

Melatoninin Yara İyileşmesi ve Angiogenesis Üzerine Etkileri

THE EFFECTS OF MELATONIN ON ANGIOGENESIS AND WOUND HEALING

Dr.Özgür ODABAŞ*, Dr.Gürsel SOYBİR*,
Dr.Ayhan BİLİR**, Dr.Haluk KARDAŞ***, Dr.Cemalettin TOPUZLU****

* Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi II.Cerrahi Kliniği, ** İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ABD, *** International Hospital, Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi, **** İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, İSTANBUL

ÖZET

Amaç: Bu deneysel çalışma modelinde 30 adet Wistar Albino sıçan üzerinde melatonin hormonunun yara iyileşmesinde angiogenesis üzerine etkileri araştırılmıştır.

Durum Değerlendirmesi: Henüz tam anlaşılammış olan yara iyileşmesinde, immün sistem hücreleri yara iyileşmesi sürecine etkili faktörlerin salınımını arttırmaktadır. Melatoninin ise özellikle IL-1, TNF- α , ve TGF- β üretimini indüklediği bilinmektedir. Yara iyileşmesi proliferasyon fazında, Melatoninin immüno-modülatör etkileri ise henüz tartışılan bir konudur.

Yöntem: Sıçanlar iki gruba ayrılarak sırt derileri üzerine yapılan insizyon öncesi ve sonrasında 1. gruba 0.25 cc/sıçan/gün %0.9 NaCl, II. gruba 0.4 mg/kg/gün olacak şekilde %0.9 NaCl içerisinde çözünmüş şekilde Melatonin intramüsküler yolla verilerek iyileşme fazları kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Deneysel başlangıcından sonra 3, 7, 10, 14 ve 21. günlerde iyileşmekte olan dokulardan eksizyonel biopsiler alınarak ışık ve elektron mikroskopisi altında angiogenesis kriterleri incelenmiş, doku hidroksiprolin düzeyleri ölçülmüştür.

Çıkarım: Işık ve elektron mikroskopisi incelemelerinde tüm evrelerde kontrol grubundan farklı olarak yeni damarlanmanın başladığı ve damar sayısında anlamlı artış gözlenmiştir ($p<0.05$). Doku hidroksiprolin ölçümlerinde ise 10., 14. ve 21. günlerde daha fazla olmak üzere tüm evrelerde Melatonin grubu kontrol grubuna göre üstünlük göstermiştir.

Sonuçlar: Melatoninin angiogenesis ve yara iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinin olabileceği ve yeni çalışmaları özendirici olduğu görülmektedir.

Anahtar kelimeler: Yara iyileşmesi, angiogenesis, melatonin

SUMMARY

The effects on angiogenesis of melatonin hormone were researched in wound healing process in the experimental study model, using 30 Wistar Albino rats. Although wound healing is not a well-known process, cells of immune system increase releasing of factors which are effective in the process. Whereas it is known that melatonin particularly induces productions of IL-1, TNF- α and TGF- β . Immunomodulator effect of melatonin is unclear at the proliferation phase of wound healing. Rats were divided into two equal groups. Before and after the incisions made on the back skin, 0,9% NaCl at the dose of 0.25 cc/rat/d was injected to group 1, and melatonin dissolved in 0,9% NaCl at the dose of 0,4 mg/kg/d was injected to group 2 via intramuscular route. The phases of healing were assessed as compared with the control group. At 3, 7, 10, 14 and 21 days of the study, excisional biopsies were made from the healing tissues, and were investigated for angiogenesis criterions under light and electron microscopes. Hydroxyprolin levels were also measured in the tissues. Unlike in control group, it was seen that neovascularization began in every stages of light and electron microscopic examinations and that

that neovascularization began in every stages of light and electron microscopic examinations and that there was a significant increase in the number of new vessels ($p < 0.05$). In all stages, particularly at 10, 14 and 21 days, melatonin group showed better developing than control group in measurement of the tissue hydroxyprolin levels. Melatonin may have positive effects on angiogenesis and wound healing, and the results were encouraging new studies.

Keywords: Wound healing, angiogenesis, Melatonin

Hala tam olarak anlaşılammış olan yara iyileşmesi biyolojik olarak inflamatuvar, proliferatif, ve remodeling olmak üzere 3 fazda gerçekleşmektedir (1).

Yara iyileşmesinde çok önemli faktör olan makrofajlar fibroblastik aktiviteyi başlatıp sürdürürken, T hücreleri ise düzenleyici ve kontrol edici bir rol alırlar. Makrofaj, nötrofil, lenfosit, trombosit ve fibroblastlar; göç, proliferasyon ve iyileşme gibi bir çok sürece etkili faktörlerin salınımını sağlarlar. Ayrıca, makrofajlar tarafından üretilen spesifik proteinler ise kemotraktanlar, büyüme faktörleri, proteazlar, ekstrasellüler matris ve doku büyümesini dizginleyecek faktörleri içerir (2,3,4,5).

İmmün sistem hücreleri ve onlardan salınan sitokin ve büyüme faktörlerinin, yara iyileşmesinin başta proliferasyon fazı ve bu fazda yer alan angiogenesis üzerine stimulan etkileri vardır. Angiogenesis sürecinde fibroblastlar yeni damarları oluşturan endotelial hücrelerin kaynağını oluşturmaktadır (2,3,4,5,6,7,8).

1958 yılında keşfedilen ve bir pineal gland hormonu olan melatonin ise interlökin-1 ve Tümör nekrotizan faktör- α (TNF- α) sitokinlerini, Transforming growth faktör- β (TGF- β) üretimini indüklemektedir. Ayrıca, angiogenesis üzerine oldukça etkili olan fibroblast proliferasyonu ve monosit sitokin üretimini de uyaran Melatonin; nöroendokrin olduğu kadar immüno-modülatör bir hormondur (9,10,11).

Bu deneysel çalışmada Melatoninin yara iyileşmesi proliferasyon fazında angiogenesis üzerine olan etkileri incelenmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) nde gerçekleştirilmiştir. 30 adet dişi Wistar Albino sıçan 15'erlik iki gruba ayrıldı. 1. Grup (158 ± 18 gr) kontrol, 2. Grup (156 ± 22 gr)

çalışma grubu olarak belirlendi. Sıçanlar bir kafeste 5 sıçan olacak şekilde, 12 saat ışık 12 saat karanlık ve $24 \pm 4^\circ\text{C}$ ısı şartlarında barındırılarak standart fare yemi ve çeşme suyu ile beslenmişlerdir.

Tüm sıçanların sırt deri tüyleri tüy dökücü krem ile temizlenmiştir. Deney başlangıcından itibaren 7 gün boyunca, 1. Gruba % 0.9 NaCl (0.25 cc/sıçan/gün), 2. Gruba 0.4 mg/kg/gün olacak şekilde % 0.9 NaCl içerisinde çözülmüş şekilde Melatonin 0.25 cc/sıçan/gün dozunda arka bacak üst m.üsküler dokuya insülin enjektörü ile enjekte edilmiştir.

Melatonin: (N-Acetyl-5-methoxytryptamine, 1gr., Katolog No: M-5250, Sigma Chemical Co St. Louis USA.)

7. gün tüm sıçanlar eter anestezisi ile uyutularak ense kuyruk dorsal hattında longitüdüal olarak sırt derilerine cilt-cilt altı dokularını içeren, 5'er cm uzunluğunda kesiler uygulanmıştır. Bu yaralar 1'er cm ara ile 9 mm'lik çelik kartuşlu cilt stapleri ile kapatılmıştır. Sütür sonrası 7. güne geldiğinde yaşayan sıçanların sütür klipleri alınmıştır.

Cilt insizyonlarının yapıldığı gün ve sonrasında melatonin ve NaCl enjeksiyonlarına sıçanlar sakrifiye edilene kadar devam edilmiştir.

Cilt insizyonunun 3. gününde her iki gruptan 3'er sıçan yüksek doz eter anestezisi ile sakrifiye edilerek, sırtta insizyon yapılan bölgede, insizyon hattı tam ortada olmak üzere 10X20 mm boyutlarında, 2 adet, cilt-cilt altı dokuları içeren flep eksizyonu uygulanmıştır.

Alınan fleplerin biri ışık mikroskopisi, diğeri elektron mikroskopisi incelemeleri için planlanmıştır.

Flep eksizyonu işlemine, cilt insizyonlarının 7. 10. ve 14. günlerinde sadece ışık mikroskopisi için tek flep olacak şekilde ve her bir gruptan 3'er sıçan olacak şekilde (7. gün 3'er sıçan, 10. gün 3'er sıçan, 14. gün 3'er sıçan) yukarıda anlatılan teknikte devam edilmiştir. İnsizyonun 21. günü ise her iki gruptan kalan 3'er sıçana yine elektron ve ışık mikroskopisi incelemesi için 2'er flep

Alınan flepler neovaskülarizasyon kriterleri incelenmesi amacı ile ışık mikroskopisi için %10 luk formol, elektron mikroskopisi için %2.5 luk gluteraldehit solüsyonunda tesbit edilmiştir. Işık mikroskopisinde Masson trichrome tekniği (12) ile boyanan preparatlar Leitz marka fotomikroskopta incelenerek 40x büyütme ile rastgele seçilmiş ardışık 10 alana düşen damar sayısı kaydedilmiştir.

Elektron mikroskopisinde makrofajlar, fibroblastlar, lenfosit infiltrasyonu, vaskülarizasyon artışı, yağ bezi ve kıl kökü oluşumları, lineer vasküler pattern ve kollajen ağ oluşumu incelenen kriterler arasında yer almıştır. Elektron mikroskopisi için alınan ve %2.5'lik gluteraldehit solüsyonunda fikse edilmiş flepler, literatürde tarif edildiği gibi (13) bloklar hazırlanarak Reichert OMU-3 marka ultramikrotomda 70-80 nm. kalınlığında kesitler yapıldı. Hazırlanan preparatlar JEOL JEM 100C elektron mikroskopta değerlendirildi.

Hidroksiprolin düzeyi ölçmek amacı ile alınan yaş doku örnekleri, kuru doku elde etmek amacı ile 65 C de 18-24 saat kurutuldu. Kuru dokular HCl ile muamele edilerek hidrolize edildi ve spektrofotometre yardımı ile hidroksiprolin düzeyleri belirlendi (14).

Alınan sonuçların değerlendirilmesi, aritmetik ortalamalar, standart sapmalar ve grupların istatistiksel karşılaştırılması SPSS 9.0 bilgisayar istatistik programında yapılmıştır.

BULGULAR

Deney sırasında planlı sakrifikasyon işlemleri haricinde ölen sıçan olmamıştır.

Işık mikroskopisi ile yapılan incelemelerde Melatonin grubunda yara iyileşmesinin daha olumlu seyrettiği, fibroblast yoğunluğunun daha fazla olduğu, endotel hücre proliferasyonunun anlamlı şekilde melatonin grubunda fazla olduğu saptanmıştır. Bu anlamlı farklılık 3., 7., 10., 14. ve 21. günlerin tamamını kapsamaktadır (Resim 1)

Gruplardan elde edilen damar sayımı sonuçları, ortalama damar sayısı değerleri Tablo 1' de sunulmuştur.

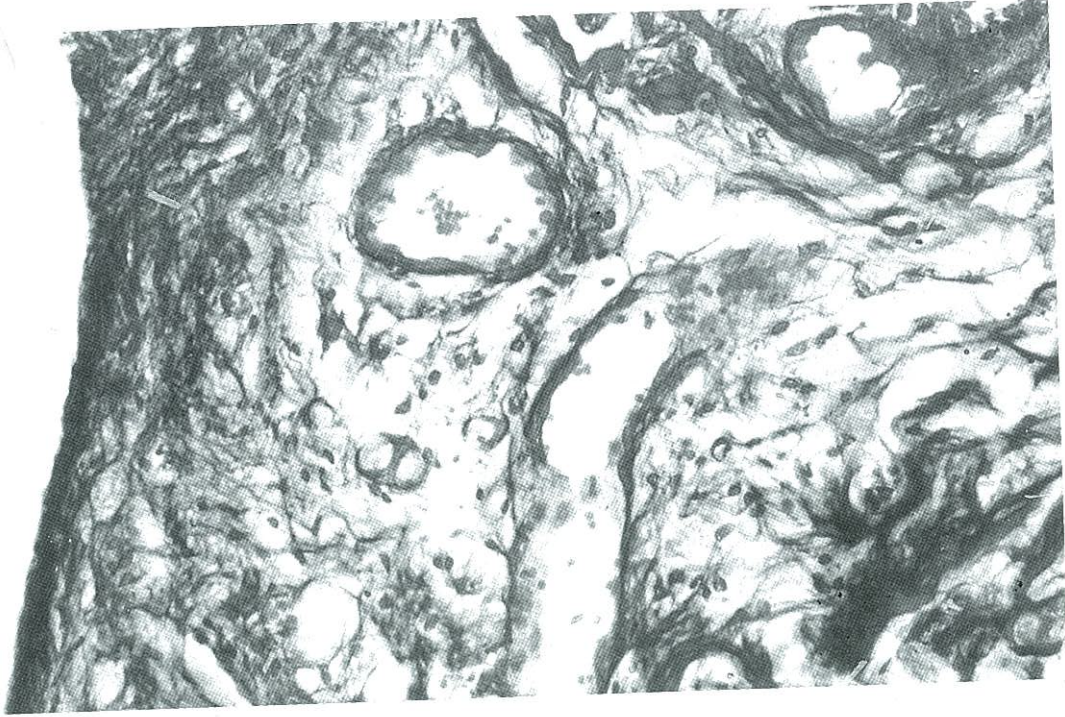
Yara iyileşmesinin 3., 7., 10., 14. ve 21. günlerinde melatonin grubu kontrol grubuna göre damar sayısı açısından anlamlı üstünlükler göstermiştir (Tablo 2).

Dokuda ölçülen hidroksiprolin düzeylerinin gruplara ve günlere göre dağılımı ve grup ortalamaları Tablo 3' de görülmektedir. Tüm evrelerde görülmekle beraber özellikle 10., 14. ve 21. günlerde hidroksiprolin seviyelerinin melatonin grubunda kontrol grubuna göre daha fazla olduğu anlaşılmıştır.

Elektron mikroskopisi sonuçlarında ise 3. ve 21. günlerde melatonin grubunda daha belirgin olmak üzere angiogenezisin arttığı tesbit edilmiştir (Tablo 4, Resim 2).

TABLO 1: ORTALAMA DAMAR SAYISI SONUÇLARI

GÜN	GRUP	3 örnek x 10 alan	ORTALAMA	STANDART SAPMA
3	Kontrol	30	4.60	1.52
	Melatonin	30	8.53	2.99
7	Kontrol	30	4.70	2.17
	Melatonin	30	11.07	12.75
10	Kontrol	30	4.60	1.89
	Melatonin	30	7.80	2.48
14	Kontrol	30	5.87	2.06
	Melatonin	30	8.93	2.66
21	Kontrol	30	6.13	1.72
	Melatonin	30	9.13	2.34



Resim 1: Melatonin grubunda ışık mikroskobu ile 25x büyütmede 21. günde damar sayısı ve kollagen lif artışı.

TARTIŞMA

Yara iyileşmesi mekanizması üzerinde son yapılan çalışmalar, bu süreçte bir çok büyüme faktörünün rol aldığını göstermektedir. Bunların içinde en iyi belirlenenleri olan PDGF ve de TGF- β , yara iyileşmesinde özellikle trombositlerin alfa granüllerinden, makrofaj ve fibroblastlardan salgılanır. Etki mekanizmaları ve dereceleri tam bilinmemekle beraber her ikisi de iyileşmenin erken döneminde kollajen içeriğini arttırmaktadır (2). Büyüme faktörleri spesifik hücre yüzey reseptörleri ile hedef hücrelere bağlanmakta, ve hücreyi göçe, bölünmeye veya yara iyileşmesinde etkili olacak diğer faktörleri üretmeye indüklemektedir

(3). İyileşen yarada PDGF- β ile ilgili tesbit edilen reseptörler vasküler düz kas hücrelerinde ve de kapiller duvar hücrelerinde bulunmaktadır (4).

Büyüme faktörleri, mast hücrelerinin yaraya toplanmasına sebep olması ile yeni damar oluşumunu kolaylaştırmaktadır (5). Yara iyileşmesinde angiogenezis, önemli olan ancak henüz çok iyi anlaşılammış bir olgudur. İyi anlaşılmmasında rol alan bir faktör de yaradaki vaskülarizasyonu sürekli şekilde ölçebilececek kantitatif bir modelin olmayışıdır (6). Angiogenezis muhtemelen keratodermal greftlerin sürekliliğinin sağlanmasında ana rolü oynamaktadır (7). Angiogenezis üzerine bir çok faktörün etkileri araştırılmaktadır. Trombosit kaynaklı yara iyileşme faktörleri yara iyileşmesinde

TABLO 2: ORTALAMA DAMAR SAYISI SONUÇLARINDA GRUPLARIN KARŞILAŞTIRILMASI

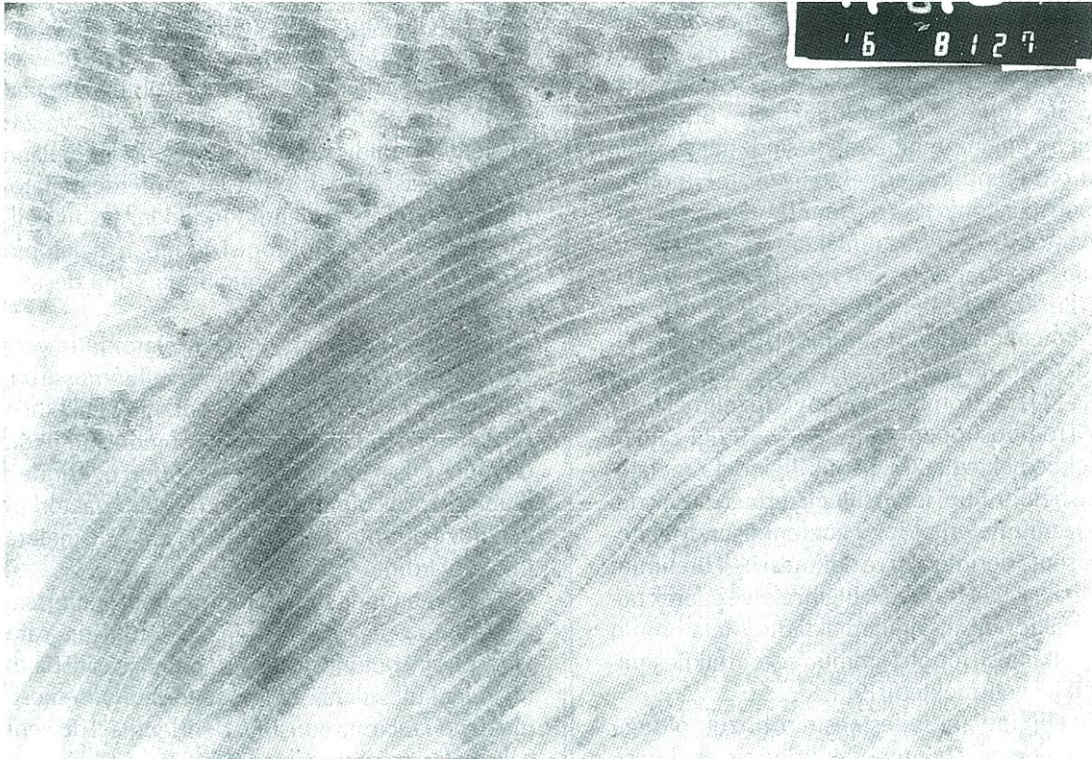
Günler	t	Anlamlılık	%95 Güvenilirlik Aralığı	
			Alt	Üst
3	-6.07	0.000	-5.26	-2.60
7	-2.70	0.011	-11.18	-1.55
10	-4.72	0.000	-4.59	-1.82
14	-5.24	0.000	-4.26	-1.87
21	-5.53	0.000	-4.11	-1.89

TABLO 3: HİDROKSİPROLİN DÜZEYİ SONUÇLARI

GÜN	GRUP	n	ORTALAMA	STANDART SAPMA
3	Kontrol	3	739.67	11.06
	Melatonin	3	756.67	2.89
7	Kontrol	3	770.00	10.00
	Melatonin	3	789.33	10.07
10	Kontrol	3	791.67	7.64
	Melatonin	3	823.00	10.82
14	Kontrol	3	825.33	9.07
	Melatonin	3	878.00	2.65
21	Kontrol	3	880.33	15.01
	Melatonin	3	923.33	10.60

angiogenezi olumlu etkilemektedir (8). FGF ve TGF- β total damar uzunluğunu 20 günlük enjeksiyonlar sonrasında %32 ve %63 oranlarında arttırmaktadırlar (15). Bu sonuçlar FGF ve TGF- β 'nin angiogeneziste endotelial hücrelerin progenitoru olarak esas rolü üstlendiğini göstermektedir (16).

EGF'ün ise konnektif dokuda iyileşmeyi arttırdığı ama önceden sanıldığı gibi angiogenezi etkilemediği gösterilmiştir (17). FGF angiogeneziste major rol oynarken, IL-1 ve IFN- γ inhibitör olarak etkili olmaktadır (18). İyileşmede rolü olan TNF ve IL2'nin en önemli kaynağı nötrofillerdir.



Resim 2: Melatonin grubunda elektron mikroskopi ile 21. günde kollagen lif artışı.

TABLO 4 : ELEKTRON MİKROSKOPİSİ SONUÇLARI

Gün	Grup	Fibroblast Artışı	Makrofaj Artışı	Kollagen Lif Oluşumu	Kollagen Ağ Oluşumu	Lenfosit İnfiltrasyonu	Damar Sayısında Artış	Yağ Bezi ve Kıl Kökü Oluşumu
3	K	+	+	+		+		
	M	++	+++	++	+	++		
21	K	++		++	+		+	
	M	+++		+++	++		+++	+++

3. ve 21. günlerde her gruptan alınan 3 örnek birarada değerlendirilmiştir. (K:Kontrol, M:Melatonin, +: hafif, ++:orta, +++:yoğun)

ve IL2'nin en önemli kaynağı nötrofillerdir. Özellikle re-epitelizasyon fazında bu etki daha fazla olmaktadır (19).

Yara iyileşmesinde rolü olan diğer bir madde melatonindir. Hipofizer bir hormon olan melatonin hem TNF ile hem de IL-2 ve 4 ile etkileşimler içindedir. Yüksek melatonin seviyelerinde, TNF'ün anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır. Bu sonuç, makrofajlardan salınan TNF ile pineal gland arasında bir feedback mekanizması olduğuna işaret eder (20). Pinealektomi sonrasında yarada artan total ve de insoluble kollajen içeriği melatonin ile suprese edilebilmektedir. Bu sonuç kollajen içeriğinin inhibe edilmesinde melatoninin etkili olduğunu göstermektedir (10). Hipofizer hormon melatonin IL-2'nin immün etkilerini arttırmakta, toksisitesini azaltmaktadır. Yine TNF'in yaptığı toksisitenin, beraberinde verilecek melatonin ile düzeltilebileceği yolunda bildiriler vardır (11). Pineal melatonin verilmesi IL-2'nin antitümör aktivitesini arttırmakta, yaşam süresini uzatmakta (21) ve trombositopeniyi düzeltmektedir (22). Trombositopeni sadece IL verildiği zaman yükselmektedir (23). Kemik iliğindeki, melatoninin, helper T tipi lenfositler üzerine yüksek derecede affiniteleri olduğu gözlenmiştir. Melatonin reseptörlerinin aktive edilmesi IL-4 üretimini arttırmakta, IL-4 ise kemik iliğini aktive ederek büyüme faktörlerini salgılatmaktadır. Melatoninin IL-4'e etkimesi, hipofiz-immün sistem etkileşimine açıklık getirmektedir (9).

Özellikle yara iyileşmesinin bozuk olduğu şartlarda eksojen büyüme faktörlerinin verilmesi, potansiyel olarak faydalı olabilmektedir. Normal dokudaki yara iyileşmesini hızlandırırken, bozuk

iyileşmesi olan dokuda da iyileşmeyi indüklemektedir (24).

Çalışmamızda yara iyileşmesinin proliferasyon ve angiogenezis fazına, büyüme faktörlerini direk indüklediği bilinen melatoninin ekzojen etkisi araştırılmış ve oldukça olumlu sonuçlar alınmıştır. Işık mikroskopisi ile yapılan incelemede eksojen verilen melatoninin iyileşme üzerine olumlu etkileri gözlenmiştir. Melatonin grubunda yara iyileşmesinin daha olumlu seyrettiği, fibroblast yoğunluğunun daha fazla olduğu, endotel hücre proliferasyonunun anlamlı şekilde fazla olduğu saptanmıştır. Bu üstün farklılık 3., 7., 10., 14. ve 21. günlerin Yine hidroksiprolin seviyelerinde grupların kıyaslanmasında 10, 14 ve 21. günlerde melatonin grubu lehine anlamlı farklılıklar tesbit edilmiştir. Elektron mikroskopisi ile alınan melatonin grubu lehine anlamlı sonuçlar da bunu desteklemektedir.

Bu çalışmada her ne kadar Melatonin'in yara iyileşmesi üzerine pozitif etkileri bulunmuşsa da, kullanılan maddenin etki mekanizması hakkında bu sonuçlar ile bir çıkarım yapmak mümkün değildir. Olası etki büyüme faktörleri üzerinden olabilir. Ancak bunun teyiti için büyüme faktörleri kan düzeylerinin de ölçüldüğü yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda melatoninin pozitif etkisi sadece angiogenezis üzerinde incelenecek büyüme faktörleri ile değerlendirilecektir. Yine elektron mikroskopisi ile alınan sonuçlar metrelere kullanılarak melatoninin yara iyileşmesinin diğer fazlarına etkisinin belirlenmesi için çalışmaları gerektirmektedir.

Yarada lokal olarak üretilen büyüme faktörlerinin endotelial cevabın gen-

olduğu gösterilmiştir. Sebep tam bilinmese de yaşlılıkla birlikte immün cevabın enflamasyonun ve de yara iyileşmesinin azaldığı kesindir (25,26). Melatoninin yaşla azalmasına bağlı olarak yara iyileşmesinin bozulduğu gerçeğinden yola çıkarak, eksojen verilen melatoninin doza bağlı olarak iyileşme üzerindeki etkilerinin ölçülmesi için melatonin kan düzeyinin ölçüldüğü yeni çalışmalara da ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak; sıçanlarda yara iyileşmesinin proliferasyon ve angiogenesis fazını eksojen verilen melatonin hormonunun olumlu olarak etkilediği düşünülmektedir. Damar sayısı ve hidrokisprolin düzeylerinde gruplar kıyaslandığında melatonin grubu lehine anlamlı farklılıklar saptanmıştır. Ancak melatoninin etki mekanizması için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu gelişme İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu'nun desteği ile gerçekleştirilmiştir

KAYNAKLAR

1. Cohen KI, Diegelmann RF, Yager DR, Wornum IL, Graham MF, Crossland MC: Wound care and wound healing. In: Schwartz SI. (ed): *Principles of Surgery*. 9th ed. New York McGraw-Hill Company, 1999:263-295.
2. Hosgood C: Wound healing. The role of platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. *Vet Surg*. 1993;22(6):490-5.
3. Herndon DN, Nguyen TT, Gilpin DA: Growth factors. Local and systemic. *Arch Surg* 1993; 128(11):1227-33.
4. Reuterdaahl C, Sundberg C, Rubin K, Funa K, Gerdin B: Tissue localization of beta receptors for platelet-derived growth factor and platelet-derived growth factor B chain during wound repair in human. *J Clin Invest* 1993;91(5):2065-75.
5. Gruber BI, Marchese MJ, Kew R: Angiogenic factors stimulate mast-cell migration. *Blood* 1995;86(7): 2488-93.
6. Kjolseth D, Kim MK, Andresen LH, Morsing A, Frank JM, Schuschke D, Anderson GL, Banis JC, Tobin GR, Weiner LJ: Direct visualization and measurements of wound neovascularization: Application in microsurgery research. *Microsurgery* 1994;15(6):390-8.
7. Gu XH, Terenghi C, Kangesu T, Navsaria HA, Springall DR, Leigh IM, Green CJ, Polak JM: Regeneration pattern of blood vessels and nerves in cultured keratinocyte grafts assessed by confocal laser scanning microscopy. *Br J Dermatol*. 1995;132(3):376-83.
8. Malcherek P, Schultz G, Wingren U, Franzen L: Formation of healing tissue and angiogenesis in repair of connective tissue stimulated by epidermal growth factor. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1994; 28(1):1-7.
9. Maestroni GJ: T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *J Pineal Res* 1995;18(2):84-9.
10. Drobniak J, Dabrowski R: Melatonin suppresses the pinealectomy-induced elevation of collagen content in a wound. *Cytobios* 1996;85(340):51-8.
11. Brackowski R, Zubelewicz B, Romanowski W, Lissoni P, Barni S, Tancini G, Maestroni GJ: Preliminary study on modulation of the biological effects of tumor necrosis factor-alpha in advanced cancer patients by the pineal hormone melatonin. *J Biol Regul Homeost Agents* 1994;8(3): 77-80.
12. Bradbury P. Rae K: Connective tissues and stains. In: Bancroft JD (ed): *Theory and Practice of Histological techniques*. 4th Ed., Hong Kong Churchill Livingstone 1996:129.
13. Robinson G., Gray T.: *Electron microscopy-2: practical procedures*. In: Bancroft JD (ed): *Theory and Practice of Histological techniques*. 4th Ed, Hong Kong, Churchill Livingstone 1996:598-600.
14. Switzer BR: Determination of hydroxyproline in tissue. *Methods of Nutr Biochem* 1991;2:229-231.
15. Frank JM, Kaneko S, Joels C, Tobin GR, Banis JC, Barker JH: Microcirculation research, angiogenesis, and microsurgery. *Microsurgery* 1994; 15(6): 399-404.
16. Kon K, Fujiwara T: Transformation of fibroblasts into endothelial cells during angiogenesis. *Cell and Tissue Res* 1994; 278(3):625-8.
17. Philips GD, Stone AM, Whitehead RA, Knighton DR: Platelet derived wound healing factors (PDWHF) accelerate and augment wound healing angiogenesis in the rat. *In Vivo*. 1994; 8(2):167-71.
18. Norioka K, Mitaka T, Mochizuki Y, Hara M, Kawagoe M, Nakamura H: Interaction of interleukin-1 and interferon-gamma on fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *Jpn J Cancer Res* 1994;85(5): 522-9.
19. Feiken E, Romer J, Eriksen J, Lund LR: Neutrophils express tumor necrosis factor-alpha during mouse skin wound healing. *J Invest dermatol* 1995;105(1):120-3.
20. Lissoni P, Barni S, Tancini G, Brivio F, Tisi E, Zubelewicz B, Brackowski R: Role of the pineal gland in the control of macrophage functions and its possible implications in cancer: a study of interactions between tumor necrosis factor-alpha and the pineal hormone melatonin. *J Biol Regul Homeost Agents* 1994;8(4):126-9.
21. Lissoni P, Barni S, Fossati V, Ardizzoia A, Cazzaniga M, Tancini G, Frigerio F: A random-

- ized study of neuroimmunotherapy with low-dose subcutaneous interleukin-2 plus melatonin compared to supportive care alone in patients with untreatable metastatic solid tumor. *Support Care Cancer* 1995;3(3):194-7.
22. Lissoni P, Barni S, Brivio F, Rossini F, Fumagalli L, Ardizzoia A, Tancini G: A biological study on the efficacy of low dose subcutaneous interleukin-2 plus melatonin in the treatment of cancer-related thrombocytopenia. *Oncology* 1995; 52(5):360-2.
23. Bregani ER, Lissoni P, Rossini F, Barni S, Tancini G, Brivio F, Conti A, Maestroni GJ: Prevention of interleukin-2 induced thrombocytopenia during the immunotherapy of cancer by a concomitant administration of the pineal hormone melatonin. *Recenti Prog Med* 1995;86(6): 231-3.
24. Benneth NT, Schultz GS: Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg* 1993;166(1): 74-81.
25. Philips GD, Stone AM: PDGF-BB induced chemotaxis is impaired in aged capillary endothelial cells. *Mech Ageing Dev* 1994; 73(3):189-96.
26. Aggarwal BB, Totpal K, Lapushin R, Chaturvedi MM, Pereira OM, Smith JR: Diminished responsiveness of senescent normal human fibroblasts to TNF-dependent proliferation and interleukin production is not due to its effect on the receptors or on the activation of a nuclear factor NF-kappa B. *Exp Cell Res* 1995;218(1):381-8.

YAZIŞMA ADRESİ:

Dr.Gürsel SOYBİR

Teşvikiye mah. Kalıpçı sok.

Polat Apt. 66/4 80200, Nişantaşı, İSTANBUL