



목초액의 혈소판 응집억제를 통한 혈행개선 작용에 관한 연구

김영대 · 배옥남 · 정승민 · 정진호

서울대학교 약학대학 종합약학연구소

Improvement of Haemostasis Mediated by Anti-Platelet Activities by Plant Vinegar

Young-Dae Kim, Ok-Nam Bae, Seung-Min Chung and Jin-Ho Chung

Research Institute of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy,
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Received April 6, 2004; Accepted May 10, 2004

ABSTRACT. We investigated the effects of plant vinegar on platelets and blood coagulation system. Plant vinegar inhibited *in vitro* platelet aggregation in a concentration dependent manner, when platelets were activated by thrombin and collagen. In addition, plant vinegar showed inhibitory effects on the serotonin secretion induced by thrombin in a concentration dependent manner. However, treatment with plant vinegar to platelets did not induce any cytotoxicity, as determined by the release of lactate dehydrogenase. Plant vinegar did not change the coagulation parameters such as activated partial thromboplastin time (aPTT) and prothrombin time (PT) using rat citrated plasma. *In vivo* study revealed that, treatment with plant vinegar prolonged the bleeding time from mouse tail. All these results suggest that plant vinegar might improve blood hemostasis mediated via antiplatelet activities.

Keywords: Plant vinegar, Platelets, Cytotoxicity, Antiplatelet activity, Cardiovascular disease.

서 론

혈행개선에는 혈액을 구성하는 혈장 및 혈구세포(적혈구 및 혈소판)가 주로 관여하며, 이들 조직은 혈류의 항상성을 유지시키며 혈관의 손상된 부위나 염증 부위에서 정상적인 지혈과 보호작용을 유지함으로써 인체의 정상적인 기능을 유지한다. 그러나 혈장내의 coagulation factors의 지나친 활성화, 혈소판 응집 촉진, 적혈구 변형능 이상은 혈류의 항상성을 파괴하여 혈행 장애 질환인 동맥경화, 뇌졸중 등의 심혈관계 질환을 유발시킨다(Ross, 1993; Harker, 1994; Packham, 1994). 심혈관계 질환은 미국, 유럽, 아시아 등 전세계적으로 주요한 사망 원인이 되고 있다. 우리나라에서도 심혈관계질환이 사망원인의 1위를 차지하고 있는 것이

각종 조사 결과에서 보고되고 있다. 정상 혈관에서는 지혈 기전의 활성화 반응과 함께 억제 반응이 균형을 이룸으로써 항상성을 유지하고 있다. 그러나 과도한 지혈작용 및 혈괴의 생성은 혈액의 흐름을 방해하여 혈행 이상을 초래하며 혈전(thrombus)과 같은 병변을 유발한다(Stormorken, 1986). 따라서 이러한 혈행장애 즉 심혈관계 질환이 발생하여 약물을 통한 치료가 이루어지기 전에 건강기능식품의 섭취를 통한 혈행 개선은 만성 성인병 예방에 매우 중요하다.

침엽수, 활엽수, 대나무등의 나무를 숯가마 속과 같이 공기가 적은 데서 가열하면 탄화라는 현상이 일어나 나무는 숯이 된다. 그 과정에서 생기는 연기를 자연 냉각하여 얻어지는 수용액이 조목초액이다. 이러한 조목초액의 정제과정을 거쳐 목초액이 생산되는데 목초액의 효능에 대한 그 동안의 연구는 다음과 같다. 흰쥐를 이용한 사염화탄소 경구투여에 대한 해독효과, 건강한 남성을 대상으로 한 알콜의 해독실험 및 insulin 분비에 미치는 실험, 참나무 목초액의 면역조절작용과 항암효과에 관한 연구(김동

Correspondence to: Jin-Ho Chung, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
E-mail: jhc302@plaza.snu.ac.kr

회 등, 2001a, b; 김판기 등, 1997) 등이 있다. 그러나 혈행개선과 관련된 연구는 아직도 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 건강기능식품으로서 목초액 성분의 혈행개선 효과를 연구하였다. 본 실험을 통하여 목초액은 thrombin 이나 collagen으로 유도되는 혈소판의 응집을 농도 의존적으로 저해하고 혈소판으로부터 serotonin 분비를 농도 의존적으로 저해하며, 또한 mouse tail bleeding time을 농도 의존적으로 연장시키는 혈행개선 효과를 관찰하였다.

재료 및 방법

실험재료

목초액 성분은 바이오 오키(주)에서 공급받아 사용하였다. Calcium chloride, sodium chloride, trisodium citrate, citric acid, thrombin, ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA), trichloroacetic acid(TCA), serotonin creatinine sulfate, α -phthalaldehyde(OPT), anhydrous dimethyl sulfoxide (DMSO), trizma[®] base, pyruvic acid (sodium salt), t-octylphenoxy-polyethoxyethanol (Triton X-100), β -nicotinamide adenine dinucleotide reduced form(β -NADH) 등 사용한 대부분의 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Activated partial thromboplastin time (aPTT) reagent와 prothrombin time(PT) reagent는 Instrumentation Laboratory(Milano, Italy)로부터, collagen은 Chronolog(Havertown, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 그 밖의 모든 시약은 모두 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

Washed platelets의 분리

실험동물은 male Sprague-Dawley rats(바이오링크, Korea)를 사용하였으며, 사육장의 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 $55 \pm 5\%$ 로 유지하였고 충분한 물과 사료(푸리나, Korea)를 공급하며 사육하였다. 체중이 300~400 g이 되는 것을 diethyl ether로 마취시킨후 복대동맥에서 18G 주사기를 이용하여 혈액을 채취하였다. 이때 항응고제로는 acid-citrate-dextrose(ACD: 85 mM trisodium citrate, 71 mM citric acid, 111 mM glucose)를 사용하였다. 실험 전 과정에 걸쳐서 유리 용기나 유리 pipette의 사용은 피하였으며, 혈소판 분리의 전 과정은 상온에서 수행하였다. 채혈액을 100 g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻었으며 다시 이 상등액을 500 g에서 10분간 원심분리하여 혈소판 pellets을 얻은 후 washing buffer(134 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1.0 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10.0 mM

HEPES, 5.0 mM dextrose, 12.0 mM NaHCO_3 , 0.34 mM Na_2HPO_4 , 10% ACD, 0.3% bovine serum albumin, pH 7.4)를 가해 현탁시켜 세척하고, 이를 다시 500 g에서 10분간 원심분리 하였다. 여기서 얻은 혈소판 pellets을 suspension buffer(134 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1.0 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10.0 mM HEPES, 5.0 mM dextrose, 12.0 mM NaHCO_3 , 0.34 mM Na_2HPO_4 , 0.3% bovine serum albumin, pH 7.4)에 재현탁시킨 후 hemacytometer를 사용하여 광학현미경으로 혈소판 개수를 세어 여기에 suspension buffer로 희석하여 1 ml 당 3×10^8 개의 혈소판이 포함되도록 한 후 CaCl_2 가 2 mM이 되도록 맞추고 실험에 사용하였다.

혈소판 응집 측정

혈소판의 응집 정도를 lumi-aggregometer(Chrono-Log Co., USA)를 이용하여 turbidity 변화로서 측정하였다. Washed platelets(WP)의 light transmission을 0%, suspension buffer의 light transmission을 100%로 맞춘 후, 37°C 에서 혈소판의 응집정도에 따른 light transmission을 측정하였다. 측정 시 silicon으로 코팅된 aggregometer cuvette을 사용하였으며 반응이 일어나는 동안 1,000 rpm에서 지속적으로 교반시켰다. WP를 aggregometer cuvette에 넣고 aggregometer 안에서 1분간 안정화시켰다. 그리고 WP와 목초액을 농도별로 가하고 water bath에서 10분간 incubation 시킨 후 WP를 취하여 aggregometer cuvette에 넣고 곧바로 thrombin 또는 collagen에서 최대 혈소판 응집을 일으키는 농도의 액을 가하여 light transmission을 확인하였다. IC_{50} 는 thrombin과 collagen을 가하였을 때 응집을 저해하는 농도를 잡아 그에 해당하는 inhibition%를 이용하여 농도-억제효과에 관한 직선식을 도출한 후, 50% inhibition에 대응하는 농도를 구하였다.

Serotonin 분비 측정

혈소판을 활성화시킬 때 생성되는 serotonin은 fluorimetric method를 이용하여 측정했다(Holmsen and Dangelmaier, 1989). WP에 목초액을 농도별로 처리하고 37°C 에서 10분간 incubation한 후, thrombin 0.1 U/ml를 가하고 다시 3분간 반응시켰다. 3분 후 5 mM EDTA를 가하여 반응을 종결시키고, 12,000 g에서 2분간 원심분리하여 상등액을 얻은 후 400 μl 를 6 M TCA에 가하여 단백을 제거하였다. 상등액 400 μl 를 취하여 OPT reagent 1.6 ml가 담긴 glass test tube에 가하고 끓는 수욕상에서 10분간 가열한 다음, 즉시 ice bath에서 냉각시켰다. 여기에 3 ml의 chloroform을 가하여 남아있는 TCA를

추출하고, 상부의 수층을 취한 후, excitation 360 nm, emission 475 nm의 파장에서 fluorescence를 측정하였다. 15% triton X-100 solution을 WP에 가한 후(final 0.3%) 측정된 fluorescence를 100%로 하여 각각의 serotonin 분비 정도를 계산하였다.

혈장 응고시간 측정

흰쥐의 대동맥에서 항응고제로는 3.8% sodium citrate을 사용하여 채취하였다. 혈액을 2500 g에서 15 분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. aPTT를 측정하기 위해 혈장에 DW 또는 목초액을 농도별로 가하고 10분간 37°C에서 incubation시켰다. 정확히 10분 후, 37°C의 fibrometer에 incubation된 sample 100 µl를 가하고 aPTT reagent 100 µl와 20 mM CaCl₂ 100 µl을 가하며 즉시 BBL fibrometer®를 작동시켜 fibrin clot이 형성될때까지의 시간을 측정하였다. PT 역시 DW나 목초액을 농도별로 가하여 10분간 incubation된 혈장 100 µl를 37°C의 fibrometer에 가하고, 즉시 37°C로 prewarming된 PT reagent 200 µl를 가한 후 BBL fibrometer®를 작동시켜 fibrin clot이 형성될때까지의 시간을 측정하였다.

Lactate Dehydrogenase(LDH) 유출 실험

혈소판으로부터의 lactate dehydrogenase(LDH) 유출은 spectrophotometry 방법을 이용하여 측정하였다. WP에 목초액을 농도별로 가한 후, 37°C에서 incubation 하면서 각 시간대별로 WP 100 µl를 취하여 10,000 g에서 2분간 원심분리하였다. 원심분리한 상등액 25 µl를 tris-EDTA buffer(56 mM Trizma® Base, 5.6 mM EDTA, pH 7.4)에 β-NADH를 0.17 mM 되게 녹인 solution 1.0

ml에 가한 다음, 37°C에서 10분 동안 incubation 하였다. 여기에 37°C에서 미리 incubation한 14 mM pyruvate solution 100 µl를 가하고, 즉시 339 nm의 파장에서 1분간 흡광도 감소를 측정하였다. LDH의 총 활성도는 0.3% triton X-100으로 lysis를 유발하여 측정하였으며, 이를 100% 활성도로 하여 계산하였다.

Mice로부터 Tail Bleeding Time 측정

Male ICR mice는 Orient사(서울, Korea)로부터 구입하였다. Saline, 목초액 10%, 20%, 30%액을 mice의 복강에 주사한 후 60분이 되었을 때 mice를 틀에 고정시키고 mice의 꼬리 끝으로부터 2 mm 되는 부분을 surgical blade로 자르고 꼬리의 나머지 부분을 37°C의 saline에 직각으로 담갔다. Bleeding time은 꼬리를 자른 시간부터 측정하여 bleeding이 완전히 멈춘 시간 까지를 (30초 이내에 다시 bleeding이 생기지 않았을 때까지) 기준으로 하여 측정하였다. 또한 200초 이상 bleeding이 된 경우 200초로 기록하였다.

결 과

혈소판 응집에 대한 목초액의 효과

목초액의 혈소판에 미치는 영향을 파악하기 위하여 Washed platelets(WP)를 분리한 후 목초액을 가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 대조군은 혈소판 응집 억제 효과가 없었으나 목초액 처리군에서는 농도 의존적으로 thrombin과 collagen에 의한 응집을 억제시켰다(Fig. 1). 2% 목초액은 thrombin 및 collagen에 의한 혈소판 응집을 완전히 억제하였다. 이러한 결과를 토대로 IC₅₀를 산출

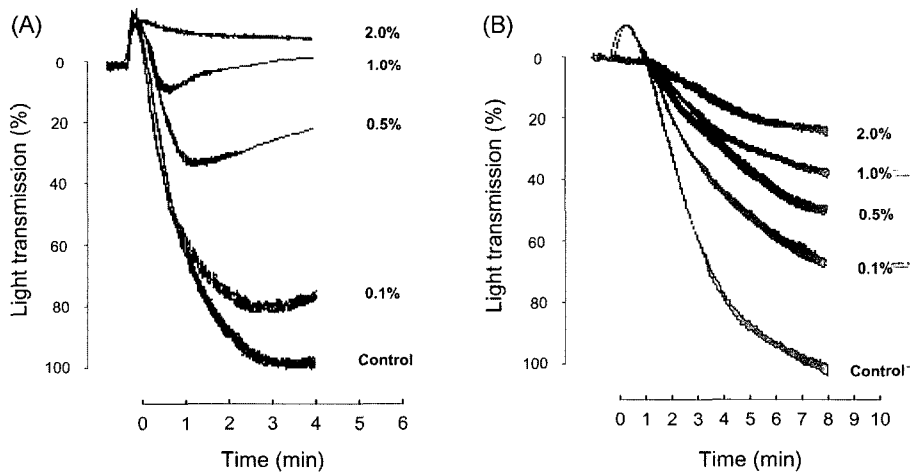


Fig. 1. Effects of plant vinegar on platelets aggregation induced by thrombin or collagen. Data from a typical experiment are presented. WP were incubated with 0~2.0% plant vinegar for 10 min at 37°C and aggregation was initiated by (A) thrombin (0.07 U/ml) or (B) collagen (4 µg/ml).

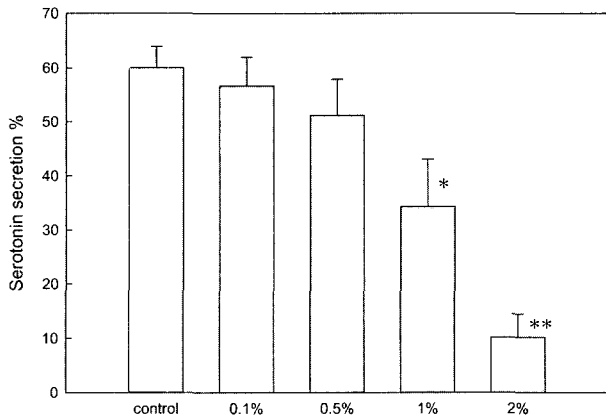


Fig. 2. Inhibitory effect of plant vinegar on thrombin-induced serotonin secretion from washed platelets. Washed platelets were incubated with plant vinegar (0~2.0%) at 37°C for 10 min prior to addition of thrombin (0.1 U/ml), and then the reaction was stopped by addition of 5 mM ice-cold EDTA. Data represent means ± SEM of 3 independent experiments. **p*<0.05, ***p*<0.01 as compared to control.

한 결과 thrombin에 대한 IC₅₀는 0.748%이었으며 그리고 collagen에 대한 IC₅₀는 0.547%이었다.

혈소판으로부터 Serotonin 분비에 대한 목초액의 효과

목초액이 thrombin에 의해 유도되는 혈소판 응집을 저해하였으므로 thrombin에 의해 혈소판이 활성화될 때 나타나는 여러 가지 현상 중 혈소판의 granule에 저장되어 있다가, agonist 자극에 의해 활성화되면 granule과 세포막의 융합에 의해 혈소판 밖으로 분비되어 혈소판 활성화 및 혈관 수축을 유발하는 serotonin 분비에 목초액의 효과를 실험 하였다. 목초액을 WP에 10분간 전처리 한 후, thrombin 0.1 U/ml를 가한 후 3분간 유리되는 serotonin을 정량하였다. 실험결과 목초액은 농도의존적으로 serotonin 분비를 억제하였다(Fig. 2). 특히 2% 목초액은 serotonin 분비를 80% 이상 억제하였다. 이 결과는 Fig. 1에서 보여주는 혈소판 응집억제 실험결과와 잘 일치하고 있다.

aPTT와 PT에 대한 목초액의 효과

목초액이 혈액 coagulation에 어떠한 효과를 갖는지 알아보기 위해 rat plasma를 분리한 다음, intrinsic pathway를 통해 fibrin clot이 형성될 때까지의 시간을 aPTT를 지표로, extrinsic pathway를 통해 fibrin clot이 형성될 때까지의 시간을 PT를 지표로 하여 혈장 응고 시간을 측정하였다. aPTT, PT는 항혈전 작용을 검색하는데 널리 사용되는 지표이며 각각 intrinsic pathway와 extrinsic pathway의 활성화 정도를 반영한다(Matsuo *et al.*,

Table 1. Effects of plant vinegar on coagulation of rat plasma

PT		aPTT	
Concentration	Time (sec)	Concentration	Time (sec)
0%	8.95 ± 0.24	0%	19.07 ± 0.83
0.1%	8.98 ± 0.08	0.1%	18.82 ± 0.36
0.5%	9.12 ± 0.15	0.5%	18.97 ± 0.59
1.0%	8.88 ± 0.13	1.0%	19.48 ± 0.74
2.0%	9.07 ± 0.08	2.0%	20.13 ± 0.99

Rat plasma were incubated with plant vinegar (0~2.0%) at 37°C for 10 min. aPTT was measured for intrinsic pathway. PT was measured for extrinsic pathway. Data represent means ± SEM of 3 independent experiments.

1997). Thrombin에 의해 유도되는 혈소판응집을 저해하였던 목초액 농도를 사용하여, plasma에 목초액을 처리하고 10분간 37°C에서 incubation후 혈장응고 시간을 측정한 결과 목초액의 사용한 농도와 관계없이 혈장응고 시간을 변화시키지 않았다. 이는 목초액은 혈장응고 인자에 직접 작용하지 않으며, thrombin inhibitor로서의 효과를 갖지 않음을 제시한다(Table 1).

LDH 유출에 대한 목초액의 효과

혈소판의 활성화를 억제하는 목초액의 효과가 세포독성과 연관성이 있는지 알아보기 위해 LDH 유출을 지표로 혈소판에 대해서 목초액의 세포독성을 실험하였다. WP에 목초액을 농도별로 가한 후 각 시간대별로 시료를 취하여 LDH의 활성을 측정한 결과 양성 대조군으로 사용한 menadione 250 µM은 LDH 유출을 크게 증가시키는 반면 목초액이 처리된 WP에서는 유의적인 LDH 유출이 없

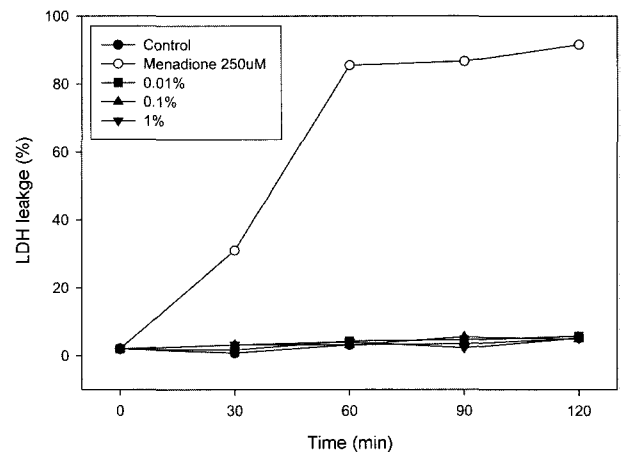


Fig. 3. Effect of plant vinegar on LDH release from rat WP. WP were incubated with various concentrations of plant vinegar. Cytotoxicity, as determined by LDH leakage, was assessed at various time points. Menadione 250 µM is used as a positive control.

Table 2. Effects of plant vinegar on mouse tail bleeding time

Group	N	Treatment	Tail bleeding time (seconds)
Control	17	Vehicle (saline)	77.7 ± 4.5
Plant vinegar	14	10%	105.9 ± 14.6
	17	20%	115.4 ± 10.8*
	12	30%	160.7 ± 14.1**
Aspirin	16	10 mg/kg	122.5 ± 10.5**

The samples were administered intraperitoneally 60 min prior to the assay.

The values are expressed as means ± SEM.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ as compared to control.

었다(Fig. 3). 이와 같은 결과로부터, 목초액의 혈소판 활성화 억제 작용은 혈소판에 미치는 세포독성 때문은 아닌 것으로 사료된다.

Mice로부터 Tail Bleeding 효과

Bleeding time의 측정은 혈소판과 혈장인자들 그리고 혈관벽과 연관된 hemostatic plug를 형성하는 능력을 측정하기 위해 고안된 실험으로써 혈소판 응집은 hemostatic plug 형성에 중요한 요인이므로 mouse tail bleeding system을 이용하여 목초액의 혈행개선 효과를 시험하였다. Vehicle을 투여한 군의 경우 tail bleeding time은 77.7 ± 4.5 초 이었으나, 목초액을 20%와 30%로 제조하여 투여한 군의 경우는 각각 115.4 ± 10.8 초, 160.7 ± 14.1 초로 bleeding time의 시간이 농도의존적으로 연장되었다(Table 2). 양성 대조군인 aspirin(10 mg/kg)은 tail bleeding 시간이 122.5 ± 10.5 초로 연장되었다.

고 찰

혈소판은 정상적인 지혈뿐만 아니라 상처를 입은 혈관에서의 혈전 생성에도 중요한 역할을 담당하고 있다(Di Minno *et al.*, 1983). 정상상태에서는 혈소판이 활성화되면서 serotonin, calcium, thromboxane A_2 등을 유리하여 주위의 다른 혈소판의 응집을 증폭시키고, 혈장에 존재하는 혈액응고인자와 반응하여 혈피를 형성함으로써 지혈을 더욱 신속하고 효과적으로 일어날 수 있도록 한다(De Clerck and David, 1981; Fanburg and Lee, 1997; FitzGerald, 1991). 그러나 지나친 혈소판 응집은 혈전을 생성하여 혈행의 흐름을 방해하며 궁극적으로는 심혈관질환으로 발전하게 된다. 인체는 혈소판응집을 촉진시키는 인자와 억제시키는 인자가 균형을 맞추고 있으나 유전적, 환경적요인에 의하여 혈소판 응집이 촉진되면 혈행의 장애를 일으키게 된다(Mustard *et al.*, 1990; Macmahon

et al., 1991; Murray *et al.*, 1994). 따라서 지나친 혈소판응집을 억제시키는 건강기능성식품은 인체의 혈행 개선에 도움을 줄 수 있다.

이번 연구에서는 *in vitro*에서 thrombin과 collagen에 의해 유도되는 rat 혈소판의 응집을 목초액이 농도 의존적으로 저해함을 보였다(Fig. 1). 또 혈소판의 granule에 저장되어 있다가, 혈소판이 thrombin 등의 agonist 자극에 의해 활성화되면 혈소판 밖으로 분비되어 혈소판 활성화 및 혈관 수축을 유발하는 serotonin 분비에 대해 목초액이 농도 의존적으로 serotonin 분비를 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 2). 더불어 *in vivo* 실험인 mouse tail bleeding 실험을 통해 목초액 농도 의존적으로 bleeding time이 연장되는 것을 확인하였다(Table 2). 또한 이러한 혈소판의 활성화를 억제하는 목초액의 효과가 세포독성과 연관이 있는지 알아보기 위해 LDH의 유출을 지표로 확인하였으나 이러한 목초액의 효과는 세포독성과는 관련이 없음을 밝혔다(Fig 3).

aPTT, PT는 혈액응고 정도를 검색하는데 널리 사용되는 지표이다(Matsuo *et al.*, 1997). 목초액은 plasma를 이용한 coagulation parameter 즉 aPTT, PT를 변화시키지 않았다. 이는 목초액이 혈액응고인자 저해제나 thrombin inhibitor 등의 작용으로 혈액응고 활성을 가지는 것이 아니라 antiplatelet activity를 통하여 thrombin이나 collagen 같은 agonist에 의한 혈소판의 응집을 저해하고, thrombin에 의해 유도되는 serotonin secretion을 저해함으로써 혈행을 개선할 수 있음을 제시한다.

실험결과로부터 thrombin과 collagen에 의한 응집의 저해는 thrombin의 경우 IC_{50} 은 0.748%이었고 collagen의 경우 IC_{50} 은 0.547%이었다. serotonin 분비 저해의 경우 thrombin에 대한 IC_{50} 을 볼 때 1.366%의 농도에서 IC_{50} 을 보였다. 또한 mouse tail bleeding time의 경우는 vehicle을 투여한 군의 경우 tail bleeding time은 77.7 ± 4.5 seconds 이었으나($n=17$) 목초액을 20%와 30%로 제조하여 투여한 군의 경우는 각각 115.4 ± 10.8 seconds ($n=17$)와 160.7 ± 14.1 seconds($n=12$)로 bleeding time의 시간이 연장되었다.

결국 이러한 결과들을 종합해 볼 때 정상상태에서 당뇨병, 담배 등 유전적, 환경적 여러 가지 요인에 의하여 혈소판이 활성화되는데, 목초액은 이러한 지나친 활성화를 억제함으로써 혈행개선제로서의 기능이 기대된다고 하겠다.

참고문헌

김동희, 최주선, 김성훈 (2001a): 목초액과 항암성 본초가 가미된 복합목초액의 항암 및 항전이활성에 미치는 영향. 동의생리병

- 리학회지, **15**, 136-142.
- 김동희, 최주선, 추지희, 송호철, 이은옥, 강인철, 최종원, 김성훈 (2001b): 참나무 목초액의 면역조절 작용과 항암효과에 관한 연구. 동역생리병리학회지, **15**, 857-862.
- 김판기, 왕성호, 김대용 (1997): Guh Sung Y.L.S.-95의 아급성 독성시험. *J. Fd. Hyg. Safety*, **12**, 234-239.
- De Clerck, F. and David, J.L. (1981): Pharmacological control of platelet and red blood cell function in the microcirculation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **3**, 1388-1412.
- DiMinno, G. and Silver, M.J. (1983): Mouse antithrombotic assay: a simple method for the evaluation of antithrombotic agents in vivo. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **225**, 57-60.
- Fanburg, B.L. and Lee, S.L. (1997): A new role for an old molecule: serotonin as a mitogen. *Am. J. Physiol.*, **272**, L795-L806.
- FitzGerald, G.A. (1991): Mechanisms of platelet activation: thromboxane A₂ as an amplifying signal for other agonists. *Am. J. Cardiol.*, **68**, 11B-15B.
- Harker, L.A. (1994): Platelets and vascular thrombosis. *N. Engl. J. Med.*, **330**, 1006-1007.
- Holmsen, H. and Dangelmaier, C.A. (1989): Measurement of secretion of serotonin. *Methods Enzymol.*, **169**, 205-210.
- Macmahon, S. and Sharpe, N. (1991): Long-term antiplatelet therapy for the prevention of vascular disease. *Med. J.*, **154**, 477-480.
- Matsuo, T., Koide, M. and Kario, K. (1997): Development of argatroban, a direct thrombin inhibitor, and its clinical application. *Semin. Thromb. Hemost.*, **23**, 517-522.
- Murray, J.C., Kelly, M.A. and Gorlick, P.B. (1994): Ticlopidine: A new antiplatelet agent for the secondary prevention of stroke. *Clin Neuropharmacol*, **17**, 23-31.
- Packham, M.A. (1994): Role of platelets in thrombosis and hemostasis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **72**, 278-284.
- Ross, R. (1993): The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, **362**, 801-809.
- Stormorken, H. (1986): Platelets in hemostasis and thrombosis. In *The Platelets: Physiology and Pharmacology* (H. Holmsen, Ed.), pp. 3-32, CRC press, Florida.