

Влияние дипиридамола на фотореактивность тромбоцитов

Центр лазерной медицины Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова

Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург

e-mail: lasmed@ya.ru

Реферат

Проведено исследование влияния дипиридамола и светодиодного облучения на агрегационную активность тромбоцитов в цельной крови крыс. Облучение осуществляли с помощью светодиода «АФС-Соларис» (630 нм). Фотореактивность тромбоцитов, проявляющаяся в изменении их агрегационной активности, зависит от параметров облучения. Через 5 мин после облучения крови (0,2 Дж) наблюдается усиление агрегации тромбоцитов, а при облучении 1,17 Дж — выраженный ингибирующий эффект. Влияние дипиридамола на эффект светодиодного облучения зависит от концентрации препарата. Предварительная инкубация крови с дипиридамолом ($1,4 \cdot 10^{-5}$ М) предотвращала эффект облучения крови (1,17 Дж). Степень угнетения агрегации тромбоцитов при раздельном и совместном действии дипиридамола ($1,4 \cdot 10^{-5}$ М) и облучения (1,17 Дж) не отличалась. Антиагрегантный эффект усиливается при облучении (1,17 Дж) после инкубации с дипиридамолом ($1,4 \cdot 10^{-6}$ М).

Ключевые слова: дипиридамола, фотореактивность, тромбоциты.

Dementyeva I. N.

The effect of dipyridamole on photoreactivity of platelets

Center of Laser Medicine, I.P. Pavlov State Medical University

V. A. Almazov Federal Center of Heart, Blood and Endocrinology, St.-Petersburg

e-mail: lasmed@ya.ru

Abstract

The effect of dipyridamole and light-emitting diode irradiation on platelet aggregation in the rat blood was investigated. The irradiation was performed with light-emitting diode «AFS-Solaris» (630 nm). Photoreactivity of platelets manifesting as the changes in their aggregation, depended on the parameters of irradiation. Increased platelet aggregation was found 5 min after blood irradiation (0,2 J) while after irradiation at higher dose (1,17 J) the marked inhibitory effect was found. The effect of dipyridamole on the effect of light-emitting diode irradiation depended on the drug concentration. Pre-incubation of blood with dipyridamole ($1,4 \cdot 10^{-5}$ M) prevented the effect of irradiation (1,17 J). The extent of aggregation inhibition after separate and combined application of dipyridamole ($1,4 \cdot 10^{-5}$ M) and irradiation (1,17 J) did not differ. Anti-platelet effect was enhanced after irradiation (1,17 J) after incubation with dipyridamole ($1,4 \cdot 10^{-6}$ M).

Keywords: dipyridamole, photoreactivity, platelets.

Введение

Известно, что низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ) и светодиодное облучение крови *in vivo* и *in vitro* оказывают влияние на функциональное состояние тромбоцитов. При определенных условиях облучения этот эффект проявляется в уменьшении агрегационной активности тромбоцитов [1, 2, 4, 5, 7, 10].

В качестве возможных механизмов ингибирующего действия низкоинтенсивного лазерного и светодиодного облучения в красной области спектра на агрегацию тромбоцитов рассматривается активация гуанилатциклазы и NO-синтазы [3].

В клинических условиях фотомодификация крови нередко проводится на фоне применения антиагрегантных препаратов, поэтому изучение их влияния на фотореактивность тромбоцитов является актуальным.

Цель исследования

Изучение совместного действия дипиридамола, механизм антиагрегантного действия которого известен, и светодиодного (630 нм) облучения крови на агрегационную активность тромбоцитов.

Материал и методы исследования

В работе использовали дипиридамола (Boehringer Ingelheim, Испания). Дипиридамола добавляли в цельную кровь крыс в конечной концентрации $1,4 \cdot 10^{-5}$ М и $1,4 \cdot 10^{-6}$ М. Конечные концентрации дипиридамола соответствовали рекомендациям по исследованию препаратов в экспериментах *in vitro*.

Для проведения исследований использовали крыс-самцов линии Wistar массой 220–240 г (питомник «Рапполово» РАМН, Санкт-Петербург). Забор крови в объеме 5 мл у крыс осуществляли в течение 40–60 с из наружной яремной вены с помощью шприца

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

(наркоз — внутривенно 20 % уретан, 0,45 мл / 100 г). В качестве стабилизатора использовали гепарин (Московский эндокринный завод) — 50 ед./мл. Соотношение крови и стабилизатора составляло 9:1. Кровь помещали в силиконизированные пробирки и осторожно перемешивали.

Агрегационную активность тромбоцитов в цельной крови исследовали на импедансном агрегометре АИ-300 при стандартной температуре (37 °С) и постоянной скорости перемешивания (1100 об./мин) сразу после завершения облучения крови [6]. В качестве индуктора использовали раствор динатриевой соли АДФ (Мм. 427,2, Reanal, Венгрия) в физиологическом растворе в конечной концентрации в пробе $2,55 \cdot 10^{-4}$ М. Соотношение объемов индуктора агрегации и пробы крови составляло 1:12. АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов определяли через 5 и 8 минут после инкубирования крови с дипиридамолом ($1,4 \cdot 10^{-5}$ М и $1,4 \cdot 10^{-6}$ М) при комнатной температуре.

Облучение крови осуществляли с помощью светодиодов («АФС-Соларис», $\lambda=630$ нм, плотность мощности — 17 мВт/см²) в темноте в кювете, внутренний диаметр которой составлял 7 мм. Облучение производили в течение 30 с и 3 минут, суммарная доза составляла соответственно 0,2 и 1,17.

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью программного пакета «STATISTICA», версия 6.1, значимость различий измеряемых параметров оценивалась с помощью критерия Манна–Уитни. Значения p менее чем 0,05 рассматривались как значимые. Результаты представлены в виде $M \pm m$.

Результаты исследования

В первой группе опытов кровь облучали *in vitro* в течение 30 с (энергия — 0,2 Дж, плотность энергии 0,51 Дж/см²). Сразу после облучения интенсивность агрегации не изменялась, а через 5 и 10 мин увеличивалась на 27 и 24 %.

Гиперактивность тромбоцитов мы рассматриваем как появление их фотореактивности. Известно, что под влиянием НИЛИ (632,8 нм) активируются ионные каналы и увеличивается концентрация кальция в клетках [8, 9, 16]. На этом фоне реакция тромбоцитов на АДФ увеличивается.

Во второй серии опытов кровь облучали в течение 3-х минут (1,17 Дж, плотность энергии — 3,06 Дж/см²). Сразу после облучения, а также через 5 и 10 минут интенсивность агрегации тромбоцитов в тесте с АДФ была достоверно снижена (рис. 1).

Эти данные мы также рассматриваем как показатель фотореактивности тромбоцитов, но в данном случае имеет место активация антиагрегантных механизмов, в том числе увеличение синтеза цГМФ.

В 3-й группе опытов кровь в течение 5 мин инкубировали с дипиридамолом, а затем определяли агрегационную активность тромбоцитов.

Как видно из рис. 1, при концентрации дипиридамола $1,4 \cdot 10^{-6}$ М интенсивность агрегации уменьшилась на 13 %, а при концентрации $1,4 \cdot 10^{-5}$ М — на 33 %.

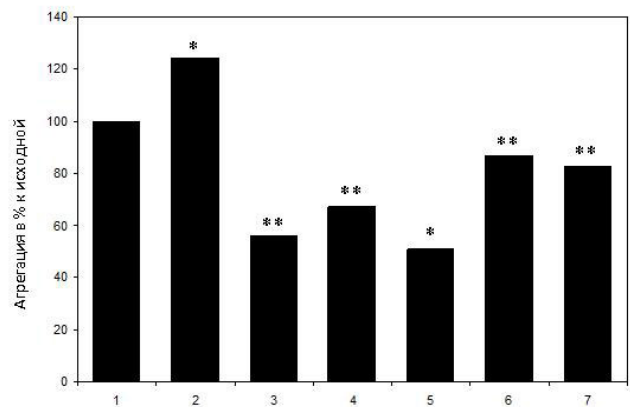


Рис. 1. Изменение интенсивности агрегации тромбоцитов в присутствии дипиридамола: 1 — контроль; 2 — 30 с облучения (0,2 Дж) + 5 мин инкубации; 3 — 3 мин облучения (1,17 Дж) + 5 мин инкубации; 4 — дипиридамолом ($1,4 \cdot 10^{-5}$ М) + 5 мин инкубации; 5 — дипиридамолом ($1,4 \cdot 10^{-5}$ М) + 8 мин инкубации; 6 — дипиридамолом ($1,4 \cdot 10^{-6}$ М) + 5 мин инкубации; 7 — дипиридамолом ($1,4 \cdot 10^{-6}$ М) + 8 мин инкубации; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ — данные статистически значимы по отношению к значениям, полученным в контроле

В использованных нами концентрациях дипиридамола угнетает активность фосфодиэстеразы в тромбоцитах, это приводит к увеличению циклических нуклеотидов [12–15]. При увеличении времени экспозиции до 8 минут ингибирующий эффект дипиридамола при концентрации $1,4 \cdot 10^{-6}$ М уменьшился на 17 %, а при концентрации $1,4 \cdot 10^{-5}$ М — на 49 %.

В 4-й группе опытов светодиодное облучение проводили после инкубации крови с дипиридамолом, т. е. на фоне увеличения цАМФ и цГМФ. При такой постановке опыта 30 с облучение (энергия — 0,2 Дж, плотность энергии — 0,51 Дж/см²) не приводило к усилению АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. Таким образом, предварительная активация антиагрегантных механизмов изменяет фотореактивность тромбоцитов. При этом интенсивность АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов была такой же, как в опытах с дипиридамолом без облучения.

В 5-й группе опытов кровь облучали в течение 3-х мин после предварительной инкубации с дипиридамолом и сразу после этого определяли агрегационную активность тромбоцитов. В качестве дополнительного контроля исследовалась АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов после 8 мин инкубации крови без облучения и после 3-минутного светодиодного облучения крови без дипиридамола.

Полученные данные приведены на рис. 2 и в таблице: степень угнетения АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов при раздельном и совместном действии дипиридамола ($1,4 \cdot 10^{-5}$ М) и облучения (1,17 Дж, плотность энергии — 3,06 Дж/см²) существенно не отличалась. Облучение крови после инкубации с дипиридамолом в концентрации $1,4 \cdot 10^{-6}$ М приводит к полному угнетению агрегации тромбоцитов, как и в опытах без дипиридамола.

Влияние различных концентраций дипиридамола и светодиодного облучения,
а также их сочетания на агрегационную активность тромбоцитов

Таблица

Дипиридапол/облучение	Значение	Р от контроля	Р от 3 мин облучения
Контроль	3,36±0,54		
Облучение 3 мин	1,98±0,40	0,007	—
Дипиридапол (10^{-5}), 8 мин	1,76±0,78	0,015	—
Дипиридапол (10^{-6}), 8 мин	2,40±0,47	0,032	—
Дипиридапол (10^{-5}), 5 мин + 3 мин облучения	1,70±0,59	0,007	0,54
Дипиридапол (10^{-6}), 5 мин + 3 мин облучения	2,06±0,26	0,007	0,84

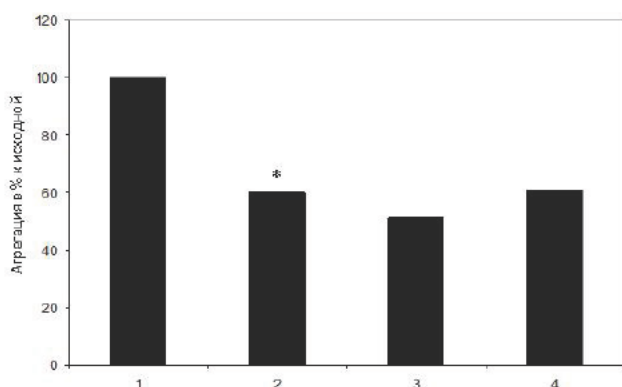


Рис. 2. Комплексное влияние светодиодного облучения и дипиридамола на агрегационную активность тромбоцитов: 1 — контроль; 2 — дипиридапол ($1,4 \cdot 10^{-5}$ М) + 5 мин инкубации + 30 с облучения (0,02 Дж) + 5 мин инкубации; 3 — дипиридапол ($1,4 \cdot 10^{-5}$ М) + 5 мин инкубации + 3 мин облучения (1,17 Дж); 4 — дипиридапол ($1,4 \cdot 10^{-6}$ М) + 5 мин инкубации + 3 мин облучения (1,17 Дж); * — $p < 0,05$ — данные статистически значимы по отношению к значениям, полученным в контроле

То есть суммации эффектов ингибирования агрегации тромбоцитов при совместном действии дипиридамола и светодиодного облучения мы не наблюдали.

Обсуждение результатов

Фотореактивность тромбоцитов проявляется в изменении активности ряда ферментов, адгезивности, агрегации и т. д. при фотостимуляции. Степень выраженности и направленность этих изменений зависит от параметров облучения [2, 11].

В наших опытах светодиодное облучение (630 нм) цельной крови в зависимости от дозы облучения приводило как к усилению реакции тромбоцитов на индуктор агрегации, так и к угнетению.

В физиологических условиях циркулирующие в крови тромбоциты постоянно подвергаются действию гемодинамических факторов и эндогенных индукторов агрегации (катехоламины, АДФ, серотонин и др.), однако количество тромбоцитов, вовлеченных в процесс внутрисосудистой агрегации, невелико. Это объясняется высокой активностью антиагрегантных механизмов. Взаимодействие АДФ с рецепторами тромбоцитов запускает ряд проагрегантных механизмов, в том числе вход Ca^{++} в клетки. Известно, что под влиянием низкоинтенсивного лазерного и светодиодного излучения в красной области спектра активируются Ca^{++} -каналы и Ca^{++} -зависимые процессы, приводящие к предстимуляции (праймингу) клеток [8, 11].

Наблюдаемое нами усиление агрегации тромбоцитов после светодиодного облучения крови (630 нм, энергия — 0,2 Дж, плотность энергии — 0,51 Дж/см²), по-видимому, связано с их предстимуляцией, проявляющейся в повышении активности проагрегантных механизмов.

Освобождение тромбоцитов от избытка кальция происходит при угнетении циклических нуклеотидов, гидролиз которых при ингибировании фосфодиэстеразы (в наших опытах дипиридамолом) уменьшается. Именно этим можно объяснить отсутствие усиления реакции тромбоцитов на АДФ после 30 с светодиодного облучения крови при ее инкубации с дипиридамолом. На фоне увеличения цГМФ не реализуется в полной мере Ca^{++} -зависимый механизм АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.

Заключение

Наиболее выраженное антиагрегантное действие на тромбоциты крыс оказывают сочетанное воздействие дипиридамола ($1,4 \cdot 10^{-5}$ М) и светодиодного облучения крови красным светом дозой (1,17 Дж). Антиагрегантный эффект усиливается при облучении крови (1,17 Дж) после инкубации с дипиридамолом ($1,4 \cdot 10^{-6}$ М).

1. Бурдули Н. М., Александрова О. М. Клинико-гемореологическая эффективность внутривенного лазерного облучения крови в комплексном лечении гипертенгической болезни // *Лазерная медицина*. 2008. № 12. С. 8–13.
2. Бриль Г. Е. и др. Влияние лазерного облучения цельной крови *in vitro* на адгезию и агрегацию тромбоцитов // *Вопросы курортол., физиотерапии и физ. культуры*. 2008. № 1. С. 15–18.
3. Бриль Г. Е., Бриль А. Г. Гуанилатциклаза и НО-синтетаза — возможные первичные акцепторы энергии низкоинтенсивного лазерного излучения // *Лазерная медицина*. 1997. Т. 1. Вып. 2. С. 39–42.
4. Дементьева И. Н. Влияние светодиодного облучения и мексикора на агрегационную активность тромбоцитов // *Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова*. 2008. Т. XV. № 4. С. 28–31.
5. Есауленко И. Э. и др. Клинико-патофизиологическое обоснование применения различных видов низкоинтенсивного лазерного излучения в клинике внутренних болезней // *Журн. теорет. и практ. мед.* 2003. № 1. С. 17–20.
6. Иванов В. И. Исследование функциональной активности тромбоцитов в цельной крови // *Гемостаз: физиологические механизмы, принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний: сб. науч. тр. / под ред. Н. Н. Петрищевой, Л. П. Папаян. СПб.: СПбГМУ; Рос. НИИ гематологии и трансфузиологии*. 1999. С. 53–58.
7. Карандашов Б. И., Петухов Е. Б., Зродников В. С. Изменение агрегационной активности тромбоцитов при облучении крови гелий-неоновым лазером и красными светодиодами // *Бюлл. эксперимент. биол. и мед.* 1998. Т. 126. № 12. С. 645–648.
8. Клебанов Г. И. и др. Гипотеза свободнорадикального механизма терапевтического действия низкоинтенсивного лазерного излучения // *Новые направления лазерной медицины: Материалы междунаrod. конф. М., 1996. С. 313–314.*
9. Колпакова М. Э. Изменение калиевых ионных токов нейронов прудовика под влиянием лазерного излучения / М. Э. Колпакова [и др.] // *Мед. академ. журн.* 2003. Т. 3. № 1. С. 36–40.
10. Москаленко Ю. Е. и др. Влияние аналогов RGD-пептидов и низкоинтенсивного светодиодного облучения на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов // *Клинико-лабораторный консилиум*. 2007. № 18. С. 37–41.
11. Петрищев Н. Н., Зубов Б. В., Дементьева И. Н. Сравнительное изучение влияния модулированного светодиодного облучения (630 нм, 450 нм) на агрегационную активность тромбоцитов // *Лазерная медицина*. 2011. Т. 15. Вып. 3. С. 49–52.
12. Garcia-Rafanell J. et al. Effect of trifusal and salicylic acid derivatives on cyclic AMP levels in rat platelets // *Arch. Int. Pharmacodyn Ther.* 1986. № 284 (1). P. 155–165.
13. De La Cruz J. P. et al. Different effects of pyrimido-pyrimidine derivatives, dipyridamole and mepidamol, on platelet and vascular cyclooxygenase activity // *Biochem. Pharmacol.* 1994. № 47 (2). P. 209–215.
14. Hamet P. et al. Rapid activation of cAMP phosphodiesterase in rat platelets // *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 1983. № 61 (11). P. 1158–1165.
15. Philp R. V. Species-dependent inhibition of platelet aggregation by adenosine and dipyridamole: paradoxical potentiation in the rat // *Thromb. Diath. Haemorrh.* 1970. № 23 (1). P. 129–139.
16. Yasuyo Maegawa et al. Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation // *Lasers in Surgery and Medicine*. 2000. № 27. P. 427–437.