

Daša Zupančič¹, Kristijan Jezernik²

Melatonin in njegovi celično-molekularni učinki

Melatonin and its Cellular-molecular Effects

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: melatonin, antioksidanti, apoptoza, celična delitev

Melatonin je pri sesalcih znan kot glavni sekretorni produkt čišerike. Njegova fiziološka funkcija je, da okrepi cirkadiani ritem in vpliva na sezonski reprodukcijski cikel, povezan pa je tudi s spanjem. V zadnjem desetletju so odkrili, da melatonin deluje kot antioksidant in da vpliva tudi na celično delitev in smrt. V članku so opisana spoznanja o vlogi melatonina kot antioksidanta pri vnetju in dejstva o vplivih melatonina na apoptozo in proliferacijo celic. Vsi predstavljeni učinki nakazujejo možnost uporabe melatonina pri zdravljenju različnih bolezni.

ABSTRACT

KEY WORDS: melatonin, antioxidant, apoptosis, proliferation

Melatonin is the main secretory product of the pineal gland of all mammals, including humans. Functionally, melatonin has been linked to the strengthening of circadian rhythms, regulation of seasonal reproduction and sleep processes. That melatonin functions as an antioxidant and affects cell proliferation and death was only uncovered in the last decade. The following article describes known facts about the role of melatonin as an antioxidant and its influence on cell proliferation and apoptosis. All these activities of melatonin indicate that it may be useful in the treatment of various conditions.

¹ Asist. dr. Daša Zupančič, univ. dipl. biol., Inštitut za biologijo celice, Lipičeva 2, 1000 Ljubljana.

² Prof. dr. Kristijan Jezernik, univ. dipl. biol., Inštitut za biologijo celice, Lipičeva 2, 1000 Ljubljana.

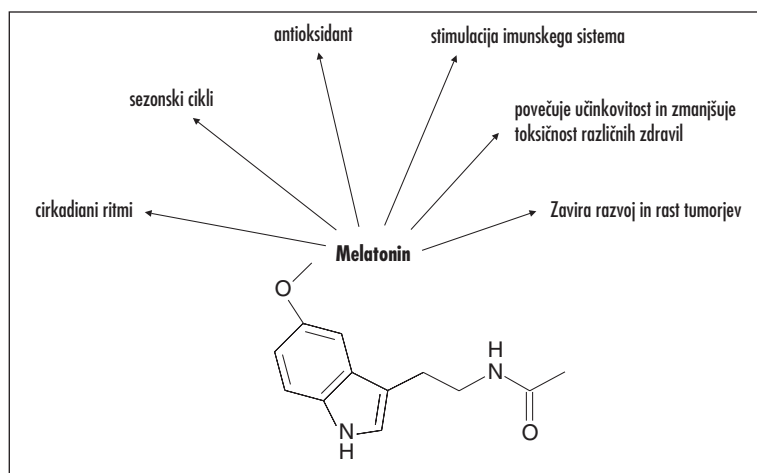
UVOD

Melatonin (N-acetil-5-metoksitriptamin) je hormon, ki ga najdemo v vseh živih organizmih. Pri sesalcih je znan kot glavni sekretorni produkt pinealne žleze – češerike, proizvaja pa se tudi v mrežnici in črevesni steni (1). Češerika se nahaja v medmožganih (diencefalon), kjer skupaj s habenulo tvori epitalamus. Sestavljena je iz dveh tipov celic: astrocitov (zvezdaste celice nevroglije) in pinealocitov (parenhimske celice). V pinealocitih se z encimsko hidroksilacijo in dekarboksilacijo aminokislina triptofan sintetizira serotonin (5-hidroksitriptamin), iz njega pa se s pomočjo encima 5-hidroksiindole-O-metiltransferaza sintetizira melatonin. Melatonin ima cirkadiani ritem sinteze in izločanja v odvisnosti od osvetlitve mrežnice in se sintetizira izključno v temi. Zato so koncentracije melatonina v plazmi čez dan nizke in dosežejo najvišjo vrednost (okrog 1 nM) ponoči. Zanimivo je, da kratkotrajno izpostavljanje nizki intenziteti svetlobe ponoči zavira izločanje melatonina in da količina melatonina, ki ga uspe sintetizirati češerika, s starostjo upada, po 80. letu pa ga ne proizvaja več. Količina melatonina se pri vseh sesalcih poveča ponoči, ne glede na to ali je žival aktivna podnevi ali ponoči. Ritem melatonina je torej endokrini označevalec noči. Trajanje povečane koncentracije melatonina v krvi je kontrolirano z dolžino dne-

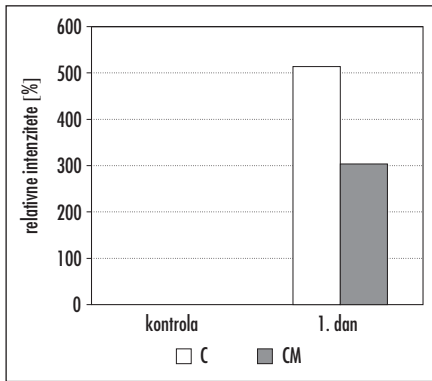
va. Poleti, ko je dan dolg, je povečanje melatonina kratko, medtem ko je v času kratkih dni pulz melatonina dolg. Dolžina dneva torej regulira ritem melatonina in tako vzpostavi vzorec koncentracijskih sprememb tega hormona, ki predstavlja endokrini koledar neke živali. S pomočjo sezonskega ritma se organizem prilagaja vsakoletnim podnebnim spremembam. Prilagajanje letnim časom vključuje spremembe reprodukcijskega statusa, prehranjevalnih navad, barve in kvalitete dlake in pripravljenosti na hibernacijo. Od odkritja melatonina leta 1958 je bilo opravljenih veliko najrazličnejših raziskav in izkazalo se je, da je melatonin vključen tako v fiziološke procese kot tudi v različne patološke spremembe. (i) Kot antioksidant in močan lovilec prostih radikalov naj bi imel zaščitno vlogo pri šoku in vnetjih ter poškodbah, povzročenih z ishemijo in ponovno prekrvavitvijo (2). Znano je, da melatonin (ii) stimulira imunski sistem (3) ter (iii) izboljša razmerje med učinkovitostjo in toksičnostjo različnih zdravil (4). (vi) Poleg tega melatonin zavira karcinogenezo, saj inhibira tako začetne stopnje rakastih sprememb kot tudi rast tumorjev (5) (slika 1).

MELATONIN DELUJE KOT ANTIOKSIDANT

Metabolizem vseh aerobnih organizmov temelji na oksidaciji hranilnih snovi. Stran-



Slika 1. Melatonin vpliva na različne fiziološke procese (cirkadiani ritmi, sezonski reprodukcijski cikel) in tudi patološke spremembe (deluje kot antioksidant, stimulira imunski sistem, povečuje učinkovitost in zmanjšuje toksičnost različnih zdravil ter zavira razvoj in rast tumorjev) (Zupančič in Jezernik).



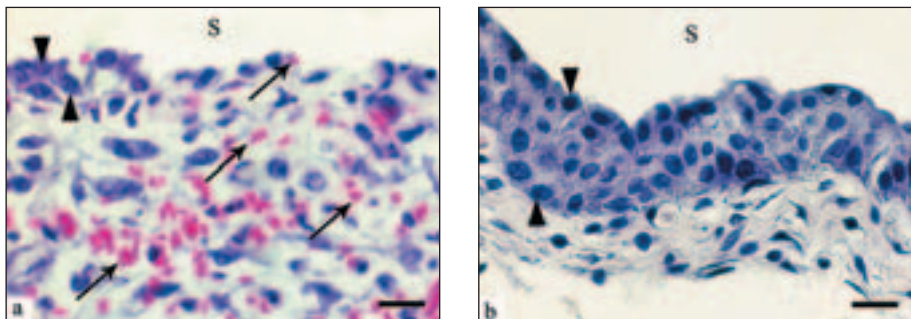
Slika 2. Relativne intenzitete proteinskih prog inducibilne dušikov oksid-sintaze po prenosu western in imunodetekciji. Prvi dan po intraperitonealni injekciji ciklofosfamida (C) pride pri poskusnih živalih do hemoragičnega cistitisa in relativna intenziteta proteinske proge inducibilne dušikov-oksid-sintaze je visoka. Po sočasni uporabi melatonina (CM) je izražanje inducibilne dušikov-oksid-sintaze nižje.

ski produkti oksidacije so prosti radikali, kot so na primer superoksidni radikal, hidroksilni radikal in vodikov peroksid. Ti kisikovi prosti radikali so zelo reaktivni in lahko povzročajo poškodbe celic in nekrozo zaradi procesov peroksidacije membranskih lipidov, denaturacije proteinov in poškodbe DNK (6). Za zaščito pred prostimi radikali so aerobni organizmi razvili antioksidante, ki že v nizki koncentraciji zavrejo ali preprečijo delovanje škodljivih kisikovih spojin.

V zadnjem desetletju pa so odkrili, da tudi melatonin deluje kot močan lovilec prostih radikalov in antioksidant (4, 7–10). Večina dobro poznanih antioksidantov je topnih le

v lipidih (na primer vitamin E) ali le v vodi (na primer vitamin C), melatonin pa je amfipatična molekula in preprečuje poškodbe, ki jih povzročajo prosti radikali tako v celičnih membranah kot tudi v citosolu in znotrajceličnih organelih (4). Melatonin s svojim delovanjem nevtralizira veliko število v celici prisotnih prostih radikalov in reaktivnih kisikovih spojin ter njihovih metabolitov. Poleg tega melatonin spodbuja sintezo nekaterih antioksidativnih encimov, kot so: superoksid-dizmutaza, glutation-peroksidaza in glutation-reduktaza, kar še dodatno povečuje njegove antioksidativne učinke (8). Pri večini antioksidantov je razmerje med lovilcem in nevtraliziranim radikalom 1 : 1, melatonin pa sproža tako imenovano antioksidativno kaskado. Ko melatonin nevtralizira različne proste radikale, nastanejo metaboliti melatonina, ki so še naprej sposobni nevtralizirati proste radikale (11).

Znano je, da so kisikovi prosti radikali (predvsem superoksidni radikal, hidroksilni radikal in peroksinitrit) vpleteni v procese vnetja (na primer pri cistitisu – vnetju sečnega mehurja in kolitisu – vnetju dela debelega črevesa). Poleg teh pri vnetnih spremembah sodelujeta tudi encima inducibilna-ciklooksigenaza (COX-2) in inducibila dušikov-oksid-sintaza (iNOS) (12–13). Ciklooksigenaza (COX) je encim, s pomočjo katerega se sintetizirajo prostaglandini, ki imajo mnoge fiziološke učinke in so tudi posredniki v vnetnih procesih. Za razliko od konstitutivne oblike ciklooksigenaze (COX-1), ki je normalno prisotna v prebavilih, ledvicah in trombocitih, je inducibilna oblika COX-2 prisotna v endo-



Slika 3. Klasično histološko barvanje s hematoksilinom in eozinom. A – Hemoragični cistitis prvi dan po injekciji ciklofosfamida. Uroeljske celice (▼▲) so večinoma odstranjene in v vezivnem tkivu so prisotni številni rožnato obarvani eritrociti (↑). B – Po sočasnem vnosu ciklofosfamida in melatonina so na površini sečnega mehurja ohranjene uroeljske celice (▼▲). S – svetlina sečnega mehurja. Merilce 10 µm.

telnih celicah, fibroblastih in makrofagih po sprožitvi vnetja z različnimi vnetnimi dejavniki, kot sta lipopolisaharid (LPS) in interleukin 1 β (IL-1 β) (14). Podobno kot konstitutivna ciklooksigenaza (COX-1) sta tudi konstitutivni obliki dušikov-oxid-sintaze (nevronska oblika - nNOS in endotelijska oblika - eNOS) v celicah stalno prisotni, medtem ko sproži sintezo inducibilne oblike (iNOS) določeni citokini in bakterijski endotoksini (12-13, 15). Za nevronske in endotelijske oblike dušikov-oxid-sintaze je značilno, da se aktivirata s povečanjem koncentracije Ca²⁺ v celicah in da je njuna aktivnost kratkotrajna. Sintetizirajo se majhne količine dušikovega oksida (NO), ki je obveščevalna molekula in lahko povzroči celično delitev in diferenciacijo. V nasprotju s tem aktivnost inducibilne oblike ni odvisna od koncentracije Ca²⁺ in lahko traja nekaj dni. Inducibilna dušikov-oxid-sintaza sintetizira velike količine dušikovega oksida, ki so lahko za celico smrtne (12-13, 15). Izražanje obeh inducibilnih encimov kontrolira jedrni transkripcijski faktor kappa B (NF- κ B) (16-17). Raziskave so pokazale, da melatonin zavira sintezo dušikovega oksida (17) in zniža izražanje inducibilne dušikov-oxid-sintaze pri vnetju popljučnice (18).

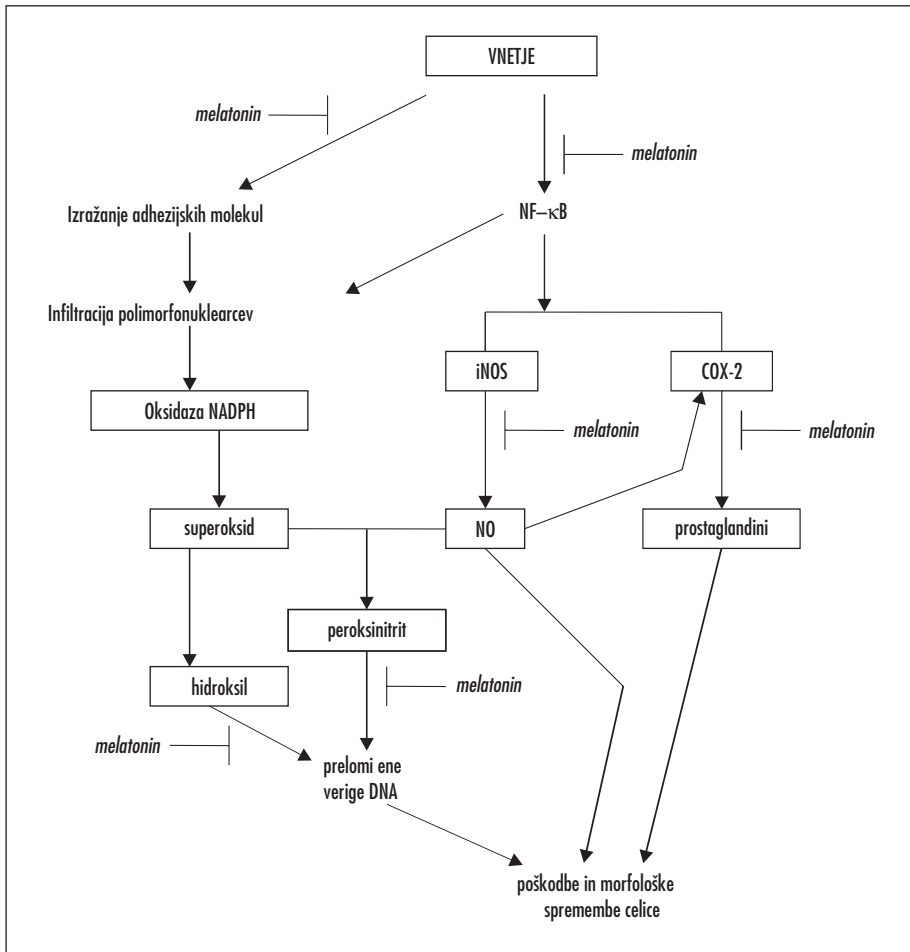
V lastnih raziskavah vnetja sečnega mehurja smo ugotovili, da se v času vnetja v urotelijskih celicah izraža inducibilna dušikov-oxid-sintaza (19). Zato nas je zanimalo, ali melatonin tudi pri vnetju sečnega mehurja zniža izražanje tega encima. Uporabili smo živalski model hemoragičnega cistitisa, povzročenege z enkratno intraperitonealno injekcijo ciklofosfamida. Analizirali smo izražanje inducibilne dušikov-oxid-sintaze v uroteliju sečnega mehurja podgan po injekciji samega ciklofosfamida ter ob sočasnem vnosu ciklofosfamida in melatonina. S pomočjo prenosa western, imunodetekcije in merjenja relativnih intenzitet proteinskih prog smo ugotovili, da melatonin zniža izražanje inducibilne dušikov-oxid-sintaze (slika 2) in tako omili vnetje (20). Pri kontrolnih živalih nismo zasledili izražanja inducibilne dušikov-oxid-sintaze (slika 2). Na sliki 3a je vidno, da prvi dan po injekciji ciklofosfamida pride do odstranjevanja urotelijskih celic in izpostavitve bazalne lamine. Znano je, da odstranjevanje urotelijskih celic povzročijo metaboliti

ciklofosfamida v urinu, ki povzročijo nekrotično odmiranje urotelijskih celic in njihovo apoptozo (19). V raziskavi smo ugotovili, da melatonin prvi dan po sočasnem vnosu ciklofosfamida in melatonina ohrani normoplastno stanje urotelija in prepreči odstranjevanje urotelijskih celic (slika 3b). Melatonin torej zniža izražanje inducibilne dušikov-oxid-sintaze v urotelijskih celicah in jih hkrati zaščiti pred odstranjevanjem (20).

Znižano izražanje inducibilne dušikov-oxid-sintaze je povezano z znanim inhibičnim učinkom melatonina na aktivacijo jedrnega transkripcijskega faktorja NF- κ B (21-23). Znano je, da melatonin zavira tudi izražanje inducibilne ciklooksigenaze (COX-2) (24). Cuzzocrea in Reiter (2) sta postavila model vnetnega procesa in nakazala mesta, na katerih naj bi melatonin deloval protivnetno (slika 4): (i) melatonin vpliva na aktivacijo jedrnega transkripcijskega faktorja NF- κ B; (ii) znižuje izražanje inducibilne dušikov-oxid-sintaze (iNOS) in inducibilne ciklooksigenaze (COX-2) na nivoju transkripcije ter (iii) zavira sintezo dušikovega oksida. Poleg tega pa melatonin tudi (iv) lovi in nevtralizira superoksidni radikal, kar zmanjšuje tvorbo peroksinitrita, (v) znižuje sintezo dušikovega oksida in tako še dodatno zmanjšuje nastajanje peroksinitrita ter (vi) nevtralizira peroksinitrit in hidrosilni radikal. Melatonin tudi (vii) zmanjša infiltracijo polimorfonuklearnih levkocitov na mestu vnetja, kar je verjetno posledica zmanjšanja oksidativne poškodbe endotelija in tako ohranjene endotelijske bariere (2).

VPLIV MELATONINA NA CELIČNO DELITEV IN SMRT

Od leta 1994, ko je izšlo prvo poročilo o vplivu melatonina na programirano celično smrt - apoptozo (25), se število tovrstnih dokazov stalno povečuje. Večino raziskav, ki so bile narejene na modelih *in vitro*, lahko razdelimo v tri skupine: (i) vlogo melatonina pri zavi-ranju apoptoze imunskih celic, (ii) vlogo melatonina pri preprečevanju apoptoze živčnih celic in (iii) vlogo melatonina pri pospeševanju celične smrti rakastih celic (26). Melatonin deluje protiapoptotsko tako na endotelne celice (27-28) kot tudi na pigmentne epitelne



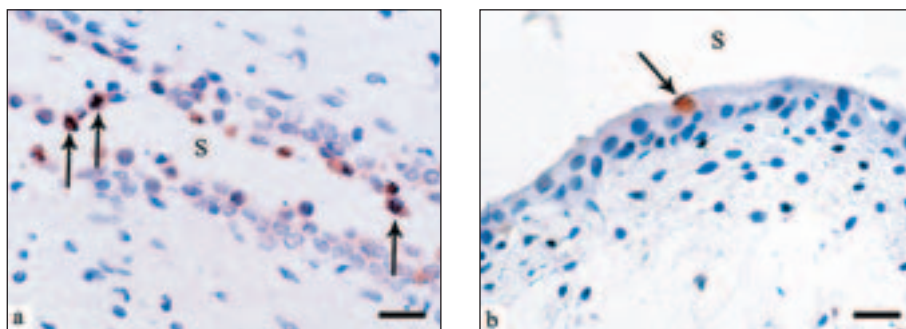
Slika 4. Model vnetnih poti (puščice) z mesti protivnetnega delovanja melatonina (2).

celice mrežnice (28). Tudi v naši raziskavi poškodbe urotelija po injekciji ciklofosfamida smo dokazali protiapoptotske učinke melatonina (20). S pomočjo apoptotskega označevalca aktivne kaspaze-3 smo spremljali apoptotsko aktivnost urotelijskih celic po injekciji ciklofosfamida. Ugotovili smo, da melatonin po sočasnem vnosu s ciklofosfamidom zniža apoptotsko aktivnost urotelijskih celic (slika 5). Elektronskomikroskopska študija je pokazala, da melatonin zaščiti urotelijske celice tudi pred nekrotično celično smrtjo (slika 6). Tako melatonin prepreči množično odmiranje in odstranjevanje urotelijskih celic, ki ga povzroči injekcija ciklofosfamida, in ohrani normoplastno stanje urotelija (20). Melatonin celo pri ishemični poškodbi ledvic prepreči

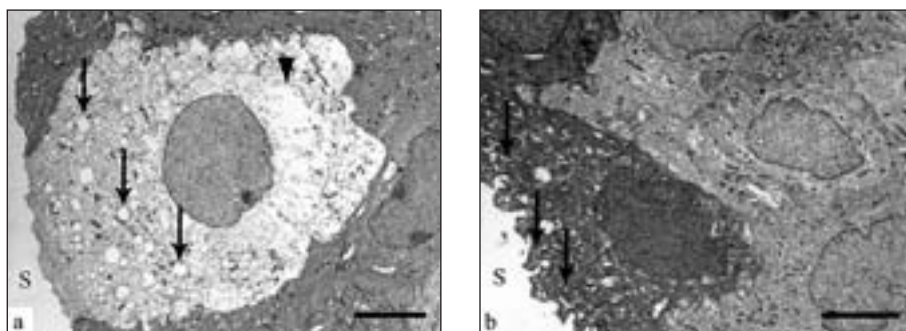
apoptozo in nekrozo, ki običajno sledi ponovni prekrvavitvi (29).

Mehanizmi, preko katerih melatonin vpliva na apoptozo, so le delno raziskani. Znano je, da so mitohondriji glavni vir reaktivnih kisikovih spojin v celici in ti prosti radikali naj bi igrali pomembno vlogo tudi pri apoptozi. Možno je, da melatonin s svojimi antioksidativnimi učinki spreminja odzivnost celice na apoptotske dražljaje (25). Obstajajo dokazi, da učinki melatonina niso omejeni le na njegovo sposobnost nevtraliziranja prostih radikalov, ampak lahko melatonin direktno vpliva tudi na različne regulirane poti apoptoze (29).

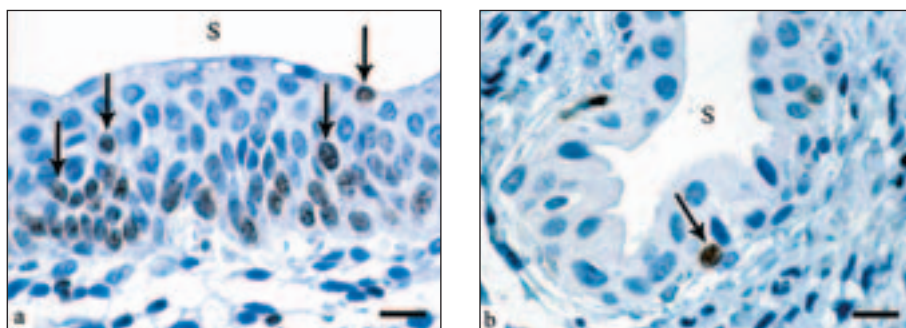
V različnih živalskih modelih karcinogeneze *in vitro* je melatonin zaviral proliferacijo celic in rast tumorja (30–33). Melatonin je



Slika 5. Imunohistokemija apoptotskega označevalca aktivne kaspaze-3. A – Prvi dan po injekciji ciklofosfamida se v svetlino sečnega mehurja (S) odstranjujejo številne aktivna kaspaza-3 pozitivne (rjavo obarvanje, ↑) apoptotske celice. B – Po sočasnem vnosu ciklofosfamida in melatonina so v uroteliju prisotne le posamezne aktivna kaspaza-3 pozitivne apoptotske celice (rjavo obarvanje, ↑). Merilce 10 µm.



Slika 6. Presečna elektronska mikroskopija. A – Nekrotična celica z nabreklo citoplazmo (▼) in številnimi povečanimi vezikli (↓) četrty dan po injekciji ciklofosfamida. B – Po sočasni aplikaciji ciklofosfamida in melatonina so urotelijske celice nepoškodovane in podobne normalnemu stanju. Površinske celice vsebujejo značilne fuziformne vezikle (↓). Merilce 5 µm.



Slika 7. Imunohistokemija proliferacijskega označevalca Ki-67. A – Sedmi dan po injekciji ciklofosfamida je urotelij hiperplastičen in številne urotelijske celice so Ki-67 pozitivne (rjavo obarvanje, ↓). B – Po sočasnem vnosu ciklofosfamida in melatonina so v normalnem uroteliju prisotne le redke Ki-67 pozitivne celice (rjavo obarvanje, ↓). Merilce 10 µm.

celo znižal proliferacijo epitelijskih celic in sintezo kolagena pri celjenju ran. Tudi pri obnovi urotelija po poškodbi s ciklofosamidom je melatonin zaviral proliferacijsko aktivnost urotelijskih celic in na ta način preprečil razvoj hiperplazije (slika 7) (20).

V študiji hepatoma pri podganah se je izkazalo, da melatonin poveča število celic v G0 in G1 fazi celičnega cikla in na ta način zaustavi nadaljevanje celičnega cikla in delitev celice (33). Melatonin torej direktno vpliva na specifične mehanizme celičnega cikla.

ZAKLJUČEK

Melatonin ima različne fiziološke funkcije, deluje pa tudi kot antioksidant, nevtralizira

različne proste radikale in stimulira delovanje nekaterih antioksidativnih encimov. Ker so prosti radikali vpleteni v procese vnetja, je pričakovati, da lahko melatonin zavira in preprečuje vnetje. Na nivoju celice melatonin zavira nekrotično in apoptotsko odmiranje celic in s tem zmanjša poškodbe celic in tkiv. V mnogih eksperimentalnih modelih neoplazij je dokazan zaviralni učinek melatonina na karcinogenezo. Melatonin namreč pospešuje apoptozo rakavih celic in zavira njihovo proliferacijo. Potrebne in smiselne so nove raziskave o značilnostih in delovanju melatonina, ki bodo pokazale, ali in v kakšni meri je možno njegove učinke uporabiti pri zdravljenju različnih bolezni.

LITERATURA

1. Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; 12: 151–80.
2. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2001; 426: 1–10.
3. Maestroni GJM. The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J Pineal Res* 1993; 14: 1–10.
4. Reiter RJ, Tan D, Sainz RM, et al. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54: 1299–321.
5. Blask DE, Dauchy RT, Sauer LA. Putting cancer to sleep at night: the neuroendocrine/circadian melatonin signal. *Endocrine* 2005; 27: 179–88.
6. Cochrane CG. Mechanism of oxidant injury of cells. *Mol Aspects Med* 1991; 12: 137–47.
7. Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, et al. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage and aging: a hypothesis. *J Pineal Res* 1993; 14: 151–69.
8. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, et al. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; 1: 57–60.
9. Hardeland R, Balzer I, Poeggeler B, et al. On the primary function of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in unicells, photo-oxidation and scavenging of free radicals. *J Pineal Res* 1995; 18: 104–11.
10. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, et al. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 1995; 18: 1–11.
11. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, et al. Significance of melatonin in antioxidative defence system: reactions and products. *Biol Signals Recept* 2000; 9: 137–59.
12. Wheeler MA, Smith SD, Weiss RM. Induction of nitric oxide synthase with urinary tract infections. *Adv Bladder Res* 1999; 359–69.
13. Mumtaz FH, Khan MA, Thompson CS, et al. Nitric oxide in the lower urinary tract: physiological and pathological implications. *BJU Int* 2000; 85: 567–78.
14. Morcos E, Jansson OT, Adolfsson J, et al. Bacillus Calmette-Guerin induces long-term local formation of nitric oxide in the bladder via the induction of nitric oxide synthase activity in urothelial cells. *J Urol* 2001; 165: 678–82.
15. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1999; 6: 3051–64.
16. Salzman AL, Denenberg AG, Ueta I, et al. Characterization of the induction and activity of the human nitric oxide synthase in a transformed intestinal epithelial cell line. *Am J Physiol* 1996; 270: G565–73.
17. Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, et al. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci* 1994; 55: PL455–60.
18. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gilard E, et al. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation. *J Pineal Res* 1997; 23: 106–16.
19. Jezernik K, Romih R, Mannherz HG, et al. Immunohistochemical detection of apoptosis, proliferation and inducible nitric oxide synthase in rat urothelium damaged by cyclophosphamide treatment. *Cell Biol Int* 2003; 27: 863–9.
20. Zupančič D. Zaščitna vloga melatonina pri poškodbi in obnovi urotelija po delovanju ciklofosamida [doktorsko delo] Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani; 2006.

21. Mohan N, Sadeghi K, Reiter RJ, et al. The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF-kappa B. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 37: 1063-70.
22. Gilad E, Cuzzocrea S, Zingarelli B, et al. Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. *Life Sci* 1997; 60: PL169-74.
23. Cuzzocrea S, Costantino G, Mazzon E, et al. Regulation of prostaglandin production in carrageenan-induced pleurisy by melatonin. *J Pin Res* 1999; 27: 9-14.
24. Maestroni GJ, Conti A, Lissoni P. Colony-stimulating activity and hematopoietic rescue from cancer chemotherapy compounds are induced by melatonin via endogenous interleukin 4. *Cancer Res* 1994; 54: 4740-3.
25. Sainz RM, Mayo JC, Rodriguez C, et al. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 1407-26.
26. Bertuglia S, Marchiafava PL, Colantuoni A. Melatonin prevents ischemia reperfusion injury an hamster cheek pouch microcirculation. *Cardiovasc Res* 1996; 31: 947-52.
27. Shaikh AY, Xu J, Wu Y, et al. Melatonin protects bovine cerebral endothelial cells from hyperoxia-induced DNA damage and death. *Neurosci Lett* 1997; 229: 193-7.
28. Osborne NN, Nash MS, Wood JP. Melatonin counteracts ischemia-induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 2374-83.
29. Kunduzova OR, Escourrou G, Seguelas MH, et al. Prevention of apoptotic and necrotic cell death, caspase-3 activation, and renal dysfunction by melatonin after ischemia/reperfusion. *FASEB J* 2003; 17: 872-4.
30. Zachary I, Woll PJ, Rozengurt A. A role for neuropeptides in the control of cell proliferation. *Dev Biol* 1987; 124: 295-308.
31. Hill SM, Blask DE. Effects of the pineal hormone on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer (MCF-7) in culture. *Cancer Res* 1988; 48: 6121-6.
32. Cini G, Coronello M, Mini E, et al. Melatonin's growth/inhibitorz effect on hepatoma AH 130 in the rat. *Cancer Lett* 1998; 125: 51-9.
33. Bulbulla N, Dogru O, Yekeler H, et al. Effect of melatonin on wound healing in normal and pinealectomized rats. *J Surg Res* 2005; 123: 3-7.

Prispelo 27.2.2007