

Tavşanlarda Demir Uygulaması İle Oluşturulan Oksidatif Hasar Üzerine Melatoninin Etkisi[¶]

EFFECT OF MELATONIN ON IRON TREATMENT- INDUCED OXIDATIVE DAMAGE IN RABBITS

Ahmet KOYU*, M.Fehmi ÖZGÜNER*, Sadettin ÇALIŞKAN**, Halit KARACA***, Halis KÖYLÜ****

* Yrd.Doç.Dr., Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD,

** Prof.Dr., Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD,

*** Dr., Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD,

**** Doç.Dr., Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD, ISPARTA

Özet

Melatonin hücre membranlarını oksidatif hasara karşı koruyan antioksidan bir hormondur. Fizyolojik şartlarda çeşitli oksidasyon basamaklarında bulunan demir iyonlarının serbest radikal oluşturduğu ve hücre içi lipit peroksidasyon reaksiyonlarında başlatıcı ve ilerletici önemli bir rolünün olduğu görülmektedir.

Bu çalışmanın amacı; demir uygulaması ile eritrositlerde ortaya çıkan oksidatif değişiklikler üzerine melatoninin koruyucu bir etkisinin olup olmadığının araştırılmasıdır.

Çalışmada Yeni Zelanda türü, ağırlıkları 600-800 g arasında değişen beş aylık 30 erkek tavşan kullanıldı. Hayvanlar üç gruba ayrıldı. 1.gruba (n:10) sadece 500 mg/kg intraperitoneal demir dekstran, 2.gruba ise (n:10) 500 mg/kg demir dekstran + 100 mg/kg melatonin intraperitoneal verildi. 3.gruba ise (n:10) 2cc serum fizyolojik enjekte edilerek kontrol grubuna ayrıldı. Eritrositlerde antioksidan enzimler olan Süperoksit Dismutaz (SOD), Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) ve Katalaz (CAT) enzim aktivite ile lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan Malondialdehit (MDA) düzeyleri tayin edildi.

Demir dekstran verilen grupta kontrol grubuna göre eritrosit SOD, GSH-Px, CAT aktivitelerinin düştüğü ve MDA düzeyinin ise arttığı tespit edildi (p<0.05). Demir dekstran + melatonin verilen grupta ise yalnız demir verilen gruba göre eritrosit SOD, GSH-Px, CAT aktivitelerinin arttığı ve MDA düzeyinin ise azaldığı tespit edildi (p<0.05). Bulgularımız ışığında eritrositlerde demire bağlı olarak ortaya çıkan toksik oksidatif etkilerin melatoninin uygulaması ile önlenilebileceği söylenebilir. Bu çalışma klinik olarak demir kullanan hekimler için faydalı olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Melatonin, Demir yüklemesi, Oksidatif hasar

T Klin Tıp Bilimleri 2000, 20:143-148

Geliş Tarihi: 19.10.1999

Yazışma Adresi: Dr.Ahmet KOYU
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi Fizyoloji AD
32040, ISPARTA

[¶]Bu makale, 25.Ulusal Fizyoloji Kongresinde (6-10 Eylül 1999 Elazığ) bildiri olarak sunulmuştur.

Bu araştırma S.Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 56 proje numarası ile desteklenmiştir.

Summary

Melatonin is an antioxidant hormone and acts to stabilize cell membranes, thereby making them more resistant to oxidative attack. Iron (Fe) causes to free radical damage because it plays important role in different oxidative steps under physiological conditions in the body. Iron ions seem to have a major role in initiation and promotion reactions of intracellular lipid peroxidation. The aim of this study was to investigate whether melatonin has protective effect on the oxidative changes induced by Fe treatment in erythrocytes. Thirty New-Zealand male, five months old rabbits weighing 600-800 g were used in this study. The animals were divided into three groups. First group (n:10) was given 500 mg/kg iron-dextran with intraperitoneal injection. Second group was given 500 mg/kg iron-dextran + 100 mg/kg melatonin. Third group was left as controls. Control animals were injected with saline solution. The activities of erythrocyte antioxidant enzymes; Superoxide Dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GSH-Px), Catalase (CAT) and Malondialdehyde (MDA) levels, an indicator of lipid peroxidation, were determined. Erythrocyte SOD, GSH-Px and CAT activities were decreased and MDA levels were increased in iron-dextran treated animals as compared to control group (p<0.05). The activities of three antioxidant enzymes were increased and MDA levels were decreased in iron-dextran and melatonin treated group compared to first group (p<0.05).

Our data indicate that lipid peroxidation occurs after iron overload in the blood. And also, in the light of our findings; melatonin administration can prevent these oxidative toxic effects induced by iron-dependent free radical damage in erythrocytes. This study may be useful for physicians who use iron management in their clinical practice.

Key Words: Melatonin, Iron overload, Oxidative damage

T Klin J Med Sci 2000, 20:143-148

Günümüzde yaşlılık dahil olmak üzere, ateroskleroz, diabet, akciğer hastalıkları ve nörodegeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın temelinde serbest radikal hasarı yatmaktadır. Demir serbest radikal oluşturan ajanlardan biridir. Bu nedenle, demir eksikliği bulunmayan bazı hastalara, yanlış bir uygulama olarak, özellikle de parenteral yolla verilen fazla miktardaki demirin, bazı hastalarda demir yüklenmesine neden olabileceğinden, çalışmamızda demir yüklenmesiyle oluşturulan hasar üzerinde durduk. Serbest radikallerin üretimi oksidatif stres ve başlıca demir gibi metal iyonlarının varlığında artmaktadır. Organizmada, oksidan ve antioksidan yapılar arasında bir denge vardır. Hücrelerin sağlıklı bir şekilde fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri, oksidan ve antioksidan moleküller arasındaki dengeye bağlıdır (1,2).

Serbest radikaller hücrede lipit, protein, DNA ve karbonhidrat gibi önemli hüresel yapı ve bileşiklere etkilidir. Membranı oluşturan fosfolipidler, glikolipidler, gliseridler gibi doymamış yağ asitleri ve membran proteinleri serbest radikaller için oldukça çekici makromoleküllerdir (2,3). Biyomoleküllerin tümü serbest radikallerin etki alanında olsalar da lipidler bu riske en duyarlı yapılardır (1). Serbest radikaller başlıca moleküler oksijenin normal metabolizma basamaklarında indirgenmesi ile açığa çıkmaktadır (4). Reaktif oksijen türü insan vücudunda sürekli oluşur. Bunların çoğu yararlı fizyolojik görevleri yerine getirir. Fakat aşırı miktarlarda veya uygunsuz koşullarda oluşumu ile toksik olabilirler. Bu toksisite demir veya bakır gibi geçiş metallerinin varlığında artar (5,6).

Melatonin hormonu güçlü bir serbest radikal toplayıcısıdır. Melatonin özellikle organizmada yapılan ve son derece tahrip edici olduğu düşünülen hidroksil radikalının (.OH) dokulardaki olumsuz etkilerini engellemektedir (7). Pineal bezden melatonin üretimi yaşlanmayla birlikte belirgin olarak azalmaktadır (8). Melatonin oldukça lipofilik bir hormon olduğundan bütün membranları kolayca geçebilmektedir. Böylece kan melatonin konsantrasyonundaki azalma hızla hücre içine de yansımakta ve melatoninin hücre içi düzeyi düşmektedir (7,9). Hücrede melatonin özellikle çekirdekte toplandığından, pineal bezin melatonin üretiminin

azalmasından en fazla çekirdek etkilenmektedir (9). Melatoninin doğrudan hidroksil radikali toplama yeteneğinin yanı sıra, önemli bir antioksidan enzim olan nöral Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) enziminin düzeyini arttırma yeteneği de vardır. Böylece melatonin doğrudan serbest radikalleri toplayarak oksidatif yıkımı önlemekle kalmayıp, aynı zamanda indirekt yoldan diğer oksidatif işlemleri de uyarır (7,9).

Materyel ve Metod

Çalışmada Yeni Zelanda türü ağırlıkları 600-800 g arasında değişen beş aylık 30 erkek tavşan kullanıldı. Deney hayvanları kafeslerde beslendi. Oda ısısı 25°C'de tutuldu 5 günlük adaptasyon dönemini takiben çalışmaya alındı. Tavşanlar çalışma boyunca 12 saat aydınlık 12 saat karanlık sıklıta tutuldu. Deney hayvanları 3 gruba ayrıldı. 1.gruptaki (n:10) hayvanlara sadece 500 mg/kg intraperitoneal (i.p) yolla demir dekstran verildi. 2.gruptaki hayvanlara (n:10) 500 mg/kg demir dekstran + 100 mg/kg melatonin i.p yolla verildi. 3.grup ise (n:10) ise kontrol grubu olarak ayrıldı ve bu gruba 2 cc serum fizyolojik enjekte edildi. Tüm enjeksiyonlar melatonin salınımının pik yaptığı karanlık peryotta (saat:22⁰⁰'de) gerçekleştirildi. Hayvanların dekapitasyonu, karanlık periyodun bitiminde (saat: 06⁰⁰'da) gerçekleştirildi. Alınan kan örnekleri, 2 cc'lik orijinal K3-EDTA'lı CBC tüplerine kondu. Kan numuneleri hiç bekletilmeden +4°C'de 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Hücre paketinde üstteki lökosit tabakası, eritrosit tabakasından ayrılarak, saf eritrositler elde edildi. Daha sonra, +4°C'lik %0.9'luk NaCl ile üç kez yıkanarak plazma artıkları uzaklaştırıldı. Yıkanan eritrositlerden hazırlanan hemolizat, +4°C de 500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek hücre partikülleri çöktürüldü. Süpernatandan uygun dilüsyonlar enzim analizinde kullanıldı.

Süperoksit Dismutaz (SOD) ve GSH-Px enzim aktiviteleri tayininde ticari kit kullanıldı (Randox Laboratories, UK). SOD metodunda 505 nm'de ksantin oksidazın katalizlediği reaksiyonla ksantinden ürik asit ve süperoksit radikali oluşur. Oluşan süperoksit radikali kırmızı renkli formazon bileşiği oluşturmak üzere 2(4-iodophenyl) - 3 - (4 - nitrophenol) - 5 - phenyltetrazolium chloride (INT) ile reaksiyona girer. Eritrosit SOD enzim aktivitesi,

Tablo 1. Grupların ortalama eritrosit SOD, GSH-PX, CAT ve kan MDA değerleri ve standart sapmaları

	Kontrol (grup 3; n=10)	Demir Dekstran (grup 1; n=10)	Melatonin+Demir Dekstran (grup 2; n=10)
Eritrosit SOD (U/g Hb)	2549 ±504	1604±345*	2075±425*
Eritrosit GSH-PX (U/g Hb)	159±42	107.5±28*	126.9±34*
Eritrosit CAT (U/g Hb)	2.48±0.64	1.54±0.39*	1.95±0.56*
Kan MDA (nmol/ml)	50.12±12.17	78.10±19.97*	64.48±16.01*

*: $p < 0.05$

bu reaksiyonun inhibisyon derecesiyle ölçüldü. U/ml olarak bulunan enzim aktiviteleri U/gHb cinsinden hesaplandı.

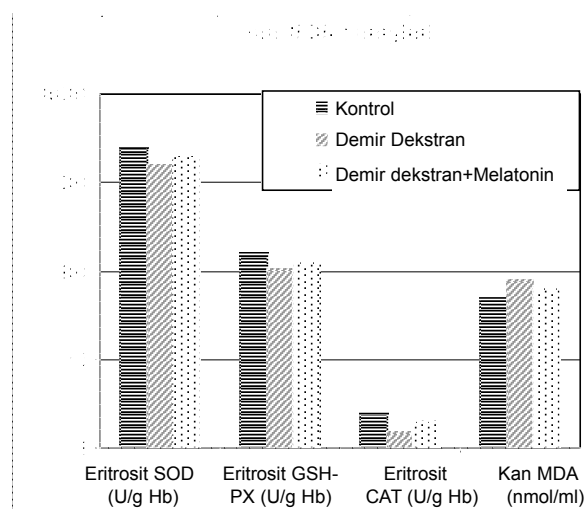
GSH-Px metodunda okside glutatyon NADPH varlığında glutatyon reduktaz tarafından indirgenir. Bu esnada NADPH NADP⁺'ye oksitlenir (10). Redakte NADPH'nin azalmasına bağlı olarak 340 nm'de meydana gelen absorbans değişimi spektrofotometrik olarak ölçülerek enzim aktivitesi tespit edilir. U/L cinsinden bulunan enzim aktivitesi U/gHb cinsinden hesaplandı.

Eritrosit katalaz (CAT) aktivitesi Aebi'nin spektrofotometrik yöntemi ile ölçüldü (11). Katalaz H₂O₂'yi H₂O'ye indirger. Metodun prensibi 240 nm'de H₂O₂'nin azalmasının takip edilmesine dayanır.

Kan Malondialdehit (MDA) düzeyleri, Valuenzuella (12)'nin tanımladığı spektrofotometrik yöntemle tayin edildi. Metodun prensibi TBA-MDA kompleksinin oluşturduğu renkli kompleksin 532 nm'de absorbansının ölçülmesi temeline dayanır.

Eritrositler ve serum için maksimal absorbans veren 532 nm dalga boyundaki MDA-TBA ekstinsiyon katsayısından ($1.56 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) yararlanılarak kan MDA seviyesi nmol/ml olarak ifade edildi.

Bulguların istatistiksel değerlendirilmeleri, bilgisayarda SPSS paket programında, anlamlılık sınırı 0.05 alınarak yapıldı. Bütün parametrelerin aritmetik ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. Karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testleri kullanıldı.

**Şekil 1.** Grupların eritrosit SOD, GSH-Px, CAT ve kan MDA düzeyleri.

Bulgular

Üç Farklı gruba ait SOD, GSH-Px, CAT aktiviteleri ve MDA düzeyinin ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 1'de gösterilmiştir. Demir dekstran verilen grupta kontrol grubuna göre eritrosit SOD, GSH-Px, CAT aktivitelerinin düştüğü ve MDA düzeyinin ise arttığı tespit edildi (Şekil 1, $p < 0.05$). Demir dekstran + melatonin verilen grupta ise yalnız demir dekstran verilen gruba göre eritrosit SOD, GSH-Px, CAT aktivitelerinin arttığı ve MDA düzeyinin ise azaldığı tespit edildi (Şekil 1, $p < 0.05$).

Tartışma

Metal iyonları lipid peroksidasyonunu arttıran maddelerdir. Geçiş metalleri, özellikle demir, fiz-

yolojik şartlarda çeşitli oksidasyon basamaklarında bulunur ve serbest radikallere bağlı doku hasarlarını hızlandırır (1,13,14).

Rachidi ve ark.(15) yaptıkları bir çalışmada; demir şelatörlerinin hem eritrosit membranında, hem de doku hemojenatlarında, lipid peroksidasyonunu engellediğini göstermişlerdir. Bacon ve ark. (16) akut demir uygulamasının lipid peroksidasyonunu arttırdığını bildirmekle beraber, düşük dozlarda (30 mg/kg) uyguladıkları demir dekstranın serbest radikal hasarının oluşturmadığını tesbit etmişlerdir. Galleno ve ark.(17) 500 mg/kg demir dekstranın tek doz uygulanmasını takiben, 20 saat sonra karaciğer hemojenatlarında CAT, SOD ve GSH-Px seviyelerinin sırasıyla %25, %36 ve %32 oranlarında düşme gösterdiğini vurgulamaktadırlar.

Ferrali ve ark.(18) sıçan eritrositlerinin akralin, fenilhidrazin gibi oksidan ajanlarla inkübe edildiğinde, eritrositlerde lipid peroksidasyonunun arttığını tespit etmişlerdir. Bu araştırma sonucunda, lipid peroksidasyonundaki artışın oksidan ajanların etkisiyle eritrositlerden salınımı artan serbest demire bağlı olduğunu vurgulamışlardır. Aynı ortamda demiri bağlayıcı bir madde olan flavonoid ilave edildiğinde, eritrositlerdeki lipid peroksidasyonunun belirgin derecede azaldığını tespit etmişlerdir.

Galleno ve ark.(19) sıçanlara 500 mg/kg intraperitoneal demir dekstran uygulamasından 20 saat sonra, plazma demir içeriğinin 12 kat arttığını tespit etmişler ve demir yüklemesi yapılan hayvanlarda, eritrositlerde lipid peroksidasyon ürünlerini, belirgin derecede yüksek bulmuşlardır. Zaidi ve ark.(20) gerek zaman ve gerek doza bağımlı olarak, demir uygulamalarında eritrosit membranı Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP'az aktivitesinin baskılandığını, buna bağlı olarak da oksidatif hasarın arttığını tespit etmişlerdir. Reiter ve ark.(7) nokturnal melatonin yüklenmesinin hemen akabinde, kardiyak ATP'az aktivitesinin en yüksek seviyede olduğunu, in vivo olarak göstermişlerdir.

Paplos ve arkadaşları (21) kalp, beyin, akciğer, böbrek dokuları ve eritrositler üzerinde yaptıkları çalışmalarda, demirin melatonin düzeyini düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Melatonin güçlü bir

serbest radikal toplayıcısıdır. Özellikle organizmada yapılan ve son derece tahrip edici olduğu düşünülen hidroksil radikali ($\cdot OH$)'ni toplar. Dolayısıyla, melatonin düzeyindeki azalma, oksidan strese savunma cevabında da bir azalma kaçınılmaz olacaktır. Bu yüzden oldukça toksik bir madde olan OH radikallerinin dokulardaki olumsuz etkileri karşımıza çıkacaktır. Çalışmamızda, 500mg/kg demir uygulamasından 8 saat sonra eritrositlerde bir oksidatif hasarın meydana geldiği artan MDA düzeyleri ile ve azalan antioksidan enzim (SOD, GSH-Px, CAT) aktiviteleri ile görülmektedir. Bu sonuç demirin direkt etkisinin yanında Pablos ve arkadaşlarının sonuçlarında belirttikleri üzere azalan melatonin düzeylerinin bir sonucu olabilir.

Melatoninin doğrudan hidroksil radikali toplama yeteneğinin yanında, melatonin önemli bir antioksidan enzim olan nöral GSH-Px'ı artırma yeteneği de vardır (22). Bu durumda eksojen melatonin uygulamasının bir diğer amacı da bu enzimin aktivitesinde artışa neden olmak ve böylece antioksidan savunmayı güçlendirmek olabilir. Bizim çalışmamızda demir verilen hayvanlarda melatonin uygulaması ile hem MDA hem de SOD, GSH-Px, CAT aktivitelerindeki ortaya çıkan artış bu araştırmacıların verileri ile uyumlu görülmektedir.

Kabuto ve ark (23) sıçanlara intrakortikal demir uygulayarak tekrarlayan epileptik nöbetler oluşturmuşlar, bu nöbetleri önlemede melatoninin etkinliğini araştırmışlardır. Nöbet oluşumundan, demir uygulamasıyla oluşan serbest radikal nöral lipid peroksidasyonuna yol açmışlardır. Önceden melatonin uyguladıkları deney gruplarında, demir uygulaması ile oluşan lipid peroksidasyonunun azaldığını ve dolayısı ile epileptik nöbetlerin azaldığını tespit etmişlerdir.

Tang ve ark.(24) sıçanlarda beyin dokusunda demirle oluşturulan lipid peroksidasyonunu önlemek için melatoninin etkinliğini araştırmışlardır. Bu çalışmada, sıçanlarda beyin hücre membranlarını 3 saat boyunca bir grubu demir, diğer bir grubu demir + melatonin inkübasyonuna tabi tutmuşlardır. Sadece demir uygulanan hayvanların nöronlarında, oksidatif hasarın daha fazla görüldüğünü, demirle birlikte melatonin uygulanan hayvanlarda ise, MDA miktarlarındaki azalma ile

paralel olarak oksidatif hasarın azaldığı sonucuna varmışlardır. Bu veriler de bizim bulgularımızla uyumludur.

Siu ve ark.(25) Fe²⁺ ile inkübe edilmiş sıçan retina hemojenatlarında meydana gelen lipid peroksidasyonunu önlemede E vitamini ve melatoninin etkisini karşılaştırmışlar ve melatoninin 7 kat daha etkili olduğunu göstermişlerdir.

Ko ve ark.(26) ferrik demir iyonu ile eritrosit membranı lipidlerinde oluşan oksidatif hasarı, tıpkı desferoksamin gibi, demirle şelasyon yapan bir madde olan trolox ilavesiyle önlemişlerdir.

Melchiorri ve ark.(27) sıçanlarda parquatla oluşturulan oksidatif hasarı önlemede melatoninin antioksidan etkisini araştırmışlardır. Parquatın 70 mg/kg dozunun karaciğerde lipid peroksidasyonunu kontrol grubuna göre %40 arttığını, ancak parquat'tan önce 10 mg/kg i.p melatonin uygulandığında, lipid peroksidasyonundaki bu artışın tamamen ortadan kalktığını rapor etmişlerdir.

Bu çalışma verileri ve literatür ışığında demirin serbest radikallere bağlı doku hasarlarına neden olduğu ortadadır. Bu hasarın miktarı dozla doğrudan bağlıdır. Ancak bununla beraber demir gibi oksidan strese neden olabilen maddelerin gereksiz olarak kullanılmaması, özellikle parenteral yolla yüksek dozlarda kullanımında daha dikkatli olunması gerekmektedir. Yapılacak daha ileri çalışmalar sonrasında, belki de melatonin gibi güçlü antioksidanların, parenteral demir tedavilerine ilave edilmesi gündeme gelebilecektir.

KAYNAKLAR

1. Auroma OI. Characterization of drug as antioksidant prophylactics. *Free Radical Biology and Medicine* 1996; 20:675-705.
2. Codogan JIG. Principles of free radical chemistry. London, The chemical society, 1973: 230-70.
3. Cheeseman KH, Slaterç TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49 (3): 479-83.
4. Pal Yu B. Cellular defenses against damage from reactive species. *Physiology Reviews* 1994; 74(1):139-62.
5. Criolo MR, Fışkın K, Martino AD, Corasaniti MT. Age-related changes in Cu, Zn, superoxide dismutase, Se-dependent and independent glutathione peroxidase and catalase activities in specific areas of rat brain. *Mech Ageing Dev* 1991; 61: 287-97.
6. Slater TF. Free radicals in medicine. *Free Radic Res Commun* 1989; 7: 119-30.
7. Reiter RJ. Pineal function during aging; attenuation of the melatonin rhythm and its neurobiological consequences. *Acta Neurobiol Exp* 1994; 54: 31-9.
8. Pierpaoli W, Regelson W. Pineal control of aging, effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91:787-91.
9. Reiter RJ. Comparative physiology: Pineal gland. *Annu Rev Physiol* 1973; 35: 305-28.
10. Paglia PE, Valentine WN. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70(1): 158-9.
11. Aebi H. Catalase in vitro. *Enzimol* 1984; 105: 121-6.
12. Valenzuela A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci* 1990; 48: 301-9.
13. Akkuş I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Yayınları, 1995: 5, 38, 543, 975.
14. Britton RS, Ram AG, Olynyle J. Pathophysiology of iron toxicity. *Iron Research* 1994; 239-53.
15. Rachidi S, Coundray C, Baret P, Gelon G. Inhibition of lipid peroxidation by a new family of iron chelators. *Biol Trace Elem Res* 1994; 41(1): 277-87.
16. Bacon Br, Britton SR. The pathology of hepatic iron overload: A free radical. Mediated process. *Hepatology* 1990; 11(1): 127-34.
17. Galleno M, Puntarulo S. Effect of mild iron overload on liver and kidney lipid peroxidation. *Brazilian J Med Biol Res* 1994; 27: 2349-58.
18. Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett* 1997; 416(2): 123-9.
19. Galleano M, Puntarulo S. Role of antioxidant on the erythrocyte resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1271(3):321-6.
20. Zaidi A, Marden MC, Poyart C, Leclerc L. Protection by Lazoroids of erythrocyte (Ca²⁺, Mg²⁺)-ATPase against iron induced inhibition. *Eur J Pharmacol* 1995; 290(2): 133-9.
21. Paplos MI, Agapito MT, Menendez-Pelaez A, Acuna-Castroviejo D, Reiter RJ, Recio JM. Iron decreases the nuclear but not the cytosolic content of the neurohormone melatonin in the several tissues in chicks. *J Cell Biochem* 1996; 60 (3):317-21.
22. Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Poeggeler B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 1995; 26(5):497-502.
23. Kabuto H, Yoko I, Ogawa N. Melatonin inhibits iron-induced epileptic discharge in rats by suppressing peroxidation. *Epilepsia* 1998; 39 (3): 237-43.

24. Tang PL, Xu MF, Qian ZM. Differential behaviour of cell membranes towards iron-induced oxidative damage and the effect of melatonin. *Biol Signals* 1997; 6(4-6): 291-300.

25. Siu AW, Reiter RJ, To CH. The efficacy of vitamin E and melatonin as antioxidation in rat retinal homogenates. *J Pineal Res* 1998; 24(4):239-44

26. Ko KM, Yick PK, Poon MK. Peroxidant and antioxidant effect of trolox on ferric ion induced oxidation of erythrocyte membrane lipids. *Mol Cell Biochem* 1994;141(1): 65-70

27. Melchiorri D, Reiter RJ, Attia AM. Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat- induced oxidative damage in rats. *Life Sci* 1994; 56(2): 83-9.