

ВЛИЯНИЕ БЕНГАЛЬСКОГО РОЗОВОГО НА АГРЕГАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ

Н.Н. Петрищев, Т.Г. Гришачева, С.Г. Чефу

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

Резюме

Проведено сравнительное изучение влияния фотоактивированного бенгальского розового на агрегацию тромбоцитов *in vitro* и в циркулирующей крови крыс-самцов Wistar. Из венозной крови получали плазму, обогащенную тромбоцитами (PRP). Агрегационную активность тромбоцитов определяли турбидиметрическим методом, индуктор агрегации – АДФ в конечной концентрации 1,25 μM . В качестве фотосенсибилизатора (ФС) использовали бенгальский розовый (БР) (Acros Organics, США). Пробы PRP, содержащие ФС, облучали с помощью лазерного аппарата АЛОД-Изумруд (ООО «Алком медика», Россия), $\lambda=532$ нм, плотность мощности 0,05 Вт/см², плотность энергии 6, 12, 24 Дж/см². Влияние фотоактивированного БР на агрегацию циркулирующих тромбоцитов изучали после лазерного облучения бедренной артерии крыс. Параметры облучения: мощность 30 мВт; диаметр пятна 2 мм; экспозиция 30 мин. БР в концентрациях 0,5 и 1 мкг/мл стимулирует, а 5–10 мкг/мл – угнетает агрегацию тромбоцитов. Фотоактивация БР ослабляет стимулирующее действие лазерного облучения на агрегацию тромбоцитов. Фотодинамическая модификация крови приводила к увеличению интенсивности агрегации тромбоцитов на 24% по сравнению с контрольной группой, на 39,6% – по сравнению с группой без фотоактивации БР ($p<0,01$). Полученные данные свидетельствуют о том, что под влиянием фотоактивации БР изменяется агрегационная активность тромбоцитов, степень выраженности и направленность эффекта зависят от концентрации БР. Изменение функциональной активности тромбоцитов является одним из проявлений фотодинамической модификации крови.

Ключевые слова: бенгальский розовый, фотоактивация, фотодинамическая модификация крови, плазма богатая тромбоцитами, агрегация тромбоцитов.

Для цитирования: Петрищев Н.Н., Гришачева Т.Г., Чефу С.Г. Влияние бенгальского розового на агрегационную активность тромбоцитов // Biomedical Photonics. – 2022. – Т. 11, № 1. – С. 20–26. doi: 10.24931/2413–9432–2022–11-1-20-26.

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

INFLUENCE OF ROSE BENGAL ON PLATELET AGGREGATION ACTIVITY

Petrishchev N.N., Grishacheva T.G., Chefu S.G.

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

Abstract

The goal of the study is to comparatively examine the effect of photoactivated rose bengal on platelet aggregation *in vitro* and in circulating blood of male Wistar rats. Platelet-rich plasma (PRP) was obtained from venous blood. The aggregation activity of platelets was determined by the turbidimetric method, the aggregation inducer was ADP at a final concentration of 1.25 μM . Rose bengal (RB) (Acros Organics, USA) was used as a photosensitizer (PS). PRP samples containing the PS were irradiated using ALOD-Izumrud laser (OOO "Alcom Medica", Russia), $\lambda = 532$ nm, power density 0.05 W/cm², energy density of 6, 12 and 24 J/cm². The effect of photoactivated RB on the aggregation of circulating PLT was studied after laser irradiation of the femoral artery of the rats: 30 mW laser power, 2 mm spot diameter and 30 min exposure. RB at concentrations of 0.5 and 1 $\mu\text{g/ml}$ was found to stimulate, and 5-10 $\mu\text{g/ml}$ —to inhibit platelet aggregation. Photoactivation of RB weakens the stimulating effect of laser irradiation on the aggregation of platelets. Photodynamic modification of blood led to an increase in the intensity of platelet aggregation by 24% in comparison to the control group, and by 39.6% compared to the group without photoactivation of RB ($p<0.01$). The data obtained indicate that under the influence of RB photoactivation, the aggregation activity of platelets changes, the severity and direction of the effect depend on the RB concentration. Change in functional activity of platelets is one of the manifestations of photodynamic modification of blood.

Keywords: rose bengal, photoactivation, photodynamic blood modification, platelet rich plasma, platelet aggregation.

For citations: Petrishchev N.N., Grishacheva T.G., Chefu S.G. Influence of rose bengal on platelet aggregation activity, *Biomedical Photonics*, 2022, vol. 11, no. 1, pp. 20–26 (in Russian). doi: 10.24931/2413–9432–2022–11-1-20-26.

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

Введение

Наличие в структуре бенгальского розового (БР) галогенизированного ксантенового кольца определяет его свойства как фотосенсибилизатора (ФС). При облучении зеленым светом (максимальное поглощение на длине волны 546 нм) БР переходит в возбужденное состояние и развиваются фотохимические реакции.

БР в качестве ФС применяется в онкологии, офтальмологии и некоторых других областях клинической медицины, а также в экспериментальных исследованиях [1, 2]. В 1985 г. В.Д. Watson и соавт. впервые показали, что облучение сосудов зеленым светом на фоне предварительного введения БР закономерно ведет к образованию тромба [3]. В последующих исследованиях было установлено, что БР поглощается эндотелием и активируется при последующем облучении. При этом образуются активные формы кислорода, в том числе синглетный кислород, вызывающие фотодинамическое повреждение эндотелия, проявляющееся в том, что из него выделяются тромбогенные вещества, экспрессируются молекулы адгезии, что и инициирует образование тромба [4–6].

Циркулирующий в крови БР поглощается не только эндотелием, но и другими клетками, в том числе клетками крови. При ФДТ опухолей происходит фотоактивация БР, фиксированного в эндотелии, а также, возможно, и в клетках крови, циркулирующих в зоне облучения. Вопрос о роли тромбоцитов, испытавших фотодинамическое воздействие в формировании тромба, остается открытым. По данным J. Inato и соавт. (1996) фотоактивированный БР оказывает слабое активирующее влияние на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека (*in vitro*). На основании этих данных авторы пришли к выводу, что фотоактивация БР не имеет большого значения в развитии фотодинамически индуцированного тромбоза [7].

Целью нашего исследования было сравнительное изучение влияния фотоактивированного БР на агрегацию тромбоцитов *in vitro* и в циркулирующей крови.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на крысах-самцах Wistar (ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»). Содержание животных и уход за ними осуществлялись в соответствии с правилами, изложенными в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Исследование одобрено комиссией по содержанию и использованию позвоночных лабораторных животных в ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова в рамках проведения Государственного задания НИОКР № АААА-А18-118091790075-0 «Разработка принципов лазерной фотодинамической терапии» (2015–2020).

Агрегацию тромбоцитов исследовали турбодиметрическим методом с помощью агрегометра АТ-02 (Россия).

Забор крови осуществляли из яремной вены у наркотизированных крыс (20% раствор уретана, 5 мл/кг массы тела, внутривенно). В качестве стабилизатора крови использовали 3,2% раствор цитрата натрия в соотношении 9:1. Режим центрифугирования крови: для получения плазмы, богатой тромбоцитами (PRP) – 200 г, 10 мин; плазмы, бедной тромбоцитами (PPP) – 1700 г, 30 мин.

Индуктор агрегации тромбоцитов – АДФ (Chrono-log Co, США) в конечной концентрации 1,25 μM . Определяли следующие показатели агрегатограммы: интенсивность агрегации – увеличение светопропускания (МА) %; время достижения МА, (t_1) с; скорость агрегации – $V_{\text{арп}}$ (МА/ t_1); время уменьшения МА в 2 раза (t_2) с; скорость дезагрегации – $V_{\text{дезарп}}$ ($1/2$ МА/ t_2).

В опытах *in vitro* в плазму, содержащую стандартное число тромбоцитов ($270\text{--}350 \cdot 10^9/\text{л}$), добавляли БР (Acros organics, USA) в концентрациях от 0,5 до 10 мкг/мл в экспериментах с исследованием влияния БР на агрегационную активность тромбоцитов без фотоактивации.

В опытах по изучению влияния фотоактивированного БР на агрегацию тромбоцитов *in vitro* в плазму, содержащую стандартное число тромбоцитов добавляли БР в определенной концентрации – 5 мкг/мл. После 5-минутной инкубации в темноте пробу облучали и определяли агрегационную активность тромбоцитов. В группах сравнения исследовали влияние БР (без облучения) и лазерного воздействия (без БР) на агрегацию тромбоцитов.

Процедура облучения

Пробы PRP объемом 370 мкл разливали в ячейки 24-луночного планшета и облучали в темноте с помощью полупроводникового лазерного аппарата (АЛОД, Россия). Торцы световода закрепляли на штативе и располагали на расстоянии 10 мм от поверхности планшета (см. рис. 1). Параметры облучения: длина волны 532 нм, мощность лазера 0,5 Вт, плотность мощности 0,05 Вт/см², плотность энергии 6 Дж/см² (экспозиция 2 мин), плотность энергии 12 Дж/см² (экспозиция 4 мин), плотность энергии 24 Дж/см² (экспозиция 8 мин). Мощность лазерного излучения контролировали с помощью измерителя мощности (Advantest Q8230, США) перед каждым экспериментом.

Изучение влияния фотоактивированного БР на циркулирующие тромбоциты проводили следующим образом: через 1 ч после внутривенного введения БР в условиях наркоза у крыс выделяли из сосудисто-нервного пучка участок бедренной артерии (см. рис. 2) и производили надсосудистое лазерное облучение с помощью фокусатора (ООО «Алком

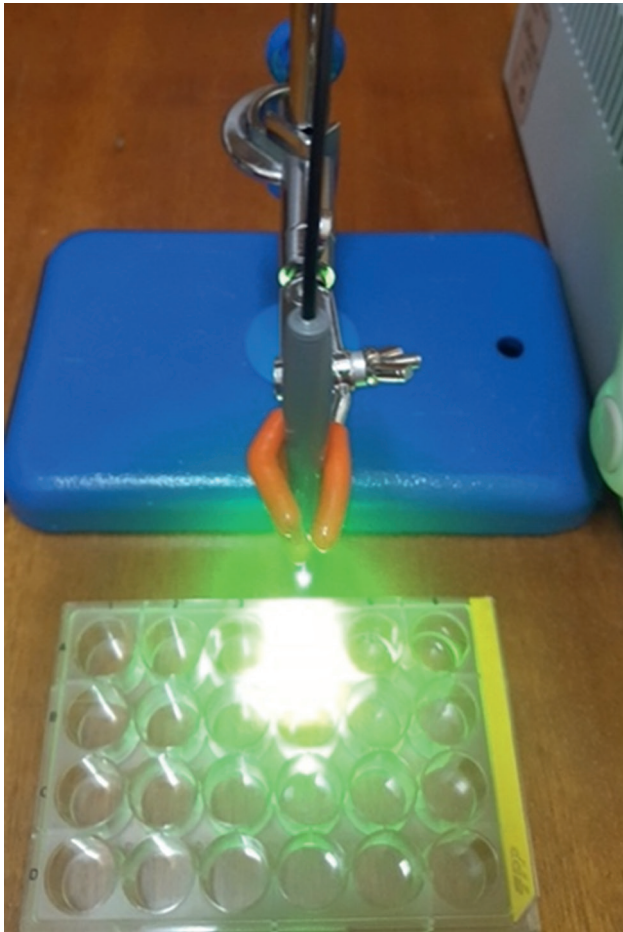


Рис. 1. Процедура облучения *in vitro* PRP в 24-луночной планшете.
Fig. 1. *In vitro* irradiation procedure of platelet-rich plasma in 24 well plate.

медика», Россия). Условия облучения: $\lambda = 532$ нм, мощность 30 мВт, диаметр пятна 2 мм, плотность мощности 0,9 Вт/см², экспозиция 30 мин, плотность энергии 1620 Дж/см². Параметры лазерного излучения были выбраны согласно данным, полученным в ранее проведенных исследованиях, в которых фотоактивация БР приводила к гарантированному снижению скорости кровотока в сосудах и образованию тромба [4]. Облучение в тех же режимах бедренной артерии у крыс без предварительного введения БР не приводило к образованию тромба.

После завершения облучения производили забор крови и исследовали агрегацию тромбоцитов. В группах сравнения оценивали влияние надсосудистого облучения бедренной артерии (без БР) и внутривенного введения БР (без облучения) на агрегацию тромбоцитов.

Статистическая обработка данных

Сбор данных осуществлялся с помощью табличного процессора Microsoft Excel 2007. Количественные

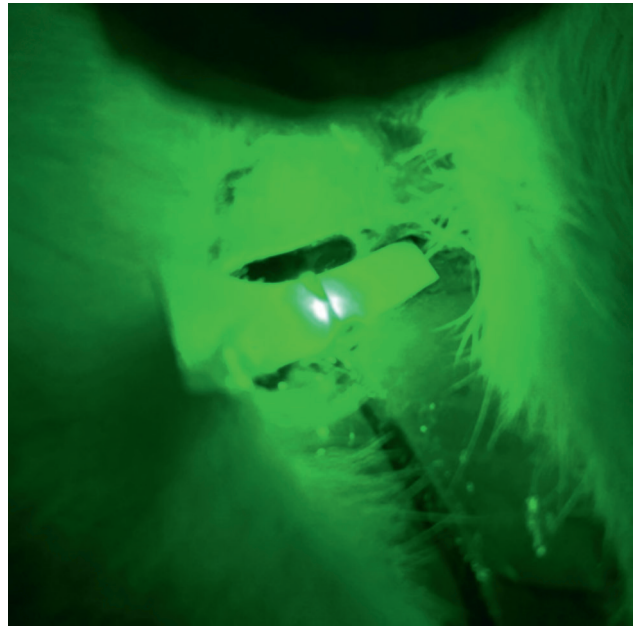


Рис. 2. Надсосудистое лазерное облучение бедренной артерии у крыс.
Fig. 2. Supravascular laser irradiation of the femoral artery in rats.

данные проверялись на соответствие нормальному распределению с использованием *W*-критерия Шапиро-Уилка. Использовались непараметрические методы статистического анализа с применением критерия Манна-Уитни. Числовые данные представлены как медиана (нижний квартиль/верхний квартиль). О значимости установленных различий судили по уровню значений $p < 0,05$.

Результаты

В опытах *in vitro* в PRP добавляли БР (конечная концентрация от 0,5 до 10 мкг/мл) и после 5-минутной инкубации в темноте исследовали агрегацию тромбоцитов. Как видно из данных на рис. 3, при концентрации 0,5 и 1 мкг/мл МА увеличивалась на 52,3 и 34,6%, соответственно, по сравнению с контролем ($p < 0,01$), при этом скорость агрегации и дезагрегации значительно не изменились. Интенсивность агрегации тромбоцитов при концентрации БР 2,5 мкг/мл не отличалась от контроля, однако скорость агрегации и дезагрегации значительно замедлились на 22,2 и 26% соответственно. Увеличение концентрации БР до 5 и 10 мкг/мл привело к снижению интенсивности агрегации тромбоцитов на 43,9 и 53,3%, соответственно. Скорости агрегации и дезагрегации значительно уменьшались ($p < 0,01$).

Таким образом, направленность и степень выраженности влияния БР на агрегацию тромбоцитов *in vitro* зависели от концентрации: при низких концентрациях (0,5 и 1 мкг/мл) наблюдалась стимуляция, а при более высоких — угнетение.

Облучение PRP (без БР) значительно увеличивало интенсивность агрегации тромбоцитов по сравнению

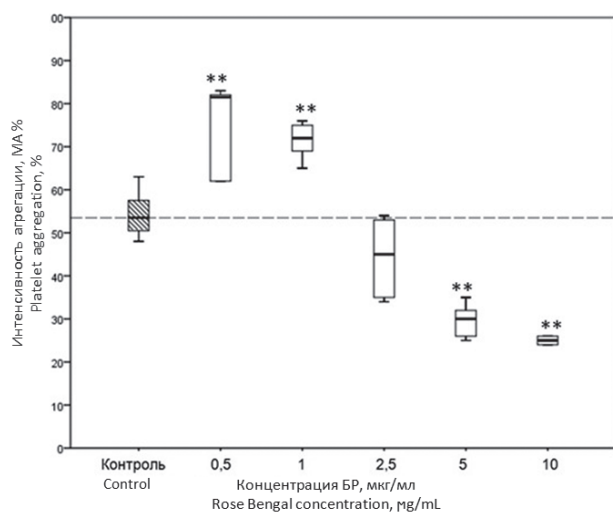


Рис. 3. Влияние бенгальского розового на интенсивность агрегации тромбоцитов.
 Примечание: ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем.
Fig. 3. Influence of rose bengal on the intensity of platelet aggregation.
 Note: ** – $p < 0,01$ compared to control.

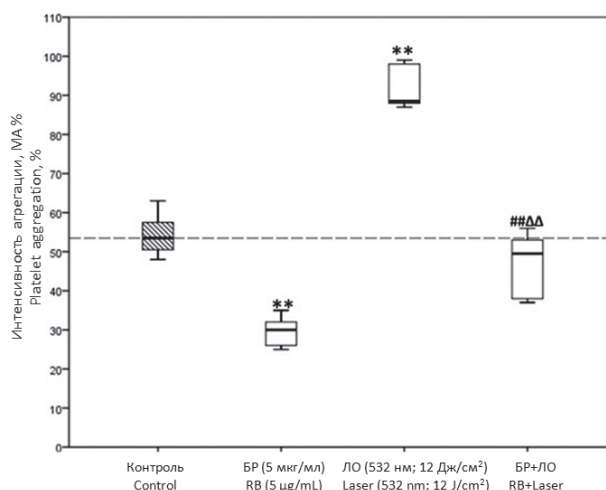


Рис. 4. Влияние БР, лазерного облучения, лазерного облучения на фоне предварительного добавления в PRP БР на интенсивность агрегации тромбоцитов.
 Примечание: ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем; ## – $p < 0,01$ по сравнению с БР; ΔΔ – $p < 0,01$ по сравнению с группой облучения.
Fig. 4. Influence of the RB, laser irradiation, laser irradiation with addition of RB to platelet-rich plasma on the intensity of platelet aggregation.
 Note: ** – $p < 0,01$ compared to control; ## – $p < 0,01$ compared to RB; ΔΔ – $p < 0,01$ in comparison with the irradiation group.

с контролем: при 6 Дж/см² МА увеличилась на 55,1%; при 12 Дж/см² – на 65,4%; при 24 Дж/см² – на 90,7% ($p < 0,01$). Скорости агрегации и дезагрегации при этом существенно не изменялись.

В следующей группе опытов после 5-минутной инкубации PRP с БР в концентрации 5 мкг/мл пробы в темноте подвергали лазерному облучению с плотностью энергии 12 Дж/см².

Как видно из рис. 4, лазерное облучение (532 нм) PRP после инкубации с БР (5 мкг/мл) приводило к уменьшению МА, в то время как облучение без БР усиливало интенсивность агрегации ($p < 0,01$). Таким образом, фотоактивация БР ослабляет стимулирующее действие лазерного облучения на агрегацию тромбоцитов (рис. 4).

Фотодинамическая модификация циркулирующей крови в наших исследованиях осуществлялась путем облучения бедренной артерии у крыс на фоне предварительного введения БР.

Как видно из таблицы, через час после внутривенного введения БР интенсивность агрегации тромбоцитов значимо не изменялась, однако время достижения МА было меньше на 20,7% по сравнению с контролем ($p < 0,01$).

Таким образом, длительный контакт циркулирующих тромбоцитов с БР оказывал влияние на их функциональную активность, но в меньшей степени, чем в опытах *in vitro*.

Облучение бедренной артерии у крыс без предварительного введения БР (фотомодификация крови) не приводило к значимому изменению агрегационной активности тромбоцитов.

Фотодинамическая модификация крови (облуче-

ние артерии) приводила к увеличению интенсивности агрегации тромбоцитов на 24% по сравнению с контрольной группой, и на 39,6% по сравнению с группой без фотоактивации БР ($p < 0,01$). Скорость агрегации увеличилась на 36,6% по сравнению с контрольной группой и на 27,3% по сравнению с группой без фотоактивации БР ($p < 0,05$) (см. табл.). Скорость дезагрегации не отличалась от данных в других группах.

Обсуждение

Слабо выраженная липофильность, наличие двойного отрицательного заряда при физиологических значениях pH ограничивают проникновение БР в клетки при низких концентрациях и отсутствии переносчиков, например, альбуминов. Именно этим объясняют то, что в водном растворе БР практически не влияет на нормальные клетки, в то время как в тех же концентрациях оказывает цитотоксический эффект на культивируемые клетки некоторых опухолей [1, 2, 8, 9].

В наших опытах установлено, что БР оказывает влияние на агрегацию тромбоцитов, при этом степень выраженности и направленность эффекта зависят от концентрации БР. Проникновение БР в интактные тромбоциты скорее всего происходит путем эндоцитоза комплекса БР с альбумином. В литературе имеются данные, что некоторые ФС оказывают прямое влияние на тромбоциты, однако большинство авторов наблюдали ингибирующий эффект только после фотоактивации ФС [10–13].

Таблица

Влияние фотодинамической модификации крови на показатели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов

Table

Influence of photodynamic blood modification on indicators of ADP-induced platelet aggregation

Группа Group	Показатели агрегации Aggregation parameters				
	Максимальная амплитуда агрегации (МА), % Maximum aggregation amplitude (MA), %	Время достижения МА, с Time to reach MA, s	Время уменьшения МА в 2 раза, с Time to decrease MA by 2 times, s	Скорость агрегации, %/с Aggregation rate, %/s	Скорость дезагрегации, %/с Disaggregation rate, %/s
Контроль Control (n=15)	54 (52–58)	130 (113–143)	219 (192–251)	0,41 (0,38–0,48)	0,31 (0,25–0,35)
БР (17 мг/кг) RB (17 mg/kg) (n=6)	48 (33–54)	103 (97–112)**	173 (153–186)**	0,44 (0,34–0,47)	0,32 (0,31–0,32)
ЛО 532 нм LI 532 nm (n=6)	57,5 (52–60)	126,5 (122–141)	222,5 (202–249)	0,45 (0,42–0,47)	0,31 (0,3–0,32)
БР+ЛО RB+LI (n=8)	67 (61–77)**## Δ	126 (103–146)	226 (179–264)	0,56 (0,48–0,61)* # Δ	0,37 (0,31–0,44)

Примечание: n — число животных; * – p<0,05 по сравнению с контролем; ** – p<0,01 по сравнению с контролем; # – p<0,05 по сравнению с группой ФС; ## – p<0,01 по сравнению с группой ФС; Δ – p<0,05 по сравнению с группой облучения. БР – бенгальский розовый; ЛО – лазерное облучение; РБ+ЛО – лазерное облучение после предварительного введения БР.

Note: n — number of animals; * – p<0.05 compared to control; ** – p<0.01 compared to control; # – p<0.05 compared to the RB group; ## – p<0.01 compared to the RB group; Δ – p<0.05 compared to the irradiation group. RB - rose bengal; LI - laser irradiation; RB+LI - laser irradiation after preliminary administration of RB.

По данным J. Inato и соавт. БР в конечной концентрации 5 мкг/мл не влиял на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека. По нашим данным БР в концентрациях 5 и 10 мкг/мл закономерно угнетал агрегацию тромбоцитов крыс, а в меньших концентрациях (0,5–1,0 мкг/мл) стимулировал. Возможно, указанные отличия связаны с видовыми особенностями тромбоцитов человека. J. Inato и соавт. отметили некоторое стимулирующее влияние фотоактивированного БР на агрегацию тромбоцитов (532 нм, доза не указана), однако этот эффект не отличался от эффекта воздействия на тромбоциты самого облучения.

Изменения функционального состояния циркулирующих тромбоцитов при облучении бедренной артерии крыс на фоне предварительного введения БР может быть результатом как прямого, так и непрямого фотодинамического воздействия. В 90-х годах прошлого столетия V.H. Fingar и соавт. показали, что при ФДТ экспериментальных опухолей в крови увеличивается содержание тромбоксана A2 (TxA2). Авторы объясняют это выделением TxA2 из эндотелия сосудов опухоли в зоне фотодинамического воздействия [14]. TxA2, как известно, является активатором тромбоцитов, что, по мнению авторов, способствует тромбообразованию в сосудах опухоли при ФДТ. Опи-

санный механизм изменения активности тромбоцитов при ФДТ можно рассматривать как непрямой, то есть не связанный с непосредственным фотодинамическим повреждением циркулирующих тромбоцитов. В наших опытах облучение бедренной артерии проводилось на фоне предварительного введения БР. В предыдущих исследованиях было показано, что при используемом дизайне эксперимента во всех случаях образуются фотодинамически индуцированные тромбы, то есть имело место повреждение эндотелия в зоне облучения [4, 18]. Однако площадь повреждения (3,14 мм²) была несоизмеримо меньше, чем в опытах V.H. Fingar и соавт. при облучении сосудов опухоли.

В литературе имеются данные о том, что внутри- и надсосудистое лазерное облучение крови после предварительного введения ФС оказывает цитотоксическое влияние на циркулирующие опухолевые клетки. Этот эффект рассматривается как результат фотодинамической модификации крови [15–18]. Можно предположить, что в тромбоцитах, циркулирующих в крови в зоне облучения бедренной артерии, также развиваются фотохимические процессы, влияющие на их функциональное состояние, то есть имеет место прямое фотодинамическое воздействие.

Заключение

В проведенном исследовании БР, как и некоторые другие ФС в предыдущих наших опытах, оказывал прямое действие на тромбоциты и их функциональную активность *in vitro* и *in vivo* [19]. Степень выраженности эффекта *in vitro* зависит от концентрации препарата. При малых концентрациях БР наблюдается стимуляция агрегационной активности тромбоцитов, при больших концентрациях – угнетение. В отличие от ФС хлоринового ряда, фотоактивация БР в концентрации 5 мкг/мл не приводила к усилению ингибирующего эффекта агрегации тромбоцитов в условиях *in vitro* [19].

Впервые показано, что фотомодификация крови на фоне предварительного введения БР приводит к умеренной активации функциональной активности тромбоцитов. Изменение функциональной активности тромбоцитов является одним из проявлений фотодинамической модификации крови. Учитывая, что фотодинамическая модель тромбоза с использованием БР широко применяется в доклинических исследованиях, эти данные следует учитывать при изучении эффективности антитромботических средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Demartis S., Obinu A., Gavini E. и соавт. Nanotechnology-based rose Bengal: A broad-spectrum biomedical tool // *Dyes and Pigments*, 2021. – Vol. 188. doi: 10.1016/j.dyepig.2021.109236.
2. Alarcón E, Edwards A.M., Aspée A. et al. Photophysics and photochemistry of rose bengal bound to human serum albumin // *Photochem Photobiol Sci*. – 2009. – Vol. 8(7). – P. 933-943. doi: 10.1039/b901056d.
3. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R. et al. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. // *Ann Neurol*. – 1985. – Vol. 17 (5). – P. 497-504.
4. Петрищев Н.Н., Васина Е.Ю., Чефу С.Г., Шамцян М.М. Модель экспериментального фототромбоза бедренной артерии крысы // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. – 2009. – Т. 8, № 1. – С. 42-45.
5. Sun Y.Y., Kuo Y.M., Chen H.R. et al. A murine photothrombotic stroke model with an increased fibrin content and improved responses to tPA-lytic treatment // *Blood Adv*. – 2020. – Vol. 4 (7). – P. 1222-1231. DOI:10.1182/bloodadvances.2019000782.
6. Kuo Y.M., Sun Y.Y., Kuan C.Y. A Fibrin-Enriched and tPA-Sensitive Photothrombotic Stroke Model. // *J Vis Exp*. – 2021. – Vol. 4 (172). doi:10.3791/61740.
7. Inamo J. Importance of photo activation of rose bengal for platelet activation in experimental models of photochemically induced thrombosis / J. Inamo, E. Belougne, C. Doutremepuich // *Thromb Res*. – 1996. – Vol. 83 (3). – P. 229-235.
8. Mousavi S. H., Hersey P. Role of caspases and reactive oxygen species in rose bengal-induced toxicity in melanoma cells // *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. – 2007. – Vol. 10 (2). – P. 118-123.
9. Mousavi S.H., Tavakkol-Afshari J., Brook A., Jafari-Anarkooli I. Direct toxicity of Rose Bengal in MCF-7 cell line: role of apoptosis. // *Food Chem Toxicol*. – 2009. Vol. 47(4). – P. 855-859. doi:10.1016/j.fct.2009.01.018.
10. Zieve P. D. The effect of hematoporphyrin and light on human platelets. I. Morphologic, functional, and biochemical changes / P. D. Zieve, H. M. Solomon, J. R. Krevans // *J. Cell. Physiol*. – 1966. – Vol. 67 (2). – P. 271-279. doi:10.1002/jcp.1040670207.
11. Самаль А. Б. Сенсибилизированное хлорином е6 фотоингибирование агрегации тромбоцитов: участие активных форм кислорода / А. Б. Самаль, А. Б. Зорина, А. Б. Черенкевич // *Гематол. и трансфузиол.* – 1991. – Т. 36, № 4. – С. 19-21.
12. Senge M. O. Platelets, photosensitizers, and PDT / M. O. Senge, M. W. Radomski // *Photodiagnosis Photo Ther*. – 2013. – Vol. 10(1). – P. 1-16. doi: 10.1016/j.pdpdt.2012.08.004.
13. Park J. Y. Chlorin e6 prevents ADP-induced platelet aggregation by decreasing PI3K-Akt phosphorylation and promoting cAMP production / J. Y. Park, H. D. Ji, B. R. Jeon, и соавт. // *Evid. Based Complement Alternat. Med*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 11. Article ID 569160. doi:10.1155/2013/569160.
14. Fingar V. H. Role of thromboxane and prostacyclin release on

REFERENCES

1. Demartis S., Obinu A., Gavini E. и соавт. Nanotechnology-based rose Bengal: A broad-spectrum biomedical tool. *Dyes and Pigments*, 2021, Vol. 188. doi: 10.1016/j.dyepig. 2021.109236.
2. Alarcón E, Edwards A.M., Aspée A. et al. Photophysics and photochemistry of rose bengal bound to human serum albumin. *Photochem Photobiol Sci*, 2009, Vol. 8(7), pp. 933-943. doi: 10.1039/b901056d.
3. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R. et al. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol*, 1985, Vol. 17 (5), pp. 497-504.
4. Petrishchev N.N., Vasina E.Yu., Chefu S.G., Shamtsyan M.M. Model of experimental photo thrombosis of the femoral artery of a rat. *Regional blood circulation and microcirculation*, 2009, Vol. 8 (1), pp. 42-45.
5. Sun Y.Y., Kuo Y.M., Chen H.R. et al. A murine photothrombotic stroke model with an increased fibrin content and improved responses to tPA-lytic treatment. *Blood Adv*, 2020, Vol. 4 (7), pp. 1222-1231. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000782.
6. Kuo Y.M., Sun Y.Y., Kuan C.Y. A Fibrin-Enriched and tPA-Sensitive Photothrombotic Stroke Model. *J Vis Exp*. – 2021. – Vol. 4 (172). doi:10.3791/61740.
7. Inamo J. Importance of photo activation of rose bengal for platelet activation in experimental models of photochemically induced thrombosis / J. Inamo, E. Belougne, C. Doutremepuich. *Thromb Res*, 1996, Vol. 83 (3), pp. 229-235.
8. Mousavi S. H., Hersey P. Role of caspases and reactive oxygen species in rose bengal-induced toxicity in melanoma cells. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2007, Vol. 10 (2), pp. 118-123.
9. Mousavi S.H., Tavakkol-Afshari J., Brook A., Jafari-Anarkooli I. Direct toxicity of Rose Bengal in MCF-7 cell line: role of apoptosis. *Food Chem Toxicol*, 2009. Vol. 47(4), pp. 855-859. doi:10.1016/j.fct.2009.01.018.
10. Zieve P. D. The effect of hematoporphyrin and light on human platelets. I. Morphologic, functional, and biochemical changes / P. D. Zieve, H. M. Solomon, J. R. Krevans. *J. Cell. Physiol*, 1966, Vol. 67 (2), pp. 271-279. doi:10.1002/jcp.1040670207.
11. Samal A. B. Sensitization of chlorinome E6 photoingibilation platelet aggregation: uchasation activatorы form oxygen / A. B. Samal A. B. Zorina, Huh. B. Cherenkevich. *Hematol. and transfusiol*, 1991, Vol. 36(4), pp. 19-21. (in Russ.)
12. Senge M. O. Platelets, photosensitizers, and PDT / M. O. Senge, M. W. Radomski // *Photodiagnosis Photo Ther*, 2013, Vol. 10(1), pp. 1-16. doi: 10.1016/j.pdpdt.2012.08.004.
13. Park J. Y. Chlorin e6 prevents ADP-induced platelet aggregation by decreasing PI3K-Akt phosphorylation and promoting cAMP production / J. Y. Park, H. D. Ji, B. R. Jeon, et al. *Evid. Based Complement Alternat. Med*, 2013, Vol. 2013, pp. 11. Article ID 569160. doi:10.1155/2013/569160.
14. Fingar V. H. Role of thromboxane and prostacyclin release on

- photodynamic therapy-induced tumor destruction / V. H. Fingar, T. J. Wieman, K. W. Doak // *Cancer Res.* – 1990. – Vol. 50(9). – P. 2599-2603.
15. Гельфонд М. Л. Предварительные результаты применения фотомодификации крови, сенсibilизированной «Фотодитазин», в лечении распространенных форм злокачественных новообразований / М. Л. Гельфонд // *Журнал физической медицины.* – 2005. – Т. 15, № 2. – С. 41-63.
 16. Каплан М. А. Системная внутривенная фотодинамическая терапия с фотосенсибилизатором «Фотодитазин» у больных злокачественными новообразованиями III-IV стадии / М. А. Каплан, В. Н. Капинус, Н. П. Ткаченко, И. А. Замулаева, и др. // *Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике : Тезисы Всероссийской научно-практической конференции, Москва, 20-21 марта 2014 года.* – С. 91.
 17. Качалова Н. М. Влияние фотодинамической модификации крови с использованием фотолон и его нанокompозита на опухолевый рост / Н. М. Т. С. Завадская, Е. А. Качалова, Л. Ю. Свириденко // *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: материалы Международной научной конференции и Двенадцатого съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, / редкол. : И. Д. Волотовский и др. в 2 ч., ч. 1. Изд. центр БГУ, 2016.* – С. 293-296.
 18. Гришачёва Т.Г., Михайлова И.А., Струй А.В. и др. Влияние фотоактивированного бенгальского розового на микроциркуляцию // *Biomedical Photonics.* – 2017. – Т. 6, № 3. – С. 11-15.
 19. Петрищев Н.Н., Галкин М.А., Гришачева Т.Г., и др. Влияние препарата на основе хлорина е6 на агрегационную активность тромбоцитов // *Biomedical Photonics.* – 2019. – Т. 8, № 3. – С. 4-10. doi: 10.24931/2413-9432-2019-8-3-4-10.
 - photodynamic therapy-induced tumor destruction / V. H. Fingar, T. J. Wieman, K. W. Doak. *Cancer Res*, 1990, Vol. 50(9), pp. 2599-2603.
 15. Gelfond M. L. Preliminary results of the use of photomodification of blood sensitized with Photoditazine in the treatment of common forms of malignant neoplasms / M. L. Gelfond // *Journal of Physical Medicine*, 2005, Vol. 15(2), pp. 41-63. (in Russ.)
 16. Kaplan M. A. Systemic intravenous photodynamic therapy with photosensitizer «Photoditazine» in patients with malignant neoplasms of stage III-IV / M. A. Kaplan, V. N. Kapinus, N. P. Tkachenko, I. A. Zamulaeva, etc. // *Antitumor therapy: from experiment to clinic : Theses of the All-Russian Scientific and practical Conference*, 2014, pp. 91. (in Russ.)
 17. Kachalova N. M. The effect of photodynamic modification of blood using photolon and its nanocomposite on tumor growth / N. M. T. S. Zavadskaya, E. A. Kachalova, L. Yu. Sviridenko // *Molecular, membrane and cellular bases of functioning of biosystems: materials of the International Scientific Conference and the Twelfth Congress of the Belarusian Public Association of Photobiologists and Biophysicists*, 2016, pp. 293-296. (in Russ.)
 18. Grishaeva T.G., Mikhailova I.A., Struy A.V. et al. The effect of photo-activated bengal pink on microcirculation // *Biomedical Photonics*, 2017, Vol. 6(3), pp. 11-15. (in Russ.)
 19. Petrishchev N.N., Galkin M.A., Grishacheva T.G., Dementjeva I.N., Chefu S.G. The effect of chlorin e6 drug on platelet aggregation activity. *Biomedical Photonics*, 2019, Vol. 8(3), pp. 4-10. doi: 10.24931/2413-9432-2019-8-3-4-10 (in Russ.)