

Agnieszka Bukowska

ROLA MELATONINY W PROCESACH ANTYNOWOTWOROWYCH — POTENCJALNE MECHANIZMY

ANTICARCINOGENIC ROLE OF MELATONIN — POTENTIAL MECHANISMS

Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera, Łódź

Zakład Epidemiologii Środowiskowej, Pracownia Epidemiologii

STRESZCZENIE

Od czasu wykrycia melatoniny w szyszynce bydłowej minęło już ponad 50 lat. Początkowo uznawano, że związek ten spełnia tylko funkcję regulatorową w procesach fizjologicznych zachodzących w rytmie dobowym, jednak w toku dalszych badań zaczęto temu hormonowi przypisywać inne właściwości, w tym także przeciwnowotworowe. Celem pracy był przegląd piśmiennictwa dotyczącego biologicznego znaczenia melatoniny, a w szczególności antynowotworowego działania tego hormonu. Do analizy wybrano prace anglojęzyczne, opublikowane od początku lat 60. do 2010 r., umieszczone w bazie Medline. Wyniki większości badań eksperymentalnych sugerują, że wpływ melatoniny na hamowanie procesów powstawania i wzrostu nowotworów hormonozależnych objawia się zmniejszeniem ekspresji receptorów estrogenowych i syntezy estradiolu. Ochronne właściwości melatoniny przed rozwojem nowotworów mogą polegać także na spowolnieniu proliferacji komórek nowotworowych, zmniejszeniu stresu oksydacyjnego oraz stymulującym działaniu na układ immunologiczny — na co wskazują wyniki większości badań *in vitro* lub *in vivo*. Mimo że zdecydowana większość prac potwierdza hipotezy o przeciwnowotworowych właściwościach melatoniny, nie jest pewne, czy takie efekty jej działania występują w warunkach naturalnych. Bardzo dużo modeli eksperymentalnych bowiem prowadzono w warunkach ekstremalnych, z użyciem wysokich dawek melatoniny, poddając zwierzęta pinealektomii lub aplikując im substancje kancerogenne. Do tej pory przeprowadzono niewiele badań epidemiologicznych potwierdzających wyniki badań eksperymentalnych. Med. Pr. 2011;62(4):425–434

Słowa kluczowe: melatonina, stres oksydacyjny, nowotwory hormonozależne

ABSTRACT

Over 50 years have passed since the detection of melatonin in the cattle pineal gland. Initially melatonin was believed to be only a regulator of physiological circadian rhythm processes, however, further studies have revealed other characteristics of this hormone, including its anticarcinogenic activity. The aim of this work was to review the literature on biological role of melatonin, with special reference to its oncostatic activity. The review covered the articles published from the early 1960's to 2010, collected in the MEDLINE database. The majority of experimental *in vitro* and *in vivo* studies suggest that melatonin inhibits initiation and growth of hormone-dependent tumors by decreasing both the expression of estrogen receptors and aromatase activity. The protective oncostatic activity of melatonin is likely to be expressed through the inhibition of cancer cell proliferation, decrease in oxidative stress and increase in immune system activity. Although most of the studies confirm a hypothesis of an anticarcinogenic effect of melatonin, it is not clear whether these effects occur in natural conditions. The majority of experimental models have been applied in extreme conditions, including high doses of melatonin, pinealectomy or exposure to carcinogens. To date, there are only limited epidemiological data supporting experimental observations. Med Pr 2011;62(4):425–434

Key words: melatonin, oxidative stress, hormone-dependent tumors

Adres autorki: Zakład Epidemiologii Środowiskowej, Pracownia Epidemiologii,
Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera, ul. św. Teresy 8, 91-348 Łódź; e-mail: bukowska@imp.lodz.pl
Nadesłano: 27 maja 2011
Zatwierdzono: 15 czerwca 2011

WSTĘP

Melatonina jest hormonem spełniającym w organizmie liczne funkcje, a w ciągu ostatnich 20 lat bardzo dynamicznie rozwijała się wiedza dotycząca jej właściwości antynowotworowych.

Istnienie potencjalnego związku między niedostateczną syntezą melatoniny przez szyszynkę a wystąpieniem zwiększonego ryzyka zachorowania na raka piersi zostało po raz pierwszy zasugerowane przez grupę badaczy z National Cancer Institute w USA (1). Następnie Stevens w 1987 r. sformułował hipotezę o udziale indu-

strializacji w etiologii raka piersi poprzez hamowanie syntezy melatoniny w wyniku ekspozycji na sztuczne światło w nocy (2). Hipoteza ta znalazła potwierdzenie w kilku (3,4), choć nie we wszystkich, badaniach epidemiologicznych (5). W badaniu przekrojowym pielęgniarek obserwowano zmniejszenie wydzielania metabolitu melatoniny (siarczanu 6-hydroksymelatoniny) wydalanego wraz z moczem po pracy w nocy (3). W niektórych analizach epidemiologicznych obserwowano nadwyżki ryzyka zachorowania na raka piersi u kobiet pracujących na zmiany nocne (6), a w kilku badaniach prospektywnych obserwowano zmniejszenie ryzyka zachorowania na raka piersi u kobiet, u których stężenia metabolitu melatoniny w próbkach moczu były najwyższe, w porównaniu z kobietami, u których te poziomy były niskie (4). Sugestie przemawiające za ochronną rolą melatoniny wydają się stosunkowo silne, jednak rozbieżności wyników badań epidemiologicznych i niespójność stosowanych w nich metod oznaczeń melatoniny utrudnia sformułowanie ostatecznych wniosków.

Poznanie mechanizmów warunkujących udział melatoniny w procesie kancerogenezy, szczególnie w warunkach zaburzeń jej syntezy, jest istotne dla wyjaśnienia przyczyn obserwowanego zwiększenia ryzyka zachorowania na wybrane nowotwory złośliwe (w tym głównie raka piersi) u osób pracujących na zmiany nocne.

Celem pracy jest przegląd opublikowanych wyników badań eksperymentalnych na zwierzętach i liniach komórkowych i podsumowanie aktualnej wiedzy na temat opisanych wyżej mechanizmów.

REGULACJA SYNTEZY MELATONINY

Melatonina (N-acetylo-5metoksytryptamina) jest hormonem należącym do grupy indoloamin. U kręgowców syntetyzowana jest głównie w szyszynce i wydzielana bezpośrednio do krwi. Ten niewielki gruczoł (jego masa u człowieka to ok. 100–200 mg) zlokalizowany jest w nadwzgorzu mózgu (*epithalamus*). Poziom melatoniny we krwi zmienia się cyklicznie w ciągu doby, ponieważ światło odgrywa kluczową rolę w biosyntezie tego związku. W nocy jej stężenie w osoczu człowieka jest wysokie (ok. 125 pg/ml), a w dzień znacznie maleje (ok. 10 pg/ml).

Cykliczne wydzielanie melatoniny w rytmie okołodobowym jest charakterystyczne dla wszystkich kręgowców, niezależnie od tego, czy organizmy określonego gatunku prowadzą dzienny czy nocny tryb życia (7). Komórki zwojowe siatkówki oka pełnią funkcję fotoreceptorów odbierających impulsy świetlne i tym

samym regulują proces syntezy melatoniny. Ekspozycja na światło hamuje proces biosyntezy melatoniny, dlatego światło jest kluczowym czynnikiem ograniczającym sekrecję melatoniny. Badania eksperymentalne wykazały, że w wyniku ekspozycji na światło w nocy dochodzi do nagłej proteolizy N-acetylotransferazy serotoniny w pinealocytach szczurów — enzymu odgrywającego kluczową rolę w procesie biosyntezy melatoniny (8). Bardzo dynamiczna regulacja poziomu melatoniny poprzez jej cykliczną syntezę oraz szybką degradację sugeruje, że hormon ten może być precyzyjnym i skutecznym sposobem przekazu informacji o ekspozycji na światło dla całego organizmu.

RECEPTORY MELATONINOWE

Melatonina wpływa na metabolizm komórek docelowych głównie poprzez oddziaływanie z receptorami melatoninowymi. Błonowe receptory melatoninowe u ssaków znajdują się głównie w komórkach układu nerwowego, siatkówki, nerek, przewodu pokarmowego, wątroby, gonad, skóry oraz układu immunologicznego (9). Melatonina poprzez aktywację receptorów błonowych (MT1 lub MT2) wpływa m.in. na działanie kanałów jonowych, stężenie przekaźników wtórnych oraz ekspresję i aktywność wielu białek enzymatycznych (10–12).

Melatonina może wnikać do komórki i w jądrze komórkowym asocjować z receptorami RZR/ROR (retinoic acid Z receptor, orphan receptor). Wzbudzenie receptorów jądrowych RZR/ROR przez melatoninę ma prawdopodobnie związek ze zmianą czynnościową układu immunologicznego lub wzrostem komórki (13).

FUNKCJE MELATONINY

Melatonina jest cząsteczką odpowiedzialną za regulację wielu procesów fizjologicznych. Uczestniczy m.in. w stabilizowaniu rytmu dobowego (wpływa na czas trwania fazy snu i czuwania), który ściśle związany jest z rytmem temperatury ciała (7). Egzogenna melatonina podawana osobom niewidomym stabilizuje u nich przebieg zmian fizjologicznych zachodzących cyklicznie w rytmie okołodobowym w wyniku jej bezpośredniego działania na zegar biologiczny (14).

Stosunek długości dnia do długości nocy zależny od pory roku ma duży wpływ na poziom melatoniny we krwi zwierząt. Zimą wysokie stężenie melatoniny utrzymuje się przez dłuższy czas, a latem krócej. Dla zwierząt zwiększenie lub zmniejszenie nocnej sekrecji

melatoniny jest ważną informacją o nadchodzących zmianach w środowisku, które związane są ze zmianą pory roku. Do sezonowych i cyklicznych zmian zachowań zwierząt zalicza się m.in. czas rozrodu (15).

Badania eksperymentalne wskazują na to, że melatonina może wpływać na aktywność rozrodczą ssaków, ponieważ hormon ten odgrywa dużą rolę w secrecji hormonów podwzgórza, przysadki i gonad (15) poprzez gonadoliberynę (ang. gonadotropin-releasing hormone — GnRH). Hormon ten pulsacyjnie wydzielany przez komórki podwzgórza reguluje secrecję hormonu folikulotropowego (ang. follicle-stimulating hormone — FSH) i hormonu luteinizującego (ang. luteinizing hormone — LH) przez przysadkę, a poprzez hormony LH i FSH wpływa na aktywność gonad. Badania przeprowadzone na linii komórek neuronów podwzgórza GT1-7 wykazały, że melatonina reguluje ekspresję genu kodującego hormon GnRH. Inkubacja komórek GT1-7 w medium zawierającym melatoninę powodowała zmniejszenie wydzielania hormonu GnRH już po 1-godzinnej inkubacji (16).

Obecność błonowych receptorów melatoninowych na komórkach gonad, a także występowanie receptorów hormonów płciowych w komórkach pinealocytów sugerują silny związek melatoniny z układem rozrodczym (17,18). Związek melatoniny z czynnością rozrodczą kobiet mogą sugerować wyniki badań pacjentek z podwzgórzowym brakiem miesiączki, u których zaobserwowano prawie trzykrotnie wyższy poziom nocnej secrecji melatoniny niż u kobiet zdrowych (19). Rola melatoniny w regulacji aktywności rozrodczej kobiet nadal jednak nie jest w pełni wyjaśniona.

MELATONINA A ROZWÓJ NOWOTWORÓW

Badanie zależności między zaburzeniami wydzielania melatoniny a rozwojem nowotworów prowadzone jest od początku lat 70. ubiegłego wieku. Wiele eksperymentalnych badań dotyczących rozwoju nowotworów u zwierząt przeprowadzono, wykorzystując możliwość chemicznej indukcji nowotworu przy użyciu 7,12-dimetylobenzantracenu lub N-nitrozo-N-metylomocznika. Najczęstszym modelem *in vivo* był gruczolakorak (*adenocarcinoma*) indukowany u szczurów 7,12-dimetylobenzantracenenem.

Badanie polegające na podawaniu szczurzym samicom melatoniny przed podaniem kancerogenu lub podawaniu melatoniny po podaniu związku indukującego powstawanie nowotworu, lub tylko samo zaaplikowanie kancerogenu wykazało, że w grupach zwierząt,

którym podawano melatoninę przed zaaplikowaniem lub po zaaplikowaniu 7,12-dimetylobenzantracenu, następowało znaczne zmniejszenie częstości powstania nowotworów. Zaobserwowano także mniejszą liczbę osobników z nowotworami w porównaniu z grupą zwierząt, którym podano tylko sam kancerogen (20). Chirurgicalne usunięcie szyszynki ma także duży wpływ na przebieg procesu kancerogenezy, co było wielokrotnie badane (21). Badanie, w którym szczury zostały poddane pinealektomii, a następnie zaaplikowano im kancerogen (7,12-dimetylobenzantracenen), wykazało u zwierząt po pinealektomii znacznie większą liczbę nowotworów niż u zwierząt z grupy kontrolnej. W dodatku podawanie melatoniny zwierzętom po pinealektomii częściowo zredukowało liczbę nowotworów w przeciwieństwie do grupy zwierząt poddanych tylko samej pinealektomii i działaniu kancerogenu (22).

Sprawdzono także, czy warunki oświetlenia mające kluczowe znaczenie w secrecji melatoniny mogą wpływać na rozwój nowotworów indukowanych kancerogenem. Podawanie melatoniny zwierzętom po chirurgicznym usunięciu szyszynki, eksponowanym na stałe, 24-godzinne oświetlenie zmniejszyło liczbę gruczolakoraków indukowanych chemicznie 9,10-dimetylo-1,2-benzantracenenem w stosunku do liczby nowotworów u zwierząt, którym nie podawano melatoniny po aplikacji kancerogenu. W tym samym badaniu wykazano także, że w grupie zwierząt eksponowanych na 10-godzinne oświetlenie w rytmie dobowym (10:14 godzin) zaobserwowano mniej przypadków wystąpienia nowotworu indukowanego kancerogenem niż u zwierząt eksponowanych na 24-godzinne oświetlenie.

Melatonina redukowała także liczbę nowotworów indukowanych 9,10-dimetylo-1,2-benzantracenenem u zwierząt po pinealektomii eksponowanych na 10-godzinne oświetlenie w ciągu doby (10:14 godzin). Dowiedziano także, że nie tylko liczba zwierząt, u których doszło do rozwoju nowotworu po ekspozycji na światło przez 24 godziny jest większa niż u zwierząt eksponowanych na 10-godzinne oświetlenie, ale także czas latencji nowotworów ulega wyraźnemu skróceniu. W grupie zwierząt poddanych pinealektomii i narażonych na 24-godzinne ekspozycję na światło również zaobserwowano krótszy czas latencji chemicznie indukowanego nowotworu w przeciwieństwie do zwierząt poddanych pinealektomii oraz eksponowanych na 10-godzinne oświetlenie w cyklu dobowym (23). Badanie przeprowadzone *in vivo* na szczurach z wykorzystaniem N-nitrozo-N-metylomocznika jako induktora karcenogenezy także potwierdziło właściwości antynowotworowe melatoniny (24).

Antyoksydacyjne właściwości melatoniny

Antynowotworowe działanie melatoniny przejawia się na różnych etapach kancerogenezy. Dzięki właściwościom antyoksydacyjnym zapobiega ona gromadzeniu się w komórce reaktywnych form tlenu mogących uszkadzać cząsteczki DNA (25,26).

Melatonina jest antyoksydantem i powoduje zmniejszenie stresu oksydacyjnego (26). Niektórzy autorzy sugerują, że jej właściwości antyoksydacyjne są znacznie skuteczniejsze niż działanie glutationu, witaminy E lub kwasu askorbinowego (26). Działanie ochronne melatoniny polega na zwiększeniu aktywności enzymów antyoksydacyjnych, m.in. dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej (27–29), zmniejszeniu aktywności enzymów prooksydacyjnych (np. syntaza tlenu azotu) (30), a także na jej bezpośrednich reakcjach z reaktywnymi formami tlenu, takimi jak rodnik hydroksylowy, nadtlenek wodoru czy tlen singletowy (25,31,32). Melatonina jest cząsteczką „bogata w elektrony”, więc spełnia funkcję donora elektronów dla wysoce reaktywnych wolnych rodników, m.in. dla rodnika hydroksylowego. Produktem końcowym interakcji melatoniny z rodnikiem hydroksylowym jest 3-hydroksymelatonina wydalana wraz z moczem (25). W wielu badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że melatonina spowalnia proces powstawania tlenu azotu poprzez zmniejszenie ekspresji i aktywności katalitycznej syntazy tlenu azotu. Odbywa się to prawdopodobnie za pośrednictwem białka regulatorowego — kalmoduliny (27).

Badania eksperymentalne przeprowadzone na zwierzętach oraz badania *in vitro* na liniach komórkowych wykazały, że melatonina zwiększa aktywności enzymów antyoksydacyjnych prawdopodobnie poprzez wzrost ich ekspresji. Zaobserwowano zwiększony poziom mRNA katalazy, peroksydazy glutationowej oraz dysmutazy ponadtlenkowej w wyniku obecności melatoniny (33–35). Większą ekspresję enzymów antyoksydacyjnych obserwowano w warunkach, w których stężenie hormonu było fizjologiczne lub bliskie fizjologicznemu. Molekularny mechanizm udziału melatoniny w regulacji ekspresji i aktywności enzymów antyoksydacyjnych nie został jeszcze dokładnie poznany. Prawdopodobnie w transdukcji sygnału uczestniczą melatoninowe receptory błonowe, system wtórnych przekaźników, a także receptory jądrowe (34,36).

Jak wykazały badania, zarówno sekwencje genów dysmutazy ponadtlenkowej, jak i peroksydazy glutationowej posiadają miejsca wiązania wielu czynników transkrypcyjnych, m.in. NF- κ B. Aktywacja czynnika

transkrypcyjnego NF- κ B odgrywa kluczową rolę w ekspresji genu kodującego mitochondrialną dysmutazę ponadtlenkową. Wykazano, że melatonina wpływa na aktywację tego czynnika, czyli prawdopodobnie może pośredniczyć w regulacji ekspresji enzymów antyoksydacyjnych (34). Melatonina zwiększa także aktywność enzymów uczestniczących w procesie syntezy i regeneracji glutationu: syntetazy γ -glutamylcysteinowej, reduktazy glutationowej oraz transferazy glutationowej (35–37). Jak wykazano, wzrost ekspresji syntetazy γ -glutamylcysteinowej w wyniku działania melatoniny prawdopodobnie zachodzi za pośrednictwem czynnika transkrypcyjnego AP-1, czego rezultatem jest znaczne zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu (36).

Stres oksydacyjny wywołany nagromadzeniem się i działaniem reaktywnych form tlenu promuje proces peroksydacji lipidów, który m.in. prowadzi do dezintegracji błony komórkowej. Szkodliwe działanie reaktywnych form tlenu prowadzi także do uszkodzeń cząsteczek DNA i białek, powodując znaczne upośledzenie prawidłowego funkcjonowania komórki, a niekiedy nawet apoptozę. Działanie protekcyjne melatoniny przed skutkami nagromadzenia się reaktywnych form tlenu przyczynia się więc znacznie do prawidłowego funkcjonowania komórek i całego organizmu.

Zmiana czynnościowa układu immunologicznego

Melatonina odgrywa ważną rolę w regulacji działania układu immunologicznego. Maestroni i wsp. pierwsi udowodnili, że zmniejszenie syntezy melatoniny prowadzi do obniżenia komórkowej i humoralnej odpowiedzi immunologicznej u myszy (38). Melatonina prawdopodobnie zwiększa aktywność komórek NK (natural killer) i fagocytów (39,40). Badania wykazały, że hormon ten powoduje zwiększenie syntezy interleukiny 2 (IL-2), interleukiny 6 (IL-6) oraz interferonu γ (IFN- γ) przez komórki jednojądrzaste (41), a także zwiększenie wydzielania interleukiny 12 (IL-12) przez ludzkie monocyty (42). Wykazano również, że hormon ten hamuje proces apoptozy komórek układu immunologicznego (43).

Obecność enzymów uczestniczących w procesie biosyntezy melatoniny opisano w ludzkich limfocytach. Miejscowo syntetyzowana melatonina ma prawdopodobnie działanie autokrynne. Występowanie specyficznych miejsc odpowiedzialnych za wiązanie melatoniny na komórkach limfocytów świadczy o możliwości bezpośredniego działania tego hormonu na komórki układu immunologicznego (44).

Regulacja przebiegu cyklu komórkowego

Melatonina hamuje dynamikę podziałów komórek nowotworowych, opóźniając rozpoczęcie fazy S cyklu komórkowego. Badania przeprowadzone na linii ludzkich komórek nowotworu piersi (MCF-7), u których występuje błonowy receptor melatoninowy MT1 (45) wykazały, że melatonina spowalnia lub blokuje proces inicjacji fazy S komórek będących w fazie G1 lub G0 (46), spowalnia proces syntezy DNA w komórkach będących w fazie S, wydłuża czas trwania cyklu komórkowego (47,48), a także zwiększa poziom białek p53 i p21 (49). Wzrost stężenia białka p53 w komórce powoduje zwiększenie ekspresji białka p21, które jest inhibitorem kinaz cyklozależnych (cyclin-dependent kinases — CDK). Spadek aktywności enzymatycznej kinaz cyklozależnych prowadzi do zmniejszenia poziomu ufosforylowanego białka pRb i w efekcie powoduje zatrzymanie procesu inicjacji fazy S cyklu komórkowego (50). Zablockowanie cyklu w fazie G1 prowadzi komórki do wejścia w fazę spoczynku (G0), a następnie powoduje rozpoczęcie różnicowania. Badania eksperymentalne na komórkach MCF-7 wykazały, że komórki inkubowane w medium hodowlanym zawierającym melatoninę charakteryzowały się wyższym poziomem zróżnicowania niż komórki linii kontrolnej (51). W komórkach tych wzrost stężenia białka p53 nie indukował procesu apoptozy (52).

Antyproliferacyjny wpływ melatoniny na komórki MCF-7 jest najsilniejszy wtedy, gdy stężenie hormonu w medium hodowlanym jest zbliżone do fizjologicznego stężenia hormonu w surowicy podczas nocnego wydzielania u większości ssaków. Proces ten jest odwracalny, ponieważ wraz z usunięciem melatoniny z pożywki zostaje przywrócony naturalny rytm wzrostu badanej linii komórkowej (51).

Właściwości antyestrogenowe melatoniny

W związku z właściwościami antyproliferacyjnymi melatoniny obserwowanymi w liniach ludzkich komórek nowotworu piersi, w których ulegają ekspresji receptory estrogenowe, a także w oparciu o wyniki eksperymentu wykazującego, że melatonina blokuje proliferację komórek MCF-7 indukowaną estrogenami powstała hipoteza, zgodnie z którą właściwości onkostatyczne melatoniny mają związek ze szlakiem odpowiedzi komórkowej na estrogeny (53). Melatonina wpływa na szlak transdukcji sygnału estrogenów oraz redukuje rozwój nowotworów hormonozależnych poprzez modyfikowanie ekspresji genów receptorów estrogenowych (45). Wyniki przeprowadzonych badań wykazują,

że melatonina nie asocjuje z receptorami estrogenowymi (54), lecz zmniejsza ekspresję receptora estrogenowego ER α (45) oraz blokuje wiązanie kompleksu receptor estrogenowy – estradiol z miejscem ERE (estrogen response element) na DNA, co w efekcie hamuje proces transkrypcji genów zależnych od tego kompleksu (54). Antyestrogenowe działanie melatoniny prawdopodobnie nie jest związane z aktywacją melatoninowych receptorów jądrowych (54), lecz jest zależne od aktywacji receptora melatoninowego MT1 (45,55).

Antyestrogenowe właściwości melatoniny mogą prawdopodobnie mieć związek z wtórnym przekaźnikiem — cyklicznym AMP, ponieważ estrogeny w wyniku asocjacji z błonowym receptorem estrogenowym aktywują cyklazę adenylanową, co prowadzi do wzrostu poziomu cAMP w komórce. Aktywacja melatoninowych receptorów błonowych prowadzi do efektu o charakterze antagonistycznym — zmniejsza aktywność enzymatyczną cyklazy adenylanowej i obniża poziom cAMP (56,57).

Estradiol może być syntetyzowany z testosteronu w wyniku aktywności aromatazy (EC 1.14.14.1) — kluczowego enzymu uczestniczącego w procesie biosyntezy estradiolu. W badaniach *in vitro* na linii komórek MCF-7 zaobserwowano zwiększoną ekspresję aromatazy. Komórki te są więc zdolne do syntezy estrogenów z androgenów. Lokalnie zsintetyzowany estradiol może więc asocjować z receptorami estrogenowymi, wpływając tym samym na regulację wielu procesów fizjologicznych, w tym także na proliferację komórki. Badania eksperymentalne prowadzone z użyciem komórek MCF-7 wykazały, że melatonina w fizjologicznym stężeniu redukuje proliferację komórek stymulowaną obecnością testosteronu w medium hodowlanym. Doświadczenia wykazały także, że melatonina nie tylko obniża aktywność aromatazy komórek MCF-7, ale także hamuje ekspresję tego enzymu. Najsilniejsze obniżenie aktywności oraz ekspresji aromatazy zaobserwowano przy fizjologicznym stężeniu melatoniny (58). Wpływ melatoniny na aktywność i ekspresję aromatazy w komórkach MCF-7 odbywa się za pośrednictwem receptora melatoninowego MT1, a wtórnym przekaźnikiem zaangażowanym w transdukcję sygnału prawdopodobnie jest cAMP. Zastugowano, że wpływ melatoniny na aktywność aromatazy może zachodzić przy udziale cAMP, ponieważ ekspresja genu kodującego aromatazę jest zależna od cAMP. Melatonina, zmieniając poziom cAMP, może więc jednocześnie indukować zmiany w ekspresji aromatazy (58,59).

Zmniejszenie aktywności enzymatycznej aromatazy przez melatoninę potwierdziło badanie *in vivo* przeprowadzone na szczurach z nowotworem indukowanym dimetylobenzantracem. Po podaniu związku kancerogenego zwierzęta poddano owariektomii. Usunięcie jajników zdecydowanie zmniejszyło liczbę i rozmiar nowotworów indukowanych kancerogenem, podczas gdy podawanie testosteronu zwierzętom po owariektomii znacznie stymulowało rozwój nowotworu. Podawanie melatoniny lub inhibitora aromatazy (aminoglutetymidu) szczurom po usunięciu jajników, którym podawano testosteron, zmniejszyło działanie testosteronu stymulujące rozwój nowotworu (60).

Prawdopodobnie antyestrogenowe działanie melatoniny możliwe jest także za pośrednictwem białka regulatorowego — kalmoduliny. Badanie eksperymentalne wykazało, że receptor estrogenowy ER α (ale nie ER β) ma miejsce wiązania kalmoduliny i może tworzyć z nią kompleks. Kalmodulina prawdopodobnie stabilizuje wiązanie kompleksu receptor estrogenowy–estradiol z regionem ERE na DNA (61). Melatonina może bezpośrednio wiązać się z kalmoduliną, czyli tworzenie się kompleksu melatoniny z kalmoduliną może być potencjalnym mechanizmem antyestrogenowych, a zarazem antynowotworowych właściwości melatoniny (62).

Blokowanie pobierania kwasów tłuszczowych

Kolejnym dowodem antynowotworowych właściwości melatoniny są badania przeprowadzone na komórkach

wątrobiaka. Wykazano, że onkostatyczne działanie melatoniny ma związek z blokowaniem pobierania przez komórki kwasów tłuszczowych, a w szczególności kwasu linolowego, co uniemożliwia tworzenie się metabolitu kwasu linolowego — kwasu 13-hydroksyoktadekadienowego, substancji będącej mitogenem. Uniemożliwienie pobierania kwasów tłuszczowych przez komórki wątrobiaka jest zależne od wzbudzenia przez melatoninę błonowych receptorów melatoninowych (63,64). Badania eksperymentalne wykazują onkostatyczne działanie melatoniny w liniach komórkowych różnych typów nowotworów, m.in. komórkach nowotworu jajnika, jelita i endometrium (65–67). Bardzo liczne wyniki badań *in vitro* i *in vivo* dostarczają wyraźnych dowodów wskazujących na onkostatyczne właściwości melatoniny, jednak biochemiczny mechanizm hamowania procesu kancerogenezy przez ten hormon nie jest jeszcze całkowicie poznany.

PODSUMOWANIE

Wiedza dotycząca melatoniny jest bardzo rozległa, a zainteresowanie naukowców właściwościami i funkcjami biologicznymi tej niezwyklej cząsteczki nadal jest bardzo duże. Obecnie dobrze poznany jest proces biosyntezy i metabolizmu melatoniny, jej właściwości antyoksydacyjne i immunomodulacyjne. Z badań *in vitro* i *in vivo* wynika, że melatonina odgrywa także ważną rolę w hamowaniu procesu nowotworzenia. Podsumowanie głównych potencjalnych mechanizmów warunkujących antynowotworowe działanie melatoniny

Tabela 1. Potencjalne funkcje melatoniny w hamowaniu procesu kancerogenezy
Table 1. Potential functions of melatonin in oncostatic actions

Funkcja Function	Mechanizm Mechanism
Antyoksydacyjne właściwości melatoniny / Melatonin as antioxidant	<ul style="list-style-type: none"> – zwiększenie aktywności i ekspresji enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazy glutationowej / increased activity and expression of antioxidant enzymes: superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase – zmniejszenie aktywności enzymów prooksydacyjnych: syntazy tlenu azotu / decreased activity of prooxidant enzymes: nitric oxide synthase – reakcja z reaktywnymi formami tlenu: rodnik hydroksylowy, tlen singletowy lub nadtlenek wodoru / interaction with reactive oxygen species: hydroxyl radical, singlet oxygen or hydrogen peroxide – zwiększenie aktywności enzymów związanych z syntezą i regeneracją glutationu (zwiększenie stężenia glutationu) / increased activity of glutathione reductase (regeneration of glutathione)
Zmiana czynnościowa układu immunologicznego / Modulation of the immune system	<ul style="list-style-type: none"> – zwiększenie aktywności komórek NK oraz pozostałych komórek układu immunologicznego / increased activity of NK cells and other cells of the immune system – regulacja sekrecji IL-2, IL-6, IL-12 oraz IFN-γ / regulation of secretion of IL-2, IL-6 and IL-12 and IFN-γ – hamowanie apoptozy komórek układu immunologicznego / inhibition of apoptosis of immune system cells

Tabela 1. Potencjalne funkcje melatoniny w hamowaniu procesu kancerogenezy — cd.
Table 1. Potential functions of melatonin in oncostatic actions — cont.

Funkcja Function	Mechanizm Mechanism
Regulacja przebiegu cyklu komórkowego / Regulation of cell cycle	<ul style="list-style-type: none"> – opóźnianie lub zatrzymanie inicjacji fazy S cyklu komórkowego / retarding or blocking progression of cells from G1 into S phase – zwiększenie długości cyklu komórkowego / increased length of the cell cycle – zwiększenie poziomu białek p53 oraz p21 / increased levels of p53 and p21 proteins – zwiększenie zróżnicowania komórek / increased cell differentiation
Właściwości antyestrogenowe / / Antiestrogenic activity	<ul style="list-style-type: none"> – zmniejszenie ekspresji ERα / decreased expression of ERα – blokowanie asocjacji kompleksu estradiol-ER z miejscem ERE na DNA / blocks binding the estradiol-ER complex to the estrogen response element (ERE) on DNA – zmniejszenie poziomu cAMP / decreased cAMP levels – zmniejszenie aktywności aromatazy / inhibited activity of aromatase
Blokowanie pobierania kwasów tłuszczowych / Inhibition of fatty acid uptake	– blokowanie pobierania przez komórki kwasu linolowego, które zapobiega tworzeniu się związku indukującego mitozę (kwasu 13-hydroksyoktadekadienowego) / inhibition of linoleic acid uptake into cells and prevention of the formation of its mitogenic metabolite (13-hydroxyoctadecadienoic acid)

zawarto w tabeli 1. Zmniejszanie ekspresji receptorów estrogenowych i syntezy estradiolu zmniejsza ryzyko powstawania i rozwoju nowotworów hormonozależnych. Wydłużanie czasu trwania cyklu komórkowego, opóźnianie inicjacji fazy S, spowalnianie syntezy DNA, a także zwiększanie poziomu inhibitora kinaz cyklinozależnych powoduje znaczne spowolnienie lub zatrzymanie cyklu komórkowego komórek nowotworowych. Zmniejszanie stresu oksydacyjnego chroni komórki przed uszkodzeniami DNA i powstawaniem mutacji, natomiast stymulujące działanie na układ immunologiczny zwiększa odporność organizmu.

PODZIĘKOWANIA

Autorka wyraża podziękowanie dr hab. Jolancie Gromaźńskiej, prof. Januszowi Maszewskiemu oraz dr Beacie Peplńskiej za cenne rady i wskazówki.

PIŚMIENNICTWO

1. Cohen M., Lippman M., Chabner B.: Pineal gland and breast cancer. *Lancet* 1978;2(8104):1381–1382
2. Stevens R.G.: Electric power use and breast cancer: a hypothesis. *Am. J. Epidemiol.* 1987;125(4):556–561
3. Marie H.A., Helene G.A., Hansen J.: Diurnal urinary 6-sulfatoxymelatonin levels among healthy Danish nurses during work and leisure time. *Chronobiol. Int.* 2006;23(6):1203–1215
4. Schernhammer E.S., Berrino F., Krogh V., Secreto G., Micheli A., Venturelli E. i wsp.: Urinary 6-sulphatoxymelatonin levels and risk of breast cancer in premenopausal women: the ORDET cohort. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2010;19(3):729–737
5. Travis R.C., Allen D.S., Fentiman I.S., Key T.J.: Melatonin and breast cancer: a prospective study. *J. Natl. Cancer Inst.* 2004;96(6):475–482
6. Brudnowska J., Peplńska B.: Praca zmianowa nocna a ryzyko choroby nowotworowej — przegląd literatury. *Med. Pr.* 2011;62(3):323–338
7. Arendt J., Skene D.J.: Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med. Rev.* 2005;9(1):25–39
8. Gastel J.A., Roseboom P.H., Rinaldi P.A., Weller J.L., Klein D.C.: Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 1998;279(5355):1358–1360
9. Ekmekcioglu C.: Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomed. Pharmacother.* 2006;60(3):97–108
10. Huan C., Zhou M., Wu M., Zhang Z., Mei Y.: Activation of melatonin receptor increases a delayed rectifier K⁺ current in rat cerebellar granule cells. *Brain Res.* 2001;917(2):182–190
11. Godson C., Reppert S.M.: The Mella melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 1997;138(1):397–404
12. Picinato M.C, Haber E.P., Cipolla-Neto J., Curi R., de Oliveira Carvalho C.R., Carpinelli A.R.: Melatonin inhibits

- insulin secretion and decreases PKA levels without interfering with glucose metabolism in rat pancreatic islets. *J. Pineal. Res.* 2002;33(3):156–160
13. Pandi-Perumal S.R., Srinivasan V., Maestroni G.J., Cardinali D.P., Poeggeler B., Hardeland R.: Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J.* 2006;273(13):2813–2838
14. Skene D.J., Arendt J.: Circadian rhythm sleep disorders in the blind and their treatment with melatonin. *Sleep Med.* 2007;8(6):651–655
15. Aleandri V., Spina V., Morini A.: The pineal gland and reproduction. *Hum. Reprod. Update* 1996;2(3):225–235
16. Roy D., Belsham D.D.: Melatonin receptor activation regulates GnRH gene expression and secretion in GT1-7 GnRH neurons. Signal transduction mechanisms. *J. Biol. Chem.* 2002;277(1):251–258
17. Soares J.M. Jr, Masana M.I., Ersahin C., Dubocovich M.L.: Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003;306(2):694–702
18. Sanchez J.J., Abreu P., Gonzalez-Hernandez T., Hernandez A., Prieto L., Alonso R.: Estrogen modulation of adrenoceptor responsiveness in the female rat pineal gland: differential expression of intracellular estrogen receptors. *J. Pineal. Res.* 2004;37(1):26–35
19. Berga S.L., Mortola J.F., Yen S.S.: Amplification of nocturnal melatonin secretion in women with functional hypothalamic amenorrhea. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1988;66(1):242–244
20. Lenoir V., de Jonage-Canonico M.B., Perrin M.H., Martin A., Scholler R., Kerdelhue B.: Preventive and curative effect of melatonin on mammary carcinogenesis induced by dimethylbenz[a]anthracene in the female Sprague-Dawley rat. *Breast Cancer Res.* 2005;7(4):R470–R476
21. Cos S., Sanchez-Barcelo E.J.: Melatonin and mammary pathological growth. *Front. Neuroendocrinol.* 2000;21(2):133–170
22. Tamarkin L., Cohen M., Roselle D., Reichert C., Lippman M., Chabner B.: Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in the rat. *Cancer Res.* 1981;41(11 Pt 1):4432–4436
23. Shah P.N., Mhatre M.C., Kothari L.S.: Effect of melatonin on mammary carcinogenesis in intact and pinealectomized rats in varying photoperiods. *Cancer Res.* 1984;44(8):3403–3407
24. Blask D.E., Pelletier D.B., Hill S.M., Lemus-Wilson A., Grosso D.S., Wilson S.T. i wsp.: Pineal melatonin inhibition of tumor promotion in the N-nitroso-N-methylurea model of mammary carcinogenesis: potential involvement of antiestrogenic mechanisms *in vivo*. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1991;117(6):526–532
25. Tan D.X., Manchester L.C., Reiter R.J., Plummer B.F., Hardies L.J., Weintreib S.T. i wsp.: A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of *in vivo* hydroxyl radical generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;253(3):614–620
26. Pieri C., Moroni F., Marra M., Marcheselli F., Recchioni R.: Melatonin is an efficient antioxidant. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 1995;20(2):159–165
27. Ozturk G., Coskun S., Erbas D., Hasanoglu E.: The effect of melatonin on liver superoxide dismutase activity, serum nitrate and thyroid hormone levels. *Jpn. J. Physiol.* 2000;50(1):149–153
28. Okatani Y., Wakatsuki A., Kaneda C.: Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. *J. Pineal. Res.* 2000;28(2):89–96
29. Tomas-Zapico C., Coto-Montes A., Martinez-Fraga J., Rodriguez-Colunga M.J., Hardeland R., Tolivia D.: Effects of delta-aminolevulinic acid and melatonin in the harderian gland of female Syrian hamsters. *Free Radic. Biol. Med.* 2002;32(11):1197–1204
30. Bettahi I., Pozo D., Osuna C., Reiter R.J., Acuna-Castroviejo D., Guerrero J.M.: Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J. Pineal. Res.* 1996;20(4):205–210
31. Gulcin I., Buyukokuroglu M.E., Kufrevioglu O.I.: Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *J. Pineal. Res.* 2003;34(4):278–281
32. Cagnoli C.M., Atabay C., Kharlamova E., Manev H.: Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J. Pineal. Res.* 1995;18(4):222–226
33. Antolin I., Rodriguez C., Sainz R.M., Mayo J.C., Uria H., Kotler M.L. i wsp.: Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J.* 1996;10(8):882–890
34. Mayo J.C., Sainz R.M., Antoli I., Herrera F., Martin V., Rodriguez C.: Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.* 2002;59(10):1706–1713
35. Esparza J.L., Gomez M., Rosa N.M., Paternain J.L., Mallo J., Domingo J.L.: Melatonin reduces oxidative stress and increases gene expression in the cerebral cortex and cerebellum of aluminum-exposed rats. *J. Pineal. Res.* 2005;39(2):129–136
36. Urata Y., Honma S., Goto S., Todoroki S., Iida T., Cho S. i wsp.: Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 1999;27(7–8):838–847

37. Erat M., Ciftci M.: Effect of melatonin on enzyme activities of glutathione reductase from human erythrocytes *in vitro* and from rat erythrocytes *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol.* 2006;537(1-3):59-63
38. Maestroni G.J., Conti A., Pierpaoli W.: Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J. Neuroimmunol.* 1986;13(1):19-30
39. Del G.V., Libri V., Villani N., Calio R., Nistico G.: Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 1989;11(5):567-573
40. Pawlak J., Singh J., Lea R.W., Skwarlo-Sonta K.: Effect of melatonin on phagocytic activity and intracellular free calcium concentration in testicular macrophages from normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol. Cell. Biochem.* 2005;275(1-2):207-213
41. Garcia-Maurino S., Gonzalez-Haba M.G., Calvo J.R., Rafii-El-Idrissi M., Sanchez-Margalet V., Goberna R. i wsp.: Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J. Immunol.* 1997;159(2):574-581
42. Garcia-Maurino S., Pozo D., Carrillo-Vico A., Calvo J.R., Guerrero J.M.: Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci.* 1999;65(20):2143-2150
43. Radogna F., Paternoster L., Albertini M.C., Cerella C., Accorsi A., Bucchini A. i wsp.: Melatonin antagonizes apoptosis via receptor interaction in U937 monocytic cells. *J. Pineal. Res.* 2007;43(2):154-162
44. Carrillo-Vico A., Calvo J.R., Abreu P., Lardone P.J., Garcia-Maurino S., Reiter R.J. i wsp.: Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* 2004;18(3):537-539
45. Yuan L., Collins A.R., Dai J., Dubocovich M.L., Hill S.M.: MT(1) melatonin receptor overexpression enhances the growth suppressive effect of melatonin in human breast cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2002;192(1-2):147-156
46. Cos S., Blask D.E., Lemus-Wilson A., Hill A.B.: Effects of melatonin on the cell cycle kinetics and "estrogen-rescue" of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J. Pineal. Res.* 1991;10(1):36-42
47. Cos S., Recio J., Sanchez-Barcelo E.J.: Modulation of the length of the cell cycle time of MCF-7 human breast cancer cells by melatonin. *Life Sci.* 1996;58(9):811-816
48. Cos S., Fernandez F., Sanchez-Barcelo E.J.: Melatonin inhibits DNA synthesis in MCF-7 human breast cancer cells *in vitro*. *Life Sci.* 1996;58(26):2447-2453
49. Mediavilla M.D., Cos S., Sanchez-Barcelo E.J.: Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells *in vitro*. *Life Sci.* 1999;65(4):415-420
50. Akiyama T., Yoshida T., Tsujita T., Shimizu M., Mizukami T., Okabe M. i wsp.: G1 phase accumulation induced by UCN-01 is associated with dephosphorylation of Rb and CDK2 proteins as well as induction of CDK inhibitor p21/Cip1/WAF1/Sdi1 in p53-mutated human epidermoid carcinoma A431 cells. *Cancer Res.* 1997;57(8):1495-1501
51. Crespo D., Fernandez-Viadero C., Verduga R., Ovejero V., Cos S.: Interaction between melatonin and estradiol on morphological and morphometric features of MCF-7 human breast cancer cells. *J. Pineal. Res.* 1994;16(4):215-222
52. Cos S., Mediavilla M.D., Fernandez R., Gonzalez-Lamuno D., Sanchez-Barcelo E.J.: Does melatonin induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells *in vitro*? *J. Pineal. Res.* 2002;32(2):90-96
53. Hill S.M., Spriggs L.L., Simon M.A., Muraoka H., Blask D.E.: The growth inhibitory action of melatonin on human breast cancer cells is linked to the estrogen response system. *Cancer Lett.* 1992;64(3):249-256
54. Rato A.G., Pedrero J.G., Martinez M.A., del R.B., Lazo P.S., Ramos S.: Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding. *FASEB J.* 1999;13(8):857-868
55. Girgert R., Hanf V., Emons G., Grundker C.: Membrane-bound melatonin receptor MT1 down-regulates estrogen responsive genes in breast cancer cells. *J. Pineal. Res.* 2009;47(1):23-31
56. Aronica S.M., Kraus W.L., Katzenellenbogen B.S.: Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91(18):8517-8521
57. Brydon L., Roka F., Petit L., de Coppet P., Tissot M., Barrett P. i wsp.: Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol. Endocrinol.* 1999;13(12):2025-2038
58. Cos S., Martinez-Campa C., Mediavilla M.D., Sanchez-Barcelo E.J.: Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J. Pineal. Res.* 2005;38(2):136-142
59. Gonzalez A., Martinez-Campa C., Mediavilla M.D., Alonso-Gonzalez C., Sanchez-Mateos S., Hill S.M. i wsp.: Effects of MT1 melatonin receptor overexpression on the aromatase-suppressive effect of melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncol. Rep.* 2007;17(4):947-953

60. Cos S., Gonzalez A., Guezmes A., Mediavilla M.D., Martinez-Campa C., Alonso-Gonzalez C. i wsp.: Melatonin inhibits the growth of DMBA-induced mammary tumors by decreasing the local biosynthesis of estrogens through the modulation of aromatase activity. *Int. J. Cancer* 2006;118(2):274–278
61. Garcia Pedrero J.M., del Rio B., Martinez-Campa C., Muramatsu M., Lazo P.S., Ramos S.: Calmodulin is a selective modulator of estrogen receptors. *Mol. Endocrinol.* 2002;16(5):947–960
62. Benitez-King G., Huerto-Delgadillo L., Anton-Tay F.: Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sci.* 1993;53(3):201–207
63. Blask D.E., Dauchy R.T., Sauer L.A., Krause J.A.: Melatonin uptake and growth prevention in rat hepatoma 7288CTC in response to dietary melatonin: melatonin receptor-mediated inhibition of tumor linoleic acid metabolism to the growth signaling molecule 13-hydroxyoctadecadienoic acid and the potential role of phytemelatonin. *Carcinogenesis* 2004;25(6):951–960
64. Sauer L.A., Dauchy R.T., Blask D.E., Armstrong B.J., Scallici S.: 13-Hydroxyoctadecadienoic acid is the mitogenic signal for linoleic acid-dependent growth in rat hepatoma 7288CTC *in vivo*. *Cancer Res.* 1999;59(18):4688–4692
65. Petranka J., Baldwin W., Biermann J., Jayadev S., Barrett J.C., Murphy E.: The oncostatic action of melatonin in an ovarian carcinoma cell line. *J. Pineal. Res.* 1999;26(3):129–136
66. Farriol M., Venereo Y., Orta X., Castellanos J.M., Segovia-Silvestre T.: *In vitro* effects of melatonin on cell proliferation in a colon adenocarcinoma line. *J. Appl. Toxicol.* 2000;20(1):21–24
67. Kanishi Y., Kobayashi Y., Noda S., Ishizuka B., Saito K.: Differential growth inhibitory effect of melatonin on two endometrial cancer cell lines. *J. Pineal. Res.* 2000;28(4):227–233