelisch, M.M. Cortese-Krott, J. Santolini, S.A. Wootton, A.A. Jackson // EXCLI J. – 2022. – V. 21. – P. 623 – 646.
397. Zhang, B. Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation / B. Zhang, C. Pan, C. Feng, C. Yan, Y. Yu, Z. Chen, C. Guo, X. Wang // Redox Rep. – 2022. – V.27, №1. – P. 45 – 52.
398. Novikov, V. The Effects of Various Chemical Agents on Priming of Neutrophils Exposed to Weak Combined Magnetic Fields / V. Novikov, E. Yablokova, N. Novikova, E. Fesenko // Biophysics. – 2019. – V. 64. – С. 209 – 213.
399. Mahmoudinasab, H. Effects of extremely low-frequency electromagnetic field on expression levels of some antioxidant genes in human MCF-7 cells / H. Mahmoudinasab, F. Sanie-Jahromi, M. Saadat // Mol. Biol. Res. Commun. – 2016. – V. 5. – P. 77 – 85.
400. Александрова, Ю.Н. О системе цитокинов / Ю.Н. Александрова // Педиатрия. – 2007. – Т. 3. – С. 125 – 127.
401. Черешнев, В.А. Иммунология воспаления: роль цитокинов / В. А. Черешнев, Е.Ю. Гусев // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, № 3. – С. 361 – 368.
402. Смирнова, С.В. Иммунопатогенез псориаза и псориатического артрита / С.В. Смирнова, М.В. Смольникова // Медицинская иммунология. – 2014. – Т.16, №2. – С. 127 – 138.
403. Новоселова, Т.В. Влияние *in vitro* и *in vivo* ряда ингибиторов сигнальных каскадов на продукцию цитокинов и сигнальных белков в макрофагах и лимфоцитах мышей / Т.В. Новоселова, О.В. Глушкова, С.Б. Парфенюк, М.О.

- Хренов, С.М. Лунин, Т.И. Смолихина, Е.Е. Фесенко, Е.Г. Новоселова // Биофизика. – 2014. – Т. 59, №1. – С.112 – 117.
404. Gomez-Ochoa, I. Pulsed electromagnetic fields decrease proinflammatory cytokine secretion (IL-1beta and TNF-alpha) on human fibroblast-like cell culture / I. Gomez-Ochoa, P. Gomez-Ochoa, F. Gomez-Casal, E. Cativiela, L. Larrad-Mur // Rheumatol. Int. – 2011. – V.3. – P. 1283 – 1289.
405. Xueging, B. The Role of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1 in Inflammation. Reviewe / B. Xueging, L. Aguilera-Aguirre, Q.T.A.N. Rashid, A. Basci, Z. Radak, S. Sur, K. Hosoki, M.L. Hegde, I. Boldogh // International Journal Molecular Sciences. – 2014. – V. 15, №9. – P. 16975 – 16997.
406. Bruner, S.D. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA / S.D. Bruner, D.P.G. Norman, G.L. Verdine // Nature. – 2000. – V. 403, № 6772. – P. 859 – 866.
407. Кубанов, А.А. Врожденный буллезный эпидермолиз: особенности регенерации эпидермиса и методы терапии / А.А. Кубанов, А.Э. Карамова, В.И. Альбанова, В.В. Чикин, Е.С. Мончаковская // Вестник дерматологии и венерологии. – 2017. – Т. 4. – P. 28 – 37. DOI-<https://doi.org/10.25208/0042-4609-2017-0-4-22-27>
408. Shinkuma, S. Dystrophic epidermolysis bullosa: a review / S. Shinkuma // Clinikal, cosmetic and Investigational Dermatology. 2015. – V.8. – P. 275 – 284. doi:10.2147/CCID.S54681.
409. Cutlar, L. Gene therapy: pursuing restoration of dermal adhesion in recessive dystrophic epidermolysis bullosa / L. Cutlar, U. Greiser, W. Wang // Experimental Dermatology. – 2014. – V. 23. – P. 1 – 6. doi:10.1111/exd.12246
410. Kiritsi, D. Mechanisms of Natural Gene Therapy in Dystrophic Epidermolysis Bullosa / D. Kiritsi, M. Gacia, R. Bra nder, C. Has, R. Meijer, M. Jose Escámez, J. Kohlhase, P.C. van den Akker, H. Scheffer, M.F. Jonkman, M. Del Rio, L. Bruckner-Tuderman, A.M.G. Pasmooij // Journal of Investigative Dermatology. – 2014. – V. 134. – P. 2097 – 2104.
411. 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 DOI: 10.25207/1608-6228-2020-27-5-88-99
412. Yakovchuk, P. Base-stacking and base-pairing contribution into thermal stability of the DNA double helix / P. Yakovchuk, E. Protozanova, M.D. Frank-Kamenetskii // *Nucleic Acids Research*. – 2006. – V. 34, №2. – P. 564. DOI: 10.1093/nar/gkj454
413. Страйер Л. Биохимия, Т.3. / Л. Страйер. – Москва: Мир, 1985. – 310 с.
414. Полтев, В.И., Анализ конформационных особенностей фрагментов Уотсон-Криковских дуплексов методами молекулярной механики и квантовой механики / В.И. Полтев, В.М. Анисимов, К. Санчес, А. Дерябина, Е. Гонсалес, Д. Гарсиа, Ф. Ривас, Н.А. Полтева // *Биофизика*. – 2016. – Т.61, № 2. – С. 259 – 269.
415. Frank-Kamenetskii, M. D. Torsional and bending rigidity of the double helix from data on small DNA rings / M.D. Frank-Kamenetskii, A.V. Lukashin, V.V. Anshelevich // *J. Biomol. Struct. Dynam.* – 1985. – P. 1005 – 1012.
416. Штаркман, И.Н. Влияние аминокислот на образование перекиси водорода и гидроксильных радикалов в воде и 8-оксогуанина в ДНК при воздействии рентгеновского излучения / И.Н. Штаркман, С.В. Гудков, А.В. Черников, В.И. Брусков // *Биофизика*. – 2008. – Т.73, №4. – С. 576 – 586.
417. Di Mascio, P. Singlet molecular oxygen reactions with nucleic acids, lipids, and proteins / P. Di Mascio, G.R. Martinez, S. Miyamoto, G.E. Ronsein, M.H.G. Medeiros, J. Cadet // *Chem. Rev.* – 2019. – V. 119, №3. – P. 2043 – 2086.
418. Ravanat, J.-L. Reactivity of singlet oxygen with DNA, an update / J.-L. Ravanat, E. Dumont // *Photochem. Photobiol.* – 2022 – V. 98, №3. – P. 564 – 571.
419. Буторина, Д.Н. Исследование кинетических параметров синглетного молекулярного кислорода в простых моделях биологических систем: дисс. канд. физ.-мат. наук / Буторина Д.Н. – Москва, 2005.
420. Tekutsкая, Е.Е. Changes in free radical processes under the influence of low-frequency electromagnetic field in rats / Е.Е. Tekutsкая, I.S. Ryabova, S.V. Kozin,

К.А. Popov, V.V. Malyshko // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2022. – V. 172, № 5. – P. 566 – 570. DOI: [10.1007/s10517-022-05434-1](https://doi.org/10.1007/s10517-022-05434-1)

421. Лобкаева, Е.П. Концептуальный подход к низкочастотной магнитотерапии опухолевых процессов в организме / Е.П. Лобкаева, А.Г. Коноплянников, Н.С. Девяткова, И.А. Синельникова, О.М. Лобынцева // Человек и электромагнитные поля. Сборник докладов V Международной конференции: – Саров: ФГУП РФЯЦ-ВНИИЭФ. – 2017. – С. 264 – 284.

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 фармакодинамики и изменения свойств водных растворов активных фармацевтических ингредиентов 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. Продемонстрировано 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 pharmacodynamics and 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 fields.

Приложение 1. Программа для ЭВМ расчета содержания перекисных соединений в водных растворах ДНК от частоты ЭМП

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Кубанский государственный университет»
(ФГБОУ ВО «КубГУ»)**

ПРОГРАММА ДЛЯ ЭВМ

Программа расчета зависимости содержания перекиси водорода в водных растворах ДНК от частоты магнитного поля

Полный текст программы для ЭВМ

Листов 7

**Авторы:
Текуцкая Е.Е.
Ильченко Г.П.
Значко В.Н.
Беженар М.В.**

Краснодар 2023

```
#!/usr/bin/python
""" Hydrogen peroxide content
    Программа расчета зависимости концентрации перекиси водорода
    от частоты магнитного поля
    Выполняется поиск экстремумов концентрации и соответствующих им
    значений частот магнитного поля

from math import sqrt
import numpy as np
from scipy.optimize import minimize

import matplotlib.pyplot as plt
from matplotlib.figure import Figure
from matplotlib.backends.backend_tkagg import FigureCanvasTkAgg

import sys
if sys.version_info[0] < 3:
    from Tkinter import *
    from Tkinter import filedialog as fd
    from Tkinter.messagebox import OK, INFO, showinfo
else:
    from tkinter import *
    from tkinter import filedialog as fd
    from tkinter.messagebox import OK, INFO, showinfo

# глобальные переменные
stitle = "Hydrogen peroxide content"
datafilename = "data1.txt" # файл с экспериментальными данными
edatafilename=None        # редактор с именем файла
window = None
out  = None
fig  = None
idx  = []
f0   = None

# GUI. Обработчики событий

# завершить работу
def quit():
    window.quit()    # stops mainloop
```

```
window.destroy() # this is necessary on Windows to prevent 'Fatal Python Error:
PyEval_RestoreThread: NULL tstate'
```

```
# диалог выбора имени файла
```

```
def dlg_selectfile():
    global datafilename
    global edatafilename
    name = fd.askopenfilename(initialdir = ".",
                              title = "Выбор файла с экспериментальными данными")
    if name != "":
        datafilename = name
        edatafilename.config(state= "normal")
        edatafilename.delete(0,END)
        edatafilename.insert(0,datafilename)
        edatafilename.config(state= "disabled")
        print(name)
```

```
# расчет и отрисовка
```

```
def run():
    runPlot(out)
```

```
# построение и пуск интерфейса
```

```
def runGUI():
    global window # главное окно
    global out     # объект для вывода графиков
    global fig
    global datafilename
    global edatafilename

    window = Tk()
    window.title(stitle)

    f1 = Frame(window)
    f1.grid(row=1, column=1, sticky=N, padx=10, pady=10)

    Button(f1, text='File ...', width=9, command=dlg_selectfile).grid(row=5, column=0,
columnspan=2)
    Button(f1, text='Run \u27a4', width=9, command=run).grid(row=6, column=0,
columnspan=2)
    Button(f1, text='Quit \u00d7', width=9, command=quit).grid(row=7, column=0,
columnspan=2)

    fig = Figure(figsize=(9, 6), dpi=100)
```

```

out = fig.add_subplot(111)
out.grid(True)

canvas = FigureCanvasTkAgg(fig, master=window)
canvas.get_tk_widget().grid(row=1, column=0)

#Label(window, text='\u03bc').grid(row=2, column=0)
edatafilename = Entry(master=window, width=90)
edatafilename.delete(0,END)
edatafilename.insert(0,datafilename)
edatafilename.config(state= "disabled")
edatafilename.grid(row=2, column=0)

window.mainloop()

```

```

def fun(a, h, f0, f, d):
    return a * h / sqrt( (f0**2 - f**2)**2 + 4 * d**2 * f**2)

```

```

def readcol(fn, n):
    """
    читаем произвольный столбец чисел из матрицы в текстовом файле
    :param fn str: имя файла
    :param n int: номер столбца с числами (0-based)
    :return list[float]: список прочитанных чисел
    """
    with open(fn) as file:
        a = [ string.split('\t')[n] for string in file.readlines() ]
        return [ float(x) for x in a ]

```

```

def targ(x):
    """
    целевая функция для оптимизации
    расхождение между экспериментом и аппроксимацией
    """
    global X, Y, f0, idx
    YC = [fun(x[0], 400.0, f0, f, x[1]) for f in X[idx]]
    #return np.dot(YC-Y[idx], YC-Y[idx])
    return np.dot((YC-Y[idx])/YC, (YC-Y[idx])/YC)

```

```

def findExt(fn):

```

```

"""
поиск индексов экстремумов концентраций
:param fn str: имя файла с экспериментальными данными
:return list[list[float]]: списки индексов минимумов и максимумов
    а также экспериментальные данные
"""

# чтение данных и преобразование в массив numpy
freq = np.array(readcol(fn, 0))
conc = np.array(readcol(fn, 1))
# индексы максимумов (крайние точки тоже максимумы)
ima = (conc[1:-1] > conc[:-2]) & (conc[1:-1] > conc[2:])
ima=np.concatenate([np.array([True]), ima, np.array([True]) ])
print(ima)
# индексы минимумов
imi = (conc[1:-1] < conc[:-2]) & (conc[1:-1] < conc[2:])
imi=np.concatenate([np.array([False]), imi, np.array([False]) ])

imin = list(np.where(imimi==True)[0])
imax = list(np.where(ima==True)[0])

# проверка
#print('min:', imin, 'freq:', freq[imin], 'conc:', conc[imin])
#print('max:', imax, 'freq:', freq[imax], 'conc:', conc[imax])

return imin, imax, freq, conc

def runPlot(out):
    global fig
    global datafilename
    global X, Y, idx, f0
    out.cla()

    # экспериментальные данные
    X, Y = np.array(readcol('data1.txt', 0)), np.array(readcol('data1.txt', 1))
    out.bar(X, Y, label="experiment")

    # индексы экстремумов для экспериментальных данных, сами данные
    imin, imax, freq, conc = findExt('data1.txt')

    msg = 'Freq \t a \t d\r\n'
    for i in range(len(imax)):
        print('Maximum %d processing' % i)
        f0 = freq[imax[i]]

```

```

print('f0 =', f0)
# индексы данных для каждой аппроксимирующей функции
a = imin[i-1] if i>0 else 0
b = imin[i] if i<len(imax)-1 else len(conc)-1
idx = list(range(a, 1+b))
print('data indexes', idx)

x0 = [10, 2]
res = minimize(targ, x0, method='SLSQP', tol=1e-6)
print(res)
x = res.x
msg += '%.1f\t %.2f\t %.2f\r\n' % (f0, x[0], x[1])
xx = np.linspace(X[idx[0]], X[idx[-1]], 150)
Y2 = [fun(x[0], 400.0, f0, f, x[1]) for f in xx]
out.plot(xx, Y2, label='F0='+str(freq[imax[i]]))
print("")

# оформление результата
out.set_title('Зависимость концентрации перекиси водорода от частоты МП')
out.set_xlabel('Частота')
fig.supxlabel('Частота')
out.set_ylabel('Концентрация перекиси водорода, мкг/л')
out.legend().get_frame().set_alpha(0.5)

# обновление рисунка в окне
fig.canvas.draw()

showinfo(title="Maximums", message="Founded maximums (frequencies and
parameters)",
         detail=msg, icon=INFO, default=OK)

if __name__ == '__main__':
    runGUI()

```

Приложение 2. Проект ОФС. 1.2.3.00XX

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕЙТЕРИЯ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ МЕТОДОМ ЯМР

Метод количественного определения дейтерия (^2H) в водных растворах основан на использовании спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) с применением лантаноидного сдвигающего реагента (ЛСР) – трифторсульфоната европия (III) $(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3\text{Eu}$, индуцирующего парамагнитный сдвиг и добавляемого в зонд в качестве внешнего ЯМР стандарта, относительно которого проводится измерение, и сравнении измеренной интегральной интенсивности соответствующего сигнала в ЯМР спектре, полученного от исследуемого образца, с интегральной интенсивностью ЯМР сигнала эталона известного состава, при идентичных аналитических условиях.

Область применения

Метод количественного определения дейтерия применим для воды и водных растворов природного происхождения, лабораторного и промышленного производства.

Оборудование

Оборудованием служит импульсный спектрометр ЯМР (ЯМР-спектрометр) с высокой разрешающей способностью и индукцией постоянного магнитного поля, равной 9,389766 Тл, диапазоном частот от 10 до 400 МГц, с шагом 0,01 Гц или аналогичный с параметрами не ниже.

Верификация ЯМР-спектрометра включает соответствующие испытания, включающие определение резонансной частоты ядер ^2H , равной 61,37 МГц (настраиваемый параметр); чувствительности для ^1H : ≥ 220 (для 0,1 % раствора этилбензола в дейтерохлороформе); дрейфа постоянного магнитного поля: менее 4 Гц/час; ширину ^1H ЯМР сигнала на полувысоте: не более 0,45 Гц (для 0,1 % раствора этилбензола в дейтерохлороформе).

Методика количественной ЯМР-спектроскопии дейтерия

Оптимальные параметры ЯМР-спектрометра для измерений на ядрах ^2H составляют: усиление 60; смещение 5 м.д.; развёртка 10 м.д.; время наблюдения спада свободной индукции 6 сек; число сканирований 256; релаксационная задержка $10 \cdot T_1(\text{D}_2\text{O}) \geq 7$ сек; температура внутри резонатора 25 °С.

Запись спектра должна проводиться без вращения образца в спектрометре, во избежание возникновения дополнительных погрешностей в определении изотопных соотношений.

Исследуемое вещество помещают в откалиброванную ампулу для ЯМР-спектроскопии диаметром $(4,97 \pm 0,01)$ мм и длиной 178 мм, с последующим введением эталонного образца, содержащего водный раствор лантаноидного сдвигающего реагента (ЛСР, безводный и водорастворимый трифторсульфонат европия (III) $(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3\text{Eu}$) и воды с известным содержанием дейтерия, в виде запаянной внутренней ЯМР-ампулы меньшего диаметра. Подготовленную систему ампул опускают в ЯМР-спектрометр и регистрируют спектр на ядрах дейтерия. Времена спин-решёточной и спин-спиновой электронной релаксации T_{1e} и T_{2e} ЛСД короткие и составляют 10^{-12} - 10^{-13} секунд. В эталонном образце концентрация $(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3\text{Eu}$ должна составлять $(0,045 \pm 0,005)$ моль/л, а содержание дейтерия должно соответствовать исследуемому диапазону концентраций дейтерия измеряемого объекта.

Все эксперименты в рамках серии образцов, включая калибровочные, проводятся в одинаковых условиях ЯМР-измерений и с одинаковыми настройками прибора.

После помещения образца в основную ЯМР-ампулу, с последующим введением внутренней ЯМР-ампулы и укупорки, образец вводят в магнит ЯМР-спектрометра. Проводят установку параметров испытания: настройки, регистрации, оцифровки сигнала спада свободной индукции. Основные параметры испытания, приводимые в фармакопейной статье, записывают или сохраняют в компьютере.

Величину относительного химического сдвига ядер дейтерия (δ) определяют согласно ОФС. 1.2.1.1.0007 «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса».

Парамагнитный химический сдвиг ядер дейтерия составляет $(1,1 \pm 0,1)$ м.д. и одинаков для всего диапазона концентраций дейтерия от природного, составляющего около 0,015%, до дейтерия, содержащегося в тяжёлой воде - 98%.

На ЯМР-спектрах регистрируют два разнесённых по шкале химических сдвига ЯМР-сигналов – от дейтерия воды с растворённым в ней ЛСР, которая находится во внутренней вставке, и от дейтерия исследуемого образца, находящегося в ампуле для ЯМР-спектроскопии.

Для количественного определения дейтерия используют калибровочные образцы чистой воды (с содержанием примесей не более 0.01 % по массе) с известным содержанием дейтерия, стандартизированные в соответствии с международным стандартом, введённым МАГАТЭ VSMOW и SLAP. Строят калибровочную кривую зависимости интегральной интенсивности (ИИ) (площади под кривой сигнала ЯМР) от содержания дейтерия в ppm относительно внутреннего стандарта. Методом наименьших квадратов находят линию тренда в линейных координатах $y = k \cdot x + b$, где y – ИИ; x - содержания дейтерия в ppm; k, b – коэффициенты линейной аппроксимации.

Используя полученную калибровочную зависимость и исходя из измеренных значений ИИ исследуемых образцов определяют содержание дейтерия в измеряемых образцах, подставляя соответствующие ИИ в уравнение аппроксимации калибровочной прямой.

