



CO-METABOLISM OF MENADIONE (VITAMIN K3) AND ETHANOL IN HUMAN LIVER FRACTIONS

Krzysztof TUTAJ, Grzegorz BUSZEWICZ, Grzegorz TERESIŃSKI, Roman MAĐRO

Chair and Department of Forensic Medicine, Medical University, Lublin, Poland

Abstract

An experiment was carried out to clarify whether the addition of menadione (i.e. vitamin K3, 2-methyl-1,4-naphthoquinone) to human liver homogenates leads to accelerated oxidation of ethanol (Et-OH) and if so, whether mitochondria and the microsomal ethanol-oxidising system (MEOS) are involved, and whether the acceleration depends on the activity of quinone reductase (QR). The kinetics of ethanol elimination in S0.6 and S9 fractions of human liver homogenates was examined after administration of menadione and Et-OH. The third experimental group was the S9 fraction, in which the MEOS was blocked by 3-amino-1,2,4-triazole (3AT). The activity of QR was blocked with dicumarol (DIC). Concentrations of Et-OH were determined using headspace gas chromatography (HS-GC) with flame ionisation detector (FID). Results: 1) acceleration of Et-OH oxidation by menadione occurs in human liver homogenates. Statistically significant smaller areas under the curve of Et-OH elimination plot (AUC values) were shown. 2) Comparison of AUC values shows that *in vitro* quinone reductase, mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase and MEOS are involved in the vitamin K-accelerated rate of Et-OH oxidation. These findings demonstrate that mitochondria, MEOS and also QR activity are involved in the menadione – increased rate of Et-OH oxidation.

Key words

Acceleration of ethanol oxidation; Human liver; Subcellular fractions; Reoxidation of NADH.

Received 24 April 2008; accepted 30 April 2008

1. Introduction

The conversion of ethanol into acetaldehyde, catalysed by alcohol dehydrogenase (ADH) with simultaneous reduction of NAD⁺ to NADH, is found to be a rate-limiting step in the ethanol metabolism pathway [17, 26]. To date, it has not been fully explained whether this is affected by the maximal activity of ADH or by the liver's ability to regenerate NAD⁺. Ryle et al. demonstrated that the administration of methylene blue to experimental animals accelerated the rate of ethanol elimination due to non-enzymatic oxidation of NADH to NAD⁺ [21]. However, it is generally believed that ethanol metabolism is accelerated by enzymatic reoxidation of NADH to NAD⁺ [7, 21].

A significantly accelerated rate of ethanol elimination *in vitro* following the administration of cyclohexanone to the S9 fraction of rat liver homogenates was explained by the “shuttle” flow of protons between substrates within the ADH-NADH complex [1], which is the most efficient mechanism of NADH reoxidation [16]. However, a study on the co-metabolism of ethanol and quinone compounds (in *vivo* in rats) revealed that quinone reductase (QR; DT-diaphorase; NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1; NQO1; EC 1.6.99.2), which is abundant in the liver, is also involved in the reoxidation of NADH to NAD⁺ outside the ADH-NADH complex [3, 4]. It is known that during the catalysis of two-electron reduction of quinones to hydroquinones, quinone reductase uses NADH with

formation of NAD⁺ [2]. Therefore, the reduction of quinone substrates (both exo- and endogenous) by QR is likely to lead to increased regeneration of NAD⁺, thus accelerating the rate of ethanol metabolism, which was demonstrated in rats [3, 4].

Among various quinones, vitamin K3 was found to be the most appropriate substrate for QR in rats [2]. Menadione belongs to the vitamin K family, which comprises phyloquinone – K1, menaquinone – K2 and menadiol – K4 [22]. Therefore, co-metabolism of menadione and ethanol is also likely to occur in humans, as menadione is a catabolic product of phyloquinone [24], thus foodstuffs rich in natural vitamin K1 may be its source [6].

Other reports have shown that cellular menadione undergoes reduction catalysed by enzymatic systems other than QR, i.e.:

- mitochondrial NADH : ubiquinone oxidoreductase (complex 1, EC 1.6.5.3; referred to henceforth in our paper as RC – respiratory chain) [25];
- enzymes linked to MEOS, i.e. NADPH – dependent cytochrome P450 reductase (EC 1.6.2.4), cytochrome b5 reductase (EC 1.6.2.2) [15, 20];
- cytosolic NADPH-dependent carbonyl reductase (CBR, EC 1.1.1.184)¹ [8, 15].

The involvement of QR, RC and MEOS-related enzymes in quinone metabolism has not been fully determined [20]. However, the model of NADH reoxidation in the presence of menadione presented in Figure 1 is considered to be probable [3, 4]. Under such conditions, NADH oxidation should be expected (probably mainly by QR), which then accelerates Et-OH elimination.

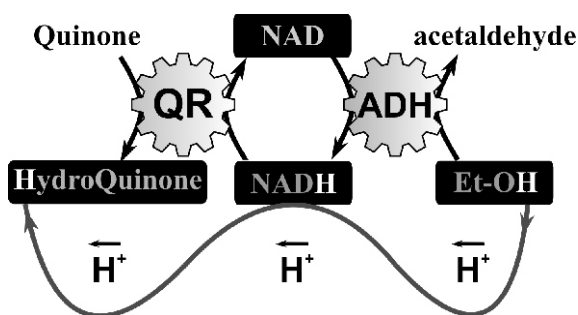


Fig. 1. Diagram of co-metabolism of ethanol (Et-OH) and quinone with involvement of alcohol dehydrogenase (ADH) and quinone reductase (QR).

In the present study concerning the possibilities of increasing ethanol metabolism, we used a system

¹ Due to the cofactor type (exclusively NADPH), the involvement of this enzyme in co-metabolism of ethanol and menadione was not considered in our study.

which contained subcellular fractions of human liver homogenates, ethanol at a concentration corresponding to ~0.5‰ and menadione in equimolar amount to Et-OH, as in earlier studies [23]. For this purpose, two variants were used (A and B). The first (A) included three experimental groups with:

- the S0.6 fraction (with active ADH and QR + MEOS + RC);
- S9 (with active ADH + QR + MEOS);
- S9 + 3AT (in which MEOS was blocked by adding 50 mM 3-amino-1.2.4-triazole, i.e. ADH + QR remained active) (Figure 2) [13].

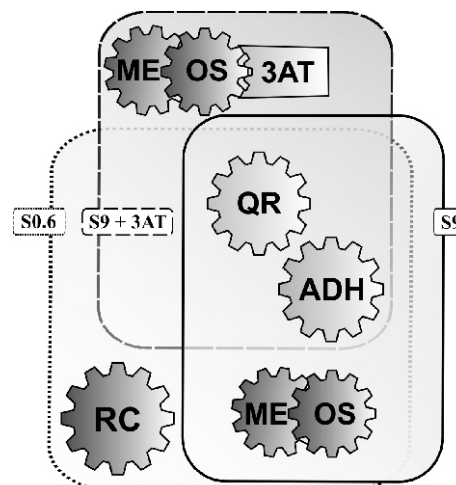


Fig. 2. Enzymatic systems in the three experimental groups. Symbols used are the same as those in the text.

In the second variant (B), in analogical experimental groups, QR [10, 19] and reductases belonging to the MEOS system [5, 11] were blocked using dicumarol. The aim of designing the experiment in this way was to explain whether the addition of menadione to human liver homogenates leads to accelerated oxidation of Et-OH and if so, whether mitochondria and the MEOS system are involved, and whether the acceleration depends on the activity of QR.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Human livers were obtained from three unselected cadavers (males aged 21, 24, 27; who had died instantly due to road accidents and were sober at the time of death). The harvested liver samples showed no visible macro- or microscopic abnormalities. The specimens had been collected 2–6 h after death for toxico-

logical expert analyses requested by prosecutors. Fractions of homogenates were obtained in the same way as in earlier studies [12, 23]. Ethanol (PoCh, Poland); NAD⁺, 4-methylpyrazole and pyrazole (Merck, Germany); menadione, tert-butanol, dicumarol, 3-amino-1,2,4-triazol and Na₂HPO₄ (Sigma, USA); Tween 85 (Koch-Light Laboratories Ltd., England) were used.

2.2. The course of the experiment

2.2.1. Variant A (without QR inhibition)

First, 2.1 ml of phosphate buffer (200 mM, pH = 7.4), 0.4 ml of NAD⁺ (30 mM), 0.8 ml of freshly thawed S0.6 or S9 fraction and 0.4 ml of 100 mM Et-OH were poured into 12 ml polypropylene test-tubes (thus obtaining 10 mM Et-OH in the reaction mixture). This mixture was divided into two portions (1.8 ml each); 0.2 ml of 100 mM menadione in 0.01% Tween 85 solution was added to the experimental trial (thus obtaining 10 mM menadione in the reaction mixture) and 0.2 ml of phosphate buffer was added to the control trial. Immediately after the addition of menadione and buffer, 0.3 ml was collected from both mixtures as the “zero” sample (into headspace vials with 10 μ l of a 1:1 mixture of 1g/l pyrazole and 4-methylpyrazole, which discontinued the ethanol oxidation reaction). The experimental and control samples were thermostated at 37°C and 0.3 ml of the reaction mixture was collected as described above after 15, 60, 120 and 180 minutes, discontinuing the Et-OH oxidation as described above. Ethanol levels were immediately analysed.

2.2.2. Variant B (with QR and MEOS inhibition)

The experiment was conducted similarly to variant A, except that DIC was added prior to the introduction of ethanol into the reaction mixture. The amount

of dicumarol was adjusted to reach a final concentration of 50 μ M [10, 19].

2.3. Ethanol determination

The concentration of Et-OH was determined by the well known headspace gas chromatography method with tert-butanol as an internal standard. Conditions for analysis were as follows: Thermo Finnigan HS 2000 autosampler, Fisons 8160 gas chromatograph with FID detector, parallel columns BAC-1 and BAC-2 30 m \times 0.52 mm i.d. (Restek, USA), oven temperature 40°C isothermal, carrier gas flow rate (Helium) 2 ml/min.

3. Results

The results of determinations in the control group as well as in variants A and B (using S0.6, S9 and S9 + 3AT) in trial 0 and after 180 min are presented in Table I. Mean concentrations of ethanol throughout the experiment are shown in Figure 3. The elimination of ethanol in the 0–180 minute period was analysed as the area under the curve (AUC) using NCSS Statistical Systems [9] (Figure 4). A Kruskal-Wallis test was used to determine which groups were significantly different from the control. Results were considered to have reached statistical significance when $p < 0.02$.

4. Discussion

Table I shows that at 180 minutes the decrease in Et-OH concentration in control trials of the three experimental groups – S0.6, S9 and S9 + 3AT was similar – 1.2, 1.3 and 1.4 mM, respectively. In the S9 group without menadione, where mitochondria were removed (by centrifugation) and MEOS blocked (by 3AT), the rate of Et-OH elimination did not markedly

TABLE I. Et-OH CONCENTRATIONS (MM) DETERMINED AT 0 AND 180 MINUTES OF INCUBATION. VALUES ARE MEANS OF THREE EXPERIMENTS \pm STANDARD DEVIATIONS ($n = 3$, MEAN \pm SD)

Experimental group	Control 0–180 min	Variant A (menadione) 0–180 min	Variant B (menadione + DIC) 0–180 min
S0.6	10.0 – 1.2 = 8.8 $\pm 0.7 \pm 0.5$	10.0 – 4.3 = 5.7 $\pm 0.7 \pm 0.9$	10.0 – 2.7 = 7.3 $\pm 1.3 \pm 1.2$
S9	10.0 – 1.3 = 8.7 $\pm 0.8 \pm 0.8$	10.1 – 3.9 = 6.2 $\pm 0.8 \pm 0.6$	10.1 – 2.9 = 7.2 $\pm 1.2 \pm 0.2$
S9 + 3AT	10.1 – 1.4 = 8.7 $\pm 0.6 \pm 2.9$	10.1 – 2.7 = 7.4 $\pm 0.4 \pm 1.7$	10.1 – 2.2 = 7.9 $\pm 2.7 \pm 1.8$

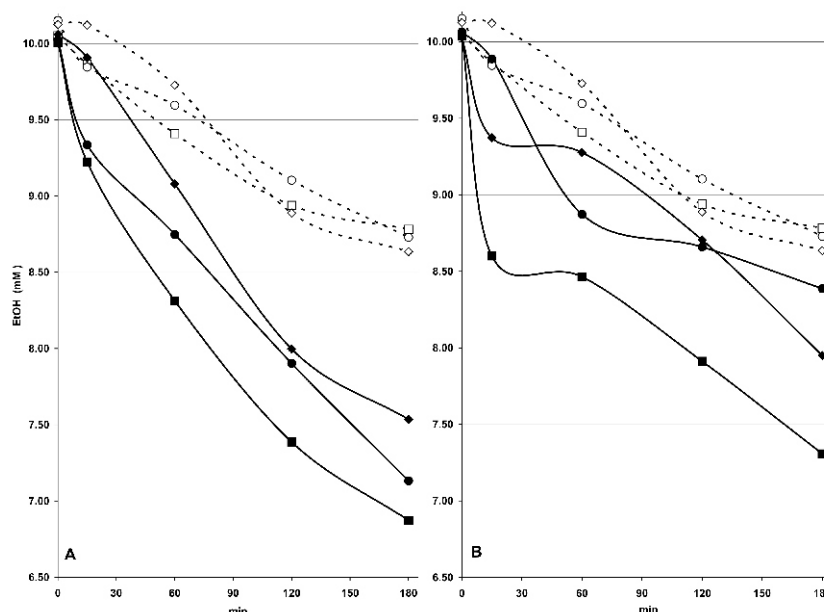


Fig. 3. Mean concentrations ($n = 3$) of Et-OH (mM) during 180 minutes of the experiment in control trials (---), in variant A after addition of menadione and in variant B after addition of menadione and DIC (—). Symbols of experimental groups: S0.6 (\square) and (\blacksquare); S9 (\circ) and (\bullet); S9 + 3AT (\diamond) and (\blacklozenge).

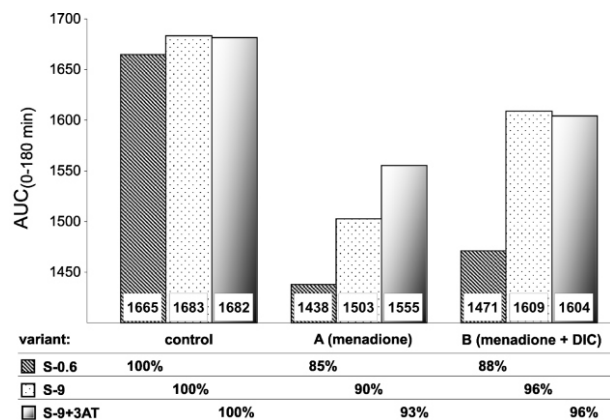


Fig. 4. Comparison of AUC values (0–180 minute) for EtOH loss (mM min^{-1}) in columns. The table includes % AUC in relation to control AUC .

decrease. Moreover, the values of AUC were similar (Figure 4).

In the analogical experimental groups (S0.6; S9 and S9 + 3AT) with menadione (i.e. in variant A), the loss of Et-OH was higher than in control trials – 4.3, 3.9 and 2.7 mM, respectively, whereas AUC was found to be decreased by 15, 10 and 7% ($p < 0.02$). The highest decreases in Et-OH and AUC in variant A fraction S0.6 may be explained by the fact that in the liver cell fractions with mitochondria (S0.6), menadione is reduced

simultaneously by the 3 enzymatic systems (QR, RC and MEOS). This is associated with enhanced NADH to NAD^+ reoxidation, which increases the ADH-NAD⁺ pool and accelerates the elimination of Et-OH. On the other hand, in variant A fraction S9 without mitochondrial NADH : ubiquinone oxidoreductase, the loss of Et-OH was found to be lower than in the S0.6 fraction, thus AUC has increased. This difference shows that mitochondria participate in menadione-stimulated reoxidation of NADH to NAD^+ . This part of our experiment confirms the involvement of RC in the reduction of menadione [18, 25]. In the third experimental group of variant A (with the S9 fraction and addition of 3AT, which inhibited MEOS), the loss of Et-OH (2.7 mM) was markedly smaller than in fractions S0.6 and S9. In this group, the value of AUC decreased by 7% (compared to the control). The relationship observed should be attributed to QR activity as only this system of NADH reoxidation was active. Thus, the difference in Et-OH loss (an increase in AUC by 3%) found in fractions S9 and S9 + 3AT of variant A should be ascribed to inconsiderable NADH reoxidation by MEOS.

In variant B, i.e. homogenates with menadione and DIC (dicumarol blocking QR and MEOS), the loss of Et-OH after the 180-minute intubation in experimental groups S0.6, S9 and S9 + 3AT was 2.7, 2.9 and 2.2 mM, respectively, while AUC decreased by 12. 4 and 4 % ($p < 0.02$, and $p > 0.2$ for S9 + 3AT), respectively. The

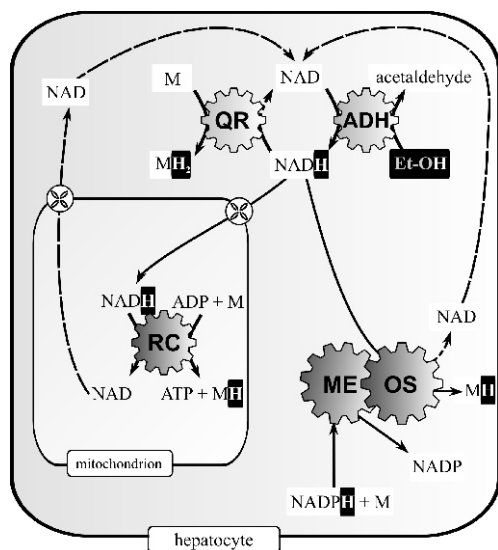


Fig. 5. A suggested diagram of relations during Et-OH and menadione co-metabolism (X – shuttle systems of proton transport).

differences between fractions S0.6, S9 and S9+3AT (decrease of *AUC* in fraction S0.6, $p < 0.02$) should be related to dicumarol-induced blocking of QR, NADPH : cytochrome P450 reductase and NADH : cytochrome b₅ reductase (i.e. the MEOS enzymes), which is confirmed by the lack of differences between *AUC* for S9 and S9 + 3AT [5, 10, 11]. Based on the above interpretation, the 8% increase in *AUC* for S9 and S9 + 3AT fractions compared to the S0.6 fraction should be attributed exclusively to the mitochondrial activity of NADH : ubiquinone oxidoreductase in the S0.6 fraction. The 4% *AUC* difference ($p > 0.02$) between S9, S9 + AT control groups and corresponding groups of variant B (where the activity of NADH-dependent menadione reducing enzymes should be blocked) may be explained by partial inhibition of these enzymes, other enzymes involved in reoxidation of NADH to NAD⁺ or even oxidation of ethanol by H₂O₂-dependent catalase [14, 15, 18].

5. Conclusions

1. In conclusion, we pinpointed the menadione-stimulated acceleration of Et-OH oxidation in human liver homogenates.
2. Comparison of *AUC* values shows that in vitro quinone reductase, mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase and MEOS are involved in the vitamin K-accelerated rate of Et-OH oxidation. The suggested diagram of relations during this

co-metabolism, based on the analysis of experimental findings, is presented in Figure 5.

3. The menadione and ethanol co-metabolism findings might be important due to the interaction of phyloquinone – rich food products and ethanol.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Medical University of Lublin under PW Grant no. 545/07.

References

1. Buszewicz G., Mądro R., In vitro co-metabolism of ethanol and cyclic ketones, *Toxicology* 2002, 177, 207–213.
2. Chesis P. L., Levin D. E., Smith M. T. [et al.], Mutagenicity of quinones: pathways of activation and detoxification, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984, 81, 1696–1700.
3. Chung J. H., Cheong J. C., Lee J. Y. [et al.], Acceleration of the alcohol oxidation rate in rats with aloin, a quinone derivative of aloe, *Biochemical Pharmacology* 1996, 52, 1461–1468.
4. Chung J. H., Rubin R. J., Cha Y. N., Effects of vitamin K1 and menadione on ethanol metabolism and toxicity, *Drug and Chemical Toxicology* 1993, 16, 383–394.
5. Cummings J., Allan L., Willmott N. [et al.], The enzymology of doxorubicin quinone reduction in tumour tissue, *Biochemical Pharmacology* 1992, 44, 2175–2183.
6. Damon M., Zhang N. Z., Haytowitz D. B. [et al.], Phylloquinone (vitamin K1) content of vegetables, *Journal of Food Composition and Analysis* 2005, 18, 751–758.
7. Eriksson P. C. J., Saarenmaa T. P. S., Bykov I. L. [et al.], Acceleration of ethanol oxidation by D-glycerate in rats, *Metabolism* 2007, 56, 895–898.
8. Forrest G. L., Gonzalez B., Carbonyl reductase, *Chemico-Biological Interactions* 2000, 129, 21–40.
9. Hintze J., NCSS. Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah 2004.
10. Hodnick W. F., Sartorelli A. C., Measurement of dicumarol-sensitive NADPH : (menadione-cytochrome c) oxidoreductase activity results in an artifactual assay of DT-diaphorase in cell sonicates, *Analytical Biochemistry* 1997, 252, 165–168.
11. Hodnick W. F., Sartorelli A. C., Reductive activation of mitomycin c by NADH : cytochrome b₅ reductase, *Cancer Research* 1993, 53, 4907–4912.
12. Kassam J. P., Tang B. K., Kadar D. [et al.], In vitro studies of human liver alcohol dehydrogenase variants using a variety of substrates, *Drug Metabolism and Disposition* 1989, 17, 567–571.

13. Kopp D. R., Inhibition of ethanol-inducible cytochrome P450IIE1 by 3-amino-1,2,4-triazole, *Chemical Research in Toxicology* 1990, 3, 377–383.
14. Lieber C. S., Alcohol and the liver: 1994 update, *Gastroenterology* 1994, 106, 1085–1105.
15. Parkinson A., Biotransformation of xenobiotics, [in:] Casarett & Doull's toxicology the basic science of poisons, Klaassen C. D. [ed.], McGraw-Hill Professional, New York 2001.
16. Pietruszko R., Nonethanol substrates of alcohol dehydrogenase [in:] Biochemistry and pharmacology of ethanol, vol. 1, Majchrowicz E., Noble E. P. [eds.], Plenum Press, New York 1979.
17. Plapp B. V., Rate-limiting steps in ethanol metabolism and approaches to changing these rates biochemically, *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1975, 56, 77–109.
18. Powis G., Svingen B. A., Appel P., Quinone-stimulated superoxide formation by subcellular fractions, isolated hepatocytes, and other cells, *Molecular Pharmacology* 1981, 20, 387–394.
19. Preusch P. C., Siegel D., Gibson N. W. [et al.], A note on the inhibition of DT-diaphorase by dicoumarol, *Free Radical Biology & Medicine* 1991, 11, 77–80.
20. Prough R. A., Gettings S. D., Lubet R. A. [et al.], The relative participation of DT-diaphorase and NADPH-cytochrome P-450 reductase in quinone reduction, *Chemica Scripta* 1987, 27A, 99–104.
21. Ryle P. R., Chakraborty J., Thomson A. D., The effect of methylene blue on the hepatocellular redox state and liver lipid content during chronic ethanol feeding in the rat, *The Biochemical Journal* 1985, 232, 877–882.
22. Tamura K., Southwick E. C., Kerns J. [et al.], Cdc25 inhibition and cell cycle arrest by synthetic thioalkyl vitamin K analogue, *Cancer Research* 2000, 60, 1317–1325.
23. Teresiński G., Buszewicz G., Mądro R., In vitro co-metabolism of acetoacetate and ethanol in human hepatic mitochondrial and cytosolic fractions, *Chemico-Biological Interactions* 2005, 156, 125–130.
24. Thijssen H. H. W., Vervoort L. M. T., Schurgers L. J. [et al.], Menadione is a metabolite of oral vitamin K, *British Journal of Nutrition* 2006, 95, 260–266.
25. Thor H., Smith M. T., Hartzell P. [et al.], The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes, *The Journal of Biological Chemistry* 1982, 257, 12419–12425.
26. Videla L., Israel Y., Factors that modify the metabolism of ethanol in rat liver and adaptive changes produced by its chronic administration, *The Biochemical Journal* 1970, 118, 275–281.

Corresponding author

Grzegorz Buszewicz
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8
PL 20-090 Lublin
e-mail: g.buszewicz@am.lublin.pl

INTERAKCJA METABOLICZNA MENADIONU (WITAMINY K3) I ETANOLU WE FRAKCJACH WĄTROBY CZŁOWIEKA

1. Wstęp

Przemiana etanolu w aldehyd octowy, katalizowana przez dehydrogenazę alkoholową (ADH, EC 1.1.1.1) przy jednoczesnej redukcji NAD⁺ do NADH, jest fazą ograniczającą szybkość szlaku metabolizmu etanolu [17, 26]. Dotychczas nie rozstrzygnięto jednak, czy uwarunkowane jest to przez maksymalną aktywność ADH, czy też przez określoną zdolność wątroby do regeneracji NAD⁺. Ryle i in. [21] wykazali, że podawanie błękitu metylenowego zwierzętom eksperymentalnym przyspiesza tempo metabolizmu etanolu przez nieenzymatyczną oksydację NADH do NAD⁺. Przeważa jednak pogląd, że metabolizm etanolu przyspiesza enzymatyczna reoksydacja NADH do NAD⁺ [7, 21]. Istotne przyspieszenie tempa eliminacji etanolu *in vitro* po dodaniu cykloheksanonu do frakcji S9 homogenatów wątrób szczurzych tłumaczono zaś „wahadłowym” przepływem protonów między substratami w obrębie kompleksu ADH-NADH [1], który stanowi najbardziej wydajny mechanizm reoksydacji NADH [16].

Wyniki badań Chung i in. [3, 4] nad interakcją metaboliczną etanolu i związków chinonowych (*in vivo* u szczurów) wskazują na to, że do reoksydacji NADH do NAD⁺ poza kompleksem ADH-NADH dochodzi także przy udziale reduktazy chinonowej (QR; DT-diaphorase; DTD; NAD(P)H : quinone oxidoreductase 1; NQO1; EC 1.6.99.2), która w dużej ilości obecna jest w wątrobie. Wiadomo przy tym, że podczas katalizowania dwuelektronowej redukcji chinonów do hydrochinonów reduktaza chinonowa wykorzystuje NADH z wytworzeniem NAD⁺ [2]. Redukcja substratów chinonowych (zarówno egzo-, jak i endogennych) przez QR może zatem prowadzić do wzmoczenia regeneracji NAD⁺, a tym samym zwiększenia tempa metabolizmu etanolu, co zostało wykazane u szczurów [3, 4].

Chesis i in. [2] stwierdzili, że u szczurów doskonałym substratem dla QR jest menadion, czyli witamina K3, oprócz której do witamin K zaliczane są: fitomenadion – K1, menachinon K2 i menadiol – K4 [22]. Prawdopodobna jest zatem interakcja metaboliczna menadionu i etanolu także u ludzi, co zasługuje na uwagę, bowiem badania Thijssen i in. [24] wykazały, że u człowieka menadion jest katabolicznym produktem fitomenadionu, zatem jego źródłem może być żywność bogata w naturalną witaminę K1 [6].

Z innych opublikowanych doniesień wiadomo natomiast, że w komórce chinony, a więc również menadion, ulegają redukcji katalizowanej przez inne niż QR układy enzymatyczne, tj.:

- mitochondrialną oksydoreduktazę NADH : ubichinon (kompleks 1, EC 1.6.5.3; oznaczoną dalej w tej pracy jako RC – ang. respiratory chain) [25];
- enzymy związane z MEOS, tj.: reduktazę cytochromu P450 zależną od NADPH (EC 1.6.2.4) i reduktazę cytochromu b5 (EC 1.6.2.2) [15, 20];
- reduktazę karbonylową zależną od NADPH (CBR, EC 1.1.1.184)¹ [8, 15].

Udział QR, RC i enzymów związanych z MEOS w metabolizmie chinonów nie został jednak dotychczas ustalony [20], ale na podstawie danych zawartych w literaturze przedmiotu [3, 4] prawdopodobny jest przedstawiony na rycinie 1 model reoksydacji NADH w obecności menadionu. Zgodnie z wcześniejszymi ustaleniami, należy bowiem wówczas oczekiwać przyspieszenia reoksydacji NAD⁺ polegającej na utlenieniu NADH (prawdopodobnie głównie przez QR) i w efekcie przyspieszenie tempa eliminacji Et-OH.

W opisanych tu badaniach nad możliwością zwiększenia metabolizmu etanolu użyty został układ badawczy, który zawierał subkomórkowe frakcje homogenatów ludzkich wątrób, etanol w stężeniu odpowiadającym ~0.5‰ i menadion w stężeniu ekwimolarnym w odniesieniu do Et-OH [23]. Zastosowano w tym celu 2 warianty (A i B), z których jeden (A) stanowiły trzy grupy badawcze z użyciem frakcji:

- S0.6 (w której aktywne były ADH oraz QR + MEOS + RC);
- S9 (gdzie aktywne były ADH + QR + MEOS);
- S9 + 3AT (gdzie przez dodanie 50 mM 3-amino-1,2,4-triazolu zablokowano MEOS [13], czyli aktywne pozostawały ADH + QR) (rycina 2).

W wariacie B, w analogicznych jak powyżej trzech grupach badawczych, przy użyciu dikumarolu (DIC) zablokowano QR [10, 19] i reduktazy należące do układu MEOS [5, 11]. Tak zaplanowany eksperyment miał wyjaśnić, czy w homogenatach ludzkich wątrób dodatek menadionu prowadzi do akceleracji utleniania Et-OH, a jeżeli tak, to czy mitochondria i system mikrosomalny MEOS biorą udział w tej akceleracji oraz czy ta akceleracja zależy od aktywności QR.

¹ Ze względu na kofaktor (NADPH) pominięto udział tego enzymu w kometabolizmie etanolu i menadionu.

2. Materiały i metody

2.1. Materiały

Fracje homogenatów uzyskano z wątroby ludzkich ($n = 3$) w sposób wcześniej przedstawiony [12, 23]. Wątroby pozyskano z trzech zwłok (mężczyźni w wieku 21, 24, 27 lat, którzy zmarli natychmiast po doznaniu urazu w wypadku drogowym oraz byli trzeźwi w momencie śmierci). Pobrane wątroby nie wykazywały żadnych widocznych makro- i mikroskopowych nieprawidłowości. Wykorzystano następujące odczynniki: etanol (PoCh, Polska); NAD⁺, 4-metylopirazol i pirazol (Merck, Niemcy); menadion, tert-butanol, dikumarol, 3-amino-1,2,4-triazol i Na₂HPO₄ (Sigma, Stany Zjednoczone); Tween 85 (Koch Laboratories Ltd, Wielka Brytania).

2.2. Przebieg eksperymentu

2.2.1. Wariant A (bez inhibicji QR)

Do próbek polipropylenowych o pojemności 12 ml odmierzano: 2,1 ml buforu fosforanowego (200 mM, pH = 7,4); 0,4 ml NAD⁺ (30 mM); 0,8 ml świeżo rozmrożonej frakcji S0.6 lub S9 i 0,4 ml 100 mM Et-OH (przez co uzyskiwano 10 mM Et-OH w mieszaninie reakcyjnej). Tę mieszaninę reakcyjną dzielono na 2 porcje (po 1,8 ml) i do próby badawczej dodawano 0,2 ml 100 mM menadionu w 0,01% roztworze Tween 85 (przez co uzyskiwano 10 mM menadionu w mieszaninie reakcyjnej), a do próby kontrolnej 0,2 ml buforu fosforanowego. Bezpośrednio po dodaniu menadionu i buforu z obu mieszanin pobierano do oznaczeń po 0,3 ml jako próbkę 0 (do fiolek *head-space* z 10 l mieszaniny 1:1 100 mg/dl pirazolu i 4-metylopirazolu, która przerywała reakcję utleniania etanolu). Następnie próbkę badawczą i kontrolną termostatowano w temperaturze 37°C i w sposób podany wyżej po upływie 15, 60, 120 i 180 min pobierano z nich po 0,3 ml mieszaniny reakcyjnej, przerywając utlenianie Et-OH w sposób wyżej podany.

2.2.1. Wariant B (z inhibicją QR i MEOS)

Eksperyment przebiegał jak w wariacie A, ale przed wprowadzeniem etanolu do mieszaniny reakcyjnej dodawano DIC w takiej ilości, aby jego stężenie końcowe wynosiło 50 M [10, 19].

2.3. Oznaczanie etanolu

Stężenie Et-OH oznaczano powszechnie używaną metodą statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej przy użyciu tert-butanolu jako standardu wewnętrznego. Zastosowano automatyczny dozownik Thermo Finnigan HS 2000 i chromatograf gazowy Fisons 8160 z detek-

torem FID i równolegle zainstalowanymi kolumnami BAC-1 i BAC-2 30 m 0,52 mm (Restek), temperatura wynosiła 40°C, a przepływ gazu 2 ml/min.

3. Wyniki i sposób ich analizy

Wyniki oznaczeń w grupie kontrolnej oraz w wariantach A i B (przy użyciu S0.6; S9 i S9 + 3AT) w próbie 0 i po 180 min zostały przedstawione w tabeli I. Na rycinie 3 zestawiono natomiast średnie stężenia etanolu w przebiegu całego eksperymentu. Eliminację etanolu w przedziale czasu 0–180 min analizowano jako pole powierzchni pod krzywą (*AUC*) przy użyciu programu NCSS Statistical Systems [9], czego rezultaty ukazuje rycina 4. Istotność statystyczną różnic między wartościami *AUC* grup badanych i kontrolnych zbadano za pomocą testu Kruskala-Wallisa. Wyniki mające wartość $p < 0,02$ rozpatrywano jako istotne statystycznie.

4. Omówienie wyników badań i dyskusja

Z tabeli I wynika, że w 180. minucie eksperymentu ubytek stężenia Et-OH w próbach kontrolnych 3 grup badawczych: S0.6; S9 i S9 + 3AT był podobny, gdyż wynosił odpowiednio 1,2, 1,3 i 1,4 mM. W grupie S9 bez dodatku menadionu, gdzie usunięto mitochondria (przez wirowanie) oraz zablokowano MEOS (za pomocą 3AT), nie doszło do znaczącego obniżenia tempa eliminacji Et-OH. Podobne były również wartości pola powierzchni pod krzywą wykresu funkcji (*AUC*, rycina 4).

W analogicznych grupach badawczych (tj. S0.6; S9 i S9 + 3AT), do których dodano menadion (tj. w wariacie A) ubytek Et-OH względem kontroli był większy niż w próbach kontrolnych i wynosił odpowiednio: 4,3, 3,9 i 2,7 mM, a *AUC* było mniejsze o 15%, 10% i 7% ($p < 0,02$). Największy zaobserwowany spadek zarówno stężenia Et-OH, jak i *AUC* we frakcji S0.6 wariantu A, należy zaś tłumaczyć tym, że w tych frakcjach komórkowych wątroby (S0.6), w których zachowane były mitochondria, redukcja menadionu jest efektem oddziaływania rozpatrywanych układów enzymatycznych (QR, RC i MEOS). Wiąże się to z odpowiednią oksydacją NADH do NAD⁺, która zwiększa pulę ADH-NAD⁺ i przyspiesza eliminację Et-OH. W wariacie A, we frakcji S9 pozbawionej RC (mitochondrialnej oksydoreduktazy : NADH : ubichinon) zaobserwowano natomiast mniejszy niż w frakcji S0.6 ubytek Et-OH oraz zwiększenie *AUC*, a różnica ta wskazuje na udział mitochondriów w stymulowanej przez menadion reoksydacji NADH do NAD⁺. Ta część eksperymentu potwierdza zatem udział mitochondrialnej oksydoreduktazy NADH : ubichinon w redukcji menadionu [18, 25]. W trzeciej grupie badawczej wariantu A, tj. z użyciem

frakcji S9 z dodatkiem 3AT, który hamował MEOS, ubytek Et-OH wynosił zaś tylko 2,7 mM, czyli był znacznie mniejszy niż we frakcjach S0.6 i S9 (natomiast wartość *AUC* w porównaniu z próbą kontrolną zmniejszyła się o 7%), co należy przypisać aktywności QR, gdyż tylko ten układ reoksydacji NADH był w tym przypadku aktywny. Różnicę w ubytku Et-OH (zwiększenie *AUC* o 3%), jaką w wariancie A obserwowano między frakcją S9 a S9 + 3AT obserwowaną, przypisać więc należy reoksydacji NADH przez MEOS.

W wariancie B, tj. w homogenatach, do których dodano zarówno menadion (czyli witaminę K3), jak i DIC (czyli dikumarol blokujący QR i MEOS), ubytek Et-OH po 180 minutach inkubacji dla grup badawczych S0.6; S9 i S9 + 3AT wynosił odpowiednio: 2,7; 2,9 i 2,2 mM, a *AUC* względem próby kontrolnej zmniejszyło się o 12%, 4% i 4% ($p < 0,02$, dla S9 + 3AT $p > 0,02$). Różnice między frakcją S0.6 a frakcjami S9 i S9 + 3AT ($p < 0,02$) wiązać należy z blokowaniem przez dikumarol zarówno QR, jak i reduktazy NADPH : cytochrom P450 oraz reduktazy NADH : cytochrom b_5 , a więc enzymów MEOS [5, 10, 11], co potwierdza brak różnic między *AUC* dla S9 i S9 + 3AT. Wzrost *AUC* między frakcjami S9 i S9 + 3AT a frakcją S0.6 wynoszący 8% w przyjętym modelu eksperymentalnym, przypisać więc należy wyłącznie aktywności mitochondrialnej oksydoreduktazy NADH : ubichinon we frakcji S0.6. Jeżeli natomiast porównać *AUC* dla frakcji S9 i S9 + 3AT w grupie kontrolnej i w wariancie B, gdzie zgodnie z założeniem wyłączona powinna zostać aktywność enzymów redukujących menadion, to różnicę wynoszącą 4% ($p > 0,02$) można tłumaczyć niekompletną inhibicją tych enzymów, ewentualnie udziałem w reoksydacji NADH do NAD⁺ także innych enzymów oraz utlenianiem etanolu przez H₂O₂ zależną katalazę [14, 15, 18].

5. Wnioski

1. Stymulowana przez menadion akceleracja utleniania Et-OH zachodzi także w homogenatach wątrób ludzkich.
2. Porównanie wartości *AUC* wskazuje, że *in vitro* w zwiększonej przez witaminę K szybkości utleniania Et-OH mają udział zarówno reduktaza chinonowa jak i enzymy mitochondrialne oraz MEOS, a proponowany schemat relacji, jakie zachodzą w trakcie tego kometabolizmu uzasadniony analizą wyników eksperymentu, przedstawia rycina 5.
3. Wyniki badań nad kometabolizmem menadionu i etanolu wskazują na możliwość interakcji etanolu i żywności bogatej w witaminę K w organizmie człowieka.

Podziękowania

Niniejsza praca była współfinansowana przez Akademię Medyczną w Lublinie w ramach grantu PW, nr 545/07.