

NEUROPROTEKTIVNO DEJSTVO MANITOLA U OKSIDATIVNOM STRESU IZAZVANOM KUMEN HIDROPEROKSIDOM

Zorica Jovanović
Katedra za Patološku fiziologiju, Medicinski fakultet Kragujevac

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF THE MANNITOL ON OXIDATIVE STRESS INDUCED BY CUMENE HYDROPEROXIDE

Zorica Jovanovic
Department of Pathophysiology, Faculty of Medicine Kragujevac

SAŽETAK

Reaktivni oblici kiseonika (ROK) se neprekidno stvaraju u biološkim sistemima. Kada proizvodnja ROK nadmaši antioksidativnu odbranu nastaju oksidativni stres i molekularna oštećenja. Najreaktivniji ROK je hidroksilni (OH•) radikal, koji velikom brzinom reaguje sa susednim molekulima, dovodeći do oksidacije proteina, lipida i nukleinskih kiselina.

Ispitivana je mogućnost oporavka promena spontanih šiljak potencijala Retzius-ovih nervnih ćelija pijavice (RNČP) u oksidativnom stresu, izazvanom kumen hidroperoksidom u prisustvu „čistača“ hidroksilnog radikala, manitola (5 mmol/l). Nađeno je da kumen hidroperoksid (CHP), u koncentraciji od 1.5 mmol/l dovodi do prolongiranja akcionih potencijala i pojave repetitivne aktivnosti, praćene smanjenjem ekscitabilnosti Retzius-ovih nervnih ćelija.

Neurotoksični efekat CHP na spontanu šiljak elektrogenezu RNČP redukovano je primenom manitola, što ukazuje na značaj hidroksilnog radikala u ovom modelu oksidativnog stresa.

Ključne reči: oksidativni stres, kumen hidroperoksid, manitol, pijavice, neuroni.

UVOD

Dok reaktivni oblici kiseonika i azota deluju kao signalni molekuli u fiziološkim koncentracijama (1), preterana količina tih molekula uzrokuje oksidativnu modifikaciju proteina, nukleinskih kiselina i lipida. Aerobni organizmi su neprekidno izloženi oksidativnom stresu, pa su razvili razne zaštitne, antioksidativne sisteme, ali u određenim uslovima reaktivni oblici kiseonika se stvaraju u količinama koje prevazilaze antioksidativni kapacitet dovodeći do oksidativnog stresa. Međutim, odgovor neurona na oksidativni stres nije jedinstven u celom mozgu. Dok su mnogi neuroni veoma otporni na oksidativna oštećenja, postoje određene populacije neurona koje su osetljive (2).

Složeni zaštitni sistemi sprečavaju, ograničavaju ili „popravljaju“ oštećenja tkiva nastala dejstvom slobodnih radikala (3). Da bi sprečilo ili umanjilo štetno dejstvo

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are constantly formed in biological systems. When production exceeds the antioxidant protection, oxidative stress leads to molecular damage. The most reactive ROS in biological systems is the hydroxyl radical which damages adjacent molecules at diffusion-controlled rates.

We examined a possibility to recover the changes of spontaneous spike potentials, caused by cumene hydroperoxide, by using a hydroxyl radical scavenger, mannitol. Leech Retzius nerve cells were exposed to cumene hydroperoxide (1.5 mmol/l) in the absence or presence of mannitol (5 mmol/l). Mannitol significantly reduced the incidence of repetitive firings.

Neurotoxic effect of cumene hydroperoxide on spontaneous spike electrogenesis of leech Retzius nerve cells was reduced in the presence of the hydroxyl radical scavenger, mannitol.

Key words: oxidative stress, cumene hydroperoxide, mannitol, leeches, neurons.

slobodnih radikala razvijeni su mnogi ne samo enzimski sistemi: superoksid dizmutaza (SOD), katalaza, glutation peroksidaza, glutatin-S-transferaza nego i neenzimski sistemi (vitamin E, vitamin C, glutation, manitol).

Sistemi antioksidativne zaštite deluju na više nivoa: uklanjaju kiseonik ili smanjuju njegovu koncentraciju, uklanjaju jone metala koji su katalizatori u reakcijama oksidativnog stresa, uklanjaju superoksidni radikal, vodonik peroksid i druga reaktivna jedinjenja kiseonika, vezuju slobodne radikale (kao što su hidroksil-, alkoksil- i peroksil- radikali).

Vodonik peroksid (H₂O₂) je neznatno toksičan, ali od njega nastaje veoma reaktivan hidroksilni (OH•) radikal. Da bi se sprečilo nastajanje ovog radikala razvijena su dva nezavisna enzimska sistema. Prvi sistem je katalaza, a drugi sistem su peroksidaze, u prvom redu glutation peroksidaza (GSH Px), koja redukuje H₂O₂, katalizujući njegovu reakciju sa redukovanim glutationom (GSH), pri čemu nastaje oksidovani glutation (GSSG) i voda.

Dokazano je da je deficijencija GSH uključena u patogenezu neurodegenerativnih oboljenja (4). Glutathion je glavni antioksidans u mozgu (5), a njegova koncentracija je 2–3 mM, što je znatno više nego u krvi i cerebrospinalnoj tečnosti (6). Iako se sinteza GSH javlja u svim ćelijama u mozgu, glija je bogatija enzimima za sintezu GSH od neurona. Neuroni takođe proizvode GSH (7, 8).

Uz ova dva konvencionalna enzima za otklanjanje H₂O₂ odgovorni su i peroksiredoksini, nova familija antioksidativnih enzima koji katalizuju redukciju H₂O₂, organskih hidroperoksida, kao i peroksinitrita (ONOO-) (9).

Kako za najreaktivniji slobodni radikal, OH• radikal ne postoje direktni (enzimski i neenzimski) zaštitni sistemi, antioksidansi trebalo bi da spreče njegovo generisanje iz superoksidnog radikala (O₂^{•-}) i H₂O₂ (npr. vezujući prelazne metale, posebno bakar i gvožđe, koji su neophodni za stvaranje ovog radikala).

S druge strane, od izuzetnog je značaja otklanjanje ovog radikala. Manitol je opisan kao čistač (eng. *scavenger*) hidroksilnog radikala (10). Sagsoz i saradnici (2002) su našli da manitol i vitamin C smanjuju ishemično-reperfuziona oštećenja, za razliku od verapamila (11). Slične rezultate su objavili Gunel i saradnici (1998) na modelu intestinalnih reperfuzionih oštećenja (12). Oni su pokazali da manitol i vitamin C, za razliku od ostalih antioksidanasa, smanjuju koncentraciju malonildialdehida (MDA), kao markera oksidativnog stresa.

Antioksidativna odbrana neurona je značajna za njihovu dugovečnost. Papadia i saradnici (2008) su pokazali da sinaptička aktivnost, posredstvom NMDA receptora, pojačava antioksidativnu odbranu, kroz promene tioredoksin-peroksiredoksin sistema. Sinaptička aktivnost poboljšava aktivnost tioredoksina, olakšava redukciju oksidisanih peroksiredoksina i poboljšava otpornost na oksidativni stres (13).

Međutim, s obzirom na to da endogena antioksidativna odbrana nije uvek i potpuno delotvorna, a sa druge strane izloženost štetnim spoljašnjim faktorima se povećava, egzogeni antioksidansi mogli bi da smanje oksidativna oštećenja. Naime, terapijska upotreba većine tih antioksidanasa je ograničena, s obzirom na to da ne prolaze krvno-moždanu barijeru. Novi antioksidansi koji bi se koristili kod akutnih i hroničnih neuroloških bolesti morali bi da ispune neophodan uslov da posle systemske primene mogu proći krvno-moždanu barijeru (14). Manitol ne prolazi krvno-moždanu barijeru (15), ali ispoljava snažno antiedematozno dejstvo, a sa druge strane ispoljava protektivno dejstvo u oksidaciji posredovanoj hidroksilnim radikalom.

CILJ RADA

Cilj ovog rada je da se ispita mogućnost oporavka promena spontane aktivnosti Retzius-ovih nervnih ćelija pijavice (RNČP) *Haemopsis sanguisuga*, nastalih delovanjem kumen hidroperoksida, u prisustvu manitola.

MATERIJAL I METODE

Preparat

Eksperimenti su izvođeni na Retzius-ovim nervnim ćelijama pijavica *Haemopsis sanguisuga*. Ganglijski lanac pijavice se sastoji od 21 segmentne ganglije, a svaka ganglija sadrži 350 ili više ćelija koje su odvojene u šest grupa vezivnim omotačem. U centralnom delu ganglije nalaze se dve džinovske ćelije, prečnika 40–60 µm, koje je otkrio Gustav Retzius i opisao ih kao 'colossal cells', a koje su u njegovu čast nazvane Retzius-ove ćelije (16).

Metoda

Posle anesteziranja pijavice 10% etanolom, one su disekovane, preparisan je ventralni pigmentni sinus u kome se nalazi ganglijski lanac, a zatim je lanac od četiri ganglije premeštan u specijalnu komoricu u kojoj je preparat ekvilibrisan u fiziološkom rastvoru 20–30 minuta.

Za registrovanje spontane električne aktivnosti RNČP koristila se standardna tehnika intracelularnog registrovanja pomoću mikroelektroda. Mikroelektrode su pravljene pomoću selenoidnog izvlačivača ili pulera (Industrial Science Associated Inc.), a zatim punjene rastvorom 3 M KCl. U eksperimentima su korišćene mikroelektrode otpora između 5 i 15 MΩ. Elektrode su ubacivane u ćelije pomoću mehaničkog mikromanipulatora. Indiferentna elektroda od Ag-AgCl postavljena je u posebno kupatilo i preko elektrolitnog mosta od 3 M KCl uspostavljena je veza između indiferentne elektrode i rastvora u kome se nalazio preparat.

Preko pojačivača 'Bioelectric Instrument DS2C' sa negativnim kapacitetom i velikim ulaznim otporom uspostavljena je veza između mikroelektroda i osciloskopa 'Tektronix 564'. Analogni signal je zatim konvertovan u digitalni pomoću A-D konvertera, a podaci su skladišteni na disku kompjutera.

Rastvori

U eksperimentima je korišćen kumen hidroperoksid (CHP) (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, USA), koji je dodavan Ringerovom rastvoru za pijavice u koncentraciji od 1.5 mmol/l, dok je manitol (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, USA) rastvaran u Ringerovom rastvoru u koncentraciji od 5 mmol/l.

Tabela 1. – Dejstvo manitola na promene trajanja i amplitude spontanijih šiljak potencijala izazvanih 1.5 mmol/l CHP. Manitol je primenjivan rastvoren u Leech Ringeru u koncentraciji od 5 mmol/l, u trajanju od 30 min. Rezultati su predstavljeni kao $X \pm SD$ repetitivna aktivnost.

	TRAJANJE(ms) i AMPLITUDA (mV) AKCIONIH POTENCIJALA RNČP						
	Leech Ringer	5 min	10 min	15 min	20 min	30min	Oporavak 20 min
1.5 mmol/l CHP n=11	10.36±1.18	16.09±3.15	20.64±4.4	41±11.27*	68.72±23.04*	127.82±65.9* p≤0.01	23.43±4.61
	48.45±2.32	40.64±0.7	42.45±3.5	42.64±4.83*	41.93±4.39*	39.91±5.57* p≤0.01	46.28±7.99
1.5mmol/L CHP + 5mmol/l manitol n=9	9.66±0.73	13.77±2.77	21.63±3.38	28.85±29.01	32.75±11.45	49.77±15.47 p≤0.01	21.45±6.87
	48.89±4.23	45.33±4.55	45.68±4.74	47.22±3.36	47.45±3.46	47.89±4.31 p>0.05	49.17±4.17

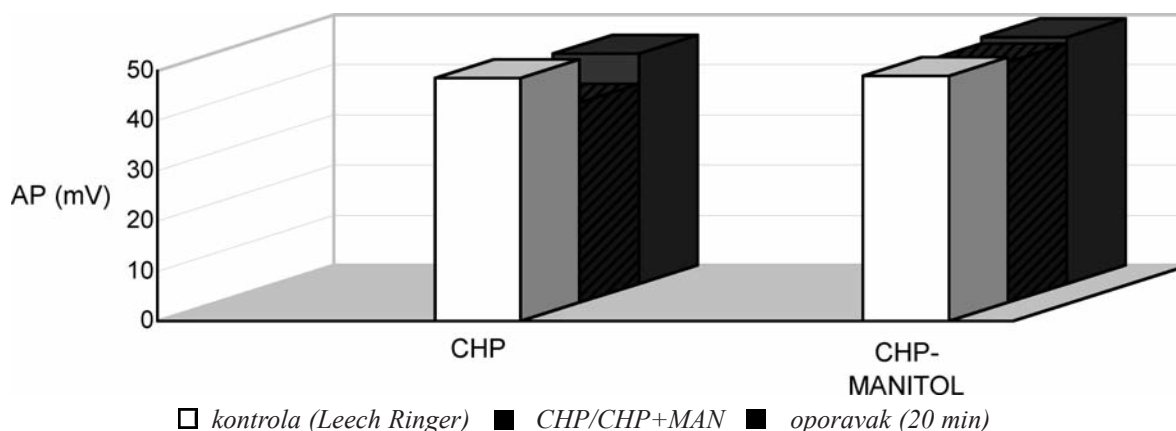
REZULTATI

Tabela 1 ilustruje dejstvo CHP u koncentraciji od 1.5 mmol/l na trajanje spontanijih šiljak potencijala RNČP. CHP je produžio akcione potencijale (što se pokazalo statistički značajnim – $p \leq 0.01$) i doveo do pojave ranih i kasnih naknadnih depolarizacija, kao i repetitivnih pražnjenja. Takođe je dolazilo do promena oblika akcionijih potencijala (dobijali su plato i postajali slični srčanijim). Ispiranjem CHP repetitivna pražnjenja su se izgubila već za 2–3 minuta po vraćanju ćelija u Ringerov rastvor za pijavice, međutim, nijedna ispitana ćelija nije pokazala kompletan oporavak. Ovi efekti na spontanu aktivnost nastajali su bez promena u potencijalu mirovanja.

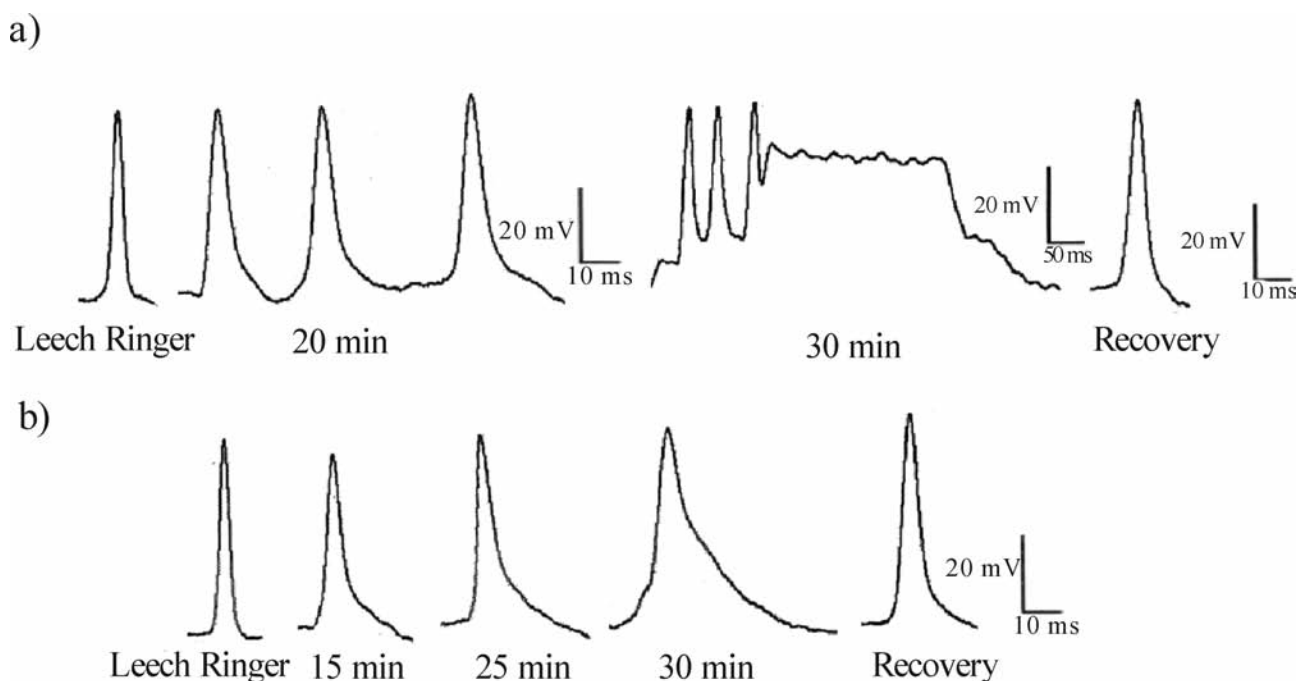
S obzirom na to da je dokazano da CHP utiče na trajanje i amplitudu akcionijih potencijala RNČP, ispitana je i mogućnost oporavka ovih promena pod uticajem antioksidansa, manitola. Manitol, rastvoren u fiziološkom rastvoru za pijavice u koncentraciji od 5 mmol/l, primenjen je neposredno posle 1.5 mmol/l CHP.

Prethodno je u kontrolnim eksperimentima ispitano dejstvo manitola na akcione potencijale Retzius-ovijh ganglijskih ćelija pijavice (i odabrana koncentracija) kako bi se isključila mogućnost dejstva samog antioksidansa na ove elektrofiziološke karakteristike. Manitol je poznat kao „čistač“ OH• radikala, koji je u ovom modelu oksidativnog stresa jedan od pretpostavljenijh posrednika.

U Tabeli broj 1 predstavljene su srednje vrednosti trajanja i amplitude spontanijih šiljak potencijala RNČP izloženijh CHP, sa manitolom ili bez manitola. Manitol je ispoljio dobar zaštitni efekat na pojavu nefizioloških, repetitivnijh pražnjenja (nisu se javila ni kod jedne od 9 ispitanih ćelija), mada je dolazilo do proširenja akcionijih potencijala. Srednje vrednosti trajanja šiljak potencijala posle 30 minuta ekspozicije RNČP dejstvu CHP i manitola su bile 49.77 ± 15.47 ms, što se statistički znatno razlikovalo od srednje vrednosti trajanja akcionijih potencijala registrovanih u odsustvu manitola (127.82 ± 65.9 ms).



Sl. 1. – Efekat manitola (MAN) u koncentraciji od 5 mmol/l ($n=10$) na promene amplitude akcionijih potencijala izazvane 1.5 mmol/l CHP-om. Na grafikonu su prikazane srednje vrednosti amplitude akcionijih potencijala ekspozicije RNČP dejstvu CHP (u prisustvu ili odsustvu manitola) u vremenu od 30 minuta.



Sl. 2. – a) Originalna registracija spontanih šiljak potencijala Retzius-ovih nervnih ćelija registrovanih u Leech Ringeru, 20 i 30 minuta po ekspoziciji izolovane ganglije 1.5 mmol/l CHP-om, kao i za vreme oporavka.

b) Originalna registracija spontanih šiljak potencijala Retzius-ovih nervnih ćelija registrovanih u Leech Ringeru, 15, 25 i 30 minuta po ekspoziciji izolovane ganglije 1.5 mmol/l CHP-u i 5 mmol/l manitolu, kao i za vreme oporavka.

Amplituda akcionih potencijala se održavala stabilnom u toku 30 minuta izlaganja Retzius-ovih ganglijskih ćelija istovremenom dejstvu CHP i manitola (slika 1).

Na slici 2 predstavljena je originalna registracija jednog eksperimenta antioksidativnog dejstva manitola na promene trajanja, amplitude akcionih potencijala i pojavu nefizioloških pražnjenja Retzius-ove nervne ćelije, izazvanih 1.5 mmol/l CHP-om. U ovom slučaju ne dolazi do pojave repetitivnih pražnjenja, iako antioksidativni efekat manitola nije kompletan, jer se akcioni potencijali proširuju i u njegovom prisustvu.

DISKUSIJA

Manitol je poznat kao „čistač“ (*scavenger*) OH• radikala, a kako je u ovom modelu oksidativnog stresa jedan od pretpostavljenih posrednika OH• radikal, pokušali smo da RNČP zaštitimo od njegovog štetnog dejstva primenom manitola. Manitol primenjen u Ringerovom rastvoru za pijavice u koncentraciji od 5 mmol/l, ispoljava zaštitni efekat na pojavu nefizioloških, repetitivnih pražnjenja, izazvanih 1.5 mmol/l CHP-om.

U dejstvo CHP na spontanu šiljak elektrogenezu RNČP može biti uključeno više mehanizama. U ogleđima sa nametnutim naponom potvrđeno je da je blokada kasnih ispravljajčkih Ca²⁺ aktivisanih K⁺ kanala RNČP odgovorna za produženo trajanje akcionih potencijala RNČP, kao i da je CHP efikasniji oksidans od H₂O₂ (17). Neurotoksični efekat CHP na spontanu šiljak elektrogenezu RNČP

redukovan je primenom glutationa, što ukazuje na značaj redukovanog glutationa u zaštiti sulfhidrilnih grupa proteina u oksidativnom stresu izazvanom kumen hidroperoksidom.

Ispitivanja Jovanović i saradnika (1997) pokazala su da su nervne ćelije pijavice otporne na oksidativni stres izazvan H₂O₂, oksidansom sa dugotrajnim dejstvom. Ovaj podatak ukazuje na to da OH• nije generisan u ovom modelu oksidativnog stresa, ili da ganglijske ćelije pijavice poseduju efikasan antioksidativni sistem za detoksikaciju H₂O₂ (18, 19).

Modulatorno dejstvo reaktivnih oblika kiseonika i azota na proteine jonskih kanala može imati značajnu ulogu u opstanku, ali i smrti neurona (20). Do danas nisu potpuno razjašnjeni jonski mehanizmi uključeni u promene membranskog i akcionog potencijala izazvani reaktivnim oblicima kiseonika. Kalijumski kanali su ključni regulatori nadražljivosti neurona. Na osnovu promena u amplitudi i trajanju akcionih potencijala, pretpostavlja se da su kalijumski kanali najverovatnija mesta za oštećenja izazvana slobodnim radikalima (21). Kao što je poznato, kasna ispravljajčka K⁺ struja vremenski je promenljiva i zadužena je za fazu repolarizacije akcionog potencijala. Ova struja značajna je jer određuje dužinu trajanja akcionog potencijala. U slučaju blokade kasne ispravljajčke K⁺ struje u tkivima koja generišu akcione potencijale kratkog trajanja (1–2 ms), moguće je registrovati akcioni potencijal koji podseća na srčani, sa platomom, što je bio slučaj i u našim eksperimentima.

Veliki broj eksperimentalnih dokaza ukazuje na povezanost oksidativnog stresa, neurodegeneracije i starenja. Elektrofiziološka istraživanja pokazala su da je akumulacija reaktivnih oblika kiseonika u toku starenja ili akutne ekspozicije oksidansima, odgovorna za promene nadražljivosti neurona. Oksidacija naponsko zavisnih K^+ kanala jedan je od pretpostavljenih mehanizama funkcionalnog pada neurona tokom starenja (22). Oksidacija K^+ kanala u mozgu posredovana reaktivnim oblicima kiseonika zajednički je mehanizam starenja, kao i neurodegenerativnih oboljenja kao što su Alchajmerova i Parkinsonova bolest (23).

Oksidativna modifikacija M-tipa K^+ kanala uzrokuje hiperpolarizaciju i smanjuje okidanje akcionih potencijala simpatičkih neurona u modelu oksidativnog stresa izazvanog H_2O_2 (24).

Istraživanja Tarra i Valenzena (1991) pokazala su da reaktivni oblici kiseonika stvoreni fotoaktivacijom bengal crvenila utiču na trajanje i amplitudu akcionih potencijala (25). Akcioni potencijali su u početku produženi, a zatim se skraćuju. Oni su izvestili da se u ovom modelu oksidativnog stresa pored slabljenja vremenski i naponsko zavisnih natrijumskih, kalijumskih i kalcijumskih struja, pojačava vremenski nezavisna struja (I_{leak}). Naši eksperimentalni nalazi dejstva CHP na RNČP su jednim delom kompatibilni nalazima Tarra i Valenzena (što se tiče inhibicije I_K), međutim, nismo našli skraćenje trajanja spontanog šiljak potencijala, već progredijentno proširenje.

Studirajući elektrofiziološku osnovu jonskih promena u oksidativnom stresu izazvanom $100 \mu M H_2O_2$, Barrington i saradnici (1988) na izolovanim miocitima registrovali su tri-etapnu promenu akcionih potencijala (26). Najpre je dolazilo do povećanja amplitude i trajanja akcionog potencijala, iza koga je sledila pojava ranih i kasnih naknadnih depolarizacija, da bi se ćelija zatim depolarisala.

Skraćenje trajanja akcionih potencijala u drugoj fazi oksidativnog stresa povezano je sa aktivacijom kasnih K^+ struja (27). Produženo trajanje akcionih potencijala ventrikularnih miocita zamorca u prvoj fazi oksidativnog stresa objašnjava se aktivacijom TTX zavisnih Na^+ kanala vodonik peroksidom, pri čemu je L tip Ca^{2+} kanala neoštećen.

Firek i Beresewicz (1990) pokazali su da H_2O_2 indukuje elektrofiziološke promene ventrikularnih miocita zamorca, što je posledica intracelularnog generisanja $OH\cdot$ radikala u tzv. Fentonovoj reakciji (28). Izlaganje miocita dejstvu $0.6 \text{ mmol/l } H_2O_2$ dovodi po početnog povećanja amplitude i trajanja akcionih potencijala, praćenog rapidnim skraćenjem i smanjenjem amplitude, pojavom naknadnih depolarizacija i na kraju smanjivanjem ekscitabilnosti ćelija.

U suprotnosti sa ovim nalazima jonskih mehanizama uključenih u izmene akcionih potencijala izazvanih slobodnim radikalima su eksperimentalni rezultati Warda i Gilesa (1997). Oni su pokazali da H_2O_2 produžava trajanje akcionih potencijala usporavanjem inaktivacije TTX zavisnih Na^+ kanala ventrikularnih miocita (29).

Jabr i Cole (1993) istraživali su vremenski zavisne promene potencijala mirovanja i oblika akcionog potencijala ventrikularnih miocita po intracelularnoj aplikaciji dihidroksi-fumarične kiseline i $FeCl_3/ADP$, a za registrovanje jonskih struja koristili su *patch clamp* tehniku (30). Izvestili su da promene potencijala mirovanja i akcionog potencijala prolaze kroz tri faze. U prvoj fazi nastaje depolarizacija, produženje akcionih potencijala i smanjenje aktivnosti ulazne ispravljачke K^+ struje. U drugoj fazi razvijaju se kasne naknadne depolarizacije, „triger“ aktivnost, usled aktivacije tranzitorne ulazne struje, sa prekidanjem procesa repolarizacije. Treću fazu karakteriše skraćivanje akcionog potencijala, hiperpolarizacija i smanjena ekscitabilnost ćelija. U osnovi ovih promena je aktivacija ATP zavisnih K^+ struja.

ZAKLJUČAK

Rezultati naših istraživanja pokazali su da manitol ispoljava protektivni efekat u oksidativnom stresu izazvanom kumen hidroperoksidom. Antioksidativno dejstvo manitola nije kompletno, jer i u njegovom prisustvu dolazi do proširenja i smanjenja amplitude akcionih potencijala RNČP, međutim, repetitivna pražnjenja se ne pojavljuju. Ovi nalazi ukazuju na značaj manitola u otklanjanju hidroksilnih radikala u oksidativnom stresu izazvanom kumen hidroperoksidom.

LITERATURA

1. Forman H, Maiorino M, Ursini F. Signaling Functions of Reactive Oxygen Species. *Biochemistry*. 2010;49(5):835–42.
2. Wang X, Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Ag Neurosci*. 2010;30:2–12.
3. Yun-Zhong F, Sheng Y, Guoyao W. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002;18:872–9.
4. Aoyama K, Watabe M, Nakaki T. Regulation of neuronal glutathione synthesis. *J Pharmacol Sci*. 2008;108(3):227–38.
5. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*. 2000;62:649–71.
6. Cooper AJ, Kristal BS. Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol Chem*. 1997;378:793–802.

7. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 2000;108:652–9.
8. Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology.* 2001;40:959–75.
9. Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life.* 2001;52:35–41.
10. Shen B, Jensen RG, Bohnert HJ. Mannitol Protects against Oxidation by Hydroxyl Radicals. *Plant Physiol.* 1997;115(2):527–32.
11. Sağsöz N, Kisa U, Apan A. Ischaemia-reperfusion injury of rat ovary and the effects of vitamin C, mannitol and verapamil. *Hum Reprod.* 2002;17(11):2972–6.
12. Günel E, Çağlayan F, Çağlayan O, Dilsiz A, Duman S, Aktan M. Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. *J Pediatr Surg.* 1998;33(10):1536–9.
13. Papadia S, Soriano FX, Léveillé F, Martel MA, Dakin KA, Hansen HH, et al. Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat Neurosci.* 2008;11(4):476–87.
14. Sherki YG, Melemed E, Offen D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology.* 2001;40(8):959–75.
15. Nakajima R, Nakamura T, Miyakawa H, Kudo Y. Effects of mannitol on ischemia-induced degeneration in rat hippocampus. *J Pharmacol Sci.* 2004;95(3):341–8.
16. Kuffler A, Potter D. Glia in the leech central nervous system: physiological properties and neuron-glia relationship. *J Neurophysiol.* 1964;27 292–320.
17. Jovanović Z, Beleslin BB. Effects of long lasting oxidants on the electrophysiological properties of leech Retzius nerve cells. *Iugoslav Physiol Pharmacol Acta.* 2004;40:55–64.
18. Jovanović Z, Beleslin BB. Resistivity of leech Retzius nerve cells to long-lasting oxidant. *J Neurochem.* 1997;66:S32.
19. Jovanović Z, Beleslin BB. Resistivity of leech Retzius nerve cells to long-lasting oxidant. In: *Cellular, Molecular and Clinical Aspects.* (Ed., Teelken and Korf. Plenum Press, New York.) 1997; (35):983–6.
20. Annunziato L, Pannaccione A, Cataldi M, Secondo A, Castaldo P, Di Renzo G, Tagliatela M. Modulation of ion channels by reactive oxygen and nitrogen species: a pathophysiological role in brain aging? *Neurobiol Aging.* 2002;23(5):819–34.
21. Barrington PL. Effects of free radicals on the electrophysiological function of cardiac membranes. *Free Rad Biol Med.* 1990;9:355–65.
22. Cai SQ, Sesti F. Oxidation of a potassium channel causes progressive sensory function loss during aging. *Nat Neurosci.* 2009;12(5):611–7.
23. Sesti F, Liu S, Cai SQ. Oxidation of potassium channels by ROS: a general mechanism of aging and neurodegeneration? *Trends Cell Biol.* 2010;20(1):45–51.
24. Gamper N, Zaika O, Li Y, Martin P, Hernandez CC, Perez MR, Wang AY, Jaffe DB, Shapiro MS. Oxidative modification of M-type K(+) channels as a mechanism of cytoprotective neuronal silencing. *EMBO J.* 2006;25(20):4996–5004.
25. Tarr M, Valenzano DP. Modification of cardiac ionic currents by photosensitizer-generated reactive oxygen. *J Mol Cell Cardiol.* 1991;23:639–49.
26. Barrington PL, Meier CF, Weglicki WB. Abnormal electrical activity induced by free radical generating system in isolated cardiocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1988;20:1163–78.
27. Beresewicz A, Horackova M. Alterations in electrical and contractile behavior of isolated cardiomyocytes by hydrogen peroxide: possible ionic mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* 1991;23(8): 899–918.
28. Firek L, Beresewicz A. Hydrogen peroxide induced changes in membrane potentials in guinea pig ventricular muscle: permissive role of iron. *Cardiovasc Res.* 1990;24(6):493–9.
29. Ward CA, Giles WR. Ionic mechanism of the effects of hydrogen peroxide in rat ventricular myocytes. *J Physiol.* 1997;500(3):631–42.
30. Jabr RI, Cole WC. Alterations in electrical activity and membrane currents induced by intracellular oxygen-derived free radical stress in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res.* 1993;72 (6):1229–44.