

Menadione에 의한 흰쥐 혈소판 세포독성에서 nitric oxide의 역할

승상애 · 김대병¹ · 윤여표¹ · 정진호*
서울대학교 약학대학, ¹충북대학교 약학대학

The Role of Nitric Oxide in Menadione-Induced Cytotoxicity in Rat Platelets

Sang-Ae Seung, Dae-Byung Kim¹, Yeo-Pyo Yun¹ and Jin-Ho Chung*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
¹College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

(Received November 18, 1995)

(Accepted December 1, 1995)

ABSTRACT : Nitric oxide, a physiological transmitter, is reported to mediate cellular injury in various tissues. Its reactivity to free radical is believed to be one of the reasons for its involvement in cytotoxicity. Menadione, a representative quinone, is cytotoxic to several cell systems including isolated hepatocyte, endothelial cell and red blood cells. Its toxic mechanism is related to oxidative stress, mediated by toxic free radicals. Our previous studies demonstrated that menadione induced cell lysis and increase of oxygen consumption in platelets. It has been reported that platelets have nitric oxide producing enzyme, nitric oxide synthase. Thus, we have investigated to manifest the role of nitric oxide in menadione-induced cytotoxicity in rat platelets. Menadione induced cytotoxicity in platelets was unaffected by N^o-nitro-arginine methyl ester (L-NAME), selective and competitive inhibitor of nitric oxide synthase. We also investigated the role of extracellular nitric oxide in menadione-induced cytotoxicity of platelets by addition with sodium nitroprusside (SNP). SNP did not affect platelet cytotoxicity by menadione. These results suggested that nitric oxide which was generated endogeneously or exogeneously might have a negligible role in menadione-induced cytotoxicity in rat platelets.

Key Words : Nitric oxide, Menadione, Platelets, Cytotoxicity, N^o-nitro-arginine methyl ester (L-NAME), Sodium nitroprusside

I. 서 론

Nitric oxide(NO)는 신경, 면역계, 심혈관계 등의 여러조직에서 생리적 기능을 담당함이 알려져 왔다(Bredt and Snyder, 1994). 또한 과도한 생성시 세포독성을 유발함이 보고된 바 있으며(Wink *et al.*, 1991) glutamate에 의한 신경독성(Dawson *et al.*, 1991), 췌장 세포의 자가면역 파괴(Radons *et al.*, 1994), ischemia/reperfusion injury(Kurose *et al.*, 1994) 등에 관련됨이 보고되어 왔다. Nitric oxide는 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase(NOS)를 통해 생성되며(Palmer *et al.*, 1988) L-arginine:nitric oxide pathway는 신경세포, macrophage, 혈관내피 세포 등에 존재함이 알려진 바

있다. NOS는 크게 Ca²⁺의 증가에 의해 활성화되는 constitutive type과, cytokine 등에 의해 유도되고 Ca²⁺의 증가에 의해서는 그 활성이 조절되지 않는 inducible type으로 나뉜다(Moncada *et al.*, 1991).

한편 최근 혈소판 내에서도 이 pathway의 존재가 밝혀졌으며 생성된 nitric oxide는 혈소판 응집과 부착을 억제함이 관찰되었으나(Radomski *et al.*, 1990; Sneddon and Vane, 1988), 그 혈소판 내에서의 생리적 기전에 관하여서는 guanylate cyclase, phospholipase C(Durante *et al.*, 1992), ADP ribosylation(Dimmeler *et al.*, 1992) 등 여러 가능성이 제시되고 있다. 혈소판내에 존재하는 NOS는 Ca²⁺의 증가에 의해 활성화되는 constitutive type으로 알려져 있다(Muruganandam and Mutus, 1994).

한편, menadione은 대표적인 quinone류로서 분리간 세포 등에서 그 독성이 광범위하게 연구된 물질이다.

*To whom correspondence should be addressed.

Menadione은 세포 내에서 NADPH-cytochrome P450 reductase에 의해 대사되어 semiquinone radical을 생성하고 생성된 radical은 다시 NADH-ubiquinone oxidoreductase에 의해 대사되어 hydroquinone을 생성한다. 이 때 생성된 semiquinone radical은 주위에 존재하는 산소분자에 전자를 주어 자신은 quinone으로 환원되며 동시에 superoxide anion을 생성하고 이때 야기되는 oxidative stress가 menadione 독성의 주된 기전으로 알려져 왔다(Thor *et al.*, 1982). 이어서 세포 괴사 이전에 일어나는 GSH, protein thiol의 감소, bleb formation 등이 관찰되었고 특히 세포내 Ca^{2+} 의 증가가 독성과 밀접한 관련이 있음이 보고된 바 있다(Dimonte *et al.*, 1984). 최근 본 연구자들은 menadione이 혈소판에서 일으키는 세포독성을 확인한 바 있으며 이 때 일어나는 산소소모의 증가를 관찰하였다(Kim *et al.*, 1996).

Menadione에 의한 세포 독성 유발시 일어나는 Ca^{2+} 의 증가는 NOS를 활성화시키는 signal이 되리라 추정되며 발생된 nitric oxide는 산소 radical과 결합하여 peroxynitrite를 형성함이 보고된 바 있다(Beckman *et al.*, 1990). 이 peroxynitrite는 OH, NO_2 , NO_2^+ (Ischiropoulos *et al.*, 1992) 등의 radical을 생성하고 lipid peroxidation(Radi *et al.*, 1991a), Na^+ channel block(Bauer *et al.*, 1992), thiol group과의 반응(Radi *et al.*, 1991b) 등의 독성을 유발함이 알려져 있어 이는 menadione에 의한 독성을 야기시키는 주요한 요인이 될 수 있으리라 생각된다.

따라서 본 연구에서는 NOS의 inhibitor로 알려진 N^G -nitro-arginine methyl ester(L-NAME)를 이용하여 그에 의한 menadione의 혈소판 독성변화를 관찰함으로써 혈소판에서의 menadione에 의한 독성유발시 nitric oxide의 역할에 대하여 알아보고, 또한 외부에서 생성된 nitric oxide의 역할에 관하여도 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

Sprague-Dawley 암컷 흰쥐를 유한양행으로부터 공급받아, 4주이상 물과 사료(제일제당, Korea)의 제한없이 사육하였으며, 체중 220 ± 20 g 되는 것을 실험에 사용하였다. 사육시 밤과 낮의 주기가 각각 12시간씩 되도록 하였다.

2. 시약

NADH, dimethyl sulfoxide(DMSO), menadione(MEN),

trisodium citrate, pyruvic acid, tris[hydroxymethyl]aminomethane, sodium nitroprusside(SNP), N^G -nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)는 Sigma(St. Louis, USA)로부터 구입하였다.

3. Platelet rich plasma의 분리

흰쥐를 diethyl ether로 마취후 개복하여 복대동맥으로부터 채혈하였다. 이때 3.8% trisodium citrate를 항응고제로 하여 혈액과 1:9의 비율로 했으며 18 gauge 주사바늘을 이용, 채혈시 용혈에 의한 혈소판의 활성화를 억제시켰다(Radomski *et al.*, 1983). 채혈액을 150 g에서 15분간 원심분리하여 상층액으로부터 platelet rich plasma(PRP)를 얻었으며, 잔사를 계속해서 1,500 g에서 20분간 원심분리하여 platelet poor plasma(PPP)를 얻었다. 이와 같이 준비한 PRP중의 혈소판수는 hemacytometer로 현미경을 사용하여 세었으며, PRP를 PPP로 희석하여 5×10^8 cells/ml가 되도록 한후 실험에 사용하였다.

4. Turbidity 실험

혈소판의 cell lysis 정도를 turbidimetry 방법으로 측정하였다. Lumi-aggregometer(Chronolog Co., USA)를 이용하여 PPP의 light transmittance를 100%, PRP의 light transmittance를 0%로 맞춘 후 혈소판의 cell lysis 정도에 따른 light transmittance를 측정하였다. 이때 PRP와 PPP를 silicon으로 코팅된 aggregometer cuvette에 495 μ l를 가한 후 PRP의 경우 1,200 rpm에서 지속적으로 교반시켰으며 1분간 방치하여 37°C가 되도록 한 후 시료를 가하였다. Menadione의 vehicle로는 DMSO 0.5%를 사용하였는데, 이 농도에서는 혈소판의 light transmittance에 영향을 미치지 않았다.

5. Lactate dehydrogenase(LDH) 유출 실험

혈소판으로부터 lactate dehydrogenase(LDH) 유출은 spectrophotometry 방법을 사용하였다(Bergmyer *et al.*, 1965). Tris-EDTA-NADH(pH 7.4) 1.0 ml에 원심분리한 menadione 처리 PRP의 상층액을 가한 후 37°C에서 10분 동안 배양시켰다. 여기에 37°C에서 미리 배양시켜 놓은 0.1 ml의 14 mM pyruvate를 가하고 339 nm에서의 흡광도 감소를 측정했다. 흡광도 감소 속도는 NADH의 산화 속도를 의미하며 이를 혈소판으로부터 유리된 LDH의 활성도로 나타냈다.

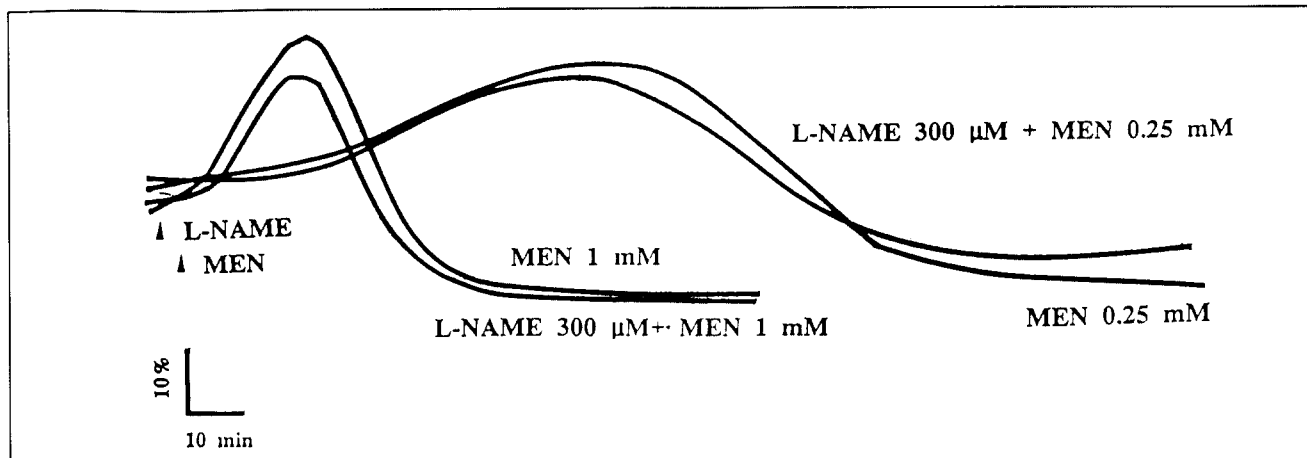


Fig. 1. Effect of N^G -nitro-arginine methyl ester (L-NAME) on menadione (MEN)-induced changes in turbidity. PRP was incubated MEN in the presence or absence of L-NAME. The X-axis represents the time of incubation and the Y-axis represents the percentage change in turbidity.

6. 통계처리

실험결과는 각 군의 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 로 표시하였으며, turbidity 실험은 3회 이상 실험하여 비슷한 경향이 나오는 것을 확인한 후 그 중 대표적인 결과를 Figure로 사용하였다.

III. 결 과

Menadione에 의해 유발되는 흰쥐 혈소판 독성에 있어 혈소판에 존재하는 L-arginine:NO pathway의 역할을 알아보기 위하여 nitric oxide synthase(NOS)의 inhibitor인 N^G -nitro-arginine methyl ester(L-NAME)가 menadione에 의한 흰쥐 혈소판 독성에 미치는 영향을 알아보았다. 독성의 지표로는 aggregometer상에서의 turbidity 변화와 lactate dehydrogenase(LDH) leakage를 사용하였다. Aggregometer를 이용한 세포독성의 평가 방법은 최근 본 저자들에 의하여 연구되었는데, 즉 turbidity가 증가되었을 때는 화학물질에 의한 세포형태 변화를 의미하며 turbidity가 감소되었을 때는 세포가 lysis되었음을 의미한다(Kim *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1995).

Platelet rich plasma(PRP)에 37°C에서 L-NAME를 3분 전처리한 후 menadione 250 μM 을 가하였을 때 L-NAME의 vehicle인 saline을 전처리하였을 때와 비교하여 독성의 증가나 감소가 전혀 관찰되지 않았으며 이는 menadione 1 mM에서도 같은 결과를 보였다(Fig. 1, Fig. 2).

혈소판과 인접한 세포인 endothelial cell에서의 ni-

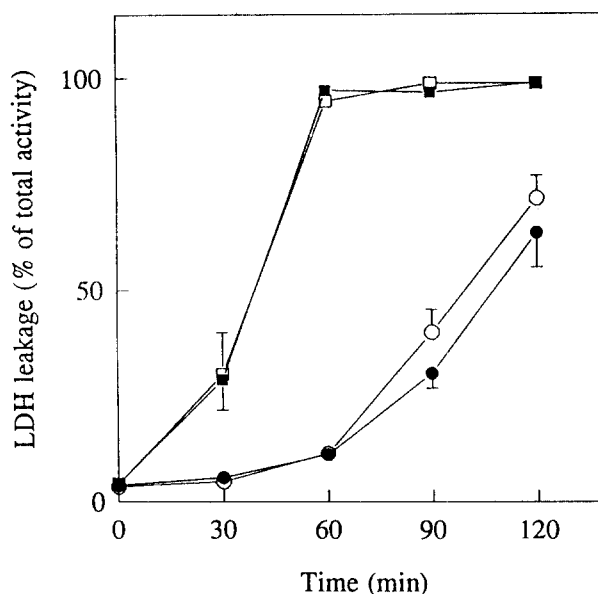


Fig. 2. Effect of N^G -nitro-arginine methyl ester (L-NAME) on menadione (MEN)-induced cytotoxicity in rat platelets. \circ ; MEN 0.25 mM, \bullet ; MEN 0.25 mM+L-NAME 300 μM , \square ; MEN 1 mM, \blacksquare ; MEN 1 mM+L-NAME 300 μM .

tric oxide의 생성은 이미 여러 연구자들에 의해 밝혀진 바 있으며 endothelium derived relaxing factor, 즉 혈관 이완인자로서의 광범위한 연구가 진행중에 있다. 따라서 본 연구자는 menadione에 의한 혈소판 독성에 있어 혈소판 외부에 존재하는 nitric oxide의 역할에 대해 알아보았다. Nitric oxide를 자발적으로 유리한다고 알려진 sodium nitroprusside(SNP) 100 μM 을 PRP에 3분 전처리한 후 menadione을 가하였을 때, SNP의 vehicle인 DDW를 전처리하였을 때와 비교하여 turbidity 변화 및

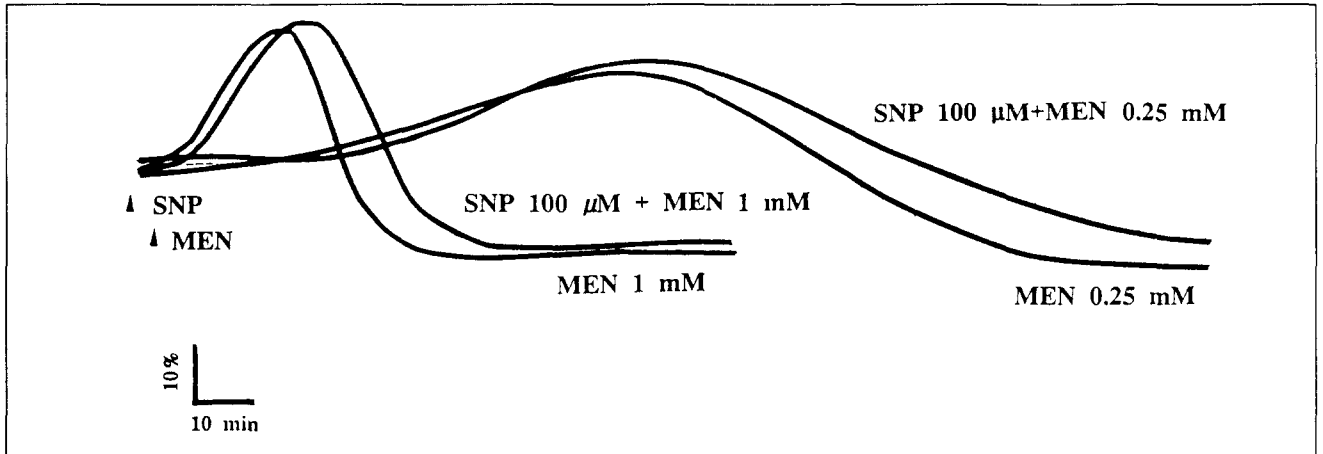


Fig. 3. Effect of sodium nitroprusside (SNP) on menadione (MEN)-induced changes in turbidity. PRP was incubated with MEN in the presence or absence of SNP. The X-axis represents the time of incubation and the Y-axis represents the percentage change in turbidity.

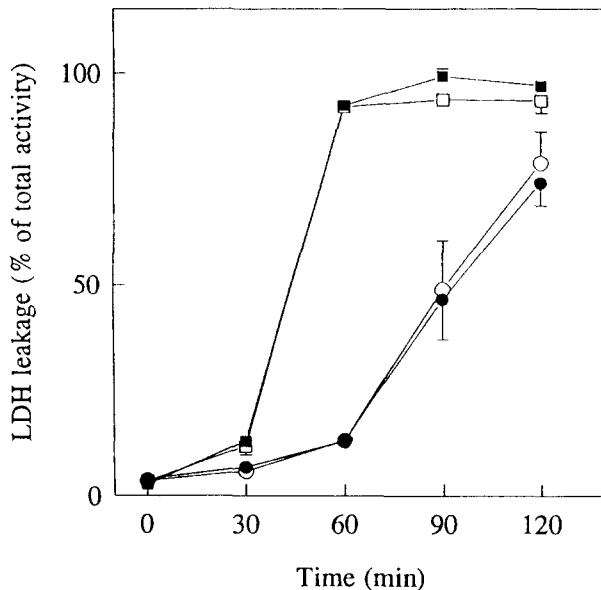


Fig. 4. Effect of sodium nitroprusside (SNP) on menadione (MEN)-induced cytotoxicity in rat platelets. ○; MEN 0.25 mM, ●; SNP 100 μM+MEN 0.25 mM, □; MEN 1 mM, ■; SNP 100 μM+MEN 1 mM.

LDH leakage를 이용한 독성지표의 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 3, Fig. 4).

IV. 고 찰

이상의 실험결과에서 menadione에 의한 혈소판 독성유발시에 혈소판 내부에서 생성되리라고 추측되어지는 nitric oxide나 또 혈소판 외부에 존재하는 nitric oxide는 독성에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 즉, nitric oxide synthase(NOS)의 specific한 inhibitor인 L-

methyl arginine methyl ester(L-NAME)를 사용하여 혈소판 내부에 존재하는 L-arginine : NO pathway를 억제하였을 경우 menadione이 유발하는 혈소판 독성에 변화를 일으키지 않았다.

Menadione은 혈소판에 노출시켰을 경우 cell lysis를 유발하며 이 때 일어나는 Ca²⁺의 증가 또한 관찰된 바 있다(Kim *et al.*, 1996; Mirabelli *et al.*, 1989). 즉 혈소판을 menadione 0.3 mM에 30분 노출시켰을 경우 세포내 Ca²⁺의 농도가 2.5 μM까지 증가함이 관찰되었다. Menadione에 의한 독성 기전으로서는 oxidative stress를 유발하는 superoxide anion, hydrogen peroxide 등의 toxic free radical의 생성이 분리 간세포에서 제시된 바 있으며(Thor *et al.*, 1982), 이는 여러 cell system에서 menadione의 독성기전으로서 광범위하게 받아들여지고 있다.

혈소판 내에 존재하는 NOS는 constitutive type으로 세포내 Ca²⁺의 농도에 의존적으로 그 활성이 증가하며 (Muruganandam and Mutus, 1994), 혈소판이 menadione에 노출되었을 경우 Ca²⁺ 증가에 기인한 NOS 활성의 증가가 일어날 것으로 예측된다. 이로 인해 생성된 nitric oxide는 아래와 같은 근거들에 의해 menadione에 의한 혈소판 독성에 영향을 미칠 것으로 예측되었다. 1) Nitric oxide의 free radical과의 반응성이다. Nitric oxide는 superoxide anion과 결합하여 peroxy-nitrite를 형성하며(Beckman *et al.*, 1990) peroxy-nitrite는 매우 독성이 강하다고 알려진 hydroxy radical과 nitrogen dioxide로 분해된다(Hogg *et al.*, 1992). 또한 nitric oxide는 hydrogen peroxide와 결합하여 반응성이 매우 강한 singlet oxygen을 생성함이 보고된 바 있다 (Noronha-Dutra *et al.*, 1993). 이는 nitric oxide가 독성

에 관여하는, 가장 광범위하게 보고되고 있는 기전이
다. 2) Nitric oxide는 NADH:ubiquinone oxidoreductase의 non heme iron과 결합하여 그 활성을 억제함이 관찰된 바 있다(Gramger and Lehninger, 1982). NADH:ubiquinone oxidoreductase는 menadione의 세포내 대사에 관여하는 효소로서 nitric oxide에 의한 이 효소의 활성억제는 menadione에 의한 혈소판 독성에 영향을 미칠 것으로 예상되었다. 3) Nitric oxide는 또한 iron-storage protein인 ferritin에 결합하여 iron을 유리, 그로 인한 지질과산화물 유발함이 보고되었다(Reif and Simmons, 1990). Iron의 존재는 또한 배양간 세포에서 menadione에 의한 세포독성에 변화를 유발함이 보고된 바 있다(Starke *et al.*, 1986).

이와 같은 보고를 종합하여 세운 가설과는 달리 nitric oxide가 menadione의 혈소판 세포독성에 관여하지 않은 이유는 첫째, menadione에의 혈소판 노출시 Ca^{2+} 의 증가에도 불구하고 NOS가 활성화되지 않았거나 활성화된 NOS가 어떤 원인에 의해 그 활성이 억제되었을 가능성이 있다. 즉 menadione에 혈소판 노출시 nitric oxide 생성자체가 이루어지지 않았을 경우이다. 이러한 가능성에 대한 근거로서는 menadione이 thiol에 특이하게 잘 결합하는 성질을 가지며(Nakai and Hase, 1968) NOS의 catalytic activity에 thiol group을 포함한 아미노산인 cysteine이 중요한 역할을 한다는 보고(Pei-Feng Chen *et al.*, 1994)와 연관지을 수 있다. Menadione이 NOS와 결합하여 그 활성을 감소시켰을 수 있기 때문이다. 둘째, 혈소판에서 생성된 nitric oxide가 소량이어서 menadione에 의한 독성에 영향을 미칠 만큼 free radical과의 반응을 일으키지 못했을 가능성이 있다.

한편 혈소판에 인접한 세포인 endothelial cell에서의 nitric oxide의 생성은 널리 보고된 바 있으며 *in vivo* 상태에서 혈소판은 외부에 존재하는 nitric oxide에 노출될 수 있다. Nitric oxide를 자발적으로 유리한다고 알려진 sodium nitroprusside(SNP)는 menadione이 유발하는 혈소판 독성에 어떤 영향도 미치지 않았으며 이는 혈소판 내부에서 생성되는 nitric oxide뿐만이 아니라 외부에 존재하는 nitric oxide 역시 menadione에 의한 혈소판 독성에 주된 역할을 하고 있지 않음을 시사한다.

감사의 말씀

이 논문은 1995년 서울대학교 신의약품 개발 연구센터(KOSEF-RCNDD) 지원으로 수행되었으며 이에 감

사드립니다.

참고문헌

- Bauer, M.L., Beckman, J.S., Bridges, R.J., Fuller, C. M. and Matalon, S. (1992): Peroxynitrite inhibits sodium uptake in rat colonic membrane vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* **1104**, 87-94.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. and Fremann, B.A. (1990): Apparent hydroxy radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1620-1624.
- Bergmeyer, H.U., Bernt, E. and Hess, B. (1965): Lactate dehydrogenase, in *Method in enzymatic analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.) pp.736, Academic press, New York.
- Bredt, D.S. and Snyder, S.H. (1994): Nitric Oxide: A physiological messenger molecule, *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 175-195.
- Chen, P.F., Tsai, A.L. and Wu, K.K. (1994): Cysteine 184 endothelial nitric oxide synthase is involved in heme coordination and catalytic activity, *J. Biol. Chem.* **269**, 25062-25066.
- Dawson, V.L., Dawson, T.M., London, E.D., Bredt, D. S. and Snyder, S.H. (1991): Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures, *Proc. natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6368-6371.
- Dimmeler, S., Lottspeich, F. and Brun, B. (1992): Nitric oxide causes ADP-ribosylation and inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* **267**, 16771-16774.
- Dimonte, D., Ross, D., Bellomo, G., Eklow, L. and Orrenius, S. (1984): Alteration in intracellular thiol homeostasis during the metabolism of menadione by isolated rat hepatocytes, *Arch. Biochem. Biophys.* **235**, 334-342.
- Durante, W., Kroll, M.H., Vanhoutte, P.M. and Schaffer, A.I. (1992): Endothelium-derived relaxing factor inhibits thrombin-induced platelet aggregation by inhibiting platelet phospholipase C, *Blood* **79**, 110-116.
- Granger, D.L. and Lehninger, A.L. (1982): Sites of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cells, *J. Cell Biol.* **95**, 527-535.
- Hogg, N., Darley-Usmar, V.M., Wilson, M.T. and Moncada, S. (1992): Production of hydroxy radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide, *Biochem. J.* **281**, 419-424.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M. and Martin, J.C. (1992): Peroxynitrite-mediated tyro-

- sine nitration catalyzed by superoxide dismutase, *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 431-437.
- Kim, K.A., Kim, M.J., Kim, C.K., Ryu, M.J., Chang, M. J., and Chung, J.H. (1995): Menadione-induced Cytotoxicity in rat platelets: Absence of the detoxifying enzyme, quinone reductase, *Arch. Pharm. Res.* **18**, 262-266.
- Kim, K.A., Lee, J.Y., Park, K.S., Kim, M.J., and Chung, J.H. (1996): The mechanism of menadione-induced cytotoxicity in rat platelets, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* in press.
- Kurose, I., Wolf, R., Grisham, M.B. and Granger, G.D. (1994): Modulation of ischemia/reperfusion-Induced microvascular dysfunction by nitric oxide, *Circ. Res.* **74**, 376-382.
- Mirabelli, F., Sallis, A., Vairetti, M., Bellomo, G., Thor, H. and Orrenius, S. (1989): Cytoskeletal alterations in human platelets exposed to oxidative stress are mediated by oxidative and Ca²⁺-dependent mechanisms, *Arch. Biochem. Biophys.* **270**, 478-488.
- Moncada, S., Higgs, E.A., Hodson, H.F., Knowles, R. G., Lopez-Jaramillo, P., McCal, T., Palmer, R.M.J., Radomski, M.W., Rees, D.D. and Shulz, R. (1991): The L-arginine: nitric oxide pathway, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **17**, S1-S9.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J. and Higgs, H.A. (1991): Nitric oxide: physiology, pathology, and pharmacology, *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142.
- Murunganandam, A. and Mutus, B. (1994): Isolation of nitric oxide synthase from human platelets, *Biochim. Biophys. Acta* **1200**, 1-6.
- Nakai, N. and Hase, J.I. (1968): The reaction of 2-methyl-1,4-naphthoquinone with sulfhydryl compounds, *Chem. Pharm. Bull.* **16**, 2334-2338.
- Noronha-Dutra, A.A., Epperlein, M.M. and Woolf, N. (1993): Reaction of nitric oxide with hydrogen peroxide to produce potentially cytotoxic singlet oxygen as a model for nitric oxide-mediated killing, *FEBS Lett.* **321**, 59-62.
- Palmer, R.M.J., Ashton, D.S. and Moncada, S. (1988): Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine, *Nature* **333**, 664-666.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M. and Freeman, B. A. (1991a): Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide, *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 481-487.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M. and Freeman, B. A. (1991b): Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls, *J. Biol. Chem.* **266**, 4244-4250.
- Radomski, M. and Moncada, S. (1983): An improved method for washing human platelets with prostaglandin, *Thromb. Res.* **30**, 383-389.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M.J. and Moncada, S. (1990): An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5193-5197.
- Radons, J., Heller, B., Bürkle, A., Hartmann, B., Rodriguez, M.L., Kröncke, K.D., Burkart, V. and Kolb, H. (1994): Nitric oxide toxicity in islet cells involves poly(ADP-ribose) polymerase activation and concomitant NAD⁺ depletion, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **199**, 1270-1277.
- Reief, D.W. and Simmons, R.D. (1990): Nitric oxide mediates iron release from ferritin, *Arch. Biochem. Biophys.* **283**, 537-541.
- Sneddon, J.M. and Vane, J.R. (1988): Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2800-2804.
- Starke, P.E., Hoek, J.B. and Farber, J.L. (1986): Calcium-dependent and calcium-independent mechanism of irreversible cell injury in cultured hepatocytes, *J. Biol. Chem.* **261**, 3006-3012.
- Thor, H., Smith, M.T., 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.
- Wink, D.A., Kasprzak, K.S., Maragos, C.M., Elespuru, R.K., Misra, M., Dunam, T.M., Cebula, T.M., Koch, W.H., Andrews, A.W., Allen, J.S. and Keefer, L.K. (1991): DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors, *Science* **254**, 1001-1003.