



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2023. Т. 23, вып. 1. С. 56–67

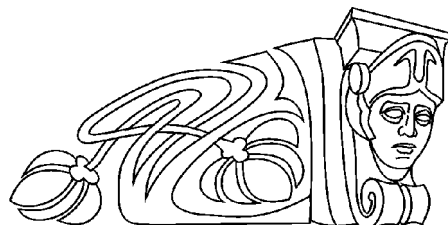
*Izvestiya of Saratov University. Physics*, 2023, vol. 23, iss. 1, pp. 56–67

<https://fizika.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1817-3020-2023-23-1-56-67>, EDN: XFFREE

Научная статья  
УДК 577.344.3

## Субмикронные частицы ватерита, загруженные фотосенсибилизатором порфиразиновой природы, для фотодинамической терапии клеток карциномы мочевого пузыря



Л. Н. Шестакова<sup>1</sup>✉, Н. Е. Галочкина<sup>1</sup>, Д. Б. Трушина<sup>2</sup>, Л. Г. Клапшина<sup>3</sup>, С. А. Лермонтова<sup>3</sup>, И. В. Балалаева<sup>1</sup>, Н. Ю. Шилиягина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Нижегородский государственный университет имени Н. И. Лобачевского, Россия, 603022, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23

<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Россия, 119991, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д. 2, стр. 4

<sup>3</sup>Институт металлоорганической химии им. Г. А. Разуваева Российской академии наук, Россия, 603137, г. Нижний Новгород, ул. Тропинина, д. 49

Шестакова Лидия Николаевна, аспирант кафедры биофизики Института биологии и биомедицины, [lsnh1998@yandex.ru](mailto:lsnh1998@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0003-3885-6085>

Галочкина Наталия Евгеньевна, магистрант кафедры биофизики Института биологии и биомедицины, [natalia.volkova.unn@yandex.ru](mailto:natalia.volkova.unn@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0001-9434-3247>

Трушина Дарья Борисовна, кандидат физико-математических наук, заведующая лабораторией направленного транспорта лекарственных препаратов, [trushina.d@mail.ru](mailto:trushina.d@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0001-9871-8050>

Клапшина Лариса Григорьевна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональных металл-органических соединений, [klarisa@iomc.ras.ru](mailto:klarisa@iomc.ras.ru), <https://orcid.org/0000-0002-2686-980X>

Лермонтова Светлана Алексеевна, кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории функциональных металл-органических соединений, [lermontovasa@rambler.ru](mailto:lermontovasa@rambler.ru), <https://orcid.org/0000-0001-8366-3886>

Балалаева Ирина Владимировна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биофизики Института биологии и биомедицины, [irin-b@mail.ru](mailto:irin-b@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-3245-3907>

Шилиягина Наталья Юрьевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биофизики Института биологии и биомедицины, [nat-lekanova@yandex.ru](mailto:nat-lekanova@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0001-5766-6880>

**Аннотация.** Рак мочевого пузыря входит в десятку самых распространенных онкологических заболеваний, обуславливающих высокий процент смертельных исходов. Фотодинамическая терапия является одним из перспективных способов лечения этого заболевания. Для повышения эффективности фотодинамической терапии необходимо обеспечить селективную доставку фотосенсибилизатора в опухоль. Одним из подходов к повышению избирательности накопления фотосенсибилизатора является использование различных транспортных систем доставки. В частности, в качестве такой системы большой интерес представляют нано- и микрочастицы карбоната кальция в полиморфной модификации ватерит.

Целью данной работы было исследование субмикронных частиц ватерита (Vp) в качестве агентов для избирательной доставки фотосенсибилизатора тетрааксис(4-бензилоксифенил)тетрацианопорфиразина (PzVn) на клеточной культуре карциномы мочевого пузыря человека T24. Было показано, что процент загрузки PzVn в частицы ватерита составляет более девяти процентов. Продемонстрировано, что PzVnVp характеризуется низкой темновой токсичностью при высокой фотодинамической активности. По полученным данным частицы ватерита могут рассматриваться как перспективные агенты для избирательной доставки фотосенсибилизатора PzVn при терапии рака мочевого пузыря.

**Ключевые слова:** фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, ватерит, порфиразин, рак мочевого пузыря

**Благодарности:** Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (грант № 0729-2020-0061).

**Для цитирования:** Шестакова Л. Н., Галочкина Н. Е., Трушина Д. Б., Клапшина Л. Г., Лермонтова С. А., Балалаева И. В., Шилиягина Н. Ю. Субмикронные частицы ватерита, загруженные фотосенсибилизатором порфиразиновой природы, для фотодинамической терапии клеток карциномы мочевого пузыря // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2023. Т. 23, вып. 1. С. 56–67. <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2023-23-1-56-67>, EDN: XFFREE

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)



Article

## Submicron vaterite particles, loaded with porphyrizine photosensitizer for photodynamic therapy of bladder carcinoma cells

L. N. Shestakova<sup>1</sup>✉, N. E. Galochkina<sup>1</sup>, D. B. Trushina<sup>2</sup>, L. G. Klapshina<sup>3</sup>, S. A. Lermontova<sup>3</sup>, I. V. Balalaeva<sup>1</sup>, N. Yu. Shilyagina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23 Gagarin Av., Nizhny Novgorod 603950, Russia

<sup>2</sup>First Moscow State Medical University, 2–4 Bolshaya Pirogovskaya St., Moscow 119991, Russia

<sup>3</sup>Institute of Organometallic Chemistry of Russian Academy of Sciences, 49 Tropinina St., Nizhny Novgorod 603137, Russia

Lydia N. Shestakova, lshn1998@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3885-6085>

Natalia E. Galochkina, natalia.volkova.unn@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9434-3247>

Daria B. Trushina, trushina.d@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9871-8050>

Larisa G. Klapshina, klarisa@iomc.ras.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2686-980X>

Svetlana A. Lermontova, lermontovasa@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8366-3886>

Irina V. Balalaeva, irin-b@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3245-3907>

Natalia Yu. Shilyagina, nat-lekanova@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5766-6880>

**Abstract. Background and Objectives:** Bladder cancer is one of the ten most common cancers causing a high mortality rate. Photodynamic therapy (PDT) is one of the promising ways to treat this disease. To increase the effectiveness of PDT it is necessary to ensure selective delivery of photosensitizer to the tumor. Selective delivery systems such as nano- and microparticles of calcium carbonate in the polymorphic modification of vaterite are of great interest to solve this problem. Therefore, the aim of this study was to investigate submicron particles of vaterite as agents for selective delivery of photosensitizer **PzBn** on human bladder T24 cell culture. **Materials and Methods:** Calcium carbonate particles were obtained by mixing equimolar solutions of  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  salts in the presence of glycerol. **PzBn** was immobilized by adsorbing the substance on preliminarily synthesized vaterite particles. The loading efficiency was evaluated using the spectrophotometric method. The experiments were carried out on the T24 human bladder carcinoma cell line. Intracellular localization was assessed using fluorescent laser confocal scanning microscopy. The study of the dynamics of **PzBnVp** accumulation by cells was carried out by spectrophotometry. Dark toxicity and photodynamic activity were analyzed using the MTT test. **Results:** The efficiency of loading porphyrizine into vaterite particles is over 9%. It has been shown that **PzBnVp** is characterized by rather rapid accumulation by T24 cells: the maximum accumulation is recorded already 30 minutes after its addition, after which the intensity of the fluorescence signal remains at a constant level for 5 hours of observation. It has been demonstrated that **PzBnVp** is characterized by low dark toxicity with high photodynamic activity. **Conclusion:** The possibility of loading vaterite particles with the photodynamic dye porphyrizine has been demonstrated. A high rate of entry of vaterite particles into the cell and the release of the loaded photosensitizer from particles and its subsequent redistribution over subcellular structures have been shown. The preservation of the photodynamic activity of porphyrizine in the composition of vaterite particles and the absence of dark toxicity in the studied concentration range have been demonstrated. Vaterite particles can be considered as promising agents for the selective delivery of porphyrizine to the tumor in order to increase the efficiency of photodynamic therapy.

**Keywords:** photodynamic therapy, photosensitizer, vaterite, porphyrizine, bladder cancer

**Acknowledgments:** This work was carried out in the framework of the State Task of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (grant no. 0729-2020-0061).

**For citation:** Shestakova L. N., Galochkina N. E., Trushina D. B., Klapshina L. G., Lermontova S. A., Balalaeva I. V., Shilyagina N. Yu. Submicron vaterite particles, loaded with porphyrizine photosensitizer for photodynamic therapy of bladder carcinoma cells. *Izvestiya of Saratov University. Physics*, 2023, vol. 23, iss. 1, pp. 56–67 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2023-23-1-56-67>, EDN: XFFREE

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

## Введение

Рак мочевого пузыря входит в десятку самых распространенных онкологических заболеваний в мире [1]. По данным на 2020 год рак мочевого пузыря занимает шестое место в мире среди всех видов онкологических заболеваний по количеству новых случаев (573 278) и четырнадцатое место по смертности (212 536 летальных случаев) [2]. Тактика лечения рака мочевого пузыря зависит от стадии опухолевого роста и степени выраженности патологии на момент проведения диагностических тестов. Наиболее распространено хирургическое удаление опухоли через уретру. При необходимости может производиться

радикальная цистэктомия мочевого пузыря. Альтернативными способами лечения являются химиотерапия, лучевая терапия, иммунотерапия, фотодинамическая терапия, а также комбинация из нескольких вышеперечисленных методов [3].

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является одним из перспективных способов лечения рака мочевого пузыря. При ФДТ рака мочевого пузыря фотоактивное соединение – фотосенсибилизатор (ФС) – вводится либо в кровоток, либо внутривезикулярно. Далее к опухолевому участку с помощью световода подводится лазерное излучение для активации фотосенсибилизатора и развития последующих фотохимических реак-



ций с образованием активных форм кислорода, которые и вызывают гибель опухолевых клеток [4].

Существенным ограничением для применения большинства известных на сегодняшний день фотосенсибилизаторов является их фототоксичность в отношении здоровых тканей организма [5]. Кроме того, для достижения эффективных концентраций в опухоли, как правило, требуется введение в организм больших доз ФС, что может приводить к проявлению сильного токсического эффекта. К настоящему моменту были предложены различные методы и подходы к направленной доставке ФС к клеткам-мишеням с использованием в качестве транспортных агентов липосом, углеродных наночастиц, дендримеров, мицелл и полимерных наночастиц [6]. Такие наночастицы обладают рядом важных характеристик: биосовместимостью, биоразлагаемостью [1], нетоксичностью и низкой иммуногенностью [7].

В качестве системы доставки лекарственных препаратов большой интерес представляют нано- и микрочастицы карбоната кальция  $\text{CaCO}_3$ . В природе карбонат кальция может существовать в нескольких полиморфных формах: кальцит, арагонит и ватерит. Для инкапсуляции биологически активных веществ активно исследуются частицы ватерита [8–12]. Интерес к ним обусловлен пористой структурой (в среднем размер пор колеблется от 20 до 60 нм), позволяющей эффективно загружать молекулы различного размера. Следует также отметить pH-чувствительную деградацию частиц, которая обеспечивает высвобождение агента, доставляемого с помощью частиц ватерита, преимущественно в опухолевых очагах, характеризующихся пониженным значением внеклеточного pH – около 6.8–7.3 [13, 14]. Исследования последних лет убедительно доказывают, что нано- и субмикронные частицы карбоната кальция могут быть успешно использованы в качестве контейнеров для инкапсуляции и последующей доставки соединений с противоопухолевой активностью, таких как доксорубин [15–17], цисплатин [18, 19], доцетаксел [20], камптотецин [21], гипокреллин В [22], фотосенс [23] и другие [24, 25].

Ранее нами было показано, что для соединений из группы порфиразинов характерно сочетание свойств фотосенсибилизаторов и сенсоров локального микроокружения [26]. Благодаря такой особенности порфиразинов их можно использовать в качестве фотодинамических

агентов, позволяющих контролировать функциональное состояние облучаемой ткани в режиме реального времени.

В этой работе исследованы субмикронные частицы карбоната кальция (**Vp**) в полиморфной модификации ватерит в качестве агентов для избирательной доставки фотосенсибилизатора тетраakis(4-бензилоксифенил)тетрацианопорфиразина (**PzBn**) на клеточной культуре карциномы мочевого пузыря человека T24. В рамках данного исследования оценена эффективность загрузки **PzBn** в частицы ватерита, проанализировано поступление загруженных частиц в клетки и оценена фотодинамическая активность частиц, загруженных **PzBn**.

## Материалы и методы

### Фотосенсибилизатор

В работе исследован тетраakis(4-бензилоксифенил)тетрацианопорфиразин (рис. 1) – соединение из класса порфиразинов, синтез которого был описан ранее [27].

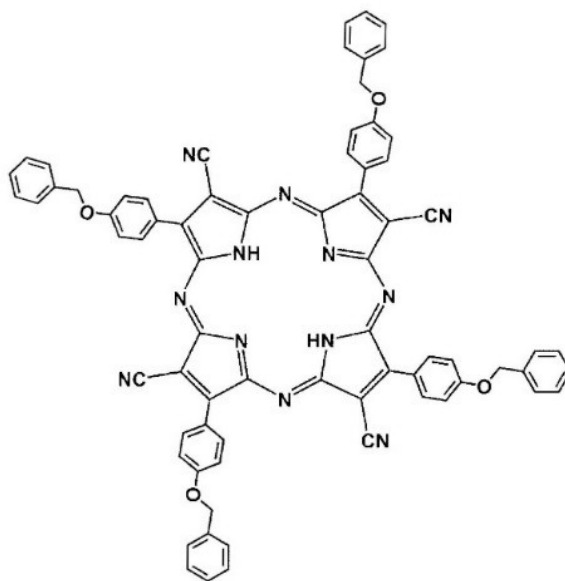


Рис. 1. Структурная формула тетраakis(4-бензилоксифенил)тетрацианопорфиразина

Fig. 1. Structural formula of tetrakis(4-benzyloxyphenyl)tetracyanoporphyrin

**PzBn** имеет несколько областей поглощения, локализованных в диапазоне 340–400 нм (коротковолновая область, полоса Soret; максимум при 360 нм) и в диапазоне 550–660 нм (длинноволновая область, Q-полоса; максимум при 590 нм). Флуоресценция **PzBn** регистрируется в диапазоне 625–825 нм с пиком при 675 нм [27].



## Ватерит

Частицы ватерита были синтезированы в соответствии с методикой, описанной ранее в работе [28]. Равные объемы 0.1 М водных растворов  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  смешивали при постоянном перемешивании при 500 об./мин с глицерином (соотношение объемов водной и глицериновой фаз составляло 1 : 5). После 60 мин непрерывного перемешивания при 25°C суспензию центрифугировали в течение 5 мин при 10000 об./мин для осаждения частиц, которые затем трижды промывали деионизированной водой для удаления непрореагировавших ионов и молекул глицерина. Далее частицы сушили при 70°C в вакууме и хранили в сухом виде.

Размер и морфологию частиц карбоната кальция оценивали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на микроскопе TM4000Plus (Hitachi, Япония). Гидродинамический размер частиц карбоната кальция и электрокинетический потенциал определяли с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Великобритания).

## Загрузка частиц ватерита порфиразином

Иммобилизацию **PzBn** осуществляли путем адсорбции вещества на предварительно синтезированных частицах ватерита. Для этого 5 мг частиц ватерита диспергировали в 500 мкл 10 мМ водного раствора **PzBn** и инкубировали в течение 30 мин с последующей трёхкратной промывкой деионизированной водой. Эффективность загрузки частиц ватерита **PzBn** оценивали с помощью планшетного спектрофотометра Synergy Mx (BioTek, США). Регистрацию спектров поглощения проводили в диапазоне длин волн 190–900 нм. Эффективность загрузки **PzBn** определяли по поглощению на длине волны 590 нм. Концентрацию загруженного **PzBn** определяли как разницу между начальной концентрацией раствора **PzBn** и концентрацией **PzBn** в надосадочной жидкости после адсорбции на частицах ватерита. **PzBn**, загруженный в частицы **Vp**, далее сокращали как **PzBnVp**.

Эффективность инкапсуляции (ЕЕ) определяли в соответствии с формулой:

$$EE = \frac{C_{add} - C_{sup}}{C_{add}} \times 100\%, \quad (1)$$

где  $C_{add}$  – концентрация **PzBn**, добавленного к частицам,  $C_{sup}$  – концентрация **PzBn** в надосадочной жидкости после адсорбции.

Массовый процент загрузки ( $M\%$ ) рассчитывали по формуле:

$$M\% = \frac{m_{PzBn}}{m_{Vp}}, \quad (2)$$

где  $m_{PzBn}$  – масса загруженного **PzBn**,  $m_{Vp}$  – масса частиц ватерита.

## Клеточная линия

Эксперименты проводили на клеточной линии карциномы мочевого пузыря человека T24 (Всероссийская коллекция клеточных культур, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в среде Игла-МЕМ (МЕМ HyClone, США), содержащей 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия) и 10%-ной фетальной бычьей сыворотки (FBS Thermo Fisher США) при 37°C в атмосфере 5%-ного  $\text{CO}_2$ . Для пассирования использовали раствор Трипсина-Версена (1 : 1) (ПанЭко, Россия).

## Исследование динамики накопления PzBnVp клетками

Клетки T24 высаживали в 96-луночный планшет в количестве 10000 клеток на лунку и культивировали в течение ночи. Затем культуральную среду заменяли на бессывороточную среду, содержащую порфиразин, загруженный в частицы ватерита, в концентрации 5 мкМ (по порфиразину). Накопление порфиразина клетками регистрировали без замены среды по интенсивности флуоресценции на длине волны 660 нм при возбуждении на 590 нм. Сигнал флуоресценции нормировали на значение в максимуме, зарегистрированное в конце инкубации, с целью исключения влияния вариации в плотности клеточной культуры в разных лунках планшета.

## Оценка внутриклеточной локализации PzBnVp

Клетки высаживали в лунки 96-луночного планшета в количестве 20000 клеток на лунку. Через 12 часов инкубации заменяли культуральную среду на бессывороточную, содержащую **PzBnVp** в концентрации 5 мкМ, и помещали в  $\text{CO}_2$ -инкубатор. После окончания инкубации (30 минут или 4 часа) среду с красителем заменяли на ростовую среду без сыворотки. Клетки визуализировали с использованием системы лазерной сканирующей микроскопии Axio Observer Z1 LSM 710 (Carl Zeiss, Германия). Возбуждение **PzBn** проводили на длине волны 594 нм; флуоресценцию регистрировали



в диапазоне 625–825 нм. Обработку результатов проводили в программе Zen Blue (Carl Zeiss, Германия).

#### Анализ темновой токсичности и фотодинамической активности

Клетки T24 высаживали на 96-луночный планшет в количестве 3000 клеток на лунку и культивировали в течение 12 часов. Затем к клеткам добавляли **Vp** или **PzBnVp** в бессывороточной среде и инкубировали в течение 4 часов. После этого заменяли среду с **Vp** или **PzBnVp** на полную ростовую питательную среду.

Для анализа фотодинамической активности клетки подвергали световому воздействию в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup> ( $\lambda_{ex}$  615–635 нм, 20 мВт/см<sup>2</sup>) с использованием светодиодного излучателя [29]. Для анализа темновой токсичности клетки инкубировали в темноте. В качестве контроля использовали клетки без добавления **Vp** или **PzBnVp**.

Фотодинамическую активность оценивали методом МТТ-теста. Для этого среду заменяли на свежую ростовую среду без сыворотки с добавлением 0.5 мг/мл МТТ-реагента (Alfa Aesar, Lancashire, Великобритания) и инкубировали в течение 4 часов. Затем среду отбирали и добавляли 200 мкл диметилсульфоксида (ДМСО, ПанЭко, Россия) для растворения образовавшихся кристаллов формазана. Оптическую плотность получившегося раствора измеряли на длине волны 570 нм с использованием планшетного спектрофотометра Synergy MX. Рассчитывали отношение оптической плотности раствора формазана в каждой лунке к контролю и полученные зависимости доза-эффект использовали для расчета концентрации полумаксимального ингибирования IC<sub>50</sub>. Расчет проводили в программе GraphPad Prism (v.9.0 GraphPad Software, США).

### Результаты и их обсуждение

#### Характеризация частиц ватерита

Анализ водной суспензии полученных частиц ватерита методом динамического светорассеяния показал, что их средний гидродинамический диаметр составляет  $560 \pm 110$  нм (рис. 2, табл. 1). В водной суспензии частицы имеют отрицательный поверхностный электрический заряд, что связано с гидролизом карбоната кальция и слоем захваченных противоионов HCO<sub>3</sub>,

находящихся вблизи поверхности частиц. Электрокинетический потенциал (дзета-потенциал) поверхности частиц определённый по их электрофоретической подвижности, составил  $-7 \pm \pm 1$  мВ (см. табл. 1). Представленные параметры структуры частиц позволили достичь 9.1 мас.% адсорбции **PzBn** при эффективности капсулирования 89.2% (см. табл. 1). Важно отметить, что процент загрузки **PzBn** в частицы ватерита превышает таковой для клинически одобренных фотосенсибилизаторов – 3.2 и 14–20 мас.% для фотодитазина [28, 30] и фотосенса [31, 32] соответственно. По всей видимости, на эффективность загрузки большое влияние оказывает

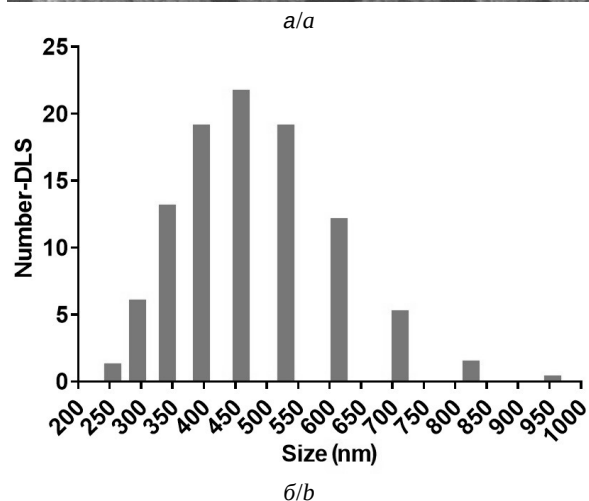
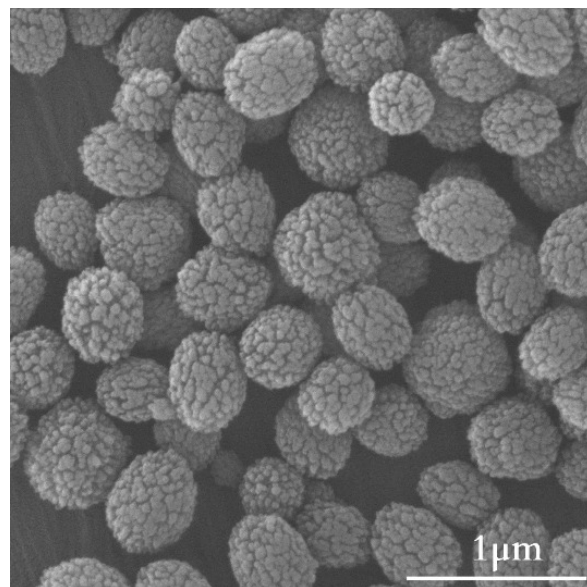


Рис. 2. Форма и размер частиц ватерита: а – СЭМ-изображение субмикронных частиц ватерита, б – гистограмма распределения частиц по гидродинамическому диаметру  
Fig. 2. Shape and size of vaterite particles: а – SEM-image of submicron vaterite particles, б – histogram of particle distribution by hydrodynamic diameter

Спецификация полученных частиц ватерита, загруженных PzBn  
Specification of the obtained vaterite particles loaded with PzBn

Гидродинамический диаметр, нм / Hydrodynamic diameter, nm	Дзета-потенциал, мВ / $\zeta$ -potential, mV	М, %	ЕЕ, %
560±110	-7±1	9.1	89.2

растворимость фотосенсибилизатора и его заряд. Так, Фотосенс является гидрофильным анионным красителем и демонстрирует более низкий процент адсорбции. При этом для гидрофобных соединений, таких как Фотодитазин и PzBn, процент загрузки становится выше.

Анализ спектра поглощения PzBnVp показал, что положение максимумов поглощения PzBn при нахождении его в составе частиц ватерита сохраняется – регистрируется максимум в коротковолновой области спектра на длине волны 360 нм и максимум – на длине волны 590 нм, что свидетельствует о сохранении изначальной структуры соединения и отсутствии агрегатов (рис. 3).

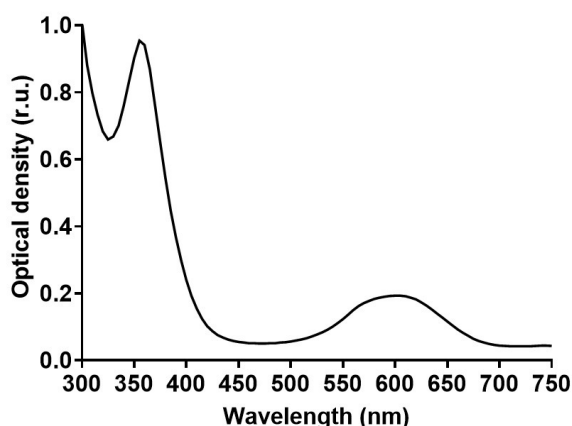


Рис. 3. Спектр поглощения PzBn после загрузки в частицы Vp

Fig. 3. Absorption spectra of PzBn after loading into Vp particles

#### Динамика накопления PzBnVp клетками

Авторами статьи была исследована динамика накопления PzBnVp клетками карциномы мочевого пузыря человека T24. Для исследования был использован метод спектрофлуориметрии. Следует отметить, что уникальные фотофизические свойства порфиразина позволяют использовать методику измерений, основанную на непрерывной регистрации сигнала флуоресценции клеток. Порфиразин, добавленный в культуральную среду, практически не флуоресцирует из-

за низкой вязкости среды. При попадании порфиразина в клетку с гораздо большей вязкостью флуоресцентный сигнал порфиразина многократно увеличивается, и, следовательно, можно регистрировать его накопление в клетке в разные моменты времени без дополнительных манипуляций. Показано, что PzBnVp характеризуется достаточно быстрым накоплением клетками T24 – максимум накопления регистрируется уже через 30 минут после его добавления, после чего интенсивность сигнала флуоресценции сохраняется на постоянном уровне в течение 5 часов наблюдения (рис. 4). Таким образом, связывание с Vp не препятствует поступлению PzBn в опухолевые клетки.

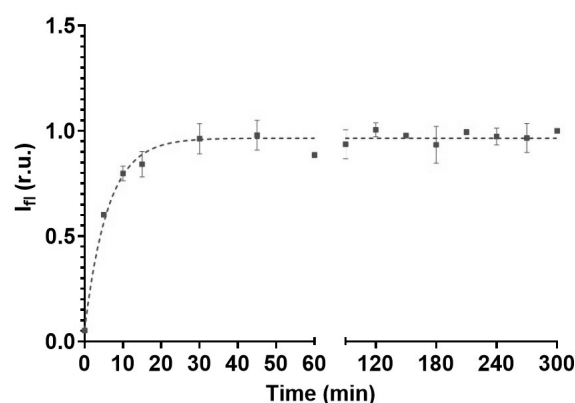


Рис. 4. Динамика накопления PzBnVp (5 мкМ) клетками карциномы мочевого пузыря T24. Регистрацию интенсивности флуоресценции проводили без замены среды. Сигнал флуоресценции нормировали на максимальное значение, зарегистрированное в конце периода инкубации. Планки погрешностей представлены стандартным отклонением  $\pm$ SD ( $n = 3$ )

Fig. 4. Dynamics of PzBnVp accumulation in bladder carcinoma T24 cells. The fluorescence intensity was recorded without replacing the medium. The fluorescence signal was normalized to the maximum value recorded at the end of the incubation period to eliminate the effect of cell culture density on the result. The data are presented as the mean values  $\pm$ SD ( $n = 3$ )

#### Внутриклеточная локализация

Методом флуоресцентной конфокальной микроскопии были оценены внутриклеточное поступление PzBnVp и выход порфиразина



из частиц. Время инкубации клеток с **PzBnVp** составило 30 минут и 4 часа. Через 30 минут показано поступление частиц ватерита в опухолевые клетки, при этом сигнал флуоресценции **PzBn** локализуется в частицах ватерита (рис. 5).

Через 4 часа инкубации был зарегистрирован высокий уровень диффузной флуоресценции в цитоплазме клеток, что свидетельствует о выходе загруженного фотосенсибилизатора из носителя и его перераспределении по субклеточным структурам. Предполагаем, что механизм выхода **PzBn** из частиц ватерита связан с рН-зависимым

растворением частиц, обусловленным пониженным значениям рН во внутриклеточной среде, в частности, в лизосомах клетки, благодаря которому происходит выход **PzBn** из состава частиц и дальнейшее диффузное распределение **PzBn** в цитоплазме клеток (рис. 6).

#### Оценка темновой токсичности и фотодинамической активности **PzBnVp**

Важным свойством применяемых в терапии агентов для доставки ФС является отсутствие у носителей собственной темновой токсично-

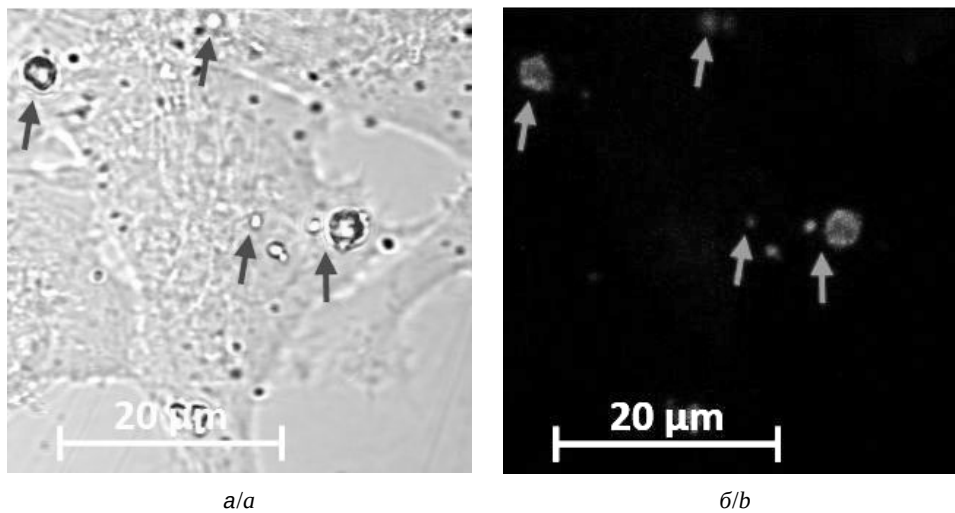


Рис. 5. Внутриклеточная локализация **PzBnVp** (5 мкМ) в клетках Т24 при инкубации в течение 30 минут;  $\lambda_{ex} = 596$  нм,  $\lambda_{em} = 673$  нм: а – просветное изображение, б – флуоресцентный канал **PzBnVp**. Стрелками указаны частицы ватерита  
Fig. 5 Intracellular localization of **PzBnVp** (5  $\mu$ M) in T24 cells after incubation for 30 minutes;  $\lambda_{ex} = 596$  nm,  $\lambda_{em} = 673$  nm: а – bright field microscopic image, б – fluorescent channel of **PzBnVp**. The arrows indicate vaterite particles

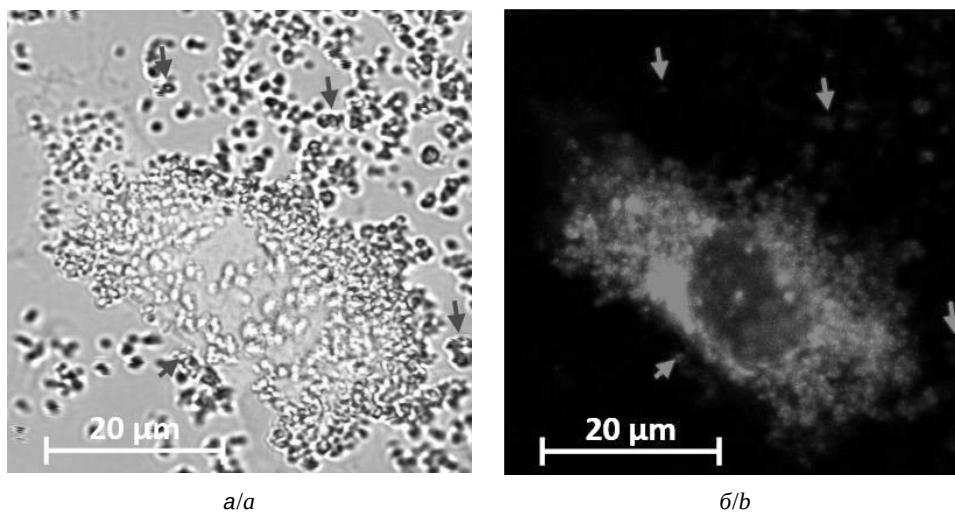


Рис. 6. Внутриклеточная локализация **PzBnVp** (5 мкМ) в клетках Т24 при инкубации в течение 4 часов;  $\lambda_{ex} = 596$  нм,  $\lambda_{em} = 673$  нм: а – просветное изображение б – флуоресцентный канал **PzBnVp**. Стрелками указаны частицы ватерита  
Fig. 6. Intracellular localization of **PzBnVp** (5  $\mu$ M) in T24 cells after incubation for 4 hour;  $\lambda_{ex} = 596$  nm,  $\lambda_{em} = 673$  nm: а – bright field microscopic image, б – fluorescent channel of **PzBnVp**. The arrows indicate vaterite particles



сти, которая может приводить к ряду побочных эффектов, в первую очередь, повреждению здоровых тканей, в том числе кожных покровов и сетчатки глаза [33]. В качестве контейнеров для доставки ФС порфиразиновой природы ранее были исследованы липосомы [34–36], полимерные щетки [37] и мицеллы [38]. При использовании этих контейнеров была продемонстрирована высокая селективность накопления препарата опухолевыми клетками по сравнению с применением препарата без носителя, а также существенное снижение темновой токсичности используемого препарата. По сравнению с упомянутыми частицами частицы ватерита отличаются относительной простотой приготовления и pH-зависимая деградация, что создаёт определённые преимущества при их использовании для доставки ФС, в том числе порфиразиновой природы.

Было показано, что частицы ватерита в диапазоне, соответствующем концентрации при загрузке, демонстрируют низкую темновую и световую активность в отношении клеток T24. Снижения жизнеспособности до 50% ( $IC_{50}$ ) не было достигнуто в диапазоне концентраций до 0.1 мг/мл, что соответствует концентрации загруженного **PzBn** 10 мкМ (рис. 7). Наблюдаемая незначительная цитотоксичность **Vp** может быть связана с влиянием на метаболизм высвобождающихся из ватерита ионов  $Ca^{2+}$ . Однако при использовании ватерита для доставки агента *in vivo* изменение полиморфной формы частиц ватерита будет наблюдаться преимущественно в области опухолевых очагов из-за более кислой среды и подобный эффект может выступить как дополнительный фактор токсичности в отношении опухолевых клеток.

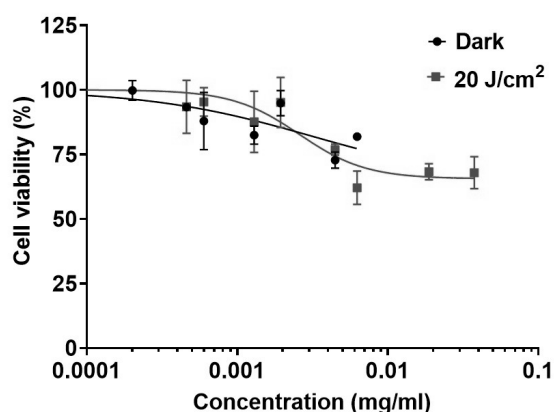


Рис. 7. Темновая и фотоиндуцированная токсичность **Vp** в отношении клеток T24

Fig. 7. Dark toxicity and photodynamic activity of **Vp** against T24 cells

Оценка темновой и фотоиндуцированной токсичности **PzBnVp** в отношении клеток T24 показала, что  $IC_{50}$  при инкубации в темноте и на свету составляет > 60 и 1,96 мкМ (95%-ный доверительный интервал 1.7–2.4 мкМ) соответственно (рис. 8). Полученные данные в целом согласуются с полученными ранее микромолярными значениями  $IC_{50}$  для фотоиндуцированной токсичности свободного **PzBn** при аналогичных условиях облучения [27]. В совокупности с такими свойствами частиц **Vp**, как биосовместимость, биоразлагаемость, сохранение фотодинамической активности **PzBn** в составе частиц ватерита, высокая скорость накопления **PzBnVp** опухолевыми клетками и высвобождение **PzBn** во внутриклеточном пространстве свидетельствуют о потенциальной перспективности использования **PzBnVp** в качестве агента для фотодинамической терапии.

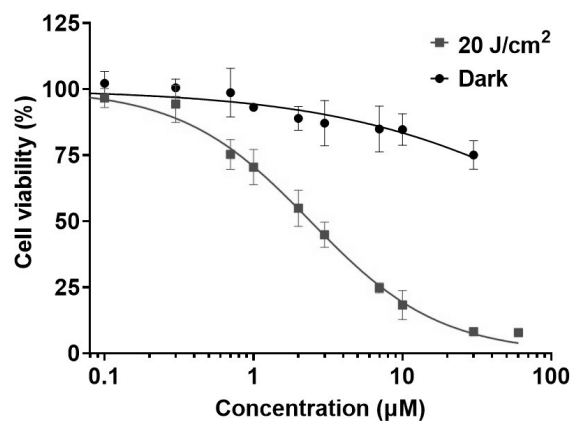


Рис. 8. Темновая и фотоиндуцированная токсичность **PzBnVp** в отношении клеток T24

Fig. 8. Dark toxicity and photodynamic activity of **PzBnVp** against T24 cells

### Заключение

Продemonстрирована возможность загрузки частиц ватерита фотодинамическим красителем тетраakis(4-бензилоксифенил)тетрациано-порфиразином. Показано, что эффективность загрузки порфиразаина в частицы ватерита составляет более девяти процентов. В эксперименте на клеточных культурах карциномы мочевого пузыря T24 зарегистрирована высокая скорость поступления частиц ватерита в клетку и выход загруженного фотосенсибилизатора из частиц и его последующее перераспределение по субклеточным структурам через четыре часа инкубации. Продemonстрировано сохранение фотодинамической активности порфиразаина в составе частиц ватерита и отсутствие темновой токсичности





в исследуемом диапазоне концентраций. Таким образом, частицы ватерита могут рассматриваться как перспективные агенты для избирательной доставки порфиразаина в опухоль с целью повышения эффективности фотодинамической терапии.

### Список литературы

1. Jain P., Kathuria H., Momin M. Clinical therapies and nano drug delivery systems for urinary bladder cancer // *Pharmacology & Therapeutics*. 2021. Vol. 226. Article number 107871. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107871>
2. Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // *CA : A Cancer Journal for Clinicians*. 2021. Vol. 71, iss. 3. P. 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
3. DeGeorge K. C., Holt H. R., Hodges S. C. Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment // *American Family Physician*. 2017. Vol. 96, iss. 8. P. 507–514.
4. Railkar R., Agarwal P. K. Photodynamic Therapy in the Treatment of Bladder Cancer: Past Challenges and Current Innovations // *European Urology Focus*. 2018. Vol. 4, iss. 4. P. 509–511. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2018.08.005>
5. Al-Omari S. Toward a molecular understanding of the photosensitizer-copper interaction for tumor destruction // *Biophys Rev*. 2013. Vol. 5, iss. 4. P. 305–311. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0112-4>
6. Kruger C. A., Abrahamse H. Utilisation of Targeted Nanoparticle Photosensitiser Drug Delivery Systems for the Enhancement of Photodynamic Therapy // *Molecules*. 2018. Vol. 23, iss. 10. Article number 2628. <https://doi.org/10.3390/molecules23102628>
7. Du Y., Chen B. Combination of drugs and carriers in drug delivery technology and its development // *Drug Design, Development and Therapy*. 2019. Vol. 13. P. 1401–1408. <https://doi.org/10.2147/dddt.s198056>
8. He X. W., Liu T., Chen Y. X., Cheng D. J., Li X. R., Xiao Y., Feng Y. L. Calcium carbonate nanoparticle delivering vascular endothelial growth factor-C siRNA effectively inhibits lymphangiogenesis and growth of gastric cancer *in vivo* // *Cancer Gene Ther*. 2008. Vol. 15, iss. 3. P. 193–202. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7701122>
9. Peng C., Zhao Q., Gao C. Sustained delivery of doxorubicin by porous CaCO<sub>3</sub> and chitosan/alginate multilayers-coated CaCO<sub>3</sub> microparticles // *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*. 2010. Vol. 353, iss. 2. P. 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.11.004>
10. Sato K., Seno M., Anzai J.-I. Release of Insulin from Calcium Carbonate Microspheres with and without Layer-by-Layer Thin Coatings // *Polymers*. 2014. Vol. 6, iss. 8. P. 2157–2165. <https://doi.org/10.3390/polym6082157>
11. Begum G., Reddy T. N., Kumar K. P., Dhevendar K., Singh S., Amarnath M., Misra S., Rangari V. K., Rana R. K. *In Situ* Strategy to Encapsulate Antibiotics in a Bioinspired CaCO<sub>3</sub> Structure Enabling pH-Sensitive Drug Release Apt for Therapeutic and Imaging Applications // *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2016. Vol. 8, iss. 34. P. 22056–22063. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b07177>
12. Lengert E., Verkhovskii R., Yurasov N., Genina E., Sventskaya Y. Mesoporous carriers for transdermal delivery of antifungal drug // *Materials Letters*. 2019. Vol. 248. P. 211–213. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.04.028>
13. Boedtker E., Pedersen S. F. The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer // *Annual Review of Physiology*. 2020. Vol. 82. P. 103–126. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034627>
14. Zhang X., Lin Y., Gillies R. J. Tumor pH and its measurement // *Journal of Nuclear Medicine*. 2010. Vol. 51, iss. 8. P. 1167–1170. <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.068981>
15. Chiang P. H., Fan C. H., Jin Q., Yeh C. K. Enhancing Doxorubicin Delivery in Solid Tumor by Superhydrophobic Amorphous Calcium Carbonate-Doxorubicin Silica Nanoparticles with Focused Ultrasound // *Mol. Pharmaceutics*. 2022. Vol. 19, iss. 11. P. 3894–3905. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00384>
16. Sudareva N., Suvorova O., Saprykina N., Vlasova H., Vilesov A. Doxorubicin delivery systems based on doped CaCO<sub>3</sub> cores and polyanion drug conjugates // *J. Microencapsul*. 2021. Vol. 38, iss. 3. P. 164–176. <https://doi.org/10.1080/02652048.2021.1872724>
17. Ibiyeye K. M., Nordin N., Ajat M., Zuki A. B. Z. Ultrastructural Changes and Antitumor Effects of Doxorubicin/Thymoquinone-Loaded CaCO<sub>3</sub> Nanoparticles on Breast Cancer Cell Line // *Front Oncol*. 2019. Vol. 9. Article number 599. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00599>
18. Khan M. W., Zou C., Hassan S., Din F. U. Cisplatin and oleanolic acid Co-loaded pH-sensitive CaCO<sub>3</sub> nanoparticles for synergistic chemotherapy // *RSC Advances*. 2022. Vol. 12, iss. 23. P. 14808–14818. <https://doi.org/10.1039/d2ra00742h>
19. Zhao P., Li M., Chen Y., He C., Zhang X., Fan T., Yang T., Lu Y., Lee R. J., Ma X., Luo J., Xiang G. Selenium-doped calcium carbonate nanoparticles loaded with cisplatin enhance efficiency and reduce side effects // *International Journal of Pharmaceutics*. 2019. Vol. 570. Article number 118638. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118638>
20. Hammadi N. I., Abba Y., Hezme M. N. M., Razak I. S. A., Kura A. U., Zakaria Z. A. B. Evaluation of *in vitro* efficacy of docetaxel-loaded calcium carbonate aragonite nanoparticles (DTX-CaCO<sub>3</sub>NP) on 4T1 mouse breast cancer cell line // *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 2017. Vol. 53, iss. 10. P. 896–907. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0197-3>
21. Qiu N., Yin H., Ji B., Klauke N., Glidle A., Zhang Y., Song H., Cai L., Ma L., Wang G., Chen L., Wang W. Calcium carbonate microspheres as carriers for the anticancer drug camptothecin // *Materials Science and Engineering : C*. 2012. Vol. 32, iss. 8. P. 2634–2640. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.08.026>



22. Dong Q., Li J., Cui L., Jian H., Wang A., Bai S. Using porous CaCO<sub>3</sub>/hyaluronic acid nanocages to accommodate hydrophobic photosensitizer in aqueous media for photodynamic therapy // *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*. 2017. Vol. 516. P. 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.12.027>
23. Svenskaya Y. I., Pavlov A. M., Gorin D. A., Gould D. J., Parakhonskiy B. V., Sukhorukov G. B. Photodynamic therapy platform based on localized delivery of photosensitizer by vaterite submicron particles // *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*. 2016. Vol. 146. P. 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.090>
24. Zhao P., Tian Y., You J., Hu X. Recent Advances of Calcium Carbonate Nanoparticles for Biomedical Applications // *Bioengineering*. 2022. Vol. 9, iss. 11. Article number 691. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9110691>
25. Trofimov A. D., Ivanova A. A., Zyuzin M. V., Timin A. S. Porous Inorganic Carriers Based on Silica, Calcium Carbonate and Calcium Phosphate for Controlled / Modulated Drug Delivery: Fresh Outlook and Future Perspectives // *Pharmaceutics*. 2018. Vol. 10, iss. 4. Article number 167. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040167>
26. Izquierdo M. A., Vyšniauskas A., Lermontova S. A., Grigoryev I. S., Shilyagina N. Y., Balalaeva I. V., Klapshina L. G., Kuimova M. K. Dual use of porphyrazines as sensitizers and viscosity markers in photodynamic therapy // *Journal of Materials Chemistry B*. 2015. Vol. 3, iss. 6. P. 1089–1096. <https://doi.org/10.1039/C4TB01678E>
27. Lermontova S. A., Grigor'ev I. S., Peskova N. N., Ladilina E. Y., Balalaeva I. V., Klapshina L. G., Boyarskii V. P. New promising porphyrazine-based agents for optical theranostics of cancer // *Russian Journal of General Chemistry*. 2017. Vol. 87, iss. 3. P. 479–484. <https://doi.org/10.1134/S1070363217030173>
28. Trushina D. B., Bukreeva T. V., Antipina M. N. Size-Controlled Synthesis of Vaterite Calcium Carbonate by the Mixing Method: Aiming for Nanosized Particles // *Crystal Growth & Design*. 2016. Vol. 16, iss. 3. P. 1311–1319. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b01422>
29. Shilyagina N. Y., Plekhanov V., Shkunov I. V., Shilyagin P. A., Dubasova L. V., Brilkina A. A., Sokolova E. A., Turchin I. V., Balalaeva I. V. LED Light Source for *in vitro* Study of Photosensitizing Agents for Photodynamic Therapy // *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2014. Vol. 6, iss. 12. P. 15–22.
30. Trushina D. B., Borodina T. N., Artemov V. V., Bukreeva T. V. Immobilization of Photoditazine on Vaterite Porous Particles and Analysis of the System Stability in Model Media // *Technical Physics*. 2018. Vol. 63, iss. 9. P. 1345–1351. <https://doi.org/10.1134/S1063784218090220>
31. Svenskaya Y., Parakhonskiy B., Haase A., Atkin V., Lukyanets E., Gorin D., Antolini R. Anticancer drug delivery system based on calcium carbonate particles loaded with a photosensitizer // *Biophys. Chem*. 2013. Vol. 182. P. 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2013.07.006>
32. Svenskaya Y. I., Navolokin N. A., Bucharskaya A. B., Terentyuk G. S., Kuz'mina A. O., Burashnikova M. M., Maslyakova G. N., Lukyanets E. A., Gorin D. A. Calcium carbonate microparticles containing a photosensitizer photosens: Preparation, ultrasound stimulated dye release, and *in vivo* application // *Nanotechnologies in Russia*. 2014. Vol. 9, iss. 7. P. 398–409. <https://doi.org/10.1134/S1995078014040181>
33. Correia J. H., Rodrigues J. A., Pimenta S., Dong T., Yang Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions // *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 13, iss. 9. Article number 1332. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091332>
34. Piskorz J., Lijewski S., Gierszewski M., Gorniak K., Sobotta L., Wicher B., Tykarska E., Düzgüneş N., Konopka K., Sikorski M., Gdaniec M., Mielcarek J., Goslinski T. Sulfanyl porphyrazines: Molecular barrel-like self-assembly in crystals, optical properties and *in vitro* photodynamic activity towards cancer cells // *Dyes and Pigments*. 2017. Vol. 136. P. 898–908. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.09.054>
35. Wiecek E., Mlynarczyk D. T., Kucinska M., Długaszewska J., Piskorz J., Popena L., Szczolko W., Jurga S., Murias M., Mielcarek J., Goslinski T. Photophysical properties and photocytotoxicity of free and liposome-entrapped diazepinoporphyrazines on LNCaP cells under normoxic and hypoxic conditions // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018. Vol. 150, iss. P. 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.064>
36. Piskorz J., Konopka K., Düzgüneş N., Gdaniec Z., Mielcarek J., Goslinski T. Diazepinoporphyrazines containing peripheral styryl substituents and their promising nanomolar photodynamic activity against oral cancer cells in liposomal formulations // *ChemMedChem*. 2014. Vol. 9, iss. 8. P. 1775–1782. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402085>
37. Krasnopeeva E. L., Melenevskaya E. Y., Klapshina L. G., Shilyagina N. Y., Balalaeva I. V., Smirnov N. N., Smirnov M. A., Yakimansky A. V. Poly(methacrylic Acid)-Cellulose Brushes as Anticancer Porphyrazine Carrier // *Nanomaterials*. 2021. Vol. 11, iss. 8. Article number 1997. <https://doi.org/10.3390/nano11081997>
38. Synatschke C. V., Nomoto T., Cabral H., Förtsch M., Toh K., Matsumoto Y., Miyazaki K., Hanisch A., Schacher F. H., Kishimura A., Nishiyama N., Müller A. H., Kataoka K. Multicompartment micelles with adjustable poly(ethylene glycol) shell for efficient *in vivo* photodynamic therapy. *ACS Nano*, 2014, vol. 8, iss. 2, pp. 1161–1172. <https://doi.org/10.1021/nn4028294>

## References

1. Jain P., Kathuria H., Momin M. Clinical therapies and nano drug delivery systems for urinary bladder cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 2021, vol. 226, article no. 107871. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107871>
2. Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA :*



- A Cancer Journal for Clinicians*, 2021, vol. 71, iss. 3, pp. 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
3. DeGeorge K. C., Holt H. R., Hodges S. C. Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. *American Family Physician*, 2017, vol. 96, iss. 8, pp. 507–514.
  4. Raikar R., Agarwal P. K. Photodynamic Therapy in the Treatment of Bladder Cancer: Past Challenges and Current Innovations. *European Urology Focus*, 2018, vol. 4, iss. 4, pp. 509–511. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2018.08.005>
  5. Al-Omari S. Toward a molecular understanding of the photosensitizer-copper interaction for tumor destruction. *Biophys Rev.*, 2013, vol. 5, iss. 4, pp. 305–311. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0112-4>
  6. Kruger C. A., Abrahamse H. Utilisation of Targeted Nanoparticle Photosensitizer Drug Delivery Systems for the Enhancement of Photodynamic Therapy. *Molecules*, 2018, vol. 23, iss. 10, article no. 2628. <https://doi.org/10.3390/molecules23102628>
  7. Du Y., Chen B. Combination of drugs and carriers in drug delivery technology and its development. *Drug Design, Development and Therapy*, 2019, vol. 13, pp. 1401–1408. <https://doi.org/10.2147/dddt.s198056>
  8. He X. W., Liu T., Chen Y. X., Cheng D. J., Li X. R., Xiao Y., Feng Y. L. Calcium carbonate nanoparticle delivering vascular endothelial growth factor-C siRNA effectively inhibits lymphangiogenesis and growth of gastric cancer *in vivo*. *Cancer Gene Ther.*, 2008, vol. 15, iss. 3, pp. 193–202. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7701122>
  9. Peng C., Zhao Q., Gao C. Sustained delivery of doxorubicin by porous CaCO<sub>3</sub> and chitosan / alginate multilayers-coated CaCO<sub>3</sub> microparticles. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 2010, vol. 353, iss. 2, pp. 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.11.004>
  10. Sato K., Seno M., Anzai J.-I. Release of Insulin from Calcium Carbonate Microspheres with and without Layer-by-Layer Thin Coatings. *Polymers*, 2014, vol. 6, iss. 8, pp. 2157–2165. <https://doi.org/10.3390/polym6082157>
  11. Begum G., Reddy T. N., Kumar K. P., Dhevendar K., Singh S., Amarnath M., Misra S., Rangari V. K., Rana R. K. *In Situ* Strategy to Encapsulate Antibiotics in a Bioinspired CaCO<sub>3</sub> Structure Enabling pH-Sensitive Drug Release Apt for Therapeutic and Imaging Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, vol. 8, iss. 34, pp. 22056–22063. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b07177>
  12. Lengert E., Verkhovskii R., Yurasov N., Genina E., Svenskaya Y. Mesoporous carriers for transdermal delivery of antifungal drug. *Materials Letters*, 2019, vol. 248, pp. 211–213. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.04.028>
  13. Boedtker E., Pedersen S. F. The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. *Annual Review of Physiology*, 2020, vol. 82, pp. 103–126. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034627>
  14. Zhang X., Lin Y., Gillies R. J. Tumor pH and its measurement. *Journal of Nuclear Medicine*, 2010, vol. 51, iss. 8, pp. 1167–1170. <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.068981>
  15. Chiang P. H., Fan C. H., Jin Q., Yeh C. K. Enhancing Doxorubicin Delivery in Solid Tumor by Superhydrophobic Amorphous Calcium Carbonate-Doxorubicin Silica Nanoparticles with Focused Ultrasound. *Mol. Pharmaceutics*, 2022, vol. 19, iss. 11, pp. 3894–3905. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00384>
  16. Sudareva N., Suvorova O., Saprykina N., Vlasova H., Vilesov A. Doxorubicin delivery systems based on doped CaCO<sub>3</sub> cores and polyanion drug conjugates. *J. Microencapsul.*, 2021, vol. 38, iss. 3, pp. 164–176. <https://doi.org/10.1080/02652048.2021.1872724>
  17. Ibiyeye K. M., Nordin N., Ajat M., Zuki A. B. Z. Ultrastructural Changes and Antitumor Effects of Doxorubicin/Thymoquinone-Loaded CaCO<sub>3</sub> Nanoparticles on Breast Cancer Cell Line. *Front Oncol.*, 2019, vol. 9, article no. 599. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00599>
  18. Khan M. W., Zou C., Hassan S., Din F. U. Cisplatin and oleanolic acid Co-loaded pH-sensitive CaCO<sub>3</sub> nanoparticles for synergistic chemotherapy. *RSC Advances*, 2022, vol. 12, iss. 23, pp. 14808–14818. <https://doi.org/10.1039/d2ra00742h>
  19. Zhao P., Li M., Chen Y., He C., Zhang X., Fan T., Yang T., Lu Y., Lee R. J., Ma X., Luo J., Xiang G. Selenium-doped calcium carbonate nanoparticles loaded with cisplatin enhance efficiency and reduce side effects. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, vol. 570, article no. 118638. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118638>
  20. Hammadi N. I., Abba Y., Hezmee M. N. M., Razak I. S. A., Kura A. U., Zakaria Z. A. B. Evaluation of *in vitro* efficacy of docetaxel-loaded calcium carbonate aragonite nanoparticles (DTX–CaCO<sub>3</sub>NP) on 4T1 mouse breast cancer cell line. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 2017, vol. 53, iss. 10, pp. 896–907. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0197-3>
  21. Qiu N., Yin H., Ji B., Klauke N., Glidle A., Zhang Y., Song H., Cai L., Ma L., Wang G., Chen L., Wang W. Calcium carbonate microspheres as carriers for the anticancer drug camptothecin. *Materials Science and Engineering : C*, 2012, vol. 32, iss. 8, pp. 2634–2640. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.08.026>
  22. Dong Q., Li J., Cui L., Jian H., Wang A., Bai S. Using porous CaCO<sub>3</sub>/hyaluronic acid nanocages to accommodate hydrophobic photosensitizer in aqueous media for photodynamic therapy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2017, vol. 516, pp. 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.12.027>
  23. Svenskaya Y. I., Pavlov A. M., Gorin D. A., Gould D. J., Parakhonskiy B. V., Sukhorukov G. B. Photodynamic therapy platform based on localized delivery of photosensitizer by vaterite submicron particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016, vol. 146, pp. 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.090>
  24. Zhao P., Tian Y., You J., Hu X. Recent Advances of Calcium Carbonate Nanoparticles for Biomedical Applications. *Bioengineering*, 2022, vol. 9, iss. 11, article no. 691. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9110691>



25. Trofimov A. D., Ivanova A. A., Zyuzin M. V., Timin A. S. Porous Inorganic Carriers Based on Silica, Calcium Carbonate and Calcium Phosphate for Controlled/Modulated Drug Delivery: Fresh Outlook and Future Perspectives. *Pharmaceutics*, 2018, vol. 10, iss. 4, article no. 167. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040167>
26. Izquierdo M. A., Vyšniauskas A., Lermontova S. A., Grigoryev I. S., Shilyagina N. Y., Balalaeva I. V., Klapshina L. G., Kuimova M. K. Dual use of porphyrazines as sensitizers and viscosity markers in photodynamic therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, vol. 3, iss. 6, pp. 1089–1096. <https://doi.org/10.1039/C4TB01678E>
27. Lermontova S. A., Grigor'ev I. S., Peskova N. N., Ladilina E. Y., Balalaeva I. V., Klapshina L. G., Boyarskii V. P. New promising porphyrazine-based agents for optical theranostics of cancer. *Russian Journal of General Chemistry*, 2017, vol. 87, iss. 3, pp. 479–484. <https://doi.org/10.1134/S1070363217030173>
28. Trushina D. B., Bukreeva T. V., Antipina M. N. Size-Controlled Synthesis of Vaterite Calcium Carbonate by the Mixing Method: Aiming for Nanosized Particles. *Crystal Growth & Design*, 2016, vol. 16, iss. 3, pp. 1311–1319. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b01422>
29. Shilyagina N. Y., Plekhanov V., Shkunov I. V., Shilyagin P. A., Dubasova L. V., Brilkina A. A., Sokolova E. A., Turchin I. V., Balalaeva I. V. LED Light Source for *in vitro* Study of Photosensitizing Agents for Photodynamic Therapy. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*, 2014, vol. 6, iss. 12, pp. 15–22.
30. Trushina D. B., Borodina T. N., Artemov V. V., Bukreeva T. V. Immobilization of Photoditazine on Vaterite Porous Particles and Analysis of the System Stability in Model Media. *Technical Physics*, 2018, vol. 63, iss. 9, pp. 1345–1351. <https://doi.org/10.1134/S1063784218090220>
31. Svenskaya Y., Parakhonskiy B., Haase A., Atkin V., Lukyanets E., Gorin D., Antolini R. Anticancer drug delivery system based on calcium carbonate particles loaded with a photosensitizer. *Biophys. Chem.*, 2013, vol. 182, pp. 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2013.07.006>
32. Svenskaya Y. I., Navolokin N. A., Bucharskaya A. B., Terentyuk G. S., Kuz'mina A. O., Burashnikova M. M., Maslyakova G. N., Lukyanets E. A., Gorin D. A. Calcium carbonate microparticles containing a photosensitizer photosens: Preparation, ultrasound stimulated dye release, and *in vivo* application. *Nanotechnologies in Russia*, 2014, vol. 9, iss. 7, pp. 398–409. <https://doi.org/10.1134/S1995078014040181>
33. Correia J. H., Rodrigues J. A., Pimenta S., Dong T., Yang Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics*, 2021, vol. 13, iss. 9, article no. 1332. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091332>
34. Piskorz J., Lijewski S., Gierszewski M., Gorniak K., Sobotta L., Wicher B., Tykarska E., Düzgünee N., Konopka K., Sikorski M., Gdaniec M., Mielcarek J., Goslinski T. Sulfanyl porphyrazines: Molecular barrel-like self-assembly in crystals, optical properties and *in vitro* photodynamic activity towards cancer cells. *Dyes and Pigments*, 2017, vol. 136, pp. 898–908. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.09.054>
35. Wieczorek E., Mlynarczyk D. T., Kucinska M., Długaszewska J., Piskorz J., Popenda L., Szczolko W., Jurga S., Murias M., Mielcarek J., Goslinski T. Photophysical properties and photocytotoxicity of free and liposome-entrapped diazepinoporphyrazines on LNCaP cells under normoxic and hypoxic conditions. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, vol. 150, pp. 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.064>
36. Piskorz J., Konopka K., Düzgüneeş N., Gdaniec Z., Mielcarek J., Goslinski T. Diazepinoporphyrazines containing peripheral styryl substituents and their promising nanomolar photodynamic activity against oral cancer cells in liposomal formulations // *ChemMedChem*. 2014. Vol. 9, iss. 8. P. 1775–1782. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402085>
37. Krasnopeeveva E. L., Melenevskaya E. Y., Klapshina L. G., Shilyagina N. Y., Balalaeva I. V., Smirnov N. N., Smirnov M. A., Yakimansky A. V. Poly(methacrylic Acid)-Cellulose Brushes as Anticancer Porphyrazine Carrier. *Nanomaterials*, 2021, vol. 11, iss. 8, article no. 1997. <https://doi.org/10.3390/nano11081997>
38. Synatschke C. V., Nomoto T., Cabral H., Förtsch M., Toh K., Matsumoto Y., Miyazaki K., Hanisch A., Schacher F. H., Kishimura A., Nishiyama N., Müller A. H., Kataoka K. Multicompartment micelles with adjustable poly(ethylene glycol) shell for efficient *in vivo* photodynamic therapy. *ACS Nano*, 2014, vol. 8, iss. 2, pp. 1161–1172. <https://doi.org/10.1021/nn4028294>

Поступила в редакцию 23.12.2022; одобрена после рецензирования 30.12.2022; принята к публикации 10.01.2023  
The article was submitted 23.12.2022; approved after reviewing 30.12.2022; accepted for publication 10.01.2023