

CITOTOKSIČNO DEJSTVO KUMEN HIDROPEROKSIDA NA RETZIUSOVE NERVNE ĆELIJE PIJAVICE

Zorica Jovanović, Bogdan Beleslin
Institut za Patološku fiziologiju, Medicinski fakultet Kragujevac
Institut za Patološku fiziologiju, Medicinski fakultet Beograd

CYTOTOXIC EFFECT OF CUMENE HYDROPEROXIDE ON LEECH RETZIUS NERVE CELLS

Zorica Jovanovic, Bogdan Beleslin
Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Kragujevac
Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Belgrade

SAŽETAK

Oksidativni stres je u osnovi različitih fizioloških i patofizioloških procesa nervnog sistema, kao što je ishemijska, trauma i neurodegenerativna oboljenja. Poznato je da reaktivni oblici kiseonika dovode do izmene funkcije proteina, uključujući jonske kanale. Voltažno-zavisni kalijumski kanali imaju značajnu ulogu u kontroli trajanja akcionih potencijala, oslobađanju neurotransmitera i hormona, Ca²⁺-zavisnoj plastičnosti sinapsi, epileptičkim pražnjenjima neurona. Dokazano je da reaktivni oblici kiseonika moduliraju aktivnost različitih tipova kalijumskih kanala.

U ovom radu je ispitivan uticaj organskog hidroperoksida, kumen hidroperoksida (CHP) na membranski potencijal i spontanu aktivnost, kao i izlazne ispravljачke K⁺ struje Retziusovih nervnih ćelija pijavice (RNĈP), *Haemopsis sanguisuga*. Nađeno je da CHP izaziva vremenski i dozno zavisnu promenu membranskog potencijala RNĈP i prolongiranje akcionih potencijala, sa pojavom repetitivne aktivnosti usled nastajanja naknadnih depolarišućih potencijala, praćenog promenama oblika akcionog potencijala, pri čemu on dobija plato i postaje sličan srčanom. U ogleđima sa nametnutim naponom nađeno je da CHP blokira kasne ispravljачke Ca²⁺ aktivisane K⁺ struje RNĈP i to kako njenu brzu tako i sporu komponentu.

Ključne reči: oksidativni stres, Retziusove nervne ćelije pijavice, kumen hidroperoksid, kasna ispravljачka Ca²⁺ aktivisana K⁺ struja

ABSTRACT

Oxidative stress has been implicated in a variety of physiological and pathophysiological processes as ischemia, trauma or neurodegenerative diseases. Reactive oxygen species are known to affect the function of a variety of proteins, including membrane channels, in both detrimental and protective ways. Voltage-gated potassium currents play crucial roles in modifying neuronal, cellular and network excitability and activity. Potassium currents control action potential duration, release of neurotransmitters and hormones, Ca²⁺-dependent synaptic plasticity and epileptiform burst activity. Many types of cloned K⁺ channels have been shown to be modulated by reactive oxygen species.

We studied the effects of organic hydroperoxide, cumene hydroperoxide (CHP) on the resting membrane potential, spontaneous spike activity and depolarizing outward potassium current in the leech Retzius nerve cells (LRNC) (*Haemopsis sanguisuga*). Exposure of the leech Retzius nerve cells to cumene hydroperoxide induced dose and time dependent membrane depolarization with a marked prolongation of spontaneous repetitive activity. In the voltage clamp experiments, fast and slow calcium-activated outward potassium currents were suppressed by cumene hydroperoxide. The data presented in this study clearly demonstrate that suppression of calcium-activated outward potassium currents is responsible for prolongation of spike potential in the leech Retzius nerve cells.

Key words: oxidative stress, leech Retzius nerve cells, cumene hydroperoxide, calcium-activated outward potassium currents

UVOD

Iako postoji veliki broj eksperimentalnih dokaza da reaktivni oblici kiseonika utiču na električnu aktivnost ekscitabilnih ćelija, uglavnom srčanih (1,2,3,4,5) do danas raspoložemo ograničenim informacijama što se tiče dejstva reaktivnih oblika kiseonika na neurone.

Poznato je da oštećenje ćelija slobodnim radikalima nije slučajno razaranje integriteta membrane, već izmena aktivnosti membranskih komponenti koje je moguće precizno identifikovati. Membranski lipidi i proteini su zbog svog strukturnog i funkcionalnog značaja u membranama, prvi na udaru reaktivnih oblika kiseonika, pa su stoga mesta na jonoizmenjivačkim

proteinima i jonskim pumpama podložna dejstvu radikala.

Od svih organa, nervni sistem je najpogodniji za stvaranje i najosetljiviji na dejstvo slobodnih radikala. Ovo svojstvo nervnog sistema uslovljeno je činjenicom da mozak sadrži velike količine polinezasićenih masnih kiselina (6) kao i da je njegova metabolička aktivnost izuzetno visoka, tako da je troši oko 20% celokupnog kiseonika. U toku ćelijske respiracije 1-3% elektrona izbegne transportni lanac elektrona u mitohondrijama i reakcijom sa kiseonikom proizvede izvesnu količinu slobodnih radikala. Neki delovi mozga, posebno bazalne ganglije akumuliraju gvožđe, što ih čini veoma osetljivim na hronični oksidativni stres. S druge strane cerebrospinalna tečnost poseduje mali kapacitet za vezivanje gvožđa. Aktivnost katalaze u mozgu je niska, a on sadrži jedino umerene količine glutatioin peroksidaze. Reaktivni oblici kiseonika imaju značajnu ulogu u nekim patološkim stanjima centralnog nervnog sistema (CNS-a), bilo da direktno oštećuju tkiva ili je njihova proizvodnja posledica oštećenja tkiva. Oksidativni stres može znatno pogoršati akutne insulte (npr. ishemijski), a slobodni radikali takođe učestvuju u hroničnim neurodegenerativnim stanjima kao što je Parkinsonova bolest i familijarna amiotrofična lateralna skleroza, oboljenje povezano sa mutacijom gena za Cu/Zn superoksid dizmutazu (SOD). Sayre i saradnici (7) ističu da senilni plakovi kod Alzheimerove bolesti sadrže redoks-aktivne prelazne metale vezane za tzv. tau protein.

Mehanizmi oštećenja neurona slobodnim radikalima su različiti: ekscitotoksičnost, metabolički poremećaji i poremećaji homeostaze intracelularnog kalcijuma (8).

Reaktivna priroda slobodnih radikala, kao i njihov kratak poluživot otežavaju proučavanje u živom tkivu. Idealan način za ispitivanje slobodnih radikala u *in vivo* uslovima bio bi da se simulira njihovo endogeno stvaranje, a pri tome ne uzrokuju druge neželjene posledice. To nije jednostavno. Mnogo je jednostavnije to uraditi u *in vitro* uslovima.

Ispitujući dejstvo slobodnih radikala na jonske struje u pretkomorskim ćelijama žabe Tarr i Valzeno (9) su pokazali da oksidativni stres u početku produžava akcioni potencijal, a u drugoj fazi skraćuje tako da srčani akcioni potencijal poprima oblik šiljak potencijala i postaje sličan nervnom.

Barrington (3) je ukazala na mogućnost da su kalcijumski i kalijumski kanali povezani sa sporom izlaznom strujom najverovatnija mesta za oštećenja slobodnim radikalima. Kada se govori o mogućim mehanizmima koji su u osnovi izmene električne aktivnosti Matsuura i Shattok (5) su pokazali da oksidativni stres smanjuje

provodljivost membrane u mirovanju za K^+ i povećava aktivnost Ca^{2+} zavisnih neselektivnih jonskih kanala.

Istraživanja Soto i sar. (10) su pokazala da reaktivni oblici kiseonika inhibiraju Ca^{2+} -aktivisane K^+ kanale.

Suprotno tome, Coetzee i sar. (11) su pokazali da oksidativni stres inhibira Na^+ - Ca^{2+} izmenjivačke struje u intaktnim ventrikularnim miocitima zamorca izloženim bengal crvenilu, a mehanizam dejstva slobodnih radikala na Na^+ - Ca^{2+} izmenjivač je modifikacija tiol grupa. Ovo je u suprotnosti sa ranijim nalazima (3,12) da oksidativni stres aktivira Na^+ - Ca^{2+} izmenu.

Beresevicz i Horackova (13), produženje akcionog potencijala, rane i kasne naknadne depolarizacije, u prvoj fazi oksidativnog stresa izazvanog H_2O_2 objašnjavaju pojačanjem TTX-senzitivnih Na^+ struja. U drugoj fazi ovog modela oksidativnog stresa dolazi do skraćivanja akcionog potencijala (u osnovi kojeg može biti pojačanje spore izlazne K^+ struje), pojave depolarizacije, kao i ekstrasistola.

Reaktivni oblici kiseonika reaguju sa sulfhidrilnim grupama proteina remeteći na taj način njihovu funkciju. S tim u vezi oksidativni stres inhibiše Na^+/K^+ ATPazu, što je dokazano brojnim studijama (14,15).

Pored mogućih direktnih dejstava slobodnih radikala na membranske komponente, promene u jonskoj raspodeli mogu povratno da utiču na funkcije ekscitabilnih ćelija, kao što su različiti transmembranski procesi i sistemi sekundarnih glasnika (16,17).

CILJ RADA

Kako dejstvo reaktivnih oblika kiseonika nije u dovoljnoj meri izučavano na nervnom sistemu i malo je literaturnih podataka o uticaju oksidativnog stresa na membranski i akcioni potencijal, kao i jonske struje nervnih ćelija, cilj ovog rada bi bio da se ispita efekat kumen hidroperoksida, na potencijal mirovanja, zatim i trajanje, amplitudu i oblik akcionih potencijala, kao i pojavu nefizioloških pražnjenja, a da se tehnikom sa nametnutim naponom ispita efekat CHP na makroskopske jonske struje, a u prvom redu dejstvo na izlazne ispravljivačke K^+ struje.

MATERIJALI I METODE

Svi eksperimenti su izvodjeni na Retziusovim nervnim ćelijama identifikovanih pijavica, *Haemopsis saguisuga*. Ove džinovske ćelije prečnika 40-60 μm nalaze se u centralnom delu ganglije. Membranski potencijal izmeren u somi ovih ćelija je niži u odnosu na druge neurone (18, 19) i iznosi između -30 i -60mV.

Posle anesteziranja, pijavice su disekovane pod stereo disekcionim mikroskopom. Za registrovanje potencijala mirovanja i spontane aktivnosti koristila se standardna tehnika intracelularnog registrovanja pomoću mikroelektroda, dok su tehnikom sa nametnutim naponom ispitivani K⁺ kanali.

U ogledima sa nametnutim naponom su korišćene dve mikroelektrode, pri čemu je jedna služila za protok konstantne struje, a druga za registrovanje promena napona ćelija. *Voltage clamp* tehnika koristi negativni *feed-back* mehanizam za održavanje membranskog potencijala konstantnim, na odredjenom nivou, dok su merene struje koje protiču kroz membranu. Preparat je dražen konstantnom strujom, pravougaonim impulsima širine 300-500 ms. 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, podaci su skladišteni na disku kompjutera.

Kumen hidroperoksid (cumene hydroperoxide, CHP, 80 %) je posle rastvaranja u 0.01 % dimetilsulfoksidu dodavan Ringerovom rastvoru za pijavice. CHP je nabavljen od Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, USA.

REZULTATI

S obzirom da je cilj ovog rada u prvom redu proučavanje efekata kumen hidroperoksida na jonske kanale, najpre je ispitivano dejstvo kumen hidroperoksida na ćelijski membranski potencijal. Na tabeli broj 1 su prikazane srednje vrednosti membranskog potencijala RNĀP izloženih različitim koncentracijama CHP u toku 25 minuta, posle čega je praćen je oporavak u standardnom rastvoru za pijavice, a u trajanju od najmanje 20 min.

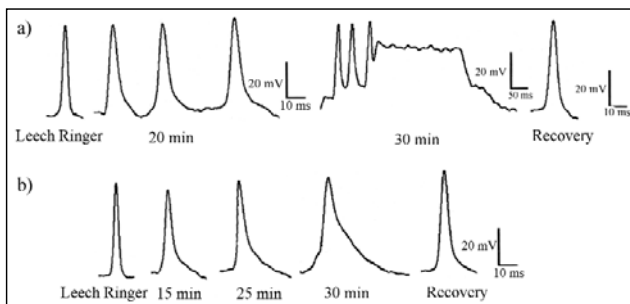
Analizirajući tabelu 1 jasno je da postoji dozna i vremenska zavisnost promena potencijala mirovanja RNĀP pod dejstvom CHP. Kod svih ispitanih preparata, dodavanje CHP u medijum u kome se nalazi ganglijski lanac sa RNĀP je dovelo do depolarizacije različitog stepena. Koncentracije CHP od 0.25, 0.5 i 1 mmol/l, nisu uzrokovale promene potencijala mirovanja u toku 25 min ekspozicije RNĀP, dok koncentracije veće od 1.5 mmol/l statistički visoko značajno izmenile potencijal (2mmol/l CHP daje priraštaj depolarizacije od 0.31 mV/min a 3 mmol/l 0.43 mV/min).

Na slici 1 je prikazana originalna registracija spontanog šiljak potencijala RNĀP po ekspoziciji ćelije

	POTENCIJAL MIROVANJA RNĀP (mV)						
	<i>Leech Ringer</i>	2 min	5 min	15 min	20 min	25 min	Oporavak 20 min
0.25mmol/l CHP n=10	-43.40±3.58	-42.7±4	-43.25±4.14	-43.1±3.96	-42.7±3.85	-42.35±3.72 p>0.05	-43±3.3
0.5 mmol/l CHP n=8	-43.63±3.36	-42±3.70	-42.5±4.18	-40.75±3.11	-40.25±3.73	-40.37±4.96 p>0.05	-39.67±5.03
1 mmol/l CHP n=8	-46.75±3.89	-42±2.18	-44.5±2.34	-46.25±2.38	-46±2	-45.5±2.5 p>0.05	-46.25±4.02
1.5 mmol/l CHP n=9	-44.2±3.11	-40.66±3.07	-41.44±3.35	-40.89±3.65	-41.25±4.02	-39.88±4.11 p≤0.05	-39.17±5.53
2 mmol/l CHP n=7	-45.34±2.93	-44.21±3.34	-42.82±3.85	-39.45±3.21	-38.24±4.13	-37.67±2.89 p≤0.01	-36.29±4.04
3 mmol/l CHP n=5	-42±6.37	-38.4±6.22	-38.2±7.33	-35.4±5.22	-33.4±6.11 p≤0.01		-27.8±1.94

TABELA 1. Dozna i vremenska zavisnost promena potencijala mirovanja RNĀP pod dejstvom CHP u koncentracijama od 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 i 3mmol/l u toku 25 minuta ekspozicije. Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SD$. n=broj ćelija.

dejstvu 1,5 mmol/l CHP. CHP je doveo pojave ranih i kasnih naknadnih depolarizacija, kao i repetitivnih pražnjenja sa promenama oblika akcionog potencijala, pri čemu on dobija plato i postaje sličan srčanom. Ovi efekti CHP na spontanu šiljak elektrogenezu nastaju, bez promena u potencijalu mirovanja.

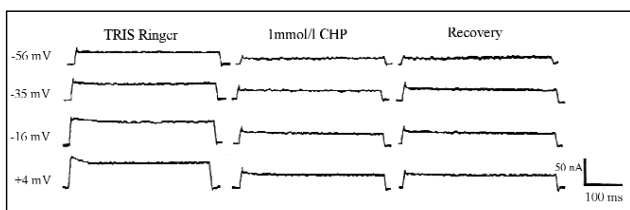


SLIKA 1. A. Repetitivna aktivnost registrovana u u odgovoru RNČP na 1,5mmol/l CHP

B. Naknadni potencijali registrovani u odgovoru RNČP na 1,5mmol/l CHP

Za dokazivanje jonskih mehanizama odgovornih za proširenje šiljak potencijala i pojavu repetitivnih pražnjenja ispitivali smo uticaj oksidativnog stresa na izlazne kalijumske struje koje su vremenski promenljive i odgovorne za repolarizaciju akcionog potencijala. Nađeno je da CHP dovodi do značajnog smanjenja jačine brze i spore komponente izlazne ispravljачke K⁺ struje.

Na slici 2 je predstavljen jedan eksperiment gde je RNČP stimulisana impulsima trajanja 650 ms u pravcu depolarizacije od holding potencijala od -76 mV preko različitih nivoa potencijala do test potencijala od +4 mV. Izlazne K⁺ struje su registrovane u TRIS Ringeru, 10 minuta po dodavanju 1 mmol/l CHP kao i za vreme oporavka struja u TRIS Ringeru. CHP je oslabio brzu, kao i sporu komponentu Ca²⁺ aktivisanih K⁺ struja.



SLIKA 2. Originalna registracija Ca²⁺ aktivisanih izlaznih ispravljачkih kalijumskih struja RNČP u TRIS Ringeru, 10 minuta po dodavanju 1 mmol/l CHP, kao i u toku oporavka ćelije

DISKUSIJA

Do danas nisu potpuno razjašnjeni svi jonski mehanizmi uključeni u promene membranskog i akcionog potencijala izazvane slobodnim radikalima. Pretpostavlja se, na osnovu promena u amplitudi i tra-

janju akcionih potencijala da su kalcijumski i kalijumski kanali najverovatnija mesta za oštećenja izazvana slobodnim radikalima (3).

Malo je literaturnih podataka o dejstvu oksidativnog stresa na spontanu aktivnost nervnih ćelija, uglavnom se odnose na efekte slobodnih radikala na srčane akcijske potencijale.

Mehanizam depolarizacije RNČP pod dejstvom CHP nije u potpunosti razjašnjen jer u njemu mogu uzeti učešće različiti faktori. Dosadašnji eksperimentalni podaci ukazuju da su ulazni ispravljачki K⁺ kanali i Na⁺/K⁺ ATPaza najverovatnije odgovorni za promene potencijala mirovanja u oksidativnom stresu.

Jedna od mogućnosti je da CHP utiče na aktivnost ulaznih ispravljачkih kalijumskih kanala (koji su značajni za potencijal mirovanja i završnu fazu repolarizacije akcionog potencijala), dovodeći do njihove inhibicije. Matsuura i Shattock (5) su dokazali slabljenje ulazne i izlazne struje ventrikularnih miocita u oksidativnom stresu. Oksidativni stres depolarizuje ćelije redukcijom ulazne ispravljачke K⁺ struje i povećanjem Ca²⁺ aktivisane membranske provodljivosti.

Tokube i saradnici (20) su u eksperimentima sa nametnutim naponom našli da H₂O₂ inhibiše ulazne ispravljачke kalijumske, kasne ispravljачke kalijumske struje i L-tip Ca²⁺ struja. U suprotnosti sa našim eksperimentalnim nalazima da CHP depolarizuje RNČP, postoje literaturni podaci da peroksidi hiperpolarizuju membranski potencijal ekscitabilnih ćelija. Naši raniji eksperimentalni nalazi (21), su pokazali da vodonik peroksid (H₂O₂) češće dovodi do prolaznih promena potencijala mirovanja u smislu nastajanja tranzitorne hiperpolarizacije, nego trajne hiper- ili depolarizacije membranskog potencijala RNČP.

Jedno od mogućih objašnjenja hiperpolarizacije je aktivacija Ca²⁺ zavisnih K⁺ kanala. Tako, Seutin i saradnici (22) ističu da H₂O₂ hiperpolarizuje ćelijsku membranu aktivacijom Ca²⁺ zavisnih K⁺ kanala.

Depolarizacija izazvana CHPom bi mogla nastati i usled inhibicije Na⁺/K⁺ ATPaze ćelijske membrane RNČP. Shattock i Matsuura (5) su studirali dejstvo oksidativnog stresa na aktivnost Na⁺/K⁺ ATPaze izolovanih ventrikularnih miocita, tehnikom nametnutog napona, i našli su da oksidativni stres inhibiše aktivnost pumpe.

Više mehanizama može biti uključeno u dejstvo CHP na spontanu šiljak elektrogenezu RNČP. U ogleđima sa nametnutim naponom je potvrđeno da je blokada kasnih ispravljачkih Ca²⁺ aktivisanih K⁺ kanala uzrok nastanka produženog trajanja akcionih potencijala RNČP. Kao što je poznato kasna ispravljачka K⁺

struja je vremenski promenjiva i repolariše akcioni potencijal, a značajna je jer određuje dužinu trajanja akcionog potencijala. U slučaju blokade ove struje u onim tkivima koja generišu akcioni potencijal koji traje vrlo kratko (1-2 ms) moguće je registrovati akcioni potencijal koji podseća na srčani, sa platoom.

Matsuura i Shattock (5) su u ogledima sa nametnutim naponom dokazali slabljenje ulazne i izlazne struje. Pokazali su da oksidativni stres dovodi do smanjenja provodljivosti membrane u mirovanju za K^+ , a povećane provodljivosti Ca^{2+} aktivisanih neselektivnih kanala, tako da nivo intacelularnog Ca^{2+} raste pri dužem izlaganju ćelija dejstvu oksidativnog stresa.

Slične rezultate dejstva $100 \mu M H_2O_2$ na akcione potencijale izolovanih miocita su prikazali Barrington i saradnici (3). Oni su registrovali tri-etapnu promenu akcionih potencijala. 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 je povezano sa aktivacijom kasnih K^+ struja (13). Produženo trajanje akcionih potencijala ventrikularnih miocita zamorca u prvoj fazi oksidativnog stresa objašnjavaju aktivacijom TTX zavisnih Na^+ kanala vodonik peroksidom.

U suprotnosti sa ovim nalazima jonskih mehanizama uključenih u izmene akcionih potencijala izazvanih slobodnim radikalima su eksperimentalni rezultati Warda i Gilesa (23). Oni su pokazali da H_2O_2 produžava trajanje akcionih potencijala usporavanjem inaktivacije TTX zavisnih Na^+ kanala ventrikularnih miocita.

Oksidativni stres indukuje trazitorne izlazne struje koje mogu biti odgovorne za naknadne depolarizacije, pojavu nefizioloških pražnjenja i automatizma. Ove struje aktivira depolarizacija ćelije posle perioda hiperpolarizacije (24).

ZAKLJUČAK

Ispitivan je uticaj oksidansa sa dugotrajnim dejstvom, CHP, na potencijal mirovanja i spontanu aktivnost RNČP tehnikom intracelularnog registrovanja, a takođe je tehnikom sa nametnutim naponom ispitivano njihovo dejstvo na izlazne ispravljачke K^+ struje. Nađeno je da CHP dovodi do depolarizacije ćelijske membrane i prolongiranja akcionih potencijala bez promene potencijala mirovanja. CHP blokira kasne ispravljачke Ca^{2+} aktivisane K^+ struje RNČP, što bi moglo biti u osnovi produženog trajanja akcionih potencijala.

Zaključeno je da reaktivni oblici kiseonika mogu imati značajnu ulogu u nastanku ćelijske repetitivne aktivnosti prekidajući proces repolarizacije.

LITERATURA:

1. Bernier M, Hearse DJ. and Manning AS. Reperfusion-induced arrhythmias and oxygen-derived free radicals. *Circ. Res.* 58: 331-340, 1986.
2. Kloner R, Przyklenk K. and Whittaker P. Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. *Circulation.* 80 (5). 1115-1127, 1989.
3. Barrington PL. Effects of free radicals on the electrophysiological function of cardiac membranes. *Free Rad. Biol. Med.* 9: 355-365, 1990.
4. Lee V, Randhawa AK. and Singal PK. Adriamycin-induced myocardial dysfunction *in vitro* is mediated by free radicals. *Am. J. Physiol.* 261: H989-H995, 1991.
5. Matsuura H. and Shattock MJ. Effects of oxidant stress on steady-state background currents in isolated ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 261: H1358-H1365, 1993.
6. Facchinetti F, Dawson VL. and Dawson TM. Free radicals as mediators of neuronal injury. *Cell. Mol. Neurobiology.* 18, 6: 667-682, 1998.
7. Sayre LM, Perry G, Harris PL, Liu Y, Schubert KA. and Smith MA. In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. *J. Neurochem.* 74 (1): 270-279, 2000.
8. Smith MA, Herson PS, Pinnock RD. and Ashford ML. Hydrogen-peroxide-induced toxicity of rat striatal neurones involves activation of a non-selective cation channel. *J Physiol* 547.2 pp 17-425, 2003.
9. Tarr M. and Valenzano DP. Modification of cardiac ionic currents by photosensitizer-generated reactive oxygen. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 23: 639-649, 1991.
10. Soto MA, Gonzalez C, Lissi E, Vergara C. and Lattore R. Ca^{2+} -activated K^+ channel inhibition by reactive oxygen species. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282: C461-C471, 2002.
11. Coetzee WA, Ichikawa H. and Hearse D. Oxidant stress inhibits Na-Ca-exchange current in cardiac myocytes: mediation by sulfhydryl groups? *Am. J. Physiol.* 266(Heart Circ. Physiol. 35): H909-H919. 1994.
12. Matsuura H. and Shattock MJ. Effects of oxidant stress on steady-state background currents in isolated

- ed ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 261: H1358-H1365, 1991.
13. Beresewicz A. and Horackova M. Alterations in electrical and contractile behavior of isolated cardiomyocytes by hydrogen peroxide: possible ionic mechanisms. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 23 (8): 899-918, 1991.
 14. Santini S, Cotroneo P, Marra G, Manto A, Giardina B, Mordente A, Greco A, Martorana G, Magnani P. and Ghirlanda G. Na⁺/K⁺ ATPase impairment and experimental glycation: the role of glucose autoxidation. *Free Radic. Res.* 24 (5): 381-389, 1996.
 15. Wang XQ, Xiao AY, Sheline C, Hyrc K, Yang A, Goldberg M, Choi DW. and Yu SP. Apoptotic insults impair Na⁺, K⁺-ATPase activity as a mechanism of neuronal death mediated by cocurrent ATP deficiency and oxidant stress. *J Cell Science* 116, 2099-2110, 2003.
 16. Van Der Vliet A. and Bast A. Effect of oxidative stress on receptors and signal transmission. *Chem. Biol. Interactions.* 85: 95-116, 1992.
 17. Newell EW. and Schlichter LC. Integration of K⁺ and Cl⁻ currents regulate steady-state and dynamic membrane potentials in cultured rat microglia. *J Physiol* 567.3 pp 869-890, 2005.
 18. Lent CM. The Retzius cells within central nervous system of leeches. *Progress in Neurochem.* 8: 81-117, 1977.
 19. Beleslin BB. Membrane physiology of excitable cells in annelids. In: Membrane physiology of invertebrates. Ed. R. B. Podesta. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, pp. 199-260, 1982.
 20. Tokube K, Kiyosue T. and Arita M. Openings of cardiac KATP channel by oxygen free radicals produced by xanthine oxidase reaction. *Am. J. Physiol.* 271 (2 Pt 2): H478-H489, 1996.
 21. Jovanović Z. and 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. Section 35, 983-986, 1997.
 22. Seutin V, Scuvee-Moreau J, Massotte L. and Dresse A. Hydrogen peroxide hyperpolarizes rat CA1 pyramidal neurons by inducing an increase in potassium conductance. *Brain Res.* 683 (2): 275-278, 1995.
 23. Ward CA. and Giles WR. Ionic mechanism of the effects of hydrogen peroxide in rat ventricular myocytes. *J. Physiol. (London).* 500 (Pt 3): 631-642, 1997.
 24. Hille B. Ionic channels of excitable membranes. Second edition. Ed. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts. 1-607, 1992.