

Action of Mitochondrial Substrates on Neuronal Excitability in Rat Substantia Gelatinosa Neurons

Hae In Lee¹ and Sang Woo Chun^{2,*}

¹Department of Dental Hygiene, Gwangyang Health Science University, Gwangyang 57764, Korea

²Department of Oral Physiology, College of Dentistry, Wonkwang University, Iksan 54538, Korea

(received May 08, 2017; revised May 22, 2017; accepted May 23, 2017)

Recent studies indicate that mitochondria are an important source of reactive oxygen species (ROS) in the spinal dorsal horn. In our previous study, application of malate, a mitochondrial electron transport complex I substrate, induced a membrane depolarization, which was inhibited by pretreatment with ROS scavengers. In the present study, we used patch clamp recording in the substantia gelatinosa (SG) neurons of spinal slices, to investigate the cellular mechanism of mitochondrial ROS on neuronal excitability. DNQX (an AMPA receptor antagonist) and AP5 (an NMDA receptor antagonist) decreased the malate-induced depolarization. In an external calcium free solution and addition of tetrodotoxin (TTX) for blockade of synaptic transmission, the malate-induced depolarization remained unchanged. In the presence of DNQX, AP5 and AP3 (a group I metabotropic glutamate receptor (mGluR) antagonist), glutamate depolarized the membrane potential, which was suppressed by PBN. However, oligomycin (a mitochondrial ATP synthase inhibitor) or PPADS (a P2 receptor inhibitor) did not affect the substrates-induced depolarization. These results suggest that mitochondrial substrate-induced ROS in SG neuron

directly acts on the postsynaptic neuron, therefore increasing the ion influx via glutamate receptors.

Key words: Malate, Membrane excitability, Reactive oxygen species, SG neurons

서론

척수의 후각 세포 중 표층에 존재하는 아교질 (lamina II) 신경세포는 신체에 유해한 통각정보를 감각 신경섬유를 통해 주변의 lamina I과 IV등의 투사신경세포를 통하여 상위중추로 전달한다 [1,2]. 만성통증은 이러한 정보전달 체계 중에서 지속적 자극에 의해 시냅스 가소성 (synaptic plasticity)의 변화가 유발되며, 이러한 변화에 의해 장기간 지속되는 세포 반응성의 증가 (long term potentiation)가 만성통증의 세포기전이라고 알려져 있다.

Superoxide ($O_2^{\cdot-}$), 과산화수소 (hydrogen peroxide; H_2O_2) 및 산화질소 (nitric oxide; NO)를 포함하는 활성산소종 (reactive oxygen species; ROS)은 유해반응이나 조직손상에 의해 세포내에 증가하며 [3-6], ROS의 형성과 생물학적 반응성은 superoxide dismutase나 catalase, glutathione peroxidase와 같은 내재성 항산화 활성에 의해 조절 된다 [7].

척수후각 세포에서 미토콘드리아는 ROS의 주요한 발생소이며 [8], 특히 $O_2^{\cdot-}$ 와 H_2O_2 를 발생시킨다 [9-11]. 미토콘드리아 전자전달계 (electron transport complex; ETC)의 I 복합체 기질인 malate와 glutamate 그리고 II 복합체 기질인 succinate의 투여로 H_2O_2 가 증가하는 것이 관찰되었고 [10,12], 척수후각 세포에서 malate에 의해 탈

*Correspondence to: Sang-Woo Chun, Department of Oral Physiology, College of Dentistry, Wonkwang University, 344-2, Shinyong-Dong, Iksan 54538, Korea
Tel: 82-63-850-6932, E-mail: physio1@wonkwang.ac.kr
ORCID : 0000-0001-8083-0124

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

분극과 흥분성이 증가되는 것은 광범위 항산화 작용을 나타내는 PBN이나 H_2O_2 를 H_2O 로 분해하는 catalase를 처리하면 억제되는 것이 관찰 되었다 [11]. Liot 등은 전자전달계 II 복합체 억제제인 3-NP에 의한 ROS 생성의 변화와 ATP 생성의 감소가 NMDA 수용체를 통해 발생되었으며, 이는 항산화제와 NMDA 수용체 길항제에 의해 억제됨을 보고하였다 [13]. 또한 glutamate가 시냅스 공간에서 EAAT4 (excitatory amino acid transporter 4)에 의해 시냅스후뉴런으로 운반되며 [14-16], 시냅스후뉴런에서 미토콘드리아 전자전달계의 기질로써 작용하여 [17] ROS를 발생시키고 ATP를 증가시킴이 보고되었다 [18].

선행 연구에서 미토콘드리아 ETC I 복합체 기질인 malate에 의해 발생된 ROS는 척수후각 아교질세포에 흥분적으로 작용하여 통증을 증가시킬 수 있다고 보고하였으나 [11], 흥분성 증가의 기전은 명백히 밝혀지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 척수후각 세포에서 미토콘드리아 기질에 의해 증가된 ROS가 어떤 기전에 의하여 세포의 흥분성에 영향을 미치는지를 patch clamp 방법으로 조사하였다.

재료 및 방법

척수절편 제작

생후 13일-18일 된 Sprague-Dawley 흰쥐를 암수 구별 없이 사용하였으며, 이 연구는 원광대학교 동물실험 윤리 위원회에서 승인을 얻었다 (WKU09-076). 흰쥐를 ether로 마취한 후 25% urethane (2 ml/Kg)을 복강 내 투여하였다. 흉추에서부터 천추까지 척수제거술 (laminectomy)을 하여 척수를 노출시킨 후 요천수 팽대부에서 1 cm 정도의 척수를 절단하였다. 조직절편기 (vibratome 752M, campden, 영국)의 조직고정대에 agar block을 먼저 부착시킨 후 순간접착제를 이용하여 척수절편을 고정하였다. 95% O_2 -5% CO_2 의 혼합가스를 공급하면서 두께 350 μ m의 척수절편을 얻었는데, 절단 중 온도조절기(model 765, Campden, 영국)를 이용하여 세포외 용액의 온도를 1-2 $^{\circ}C$ 정도로 낮게 유지하였다. 척수절편은 32 $^{\circ}C$ 의 세포외 용액에 30분-1시간 정도 보관하여 정상상태로 회복시켰고, 이후에는 실온에서 실험을 시행하였다. 기록은 척수절편을 현미경 (BX50WI, Olympus, 일본) 위의 기록용기 (1 ml)에 옮긴 후 시행하였고, 실험기간 동안 지속적으로 95% O_2 -5% CO_2 가 포함된 용액을 관류펌프 (Minipuls 3, Gilson, 프랑스)를 이용하여 순환시켰다 (1-2 ml/min).

실험용액

막전압을 기록하기 위한 세포외 용액의 조성 (mM)은 117

NaCl, 3.6 KCl, 2.5 $CaCl_2$, 1.2 $MgCl_2$, 1.2 NaH_2PO_4 , 25 $NaHCO_3$, 11 Glucose 등으로 구성되었고 95% O_2 -5% CO_2 를 공급하여 pH를 7.4로 유지하였다. 실험에서 사용된 Ca^{2+} 을 제거한 용액은 $CaCl_2$ 대신에 1 EGTA를 추가하였다. 세포내 용액은 150 K-Glu, 10 HEPES, 5 KCl, 0.1 EGTA, 2 MgATP를 사용하였고, pH는 KOH를 첨가하여 7.3으로 조정하였다. 실험에 사용한 oligomycin, suramin, malate, N-tert-butylnitron (PBN), glutamate, (\pm)2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5) 등은 Sigma사 (미국)에서 구입하였고, pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2-4-disulphonic acid (PPADS), tetrodotoxin (TTX), 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX), (\pm)2-amino-3-phosphonopropionic acid (AP3) 등은 Tocris사 (영국)에서 구입하여 사용하였다. DNQX는 DMSO에 먼저 녹인 후 최종 농도로 실험직전에 세포외 용액에 희석하여 사용하였고, AP3는 NaOH에 녹여 사용하였다. 세포에 대한 실험용액의 적용은 증력을 이용한 관류장치 (BPS-4SG, Ala Scientific Instruments, 미국)를 이용하여 용액을 교환하였다.

전기생리학적 기록방법

막전압의 기록은 whole-cell patch clamp 방법과 gramicidin을 이용한 perforated patch clamp 방법을 사용하였다. 미세 유리전극 제조기 (PP-830, Narishige, 일본)를 이용하여 외경 1.5 mm의 연질 유리미세관 (TW150-3, WPI, 미국)을 저항이 6-10 $M\Omega$ 이 되도록 기록전극을 제작하였다. Gramicidin (Sigma, 미국)을 DMSO에 녹인 후 세포내 용액에 2.5-5 μ g/ml의 농도가 되게 희석시켜 사용하였다. 다른 부위에 비해 밝은 띠를 형성하고 있는 척수후각 아교질 부위를 확인한 후 전극에 양압을 가하면서 미세 전극조절기 (ROE-200, Sutter, 미국)를 이용하여 세포에 접근하였다. Seal test를 시행하면서 세포에 접근하여 세포와의 gigaohm seal을 이루었으며, gigaohm seal을 이룬 후 15-20분 경과하여 막전압이 -45 mV 이하로 안정되었을 때 기록을 시작하였다. 전압측정에는 Axopatch 200B 증폭기 (Axon, 미국)를 사용하였고, 이 증폭기는 Digidata 1322 (Axon, 미국) AD변환기를 통하여 컴퓨터에 연결하였으며, pCLAMP software (version 9.0, Axon, 미국)를 사용하여 실험을 수행하였다. 모든 실험은 실온에서 시행하였다.

실험자료의 분석

막전압 분석은 Clampfit (version 8.0, Axon, 미국)을 이용하였다. 약물처리군 사이에서 통계적으로 유의한 차이가 존재하는지는 independent t-test를 이용하여 확인하였고, $p < 0.05$ 에서 통계적으로 유의하다고 판정하였다. 모든 결과의 값은 평균값 \pm 표준오차 (mean \pm SEM)로 표시하였다.

결 과

Malate가 시냅스후신경세포에 미치는 영향

척추후각 세포에서 patch clamp 방법을 이용하여 막전압을 기록하여 전자전달계 I 복합체 기질인 malate의 작용을 확인하였다. Gramicidin으로 pore를 형성하여 whole cell이 되었을 때 막전압이 -45 mV 이하로 안정된 세포만을 결과분석에 이용하였다. 전류기록법으로 막전압을 기록하면서 malate 10 mM을 5분간 처리하였는데 약물 주입 후 5.0 ± 0.3 mV (n=60)의 탈분극이 관찰되었으며, 이는 malate를 제거하면 천천히 원상태로 회복되었다.

Malate에 의해 발생한 ROS가 시냅스후신경세포에 직접적으로 작용하였는지 확인하고자 NMDA 수용체 길항제인 AP5 25 μ M과 AMPA 수용체 길항제인 DNQX 20 μ M 등을 전처리 한 후 malate의 투여효과를 확인하였다. AP5

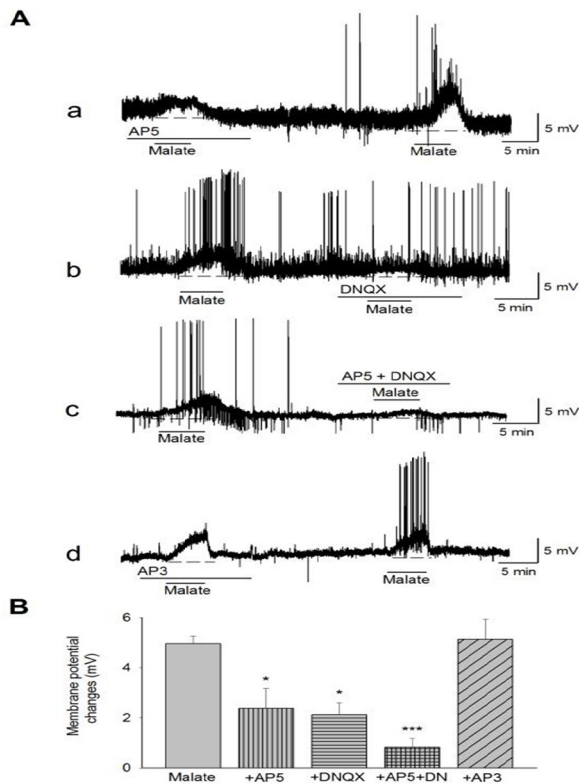


Fig. 1. Effects of glutamate receptor antagonists on malate-induced depolarization. (A) Malate-induced depolarization was blocked by pretreatment with the NMDA receptor antagonist AP5 (25 μ M) (a), AMPA receptor antagonist DNQX (20 μ M) (b), and AP5+DNQX (c), but it was not blocked by pretreatment with AP3 (100 μ M) (d). (B) Mean malate-induced membrane depolarization in control and in neurons pretreated with AP5, DNQX, AP5+DNQX and AP3. *: Values are significantly different from the control by t-test ($p < 0.05$). *** $p < 0.001$. Means \pm SEM.

용액으로 관류한 후 malate를 투여하였을 때 2.4 ± 0.8 mV (n=9, $p < 0.05$)의 탈분극을 보였고, DNQX의 처리에서는 2.1 ± 0.4 mV (n=9, $p < 0.05$)의 탈분극이 발생하여 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. NMDA와 AMPA 수용체를 동시에 차단하면 malate에 의해 발생하는 탈분극이 0.8 ± 0.3 mV (n=9) 수준으로 감소하였다 ($p < 0.001$) (Fig. 1A).

Malate의 작용이 이온투과성 수용체 (NMDA, AMPA 수용체)에 선택적으로 일어나는지 확인하고자 I 군 대사성 glutamate 수용체 길항제인 AP3 100 μ M를 malate와 함께 투여하였다. AP3의 전처리는 5.1 ± 0.8 mV의 탈분극으로 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 1A). 따라서 malate에 의한 탈분극은 이온투과성 수용체가 주로 관여하는 것으로 생각된다.

Malate가 시냅스전신경세포에 미치는 영향

시냅스후신경세포에 (NMDA, AMPA 수용체) 직접적으로 작용한 ROS가 시냅스전신경세포에도 관여하는지를 알아보기 위하여 시냅스의 신호전달을 차단하기 위한 TTX (0.5 μ M)와 칼슘을 제거한 세포외 용액으로 전처리

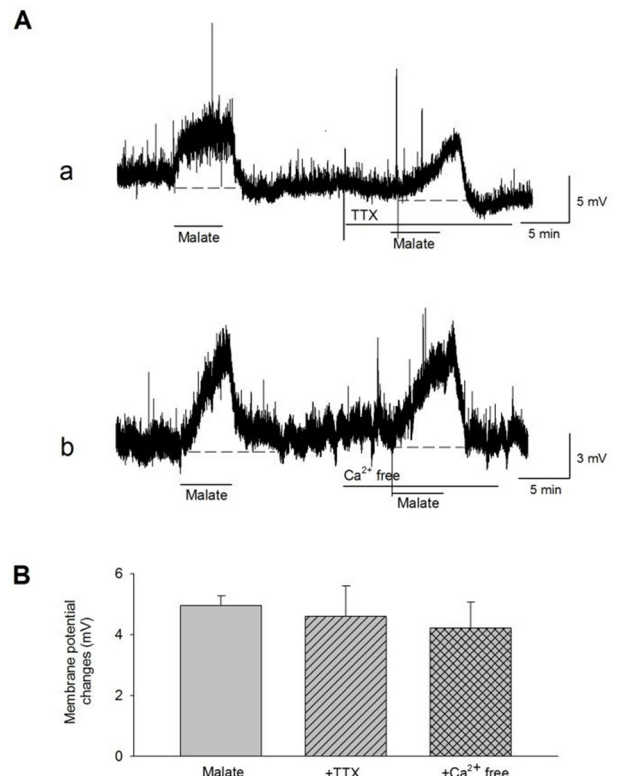


Fig. 2. Effects of blockade of the synaptic transmission on malate-induced depolarization. (A) Malate-induced depolarization was not changed by pretreatment with TTX (0.5 μ M) (a) and a Ca²⁺ free solution (b). (B) Mean malate-induced depolarization in control and in neurons pretreated with TTX and a Ca²⁺ free solution. Means \pm SEM.

한 후 malate를 투여하여 변화를 측정하였다. TTX 용액으로 관류한 후 malate를 투여하였을 때는 4.6 ± 0.8 mV ($n=7$)의 탈분극이 발생하여 막전압을 변화시키지 않았고, 칼슘을 제거한 용액의 전 처리에서도 4.2 ± 0.8 mV ($n=7$)의 탈분극을 보여 대조군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 2). 결과적으로 malate에 의해서 발생한 ROS는 시냅스전신경세포 보다는 시냅스후신경세포에 작용하여 막전압을 변화시킨다고 추측할 수 있다.

Glutamate가 시냅스후신경세포에 미치는 영향

시냅스후뉴런에서 미토콘드리아 전자전달계의 복합체 I 기질로 작용하며 [17] 뇌와 척수의 미토콘드리아에서 ROS를 발생시키고 ATP를 증가시킨다고 보고 [18]되어 있는, 대표적 흥분성 신경전달물질인 glutamate가 시냅스

후신경세포의 막전압에 미치는 효과를 관찰하였다. Glutamate 5 mM을 3분간 처리하였을 때 약물 주입 후 49.0 ± 3.5 mV ($n=10$)의 현저한 탈분극이 관찰되었고 이는 약물이 포함되지 않은 용액으로 처리하였을 때 원상태로 회복되어 흥분성 신경전달물질에 의한 탈분극 효과를 확인하였다 (Fig. 3Aa).

Glutamate가 ROS를 발생시켜 시냅스후신경세포에 작용하는지 알아보기 위해서 DNQX 20 μ M, AP5 25 μ M 그리고 AP3 100 μ M 등을 동시에 전처리 한 후 glutamate를 추가한 결과 31.8 ± 5.3 mV ($n=6$, $p<0.05$)의 탈분극이 발생하였고, ROS scavenger인 PBN 2 mM을 처리하였을 때 23.0 ± 2.6 mV ($n=6$, $p<0.05$)의 전압변화를 기록하여 약물 처리 전에 비해 유의하게 감소하였다 (Fig. 3Ab).

전압고정법으로 전류를 기록하면서 DNQX, AP5 그리고 AP3의 혼합물을 전처리 한 후 glutamate가 포함된 용액으로 관류시 59.2 ± 6.0 pA ($n=5$)의 내향성 전류가 기

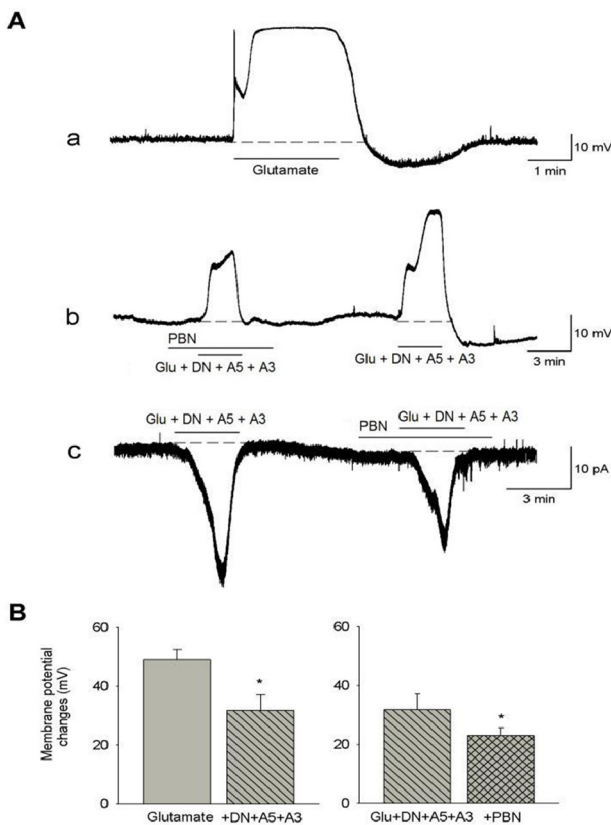


Fig. 3. ROS are involved in glutamate-induced depolarization. (Aa) Glutamate (5 mM) applied for 3 min caused a reversible membrane depolarization. (b) In the presence of DNQX+AP5+AP3, glutamate also induced membrane depolarization, which was decreased by PBN (2 mM). (c) In the presence of DNQX+AP5+AP3, glutamate-induced inward current was decreased by PBN. (B) Mean glutamate-induced membrane depolarization in control and in neurons pretreated with DNQX+AP5+AP3 and DNQX+AP5+AP3+PBN. *: Values are significantly different from the control by independent *t*-test ($p<0.05$). Means \pm SEM.

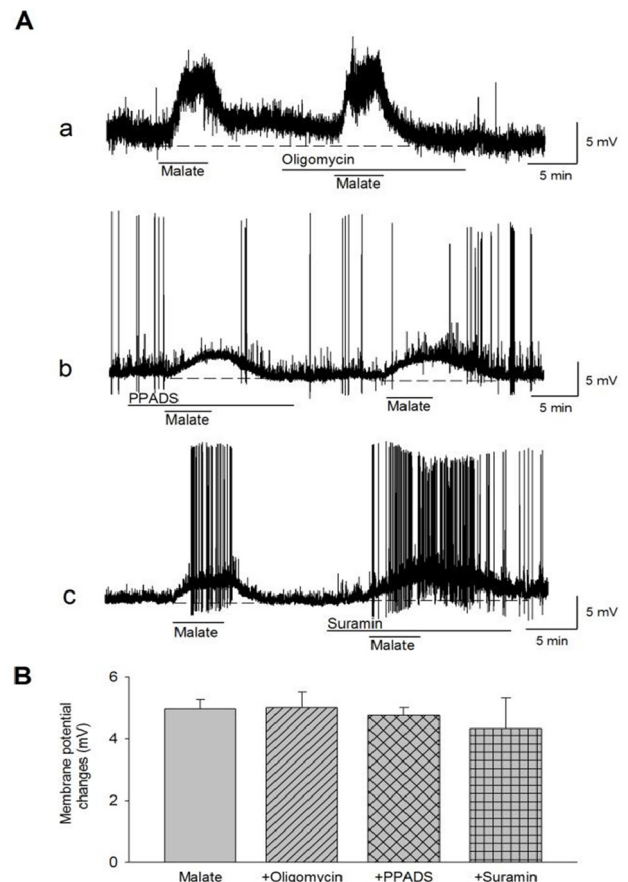


Fig. 4. Malate-induced depolarization was not caused by the ATP synthesis. (A) Malate-induced depolarization was not changed by pretreatment with oligomycin (10 μ M), PPADS (10 μ M) and suramin (50 μ M). (B) Mean malate-induced responses in control and in neurons pretreated with oligomycin, PPADS and suramin. Means \pm SEM.

록되었고, 이 혼합물에 PBN의 추가는 39.8 ± 2.0 pA ($n=5$)의 감소된 내향성 전류가 기록되었다 (Fig. 3Ac). 이러한 결과는 glutamate가 흥분성 신경전달물질로써 시냅스후뉴론을 직접 탈분극시키는 작용 외에도 미토콘드리아의 substrate로 작용하여 ROS 발생에 의해 탈분극을 유발하였음을 의미한다.

Malate에 의한 탈분극에 ATP가 미치는 영향

미토콘드리아는 전자전달계를 통해 세포대사에 필요한 ATP를 생산한다 [19]. Malate에 의해 전자전달계가 활성화되면 ATP 증가를 일으키는데 이것이 탈분극을 일으키는 요인인지 확인하기 위하여 ATP synthase inhibitor인 oligomycin 10 μ M을 전처리하고 malate를 투여한 결과 5.0 ± 0.5 mV ($n=7$)의 탈분극이 발생하여 대조군과 차이가 없었다 (Fig. 4Aa). ATP 수용체인 P2 수용체 차단제 PPADS 10 μ M과 suramin 50 μ M을 전처리한 후 malate를 투여하였다. 먼저 PPADS의 전처리에 의해 4.7 ± 0.2 mV ($n=5$)의 탈분극이 발생하여 대조군과 차이가 없었고 (Fig. 4Ab), suramin을 전처리 하였을 때에도 4.3 ± 1.0 mV ($n=6$)로 변화를 보이지 않아 (Fig. 4Ac), malate에 의한 척수 후각세포의 흥분성의 변화는 활성산소의 발생에 기인하였을 것으로 생각된다.

고 찰

활성산소 (ROS)는 유기호흡의 정상적인 대사과정과 세포내, 외부의 자극에 의하여 끊임없이 생성된다. 뇌허혈, 저산소증과 같은 상황에서는 ROS의 생성이 촉진되어 방어체계의 한계를 넘는 산화스트레스를 유발하여 신경세포의 손상을 야기하기도 하며 [20], 한편 유전자 발현, 세포분화와 증식 등 여러 가지 다양한 생리적 기능을 조절하는 역할도 보고되어 있다 [21-24].

최근에는 ROS가 통증발생에 관여되어 있다고 보고되었는데, 통각전달에 일차적 중계역할을 하는 척수 아교질 세포에서 ROS 공여체인 t-BuOOH가 통증을 유발하였다 [25]. ROS에 의해 유발된 통증은 superoxide dismutase [6], PBN [26], 비타민 E [27]와 같은 항산화제 투여에 의해 진통효과를 보였으며, 이러한 결과는 척수의 활성산소가 통증의 발생과 전달에 관여하고 있음을 의미한다. Lee 등 [11]의 연구에서는 전기생리학적인 방법을 이용하여 척수 아교질 뉴런의 미토콘드리아에서 기질에 의해 발생한 ROS와 통증의 관련성을 보고하였으나, 이러한 작용의 기전을 규명하는 연구 결과는 아직 확실하지 않다.

ROS는 다양한 경로를 통해서 얻어지는데 대표적으로

미토콘드리아 세포호흡의 부산물로 생성되며, 이는 대사과정 동안 미토콘드리아 전자전달계에서 발생된다 [28,29]. 전자전달계는 I-V복합체로 구성되는데 I복합체는 malate, glutamate, pyruvate에 의한 tricarboxylic acid (TCA) cycle의 생성물인 NADH가 기질로 작용한다. 이 연구에서는 미토콘드리아 I복합체의 기질인 malate와 glutamate를 처리하여 아교질 세포의 막전압을 탈분극시켜 흥분성을 증가시켰으며, 그것이 어떠한 기전에 의하여 발생하는지를 확인하였다.

ROS가 세포활성을 조절하는데 NMDA 수용체가 관련된다는 연구가 보고되어 있다. 해마세포에서는 과산화수소가 NMDA 수용체 활성화에 의해 과흥분성을 나타냄이 관찰되었고 [30], 항산화제인 비타민 E가 인산화된 NMDA 수용체 (pNR1)를 감소시켜 진통효과를 나타낸다고 하였다 [27]. 따라서 척수후각 세포내 ROS가 증가되는 기전으로는 먼저 일차 구심신경의 활성화증가에 의한 시냅스 공간에 glutamate가 증가됨에 의해 시냅스후신경 세포의 세포막에 존재하는 NMDA 수용체가 활성화되며 [31,32], 이는 세포내 ROS 발생 증가를 일으키거나 다양한 단백질산화 효소를 활성화 시킨다.

본 연구에서도 malate 투여에 의한 탈분극이 NMDA 수용체의 활성화에 의해 발생하는지를 확인하였다. NMDA 수용체 차단제인 AP5를 전처리한 후 malate를 투여한 결과 탈분극이 감소되었으며 이는 AMPA수용체 차단제인 DNQX의 처리나 두 가지 차단제를 병행으로 전처리한 경우에도 유사하였다. 그러나 대사성 glutamate 수용체 중 흥분성효과를 가지고 있는 I군 수용체의 차단제를 전처리한 후 malate를 투여하였을 때는 억제효과가 관찰되지 않아 ROS에 의한 탈분극은 이온투과성 수용체의 활성화에 기인하는 것으로 생각된다.

Glutamate는 흥분성 신경전달물질로써의 작용 외에도 시냅스후신경세포에서 미토콘드리아 전자전달계의 기질로써 작용하여 [17] 뇌와 척수의 미토콘드리아에서 ROS를 발생시키고 ATP를 증가시킨다고 보고되었다 [18]. 본 연구에서도 glutamate에 의한 시냅스 후 신경세포의 미토콘드리아에서 ROS 발생을 확인하였다. DNQX, AP5, AP3를 동시에 전처리하여 이온투과성 및 대사성 수용체를 차단한 후 glutamate를 투여한 결과 glutamate에 의한 탈분극이 발생되었고, ROS scavenger인 PBN을 추가 했을 때에는 유의하게 감소하여, 이는 glutamate가 전자전달계 기질로 작용하여 ROS를 발생시켰다고 추측할 수 있다.

또한 기질에 의해 전자전달계가 활성화되면 ATP 증가를 일으키는데 이것이 탈분극을 일으키는 요인인지 확인하기 위하여 ATP synthase inhibitor인 oligomycin을 처리하였는데 대조군과 차이를 보이지 않았다. Mason 등은

[33] 세포에 저산소증을 유발하면 미토콘드리아에서 ROS의 생성이 증가되는데, 이는 세포질로 이동하여 세포막의 P2 수용체를 자극한다고 하였다. ATP에 의하여 활성화되는 P2 수용체의 광범위한 차단제인 suramin과 PPADS을 전처리한 후 malate에 대한 효과를 확인한 결과 역시 유의한 변화를 보이지 않았다.

결론적으로 미토콘드리아 전자전달계 기질의 투여는 척수후각 신경세포에서 막전압을 탈분극시키고 활동전압을 발생시켰으며, 이는 발생한 ROS가 직접적으로 시냅스 후뉴론에 작용하여 NMDA 수용체를 통한 세포내 이온을 유입시켜 발생하였음을 확인하였다. 이러한 결과는 ROS가 시냅스후세포의 활동전압이 보다 용이하게 발생되도록 작용하여 통증의 정보전달과정에서 중요하게 작용하고 있음을 시사한다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (NRF-2015R1D1A1A01060762)

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Kumazawa T, Perl ER. Excitation of marginal and substantia gelatinosa neurons in the primate spinal cord: indications of their place in dorsal horn functional organization. *J Comp Neurol*. 1978;177(3):417-434. doi: 10.1002/cne.901770305.
2. Yoshimura M, Jessell TM. Membrane properties of rat substantia gelatinosa neurons in vitro. *J Neurophysiol*. 1989;62(1):109-118.
3. Levy D, Zochodne DW. Local nitric oxide synthase activity in a model of neuropathic pain. *Eur J Neurosci*. 1998;10(5):1846-1855. doi: 10.1046/j.1460-9568.1998.00186.x.
4. Liu D, Liu J, Sun D, Wen J. The time course of hydroxyl radical formation following spinal cord injury: the possible role of the iron-catalyzed Haber-Weiss reaction. *neuropathic pain*. 1998;10(5):1846-1855. doi: 10.1089/0897715041269650.
5. Khalil Z, Khodr B. A role for free radicals and nitric oxide in delayed recovery in aged rats with chronic constriction nerve injury. *Free Radic Biol Med*. 2001;31(4):430-439. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00597-4.
6. Wang ZQ, Porreca F, Cuzzocrea S, Galen K, Lightfoot R, Masini E, Muscoli C, Mollace V, Ndengele M, Ischiropoulos H, Salvemini D. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;309(3):869-878. doi: 10.1124/jpet.103.064154.
7. Djordjević VB. Free radicals in cell biology. *Int Rev Cytol*. 2004;237:57-89. doi: 10.1016/S0074-7696(04)37002-6.
8. Park ES, Gao X, Chung JM, Chung K. Levels of mitochondrial reactive oxygen species increase in rat neuropathic spinal dorsal horn neurons. *Neurosci Lett*. 2006;391:108 - 111. doi: 10.1016/j.neulet.2005.08.055.
9. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*. 1979;59(3):527-605.
10. Kwong LK, Sohal RS. Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 1998;350(1):118-126. doi: 10.1006/abbi.1997.0489
11. Lee HI, Park AR, Chun SW. Effects of Mitochondrial Reactive Oxygen Species on Neuronal Excitability in Rat Spinal Substantia Gelatinosa Neurons. *Int J Oral Biol*. 2012;37(1):17-23.
12. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem*. 2003;278(38):36027-36031. doi: 10.1074/jbc.M304854200.
13. Liot G, Bossy B, Lubitz S, Kushnareva Y, Sejbuk N, Bossy-Wetzl E. Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ*. 2009;16(6):899-909. doi: 10.1038/cdd.2009.22.
14. Otis TS, Kavanaugh MP, Jahr CE. Postsynaptic glutamate transport at the climbing fiber-Purkinje cell synapse. *Science*. 1997;277(5331):1515-1518. doi: 10.1126/science.277.5331.1515.
15. Dehnes Y, Chaudhry FA, Ullensvang K, Lehre KP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J Neurosci*. 1998;15;18(10):3606-3619.
16. Brasnjo G, Otis TS. Isolation of glutamate transport-coupled charge flux and estimation of glutamate uptake at the climbing fiber-Purkinje cell synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(16):6273-6278. doi: 10.1073/pnas.0308149101.
17. Yudkoff M, Nelson D, Daikhin Y, Erecińska M. Tricarboxylic acid cycle in rat brain synaptosomes. Fluxes and interactions with aspartate aminotransferase and malate/aspartate shuttle. *J Biol Chem*. 1994;269(44):27414-27420.
18. Panov A, Schonfeld P, Dikalov S, Hemendinger R, Bonkovsky HL, Brooks BR. The neuromediator glutamate, through specific substrate interactions, enhances mitochondrial ATP production and reactive oxygen species generation in nonsynaptic brain mitochondria. *J Biol Chem*. 2009;284(21):14448-14456. doi: 10.1074/jbc.M900985200.
19. Navarro A, Boveris A. Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;

- 287(5):R1244-1249. doi: 10.1152/ajpregu.00226.2004.
20. Cai J, Jones DP. J. Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *Biol Chem.* 1998;8;273(19):11401-11404.
 21. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001.
 22. Gonzalez C, Sanz-Alfayate G, Agapito MT, Gomez-Niño A, Rocher A, Obeso A. Significance of ROS in oxygen sensing in cell systems with sensitivity to physiological hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol.* 2002; 22;132(1):17-41.
 23. Baran CP, Zeigler MM, Tridandapani S, Marsh CB. The role of ROS and RNS in regulating life and death of blood monocytes. *Curr Pharm Des.* 2004;10(8):855-866.
 24. Bubici C, Papa S, Pham CG, Zazzeroni F, Franzoso G. The NF-kappaB-mediated control of ROS and JNK signaling. *Histol Histopathol.* 2006;21(1):69-80. doi: 10.14670/HH-21.69.
 25. Yowtak J, Lee KY, Kim HY, Wang J, Kim HK, Chung K, Chung JM. Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. *Pain.* 2011;152(4):844-52. doi: 10.1016/j.pain.2010.12.034.
 26. Kim HK, Park SK, Zhou JL, Tagliatela G, Chung K, Coggeshall RE, Chung JM. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain.* 2004;111(1-2):116-124. doi: 10.1016/j.pain.2004.06.008.
 27. Kim HK, Kim JH, Gao X, Zhou JL, Lee I, Chung K, Chung JM. Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. *Pain.* 2006; 122(1-2):53-62. doi: 10.1016/j.pain.2006.01.013.
 28. Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33(6):1065-1089. doi: 10.1006/jmcc.2001.1378.
 29. Stowe DF, Camara AK. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(6):1373-1414. doi: 10.1089/ARS.2008.2331.
 30. Avshalumov MV, Rice ME. NMDA receptor activation mediates hydrogen peroxide-induced pathophysiology in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol.* 2002;87(6):2896-2903.
 31. Smythies J. The neurotoxicity of glutamate, dopamine, iron and reactive oxygen species: functional interrelationships in health and disease: a review-discussion. *Neurotox Res.* 1999;1(1):27-39.
 32. Sung B, Lim G, Mao J. Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neuropathic pain in rats. *J Neurosci.* 2003;1;23(7):2899-910.
 33. Mason HS, Bourke S, Kemp PJ. Selective modulation of ligand-gated P2X purinoceptor channels by acute hypoxia is mediated by reactive oxygen species. *Mol Pharmacol.* 2004;66(6):1525-1535. doi: 10.1124/mol.104.000851.