

Renal iskemi-reperfüzyonda uzak organ zedelenmesi: Melatoninin karaciğer histopatolojisine etkisi

End organ injury in renal ischemia-reperfusion: The effect of melatonin on hepatic histopathology

Mete Köksal¹, Zehra Kurçer², Elif Oğuz³, Füsün Baba⁴, Nurten Aksoy⁵

¹ Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı

² Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı

³ Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı

⁴ Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı

⁵ Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı

Yazışma adresi:

Mete Köksal, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı

Özet

Amaç: Böbrek yetmezliği sonrası karaciğer hasarı önemli problemlerdendir. Çalışmamızda, böbrek iskemi reperfüzyon (IR) hasarı sonrası karaciğerde meydana gelen histopatolojik değişiklikler ve melatonin tedavisinin değişikliklere etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Materyal ve metod: Altı grup ve her grupta 8 hayvan vardı. Erkek Wistar albino sincanlar (200-300 g) ketamin hidroklorid (75 mg/kg i.p.) ve ksilazin (8 mg/kg i.p.) ile anestezi edildi. Sincanlara sağ nefrektomi sonrası sol renal arter ve vene 1 saat oklüzyon ve ardından 24 saat reperfüzyon uygulandı. Melatonin (10 mg/kg, i.p.) ya da çözücü (salin içerisinde %1 etanol) iskemiden 10 dakika önce uygulandı. Reperfüzyondan 24 saat sonra, karaciğer biopsileri alındı. Yüzde 10'luk formalin solusyonu fiksasyonu sonrası rutin ışık mikroskopu takibi yapıldı ve dokuların histopatolojisi Knodell skorlaması kullanılarak değerlendirildi.

Bulgular: Histopatolojik değerlendirme, iskemik grupta yalnızca santral nekroz skorunun kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek olduğunu gösterdi. Melatonin-iskemi reperfüzyon grubunda santral nekroz gözlenmedi. Interface hepatit ve köprüleşme nekrozu grupların hiçbirinde gözlenmezken, iskemik grumlarda lobular litik nekroz 2 ve portal inflamasyon 1 hayvanın karaciğerinde görüldü.

Sonuç: Bu çalışma, nefrektomi sonrası 1 saat renal iskemi, 24 saat reperfüzyonun karaciğer dokusunda histopatolojik hasar oluşturduğunu, melatoninin bu hasarı engellediğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Melatonin, karaciğer, renal iskemi-reperfüzyon, uzak organ hasarı

Abstract

Background: Hepatic injury after renal failure is an important problem. In our study, it was aimed to investigate the histopathological alterations in liver after ischemia reperfusion (IR) damage of kidney and investigate the effect of melatonin treatment on these alterations.

Methods: There were 6 groups and each group had 8 animals. Male Wistar albino rats (200-300 gr) were anesthetized by ketamin-hidroklorid (75 mg/kg i.p) and ksilazin (8 mg/kg i.p.). After right nephrectomy, left renal artery and vein was occluded for 1 h, then reperfused for 24 h. Melatonin (10 mg/kg, i.p.) or its solvent (1% ethanol in saline) was administered 10 minutes before ischemia. After 24th hours of reperfusion, liver biopsies were taken. Routine light microscopic procedures were followed-up and histopathological evaluation was performed by using Knodell scoring index after fixation by 10% formalin solution.

Results: Histopathological evaluation revealed that, only the central necrosis score of ischemic group was significantly higher than control group. Central necrosis was not observed in melatonin-ischemia-reperfusion group. Interface hepatitis and bridging necrosis was not observed in none of the groups, lobular lytic necrosis was seen in two and portal inflammation was seen in one of the animals liver.

Conclusions: This study shows that, 1 hour ischemia and 24 hours of reperfusion after nephrectomy causes histopathological damage in liver tissue and melatonin prevents this damage.

Key words: Melatonin, liver, renal ischemia-reperfusion, end organ injury

Giriş

Renal iskemi/reperfüzyon (IR) hasarı renal transplantasyon, parsiyel nefrektomi, aort anevrizması, kardiyopulmoner bypass cerrahisi sonrası gelişebilir. Renal kan akımının geçici olarak sağlanamaması ölüm gibi ciddi sorunlara yol açmasının yanında, kan akımının tekrar sağlanması da dokuda hasara yol açar. IR sonrası

kalsiyum dengesizliği, reaktif oksijen radikallerinin üretimi, mitokondriyal disfonksiyon ve nötrofil sekestrasyonu gibi birçok fizyopatolojik bozukluk ortaya çıkar. IR'nin, meydana geldiği organ dışında vücuttan diğer organlarında da hasara neden olabildiği gözlenmiş ve bu durum "uzak organ hasarı" olarak adlandırılmıştır. Böbrek IR sonrası da karaciğerde uzak organ hasarı

olduğunu gösteren bazı biyokimyasal parametrelerde değişiklikler rapor edilmiştir.

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) bir indoldür, karanlıkta ve genellikle memeli epifiz bezinden salgılanır. Melatoninin memeli dışındaki omurgalı ve omurgasız organizmalarda ve sadece epifiz dışında barsak, over, testis, kemik iliği ve lens gibi değişik dokulardan salgılandığı belirtilmiştir. Serbest radikal üretimi sonucunda oluşan oksidatif stres yaşlanması, nörodejeneratif bozukluklar ve denyesel IR hasarı çalışmalarındaki oksidatif strese yol açan durumlarda meydana gelir. Melatonin ise hücreleri oluşan bu oksidatif strese karşı korur.

Melatonin maküler dejenerasyon ve glokomda, gastrik mukozanın korunmasında, irritabl barsak sendromunda, diyabette, radyoterapi ve kemoterapinin yan etkilerine karşı, hemodiyaliz hastalarında, uyu bozukluklarında, nörodejeneratif hastalıklarda ve bazı anestezi işlemlerinde koruyucu olduğu ve adjuvan olarak etkin bir şekilde kullanıldığı belirtilmiştir. Melatonin, immün sistem modülatörü ve antienflamatuar rolü yanında, esas olarak *in vivo* ya da *in vitro* ortamlarda oksidatif stres durumlarında oluşan radikallere karşı koruyucu, kuvvetli bir antioksidan ve serbest radikal yakalayıcısıdır. Serbest oksijen radikallerinin hücredeki lipit, protein ve DNA gibi temel elemanlara karşı zararlı olduğu bilinmektedir. IR gibi dokularda gözlenen patolojik süreçlerin çoğunda serbest radikal üretimi sonucunda oksidatif stres oluşur. Yapılan çalışmalarda melatoninin kalp, böbrek, karaciğer ve testis gibi birçok organda oluşturulan IR hasarında koruyucu etkisi rapor edilmiştir. Melatoninin böbrek IR'ye bağlı oluşan akut böbrek yetmezliği üzerinde ve yine böbrek IR'ye bağlı oluşan karaciğer hasarının biyokimyasal verileri üzerinde iyileştirici etkileri olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte böbrek IR sonrası karaciğerde gelişebilecek uzak organ hasarı üzerine histopatolojik etkisi olup olmadığı bilinmemektedir.

Bu çalışmada, böbrek IR sonrası karaciğerde oluşabilecek histopatolojik değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine melatoninin etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Materyal metod

Deney grupları

Bu çalışmada tüm deneyler "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publication No. 86-23, revised 1984) kurallarına uyularak ve Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onay alınarak yapıldı.

200–300 g ağırlığında erkek Wistar türü sıçanlar oda sıcaklığında ($21\pm2^\circ\text{C}$), %60 \pm 5 nemli ortamda ve 12-12 saat aydınlatık karanlık sikluslu ortamda saklandı. Sıçanlar randomize olarak üç gruba (kontrol, sham ve I/R) bölündü. Melatonin (Sigma®, St Louis, MO, USA) etanolda (%96) çözüldükten sonra %0,09 NaCl ile dilüe edildi ve final konsantrasyon %1 olarak hazırlandı.

Sıçanlara randomize olarak melatonin (10 mg kg⁻¹) ya da çözücü (%0,09 NaCl içerisinde %1 etanol) nefrektomiden 20 dakika sonra ya da iskemi işleminden 10 dakika önce i.p. olarak uygulanarak, melatoninlu ve melatoninsız gruplar ayrıldı.

Renal iskemi reperfüzyon

Sıçanlar ketamin hidroklorid (75 mg kg⁻¹ i.p.) ve ksilazin (8 mg kg⁻¹ i.p.) ile anestezi edildi. Dorso-lateral insizyonla sağ nefrektomi, iskemiden 30 dakika önce yapıldı. Sıçanların bir kısmında sol renal arter 60 dakika oklüze ve 24 saat reperfüze edildi. Sham grubu sıçanlara yalnızca sağ nefrektomi uygulandı. Bütün bu işlemlerden sonra kontrol, melatonin, sham, sham+melatonin, I/R, I/R+melatonin olarak ve her birinde 8 hayvan olan 6 grup olmuştu. Sıçanlar reperfüzyonun 24. saatinde anestezi verilerek karaciğer dokuları çıkarıldı.

Histopatolojik değerlendirme

Karaciğer dokuları %10'luk tamponlanmış nötral formalin solüsyonuna alındı ve 24 saat fikse edildi. Tüm parçalar histopatolojik inceleme için rutin otomatik doku takibi işleminden geçirilerek parafine gömülü. Parafin bloklardan hazırlanan 5 μm kalınlığındaki kesitler hematoxylin-eosin (H&E) ile boyandı. Histopatolojik değerlendirme ışık mikroskopu (Axioplan 2, Zeiss, Germany) altında, H&E boyalı kesitler taranarak gerçekleştirildi. Dokular Ishak ve ark. tarafından tanımlanan, modifiye Knodell Skorlama sistemi ile değerlendirildi. Dokularda santral nekroz, güve yeniği nekrozu (interface hepatit), lobüler litik nekroz, portal inflamasyon ve köprüleşme hasarı açısından değerlendirildi ve skorlandı.

Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Veriler aritmetik ortalama \pm standart hata olarak sunuldu. Grupların histopatolojik verilerinin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi uygulandı. Gruplar arasındaki farklılıklar Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde, $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

Histopatolojik değerlendirmede iskemik grupta, yalnızca santral nekroz skoru kontrol gruptan anlamlı olarak yüksek gözlendi. Melatonin-I/R grubunda santral nekroz gözlenmedi. Piecemeal (güve yeniği) nekrozu ve köprüleşme nekrozu grupların hiç birinde gözlenmedi. İskemi/reperfüzyon grubunda 2 deneğin karaciğerinde lobüler litik nekroz ve 1 deneğin karaciğerinde hafif derecede portal inflamasyon görüldü ve melatonin-I/R grubu dâhil olmak üzere diğer grplarda bu bulgulara rastlanmadı (Tablo 1).

Tartışma

Böbrek IR sonucunda oluşacak hasar böbrekte gözlenebildiği gibi, uzak organlarda da oluşabilmektedir.

Reaktif oksijen türevi kaynaklı hücresel hasar, reperfüzyon sonrasında dokudaki oksijen seviyesinin tekrar yükselmesiyle, reaktif oksijen türevi oluşumunun

artması ve hücrelerin detoksifikasyon kapasitesinin bunu karşılayamaması sonucu oluşur . Reperfüzyon sırasında moleküller oksijen, elektron tutucu olarak harcanır ve IR sırasında gerçek hasar yapıcı iki tane süperoksit anyonu olan hidrojen peroksit ve hidroksil radikali oluşur . Serbest radikal oluşturma mekanizmalarına katkıda bulunan maddelerden birisi de nitrik oksittir (NO). NO, O₂- ile birlikte, kuvvetli ve agresif bir hücre oksitleyici olan peroksinitritin oluşumuna katkıda bulunur.

Akut iskemik renal yetmezliğine neden olan mekanizmalar tam bilinmemesine rağmen, reperfüzyon sırasında hasarda serbest radikallerin anahtar rol oynadığı anlaşılmıştır . Çoğu çalışma böbrekteki iskeminin lipit peroksidasyonu ile ilişkili olduğunu belirtmektedir . Lipit peroksidasyonu, hücre zarlarının oksidatif yıkımına, sonunda hücresel ölümün gerçekleşebileceğine toksik ve reaktif maddelerin oluşumuna yol açan otokatalitik bir mekanizmadır .

Kelly ve ark. ile Fadılioğlu ve ark. yaptıkları çalışmalarında renal IR sonrası uzak organlarda inflamatuar hasarın oluşabileceği bildirilmiştir . Nötrofiller O₂- ile HOCl gibi ve başka reaktif oksijen türevlerinin kaynağıdır. HOCl protein, aminoasit, karbonhidrat, nükleik asit ve lipit gibi hücresel moleküllerin oksidasyonuna, dolayısıyla hasarlanmasına yolaçar . Matsuyama ve ark. dokularda olacak hasarın daha yoğun olarak, IR uygulamasından sonraki 12 ila 24. saatlerde ortaya çıktığını bildirmiştir . Çalışmamızda biz de renal IR'de, 1 saat iskemi ve 24 saat reperfüzyondan sonra elde ettiğimiz karaciğer dokusunda uzak organ hasarı olup olmadığını, oluyorsa bu hasar üzerinde antioksidan olarak kullandığımız melatoninin etkisini histopatolojik olarak ortaya koymayı amaçladık.

Melatonin hücre zarlarının stabilizasyonunu sağlayarak onları oksidatif hasara karşı daha dayanıklı yapmaktadır . Melatonin aynı zamanda bir antioksidan ve serbest radikal yakalayıcısıdır . Rodriguez-Reynoso ve ark. yaptıkları çalışmada, eksojen melatonin uygulamasının glutatyon seviyesini artırdığını, lipit peroksidasyonunu azalttığını, IR sonucu oluşan NO seviyesi artışını düşürdüğünü ve böbrek fonksiyonunu koruduğunu belirtmişler ve melatonin uygulaması histopatolojik böbrek hasarını azalttığını bildirmiştir . Kurcer ve ark. uzun süreli melatonin uygulamasının lipit peroksidasyonunu ve NO oluşumunu azaltarak, böbrek hasarını azalttığı gösterilmişlerdir . Renal IR vakalarında uzak organ hasarlanmasıın histopatolojik olarak değerlendirildiği çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar daha önce Serteser ve ark. tarafından yapılan çalışma sonuçlarını teyit etmektedir. Serteser ve ark. iskemi ve reperfüzyondan sonra biyokimyasal olarak karaciğer dokusunda yüksek protein ve lipid peroksidasyonunu ve oksidan hasarın DNA, protein ve zar lipitleri gibi hücresel molekülleri etkilemeye olduğunu göstermişlerdir . Fadılioğlu ve ark. yaptığı bir çalışmada

böbreklerdeki IR uygulamasının karaciğer gibi uzak organlarda da hasara yol açtığını yine biyokimyasal verilerle göstermişler ve melatonin uygulamasının böbrekteki IR sonrası ortaya çıkan karaciğer hasarını önlediğini bildirmiştirlerdir . Bizim çalışmamız da böbreklere uygulanan IR histopatolojik olarak uzak organlardan birisi olan karaciğerde hasara yol açmıştır ve melatoninlu IR grubunda bu hasar gözlenmemiştir.

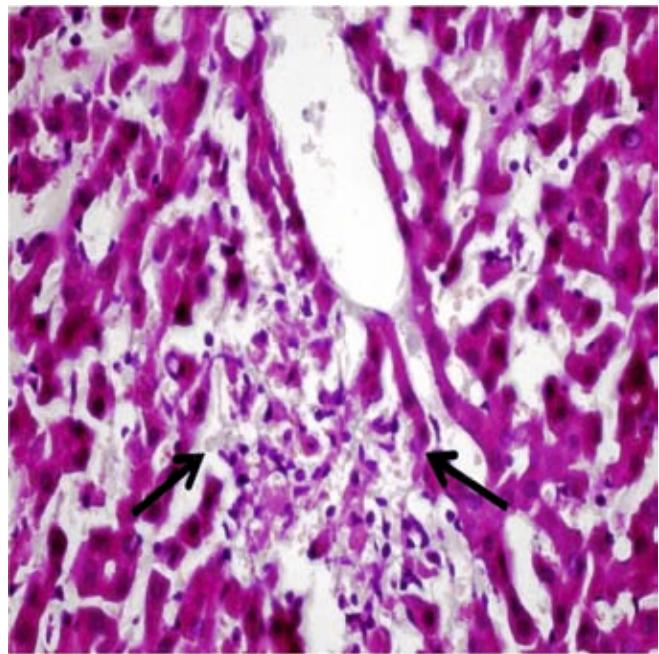
Kurcer ve ark. yaptığı benzer başka bir çalışmada 24 saatlik reperfüzyon sonucu böbrek dokularında histopatolojik olarak proksimal tubüllerde yoğun nekroz ve apoptosisin yanında, glomerüllerde hafif konjesyon ve medullada yoğun konjesyon ve staz bulgularıyla karşılaşılmıştır ve melatonin böbreğin histolojisini korumuştur. Kurcer ve ark. göre melatoninun koruyucu etkisi daha çok antioksidan özelliklerine bağlıdır . Bizim çalışma sonucunda tespit ettiğimiz melatoninun karaciğer histopatolojisindeki olumlu koruyucu etkininde yine melatoninun güçlü antioksidan etkisinden kaynaklanabileceğini düşünmektedir.

Çalışmamızda istatiksel olarak anlamlı olmasa da bir gruptaki deneğin karaciğerinde hafif portal inflamasyona rastlandı. Şener ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, 45 dakika iskemi sonrasında reperfüzyonun 1., 3., 6., 24. ve 48. saatlerinde sıçan böbrek dokularını histolojik olarak değerlendirmişler ve erken saatlerde böbrek hasarının daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada, 1 saatlik reperfüzyon sonrasında belirgin lökosit infiltrasyonu, glomerüller çevresinde vazokonjesyon, glomerüler ve tubuler dejenerasyon ve hafif interstisyal ödem varken, melatonin uygulanmış grupta vazokonjesyonun olmadığı, orta derecede lökosit infiltrasyonunun, hafif derecede glomerüler ve tubuler dejenerasyonun olduğu belirtilmiştir

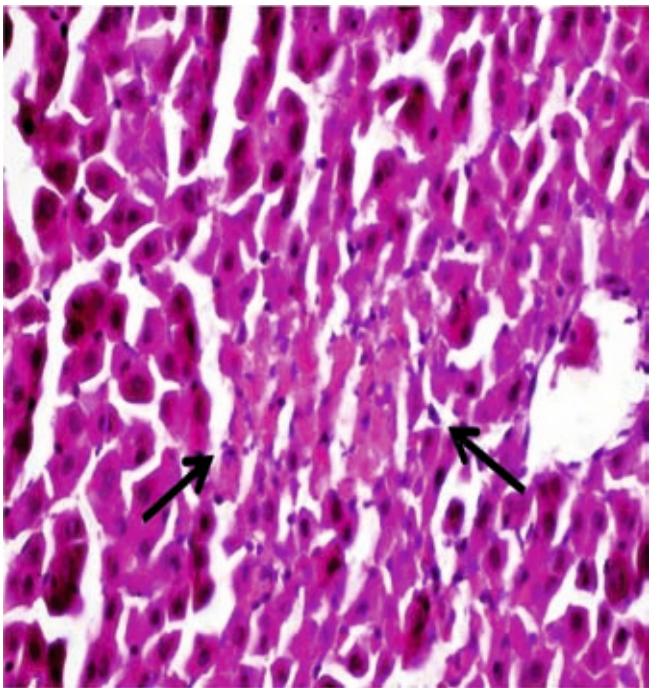
. Çalışmamızda dokuları reperfüzyonun 24. saatinde değerlendirdik ve en önemli bulgu olarak santral ven çevresinde nekroz ve apoptosis tespit ettiğimiz ve melatonin uygulanan grupta santral nekroz ve belirgin apoptozisin izlenmediğini bulduk.

Sonuç olarak çalışmamızda böbreğe uygulanan IR sonucu uzak organ olan karaciğerde histopatolojik olarak anlamlı bir hasar gözlenmiştir. Hasarın hangi mekanizmayla meydana geldiğini mevcut çalışmaya kesin olarak söyleyemeyiz. Kuvvetli bir antioksidan olan melatonin uygulayarak yaptığımız incelemede olabilecek hasarın tamamen önlenmiş olması, bunun IR sonucu oluşan şiddetli oksidatif stresten kaynaklanmış olabileceği tezini güçlendirmektedir. Ama sonuçlarımızın oksidatif hasarı gösterecek daha ileri ve detaylı biyokimyasal araştırmaları da içeren kapsamlı çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

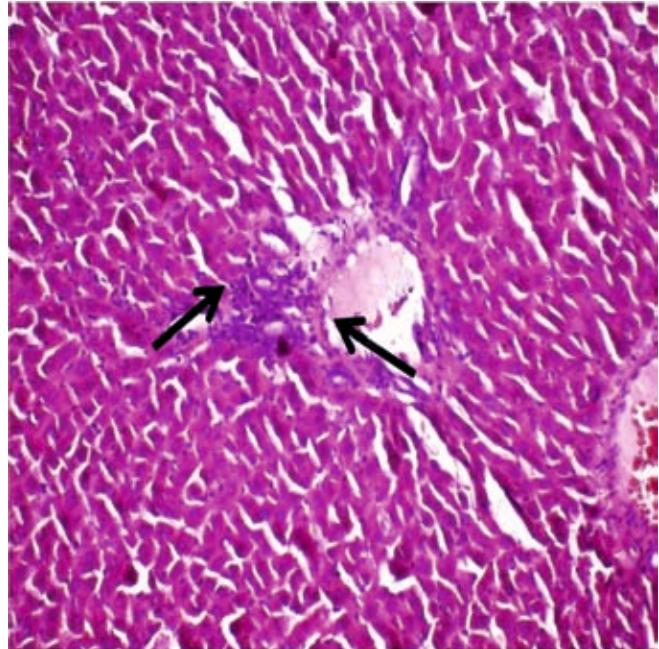
Bu çalışma 20-23 Mayıs 2008 tarihleri arasında Adana'da IX. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresinde poster bildirisi olarak sunulmuştur.



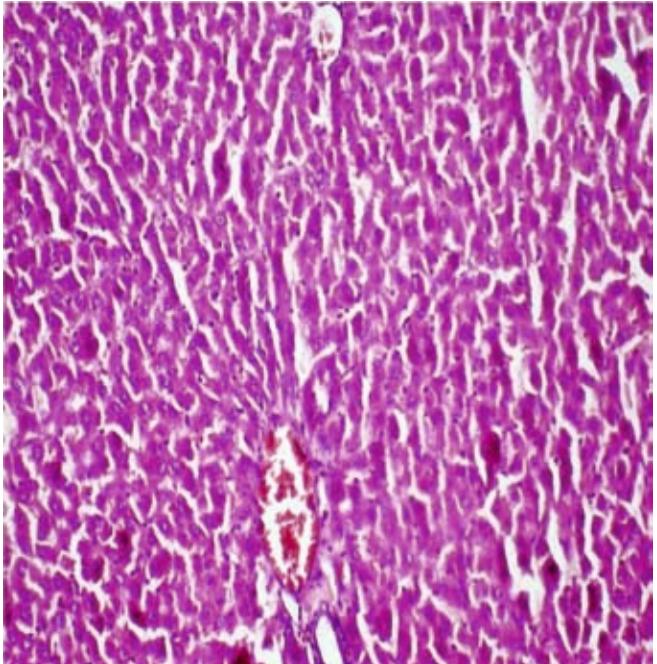
Resim 1. Vena santralis çevresinde nekroz ve apoptozis gösteren hepatositler.
(İskemik karaciğer grubu, HE x200)



Resim 2. Santral veden uzakta zon 2 de lobuler nekroz (İskemik karaciğer grubu, HE x200).



Resim 3. Portal alanda inflamasyon
(İskemik karaciğer grubu, HE x200).



Resim 4. Normal karaciğer
(İskemi sonrası melatonin grubu grubu, HE x200).

Renal iskemi-reperfüzyonda melatonin

Tablo 1. Karaciğer hasarının modifiye Knodell skorlamasına göre istatistiksel değerlendirmesi

GRUP	LLN	PI	IFH	SN	KH
Kontrol	0±0	0±0	0±0	0±0+	0±0
M	0±0	0±0	0±0	0±0+	0±0
SHAM	0±0	0±0	0±0	0±0+	0±0
SHAM+M	0±0	0±0	0±0	0±0+	0±0
IR	0,38±0,263	0,13±0,125	0±0	0,75±0,313*	0±0
IR+M	0±0	0±0	0±0	0±0+	0±0

Veriler ortalama ±Standart Hata*: p< 0.05 kontrolden farkı, +: p< 0.05 IR gruptan farkı gösterir.

LLN: Lobüler litik nekroz, PI: Portal inflamasyon, IFH: Interface hepatit, SN: Santral nekroz, KH: Köprüleşme hasarı

Yazarlarla ilgili bildirilmesi gereken konular (Conflict of interest statement) : Yok (None)

Kaynaklar

- Paller MS. Acute renal failure: controversies, clinical trials, and future directions. *Semin Nephrol* 1998; 18(5): 482-9.
- Reiter RJ, Tan DX, Gitto E, et al. Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. *Polish Journal of Pharmacology* 2004; 56(2): 159-70.
- Meldrum DR, Cleveland JC, Jr., Sheridan BC, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH. Cardiac surgical implications of calcium dyshomeostasis in the heart. *Ann Thorac Surg* 1996; 61(4): 1273-80.
- Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia--reperfusion injury. *Br J Surg* 1996; 83(2): 162-70.
- Rouslin W. Mitochondrial complexes I, II, III, IV, and V in myocardial ischemia and autolysis. *Am J Physiol* 1983; 244(6): H743-8.
- Serteser M, Koken T, Kahraman A, Yilmaz K, Akbulut G, Dilek ON. Changes in hepatic TNF-alpha levels, antioxidant status, and oxidation products after renal ischemia/reperfusion injury in mice. *J Surg Res* 2002; 107(2): 234-40.
- Kelly KJ. Distant effects of experimental renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(6): 1549-58.
- Fadillioglu E, Kurcer Z, Parlakpinar H, Iraz M, Gursul C. Melatonin treatment against remote organ injury induced by renal ischemia reperfusion injury in diabetes mellitus. *Archives of Pharmacal Research* 2008; 31(6): 705-12.
- Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 79(1-3): C153-8.
- Menendez-Pelaez A, Howes KA, Gonzalez-Brito A, Reiter RJ. N-acetyltransferase activity, hydroxyindole-O-methyltransferase activity, and melatonin levels in the Harderian glands of the female Syrian hamster: changes during the light:dark cycle and the effect of 6-parachlorophenylalanine administration. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 145(3): 1231-8.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, et al. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1472(1-2): 206-14.
- Hardeland R, Poeggeler B. Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res* 2003; 34(4): 233-41.
- Tomas-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res* 2005; 39(2): 99-104.
- Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT. Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 2002; 2(2): 113-32.
- Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(11): 7124-8.
- Kehler JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993; 23(1): 21-48.
- Knight JA. Free radicals: their history and current status in aging and disease. *Ann Clin Lab Sci* 1998; 28(6): 331-46.
- Sanchez-Barcelo EJ, Mediavilla MD, Tan DX, Reiter RJ. Clinical Uses of Melatonin: Evaluation of Human Trials. *Current Medicinal Chemistry* 2010; 17(19): 2070-95.
- Aksøy N, Vural H, Sabuncu T, Aksoy S. Effects of melatonin on oxidative-antioxidative status of tissues in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct* 2003; 21(2): 121-5.
- Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem* 2002; 2(2): 181-97.
- Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem* 2002; 2(2): 167-79.
- Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol* 2005; 165(1-2): 139-49.
- de Groot H. Reactive oxygen species in tissue injury. *Hepatogastroenterology* 1994; 41(4): 328-32.
- Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int* 1999; 49(2): 91-102.
- Sahna E, Acet A, Ozer MK, Olmez E. Myocardial ischemia-reperfusion in rats: reduction of infarct size by either supplemental physiological or pharmacological doses of melatonin. *J Pineal Res* 2002; 33(4): 234-8.
- Kurcer Z, Oguz E, Ozbilge H, et al. Melatonin protects from ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats: this effect is not mediated by proinflammatory cytokines. *Journal of Pineal Research* 2007; 43(2): 172-178.
- Kurcer Z, Oguz E, Iraz M, et al. Melatonin improves methanol intoxication-induced oxidative liver injury in rats. *J Pineal Res* 2007; 43(1): 42-9.
- Kurcer Z, Oguz E, Ozbilge H, Baba F, Aksoy N, Celik N. Effect of melatonin on testicular ischemia/reperfusion injury in rats: is this effect related to the proinflammatory cytokines? *Fertil Steril* 2008; 89(5 Suppl): 1468-73.
- Donnahoo KK, Meng X, Ayala A, Cain MP, Harken AH, Meldrum DR. Early kidney TNF-alpha expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1999; 277(3 Pt 2): R922-9.
- Meldrum KK, Meldrum DR, Meng X, Ao L, Harken AH. TNF-alpha-dependent bilateral renal injury is induced by unilateral renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282(2): H540-6.
- Ishak K, Baptista A, Bianchi L, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22(6): 696-9.
- Erdogan H, Fadillioglu E, Yagmurca M, Ucar M, Irmak MK. Protein oxidation and lipid peroxidation after renal ischemia-reperfusion injury: protective effects of erdosteine and N-acetylcysteine. *Urol Res* 2006; 34(1): 41-6.
- Holmberg SR, Cumming DV, Kusama Y, et al. Reactive oxygen species modify the structure and function of the cardiac sarcoplasmic reticulum calcium-release channel. *Cardioscience* 1991; 2(1): 19-25.
- Yagmurca M, Erdogan H, Iraz M, Songur A, Ucar M, Fadillioglu E. Caffeic acid phenethyl ester as a protective agent against doxorubicin nephrotoxicity in rats. *Clin Chim Acta* 2004; 348(1-2): 27-34.
- Kurcer Z, Parlakpinar H, Vardi N, et al. Protective effects of chronic melatonin treatment against renal ischemia/reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 2007; 115(6): 365-71.
- Eschwege P, Paradis V, Conti M, et al. In situ detection of lipid peroxidation by-products as markers of renal ischemia injuries in rat kidneys. *J Urol* 1999; 162(2): 553-7.
- Arnhold J, Osipov AN, Spalteholz H, Panasenko OM, Schiller J. Effects of hypochlorous acid on unsaturated phosphatidylcholines. *Free Radic Biol Med* 2001; 31(9): 1111-9.
- Matsuyama M, Yoshimura R, Hase T, Kawahito Y, Sano H, Nakatani T. Study of cyclooxygenase-2 in renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 2005; 37(1): 370-2.
- Sener G, Sehirli AO, Keyer-Uysal M, Arbak S, Esroy Y, Yegen BC. The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *J Pineal Res* 2002; 32(2): 120-6.
- Rodriguez-Reynoso S, Leal C, Portilla-de Buen E, Castillo JC, Ramos-Solano F. Melatonin ameliorates renal ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2004; 116(2): 242-7.