Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «УРАЛЬСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ПЕРВОГО ПРЕЗИДЕНТА РОССИИ Б.Н. ЕЛЬЦИНА»
(ФГАОУ ВО УрФУ)

УДК 544.431.15
Рег. №

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель проректора по науке ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина»
_____ В.В. Кружаев
«30» Сентября 2026 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ И ОПЫТНО-КОНСТРУКЦИОННОЙ РАБОТЕ

«Исследование процессов образования свободных радикалов в водных средах методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) при воздействии ультразвукового генератора "Фотек ACTITON»

Руководитель НИОКР
Зав. лабораторией, канд.хим.наук _____ К.В. Гржегоржевский

Екатеринбург 2026

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»:

Руководитель НИОКР,

Зав. лабораторией, канд. хим. наук — подпись, дата — К.В. Гржегоржевский (введение, основная часть, заключение)

Исполнители:

Лаборант-исследователь, — подпись, дата — А.Е. Левченко (результаты испытаний)

Старший научный сотрудник — подпись, дата — М.Ю. Артёмов (методики исследований, результаты испытаний)

РЕФЕРАТ

Отчет 23 с., 2 рис., 4 табл., 5 источн.

Ключевые слова: ультразвук, свободные радикалы, электронный парамагнитный резонанс.

Отчет содержит результаты по исследованию процессов образования свободных радикалов, регистрируемых с помощью метода ЭПР-спектроскопии, в водных растворах в процессе их обработки ультразвуковым генератором производства компании ООО «ФОТОЕК» модель ACTITON.

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ....4
ПЕРЕЧЕНЬ ОПРЕДЕЛЕНИЙ, СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ....5
ВВЕДЕНИЕ....6
ОБЪЕКТЫ И МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ....7
Объект исследования....7
Методы исследования....7
РЕЗУЛЬТАТЫ....9
Таблица №1. Влияние условий эксперимента на интенсивность сигнала ЭПР от DMPO-OH. Режим №1....10
Таблица №2. Влияние условий эксперимента на интенсивность сигнала ЭПР от DMPO-OH. Режим №2....14
Таблица №3. Влияние условий эксперимента на интенсивность сигнала ЭПР от DMPO-OH. Режим №3....15
ОБСУЖДЕНИЕ....19
ЗАКЛЮЧЕНИЕ....22
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ....23

ПЕРЕЧЕНЬ ОПРЕДЕЛЕНИЙ, СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

УЗ – ультразвук

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

DMPO - 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксид

TEMP - 2,2,6,6-тетраметилпиперидин

мкл – микролитр

NaCl – хлорид натрия

Гс – Гаусс

Гц – Герц

ГГц – Гигагерц

у.ед. – условны единицы

MAPK - Mitogen-Activated Protein Kinase

ВВЕДЕНИЕ

Процесс обработки ран водными растворами (дистиллированная вода и 0.9% раствор NaCl), подвергающимися *in situ* воздействию ультразвука, широко используется в медицинской практике для санации ран в хирургии, профилактике ЛОР заболеваний и промотированию регенеративного эффекта в урологии и гинекологии. Однако, несмотря на известный механизм воздействия УЗ на водные среды, заключающийся в образовании и кавитации микропузырьков, ответственных за микромассажный эффект мягких тканей, влияние такой обработки на молекулярном уровне остается не изученным в полной мере. Эффекты противомикробного, асептического, регенеративного действия, косвенно указывающие на наличие сложных биохимических процессов при воздействии УЗ, в частности, при использовании приборов компании ООО «Фототек» типа ACTITON, нуждаются в исследовании молекулярной природы тех частиц, которые могут возникать в водной среде под действием ультразвука.

В связи с этим цель выполненной НИР — регистрация сигналов от свободных радикалов в водных растворах (дистиллированная вода и 0.9% раствор NaCl) методом ЭПР-спектроскопии после или в процессе воздействия УЗ-излучения, а также исследования влияния режима УЗ-обработки, времени и мощности воздействия.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования

Водные растворы (дистиллированная вода и 0.9% раствор NaCl), прошедшие обработку УЗ с помощью прибора ACTITON (производитель ООО «Фотек», рис.1) в различных режимах работы. Дистиллированная вода получена на аквадистилляторе электрический Liston A 1204. Раствор 0.9% NaCl предоставлен компанией ООО «Фотек» в заводской упаковке. Прибор был снабжен насадкой, позволяющий проводить обработку растворов с помощью УЗ в погружном режиме (кавитационное барботирование раствора) и в режиме бесконтактного распыления раствора.



Рисунок 1 – прибор ACTITON (производитель ООО «Фотек»)

Методы исследования

Для проведения экспериментов по генерации свободных радикалов контролировались следующие параметры:

1.Тип раствора - дистиллированная вода или 0.9% раствор NaCl;

2.Вид УЗ-воздействия – бесконтактное распыление раствора или кавитационное барботирование раствора;

3.Объем приемного раствора;

4.Глубина погружения насадки в раствор;

5.Рабочие параметры УЗ-генератора (мощность, время воздействия);

6.Наличие радикальных ловушек (TEMP, DMPO), способ их введения (перед или после воздействия УЗ) и концентрация;

7.Статический (без циркуляции приемного раствора) и динамический режимы (циркуляция приемного раствора через УЗ-насадку с помощью перистальтического насоса).

Регистрация радикалов проводилась посредства записи ЭПР-спектров в кварцевых капиллярах (40 мкл) на ЭПР-спектрометре EMX Plus (Bruker, Германия) в диапазоне значений магнитного поля от 3475 до 3575 Гс, частота микроволнового резонатора 9.879124 ГГц, число сканов от 1 до 10 на каждый спектр.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Процесс регистрации свободных радикалов можно разделить на несколько этапов:

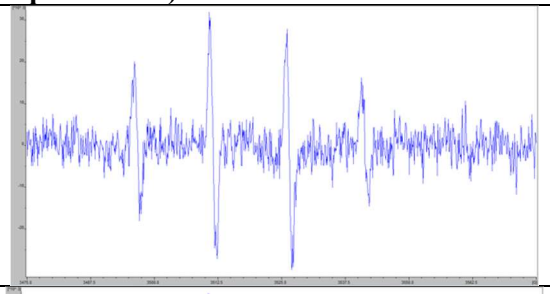
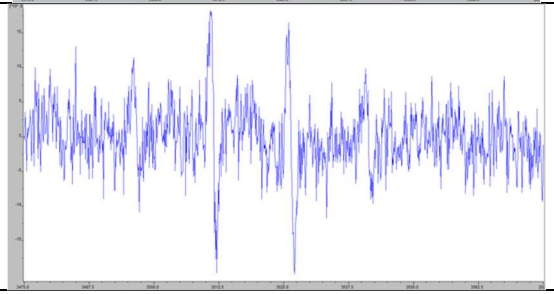
1.Генерация короткоживущих радикалов в водной среде (дистиллированная и раствор NaCl) под действием УЗ: $O_2^{\cdot-}$ (супероксид радикал), HO· (гидроксильный радикал), Cl· (хлор радикал);

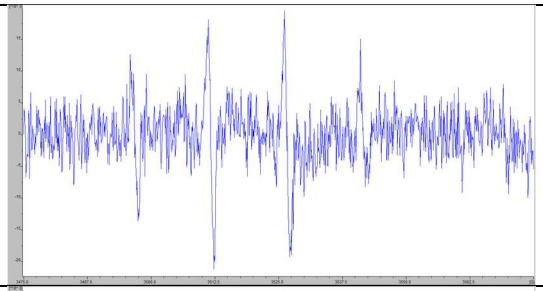
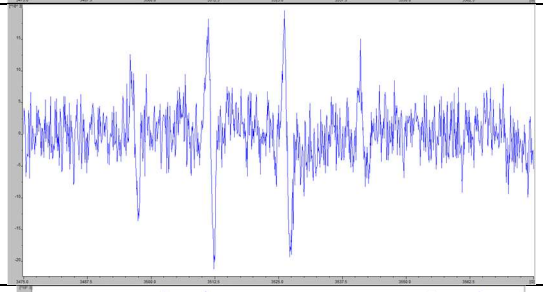
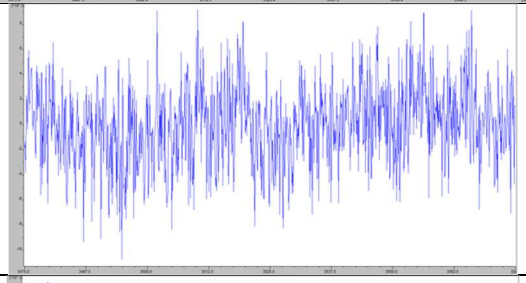
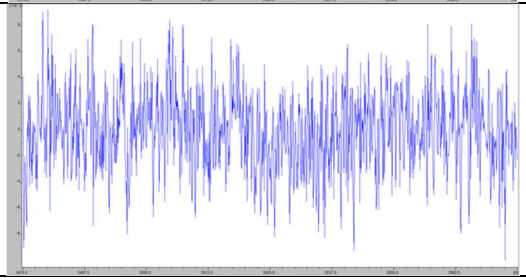
2.Захват радикала молекулой-ловушкой (TEMP или DMPO), в результате которого образуется устойчивый долгоживущий радикал (TEMPO или DMPO-OH);

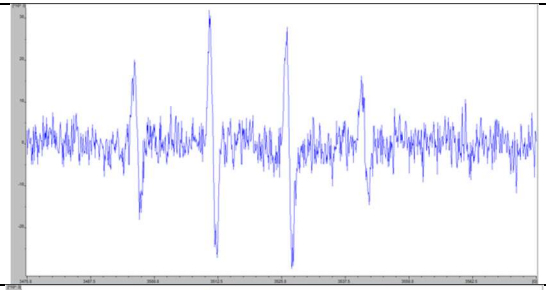
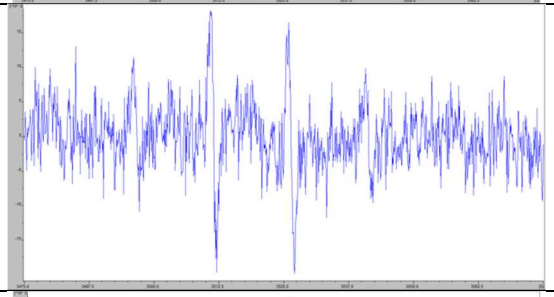
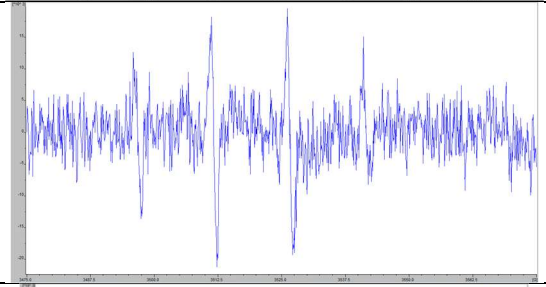
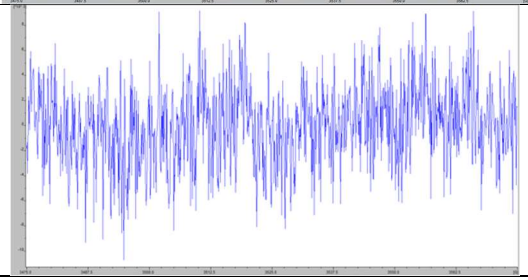
3.Регистрация долгоживущего радикала методом ЭПР-спектроскопии.

В таблицах 1-3 представлены зависимости интенсивности сигналов свободных радикалов (DMPO-OH) от условий эксперимента. Проведение аналогичных опытов с использованием в качестве радикальной ловушки молекулы TEMP не показало наличие радикалов в растворе (24 эксперимента), в отличие от случая с DMPO (34 эксперимента), что косвенно указывает на природу радикальных частиц, которые образуются под действием УЗ-излучения, - гидроксильные радикалы. DMPO известен тем, что преимущественно реагирует именно с этими радикальными частицами [1].

Таблица №1. Влияние условий эксперимента на интенсивность сигнала ЭПР от DMPO-OH. Режим №1.

№	Условия эксперимента								Результат	
	Название	**Вид воздействия**	**Раствор**	**Объем раствора, мл**	**Мощность УЗ, %**	**Время воздействия, мин**	**Добавление ловушки**	**Ловушка**	**Концентрация ловушки, мМ**	**График**	**Интенсивность, у.ед.**
Режим №1 с ультразвуком (насадка погружена в раствор на 17 мм)											
	Определение рабочей концентрации ловушки радикалов	кавитационное барботирование раствора	вода				сразу в растворе	DMPO			
											

											
											
											нет сигналов
											нет сигналов

			физ. раствор								
											
											
											нет сигналов

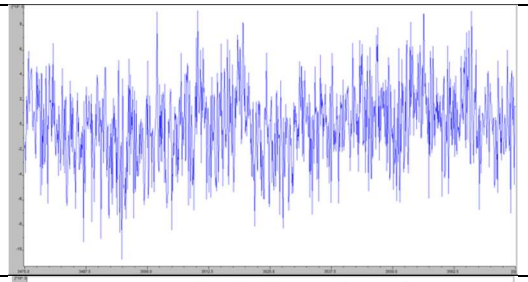
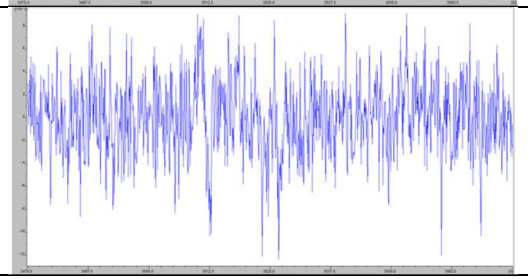
											нет сигналов
	Варьирование времени работы	кавитационное барботирование раствора	вода				сразу в растворе	DMPO			нет сигналов
	Варьирование мощности УЗ	кавитационное барботирование раствора	вода				сразу в растворе	DMPO			

Таблица №2. Влияние условий эксперимента на интенсивность сигнала ЭПР от DMPO-OH. Режим №2.

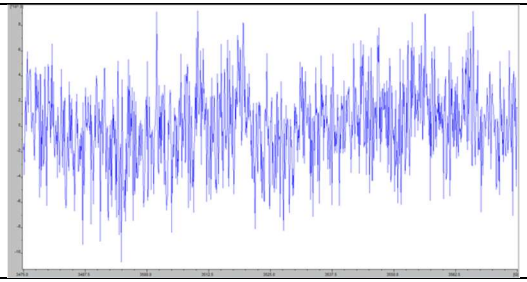
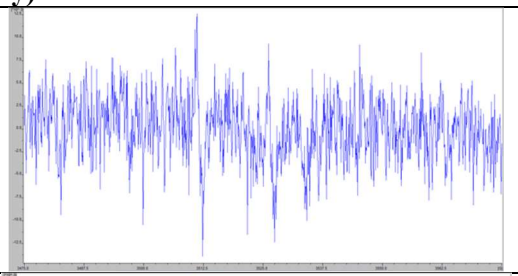
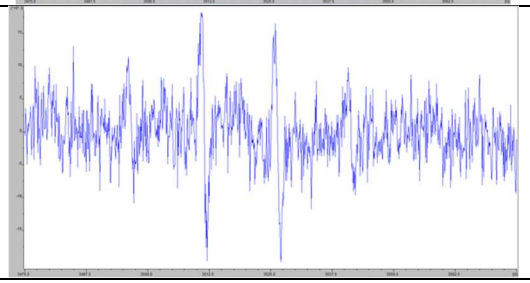
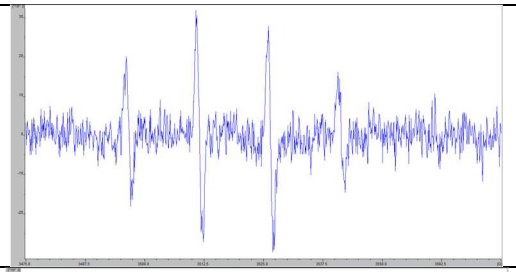
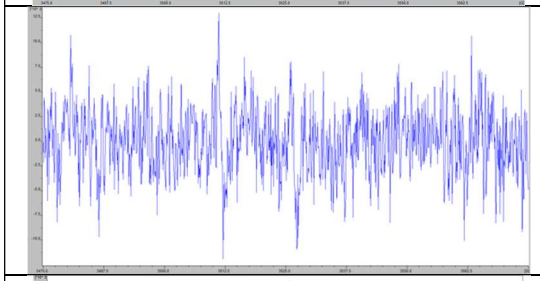
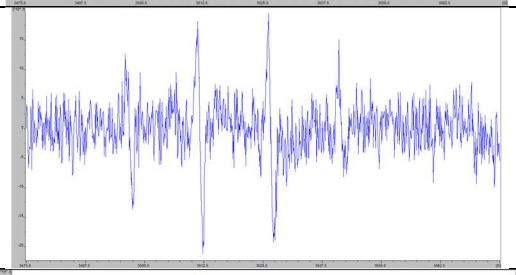
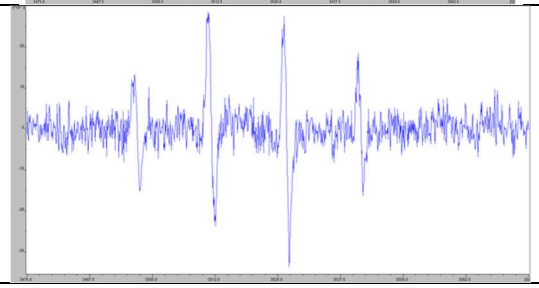
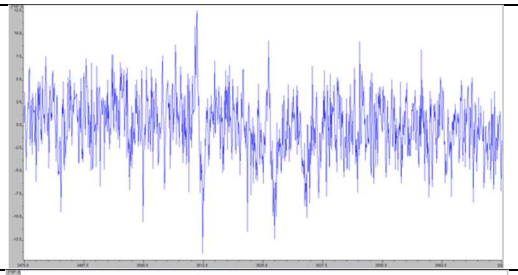
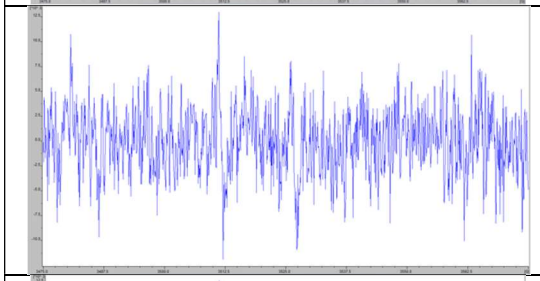
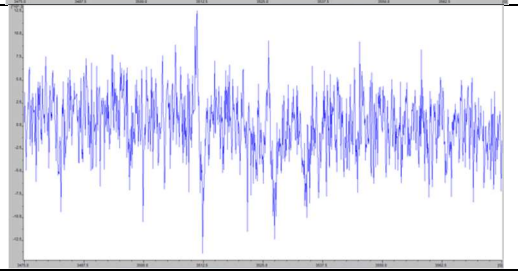
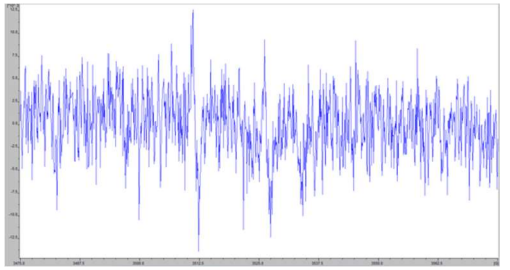
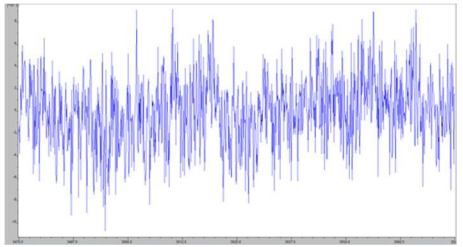
№	Условия эксперимента									Результат	
	Название	**Вид воздействия**	**Раствор**	**Объем раствора, мл**	**Мощность УЗ, %**	**Время воздействия, мин**	**Добавление ловушки**	**Ловушка**	**Концентрация ловушки, мМ**	**График**	**Интенсивность, у.ед.**
Режим №2 с ультразвуком (насадка в растворе на глубине 42 мм, приемный раствор подается через перистальтический насос со скоростью 50.7 мл/мин по кругу в насадку)											
	Варьирование времени работы	кавитационное барботирование раствора	вода				сразу в растворе	DMPO			нет сигналов
	Варьирование мощности УЗ	кавитационное барботирование раствора	вода				сразу в растворе	DMPO			

Таблица №3. Влияние условий эксперимента на интенсивность сигнала ЭПР от DMPO-OH. Режим №3.

№	Условия эксперимента								Результат	
	Название	**Вид воздействия**	**Раствор**	**Объем раствора, мл**	**Мощность УЗ, %**	**Время воздействия, мин**	**Добавление ловушки**	**Ловушка**	**Концентрация ловушки, мМ**	**График**	**Интенсивность, у.ед.**
Режим №3 с ультразвуком и распылением (насадка над раствором на высоте 28 мм, приемный раствор подается через перистальтический насос со скоростью 50.7 мл/мин по кругу в насадку)											
	Варьирование времени работы	бесконтактное распыление раствора	вода				сразу в растворе	DMPO			
											

											57.2
			физ. раствор								
											
											58.5

	Варьирование мощности	бесконтактное распыление раствора	вода				сразу в растворе	DMPO	1		
28											
29			физ. раствор								
30											

31	Определение времени добавления ловушки	бесконтактное распыление раствора	вода				через 30 сек после	DMPO			нет сигнала
32							через 1 мин после				
33							через 5 мин после				
34							через 10 мин после				

ОБСУЖДЕНИЕ

Первичный опыт был проведен в «режиме №1», когда насадка без защитного кожуха была погружена в малый объем приемного раствора (3 мм, глубина погружения 17 мм) с целью достичь высокой плотности УЗ-излучения при кавитационном барботировании. Согласно данным Таблицы 1 образование радикалов, предположительно, гидроксильных HO·, происходит при концентрации DMPO выше 1 мМ, мощности УЗ-генератора 80% и длительности воздействия 1 мин. Интенсивность сигнала от радикалов, захваченных спиновой ловушкой, увеличивается с ростом концентрации DMPO от 1 мМ до 50 мМ с 38 до 58 у.ед. для дистиллированной воды и с 39 до 60 у.ед. в случае 0.9% NaCl. Увеличение времени воздействия до 5-10 минут и уменьшение мощности до 20% приводит к исчезновению радикалов – ЭПР-сигнал отсутствует. Вероятно, небольшое увеличение ЭПР-сигнала при переходе от дистиллированной воды к 0.9% NaCl может быть связано с появлением хлор радикала, который может дальше приводить к образованию гидроксильного радикала, который, в свою очередь, уже реагирует с DMPO.

Недостатком «режима №1», как показал эксперимент, является сильное разбрызгивание раствора, что может приводить к искажению количественных результатов. Кроме того, при таком малом объеме приемного раствора не удается провести корректно эксперимент с насадкой в режиме бесконтактного распыления раствора, поскольку поступающая из распылителя жидкость существенно увеличивает объем приемного раствора, что приводит к постоянному изменению концентрации DMPO и невозможности дать количественную оценку образующихся радикалов.

Чтобы решить эту проблему нами была предложена альтернативная схема эксперимента – режим №2. В приемный раствор (50 мл) погружалась насадка (без кожуха, глубина погружения 42 мм). Приемный раствор циркулировал через насадку с помощью перистальтического насоса, который забирал жидкость из приемного раствора и возвращал ее обратно через верхнее отверстие в насадке УЗ-генератора. Скорость работы насоса составляла 50.7 мл/мин. Идея такой установки заключается в том, что в ходе работы УЗ-генератора процесс образования радикалов (в ходе кавитационного барботирования) выходит на стационарное равновесие, т.е. скорость образования радикалов и их захват ловушкой DMPO приходит в баланс со скоростью распада короткоживущих радикалов. В результате, DMPO должен поймать все возможные радикалы, которые будут накапливаться в процесс работы УЗ-генератора и циркуляции приемного раствора.

Как видно из данных таблицы 2, методом ЭПР-спектроскопии не удалось зарегистрировать образование радикальных частиц. Однако, используя туже схему эксперимента, но расположив зонд над раствором (на высоте 28 мм), когда реализуется режим бесконтактное распыление раствора в приемный раствор, который также циркулирует по кругу – режим №3, нами были успешно зарегистрировано образование радикальных частиц, которое протекает воспроизводимо и позволяет дать количественную оценку данного процесса (Таблица 3, рис.2).

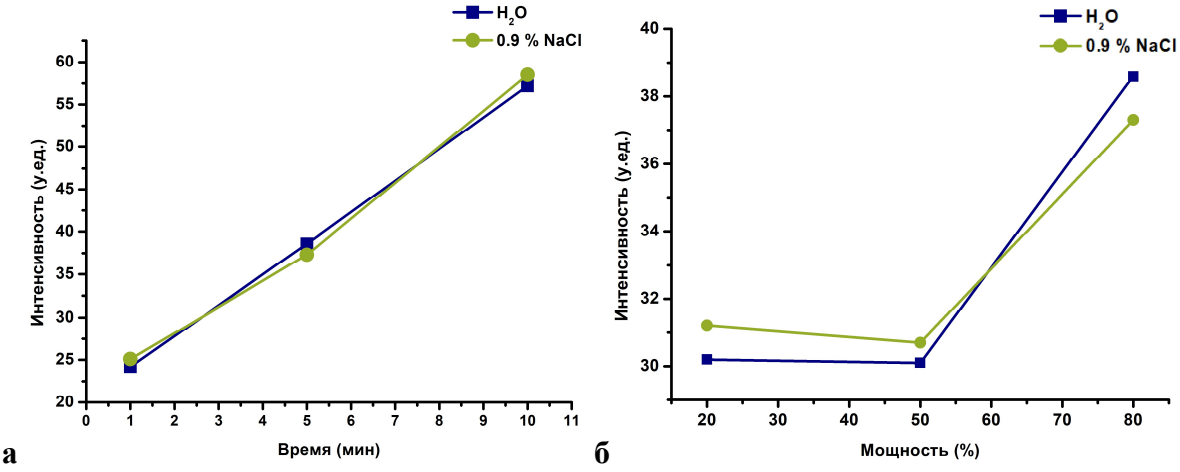


Рисунок 2 – Зависимость интенсивности ЭПР-сигнала радикалов DMPO-OH от времени воздействия (а) и мощности УЗ-генератора (б) при проведении экспериментов в режиме №3

При фиксированной мощности 80% интенсивность сигналов от DMPO-OH линейно растет с увеличением времени воздействия. В Случае варьирования мощности от 20 до 80% при постоянном времени УЗ-воздействия можно видеть, что существует пороговая зависимость, характеризующая нелинейный рост сигнала от свободно радикальных частиц выше 50% мощности. Кроме того, было показано, что присутствие DMPO в приемном растворе непосредственно до начала УЗ-облучения критически важно, чтобы поймать короткоживущие свободные радикалы – при добавлении DMPO после УЗ-воздействия обнаружить радикалы уже не удается.

ВЫВОДЫ

На основе полученные экспериментальных данных можно сделать следующие выводы:

1. При воздействии УЗ-генератора ACTITON (производства ООО «Фотек») на водные растворы (дистиллированная вода, 0.9% NaCl) происходит генерация свободных радикалов;
2. Образующиеся радикалы могут быть эффективно детектированы с помощью ловушки DMPO, которая переходит в стабильный радикал DMPO-OH, позволяя сделать вывод, что радикальные частицы – это гидроксильные радикалы [HO·];
3. Образование радикалов было зарегистрировано при кавитационном барботировании малого объема жидкости (3 мл) насадкой без защитного кожуха, а также при работе насадки в режиме бесконтактного распыления раствора в условиях циркуляции приемного раствора по замкнутому циклу. В обоих случаях общим является образование большого количества капель (аэрозоль), что указывает, косвенно, что в процессе образования радикалов под действием УЗ происходит с участием границы раздела воздух/раствор. Этот вывод подтверждается отсутствием сигналов от радикальных частиц при погружении зонда в раствор большого объема (50 мл) при циклической циркуляции и отсутствии образования капель и аэрозоля;
4. Время воздействия УЗ-насадкой в режиме бесконтактного распыления раствора линейно коррелирует с ростом интенсивности сигналов от свободных радикалов, приводя к увеличению их концентрации в 2.4 раза при переходе от 1 мин к 10 мин воздействия;
5. Влияние мощности УЗ-генератора на концентрацию образующихся радикалов имеет нелинейный характер, что может быть связано как с влиянием мощности на размер капель аэрозоля (более мелкодисперсный аэрозоль имеет большую поверхность раздела раствор/воздух), а также с влиянием на процесс образования и кавитации микропузырьков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя, можно сделать заключения, что поставленная цель исследования достигнута в полном объеме – установлена качественная и количественная связь между режимами работы УЗ-генератора ACTITON (производства ООО «Фотек») и эффективностью процесса образования активных радикальных форм с использованием ЭПР-спектроскопии. В свою очередь, это позволяет подтвердить высказанную гипотезу о молекулярном механизме, который может вносить существенный вклад в терапевтический эффект от использования данного прибора в медицинской практике, имеющей независимое документально подтверждение в рамках клинических наблюдений.

Из литературных данных по лечению хронических диабетических ран и по анализу процессов регенерации кожных дефектов известно, что активные формы кислорода и другие короткоживущие радикалы, такие как [HO·], могут влиять на пролиферацию клеток и ангиогенез через путь MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) [2,3]. Причина такой связи заключается в способности кислород-содержащих радикалов окислять тиольные группы в аминокислоте цистеин, формируя дисульфидные мостики, влияющие на конформацию белка и промотирующие его функционирование или ингибирующие его активность. В одном из возможных ключевых этапов этого биохимического пути может участвовать p38 MAPK, которая приводит к выработке активных форм кислорода, которые, в свою очередь, могут вызывать усиленную клеточную пролиферацию [4,5]. Однако, учитывая, что высокие дозы радикальных частиц могут быть факторами мутагенности, то активная пролиферация в данных условиях может иметь негативные последствия, что также отмечено в литературе [5].

В случае экспериментов, описанных в данном отчете, при воздействии УЗ-генератора концентрация возникающих радикалов, в сравнении с фотоиндуцированными процессами образования радикалов, например, в насыщенном водном растворе рибофлавина (витамин Б2), отличается на порядки и, вероятно, позволяет заключить, что воздействие УЗ-генератором ACTITON (производства ООО «Фотек») находится в допустимом терапевтическом концентрационном окне, способствуя активации процессов регенерации тканей в месте воздействия [6]. Для установления точной концентрации радикалов в водном растворе под действием УЗ-генератора требуется проведение дополнительных экспериментов с использованием калибровочных стандартов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rutely C. B.C. et al. Towards reliable quantification of hydroxyl radicals in the Fenton reaction using chemical probes // RSC Adv. 2018. Vol. 8, № 10. P. 5321–5330.

2. Uddin T. et al. Reactive oxygen species (ROS) in cancer: from redox signaling and metabolic plasticity to therapeutic vulnerabilities // Explor. Target. Anti-tumor Ther. 2026. Vol. 7. P. 1–28.

3. Guo Y.-L. et al. Crosstalk between oxidative stress and inflammatory pathways: Natural therapeutic approaches for diabetic wound healing // World J. Diabetes. 2025. Vol. 16, № 11. P. 1–21.

4. Mavrogonatou E., Konstantinou A., Kletsas D. Long-term exposure to TNF-α leads human skin fibroblasts to a p38 MAPK- and ROS-mediated premature senescence // Biogerontology. Springer Netherlands, 2018. Vol. 19, № 3–4. P. 237–249.

5. della Volpe L. et al. A p38 MAPK-ROS axis fuels proliferation stress and DNA damage during CRISPR-Cas9 gene editing in hematopoietic stem and progenitor cells // Cell Reports Med. 2024. Vol. 5, № 11. P. 101823.

6. Ukaegbu K., Allen E., Svoboda K.K.H. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Wound Healing: Mechanisms and Therapeutic Potential // Int. Wound J. 2025. Vol. 22, № 5.