

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ХЛОРИНА e_6 НА АГРЕГАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ

Н.Н. Петрищев^{1,2}, М.А. Галкин¹, Т.Г. Гришачева¹, И.Н. Дементьева¹, С.Г. Чефу^{1,2}

¹Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Цель исследования – изучение влияния радахлорина на агрегационную активность тромбоцитов в опытах *in vitro* и *ex vivo*. Опыты проведены на крысах-самцах линии Wistar. Агрегационную активность тромбоцитов определяли в плазме, обогащенной тромбоцитами (PRP), турбидиметрическим методом, индуктор агрегации – аденозиндифосфат (АДФ) в конечной концентрации 1,25 μM . Пробы PRP, содержащие радахлорин, облучали при плотности мощности 0,05 Вт/см². После темновой инкубации в течение 5 мин PRP с радахлорином наблюдали дозозависимое угнетение агрегации тромбоцитов. Лазерное облучение (плотность энергии 12,5 Дж/см² и 25 Дж/см²) усилило ингибирующее влияние радахлорина. Через 3 ч после внутривенного введения фотосенсибилизатора скорость и интенсивность агрегации тромбоцитов не изменялись, а дезагрегация значительно замедлялась. Облучение при плотности энергии 5 Дж/см² не повлияло на кинетику агрегации тромбоцитов, при 10 Дж/см² – дезагрегация еще больше замедлялась, а при 20 Дж/см² – уменьшались скорость и интенсивность агрегации тромбоцитов, а дезагрегации не происходило.

В условиях *in vitro* радахлорин дозозависимо ингибирует АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов крыс; после лазерного облучения этот эффект значительно усиливается. Воздействие радахлорина на циркулирующие тромбоциты приводит к изменению их функционального состояния, что проявляется в замедлении дезагрегации после воздействия АДФ. После лазерного облучения (10–20 Дж/см²) выраженность функциональных изменений увеличивается. Обсуждается вопрос о роли снижения дезагрегационной активности тромбоцитов в механизме тромбоза сосудов в зоне воздействия при фотодинамической терапии.

Ключевые слова: хлорин e_6 , фотоактивация, АДФ, агрегация тромбоцитов.

Для цитирования: Петрищев Н.Н., Галкин М.А., Гришачева Т.Г., Дементьева И.Н., Чефу С.Г. Влияние препарата на основе хлорина e_6 на агрегационную активность тромбоцитов // Biomedical Photonics. – 2019. – Т. 8, № 3. – С. 4–10. doi: 10.24931/2413-9432-2019-8-3-4-10.

Контакты: Гришачева Т.Г., e-mail: laser82@mail.ru

THE EFFECT OF CHLORIN e_6 DRUG ON PLATELET AGGREGATION ACTIVITY

Petrishchev N.N.^{1,2}, Galkin M.A.¹, Grishacheva T.G.¹, Dementjeva I.N.¹, Chefu S.G.^{1,2}

¹Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

²Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Abstract

The goal of the study is to evaluate the effect of Radachlorin (OOO "RADA-PHARMA", Russia) (RC) on platelet aggregation in *ex vivo* and *in vivo* experiments. The experiments were conducted on male Wistar rats. Platelet aggregation activity was determined in platelet-rich plasma (PRP) using a turbidimetric method and the aggregation inducer was ADP at a final concentration of 1.25 μM . PRP samples containing RC were irradiated with ALOD-Granat laser device (OOO "Alkom Medika", Russia) at 662 nm wavelength with 0.05 W/cm² power density. After a 5-minute incubation of PRP with RC in the dark, dose-dependent inhibition of platelet aggregation was observed. Laser irradiation (12.5 J/cm² and, especially, 25 J/cm²) increased the inhibitory effect of RC. 3 hours after intravenous administration of RC, the rate and intensity of platelets aggregation did not change, while disaggregation slowed down significantly. Irradiation at a dose of 5 J/cm² did not affect the platelets aggregation kinetics, and disaggregation slowed down even more at 10 J/cm², and at 20 J/cm² the rate and intensity of platelets aggregation decreased, and no disaggregation occurred.

In vitro, RC inhibited the ADP-induced platelet aggregation in rats in a dose-dependent manner; after laser irradiation, this effect was enhanced significantly. The effect of RC on circulating platelets leads to a change in their functional state, which manifests in slowing down the disaggregation after exposure to ADP. After laser irradiation (10 J/cm² and, especially, 20 J/cm²), the severity of the functional changes increases. The role of decreasing the disaggregation activity of platelets in the mechanism of vascular thrombosis in the affected area of photodynamic therapy (PDT) is discussed.

Key words: chlorin e_6 , photoactivation, ADP, platelet aggregation.

For citations: Petrishchev N.N., Galkin M.A., Grishacheva T.G., Dementjeva I.N., Chefu S.G. The effect of chlorin e_6 drug on platelet aggregation activity, *Biomedical Photonics*, 2019, vol. 8, no. 3, pp. 4–10. (in Russian). doi: 10.24931/2413–9432–2019–8-3-4-10.

Contacts: Grishacheva T.G., e-mail: laser82@mail.ru

Введение

Данные о влиянии фотодинамического воздействия на агрегационную активность тромбоцитов многочисленны и весьма противоречивы. В опытах *in vivo* при облучении сосудов микроциркуляторного русла на фоне введения различных фотосенсибилизаторов (ФС) в зоне воздействия наблюдается адгезия и агрегация тромбоцитов. Предполагается, что их активация происходит вследствие влияния биологически активных веществ (аденозиндифосфат (АДФ), тромбоксан А2 и др.), поступающих из поврежденного эндотелия [1], однако некоторые авторы не исключают фотодинамической активации тромбоцитов, циркулирующих в крови [2]. В опытах *in vitro* показано, что при сочетанном действии различных ФС и облучения развиваются структурно-функциональные изменения тромбоцитов, в том числе отмечается снижение их агрегационной активности [3–9]. При проведении фотодинамической терапии новообразований в эксперименте и клинике ФС обычно вводят внутривенно за 2–3 ч до облучения, и, следовательно, циркулирующие клетки крови, в том числе тромбоциты, в течение длительного времени подвержены действию ФС, поэтому можно предположить, что это влияет на их фоточувствительность.

Целью настоящей работы было изучение влияния радахлорина на агрегационную активность тромбоцитов в условиях *in vitro* и *ex vivo* до и после фотоактивации.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на крысах-самцах линии Wistar массой 240–280 г (ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово») в соответствии с «Руководством по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» [10], составленным на основе Директивы Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей.

Животных содержали на неограниченном потреблении стандартного корма К-120 («Информ-корм», Россия) и воды при фиксированном световом режиме 12.00:12.00 ч (свет:темнота). Температуру поддерживали в пределах 22–25 °С, относительная влажность – 50–70%. Длительность карантина составляла 14 суток.

Забор крови для исследования агрегации тромбоцитов производили из яремной вены у наркоти-

зированных крыс (20%-й раствор уретана, 5 мл/кг внутривенно). В качестве стабилизатора крови использовали цитрат натрия (3,2%) в соотношении 9:1. Для получения богатой тромбоцитами плазмы (platelet-rich plasma, PRP) кровь центрифугировали 10 мин (200 g) при комнатной температуре. Часть PRP отбирали в пластиковую пробирку, а из оставшейся крови центрифугированием в течение 30 мин (1700 g) получали бедную тромбоцитами плазму (platelet-poor plasma, PPP), которую использовали для калибровки шкалы оптической плотности агрегометра и разведения PRP до концентрации тромбоцитов 200–300·10⁹/л. Исследование агрегации тромбоцитов проводили не позднее 2 ч после получения PRP.

Агрегационную активность тромбоцитов определяли турбидиметрическим методом с помощью агрегометра АТ-01 (НПФ «Медтех», Россия), в качестве индуктора агрегации использовали АДФ (CHRONO-LOG Corporation, США) в конечной концентрации 1,25 мМ.

В ходе исследования регистрировали следующие показатели агрегатограммы:

- максимальная амплитуда агрегации (МА) – максимальное увеличение коэффициента светопропускания от момента внесения АДФ, в % к светопропусканию бестромбоцитной плазмы;
- t_1 – время достижения МА, с;
- $V_{арг}$ – скорость агрегации – $МА/t_1$, %×с⁻¹;
- t_2 – время уменьшения МА в 2 раза, с;
- $V_{дезагр}$ – скорость дезагрегации – $1/2 МА/t_2$, %×с⁻¹.

Пробы PRP облучали в полипропиленовой кювете ($d = 7$ мм, $h = 45$ мм) с помощью полупроводникового лазерного аппарата АЛОД-Гранат (ООО «Алком медука», Россия), длина волны – 662 нм. Использовали световод с линзой для наружного облучения (ООО «Полироник», Россия), закрепленный в штативе. Торец световода располагали на расстоянии 40 мм от поверхности пробы.

В качестве фотосенсибилизатора использовали 0,35%-ый раствор радахлорина (ООО «РАДА-ФАРМА», Россия, регистрационное удостоверение №ЛС-001868 от 16.12.2011). Концентрацию радахлорина в плазме крови крыс определяли после внутривенного введения спектрофотометрически. В момент введения расчетная концентрация радахлорина с учетом гематокрита составляла 160 мкг/мл плазмы. PPP разводили в 2 раза с PBS (фосфатно-солевой буфер, pH 7,4) и определяли оптическую плотность при

662 нм на спектрофотометре СФ-2000 (АО «ЛОМО», Россия). 800 мкл препарата вносили в кварцевую кювету ($l = 0,5$ см), измерение проводили в сравнении с плазмой контрольных крыс, разведенной в 2 раза PBS. Концентрацию радахлорина в плазме определяли на основе калибровочного графика, построенного для радахлорина, разведенного в контрольной плазме в PBS, в интервале концентраций от 2,5 до 30 мкг/мл.

В первой группе опытов исследовали влияние радахлорина на агрегацию тромбоцитов *in vitro*. В стандартную по содержанию тромбоцитов плазму добавляли радахлорин в конечной концентрации 10, 20 и 40 мкг/мл и после 5-минутной инкубации в темноте и определяли агрегационную активность тромбоцитов.

В следующей группе опытов исследовали влияние фотоактивированного радахлорина на агрегацию тромбоцитов *in vitro*: в плазму, содержащую стандартное число тромбоцитов, вводили радахлорин (14 мкг/мл), после 5-минутной инкубации в темноте пробу облучали и определяли агрегационную активность тромбоцитов. В группе сравнения исследовали влияние облучения в той же дозе на агрегацию тромбоцитов. Режимы облучения: плотность мощности на поверхности пробы – 0,05 Вт/см², плотность энергии – 12,5 и 25 Дж/см².

В третьей группе опытов животным в хвостовую вену вводили болюсно радахлорин (5 мкг/кг). До забора крови животные содержались в темноте. Через 3 ч проводили забор крови из яремной вены, получали стандартную по тромбоцитам плазму, облучали ее и определяли агрегационную активность тромбоцитов. Режимы облучения: плотность мощности на поверхности пробы – 0,05 Вт/см², плотность энергии – 5, 10, 20 Дж/см².

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программного пакета IBM «SPSS Statistics Version 20.0». Значимость различий измеряемых параметров оценивали с помощью критерия Манна – Уитни. Отличия считали статистически значимыми при значениях p менее, чем 0,05. Результаты представлены в виде медиана (нижний/верхний квартиль). Корреляционный анализ проводили с использованием критерия Спирмена.

Результаты и обсуждение

В наших опытах для индукции агрегации тромбоцитов в крови крыс использовали аденозиндифосфат (АДФ) в концентрации 1,25 μ M, при этом агрегация имела обратимый характер. Данные о влиянии радахлорина на агрегацию тромбоцитов *in vitro* приведены в табл. 1. После 5-минутной инкубации PRP с радахлорином кинетика процесса изменилась: интенсивность агрегации уменьшилась, скорость агрегации и дезагрегации замедлились. Выраженность этих эффектов напрямую зависела от концентрации радахлорина. Как видно из табл. 1, снижение агрегационной активности тромбоцитов при инкубации с радахлорином носило дозозависимый характер (коэффициент корреляции Спирмена $r = -0,915$; $p < 0,001$).

В следующей группе опытов после 5-минутной темновой инкубации PRP с радахлорином пробы облучали (12,5 и 25 Дж/см²). В качестве дополнительного контроля исследовали агрегацию тромбоцитов сразу после лазерного облучения в тех же дозах в пробах без ФС. Как видно из данных табл. 2, лазерное облучение PRP (особенно при дозе 25 Дж/см²) приводило к значимому увеличению интенсивности агрегации тромбоцитов, однако кинетика процесса при этом

Таблица 1
Влияние радахлорина на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro*

Table 1
The effect of radachlorin on ADP-induced platelet aggregation *in vitro*

Группа Group	Число крыс (N) Number of rats (N)	Максимальная амплитуда агрегации (MA), % Maximal aggregation amplitude (MA), %	Скорость агрегации (V_{agr}), % \times с ⁻¹ Aggregation rate (V_{agr}), % \times sec ⁻¹	Скорость деагрегации ($V_{деагр}$), % \times с ⁻¹ Disaggregation rate (V_{disagg}), % \times sec ⁻¹
Контроль Control	10	55,5 (51–61,7)	0,42 (0,39–0,45)	0,31 (0,26–0,34)
Радахлорин, 10 мкг/мл Radachlorin, 10 μ g/ml	5	46 (44–49)*	0,35 (0,29–0,37)*	0,15 (0,15–0,19)*
Радахлорин, 20 мкг/мл Radachlorin, 20 μ g/ml	5	36 (30–41)*	0,23 (0,23–0,29)*	0,12 (0,11–0,12)*
Радахлорин, 40 мкг/мл Radachlorin, 40 μ g/ml	5	21 (21–28)*	0,2 (0,17–0,22)*	0,08 (0,08–0,09)*

* – $p < 0,01$ по сравнению с контролем (без радахлорина)

* – $p < 0,01$ compared to control (without Radachlorin)

Таблица 2

Влияние фотоактивированного (12,5 и 25 Дж/см²) радахлорина (14 мкг/мл) на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов

Table 2

The effect of photoactivated (12.5 and 25 J/cm²) radachlorin (14 µg/ml) on ADP-induced platelet aggregation

Показатель Criterion	Контроль (n=10) Control (n=10)	Лазерное облучение, Дж/см ² Laser irradiation, J/cm ²		Радахлорин (n=5) Radachlorin (n=5)	Радахлорин + лазерное облучение, Дж/см ² Radachlorin + laser irradiation, J/cm ²	
		12,5 (n=5)	25 (n=5)		12,5 (n=5)	25 (n=5)
Максимальная амплитуда агрегации (МА), % Maximal aggregation amplitude (MA), %	55,5 (51–61,7)	76 (76–77)*	81 (81–82)*	37 (36–39)*	29 (26–30)*#	18 (8–18)*#
Скорость агрегации (V _{агр}), %×с ⁻¹ Aggregation rate (V _{агр}), % × s ⁻¹	0,42 (0,39–0,45)	0,59 (0,57–0,64)	0,8 (0,74–0,82)	0,28 (0,26–0,29)	0,09 (0,08–0,15)#	0,07 (0,02–0,09)#
Скорость дезагрегации (V _{дезагр}), %×с ⁻¹ Disaggregation rate (V _{дезагр}), % × s ⁻¹	0,31 (0,26–0,34)	0,34 (0,32–0,34)	0,3 (0,29–0,33)	0,13 (0,13–0,14)*	Нет дезагрегации No disaggregation	

* – p<0,01 по сравнению с контролем; # – p<0,01 по сравнению с радахлорином без лазерного облучения.

* – p<0.01 compared to control; # – p<0.01 compared to Radachlorin without laser irradiation.

Таблица 3

Влияние фотоактивированного (5, 10, 20 Дж/см²) радахлорина (через 3 ч после внутривенного введения в дозе 5 мг/кг) на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов

Table 3

The effect of photoactivated (5, 10, 20 J/cm²) Radachlorin (3 hours after intravenous administration at a dose of 5 mg/kg) on ADP-induced platelet aggregation

Группа Group	Число крыс (N) Number of rats (N)	Максимальная амплитуда агрегации (МА), % Maximal aggregation amplitude (MA), %	Скорость агрегации (V _{агр}), %×с ⁻¹ Aggregation rate (V _{агр}), % × s ⁻¹	Скорость дезагрегации (V _{дезагр}), %×с ⁻¹ Disaggregation rate (V _{дезагр}), % × s ⁻¹
Контроль Control	10	55,5 (51–61,7)	0,42 (0,39–0,45)	0,31 (0,26–0,34)
в/в-введение радахлорина за 3 ч до забора крови IV-administration of Radachlorin 3 hours before blood sampling	5	68 (67–74)*	0,44 (0,41–0,46)	0,22 (0,18–0,23)*
Облучение 5 Дж/см ² Irradiation 5 J/cm ²	5	65 (64–68)	0,41 (0,36–0,49)	0,21 (0,15–0,22)*
Облучение 10 Дж/см ² Irradiation 10 J/cm ²	5	56 (56–57)	0,45 (0,43–0,46)	0,12 (0,1–0,13)#
Облучение 20 Дж/см ² Irradiation 20 J/cm ²	5	36 (32–37)#	0,08 (0,06–0,18)#	Нет N/A

* – p<0,05 по сравнению с контролем; # – p<0,01 по сравнению с контролем.

* – p<0.05 compared to control; # – p<0.01 compared to control

существенно не изменялась. После облучения PRP, предварительно инкубированной с радахлорином, наблюдали уменьшение интенсивности агрегации и замедление дезагрегации, особенно при дозе 25 Дж/см². Таким образом, фотоактивация радахлорина усиливала его ингибирующее влияние на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов крыс, при этом стимулирующего влияния самого облучения на агрегацию не отмечено.

В третьей группе опытов через 3 ч после внутривенного введения крысам радахлорина производили забор крови, получали PRP, подвергали пробы лазерному облучению в разных дозах и определяли агрегационную активность тромбоцитов.

Исходя из объема крови у крыс (63 мл/кг), максимальная концентрация радахлорина в плазме сразу после введения составила 160 мкг/мл. Через 3 ч после внутривенного введения остаточная концентрация ФС в PRP крови крыс составила (38,0±1,3) мкг/мл, или 24% от исходной концентрации, что согласуется с литературными данными (10–30%) [11–14]. При этом агрегационная активность тромбоцитов не изменялась, а скорость дезагрегации значимо уменьшалась. В опытах *in vitro* при сопоставимых концентрациях радахлорина (20, 40 мкг/мл) эффект был значительно более выражен ($p < 0.01$) (табл. 3.).

Как видно из данных табл. 3, после облучения PRP в дозе 5 Дж/см² не наблюдали изменения кинетики агрегационной активности тромбоцитов, при дозе 10 Дж/см² значимо замедлялась скорость дезагрегации, а после облучения в дозе 20 Дж/см² значительно уменьшались интенсивность и скорость агрегации тромбоцитов, дезагрегации при этом не наблюдалось.

Приведенные исследования показали, что радахлорин (основным действующим веществом которого является хлорин e_6) оказывает прямое влияние на агрегацию тромбоцитов в крови крыс, причем в опытах *in vitro* эффект более выражен, чем *ex vivo*.

In vitro добавление радахлорина дозозависимо уменьшало интенсивность АДФ-индуцированной агрегации, что согласуется с данными литературы [15], а также приводило к замедлению скорости дезагрегации. Этот эффект ранее описан не был. По данным J.Y. Park et al. [15], хлорин e_6 влияет практически на все процессы, активирующиеся после взаимодействия АДФ с пуриновыми рецепторами, т. е. действует подобно блокаторам P_2Y_{12} -рецепторов. Однако этот механизм не является единственным, так как ранее нами было описано ингибирующее влияние радахлорина на коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов у крыс, не связанную с активацией пуриновых рецепторов [16].

По современным представлениям дезагрегация тромбоцитов является активным процессом. Иницирующие его механизмы постоянно протекают

в тромбоцитах, предотвращая их активацию и агрегацию в сосудистом русле [17]. Как видно из данных табл. 2, радахлорин дозозависимо тормозил скорость как агрегации, так и, в еще большей степени, дезагрегации. На модели АДФ-индуцированной обратимой агрегации тромбоцитов крыс показано, что ингибитор P_2Y_{12} -рецепторов (CS-747) уменьшал интенсивность агрегации и не влиял на скорость дезагрегации [18]. Это подтверждает наше предположение, что точкой приложения радахлорина являются не только пуриновые, но и другие рецепторы тромбоцитов.

При высокой концентрации радахлорина агрегации тромбоцитов крыс, активированных АДФ и коллагеном, практически не происходило. Агрегатограмма при этом имела такой же вид, как при болезни Гланцмана (генетический дефицит GPIIb/IIIa-рецепторов). Возможно, основной механизм влияния радахлорина на агрегацию и дезагрегацию тромбоцитов связан с его действием на мембранные рецепторы, в том числе GPIIb/IIIa. Выраженность экспрессии GP-рецепторов и прочность их связи с фибриногеном определяют интенсивность агрегации и возможность дезагрегации. Возможно, при высокой концентрации радахлорина связь фибриногена с GP-рецепторами становится необратимой. Одним из механизмов резкого угнетения агрегации тромбоцитов *in vitro* при высоких концентрациях радахлорина, особенно после активации светом, может быть утрата (shedding) GP-рецепторов. Подобное влияние на GP-рецепторы тромбоцитов оказывает повышение температуры [19].

При фотоактивации радахлорина его влияние на агрегацию и дезагрегацию тромбоцитов значимо усиливалось, причем процесс дезагрегации был более чувствительным.

При проведении ФДТ циркулирующие в крови ФС проникают в клетки крови, в том числе тромбоциты; после облучения происходит фотоактивация ФС и, возможно, фотодинамическое повреждение тромбоцитов. В какой мере это может повлиять на образование тромбов и нарушение микроциркуляции в области ФДТ, остается неясным. В первом приближении ответ на этот вопрос можно получить в опытах *ex vivo*, исследуя агрегационную активность тромбоцитов после их длительного контакта с ФС в русле крови.

По нашим данным, через 3 ч после внутривенного введения радахлорина скорость агрегации не изменялась, а скорость дезагрегации значимо уменьшалась. Последующее лазерное облучение *in vitro* оказало ингибирующее влияние на оба процесса, причем более значимое – на скорость дезагрегации (рис. 1). На основании этих данных можно полагать что облучение фотосенсибилизированных тромбоцитов в зоне проведения ФДТ может привести к изменению их функциональной активности, однако степень выраженности этих изменений вряд ли значима для на-

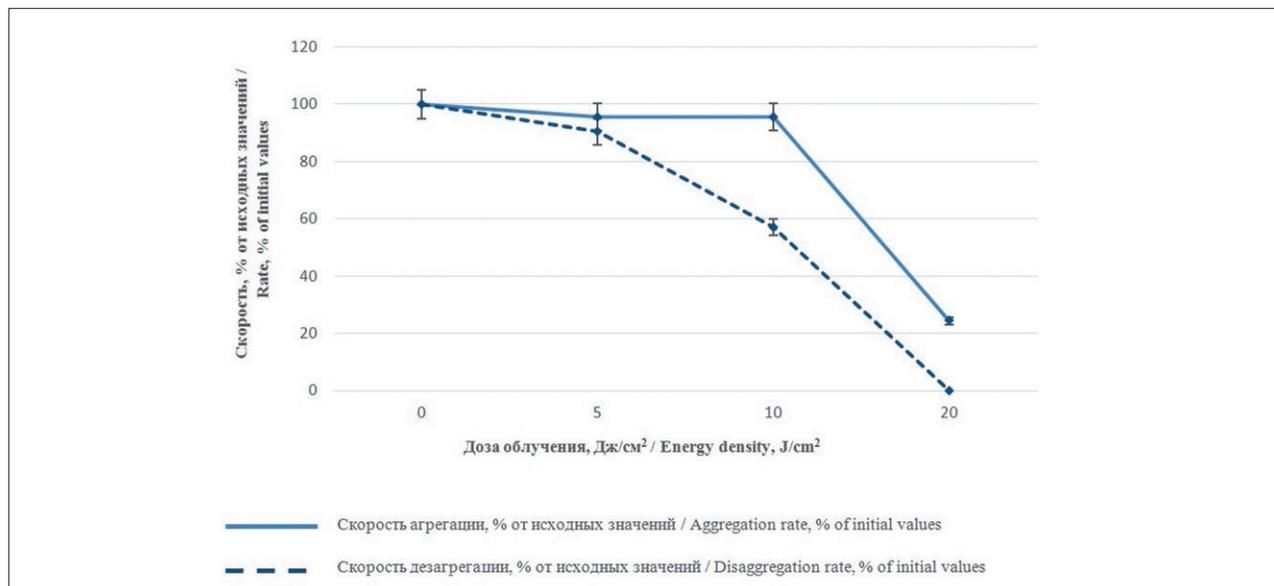


Рис. 1. Изменение скорости агрегации и дезагрегации тромбоцитов в зависимости от дозы облучения
Fig. 1. Change in the rate of aggregation and disaggregation of platelets depending on the dose of radiation

рушения микроциркуляции. Снижение дезагрегационной активности можно рассматривать как фактор, способствующий тромбозу при активации тромбоцитов тромбогенными факторами (АДФ, тромбоксан А2 и др), выделяющимися из поврежденных эндотелиальных клеток в зоне ФДТ.

Заключение

В условиях *in vitro* радахлорин дозозависимо ингибирует АДФ-индуцированную агрегацию тром-

боцитов крыс; после лазерного облучения этот эффект значимо усиливается. Воздействие радахлорина на циркулирующие тромбоциты приводит к изменению их функционального состояния, что проявляется в замедлении дезагрегации. После лазерного облучения выраженность функциональных изменений увеличивается. Снижение дезагрегационной активности тромбоцитов может иметь значение в механизме тромбоза сосудов в зоне воздействия при ФДТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Senge M.O., Radomski M.W. Platelets, photosensitizers, and PDT // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2013. – Vol. 10. – P. 1–16.
2. Chuannong Z. Mechanisms of tumor necrosis induced by photodynamic therapy // *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*. – 1989. – No. 3. – P. 299–318.
3. Zieve P.D., Solomon H.M., Krevans J.R. The effect of hematoporphyrin and light on human platelets. I: Morphologic, functional, and biochemical changes // *J. Cell. Physiol.* – 1966. – Vol. 67. – P. 271–279. Doi:10.1002/jcp.1040670207.
4. Solomon H.M., Zieve P.D., Krevans J.R. The effect of hematoporphyrin and light on human platelets. II: Uptake of hematoporphyrin // *J. Cell. Physiol.* – 1966. – Vol. 67, No. 2. – P. 281–284.
5. Zieve P.D., Solomon H.M. The effect of hematoporphyrin and light on human platelets. III: Release of potassium and acid phosphatase // *J. Cell. Physiol.* – 1966. – Vol. 68. – P. 109–111. Doi: 10.1002/jcp.1040680204.
6. Самаль А.Б., Зорина Т.Е., Черенкевич С.Н. Сенсibilizированное хлорином e₆ фотоингибирование агрегации тромбоцитов: участие активных форм кислорода // *Гематол. и трансфузиол.* – 1991. – Т. 36, № 4. – С. 19–21.
7. Самаль А.Б., Зорина Т.Е., Веселко Н.И. Фотосен-

REFERENCES

1. Senge M.O., Radomski M.W. Platelets, photosensitizers, and PDT, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2013, no. 10, pp. 1–16.
2. Zhou Chuannong. Mechanisms of tumor necrosis induced by photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, 1989, no. 3, pp. 299–318.
3. Zieve P.D., Solomon H.M., Krevans J.R. The effect of hematoporphyrin and light on human platelets. I. Morphologic, functional, and biochemical changes, *J. Cell. Physiol.*, 1966, no. 67, pp. 271–279. Doi: 10.1002/jcp.1040670207.
4. Solomon H.M., Zieve P.D., Krevans J.R. The effect of hematoporphyrin and light on human platelets. II. Uptake of hematoporphyrin, *J Cell Physiol*, 1966, Apr, vol. 67, no. 2, pp. 281–284.
5. Zieve P.D., Solomon H.M. The effect of hematoporphyrin and light on human platelets. III. Release of potassium and acid phosphatase, *J. Cell. Physiol.* 1966, № 68, pp. 109–111. Doi: 10.1002/jcp.1040680204.
6. Samal A.B., Zorina T.E., Cherenkevich S.N. Chlorin e₆ sensitized photoinhibition of platelet aggregation: participation of reactive oxygen species, *Gematologiya i transfuziologiya*, 1991, vol. 36, no. 4, pp. 19–21. (In Russ.).
7. Samal A.B., Zorina T.E., Veselko N.I., Hmara N.F., Cherenkevich S.N. Chlorin e₆ photosensitized inhibition of human platelet

- сублизованное хлорином e₆ ингибирование агрегации тромбоцитов человека // Фармакол. и токсикол. – 1991. – Т. 54, № 1. – С. 32–34.
8. Hendersen B.W., Wieman T.J., Haydon P.S. The effects of thrombocytopenia on vessel stasis and macromolecular leakage therapy using photofrin // *Photochem Photobiol.* – 1997. – Vol. 66. – P. 513–517.
 9. Зорина Т.Н., Далидович А.А., Марченко Л.Н. Механизмы фотодинамической терапии неоваскулярных заболеваний глазного дна // *Материалы науч.-практ. конф. / под ред. С. М. Смотрина [и др.].* – Гродно: ГрГМУ, 2011. – С. 27–30.
 10. Белозерцева И.В., Драволина О.А., Тур М.М. Руководство по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова / под ред. Э.Э. Звартау. – СПб.: СПбГМУ, 2014. – 80 с.
 11. Privalov V.A., Lappa A.V., Seliverstov O.V. Clinical Trials of a New Chlorin Photosensitizer for Photodynamic Therapy of Malignant Tumors // *Proc. SPIE The International Society for Optical Engineering.* – 2002. – P. 4612. Doi: 10.1117/12.469355.
 12. Shi H., Liu Q., Qin X. et al. Pharmacokinetic study of a novel sonosensitizer chlorin-e6 and its sonodynamic anti-cancer activity in hepatoma-22 tumor-bearing mice // *Biopharm. Drug. Dispos.* – 2011. – Vol. 32, № 6. – P. 319–332. Doi: 10.1002/bdd.761.
 13. Shton I.O., Sarnatskaya V.V., Prokopenko I.V. Chlorin e6 combined with albumin nanoparticles as a potential composite photosensitizer for photodynamic therapy of tumors // *Exp. Oncol.* – 2015. – Vol. 37, № 4. – P. 250–254. PMID: 26710836.
 14. Volovetsky A.B., Sukhov V.S., Balalaeva I.V. et al. Pharmacokinetics of Chlorin e6-Cobalt Bis(Dicarbollide) Conjugate in Balb/c Mice with Engrafted Carcinoma // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18, № 12. – P. 2556. Doi: 10.3390/ijms18122556.
 15. Park J.Y., Ji H.D., Jeon B.R. et al. Chlorin e6 prevents ADP-induced platelet aggregation by decreasing PI3K-Akt phosphorylation and promoting cAMP production // *Evid Based Complement Alternat Med.* – 2013. Doi: 10.1155/2013/569160.
 16. Влияние фотосенсибилизатора радахлорина и фотодинамического воздействия на индуцированную коллагеном агрегацию тромбоцитов / Т. Г. Гришачева, И. Н. Дементьева, С. Г. Чефу, Н. Н. Петрищев // *Лазер. мед.* – 2017. – № 4. – С. 42–46.
 17. Maayani S., Tagliente T. M., Schwarz T. et al. Deaggregation is an integral component of the response of platelets to ADP in vitro: kinetic studies of literature and original data // *Platelets.* – 2001. – № 12 (5). – P. 279–291. Doi: 10.1080/09537100120071004.
 18. Sugidachi A., Asai F., Ogawa T. et al. The in vivo pharmacological profile of CS-747, a novel antiplatelet agent with platelet ADP receptor antagonist properties // *British Journ. of Pharmacology.* – 2000. – № 129. – P. 1439–1446. Doi: 10.1038/sj.bjp.0703237.
 19. Wang Z., Cai F., Chen X. et al. The Role of Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species in Hyperthermia-Induced Platelet Apoptosis // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8, № 9. – P. e75044. Doi: 10.1371/journal.pone.0075044.
 - aggregation, *Farmakologiya i toksikologiya*, 1991, vol. 54, no. 1, pp. 32–34. (In Russ.).
 8. Hendersen B.W., Wieman T.J., Haydon P.S. The effects of thrombocytopenia on vessel stasis and macromolecular leakage therapy using photofrin, *Photochem Photobiol.*, 1997, no. 66, pp. 513–517.
 9. Zorina T.N., Dalidovich A.A., Marchenko L.N., Krivososov V.V., Kravchenko I.E., Zorin V.P. Mechanisms of photodynamic therapy of neovascular ocular fundus diseases, *Materialy nauchno-prakticheskoy konferencii*, by eds. S.M. Smotrin et al., Grodno, GrSMU, 2011, pp. 27–30. (In Russ.).
 10. Belozerceva I.V., Dravolina O.A., Tur M.A. *Rukovodstvo po ispol'zovaniyu laboratornyh zhivotnyh dlya nauchnyh i uchebnyh celej v PSPbGMU im. akad. I.P. Pavlova* [Guidelines for the use of laboratory animals for scientific and educational purposes at Pavlov FSPbSMU], by. E.E. Zvartau as eds. Sankt-Peterburg, SPbSMU, 2014, 80 p.
 11. Privalov V.A., Lappa A.V., Seliverstov O.V., Faizrakhmanov A.B. et al. Clinical Trials of a New Chlorin Photosensitizer for Photodynamic Therapy of Malignant Tumors. *Proc. SPIE The International Society for Optical Engineering*, 2002, p. 4612. Doi: 10.1117/12.469355.
 12. Shi H., Liu Q., Qin X., Wang P., Wang X. Pharmacokinetic study of a novel sonosensitizer chlorin-e6 and its sonodynamic anti-cancer activity in hepatoma-22 tumor-bearing mice, *Biopharm Drug Dispos*, 2011, Sep; vol. 32, no. 6, pp. 319–32. Doi: 10.1002/bdd.761.
 13. Shton I.O., Sarnatskaya V.V., Prokopenko I.V., Gamaleia N.F. Chlorin e6 combined with albumin nanoparticles as a potential composite photosensitizer for photodynamic therapy of tumors, *Exp. Oncol*, 2015, Dec, vol. 37, no. 4, pp. 250–254. PMID: 26710836.
 14. Volovetsky A.B., Sukhov V.S., Balalaeva I.V., Dudenkova V.V. et al. Pharmacokinetics of Chlorin e6-Cobalt Bis(Dicarbollide) Conjugate in Balb/c Mice with Engrafted Carcinoma, *Int. J. Mol. Sci*, 2017, vol. 18, no. 12, pp. 2556. Doi: 10.3390/ijms18122556.
 15. Park J.Y., Ji H.D., Jeon B.R., Im E.J., Son Y.M., Lee J.Y., Lee D.H., Lee Y.C., Hyun E., Jia Q. et al. Chlorin e6 prevents ADP-induced platelet aggregation by decreasing PI3K-Akt phosphorylation and promoting cAMP production, *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013. Doi: 10.1155/2013/569160.
 16. Grishacheva T.G., Dement'eva I.N., Chefu S.G., Petrishchev N.N. Effect of Radachlorin photosensitizer and photodynamic treatment on collagen-induced platelet aggregation, *Lazernaya medicina*, 2017, no. 4, pp. 42–46. (In Russ.).
 17. Maayani S., Tagliente T.M., Schwarz T., Craddock-Royal B., Alcalá C., Marrero G., Martinez R. Deaggregation is an integral component of the response of platelets to ADP in vitro: kinetic studies of literature and original data, *Platelets*. 2001, vol. 12, no. 5, pp. 279–291. Doi: 10.1080/09537100120071004.
 18. Sugidachi A., Asai F., Ogawa T., Inoue T. and Koike H. The in vivo pharmacological profile of CS-747, a novel antiplatelet agent with platelet ADP receptor antagonist properties, *British Journal of Pharmacology*, 2000, № 129, pp. 1439–1446. Doi: 10.1038/sj.bjp.0703237.
 19. Wang Z., Cai F., Chen X. et al. The Role of Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species in Hyperthermia-Induced Platelet Apoptosis. *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, no. 9, pp. e75044. Doi: 10.1371/journal.pone.0075044.