

Menadione과 Plasma내의 Protein Thiols의 비효소적인 화학적반응에 의한 활성산소 생성

정선화 · 이무열 · 이주영 · 장문정* · 정진호
서울대학교 약학대학, *국민대학교 사범대학

Generation of Reactive Oxygen Species by Nonenzymatic Reaction of Menadione with Protein Thiols in Plasma

Sun-Hwa Chung, Moo-Yeol Lee, Joo-Young Lee, Moon-Jeong Chang* and Jin-Ho Chung

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, and *Department of
Home Economics Education, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea

(Received July 21, 1997)

(Accepted August 10, 1997)

ABSTRACT : Quinones have been reported to undergo nonenzymatic reaction with thiols to generate reactive oxygens. It is therefore possible that the nonenzymatic reaction of quinones with thiols in plasma could lead to potentiated cellular toxicity or disease. When 1 mM menadione was added in plasma under pH 11.2, 7.4 and 5.0, the increase in oxygen consumption rate was the order of pH 11.2 > pH 7.4 > pH 5.0. In addition, oxygen consumption rates under plasma anticoagulated with trisodium citrate solution (pH 7.85) was significantly higher than those with acid-citrate-dextrose solution (pH 6.87). SOD and catalase reduced the rate of oxygen consumption induced by menadione in plasma. Taken together, these results suggest that the menadione-induced increased oxygen consumption was due to nonenzymatic reaction of menadione with thiols in the plasma. The presence of plasma has an additive effect on the increased oxygen consumption rates induced by the menadione treatments on our model tissue, platelets, as compared between washed platelet (WP) and platelet rich plasma (PRP). Cytotoxicity, as determined by LDH release, are well correlated with the oxygen consumption rates observed in each system and strongly suggest that menadione-induced cytotoxicity can be increased with the presence of blood plasma.

Key Words : Menadione, Cytotoxicity, Plasma, Protein thiols, Reactive oxygens

I. 서 론

Menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone)은 quinone 계 화합물로서 분리 간세포에서 세포독성을 유발하며, 그 독성이 menadione에 의한 과도한 활성산소의 생성과 관련됨이 보고되었다(Thor *et al.*, 1982). Menadione에 의한 활성산소의 생성기전으로는 주로 효소에 의한 one electron reduction이 논의되고 있다. 즉, menadione이 NADPH cytochrome P-450 reductase, NADH cytochrome b₅ reductase, NADH-ubiquinone reductase 등의 다양한 flavoenzyme에 의해 one electron reduction되어 semiquinone이 형성된다. 이렇게 형성된 semiquinone은 주위에 산소가 존재하는 상황에서 superoxide를 생성하면서 다시 quinone의 형태로 돌아

가며, 이로 인해 세포는 과도한 활성산소에 노출되게 된다(Kappus, 1986).

그러나 시험관 내에서 menadione은 reduced glutathione(GSH), dithiothreitol 등의 여러 thiol과 비효소적으로 반응하여 semiquinone을 생성함이 관찰되었다. 이러한 menadione과 thiol의 비효소적인 반응은 산소 존재 하에서는 superoxide, hydrogen peroxide 및 singlet oxygen 등의 활성산소를 생성함이 또한 보고되어 있다(Nakai *et al.*, 1968; Gant *et al.*, 1986; Takahashi *et al.*, 1987; Miura *et al.*, 1992). 시험관에서 뿐만 아니라 세포 내에서도 menadione과 thiol의 비효소적인 반응이 관찰되었다. Orrenius 등은 효소적인 반응의 cofactor인 NAD(P)H가 고갈된 상태에서도, oxidative stress 결과 증가한다고 알려져 있는 GSSG (Adams *et al.*, 1983)의

생성이 증가함을 관찰하였다(Ross *et al.*, 1985). 그들은 또한 liver microsome에서 효소반응의 cofactor인 NAD(P)H 없이도 superoxide가 생성되며, 그 생성은 thiol oxidizing agent인 N-ethylmaleimide(NEM)에 의해 완전히 억제됨을 확인하였다(DiMonte *et al.*, 1984). Wefers 등도 GSH level이 낮은 세포에서 정상세포에서 보다 menadione에 의한 singlet oxygen이 더 적게 생성됨을 관찰하여 세포 내에서 이 반응이 일어날 수 있음을 보였다. 그러나 이들은 menadione과 thiol의 반응이 세포 내에서 존재하는 효소인 glutathione-S-transferase(GST)에 의해 매개될 때는 활성산소를 생성하지 않는다는 사실을 동시에 확인함으로써, 세포 내에서 menadione과 thiol과의 비효소적인 반응 뿐 아니라 효소적인 반응 역시 일어날 수 있음을 보였다(Wefers *et al.*, 1983). Menadione은 세포 내에서 soluble thiol, protein thiol 모두와 비효소적으로 반응하여 활성산소를 생성할 수 있음에도 불구하고 세포 내에서 높은 활성을 갖고 있는 GST의 존재를 고려할 때(Stocker *et al.*, 1991), 이 반응의 세포 내에서의 독성학적 중요성은 불분명하다.

Plasma는 생체 내에서 운반의 기능을 가지므로, 의약품 및 화학물질에 일차적으로 노출되게 된다(Anderson *et al.*, 1979). Plasma는 세포 내와는 달리 soluble thiol의 level은 낮으나, 상당량의 protein thiol을 함유하고 있다(Hamvas *et al.*, 1992). 또한 menadione의 독성에 대한 방어 작용을 갖는 효소인 GST가 거의 존재하지 않는 것으로 알려져 있다(Stocker *et al.*, 1991). 따라서 plasma에서는 menadione과 thiol의 비효소적인 반응에 의한 활성산소의 형성이 주요하게 일어나리라 추정할 수 있다.

본 연구에서는 실제 menadione이 plasma에서 thiol과 비효소적으로 반응함을 확인함과 동시에, plasma의 존재로 인한 활성산소의 생성이 plasma에 노출된 세포인 혈소판에 대한 menadione의 세포독성에 기여할 수 있는 가능성을 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

Menadione, anhydrous dimethyl sulfoxide(DMSO), trisodium citrate, citric acid, dextrose, superoxide dismutase와 catalase는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)로부터 구입하였다. 그밖의 시약은 모두 특급시약을 사용하였다.

2. 실험 동물

Sprague-Dawley 암컷 흰쥐를 유한양행(Korea)으로부터 공급받아, 4 주 이상 물과 사료(삼양사, Korea)의 제한 없이 사육하였으며, 체중 200 ± 20 g이 되는 것을 실험에 사용하였다. 사육시 밤과 낮의 주기가 각각 12 시간씩 되도록 하였다.

3. Plasma, platelet rich plasma와 washed platelet의 분리 및 배양

실험의 전 과정에 걸쳐서 유리 용기나 유리 pipette의 사용은 피하였으며, 혈소판 분리의 전 과정을 상온에서 수행하였다. 흰쥐를 diethyl ether로 마취 후 개복하여 복대 동맥으로부터 채혈하였다. 항응고제로는, 3.8% trisodium citrate를 1:9의 비율로 또는 acid-citrate-dextrose(ACD; 85 mM trisodium citrate, 71 mM citric acid, 111 mM dextrose)를 1:6의 비율로 사용하였다.

Plasma에 의한 혈소판독성의 변화를 관찰하는 실험을 위한 sample은 다음과 같이 분리하였다. Plasma를 얻기 위해 채혈액을 1,500 g에서 20 분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. PRP와 WP가 동일한 원심분리 조건에 노출되게 하기 위해 아래의 방법으로 혈소판을 조제하였다. PRP와 WP를 얻기 위하여 채혈액을 150 g에서 15 분간 원심분리하여 상층액을 취하고, 이를 500 g에서 10 분간 원심분리하여 pellet을 얻은 후 washing buffer(138 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 0.8 mM KH_2PO_4 , 0.8 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 5.6 mM dextrose, EDTA 2 mM, BSA 0.35%, pH 7.4)를 가해 세척하고, 이를 다시 500 g에서 10 분간 원심분리하였다. 여기에서 얻은 혈소판 pellet을 PRP의 경우는 위의 조건으로 얻은 plasma로, WP의 경우는 HEPES-Tyrodé's buffer(138 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 0.8 mM KH_2PO_4 , 0.8 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 5.6 mM dextrose, BSA 0.35%, pH 7.4)로 재현탁시켰다. 이와 같이 준비한 PRP와 WP 용액중의 혈소판의 수를 광학현미경으로 세어서, PRP의 경우 plasma로, WP의 경우 suspension buffer로 희석하여 세포수가 5×10^8 cells/ml이 되도록 한 후 실험에 사용하였다.

준비된 plasma, PRP 및 WP는 plastic flask에서 배양하였다. Menadione stock은 DMSO에 녹여 사용하고, 가해진 DMSO의 최종농도는 0.5%가 되게 하였다. 사용한 DMSO의 농도에서 혈소판에 대한 약물의 반응성에는 영향이 없었다.

4. 산소소모율의 측정

Plasma, PRP 또는 WP에서의 산소소모율을 oxygen

electrode가 연결된 biological oxygen monitor(YSI 5300, USA)를 이용하여 측정하였다. 1 ml의 plasma, PRP 또는 WP를 sample chamber에 넣고 37°C에서 3 분 동안 교반시켜 공기로 포화시킨 후, electrode를 꽂고 산소소모량을 측정하였다. 기준선을 3 분 동안 설정한 후 menadione을 농도별로 가하고 나서 산소소모율의 변화를 측정하였다.

5. 혈소판 turbidity 변화의 관찰

혈소판의 세포독성(lysis) 정도를 turbidimetry의 방법으로 측정하였다. Lumi-aggregometer(Chrono-log Co., USA)를 이용하여 PRP나 WP의 흡광도를 0% 응집으로, plasma 자체나 buffer의 흡광도를 100% 응집으로 맞춘 후, turbidity 변화에 따른 흡광도를 측정하였다. 이 때 PRP나 WP는 silicon으로 coating된 aggregometer cuvette에 넣고, 1,200 rpm에서 지속적으로 교반하면서 1 분간 방치하여 37°C가 되게 한 후, 시료를 가하였다.

6. 통 계

산소소모 속도의 측정 및 light transmission의 변화 등의 Table은 3회 이상 실험한 후, 그 값을 means \pm SEM으로 표시하였다. 산소소모의 time course 및 turbidity 변화에 관한 data는 3 회 이상 실험하여 동일한 경향이 나오는 것을 확인하고, 그 중 대표적인 그림을 Figure로 실었다.

III. 결과 및 고찰

Menadione이 시험관에서 thiol과 비효소적으로 반응하여 oxidative stress를 유발할때 이 반응은 pH 의존적임이 보고된 바 있다(Miura *et al.*, 1992). 따라서 menadione이 plasma의 thiol과 반응하여 oxidative stress 유발을 확인함과 동시에 pH 의존성 여부를 실험하였다. 혈액으로부터 platelet poor plasma(PPP)를 분리하여 plasma sample로 사용하였으며 oxidative stress여부는 산소소모 증가로부터 확인하였다(Fig. 1). PPP의 액성을 pH 11.2, 7.4 및 5.0로 조절한후 menadione 1 mM을 가하면 혐기성의 경우 3 분이내 급격히 산소소모가 포화되는 양상을 보였으나 산성의 경우 9분 까지 산소소모가 서서히 증가되는 양상을 보였다. 이러한 산소소모 증가는 superoxide dismutase 및 catalase 처리에 의하여 억제되었다(결과 제시 안함). 한편 대조군으로 menadione을 녹인 용매인 DMSO를 처리하였을 때에

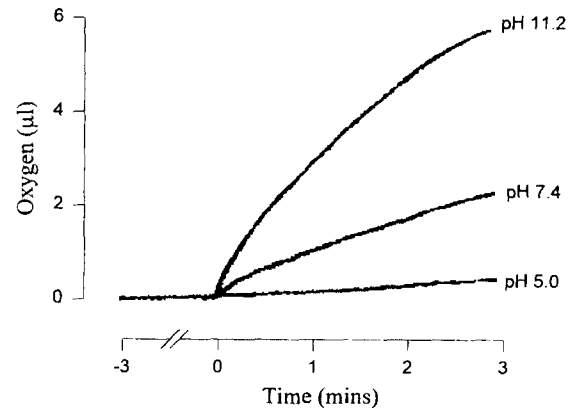


Fig. 1. Effect of pH on menadione-induced oxygen consumption in rat plasma. The preparation of platelet poor plasma(PPP) from rats was described under Materials and Methods. pH in PPP was adjusted to 11.2, 7.4 and 5.0, respectively. Oxygen consumption was measured by a Clarke oxygen electrode.

는 시간에 따른 산소소모의 증가는 전혀 관찰되지 않았다. 이상의 결과는 menadione이 plasma 내에서 thiol과 비효소적인 반응을 일으켜, 이로 인해 활성산소 생성이 증가함을 제시하고 있다.

혈액으로부터 혈소판 분리시 항응고제로서 3.8% trisodium citrate 또는 acid-citrate-dextroscitrate(ACD)을 사용하고 있으나 이러한 항응고제는 pH가 서로 다르다. 따라서 menadione이 thiol과 비효소적으로 반응하여 산소소비를 증가시키는데 항응고제에 따른 차이를 실험하였다. Table 1에서는 항응고제 pH의 미세한 변화에 따른 산소소비량의 차이를 보여주고 있다. Fig. 1과 마찬가지로 pH가 높아짐에 따라 산소 소비량이 증가함을 알 수 있다. 이 실험 결과 역시 menadione이 plasma 내에서 thiol과 비효소적인 반응을 일으켜 산소소모를 증가시킴을 제시하고 있다.

현재까지 menadione은 여러 tissue에서 뿐만 아니라, erythrocyte, neutrophil 등의 blood cell에 독성을 유발함이 보고되어 있다(Munday *et al.*, 1994; Gallin, 1982). 앞선 연구 결과에서 plasma에서 menadione의 처리에

Table 1. Effect of anti-coagulants on menadione-induced oxygen consumption in rat plasma.

	ACD-PPP	citrate-PPP
pH	6.87 \pm 0.09	7.85 \pm 0.04
O ₂ consumption rate	0.94 \pm 0.06	1.40 \pm 0.09

The preparation of anti-coagulants and platelet poor plasma (PPP) from rats was described under Materials and Methods. PPPs isolated using anti-coagulant, acid-citrate-dextrose(ACD) or trisodium citrate, were exposed to 0.25 mM menadione, respectively, and oxygen consumption was measured by a Clarke oxygen electrode.

의해 활성산소가 생성되기 때문에 plasma의 존재가 plasma와 직접 노출된 세포에 대한 menadione의 세포독성에 관여할 수 있으리라 사료된다. 이 가정을 증명하기 위해 다음과 같은 이유로 혈소판 model을 선택하였다. 1) 혈소판은 blood cell의 일종으로, 직접 plasma에 노출되어 있으며, 2) 또한, 혈소판은 menadione이 유도하는 세포독성에 민감한 것으로 보고되어 있고 (Kim *et al.*, 1995; Mirabelli *et al.*, 1989), 3) 그 생리, 약리학적 기능을 규명하기 위해 plasma가 있는 PRP(platelet rich plasma) system과 plasma가 없는 WP(washed platelet) system이 연구자들에 의해 광범위하게 사용되고 있기 때문이다(Mustard *et al.*, 1972).

위의 가설을 명확히 규명하기 위하여, plasma가 있는 혈소판 system(PRP)과 plasma가 없는 혈소판 system(WP) 간의 menadione의 독성을 비교함으로써 plasma의 존재가 menadione 세포독성에 관여하는지를 확인하였다. 먼저 각 system에서 산소소모의 증가를 살펴보았다(Fig. 2). 혈소판만 있는 PRP와 WP control들의 경우 산소소모가 소량 관찰되었는데, 이는 세포가 존재하는 경우 세포의 에너지 대사과정에서 산소가 소모되기 때문으로 추정된다. Plasma에 menadione(0.25 mM)을 처리한 경우 Fig. 1의 결과에서 보이듯이 시간에 따른 산소소모의 증가가 관찰되었다. Plasma가 없는 혈소판 system인 WP의 경우에도 menadione 처리에 의해 산소소모 속도가 증가하였다. Menadione은 다른 세포에서와 마찬가지로 platelet에서도 redox cycling을 돌아 reactive oxygen을 생성함이 보고된 바(Mirabelli

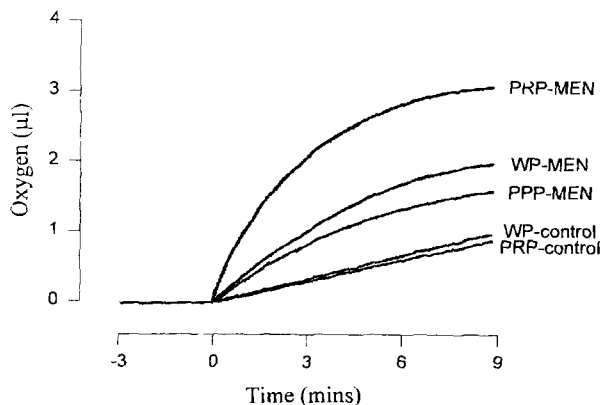


Fig. 2. Effect of menadione on oxygen consumption rates in platelet rich plasma(PRP) and washed platelet(WP). PRP, WP, and platelet poor plasma(PPP) were exposed to 0.25 mM menadione and oxygen consumption rate was measured by a Clarke oxygen electrode. Data in the figure are from one representative *in vitro* run; two other similar *in vitro* runs were also performed. PRP-MEN, menadione-treated platelet rich plasma; WP-MEN, menadione-treated washed platelet; PPP-MEN, menadione-treated platelet poor plasma.

et al., 1989), WP에서의 산소소모 증가도 그러한 사실에 기인하는 것이라 사료된다. Plasma가 있는 혈소판 system인 PRP의 경우 WP보다 빠른 속도로 산소가 소모되는 것이 확인되었다. 이로부터 menadione에 의한 산소소모 속도는 plasma의 존재에 의해 상가적으로 증가함을 확인하였다.

Plasma의 존재가 혈소판에 대한 menadione의 독성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 WP와 PRP system에서 menadione을 가한 뒤 platelet aggregometer 상의 turbidity 변화를 비교하였다(Fig. 3). 이전의 보고에서 light transmission의 감소는 혈소판의 형태 변화, light transmission의 증가는 혈소판의 세포독성을 각각 나타냄을 제시한 바 있다(Kim *et al.*, 1996). PRP-menadione의 light transmission 증가는 WP-menadione에 의한 증가보다 큰 것으로 보아 PRP-menadione은 plasma의 존재로 인하여 세포독성이 증가함을 확인할 수 있었다. 이 결과들은 Fig. 2의 산소소모속도와 잘 일치되는 양상을 보여주고 있다. 이러한 light transmission의 변화의 각 지표를 요약하여 Table 2에 나타냈다. Plasma 존재(PRP) 하에 light transmission의 최대 감소에

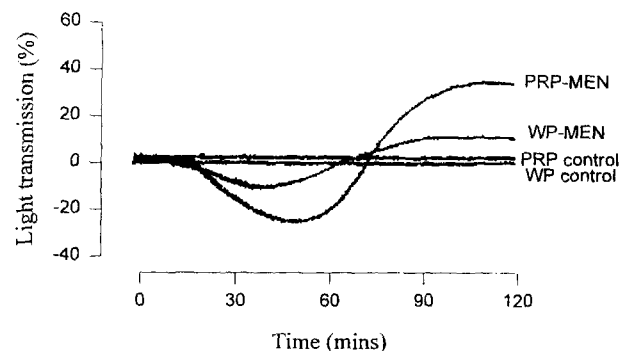


Fig. 3. Effect of menadione on turbidity changes by platelet rich plasma(PRP) and washed platelet(WP) in aggregometer. PRP and WP were exposed to 0.25 mM menadione and turbidity changes were measured by a platelet aggregometer. Data in the figure are from one representative *in vitro* run; two other similar *in vitro* runs were also performed. PRP-MEN, menadione-treated platelet rich plasma; WP-MEN, menadione-treated washed platelet.

Table 2. Effect of menadione on changes of light transmission between platelet rich plasma(PRP) and washed platelet(WP) in aggregometer.

	n	T _{min} (min)	T _{baseline} (min)	T _{max} (min)	OD _{min} (%)	OD _{max} (%)
WP	3	36 ± 1	63 ± 2	90-120	14 ± 1	10 ± 3
PRP	4	51 ± 3*	71 ± 4	90-120	29 ± 1*	35 ± 4*

Data were calculated from Fig. 3. T_{min}(T_{baseline}, T_{max}), time to reach minimum(baseline, maximum) light transmission; OD_{max}(OD_{min}), optical density at maximum(minimum) light transmission. * represent significant differences from WP.

걸리는 시간(T_{min})이 지연되며 optical density의 최대 및 최소치가 현저히 증가함을 알 수있다. 이상의 결과들은 plasma에서 menadione에 의해 생성되는 활성산소가 인접한 세포에 대한 menadione의 독성을 증가시킬 수 있음을 강하게 시사하고 있다.

Menadione에 의한 세포독성은 혈소판 이외에도 적혈구(Munday *et al.*, 1994), neutrophil(Gallin *et al.*, 1982) 등의 blood cell에 대해 연구되었다. Blood cell에 대한 세포독성 연구시 본 실험에서와 마찬가지로, plasma의 존재가 blood cell에 대한 세포독성의 증가를 유발할 수 있을 것으로 보인다. 본 실험과 유사한 결과가 Cazana등 (Cazana *et al.*, 1990)에 의해 보고되었는데, 이들은 phenylhydrazin의 적혈구에 대한 독성이 plasma의 존재시 증가되어 나타나는 것을 확인하였다. 이들은 그 현상의 기전에 대해서는 분명히 설명하고 있지는 못하나, blood cell에 대한 세포독성 연구시, *in vivo*에서의 효과를 추정하고자 할 때에는 반드시 plasma에 의한 효과를 고려하여야 할 것이다.

Menadione의 독성과 그 기전연구는 주로 Orrenius 등에 의해 분리 간세포에서 이루어졌으며, *in vitro*로 menadione이 간세포의 necrosis를 유발시킬 수 있을 만큼 강력한 toxicant임이 보고되었다(Thor *et al.*, 1982). 그러나, menadione은 *in vivo* 실험에서 간독성을 포함한 세포독성을 유발하지 않으나, 고용량 노출이나 신생아의 경우 등에 대해서 erythrocytes를 hemolysis시킴이 보고된 바 있다(Gasser, 1959; Woolf *et al.*, 1972). 이러한 결과는 본 실험에서 관찰된 사실들에 근거하여 설명할 수 있다. 즉, 정맥주사 또는 경구로 흡수된 menadione은 일차적으로 plasma와 광범위하게 반응함으로써 간 등의 독성부위로 이동할 수 있는 유리 menadione의 농도는 상대적으로 낮아지게 되리라는 것이다. Menadione에 대한 약물동력학적인 결과들은, 생체 내에서 menadione 자체의 clearance가 1-2 분내에 신속하게 일어남을 보여주고 있다(Weierstall, 1973). 또한 본 실험실에서는 PRP에서 menadione 1 mM을 가하면 free menadione은 0.25 mM로 급격히 감소함을 관찰하였다(Chung *et al.*, 1997). 이러한 사실들은 menadione의 체내 대사시 생체 내에서 menadione의 extrahepatic clearance가 일어나며, plasma가 menadione의 clearance에 대해 한 organ으로 작용함을 제시하고 있다.

결론적으로, 본 연구에서는 menadione이 plasma에서 그 thiol과 반응하여 활성산소를 형성하며, 형성된 활성산소가 plasma와 인접한 세포의 독성에 영향을 줄 수 있음을 확인하였다. 이 사실은 plasma자체와 blood cells, 그리고 vascular system 등이 menadione의 독성

target이 될 수 있음을 강력히 시사하고 있다. 생체 내에서 blood cells 및 vascular system이 갖는 생리학적 중요성을 고려한다면, 이 부분에 관한 연구는 지속적으로 수행되어야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 서울대학교 약학대학 교육연구재단 연구비에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

- Adams, J.D.J., Lauterburg, B.H. and Mitchell, J.R. (1983): Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat: regulation and response to oxidative stress, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **227**, 749-754.
- Anderson, L. and Lunden, R. (1979): The composition of human plasma, in *Plasma Proteins* (Blomber, B. and Hanson, L., eds.) pp. 17-21, John Wiley & Sons, Chichester.
- Cazana, L.F.J., Marques, M.L., Jimenez, A. and Rodriguez Puyol, M. (1990): *In vitro* effect of plasma during phenylhydrazine-induced erythrocyte oxidative damage, *Biomed. Biochim. Acta.*, **49**, 425-428.
- Chung, J.H., Seo, D.C., Chung, S.H., Lee, J.Y. and Seung, S.A. (1997): Metabolism and cytotoxicity of menadione and its metabolites in rat platelets, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **142**, 378-385.
- DiMonte, D., Ross, D., Bellomo, G., Ekl, L. and Orrenius, S. (1984): Alterations in intracellular thiol homeostasis during the metabolism of menadione by isolated rat hepatocytes, *Arch. Biochem. Biophys.* **235**, 334-342.
- Gallin, J.I., Seligmann, B.E., Cramer, E.B., Schiffmann, E. and Fletcher, M.P. (1982): Effects of vitamin K on human neutrophil function, *J. Immunol.* **128**, 1399-1408.
- Gant, T.W., Doherty, M.D., Odowole, D., Sales, K.D. and Cohen, G.M. (1986): Semiquinone anion radicals formed by the reaction of quinone with glutathione or amino acid, *FEBS Lett.* **201**, 296-300.
- Gasser, C. (1959): Heinz body anemia and related phenomena, *J. Pediatr.* **54**, 673-690.
- Gryglewski, R.J., Palmer, R.M.J. and Moncada, S. (1986): Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor, *Nature* **320**, 454-456.
- Hamvas, A., Palazzo, R., Kaiser, L., Cooper, J., Shuman, T., Velazquez, M., Freeman, B. and Schust-

- er, D.P. (1992): Inflammation and oxygen free radical formation during pulmonary ischemia-reperfusion injury, *J. Appl. Physiol.* **72**, 621-628.
- Kappus, H. (1986): Overview of enzymatic systems involved in bioreduction of drugs and in redox cycling, *Biochem. Pharmacol.* **35**, 1-6.
- Kim, K.A., Lee, J.Y., Park, K.S., Kim, M.J. and Chung, J.H. (1995): The mechanism of menadione-induced cytotoxicity in rat platelets, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **138**, 12-19.
- Mirabelli, F., Salis, A., Vairetti, M., Bellomo, G., Thor, H. and Orrenius, S. (1989): Cytoskeletal alteration in human platelets exposed to oxidative stress are mediated by oxidative and Ca²⁺-dependent mechanisms, *Arch. Biochem. Biophys.* **270**, 478-488.
- Miura, T., Muraoka, S. and Ogiso, T. (1992): Generation of semiquinone and oxygen radicals by the reaction of menadione with reduced glutathione at various pH, *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 709-712.
- Munday, R., Fowke, E.A., Smith, B.L. and Munday, C.M. (1994): Comparative toxicity of alkyl-1,4-naphthoquinone in rats: relationship to free radical production *in vitro*, *Free Rad. Biol. Med.* **16**, 725-731.
- Mustard, J.F., Perry, D.W., Ardlie, N.G. and Packham, M.A. (1972): Preparation of suspensions of washed platelets from humans, *Br. J. Haematol.* **22**, 193-204.
- Nakai, N. and Hase, J.-I. (1968): The reaction of 2-methyl-1,4-naphthoquinone with sulfhydryl compounds, *Chem. Pharm. Bull.* **16**, 2334-2338.
- Ohno, K., Fujimoto, M. and Hirata, M. (1991): Protective effect of prostaglandin A₂ against menadione induced cell injury in cultured porcine aorta endothelial cells, *Chem. Biol. Interact.* **78**, 67-75.
- Ross, D., Thor, H., Orrenius, S. and Moldeus, P. (1985): Interaction of menadione(2-methyl-1,4-naphthoquinone) with glutathione, *Chem. Biol. Interact.* **55**, 177-184.
- Rubiayi, G.M. (1993): The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and disease, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **22**(suppl. 4), S1-S14.
- Stocker, R. and Frei, B. (1991): Endogenous antioxidant defences in human blood plasma, in *Oxidative Stress*(Sies, H., ed.) pp. 214-243, Academic Press, London.
- Thor, H., Smith, M.T., Hartzell, P., Bellomo, G., Jewell, S.A. and Orrenius, S. (1982): The metabolism of menadione(2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes, *J. Biol. Chem.* **257**, 12419-12425.
- Wefers, H. and Sies, H. (1983): Hepatic low-level chemiluminescence during redox cycling of menadione and the menadione-glutathione conjugate: relation to glutathione and NAD(P)H:quinone reductase(DT-diaphorase) activity, *Arch. Biochem. Biophys.* **224**: 568-578.
- Weierstall, R.P. (1973): The pharmacokinetics of menadione and menadione sodium bisulfite in animals, University of California, San Francisco.
- Wolf, I.L. and Babior, B.M. (1972): Vitamin K and Wafarin, *Am. J. Med.* **53**, 261-267.