



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학석사학위논문

천연물 유래 합성물질의 shear stress에 의한  
혈소판 활성화 억제작용

Inhibitory Effects of Natural Product Derivatives  
on Shear Stress-Induced Platelet Aggregation

2017년 8월

서울대학교 대학원  
약학과 예방약학전공  
노 학 준

## 초 록

혈소판은 생체 내 주요 방어기전인 지혈 작용에 있어서 주요한 역할을 하지만, 혈소판이 과도하게 활성화되는 경우 혈전 생성을 발생시켜 관상동맥 질환, 심근경색, 뇌졸중과 같은 다양한 심혈관계 질환으로 발전할 수 있다. 그리고 심혈관계 질환은 전 세계 사망 원인의 가장 큰 부분을 차지하고 있다. 따라서 다양한 항혈소판제제들이 혈전 질환 및 심혈관계 질환의 치료 및 예방을 위해 이용되었다.

Aspirin, Clopidogrel 등의 기존 항혈소판제제의 경우 심혈관계 질환에 대한 치료 및 예방 효과가 입증됐지만, 동시에 정상적인 지혈작용을 저해함으로써 출혈 부작용을 가지는 것으로 알려져 있다. 따라서 정상적인 지혈작용에는 영향을 주지 않으면서 병적인 혈전의 생성은 저해할 수 있는 더욱 안전한 항혈소판제제를 개발하는 것이 필요하다.

혈소판은 생리적인 agonist 들인 thrombin, adenosine diphosphate (ADP), collagen 등과 혈류에 의한 물리적인 shear stress 의해 활성화된다. shear stress에 의한 혈소판 응집은 다른 agonist 들에 의한 혈소판 응집과는 달리 정상적인 지혈작용에는 크게 관여하지 않지만, 병적인 상태에서의 혈전 생성에 주로 관여한다. 그래서 shear stress-induced platelet aggregation(SIPA)은 새로운 항혈소판제의 주요 개발 목표로 여겨지고 있다.

12 종의 천연물 유래 합성물질의 SIPA에 대한 혈소판 응집 억제 효과를 관찰하기 위하여 다음의 연구를 수행하였다. 천연물 유래 합성물질을 사람의 platelet rich plasma (PRP)에 가한 후 SIPA에 대한 효과를 확인해 보았다. 그 결과 MG1002, 1009 이 가장 큰 억제 효과를 보였으며, 그 효과는 농도 의존적이었다. 물리적 요인인 SIPA에 대한 효과와 생리적인 agonist (thrombin, ADP, collagen)에 의한 혈소판 응집에 대한 효과를 비교해 보았다. 그 결과, agonist 에 의한 혈소판 응집에서 MG1002, 1009는 혈소판 응집 억제 효과가 나타나지 않았지만, SIPA에서 MG1002, 1009에 의한 억제 효과가 특이적으로 나타났다. 혈소판에 대한 세포독성 지표인 lactate dehydrogenase (LDH) leakage를 확인해 본 결과 세포 독성은 나타나지 않았다.

그리고 platelet poor plasma (PPP)에서의 prothrombin time (PT)와 activated partial thromboplastin time (aPTT)에 영향을 주지 않는 것을 확인함으로써 지혈시간 지연 작용에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다.

MG1002, 1009의 SIPA 억제 효과가 실제 생체 내에서 혈전 생성에 어떤 영향을 주는지 확인하고자 *in vivo* arterial thrombosis model을 이용하였다. MG1002, 1009을 경구 투여하고 FeCl<sub>3</sub>를 적용한 후 혈전 생성으로 인한 혈류 속도의 변화를 관찰하였다. 그 결과 MG1009는 혈류가 멈추는데 걸리는 시간인 occlusion time을 지연시켰으며, 이는 혈전 생성을 저해함을 의

미한다. 또한 항혈소판제제의 대표적인 부작용인 bleeding time의 문제점을 검증하기 위해서 *in vivo* tail bleeding time model을 이용하였다. MG1002, 1009 모두 bleeding time을 지연시키지 않았다.

결론적으로 MG1009는 신체 내에서 중요한 혈소판 활성화 요인 중 하나인 shear stress에 의해 유도되는 혈소판의 활성화와 응집에 대해서 특이적인 억제 효과를 보였으며, 출혈 부작용 없이 혈소판이 주요한 역할을 하는 혈전 생성을 저해하였다. 이는 심혈관계, 특히 shear stress와 관련된 질환들의 예방 및 치료와 관련해 유용하게 활용될 수 있다고 사료된다.

주요어: 천연물 유래 합성물질, 혈소판, 혈소판 응집, shear stress, 혈전 생성, bleeding time

## 목 차

|                           |             |     |
|---------------------------|-------------|-----|
| 초                         | 록           | i   |
| 목                         | 차           | v   |
| List of Figures and Table |             | vi  |
| List of Abbreviations     |             | vii |
| 서                         | 론           | 1   |
| 실                         | 험           | 3   |
| 방                         | 법           | 3   |
| 시                         | 약           | 4   |
| 및                         | 기           | 4   |
| 기                         |             | 4   |
| 혈                         | 액           | 5   |
| 시                         | 료           | 5   |
| 의                         | 준           | 5   |
| 비                         |             | 5   |
| Shear                     | stress      | 6   |
| 의                         | 적           | 6   |
| 용                         |             | 6   |
| Shear-Induced             | Platelet    | 6   |
| Aggregation               | (SIPA)      | 6   |
| 측                         | 정           | 6   |
| Agonist-Induced           | Aggregation | 7   |
| 측                         | 정           | 7   |
| Cytotoxicity              | 측           | 8   |
| 정                         |             | 8   |
| 혈                         | 관           | 9   |
| 조                         | 직           | 9   |
| 분                         | 리           | 9   |
| 혈                         | 관           | 10  |
| 의                         | 수           | 10  |
| 축                         | 력           | 10  |
| 측                         | 정           | 10  |
| <i>In vivo</i>            | 동           | 11  |
| 맥                         | 혈           | 11  |
| 전                         | 생           | 11  |
| 성                         | 능           | 11  |
| 측                         | 정           | 11  |
| <i>In vivo</i>            | 혈           | 12  |
| 액                         | 응           | 12  |
| 고                         | Bleeding    | 12  |
| time                      | 측           | 12  |
| 측                         | 정           | 12  |
| 통                         | 계           | 13  |
| 처                         | 리           | 13  |
| 실                         | 험           | 14  |
| 결                         | 과           | 14  |
| 고                         | 찰           | 26  |
| 참                         | 고           | 30  |
| 문                         | 헌           | 30  |
| Abstract                  |             | 33  |

## List of Figures and Table

Figure 1. Inhibitory effects of MGs on Shear Stress-Induced Platelet Aggregation in human platelet rich plasma.

Figure 2. Inhibitory effects of MG1002, 1009 in various concentration on SIPA in human PRP and WP.

Figure 3. Effects of MG1002, 1009 on agonist-induced platelet aggregation in human PRP.

Figure 4. Effects of MG1002, 1009 on Cytotoxicity.

Figure 5. Effects of MG1002, 1009 on coagulation.

Figure 6. Effects of MG1009 on Phenylephrine induced contraction in rat aortic ring.

Figure 7. Effects of MG1002, 1009 on thrombus formation in rat in vivo arterial thrombosis model.

Figure 8. Effects of MG1002, 1009 on thrombus formation in rat in vivo tail bleeding time measurement.

Table 1. Comparison of inhibitory effects by MG1002, 1009 on SIPA and agonist-induced platelet aggregation in human PRP.

## List of Abbreviations

|                  |   |  |
|------------------|---|--|
| ACD              | : | acid citrate dextrose                                    |
| ADP              | : | adenosine diphosphate                                    |
| aPTT             | : | activated partial thromboplastin time                    |
| DMSO             | : | dimethyl sulfoxide                                       |
| EDTA             | : | ethylene diaminetetraacetic acid                         |
| GP               | : | glycoprotein   |
| LDH              | : | lactate dehydrogenase                                    |
| $\beta$ -NADH    | : | $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form |
| PE               | : | phenylephrine  |
| PGE <sub>1</sub> | : | prostaglandin E <sub>1</sub>                             |
| PPP              | : | platelet poor plasma                                     |
| PRP              | : | platelet rich plasma                                     |
| PT               | : | prothrombin time   |
| vWF              | : | von Willebrand factor                                    |
| WP               | : | washed platelets   |



## 서 론

혈액의 구성 성분으로 혈액 응고에 중요한 역할을 하는 혈소판은 골수의 거핵세포 (megakaryocyte)로부터 분화되어 생성되며 혈류를 따라 전신을 순환하는 혈액 세포로(Hartwig and Italiano, 2003) 활성화되어 지혈작용 (haemostasis)과 혈전생성작용 (thrombosis)에 중요한 역할을 담당한다(Ni and Freedman, 2003). 이러한 작용은 혈소판 응집 및 혈소판과 인접 조직과의 상호작용을 통해 이루어진다(Andrews and Berndt, 2004). 지혈작용의 경우 혈관 손상에 의한 내피 하층 (subendothelium)의 노출로 인해 collagen이 혈류에 노출되거나, 여러 자극에 의해 thrombin 등 활성화 물질이 증가하면, 혈소판 활성화가 유발된다. 혈소판의 활성화는 subendothelium의 collagen과 von Willebreand Factor (vWF)를 매개로 한 subendothelium에의 부착 (adhension), 분비 (secretion) 및 응집(aggregation)이라는 일련의 순서를 통해 혈소판 응집체 (aggregate)까지 형성하는 과정을 말한다. 여러 요인들에 의해 혈소판이 과도한 활성화가 일어나면, 관상동맥 혈전증, 뇌졸중 (stroke), 동맥경화 (atherosclerosis) 등의 심혈관계질환을 일으킨다(Michelson, 2004).

혈소판을 활성화시키는 요인에는 생리적 agonist에 의한 요인과 혈류에 의해 유발되는 물리적 요인인 shear stress가 있다. 이전에 심혈관계 연구에 있어서 thrombin, adenosine diphosphate (ADP), collagen, arachidonic acid 등의 생리

적 agonist에 의한 혈소판 활성화에 관한 연구가 많이 이루어져 왔다(Jackson, 2007). 물리적 요인인 shear stress는 agonist에 의한 혈소판 활성화와는 다른 기전을 통해 혈소판 활성화를 유발하며(Kulkarni et al., 2000), 혈류에 의해 유발되는 환경을 반영하기 유리하다(Kroll et al., 1996). 이러한 이유로 shear stress에 의해 유도된 혈소판 응집을 shear stress-induced platelet aggregation(SIPA)이라 정의하고 최근 많은 관심을 가지고 있다. Shear stress는 혈류에 의해 작용되는 단위 면적당 힘이라 정의하며, 점성이 있는 혈액의 흐름에 의해 혈과 내피세포 (endothelial cell)나 혈소판, 적혈구 등의 혈액 세포에 가해지는 힘을 의미한다(Hanson and Sakariassen, 1998). 일반적으로 정맥에서는  $20\sim 200\text{ s}^{-1}$ , 동맥에서는  $300\sim 800\text{ s}^{-1}$ , 미세 혈관에서는  $500\sim 1,600\text{ s}^{-1}$  정도의 shear rate가 나타나며, 동맥경화나 뇌경색 등의 질환과 같이 병적인 상태의 협착성 혈관에서는  $10,800\text{ s}^{-1}$  이상까지 shear rate가 증가한다(Kroll et al., 1996). 따라서 협착성 혈관에서는 SIPA가 증가하면, 혈전의 생성이 증가하게 된다(Holme et al., 1997).

기존의 항 혈소판 제제로 사용되었던 약물들에 대해서 SIPA에 어떤 효과가 있는 지 확인된 바 있다. 대표적인 항 혈소판 제재인 aspirin과 SIPA에 효과가 없으며(Nesbitt et al., 2009; Tanigawa et al., 2000), ticlopidine(Matsumoto et al., 2005), abciximab, eptifibatide, tirofiban(Derhaschnig et al., 2004; Goto et al., 2003; Haga et al., 2002; Wang et al., 2002), cilostazol(Minami et al., 1997) 등

은 SIPA 또한 억제하는 것으로 보고된 바 있다. 그리고 최근 여러 천연물과 그로부터 분리한 유효 성분들이 SIPA억제 효과와 혈전 생성 저해 효과가 있다고 보고 되고 있다.

Protocatechuic acid는 전통적으로 한약재로 사용되어온 금은화의 유효 성분으로 혈액순환 개선에 도움을 준다고 알려진 천연물 추출물이다. 여러 연구들을 통해 Protocatechuic acid가 항 혈소판, 항 혈전 작용이 있다고 보고된 바 있다 (Kim et al., 2012). 본 연구에서는 Protocatechuic acid의 유래 합성물질 12종을 사용하여 SIPA에 대한 작용을 검색하였다. 그리고 혈전 생성에 주는 영향에 대해 연구해보았다.

## 실 험 방 법

### 시약 및 기기

Bovine Serum albumin, ADP, thrombin, EDTA, Triton X-100,  $\beta$ -NADH, Ferric chloride 그리고 50% glutaraldehyde 등은 Sigma Chemical Co. (St Louis, USA), Collagen은 Chrono-Log Corp에서 구입하였고, von Willebrand factor (vWf)는 Calbiochem (San diego, USA)에서 구입하였으며, MG 유도체 화합물은 신풍제약 으로부터 공급받아 사용하였다. 그 밖의 시약은 모두 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

### 실험동물

Sprague-Dawley 수컷 흰쥐를 영바이오 (Korea)로부터 공급받아, 서울대학교 약학대학 실험동물실에서 일주일 가량 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사육실은 온도  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 습도 45-55%를 유지하였으며, 오전 7시 30분과 오후 7시 30분을 기준으로 하여 밤낮을 조절하였다. 사료(애그니브랜드, 퓨리나코리아)와 물은 제한 없이 공급하였다.

## 혈액 시료의 준비

Platelet rich plasma (PRP)를 분리하기 위하여, 2주일 이상 약물을 복용하지 않은 건강한 남성의 정맥으로부터 3.2% sodium citrate를 항응고제로 하여 혈액을 채취한다. 실험 전 과정에 걸쳐서 유리 용기나 유리 pipette의 사용은 피하였으며. 혈소판 분리의 전 과정은 상온에서 수행한다. 채혈 후 150g에서 15분간 원심 분리한 후 상층액 (PRP)을 얻고 잔사를 2000g에서 20분간 원심 분리하여 platelet poor plasma (PPP)를 얻는다. 이와 같이 얻은 PRP의 혈소판 수는 hemacytometer를 이용하여 광학 현미경으로 세며. PRP를 PPP로 희석하여 1 ml당  $3 \times 10^8$ 개의 혈소판이 포함되도록 한 후 실험에 사용하였다.

Washed platelet (WP)를 분리하기 위하여, 2주일 이상 약물을 복용하지 않은 건강한 남성의 정맥으로부터 acid-citrate-dextrose(ACD)를 항응고제로 하여 혈액을 채취한다. 채혈 시 prostaglandin E1(PGE<sub>1</sub>) 1M을 처리하여 혈소판의 활성화를 억제하였다. 채혈한 혈액을 150g에서 15분간 원심 분리하여 상층액에서 PRP를 얻고, 이를 500g에서 10분간 원심 분리하여 혈소판 pellet을 얻는다. 이를 washing buffer (134 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10.0mM HEPES, 5.0 mM dextrose, 12.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.34mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10% ACD, 0.3% bovine serum albumin, 1M PGE<sub>1</sub>, pH7.4)로 현탁하여 세척한 후, 다시 400g에서 10분간 원심분리한다. 여기서 얻어진 혈소판 pellet을 suspension

buffer (134 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10.0 mM HEPES, 5.0 mM dextrose, 12.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% BSA, pH7.4)로 현탁한다. WP 중의 혈소판 수는 hemacytometer를 이용하여 광학 현미경으로 세며. suspension buffer로 희석하여 1 ml당  $3 \times 10^8$ 개의 혈소판이 포함되도록 한 후 실험에 사용한다. WP의 경우 CaCl<sub>2</sub>를 최종 농도가 2 mM이 되도록 가한 후 실험에 사용한다.

### Shear stress의 적용

시료 500  $\mu$ l를 cone-plate viscometer (RotoVisco 1, Haake, Germany)에 올린 후  $10,800 \text{ s}^{-1}$ 의 shear rate로 37°C에서 3분 동안 shear stress를 준다. Shear stress에 의한 혈소판의 응집 효과를 측정하기 위하여, WP의 경우 vWF를 최종 농도가 10  $\mu$ g/ml가 되도록 가하고 shear stress를 준다. 각각의 실험에서 shear stress를 가하지 않은 대조군은 시료를 cone-plate viscometer에 올린 후, cone을 회전시키지 않은 것으로 한다.

### Shear stress-induced Platelet Aggregation (SIPA)

PRP 또는 WP 598.5  $\mu$ l에 DMSO 또는 후보물질을 1.5  $\mu$ l 가하고 thermomixer를 이용하여 37°C에서 3 분간 배양한다. WP의 경우에는 배양한 WP 495  $\mu$ l를 100  $\mu$ g/ml vWF 55  $\mu$ l에 가하여 최종 농도가 10  $\mu$ g/ml가 되도록

한다. 그리고 PRP 또는 WP 500  $\mu$ l를 cone-plate viscometer에 올린 후 10,800  $s^{-1}$ 의 shear rate로 37 $^{\circ}$ C에서 3분 동안 shear stress를 준다. Shear stress를 가한 후, 20  $\mu$ l의 PRP를 0.5% glutaraldehyde를 포함한 Isoton II buffer 280  $\mu$ l에 넣어 고정시킨다. 그 후 이 현탁액 중에 단독 존재하는 혈소판 수를 hemacytometer를 이용하여 광학 현미경으로 세어, aggregation 정도를 다음과 같이 표현한다.

$$\text{Aggregation (\%)} = (1 - A/A_0) \times 100$$

$$\text{Inhibition (\%)} = (\text{Aggregation \% of sample} / \text{Aggregation \% of control})$$

$$\text{Maximal Inhibition (\%)} = \text{Inhibition} \times 2$$

A: 후보물질을 가한 후 shear stress를 준 sample의 혈소판 수

A<sub>0</sub>: Shear stress를 주지 않은 sample의 혈소판 수

### Agonist에 의한 후보물질 selectivity 평가

후보물질의 agonist에 의한 selectivity를 평가하기 위하여 혈소판의 응집 정도를 lumi-aggregometer (Chrono-Log Co., USA)를 이용하여 turbidity 변화로써 측정한다. PRP의 light transmission을 0%, PPP의 light transmission을 100%로 맞춘 후, 37 $^{\circ}$ C에서 혈소판의 aggregation 정도에 따른 light transmission을 측

정한다. 측정 시 silicon으로 코팅된 aggregometer cuvette을 사용하며, 반응이 일어나는 동안 1,000 rpm에서 지속적으로 교반한다.

PRP 598.5  $\mu$ l에 DMSO 또는 후보물질을 1.5  $\mu$ l 가하고 thermomixer를 이용하여 37°C에서 3분간 배양한다. 배양한 PRP 500  $\mu$ l를 aggregometer cuvette에 넣고 1분간 pre-incubation하여 37°C가 되게 한 다음 혈소판 응집 유발 시료인 thrombin, ADP 그리고 collagen을 최대응집을 일으키는 최소농도를 가한다. 이후 thrombin은 6분, ADP 6분, collagen은 6분간 반응을 관찰한다.

### PT 및 aPTT 혈액응고시간 측정

사람으로부터 분리한 혈액을 상온에서 2000 g에서 15 분간 원심분리하여 혈장을 얻는다. 혈장 응고시간은 BBL®Fibrometer를 이용하여 aPTT, PT를 측정하였다. aPTT 측정을 위하여 혈장과 aPTT 시약을 fibrometer cup에 가한 후 3 분간 37°C에서 배양한다. 배양 후 CaCl<sub>2</sub>를 가하고, 즉시 혈액 응고 시간을 측정한다. PT의 측정을 위해서 가온된 혈장에 PT 시약을 가하고 즉시 혈액응고 시간을 측정한다.

### Cytotoxicity 측정

Cytotoxicity 측정은 혈소판으로부터 lactate dehydrogenase (LDH) 유출은 spectrophotometry 방법을 이용한다. PRP 499  $\mu$ l에 DMSO 또는 후보물질을 1



$\mu\text{l}$  가하고 thermomixer를 이용하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 3분간 배양한다. 배양 후 시료 100  $\mu\text{l}$ 를 취해 12,000 g에서 2분간 원심 분리하고, 상층액 80  $\mu\text{l}$ 를 취하여 assay 전까지 냉장 보관하며, assay는 24 시간 이내에 수행한다. Positive control로서 50  $\mu\text{M}$  digitonin을 가하여 1시간 동안 처리한다.

미리 가운한 Tris-EDTA NADH 용액 (56 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane, 5.6 mM EDTA, 0.17mM  $\beta$ -NADH pH 7.4) 1 ml에 시료 25  $\mu\text{l}$ 를 가한 다음,  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 5 분 동안 배양한다. 여기에  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 미리 가온해 놓았던 100  $\mu\text{l}$ 의 14 mM pyruvate 용액을 가하고, 즉시 UV-Vis spectrophotometer (UV-2201, Shimadzu, Japan)를 이용하여 339 nm의 파장에서 1분간 흡광도 감소를 측정한다. 흡광도 감소 속도는 NADH의 산화속도를 의미하며, 이는 혈소판으로부터 유리된 LDH의 활성도를 나타낸다. 0.3 % Triton X-100으로 혈소판의 lysis를 유발하여 LDH의 총 활성도를 측정한다. 각 시료의 활성도는 LDH의 총 활성도에 대한 백분율로 측정한다.

### 혈관 조직 분리

혈관의 반응은 organ bath system을 이용하여 측정하였다. 흰쥐를 실혈 치사시킨 후 개흉하여 신속하게 흉부 대동맥 (thoracic aorta)을 적출하고, 즉시 95%  $\text{O}_2/5\%$   $\text{CO}_2$ 의 혼합가스로 포화된 ice-cold Krebs-Ringer 완충액 (NaCl 115.5 mM, KCl 4.6 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM,  $\text{MgSO}_4$  1.2 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM,  $\text{NaHCO}_3$

25.0 mM, disodium. Ca<sup>2+</sup> -EDTA 0.026 mM, glucose 11.1 mM, pH 7.4)으로 옮겼다. 혈관내의 혈액과 주변의 결합조직 및 지방 등을 제거하고 길이 3~4 mm의 혈관 ring을 만들었다. 내피세포가 없는 혈관은 안과용 핀셋 끝을 혈관 내에 넣고 KR 완충액으로 적신 거름종이 위에서 3초씩 10회 정도 회전시켜 내피를 제거하였다. 매 3초마다 KR 완충액에 다시 담그고 혈관이 건조해지지 않도록 하였다.

### 혈관의 수축력 측정

만들어진 혈관 ring을 혈관에 자극이 가해지지 않도록 주의하면서 KR 완충액 10 ml가 채워진 organ bath에 현수하였다. Organ bath내의 KR 완충액은 circulator bath (PolyScience, USA)를 이용하여 37°C를 유지하고, 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>의 혼합가스를 지속적으로 공급하여 pH 7.4를 유지시켰다. 혈관 ring은 두 개의 텅스텐 사를 이용하여 고정하였는데 하부의 텅스텐 사는 organ bath내의 holder에 부착되어 있고, 하부의 철사와 평행되게 장치한 상부의 텅스텐 사는 Grass FT03 force transducer (Grass Instrument Co., Quincy, USA)에 연결되어 혈관의 장력을 감지하도록 하였다. 감지된 장력의 변화는 BIOPAC's MP100 data acquisition system (BIOPAC Systems Inc. Goleta, USA)에 의해 computer로 전달되고, Acknowledge III computer program으로 결과를 기록, 분석하였다.

혈관 ring은 초기 30분간 점증적으로 장력을 주어 resting tension인 2g이 된 후 30분 이상 방치하여 평형 상태에 도달하도록 하였다. 혈관을 phenylephrine (PE)  $10^{-6}$  M으로 수축시킨 후, acetylcholine (Ach)  $10^{-6}$  M 을 가하여 이완시켰을 때 이완율이 80% 이상인 것을 표본으로 사용하였다. 그 후 30분간 혈관 장력을 2g의 평형 상태로 유지시킨 다음, NaCl과의 이온 평형을 고려하여 제조한 90 mM KCl을 함유한 KR 완충액(37°C)으로 Organ bath내의 완충액을 교환하여 혈관의 수축을 유도하였다. 이것을 최대 수축으로 삼아 혈관 수축률을 구하였다. 그 후 3번 wash 한 후 혈관 장력이 2g의 평형상태로 유지 되도록 30분간 KR 완충액상에 두었다. MG1009의 용량 의존성 효과를 관찰하기 위해서 2g의 평형 상태에서, 혈관에 용매(DMSO) 혹은 MG1009를 30분 전 처리 한 다음, Organ bath 상에서 수축 유발 agonist인 PE를 점증적으로 가하여 혈관 장력의 변화를 관찰하였다.

### ***In vivo* 동맥 혈전 생성능 측정**

실험에는 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐 중 체중이 250 ~ 300 g이 되는 것을 실험에 사용하며, 실험 동물은 실험에 사용하기 전에 하룻밤 절식한다. 실험동물에 Control 시료 (DMSO : DW : Tween 80 = 1 : 2 : 17) 또는 후보물질을 농도 별로 경구 투여한 후 30 분 뒤에 urethane (1.25 g/kg)을 복강 투여하여 실험동물을 마취시킨다. 마취가 되면 수술대 위해 실험 동물을 고정시키고, 전 수

술 과정 동안 heating pad를 이용하여 실험 동물의 체온을 유지시킨다. 실험 동물의 목 부근을 절개하여 right carotid artery를 조심스럽게 노출시키고, 혈관에 붙은 지방조직을 조심스럽게 제거한다. Doppler flow probe (0.5 mm-diameter, DBF-20A, Crystal Biotech, USA)를 노출된 carotid artery에 고정하고, Doppler flowmeter (PD-20, Crystal Biotech, USA)에 연결시킨다. 경구 투여 후 60분이 되는 시점에서 50% FeCl<sub>3</sub>에 적신 whatman No. 1 여과지(4 mm x 2 mm) 조각을 probe가 고정된 바로 밑 혈관 위에 부착한다. 여과지는 10분 후 제거하며, 제거한 시점부터 60분 동안 carotid artery 내의 혈전 생성에 의한 혈류의 변화를 측정한다. Occlusion time은 최초로 혈류가 0 이 되어 30초 이상 지속되는 시점으로 한다.

### ***In vivo* 혈액응고 Bleeding time 측정**

실험에는 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐 중 체중이 250 ~ 300 g이 되는 것을 실험에 사용하며, 실험 동물은 실험에 사용하기 전에 하룻밤 절식한다. 실험동물에 Control 시료 (DMSO : DW : Tween 80 = 1 : 2 : 17) 또는 후보물질을 농도 별로 경구 투여한 후 30 분 뒤에 urethane (1.25 g/kg)을 복강 투여하여 실험동물을 마취시킨다. 마취가 되면 수술대 위해 실험 동물을 고정시키고, 전 수술 과정 동안 heating pad를 이용하여 실험 동물의 체온을 유지시킨다. 경구 투여 60분 후 rat의 꼬리 끝 3 mm 부분을 자르고 매 30초마다 whatman No. 1

여과지를 이용하여 흘러나온 혈액을 조심스럽게 닦아준다. 출혈 시간은 더 이상 혈액이 묻어 나오지 않을 때까지 시간으로 측정하며, 출혈이 30분 이상 지속될 경우 출혈 시간은 30분으로 기록한다.

## 통계처리

실험결과는 mean  $\pm$  S.E.M으로 표시하였다. 두 군 사이의 차이는 t-test로서 검증하였으며, 세 군 이상의 비교에서는 one-way ANOVA test를 수행한 후 Duncan's multiple range test를 실시하여 유의성을 검증하였다. 유의적인 차이는 p value가 0.05 이하인 경우에 인정한다.

## 실 험 결 과

심혈관계 질환에 효과가 알려진 천연물 MG의 유도체 12종을 25  $\mu\text{M}$ 의 농도로 인체의 혈액으로부터 분리된 PRP에 3분간 배양 후 SIPA에 대한 억제효과를 검색하였다. 검색한 결과를 토대로 Aggrgation (%)과 Maximal Inhibition (%)를 계산하여 도출했다(Fig. 1). 그 결과 MG1002, MG1009에서 높은 SIPA 억제 효과가 나타났다. MG1002와 MG1009를 선택하여 10, 25, 50  $\mu\text{M}$  농도에 따른 SIPA 억제효과를 확인해 본 결과 농도 의존적인 SIPA 억제 경향성이 나타났다(Fig. 2A, B).

혈소판을 활성화 시키는 요인들 중 SIPA와 생리적인 agonist에 의한 혈소판 응집에 MG1002와 MG1009의 억제효과를 비교하기 위해서 thrombin, ADP, collagen을 agonist로 하여 PRP에서 확인하였다. 그 결과 MG1002와 MG1009는 250  $\mu\text{M}$ 까지 모든 agonist에서 혈소판 응집 억제효과가 거의 관찰되지 않았다(Fig. 3A, B, C).

WP에서 SIPA에 대한 MG1002, MG1009의 혈소판에 대한 독성을 확인해 보기 위해 LDH의 유출 정도를 확인해본 결과(Fig. 4A) positive control로 사용한 50  $\mu\text{M}$ 의 digitonin의 경우 세포 독성이 뚜렷하게 보인 반면 MG1002, MG1009에서는 세포 독성이 확인되지 않았다. 또한 간세포 HepG2 cell-line에 대한

MG1002, MG1009의 독성을 확인해 보기 위해서 MTT assay로 cell viability를 측정한 결과(Fig. 4B) positive control로 사용한 40 mM의 acetaminophen에서는 cell viability가 현저하게 감소하였지만 250  $\mu$ M의 MG1002, MG1009에서는 세포 독성이 확인되지 않았다.

혈액응고 부작용을 평가하기 위해서 MG1002, MG1009을 혈장에 3분간 처리한 후 PT, aPTT assay를 수행하였다(Fig. 5A, B). positive control로서 direct thrombin inhibitor (DTI) 2  $\mu$ M을 3분간 처리하였다. 그 결과, DTI를 처리한 실험군에서는 PT, aPTT 모두 현저히 증가한 반면, MG1002, MG1009은 PT, aPTT이 증가하지 않았다. 즉 MG1002, MG1009은 혈장 내에서의 혈액 응고에 직접적인 영향을 주지 않았다.

혈관의 수축에 미치는 영향을 실험하기 위해서 organ bath system에서 MG1009 50, 100, 250  $\mu$ M씩 30분간 혈관에 전처리 한 후 혈관 수축 물질인 phenylephrine (PE)을 점증적으로 가하여 혈관 수축의 변화를 관찰하였다(Fig. 6).

혈전 생성에 있어서 혈소판은 중요한 역할을 하므로, MG1002, MG1009에 의한 SIPA 억제효과가 혈전 생성에 어떠한 영향을 주는지 확인하고자 *in vivo* arterial thrombosis model을 이용하였다. MG1002, MG1009을 5, 10, 25 mg/kg으로 경구 투여하고 1시간 후에 50% FeCl<sub>3</sub>를 10분간 적용하여 혈전 생성을 유발하고 이후 혈류의 변화를 관찰하였다(Fig. 7A, B). 그 결과 positive control인

8 mg/kg clopidogrel을 투여한 그룹의 Occlusion time을 현저히 증가시켰지만, MG1002는 Control값 대비 유의미한 차이가 없었다. 반면, MG1009는 농도 의존적으로 혈류가 멈추는데 걸리는 시간인 Occlusion time을 지연시켰다. MG1009의 10, 25 mg/kg의 경우 유의적인 효과가 나타났다.

출혈 부작용에 대한 효과를 검증하기 위해 *in vivo* tail bleeding time model을 도입 했다. MG1002, MG1009을 25, 100 mg/kg으로 경구 투여하고 1시간 후에 꼬리 끝 3 mm 부분을 절단한 후 출혈이 멈출 때까지의 시간을 측정하였다(Fig. 8A, B). Positive control인 8 mg/kg clopidogrel을 투여한 그룹의 bleeding time을 현저히 증가한 반면, MG1002, 1009을 25, 100 mg/kg 에서는 control 그룹과 큰 차이가 없었다.



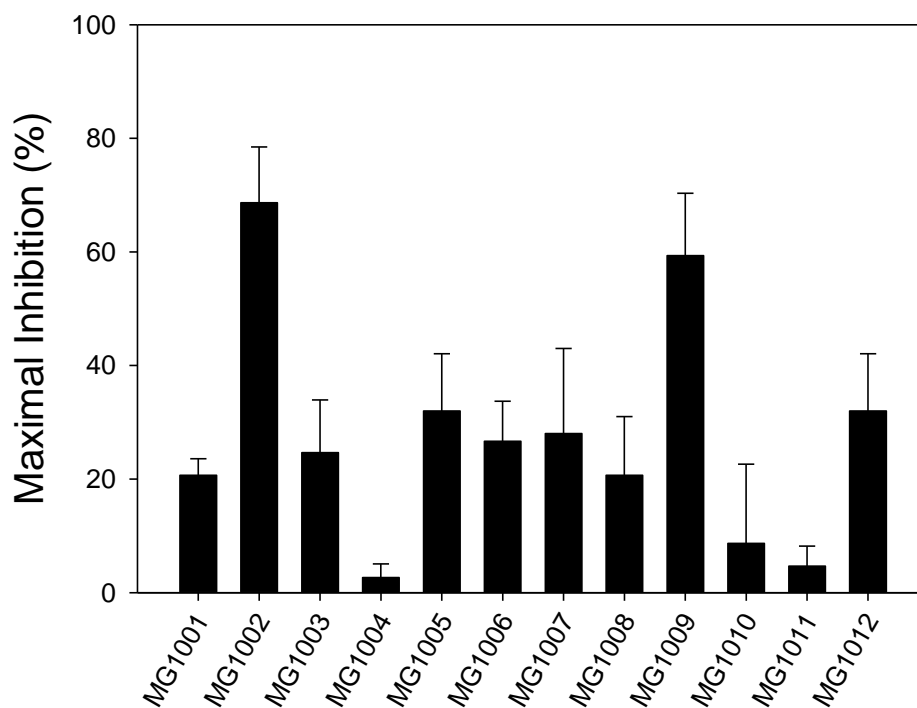


Figure 1. Inhibitory effects of MGs on Shear Stress-Induced Platelet Aggregation(SIPA) in human platelet rich plasma(PRP).

Human PRP was incubated with 12 MGs (25  $\mu$ M) for 3 min at 37  $^{\circ}$ C and then sheared at 10,800  $s^{-1}$  for 3 min. Values are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.

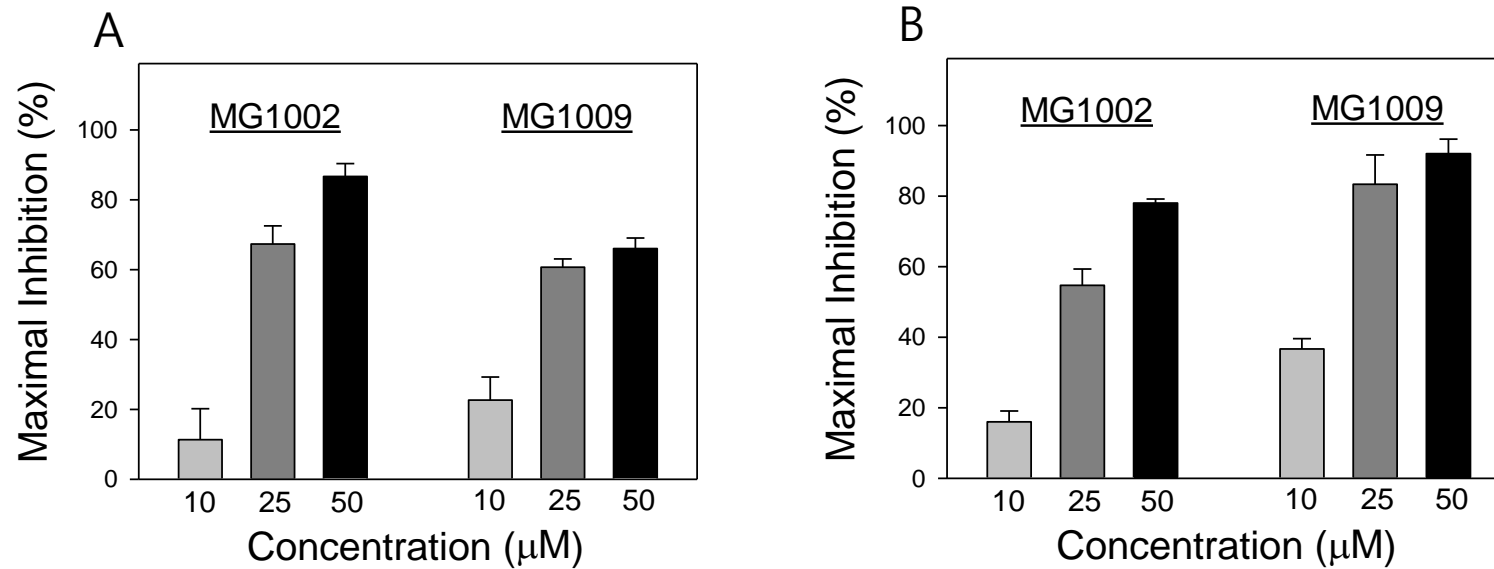


Figure 2. Inhibitory effects of MG1002, 1009 in various concentration on SIPA in human PRP and WP.

A. Human PRP or B. Human WP were incubated with various concentration of MG1002, 1009 for 3 min at 37°C and then sheared at 10,800 s<sup>-1</sup> for 3 min. Values are mean ± SEM of three independent experiments.

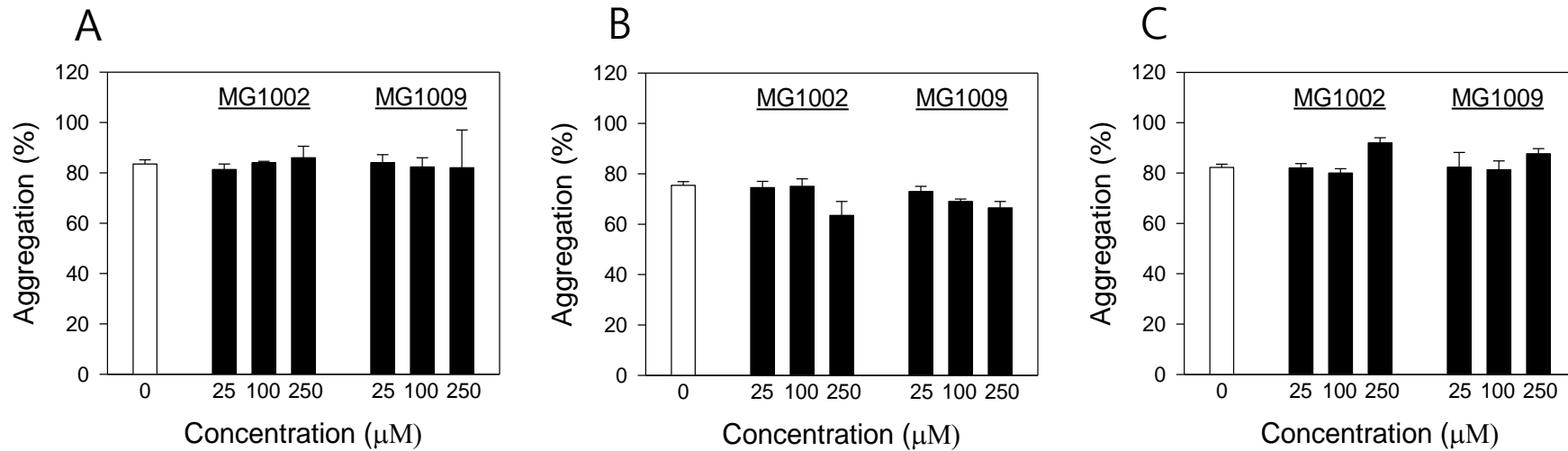


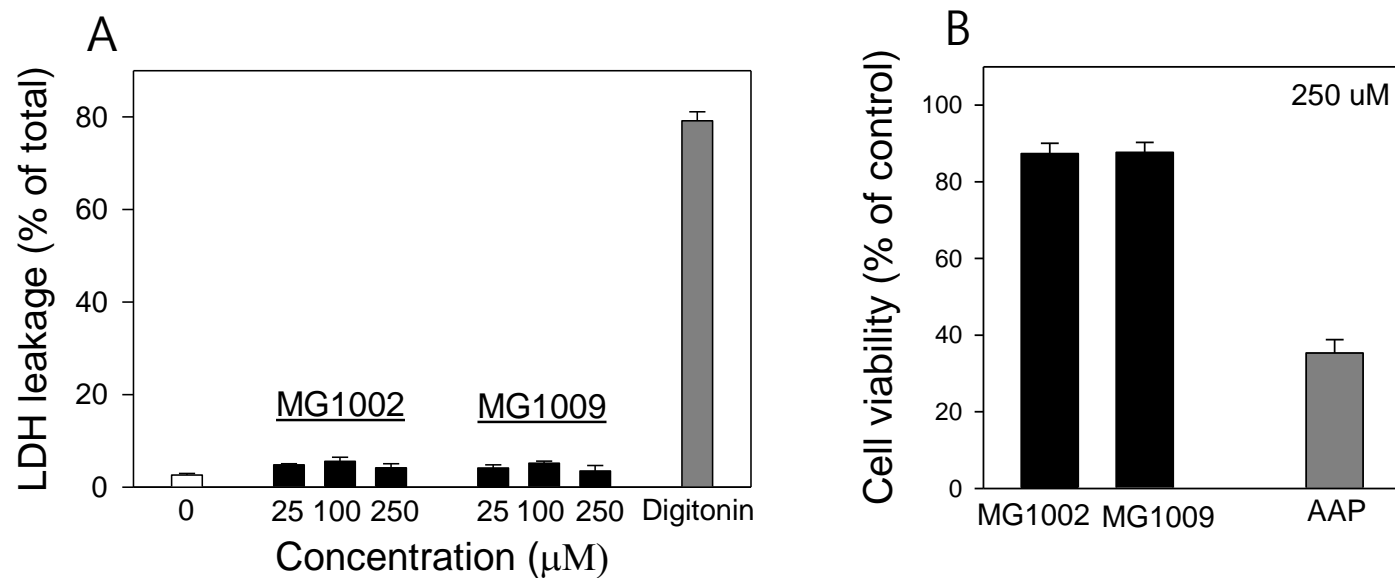
Figure 3. Effects of MG1002, 1009 on agonist-induced platelet aggregation in human PRP.

Human PRP was incubated with various concentration of MG1002, 1009 for 3 min at 37 °C, and then aggregation was initiated by a sub-threshold of **A.** thrombin, **B.** ADP, **C.** collagen. Values are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.

| Platelet Activator | MG1002 ( $\mu\text{M}$ ) | MG1009 ( $\mu\text{M}$ ) |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| Shear Stress       | $18.6 \pm 1.3$           | $20.0 \pm 4.3$           |
| Thrombin           | >250                     | >250                     |
| ADP                | >250                     | >250                     |
| Collagen           | >250                     | >250                     |

Table 1. Comparison of inhibitory effects by MG1002, 1009 on SIPA and agonist-induced platelet aggregation in human PRP.

Human PRP was incubated with various concentration of MG1002, 1009 for 3 min at 37°C and then various platelet activators were added. Values are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.



**Figure 4. Effects of MG1002, 1009 on Cytotoxicity.**

**A.** Human WP was incubated with various concentration of MG1002, 1009 for 3 min at 37°C, and then release of LDH (lactate dehydrogenase) was determined. Digitonin(50  $\mu\text{M}$ ) was used as a positive control. **B.** HepG2 cells were treated with MG1002, 1009(250  $\mu\text{M}$ ) or Acetaminophen(40 mM) and incubated for 3 min at 37°C. Values are mean  $\pm$  SEM of two to three independent experiments.

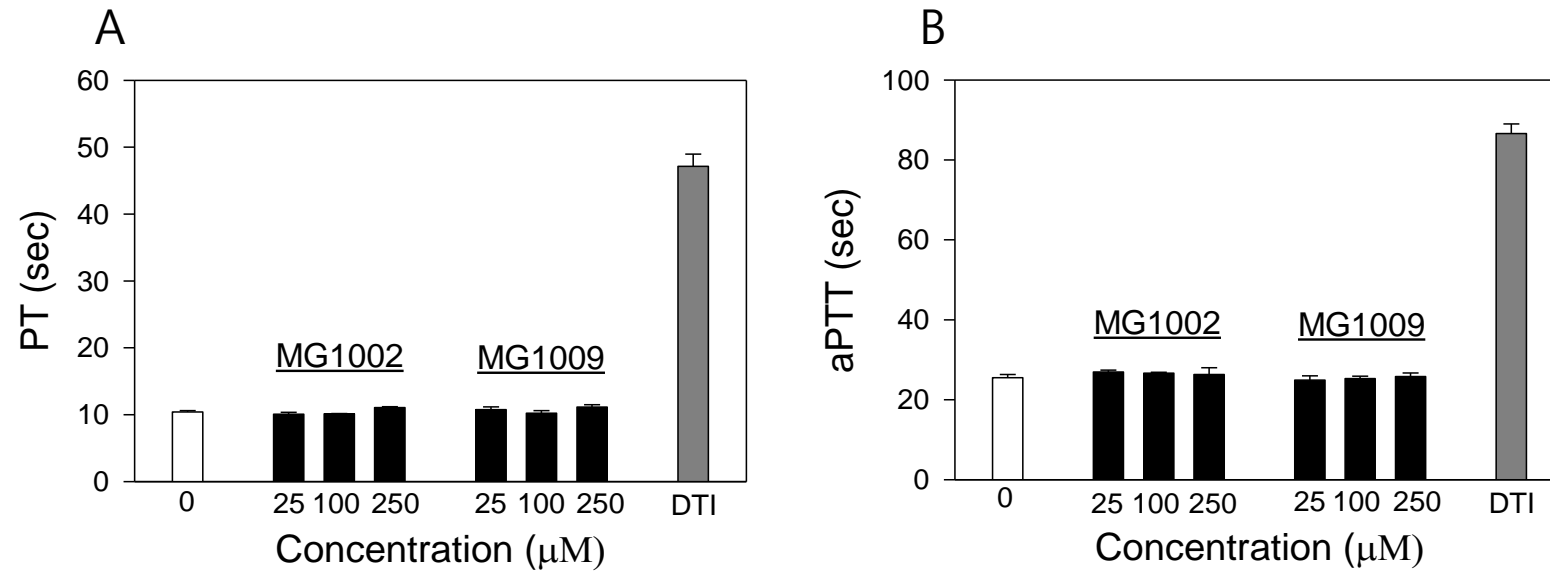


Figure 5. Effects of MG1002, 1009 on coagulation.

Human plasma was isolated and **B.** activated partial thromboplastin time (aPTT) or **A.** prothrombin time (PT) was determined. Values are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.

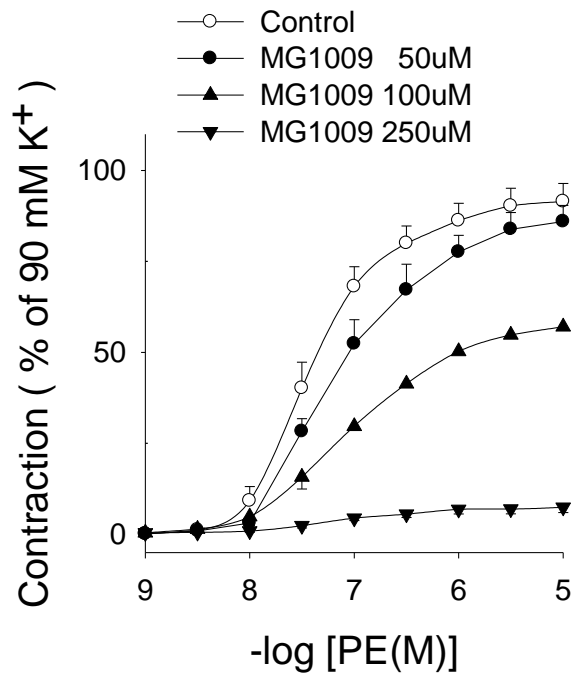


Figure 6. Effects of MG1009 on Phenylephrine (PE) induced contraction in rat aortic ring.

After MG1009 was treated to aortic ring with endothelium for 30 min, dose-dependent curve of phenylephrine induced contraction. Values are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.

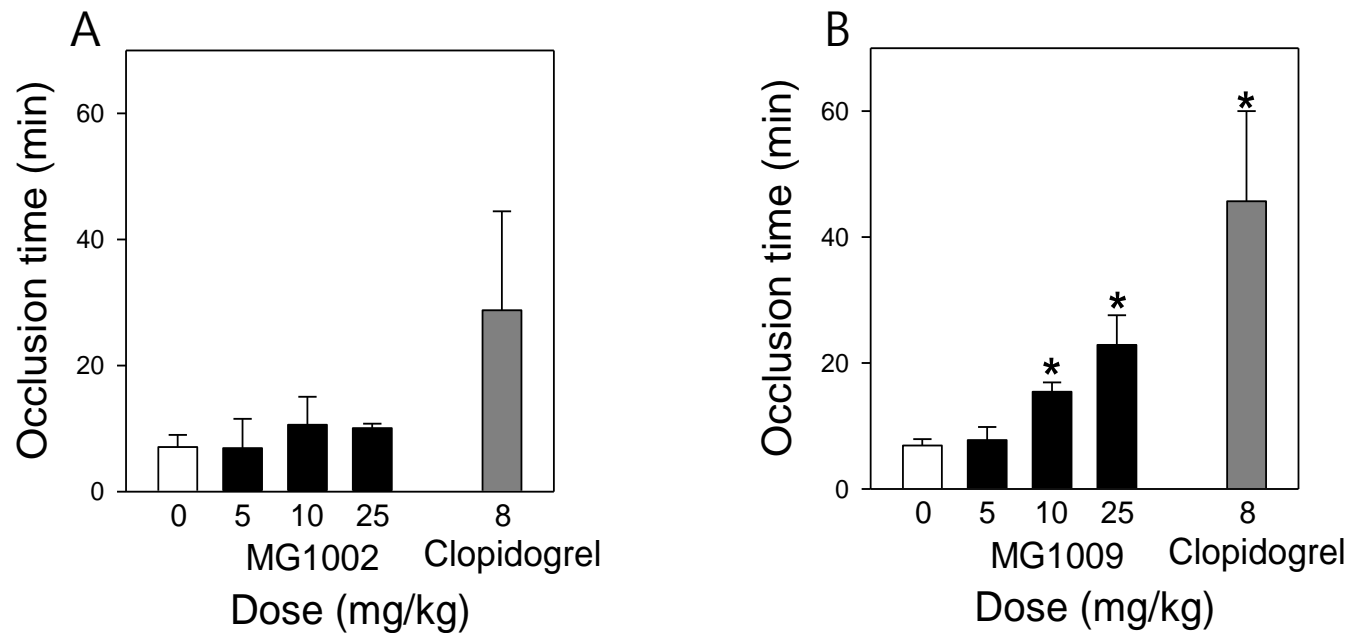


Figure 7. Effects of MG1002, 1009 on thrombus formation in rat *in vivo* arterial thrombosis model.

1 h after oral administration of 5, 10, 25 mg/kg of A. MG1002, B. MG1009, 50% of FeCl<sub>3</sub> was applied to carotid artery for 10 min. The time needed for occlusion was measured for up to 60 min. Values are mean  $\pm$  SEM of three to four independent experiments. \* represents significant difference from corresponding control (p < 0.05)



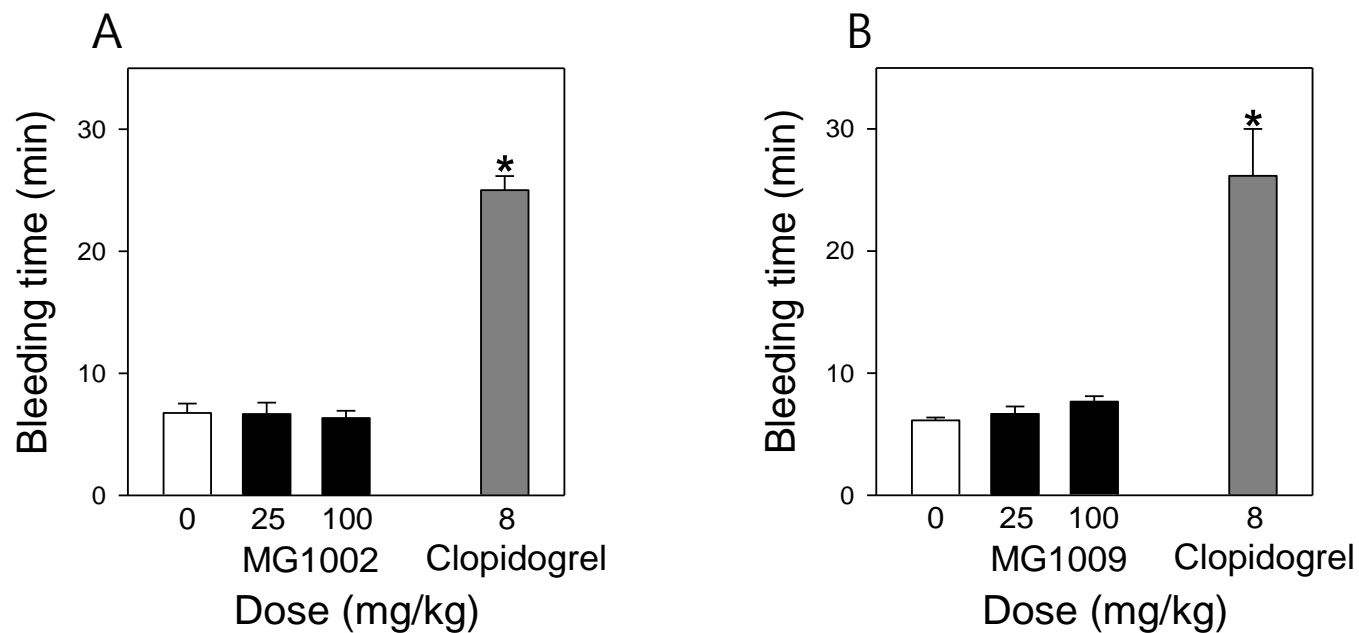


Figure 8. Effects of MG1002, 1009 on thrombus formation in rat *in vivo* tail bleeding time measurement.

1h after oral administration of 25, 100 mg/kg of MG1002, 1009 and clopidogrel(8 mg/kg), the bleeding time was determined in the rat tail transection model. Values are mean  $\pm$  SEM of three to four independent experiments.

\* represents significant difference from corresponding control ( $p < 0.05$ )

## 고 찰

본 연구에서는 심혈관계 질환에 효과를 보인다고 알려진 기존의 천연물 중에서 천연물 유래 합성물질 12종을 합성하여 SIPA에 대한 억제효과를 검색하였다. 그 결과 12종의 천연물 유래 합성물질 중 MG1002, MG1009 2종이 SIPA에 대한 억제 효과가 가장 컸다. MG1002, MG1009는 PRP와 WP 모두에서 농도의존적으로 SIPA에 의한 억제효과를 보여주었으며, PRP와 WP에서의 SIPA에 대한 억제 효과가 크게 차이가 없음을 알 수 있다. 그 결과 MG1002, MG1009는 혈장단백과 결합이 크지 않음을 의미한다. 사람의 PRP에서 MG1002, MG1009의 SIPA에 대한 효과와 agonist에 대한 억제효과를 비교해 보았다. MG1002, MG1009의 agonist에 대한 억제효과는 SIPA에서 효과를 보인 농도 25  $\mu\text{M}$ 의 10배인 250  $\mu\text{M}$ 까지 유의미한 억제효과는 보이지 않았다. SIPA에 대한 억제 효과의  $\text{IC}_{50}$ 는 MG1002는  $18.6 \pm 1.3 \mu\text{M}$ , MG1009는  $20.0 \pm 4.3 \mu\text{M}$  이었다 반면, 생리적 agonist에서는 250  $\mu\text{M}$  이상의  $\text{IC}_{50}$  값을 보여주었다. 이는 MG1002, MG1009가 shear stress에 대한 혈소판 활성화 억제에 선택적 억제 효과를 보이는 것을 의미한다. MG1002, MG1009의 세포독성을 확인하기 위해서 혈소판에서 LDH assay, 간세포 cell-line에서 MTT assay를 실행하였다. 그 결과 세포독성은 관찰

되지 않았으며, 이는 MG1002, MG1009의 SIPA 억제효과가 혈소판의 세포 독성으로 인한 것이 아님을 의미한다.

MG1002, MG1009에 대한 coagulation 부작용을 확인하기 위해 PT / aPPT assay를 실행한 결과 고농도에서도 PT와 aPPT는 증가하지 않았다. 그 결과 MG1002, MG1009는 혈소판 응집에 관여하는 혈장 내의 factor에 직접적인 영향을 주지 않아 혈장 내에서의 혈액 응고에 영향을 주지 않았다.

혈관의 수축에 미치는 영향을 실험하기 위해서 organ bath system에서 MG1009의 혈관 수축의 변화를 관찰하였다. SIPA실험에서 사용한 최고 농도인 50  $\mu$ M에서는 유의미한 혈관 수축 억제 작용은 보이지 않았지만 100, 250  $\mu$ M에서는 혈관 수축 억제 작용이 관찰되었다. 고농도에서의 혈관 수축 억제 작용이 독성에 의한 비가역적 수축인지, 약리적 효과에 의한 가역적 수축 억제 작용인지 실험으로 확인해 봐야 할 것이다.

SIPA를 억제한다고 보고 되어 있는 기존의 항혈소판제 cilostazol (Goto, 2005; Goto et al., 2003)은 혈소판의 c-AMP phosphodiesterase type III를 선택적으로 억제하여 혈소판 활성화 억제 및 혈관 수축 억제 등의 다양한 작용을 한다. 혈소판 내의 c-AMP 농도 상승으로 혈소판 내의  $Ca^{2+}$  이온을  $Ca$ 으로 저장 과립화 시킴으로써 ADP, Serotonin 등의 방출 억제작용을 통한 혈소판 활성화 억제 작용을 하며, 동시에 혈관 평활근 세포내의 phosphodiesterase 활성 저해에 의한 혈관 수축 억제작용을 한다(Tanaka

et al., 1988).

MG1009는 cilostazol과 유사하게 SIPA에 대한 억제효과를 가지고 있으면서 혈관 수축 억제 작용을 가지고 있다 그래서 작용기전 연구에 있어서 대조 연구가 필요하다.

*In vitro* 실험을 통해 확인한 항혈소판제 후보물질들의 효과를 *In vivo* 상태에서 확인 하는데 여러 thrombosis model이 이용되고 있다. Shear stress는 혈류에 의해 작용되는 힘이기 때문에 혈류 속도가 중요한 역할을 한다. 그래서 정맥보다는 동맥, 그리고 협착성 혈관에서 주로 발생하므로 동맥에 손상을 주어 혈전 생성을 유도하고 혈관 폐색을 유발하는 *In vivo* arterial thrombosis model을 이용하였다. SD rat에 MG1002 또는 MG1009를 5, 10, 25 mg/kg으로 경구투여 후 FeCl<sub>3</sub>를 이용하여 인위적으로 혈전 생성을 유발하고 그로 인해 생성된 혈전이 혈관을 폐색하여 혈류가 0이 되는 시점인 occlusion time을 측정 하였다. 그 결과 양성대조군인 clopidogrel 투여 그룹에서는 occlusion time이 현저하게 증가시켰지만 MG1002 투여 그룹에서는 control 그룹 대비 유의미한 차이가 없었다. 반면 MG1009 투여 그룹에서는 농도 의존적으로 occlusion time을 증가시켰는데 이는 농도 의존적으로 동맥에서의 혈전 생성을 억제 시켰음을 의미한다. MG1002는 *In vitro* 실험에서는 효과가 있었지만 *In vivo* 실험에서는 효과를 보이지 않았다. 약리적 효과가 보이지 않는 원인을 찾기 위해서 pharmacokinetics 실험으로 확

인해 봐야 할 것이다. 항혈소판제의 대표적인 부작용인 출혈 부작용을 검증하기 위해서 *In vivo* tail bleeding time measurement 실험을 이용하였다. 에 MG1002 또는 MG1009를 25, 100 mg/kg 용량으로 경구투여 1시간 뒤 꼬리 끝을 절단한 후 출혈이 멈출 때까지의 시간을 측정한 결과, 양성대조군인 clopidogrel은 bleeding time이 현저히 증가한 반면 MG1002, MG1009 투여 그룹에서는 control 그룹 대비 유의미한 차이가 없었으며 고농도인 100 mg/kg에서도 bleeding time에 영향을 주지 않았다. 반복 투여 하였을 때도 bleeding time을 연장 시키지 않는지 확인해 봐야 할 것이다.

결론적으로 혈소판 활성화 및 응집은 심근경색, 뇌졸중, 동맥경화와 같은 다양한 심혈관계 질환에서 주요 원인이다. 그러므로 혈소판 활성화 및 응집 억제제는 이러한 심혈관계 질환에 있어서 효과적인 예방 및 치료의 방법으로 사용되고 있다. 본 연구자는 심혈관계 질환에 효과가 있다고 알려진 천연물 유래 합성물질을 이용하여 SIPA에 대한 효과를 확인해본 결과 MG1009가 Shear Stress에 의해 유발되는 혈소판 활성화 억제에 가장 효과가 있었다. 그리고 혈소판을 활성화시키는 요인들 중 생리적 요인인 agonist에 의한 혈소판 응집은 억제하지 않고 SIPA에 특이적으로 작용하였다. 약리적 효과를 보이는 농도에서 세포 독성은 나타나지 않았으며 MG1009는 혈전 생성을 억제하지만 출혈 부작용이 없다. 따라서 MG1009는 심혈관계 질환의 예방 및 치료와 관련해 유용하게 활용할 수 있다고 사료된다.

## 참 고 문 헌

Andrews RK and Berndt MC (2004) Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res* 114:447-453.

Derhaschnig U, Pachinger C and Jilma B (2004) Variable inhibition of high-shear-induced platelet plug formation by eptifibatid and tirofiban under conditions of platelet activation and high von Willebrand release: a randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Am Heart J* 147:E17.

Goto S (2005) Cilostazol: potential mechanism of action for antithrombotic effects accompanied by a low rate of bleeding. *Atherosclerosis Supplements* 6:3-11.

Goto S, Tamura N, Li M, Handa M, Ikeda Y, Handa S and Ruggeri ZM (2003) Different effects of various anti-GPIIb-IIIa agents on shear-induced platelet activation and expression of procoagulant activity. *J Thromb Haemost* 1:2022-2030.

Haga JH, Jennings LK and Slack SM (2002) Inhibition of shear-stress-induced platelet aggregation and phosphotyrosine signaling by GPIIb-IIIa antagonists. *Ann Biomed Eng* 30:1262-1272.

Hanson SR and Sakariassen KS (1998) Blood flow and antithrombotic drug effects. *Am Heart J* 135:S132-145.

Hartwig J and Italiano J, Jr. (2003) The birth of the platelet. *J Thromb Haemost* 1:1580-1586.

Holme PA, Orvim U, Hamers MJ, Solum NO, Brosstad FR, Barstad RM and Sakariassen KS (1997) Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:646-653.

Jackson SP (2007) The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 109:5087-5095.

Kim K, Bae ON, Lim KM, Noh JY, Kang S, Chung KY and Chung JH (2012)

Novel antiplatelet activity of protocatechuic acid through the inhibition of high shear stress-induced platelet aggregation. *J Pharmacol Exp Ther* 343:704-711.

Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI and Moake JL (1996) Platelets and shear stress. *Blood* 88:1525-1541.

Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, Ravanat C, Freund M, Mangin P, Heel KA, Street A, Harper IS, Lanza F and Jackson SP (2000) A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest* 105:783-791.

Matsumoto M, Kawaguchi S, Ishizashi H, Yagi H, Iida J, Sakaki T and Fujimura Y (2005) Platelets treated with ticlopidine are less reactive to unusually large von Willebrand factor multimers than are those treated with aspirin under high shear stress. *Pathophysiol Haemost Thromb* 34:35-40.

Michelson AD (2004) Platelet function testing in cardiovascular diseases. *Circulation* 110:e489-493.

Minami N, Suzuki Y, Yamamoto M, Kihira H, Imai E, Wada H, Kimura Y, Ikeda Y, Shiku H and Nishikawa M (1997) Inhibition of shear stress-induced platelet aggregation by cilostazol, a specific inhibitor of cGMP-inhibited phosphodiesterase, in vitro and ex vivo. *Life Sci* 61:PL 383-389.

Nesbitt WS, Westein E, Tovar-Lopez FJ, Tolouei E, Mitchell A, Fu J, Carberry J, Fouras A and Jackson SP (2009) A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation. *Nat Med* 15:665-673.

Ni H and Freedman J (2003) Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. *Transfusion and Apheresis Science* 28:257-264.

Tanaka T, Ishikawa T, Hagiwara M, Onoda K, Itoh H and Hidaka H (1988) Effects of cilostazol, a selective cAMP phosphodiesterase inhibitor on the contraction of vascular smooth muscle. *Pharmacology* 36:313-320.

Tanigawa T, Nishikawa M, Kitai T, Ueda Y, Okinaka T, Makino K, Ito M, Isaka N, Ikeda Y, Shiku H and Nakano T (2000) Increased platelet aggregability in response to shear stress in acute myocardial infarction and its inhibition by combined therapy with aspirin and cilostazol after coronary intervention. *Am J Cardiol* 85:1054-1059.

Wang X, Dorsam RT, Lauver A, Wang H, Barbera FA, Gibbs S, Varon D, Savion N, Friedman SM and Feuerstein GZ (2002) Comparative analysis of various platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists on shear-induced platelet activation and adhesion. *J Pharmacol Exp Ther* 303:1114-1120.



# Abstract

HAKJUN NOH

Preventive Pharmacy

The Graduate School

Seoul National University

The platelet of the blood has a huge role functioning as a vital defense mechanism of the body. However, excessive activation of the platelet can cause thrombosis, which can lead to several cardiovascular diseases such as coronary artery disease, myocardial infarction, and cerebral infarction. Because cardiovascular disease is one the most prevalent cause of death worldwide, a variety of antiplatelet drugs were created to treat and prevent thrombosis and cardiovascular diseases.

While anti-platelet drugs such as Aspirin and Clopidogrel are known to be effective treatment for cardiovascular diseases, they tend to cause bleeding, a side effect caused by inhibition to the hemostasis. Therefore, it is necessary to develop anti-platelet drugs that effectively reduces the

abnormal formation of blood clots while still not affecting normal hemostasis.

Platelets are activated by both physiological agonists such as thrombin, adenosine diphosphate (ADP), and collagen and physical shear stress of the blood stream. Platelet aggregation from shear stress, different from other platelet aggregation due to agonists, generally do not participate in the production of normal hemostasis. However, it is involved in the pathological formation of thrombosis. As a result, an important goal for the production of a new anti-platelet drug is developing a Shear Stress-induced Platelet Aggregation (SIPA).

We conducted a research examining the inhibition of platelet aggregation of the 12 kinds of natural product derivatives of SIPA. After adding the natural product derivatives to the platelet rich plasma (PRP) of a person, we examined the effect of SIPA. The results that showed the largest inhibitory effect was MG1002 and MG1009, which were dependent on the concentration of PRP. We compared the effect of SIPA, the physical factor, and the effect of platelet aggregation caused by physiological agonists (thrombin, ADP, collagen). According to the results, when looking at the effect of platelet aggregation caused by agonists, MG1002

and MG1009 did not show inhibitory effect of platelet aggregation. On the other hand, when examining the effect of SIPA, inhibitory effects from MG1002, and MG1009 did specifically show up. We found that there was no sign of cytotoxicity after examining the lactate dehydrogenase leakage(LDH), which is a cytotoxicity indicator of the platelet.

In addition, after we checked that the prothrombin time (PT) and the activated partial thromboplastin time (aPTT) of the platelet poor plasma (PPP) was left unaffected we drew a conclusion that MG1002 and MG1009 did not have an effect on the coagulation.

In order to see how the SIPA inhibitory effect of MG1002 and MG1009 affects the production of thrombosis in our bodies, we used the *in vivo* arterial thrombosis model. After orally administrating MG1002 and MG1009 and applying FeCl<sub>3</sub>, we examined the change in the velocity of blood flow after the formation of thrombosis. The results show that MG1009 delayed the occlusion time, which shows the time it take for the blood flow to stop. This means that it inhibits the production of thrombosis. Furthermore, in order to verify the issues regarding the bleeding time side effect of antiplatelet drugs, we used the *in vivo* tail bleeding time model. Both MG1002 and MG1009 did not delay the bleeding time.

Because MG1009 has an inhibitory effect on platelet activation and aggregation, which is induced by an important platelet activation factor, shear stress, it inhibits the formation of thrombosis of the platelet without bleeding side effects in our bodies. Therefore, MG1009 is especially useful in preventing and curing cardiovascular diseases, especially those related to shear stress.

Key words: Natural product derivatives, Platelet, Platelet aggregation,  
Shear stress, Thrombus formation, bleeding time

Student number: 2015-23180