

Оригинальная статья / Original article

УДК 535.212:544.52

<https://doi.org/10.21869/2223-1528-2023-13-4-109-122>

Исследование фотодеградации тиазинового красителя метиленового синего при воздействии лазерным источником для фотодинамической терапии

Д. С. Рассеко¹✉, М. А. Пугачевский¹, А. И. Жакин¹¹ Юго-Западный государственный университет

ул. 50 лет Октября, д. 94, г. Курск 305040, Российская Федерация

✉ e-mail: rasseko.dmitriy@bk.ru

Резюме

Цель исследования. Изучить процесс фотодеградации метиленового синего под действием лазерного излучения с длиной волны 660 нм, используемого для установок фотодинамической терапии, на предмет формирования активных форм кислорода, в частности короткоживущих гидроксильных радикалов с помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса.

Методы. Определение остаточной концентрации метиленового синего в процессе фотодеградации производилось с помощью спектрометра HR2000. Детектирование образования гидроксильных групп осуществляли с помощью ЭПР-спектрометра SPINSCAN X.

Результаты. Анализ данных фотодеградации метиленового синего показывает, что под действием лазерного излучения с длиной волны 660 нм происходит разрушение структуры метиленового синего, проявляющееся в постепенном обесцвечивании раствора красителя. При добавлении триафлавина в раствор скорость фотодеградации метиленового синего значительно замедляется. Анализ данных ЭПР-спектроскопии показывает, что при воздействии красным лазером на метиленовый синий в растворе начинают интенсивно формироваться (ОН[•]) радикалы. Их содержание значительно возрастает с увеличением мощности облучения.

Заключение. Облучение лазерным источником мощностью 0,3–1 Вт с длиной волны 660 нм водного раствора тиазинового красителя метиленового синего приводит к его активной фотодеградации. Добавление триафлавина приводит к замедлению процесса фотодеградации метиленового синего при облучении красным светом за счёт расходования части генерируемых кислородсодержащих радикалов на деградацию триафлавина. По данным ЭПР спектроскопии с использованием спиновых ловушек ДМПО доказано, что при облучении метиленового синего красным лазером происходит активное образование гидроксильных ОН[•] радикалов. Установлено, что с увеличением интенсивности лазерного излучения количество генерированных гидроксильных радикалов (ОН[•]) значительно увеличивается. Представленные результаты могут способствовать разработке эффективных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии опухолевых новообразований.

Ключевые слова: метиленовый синий; триафлавин; ЭПР спектроскопия; лазерное излучение; ОН[•] радикалы.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ и Министерства образования и науки Курской области (Соглашение № 23-29-10198, №173). Работа выполнена также при поддержке Министерства образования и науки РФ (з/з 2020 № 0851-2020-0035), в рамках реализации программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030» (Соглашение № 075-15-2021-1155).

Конфликт интересов: Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Рассако Д. С., Пугачевский М. А., Жакин А. И. источником для фотодинамической терапии // Известия Юго-Западного государственного университета. Серия: Техника и технологии. 2023. Т. 13, № 4. С. 109–122. <https://doi.org/10.21869/2223-1528-2023-13-4-109-122>.

Поступила в редакцию 12.10.2023

Подписана в печать 20.11.2023

Опубликована 25.12.2023

Study of Photodegradation of Thiazion Dye Methylene Blue under Exposure to a Laser for Photodynamic Therapy

Dmitriy S. Rasseko^{1✉}, Maksim A. Pugachevskii¹, Anatoly I. Zhakin¹

¹ Southwest State University
50 Let Oktyabrya Str. 94, Kursk 305040, Russian Federation

✉ e-mail: rasseko.dmitriy@bk.ru

Abstract

Purpose. To study the process of photodegradation of methylene blue under the influence of laser radiation with a wavelength of 660 nm, used for photodynamic therapy installations, for the formation of reactive oxygen species, in particular short-lived hydroxyl radicals, using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy.

Methods. The residual concentration of methylene blue during photodegradation was determined using an HR2000 spectrometer. The formation of hydroxyl groups was detected using an EPR spectrometer SPINSCAN X.

Results. Analysis of data on the photodegradation of methylene blue shows that under the influence of laser radiation with a wavelength of 660 nm, the structure of methylene blue is destroyed, manifested in the gradual discoloration of the dye solution. When trypaflavin is added to the solution, the rate of photodegradation of methylene blue slows down significantly. Analysis of ESR spectroscopy data shows that when methylene blue is exposed to a red laser, (OH[•]) radicals begin to intensively form in the solution. Their content increases significantly with increasing irradiation power.

Conclusion. Irradiation of an aqueous solution of the thiazion dye methylene blue by a laser source with a power of 0.3–1 W and a wavelength of 660 nm leads to its active photodegradation. The addition of trypaflavin leads to a slow-down in the process of photodegradation of methylene blue when irradiated with red light due to the consumption of part of the generated oxygen-containing radicals for the degradation of trypaflavin. According to EPR spectroscopy data using DMPO spin traps, it has been proven that when methylene blue is irradiated with a red laser, active formation of hydroxyl OH[•] radicals occurs. It was found that with increasing laser radiation intensity, the amount of generated hydroxyl radicals (OH[•]) increases significantly. The presented results may contribute to the development of effective photosensitizers for photodynamic therapy of tumor tumors.

Keywords: methylene blue; trypaflavin; EPR spectroscopy; laser radiation; OH[•] radicals.

Funding: The study was carried out with financial support from the Russian Science Foundation and the Ministry of Education and Science of the Kursk Region (Agreement No. 23-29-10198, No. 173). The work was also carried out with the support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (G/Z 2020 No. 0851-2020-0035), as part of the implementation of the strategic academic leadership program "Priority-2030" (Agreement No. 075-15-2021-1155).

Conflict of interest: The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Rasseko D. S., Pugachevskii M. A., Zhakin A. I. Study of Photodegradation of Thiazion Dye Methylene Blue under Exposure to a Laser for Photodynamic Therapy. *Izvestiya Yugo-Zapadnogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Tekhnika i tekhnologii* = *Proceedings of the Southwest State University. Series: Engineering and Technologies*. 2023; 13(4): 109–122. (In Russ.) <https://doi.org/10.21869/2223-1528-2023-13-4-109-122>

Received 12.10.2023

Accepted 20.11.2023

Published 25.12.2023

Введение

В последнее время активно ведутся исследования по разработке эффективных и безопасных сенсibilизаторов для фотодинамической терапии (ФДТ) онкологических заболеваний [1]. Известно, что при ФДТ фотосенсibilизаторы, поглощая оптические излучения, передают энергию световых квантов кислороду, растворенному в крови и тканях организма, что обеспечивает формирование высокоактивных кислородсодержащих радикалов, атакующих опухолевые клетки. При этом сенсibilизаторы должны отвечать ряду требований, таких как: наличие низкой темновой и световой токсичности, высокая селективность накопления в злокачественных тканях; сильное поглощение в красном и ближнем ИК-диапазоне, где биологические ткани обладают наибольшим пропусканием с глубиной до 3 см, высоким квантовым выходом образования синглетного кислорода и др. В работах [2; 3] было высказано предположение, что тиазиновый краситель метиленовый синий (МБ) может выступать в качестве фотосенсibilизатора для ФДТ. Так при облучении МБ терапевтическим источником с длиной волны 600–900 нм возможно активное поглощение оптических фотонов красителем и фотогенерация в нем электрон-дырочных носителей, которые в дальнейшем способны инициировать каскад окислительно-восстановительных реакций, приводящих к деградации органических клеточных компонентов и, как следствие, гибели опухолевых клеток.

Метиленовый синий является ароматическим и гетероциклическим красителем, имеющим молекулярную массу 319,85 г/моль, и с молекулярной формулой $C_{16}H_{18}ClN_3S$, а также с максимальной длиной волны поглощения 663 нм [4; 5]. В работах [6; 7] было показано, что под дей-

ствием красного лазерного света происходит фотодеградация метиленового синего. Можно предположить, что разрушение метиленового синего и высвечивание раствора на его основе происходит за счет формирования высокоактивных кислородсодержащих радикалов, в частности короткоживущих гидроксильных радикалов, которые атакуют молекулы метиленового синего и разрушают центры окраски. Известно, что с помощью исследований электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [8–11], применяя спиновые ловушки, как, например, N-оксид 5,5-диметил-1-пирролин (ДМПО), можно качественно доказать формирование и количественно определить содержание гидроксильных радикалов $\cdot OH$ в реакционной системе. Тем самым можно изучить механизм и закономерности разложения метиленового синего при облучении внешним источником, что является важным моментом в определении его фотостабильности как сенсibilизатора для фотодинамической терапии. Таким образом, данная работа посвящена изучению и выявлению закономерностей процесса фотодеградации метиленового синего под действием лазерного излучения с длиной волны 660 нм на предмет формирования короткоживущих гидроксильных радикалов с помощью исследований спектроскопии электронного парамагнитного резонанса.

Материалы и методы

Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса в сочетании с метками спиновых ловушек является популярным методом определения гидроксильных радикалов ($\cdot OH$) [10; 12–15]. Сам метод ЭПР основывается на эффекте Зеемана, который заключается в расщеплении электронных энергетических уровней в условиях внешнего магнитного поля [16]. Экспериментальные исследования по

ЭПР-спектроскопии проводятся в различных частотных диапазонах, среди которых наиболее распространенным является X-диапазон при приложении магнитного поля около 3480 G, с резонансной частотой $\sim 8,75$ ГГц (значения частоты зависят от фактора g). По практическим соображениям в исследованиях удобно фиксировать постоянной частоту микроволн, одновременно варьируя значение индукции магнитного поля в заданном диапазоне. Магнитное поле при этом модулируется, что даёт возможность использовать фиксированное усиление, что значительно повышает чувствительность метода. ЭПР-спектры, как правило, измеряются как первая производная спектров поглощения. Последний может быть легко восстановлен при помощи интегрирования измеренного сигнала, двойное интегрирование определяет площади пиков, которые будут пропорциональны числу спинов в образце [16; 17].

В качестве спиновой ловушки для радикалов активно используется N-оксид 5,5-диметил-1-пирролин (ДМПО) [18; 19]. Свободный радикал ($\cdot\text{OH}$) способен вступать в реакцию со спиновой ловушкой, образуя при этом более долговечный парамагнитный спиновый аддукт (ДМПО-ОН). ДМПО может использоваться и для детектирования радикала O_2^- , но реакция захвата при этом оказывается затруднённой из-за низкой скорости. Образованный таким способом аддукт представляет спектр, который аналогичен спектру для других пероксильных аддуктов. ЭПР очень чувствителен к частицам с неспаренными электронами. Так как частицы, имеющие закрытую оболочку, не формируют ЭПР сигнал, то интерпретация данных значительно упрощается в сравнении с другими методами. Также достаточно легко достигается высокая чувствительность метода (до 10^9 спинов).

Помимо ЭПР существуют и другие методы детектирования радикалов, которые образуются при фотокатализе, например спектроскопия переходного поглощения [20]. По сравнению с ЭПР у неё очень высокое временное разрешение в порядке наносекунд, что может дать более полную информацию о происходящих процессах, но её сложно интерпретировать. Определению спектральных полос мешает низкое спектральное разрешение и невысокая специфичность метода. Другим инструментом служит инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье-диффузного отражения [21; 22]. Однако из-за того, что H_2O и органические растворители имеют сильное поглощение в инфракрасной области, использование данного метода значительно ограничено. Микроволновая проводимость с временным разрешением также может быть задействована, но она способна детектировать только свободные электроны [23]. Можно использовать также и комбинацию нескольких методов, например ЭПР с ИК-спектроскопией [24]. В нашем случае была использована ЭПР-спектроскопия как основной метод исследований.

Для дополнительного доказательства формирования гидроксильных радикалов при облучении метиленового синего красным светом был использован метод оптической спектроскопии для наблюдения за фотодеградацией центров окраски как раствора метиленового синего, так и органического красителя трипафлавина ($\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{ClN}_6(\text{HCl})$). Стоит отметить, что спектры оптического поглощения красителей метиленового синего и трипафлавина принципиально различаются (рис. 1), что позволяет селективно активировать красители при облучении светом различной длины волны.

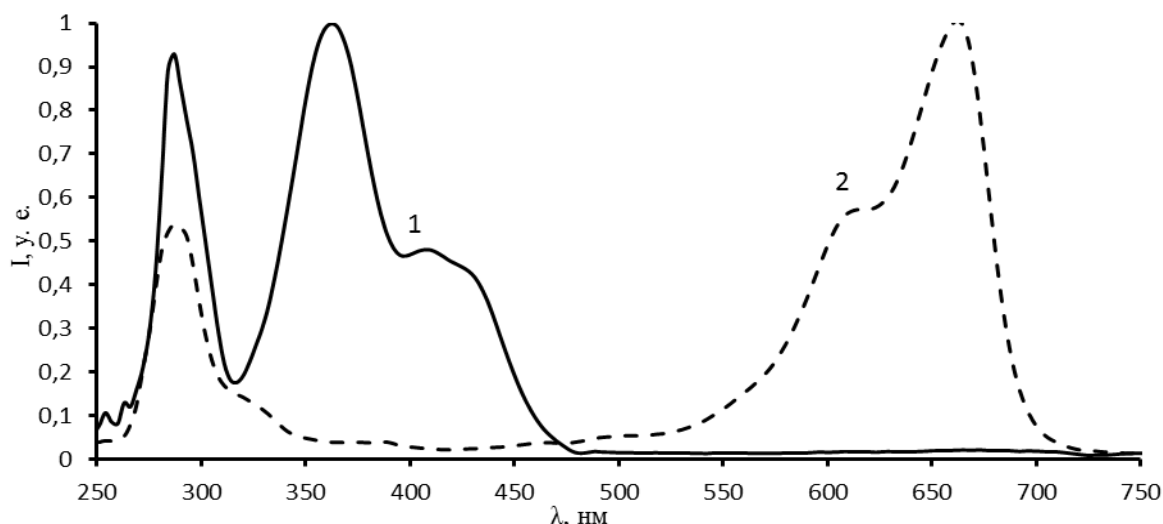


Рис. 1. Спектры оптического поглощения красителей: 1 – трипафлавина; 2 – метиленового синего

Fig. 1. Optical absorption spectra of dyes: 1 – tripaflavin; 2 – methylene blue

Было высказано предположение, что при облучении красным светом на метиленовом синем будут формироваться активные кислородсодержащие радикалы, в то время как на трипафлавине оптические фотоны с длиной волны 660 нм практически не поглощаются и, соответственно, не происходит возбуждение электрон-дырочных пар. В этом случае разрушение центров окраски трипафлавина возможно только при химическом воздействии активных радикалов, формирующихся на метиленовом синем. С красителями метиленовым синим и трипафлавином было проведено два эксперимента, в первом в кювету наливали 1 мл дистиллированной воды и 40 мкл водного раствора метиленового синего. Включался лазер 660 нм на 0,5 Вт и после 30 с добавлялось 40 мкл водного раствора трипафлавина (разбавлен в 20 раз) и снимались спектры ещё 60 с. Во втором эксперименте при включенном лазере 660 нм на 0,5 Вт сначала добавляли 40 мкл трипафлавина, а затем уже после 40 с облучения добавляли 40 мкл метиленового синего. В первом случае съёмку спектров проводили на 660 нм,

тем самым регистрируя остаточное содержание метиленового синего в растворе, во втором на 340 нм – для регистрации содержания в растворе трипафлавина.

Эксперимент с ЭПР проводили следующим образом: смешивали водный раствор метиленового синего с ДМПО в соотношении 1:5, после чего 10 мкл смеси помещали в стеклянный капилляр для измерений в спектрометре SPINSCAN X. Далее измерения проводились при включённой лазерной установке Аллод-01 с длиной волны излучения 660 нм. Были установлены следующие параметры измерений: центральное значение магнитного поля 336 мТл, ширина развёртки 15 мТл, амплитуда модуляции 100 мТл. Второй эксперимент с ЭПР проводился при следующих параметрах: центральное магнитное поле 336,95 мТл, ширина развёртки 0,8 мТл, амплитуда модуляции 100 мТл. ЭПР-спектры регистрировались с периодичностью в 10 с. Также был осуществлен эксперимент, где в моменты времени включался лазерный свет на 10 с с одновременной регистрацией ЭПР-спектров.

Результаты и их обсуждение

Для доказательства формирования гидроксильных радикалов при облучении красителя метиленового синего красным светом был использован метод оптической спектроскопии, с помощью которого в режиме реального времени наблюдалось

высвечивание центров окраски в водном растворе красителя при облучении лазерным источником с длиной волны 660 нм. На рисунке 2 представлены кинетические кривые фотодеградации раствора метиленового синего как чистого, так и с добавлением триафлавина.

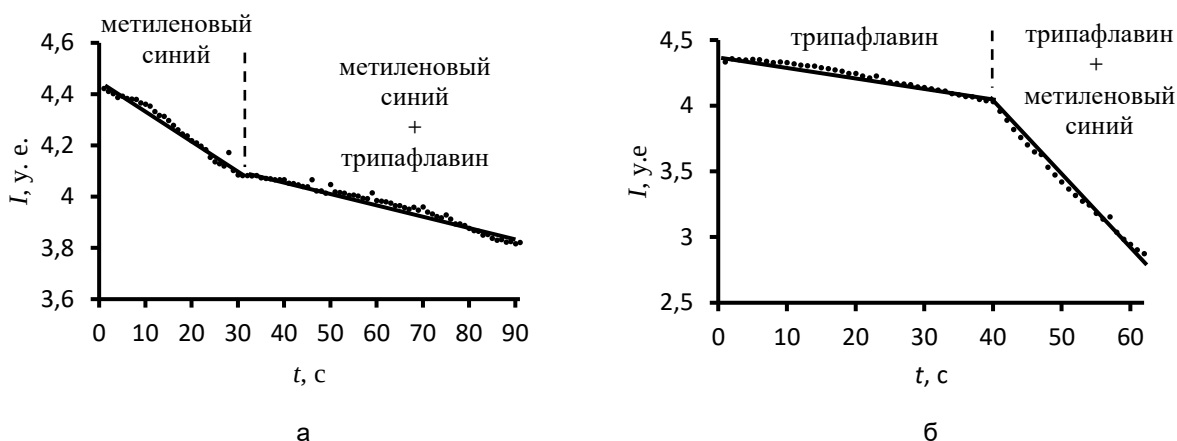


Рис. 2. Кинетические кривые фотодеградации при воздействии лазерным излучением мощностью 0,5 Вт: а – на раствор метиленового синего с последующим добавлением триафлавина после 30 с облучения; б – на раствор триафлавина при красном лазерном излучении (0,5 Вт) с добавлением метиленового синего через 40 с облучения

Fig. 2. Kinetic curve of photodegradation when exposed to laser radiation with a power of 0,5 W: а – to a methylene solution followed by the addition of triaflavin after 30 seconds of irradiation; б – to a triaflavin solution under red laser radiation (0,5 W), with the addition of methylene blue after 40 seconds of irradiation

На рисунке 2, а видно, что добавление триафлавина значительно уменьшает скорость разложения метиленового синего. Скорость реакции снижается с $11,8 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ до $4,5 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$. Объяснением может служить то, что часть фотогенерированных радикалов, помимо красителя метиленового синего, начинает активно атаковать триафлавин.

На рисунке 2, б хорошо заметно, что активная фотодеградация триафлавина начинается только после добавления в раствор метиленового синего, на котором поглощение света с длиной волны 660 нм

и образование кислородсодержащих радикалов происходит значительно активней. Скорость реакции увеличивается больше, чем в пять раз, с $8,8 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ до $51,2 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$.

В ЭПР-экспериментах водный раствор метиленового синего смешивали со спиновой ловушкой ДМПО и производили измерения с помощью спектрометра SPINSCAN X. На рисунке 3 представлены ЭПР-спектры гидроксильных радикалов ($\cdot\text{OH}$), которые формируются на метиленовом синем при облучении лазером мощностью 0,5 Вт.

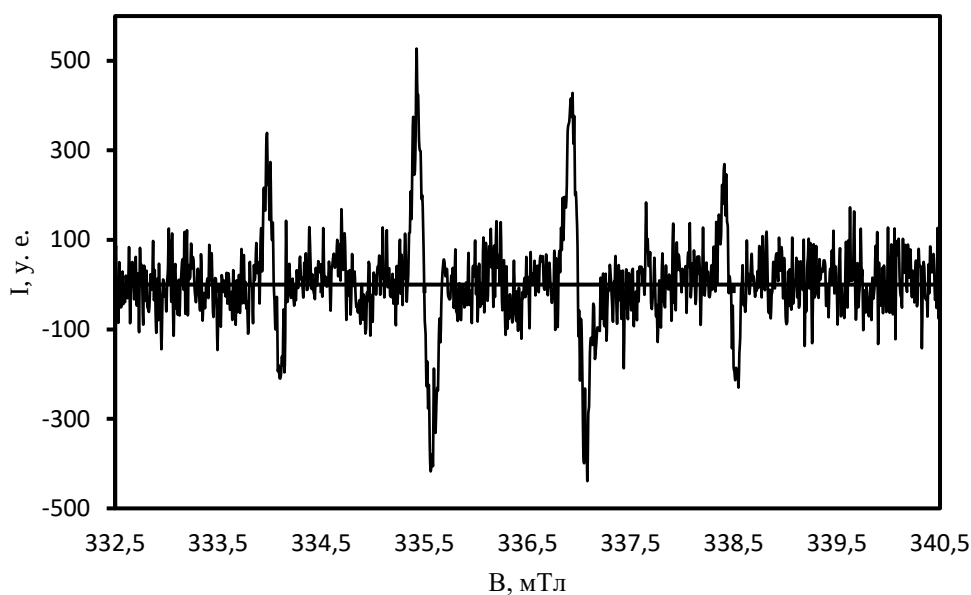


Рис. 3. Спектры радикалов $\cdot\text{OH}$ в метиленовом синем при облучении лазером мощностью 0,5 Вт

Fig. 3. Spectra of $\cdot\text{OH}$ radicals in methylene blue irradiated with a 0,5 W laser

На рисунке 4 представлены графики, на которых видно, как снижается концентрация $\cdot\text{OH}$ радикалов в метиленовом си-

нем с течением времени при различной интенсивности облучения.

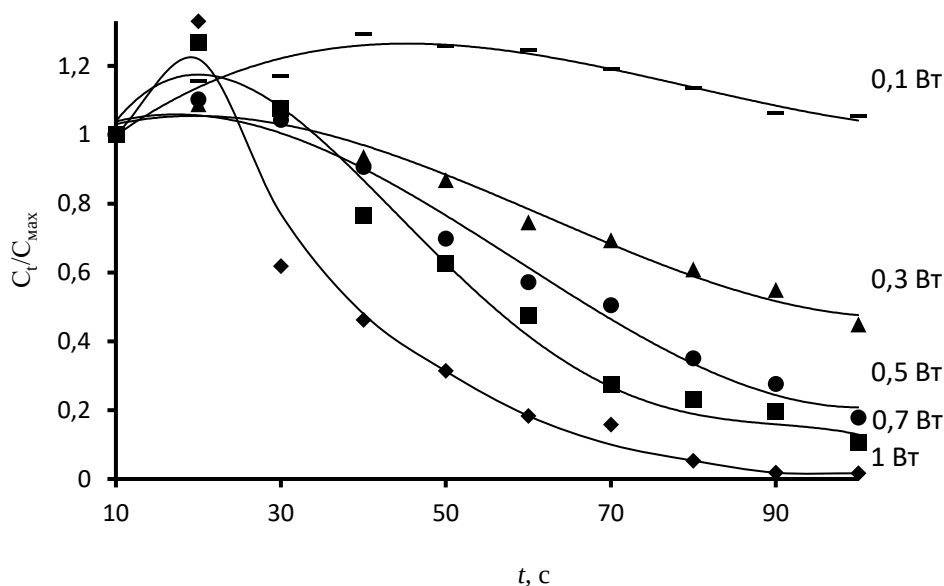


Рис. 4. Зависимости концентрации гидроксильных групп в непрерывно облучаемом лазерным источником различной интенсивности метиленовым синим от времени

Fig. 4. Dependence of the concentration of hydroxyl groups in continuously irradiated methylene blue laser source of varying intensity on time

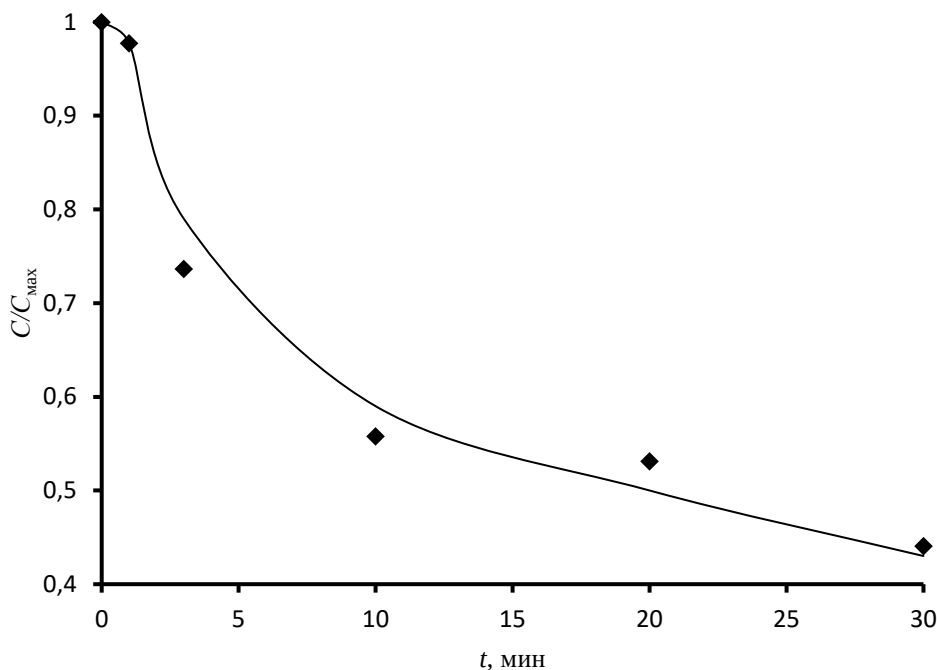


Рис. 5. Зависимость концентрации гидроксильных групп при кратковременном (10 с) облучении метиленового синего лазерным излучением 0,5 Вт в различные моменты времени

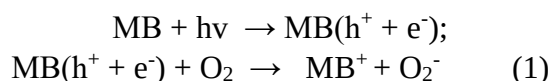
Fig. 5. Dependence of the concentration of hydroxyl groups during short-term (10 seconds) irradiation of methylene blue with laser radiation of 0,5 W at different times

На рисунках 4 и 5 хорошо заметно, что сначала интенсивность образования $\cdot\text{OH}$ радикалов возрастает, а затем начинает лавинообразно снижаться. При этом чем больше интенсивность излучения лазера, тем быстрее уменьшается концентрация $\cdot\text{OH}$ радикалов. Это можно объяснить следующим образом. При включении лазерного излучения в метиленовом синем формируются $\cdot\text{OH}$ радикалы, с которыми ДМПО аддукты начинают активно взаимодействовать, в результате чего образуются спиновые аддукты (ДМПО-ОН). Стоит отметить, что время жизни этих аддуктов ограничено, как правило, не больше 30 мин, поскольку они сами быстро разрушаются под действием активных кислородсодержащих радикалов, находящихся в растворе.

Поэтому лавинообразное снижение их концентрации связано с другим факто-

ром, заключающимся в окислении аддукта из-за избытка образования радикалов $\cdot\text{OH}$ в метиленовом синем.

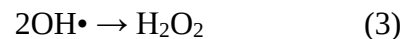
Сам процесс фотодеградации метиленового синего может быть описан следующим образом:



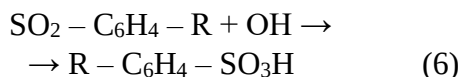
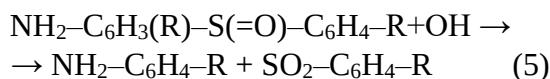
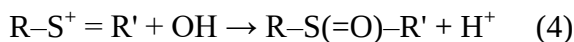
В основных средах образование радикалов $\cdot\text{OH}$ происходит при моноэлектронном восстановлении радикалов MB^+ на OH^- :



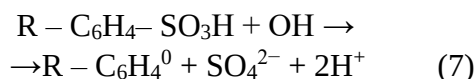
Радикалы $\cdot\text{OH}$ реагируют друг с другом, образуя H_2O_2 , являющийся важным активным веществом в процессах разложения органических загрязнителей:



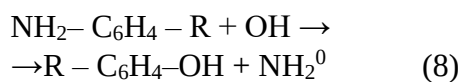
Основные реакции для фотолиза метиленового синего представлены ниже:



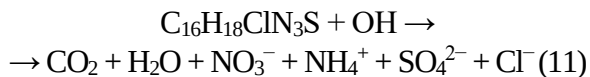
Воздействие $\bullet OH$ приводит к образованию SO_4^{2-} :



Также атакой $\bullet OH$ объясняется образование NH_4^+ :



Общее уравнение для фотодегradации метиленового синего можно выразить таким образом [25]:



$\bullet OH$ принимает активное участие в раскрытии кольца метиленового синего, в начальной стадии фотодегradации он атакует группу $C-S^+ = C$. Индуцированный дырками H^+ принимает активное участие в образовании связей CH и NH , именно благодаря тому, что более сложная молекула расщепляется на более мелкие промежуточные продукты и происходит фотодегradация метиленового синего. Известны исследования, в которых при помощи ИК-спектроскопии было обнаружено, что группы $\bullet OH$ во время разложения метиленового синего атакуют боковые цепи, что приводит к удалению метильной группы CH_3 . Скорость разложения красителя зависит от таких параметров, как время облучения и интенсивность источника света, начальной концентрации

метиленового синего, кислотности раствора, действия окислителей, действия поглотителей радикалов и ионов [26].

Таким образом, на основании представленных данных можно заключить, что процесс фотодегradации чистого метиленового синего под действием красного лазерного излучения с длиной волны 660 нм происходит за счёт образования гидроксильных радикалов и носит окислительно-восстановительный характер. Полученные результаты могут быть использованы для выработки новых решений по повышению эффективности очистки промышленных сточных вод от загрязнения красителями, а также в области медицины для лечения онкологических заболеваний, где метиленовый синий может выступать как фотосенсибилизатор для уничтожения раковых клеток.

Выводы

1. Облучение лазерным источником с длиной волны 660 нм водного раствора тиазинового красителя метиленового синего приводит к его активной фотодегradации.

2. Добавление триафлавина приводит к замедлению процесса фотодегradации метиленового синего при облучении красным светом за счёт расходования части генерируемых кислородсодержащих радикалов на деградацию триафлавина.

3. По данным ЭПР-спектроскопии с добавлением спиновой ловушки ДМПО доказано, что при облучении метиленового синего лазерным излучением с длиной волны 660 нм происходит активное образование гидроксильных $OH^\bullet$ радикалов.

4. Установлено, что с увеличением интенсивности лазерного излучения количество генерированных гидроксильных радикалов ($OH^\bullet$) значительно увеличивается.

Список литературы

1. Photodynamic effect of methylene blue and low level laser radiation in head and neck squamous cell carcinoma cell lines / B. Kofler, A. Romani, C. Pritz, T. Steinbichler, V. Scharfetter, H. Riechelmann, J. Dudas // *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. Vol. 19, no. 4. Art. no. 1107. <https://doi.org/10.3390/ijms19041107>.
2. Effect of methylene blue photodynamic therapy on human neutrophil functional responses / E. Trevisan, R. Menegazzi, G. Zabucchi, B. Troian, S. Prato, F. Vita, V. Rapozzi, M. Grandolfo, V. Borelli // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2019. Vol. 199. P. 111605. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111605>.
3. Methylene blue-mediated photodynamic therapy in the treatment of oral microbiota. A Systematic Review / L. C. T. Moreti, L. A. Garcia, K. G. C. Fernandes, D. I. Kozusny-Andreani, J. A. S. Souza, C. R. Tim // *Research, Society and Development*. 2022. Vol. 11, no. 6. P. e53411629001. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i6.29001>.
4. Kuang Y., Zhang X., Zhou S. Adsorption of methylene blue in water onto activated carbon by surfactant modification // *Water*. 2020. Vol. 12, no. 2. P. 587. <https://doi.org/10.3390/w12020587>.
5. Fast and highly efficient removal of dye from aqueous solution using natural locust bean gum based hydrogels as adsorbent / S. Pandey, J. Y. Do, J. Kim, M. Kang // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. Vol. 143. P. 60–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.002>.
6. On the discoloration of methylene blue by visible light / A. Sáenz-Trevizo, P. Pizá-Ruiz, D. Chávez-Flores, J. Ogaz-Parada, P. Amézaga-Madrid, A. Vega-Ríos, M. Miki-Yoshida // *Journal of Fluorescence*. 2019. Vol. 29, no. 1. P. 15–25. <https://doi.org/10.1007/s10895-018-2304-6>.
7. Homogeneous photosensitized degradation of pharmaceuticals by using red light LED as light source and methylene blue as photosensitizer / Y. Ye, H. Bruning, D. Yntema, M. Mayer, H. Rijnaarts // *Chemical Engineering Journal*. 2017. Vol. 316. P. 872–881. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.053>.
8. Fadda A., Barberis A., Sanna D. Influence of pH, buffers and role of quinolinic acid, a novel iron chelating agent, in the determination of hydroxyl radical scavenging activity of plant extracts by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) // *Food Chemistry*. 2018. Vol. 240. P. 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.076>.
9. Reactive oxygen species formation at Pt nanoparticles revisited by electron paramagnetic resonance and electrochemical analysis / S. den Hartog, M. Samanipour, H. Y. V. Ching, S. Van Doorslaer, T. Breugelmans, A. Hubin, J. Ustarroz // *Electrochemistry Communications*. 2021. Vol. 122. Art. no. 106878. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2020.106878>.
10. Sanna D., Fadda A. Role of the Hydroxyl radical-generating system in the estimation of the antioxidant activity of plant extracts by electron paramagnetic resonance (EPR) // *Molecules*. 2022. Vol. 27, no. 14. Art. no. 4560. <https://doi.org/10.3390/molecules27144560>.
11. Estimation of the local concentration of the markedly dense hydroxyl radical generation induced by X-rays in water / K. I. Matsumoto, M. Ueno, Y. Shoji, I. Nakanishi // *Molecules*. 2022. Vol. 27, no. 3. Art. no. 592. <https://doi.org/10.3390/molecules27030592>.
12. Electron spin resonance evidence for electro-generated hydroxyl radicals / S. Pei, S. You, J. Ma, X. Chen, N. Ren // *Environmental Science and Technology*. 2020. Vol. 54, no. 20. P. 13333–13343. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c05287>.
13. Electron paramagnetic resonance of sonicated powder suspensions in organic solvents / H. Laajimi, M. Mattia, R. S. Stein, C. L. Bianchi, D. C. Boffito // *Ultrasonics Sonochemistry*. 2021. Vol. 73. Art. no. 105544. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105544>.
14. Electron paramagnetic resonance for the detection of electrochemically generated hydroxyl radicals: issues associated with electrochemical oxidation of the spin trap / E. Braxton, D. J. Fox,

B. G. Breeze, J. J. Tully, K. J. Levey, M. E. Newton, J. V. Macpherson // ACS Measurement Science Au. 2023. Vol. 3, no. 1. P. 21–31. <https://doi.org/10.1021/acsmeasuresciau.2c00049>.

15. Accurate identification of radicals by in-situ electron paramagnetic resonance in ultraviolet-based homogenous advanced oxidation processes / L. Chen, J. Duan, P. Du, W. Sun, B. Lai, W. Liu // Water Research. 2022. Vol. 221. P. 118747. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118747>.

16. Application of EPR Spectroscopy in TiO₂ and N₂O₅ Photocatalysis / O. Al-Madanat, B. N. Nunes, Y. Alsalka, A. Hakki, M. Curti, A. O. T. Patrocinio, D. W. Bahnemann // Catalysts. 2021. Vol. 11. P. 1514. <https://doi.org/10.3390/catal11121514>.

17. Electron magnetic resonance in heterogeneous photocatalysis research / M. Chiesa, E. Giamello, S. Livraghi, M. C. Paganini, V. Polliotto, E. Salvadori // Journal of Physics. Condensed Matter. 2019. Vol. 31(44). Art. no. 444001. <https://doi.org/10.1088/1361-648X/ab32c6>.

18. First direct and unequivocal electron spin resonance spin-trapping evidence for ph-dependent production of hydroxyl radicals from sulfate radicals / H. Y. Gao, C. H. Huang, L. Mao, B. Shao, J. Shao, Z. Y. Yan, M. Tang, B. Z. Zhu // Environmental Science and Technology. 2020. Vol. 54, no. 21. P. 14046–14056. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c04410>.

19. Interaction between air plasma-produced aqueous ¹O₂ and the spin trap DMPO in electron spin resonance / C. Chen, F. Li, H. L. Chen, M. G. Kong // Physics of Plasmas. 2017. Vol. 24, no. 10. Art. no. 103501. <https://doi.org/10.1063/1.4986008>.

20. Dynamics of photoinduced bulk and surface reactions involving semiconductors characterized by time resolved spectroscopy techniques (2015–2018) / C. Günnemann, M. Curti, J. Schneider, D. W. Bahnemann // Photochemistry. 2020. Vol. 47. P. 122–158. <https://doi.org/10.1039/9781788016520-00122>.

21. Electron traps and the stark effect on hydroxylated titania photocatalysts / S. H. Szczepankiewicz, J. A. Moss, M. R. Hoffmann // The Journal of Physical Chemistry B. 2002. Vol. 106, no. 31. P. 7654–7658. <https://doi.org/10.1021/jp020472v>.

22. Szczepankiewicz S. H., Moss J. A., Hoffmann M. R. Slow surface charge trapping kinetics on irradiated TiO // Journal of Physical Chemistry B. 2002. Vol. 106. P. 2922–2927. <https://doi.org/10.1021/jp004244h>.

23. Charge separation and trapping in n-doped TiO photocatalysts: A time-resolved microwave conductivity study / R. Katoh, A. Furube, K. Yamanaka, T. Morikawa // The Journal of Physical Chemistry Letters. 2010. Vol. 1, no. 22. P. 3261–3265. <https://doi.org/10.1021/jz1011548>.

24. Light-induced charge separation in anatase TiO particles / T. Berger, M. Sterrer, O. Diwald, E. Knözinger, D. Panayotov, T. L. Thompson, J. T. Yates // The Journal of Physical Chemistry B. 2005. Vol. 109, no. 13. P. 6061–6068. <https://doi.org/10.1021/jp0404293>.

25. Rapid photodegradation of methylene blue by laser-induced plasma / J. Jiang, N. Xie, Y. Jiang, J. Han, G. Feng, Z. Shi, C. He // RSC Advances. 2022. Vol. 12, no. 33. P. 21056–21065. <https://doi.org/10.1039/D2RA03633A>.

26. Review on methylene blue: its properties, uses, toxicity and photodegradation / I. Khan, K. Saeed, I. Zekker, B. Zhang, A. H. Hendi, A. Ahmad, S. Ahmad, N. Zada, H. Ahmad, L. A. Shah, T. Shah, I. Khan // Water. 2022. Vol. 14(2). P. 242. <https://doi.org/10.3390/w14020242>.

References

1. Kofler B., Romani A., Pritz C., Steinbichler T., Scharfing V., Riechelm H., Dudas J. Photodynamic effect of methylene blue and low level laser radiation in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, vol. 19, no. 4, art. no. 1107. <https://doi.org/10.3390/ijms19041107>

2. Trevisan E., Menegazzi R., Zabucchi G., Troian B., Prato S., Vita F., Rapozzi V., Grandolfo M., Borelli V. Effect of methylene blue photodynamic therapy on human neutrophil functional responses. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2019, vol. 199, pp. 111605. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111605>
3. Moreti L. C. T., Garcia L. A., Fernandes K. G. C., Kozusny-Andreani D. I., Souza J. A. S., Tim C. R. Methylene blue-mediated photodynamic therapy in the treatment of oral microbiota. A Systematic Review. *Research, Society and Development*, 2022, vol. 11, no. 6, pp. e53411629001. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i6.29001>
4. Kuang Y., Zhang X., Zhou S. Adsorption of methylene blue in water onto activated carbon by surfactant modification. *Water*, 2020, vol. 12, no. pp. 587. <https://doi.org/10.3390/w12020587>
5. Pandey S., Do J. Y., Kim J., Kang M. Fast and highly efficient removal of dye from aqueous solution using natural locust bean gum based hydrogels as adsorbent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, vol. 143, pp. 60–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.002>
6. Sáenz-Trevizo A., Pizá-Ruiz P., Chávez-Flores D., Ogaz-Parada J., Amézaga-Madrid P., Vega-Ríos A., Miki-Yoshida M. On the discoloration of methylene blue by visible light. *Journal of Fluorescence*, 2019, vol. 29, no. 1, pp. 15–25. <https://doi.org/10.1007/s10895-018-2304-6>
7. Ye Y., Bruning H., Yntema D., Mayer M., Rijnaarts H. Homogeneous photosensitized degradation of pharmaceuticals by using red light LED as light source and methylene blue as photosensitizer. *Chemical Engineering Journal*, 2017, vol. 316, pp. 872–881. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.053>
8. Fadda A., Barberis A., Sanna D. Influence of pH, buffers and role of quinolinic acid, a novel iron chelating agent, in the determination of hydroxyl radical scavenging activity of plant extracts by electron paramagnetic resonance (EPR). *Food Chemistry*, 2018, vol. 240, pp. 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.076>
9. den Hartog S., Samanipour M., Ching H. Y. V., van Doorslaer S., Breugelmans T., Hubin A., Us-tarroz J. Reactive oxygen species formation at Pt nanoparticles revisited by electron paramagnetic resonance and electrochemical analysis. *Electrochemistry Communications*, 2021, Vol. 122, art. no. 106878. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2020.106878>
10. Sanna D., Fadda A. Role of the hydroxyl radical-generating system in the estimation of the anti-oxidant activity of plant extracts by electron paramagnetic resonance (EPR). *Molecules*, 2022, vol. 27, art. no. 4560. <https://doi.org/10.3390/molecules27144560>
11. Matsumoto K. I., Ueno M., Shoji Y., Nakanishi I. Estimation of the local concentration of the markedly dense hydroxyl radical generation induced by X-rays in water. *Molecules*, 2022, vol. 27, no. 3, art. no. 592. <https://doi.org/10.3390/molecules27030592>
12. Pei S., You S., Ma J., Chen X., Ren N. Electron spin resonance evidence for electro-generated hydroxyl radicals. *Environmental Science and Technology*, 2020, vol. 54, no. 20, pp. 13333–13343. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c05287>
13. Laajimi H., Mattia M., Stein R. S., Bianchi C. L., Boffito D. C. Electron paramagnetic resonance of sonicated powder suspensions in organic solvents. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2021, vol. 73, art. no. 105544. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105544>
14. Braxton E., Fox D. J., Breeze B. G., Tully J. J., Levey K. J., Newton M. E., Macpherson J. V. Electron paramagnetic resonance for the detection of electrochemically generated hydroxyl radicals: issues associated with electrochemical oxidation of the spin trap. *ACS Measurement Science Au*, 2023, vol. 3, no. 1, pp. 21–31. <https://doi.org/10.1021/acsmeasuresciau.2c00049>
15. Chen L., Duan J., Du P., Sun W., Lai B., Liu W. Accurate identification of radicals by in-situ electron paramagnetic resonance in ultraviolet-based homogenous advanced oxidation processes. *Water Research*, 2022, vol. 221, pp. 118747. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118747>

16. Al-Madanat O., Nunes B.N., Alsalka Y., Hakki A., Curti M., Patrocinio A. O. T., Bahnemann D.W. Application of EPR Spectroscopy in TiO_2 and Nb_2O_5 . *Photocatalysis, Catalysts*, 2021, vol. 11, pp. 1514. <https://doi.org/10.3390/catal11121514>
17. Chiesa M., Giamello E., Livraghi S., Paganini M.C., Polliotto V., Salvadori E. Electron magnetic resonance in heterogeneous photocatalysis research. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2019, vol. 31(44), art. no. 444001. <https://doi.org/10.1088/1361-648X/ab32c6>
18. Gao H. Y., Huang C. H., Mao L., Shao B., Shao J., Yan Z. Y., Tang M., Zhu B. Z. First direct and unequivocal electron spin resonance spin-trapping evidence for pH-dependent production of hydroxyl radicals from sulfate radicals. *Environmental Science and Technology*, 2020, vol. 54, no. 21, pp. 14046–14056. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c04410>
19. Chen C., Li F., Chen H. L., Kong M. G. Interaction between air plasma-produced aqueous $^1\text{O}_2$ and the spin trap DMPO in electron spin resonance. *Physics of Plasmas*, 2017, vol. 24, no. 10, art. no. 103501. <https://doi.org/10.1063/1.4986008>
20. Günnemann C., Curti M., Schneider J., Bahnemann D. W. Dynamics of photoinduced bulk and surface reactions involving semiconductors characterized by time resolved spectroscopy techniques (2015–2018). *Photochemistry*, 2020, vol. 47, pp. 122–158. <https://doi.org/10.1039/9781788016520-00122>
21. Szczepankiewicz S. H., Moss J. A., Hoffmann M. R. Electron traps and the stark effect on hydroxylated titania photocatalysts. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002, vol. 106, no. 31, pp. 7654–7658. <https://doi.org/10.1021/jp020472v>
22. Szczepankiewicz S. H., Moss J. A., Hoffmann M. R. Slow surface charge trapping kinetics on irradiated TiO_2 . *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002, vol. 106, pp. 2922–2927. <https://doi.org/10.1021/jp004244h>
23. Katoh R., Furube A., Yamanaka K., Morikawa T. Charge separation and trapping in N-doped TiO_2 photocatalysts: a time-resolved microwave conductivity study. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2010, vol. 1, no. 22, pp. 3261–3265. <https://doi.org/10.1021/jz1011548>
24. Berger T., Sterrer M., Diwald O., Knözinger E., Panayotov D., Thompson T. L., Yates J. T. Light-induced charge separation in anatase TiO_2 particles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2005, vol. 109, no. 13, pp. 6061–6068. <https://doi.org/10.1021/jp0404293>
25. Jiang J., Xie N., Jiang Y., Han J., Feng G., Shi Z., He C. Rapid photodegradation of methylene blue by laser-induced plasma. *RSC Advances*, 2022, vol. 12, no. 33, pp. 21056–21065. <https://doi.org/10.1039/D2RA03633A>
26. Khan I., Saeed K., Zekker I., Zhang B., Hendi A. H., Ahmad A., Ahmad S., Zada N., Ahmad H., Shah L. A., Shah T., Khan I. Review on methylene blue: its properties, uses, toxicity and photodegradation. *Water*, 2022. vol. 14 (2), p. 242. MDPI, <https://doi.org/10.3390/w14020242>

Информация об авторах / Information about the Authors

Рассеко Дмитрий Сергеевич, аспирант кафедры нанотехнологий, микроэлектроники, общей и прикладной физики, Юго-Западный государственный университет, г. Курск, Российская Федерация,
e-mail: rasseko.dmitriy@bk.ru,
ORCID: 0000-0002-1247-257X

Dmitry S. Rasseko, Post-Graduate Student of the Department of the of Nanotechnology, Microelectronics and Engineering Physics, Southwest State University, Kursk, Russian Federation,
e-mail: rasseko.dmitriy@bk.ru,
ORCID: 0000-0002-1247-257X

Пугачевский Максим Александрович, доктор физико-математических наук, профессор кафедры нанотехнологий, микроэлектроники, общей и прикладной физики, директор Регионального центра нанотехнологий, Юго-Западный государственный университет, г. Курск, Российская Федерация, e-mail: pmaximal@mail.ru, ORCID: 0000-0002-5004-0823

Жакин Анатолий Иванович, доктор физико-математических наук, профессор кафедры нанотехнологий, микроэлектроники, общей и прикладной физики, Юго-Западный государственный университет, г. Курск, Российская Федерация, e-mail: zhakin@mail.ru, ORCID: 0000-0001-5635-8149

Maksim A. Pugachevskii, Doctor of Sciences (Physics and Mathematics), Professor at the Department of Nanotechnology, Microelectronics and Engineering Physics, Director of the Regional center of nanotechnology, Southwest State University, Kursk, Russian Federation, e-mail: pmaximal@mail.ru, ORCID: 0000-0002-5004-0823

Anatoly I. Zhakin, Doctor of Sciences (Physics and Mathematics), Professor of the Department of Nanotechnology, Microelectronics, General and Applied Physics, Southwest State University, Kursk, Russian Federation, e-mail: zhakin@mail.ru, ORCID: 0000-0001-5635-8149