

## Triflusal과 Ibudilast 동시처리에 의한 혈소판응집 및 혈액응고 억제효과

황인영 · 손윤아 · 황선아 · 구연경\* · 김선영\* · 윤혜숙\* · 권순경 · 정춘식<sup>#</sup>

덕성여자대학교 약학대학, \*서울대학교 천연물과학연구소

(Received May 30, 2012; Revised June 22, 2012; Accepted June 30, 2012)

### Inhibitory Effects on Platelet Aggregation and Blood Coagulation by Concurrent Administration of Triflusal and Ibudilast

In Young Hwang, Yoon Ah Sohn, Seon A Hwang, Yean Kyoung Koo\*, Sun Young Kim\*, Hye Sook Yun-Choi\*, Soon Kyoung Kwon and Choon Sik Jeong<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

\*Natural Products Research Institute, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**Abstract** — This study aims to develop a novel regimen for enhanced efficacy and reduced side effect in inhibiting platelet aggregation and blood coagulation by concurrent administration of triflusal and ibudilast as anticoagulants. The result shows this combination of triflusal and ibudilast (300~500  $\mu$ M, respectively) has additive effect in inhibiting platelet aggregation and blood coagulation over the administration of triflusal or ibudilast as a single treatment. This pharmaceutical composition is expected to be useful for the prevention or treatment of various diseases and symptoms, for example, ischemic heart disease, ischemic cerebral infarction, arteriosclerosis, and thrombosis caused by the insertion of a stent.

**Keywords** □ triflusal, ibudilast, platelet aggregation, blood coagulation

혈소판응집 또는 혈액응고 시스템의 비정상적인 활성화는 혈관 내 혈전생성의 원인이 되며, 동맥, 정맥 또는 미세혈관 등 폐쇄혈관 내에 생성되는 혈전은 혈관 내 혈액의 원활한 흐름을 방해한다. 혈소판 부착 및 응집은 혈관 내 혈전증의 주요한 요인이며, 혈전은 동맥혈관을 막을 만큼 충분한 크기로 성장할 수 있다.<sup>1)</sup> 혈전은 또한 정맥 내의 정체 또는 저혈류 속도 지역에서 형성될 수 있다. 정맥혈전은 그 자체의 위치에서 쉽게 분리되어 순환계를 통해 이동할 수 있고 폐동맥 같은 다른 혈관의 폐색을 초래할 수 있다. 따라서, 동맥혈전은 국소폐색에 의한 심각한 질환을 야기하며, 정맥혈전은 주로 원거리 폐색, 또는 색전을 야기한다.<sup>2)</sup> 따라서, 혈소판 응집억제 또는 혈전용해 작용을 하는 의약품은 혈전, 색전과 관련이 있는 질병들 즉, 심근경색, 협심증, 혈전성 정맥염, 동맥색전증, 관상 및 뇌동맥혈전증, 말초혈관 또는 심부정맥 혈전증, 임의 혈관의 동맥 혈전증, 정맥혈전증, 허혈성 뇌경색, 동맥경화, 고혈압, 폐고혈압, 뇌경색, 뇌졸중, 만성동맥폐색증, 폐

경색, 뇌색전증, 신장색전증, 혈전색전증 및 지주막하 출혈 후의 병적 증상, 경피적 관상동맥 성형술(PTCA) 및 스텐트(stent) 삽입 시의 혈전 생성, 스텐트 설치 후의 재협착, 카테터 혈전성 폐색 또는 재폐색, 급성 관상동맥증후군, TIA(일과성 뇌허혈 발작 또는 급성 뇌혈관 증후군), 심부전증, 허혈성 병인에 의한 가슴 통증, X 증후군, 진성당뇨병의 예방 및 치료에 사용될 수 있다.<sup>3)</sup> Aspirin 및 dipyridamole과 같은 일부 제제는 예방적 항혈전제로 사용되었다. 현재 국내외에서 혈전생성 예방의 목적으로 임상적으로 널리 사용되고 있는 aspirin은 소량을 지속적으로 복용할 경우 혈소판의 응집을 억제하여 혈전생성을 예방하는 것으로 알려져 있다. 그러나 aspirin은 복용량, 복용기간에 따라 위염의 발생, 출혈 등의 부작용의 위험이 있다. 또한, aspirin을 복용하여도 혈소판응집을 적절하게 억제하지 못하는 아스피린 저항성(aspirin resistance) 증상을 보이는 환자의 비율이 상당히 보고되었다.<sup>4,5)</sup> Aspirin 다음으로 많이 사용되고 있고 ADP에 의해 유도되는 혈소판 응집물질(칼슘, 세로토닌, 피브리노겐 등)을 억제해 혈소판 응집 및 혈전형성을 감소시키는 작용을 하는 혈소판 응집억제제인 clopidogrel은 실제적인 부작용을 가질 뿐 아니라 저항성의 문제점이 있는 것으로 나타났고,<sup>6)</sup> thienopyridine의 경

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-901-8382 (팩스) 02-901-8386  
(E-mail) choonsik@duksung.ac.kr

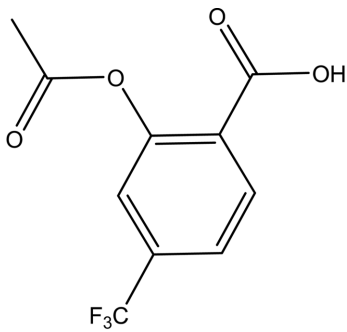


Fig. 1 – Chemical structure of triflusal.

우 강력하게 생명을 위협하는 혈전성 혈소판감소성 자반증의 발병률을 증가시키는 것으로 나타났다.<sup>7)</sup> ReoPro(7E3) 약물은 임상효능은 인상적이나 과도한 출혈, 때때로 수혈을 필요로 할 만큼의 증가된 위험과 관련이 있다는 것이 밝혀졌다.<sup>8)</sup> 따라서, 기존의 제품이 갖는 문제점 및 부작용이 적고 효능이 우수한 제품의 개발이 필요하다. 한편, triflusal은 Fig. 1의 구조를 갖는 화합물로, 혈전증에 의한 합병증을 포함한 혈전, 색전 질환 예방 및 치료제, 혈소판 응집억제, 외과수술 후 심부정맥 혈전증 및 동맥 경화성 기능장애에 사용되는 혈소판응집억제 약물이다. Triflusal은 화학구조가 aspirin과 매우 유사한 혈소판응집 억제작용물질이나 aspirin보다 위장출혈 위험성이 월등히 낮다. 또한 triflusal은 aspirin과 유사하게 혈소판의 시클로옥시게나제(cyclooxygenase, COX)를 억제하여 트롬복산 A2(Thromboxane A2) 생성을 억제할 뿐 아니라 cAMP, 포스포디에스터라제(phosphodiesterase, PDE)를 억제한다고 알려져 있다.<sup>9-11)</sup> Ibudilast는 Fig. 2의 구조를 가지며, PDE 저해제로서 뇌경색 후유증에 따른 뇌순환장애로 인한 어지럼증의 개선에 사용되는 약물이다. Ibudilast는 cAMP PDE를 억제하여 cAMP 농도를 증가시킬 뿐 아니라 혈관내피 세포에서 NO나 PGI<sub>2</sub>의 생성을 증가시켜 혈소판응집을 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>12)</sup>

즉 triflusal과 ibudilast를 단독 처리 시 혈소판 응집 억제 작용과 혈액 항응고 작용에 미치는 영향을 각각 확인하고 이들을 복

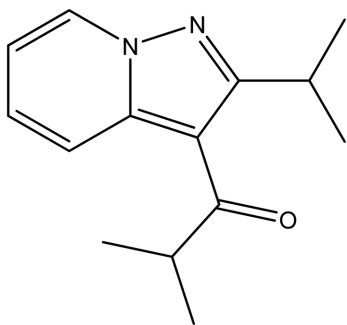


Fig. 2 – Chemical structure of ibudilast.

합제제로 할 경우 혈소판 응집 억제 작용과 혈액항응고 작용에 미치는 영향을 확인하여 양의 감소 및 증가에 따른 효과를 비교하여 기존의 제품이 갖고 있는 부작용은 줄이고 효능이 우수한 복합제제를 개발하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험동물과 혈장

동물은 180~250 g의 Sprague-Dawley 웅성 흰쥐를 사용하였고, 혈장은 서울대학교병원 혈액은행에서 사람의 신선 동결혈장을 공급받아 사용하였다.

### 시험물질의 조제

활성을 검색하고자 하는 시료를 0.5% EtOH(최종농도)에 녹여 사용하였다. 검색약물들은 용해가 가능한 최고농도로서 triflusal은 최종농도 1400  $\mu$ M, ibudilast는 최종농도 1000  $\mu$ M까지 실험하였다. Triflusal과 ibudilast는 주식회사 우남약품으로부터 제공받아 사용하였다.

### 시험에 사용된 기기

Centrifuge(Hamil, Incheon, Korea), Excell<sup>TM</sup>18 Hematology Analyzer(Drew Scientific Inc., Dallas, TX, U.S.A.) 및 Platelet aggregometer(490X, Chrono-Log Corp., Havertown, PA, U.S.A.) 등을 사용하였다.

### 혈소판응집 억제작용 검색

**Platelet rich plasma(PRP) 및 platelet poor plasma(PPP)의 조제** - 흰쥐를 diethyl ether로 흡입 마취하였으며, 모든 혈소판을 이용한 실험에는 polystyrene 또는 polyethylene 용기를 사용하였다. 항응고제로서 2.2% trisodium citrate 0.1 volume를 plastic 주사기에 넣고, 이를 이용하여 심장으로부터 0.9 volume의 혈액을 채취하였다. 혈액을 조심스럽게 섞은 후, 상온에서 200 $\times$ g로 10분간 원심분리하여 상층액 PRP를 얻었다. PRP를 취하고 남은 층을 1500 $\times$ g에서 20분간 원심 분리하여 PPP를 얻고, PRP을 PPP로 희석하여 혈소판 수를 350-450 $\times$ 10<sup>6</sup>/mL로 맞추어 실험에 사용하였다.

### 혈소판응집 억제작용의 검색(Turbidimetric method)

혈소판 수를 일정하게 맞춘 PRP 500  $\mu$ L를 37 $^{\circ}$ C platelet aggregometer에서 2분간 배양시키고 1200 rpm으로 교반하면서 각 5  $\mu$ L의 시료용액(또는 vehicle)을 가한다. 1분 30초 후 응집유도물질로서 collagen 또는 ADP 5  $\mu$ L를 첨가하여 혈소판응집을 유도하였다. AA에 의한 혈소판응집은, threshold concentration의 collagen 존재 하에서 실험하였다. 즉 threshold concentration

의 collagen(1~1.8 µg/ml)을 가하고 30초 후 AA 5 µl를 가하여 혈소판응집을 유도하였다.<sup>13,14)</sup> 각각의 응집유도 물질의 최종농도는 다음과 같다.

Collagen: 2~5 µg/ml, ADP: 2~3 µM, AA: 50~150 µM.

혈소판응집억제률(%)은 다음의 식에 의하여 구하였다.

$$\text{Inhibition of platelet aggregation (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A; PRP에 vehicle(0.5% EtOH, final concentration)을 가한 후 agonist를 가하였을 때의 혈소판응집도(%)

B; PRP에 0.5% EtOH(final concentration)에 녹인 실험시료를 가한후 agonist를 가하였을 때의 혈소판응집도(%)<sup>9,10)</sup>

#### 시료물질의 농도 및 억제작용

우선 각각의 응집유도 물질(collagen, ADP 또는 AA)에 대하여 triflusal 및 ibudilast이 각각 10~80%의 응집억제도를 보이는 농도를 확인하고, 2종의 물질을 함께 가하였을 때의 억제도를 %로 구하였다. 대조군으로 aspirin을 사용하여 복합시료의 작용강도를 비교함으로써 실제 사용 시 결과를 예측하는데 목표를 두었다.

#### 혈액 항응고작용 검색

**aPTT(Activated Partial Thromboplastin Time) assay** - 검색시료 3 µl(또는 vehicle)를 혈장 100 µl에 넣고 37°C에서 2분간 배양시킨 후, aPTT 시약(STA<sup>®</sup>-PTT A⑤, Stago) 100 µl를 넣고 계속해서 37°C에서 3분간 배양시켰다. 0.025 M CaCl<sub>2</sub> 100 µl를 첨가한 후 혈장이 응고되기까지의 시간을 검체 중에 fibrin이 형성되면 그것이 이동전극에 휘감겨 전기회로에 전압이 걸리고, 그와 동시에 회로가 단히 타임레코더가 정지되는 자동 혈액응고 시간 측정기(fibrometer)로 측정하였으며 모든 데이터는 초 단위로 표시 하였다.<sup>15)</sup>

**PT(Prothrombin Time) assay** - 검색시료 3 µl(또는 vehicle)를 혈장 100 µl에 넣고 37°C에서 3분간 배양시킨 후, 미리 37°C로 가열시켜 놓은 PT 시약(Neoplastine<sup>®</sup> CI Plus②, Stago) 200 µl를 첨가하고 혈장이 응고되기까지의 시간을 자동 혈액응고 시간 측정기로 측정하였으며 모든 데이터는 초 단위로 표시하였다.<sup>15)</sup>

**TT(Thrombin Time) assay** - 검색시료 3 µl(또는 vehicle)를 혈장 100 µl에 넣고 37°C에서 3 분간 배양시킨 후, 미리 37°C로 가열시켜 놓은 TT 시약(STA<sup>®</sup>-Thrombin②, Stago) 200 µl를 첨가하고 혈장이 응고되기까지의 시간을 자동 혈액응고 시간 측정기로 측정하였으며 모든 데이터는 초 단위로 표시 하였다.<sup>14)</sup>

#### 시료물질의 농도 및 항응고작용

Triflusal과 ibudilast를 이용하여 각각 300~500 µM 농도에서 aPTT, PT 또는 TT 시간을 정상응고시간에 비하여 연장시키는 경향이 있는지 검색하였다. 또한 2종의 약물을 동시 처리하여 혈소판응집억제작용의 상승작용을 보인 복합농도에서 2종의 물질을 함께 가하였을 때의 혈액응고시간 연장효과가 있는가를 관찰하였다. 대조군으로 heparin을 사용하여 복합시료의 작용강도를 비교함으로써 실제 사용 시 결과를 예측하는데 목표를 두었다.

#### 통계처리

모든 실험결과는 평균±표준오차(Mean±S.E.)로 계산하였으며, 각 군 간의 유의성 검정은 Student's *t*-test를 사용하고, *p*값이 0.05 미만일 때 유의성이 있다고 판정하였다.

### 실험결과 및 고찰

#### 혈소판응집 억제작용

**Collagen 유도 혈소판응집에 대한 억제 활성 시험결과** - Table I과 같이 collagen에 의하여 유도된 혈소판응집에 대하여 ibudilast는 300~650 µM에서 14~91%의 억제도를 보여 aspirin과 유사한 정도의 억제작용을 가짐을 알 수 있었다. 또한 triflusal과 ibudilast는 복합 투여할 때 대부분의 농도에서 additive effects를 보였다. 특히 triflusal 300 µM과 ibudilast 600 µM을 동시 투여할 때 collagen에 의한 혈소판응집은 72±3.8%의 억제작용을 보였고, triflusal 500 µM과 ibudilast 300 µM을 동시 투여할 때 collagen에 의한 혈소판응집은 99±1.0%의 높은 억제작용을 보였다.

**Table I** - The effects of triflusal and ibudilast on collagen induced platelet aggregation

Aspirin (M)	Triflusal (M)	Ibudilast (M)	Inhibition (%)
300	-	-	15±6.0
400	-	-	70±11.0**
450	-	-	98±1.2**
-	300	-	19±3.0
-	450	-	49±12.0*
-	500	-	71±13.0**
-	-	300	14±1.7
-	-	500	31±9.0
-	-	600	46±13.0*
-	-	650	91±8.3**
-	300	300	20±7.0
-	300	500	56±13.0*
-	300	600	72±3.8**
-	300	700	97±1.0**
-	450	300	36±7.6
-	450	600	56±9.4*
-	500	300	99±1.0**
-	500	600	98±0.5**
-	500	650	98±1.8**

\**P*<0.05, \*\**P*<0.01.

**Table II** – The effects of triflusal and ibudilast on arachidonic acid induced platelet aggregation

Aspirin (M)	Triflusal (M)	Ibudilast (M)	Inhibition (%)
30	-	-	8.0±7.1
50	-	-	28±12.0
100	-	-	98±0.0**
200	-	-	97±0.6**
-	300	-	23±9.0
-	500	-	48±12.0*
-	600	-	65±7.8*
-	-	300	13±9.0
-	-	600	30±8.0
-	-	700	58±19.0*
-	300	300	54±4.7*
-	300	600	86±8.0**
-	300	700	98±1.7**
-	500	300	86±12.0**
-	500	600	86±7.8**
-	600	300	97±1.2*v

\*P&lt;0.05, \*\*P&lt;0.01.

**Arachidonic acid 유도 혈소판응집에 대한 억제 활성 시험결과**

Table II에 나타난 바와 같이, AA에 의하여 유도되는 혈소판 응집에 대하여 ibudilast의 경우 300~700 µM에서 13~58%의 농도의존적인 응집억제도를 보였으며, triflusal은 300~600 µM에서 23~65%의 응집억제도를 나타내었다. Ibudilast와 triflusal을 동시에 투여하면, 각각의 약물을 단독으로 투여하였을 때와 비교하여 상승적으로 억제효과가 증가하였다. 예를 들어, ibudilast 600 µM 및 triflusal 300 µM을 단독으로 투여할 경우 각각 30±8.0% 및 23±9.0%의 억제율을 보였으나, 두 약물을 동시 투여하면, 86±8.0%의 억제작용을 보였다.

**ADP 유도 혈소판응집에 대한 억제 활성 시험결과**

Table III에서 보는 바와 같이, ADP에 의하여 유도되는 혈소판응집에 대하여 ibudilast를 단독으로 첨가한 경우 600 µM 농도까지 억제작용을 보이지 않았으며 1000 µM에서 10%의 억제효과를 나타내었고, triflusal은 1000 µM까지 전혀 억제작용을 보이지 않았으며 1400 µM에서 약 34%의 억제효과를 보여, 양성 대조군(positive control)인 aspirin과 비교하여 억제효과가 훨씬 낮았다. 그러나 위와 같이 단독으로 첨가하였을 때 ADP에 의해 유도된 혈소판 응집에 대한 억제효과를 보이지 않았던 농도인 ibudilast 300 µM 및 triflusal 300 µM을 동시에 첨가하면 16±9.2%, ibudilast 600 µM 및 triflusal 300 µM을 동시에 첨가하면 15±6.8%, ibudilast 300 µM 및 triflusal 500 µM을 동시에 첨가하면 24±7.0%의 억제효과를 나타내었다. 이와 같이 단독 사용에 의해서는 혈소판 응집 억제효과가 없었던 두 가지 약물을 병용함으로써 인하여 억제효과를 보이는 것은 단독 약물로부터 전혀 예측할 수 없는 효과이다. 또한, 단독으로 사용할 때 10±0%의 억제효과를 보였던 ibudilast 1000 µM과 34±0.7%의 억제효과를

**Table III** – The effects of triflusal and ibudilast on ADP induced platelet aggregation

Aspirin (M)	Triflusal (M)	Ibudilast (M)	Inhibition (%)
300	-	-	9.0±0.6
400	-	-	18±7.2
450	-	-	17±2.5
500	-	-	32±0.0
1000	-	-	35±4.2
2000	-	-	62±8.1*
-	300	-	N*
-	500	-	N
-	1000	-	N
-	1400	-	34±0.7
-	-	300	N
-	-	600	N
-	-	1000	10±0.0
-	300	300	16±9.2
-	300	600	15±6.8
-	500	300	24±7.0
-	1400	1000	49±9.1*

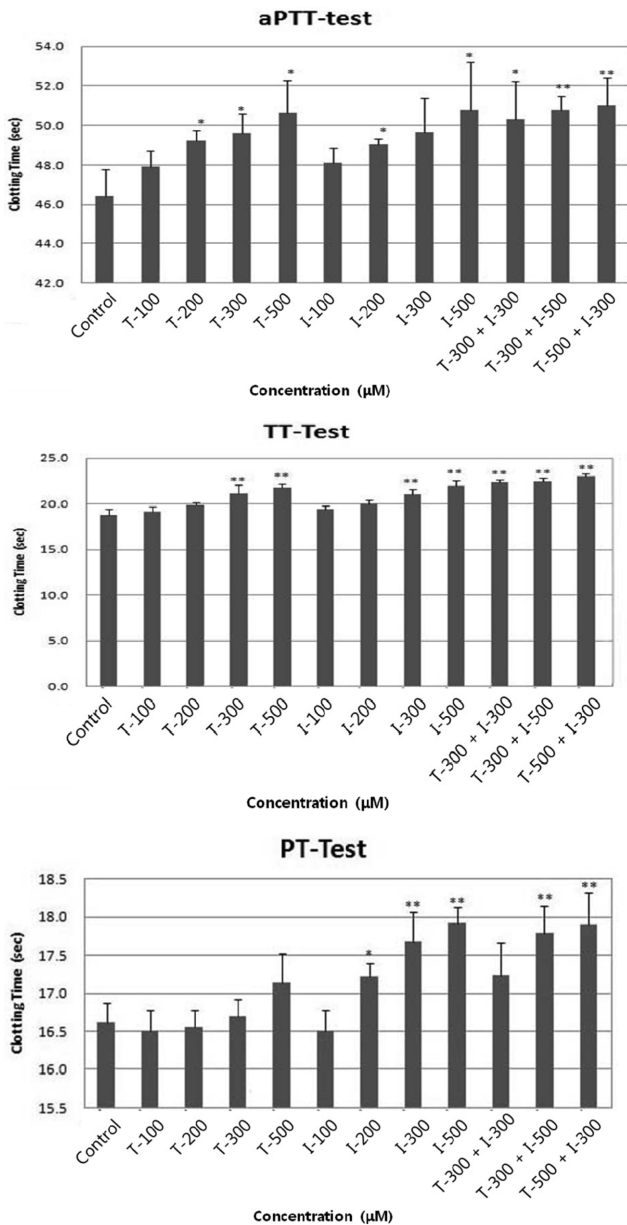
N\*: no effect.

\*P&lt;0.05.

보였던 triflusal 1400 µM을 동시에 첨가할 경우 49±9.1%의 억제효과가 나타나 두 약물의 각각의 억제효과를 더한 값보다 더 높은 억제율을 보여 두 약물을 병용 사용하면 억제효과가 상승적으로 나타난다는 것이 확인되었다.

**혈액 항응고작용**

Fig. 3에서 ibudilast와 triflusal의 두 종의 약물을 병용처리하여 혈소판 응집억제 작용의 상승효과를 보인 농도인 ibudilast 또는 triflusal 각각 300~500 µM 농도에서 정상응고시간에 비하여 aPTT, PT 또는 TT 시간을 연장시키는가 관찰하였다. 또한 2종의 약물을 동시 처리하여 혈소판응집 억제작용의 상승작용을 보인 농도에서 혈액응고시간 연장효과가 있는가를 관찰하였다. 양성 대조군으로 heparin을 사용하여 복합시료의 작용강도를 비교함으로써 실제 사용 시 결과를 예측하였다. Ibudilast 및 triflusal을 포함하는 조성물이 혈액 항응고작용을 갖는가를 내인계, 외인계 및 공통 응고계에 대하여 응고시간을 연장시키는지 여부로 검토하였다. Heparin의 경우 0.05~2 U/ml의 농도에서 대조군과 비교하여 aPTT, PT, TT 시간(sec)이 각각 80.2%, 106.6%, 171.7% 연장되어 강력한 항혈액응고 효과를 나타냄을 알 수 있었으며 이는 출혈 위험성이 상당히 크다는 것을 나타내며 따라서 사용에 상당한 주의를 필요로 한다. Ibudilast 또는 triflusal을 단독처리할 때 PT와 aPTT 시간에는 영향이 없거나 10% 이하의 약한 연장을 보인 반면, TT 시간을 12~18% 연장시켜 공통계에 의한 혈액 응고시간 연장효과를 가져 항응고 효과를 보이거나, 대조군과 비교하여 그 정도가 그리 크지 않았다. 또한 ibudilast와 triflusal을 동시 투여하였을 때 역시 PT와 aPTT 시간은 10%



**Fig. 3** – The effects of triflusal and ibudilast on coagulation times. Concentrations for PT: 2.0 μ/ml, TT: 0.1 U/ml, aPTT: 0.05 U/ml. \*P<0.01, \*\*P<0.001.

이하의 연장을 보인 반면, TT 시간을 19~23% 연장시켜 단독 투여하였을 때보다 약간 증가되었다. 이로부터, ibudilast 및 triflusal 병용처리는 혈액응고 기전 중 공통체인 TT 시간 만을 연장시켜 이들 물질들의 혈소판 응집억제 효과를 보완하면서, 출혈 위험성이 적을 것으로 추정된다.

**결 론**

위의 실험결과로서 triflusal 와 ibudilast는 각각 300~500 μM

을 복합투여 함으로서 상가적인 혈소판응집억제작용 및 항혈액응고 효과를 가짐을 알 수 있었으며, aspirin과 유사하게 혈전생성 예방효과를 가지며 출혈성 부작용은 적을 것으로 기대된다.

**참고문헌**

- Rubin, R. : Essentials of Rubin's pathology, *Koonja*, Seoul, p. 255 (2011).
- Chang, C., Lee, C., Shin, J., Cho, H. and Suh, J. : Fibrinolytic and anticoagulant effects of earthworm. *Lumbricus rubellus*, extracts. *Yakhak Heoeji* **39**, 666 (1995).
- Kim, Y., Choe, W., Kwon, O., Lee, C., Park, H. and Koh, Y. : Effect of intraarterially administered abciximab (Glycoprotein IIb-IIIa Inhibitor) in the acute cerebral vascular occlusion. *J. Korean Neurosurg. Soc.* **35**, 147 (2004).
- Grotemeyer, K. : Effects of acetylsalicylic acid in stroke patients. Evidence of nonresponders in a subpopulation of treated patients. *Thromb. Res.* **63**, 587 (1991).
- Gum, P., Kottke-Marchant, K., Poggio, E., Gurm, H., Welsh, P., Brooks, L., Sapp, S. and Topol, E. : Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* **88**, 230-235 (2001).
- Kim, S. and Lee, S. : Effects of drug interaction with clopidogrel on cardiovascular events and side effects. *Kor. J. Clin. Pharm.* **15**, 1 (2005).
- Bennett, C., Connors, J., Carwile, J., Moake, J., Bell, W., Taramtolo, S., McCarthy, L., Sarode, R., Hatfield, A., Feldman, M., Davison, C. and Tsai, H. : Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with clopidogrel. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1773 (2000).
- The EPIC Investigators: Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. *N. Engl. J. Med.* **330**, 956 (1994).
- Murdoch, D. and Plosker, G. : Triflusal: A review of its use in cerebral infarction and myocardial infarction, and as thromboprophylaxis in atrial fibrillation. *Drugs* **66**, 672 (2006).
- Gonzalex-Correa, J. and DeLa Cruz, J. : Triflusal: An antiplatelet drug with a neuroprotective effect, *Cardiovasc. Drugs* **24**, 11 (2006).
- Cesarone, M., Laurora, G., De Sanctis, M., Incandela, L., Fugazza, L., Girardello, R. Poli, A., Peracino, L., Ambrosoli, L. and Belcaro, G. : Effects of triflusal on arteriosclerosis progression assessed with high-resolution arterial ultrasound. *Angiology* **50**, 455 (1999).
- Kishi, Y., Ohta, S., Kasuya, N., Sakita, S., Ashikaga, T. and Isobe, M. : Ibudilast: A non-selective PDE inhibitor with multiple actions on blood cells and the vascular wall. *Cardiovasc. Drug* **19**, 215 (2001).

- 13) Rand, M., Leung, R. and Packham, M. : Platelet function assays. *Transfus Apher. Sci.* **28**, 307 (2003).
- 14) Yun-Choi, H., Park, K. and Pyo, M. : Epinephrine induced platelet aggregation in rat platelet-rich plasma. *Thromb. Res.* **100**, 511 (2000).
- 15) Osoniyi, O. and Onajobi, F. : Coagulant and anticoagulant activities in *Jatropha curcas* latex. *J. Ethnopharmacol.* **89**, 101 (2003).