

КИНЕТИКА ДЛИТЕЛЬНОЙ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ЭРИТРОЗИНА В ТКАНЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ *in vitro*

© 2024 г. С.Н. Летута*, А.Т. Ишемгулов*,[#], М.А. Сеньчукова**

*Оренбургский государственный университет, просп. Победы, 13, Оренбург, 460018, Россия

**Оренбургский государственный медицинский университет, Советская ул., 6, Оренбург, 460000, Россия

[#]E-mail: azamat.ischemgulov@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.02.2024 г.

После доработки 28.03.2024 г.

Принята к публикации 03.04.2024 г.

Исследована *in vitro* кинетика замедленной флуоресценции и фосфоресценции фотосенсибилизатора эритрозина во фрагментах нормальных тканей и злокачественных опухолей молочной железы пациенток онкологического диспансера. Показано, что кинетика замедленной флуоресценции красителя формируется как суперпозиция сигналов термоактивированной люминесценции и свечения, возникающего в результате синглет-триплетной аннигиляции молекул фотосенсибилизатора и синглетного кислорода. Обнаружено тушение аннигиляционной составляющей замедленной флуоресценции при возбуждении молекул серией из n импульсов с частотой 5–10 Гц. Форма кривой замедленной флуоресценции, интенсивность и длительность послесвечения молекул красителя определяются соотношением скоростей потребления/восстановления содержания кислорода в тканях. Установлена корреляция показателей замедленной флуоресценции с клинико-морфологическими характеристиками опухолей, обсуждается применение результатов в оптической экспресс-диагностике тканей.

Ключевые слова: фотосенсибилизаторы, импульсно-периодическое возбуждение, синглетный кислород, аннигиляция, замедленная флуоресценция, оптическая диагностика.

DOI: 10.31857/S0006302924030191, EDN: OECQUH

Оптические экспресс-методы исследования различных опухолей широко используются для ранней диагностики с целью повышения эффективности лечения онкологических заболеваний и поэтому востребованы в биологии и медицине. Перспективное направление развития оптической диагностики — использование длительной люминесценции (замедленной флуоресценции (ЗФ) и фосфоресценции) молекул-зондов. Длительная люминесценция возникает при излучательной релаксации долгоживущих метастабильных триплетных состояний молекул, которые за время жизни, как правило, успевают взаимодействовать с окружением, что повышает информативность метода и открывает дополнительные возможности для диагностики опухолей [1–10].

В настоящей работе представлены результаты исследования *in vitro* ЗФ и фосфоресценции ксантенового красителя эритрозина во фрагментах тканей молочной железы пациенток онкологического диспансера. Экспериментально регистри-

руемая ЗФ эритрозина в тканях представляет собой суперпозицию термоактивированного свечения типа Е [12] и излучения, возникающего после синглет-триплетной аннигиляции триплет-возбужденной молекулы красителя и синглетного кислорода (механизм замедленной флуоресценции Каутского–Мюллера [11], или «singlet oxygen feedback delayed fluorescence» [13–17]). Далее аннигиляционную составляющую общего сигнала ЗФ будем обозначать как СТАЗФ.

В отличие от других разновидностей длительного послесвечения интенсивность СТАЗФ не монотонно зависит от концентрации кислорода в среде. В работах [18–20] показано, что при возбуждении эритрозина в нативных тканях лабораторных мышей в режиме флэш-фотолиза с частотой следования возбуждающих импульсов 5–10 Гц, в опухолях интенсивность СТАЗФ снижалась, а после окончания возбуждения в течение нескольких секунд обратимо восстанавливалась до первоначального уровня. Авторы связали это явление с образованием синглетного кислорода и его более активным расходом в опухолях по сравнению с нормальными тканями. Цель насто-

Сокращения: ЗФ — замедленная флуоресценция, СТАЗФ — аннигиляционная составляющая общего сигнала ЗФ.

Таблица 1. Распределение полученных образцов по гистологической картине

Гистологическая картина	Количество образцов	Наличие злокачественности
Протоковый рак молочной железы	53	Да
Другие формы рака молочной железы (листовидная, папиллярная, муцинозная формы)	9	Да
Доброкачественная опухоль (фиброаденома или мастит)	14	Нет
Лимфоузел без метастазов	89	Нет
Лимфоузел с метастазом	3	Да
Лимфоузел (реактивные изменения)	12	Нет
Всего образцов	180	

ящей работы состоит в распространении методики, апробированной в работах [18–20] на животных, на исследования тканей человека, что приближает разработку к практическому внедрению. Обнаруженные особенности послесвечения молекул могут быть использованы для диагностики патологий и оценки краев резекции при хирургическом удалении опухоли.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы образцы ткани молочной железы, полученные хирургическим путем от 81 пациентки. Средний возраст пациенток – 57.9 лет.

Производился хирургический забор опухолевой ткани и лимфоузлов, фрагменты макропрепаратов направлялись на гистологию и одновременно на исследования кинетики затухания длительной люминесценции молекул-зондов. Гистологическое исследование проводилось в ГАУЗ «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер» (Оренбург, Россия). Гистологические и флуоресцентные исследования проводились параллельно и независимо (двойное слепое исследование). Распределение образцов по результатам гистологии показано в табл. 1.

После удаления операционного препарата исследуемые макропрепараты рассекались на 2 равные части. Выполнялись срезы с поверхности рассеченного лимфоузла и краев резекции толщиной 1 мм. Образцы помещали в среду 199 с солями Хэнкса для транспортирования из операционной в лабораторию. Время от забора образца до измерения люминесценции составляло в среднем 1 ч.

Окрашивание проводили путем погружения в физиологический раствор с эритрозинном (концентрация красителя 10^{-3} моль/л) на 1 мин, затем образцы промывали в чистом физиологическом

растворе, чтобы удалить невпитавшийся краситель. Подготовленные фрагменты тканей размещали в герметичной термостатируемой камере. Одновременно в камере можно разместить до шести фрагментов, этим обеспечивались одинаковые условия эксперимента для всех образцов. Каждый фрагмент накрывали тонкой металлической пластиной с круглым отверстием диаметром 5 мм. К камере при необходимости подключали баллон со сжатым азотом для снижения концентрации кислорода в атмосфере над образцами. Эксперимент проводили при комнатной температуре (20–25°C).

Кинетика затухания длительной люминесценции исследовалась методом флэш-фотолиза на автоматизированной установке динамической спектрофлуориметрии. Для возбуждения длительной люминесценции эритрозина использовали излучение второй гармоники (532 нм) импульсно-периодического твердотельного лазера на YAG:Nd³⁺ (лазер LQ-214, Solar, Беларусь). Энергия возбуждающего импульса варьировалась в диапазоне 0.2–30 мДж при длительности 10 нс. Возбуждение производилось не одним импульсом, а серией из 7–10 импульсов с частотой 5–10 Гц. Свечение регистрировалось через монохроматор МДР-41 с помощью фотоумножителя ФЭУ-84-3, имеющего специальный электрод для управления чувствительностью. Для аппроксимации кривых использовалась программа Wolfram Mathematica.

Эритрозин (Acros Organics, Индия) – синтетический краситель, широко использующийся в качестве фотосенсибилизатора в фотодинамической терапии и флуоресцентном анализе [21–23]. Благодаря наличию в своей структуре тяжелых атомов йода эритрозин обладает высоким квантовым выходом Φ_T в триплетное состояние (в физиологическом растворе $\Phi_T \approx 0.98$), что позволяет

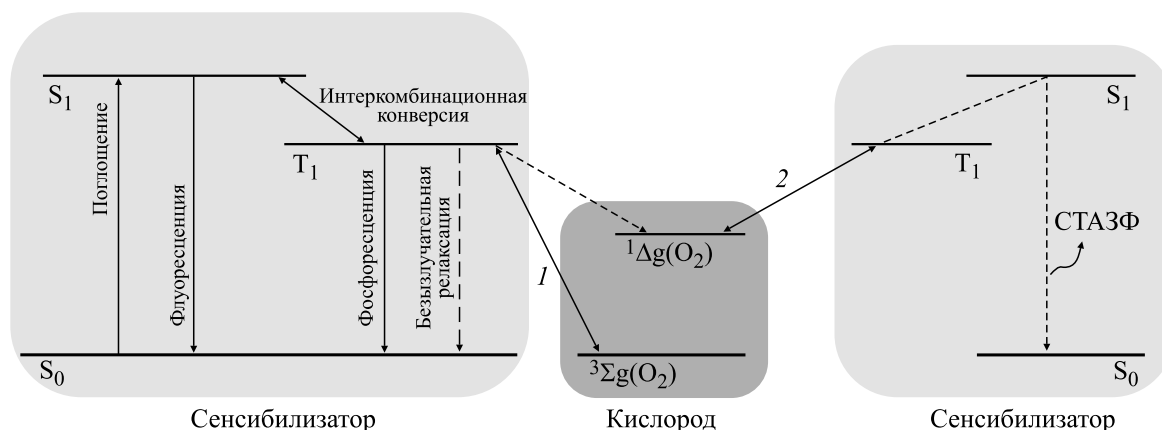


Рис. 1. Схема возникновения замедленной флуоресценции после синглет-триплетной аннигиляции.

использовать его одновременно и в качестве сенсibilизатора синглетного кислорода, и в качестве реагента в реакции кросс-аннигиляции, сопровождающейся СТАЗФ. Эритрозин имеет относительно большой коэффициент экстинкции на длине волны 532 нм (сечение поглощения в физиологическом растворе $\sigma \approx 2.8 \cdot 10^{-16} \text{ см}^2$) и яркую флуоресценцию, что облегчает визуализацию свечения при диагностике. Эритрозин фотостабилен, растворим в воде и хорошо проникает в ткани. Вместе с тем длины волн возбуждения и излучения эритрозина (500–540 нм и 550–700 нм соответственно) находятся на краю «терапевтического окна», что ограничивает глубину проникновения света в ткани и его применение при обнаружении и терапии глубоко расположенных опухолей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Двухстадийную реакцию возникновения СТАЗФ можно описать следующим образом (рис. 1): при взаимодействии T_1 -состояния люминофора с молекулярным кислородом $^3\text{O}_2$ происходит передача энергии $T_1 \rightarrow ^3\text{O}_2$, при этом образуется синглетный кислород $^1\text{O}_2$: $T_1 + ^3\text{O}_2 \rightarrow S_0 + ^1\text{O}_2$ (обозначено цифрой 1 на рис. 1). Эффективность этого процесса пропорциональна концентрации молекул в T_1 -состояниях и содержанию свободного кислорода в ткани. На втором этапе происходит синглет-триплетная аннигиляция $T_1 + ^1\text{O}_2$ и образуются флуоресцентные S_1 -состояния: $T_1 + ^1\text{O}_2 \rightarrow S_1 + ^3\text{O}_2$ (обозначено цифрой 2 на рис. 1). Количество образуемого синглетного кислорода в ткани непосредственно влияет на интенсивность СТАЗФ.

Полагая, что в тканях связанные молекулы красителя имеют ограниченную подвижность,

при описании кинетики 3Ф можно не учитывать вклад свечения, возникающего после аннигиляции $T_1 + T_1$ двух триплет-возбужденных молекул эритрозина (3Ф Р-типа [12]). Если воспользоваться формально-кинетическим описанием кинетики 3Ф, то интенсивность свечения определяется выражением [18]

$$I_{3\Phi}(t) = \Phi_{\text{фл}} k_{\text{o}_2} p_S n_T(t) n_{\text{o}_2}(t) + \Phi_{\text{фл}} k_{T_1 S_1} n_T(t), \quad (1)$$

где $\Phi_{\text{фл}}$ — квантовый выход флуоресценции, p_S — вероятность генерации S_1 -состояний молекул в реакции синглет-триплетной аннигиляции ($T_1 + ^1\text{O}_2$), k_{o_2} — скорость синглет-триплетной аннигиляции, $k_{T_1 S_1}$ — скорость перехода из нижнего триплетного (T_1) в синглетное (S_1) состояние, $n_T(t)$ — концентрация молекул в триплетном состоянии, $n_{\text{o}_2}(t)$ — концентрация синглетного кислорода. Первое слагаемое в выражении (1) определяет СТАЗФ, а второе — термоактивированную 3Ф типа Е [12].

Экспериментальная зависимость $I_{3\Phi}(t)$ представлена на рис. 2. При нормальных условиях на коротких временах вклад второго слагаемого в выражение (1) невелик. В диапазоне времени 1–10 мкс основной вклад в 3Ф дает свечение, обусловленное СТАЗФ. Длительность этого свечения лимитируется временем жизни синглетного кислорода в среде. На больших временах наблюдается только термоактивированная 3Ф, интенсивность которой много меньше СТАЗФ.

При импульсно-периодическом возбуждении с частотой 5–10 Гц в некоторых тканях имеет место обратимое снижение интенсивности СТАЗФ (обратимое тушение 3Ф), в большей степени характерное для злокачественных опухолей (рис. 2а). В зависимости от типа патологии в тканях тушение интенсивности 3Ф сразу после окончания серии возбуждающих импульсов со-

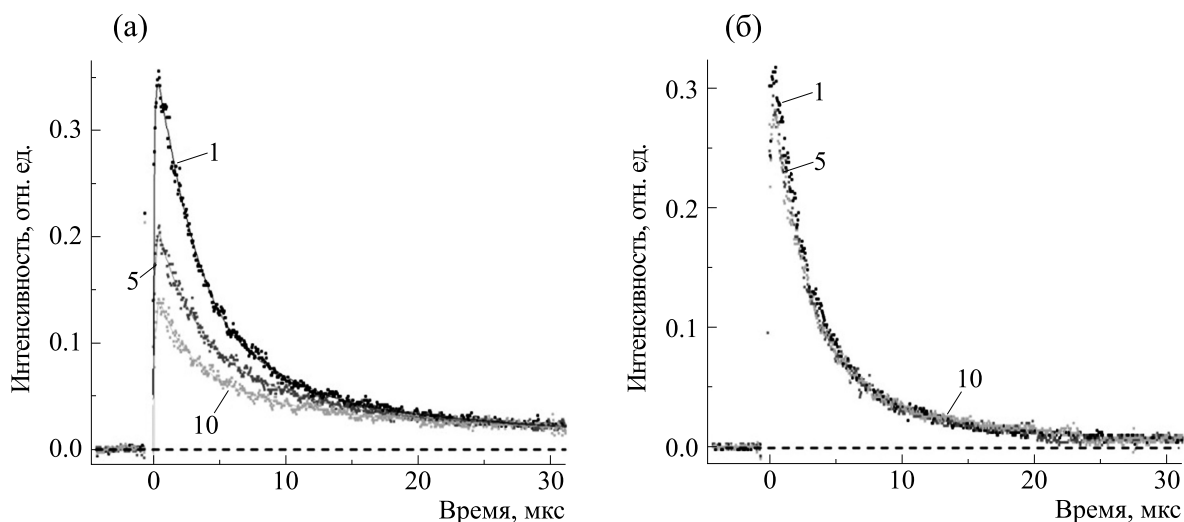


Рис. 2. Кинетика затухания замедленной флуоресценции эритрозина: (а) — в тканях злокачественной опухоли молочной железы (патология подтверждена гистологическими исследованиями) и (б) — в прилегающем лимфоузле (без патологии) после первого, пятого и десятого возбуждающих импульсов, следовавших с частотой 10 Гц.

ставляло от нескольких процентов до свыше 60%. Кинетика обратимого восстановления интенсивности и формы кривой ЗФ эритрозина исследованы по методике, описанной в работе [19]. Время полного восстановления кривой составляло 5–7 с (рис. 3).

Тушение СТАЗФ зависит от частоты возбуждения: эффективность тушения повышается с увеличением частоты (рис. 3а). Из выражения (1) следует, что при неизменной интенсивности возбуждения (начальная концентрация n_T молекул в триплетном состоянии одинакова после каждого возбуждающего импульса) яркость СТАЗФ снижается в том случае, если уменьшается множитель $n_{O_2}(t)$, т.е. если уменьшается содержание кислорода в ткани. После окончания первого воз-

буждающего импульса в ткани образуется синглетный кислород, активно вступающий в химические реакции с окружением, и в целом концентрация кислорода в ткани уменьшается. Одновременно кислород поступает в ткань из атмосферы. Если скорость потребления кислорода превышает скорость его восстановления в ткани, то множитель $n_{O_2}(t)$ будет уменьшаться и произойдет тушение СТАЗФ. С увеличением частоты следования возбуждающих импульсов сокращается время на восстановление концентрации кислорода в ткани, поэтому эффективность тушения свечения будет возрастать.

Поскольку по мере импульсно-периодического облучения окрашенной ткани в ней снижается концентрация кислорода, то следует ожидать по-

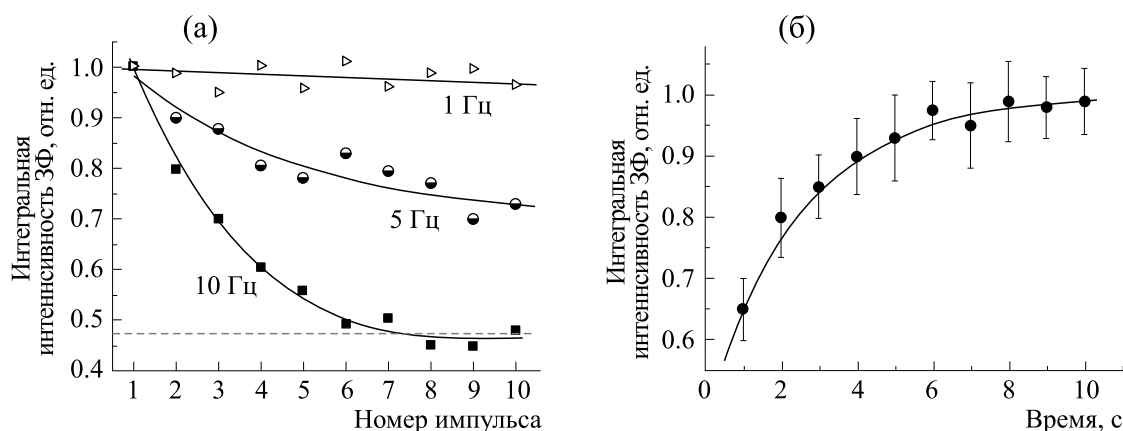


Рис. 3. Интегральная интенсивность замедленной флуоресценции (площадь под кинетической кривой на участке 1–10 мкс) эритрозина в опухоли молочной железы: (а) — в ходе импульсно-периодического возбуждения с разной частотой; (б) — спустя указанное время после 10-импульсного возбуждения с частотой 10 Гц.

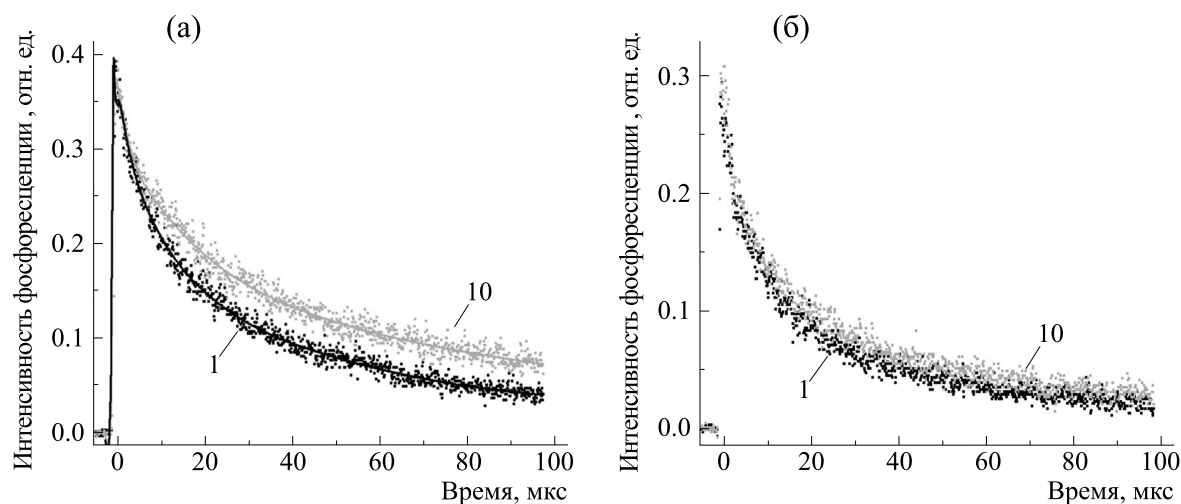


Рис. 4. Кинетика затухания фосфоресценции эритрозина в тканях злокачественной опухоли молочной железы (а) и прилегающем лимфоузле (б) после первого и десятого возбуждающих импульсов, следовавших с частотой 10 Гц.

вышения интенсивности и увеличения продолжительности свечения фосфоресценции и термоактивированной ЗФ. На рис. 4 приведены кинетические кривые затухания фосфоресценции эритрозина в тех же образцах и при тех же условиях, что представлены на рис. 1. Хорошо видно, что интегральная интенсивность фосфоресценции после 10-го импульса выросла на 20% (отношение площадей под кинетическими кривыми), а длительность свечения увеличилась от 40 до 80 мкс. При этом начальная интенсивность фосфоресценции остается неизменной.

Интенсивность термоактивированной ЗФ также увеличивается. На рис. 5 представлены кинетические кривые ЗФ эритрозина в диапазоне вре-

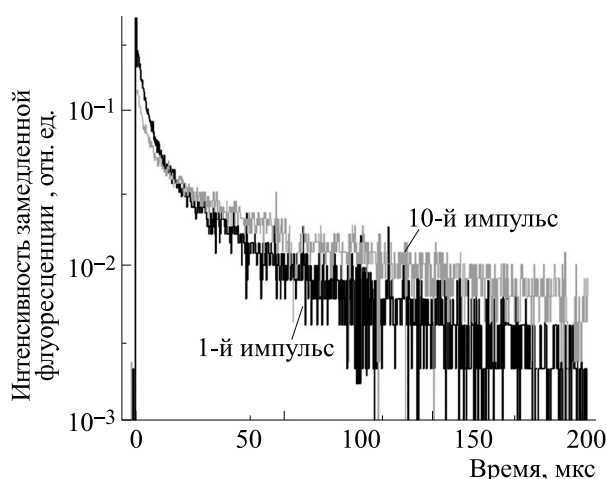


Рис. 5. Кинетика затухания ЗФ эритрозина (в полупологарифмических координатах) в опухоли молочной железы после первого (черная кривая) и десятого (серая кривая) возбуждающих импульсов, следовавших с частотой 10 Гц.

мени 0–200 мкс. Начиная примерно с 30–50 мкс после возбуждения характер затухания кинетической кривой становится практически экспоненциальным, что указывает на мономолекулярный характер релаксации триплетных T_1 -состояний эритрозина. Из рис. 5 видно, что после 10-го импульса возбуждения с частотой 10 Гц интенсивность СТАЗФ уменьшается, а интенсивность и длительность термоактивированной ЗФ, наоборот, закономерно увеличиваются.

В пользу предложенной «кислородной» модели тушения СТАЗФ свидетельствуют следующие экспериментальные факты. Параметры кинетических кривых ЗФ не меняются при частотах строб-возбуждения меньше 1 Гц (рис. 3а). При другом механизме тушения, например, фотообесцвечивании красителя, эффект регистрировался бы при любой частоте. В окрашенных тканях в диапазоне длин волн 300–800 нм не обнаружены новые полосы в спектрах возбуждения флуоресценции эритрозина или новые линии свечения возможных короткоживущих продуктов фотореакций. Начальная интенсивность фосфоресценции после каждого возбуждающего импульса не изменяется (рис. 4б), что однозначно указывает на постоянство концентрации красителя в ткани. На основании этих экспериментальных данных можно утверждать, что причина обратимого тушения СТАЗФ заключается именно в кратковременном снижении уровня кислорода в облучаемых биотканях.

Изменение кинетики длительной люминесценции эритрозина в зависимости от содержания кислорода в тканях проиллюстрировано экспериментально при продувке камеры с образцами газообразным азотом. Удаление кислорода из тканей и его восстановление после обратной закачки

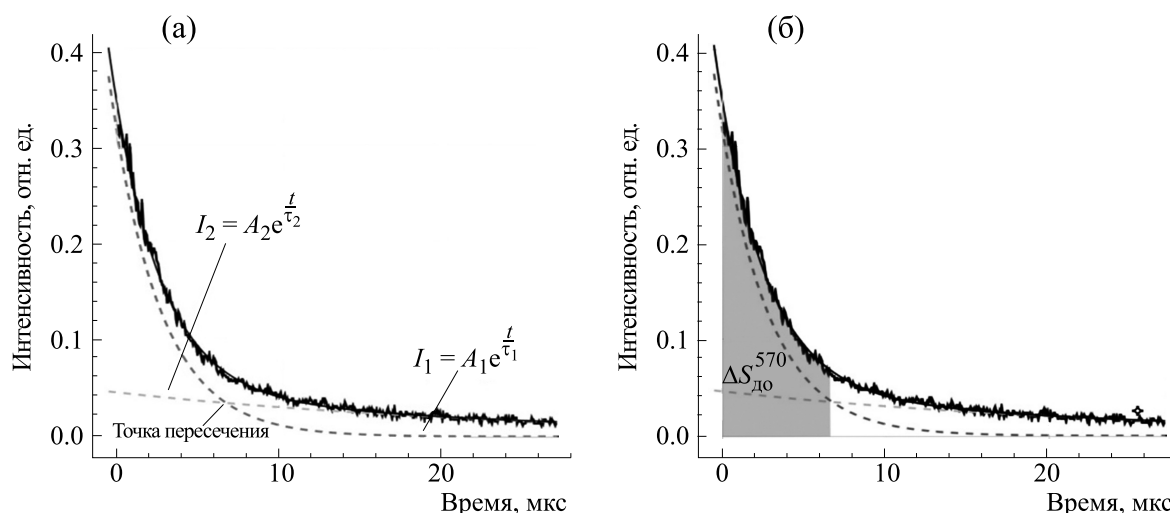


Рис. 6. Иллюстрация математической обработки кинетической кривой: (а) — аппроксимация кинетической кривой затухания замедленной флуоресценции двумя экспонентами, нахождение точки пересечения; (б) — определение величины $\Delta S_{\text{до}}^{570}$.

воздуха в камеру сопровождаются обратимыми изменениями интенсивности и формы ЗФ и фосфоресценции, аналогичными представленным на рис. 2 и 4.

Тушение СТАЗФ с одновременным увеличением интенсивности термоактивированной ЗФ и фосфоресценции молекул-зондов в тканях при импульсно-периодическом возбуждении преимущественно имеет место в злокачественных опухолях и может служить признаком, указывающим на развитие патологии. Для сравнения люминесцентных характеристик (интенсивность и длительность свечения) в выборке «есть опухоль» и в выборке «нет опухоли», применен t -критерий Стьюдента [24], широко использующийся в биомедицинских приложениях. Уровень значимости критерия выбран $\alpha = 0.01$, критическое значение для выборки 2.609.

Все образцы отбирали, окрашивали и облучали при одних и тех же условиях. Регистрацию свечения молекул проводили путем записи серий из 10 кинетических кривых затухания ЗФ (570 нм) и фосфоресценции (680 нм) эритрозина при импульсном возбуждении с частотой 10 Гц. Математическую обработку полученной серии кинетических кривых проводили следующим образом (см. также рис. 6):

— каждую кинетическую кривую в серии аппроксимировали двумя экспонентами (см. также рис. 5):

$$I(t) = A_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}}; \quad (2)$$

— автоматически определялась точка пересечения двух экспонент на временной оси;

— площадь под кинетической кривой до точки пересечения определяли как $S_{\text{до}}(i)$, где $i = 1, 2, 3, \dots, 10$ — порядковый номер возбуждающего импульса;

— площадь под кинетической кривой после точки пересечения определяли как $S_{\text{после}}(i)$;

— для каждой серии кинетических кривых составляли 4 таблицы следующих величин: $S_{\text{до}}(i)/S_{\text{до}}(1)$; $S_{\text{после}}(i)/S_{\text{после}}(1)$; $\tau_1(i)/\tau_1(1)$; $\tau_2(i)/\tau_2(1)$; т.е. все полученные значения нормировали на аналогичную величину после первого импульса.

Для построения кривых на рис. 3а использованы значения $S_{\text{до}}(i)/S_{\text{до}}(1)$ ЗФ эритрозина. Видно, что при частоте возбуждения 10 Гц уже примерно после пятого импульса тушение СТАЗФ закономерно выходит на насыщение. Для оценки изменяющегося отношения:

$$\Delta S_{\text{до}} = \frac{\frac{S_{\text{до}}(6)}{S_{\text{до}}(1)} + \frac{S_{\text{до}}(7)}{S_{\text{до}}(1)} + \frac{S_{\text{до}}(8)}{S_{\text{до}}(1)} + \frac{S_{\text{до}}(9)}{S_{\text{до}}(1)} + \frac{S_{\text{до}}(10)}{S_{\text{до}}(1)}}{5}. \quad (3)$$

На рис. 3а значение этой величины при частоте возбуждения 10 Гц показано пунктиром. Очевидно, если $\Delta S_{\text{до}}$ мало отличается от единицы, то можно считать, что данный параметр не изменяется в ходе многоимпульсного возбуждения.

В ходе анализа выявлены четыре величины, по изменению которых могут различаться злокачественные опухоли и нормальные ткани:

— изменение интегральной интенсивности ЗФ на отрезке времени до точки пересечения двух ап-

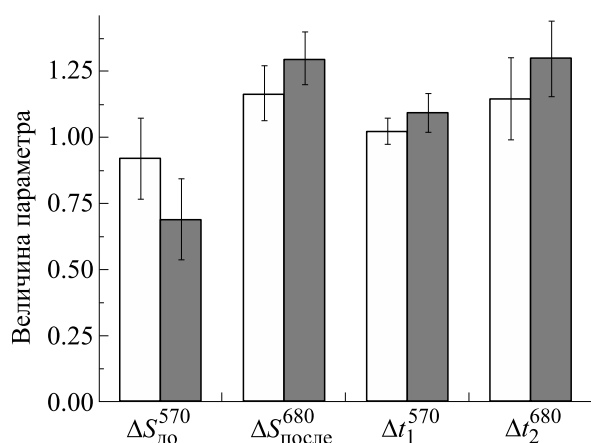


Рис. 7. Изменение параметров длительной люминесценции эритрозина в тканях без злокачественной опухоли (белые столбики) и в злокачественных опухолях (серые столбики).

проксимирующих экспонент $\Delta S_{до}^{570}$ — соответствует тушению СТАЗФ;

— изменение интегральной интенсивности фосфоресценции на участке после точки пересечения двух аппроксимирующих экспонент $\Delta S_{после}^{680}$ — соответствует увеличению интенсивности фосфоресценции;

— изменение показателя первой аппроксимирующей экспоненты для кривой затухания ЗФ Δt_1^{570} — показывает изменение длительности свечения короткоживущей компоненты ЗФ (СТА-ЗФ);

— изменение показателя второй аппроксимирующей экспоненты для кривой затухания фосфоресценции Δt_2^{680} — показывает изменение времени жизни долгоживущей компоненты фосфоресценции.

Результаты исследования 180 образцов тканей разделены на две выборки: «нет злокачественной опухоли» и «есть злокачественная опухоль». При этом в выборку «нет злокачественной опухоли» включены доброкачественные новообразования и ткани с реактивными изменениями. Каждая из этих выборок удовлетворяла критерию нормальности. Для выбранных величин t -критерий оказался больше критического: для $\Delta S_{до}^{570}$ — 9.405, для $\Delta S_{после}^{680}$ — 8.173, для Δt_1^{570} — 6.973, для Δt_2^{680} — 6.438. На рис. 7 результаты представлены в виде гистограмм.

Полученные результаты дают основание утверждать, что в злокачественных опухолях вероятность обнаружить изменение параметров длительной люминесценции фотосенсибилизатора

выше по сравнению с нормальными тканями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружено изменение интенсивности и формы кинетических кривых затухания длительной люминесценции эритрозина в тканях молочной железы при периодическом возбуждении лазерными импульсами длительностью 10 нс, следующих с частотой 10 Гц. Наибольшие изменения отмечены для:

— участка кинетической кривой затухания ЗФ (диапазон 1–10 мкс) — интенсивность свечения уменьшается, продолжительность свечения увеличивается;

— кинетической кривой затухания фосфоресценции (диапазон от 20 до 600 мкс) — интенсивность и продолжительность свечения увеличиваются.

Обнаружено статистически значимое различие интенсивности и длительности свечения молекул-зондов в злокачественных опухолях (32 образца) и нормальных (59 образцов) тканях с помощью t -критерия Стьюдента с уровнем значимости 0.01:

— изменение интенсивности (площади под кинетической кривой) ЗФ в диапазоне 1–10 мкс;

— изменение длительности затухания ЗФ в диапазоне 1–10 мкс;

— изменение длительности затухания фосфоресценции (от 20 до 600 мкс).

Полученные результаты могут найти применение в биомедицинской диагностике онкологических заболеваний, в том числе для экспресс-диагностики краев резекции тканей в ходе операции.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность и признательность коллективу ГАУЗ «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер» и всем пациентам, принявшим участие в исследовании.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (проект № FSGU-2023-0003) и Российского научного фонда (грант № 23-25-00183).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией и международно-признанными рекомендациями после одобрения исследований Комитетом по этике Оренбургского государственного медицинского университета (протокол № 311 от 13 января 2023 г.). Все пациенты дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tuchin V. V. *Tissue optics, light scattering methods and instruments for medical diagnostics* (SPIE Press Book, 2015).
2. Demchenko A. P. *Introduction to fluorescence sensing* (Wiesbaden, Springer Science & Business Media, 2010).
3. Berezin M. Y. and Achilefu S. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chem. Rev.*, **110**, 2641–2684 (2010). DOI: 10.1021/cr900343z
4. Mieog J. S. D., Achterberg F. B., Zlitni A., Hutteman M., Burggraaf J., Swijnenburg R.-J., Gioux S., and Vahrmeijer A. L. Fundamentals and developments in fluorescence-guided cancer surgery. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **19** (1), 9–22 (2022). DOI: 10.1038/s41571-021-00548-3
5. Ito R., Kamiya M., and Urano Y. Molecular probes for fluorescence image-guided cancer surgery. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **67**, 102112 (2022). DOI: 10.1016/j.cbpa.2021.102112
6. Lan M., Zhao Sh., Liu W., Lee Ch.-S., Zhang W., and Wang P. Photosensitizers for photodynamic therapy. *Adv. Healthcare Mater.*, **8** (13), E1900132 (2019). DOI: 10.1002/adhm.201900132
7. Janotka M. and Ostadal P. Biochemical markers for clinical monitoring of tissue perfusion. *Mol. Cell Biochem.*, **473** (3), 1313–1326 (2021). DOI: 10.1007/s11010-020-04019-8
8. Murphy M. P., Bayir H., Belousov V., Chang Ch. J., Davies K. J. A., Davies M. J., Dick T. P., Finkel T., Forman H. J., Janssen-Heininger Y., Gems D., Kagan V. E., Kalyanaraman B., Larsson N.-G., Milne G. L., Nyström Th., Poulsen H. E., Radi R., Van Remmen H., Schumacker P. T., Thornalley P. J., Toyokuni Sh., Winterbourn Ch. C., Yin H., and Halliwell B. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nat. Metab.*, **4** (6), 651–662 (2022). DOI: 10.1038/s42255-022-00591-z
9. Rey-Barroso L. Optical Technologies for the Improvement of Skin Cancer Diagnosis: A Review. *Sensors (Basel)*, **21** (1), 252 (2021). DOI: 10.3390/s21010252
10. Grosenick D., Rinneberg H., Cubeddu R., and Taroni P. Review of optical breast imaging and spectroscopy. *J. Biomed. Opt.*, **21** (9), 091311 (2016). DOI: 10.1117/1.JBO.21.9.091311
11. Kautsky H. and Müller G. Luminescenzumwandlung durch Sauerstoff. Nachweis geringster Sauerstoffmengen. *Z. Naturforsch. A*, **2**, 167–172 (1947). DOI: 10.1515/zna-1947-0308
12. Parker C. A. and Hatchard C. G. Triplet-singlet emission in fluid solutions. *Trans. Faraday Soc.*, **57**, 1894–1904 (1961). DOI: 10.1039/TF9615701894
13. Kenner R. D. and Khan A. U. Molecular oxygen enhanced fluorescence of organic molecules in polymer matrices: a singlet oxygen feedback mechanism. *J. Chem. Phys.*, **64** (5), 1877–1882 (1976). DOI: 10.1063/1.432471
14. Croizat G., Gregor A., Gerelli E., Joniova J., Scholz M., and Wagnières G. A general framework for non-exponential delayed fluorescence and phosphorescence decay analysis, illustrated on protoporphyrin IX. *J. Photochem. Photobiol. B*, **209**, 111887 (2020). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111887
15. van Dijk L. J. D., Ubbink R., Terlouw L. G., van Noord D., Mik E. G., Bruno M. J. Oxygen-dependent delayed fluorescence of protoporphyrin IX measured in the stomach and duodenum during upper gastrointestinal endoscopy. *J. Biophotonics*, **12**, e201900025 (2019). DOI: 10.1002/jbio.201900025
16. Mosinger J, Lang K., Hostomský J., Franc J., Sýkora J., Hof M., and Kubát P. Singlet oxygen imaging in polymeric nanofibers by delayed fluorescence. *J. Phys. Chem. B*, **114** (48), 15773–15779 (2010). DOI: 10.1021/jp105789p
17. Scholz M., Gunn J. R., Luke G. P., and Pogue B. W. Imaging of singlet oxygen feedback delayed fluorescence and lysosome permeabilization in tumor *in vivo* during photodynamic therapy with aluminum phthalocyanine. *J. Biomed. Opt.*, **25** (6), 063806 (2020). DOI: 10.1117/1.JBO.25.6.063806
18. Letuta S. N., Pashkevich S. N., Ishemgulov A. T., Lantukh Y. D., Alidzhanov E. K., Sokabaeva S. S., and Bryukhanov V. V. Delayed luminescence of erythrosine in biological tissue and photodynamic therapy dosimetry. *J. Photochem. Photobiol. B*, **163**, 231–236 (2016). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.08.036
19. Letuta S. N., Ishemgulov A. T., Letuta U. G., and Pashkevich S. N. Continuous in vivo monitoring of the oxygen concentration in tissues. *Biophysics*, **63** (5), 798–804 (2018). DOI: 10.1134/S0006350918050160
20. Letuta S. N. Monitoring of Changes in Oxygen Concentration in Tissues by the Kinetics of Delayed Fluorescence of Exogenous Dyes. *Opt. Spectr.*, **127**, 1169–1176 (2019). DOI: 10.1134/S0030400X19120129
21. Ke E. Sh., Nazzal S., Tseng Y.-H., Chen Ch.-P., and Tsai Ts.-M. Erythrosine-mediated photodynamic inactivation of bacteria and yeast using green light-emitting diode light. *J. Food Drug Anal.*, **20** (4), 951–956 (2012). DOI: 10.6227/jfda.2012200426
22. Garg A. D., Bose Muthiah, Ahmed M. I., Bonass W. A., and Wood S. R. *In Vitro* Studies on erythrosine-based photodynamic therapy of malignant and pre-malignant oral epithelial cells. *PLoS One*, **7** (4), e34475 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0034475

23. Yesilgul N. Singlet Oxygen Generation with Chemical Excitation of an Erythrosine–Luminol Conjugate. *ACS Omega*, **2** (4), 1367–1371 (2017). DOI: 10.1021/acsomega.7b00228
24. Mishra P., Singh U., Pandey Ch. M., Mishra P., and Pandey G. Application of Student's *t*-test, analysis of variance, and covariance. *Ann. Card. Anaesth.*, **22** (4), 407–411 (2019). DOI: 10.4103/aca.ACA_94_19

Long-Term Luminescence Kinetics of Erythrosine in Breast Tissue *in vitro*

S.N. Letuta*, A.T. Ishemgulov*, and M.A. Senchukova**

*Orenburg State University, prosp. Pobedy 13, Orenburg, 460018 Russia

**Orenburg State Medical University, Sovetskaya ul. 6, Orenburg, 460000 Russia

The kinetics of delayed fluorescence and phosphorescence of the photosensitizer erythrosine in fragments of normal tissues and malignant breast tumors of patients at an oncology clinic was studied *in vitro*. It has been shown that the kinetics of delayed fluorescence of the dye is formed as a superposition of signals of thermally activated luminescence and luminescence resulting from singlet-triplet annihilation of photosensitizer molecules and singlet oxygen. The quenching of the annihilation component of delayed fluorescence was discovered when molecules were excited by a series of *n* pulses with a frequency of 5–10 Hz. The shape of the delayed fluorescence curve, the intensity and duration of the afterglow of dye molecules are determined by the ratio of the rates of consumption/regeneration of oxygen content in tissues. A correlation between delayed fluorescence indicators and the clinical and morphological characteristics of tumors has been established, and the application of the results in rapid optical diagnostics of tissues is discussed.

Keywords: photosensitizers, pulse-periodic excitation, singlet oxygen, annihilation, delayed fluorescence, optical diagnostics