

Przegląd doniesień na temat wpływu melatoniny na patogenezę i terapię raka piersi

The news about the influence of melatonin on pathogenesis and therapy of breast cancer

Kinga Grabińska, Magdalena Wróbel, Joanna Mykała-Cieśla,
Hanna Wichary

STRESZCZENIE

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych
i Chemioterapii Onkologicznej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach

Melatonina pełni przede wszystkim funkcję biochemicznego regulatora rytmów okołodobowych i sezonowych, ale szczególne zainteresowanie naukowców wzbudzają udowodnione już jej właściwości antyoksydacyjne i immunomodulujące oraz jej wpływ na regulację wydzielania innych hormonów.

W ostatnich latach zostało przeprowadzonych wiele badań dotyczących roli oraz potencjalnego zastosowania melatoniny w profilaktyce i leczeniu różnych jednostek chorobowych.

Praca jest przeglądem piśmiennictwa dotyczącego badań nad wpływem melatoniny na patogenezę raka sutka i jej terapeutycznego zastosowania w tym nowotworze.

Badano prawdopodobne mechanizmy onkostatyczne dotyczące wpływu na oś podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalną oraz działanie melatoniny jako selektywnego modulatora receptora estrogenowego (SERM) i enzymów biorących udział w biosyntezie estrogenów w tkankach obwodowych (SEEM).

Ponadto zaobserwowano związek między zaburzeniami rytmu dobowego u kobiet a wzrostem ryzyka zachorowania na raka sutka.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie mechanizmów działania melatoniny i jej zastosowania w onkologii.

SŁOWA KLUCZOWE

melatonina, rak piersi, estrogeny

ADRES

DO KORESPONDENCJI:

Kinga Grabińska
Katowice, ul. Ligocka 5/16
tel. +48 694 159 122, +48 505 597 250
e-mail: kingagrabska@interia.pl

ABSTRACT

The main role of melatonin is regulation of circadian and seasonal rhythm. Recently there were carried out a lot of researches on the role and potential application of melatonin in prevention and therapy of various dis-

eases. This work is related to researches about the melatonin influence on estrogen-dependent breast cancer and application in treating this neoplasm.

Probable oncostatic mechanisms i.e. melatonin acting as SERM, SEEM and its influence on the hypothalamic – pituitary – reproductive axis, was analyzed.

Moreover the relation between circadian disruptions and increase in breast cancer risk were observed.

The aim of this work is to show mechanisms melatonin acting and how we can use this hormone in oncology.

KEY WORDS

melatonin, breast cancer, estrogens

WSTĘP

Melatonina, hormon snu będący regulatorem zegara biologicznego, już w latach 50. XIX wieku stanowiła obiekt zainteresowania naukowców zajmujących się różnymi działaniami medycyny. Kolejne prace ukazywały coraz to nowsze znaczenie tego hormonu w patogenezie i leczeniu wielu chorób. Poza leczeniem zaburzeń snu i rytmu dobowego melatonina przedstawiana jest jako „hormon młodości” i potencjalny lek w terapii chorób układu krążenia, choroby Alzheimerera, padaczki, depresji, choroby wrzodowej oraz jako substancja działająca przeciwnowotworowo.

Ostatnie lata to okres intensywnych badań nad jej antyonkogennym działaniem, szczególnie w nowotworach hormonozależnych, takich jak rak piersi czy prostaty oraz nad zastosowaniem egzogennej melatoniny jako substancji wspomagającej w chemio- i radioterapii.

ANATOMIA I FIZJOLOGIA

1. Podstawowe miejsca syntezy, działania i metabolizmu melatoniny

Melatonina wytwarzana jest w organizmie człowieka z aminokwasowego prekursora L-tryptofanu głównie w szyszynce, ale także w siatkówce oraz w przewodzie pokarmowym. Synteza melatoniny jelitowej nie podlega kontroli ze strony zegara biologicznego, a jest ona pobudzana przez obecność pokarmu [1]. Produkowana w komórkach APUD przewodu pokarmowego melatonina trafia następnie do krążenia wrotnego, układu tkanki chłonnej, wykazuje także działanie parakryne i autokryne [1]. Istotny jest fakt, że spadek ilości komórek APUD produkujących m.in. mela-

toninę, jest związany z występowaniem raka okrężnicy [1].

Melatonina pochodząca z siatkówki oka nie przechodzi do płynów ustrojowych, lecz podlega szybkiej degradacji do kwasu 5-metoksyindolooctowego i 5-metoksytryptofolu. Nie jest ona produkowana dla potrzeb całego organizmu, tak jak melatonina pochodzenia szyszynkowego, ale pełni rolę neuroprzekaźnika w siatkówce i uczestniczy w regulacji procesów przebiegających w oku w sposób rytmiczny [2, 3, 4].

Synteza melatoniny przebiega głównie w szyszynce, następnie uwalniana jest ona do krwioobiegu i płynu mózgowo-rdzeniowego. Docierając do wszystkich narządów organizmu, działa jako „zmiatacz” wolnych rodników, a pozostałe efekty działania tego hormonu wynikają z pobudzenia specyficznych receptorów błonowych. Unieczynnienie melatoniny szyszynkowej zachodzi przede wszystkim w wątrobie, a głównym nieaktywnym metabolitem związku jest 6-sulfatoksymelatonina wydalana z moczem [1].

2. Rytm wydzielania melatoniny

Biosynteza melatoniny przebiega w rytmie okołodobowym zależnym od warunków oświetlenia. Produkcja melatoniny jest zawsze najwyższa w nocy, bez względu na to, jaki tryb życia prowadzi dany gatunek [2, 5, 3, 6].

Stężenie melatoniny we krwi człowieka zaczyna wzrastać późnym wieczorem (około godziny 22), osiągając najwyższe wartości między godziną 2 a 3 [1].

Melatonina pełni rolę koordynatora rytmów biologicznych, przekazując organizmowi informację o porze dnia (rola biochemicznego zegara) i spodziewanej porze roku (rola biochemicznego kalendarza) [2, 6, 7].

Najważniejszym czynnikiem kontrolującym produkcję melatoniny jest światło. Najsilniejsze działanie supresyjne na układ wytwarzający melatoninę wywiera światło o długości fali 460–480 nm [8].

2.1. Działanie centralnego zegara biologicznego.

Każdy zegar biologiczny występujący w organizmie żywym składa się z trzech elementów:

- a) właściwego generatora rytmu, który jest strukturą wykazującą spontaniczne cykliczne zmiany swojej aktywności;
- b) receptorów oraz szlaków aferentnych doprowadzających sygnały środowiskowe do zegara;
- c) szlaków eferentnych, za pomocą których rytmiczne sygnały powstałe w zegarze są przesyłane do odpowiednich struktur efektorowych organizmu [1, 9].

U człowieka informacja o warunkach oświetlenia dociera do szyszynki złożonym szlakiem wieloneuronalnym [2, 3, 5].

Funkcję receptora w tym szlaku pełni siatkówka, a dokładniej jej warstwa zwojowa zawierająca melanopsynę. Wykazano, że komórki tej warstwy są światłoczułe, zaś ich aksony budują szlak siatkówkowo-podwzgórzowy, łączący siatkówkę z jądrem skrzyżowania (SCN) [10]. W neuronach melanopsyno-pozytywnych stwierdzono obecność peptydu stymulującego przysadkową cyklazę adenylową – PACAP (działającą przede wszystkim podczas dnia i kontrolującą poziom cAMP w komórce), która wraz z kwasem glutaminowym (działającym głównie w nocy i kodującym ekspozycję na światło) pełni rolę neurotransmitera pośredniczącego we wpływie światła na aktywność neuronów SCN [10, 11].

Właściwym endogennym oscylatorem centralnego zegara biologicznego u człowieka jest jądro skrzyżowania (SCN), położone w międzymózgowiu, dojrzbietowo od skrzyżowania wzrokowego i boczo-dobrzusznie od komory III mózgu [12]. Najważniejszą cechą neuronów SCN jest ich zdolność do spontanicznej generacji cyklicznych zmian swojej aktywności (o okresie zbliżonym do 24 godzin), która jest wynikiem wzajemnie sprzężonej transkrypcji tzw. genów zegarowych [9].

SCN wpływa na aktywność szyszynki za pośrednictwem wielosynaptycznej drogi nerwowej, w skład której wchodzi kolejno: neurony jądra przykomorowego, neurony jąder pośrednio-bocznych rdzenia kręgowego oraz

neurony zwoju szyjnego przedniego. Unerwienie współczulne szyszynki jest utworzone przez włókna zazwojowe tych ostatnich z wyżej wymienionych neuronów [9]. Z ich zakończeń uwalniana jest noradrenalina pobudzająca receptory beta-1-adrenergiczne, co powoduje wzrost poziomu cAMP w komórce i w konsekwencji wzrost aktywności N-acetylotransferazy akryloalkyloaminowej (AA-NAT). Enzym ten katalizuje przemianę serotoniny do N-acetyloserotoniny, zwiększając tym samym produkcję melatoniny w pinealocytach szyszynki. Zjawisko to zachodzi głównie w nocy, kiedy zmniejsza się aktywność neuronów SCN, a zwiększa aktywność szlaku współczulnego łączącego zwoje szyjne z szyszynką [2, 3, 5, 9].

Warto zwrócić uwagę, że poziom sekrecji melatoniny odzwierciedla wielkość jej produkcji, gdyż hormon ten nie jest magazynowany w ziarnistościach wydzielniczych, lecz jest uwalniany z pinealocytów bezpośrednio po jego syntezie [9].

MECHANIZMY DZIAŁANIA

Najczęściej opisywane mechanizmy działania melatoniny polegają m.in. na: zdolności wiązania białek wewnątrzkomórkowych, tj. kalmoduliny, na działaniu antyoksydacyjnym oraz łączeniu się z receptorami komórkowymi. Hormon ten stanowi ligand dla receptorów jądrowych należących do podrodziny ROR/RZR (retinoid orphan receptors/retinoid Z receptors), a także dla własnych melatoninowych receptorów błonowych [13, 14].

Kalmodulina jest białkiem wiążącym jony wapnia i zaangażowanym w regulację cyklu komórkowego. Aktywowane wapniem białko wpływa na inicjację fazy S i M cyklu komórkowego, przejście komórek z fazy spoczynkowej G0 do fazy G1 oraz ekspresję genów cyklu komórkowego. Prawdopodobnie melatonina, wiążąc się z kalmoduliną, uniemożliwia jej udział w powyższych procesach, interakcja ta hamuje etapy cyklu komórkowego, a tym samym zapobiega proliferacji komórek, także komórek nowotworowych [15].

Potwierdzono, że melatonina jest silnym „zmiataczem” wolnych rodników i niweluje skutki stresu oksydacyjnego, stanowiącego istotny czynnik w patogenezie wielu chorób m.in. chorób nowotworowych. W naszych organizmach ok. 5% wykorzystywanego tlenu przeradza się w reaktywne formy tlenu

(ok. biliona wolnych rodników wytwarzanych w komórce w ciągu doby), będące potencjalną przyczyną uszkodzeń DNA, białek i lipidów.

Okazuje się, że opisywany hormon może równocześnie pełnić rolę antyutleniacza hydrofobowego i hydrofilowego, ponieważ posiada zdolność rozpuszczania się zarówno w tłuszczach, jak i w wodzie [16, 17].

Ta mała cząstka o amfifilowej naturze dzięki swym właściwościom z łatwością penetruje liczne kompartmenty komórkowe, gdzie unieczynnia wolne rodniki, tj. tlen singletowy, tlenek azotu czy rodnik wodorotlenkowy, oraz hamuje peroksydację lipidów silniej niż witamina C czy E. Melatonina wpływa również stymulująco na enzymy antyoksydacyjne, takie jak dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza czy peroksydaza glutationowa [17, 18].

Kolejny mechanizm działania melatoniny polega na wiązaniu się z receptorami zaliczanymi do tzw. sierocych receptorów jądrowych ROR/RZR. Receptory te uczestniczą w regulacji procesów immunologicznych, w różnicowaniu ośrodkowego układu nerwowego oraz w dojrzewaniu limfocytów T [13].

Do aktywacji tych receptorów potrzeba ok. pięciokrotnie większej ilości melatoniny niż w przypadku receptorów błonowych MT1, gdzie wystarczą fizjologiczne stężenia hormonu wynoszące ok. 10^{-9} M (mol/l). Obydwa receptory sieroce są niezależnie wykrywane w komórkach MCF-7 raka piersi, a ich znaczenie w mediowaniu antyproliferacyjnych i antyestrogenowych efektów działania melatoniny jest nie do końca poznane. Badania molekularne nie wykazały jednak dodatniej korelacji między ekspresją receptorów jądrowych w komórkach MCF-7 raka sutka a wpływem tego hormonu na geny odpowiedzi na estrogeny.

Błonowe receptory melatoninowe należą do nadrodziny receptorów związanych z białkiem G (GPCR). U ludzi zidentyfikowano dwa główne typy receptorów o wysokim powinowactwie do melatoniny: receptory MT1 i MT2 posiadające około 60% homologii na poziomie sekwencji aminokwasowej. Receptory te zbudowane są z siedmiu transbłonowych obszarów hydrofobowych o strukturze helikalnej i zlokalizowane są w wielu tkankach organizmu [13]. Wykazano, że większość molekularnych działań melatoniny zachodzi poprzez aktywację rec. MT1, która prowadzi do obniżenia aktywności cykazy adenyłowej w komórce, a tym samym zmniejszenia ilości produkowanego cAMP, wpływa także na szlaki zwią-

zane z udziałem wtórnych przekaźników wewnątrzkomórkowych. Zmiana wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP moduluje aktywność białkowej kinazy C (PKC), białkowej kinazy A (PKA), kinaz aktywowanych miogena-
mi (MAPK), kanałów potasowych, wpływa na poziom cGMP czy wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia. Poprzez te mechanizmy melatonina wywiera działanie hamujące proliferację komórek, a także bierze udział w regulacji ekspresji wielu genów, co leży u podstaw jej onkostatycznego działania [13, 19, 20, 24].

DZIAŁANIE ANTYONKOGENNE

Fizjologiczne, jak i farmakologiczne stężenia melatoniny wpływają hamująco na wzrost i progresję różnego rodzaju nowotworów, a zastosowanie jej w chemio- czy radioterapii wspomaga efekty leczenia i łagodzi jego skutki uboczne. Dokładne podstawy i mechanizmy tego zjawiska nie są jeszcze w pełni poznane [13, 17, 21]. Badania na zwierzętach dowiodły, że ta indolamina podawana podczas chemioterapii łagodzi efekty toksyczne, ze względu na swoje działanie nefro-, kardio- i mielo-
protektoryjne, a także zwiększa efektywność leczenia [6]. Obserwacje kliniczne w większości potwierdzają również jej korzystny wpływ na leczenie przy użyciu radioterapii [22].

Przeciwo proliferacyjne działanie melatoniny za pośrednictwem receptorów MT1 potwierdzone zostało na hodowlach komórek: raka piersi MGH-7, raka okrężnicy HT-29, czerniaka M-6, neuroblastomy SK-N-MC, guza chromochłonnego nadnerczy PC12 i raka prostaty LNCaP. Zaburzenia wydzielania tego hormonu prawdopodobnie mają także wpływ na rozwój raka jajnika i raka endometrium [13, 17, 23, 24].

Szczególne zainteresowanie budzi hamujący wpływ melatoniny na rozwój hormonozależnego raka piersi. Przypuszcza się, że główną rolę odgrywa tu jej działanie przeciwo proliferacyjne i antyestrogenowe, a hamowanie rozrostu komórek nowotworowych zależy od tempa ich proliferacji i ekspresji receptorów estrogenowych ER α oraz receptora MT1 [25].

Badania immunohistochemiczne Dillona i wsp. udowodniły dodatnią korelację między ekspresją receptora MT1 a stopniem złośliwości raka piersi (wzrost ekspresji w guzach o wysokim wskaźniku jądrowym, niskozróżnicowanych) [26]. Kolejne badania wskazały na współtowarzyszący wzrostowi aktywności receptora MT1 spadek ekspre-

sji receptorów estrogenowych ER α i receptorów progesteronowych PR w komórkach raka sutka [13].

Austriaccy naukowcy dowiedli jednak, że duże zagęszczenie tych receptorów występuje także na komórkach nisko zróżnicowanego raka sutka nie posiadających rec. estrogenowych, co wskazuje na dodatkowe, niezależne od hormonów płciowych, działanie melatoniny. Błonowe receptory melatoninowe zlokalizowano na komórkach mioepitelialnych i nabłonkowych przewodów mlecznych oraz w zrębie zarówno zdrowego, jak i zmienionego nowotworowo gruczołu piersiowego [24].

Interesujące są również badania prowadzone na zwierzętach. Obserwowano samice szczura z zachowaną funkcją szyszynki, przebywające długo w ciemności oraz po bezpośrednim podaniu melatoniny, a także osobniki po pinealektomii lub narażone na ciągłe oświetlenie, u których poziom tego hormonu był obniżony. U zwierząt z wysokim stężeniem melatoniny w surowicy, w porównaniu do grupy, u której jej wydzielanie zostało zaburzone, zauważono: mniejszą zapadalność na raka sutka, także chemicznie indukowanego 7,12-dimetylobenz[*a*]antracenenem (DMBA), wolniejszy wzrost nowotworu, a nawet redukcję liczby i wielkości guzów. Doświadczenia dodatkowo wykazały obniżenie poziomu estradiolu, FSH (folikulotropiny) i LH (luteotropiny) w surowicy oraz spadek koncentracji receptora ER α na komórkach nowotworowych. Co ciekawe, obserwuje się wzrost wydzielania melatoniny w odpowiedzi na kancerogeny, co może być pewnego rodzaju mechanizmem obronnym organizmu [14].

Podstawy antyonkogenne działanie melatoniny polegają na odwróceniu zjawisk indukowanych przez estrogeny. Następuje zmniejszenie proliferacji na korzyść wzrostu różnicowania się i dojrzewania komórek nowotworu. W badaniach na liniach ludzkich komórek raka sutka MGH-7 i tych samych komórek wszczepionych samicom szczura udowodniono antyestrogenowe działanie melatoniny. Hormon ten zmniejsza produkcję estrogenów jajnikowych poprzez hamujący wpływ na oś podwzgórze – przysadka – gonady, potrafi się także zachowywać jak selektywny modulator receptorów estrogenowych (SERM) oraz enzymów biorących udział w syntezie estrogenów (SEEM), zmniejszając tempo wzrostu guza i jego zdolności metastazy [14, 27].

Poprzez rec. MT1 melatonina moduluje rec. ER α , wpływa na geny zależne od estrogenów, tj. BRCA-1, TGF- α , c-myc, c-fos, p53, p21^{WAF}, które biorą udział m.in. w kontroli cyklu komórkowego.

Gründker i wsp. wykazali, że większość efektów przeciwnowotworowych ma związek z epigenetycznym działaniem melatoniny poprzez rec. MT-1. W badaniach molekularnych na liniach komórek raka sutka MCF-7 i MCU-1 zaobserwowali oni zjawisko „up-regulation” genów BRCA-1, p53, p21WAF i c-myc po inkubacji z 10⁻¹¹ M estradiolu oraz zmniejszenie ekspresji tych genów po dodaniu 10⁻⁹ M melatoniny, co dotyczyło głównie genu BRCA-1 [19].

Wyniki tych badań okazały się sprzeczne z wcześniej opisywanymi przez Mediavilla i wsp., które wskazywały na wzrost ekspresji genów p53, p21 WAF po leczeniu melatoniną [28], oraz z badaniami włoskich naukowców, którzy wykazali udział melatoniny w procesie apoptozy poprzez zwiększenie ekspresji p53 oraz p73 (analogu p53) [25].

Zmniejszenie inwazyjności pod wpływem działania melatoniny ma związek ze spadkiem przylegania komórek nowotworowych do błony podstawnej oraz zwiększeniem ilości połączeń międzykomórkowych typu „gap junction”. Następuje także wzrost ekspresji E-kadheryny odpowiedzialnej za przyleganie komórka-komórka. Zmiany te indukują zwiększone różnicowanie się komórek, ograniczają rozrost guza i możliwość wystąpienia przerzutów odległych [15].

Jedną z teorii zakłada, że melatonina ogranicza wzrost guza poprzez wpływ na metabolizm kwasów tłuszczowych. Metabolity kwasu linolenowego (LA) zwiększają ekspresję miogenu aktywowanego kinazami białkowymi (MAPK) oraz genów związanych z ekspresją rec. estrogenowego ER α , wpływają także na progresję cyklu komórkowego. Melatonina, działając poprzez rec. błonowe, powoduje spadek cAMP, co prowadzi do zmniejszenia wychwytu i metabolizmu tego kwasu w komórkach raka sutka, a przez to do hamowania receptorów epidermalnego czynnika wzrostu (EGFR), bloku szlaków MAPK i gromadzenia się w komórkach inhibitorów wzrostu guza [29]. Opublikowane w grudniu 2009 roku badania Blask i wsp. potwierdzają powyższą teorię. Zauważono szybszy rozrost ludzkich komórek MCF-7 transfekowanych samicom szczura po wcześniejszym nocnym narażeniu zwierząt na polichromatyczne białe światło,

powodujące supresję wydzielania melatoniny, wzrost wychwytu LA i jego metabolitu – mitogenego kwasu 13-hydroxyoctadekadienowego (13-HODE). Zjawisko to częściowo tłumaczy zwiększoną zapadalność na raka piersi i niektóre inne nowotwory u kobiet pracujących w systemie zmianowym [30].

Melatonina wpływa także na obniżenie aktywności telomerazy odpowiedzialnej za nieograniczone podziały komórek nowotworowych oraz na hamowanie cykliny D zaangażowanej w cykl komórkowy [24].

W badaniach przeprowadzonych przez włoskich badaczy stwierdzono, że melatonina działa proapoptotycznie na komórki MCF-7 i jest to działanie TGF- β zależne. Hormon ten powoduje „up-regulation” mRNA dla TGF- β odpowiedzialnego za późną apoptozę, a przeciwdziała przeciwko tej cytokinie całkowicie znosząc hamujący wpływ melatoniny na raka piersi. Udział melatoniny w apoptozie polega także na zwiększeniu aktywności kaspazy 7 w komórkach raka sutka, a co za tym idzie – kaspazy 9 oraz redukcję szlaku Bcl2/Bax. Zmiany w tych szlakach prowadzą do zwiększenia procesu fragmentacji wadliwego DNA w tkankach guza [25].

Występuje także znaczne spowolnienie cyklu komórkowego, bez specyficznego zatrzymania komórek w danej fazie [25], chociaż wcześniejsze badania wskazywały na zatrzymanie komórek w fazie G0 i szczególne zwolnienie przejścia z fazy G1 do fazy S [14]. Badanie Cucina i wsp. wykazało wzrost ekspresji p53 we wczesnej apoptozie oraz jego analogu – p73 w późnej apoptozie [25].

Podsumowując antyonkogenne działanie melatoniny, nie sposób pominąć jej immunomodulującego wpływu na komórki. Na efekt przeciwnowotworowy składa się wzrost aktywacji komórek NK, Th-1 i makrofagów oraz wzmożone wydzielanie cytokin, tj. IL-2, IL-6, IL-12 i interferonu-gamma [14, 31].

RAK PIERSI

1. Epidemiologia

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet w Polsce. Według Krajowego Rejestru Nowotworów w 2006 roku stwierdzono w Polsce 13 322 nowe zachorowania na raka piersi (wskaźnik struktury - 21,5%). Aktualnie rak sutka jest przyczyną największej liczby zgonów wywołanych

przez nowotwory złośliwe u kobiet, a w 2006 roku odsetek zgonów wynosi 13,1%. [32]

2. Patogeneza

Niestety, wciąż nie istnieje jednomyślność co do głównej przyczyny raka piersi. Zauważa się znaczne różnice terytorialne, jeśli chodzi o zapadalność na ten nowotwór. Zaobserwowano, że ryzyko zachorowania wzrasta wraz ze stopniem uprzemysłowienia kraju [8].

Opierając się na znaczących badaniach epidemiologicznych oraz badaniach przeprowadzanych na zwierzętach, można przypuszczać, że największy wpływ na ryzyko rozwoju raka sutka ma długość życia, podczas której gruczoł piersiowy narażony jest na działanie estrogenów [8, 33]. Jednak brak jest jednoznacznego naukowego potwierdzenia, które ustaliłoby, jakie osobnicze lub demograficzne czynniki wpływają na poziom estrogenów, wyjaśniając różnice w występowaniu raka piersi wewnątrz, jak i pomiędzy społeczeństwami. Bierze się pod uwagę sumę czynników, takich jak aktywność fizyczna, alkohol czy czynniki związane z rozrodczością, w tym karmienie piersią [8].

Rak piersi jest klasycznym przykładem nowotworu hormonalnie zależnego. Estrogeny zaangażowane są we wzrost i różnicowanie prawidłowego gruczołu sutkowego [15].

W okresie przedmenopauzalnym 70% estrogenów pochodzi z produkcji jajnikowej, a 30% z konwersji obwodowej z androgenów [35, 36]. Potwierdzono, że około 2/3 nowotworów złośliwych sutka występuje w okresie pomenopauzalnym, kiedy to aktywność hormonalna jajników stopniowo wygasa i prawie 100% estrogenów jest syntetyzowanych w komórkach obwodowych z prekursorów pochodzenia nadnerczowego. W tej sytuacji stężenie estrogenów w osoczu jest niskie, natomiast w tkankach obwodowych, w tym w gruczole sutkowym – wysokie (jako wynik ich biosyntezy *in situ*) [35, 36].

Niestety, estrogeny pełnią również istotną rolę w kancerogenezie poprzez zwiększanie proliferacji komórek nabłonka (pośredni efekt kancerogeny) i mutagenne działanie samych estrogenów, jak i ich metabolitów (bezpośredni efekt kancerogeny). Do tej pory nie ustalono jednak, który z wyżej wymienionych mechanizmów odgrywa główną rolę w patogenezie raka sutka, natomiast wiadomo, że w mechanizmach tych bierze udział przede wszystkim estradiol [14, 37].

3. Strategie leczenia oraz rola melatoniny w patogenezie i terapii raka sutka:

Metody leczenia raka piersi to: leczenie chirurgiczne, radioterapia, chemioterapia i hormonoterapia, stosowane samodzielnie lub w skojarzeniu. Hormonoterapia wykorzystuje następujące mechanizmy:

a) leki działające na receptor estrogenowy, ingerujące w działanie endogennych estrogenów tzw. selektywne modulatory receptorów estrogenowych (SERMs), których najlepszym przykładem jest tamoksyfen;

b) leki zaburzające syntezę hormonów steroidowych poprzez hamowanie enzymów biorących udział w konwersji androgenów do estrogenów, zwane selektywnymi modulatorami enzymów estrogenowych (SEEMs) [38].

Udowodniono, że melatonina potrafi zachowywać się zarówno jako SERM, jak i SEEM, zmniejszając tempo wzrostu guza i jego zdolności metastatyczne.

3.1. Melatonina jako selektywny modulator receptora estrogenowego (SERM)

Melatonina nie wiąże się z receptorem estrogenowym ani nie ingeruje w wiązanie się estrogenów do tego receptora, natomiast prawdopodobnie zmniejsza ona ekspresję receptora estrogenowego alfa ($ER\alpha$) i hamuje wiązanie kompleksu estradiol- $ER\alpha$ do ERE (estrogen response element) w określonym odcinku DNA [39, 40, 41]. Wykazano, że efekt ten melatonina wywiera poprzez wiązanie ze specyficznym receptorem błonowym MT-1 i w taki sposób wpływa na ścieżkę sygnału receptora estrogenowego.

Prawdopodobnie wzajemne oddziaływanie pomiędzy drogami przekazu sygnału estrogenowego i melatoninowego opierają się na przeciwstawnej modulacji stężenia wewnątrzkomórkowego cAMP oraz na wpływie melatoniny na wewnątrzkomórkowy kompleks kalmoduliny z wapniem (Ca^{2+}/CaM).

W pierwszym z wymienionych mechanizmów dowiedziono, że w komórkach MCF-7 estrogeny aktywują cyklazę adenylową, zwiększając tym samym stężenie wewnątrzkomórkowego cAMP, co powoduje aktywację receptora estrogenowego $ER\alpha$ [42]. Melatonina natomiast działając poprzez receptor błonowy MT-1 związany z białkiem Gi, hamuje cyklazę adenylową, zmniejszając stężenie cAMP w komórce, co skutkuje zahamowaniem transkrypcji genów receptora estrogenowego $ER\alpha$ [14, 43].

Drugi mechanizm oddziaływania pomiędzy estrogenami a melatoniną angażuje kalmodulinę, która jest modulatorem aktywności transkrypcyjnej receptora estrogenowego. Kalmodulina oddziałuje z receptorem $ER\alpha$, co stymuluje jego fosforylację i w ten sposób ułatwia wiązanie się zarówno estrogenów, jak i kompleksów estrogen-receptor (E2-ER) do ERE na DNA. Wykazano, że melatonina wywiera wpływ na przekazywanie sygnału związanego z kompleksem Ca^{2+}/CaM [44]. Wiążąc się z tym kompleksem, inaktywuje go i w ten sposób hamuje estrogenową drogę przekazu sygnału wewnątrz komórki [41].

Należy jednak zwrócić uwagę na to, że melatonina posiada zdolność selektywnego blokowania tylko receptora $ER\alpha$, natomiast nie wpływa na receptor $Er\beta$. Wynika z tego, że wrażliwość ludzkich komórek raka sutka na działanie melatoniny zależy przede wszystkim od stężenia receptora $ER\alpha$ [45].

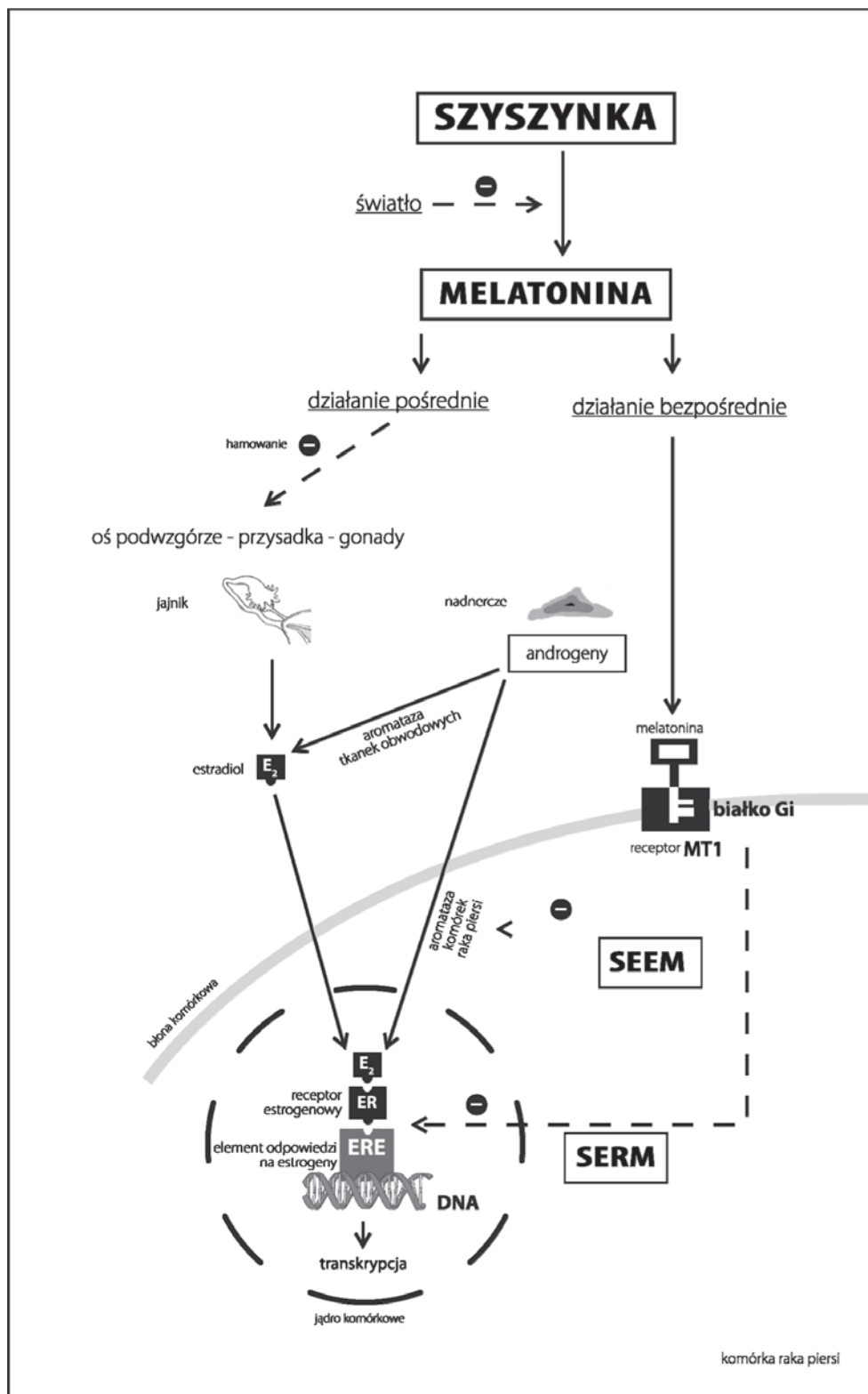
3.2. Melatonina jako selektywny modulator enzymów estrogenowych (SEEM)

W raku sutka występującym u kobiet w okresie pomenopauzalnym estrogeny są syntezowane w gruczole piersiowym głównie w procesie transformacji z prekursorów androgenowych pochodzenia nadnerczowego, a proces ten jest katalizowany przez enzymy należące do kompleksu aromatazy. Wykazano, że proces ten zachodzi także w komórkach MCF-7 raka piersi. Estrogeny produkowane z udziałem aromatazy mogą wywierać autokrynne i parakrynne działanie na promotory procesu proliferacji komórek guza [14].

Działanie melatoniny polega na redukowaniu aktywności tego enzymu w komórkach raka sutka zarówno w warunkach podstawowych, jak i w sytuacji, gdy aktywność aromatazy jest pobudzana przez cAMP lub kortyzol [46]. Melatonina prawdopodobnie powoduje spadek cAMP i wzrost cGMP, co skutkuje zmniejszeniem konwersji androgenów do estrogenów w tkankach obwodowych, w gruczole piersiowym i w komórkach raka sutka [14].

BADANIA:

Badania ostatnich dekad coraz szerzej opisują rolę melatoniny i jej wpływ na onkogenezę. Wiele prób klinicznych dotyczyło wpływu czynników środowiskowych na rytmy dobowe, sezonowe oraz na produkcję melatoniny. Dowiedziono, że narażenie na światło



Ryc. 1. Schemat działania melatoniny jako Selektynnego Modulatora Receptora Estrogenowego (SERM) i Selektynnego Modulatora Enzymów Estrogenowych (SEEM). Opis w tekście.

Fig. 1. Diagram that shows the mechanisms which melatonin thus behaving as a selective estrogen receptor modulator (SERM) and a selective estrogen enzyme modulator (SEEM).

w nocy (Light at night – LAN), praca zmianowa, zmniejszona ilość snu oraz pole elektromagnetyczne mogą wpływać na spadek nocnego wydzielania melatoniny oraz wzrost zapadalności na nowotwory hormonozależne, tj. raka piersi czy raka prostaty [30, 8, 47, 48]. Już w 1978 roku pojawiła się w Lancet publikacja Cohena i wsp., w której opisywano wpływ niskiego poziomu melatoniny na wzrost stężenia estrogenów oraz zwiększonego ryzyka raka piersi [49].

Teoria LAN w odniesieniu do raka piersi zakłada, że nocne narażenie na światło skutkuje hamowaniem wydzielania melatoniny, co prowadzi do wzrostu produkcji estrogenów i zwiększonej zapadalności na ten nowotwór [8, 50]. Należy jednak zaznaczyć, że zaburzenia rytmu dobowego prowadzą także do zmian w wydzielaniu kortyzolu i nieadekwatnej produkcji witaminy D, co może stanowić kolejny potencjalny czynnik kancerogenezy [8].

Efekt LAN zależny jest od dawki i długości fali światła (najsilniej hamuje produkcję melatoniny światło o długości fali 460–480 nm), znaczenie ma również osobnicza wrażliwość, na którą wpływa kolor oczu, płeć (kobiety są bardziej wrażliwe niż mężczyźni) i czynniki genetyczne [8]. Udowodniono już związek między zmianami w ekspresji genów zegarowych PER a ryzykiem raka sutka. Polimorfizm w genie zegarowym PER3 związany jest ze zdolnością adaptacyjną organizmu do zmian rytmu dobowego, co wpływa na osobniczo zmienną wrażliwość na LAN. Odkryto także zmiany w ekspresji genu PER2, który funkcjonuje jako gen supresorowy. W komórkach nowotworowych PER2 ulega najprawdopodobniej metylacji, co wpływa na rozregulowanie jego ekspresji i promocję kancerogenezy [50, 51].

Wyniki jednego z najbardziej istotnych dla zrozumienia patogenezy raka piersi badania klinicznego The Nurses' Health Study cohort (NHS) oraz innych badań potwierdzają przeciwną zależność między stężeniem 6-sulfatoksymelatoniny w moczu i ryzykiem raka sutka [52, 53, 54]. Obserwacje prowadzone na japońskich kobietach w wieku postmenopauzalnym również wspierają teorię LAN, chociaż nie wykazano tu związku między LAN i zmianą stężenia hormonów płciowych, znamienne było obniżenie stężenia 6-sulfatoksymelatoniny w moczu korelujące ze wzrostem zapadalności na raka sutka [53].

Ciekawe badania prowadzone na społeczności Izraela dowodzą, że na terenach kraju, gdzie

nocne natężenie światła było większe, zapadalność na raka sutka wzrastała, co wspiera teorię o dawkozależnym efekcie LAN [55].

1. Praca zmianowa

W 2007 roku IARC (International Agency for Research on Cancer) zakwalifikowała „zaburzenia rytmów okołodobowych i pracę zmianową” jako czynnik potencjalnie kancerogeny (GRUPA 2A). Przeprowadzono bowiem wiele badań wykazujących zależność pomiędzy pracą zmianową kobiet a zwiększonym ryzykiem wystąpienia nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem raka sutka [8, 29], które potwierdziły tzw. „hipotezę melatoninową” opublikowaną po raz pierwszy już w 1987 roku [56].

Jednym z pierwszych badań potwierdzających powyższą hipotezę było badanie duńskie kliniczno-kontrolne, w którym w grupie badanej uczestniczyło 7035 osób w wieku 30–54 lat, u których rozpoznano w latach 1970–1989 raka sutka. Osoby te pracowały w trybie zmianowym co najmniej pół roku i przynajmniej pięć lat przed postawieniem diagnozy. Grupę kontrolną tworzyły kobiety niepracujące w systemie zmianowym, odpowiednio dobrane pod względem wieku i płci do grupy badanej. Wyniki badania przedstawiały się następująco: względne ryzyko wystąpienia raka sutka w populacji badanej wynosiło 1,5, a u kobiet pracujących w trybie zmianowym ponad 6 lat – 1,7, co dowodzi bezpośredniego związku pracy zmianowej z ryzykiem nowotworu. Wadą badania był przede wszystkim brak klasyfikacji osób badanych pod względem dokładnego czasu pracy w nocy [57].

Kolejne badanie zostało przeprowadzone w Seattle i dotyczyło 813 przypadków zachorowań na raka piersi u kobiet w wieku 20–74 lat, które zostały zdiagnozowane w latach 1992–1995. Randomizowaną grupę kontrolną stanowiły 793 osoby. Badanie wykazało, że u osób, które w przeciągu 10 lat często nie spały w nocy, występuje o 14% zwiększone ryzyko raka piersi i wzrasta ono proporcjonalnie do liczby lat, podczas których zaburzony był wypoczynek nocny, szczególnie w godzinach maksymalnego wydzielania melatoniny, tj. pomiędzy godziną 1:00 a 2:00 w nocy. Natomiast ryzyko tej choroby nie rosło w przypadku osób, które miały tylko przerywany sen z zapaleniem sztucznego światła [58].

Badanie The Nurses' Health Study (NHS) dotyczyło 78 586 pielęgniarek pracujących w systemie zmianowym (co najmniej trzy zmia-

ny nocne w miesiącu), wśród których w ciągu 10 lat zarejestrowano 2441 przypadków zachorowania na raka piersi.

Zgodnie z wynikami badania ryzyko wystąpienia tego nowotworu rosło od około 8% u kobiet ze stażem pracy od 1 roku do 29 lat, aż do 36% u kobiet pracujących w trybie zmianowym przez ponad 30 lat [23, 59].

2. Kobiety niewidome

Z drugiej strony patrząc, możemy wysnuć wniosek, że skoro światło hamuje nocny wzrost wydzielania melatoniny, to brak jego percepcji u osób niewidomych będzie sprzyjał jej produkcji, a zachorowalność na raka sutka w tej grupie będzie niższa. Badania kliniczne Hahna [60], Pukkala i wsp. [61], Feyching i wsp. [62] rzeczywiście potwierdzają odwrotną korelację między ślepotą i ryzykiem raka sutka. W fińskich badaniach wykazano spadek ryzyka raka piersi przy wzroście zapadalności na inne npl [61], podczas gdy szwedzkie doniesienia wskazywały na znamienne niższą zapadalność na wszystkie rodzaje npl u niewidomych [62]. Kolejnym badaniem jest opublikowane w listopadzie 2009 roku badanie kohortowe na 1392 niewidomych kobietach zamieszkujących Amerykę Północną. Wyniki wykazały znamienne niższą zachorowalność na raka piersi u kobiet niewidomych z całkowitym brakiem percepcji światła na siatkówce w porównaniu do kobiet z zachowaną percepcją [63].

3. Długość snu

Verkasalo przewidywał, że ryzyko zachorowania na raka piersi jest odwrotnie proporcjonalne do długości snu, gdyż jak wiadomo szczyt wydzielania melatoniny występuje w nocy. Udowodniono to następnie w badaniach, z których kilka zostało przedstawionych poniżej [64].

Badanie kohortowe przeprowadzone w Singapurze (The Singapore Chinese Health Study), w którym uczestniczyło 33 528 dowiodło, że wśród kobiet po menopauzie, które spały w nocy dłużej niż 9 godzin, ryzyko zachorowania na raka piersi było mniejsze niż u kobiet, których długość snu wynosiła poniżej 6 godzin (ryzyko względne wynosiło 0,67) [65]. Jednym z ostatnich przeprowadzanych badań dotyczących wpływu długości snu na ryzyko wystąpienia nowotworu złośliwego sutka było kohortowe badanie populacji kobiet mieszkających w północno-wschodniej Japonii (The Ohsaki Cohort Study), w którym wzięło udział 28 515 kobiet w wieku 40–79 lat. U osób śpią-

cych podczas doby 6 h lub mniej wykazano $HR=1,62$, w grupie, w której długość snu wynosiła 8 h, $HR=1,14$, a gdy sen trwał ponad 9h $HR=0,72$ [66].

Wszystkie wymienione wyżej badania posiadały pewne ograniczenia, ale dowiodły, że ryzyko raka sutka wzrasta wraz ze zmniejszaniem ilości godzin snu podczas doby.

4. Szerokość geograficzna i pory roku

Zgodnie z wyżej przytoczonymi informacjami dotyczącymi fizjologii wydzielania melatoniny oczywistym jest, że w miejscach położonych w pewnej odległości od równika (czyli w większych szerokościach geograficznych) będzie występował deficyt światła bezpośrednio wpływający na wzrost syntezy tego hormonu. Erren i Piekarski przewidywali, iż u rdzennych mieszkańców terenów wysuniętych na północ, szczególnie zamieszkujących okolicę koła podbiegunowego (np. Lapończyków, Eskimosów, Indian, ludności Grenlandii) występuje większe stężenie melatoniny. Badacze zasugerowali, że może mieć to związek z mniejszym rozpowszechnieniem nowotworów hormonozależnych w tych populacjach [67].

5. Pole elektromagnetyczne

Najprawdopodobniej poza światłem na zmniejszenie nocnej produkcji melatoniny wpływa również pole elektromagnetyczne (EMF). Już w 1987 roku hipotezę tę rozwinął Stevens w jednej ze swoich prac [56]. W 2001 roku ukazała się praca Davisa i wsp. oceniająca wpływ pola magnetycznego o częstotliwości 60 Hz na zwiększenie ryzyka raka sutka w mechanizmie hamowania nocnego wydzielania melatoniny. W badaniu oceniano poziom stężenia 6-sulfatoksymelatoniny z nocnej zbiórki moczu u 203 kobiet w wieku od 20 do 74 lat, bez raka piersi w wywiadzie, po narażeniu na pole magnetyczne 60 Hz. W oparciu o wyniki pomiarów i dodatkowe informacje pochodzące z wcześniej zebranego wywiadu lekarskiego wysnuto wnioski. Wykazano, że niskie stężenie melatoniny w moczu ma związek z narażeniem na pole magnetyczne 60 Hz, a także z dłuższym narażeniem na światło, starszym wiekiem, wyższym BMI (Body Mass Index), ostatnio spożywanym alkoholem oraz stosowaniem leków, takich jak: blokery kanału wapniowego, β -blokery czy leki o działaniu psychotropowym [68]. Wadą tego badania była niekontrolowana obecność innych czynników zwiększających ryzyko raka sut-

ka, co modyfikowało wynik badania, poziom 6-sulfatoksymelatoniny w moczu u osób narażonych był niższy niż u nienarażonych, ale różnica ta nie była znamienna statystycznie [50]. Kolejne próby podjęte m.in. przez niemieckich naukowców zaowocowały opublikowanym w sierpniu 2009 roku badaniem, które wykazało, że zmienne EMF 1,2 mikroT, o częstotliwości 50 Hz negatywnie wpływa na antyestrogenowe działanie melatoniny na komórki raka sutka [69]. Podsumowaniem prac nad wpływem EMF na ryzyko nowotworu jest metaanaliza dotycząca 15 badań zamieszczonych w bazach: Medline, PubMed, Embase, the Cochrane Library i Web of Science. Prace obejmują 24 338 badanych przypadków i liczącą 60 668 osób grupę kontrolną. W rezultacie nie wykazano znamiennego związku między narażeniem na EMF i zapadalnością na raka sutka (OR = 0,988; 95% CI = 0,898–1,088) [70].

PODSUMOWANIE

Należy pamiętać, że w patogenezie raka piersi udział biorą liczne czynniki. Wiele prac kli-

nicznych oceniających wpływ narażenia na światło w nocy, pracę zmianową czy niedostateczną długość snu zawierało błędy metodologiczne, nie zawsze uwzględniano inne czynniki ryzyka, tj. natężenie światła, długość jego fali czy dokładny czas trwania pracy zmianowej w godzinach nocnych [71]. Krytyka prac dotyczy także oznaczeń 6-sulfatoksymelatoniny w moczu, która wg analizy Trivisa nie do końca koreluje z ryzykiem raka piersi [72].

Atutem stosowania melatoniny w terapii jest jej łatwa dostępność, niski koszt leczenia, nieznaczne działania niepożądane (ból głowy, splątanie, senność, obniżenie temperatury ciała) i nie stwierdzone dotychczas interakcje z innymi lekami. Zachęcające wydają się dotychczas przeprowadzone badania dotyczące zastosowania melatoniny w leczeniu skojarzonym, jako środka wspomagającego i protekcyjnego w chemio- i radioterapii [18, 22]. Potrzebne są kolejne dobrze zaprojektowane badania kliniczne na dużych grupach, które pomogą jednoznacznie określić przydatność melatoniny w terapii raka piersi.

PIŚMIENNICTWO:

- Zawilska J.B., Nowak J.Z. Rytmika okołodobowa i zegar biologiczny. *Sen*. 2002; 2(4): 127–136.
- Arendt J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of Reproduction*. 1998; 3: 13–22.
- Zawilska J.B., Nowak J.Z. Melatonin: from biochemistry to therapeutic applications. *Pol. J. Pharmacol.* 1999; 51: 3–23.
- Zawilska J.B., Nowak J.Z. Regulatory mechanisms in melatonin biosynthesis in retina. *Neurochem. Int.* 1992; 20: 23–36.
- Reiter R.J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* 1991; 12: 151–180.
- Nowak J.Z., Zawilska J.B. Melatonina jako koordynator rytmów biologicznych: regulacja biosyntezy, działania fizjologiczne i znaczenie terapeutyczne. *Lęk i Depresja*. 1996; 1: 189–211.
- Reiter R.J. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1991; 79: C153–C158.
- Stevens R.G. Light-at-night, circadian disruption and breast cancer: assessment of existing evidence. *Int. J. Epidemiol.* 2009; 38(4): 963–970.
- Lewczuk B. Siatkówka, jądro skrzyżowania oraz szyszynka jako elementy zegara biologicznego ssaków. *Medycyna Wet.* 2007; 63(5): 506–511.
- Hannibal J. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res.* 2002; 309: 73–88.
- Hannibal J., Ding J.M., Chen D., Fahrenkrug J., Larsen P.J., Gillette M.U., Mikkelsen J.D. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *J. Neurosci.* 1997; 17: 2637–2644.
- Moore R.Y., Speh J.C., Leak R.K. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res.* 2002; 309: 89–98.
- Danielczyk K., Dzięgiel P. MT1 melatonin receptors and their role in the oncostatic action of melatonin. *Postępy Hig Med Dosw (Online)*. 2009; 63: 425–434.
- Cos S., González A., Martínez-Campa C., Mediavilla M.D., Alonso-González C., Sánchez-Barceló E.J. Estrogen-signaling pathway: a link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. *Cancer Detection and Prevention*. 2006; 30: 118–128.
- Blask D.E., Sauer L.A., Dauchy R.T. Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr Top Med Chem.* 2002; 2(2): 113–132.
- Reiter R.J., Tan D.X., Terron M.P., Flores L.J., Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochim Pol.* 2007; 54(1): 1–9.
- Karasek M. Szyszynka i melatonina. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa – Łódź 1997.
- Dzięgiel P., Podhorska-Okołów M., Zabel M. Melatonin: adjuvant therapy of malignant tumors. *Med Sci Monit.* 2008; 14(5): RA64–70.
- Girgert R., Hanf V., Emons G., Gründker C. Membrane-bound melatonin receptor MT1 down-regulates estrogen responsive genes in breast cancer cells. *J Pineal Res.* 2009; 47: 23–31.
- Hill S.M., Frasch T., Xiang S., Yuan L., Duplessis T., Mao L. Molecular mechanisms of melatonin anticancer effects. *Integr Cancer Ther.* 2009; 8(4): 337–346.
- Solár P. Melatonin and its wide-spectrum effects: use of melatonin in the treatment of tumors. *Cesk Fysiol.* 1999; 48(1): 27–40.
- Moss R.W. Do antioxidants interfere with radiation therapy for cancer? *Integr Cancer Ther.* 2007; 6(3): 281–292.
- Bilski B. Czy praca zmianowa jest czynnikiem ryzyka choroby nowotworowej? *Medycyna Pracy*. 2005; 56(2): 175–178.
- Rögelsperger O., Ekmekcioglu C., Jäger W. i wsp. Coexpression of the melatonin receptor 1 and nestin in human breast cancer specimens. *J Pineal Res.* 2009; 46(4): 422–432.

25. Cucina A., Proietti S., D'Anselmi F., Coluccia P., Dinicola S., Frati L., Bizzarri M. Evidence for a biphasic apoptotic pathway induced by melatonin in MCF-7 breast cancer cells. *J Pineal Res.* 2009; 46(2): 172-180.
26. Dillon D.C., Easley S.E., Asch B.B. i wsp. Differential expression of high-affinity melatonin receptors (MT1) in normal and malignant human breast tissue. *Am J Clin Pathol.* 2002; 118(3): 451-8.
27. Cos S., González A., Martínez-Campa C., Mediavilla M.D., Alonso-González C., Sánchez-Barceló E.J. Melatonin as a selective estrogen enzyme modulator. *Curr Cancer Drug Targets.* 2008; 8: 691-702.
28. Mediavilla M.D., Cos S., Sánchez-Barceló E.J. Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Life Sci.* 1999; 65(4): 415-420.
29. Blask D.E. Melatonin, sleep disturbance and cancer risk. 2008; 13: 257-264.
30. Blask D.E., Dauchy R.T., Brainard G.C., Hanifin J.P. Circadian stage-dependent inhibition of human breast cancer metabolism and growth by the nocturnal melatonin signal: consequences of its disruption by light at night in rats and women. *Integr Cancer Ther.* 2009; 8(4): 347-353.
31. Srinivasan V., Spence D.W., Pandi-Peumal S.R., Trakht I., Cardinali D.P. Therapeutic actions of melatonin in cancer: possible mechanisms. *Integr Cancer Ther.* 2008; 7(3): 189-203.
32. Jassem J., Bobek-Biliewicz B., Krzakowski M. i wsp. Rak Piersi. Krzakowski M., Herman K., Jassem J. i wsp. Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych – 2009. Część I. *Via Medica, Gdańsk* 2009: 185-231.
33. Feigelson H.S., Henderson B.E. Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis.* 1996; 17: 2279-2284.
34. Russo I.H., Russo J. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1998; 3: 49-61.
35. Landeghem A.A., Poortman J., Nabuurs M., Thijssen J.H. Endogenous concentration and subcellular distribution of estrogens in normal and malignant human breast tissue. *Cancer Res.* 1985; 45: 2900-2906.
36. Yue W., Wang J.P., Hamilton C.J., Demers L.M., Santen R.J. In situ aromatization enhances breast tumor estradiol levels and cellular proliferation. *Cancer Res.* 1998; 58: 927-32.
37. Yue W., Santen R.J., Wang J.P. i wsp. Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003; 86: 477-486.
38. Wong Z.W., Ellis M.J. First-line endocrine treatment of breast cancer: aromatase inhibitor or antiestrogen? *Br J Cancer.* 2004; 90: 20-25.
39. Molis T.M., Spriggs L.L., Hill S.M. Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol.* 1994; 8: 1681-1690.
40. Molis T.M., Walters M.R., Hill S.M. Melatonin modulation of estrogen receptor expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Oncol.* 1993; 3: 687-694.
41. Rato A.G., Pedrero J.G., Martínez M.A., del Rio B., Lazo P.S., Ramos S. Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding. *FASEB J.* 1999; 13: 857-868.
42. Aronika S.M., Kraus W.L., Katzenellenbogen B.S. Estrogen action via the cAMP signalling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 8517-8521.
43. Kiefer T., Ram P.T., Yuan L., Hill S.M. Melatonin inhibits estrogen receptor transactivation and cAMP levels in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2002; 71: 37-45.
44. Dai J., Inoscho E.W., Yuan L., Hill S.M. Modulation of intracellular calcium and calmodulin by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res.* 2002; 32: 112-9.
45. Del Rio B., García-Pedrero J.M., Martínez-Campa C., Zuazua P., Lazo P.S., Ramos S. Melatonin: an endogenous specific inhibitor of estrogen receptor a via calmodulin. *J Biol Chem.* 2004; 279: 38294-38302.
46. Cos S., Martínez-Campa C., Mediavilla M.D., Sánchez-Barceló E.J. Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res.* 2005; 38: 136-142.
47. Reiter R.J., Tan D.X., Erren T.C., Fuentes-Broto L., Paredes S.D. Light-mediated perturbations of circadian timing and cancer risk: a mechanistic analysis. *Integr Cancer Ther.* 2009; 8(4): 337-46.
48. Oh E.Y., Ansell C., Nawaz H., Yang C.H., Wood P.A., Hrushesky W.J. Global breast cancer seasonality. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 123(1): 233-243.
49. Cohen M., Lippman M., Chabner B. Role of pineal gland in aetiology and treatment of breast cancer. *Lancet.* 1978; 2(8094): 814-816.
50. Davis S., Mirick D.K. Circadian disruption, shift work and the risk of cancer: a summary of the evidence and studies in Seattle. *Cancer Causes Control.* 2006; 17(4): 539-545.
51. Chen S.T., Choo K.B., Hou M.F., Yeh K.T., Kuo S.J., Chang J.G. Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers. *Carcinogenesis.* 2005; 26(7): 1241-6.
52. Schernhammer E.S., Hankinson S.E. Urinary melatonin levels and postmenopausal breast cancer risk in the Nurses' Health Study cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18(1): 74-79.
53. Nagata C., Nagao Y., Yamamoto S., Shibuya C., Kashiki Y., Shimizu H. Light exposure at night, urinary 6-sulfatoxymelatonin, and serum estrogens and androgens in postmenopausal Japanese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17(6): 1418-1423.
54. Schernhammer E.S., Berrino F., Krogh V. i wsp. Urinary 6-sulfatoxymelatonin levels and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100(12): 898-905.
55. Kloog I., Haim A., Stevens R.G., Barchana M., Portnov B.A. Light at night contributes with incident breast but not lung cancer in the female population of Israel. *Chronobiol Intl.* 2008; 25: 65-81.
56. Stevens R.G. Electric power use and breast cancer: a hypothesis. *Am J Epidemiol.* 1987; 125(4): 556-561.
57. Hansen J. Risk of breast cancer after night- and shift work: current evidence and ongoing studies in Denmark. *Cancer Causes Control.* 2006; 17(4): 531-537.
58. Davis S., Mieick D.K., Stevens G. Night shift work, Light at night, and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93(20): 1557-1562.
59. Schernhammer E.S., Schulmeister K. Melatonin and cancer risk: does light at night compromise physiologic cancer protection by lowering serum melatonin levels? *Br J Cancer.* 2004; 90(5): 941-943.
60. Hahn R.A. Profound bilateral blindness and the incidence of breast cancer. *Epidemiology.* 1991; 2(3): 208-210.
61. Pukkala E., Verkasalo P.K., Ojamo M., Rudanko S.L. Visual impairment and cancer: a population-based cohort study in Finland. *Cancer Causes Control.* 1999; 10(1): 13-20.
62. Feychting M., Osterlund B., Ahlbom A. Reduced cancer incidence among the blind. *Epidemiology.* 1998; 9(5): 490-494.
63. Flynn-Evans E.E., Stevens R.G., Tabandeh H., Schernhammer E.S., Lockley S.W. Total visual blindness is protective against breast cancer. *Cancer Causes Control.* 2009; 20(9): 1753-1756.
64. Verkasalo P.K., Lillberg K., Stevens R.G. Sleep Duration and Breast Cancer: A Prospective Cohort Study. *Cancer Res.* 2005; 65: 9595-9600.
65. Wu A.H., Wang R., Koh W.P., Stanczyk F.Z., Lee H.P., Yu M.C. Sleep duration, melatonin and breast cancer among Chinese women in Singapore. *Carcinogenesis.* 2008; 29: 1244-1248.
66. Kakizaki M., Kuriyama S., Sone T. i wsp. Sleep duration and the risk of breast cancer: the Ohsaki Cohort Study. *Br J Cancer.* 2008; 99(9): 1502-1505.
67. Erren T.C., Piekarski C. Does winter darkness in the Arctic protect against cancer? The melatonin hypothesis revisited. *Med Hypotheses.* 1999; 53: 1-5.
68. Davis S., Kaune W.T., Mirick D.K., Chen C., Stevens R.G. Residential magnetic fields, light-at-night, and nocturnal urinary 6-sulfatoxymelatonin concentration in women. *Am J Epidemiol.* 2001; 154(7): 591-600.
69. Gergert R., Hanf V., Emons G., Gröndker C. Signal transduction of the melatonin receptor MT1 is disrupted in breast cancer cells by electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics.* 2010; 31(3): 237-245.
70. Chen C., Ma X., Zhong M., Yu Z. Extremely low-frequency electromagnetic fields exposure and female breast cancer

risk: a meta-analysis based on 24,338 cases and 60,628 controls. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 123(2): 569-576.

71. Kolstad H.A. Nightshift work and risk of breast cancer and other cancers--a critical review of the epidemiologic evidence. *Scand J Work Environ Health.* 2008; 34(1): 5-22.

72. 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.