

Efectele hepatoprotectoare ale *Melatoninei* și *Tinospora cordifolia* administrate *per os* în icterul colestatic indus experimental

M.H. Stanca¹, A. Nagy², M. Toşa³, L. Vlad¹

¹Departamentul Chirurgie, Clinica Chirurgie 3, Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, România

²Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca, România

³Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babes Bolyai Cluj-Napoca, România

Rezumat

Colestaza extrahepatică este caracterizată de declanșarea unui stres oxidativ intens, soldat cu importante alterări morfo-funcționale celulare. Acest studiu experimental are ca scop evaluarea efectului hepatoprotector al *Melatoninei* și al extractului de *Tinospora cordifolia* în icterul colestatic indus prin ligatura coledocului la șobolan. Am ales să administrăm cele două substanțe *per os*, pentru a compara rezultatele cu cele existente în restul experimentelor publicate, în care administrarea s-a făcut sub formă injectabilă. Analiza datelor obținute în urma evaluării probelor histopatologice, a măsurătorilor cantitative biochimice și de produși de stres oxidativ au indicat un efect hepatoprotector intens al celor doi compuși. Rezultatele obținute recomandă utilizarea *Melatoninei* și a *Tinospora cordifolia* pentru combaterea stresului oxidativ în colestaza extrahepatică la om.

Cuvinte cheie: icter colestatic, stres oxidativ, *Melatonină*, *Tinospora cordifolia*, oxid nitric

Abstract

Hepatoprotective effects of per os administrated melatonin and tinospora cordifolia in experimental induced jaundice

Posthepatic cholestasis is figured by the onset of an intense oxidative stress, followed by important celular morphological and functional abnormalities. The aim of this experimental study is to assess the hepatoprotective effects of *Melatonin* and extract of *Tinospora cordifolia* in bile duct ligation induced jaundice in rats. We choosed to administrate both pharmacological products *per os*, in order to compare the results with those already published, in which melatonin was administrated injectable. The assessment of microscopy, lab tests and the measurement of oxidative stress products indicates a marked hepatoprotective effect of those two compounds. The results allowed us to recomand the use of melatonin and *Tinospora cordifolia* to reduce the cholestasis's oxidative stress in human.

Key words: jaundice, oxidative stress, *Melatonin*, *Tinospora cordifolia*, nitric oxide

Correspondență: Marius Horațiu Stanca
Departamentul Chirurgie, Clinica Chirurgie 3
Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu
Hațieganu" Cluj-Napoca, România
E-mail: mariustanca@yahoo.com
horatiu.stanca@umfcluj.ro

Introducere

Colestaza extrahepatică este consecința unui proces obstructiv sau compresiv pe căile biliare intra și extrahepatice. Ocluzia completă a arborelui biliar duce la acumularea produșilor biliari în hepatocite, care vor induce exacerbarea unui stres oxidativ, responsabil de alterarea funcțiilor și structurii celulare

(1). La bolnavul icteric, până la aplicarea unei metode de drenaj biliar, se încearcă protejarea hepatocitului prin diverse metode farmacologice. În practică protejarea celulei hepatice se face, în general, prin administrarea intravenos sau intramuscular a derivaților corticosteroizi (fosfat sodic de dexametasonă) și a preparatelor creditate cu efecte hepatoprotectoare (aspartofort). Studii experimentale pe șobolani au demonstrat eficiența melatoninei în ceea ce privește reducerea marcată a stressului oxidativ în celula hepatică expusă acțiunii nocive a sărurilor biliare din colestază sau a altor substanțe hepatotoxice (1,2). De asemenea, se citează efecte similare ale unor extracte naturale de plante, cel mai frecvent în literatură fiind întâlnită *Tinospora cordifolia* (3,4). În lucrările consultate, administrarea melatoninei s-a efectuat pe cale injectabilă, sub formă de soluție slab alcoolică (0,26%) (1). Scopul studiului nostru este de a evalua efectele antioxidante ale *Melatoninei* și preparatelor de *Tinospora cordifolia*, administrate per os la șobolani cu colestază extrahepatică indusă prin ligatura coledocului.

Material și Metodă

S-au folosit două loturi de șobolani albi adulți din rasa Wistar, având greutatea de 200 grame, ținuti în condiții de vivarium, la care s-a practicat ligatura canalului coledoc LC.

Ligatura coledocului: fiecare șobolan a fost anesteziat cu un amestec de soluție de Ketamină 10% (vetased) și xylazină bio 10% 0,3 ml amestec/200 g animal, injectat intramuscular. Pe abord median, se identifică și se ligaturează coledocul distal cu un fir nerezorabil de mătase, mărimea 4-0. Postoperator animalele au fost cazate în camera de carantină a biobazei. Primul lot de șobolani a fost considerat lotul de urmărire a efectelor colestazei. Astfel, fiecare individ a primit hrană și apă în condiții standard. S-a recoltat sânge înainte de ligatura de coledoc și apoi la 1-2-3-4 săptămâni, dozându-se bilirubina totală și directă (Bb), fosfataza alcalină (FA), transaminazele (ASAT, ALAT). După recoltare s-au sacrificat câte 2 indivizi, în anestezie similară celei de la operație, urmată de luxația-fractură occipito-cervicală. S-au evaluat modificările macroscopice hepato-coledociene și s-a recoltat ficatul și ductul coledoc pentru analiza morfopatologică. S-au realizat lame cu colorație hematoxilin-eozină, tricrom Masson și roșu de Siria. S-a analizat evoluția probelor biologice și a modificărilor relevate de către microscopia optică, apoi s-au făcut corelații corelații ale datelor recoltate.

Al doilea lot de șobolani cu LC, destinat studiului comparativ, a fost divizat în trei grupe. Prima grupă a constituit-o sublotul martor, care a primit hrană și apă în condiții standard și a fost notată ca grupa L (ligatură). A doua grupă a primit hrană standard iar aportul lichidian a fost reprezentat de o soluție apoasă de *Melatonină*, fiind notată ca grupa M (melatonină). Doza de *Melatonină* calculată a fost de 1 mg/kgc/zi. A treia grupă a primit hrană standard, iar lichidele au fost asigurate prin infuzie de *Tinospora cordifolia*, obținut din preparatul comercial Guduchi și a fost notată ca grupa T (*Tinospora*). Recoltările de sânge și țesut hepatic s-au făcut

înainte de ligatură și apoi la 1 și 2 săptămâni, apoi s-au realizat studiile biochimice și de microscopie optică. La fiecare sacrificare, șobolanilor li s-au recoltat fragmente de ficat pentru determinarea produșilor de stress oxidativ. Aceasta s-a efectuat prin determinarea cantității de azotit NO₂ prin spectrofotometrie, exprimarea rezultatelor făcându-se prin cantitate de NO₂/gram de țesut hepatic. Probele congelate la -80°C au fost suspendate în 10 ml apă demineralizată și apoi omogenizate timp de 3 minute cu sonda de ultrasunete, astfel încât să nu se depășească 40°C în probă. Reziduul solid s-a îndepărtat prin centrifugare în 2 etape, la -4°C: 30 min la 15000 rotații/minut apoi 30 min la 20000 rotații/minut. S-au obținut soluții colorate, care au fost analizate. S-a determinat curba de calibrare din soluție stoc de NaNO₂ 1 mM în apă demineralizată, apoi diluții succesive cu apă demineralizată până la concentrații în domeniul 1-100 μM, determinarea absorbanței la 550 nm față de reactivul Griess în cuve de 3 ml în care se pun câte 300 μL soluție de analizat, 100 μL reactiv Griess și 2600 μL apă demineralizată (blank-ul cu 100 μL reactiv Griess și 2900 μL apă), folosind un aparat UV-VIS Agilent 8453, la cca 24 °C. Deproteinizarea homogenatelor s-a făcut cu reactiv Somogyi. Experimentul a fost aprobat de către Comisia de Etică a UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca.

Rezultate

Lotul de urmărire

Evoluția postligatură a fost bună, șobolanii și-au reluat consumul de apă din ziua intervenției și cel de alimente a doua zi. La necropsii s-a observat creșterea dramatică a diametrului coledocului deasupra ligaturii, dimensiunile interne ale acestuia evoluând de la 0,2-0,5 mm preoperator, până la 5-7 mm în săptămâna a treia, ulterior scăzând puțin. Ficatul și-a păstrat aspectul, nu s-au evidențiat modificările colestatice similare ficatului uman. Microscopia optică descrie cronologic evoluția histologică, caracterizată în primul rând de reacția ductală, adică proliferarea masivă a celulelor epiteliale biliare (colangiocite), cu creșterea numărului de canalicule biliare, funcționale și nefuncționale; piecemeal necrosis și instalarea la nivelul spațiilor Kiernan a unui infiltrat inflamator dominat de polimorfonucleare și limfocite. Modificările apar din prima săptămână postligatură, sunt maxime la 2 și 3 săptămâni, apoi la 4 săptămâni săptămâni am constatat o diminuare a reacției ductale, apărând în schimb o proliferare de celule mezenchimale la nivel periportal (tranziție epitelial-mezenchimală?), consecutiv apărând expansiuni fibroase la nivelul spațiilor porto-biliare. Țesutul hepatic apare rarefiat, în anumite zone hepatocitele suferă distrofie sub acțiunea toxică a bilei – "Feathery degeneration". Infiltratul inflamator de la nivelul spațiilor porto-biliare este mai puțin abundent (Fig. 1). Evaluarea valorilor Bb, FA, ASAT, ALAT a indicat un model în care se produce o creștere accentuată a acestora, cu un maxim la 2 săptămâni de la ligatură, urmată de scăderea valorilor biochimice spre valorile bazale la 4 săptămâni (Fig. 2, Fig. 3).

Figura 1. Spațiu porto-biliar cu reacție ductală și infiltrat inflamator la 1 (A), 2 (B) și 3 (C) săptămâni de la ligatură. Feathery degeneration la 4 săptămâni (D). HE x200

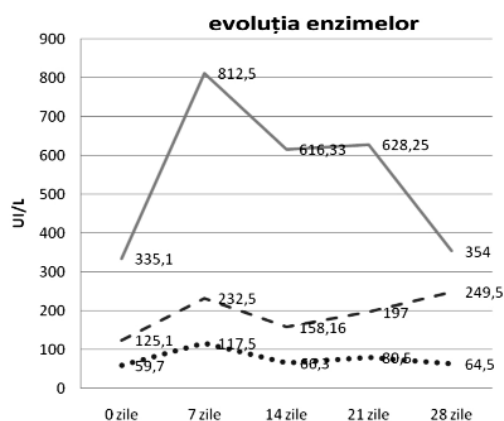
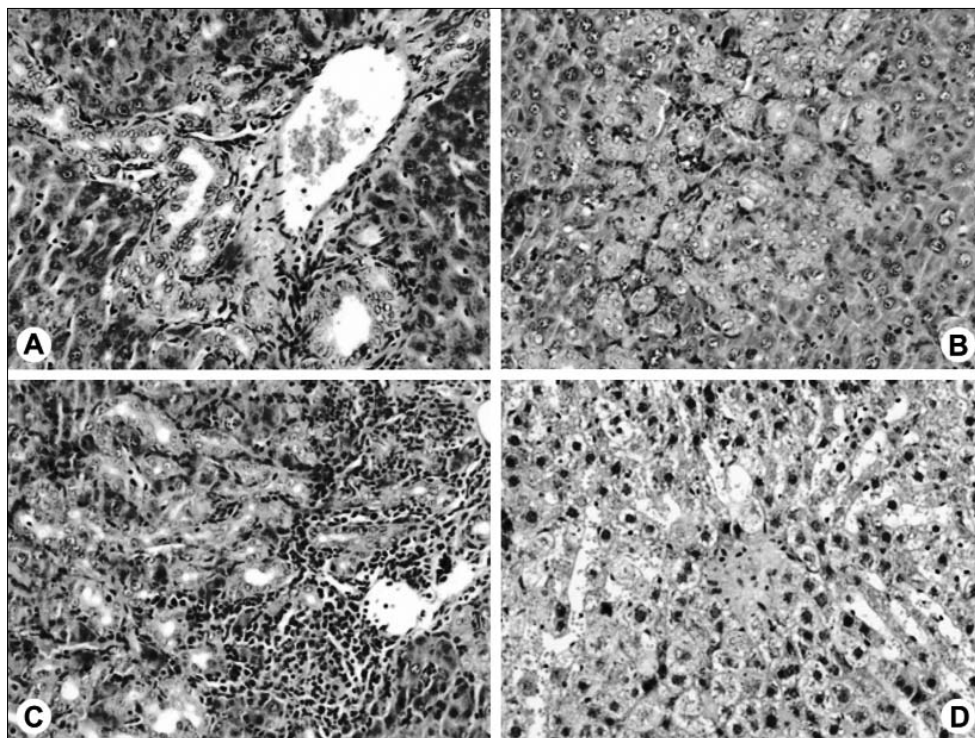


Figura 2. Modelul de evoluție al ASAT, ALAT, FA la șobolanii cu ligatură experimentală de coledoc (cifrele reprezintă valoarea medie în lot la momentul determinării)

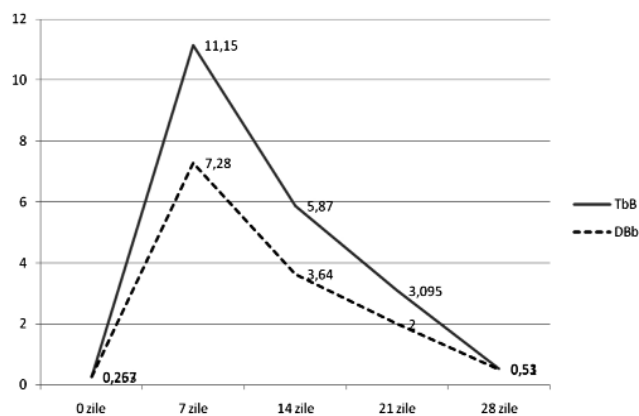


Figura 3. Modelul de evoluție al BbT și BbD FA la șobolanii cu ligatură experimentală de coledoc (cifrele reprezintă valoarea medie în lot la momentul determinării)

Lotul de studiu comparativ

Modificările histopatologice ale șobolanilor tratați cu Melatonină constau într-o reacție ductală marcată, dar mai redusă decât la grupa L și o reducere a gradului inflamației (Fig. 4). Se observă necroză de tip piecemeal moderată. La acest lot nu au fost observate leziuni de fibroză hepatică. Grupa de șobolani tratați cu infuzie de tinospora cordifolia prezintă o proliferare anarhică de celule epiteliale biliare, cu creșterea numărului de canalicule. La nivelul parenchimului am întâlnit rare focare de necroză de coagulare însoțite de infiltrat inflamator cu marofage și

neutrofile. Necroza de tip piecemeal a avut o intensitate ușoară. La nivelul spațiilor porto-biliare pe lângă creșterea numărului de canalicule se constată prezența unui infiltrat inflamator dominat de mononucleare. Măsurarea enzimelor hepatice a relevat evoluții diferite a grupelor M și T comparativ cu grupa martor L. În cazul grupei L se constată evoluția similară lotului de urmărire cercetat anterior. Enzimele grupelor M și T cresc la valori apropiate celor din grupa L la 1 săptămână, apoi descresc marcat, valorile bilirubinei ajungând la nivel bazal după numai 2 săptămâni de la ligatură (Fig. 5, 6). Modul de manifestare a probelor biologice în cadrul indivizilor tratați cu melatonină și

Figura 4. Spațiu porto-biliar cu reacție ductală și infiltrat inflamator la ficatul tratat cu melatonină (A la 1 săptămână, B la 2 săptămâni) și tinospora cordifolia (C la 1 săptămână, D la 2 săptămâni). HE x200

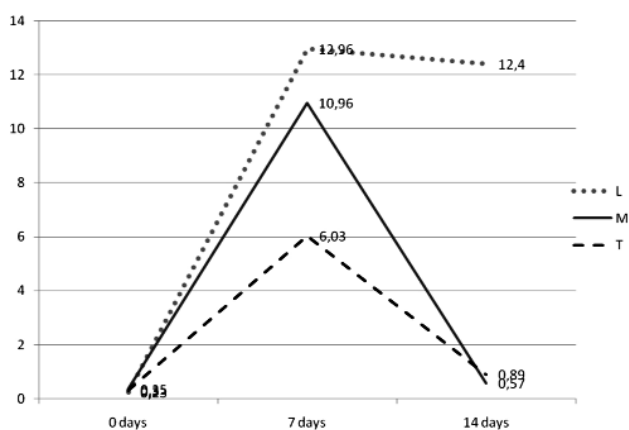
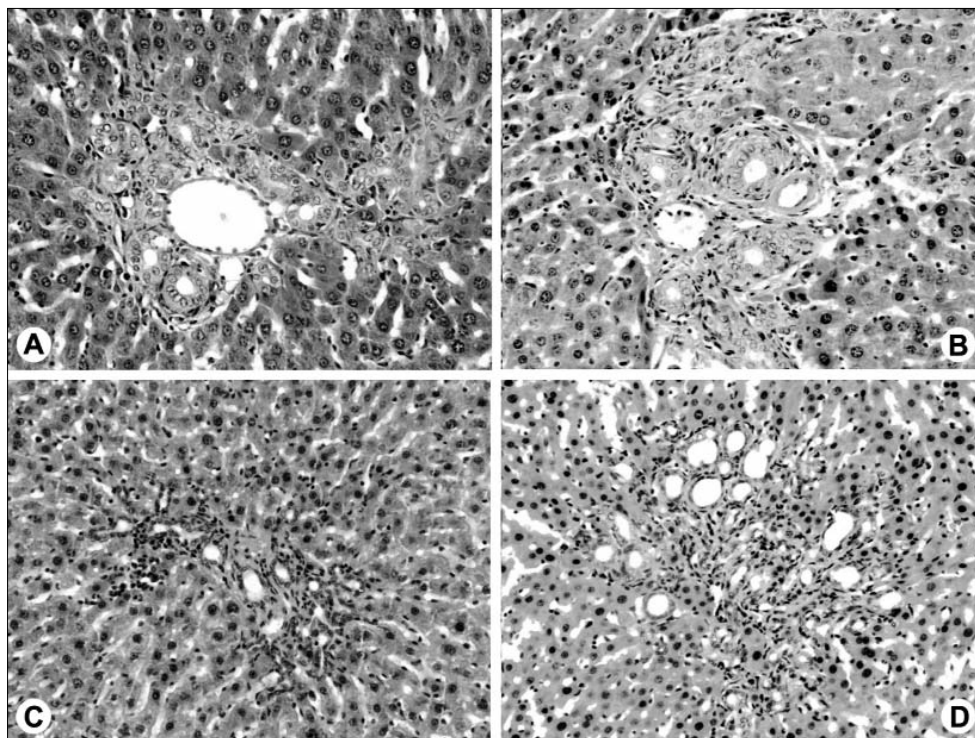


Figura 5. Evoluția comparativă a Bb în cadrul celor trei loturi (L - ligatură simplă, M - melatonină, T - tinospora) (cifrele reprezintă valoarea medie în lot la momentul determinării)

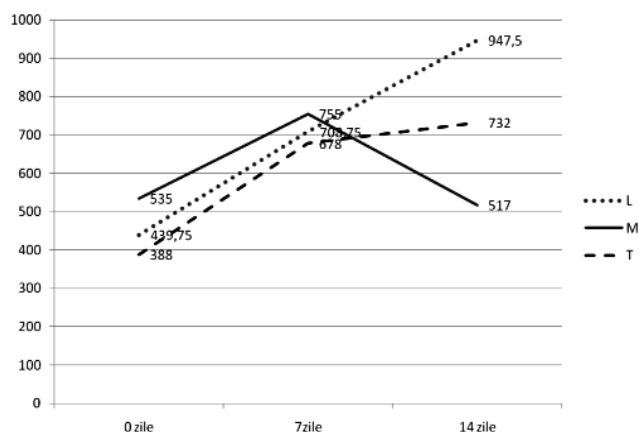


Figura 6. Evoluția comparativă a FA în cadrul celor trei loturi (L - ligatură simplă, M - melatonină, T - tinospora) (cifrele reprezintă valoarea medie în lot la momentul determinării)

tinospora cordifolia indică revenirea la nivelul bazal cu 2 săptămâni mai repede a valorilor enzimactice. Pentru studiul produșilor de stres oxidativ, după obținerea curbelor de calibrare, s-au făcut măsurători la 1 și 2 săptămâni, calculându-se cantitatea de NO₂ per gram de țesut și s-a raportat la martor, adică șobolanii din grupa L. Reprezentarea grafică a rezultatelor este intens sugestivă pentru diminuarea producției de NO în grupele tratate cu M și T (Fig. 7).

Discuții

Înteruperea fluxului biliar are repercusiuni la nivelul complexului sinusoido-hepatocito-canalicular, care se manifestă prin alterarea transportului vectorial prin celula hepatică, disiparea gradientului osmotice între spațiul sinusoidal și cel canalicular, refluxul produșilor biliari în sânge. Acizii biliari prezintă o toxicitate crescută asupra celulei hepatice, de aceea ei nu au un nivel maximal de transport, producția lor inhibându-se pe măsură ce se acumulează în celulă (5,6).

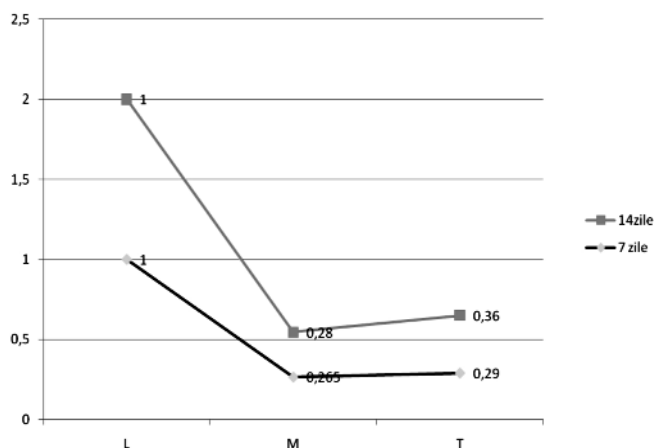


Figura 7. Producția de NO în ficatul de șobolan la 1 (A) și 2 (B) săptămâni după ligatura de coledoc, raportat la martor (cifrele reprezintă valoarea medie în lot la momentul determinării)

Prezența acestora declanșează procese complexe de stress oxidativ, responsabile în bună parte de alterările morfofuncționale. Modelul experimental al colestazei extrahepatice prin ligatura de coledoc la șobolan este cel mai întâlnit, datorită disponibilității și ușurinței de realizare (7). Scopul studiului nostru a fost acela de a creiona modificările apărute la nivelul parenchimului hepatic și al căilor biliare, precum și evaluarea unor metode de protecție hepatocitară. Din punct de vedere morfopatologic, modificările ce apar la nivelul căilor biliare extrahepatice și a parenchimului hepatic sunt asemănătoare celor descrise la om, dar diferă comportamentul enzimelor măsurate, care e similar modelului uman în primele două săptămâni, ca ulterior să fie complet diferit.

Proliferarea ductală este însoțită de inflamație și de fibroză, aspect cunoscut sub denumirea de "reacție ductală" și este o caracteristică a colestazei. Rolul reacției ductale nu este pe deplin elucidată. Ductele proliferate pot avea rol de bypass în drenajul bilei, în boli în care canaliculele biliare interlobulare sunt distruse, cum ar fi ciroza biliară primară. De asemenea, celulele epiteliale ductale reabsorb acizii biliari, protejând astfel hepatocitele de efectele nocive ale supraîncărcării cu acizi biliari (8). Reacția ductală și reacția inflamatoare consecutivă joacă un rol important în procesele de fibroplazie portală și periportală. Epiteliul ductal secretă o serie de substanțe biologice active, citokine și chemokine (TNF α , IL-6, IL-8, NO etc.) cu un potențial rol în reacția inflamatoare și fibrogeneză. Fibroplazia se datorează de asemenea și stimulării celulelor mezenchimale. Ductele biliare reactive exprimă factori de creștere (HGF, CTGF, TGF- β 2, PDGF) care activează celulele mezenchimale și producția de matrice extracelulară (8,9).

Urmărirea probelor biochimice hepatice au indicat un comportament interesant al acestora, curbele obținute demonstrează un vârf al acestora la 7 zile de la ligatură, cu o scădere ușoară la 14 zile, apoi cu o scădere mai accentuată, apropiindu-se de valorile inițiale după 21 de zile de icter colestatic, în ciuda persistenței ocluziei coledociene. Studii anterioare pe rozătoare au demonstrat existența unui mecanism adaptativ

la colestaza extrahepatică, prin dezvoltarea unor căi alternative de detoxifiere și eliminare a produșilor cu potențial periculos pentru hepatocit, cum sunt canalicule bazolaterale, creșterea excreției urinare a sărurilor biliare solubilizate (10), astfel că pe probele recoltate după ligatura coledociană nu s-au evidențiat existența sărurilor biliare în celulă. Deoarece aceste mecanisme sunt necaracteristice omului, modelul experimental nu este superpozabil în întregime cu situația din cadrul icterului mecanic la om (1).

Cu toată aparenta absență a pigmentilor și sărurilor din celulă, leziunile specifice colestazei apar și sunt evidente, similare omului. Substratul acestui lucru pare a fi acela că acumularea inițială de produși agresivi, cu declanșarea stresului oxidativ, sensibilizează hepatocitul la acțiunea distructivă a unor cantități mici de săruri biliare, ceea ce explică evoluția spre necroză și fibroză în ciuda normalizării biochimice (1).

Sindromul colestatic este cunoscut acum ca fiind caracterizat de o creștere extraordinară a stress-ului oxidativ la nivel hepatocitar, cu efecte nu numai hepatice, dar și generale (2). Obstrucția acută și completă a căilor biliare este urmată de augmentarea peroxidării lipidelor și reducerea marcată a glutatationului, un antioxidant important, ceea ce duce la creșterea cantității de radicali liberi în celulă. Modelul de distrugere celulară sugerează medierea fenomenelor de către peroxynitrit. Ca și radical liber, NO mediază citotoxicitatea datorată macrofagelor și neutrofilelor activate în cadrul răspunsului inflamator sistemic (1).

Deoarece detectarea din probele biologice a radicalilor liberi este dificilă, se obișnuiește căutarea unor produși secundari ai proceselor de oxido-reducere caracteristice stresului oxidativ. Radicalul oxid nitric NO este produs în celulă sub acțiunea unei enzime, iNOS (sintetaza inductibilă de oxid nitric). Nivelul de acțiune al melatoninei este la nivelul iNOS, pe care o inhibă în mod direct, dar și prin reducerea expresiei genei care reglează iNOS (11). Evaluarea activității NO în celule se face prin măsurarea valorilor NO₂ și NO₃ din omogenatele obținute din ficat (1).

În majoritatea lucrărilor studiate, administrarea melatoninei se făcea sub formă de soluție injectată intraperitoneal. Am hotărât să administrăm produsul per os, pentru a putea vedea dacă sunt diferențe ale efectelor asupra ficatului, având în vedere farmacocinetica și biodisponibilitatea diferită, în funcție de calea de administrare. Doza pe care am preconizat-o a fost de 1 mg/kgc/zi, fiind similară dozei dovedite a fi eficientă pe cale injectabilă (1).

Adițional am optat pentru cercetarea proprietăților anti-oxidante ale unui preparat folosit în medicina ayurvedică, creditat cu efecte hepatoprotectoare - *Tinospora cordifolia*, găsit în forma preparatelor comerciale sub numele de Guduchi. Există studii care au reușit să obiectiveze efecte antioxidante ale acestei plante, fără să poată preciza mecanismele intime de acțiune (3,4,12). Doza per kilogram corp nu a putut fi stabilită datorită faptului că din produsul comercial s-a realizat o infuzie, care a fost administrată în locul apei.

Din punct de vedere microscopic modificările tisulare nu sunt dramatic diferite de animalele netratate. Aspectele sunt explicabile prin acțiunea bruscă, violentă a ligaturii coledo-

ciene, cu repercusiuni asupra unui ficat neprotejat în prealabil prin nici un mecanism. În schimb, reacția ductală și gradul de inflamație periportală sunt mai reduse. Acest lucru ne facem să credem că, sub acțiunea acestor substanțe, se produce o reducere a produșilor de stres oxidativ și o imunomodulare la nivel hepatic, cu scăderea răspunsului inflamator. Reacția de proliferare ductală este un proces adaptativ și protector în colestază, reducerea ei poate să însemne resimțirea mai puțin agresivă, sub acțiunea protectoare a melatoninei și tinosporei, a colestazei.

Din punct de vedere al prezentării a sindromelor de hepatocitoliză și colestază am remarcat o asemănare a curbelor de evoluție cu animalele netratate în prima săptămână, când nu există diferențe semnificative între valorile ASAT, ALAT, Bb, FA la cele trei grupe. După prima săptămână se remarcă revenirea la valorile bazale a aproape tuturor probelor biochimice la grupele melatonină și tinospora, comparativ cu lotul martor. Având în vedere modul de comportament al enzimelor și bilirubinei la primul lot studiat, se poate afirma că administrarea de *Melatonină* și tinospora la animalele cu icter colestatic induce "normalizarea" probelor biochimice ale subiecților cu două săptămâni mai repede decât în modelul natural de evoluție. Cu toate că explicația acestui tip de comportament la șobolan nu poate fi explicat decât prin declanșarea unor mecanisme protectoare, rezultatele experimentului nostru promovează ideea că administrarea de substanțe antioxidante au și un rol modulator al sistemelor adaptative hepatice, prin stimularea activității lor. Efectele melatoninei și tinosporei cordifolia sunt mai evidente asupra enzimelor de colestază și a bilirubinei. Măsurarea compușilor de stres oxidativ a fost în corelație cu datele obținute din analiza biochimiei și a morfopatologiei. Comparativ cu lotul martor, la exemplarele tratate cu melatonină și tinospora cordifolia cantitatea de NO₂/gram de țesut a fost semnificativ mai mică. După primele 7 zile cantitatea de NO₂/gr țesut este, în medie, egală la grupele M și T, iar la 14 zile se observă menținerea valorilor de la o săptămână.

Utilizarea clinică a melatoninei pare sigură chiar la doze de 100 de ori mai mari decât cele folosite în mod curent pentru tratamentul insomniei (13). Pe aceste considerente a debutat la Heidelberg, în 2008 un studiu care cercetează efectele protectoare ale melatoninei în cazul pacienților umani cu rezecții hepatice majore, dar a cărui rezultate nu au fost încă publicate (14).

Concluzii

Având în vedere multitudinea de studii experimentale care au certificat efectul antioxidant și citoprotector al *Melatoninei*, dar și al altor compuși fitofarmaceutici, se poate avea în vedere

administrarea acestora și la om, în condițiile în care efectele secundare sunt minore iar potențialul periculos al supradozării nu a fost pus în evidență.

Bibliografie

1. Esrefoglu M, Gül M, Emre MH, Polat A, Selimoglu MA. Protective effect of low dose of melatonin against cholestatic oxidative stress after common bile duct ligation in rats. *World J Gastroenterology*. 2005;11(13):1951-56.
2. Huang LT, Tiao MM, Tain YL, Chen CC, Hsieh CS. Melatonin ameliorates bile duct ligation-induced systemic oxidative stress and spatial memory deficits in developing rats. *Pediatr Res*. 2009; 65(2):176-80.
3. Panchabhai TS, Kulkarni UP, Rege NN. Validation of therapeutic claims of *Tinospora cordifolia*: a review. *Phytother Res*. 2008; 22(4):425-41.
4. Nagarkatti DS, Rege NN, Desai NK, Dahanukar SA. Modulation of Kupffer cell activity by *Tinospora cordifolia* in liver damage. *J Postgrad Med*. 1994;40(2):65-7.
5. Grigorescu M. Sindromul colestatic. În: Grigorescu M, Pascu O, editors. *Tratat de gastroenterologie clinică*, vol II. București: Editura Tehnică; 1997. pag 185-203.
6. Erlinger S. Bile secretion. În: Blumgart LH, Fong Y, editors. *Surgery of the liver and biliary tract*, vol. I. London: W.B. Saunders; 2000. pag 109-119.
7. Biecker E, De Gottardi A, Neef M, Unterna M, Schneider V, Ledermann M, et al. Long-Term Treatment of Bile Duct-Ligated Rats with Rapamycin (Sirolimus) Significantly Attenuates Liver Fibrosis: Analysis of the Underlying Mechanisms. *JPET*. 2005; 313:952-61.
8. Burt DA și col. *McSween's Pathology of the liver*, Fifth edition. Churchill Livingstone Elsevier. 2007.
9. Burt AD. Cellular and molecular aspect of hepatic fibrosis. *J Pathol*. 1993;170:105-14.
10. Trauner M, Boyer JL. Cholestatic syndrome. *Curr Opin Gastroenterol*. Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
11. Kireev RA, Tresguerres ACF, Garcia C, Ariznavarreta C, Vara E, Jesus AE. Tresguerres: Melatonin is able to prevent the liver of old castrated female rats from oxidative and pro-inflammatory damage. *J Pineal Res*. 2008;45:394-402.
12. Bishayi B, Roychowdhury S, Ghosh S, Sengupta M. Hepatoprotective and immunomodulatory properties of *Tinospora cordifolia* in CCl₄ intoxicated mature albino rats. *J Toxicol Sci*. 2002;27(3):139-46.
13. EPARs for authorised medicinal products for human use, European Medicines Agency site <http://www.ema.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/circadin/circadin.htm>
14. Schemmer P, Nickkholgh A, Schneider H, Sobirey M, Weigand M, Koch M, et al. PORTAL: pilot study on the safety and tolerance of preoperative melatonin application in patients undergoing major liver resection: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *BMC Surg*. 2008;8:2.