Journal of Food Hygiene and Safety 9(1), 23-30(1994)

자연식품에 의한 혈소판 응집 억제능의 효율적 검색

류근호 · 이주영 · 조연숙 · 김미정 · 정진호
서울대학교 약학대학

Assay for Screening Anti-Platelet Aggregating Capacity of Natural Food

Keun-Ho Ryu, Joo-Young Lee, Youn-Sook Cho, Mee-Jung Kim and Jin-Ho Chung
College of Pharmacy, Seoul National University, 151-742, Seoul

ABSTRACT–When three systems commonly used for screening(washed platelets suspended in buffer containing Ca^{2+}, washed platelets in buffer without Ca^{2+} and platelet rich plasma) are compared by studying the anti-aggregating capacity of garlic extract, platelet rich plasma was the least sensitive system. The most sensitive assay system, based on the IC_{50}s of garlic extract and 2 other platelet aggregation-inhibiting agents(vitamin K_3 and propranolol), was the platelet preparation without Ca^{2+} in the suspension buffer. This system was confirmed as the most sensitive during subsequent investigation of garlic extract's capacity to inhibit platelet ATP release. These results suggest that applying the system with washed platelet without Ca^{2+} is most effective to screen for the anti-aggregating capacity of natural food.

Keyword ☐ Platelet rich plasma(PRP), Washed platelet, Platelet aggregation, Garlic extracts, ATP release, Albumin.

식생활에서 육류가 차지하는 비중이 늘어나면서 동맥경화, 혈전증등 심순환기계 질환이 늘어나고 있다. 이러한 심순환기계 질환에 혈소판이 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다. 혈소판은 혈관이 손상되면 활성화되어 응집함으로써 혈액유실을 방지하지만, 어떤 병적인 증상에 의해 과도하게 활성화될 경우 응집함으로써 혈전을 생성하여 혈액순환에 장애를 주어 심경색 등을 유발하기도 한다.[1,2] 또한 혈소판이 활성화되면서 혈소판내의 α granule로부터 분비되는 PDGF(platelet derived growth factor)는 혈관벽 재생을 유도하지만 동시에 동맥경화의 원인이 되기도 한다.[2] 혈소판의 이러한 병적인 증상을 예방하거나 치료하는 식품이나 약물을 개발하기 위해 많은 연구가 있어왔다.[3,4] 이러한 연구에 있어 가장 많이 사용되는 방법 중의 하나는 여러 가지 조건으로 분리된 혈소판에 식품 추출물이나 약물을 가하고 agonists를 가해 일어나는 혈소판 응집에 미치는 영향을 관찰하는 것이다.[5] 특히 식품의 경우 약물과는 달리 장기간에 걸쳐 다량을 섭취하기 때문에 효율적인 검색 조건으로 식품의 영향을 정확히 평가하여 정보를 제공하는 것은 중요한 일이라 하겠다. 마늘은 우리가 섭취하는 식품 중 항혈소판 작용을 나타내는 대표적인 것으로 이것의 메탄올 추출물은 혈소판 응집과 granule secretion을 억제한다고 알려져 있다.[6] 따라서 항혈소판 작용을 함유한 식품을 효율적으로 검색하기 위해서 현재 항혈소판 작용 검색에 많이 사용되고 있는 PRP(platelet rich pasma), washed platelet (Ca^{2+}첨가), washed platelet(Ca^{2+}비첨가)등 세가지 혈소판 분리조건에서, thrombin에 의한 혈소판응집과 granule secretion에 미치는 마늘 추출물의 영향을

비교하여 가장 효율적인 검색방법을 규명하고 분리 조건에 따라 혈소판 응집억제능의 차이가 생기는 이유를 알아보았다.

재료 및 방법

시 약

마늘은 재래시장에서 신선한 것을 구입하였고, thrombin, menadione(vitamin K_3), $NaHCO_3$, NaH_2PO_4, NaCl, $MgCl_2$, KCl, glucose, EDTA, bovine serum albumin, $CaCl_2$등은 Sigma 제품을 구입하여 사용하였다. Luciferin-luciferase와 ATP standard는 Chrono-log 제품을 구입하였고, propranolol은 대웅제약에서 구입하였다.

실험 동물

유한양행에서 Sprague-Dawley(SD) female rat를 공급받아, 한달 이상 사육하여 무게가 200±30g되는 것을 실험에 사용하였다. 물과 사료는 제한하지 않았으며, 물은 수도물을 사료는 제일제당 사료를 각각 사용하였다. 사육시 밤과 낮의 주기가 각각 12시간씩 되도록 하였다.

마늘 추출법

Apitz-Castro와 Block의 방법을 참조하여 다음과 같이 수행하였다.[6,7] 신선한 마늘 1 kg을 잘게 썰어 메탄올 1,200 ml에 넣고 25℃에서 72시간동안 추출하였다. 위 조작을 3회 반복한 후 여과지로 여과하고 25℃에서 감압 증류하여 200 ml 되도록 농축하였다. 500 ml의 물을 가하고 diethyl ether 300 ml씩으로 5회 추출하였다. diethyl ether 분획에 $MgSO_4$을 가해 흔들면서 1시간 방치하여 탈수하였다. 여과지로 여과하고 감압 증류하여 얻은 0.64 g의 노란색 추출물을 메탄올에 용해하여 이후 실험에 사용하였다.

Platelet rich plasma와 washed platelet의 분리

Rat를 diethyl ether로 마취하고 개복하여 복대동맥으로부터 채혈하여 3.8% Na-citrate용액과 1대 9의 비율로 혼합한 뒤 150 g에서 15분간 원심 분리하여 상층의 PRP(platelet rich plasma)를 취하고 잔사는 계속하여 1,500 g에서 20분간 더 원심분리하여 상층에서 PPP(platelet poor plasma)를 얻었다. PRP를 500 g로 10분간 원심 분리하여 상층의 혈장을 제거한 후 EDTA를 포함하는 washing buffer(11.9 mM $NaHCO_3$, 0.33 mM NaH_2PO_4, 163.3 mM NaCl, 1.1 mM $MgCl_2$ 2.8 mM KCl, 11.2 mM α-[D]glucose, 2.0 mM EDTA, 0.35% bovine serum albumin, pH 7.4) 3 ml를 가하고 teflon-coated stirring bar를 넣어 저속으로 교반함으로써 혈소판을 재현탁시켰다. 이 혈소판을 다시 500 g에서 10분간 원심분리한 후, 세척액을 버리고, 잔사인 혈소판을 위의 방법으로 한번 더 세척하였다. 세척후 혈소판을 둘로 나누어, 한쪽은 suspension buffer(11.9 mM $NaHCO_3$, 0.33 mM NaH_2PO_4, 163.3 mM NaCl, 1.1 mM $MgCl_2$, 2.8 mM KCl, 11.2 mM α-[D] glucose, 1.0 mM $CaCl_2$, pH 7.4)에, 그리고 나머지 한쪽은 1.0 mM $CaCl_2$를 포함하지 않는 suspension buffer에 재현탁시켜 washed platelet(Ca^{2+} 첨가)와 washed platelet (Ca^{2+}비첨가)를 각각 조제하였다. PRP와 washed platelet중의 혈소판 수를 광학 현미경으로 세어, PRP는 PPP로, washed platelet는 suspension buffer로 희석하여 혈소판 수가 5×10^8/ml가 되도록 하여 실험에 사용하였다.

혈소판 응집 실험

Aggregometer(Chrono-log)를 사용하여 37℃에서 turbidometric 방법으로 혈소판 응집을 측정하였다.[5] PRP와 여러 농도의 마늘 추출물을 aggregometer상에서 2분간 처리한뒤 thrombin(1.2 units)을 가해 혈소판 응집을 유도했다. 이때 시험물질 대신 용매(0.6%)메탄올(또는 dimethyl sulfoxide)를 넣은 것을 대조군으로 하여 대조군의 응집력을 100%로 잡고 약물의 농도별 억제율을 산출한 후 이를 logarithmic linear regression에 대입하여 회귀직선을 구한 후 이 직선으로부터 각 시험물질의 50% 억제율인 IC_{50} 값을 구하였다. Menadione은 dimethyl sulfoxide에 녹여서 사용하였으며 propranolol은 메탄올에 녹여 실험에 사용하였다.

ATP release 측정

Luciferin-luciferase와 ATP가 반응할 때 발생하는 luminescence로 ATP release를 측정하였다.[8] PRP와 마늘 추출물을 2분간 반응시키고 luciferin-luciferase를 넣었다. 30초 후 thrombin(1.2 units)을 가해 ATP release를 유도한 후, lumi-aggregometer로 luminescence를 측정하였다. 유리된 ATP의 양은 luciferin-luciferase 투여 30초 후에 ATP standard를 가해 발생한 luminescence를 측정하고 이것과 비교하여 계산하였다.

통계처리

통계 처리는 NCSS program을 사용하였으며, Two-way ANOVA test를 통하여 유의성이 확인되면 Fisher's LSD multiple range test($p<0.05$)를 수행하여 각 군별 유의적인 차이를 결정하였다.

결과 및 고찰

본 실험에 앞서 혈소판 분리 3가지 조건하에서 비슷한 정도로 혈소판 응집을 유도하는 thrombin의 농도를 구했다. 그 결과 thrombin 1.2 units가 PRP, washed platelet(Ca^{2+}첨가), washed platelet(Ca^{2+}비첨가) 등 혈소판 분리 세가지 조건에서 모두 같은 정도로 혈소판 응집을 유도하였다(Fig. 1).

따라서 이후 실험에서는 thrombin 1.2 units로 혈소판 응집을 유도하였다.

마늘 추출물의 혈소판 응집 억제 실험을 한 결과, 마늘 추출물은 PRP, washed platelet(Ca^{2+}첨가), washed platelet(Ca^{2+}비첨가) 등 혈소판 분리 세가지 조건에서 농도 의존적으로 혈소판 응집을 억제하였다(Fig. 2). 혈소판 응집을 100% 억제시키는 마늘 추출물 농도가 PRP, washed platelet(Ca^{2+}첨가), washed platelet(Ca^{2+} 비첨가)에서 각각 6,600 μg/ml, 1,100 μg/ml, 330 μg/ml로 나타나, 마늘 추출물의 혈소판 응집 억제능은 PRP<washed platelet (Ca^{2+}첨가)<washed platelet(Ca^{2+}비첨가)의 순으로 증가하는 경향을 나타내었다. 마늘 추출물을 사용한 이러한 결과가 다른 화학물질에서도 나타나는지

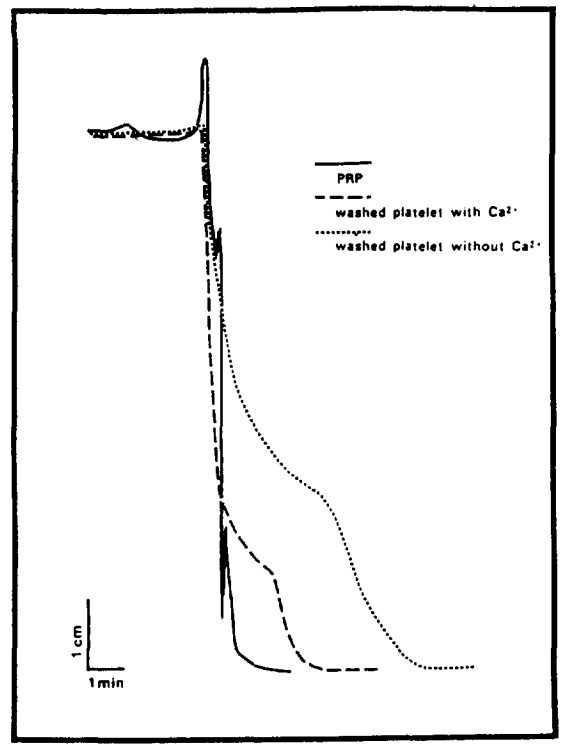

Fig. 1. Platelet aggregation induced by thrombin under three different preparations of platelets.

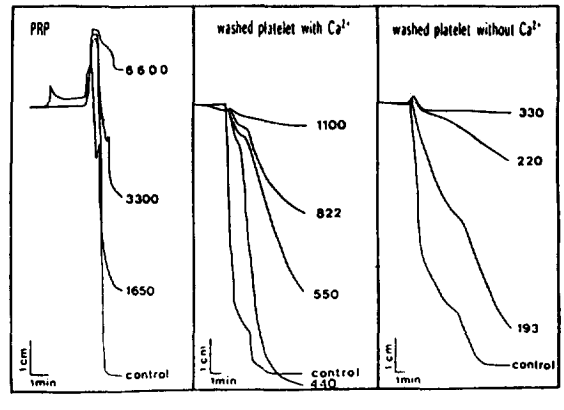

Fig. 2. Effects of extracts of garlic on platelet aggregation under three different preparations of platelets. The values are expressed as microgram per milliliter of total volume.

알아보기 위해, 마늘 추출물과는 다른 기전으로 혈소판 응집을 억제하는 menadione(vitamin K_3)과 propranolol에 대해서도 실험을 수행하였다. 마늘은 fibrinogen과 혈소판의 결합을 억제하고 혈소판 막의 microviscosity를 변화시켜 혈소판응집을 억제하는데 비해,[9,10] menadione은 oxidative stress에 의해 혈소판의 cytoskeleton을 손상시키고, phosphoinositides의 분해를 억제함으로써,[11-15] propranolol은 혈소판막의 안정화 작용에 의해 혈소판 응집을 억제한다.[16,17] Menadione은 마늘 추출물과 마찬가지로 용량 의존적으로 혈소판 응집을 억제하였다(Fig. 3). 또한 혈소판 응집을 완전히 억제하는 menadione농도가 PRP, washed platelet(Ca^{2+}), washed platelet(Ca^{2+} 비첨가)에서 각각 600 μg/ml, 150 μg/ml, 100 μg/ml로 나타나 마늘 추출물과 비슷한 경향을 나타내었다. 한편 propranolol도 용량 의존적으로 혈소판 응집을 억제하였고, 혈소판 분리 세가지 조건에서 마늘 추출물이나 menadione과 같은 경향을 나타냈다(Fig. 4).

이상의 실험으로부터 마늘 추출물, menadione (vitamin K_3), propranolol의 IC_{50}을 산출하여 Table 1에 나타냈다. 그 결과 서로 다른 기전으로 혈소판 응집을 억제하는 마늘 추출물, menadione, propranolol 모두 PRP에서보다 washed platelet에서 유의적인 IC_{50} 값의 감소를 나타냈으며, 마늘 추출물과 menadione의 경우 washed platelet(Ca^{2+} 첨가)에서보다 washed platelet(Ca^{2+}비첨가)에서 IC_{50}값이 더 낮았다. 또한 propranolol의 경우도 비록 유의성은 없었지만 washed platelet(Ca^{2+}비첨가)에서 가장 낮은 IC_{50} 값을 나타냈다.

혈소판의 특징 중의 하나는 많은 secretable granule을 지니고 있다가, 활성화되면 이들을 분비하는 것이다. 이렇게 분비된 granule의 내용물에는 ATP,

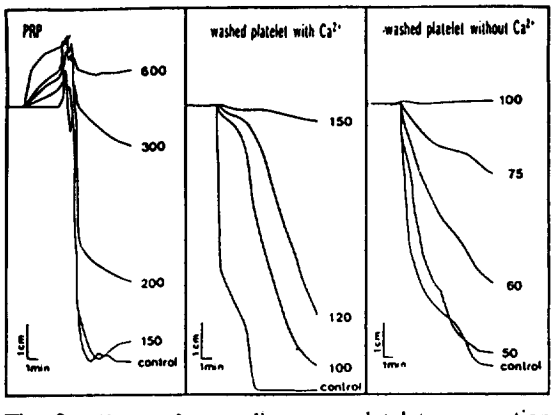

Fig. 3. Effects of menadione on platelet aggregation under three different preparations of platelets. The values are expressed as microgram per milliliter of total volume.

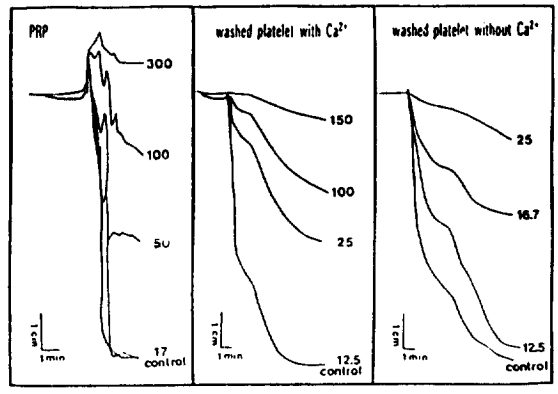

Fig. 4. Effects of propranolol on platelet aggregation under three different preparations of platelets. The values are expressed as microgram per milliliter of total volume.

Table 1. IC_{50} values for the inhibitory effect of garlic extracts, menadione and propranolol on platelet aggregation

	garlic extracts (μg/ml)	menadione (μg/ml)	propranolol (μg/ml)
PRP	2,348±325	136±23	252±18*
Washed platelet (with Ca^{2+})	851±43*	59±4*	123±15*
Washed platelet (without Ca^{2+})	221±22*,+	16±6*,+	84±4*

Values are means ± standard error for more than four experiments. * indicates siginificant difference from washed platelet with Ca^{2+} (two-way ANOVA followed by Fisher's LSD multiple range tes, $p<0.05$)

ADP, serotonin, Ca^{2+}, PDGF등이 있는데, 이들은 다른 혈소판이나, 혈장 단백, 혈관벽 등과 반응하여 혈전생성, fibrinolysis의 조절, 혈관벽 재생 등에 관여한다.[1,2] 혈소판이 활성화될 때 나타나는 granule secretion은 ATP release나 유리된 serotonin의 양을 측정하면 알 수 있다. 혈소판 활성을 나타내는 또 다른 지표인 granule secretion에도 위의 혈소판 응집 억제 실험과 같은 경향이 나타나는지 알아보기 위해 마늘추출물의 granule secretion 억제능을 혈소판 분리 세가지 조건에서 ATP release 실험을 통해 비교하여 보았다. 먼저 혈소판 응집능 실험에 사용하였던 thrombin 1.2 units로 혈소판 분리 세가지 조건하에서 ATP release를 유도한 결과 Fig. 5와 같은 결과가 나타났다. 유리된 ATP량을 산출한 결과 PRP에서는 8 nM ATP/(5×10^8 혈소판), washed platelet (Ca^{2+}첨가)에서는 12 nM ATP/(5×10^8 혈소판), 그리고 washed platelet(Ca^{2+}비첨가)에서는 11 nM ATP/(5×10^8 혈소판)로 나타났다. PRP에서의 ATP release량이 washed platelet에서와 비교해 낮았는데, 이것은 luciferin-luciferase를 이용한 ATP release 측정에서 PRP중에 존재하는 혈장 인자들에 의해 luciferin-luciferase와 ATP의 반응이 방해받아 실제보다 낮게 측정되었기 때문으로 추측된다. 실제로 PRP에서 ATP와 luciferin-luciferase반응에 의한 luminescence측정시 측정 감도를 washed platelet에 비해 20배 증가시켜야 했다. 마늘 추출물의 ATP release억제 실험을 한 결과, 마늘 추출물은 PRP, washed platelet(Ca^{2+}첨가), washed platelet(Ca^{2+}비첨가)등 혈소판 분리 세가지 조건에서 농도 의존적으로 ATP release를 억제하였다(Fig. 6). IC_{50}을 구한 결과, PRP>washed platelet(Ca^{2+}첨가)>washed platelet(Ca^{2+}비첨가)의 순으로 유의적인 감소 현상을 보였다. 따라서 혈소판 응집과 ATP release 억제 실험에서 Ca^{2+}이 첨가되지 않는 washed platelet를 사용하는 것이 가장 효과적임을 나타내고 있다 (Table 2).

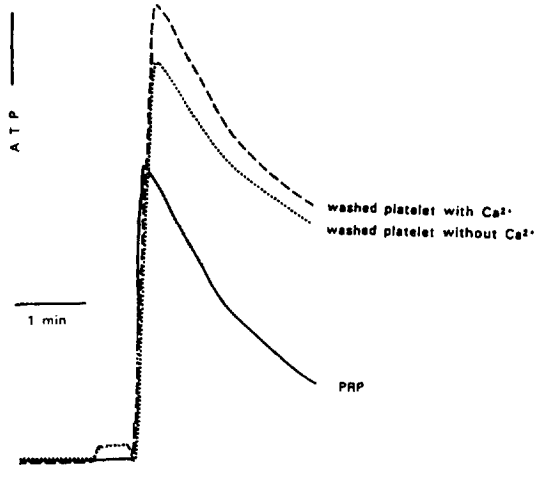

Fig. 5. ATP release induced by thrombin under three different preparations of platelets.

Tamura등[18,19]은 혈장 중의 albumin농도를 낮추었을 때 phenytoin 및 chlorpromazine의 농도가 증가하는 것을 관찰하였다. 따라서 PRP와 washed platelet에서 나타나는 혈소판응집 억제능의 차이가 PRP중에 존재하는 albumin등 혈장 단백과 약물의 결합에 의한 유효 약물 농도가 감소하기 때문이라고 추정되어 다음 실험을 수행하였다. Washed platelet(Ca^{2+}비첨가)에 albumin을 가해 최종 농도를 albumin의 생리적 농도인 0.35% 그리고 10배량인 3.5%로 만든 후, 마늘 추출물과 menadione(vitamin K_3)을 가해 혈소판 응집 억제 실험을 하였다. 그 결과 마늘 추출물은 albumin 농도 의존적인 IC_{50}의 증가를 보였고, mena-

Table 2. IC_{50} values for the inhibitory effect of garlic extracts on ATP release

	PRP	washed platelet (with Ca^{2+})	washed platelet (without Ca^{2+})
garlic extracts (μg/ml)	3,790±175	374±57*	218±100*,+

Values are means ± standard error for more than three experiments. * indicates siginificant difference from PRP. + indicates significant difference from washed platelet with Ca^{2+} (two-way ANOVA followed by Fisher's LSD multiple range test, $p<0.05$)

Table 3. Effects of albumin in washed platelet on the inhibitory effects of garlic extracts and menadione

	garlic extracts (μg/ml)	menadione (μg/ml)
control	221±22	16±6
0.35% albumin	372±16*	28±2
3.50% albumin	1,555±72*	167±2*+

Values are means ± standard error for more than four experiments. * indicates siginificant difference from PRP. + indicates significant difference from washed platelet with Ca^{2+} (two-way ANOVA followed by Fisher's LSD multiple range test, $p<0.05$)

dione은 3.5% albumin에서 control에 대해 유의적인 IC_{50}증가를 나타내었다(Table 3). 이러한 결과는 albumin등 혈장단백과 화학물질의 결합에 의한 유효 농도감소가 PRP와 washed platelet에서 나타나는 혈소판 응집 억제능 차이의 한 원인임을 제시한다.

본 실험에서 마늘 추출물과 menadione의 혈소판 응집 억제능은 washed platelet에 1 mM Ca^{2+}첨가 여부에 따라 유의적인 차이를 나타냈다(Table 1). 마늘 추출물의 ATP release 억제능도 washed platelet(Ca^{2+}비첨가)에서 washed platelet(Ca^{2+}첨가)에 비해 유의적인 증가를 나타냈는데 그 이유를 다음과 같이 추정해 볼 수 있다. 혈소판 응집 정도와 혈소판 세포질 내 free Ca^{2+}농도는 상관 관계를 나타내는데,[20] 혈소판 내 Ca^{2+} 농도의 증가는 혈소판 내의 dense tubular system에서 혈소판 세포질로의 유리와 세포외액으로부터 유입에 의한 것이다.[21] 만약 medium중에 Ca^{2+}을 넣지 않고 thrombin으로 자극하면 혈소판 내의 Ca^{2+}농도가 0.8-2 μM 정도 증가에 그치는데 반해, medium에 Ca^{2+} 1 mM를 가하고 thrombin으로 자극하면 2-4 μM로 더 많이 증가한다.[22,23] 이상과 같은 사실로부터 medium중에 Ca^{2+}이 없으면 thrombin에 의한 혈소판 세포질 내 Ca^{2+} 증가가 적어져서 혈소판 응집능이 상대적으로 약화되어 화학물질에 의한 혈소판 응집 억제효과가 강화되리라 추정된다. 그 증거로써 Castro는 prostacycline, forskolin 등 혈소판 내 Ca^{2+}농도를 감소시키는 화학물질이 ajoene(마늘 추출물)의 혈소판 응집 억제 효과를 강화시켜 IC_{50} 값을 낮춘다는 것을 보고 하였다.[24] 또한 thrombin에 의한 serotonin release도 외부 Ca^{2+} 존재여부에 따라 그 정도가 달라짐이 관찰되었다.[20]

이상과 같은 결과를 종합하면 1) 혈소판 분리 세가지 조건 중 washed platelet(Ca^{2+}비첨가)가 식품에 의한 혈소판 응집 억제 효과 및 ATP release억제능 검색에 가장 효율적으로 사용될 수 있으며 2) albumin등 혈장 단백질과 화학물질간의 단백 결합에 의한 유효 농도 감소가 PRP와 washed platelet의 식품의 혈소판 응집 억제 작용에 대한 민감도 차이의 한 원인으로 추정된다. 이러한 효율적인 검색방법을 통하여 식품에 의한 혈소판 응집 억제능을 실험할 수 있으며 더욱 나아가 심혈관 질환예방에 응용될 수 있다.

국문 요약

본 연구에서는 마늘 메탄올 추출물의 혈소판 응집 억제능을 platelet rich plasma(PRP), washed platelet(Ca^{2+}비첨가), washed platelet(Ca^{2+}첨가) 등 세가지 분리 조건을 사용하여 실험하였다. 그 결과 마늘 추출물의 IC_{50}이 각각 2348 μg/ml, 221 μg/ml, 851 μg/ml로서, washed platelet(Ca^{2+}비첨가)가 마늘 추출물의 혈소판 응집 억제 작용에 가장 민감한 것으로 나타났다. 또한 마늘 추출물과는 다른 기전으로 혈소판 응집 억제 효과를 나타내는 menadione(vitamin K_3)과 propranolol도 이와 동일한 경향을 나타냈다. 혈소판 활성을 나타내는 또다른 지표인 granule secretion에 미치는 마늘 추출물의 영향을 혈소판 분리 세가지 조건에서 ATP release실험을 통해 검색하였다. 그 결과 ATP release를 50%억제하는 마늘 추출물의 용량이 PRP>Washed platelet(Ca^{2+}첨가)>washed platelet

(Ca^{2+}비첨가)순으로 감소하여 혈소판 응집 실험에서와 같은 경향을 보였다. 실험 조건에 따른 이러한 차이가 PRP중에 존재하는 알부민 등과의 단백 결합에 의한 화학물질의 유효농도 감소에 기인한다고 추정되어, washed platelet에 여러 농도의 알부민을 첨가하여 혈소판 응집 억제 실험을 실시한 결과 IC_{50}은 알부민 농도 의존적으로 증가하였다. 혈소판 응집과 함께 혈소판 기능 변화를 측정하는 지표인 혈소판 분비능을 분비된 ATP를 luciferin-luciferase로 측정하여 알아보았다. thrombin에 의한 혈소판의 ATP유리에 미치는 마늘 추출물의 영향을 위의 세 실험 조건에서 실험하여 IC_{50}을 비교한 결과 그 값이 washed platelet에서 가장 낮고 PRP에서 가장 높아, 혈소판 응집 억제 실험과 동일한 결과를 나타내었다. 이상의 결과는 세가지 혈소판 분리 조건 중 washed platelet(Ca^{2+}비첨가)가 식품에 의한 혈소판 기능 억제 실험에 가장 효율적임을 제시하고 있으며, 그 주요한 원인은 알부민 등 단백 결합에 의한 유효 화학물질 농도 감소 때문이라고 추정된다.

참고 문헌

1. Mustard, J.F. and Packham, M.A. : Factors influencing platelet function : adhesion, release and aggregation. *Pharmacol. Rev.*, **22**, 97(1970).
2. Longenecker, G.L. : *The platelets : physiology and pharmacology*, part 17, Orlando, Academic Press INC., 1985.
3. Morimitsu, Y. and Kawakishi, S. : Inhibitors of platelet aggregation from onion, *Phytochemistry*, **29**, 3435(1990).
4. Chen, C.H. and Huang, T.F. : Antiplatelet actions of paraxynol and ginsenosides isolated from ginsen. *Biochim. Biophy. Acta*, **990**, 315(1989).
5. Hawiger, J. : *Platelets : receptors, adhesion, secretion*, part 10, San Diego, Academic Press, INC., (1989).
6. Castro, R.A., Cabrera, S., Cruz, M.R., Ledezma, E. and Jain, M.K. : Effects of garlic extracts and of three pure components isolated from it on human platelet aggregtion, arachidonate metabolism, release reaction and platelet ultrastructure, *Thromb. Res.*, **32**, 155(1983).
7. Block, E., Ahmad, S., Catalfamo, J.L., Jain, M.K. and Castro, R.A : Antithrombitic organosulfur compounds from garlic : Structural, mechanical and synthetic studies, J. ynthetiand, cudies, *J. Chem. Am. Soc.*, **108**, 7045(1986).
8. Feinman, R.D, Lubowasky, J., Charo, I. and Zabinski, M.P. : The lumi-aggregometer : a new instrument for simultaneous measurement of secretion and aggregation by platelets, *J. Lab. Clin. Med.*, **90**, 125(1977).
9. Castro, R.A., Ledezma, E., Escalante, J. and Jain, M.K. : The molecular basis of the antiplatelet action of ajoene : direct interaction with the fibrinogen receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **141**, 145(1986).
10. Rendu, F., Daveloose, D., Debouzy, J.C., Bourdeuau, N., Toledano, S.L., Jain, M.K. and Castro, R.A. : Ajoene, the antiplatelet compound derived from garlic, specifically inhibits platelet release reaction by affecting the plasma membrane internal microviscosity, *Biochem. Pharmcol.*, **38**, 1321(1989).
11. Bellomo, G., Mirabelli, F., Vairetti, M., Iosi, F. and Malorni, W. : Cytoskeleton as a target in menadione-induced oxidative stress in cultured mammalian cells. I. biochemical and immunocytochemical features, *J. Cell. Physiol.*, **143**, 118(1990)
12. Mirabelli, F., Salis,, A., Vairetti,, M., Bellomo,, G., Thor, H. and Orrenius, S. : Cytoskeletal alterations in human platelets exposed to oxidative stress are mediated by oxidative and Ca^{2+}-dependent mechanisms, *Arch. Biochem. Biophys.*, **270**, 478(1989).
13. Shakarjian, M.P. and Carchman, RiA. : Alteration of human granulocyte functional responses by menadione, *Arch. Biochem. Biophys.*, **283**, 1(1990).

14. Ko,, F.N., Sheu,, S.J., Lie,, Y.M., Huang, T.F. and Teng, C.M. : Inhibition of rabbit platelet aggregation by 1,4-naphthoquinones, *Thromb. Res.*, **57**, 453(1990).
15. Blackwell, G.J., Radomski, M. and Moncada, S. : Inhibition of human platelet aggregation by vitamin K, *Thromb. Res.*, **37**, 103(1985).
16. Vanderhoek, J.Y. and Feinstein, M.B. : Local anesthetics, Chlorpromazine and propranolol inhibit stimulus activation of phospholipase A_2 in human platelet, *Mol. Pharmacol.*, **16**, 171(1978).
17. Ruegni, M., Provvedi,, D., Bellini, P.G., Bandinelli, C. and De Mauro, G. : Propranolol and platelet aggregation, *Circulation*, **52**, 964(1975).
18. Tamura,, A., Sugimoto, K., Sato, T. and Fujii, T. : The effects of haematocrit, plasma protein concentration and temperature of drug-containing blood in vitro on the concentrations of the drug in the plasma, *J. Pharm. Pharmacol.*, **42**, 577(1990).
19. Melten, J.W., Wittebrod, A.J., Wemer, J., Faber, D.B. : On the modulating effects of temperature, albumin, pH and calcium on the free fraction of phenobarbitone and phenytoin. *J. Pharm. Pharmacol.*, **38**, 643(1986).
20. Rink, T.J., Smith, S.W. and Tsien, R.Y. : Cytoplasmic free Ca^{2+} thresholds and Ca-independent activation for shape-change and secretion, *FEBS Lett.*, **148**, 21(1982).
21. Sage,, S.O., Reast, R. and Rink, T.J. : ADP evoke s biphasic Ca^{2+} influx in fura-2-loaded human platelets, *Biochem. J.*, **265**, 675(1990).
22. Johnson, P.C., Ware, J.A., Cliveden, P.B., Smith, M., Dvorak, A.M. and Salzman, E.W. : Measurment of ionized calcium in blood platelets with the photoprotein aequorin, *J. Biol. Chem.*, **260**, 2069(1985).
23. Sage, S.O., Merritt, J.E., Hallam, T.J. and Rink, T.J. : Receptor-mediated calcium entry in fura-2-loaded human platelets stimulated with ADP and thrombin, *Biochem. J.*, **258**, 923(1989).
24. Apitz-Castro, R., Escalante, J., Vargas, R. and Jain, M.K. : Ajoene, the antiplatelet principle of garlic, synergistically potentiates the antiaggregatory action of prostacyclin, forskolin, indomethacin and dypiridamole on human platelets, *Thromb. Res.*, **42**, 303(1986).