

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-005.6-08

Васина Е.Ю., Чефу С.Г., Петрищев Н.Н.

Влияние Нотромбела на развитие FeCl₃-индуцированного тромбоза сонной артерии крыс

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, 197022, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Льва Толстого, д. 6-8

Цель работы – изучение влияния Нотромбела (ЗАО «Вертекс», Санкт-Петербург, РФ) на развитие экспериментального тромбоза.

Методика. Опыты выполнены на крысах-самцах Вистар массой 250-270 г. Нотромбел вводили внутривенно и интрагастрально в течение 10 сут (курсовая доза 25, 50 и 100 мг/кг). В качестве препаратов сравнения использовали ацетилсалициловую кислоту (АСК) и Клопидогрел (курсовая доза 10,5 и 20 мг/кг соответственно). Тромбоз сонной артерии вызывали 60-секундной аппликацией 20% FeCl₃. Кровоток регистрировали методом высокочастотной ультразвуковой доплерографии («Минимакс-Допплер-К» Санкт-Петербург, РФ, с рабочей частотой датчика 20 МГц). Прекращение кровотока рассматривали как показатель тромбоокклюзии сонной артерии.

Результаты. У контрольных крыс через 20-30 мин после аппликации FeCl₃ кровоток в сонной артерии не определялся, что свидетельствовало о развитии тромбоза. Нотромбел как при интрагастральном, так и при внутривенном введении тормозил развитие FeCl₃-индуцированного тромбоза сонной артерии. Наиболее эффективной независимо от способа введения оказалась курсовая доза препарата 100 мг/кг, при которой ни в одном из опытов тромбоз не развивался. Антитромботический эффект Нотромбела сопоставим с эффектами АСК и Клопидогрела. В механизме антитромботического влияния Нотромбела имеют значение его прямое ингибирующее влияние на функциональную активность тромбоцитов, а также антиоксидантная активность.

Заключение. Нотромбел можно рассматривать как перспективный антитромботический препарат.

Ключевые слова: N,N'-замещенные пиперазины, Нотромбел, FeCl₃-индуцированный тромбоз, сонная артерия, ацетилсалициловая кислота, Клопидогрел.

Для цитирования: Васина Е.Ю., Чефу С.Г., Петрищев Н.Н. Влияние Нотромбела на развитие FeCl₃-индуцированного тромбоза сонной артерии крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(2): 50-55.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.02.50-55

Для корреспонденции: Чефу Светлана Григорьевна, канд. биол. наук, зав. лаб. экспериментальных исследований Центра лазерной медицины, e-mail: chefusveta@yandex.ru

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 26.06.2018

Vasina E.Y., Chefu S.G., Petrishchev N.N.

The effect of Notrombel on FeCl₃-induced carotid artery thrombosis in rats

I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University,
L'va Tolstogo Str. 6-8, Saint Petersburg 197022, Russia

Aim. To study the effect of Notrombel (ZAO Vertex, St. Petersburg, Russia), a drug of the N, N'-substituted piperazine class containing a carboximidamide group, on experimental thrombosis.

Methods. Experiments were carried out on male Wistar rats weighing 250-270 g. Notrombel was administered intravenously and intragastrically for 10 days (course doses 25, 50, and 100 mg/kg). Acetylsalicylic acid (ASA) and Clopidogrel (course doses 10.5 and 20 mg/kg, respectively) were used as comparator drugs. Carotid artery thrombosis was induced by a 60-s application of 20% FeCl₃. Blood flow was recorded by high-frequency ultrasonic dopplerography (Minimax-Doppler-K, St. Petersburg, RF; sensor operating frequency, 20 MHz). Stagnation of blood flow was considered as an indicator of carotid artery occlusion.

Results. In control rats 20-30 minutes after the application of FeCl₃, the carotid blood flow was undeterminable, which indicated development of thrombosis. Notrombel, both intragastric and intravenous, inhibited the development of FeCl₃-induced carotid thrombosis. The most effective dose was 100 mg/kg irrespective of the administration route. Thrombosis has not developed in any experiment. The antithrombotic effect of Notrombel was comparable to that of ASA and Clopidogrel. The Notrombel inhibition of platelet activity and its antioxidant properties contribute to the mechanism of Notrombel antithrombotic effect. **Conclusion:** Notrombel can be considered as a promising antithrombotic drug.

Keywords: N, N'-substituted piperazines, Notrombel, FeCl₃-induced thrombosis, carotid artery, Acetylsalicylic acid, Clopidogrel.

For citation: Vasina E.Y., Chefu S.G., Petrishchev N.N. The effect of Notrombel on FeCl₃-induced carotid artery thrombosis in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(2): 50-55. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.02. 50-55

For correspondence: *Svetlana G. Chefu*, Candidate of Biological Sciences, Head of Experimental Research Laboratory of the Laser Medicine Center (Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 197022, Russian Federation, Saint Petersburg, L'va Tolstogo str. 6-8), e-mail: chefusveta@yandex.ru

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Received 26.06.2018

Введение

Среди новых антитромботических препаратов, проходящих доклинические исследования, большой интерес представляют производные N-замещенных пиперазинов. Ранее было установлено, что один из N,N'-замещенных пиперазинов, содержащий карбоксимидамидную группу (Нотромбел, ЗАО «Вертекс», Санкт-Петербург, РФ), является ингибитором агрегации тромбоцитов, уменьшает экспрессию P-селектина и тромбоцитарного мембранного комплекса GPIIb-IX-V, тормозит тромбин-индуцированное образование тромбоцитарно-лейкоцитарных комплексов. Возможными мишенями для Нотромбела являются тромбоксановый путь передачи сигнала активации, а также непосредственно мембранные рецепторы GPIIb-IX-V [1-4]. Антитромботические свойства Нотромбела были продемонстрированы на модели фототромбоза бедренной артерии крыс [5]. Продолжая исследование в этом направлении, мы использовали модель FeCl₃-индуцированного тромбоза артерий, которая рекомендуется для тестирования препаратов с потенциальным антитромботическим действием [6].

Цель работы – изучение влияния курсового внутривенного и интрагастрального введения препарата Нотромбел на развитие экспериментального тромбоза, индуцированного FeCl₃.

Методика

Все работы с лабораторными животными проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министра здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского Университета им. акад. И.П. Павлова. Исследования проводились на крысах-самцах Вистар массой 250–270 г (ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово») в соот-

ветствии с «Руководством по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» [7]. Животные содержались на стандартном рационе при свободном доступе к воде без ограничения, при фиксированном световом режиме 12.00:12.00 ч. Температура поддерживалась в пределах 22–25 °С, относительная влажность – 50–70%. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла 14 сут.

Исследуемый препарат Нотромбел вводили ненаркотизированным животным 10-кратно 1 раз в сут в фиксированный световой период (с 10.30 до 13.00). Препарат вводили вне зависимости от приема пищи:

- а-внутривенно (хвостовую вену) в течение 1 мин,
- б-интрагастрально

В качестве сравнения использовали препараты, механизм действия которых хорошо изучен:

а) ацетилсалициловую кислоту при внутривенном введении,

б) Клопидогрел – при интрагастральном введении.

Разовые дозы для введения препаратов:

Нотромбел использован в одинаковых дозах 2,5; 5,0 и 10,0 мг/кг в объеме 4 мл/кг для всех доз.

Клопидогрел – 2,0 мг/кг в объеме 4 мл/кг
ацетилсалициловая кислота (АСК) – 1,05 мг/кг в объеме 4 мл/кг

Приготовление растворов.

Нотромбел для внутривенного введения растворяли в физиологическом растворе (контроль 1), при интрагастральном введении – в ацетатном буфере, содержащем 0,5 % TWIN-80 (контроль 2).

АСК (Sigma Aldrich) для внутривенного введения растворяли в воде для инъекций при нагревании (40 °С) на водяной бане при периодическом энергичном встряхивании до полного растворения кристаллов, после чего добавляли стерильный 10% раствор хлорида натрия до конечной концентрации 0,9%.

Клопидогрел для интрагастрального введения растворяли в ацетатном буфере, содержащем 0,5% TWIN-80(ЗАО «Вертекс», Санкт-Петербург, РФ).

Разовый объем вводимых растворов как при внутривенном, так и при интрагастральном введении составлял 4 мл/кг для всех доз.

Исследования начинали через 90 мин после 10-го интрагастрального введения препаратов и через 24 ч после завершения курса внутривенного введения препаратов. Животных наркотизировали (4,3% хлоралгидрат 10 мл/кг внутривенно). Производили разрез длиной около 3 см на передней поверхности шеи животного. Участок сонной артерии длиной около 6 мм выделяли из сосудисто-нервного пучка, подводили под него полоску пластика шириной 4 мм, изолируя тем самым окружающие ткани от воздействия FeCl₃.

Модель FeCl₃-индуцированного тромбоза магистральных артерий была разработана Kurz KD с соавторами в 1990 г [8]. В настоящее время для тестирования антитромботических препаратов рекомендуется использовать 20% FeCl₃ [9, 10].

После регистрации фонового кровотока на правую сонную артерию накладывали смоченный в 20% растворе FeCl₃ диск фильтровальной бумаги (фильтры обеззоленные Красная лента, ООО «Мелиор XXI») диаметром 3 мм; экспозиция составляла 60 с.

Исследование кровотока в сонной артерии проводили при помощи высокочастотной ультразвуковой доплерографии («Минимакс-Допплер-К» Санкт-Петербург, РФ, с рабочей частотой датчика 20 МГц) непосредственно перед моделированием тромбоза и в последующие 70 мин эксперимента. В случае отсутствия кровотока при повторной 2-х-кратной регистрации исследование прекращали.

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью программного пакета IBM SPSS Statistics Version 20. Значимость различий измеряемых параметров оценивалась с помощью критерия Пирсона χ-квадрат. Значения p менее чем 0,05 рассматривались как значимые.

Результаты и обсуждение

Введение Нотромбела, АСК и Клопидогрела все животные переносили удовлетворительно. В 10-суточный период наблюдения изменений общего состояния животных не отмечено. При инъекциях и проведении хирургических манипуляций повышенной кровоточивости не наблюдалось.

У интактных животных и крыс контрольных групп (получавших внутривенно 0,9% раствор NaCl либо интрагастрально ацетатный буфер) остановка кровотока в сонной артерии наступала не позднее 30-й мин после аппликации FeCl₃ (табл. 1 и 2), что свидетельствует о тромбоокклюзии сосуда.

В группе животных, получавших внутривенно АСК, остановка кровотока на 30-й мин наблюдалась у 2 животных из 8 (25%), и до 70-й мин кровотоки сохранились у 5 крыс (62,5%), что свидетельствует об антитромботическом действии АСК (табл. 1).

У крыс, получавших внутривенно Нотромбел в дозе 2,5 мг/кг, окклюзия сонной артерии на 30-й мин имела место в 4 случаях из 8 (50%), на 70-й мин — у всех животных, при этом время развития тромбоза варьировало от 10 до 70 мин (табл. 1). В группе крыс, получавших внутривенно Нотромбел в дозе 5,0 мг/кг, на 30-й мин кровотоки сохранялись у 7 животных из 8 (87%), а 70-й мин — у 4 из 8 (50%) (табл. 1). У крыс, получавших внутривенно Нотромбел в дозе 10,0 мг/кг, не было зафиксировано ни одного случая тромбоокклюзии (табл. 1).

Таким образом, Нотромбел при внутривенном введении препятствовал развитию тромбоза сонной артерии, индуцированного FeCl₃. Наиболее эффективной оказалась доза 10 мг/кг.

В группе животных, получавших интрагастрально Клопидогрел, на 30-й мин остановки кровотока в сонной артерии после аппликации FeCl₃ не наблюдалось. До 70-й мин кровотоки сохранились у 6 крыс из 8 (75%),

Таблица 1

Влияние внутривенного введения Нотромбела и АСК на развитие FeCl₃-индуцированного тромбоза в сонной артерии

Группа животных	Количество животных с наличием кровотока в сонной артерии								
	До FeCl ₃	Время после аппликации FeCl ₃ , мин							
		10	20	30	40	50	60	70	
Интактные	7	7	0	0	0	0	0	0	
Контроль 1 (NaCl)	8	8	3	0	0	0	0	0	
АСК, 1,05 мг/кг	8	8	6	6**	6**	5**	5**	5**	
Нотромбел, мг/кг	2,5	8	8	5	4*	4*	2	1	0
	5,0	8	8	7*	7**	6**	5**	5**	4*
	10,0	7	7	7*	7**	7**	7**	7**	7**

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

что свидетельствует об антитромботическом действии Клопидогрела (табл. 2).

У крыс, получавших интрагастрально Нотромбел в дозе 2,5 мг/кг, остановка кровотока на 30-й мин наблюдалась в 4 из 7 опытов (57,1 %), на 70-й мин кровотока сохранялся только у одного животного (14,3 %) (табл. 2).

В группе крыс, получавших интрагастрально Нотромбел в дозе 5,0 мг/кг, на 30-й мин кровотока сохранялся у 6 животных из 7 (85,7 %) на 70-й мин – у 3 (42,9 %) (табл. 2).

У крыс, получавших интрагастрально Нотромбел в дозе 10,0 мг/кг, не было зафиксировано ни одного случая остановки кровотока (табл. 2).

Таким образом, при интрагастральном введении (как и при внутривенном) Нотромбел препятствовал развитию индуцированного $FeCl_3$ тромбоза сонной артерии. Наиболее эффективной также оказалась доза 10 мг/кг.

По данным литературы, после аппликации $FeCl_3$ развиваются структурные изменения во всех слоях стенки сонной артерии крыс, в том числе наблюдаются участки дезэндоотелизации [8-12]. Показано, что $FeCl_3$ воздействует на стенку сосуда не только со стороны адвентиции, но, проникая в просвет сосуда, и со стороны ламинальной поверхности эндотелиоцитов [11, 13].

В механизме альтерации сосудистой стенки под влиянием $FeCl_3$ имеют значение: прямое влияние на белковые структуры [13, 14]; воздействие на эритроциты и их гемолиз, окисление гемоглобина и образование редокс-активных молекул, нарушающих функции эндотелия и лейкоцитов [15, 16]; образование активных форм кислорода при железозависимой генерации свободных радикалов [16-18].

Комплексное воздействие $FeCl_3$ на клеточные элементы крови и молекулы сосудистой стенки приводит

к образованию окклюзионного тромба, состоящего из тромбоцитов, эритроцитов и фибрина [8].

Модель $FeCl_3$ -индуцированного тромбоза широко используется для исследования эффективности антитромботических препаратов [19–21]. Замедление $FeCl_3$ -индуцированного тромбоза в артериях наблюдалось при профилактическом применении антикоагулянтов и антиагрегантных препаратов [9, 10, 20, 22, 23]. Известно, что Клопидогрел, являющийся селективным ингибитором пуриновых рецепторов тромбоцитов, оказывал более выраженный антитромботический эффект, чем АСК (ингибитор циклооксигеназы). При пероральном однократном введении крысам Клопидогрел (30 мг/кг) за 4 ч до аппликации $FeCl_3$ статистически значимо замедлял тромбоокклюзию сонной артерии, а АСК в той же дозе оказалась неэффективной; при 3-х - суточном применении (курсовая доза 90 мг/кг) АСК и особенно Клопидогрел увеличивали время сохранности кровотока [9]. В нашем исследовании при применении в меньших дозах АСК (курсовая доза 10,5 мг) и Клопидогрел (20 мг) также проявляли выраженный антитромботический эффект, причем Клопидогрел увеличивал время до тромбоокклюзии в большей степени, чем АСК.

Нотромбел оказывал дозозависимый антитромботический эффект, сопоставимый с препаратами сравнения, как при внутривенном, так и при интрагастральном применении. Нотромбел, как было показано ранее, обладает выраженной антиагрегантной активностью, уменьшает тромбин-индуцированную активацию тромбоцитов. Учитывая возможность влияния Нотромбела непосредственно на мембранные рецепторы GPIIb-IX-V [3], можно предположить важную роль снижения адгезии и агрегации тромбоцитов в его антитромботическом действии. Это предположение согласуется с данными других авторов. Так, использо-

Таблица 2

Влияние интрагастрального введения Нотромбела и Клопидогрела на развитие экспериментального тромбоза в сонной артерии

Группа животных	Количество животных с наличием кровотока в сонной артерии								
	До $FeCl_3$	Время после аппликации $FeCl_3$, мин							
		10	20	30	40	50	60	70	
Интактные	7	7	0	0	0	0	0	0	
Контроль 2 (Ацетатный буфер)	7	7	2	0	0	0	0	0	
Клопидогрел 2,0 мг/кг	8	8	8**	8**	8**	8**	7**	6**	
Нотромбел, мг/кг	2,5	7	7	5	4*	4*	2	1	1
	5,0	7	7	7**	6**	6**	4**	3	3
	10,0	7	7	7**	7**	7**	7**	7**	7**

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

вание метода прижизненной биомикроскопии показало, что Анфибатид — антагонист GPIb рецепторов тромбоцитов — замедлял FeCl₃-индуцированный тромбоз в мезентериальных сосудах крыс [21].

Антитромботическая активность Нотромбела, выявленная нами на модели FeCl₃-индуцированного тромбоза сонной артерии, по-видимому, связана как с прямым влиянием на тромбоциты и снижением их функциональной активности [1-3], так и с антиоксидантным действием, учитывая роль активных форм кислорода в механизме повреждения эндотелия [24].

Заключение. Нотромбел как при интрагастральном, так и при внутривенном введении тормозил развитие FeCl₃-индуцированного тромбоза сонной артерии. Наиболее эффективной оказалась доза 10 мг/кг. Нотромбел можно рассматривать как перспективный антитромботический препарат.

Авторы выражают благодарность ЗАО «ВЕРТЕКС» за предоставленный для проведения исследования препарат Нотромбел.

Литература

1. Весёлкина О.С., Викторов Н.Б., Петрищев Н.Н., Поплавская Ю.В. Вещество, обладающее сочетанной антиагрегантной, антикоагулянтной и вазодилаторной активностью, N,N'-замещенные пиперазины и способ их получения. Патент 2 469 029.
2. Весёлкина О.С., Петрищев Н.Н., Васина Л.В., Боровитов М.Е., Селютин А.В., Чепанов С.В., Сельков С.А. Влияние новых соединений, N,N'-замещенных пиперазинов, на тромбин-индуцированную активацию тромбоцитов. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2014; 77(8): 28-33.
3. Весёлкина О.С., Петрищев Н.Н., Васина Л.В., Боровитов М.Е., Селютин А.В., Чепанов С.В., Сельков С.А. Влияние препарата Нотромбел на экспрессию мембранного комплекса GPIb-IX-V тромбоцитами, активированными тромбином. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2016; 102(5): 590-6.
4. Весёлкина О.С., Петрищев Н.Н., Васина Л.В., Боровитов М.Е., Селютин А.В., Чепанов С.В., Сельков С.А. Влияние препарата Нотромбел на тромбин-индуцированное образование тромбоцитарно-лейкоцитарных комплексов. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2017; 103(3): 318-26.
5. Васина Е. Ю., Чефу С. Г., Петрищев Н. Н., Веселкина О. С. Влияние препарата Нотромбел на процесс фотоиндуцированного тромбообразования. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2017; 16(3): 70-5. doi: 10.24884/1682-6655-2017-16-3-70-75.
6. Миронов А.Н., ред. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*; Часть 1. М.; Гриф и К; 2012.
7. Белозерцева И.В., Драволлина О.А., Тур М.А.; под ред. Э.Э. Звартау. *Руководство по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова*; СПб; издательство СПбГМУ, 2014.
8. Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res*. 1990; 60(4): 269-80.
9. Surin WR, Prakash P, Barthwal MK, Dikshit M. Optimization of ferric chloride induced thrombosis model in rats: effect of anti-platelet and anti-coagulant drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2010; 61(3): 287-91. doi: 10.1016/j.vascn.2009.11.002.
10. Eckly A, Hechler B, Freund M, Zerr M., Cszenave J-P, Lanza F et al. Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2011; 9(4): 779-89. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04218.x.
11. Tseng MT, Dozier A, Haribabu B, Graham UM. Transendothelial migration of ferric ion in FeCl₃ injured murine common carotid artery. *Thromb Res*. 2006; 118(2): 275-80.
12. Westrick RJ, Winn ME, Eitzman DT. Murine models of vascular thrombosis (Eitzman series). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27(10): 2079-93. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.142810.
13. Ciciliano JC, Sakurai Y, Myers DR, Fay ME, Hechler B, Meeks S, et al. Resolving the multifaceted mechanisms of the ferric chloride thrombosis model using an interdisciplinary microfluidic approach. *Blood*. 2015; 126(6): 817-24. doi: 10.1182/blood-2015-02-628594.
14. Hoeschele JD, Turner JE, England MW. Inorganic concepts relevant to metal binding, activity, and toxicity in a biological system. *Sci Total Environ*. 1991; 109-110: 477-92.
15. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA*. 2005; 293(13): 1653-62. DOI: 10.1001/jama.293.13.1653.
16. Woollard KJ, Sturgeon S, Chin-Dusting JP, Jackson S.P, Salem HH. Erythrocyte hemolysis and hemoglobin oxidation promote ferric chloride-induced vascular injury. *J Biol Chem*. 2009; 284(19): 13110-8. doi: 10.1074/jbc.M809095200.
17. Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood*. 2001; 98(6): 1802-11. doi: https://doi.org/10.1182/blood.V98.6.1802.
18. Graça-Souza AV, Arruda MA, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood*. 2002; 99(11): 4160-5. doi: https://doi.org/10.1182/blood.V99.11.4160.
19. Damiano BP, Mitchell JA, Giardino E, Corcoran T, Haertlein BJ, de Garavilla L, et al. Antiplatelet and antithrombotic activity of RWJ-53308, a novel orally active glycoprotein IIb/IIIa antagonist. *Thromb Res*. 2001; 104(2): 113-26.
20. Митина Т.М., Яковлев Д.С., Спасов А.А., Суздаев К.Ф. антиагрегантная и антитромботическая активности нового P2Y₁-антагониста — соединения Sbt-119 ex и in vivo. *Вестник ВолгГМУ*. 2011; 4 (40): 19-21.
21. Lei X, Reheman A, Hou Y, Zhou H, Wang Y, Marshall AH et al. Anfibatide, a novel GPIb complex antagonist, inhibits platelet adhesion and thrombus formation in vitro and in vivo in murine models of thrombosis. *Thromb Haemost*. 2014; 111(2): 279-89. doi: 10.1160/TH13-06-0490.
22. Lockyer S, Kambayashi J. Demonstration of Flow and Platelet Dependency in a Ferric Chloride-Induced Model of Thrombosis. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1999; 33(5): 718-725.
23. Kawamura Y, Takahari Y, Tamura N, Eguchi Y, Urano T, Ishida H, Goto S. Imaging of structural changes in endothelial cells and thrombus formation at the site of FeCl₃-induced injuries in mice cremasteric arteries. *J Atheroscler Thromb*. 2009; 16(6): 807-14.
24. Веселкина О.С., Соловцова И.Л., Петрищев Н.Н., Галебская Л.В., Боровитов М.Е., Нилов Д.И. и др. Влияние N,N'-замещенных пиперазинов на цитолиз. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015; 49(11): 25-31.

References

- Vesvolkina O.S., Viktorov N.B., Petrishchev N.N., Poplavskaya YU.V. A substance that has a combined antiplatelet, anticoagulant and vasodilator activity, N, N'-substituted piperazines, and a process for their preparation. Patent 2 469 029. (in Russian)
- Vesvolkina O.S., Petrishchev N.N., Vasina L.V., Borovitev M.E., Selyutin A.V., Chepanov S.V., Sel'kov S.A. Influence of New N,N'-Substituted Piperazines on Thrombin-Induced Platelet Activation. *Eksperim klin farmakologiya*. 2014; 77 (8): 28-33. (in Russian)
- Vesvolkina O.S., Petrishchev N.N., Vasina L.V., Borovitev M.E., Selyutin A.V., Chepanov S.V., Sel'kov S.A. Nothrombel effect on the expression of membrane complex gpIb-ix-v platelets activated by thrombin. *Rossiyskiy Fiziologicheskiy Zhurnal imeni I.M. Sechenova*. 2016; 102 (5): 590-596. (in Russian)
- Vesvolkina O.S., Petrishchev N.N., Vasina L.V., Borovitev M.E., Selyutin A.V., Chepanov S.V., Sel'kov S.A. Nothrombel effect on the formation of platelet-leukocyte complexes induced by thrombin. *Rossiyskiy Fiziologicheskiy Zhurnal imeni I.M. Sechenova*. 2017; 103(3): 318-26. (in Russian)
- Vasina E.Y., Chefu S.G., Petrishchev N.N., Veselkina O. S. The influence of Notrombel on the process of photo-induced thrombogenesis. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya*. 2017; 16(3): 70-5. doi: 10.24884/1682-6655-2017-16-3-70-75. (in Russian)
- A guide to preclinical drug research. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv; CHast' I].* Ed. A.N. Mironov. Part one. Moscow; Grief and K, 2012. (in Russian)
- Guidelines for the use of laboratory animals for scientific and educational purposes in the PSPbGMU them. acad. I.P. [Pavlova Rukovodstvo po ispol'zovaniyu laboratornykh zhivotnykh dlya nauchnykh i uchebnykh tseley v PSPbGMU im. akad. I.P. Pavlova].* Belozertseva IV, Dravalina OA, Tour MA; Ed. E.E. Zvartau. St. Petersburg, publishing house SPbGMU, 2014. (in Russian)
- Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res*. 1990; 60(4): 269-80.
- Surin WR, Prakash P, Barthwal MK, Dikshit M. Optimization of ferric chloride induced thrombosis model in rats: effect of anti-platelet and anti-coagulant drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2010; 61(3): 287-91. doi: 10.1016/j.vascn.2009.11.002.
- Eckly A, Hechler B, Freund M, Zerr M., Csenave J-P, Lanza F et al. Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2011; 9(4): 779-89. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04218.x.
- Tseng MT, Dozier A, Haribabu B, Graham UM. Transendothelial migration of ferric ion in FeCl₃ injured murine common carotid artery. *Thromb Res*. 2006; 118(2): 275-80.
- Westrick RJ, Winn ME, Eitzman DT. Murine models of vascular thrombosis (Eitzman series). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27(10): 2079-93. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.142810.
- Ciciliano JC, Sakurai Y, Myers DR, Fay ME, Hechler B, Meeks S, et al. Resolving the multifaceted mechanisms of the ferric chloride thrombosis model using an interdisciplinary microfluidic approach. *Blood*. 2015; 126(6): 817-24. doi: 10.1182/blood-2015-02-628594.
- Hoeschele JD, Turner JE, England MW. Inorganic concepts relevant to metal binding, activity, and toxicity in a biological system. *Sci Total Environ*. 1991; 109-110: 477-92.
- Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA*. 2005; 293(13): 1653-62. DOI: 10.1001/jama.293.13.1653.
- Woollard KJ, Sturgeon S, Chin-Dusting JP, Jackson S.P, Salem HH. Erythrocyte hemolysis and hemoglobin oxidation promote ferric chloride-induced vascular injury. *J Biol Chem*. 2009; 284(19): 13110-8. doi: 10.1074/jbc.M809095200.
- Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood*. 2001; 98(6): 1802-11. doi: https://doi.org/10.1182/blood.V98.6.1802.
- Graça-Souza AV, Arruda MA, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood*. 2002; 99(11): 4160-5. doi: https://doi.org/10.1182/blood.V99.11.4160.
- Damiano BP, Mitchell JA, Giardino E, Corcoran T, Haertlein BJ, de Garavilla L, et al. Antiplatelet and antithrombotic activity of RWJ-53308, a novel orally active glycoprotein IIb/IIIa antagonist. *Thromb Res*. 2001; 104(2): 113-26.
- Mitina T.M., Yakovlev D.S., Spasov A.A., Suzdalev K. Ph. Antiaggregant and antithrombotic activity of new substance P2Y₁-antagonists - SBT-119 ex and in vivo. *Vestnik of VolgGMU*. 2011; 4 (40): 19-21. (in Russian)
- Lei X, Reheman A, Hou Y, Zhou H, Wang Y, Marshall AH et al. Anfibatide, a novel GPIIb complex antagonist, inhibits platelet adhesion and thrombus formation in vitro and in vivo in murine models of thrombosis. *Thromb Haemost*. 2014; 111(2): 279-89. doi: 10.1160/TH13-06-0490.
- Lockyer S, Kambayashi J. Demonstration of Flow and Platelet Dependency in a Ferric Chloride-Induced Model of Thrombosis. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1999; 33(5): 718-25.
- Kawamura Y, Takahari Y, Tamura N, Eguchi Y, Urano T, Ishida H, Goto S. Imaging of structural changes in endothelial cells and thrombus formation at the site of FeCl₃-induced injuries in mice cremasteric arteries. *J Atheroscler Thromb*. 2009; 16(6): 807-14.
- Veselkina O. S., Solovcova I. L., Petrishchev N. N., Galebskaya L.V., Borovitev M. E., Nilov D. I. et al. Effect of NN-substituted piperazines on cytolysis. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*. 2015; 49(11): 25-31. (in Russian)

Сведения об авторах:

Васина Елена Юрьевна, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии с курсом клинической патофизиологии (Первый СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова), e-mail: elenasvasina17@gmail.com;

Чefу Светлана Григорьевна, канд. биол. наук, зав. лаб. экспериментальных исследований Центра лазерной медицины (Первый СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова), e-mail: chefusveta@yandex.ru;

Петрищев Николай Николаевич, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии с курсом клинической патофизиологии (Первый СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова), e-mail: lasmed@yandex.ru