

EFFICACIA DELL'UTILIZZO TOPICO DI CILOSTAZOLO - INIBITORE DELLA FOSFODIESTERASI III - PER IL TRATTAMENTO DEL VASOSPASMO ARTERIOSO

F. BASSETTO¹, B. BASSIRI GHARB¹, A. RAMPAZZO¹, E. PERISSINOTTO²,

R. PADRINI³, A. PONTINI¹

¹Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche, Istituto di Chirurgia Plastica e Ricostruttiva, Università degli Studi di Padova;

²Dipartimento di Medicina Ambientale e sanità Pubblica, Sezione di Statistica ed Epidemiologia, Università degli Studi di Padova;

³Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Sezione di Farmacologia, Università degli studi di Padova

Effectiveness of topical Cilostazol-Phosphodiesterase III Inhibitor. Application for the treatment of arterial vasospasm

SUMMARY

Arterial spasm represents a common problem in microvascular surgery. Appropriate treatment of the triggering causes and topical application of spasmolytic agents could resolve the vessel constriction. Nonetheless, sometimes severe spasm develops leading to the failure of the reconstructive procedure. This study was conducted to reproduce the clinical setting of arterial spasm and investigate the potential therapeutic effect of the local application of Cilostazol, a selective phosphodiesterase III inhibitor, in DMSO vehicle, compared to the most widely used papaverine. The femoral artery of 30 male Wistar rats was interrupted and a microsurgical repair was performed (10/0 prolene). Norepinephrine solution (1.6 mg/ml) was applied topically to induce vasospasm. The animals were then divided in 5 groups and the vessels were treated respectively with saline solution (5), DMSO (5), papaverine 4 μ M (5), papaverine 40 μ M (5) and Cilostazol in DMSO solution 4 μ M (10). Blood flow (l/min) was registered by an ultrasonic doppler flowmeter (8 MHz). Statistically significant spasm resolving effect was shown in papaverine 40 μ M ($p < 0.05$) and Cilostazol group ($p < 0.001$). Application of Cilostazol provoked greater increase in blood flow compared to papaverine at the same molar concentration. The results of this study indicates that Cilostazol in DMSO solution could be used as an effective topical vasodilating agent to resolve vasospasm in reconstructive surgery.

Riv Chir Mano 2009; 1: 70-78

KEY WORDS

Cilostazol, phosphodiesterase III inhibitor, arterial spasm, papaverine

RIASSUNTO

Lo spasmo arterioso rappresenta un problema comune nell'ambito della chirurgia microvascolare. Un trattamento appropriato delle cause scatenanti e l'applicazione topica di agenti spasmolitici possono risolvere la vasocostrizione. Tuttavia, talvolta, lo spasmo severo può condurre al fallimento delle procedure ricostruttive. Questo studio è stato condotto riproducendo la situazione clinica dello spasmo arterioso, indagando il potenziale effetto terapeutico dell'applicazione topica di Cilostazolo, un inibitore selettivo delle Fosfodiesterasi III, in soluzione di DMSO (Dimetilsolfossido), comparandone l'efficacia a quella dell'agente spasmolitico maggiormente utilizzato, la Papaverina. L'arteria femorale di 30 ratti maschi Wistar veniva interrotta e sottoposta a sutura microchirurgica (10/0 prolene). Una soluzione di norepinefrina (1.6 mg/ml) è stata applicata localmente per indurre il vasospasmo. Gli animali sono stati successivamente divisi in 5 gruppi, trattati rispettivamente con soluzione fisiologica (5), DMSO (5), papaverina 4 μ M (5), papaverina 40 μ M (5) e Cilostazolo in soluzione di DMSO 4 μ M (10). Il flusso sanguigno (l/min) veniva registrato da una sonda Doppler (8

MHz). Un effetto spasmolitico statisticamente significativo è stato dimostrato nella papaverina 40 μM ($p < 0.05$) e nel gruppo del Cilostazolo ($p < 0.001$). L'applicazione di Cilostazolo ha provocato un notevole aumento del flusso sanguigno se comparato alla papaverina alla medesima concentrazione molare. Il risultato di questo studio dimostra che il cilostazolo in soluzione di DMSO può essere utilizzato come efficace agente vasodilatante topico per la risoluzione del vasospasmo nella chirurgia ricostruttiva.

PAROLE CHIAVE

Cilostazolo, inibitore della Fosfodiesterasi III, spasmo arterioso, papaverina

INTRODUZIONE

Lo spasmo arterioso, descritto per la prima volta da Hunter (1) nel 1835, è definito come una prolungata vasocostrizione resistente alla dilatazione meccanica, che ha come conseguenza un ridotto flusso attraverso la microanastomosi ed in una ipoperfusione dei tessuti a valle. La risoluzione dello spasmo dev'essere rapida ed efficace per ristabilire un flusso adeguato.

La patogenesi del vasospasmo non è completamente nota e probabilmente molteplici fattori sono coinvolti (2-4): risposta dei miociti al trauma chirurgico, lesione dell'endotelio (rilascio di Endotelina-1 e riduzione di fattori rilascianti prodotti dall'endotelio quali la prostaciclina e l'ossido nitrico), attivazione delle piastrine (che rilasciano Trombosano- A_2 e Serotonina), ossiemoglobina e radicali dell'ossigeno (con distruzione dei fattori vasorilassanti prodotti dall'endotelio e aumento del Ca^{2+} intracellulare), riflesso simpatico (mediato dalla norepinefrina), sconvolgimenti metabolici quali quelli dovuti a ipovolemia, ipotermia e dolore.

Una serie di farmaci è stata sperimentata per contrastare il vasospasmo ed aumentare il flusso sanguigno. Ad oggi, nessun singolo agente si è dimostrato in grado di risolvere definitivamente il problema e lidocaina e papaverina rimangono i farmaci maggiormente impiegati per risolvere il vasospasmo.

La papaverina è un benzilquinolone alcaloide, con molteplici attività quali inibitore della fosfodiesterasi AMP ciclico dipendente, inibitore del canale del calcio e antagonista dell'attività del recettore alfa-adrenergico (5). Nel muscolo liscio ileale, la papaverina inibisce la contrazione del muscolo li-

scio attraverso l'inibizione della respirazione mitocondriale (6). È usata principalmente nel trattamento dello spasmo viscerale (dotti biliari, ureteri) (7), disfunzione erettile (8) e vasospasmo (che coinvolga nella fattispecie i vasi cerebrali e l'arteria mammaria interna) (9, 10). Il sale di idrocloride è la soluzione salina che è commercialmente disponibile per uso intramuscolare, endovenoso, rettale e per utilizzo topico.

Il Cilostazolo è un chinolone derivato, che è inibitore selettivo della fosfodiesterasi IIIA (sottotipo cardiovascolare) che provoca vasodilatazione ed inibisce l'aggregazione piastrinica (11, 12).

Il Cilostazolo produce una dilatazione non omogenea dei letti vascolari, con grande dilatazione nelle arterie femorali, per questo motivo è stato approvato quale farmaco nella riduzione dei sintomi della claudicatio intermittens (13).

Il possibile effetto dell'uso topico di Cilostazolo, per risolvere lo spasmo arterioso non è stato ancora indagato.

Questo studio è stato intrapreso per documentare l'azione vasodilatatoria del Cilostazolo (in soluzione di DMSO) in uso topico, comparandolo con la papaverina, in termini di aumento del flusso sanguigno, attraverso vasi farmacologicamente vasocostritti dopo interruzione e riparo microchirurgico in un modello sperimentale murino.

MATERIALI E METODI

Questo studio è stato condotto in accordo con i regolamenti dettati dal Ministero della Salute riguardo alla sperimentazione su animali, presso il Centro di Chirurgia Sperimentale dell'Università

di Padova. È stata utilizzata l'arteria femorale di 30 ratti maschi Wistar dal peso medio di 350 g (range di 320-410 g) per valutare l'effetto della somministrazione topica di ciascun agente. Gli animali sono stati anestetizzati con un'iniezione intramuscolo di Zoletil 100 (tiletamina cloridrato + zolazepam cloridrato, anestetico ad uso veterinario) alla dose di 0,6 mg/ml. La temperatura della stanza è stata mantenuta a 25°C.

Farmaci

1. **Norepinefrina.** Noradrenalina Tartrato (Monico SpA, Italia), alla concentrazione originale di 2 mg/ml, preparata alla concentrazione di 1,6 mg/ml. La soluzione viene conservata alla temperatura di 4°C per mantenerla stabile.
2. **Papaverina.** Papaverina Cloridrato (Monico SpA, Italia), alla concentrazione di 30 mg/2 ml. Si è utilizzata alla concentrazione originale, a 15 mg/ml (40 µM) e in soluzione diluita 1:10 di 1,5 mg/ml (4 µM).
3. **Cilostazolo.** Cilostazolo (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd, Giappone). Il farmaco è stato preparato in soluzione di DMSO (100%) alla concentrazione di 1,46 mg/ml (4 µM). La soluzione è stata mantenuta alla temperatura di 4°C, alla quale è stabile per diverse settimane e protetta da fonti luminose.
4. **DMSO.** Dimetilsolfossido, utilizzato come solvente nella preparazione della soluzione di Cilostazolo e come confronto alla dose di 1 ml di solvente puro (100%).

TECNICA CHIRURGICA

L'incisione della cute viene effettuata dalla radice dei genitali per circa 3 cm lungo la piega inguinale. Con l'ausilio del microscopio operatorio [Carl Zeiss Inc., OPMI1], si visualizza il pannicolo adiposo inguinale, lassamente adeso al derma. La dissezione procede al di sotto del pannicolo. I vasi epigastrici vengono evidenziati e preservati nel loro decorso all'interno del pannicolo. Si isola il peduncolo costituito dalla vena femorale medialmente, dal nervo femorale situato lateralmente e dall'arte-

ria femorale (diametro 0,5-0,7 mm) situato tra questi su un piano più profondo. L'arteria femorale quindi viene sezionata a monte ed a valle del punto di diramazione dell'arteria femorale profonda. I monconi dell'arteria vengono preparati con lieve avventiziectomia, dilatati e lavati con soluzione fisiologica. Si esegue quindi l'anastomosi con 7-8 punti staccati in Prolene 10/0. La pervietà del vaso viene valutata dopo 2 minuti e dopo ulteriori dieci minuti dalla stabilizzazione del flusso, prima di procedere all'applicazione di norepinefrina.

IL PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Dopo un periodo di stabilizzazione del flusso attraverso l'anastomosi (10'), viene applicato un millilitro di soluzione contenente noradrenalina (1.6 mg/ml), per indurre lo spasmo. Dopo 10 minuti per ottenere il massimo effetto, la soluzione residua viene rimossa con garza e viene applicato un millilitro di soluzione contenente il farmaco prescelto per un periodo di 10'. Gli animali sono stati suddivisi in 5 gruppi trattati rispettivamente:

- Gruppo I (5 ratti): Soluzione Fisiologica (NaCl 0.9%);
- Gruppo II (5 ratti): DMSO (solvente puro al 100%);
- Gruppo III (5 ratti): Papaverina 1.5 mg/ml (4 µM);
- Gruppo IV (5 ratti): Papaverina 15 mg/ml (40 µM);
- Gruppo V (10 ratti): Cilostazolo 1.46 mg/ml (4 µM).

Il flusso (l/min), la velocità media (cm/s), la velocità sistolica e diastolica media (cm/s) dell'arteria femorale sono stati registrati con la sonda Doppler da 8MHz (modello "Basic Tcd", Atys Medical):

1. Dopo la visualizzazione dell'arteria femorale ("livello base");
2. Dopo la dissezione dell'arteria femorale;
3. 10 minuti dopo l'anastomosi arteriosa;
4. 10 minuti dopo l'applicazione di norepinefrina per valutare lo spasmo;
5. 10 minuti dopo l'applicazione di ciascun agente impiegato per risolvere lo spasmo (un esempio di

tracciato Doppler a tempi differenti è mostrato in figura 1).

Per monitorare alterazioni sistemiche, il flusso sanguigno veniva misurato al lato di controllo al livello base e dopo 30 minuti dall'applicazione di ciascun agente usato per risolvere lo spasmo sul lato impiegato nell'esperimento.

I dati venivano sempre registrati dopo la stabilizzazione dei parametri studiati.

ANALISI STATISTICA

Per illustrare le caratteristiche dei cinque gruppi, l'analisi statistica include la media e la deviazione standard (SD). Le differenze del flusso medio attraverso i cinque gruppi a tempi differenti sono state testate con il test non parametrico di Kruskal-Wallis. Quando una differenza significativa veniva evidenziata, il test di Tukey per la comparazione multipla è stato applicato alle diverse variabili per comparare le coppie di dati.

L'efficacia di ciascun trattamento nel risolvere lo spasmo è stata misurata come la differenza tra il flusso medio dopo il trattamento ed il flusso medio dopo l'applicazione di norepinefrina. All'interno di ciascun gruppo i valori appaiati, sono stati comparati attraverso il test di Wilcoxon, dopo che differenze significative erano state valutate tra i cinque gruppi attraverso il test di Kruskal-Wallis e di

Tukey. L'efficacia è stata espressa con un valore del 95% CI (Intervallo di Confidenza).

Per stimare il potenziale effetto dell'assorbimento sistemico degli agenti farmacologici, il valore del livello basale e quello del flusso finale, su entrambe le arterie femorali, sono stati comparati con il test di Wilcoxon e le differenze risultanti dal trattamento in ciascun gruppo sono state comparate con il test di Kruskal-Wallis.

La significatività statistica è stata posta per valori di $p \geq 0.05$. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite mediante il software per statistica SAS versione 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

RISULTATI

Sono state eseguite 30 anastomosi microvascolari. Ognuna era pervia alla rimozione dei clamp, ad eccezione di un caso che è stato escluso dallo studio (gruppo V).

Differenze statisticamente significative non sono state registrate tra i vari gruppi prima dell'applicazione di ciascun agente. Il flusso sanguigno diminuiva dopo l'isolamento dell'arteria e l'anastomosi del vaso a livello del lato sperimentale di ciascun gruppo trattato (Fig. 1). L'applicazione topica di norepinefrina ha prodotto una significativa riduzione del flusso quando comparato al valore basale ($p < 0.05$).

Tabella 1. L'applicazione dell'agente si riferisce alle misurazioni eseguite dopo l'applicazione di ciascun agente nei gruppi I-V.

	Lato dell'esperimento					Lato controllo	
	Valore Base	Dopo isolamento peduncolo	Dopo anastomosi	Applicazione Norepinefrina	Applicazione agente	Valore base	Dopo applicazione controlaterale
	Flusso (l/min)	Flusso (l/min)	Flusso (l/min)	Flusso (l/min)	Flusso (l/min)	Flusso (l/min)	Flusso (l/min)
Fisiologica (group I)	0.3 ± 0.04	0.28 ± 0.06	0.14 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.1 ± 0.04	0.22 ± 0.04	0.2 ± 0.08
DMSO (group II)	0.32 ± 0.04	0.3 ± 0.06	0.16 ± 0.04	0.12 ± 0.02	0.14 ± 0.04	0.24 ± 0.04	0.22 ± 0.06
Papaverina 4 µM (group III)	0.3 ± 0.02	0.32 ± 0.08	0.2 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.26 ± 0.01
Papaverina 40 µM (group IV)	0.36 ± 0.02	0.32 ± 0.04	0.24 ± 0.06	0.16 ± 0.02	0.3 ± 0.04	0.3 ± 0.04	0.24 ± 0.06
Cilostazolo 4 µM (group V)	0.35 ± 0.08	0.26 ± 0.06	0.22 ± 0.06	0.12 ± 0.04	0.33 ± 0.04	0.3 ± 0.04	0.24 ± 0.06

I risultati hanno confermato un rilevante effetto spasmolitico della papaverina 40 μM e nel gruppo del Cilostazolo, dimostrato da un significativo aumento del flusso medio ($p=0.05$ e $p=0.001$, rispettivamente) (Fig. 2) mentre negli altri gruppi il flusso medio non è aumentato significativamente. Il flusso medio successivo all'applicazione di Cilostazolo era significativamente superiore a quello dopo l'applicazione di papaverina alla stessa molarità. Non vi sono differenze tra il Cilostazolo e la Papaverina 40 μM .

L'efficacia di ciascun agente (95% IC) è mostrata nella figura 2. L'applicazione di Cilostazolo ha più che raddoppiato il flusso sanguigno medio successivo all'applicazione di norepinefrina. Dal test di Tukey per comparazioni multiple questo effetto risulta statisticamente superiore alla papaverina alla stessa molarità e comparabile con la papaverina alla concentrazione di 40 μM (Fig. 2). Quando si confrontano il flusso medio susseguente all'applicazione di ciascun agente con il valore base, i gruppi I, II e III hanno mostrato una significativa ($p<0.05$) riduzione (-0.20, -0.18 and -0.14 l/min, rispettivamente),

mentre non vi erano differenze statisticamente significative (-0,06 e -0.01 l/min, rispettivamente) nei gruppi IV e V.

Questo significa che solo il Cilostazolo e la Papaverina 40 μM si sono dimostrati efficaci nel ristabilire il flusso sanguigno post-anastomotico.

Per evidenziare un possibile effetto sistemico dovuto all'assorbimento degli agenti, si è analizzata la differenza tra il flusso sanguigno successivo all'applicazione di ciascun agente e il valore basale a livello del sito di controllo controlaterale. Le analisi non hanno dimostrato alcuna differenza significativa tra i gruppi (Fig. 3).

DISCUSSIONE

Il Cilostazolo appartiene all'ultima generazione di inibitori della Fosfodiesterasi III, che aumenta i livelli intracellulari di AMP ciclico (c-AMP) inibendo la sua degradazione e bloccando il riassorbimento dell'adenosina da parte della cellula con un aumento di c-AMP intracellulare (11). L'incre-

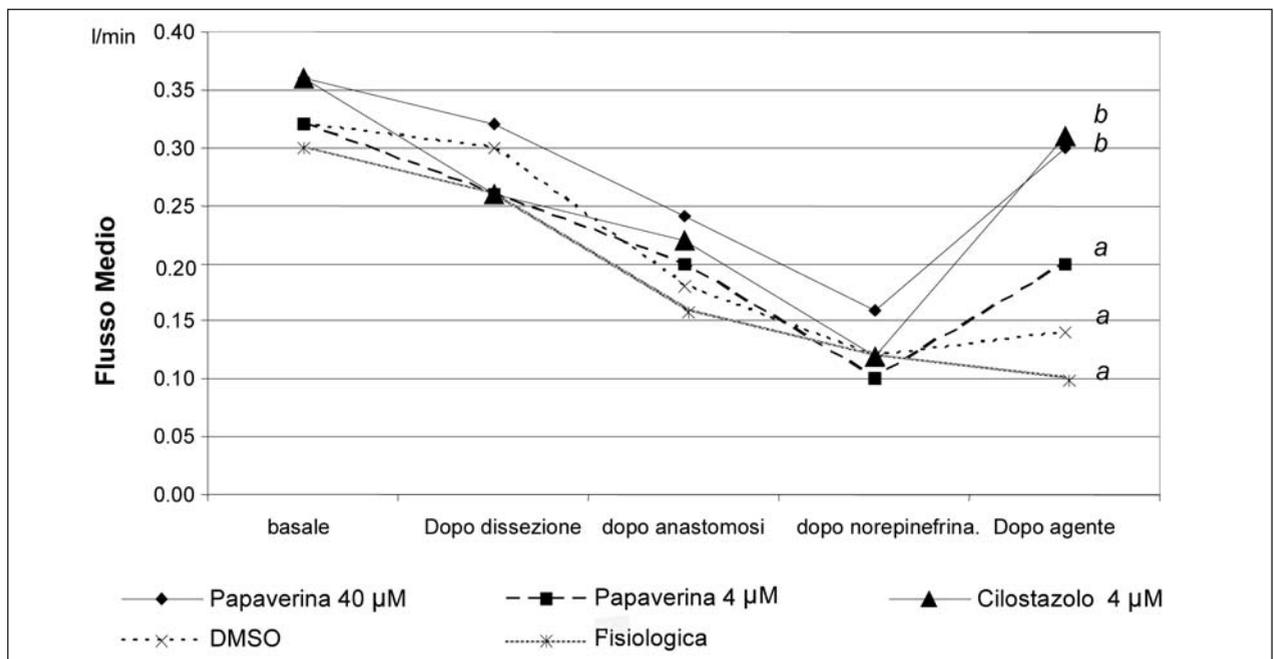


Figura 1. Andamento del flusso sanguigno medio nei differenti gruppi analizzati attraverso il test di Kruskal-Wallis, le differenze attraverso i vari gruppi ad ogni tempo non erano statisticamente significative, ad eccezione della fase successiva all'applicazione dell'agente. a; b) I gruppi con lettere differenti erano significativamente diversi ($p<0.05$) al test di comparazione multipla di Tukey.

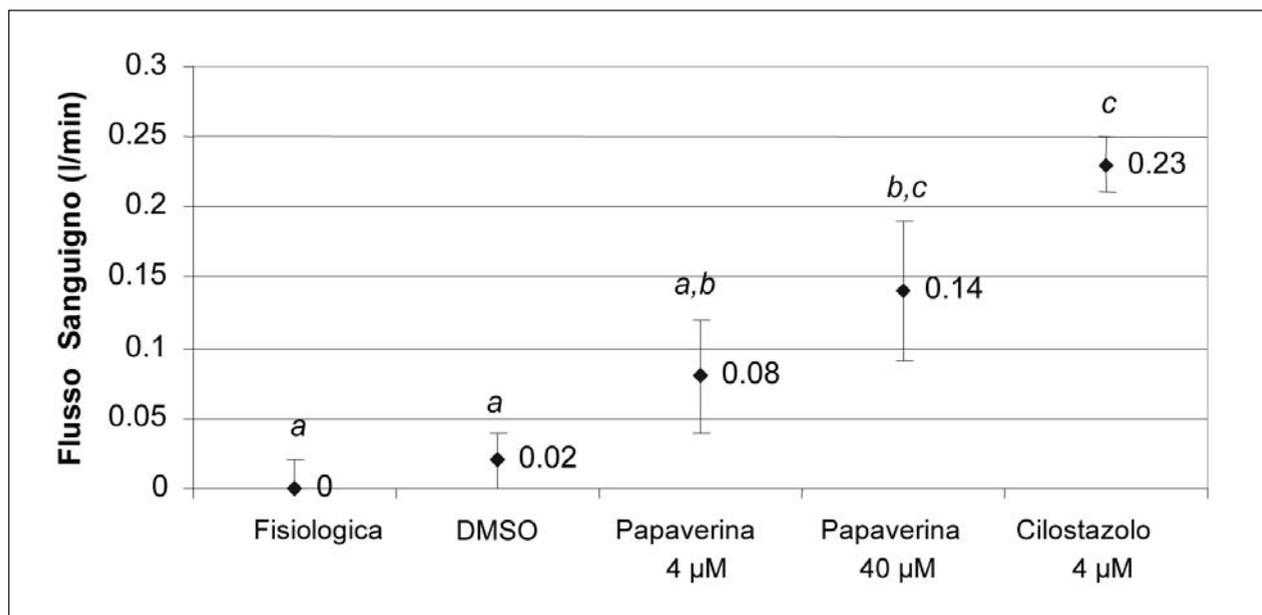


Figura 2. Incremento del flusso al lato sperimentale (flusso dopo applicazione dell'agente - flusso dopo norepinefrina) al 95% CI. a, b, c) I gruppi con lettere differenti erano significativamente diversi ($p < 0.05$) al test di comparazione multipla di Tukey.

mento di c-AMP nel muscolo liscio vascolare determina una dilatazione dei vasi per la stimolazione da parte della protein chinasi c-AMP dipendente (PKA) e la pompa Na/K-ATPasi, aumento della defosforilazione delle catene leggere della mioglobina (14) e attivazione della Ossido Nitrico sintasi dell'endotelio (15).

Oltre ad essere un agente vasodilatante, il Cilostazolo dimostra diverse altre proprietà che possono provocare un beneficio nella fisiopatologia del vasospasmo. Il Cilostazolo inibisce direttamente l'aggregazione piastrinica e riduce il numero di piastrine circolanti parzialmente attivate (12).

Diminuisce lo stress ossidativo e la reattività muscolare, inibendo la produzione di Superossido (16) e alla concentrazione di 1 µM, sopprime i ROS (specie reattive dell'ossigeno) (17).

Gli effetti antiproliferativi e anti-infiammatori sulle cellule endoteliali, e sulla muscolatura liscia vasale sono state descritte (18, 19) attraverso la cascata dei segnali del fattore TGF (16, 20).

Il Cilostazolo, nelle sue applicazioni cliniche, migliora significativamente il flusso sanguigno dopo infarti cerebrali (21) e nelle malattie occlusive degli arti inferiori. Esso inoltre aumenta il diame-

tro dei vasi nei pazienti che soffrono di attacchi di vasospasmo nel morbo di Raynaud (22).

Non provoca un aumento del tempo di sanguinamento (12) e sia da solo che in triplice terapia con antiaggreganti, riduce la frequenza di ristenosi dopo un intervento di stent coronarico (23, 24). Ha un effetto benefico sui lipidi sierici e gli acidi grassi (25) e possiede effetti anti-aterosclerotici (26). Il Cilostazolo è stato usato con successo nella trattamento cronico della sindrome di Brugada (27).

Comparato con altri inibitori selettivi della Fosfodiesterasi III, che sono stati impiegati con successo nel risolvere il vasospasmo, il Cilostazolo influenza principalmente la circolazione vascolare con un minimo effetto sulla funzione ventricolare cardiaca, rappresentando una migliore scelta (28-31).

Pochi studi sono stati sinora condotti sulla sua applicazione topica. Su anelli aortici di ratto, dopo angioplastica, il Cilostazolo 0,5 µM riduce la massima risposta contrattile alla fenilefrina (32) e con concentrazione tra 10 e 100 µM, provoca vasodilatazione su arterie della colonna spinale del coniglio (33).

Ono et al (34) hanno sperimentato gli effetti di

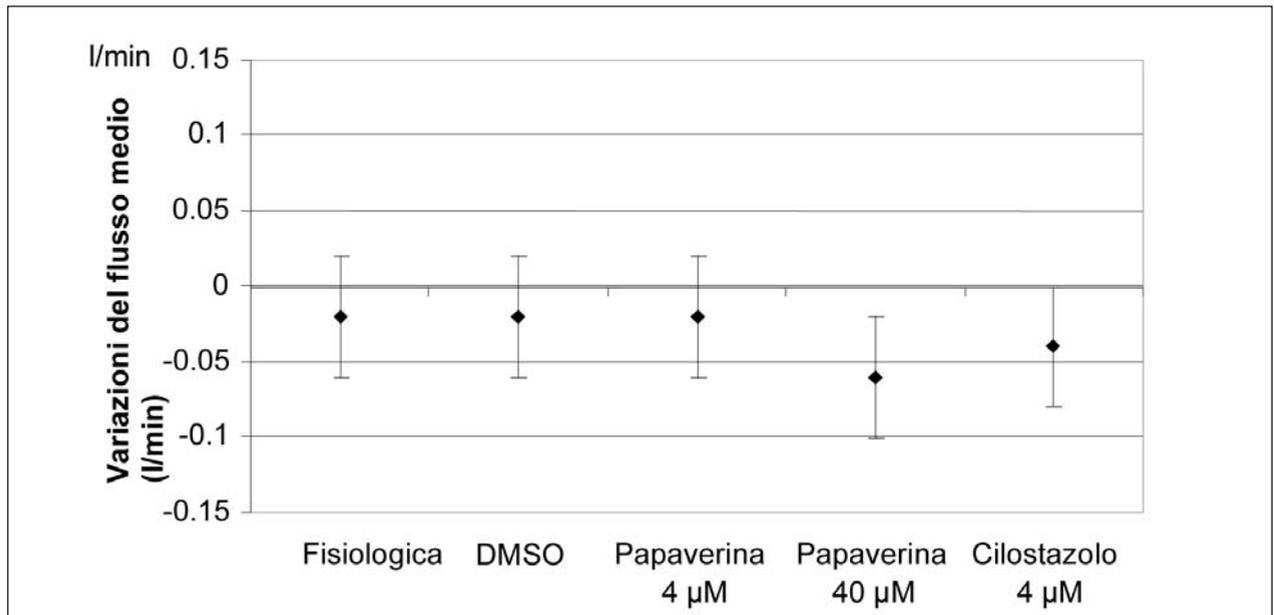


Figura 3. Variazione del flusso medio al lato di controllo (flusso dopo applicazione dell'agente - flusso base) at 95% CI.. Le differenze tra i gruppi non erano statisticamente significative quando analizzate con test di Kruskal-Wallis.

una lozione di Cilostazolo (2,5 mg/ml, 5 mg/ml and 7,5 mg/ml) dissolta in etanolo sul flusso sanguigno della pelle del coniglio. La lozione di Cilostazolo allo 0,5% e 0,75% ha aumentato il flusso dopo 45-60 minuti, sebbene un immediato incremento si abbia avuto nel flusso a 15 e 30 minuti, imputato alla rapida evaporazione del solvente etanolo.

Noi abbiamo selezionato una soluzione 4 µM (1.46 mg/ml), che è stato dimostrato produce una concentrazione intracellulare pari a 0,2 µM, che è equivalente alla concentrazione inibente (IC₅₀) dell'enzima bersaglio (35). La concentrazione equimolare che è stata utilizzata in questo studio ha permesso pertanto di valutare la Potenza relativa di ciascun agente testato. Per comparare il Cilostazolo con la papaverina abbiamo utilizzato sia una soluzione di Papaverina equi-molare (4 µM, 1.5 mg/ml) e la forma commercialmente disponibile che viene utilizzata durante le procedure ricostruttive (40 µM, 15 mg/ml). Questo studio ha dimostrato che il Cilostazolo 4 µM è efficace nel produrre vasodilatazione quando applicato localmente. Dalla comparazione dei dati, questo effetto vasodilatatorio ha superato in modo significativo quello

della Papaverina alla stessa concentrazione molare ed è comparabile con la Papaverina 40 µM.

La soluzione con DMSO è risulta essere un veicolo stabile durante l'esperimento. La sicurezza del DMSO quale solvente è supportata da dati clinici e sperimentali (36) ed è stato descritto che, quando mescolati con DMSO, diversi farmaci appaiono essere potenziati nei loro effetti fisiologici e non possiamo escludere che l'intensificazione della vasodilatazione provocata dal Cilostazolo sia dovuta anche dalla soluzione in DMSO (37).

La concentrazione di Cilostazolo che si è dimostrata efficace in questo studio, non ha causato alcun effetto avverso. La dose tossica di Cilostazolo che è riportata in letteratura è molto alta nel ratto adulto (LD₅₀: > 1 g/Kg intramuscolo, LD₅₀: > 5 g/Kg orale) (35). In rapporto a questo dato il Cilostazolo può essere utilizzato in modo più sicuro che i farmaci maggiormente impiegati quali lidocaina (38) e Papaverina (39).

In conclusione il risultato di questo studio dimostra che il Cilostazolo può essere effettivamente utilizzato per risolvere il vasospasmo se somministrato topicamente. Ulteriori ricerche possono valutare il suo possibile ruolo se somministrato oralmente

nella profilassi e trattamento dello spasmo ritardato, essendo altresì il Cilostazolo legato ad un minor rischio emorragico rispetto l'acido acetilsalicilico.

BIBLIOGRAFIA

- Hunter RJ. The Works. In: Palmer JF, editor. *Vascular Surgery* London: Longman; 1835. p. 538.
- Seaber AV. Experimental vasospasm. *Microsurgery* 1987; 8(4): 234-41.
- Black CE, Huang N, Neligan PC, Forrest CR, Lipa JE, Pang CY. Vasoconstrictor effect and mechanism of action of endothelin-1 in human radial artery and vein: implication of skin flap vasospasm. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 41(3): 460-7.
- Kim HW, Greenburg AG. Hemoglobin mediated vasoactivity in isolated vascular rings. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1995; 23(3): 303-9.
- Chulia S, Ivorra MD, Martinez S, Elorriaga M, Valiente M, Noguera MA, et al. Relationships between structure and vascular activity in a series of benzyloquinolines. *Br J Pharmacol* 1997; 122(3): 409-16.
- Kaneda T, Shimizu K, Nakajyo S, Urakawa N. The difference in the inhibitory mechanisms of papaverine on vascular and intestinal smooth muscles. *Eur J Pharmacol* 1998;355(2-3):149-157.
- Romics I, Molnar DL, Timberg G, Mrklic B, Jelakovic B, Koszegi G, et al. The effect of drotaverine hydrochloride in acute colicky pain caused by renal and ureteric stones. *BJU Int* 2003; 92(1): 92-6.
- Bella AJ, Brock GB. Intracavernous pharmacotherapy for erectile dysfunction. *Endocrine* 2004; 23(2-3): 149-55.
- Mathis JM, Jensen ME, Dion JE. Technical considerations on intra-arterial papaverine hydrochloride for cerebral vasospasm. *Neuroradiology* 1997; 39(2): 90-8.
- Dregelid E, Heldal K, Resch F, Stangeland L, Breivik K, Svendsen E. Dilation of the internal mammary artery by external and intraluminal papaverine application. *J Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1995; 110(3): 697-703.
- Liu Y, Shakur Y, Yoshitake M, Kambayashi Ji J. Cilostazol (pletal): a dual inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 3 and adenosine uptake. *Cardiovasc Drug Rev* 2001; 19(4): 369-86.
- Goto S. Cilostazol: potential mechanism of action for antithrombotic effects accompanied by a low rate of bleeding. *Atheroscler Suppl* 2005; 6(4): 3-11.
- Regensteiner JG, Ware JE, Jr, McCarthy WJ, Zhang P, Forbes WP, Heckman J, et al. Effect of cilostazol on treadmill walking, community-based walking ability, and health-related quality of life in patients with intermittent claudication due to peripheral arterial disease: meta-analysis of six randomized controlled trials. *J Am Geriatr Soc* 2002; 50(12): 1939-46.
- Honerjager P. Pharmacology of positive inotropic phosphodiesterase III inhibitors. *Eur Heart J* 1989; 10 Suppl C: 25-31.
- Hashimoto A, Miyakoda G, Hirose Y, Mori T. Activation of endothelial nitric oxide synthase by cilostazol via a cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism. *Atherosclerosis* 2006; 189 (2): 350-7.
- Park SY, Lee JH, Kim CD, Lee WS, Park WS, Han J, et al. Cilostazol suppresses superoxide production and expression of adhesion molecules in human endothelial cells via mediation of cAMP-dependent protein kinase-mediated maxi-K channel activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 317(3): 1238-45.
- Koike N, Takamura T, Kaneko S. Induction of reactive oxygen species from isolated rat glomeruli by protein kinase C activation and TNF-alpha stimulation, and effects of a phosphodiesterase inhibitor. *Life Sci* 2007; 80(18): 1721-8.
- Yang Y, Luo J, Takeuchi K, Watanabe H. Antiproliferative effect of cilostazol on human umbilical vein endothelial cells through TGF-beta inducing p21(Cip1/Waf1) expression. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 41: 1067.
- Kim MJ, Park KG, Lee KM, Kim HS, Kim SY, Kim CS, et al. Cilostazol inhibits vascular smooth muscle cell growth by downregulation of the transcription factor E2F. *Hypertension* 2005; 45(4): 552-6.
- Yang Y, Luo J, Kazumura K, Takeuchi K, Inui N, Hayashi H, et al. Cilostazol suppresses adhesion of human neutrophils to HUVECs stimulated by FMLP and its mechanisms. *Life Sci* 2006; 79(7): 629-36.
- Matsumoto S, Shimodozono M, Kawahira K. Effective Cerebral Blood Flow Increase and Rehabilitation Effect Following Cilostazol Administration. *Arch Phys Med Rehabil* 2007; 88 (9): E106-7.
- Rajagopalan S, Pfenninger D, Somers E, Kehler C, Chakrabarti A, Mukherjee D, et al. Effects of cilostazol in patients with Raynaud's syndrome. *Am J Cardiol* 2003; 92(11): 1310-5.
- Zhang Z, Foster JK, Kolm P, Jurkowitz CT, Parker KM, Murrain NV, et al. Reduced 6-month resource use and costs associated with cilostazol in patients after successful coronary stent implantation: results from the Cilostazol for RE-STenosis (CREST) trial. *Am Heart J* 2006; 152(4): 770-6.
- Lee BK, Lee SW, Park SW, Lee SW, Park DW, Kim YH, et al. Effects of triple antiplatelet therapy (aspirin, clopidogrel, and cilostazol) on platelet aggregation and P-selectin expression in patients undergoing coronary artery stent implantation. *Am J Cardiol* 2007; 100 (4): 610-4.
- Nakamura N, Osawa H, Yamabe H, Okumura K, Hama-

- zaki T. Effects of cilostazol on lipid and fatty acid metabolism. *Clin Exp Med* 2005; 4 (4): 170-3.
26. Takase H, Hashimoto A, Okutsu R, Hirose Y, Ito H, Imaizumi T, et al. Beneficial effect of Cilostazol on atherosclerosis development in apolipoprotein-E knockout mice. *Atheroscler Suppl* 2006; 7: 394.
27. Ohgo T, Okamura H, Noda T, Satomi K, Suyama K, Kurita T, et al. Acute and chronic management in patients with Brugada syndrome associated with electrical storm of ventricular fibrillation. *Heart Rhythm* 2007; 4(6): 695-700.
28. Garcia-Rinaldi R, Soltero ER, Carballido J, Mojica J. Intraluminal milrinone for dilation of the radial artery graft. *Tex Heart Inst J* 1999; 26(3): 189-91.
29. Ichioka S, Nakatsuka T, Ohura N, Sato Y, Harii K. Topical application of amrinone (a selective phosphodiesterase III inhibitor) for relief of vasospasm. *J Surg Res* 2000; 93(1): 149-55.
30. Adachi H, Kamata S, Kodama K, Nagakura T. Vasorelaxant effect of a phosphodiesterase 3 inhibitor, olprinone, on isolated human radial artery. *Eur J Pharmacol* 2000; 396(1): 43-7.
31. Shakur Y, Fong M, Hensley J, Cone J, Movsesian MA, Kambayashi J, et al. Comparison of the effects of cilostazol and milrinone on cAMP-PDE activity, intracellular cAMP and calcium in the heart. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002; 16 (5): 417-27.
32. Zhao H, Quilley J, Montrose DC, Rajagopalan S, Guan Q, Smith CJ. Differential effects of phosphodiesterase PDE-3/PDE-4-specific inhibitors on vasoconstriction and cAMP-dependent vasorelaxation following balloon angioplasty. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292 (6): H2973-81.
33. Yashiro Y, Ohhashi T. Effects of cilostazol, a selective cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor on isolated rabbit spinal arterioles. *Jpn J Physiol* 2002; 52(5): 471-7.
34. Ono I, Gunji H, Suda K, Kaneko F. Effects of cilostazol lotion on blood flow in rabbit skin. *J Dermatol Sci* 1994; 7(2): 79-83.
35. Schror K. The pharmacology of cilostazol. *Diabetes Obes Metab* 2002; 4 Suppl 2: S14-9.
36. Swanson BN. Medical use of dimethyl sulfoxide (DMSO). *Rev Clin Basic Pharm* 1985; 5(1-2): 1-33.
37. Wood DC, Wood J. Pharmacologic and biochemical considerations of dimethyl sulfoxide. *Ann NY Acad Sci* 1975; 243: 7-19.
38. Klein SW, Sutherland RI, Morch JE. Hemodynamic effects of intravenous lidocaine in man. *Can Med Assoc J* 1968; 99(10): 472-5.
39. Yoshimura S, Hashimoto N, Goto Y, Sampei K, Tsukahara T, Iihara K. Intraarterial infusion of high-concentration papaverine damages cerebral arteries in rats. *AJNR Am J Neuroradiol* 1996; 17(10): 1891-4.