

Mélatonine et vieillissement

Y. Touitou, A. Bogdan, A. Auzéby, B. Selmaoui

Service de Biochimie Médicale, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, 91 bd. de l'Hôpital, 75013, Paris

Tirés-à-part : Y. Touitou

Texte reçu le 21 avril 1998 et accepté le 16 juin 1998

Résumé : La mélatonine est une hormone sécrétée principalement par la glande pinéale ou épiphyse et secondairement par la rétine. Synthétisée à partir du tryptophane, son rythme circadien caractéristique est sous le contrôle de la lumière via les deux enzymes clés de sa synthèse, la N-acétyl-transférase et l'hydroxyindole-O-méthyl-transférase. Chez l'homme, comme chez toutes les espèces étudiées, son maximum plasmatique est nocturne, aussi est-elle considérée comme le transducteur du jour solaire fournissant à l'organisme le cadre temporel sur lequel se construisent les séquences métaboliques. Ses taux circulants diminuant pendant le vieillissement, la question se pose de l'origine et/ou des effets de cette diminution ainsi que de l'éventuel bénéfice que l'on peut envisager de son administration chez le sujet âgé.

Mots-clés : mélatonine, vieillissement, désynchronisation, rythme.

Melatonin and ageing

Summary : Melatonin is a hormone secreted mainly by the pineal gland but also by the retina. It is synthesized from tryptophan and its characteristic circadian rhythm is ruled by light through the control of two limiting enzymic activities N-acetyl-transferase and hydroxyindole-O-methyl-transferase. In man - as in all studied species - its maximum plasma concentration is at night. Therefore it is considered as a signal transducing information on solar light within the organism thus providing the temporal framework upon which metabolic pathways are organized. Since its circulating levels decrease with ageing the question arises as to the origin and/or the consequences of this decrease, as well as the possible beneficial effects which could result from its administration in ageing humans.

Key words: melatonin, ageing, desynchronisation, rhythm.

Caractéristiques de la production de la mélatonine

La mélatonine (N-acétyl-5-méthoxytryptamine) est un composé indolique dérivé de la sérotonine. Principale hormone sécrétée par la glande pinéale, l'une de ses caractéristiques est sa sécrétion essentiellement nocturne. L'élévation nocturne de la production de mélatonine est la conséquence d'un message neuronal atteignant la

glande pinéale via les nerfs sympathiques périphériques qui l'innervent. Ce message est amorcé dans le noyau supra-chiasmatique (NSC) de l'hypothalamus quand les neurones sont soustraits à l'effet inhibiteur de la lumière. Le potentiel d'action arrivant à la glande pinéale induit, par les terminaisons nerveuses adjacentes aux pinéaloctes, la libération de la noradrénaline (NA), neurotransmetteur catécholaminergique.

La synthèse de la NA, élevée la nuit, est suivie par sa rapide libération. Une fois dans la fente synaptique, la NA interagit aux niveaux de la membrane du pinéaloctes avec les récepteurs β -adrénergiques et à un degré moindre avec les récepteurs α -adrénergiques. Les récepteurs β -adrénergiques transmettent le stimulus au système adénylate cyclase via les protéines stimulatrices liées aux nucléotides guanines (protéines Gs), il en résulte une augmentation intracellulaire en AMPc¹. L'expression de ce second messager intracellulaire compte pour l'augmentation de la production de la mélatonine nocturne.

La mélatonine est synthétisée dans la glande pinéale à partir d'un précurseur, le tryptophane, qui est transformé en 5-hydroxytryptophane par la tryptophane hydroxylase puis en 5-hydroxytryptamine ou sérotonine grâce à l'action d'une décarboxylase (Fig. 1). La voie de synthèse à partir de la sérotonine nécessite la présence de deux enzymes, la N-acétyltransférase (NAT) qui est considérée comme l'enzyme-clé capable de contrôler la vitesse à laquelle la mélatonine est synthétisée, et l'hydroxyindole-O-méthyltransférase (HIOMT).

Régulation

La mélatonine est synthétisée selon un rythme circadien très marqué avec un maximum pendant la phase d'obscurité. Cette rythmicité est générée par les noyaux supra-chiasmatiques et entraînée par l'alternance lumière/obscurité ; de plus la lumière contrôle la sécrétion de mélatonine : l'illumination nocturne, aussi brève qu'un

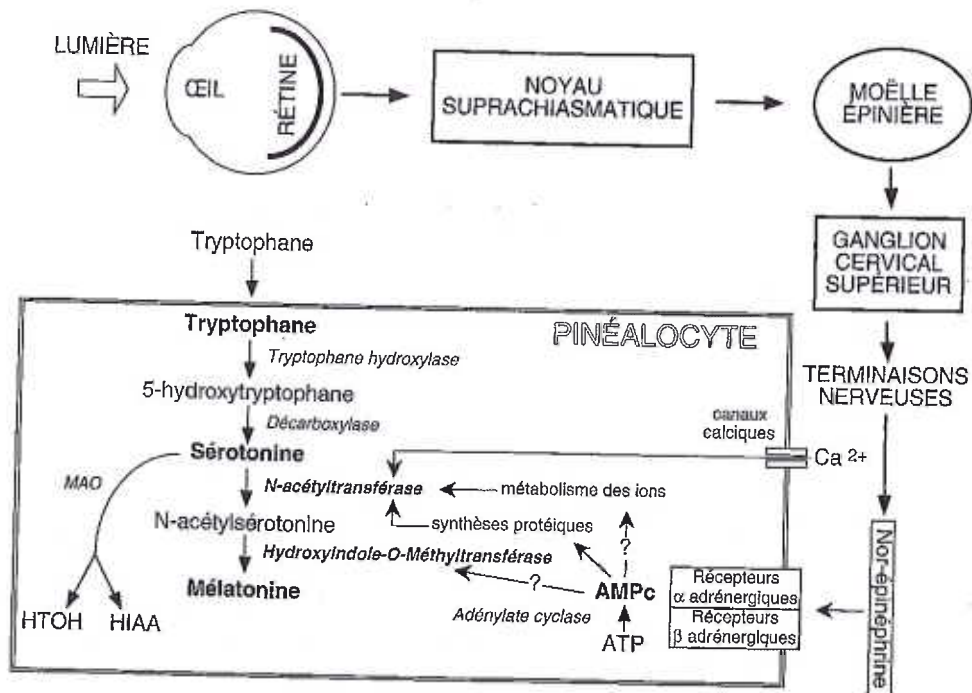


Fig. 1. Schéma du contrôle neuronal et de la biosynthèse de la mélatonine. AMPc, adénosine 3'-5' monophosphate cyclique; ATP, adénosine triphosphate; HIAA, acide 5-hydroxyindole acétique; HTOH, 5-hydroxytryptophol, MAO, monoamine oxydase, Nor-épinéphrine=Noradrénaline. Les points d'interrogations signalent les hypothèses non encore vérifiées.

flash de quelques secondes, abaisse le taux circulant de mélatonine chez l'animal de laboratoire (rat, hamster, par exemple). Le signal lumineux reçu par la rétine est transmis au noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus puis par des voies multisynaptiques complexes, au ganglion cervical supérieur qui lui-même envoie l'information à la glande pinéale¹. La noradrénaline libérée par les terminaisons nerveuses du système sympathique stimule les récepteurs β -adrénergiques des pinéalocytes. L'activité adénylate cyclase est augmentée et l'AMP cyclique formé favorise la synthèse des molécules de NAT via l'action de protéines kinases. En outre, l'augmentation de l'activité enzymatique de la NAT au cours de la nuit a pour effet de diminuer la concentration de sérotonine et d'augmenter celles de la N-acétyl sérotonine et de la mélatonine. Le catabolisme de la mélatonine (Fig. 2) est cérébral mais surtout hépatique. Au niveau cérébral, la mélatonine est oxydée avec ouverture du noyau pyrrole passant par une étape formylée pour aboutir à la N-acétyl-5-méthoxykinurénamine. Au niveau hépatique, la mélatonine est 6-hydroxylée par une hydroxylase microsomale en composé biologiquement inactif avant d'être soit sulfo-conjugué (70 à 80 pour cent) soit glucuro-conjugué (environ 5 pour cent). Il existe également, toujours au niveau hépatique,

des voies secondaires de désacétylation en 5-méthoxytryptamine puis d'oxydation en acide 5-méthoxyindole-acétique ou encore de déméthylation en N-acétyl sérotonine puis sulfo- ou glucuro-conjugaison. L'élimination se fait par les fécès (20 pour cent) et par les urines (70% pour cent), essentiellement sous forme de glucuro- et sulfo-conjugués de la 6-hydroxymélatonine et de kinurénamines ; la mélatonine libre et l'acide 5-méthoxyindole-acétique représentent respectivement moins de 1 pour cent et 0.5 pour cent de l'élimination urinaire.

Facteurs contrôlant le rythme de sécrétion de mélatonine

La lumière

La lumière est le facteur principal de l'environnement qui influe sur le rythme circadien du métabolisme des indoles dans la glande pinéale. La photopériode coordonne ou entraîne l'horloge endogène de l'organisme grâce au cycle lumière/obscurité de l'environnement. Chez les mammifères, la synchronisation de l'horloge endogène avec la photopériode commence très tôt, dès la vie fœtale, en relation avec la sécrétion de la mélatonine maternelle². Les

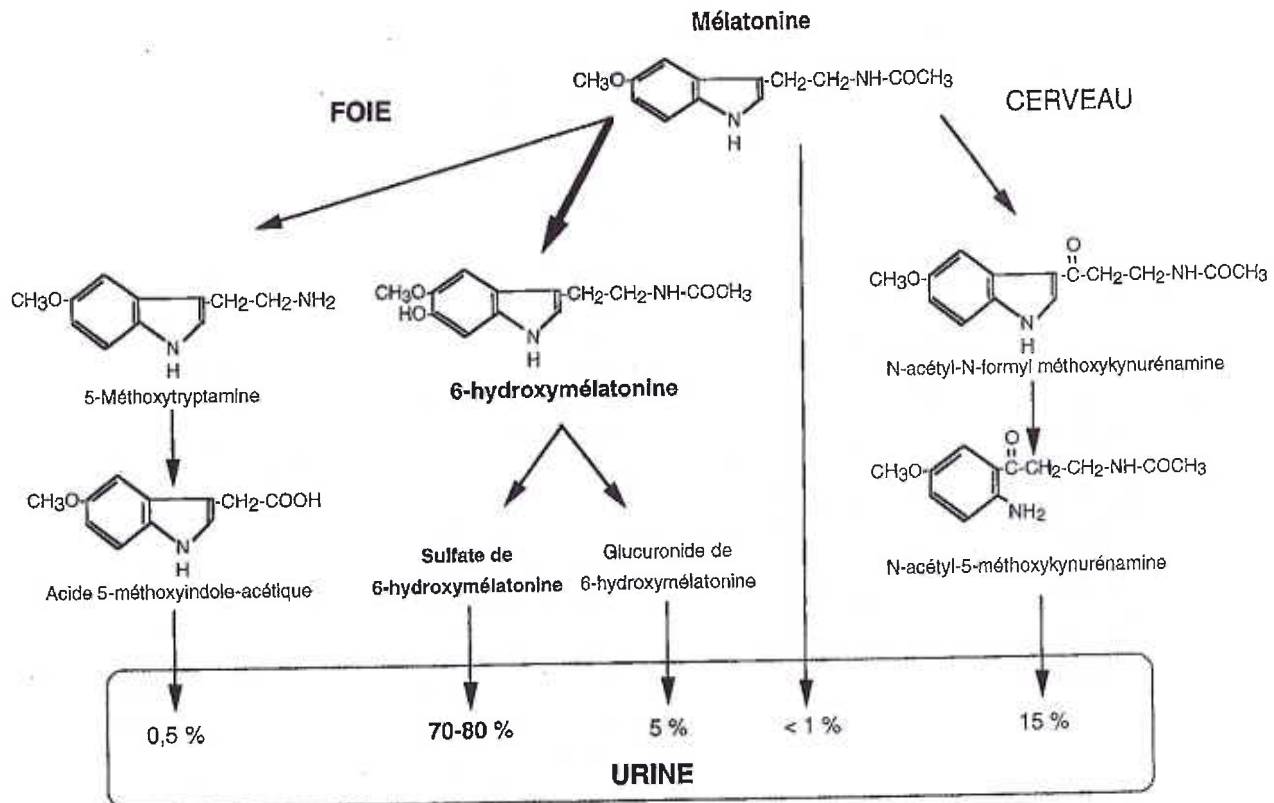


Fig. 2. Schéma du catabolisme hépatique et cérébral de la mélatonine.

changements de la photopériode modifient le rythme de la mélatonine (car la durée de sécrétion est proportionnelle à la longueur de la nuit) ainsi qu'on peut l'observer lors du travail posté^{3,4} ou du changement rapide de fuseau horaire, i.e. 'jet lag'^{5,6}.

Les champs magnétiques

Récemment, il a été montré que l'exposition au champ électromagnétique de basse fréquence (50 ou 60 Hz) peut moduler le rythme circadien de la synthèse et de la sécrétion de la mélatonine⁷. L'effet du champ magnétique de 50 Hz entraîne une diminution de la production de mélatonine avec 100 μ Tesla (μ T) seulement lorsque les rats sont soumis à une exposition aiguë (12 h) et à partir de 10 μ T lorsqu'il subissent une exposition chronique (un mois). L'apparition d'un effet avec 10 μ T en exposition chronique est en relation avec la durée d'exposition et peut donc correspondre à un effet cumulatif des champs magnétiques⁸. Cet effet a été rapporté à une diminution de l'activité de la NAT⁸.

Par contre, dans une étude récente réalisée sur 32 volontaires (âgés de 20 à 30 ans) et sains, nous n'avons observé aucun effet de l'exposition nocturne des jeunes

hommes à un champ magnétique de 50 Hz (10 μ T) pendant 9 h sur les profils circadiens de la mélatonine sérique, la 6-sulfatoxymélatonine urinaire, les variables immuno-hématologiques et le cortisol sérique^{9,10}.

Mélatonine et vieillissement

Les concentrations plasmatiques de mélatonine varient avec l'âge : élevées pendant la première enfance, elles diminuent pendant le développement jusqu'à l'âge adulte, se stabilisent pendant la maturité, puis baissent significativement avec le grand âge^{11,12}. Chez l'homme âgé (Fig. 3), une diminution de la concentration plasmatique de mélatonine est observée chez les sujets sains comme dans diverses pathologies¹³. Chez 39 sujets sains (6 hommes, 33 femmes) âgés d'environ 85 ans, les taux circulants de mélatonine étaient inférieurs à 0.17 nmol/l pour 54 pour cent, compris entre 0.17 et 0.43 nmol/l pour 37.5 pour cent et supérieurs à 0.43 nmol/l pour 8.5 pour cent d'entre eux¹³. Cette décroissance avec l'âge a également été observée dans le liquide céphalo-rachidien chez l'homme¹⁴, dans la glande pinéale et/ou le plasma de hamster de Syrie¹⁵, de rat femelle¹⁶ et de gerboise mâle¹⁷.

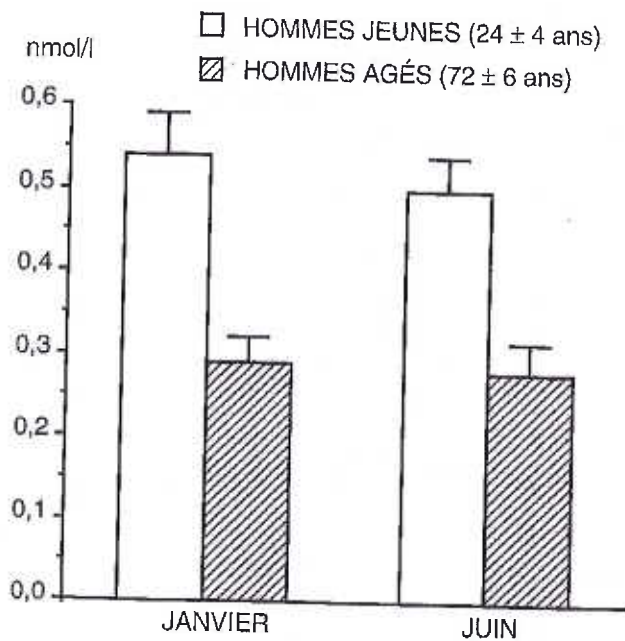


Fig. 3. Taux du pic mélatonine sérique chez les hommes jeunes et âgés.

La question se pose de l'origine de cette diminution. De nombreuses hypothèses sont avancées dont aucune, pour l'heure, ne semble pouvoir, à elle seule, rendre compte du phénomène.

Il est établi que la glande pinéale subit une calcification croissante avec l'âge¹⁸, ce qui pourrait être en rapport avec la diminution des taux circulants, mais il a été montré qu'il ne survenait ni d'altération des pinéaloctes¹⁹ ni de modification des activités enzymatiques dans la synthèse de la mélatonine²⁰.

Les modifications histologiques et fonctionnelles de l'hypothalamus, et en particulier du noyau suprachiasmatique, au cours du vieillissement²¹ pourraient porter une part de responsabilité dans l'évolution des taux de mélatonine.

Le vieillissement pourrait s'accompagner d'un ou plusieurs des facteurs suivants : diminution de la libération de la mélatonine par la glande pinéale, augmentation de son métabolisme ou de son excrétion, augmentation de la sensibilité à la lumière de l'axe rétine-SCN-pinéale chez le sujet âgé.

Par ailleurs il a été décrit chez les rongeurs une diminution avec l'âge du nombre des récepteurs β_1 -adrénergiques dans la membrane du pinéaloctes ou de leur sensibilité à la noradrénaline^{15,22,23} qui pourrait dans une certaine mesure participer au phénomène.

Enfin, la polyopathie du sujet âgé augmente la fréquence de l'administration chronique d'un certain nombre de drogues (antagonistes β -adrénergiques, IMAO,

benzodiazépines, AINS) connues pour diminuer les taux de mélatonine²⁴. D'autre part, d'un point de vue nutritionnel, les carences d'apport alimentaire de tryptophane sont plus probables avec l'accroissement de l'âge.

Mélatonine comme agent pharmacologique

Rôle dans le sommeil chez les sujets âgés

L'administration de mélatonine est suivie après un délai d'environ 1 h, d'une augmentation de la somnolence subjective²⁵⁻²⁹ et de modifications objectives de l'EEG en éveil³⁰. Sa propriété de réduire le temps de latence à l'endormissement s'accompagne de celle d'abaisser la température corporelle³¹. Les perturbations du sommeil chez le sujet âgé sont un fait patent³², et l'on a pu mettre en évidence chez ces sujets âgés affectés de trouble du sommeil des perturbations du rythme de la mélatonine similaires à ceux observés chez les aveugles : retard de phase de la mélatonine plasmatique³³, diminution de l'excrétion de la 6-sulfatoxymélatonine avec déphasage de son pic³⁴. C'est pourquoi elle a été envisagée comme moyen thérapeutique de correction des troubles du sommeil avec retard ou avance de phase, chez les sujets âgés^{35,36} comme chez les aveugles^{37,38}. Le ou les mécanismes d'action impliqués sont à rechercher.

Rôle anti-radicaux libres

La mélatonine, composé lipophile, pénètre facilement les cellules et toutes les actions qu'elle est susceptible de présenter ne mettent donc pas obligatoirement en jeu ses récepteurs membranaires spécifiques couplés aux protéines G. C'est ainsi que l'on a montré qu'elle possédait des propriétés antioxydantes et agissait comme un anti-radical libre plus puissant encore que la vitamine E^{39,40}, référence en la matière. Le rôle - suspecté - des radicaux libres dans les processus du vieillissement cellulaires font donc à nouveau envisager la mélatonine comme un moyen de lutte contre les processus neurodégénératifs liés au vieillissement.

Rôle inhibiteur de la croissance tumorale

L'inhibition *in vitro* de la croissance tumorale a été montrée sur des cellules de cancer du sein en culture^{41,42}, alors qu'*in vivo* la pinéalectomie de souris augmente le taux des mitoses des tumeurs⁴³. Une corrélation significative entre taux abaissés de mélatonine plasmatique et cancer de l'endomètre⁴⁴ a été mise en évidence et, eu égard à l'âge et à la ménopause, la diminution de la mélatonine plasmatique était plus importante dans le groupe de patientes cancéreuses que dans le groupe contrôle. Cette même corrélation a été trouvée pour le cancer du sein, et la diminution de la mélatonine plasmatique était d'autant plus importante que la tumeur était hormono-dépendante⁴⁵. D'autres études menées sur des patients avec des tumeurs solides à un stade

très avancé et traités par une association d'interleukine 2 et de mélatonine ont permis d'observer une stabilisation de l'affection et une amélioration des conditions de vie⁴⁶ et des résultats préliminaires analogues ont été obtenus par l'association de tamoxifène et de mélatonine dans le traitement du cancer du sein métastatique⁴⁷. Ces résultats restent à confirmer.

Effets secondaires connus

S'il n'ont pas été spécifiquement étudiés chez le sujet âgé, de nombreux effets secondaires - à court terme - de l'administration de la mélatonine ont déjà été rapportés⁴⁸ : hyperkinésie, torpeur, hémorragie, pigmentation, désordres gastro-intestinaux, céphalées, œdème des chevilles, exanthème, diplopie, douleurs hépatiques, thromboses, hyperglycémie (chez des diabétiques).

Les recherches sur la toxicité *stricto sensu* de la mélatonine à moyen et à long terme en sont à leur début [revue en⁴⁹]. Les premières études à l'échelle intracellulaire ont montré des variations significatives de l'activité mitochondriale et de la concentration de glutathion après traitement *in vitro* avec la mélatonine⁵⁰.

Conclusions

La mélatonine, par sa sécrétion essentiellement nocturne, donne à l'organisme la notion de photopériode (longueur respective du jour et de la nuit) mais aussi de l'alternance des saisons. Elle représente un outil de recherche puisque son administration, comme celle de la lumière forte, agit sur la phase des rythmes biologiques, permettant de les avancer ou de les retarder et ainsi de corriger les états accompagnés de tels désordres⁵¹. Pour autant, bien que de très nombreux travaux soient en cours, aucun résultat ne permet actuellement de poser l'indication du traitement par la mélatonine d'une quelconque autre pathologie que celles relatives à la désynchronisation. Bien plus, rien ne prouve encore que l'administration chronique ou à haute dose de cette neurohormone soit exempte de toxicité et la plus grande prudence continuera de s'imposer tant que les conditions de son innocuité ne seront pas cernées.

Références

1. Touitou Y, Arendt J, Pévet P. *Melatonin and the Pineal Gland: From Basic Science to Clinical Application*. Amsterdam: Elsevier, 1993.
2. Reppert SM, Duncan MJ, Goldman BD. Photoc influences on the developing mammal. In: *Photoperiodism, Melatonin and the Pineal*, Ciba Foundation Symposium 117. London: Pitman, 1985; 116-128.
3. Touitou Y, Motohashi Y, Reinberg A *et al*. *Eur J Appl Physiol* 1990; 60: 288-292.
4. Miyachi F. Night-shifted work affects circadian rhythms of melatonin, prolactin and LH. In: Touitou Y, Arendt J, Pévet P, eds. *Melatonin and the Pineal Gland: From Basic Science to Clinical Application*. Amsterdam: Elsevier 1993; 383-386.
5. Carruthers M, Arguelles AE, Mosovich A. Man in transit: biochemical and physiological changes during intercontinental flights. *Lancet* 1976; May: 977-981.
6. Daan S, Lewy AJ. Scheduled exposure to daylight: a potential strategy to reduce 'jet lag' following transmeridian flight. *Psychopharmacol Bull* 1984; 20: 566-568.
7. Wilson BW, Stevens RG, Anderson LE. Neuroendocrine mediated effects of electromagnetic-field exposure: possible role of the pineal gland. *Life Sci* 1989; 45: 1319-1332.
8. Selmaoui B, Touitou Y. Sinusoidal 50-Hz magnetic fields depress rat pineal NAT activity and serum melatonin. Role of duration and intensity of exposure. *Life Sci* 1995; 57: 1351-1358.
9. Selmaoui B, Lambrozo J, Touitou Y. Magnetic fields and pineal function in humans: evaluation of nocturnal acute exposure to extremely low frequency magnetic fields on serum melatonin and urinary 6-sulfatoxymelatonin circadian rhythms. *Life Sci* 1996; 58: 1539-1549.
10. Selmaoui B, Bogdan A, Auzéby A, Lambrozo J *et al*. Acute exposure to 50 Hz magnetic field does not affect hematologic or immunologic functions in healthy young men: a circadian study. *Bioelectromagnetics* 1996; 17: 364-372.
11. Touitou Y, Fèvre M, Lagoguey M, Carayon A *et al*. Age- and mental health-related circadian rhythms of plasma levels of melatonin, prolactin, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in man. *J Endocrinol* 1981; 91: 467-475.
12. Waldhauser F, Weiszenbacher G, Tatzler E, Gisinger B *et al*. Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and ageing. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66: 648-652.
13. Touitou Y, Fèvre-Montange M, Proust J *et al*. Age- and sex-associated modification of plasma melatonin concentrations in man. Relationship to pathology, malignant or not, and autopsy findings. *Acta Endocrinol* 1985; 108: 135-144.
14. Brown GM, Younf SN, Gauthier S, Tsui H *et al*. Melatonin in human cerebrospinal fluid in daytime: its origin and variation with age. *Life Sci* 1979; 25: 929-936.
15. Reiter RJ, Richardson BA, Johnson LY, Ferguson BN *et al*. Pineal melatonin rhythm: reduction in aging Syrian hamsters. *Science* 1980; 210: 1372-1373.
16. Reiter RJ, Craft CM, Johnson LY, King TE *et al*. Age-associated reduction in nocturnal pineal melatonin levels in female rats. *Endocrinology* 1981; 109: 1295-1297.
17. King TS, Richardson BA, Reiter RJ. Age-associated changes in pineal serotonin-N-acetyltransferase activity and melatonin content in the male gerbil. *Endocr Res Commun* 1981; 8: 253-262.
18. Schmid HA, Requinta PJ, Oxenkrug GF, Sturner W. Calcium, calcification, and melatonin biosynthesis in the human pineal gland: a postmortem study into age-related factors. *J Pineal Res* 1994; 16: 178-183.

19. Tapp E, Huxley M. The histological appearance of the human pineal gland from puberty to old age. *J Pathol* 1972; 108: 137-144.
20. Wurtman R, Axelrod J, Snyder SH. Age and enzyme activity in the human pineal gland. *J Clin Endocr Metab* 1964; 24: 299-301.
21. Hofman MA. Lifespan changes in the human hypothalamus. *Exp Gerontol* 1997; 32: 559-575.
22. Greenberg LH, Weiss B. β -adrenergic receptors in aged rat brain: reduced number and capacity of pineal gland to develop supersensitivity. *Science* 1978; 201: 61-63.
23. Weiss B, Greenberg LH, Cantor E. Age-related alterations in the development of adrenergic denervation supersensitivity. *Fed Proc* 1979; 38: 1915-1921.
24. Penev PD, Zee PC. Melatonin: a clinical perspective. *Ann Neurol* 1997; 42: 545-553.
25. Arendt J, Aldhous M, English J, Marks V et al. The effect of chronic, small doses of melatonin given in the afternoon on fatigue in man: a preliminary study. *Neurosci Lett* 1984; 45: 317-321.
26. Dollins AB, Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ et al. Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature and performance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1824-1828.
27. Nave R, Peled R, Lavie P. Melatonin improves evening napping. *Eur J Pharmacol* 1995; 275: 213-216.
28. Tzischinsky O, Lavie P. Melatonin possesses time-dependent hypnotic effects. *Sleep* 1994; 17: 638-645.
29. Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ et al. Sleep inducing effects of low doses of melatonin ingested in the evening. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 57: 552-558.
30. Cajochen C, Kräuchi K, von Arx M-A, Möri D et al. Daytime melatonin administration enhances sleepiness and theta/alpha activity in the waking EEG. *Neurosci Lett* 1996; 207: 209-213.
31. Reid K, Van Den Heuvel C, Dawson D. Day-time melatonin administration: effects on core temperature and sleep onset latency. *J Sleep Res* 1996; 5: 15-154.
32. Dement W, Richardson G, Prinz P et al. Changes in sleep and wakefulness with age. In: Finch C ed. *Handbook on the Biology of Aging*. New York, Van Nostrand, 1985; 692-717.
33. Sharma M, Palacios-Bois J, Schwartz G et al. Circadian rhythms of melatonin and cortisol in aging. *Biol Psychiatry* 1989; 25: 209-216.
34. Haimov I, Laudon M, Zisapel N, Souroujon M et al. Sleep disorders and melatonin rhythms in elderly people. *BMJ* 1994; 309: 167.
35. Haimov I, Lavie P, Laudon M, Herer P et al. Melatonin replacement therapy of elderly insomniacs. *Sleep* 1995; 18: 598-603.
36. Tzischinsky O, Dagan Y, Lavie P. The effects of melatonin on the timing of sleep in patients with delayed sleep phase syndrome. In: Touitou Y, Arendt J, Pévet P eds. *Melatonin and the Pineal Gland: From Basic Science to Clinical Application*. Amsterdam: Elsevier, 1993; 351-354.
37. Tzischinsky O, Pal I, Epstein R et al. The importance of timing in melatonin administration in a blind man. *J Pineal Res* 1992; 12: 105-108.
38. Arendt J, Skene DJ, Middleton B et al. Efficacy of melatonin treatment in jet lag, shift work, and blindness. *J Biol Rhythms* 1997; 6: 235-248.
39. Reiter J, Melchiorri D, Sewerinek E et al. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 1995; 18: 1-11.
40. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B et al. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; 1: 57-60.
41. Cos S, Sanchez-Barcelo E. Melatonin inhibition of MCF-7 human breast cancer cells growth: influence of cell proliferation rate. *Cancer* 1995; 13: 207-212.
42. Lemus-Wilson A, Kelly PA, Blask DE. Melatonin blocks the stimulatory effects of prolactin on human breast cancer cell growth in culture. *Br J Cancer* 1995; 72: 1435-1440.
43. Crespo D, Fernandez-Viadero C, Verduga R. Interaction between melatonin and estradiol on morphological and morphometric features of MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res* 1994; 16: 215-222.
44. Grin W, Grünberger W. A significant correlation between melatonin deficiency and endometrial cancer. *Gynecol Obstet Invest* 1998; 45: 62-65.
45. Tamarkin L, Almeida OFX, Danforth DN. Melatonin and malignant disease. In: *Photoperiodism, Melatonin and the Pineal*, Ciba Foundation Symposium 117. London: Pitman, 1985; 284-299.
46. Lissoni P, Barni S, Rovelli F, Brivio F et al. Neuroimmunotherapy of advanced solid neoplasms with single evening subcutaneous injection of low-dose interleukin-2 and melatonin: preliminary results. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 185-189.
47. Lissoni P, Barni S, Meregalli S et al. Modulation of cancer endocrine therapy by melatonin: a phase II study of tamoxifen plus melatonin in metastatic breast cancer patients progressing under tamoxifen alone. *Br J Cancer* 1995; 71: 854-856.
48. Nagtegaal JE, Smits MG, Van Der Meer YG, Fischer-Steenvoorden MGJ. Melatonin: a survey of suspected adverse drug reactions. *Sleep-Wake Res Netherl* 1997; 7: 115-118.
49. Guardiola-Lemaître B. Toxicology of melatonin. *J Biol Rhythms* 1997; 12: 697-706.
50. Osseni RA, Rat P, Bogdan A, Adolphe M et al. Circadian rhythms of glutathione and mitochondrial activity in human hepatic cell line. Influence of melatonin. In: Touitou Y ed. *Biological Clocks - Mechanisms and Applications*. Amsterdam: Elsevier, 1998; 111-114.
51. Touitou Y, Haus E. *Biologic Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine*. Berlin: Springer Verlag, 1994.