

## Urokinase의 적출심장의 심근허혈에 대한 보호작용과 invitro 및 exvivo항혈전작용 실험

권광일<sup>†</sup> · 신흥섭 · 윤정옥 · 김보신 · 민지하 · 이병호\* · 허인회\*\*  
중남대학교 약학대학, \*한국화학연구소, \*\*중앙대학교 약학대학  
(1991년 12월 12일 접수)

### Protective Effect of Urokinase on Reperfusion Function in Isolated Perfused Rat Heart, and Anti-platelet Aggregation Effect Invitro and Exvivo.

Kwangil Kwon,<sup>†</sup> Hongseup Shin, Jongok Yoon, Boshin Kim,  
Jiha Min, Byungho Lee\* and Inhoe Huh\*\*

College of Pharmacy, Chung Nam National University, Daejeon 302-376, Korea

\*Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 302-343, Korea

\*\*College of Pharmacy, Jung Ang University, Seoul 156-756, Korea

(Received Dec. 12, 1991)

Protective effect of urokinase on reperfusion were studied followed by global ischemia in the isolated perfused rat heart. Separately, anti-platelet aggregation effect of urokinase also investigated. Urokinase exhibited positive effect for the protection of rat heart function by increasing the LV dp/dt, coronary flow(CF) and the rate pressure product(RPP), and by decreasing the LVEDP on reperfusion. Urokinase also decreased arrhythmia by 74.7%( $P<0.05$ ) induced by global ischemia in the rat heart. In the platelet aggregation study, urokinase did not show the inhibitory effect of ADP or collagen induced platelet aggregation invitro and exvivo.

## 서 론

심근에 허혈(ischemia)을 유발하면 여러가지 catecholamine과 특정한 eicosanoids, glycerophospholipids 및 기타 세포독성 물질을 분비하여 정상적인 조직기능을 잃게 한다.<sup>1,2)</sup> Alkyl-ether glycerolipid인 PAF(platelet activating factor)도 조직허혈 및 저산소증시에 분비되어 조직손상에 관련하는 것으로 알려져 있으며<sup>3,4)</sup> 또한 eicosanoids인 thromboxane A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)과 leukotrienes의 심근에 대한 유해작용도 허혈시에 심근에서 분비되는 prostacy-

clin(PGI<sub>2</sub>)의 유익한 작용에 상반되는 작용을 하는 것으로 잘 알려져 있다.<sup>5,7)</sup>

혈소판응집은 지혈작용과 혈전증(thrombosis) 유발에 직접적으로 기여하며 이를 induce하는 주요물질로는 platelet에서 분비되는 ADP(Adenosine diphosphate)와 epinephrine, 손상된 조직에서 분비되는 collagen이 있으며 aspirin이 차단할 수 있는 arachidonic acid가 있고 이외에도 PAF, thrombin 등이 있으며 각기 다른 질병의 진단 및 antagonist약물의 검색에 사용된다.<sup>8-10)</sup> 이중에서 여러가지 platelet aggregation pathway중 최종적이며 공

<sup>†</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

통적으로 platelet에서 분비되는 ADP가 일차적인 약물효과 검색에 많이 사용된다.<sup>11, 12)</sup>

본 실험에서 plasmin을 activation시켜 fibrinolysis를 유도하는 urokinase의 rat heart허혈유발후에 reperfusion 시킬 때의 심장기능 보호작용을 실험하였고 또한 ADP에 의해 유도된 platelet aggregation에 대한 억제작용을 invitro 및 exvivo로 실험하였다.

## 실험 방법

### 1. 적출심장에 대한 ischemia-reperfusion 실험

체중 200~250g의 male SD rat을 사용하여 실험하였다. Rat을 blow head법으로 기절 시킨후 carotid artery를 절개하여 유혈 시킨후 심장을 적출하여 약 20°C의 생리액에서 tip을 aorat에 삽입 한후 perfusion apparatus에 장착하고 70mmHg의 perfusion pressure하에서 37°C의 생리액에서 관류하였다.<sup>13)</sup> 생리액은 Krebs-Henseleit buffer를 사용하였으며 조성은 (mM) NaCl 118, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, EDTA 0.5, NaHCO<sub>3</sub> 25.0, Glucose 5.5 및 Na-Pyruvate 2.0이었다. Buffer는 pH 7.4를 유지하도록 95% O<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub>의 혼합 gas를 관류시켰다.

좌심실압(LVP)는 Isotec transducer(Hugo Sachs Electronic, Germany)를 이용하여 Graphtec Linearcorder WR 3310 Physiograph(HSE, Germany)로 측정하였다. LVP는 saline을 채운 latex풍선을 좌심방을 통해 좌심실에 삽입한후 측정하였으며 LVEDP(Left Ventricular End Diastolic Pressure)는 6~8mmHg로 인정화 시켰다. LVP의 시간에 대한 미분치인 LV dp/dt는 측정된 LVP를 전기적으로 미분하여 기록하였으며 심박동수(Heart Rate)도 LVP로부터 측정하였다. 관상동맥 관류량(Coronary Flow)은 관상동맥을 관류하여 유실되는 생리액의 양을 측정하여 기록하였다. LVP와 LVEDP의 차이를 LVDP(Left Ventricular Developed Pressure)로 나타 내었고 LVDP에 Heart Rate(HR)을 곱하여 Rate-Pressure Product(RPP)로 나타내었다. Ischemia의 면적은 trapezoidal rule로 산출하였다. Global ischemia는 적출관류심장이 안정한 상태에 도달한 후 30분간 perfusion pressure를

OmmHg로하여 생리액 공급을 차단하여 유발시켰으며 30분후에는 정상적인 perfusion을 시도하면서 ischemia유발전과 동일한 parameter를 측정하였고 추가로 arrhythmia가 나타나는 시간을 관찰하였다.

Reperfusion시의 urokinase의 효과를 측정하기 위하여 Krebs Henseleit생리액에 urokinase를 혼합하여 최종농도가 10IU/ml가 되도록하여 일반 Krebs Henseleit buffer대신에 사용하여 실험하였다. 또한 ischemia를 회복시키는 데 대한 약물효과 외에 정상적인 생리액 관류시에 urokinase의 LVP, LV dp/dt, HR 및 Coronary Flow에 대한 효과를 관찰하기 위하여 urokinase 10~1000IU를 0.2ml용량으로 주입하여 측정하였다.

### 2. Invitro Platelet Aggregation 억제 실험

건강한 지원자의 상박 정맥으로부터 혈액을 약 60ml정도 실험당일에 채취하여 실험하였다. 지원자는 실험 전날부터 일체의 약물과 caffeine 함유 음료, alcohol복용을 금하였고 마늘이 함유되어있는 음식도 피하도록 하였다. 실험 당일 아침은 먹지 않고 오전 9시경에 혈액을 채취하여 3.8% Na-citrate가 들어있는 test tube에 혈액을 1 : 9의 비율로 넣고 약하게 아래위로 흔들어서 혈액응고를 방지하였다. 이 혈액을 약 100g에서 15분간 원심분리하여 상층액으로부터 PRP를 얻은후 잔액을 다시 약 180g에서 10분간 원심분리하여 상층액으로부터 PPP를 얻었다. PRP의 optical density는 일정하게 약 0.5가 되도록 PPP로 희석하였다. PRP를 담기위한 test tube와 pipette은 plastic재질을 사용하였으며 PRP는 실험기간동안 마개를하여 공기 노출에 의한 pH변화를 막고자하였다.

항혈소판 응집효과는 automated platelet aggregation analyzer(aggrecorder 2; Kagaku Co. Ltd., Kyoto, Japan)를 사용하여 Born에 의한 turbidimetric method로 측정하였다. PRP 200 $\mu$ l를 7.25 $\times$ 50 mm silicon-treated glass tube에 취하고 micro-magnetic bar를 넣은후 37°C에서 1~2분간 방치하였다. 이에 약물이나 vehicle(saline) 25 $\mu$ l를 가하여 다시 37°C에서 100rpm정도로 stirring하면서 3~5분간 incubation하였고 이어서 ADP 또는 collagen solution 25  $\mu$ l를 가하여 aggregation을 유발시켰다. 이때 약물에 의해 aggregation이 억제되는 정도를 다

음과 같이 계산하였다.

$$\text{Inhibition \%} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A=control(vehicle)의 maximum aggregation %  
B=약물처리시의 maximum aggregation

약물은 urokinase 1000IU/ml를 stock solution으로 하여 최종농도 100IU/ml, 10IU/ml가 되도록 saline 용액으로 희석하여 사용하였고 snake extract는 250 00unit/ml를 stock solution으로 하여 최종농도가 500 unit/ml 및 50unit/ml가 되도록 saline-용액으로 희석하여 사용하였다. Acetyl Salicylic Acid(ASA)는 용매효과가 나타나지않는 1% methanol-용액으로 10 mg/ml가 되도록 용해시킨 후 최종농도 100 µg/ml 및 10µg/ml가 되도록 saline으로 희석하여 사용하였고 positive control로서 KR-30075는 용매효과가 나타나지않는 1%이하의 PEG 현탁액을 사용하여 각각 10<sup>6</sup>M, 3×10<sup>6</sup>M 및 10<sup>8</sup>M이 되도록 saline으로 희석하여 사용하였다. inducer로서 ADP는 5µM, collagen은 3-5µg/ml를 최종농도로 사용하였다.

### 3. Ex-vivo platelet aggregometry 억제 실험

200±20g SD male rat에 urokinase 2000 IU/kg 및 snake extract 50000unit/kg를 정맥투여한 10분후 ether 마취시키고 개복하여 heart puncture하여 blood를 취하였다. Rat 한마리당 5.4ml 일정량씩 채혈하였으며 이를 0.6ml의 3.8% sodium citrate soln이 담긴 polyethylene test tube에 바로 옮겨 뚜껑을 막고 위아래로 가볍게 흔들어 섞었다. 이렇게 얻은 blood를 110g에서 10분간 원심분리하여 상등액으로부터 PRP를 얻었으며 얻어진 PRP는 test tube에 넣고 뚜껑을 막아 pH변화를 최소화 하였다. PRP를 제외한 잔류물은 다시 1000이상에서 15분간 원심분리하여 상등액으로부터 platelet poor plasma(PPP)를 얻었다. PRP는 Coulter Counter를 이용하여 혈소판수를 측정한 후 5×10<sup>6</sup> cells/µl이 되도록 PPP로 희석하였다.

항 혈소판 응집효과는 aggregometer(Bio Data)를 사용하여 Born에 의한 turbidimetric method로 측정하였다. PRP 180 µl를 silicone coating된 7.25×55 mm cuvette에 취하고 micro-magnetic bar를 넣은후

콜크 마개로 막고 37℃에서 1~2분간 방치하였다. 이에 다시 37℃에서 stirring하면서 1분간 incubation 하였고 이어서 5µM ADP-용액 20µl를 가하여 platelet aggregation을 유발시켰다. 이때 약물에 의해 aggregation이 억제되는 정도(%)는 *in vitro* 실험에서와 같이 계산하였다. 혈소판응집 inducer로 사용한 ADP의 최적 농도를 찾아내기 위하여 여러농도에서의 혈소판 응집 정도를 관찰하였으며 ADP농도를 측정 PRP의 최종농도 5µM로 정하여 실제 50µM농도의 ADP 20µl를 PRP 180µl에 가하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 적출심장에 대한 ischemia-reperfusion 실험

Rat의 적출심장을 이용한 reperfusion실험결과 urokinase투여군에서 Left Ventricular Pressure(LVP)와 Left Ventricular Developed Pressure(LVDP)가 감소하는 양상을 보였다. (Fig. 1, 2), LV dp/dt는 증가하여 positive inotropic effect가 있는 것으로 나타났다(Fig. 3). 실제 심장기능을 나타내는 Rate Pressure Product(RPP)도 urokinase군의 경우 증가했다(Fig. 8). 이러한 심장기능의 증가가 혈전증에 의한 협심증이나 심부전시 등에 유익한가 혹은 오히려 해로운가 하는 판정에는 논란의 여지가 있을 수 있으나 심장보호에 대한 유익한 parameter로서 Coronary Flow(CF)의 경우도 urokinase투여군의 경우 증가하는 양상을 보였다. (Fig. 4). 또한 심장의 이완상태 즉 preload를 나타내는 Left Ventricular End Diastolic Pressure(LVEDP)와 심장의 후식율을 나타내는 (-dp/dt)/(+dp/dt)도 urokinase투여군은 LVEDP를 감소시키고 (-dp/dt)/(+dp/dt)는 증가시켜서 긍정적인 효과를 보였다(Fig. 6, 7). Heart Rate(HR)는 urokinase투여군의 경우 증가하는 경향을 나타냈다.(Fig. 5). Reperfusion시 심장의 상태를 나타내는 주요 parameter인 부정맥(Arrhythmia)의 면적은 urokinase군에서 74.7%(P<0.05)가 감소해서 부정맥 유발억제에 유의한 효과가 있음을 나타냈다. 부정맥 유발기간도 control군의 114±90초보다 urokinase군이 42.1% 감소한 66±12초를 나타냈다(Fig. 9).

Normal physiological solution으로 perfusion하면서 실험약물을 적출심장에 투여한후 LVP, LV dp/dt,

Heart Rate 및 Coronary Flow를 측정 한 실험에서는 urokinase 10, 100 및 1000IU를 각각 0.2ml 용량으로 투여시 적출심장에 유의한 영향을 주는것을 관찰 할수 없었다. 이것은 urokinase가 위의 reperfusion 실험에서의 효과에도 불구하고 적출심장 기능에 대해 직접적인 약리작용이나 급성독성작용은 하지 않는 것으로 보여진다.

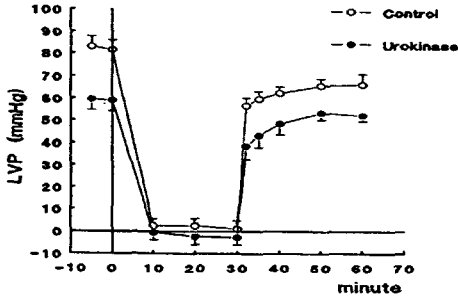


Fig. 1. LVP during preischemic(-5-0 min), ischemic(0-30 min) and reperfusion(30-60 min) in rat hearts perfused with physiological solution only and with urokinase(10 IU/ml). Each point represents the mean value  $\pm$  SEM(n=6-8).

\* : Urokinase reduced LVP significantly(P<0.05) in all points except ischemic phase.

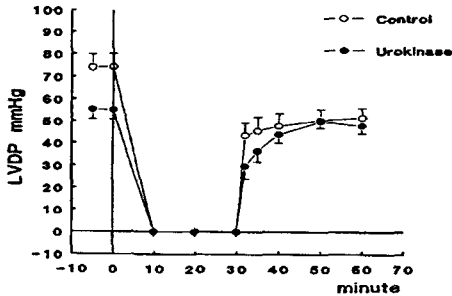


Fig. 2. LVDP during preischemic(-5-0 min), ischemic(0-30 min) and reperfusion(30-60 min) in rat hearts perfused with physiological solution only, and with urokinase(10 IU/ml). Each point represents the mean value  $\pm$  SEM(n=6-8)

\* : Significantly different from control at P<0.05,  
 \*\* : P<0.01.

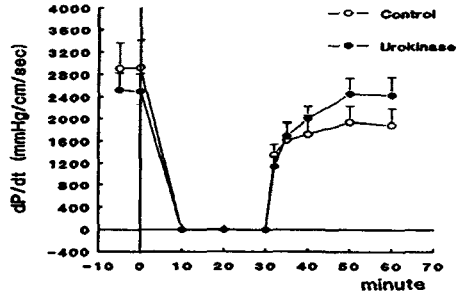


Fig. 3. LV dp/dt during preischemic(-5-0 min), ischemic(0-30 min) and reperfusion(30-60 min) in rat hearts perfused with physiological solution only, and with urokinase(10 IU/ml). Each point represents the mean value  $\pm$  SEM(n=6-8).

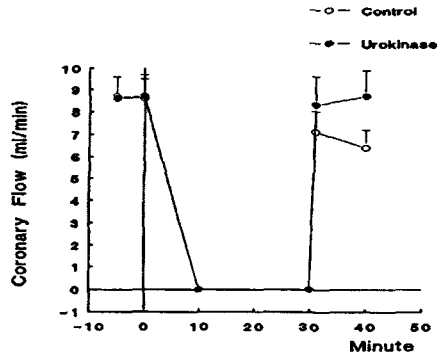


Fig. 4. Coronary flow during preischemic(-5-0 min), ischemic(0-30 min) and reperfusion(30-40 min) in rat hearts perfused with physiological solution only, and with urokinase(10 IU/ml). Each point represents the mean value  $\pm$  SEM(n=6-8)

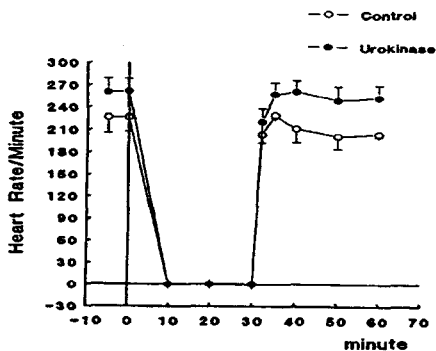


Fig. 5. Heart rate during preischemic (-5-0 min), ischemic (0-30 min) and reperfusion (30-60 min) in rat hearts perfused with physiological solution only, and with urokinase(10 IU/ml). Each point represents the mean value $\pm$  SEM(n=6-8).

\* : Significantly different from control at P<0.05

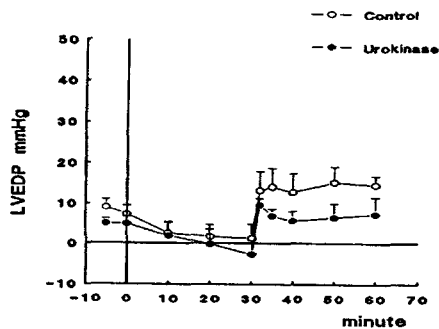


Fig. 6. LVEDP during preischemic (-5-0 min), ischemic (0-30 min) and reperfusion (30-60 min) in rat hearts perfused with physiological solution only, and with urokinase(10 IU/ml). Each point represents the mean value $\pm$  SEM(n=6-8).

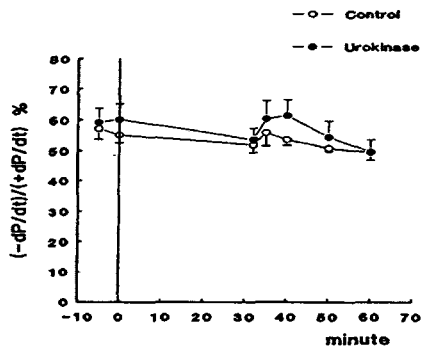


Fig. 7.  $(-dp/dt)/(+dp/dt)$  during preischemic (-5-0 min), ischemic (0-30 min) and reperfusion (30-60 min) in rat hearts perfused with physiological solution only, and with urokinase(10 IU/ml). Each point represents the mean value $\pm$  SEM(n=6-8).

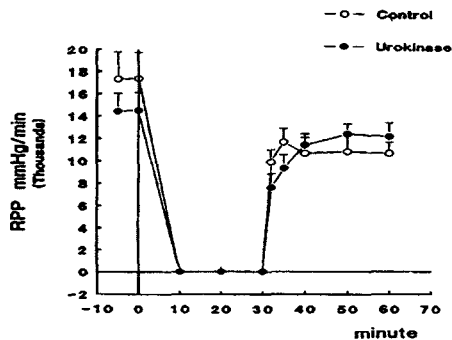


Fig. 8. Rate Pressure Product (RPP) during preischemic (-5-0 min), ischemic(0-30 min) and reperfusion (30-60 min) in rat hearts perfused with physiological solution only, and with urokinase(10 IU/ml). Each point represents the mean value $\pm$  SEM(n=6-8).

현저한 혈소판 응집 억제효과를 보였으며(Table 2) 이것은 PDE억제에 의한 c-AMP농도 증가에 기인하는 것으로 간주된다.<sup>14)</sup>

응집 시작부터 최대로 응집되는 점까지의 기울기를 보면 urokinase는 ADP 및 collagen-응집군 모두에게 변화가 없었다. ASA는 10 $\mu$ g/ml 농도에서는 변화가 없었다. KR-30075는 농도별로 기울기 감소가 현저하게 나타났다.(Table 3).

Urokinase는 plasma에 있는 plasminogen의 plasmin으로의 변화를 촉진하는 plasmin activator로서 작용한다. 이 plasmin이 fibrin을 용해시켜서 혈전을 용해하므로 thrombolytic drug으로서 널리 사용되고 있는데 본 예측한대로 관찰할 수 없었다. Collagen의 platelet aggregation작용도 결국 platelet에서의 ADP 분비를 촉진시키는 것이나 그외에도 손상된 조직에서의 platelet 점착력을 증가시킬 뿐 아니라 fibrinogen의 receptor를 노출시켜서 혈액응고를 촉진시키기도 하므로 plasmin activator인 urokinase 혹은 이와 유사한 snake extract의 경우 항혈액응고작용을 통한 혈소판 응집 억제작용이 일부 나타날 것으로 기대하였으나 실제 유의한 효과가 없었다. 이것은 혈소판 응집(platelet aggregation)의 경우 혈액응고(blood coagulation)로 진행하나 fibrin에 의한 혈액 응고 작용만 차단한 경우 그 전단계인 platelet aggregation은 억제하지 못하는 것에 기인하는 것으로 간주된다.

### 3. Ex-vivo platelet aggregationometry 억제실험

Control군에 비해 Urokinase 2000 IU/kg 투여군은 약간의 혈소판 응집농 변화를 나타 내었지만 유의성있는 차이는 없었다(Figure 10). 즉 ADP 5 $\mu$ M에 의한 평균 혈소판 응집율은 control군(saline 투여군)이 39.3 $\pm$ 3.3%(mean $\pm$ SEM)이었으며 urokinase군이 37.3 $\pm$ 2.3%로 유의한 변화를 관찰할 수 없었다. 따라서 urokinase의 thrombolytic effect는 invitro실험에서 언급한것 처럼 platelet aggregation억제에 관하여 하지 않고 plasminogen의 plasmin으로의 전환을 activation시키는 것으로 추측된다.

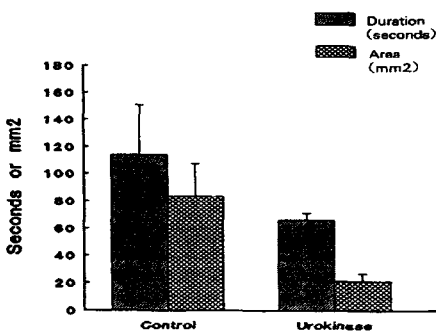


Fig. 9. The duration and the area of arrhythmia developed following global ischemia for 30 minutes in rat hearts perfused with physiological solution only, and with urokinase(10 IU/ml). Each bar represents the mean value $\pm$ SEM(n=6-8). Urokinase reduced the area of arrhythmia 74.7%.

\* : Significantly different from control at P<0.05

### 2. Invitro Platelet Aggregation 억제 실험

인체 혈액을 이용한 invitro platelet aggregation 실험에서 urokinase는 ADP에 의한 혈소판 응집 효과를 10 IU/ml 6.1 $\pm$ 3.0%, 100IU/ml 농도에서 -4.5 $\pm$ 12.6%억제하여 사실상 혈소판응집 억제효과가 없었으며(Table 1) collagen에 의해 유도된 혈소판응집에 대해서도 urokinase 10 IU/ml 농도에서 -14.6 $\pm$ 3.8%, 또 100 IU/ml 농도에서 -13.3 $\pm$ 6.3%를 억제하여 혈소판 응집 억제효과가 거의 없었던 것으로 나타났다(Table 2).

ASA는 cyclooxygenase억제제로서, arachidonic acid에 의해 유도되는 혈소판 응집에 대해 억제작용을 나타내어 항혈전 약물로 널리 사용되기 시작한 약물이나 ADP에 의한 혈소판 응집에 대해서는 예측한 대로 효과를 거의 보이지 않았다(Table 1). Positive control로서 phosphodiesterase(PDE)억제제인 KR-30075를 사용하였으며 이것은 collagen에 의한 응집에 대해 3 $\times$ 10<sup>-6</sup>M에서 29.9%, 10<sup>-5</sup>M에서 76.3%의

**Table 1.** Inhibition(%) of human platelet aggregation, induced by ADP(5 $\mu$ M).

Drug	Conc.	1	2	3	4	5	6	Mean $\pm$ SD
urokinase	10 IU/ml	-8.8	6.3	16.3	-10.8	18.1	15.7	6.1 $\pm$ 3.0
	100 IU/ml	-6.6	-13.1	-11.5	-18.2	11.7	10.4	4.5 $\pm$ 12.6
ASA	10 $\mu$ g/ml	-12.5	-2.5	7.5	-4.4	11.1	13.3	2.1 $\pm$ 0.1
	100 $\mu$ g/ml	12.2	12.2	3.0	1.6	-1.6	1.6	4.8 $\pm$ 5.9

SD : Standard Deviation

**Table 2.** Inhibition(%) of human platelet aggregation, induced by collagen(3-5 $\mu$ g/ml).

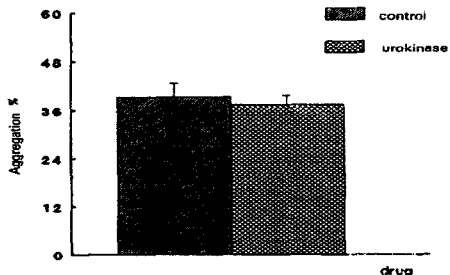
Drug	Conc.	1	2	3	4	5	6	Mean $\pm$ SD
urokinase	10 IU/ml	-1.8	0	-4.6	-27.8	-27.7	-23.4	-14.6 $\pm$ 3.8
	100 IU/ml	9.5	3.8	10.5	-85.2	-11.1	-7.4	-13.3 $\pm$ 6.3
KR-30075	10 <sup>-6</sup> M	3.9	13.9	1.9				6.6 $\pm$ 6.4
	3 $\times$ 10 <sup>-6</sup> M	63.5	20.4	5.8				29.9 $\pm$ 10.0
	10 <sup>-5</sup> M	85.6	76.9	66.4				76.3 $\pm$ 9.6

SD : Standard Deviation

**Table 3.** Slope of platelet aggregation, induced by ADP and collagen(Mean  $\pm$  SD, n=6).

	saline	urokinase IU/ml		ASA $\mu$ g/ml		KR-30075 $\times 10^6$ M		
		10	100	10	100	1	3	10
ADP (5 $\mu$ M)	54.9 $\pm$ 8.6	68 $\pm$ 3.1	69 $\pm$ 4.1	39.3 $\pm$ 3.0	55.7 $\pm$ 2.3	-	-	-
collagen (5 $\mu$ g/ml)	40.8 $\pm$ 2.6	41.3 $\pm$ 0.8	35.7 $\pm$ 6.6	-	-	56 $\pm$ 4.0	38 $\pm$ 9.6	10.3 $\pm$ 3.0

SD : Standard Deviation



**Fig. 10.** Maximal effect of platelet aggregation induced by 5  $\mu$ M ADP followed by I.V. administration of vehicle and urokinase 2000 IU/kg in the rat. Values presented are mean  $\pm$  SEM.

결 론

1. Isolated perfused heart에 대한 ischemia 유발후 urokinase의 심장보호작용에 대한 실험 결과
  - 1) Urokinase투여의 경우 reperfusion시에 LV dp/dt 및 Coronary Flow를 증가시키고 또 (-dp/dt)/(+dp/dt)와 RPP도 증가시켰으며 LVEDP는 감소시키는 등의 심장기능 및 심장보호에 대해 유의한 작용을 나타냈다.
  - 2) 심장보호작용의 유의한 지표로 볼 수 있는 reperfusion시의 부정맥(arrhythmia) 유발면적 억제작용은 74.7%(P<0.05)로서 유의한 효과를 보였다.
  - 3) 적출심장에 정상생리액을 perfusion하면서 urokinase를 각각 최고 1000IU 및 5000 unit까지 투여시 심장기능에 유의한 약리작용이나 독성을 관찰할 수 없었다.
2. Invitro platelet aggregation 실험에서 urokinase는 ADP 혹은 collagen에 의해 유도된 platelet aggregation을 억제하지 않았다.
3. Exvivo에서의 실험에서도 urokinase는 ADP에 의해 유도된 platelet aggregation을 억제하지 않았다.

감사의 말씀

본 연구는 충남대학교 의약품개발연구소의 연구비 지원에 의하여 일부 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Bertì, F., Magni, F., Rossoni, G., Angelis, L. and Galli G. : Production and biologic interactions of prostacyclin and PAF in acute myocardial ischemia in the perfused rabbit heart. *J. Cardiovascular Pharmacol.*, 16 : 727-732(1990).
- 2) McCord, J. M. : Free radicals and myocardial ischemia : overview and outlook. *Free Radical Biol. Med.*, 4 : 9-14(1988).

- 3) Manning, S. S. and Hearse, D. J. : Re-perfusion induced arrhythmias : mechanisms and prevention. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 16 : 497-518(1984).
- 4) Droy-Lefelix, M. T., Drouet, Y., Geraud, G. and Braquet, P. : Involvement of PAF in rat ischemia reperfusion gastric damage. In : Braquet P, ed. *Ginkgolides : chemistry, biology, pharmacology and clinical perspectives*, vol. 1. Barcelona : *J. R. Prous Science*, 563-74(1988).
- 5) Spinnewyn, B., Blavet, N., Clostre, F. and Braquet, P. : Prospective effects of ginkgolides in cerebral post-ischemic phase in mongolian gerbil. In : Braquet p, ed. *Ginkgolides : chemistry, biology, pharmacology and clinical perspectives*, vol. 1. Barcelona : *J. R. Prous Science*, 665-79 (1988).
- 6) Allan, G. and Levi, R. : Prostaglandins and thromboxane A<sub>2</sub> mediate coronary spasm during allergic reaction in the heart. *Fed Proc.*, 39 : 1104(1980).
- 7) Piper, P. J. : Biological actions of leukotrienes. In. Chakrin LW, Bailey DM. eds. *The leukotrienes, chemistry and biology*. New York : Academic Press, 215-30(1984).
- 8) Emms, H. and Lewis, G.P. : The roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub> and adenosine diphosphate in collagen induced aggregation in man and the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 87 : 109-115(1986).
- 9) Hidaka, H., Hayashi, H., Kohri, H., Kimura, Y., Hosokawa, T., Igawa, T. and Saitoh, Y. : Selective inhibitor of platelet c-AMP phosphodiesterase, Cilostamide, inhibits platelet aggregation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 211(1) : 26-30(1979).
- 10) Doebber, T. W. and Wu, M.S. : Platelet activating factor induced cellular and pathophysiological responses in the cardiovascular system. *Drug Develop Res.*, 12 : 151-161(1988).
- 11) Colman, R. W. and Walsh, P. N. : Mechanisms of platelet aggregation. In. *Platelet production and destruction*. Chapter 32 : 594-605(1987).
- 12) Kimura, Y., Tani, T., Kanbe, T. and Watanabe,



- K. : Effect of Cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneim-Forsch. Drug Res.*, 35(7a) : 1144-1149(1985).
- 13) Neubauer, S., Ertl, G., Haas, U., Pulzer, F. and Kochsiek, K. : Effects of endothelin 1 in isolated perfused rat heart. *J. Cardiovascular Pharmacol.*, 16 : 1-8(1990).
- 14) Lee, S. K., Kwon, K. I. and Zee, O.P. : Selective inhibitory effect of new phosphodiesterase inhibitors on PDE isozymes in guinea pig cardiac muscle. *Arch. Pharm. Res.*, 12(4) : 276-281(1989).
- 15) Colman, R. W. and Walsh, P. N. : Mechanisms of platelet aggregation, Chapter 32 : 594-605.