

Prof. Luigi Di Bella

ASPETTI CHIAVE
NELLA FISIOLOGIA
DELLA MELATONINA:
TRENT'ANNI
DI RICERCHE

A
EDIZIONI
ARTESTAMPA

ASPETTI CHIAVE NELLA FISIOLOGIA DELLA MELATONINA: TRENTA ANNI DI RICERCHE

Luigi Di Bella

review a cura di: Luciano Gualano

(Laboratorio Privato di Fisiologia "Prof. Luigi Di Bella", Modena)

RIASSUNTO

Molti sono ormai gli articoli in cui la Melatonina non è considerata solo un neuroormone con effetti sui ritmi circadiani ma studiata anche come agente antiossidante, anticancerogeno o immunomodulatore. Lo scopo di questa revisione, oltre a presentare i risultati di oltre trent'anni di studi, è focalizzare l'attenzione sulle seguenti conclusioni: la Melatonina è in grado di stimolare la produzione di piastrine da parte dei megacariociti, di agire sui canali ionici di questi ultimi tramite le "outward currents", di esercitare una fisiologica attività antiaggregante, allungando così l'emivita delle piastrine. La Melatonina può essere trasportata ovunque per opera delle piastrine e per le sue caratteristiche di solubilità lipofila attraversare facilmente le membrane cellulari, modulando così gli scambi emotissutali ed assicurando un'ottima crasi ematica. Essa interagisce con le cellule dell'endotelio, regolandone il rilascio di E_{drf} e E_{dcf} (Endothelium-derived relaxing factor ed Endothelium-derived contracting factor), e con le piastrine, influenzandone la cessione dei componenti dei corpi densi (dense bodies). Infine le piastrine, considerate elementi mobili e itineranti, si potrebbero comportare come propagazioni serotoninergiche e/o melatoninergiche e questa funzione potrebbe essere assimilata al rilascio di neurotrasmettitori da parte dei neuroni del sistema nervoso centrale; questo dinamismo nella fisiologia della Melatonina può essere la nuova chiave per intervenire nell'eziopatogenesi dei tumori.

Parole chiave: melatonina • trombocitogenesi • aggregazione piastrinica • canali ionici • tumori

Abbreviazioni

Melatonina (MLT)
Megacariocita/i (MEG)
Piastrina/e (PLT)
Serotonina (5-HT)
N-acetiltransferasi (NAT)
Acetilcoenzima (Ac.CoA)
Idrossindolo-O-metiltransferasi (HIOMT)
Demarcation Membrane System (DMS)
2,3-Difosfo-D-glicerato (2,3-DPG)
Sindrome Depressiva Stagionale (SAD)
Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF)
Endothelium-Derived Contracting Factor (EDCF)
Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)
Amine Precursor Uptake Decarboxylatoin (APUD)

INTRODUZIONE

Mentre sempre più spesso sono pubblicati articoli e rassegne di studi sulla validità o meno degli effetti oncostatici della Melatonina (Mlt) [59, 2, 74, 46], pensiamo sia opportuno anche da parte nostra, che per oltre trent'anni ci siamo interessati del problema, fare il punto sulle ricerche che, in particolare, abbiamo svolto in questo tempo su megacariociti (Meg), piastrine (Plt) e Mlt.

La qualifica di multidisciplinarietà nell'azione della Mlt, definizione usata per la prima volta dalla dr.ssa Beatrice Guardiola al Congresso della "Society for Neuroscience" nel 1994, appare pienamente giustificata. L'ubiquità della sostanza, la sua neuroergia, il suo "uptake" possono, infatti, modificare molte vedute sulla fisiologia del sistema nervoso e di quello serotoninergico in particolare [Di Bella⁶] [29, 81, 100]. Il relegare l'azione della Melatonina agli effetti sui ritmi circadiani o come antiossidante e anticitotossico è probabilmente limitante, mentre può non essere vano pensare agli effetti su tutti gli organi periferici raggiungibili direttamente mediante le piastrine, queste ultime possono, infatti, immagazzinare la Melatonina, distribuirla ovunque mediante i vasi sanguigni e adoperarla nel metabolismo dei neurotrasmettitori del sistema nervoso centrale [85, 1, 13, 78].

SINTESI DELLA MELATONINA

La Melatonina è formata in organi diversi: nella pineale, nella retina e nelle ghiandole di Harder, nella mucosa dell'apparato gastroenterico, nei Meg e nelle Plt; in quantità, velocità, modalità e condizioni diverse in relazione all'organo, alla sua funzione ed ai suoi rapporti con gli altri organi; in relazione alla temperatura ed alla disponibilità dell'amminoacido da cui prende origine, il triptofano.

L'amminoacido essenziale L-triptofano viene idrossilato e decarbossilato in 5-idrossitriptamina o serotonina (5-ht); quest'ultima viene prima acetilata per opera dell'N-acetiltransferasi (Nat), trasferendo un gruppo acetilico dall'acetil coenzima A (Ac.CoA), quindi metilata mediante l'idrossindolo-O-metiltransferasi (Hiomt) in N-acetil-5-metossitriptamina o Mlt, il metile in posizione -5- è ceduto probabilmente dall'adenosinmetionina [80]; la Mlt è poi copulata in posizione -6- con solfati o glucuronati nel fegato ed infine eliminata con la saliva e l'urina [51, 56]. La Mlt può, infine, essere riconvertita nel suo precursore N-acetilserotonina, presumibilmente nella retina [102] e nelle piastrine [54].

La Melatonina viene distribuita a tutto l'organismo tramite il plasma ove è sospesa ovvero le piastrine ove si accumula mediante un legame d'idrogeno con l'Adenosina [17], in virtù di questo legame le Plt sono in grado di regolare la concentrazione di Mlt nell'ambiente circostante.

MELATONINA E PIASTRINOGENESI

Sono espresse qui di seguito, nella loro sequenza temporale, le intuizioni che ci hanno permesso di collegare la Melatonina con la piastrinogenesi.

1969. Poiché la stimolazione del sistema abenulo-epifisario induce nel ratto un aumento temporaneo significativo del tasso piastrinamico [29, 28], senza contemporanea modificazione significativa degli elementi della serie rossa o bianca [27], e poiché l'epifisi forma la Mlt [1, 57], si ritenne non improbabile riferire alla Mlt le modificazioni piastriniche rilevate [85, 21, 61]. Ciò comportava inevitabilmente l'esistenza di due importanti fattori: la permeabilità del midollo osseo alla Mlt e la reattività dei Meg alla stessa [Di Bella¹] [54, 104, 16].

1977. Si decise così di aggiungere Mlt "in vitro" ad una sospensione di midollo osseo di ratto [40, 38]. I Meg formano le Plt dal "Demarcation Membrane System" (Dms) di Behnke [4], ma con modalità diverse alla periferia rispetto alla zona perinucleare. La piastrinogenesi è condizionata dai sistemi microtubulari e dalle reti actomiosiniche, la cui attivazione dipende dalla concentrazione serotoninica [71], a sua volta dipendente dalla sintesi melatoninica, nonché da alcuni mediatori come l'Adrenalina e l'Acetilcolina [Di Bella¹] [25]. I componenti metilati e/o acetilati, necessari alla formazione delle Plt, potrebbero essere forniti al Meg dalle fibre nervose colinergiche del midollo osseo e trasferite alla 5-ht dalla Acetilcolinesterasi dei globuli rossi [35, 32]. Espansioni citoplasmatiche nei Meg furono osservate "in vitro" staccarsi dalla cellula madre e risolversi in Plt [50, 37]; queste si formerebbero per coalescenza, allungamento e ripiegatura del sistema di membrane Dms [4, 66]. Il Dms, che forma le protrusioni citoplasmatiche prima e le Plt dopo, si approfondisce nel sistema canalicolare aperto e consente il trasferimento di sostanze dall'esterno verso i granuli alfa e i corpi densi [75, 101, 67, 103], questi ultimi sono numerosi nelle Plt dove possono formare depositi di 5-ht [69, 20, 98]. Le Plt, inoltre, presentano attività Ac.CoA-carbossilasica, nonché gli enzimi Nat e Hiomt necessari al metabolismo della 5-ht [68, 64, 70], sono quindi potenzialmente in grado di sintetizzare la Mlt [29, 54, 14].



Figura 1. Megacariocita in soluzione di Melatonina e Adp (1200x). La freccia superiore indica un'evidente granulosa protrusione citoplasmatica. La Melatonina induce un progressivo aumento nella granulosità del citoplasma. A sinistra, la membrana del Megacariocita diventa sottile, fino a scomparire, rilasciando così le piastrine.

1979. L'aggiunta di Mlt e/o Adp al substrato di coltura della sospensione di midollo osseo "in vitro" ha portato all'osservazione di numerose immagini riferibili ad eventi di piastrinogenesi (Fig.1,2) [39, 24]. La spiegazione per questo accelerato e/o potenziato effetto trombocitogenico potrebbe essere plausibile se la Mlt esercitasse a livello del Meg un'azione simile a quella della 5-lt sulle Plt [105] e si potesse attivare rapidamente il sistema actomiosinico microtubulare della membrana del Meg [71].

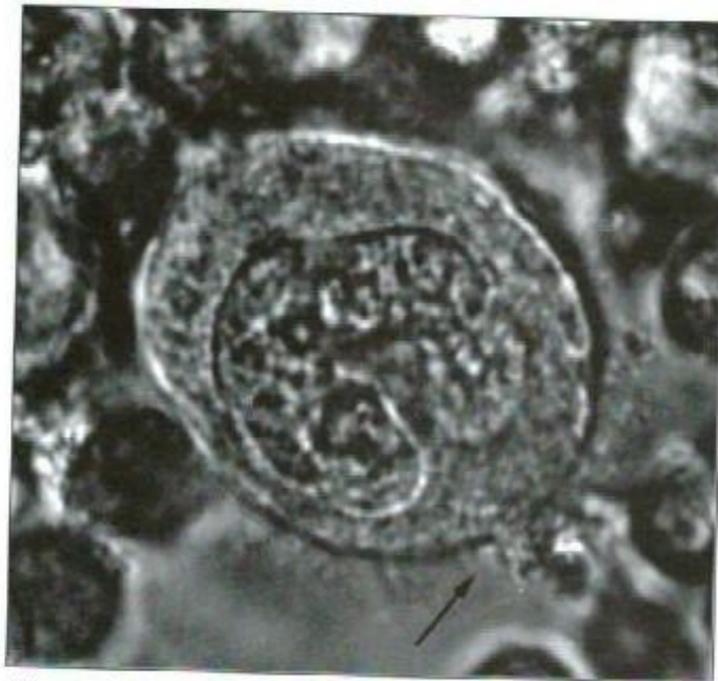


Figura 2. Megacariocita in soluzione di Melatonina e Adp (1600x). Evidenziata dalla freccia la soluzione di continuo della membrana cellulare, da cui fuoriesce un getto di piastrine. Il megacariocita osservato è evidentemente ad un basso stadio di maturazione.

1980. Lo studio, con filtro di eccitazione a 510 nm, della fluorescenza dei Meg, dopo l'aggiunta di Mlt al mezzo di sospensione, ha dimostrato la necessità della presenza di inibitori della Nat o della Hiomt per la comparsa di immagini intensamente fluorescenti [Gualano⁸]. Presenti gli inibitori della Nat (4-1naftilvinil-piridina) (Fig.3), la Mlt promuove, infatti, una vistosa formazione di Plt su tutta la superficie del Meg; un effetto meno marcato, ma della stessa natura, hanno gli inibitori della Hiomt (S-adenosil-L-cisteina) [83].

1984. Anche dopo trattamento endovenoso (1mg Mlt/0,1ml A.Et. 95°, sol.10%) di Mlt in ratti adulti, si sono ottenuti Meg in piastrinogenesi [Rossi⁹]. L'osservazione al microscopio elettronico a scansione (Fig.4) del comportamento dei Meg in presenza di Mlt ha permesso di ottenere immagini simili a quelle già viste al microscopio ottico ed ha confermato l'influenza della Mlt sull'integrità della membrana e sulla funzione piastrinopoietica dei Meg [84].

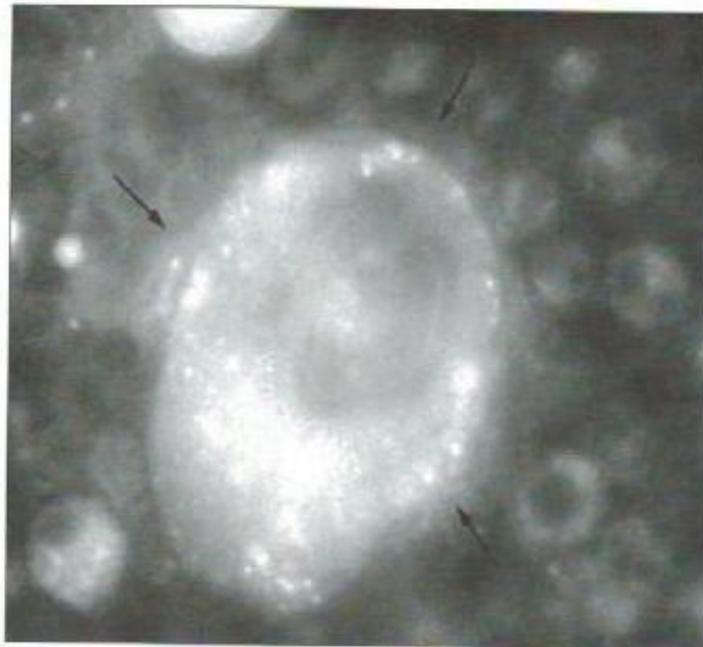


Figura 3. Megacariocita perfuso con Melatonina e inibitore della Nat (1200x). La fluorescenza (510nm) rende evidenti (freccie) numerose piastrine sulla superficie della membrana cellulare. L'area riferibile al nucleo risalta per la minor fluorescenza.

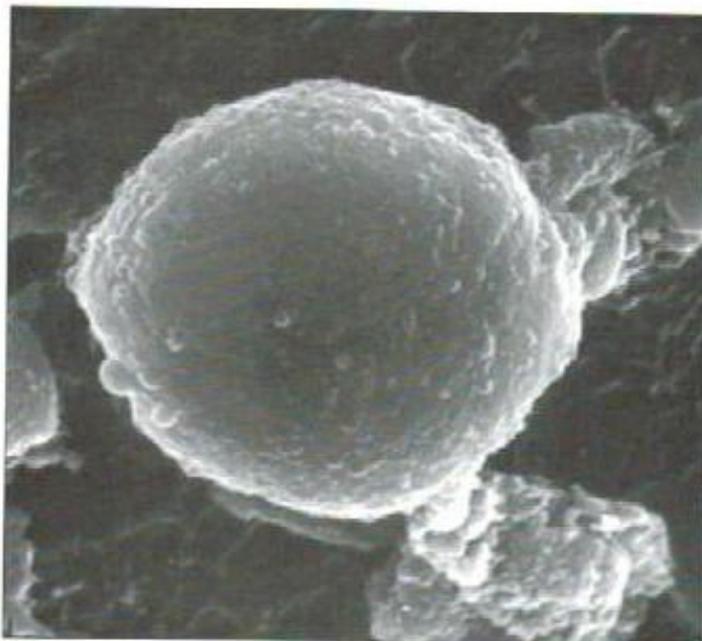
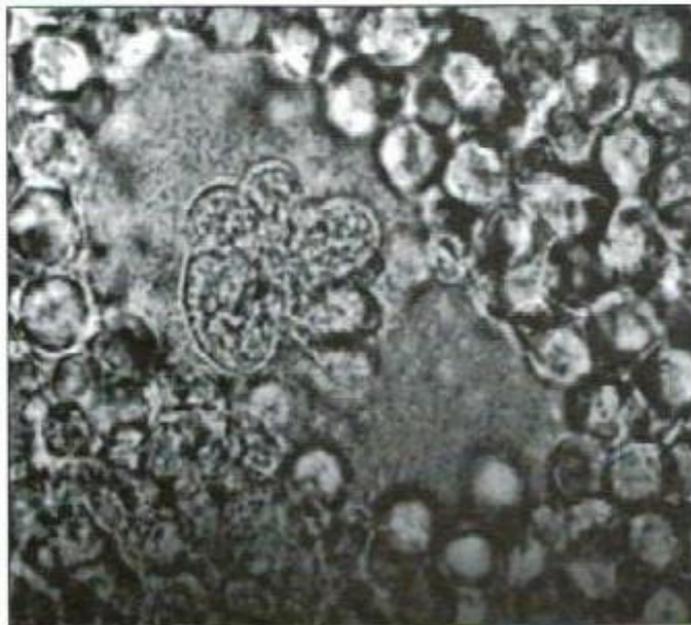


Figura 4. Megacariocita in soluzione di Melatonina al microscopio a scansione elettronica (3000x). Numerose protrusioni citoplasmatiche di dimensioni diverse sono visibili sulla intera superficie cellulare.

1994. Si passò quindi ad osservare il comportamento dei Meg dopo microiniezioni intra o extracitoplasmatiche di alcuni mediatori chimici, tra cui Serotonina, Epinefrina, Acetilcolina [Di Bella¹]. Dopo microiniezione intracitoplasmatica di una soluzione di Melatonina/Adenosina, quest'ultima accresce di molto la solubilità in acqua della Melatonina [17], si osservò la comparsa e l'accrescimento di una formazione piastrino-simile (Fig.5,6,7,8,9). Le immagini si distribuiscono in un arco di soli venti minuti primi, con la neoformazione che risulta, all'osservazione in luce fluorescente (510nm), sempre molto più luminosa del citoplasma circostante [Gualano^h] [22].



*Figura 5. Megacariociti in soluzione di coltura (1200x).
Il citoplasma appare omogeneamente granuloso.*

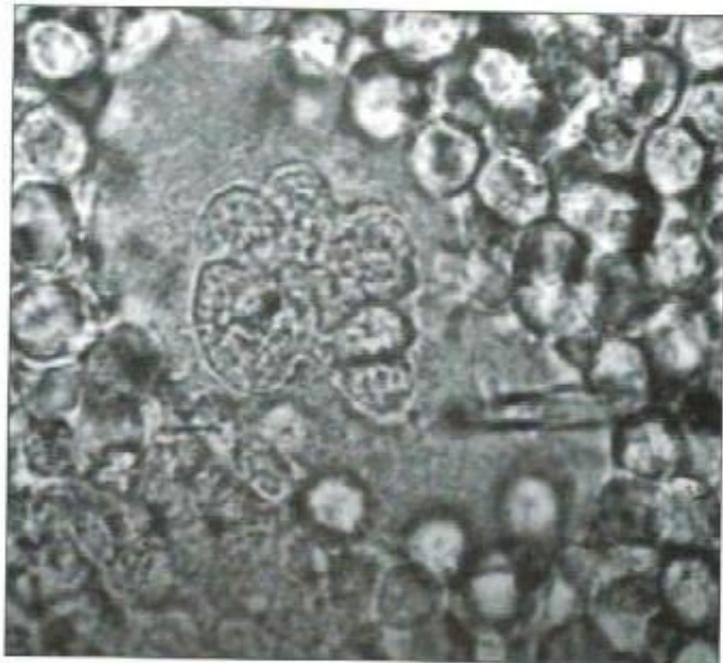


Figura 6. Megacariocita e microiniezione intracitoplasmatica (1200x). Mediante microiniettore Eppendorf 5242 si effettua una iniezione intracitoplasmatica con una soluzione di Melatonina/Adenosina (2/9, 5mg/200 μ l).

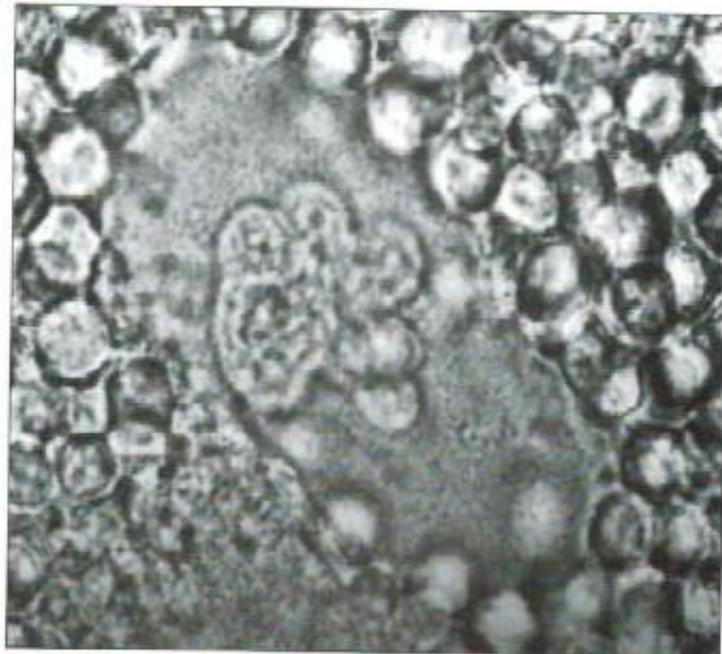


Figura 7. Lo stesso megacariocita dopo 1' (1200x). Dopo solo un minuto primo, all'interno dell'affossamento causato dall'ago, appare un piccolo granulo

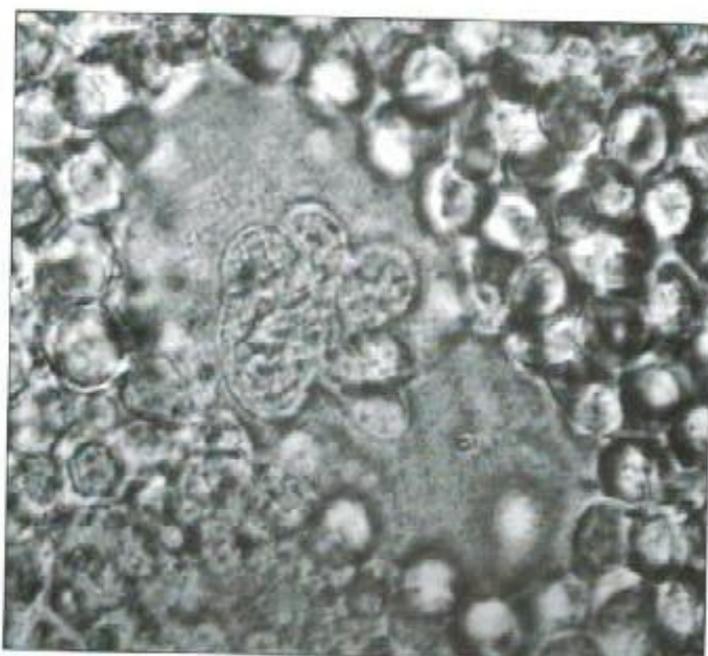


Figura 8. Lo stesso dopo 6' (1200x). Dopo sei minuti primi, la neoformazione è evidente.

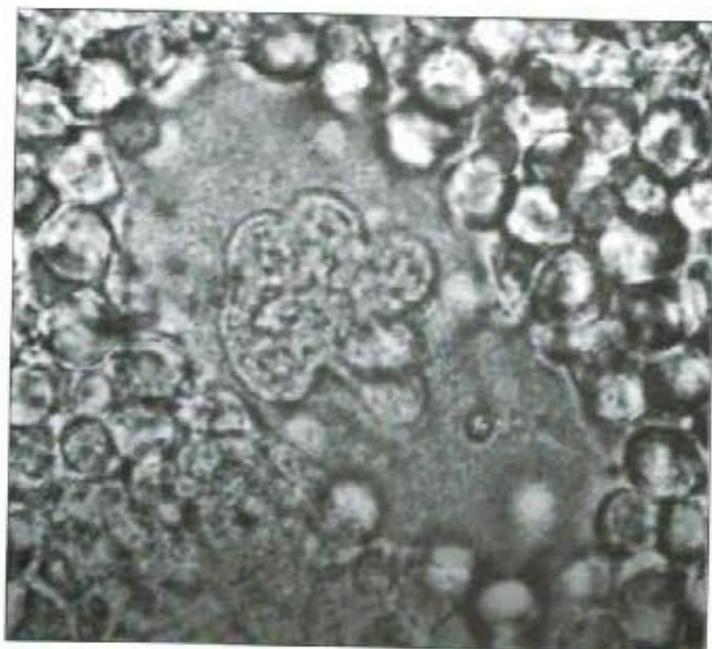


Figura 9. Lo stesso dopo 20' (1200x). Venti minuti primi dopo, la neoformazione ha raggiunto dimensioni notevoli.

1999. La Mlt, che non interagisce con la membrana cellulare del Meg o con le membrane del Dms, probabilmente raggiunge il nucleo dove potrebbe esercitare un'azione simile a quella della Citocalasina B, sia nell'inibire il processo di endoreduplicazione sia nell'aumentare la poliploidia nucleare [36, 23]. Alcune immagini in fluorescenza, ove l'aumento della stessa è confinata al citoplasma o al nucleo del Meg a secondo della presenza o meno di fenomeni riferibili a piastrinogenesi, sembrano avvalorare questa ipotesi (Fig.3).

Da quanto sopra riportato si può dedurre: 1) l'esistenza di reazioni di demetilazione e di desacetilazione della Mlt a livello della membrana megacariocitica [80, 54, 84, 94]; 2) la presenza di sistemi contrattili sulla stessa membrana e su quella delle Plt [71, 12, 76]; 3) l'attivazione di questi sistemi ad opera della Mlt [84, 6]; 4) la coalescenza delle membrane del Dms ad opera della Mlt con neoformazione di Plt [19]; 5) che solo i punti sulla membrana esterna dei Meg in cui la Mlt riuscirebbe a raggiungere una concentrazione adeguata siano pronti ad un rilascio di Plt [Di Bella²]; 6) che il bilanciamento della rete energetica dei mediatori chimici promuoverebbe la contrazione dei filamenti della membrana dei Meg inducendo così l'espulsione delle Plt [95].

MELATONINA ED AGGREGAZIONE PIASTRINICA

1976. Dati gli effetti favorevoli sull'ossigenazione del sangue e dei tessuti dopo trattamento con Mlt [Di Bella¹], abbiamo indagato se cresceva nei globuli rossi il tasso di 2,3-Difosfo-D-glicerato (2,3-Dpg) [5, 26]. Il trattamento con Mlt sembra far calare significativamente, dopo 150 minuti, rispetto agli animali di controllo, il contenuto in 2,3-Dpg intracitocitario; questa diminuzione potrebbe contribuire a spiegare la maggiore ossigenazione osservata [88, 86].

1979. Con tutti i citati presupposti, lo studio dell'influenza della Mlt sulla aggregazione piastrinica è stato ritenuto utile alla conoscenza della complessa fisiologia delle Plt [Di Bella⁵] [52, 31].

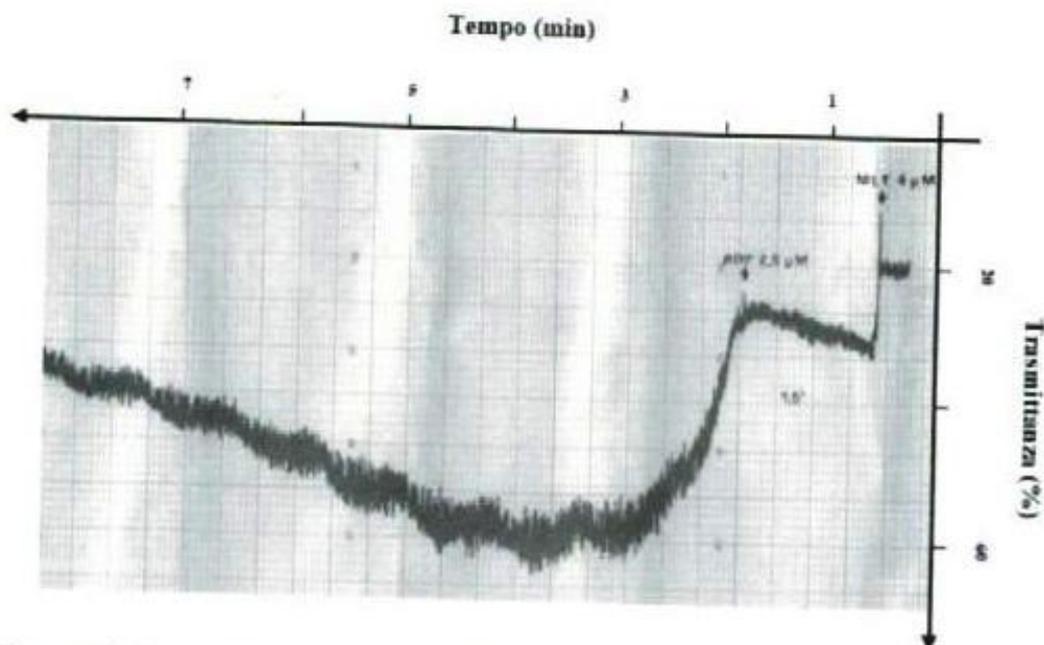


Figura 10. Aggregazione piastrinica. La Melatonina ($4,0\mu\text{M}$), aggiunta 90 minuti secondi prima dell'Adp ($2,5\mu\text{M}$), riesce a bloccare la reazione di liberazione (release reaction) dell'Adp endogeno, rendendo così reversibile l'aggregazione piastrinica (velocità della carta: $2,5\text{cm}/\text{min}$).

La Mlt, a concentrazioni farmacologiche ($4\mu\text{M}$) nel plasma umano o di ratto, può, in parte, disaggregare una sospensione piastrinica (Prp, plasma ricco di piastrine) già avviata all'aggregazione dall'aggiunta di Adp ($2.5\mu\text{M}$) o, se aggiunta preventivamente, bloccare la "release reaction" di Adp nelle Plt, probabilmente attraverso il suo legame con la tubulina piastrinica [12, 72], rendendo reversibile il fenomeno (Fig.10) e prolungando così la vita alle Plt stesse. Non è improbabile che nelle Plt possa coesistere la Mlt accanto alla 5-ht e che dal rapporto di concentrazione dei due composti indolici, dalla trasformazione dell'uno nell'altro [98], possa in parte dipendere il cambiamento di forma delle Plt (shape change) che precede il processo di adesione e di aggregazione piastrinica nonché alcune turbe della funzionalità delle stesse [3, 34]. La Mlt risulterebbe, quindi, essere il più fisiologico degli antiaggreganti piastrinici, permettendo in questo modo alle Plt di raggiungere gli endoteli dei vasi sanguinei e di liberare man mano le sostanze in esse contenute [Rossi¹⁰] [97, 96].

MELATONINA E CANALI IONICI

2002. Essendo stato osservato in numerose emopatie uno sviluppo anormale del sistema microtubulare delle Plt [91], così come variazioni nell'intensità di corrente nelle "outward K⁺ currents", normalmente presenti sulla membrana dei Meg [49, 82], legate alla maturazione della cellula [47] è stato ritenuto utile studiare l'effetto della Mlt sui canali ionici presenti sulla membrana del Meg.

La variazione dell'intensità delle "outward currents" fu studiata fruendo della tecnica del "patch-clamp", che permette l'identificazione delle correnti ioniche che fluiscono attraverso i canali voltaggio-dipendenti della membrana cellulare [41], e quindi registrata mediante un amplificatore Axopatch model 1D (Axon Instrument, U.S.A.). Questa variazione, relativa allo ione K⁺ presente sulla membrana del Meg, risulta, in effetti, direttamente influenzata dalla concentrazione di Mlt perfusa nel substrato di coltura della sospensione di midollo osseo (Fig.11) [22]. Il clampaggio è stato condotto in configurazione di "whole-cell" a -60 mV e sottoposto ad un protocollo di voltaggio (la membrana fu depolarizzata in gradini di 10 mV da -60 mV a +50 mV, con la durata dell'impulso di 180 millisecondi) che veniva monitorato tramite un oscilloscopio. Dopo la rottura della membrana, il potenziale calcolato a V₀ variava da -17 a -65 mV (-35±15; n=50) e la resistenza di entrata indicava una oscillazione da 0,6 a 2,6 G Ω (1,6±1,2; n=50) [90, 44].

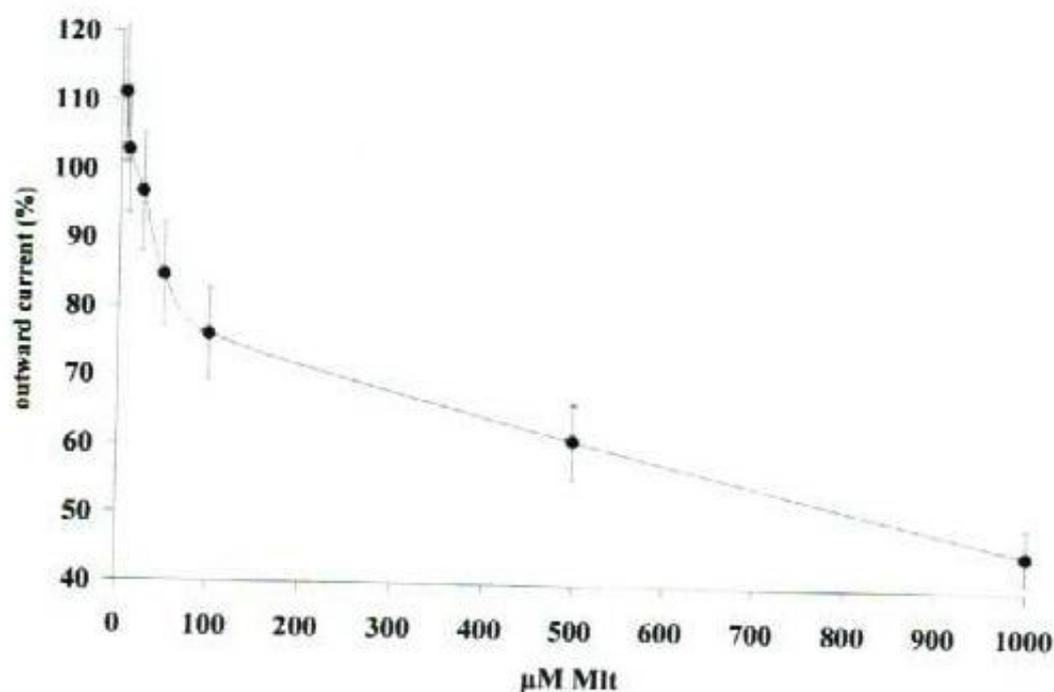


Figura 11. Concentrazione di Melatonina e Outward K⁺ Currents. La curva mostra il comportamento delle "outward currents", dopo 2 minuti prima di perfusione, a differenti concentrazioni di Melatonina (5-10-25-50-100-500-1000µM) (media+s.d.; n=5). Dai 25µM in poi, vi è un decremento nelle "outward currents" proporzionale alla concentrazione di Melatonina. Il declino della intensità di corrente (I/V) è reversibile fino a 500µM, mentre diventa irreversibile quando la concentrazione di Melatonina raggiunge o supera 1000µM.

Questa stretta correlazione tra Mlt, Plt e canali ionici, in virtù della correlazione tra la pompa cationica della membrana e gli intimi processi di produzione delle piastrine, può quindi rappresentare un approccio innovativo allo studio della trombocitogenesi. Inoltre, si potrebbe ipotizzare che la funzione più squisitamente fisiologica della ghiandola pineale non sia limitata all'increzione melatoninica, ma che, attraverso i meccanismi elettrofisiologici legati alla Mlt e alle "outward currents", si possa estendere al controllo dell'attività di ogni singola cellula. La Mlt e il suo metabolismo possono rappresentare il principale sistema di integrazione neurovegetativa.

MELATONINA E NEOPLASIE

È universalmente riconosciuto che la Mlt interviene nei processi metabolici collegati in qualche modo coi ritmi circadiani del buio/luce – sonno/veglia, i quali in molti casi sono a loro volta in relazione con la Sad (Sindrome Depressiva Stagionale) ed altri disordini comportamentali [73], ma tutti questi ben noti ed ampiamente studiati meccanismi non servono a chiarire l'azione della Mlt in un approccio oncologico. La modalità d'azione della Mlt nella malattia cancerosa non è unica, né identica in ogni caso; i punti chiave che, a nostro avviso, meglio caratterizzano e spiegano quest'azione possono essere sintetizzati come segue:

a) azione diretta sulla trombocitogenesi e ripercussione indiretta sull'intera emopoiesi. Disturbi nella nutrizione con malassorbimento di aminoacidi essenziali accompagnano spesso affezioni tumorali. Riduzione o mancanza di 5ht, Nat e Hiomt provocano una diminuzione della produzione o un malfunzionamento delle piastrine; anemia, leucopenia e trombocitopenia sono, infatti, presenti in un gran numero di pazienti cancerosi. Somministrazione di Melatonina in pazienti neoplastici normalizza i valori della crasi ematica e ristabilisce le funzioni del sistema serotoninico [Di Bella³, Gualano⁷] [28, 63, 7].

b) interazione con le cellule dell'endotelio e scambi con la membrana basale, mediante il rilascio di Edrf (Endothelium-Derived Relaxing Factor) o Edcf (Endothelium-Derived Contracting Factor) e la cessione di Pdgf (Platelet-Derived Growth Factor). Il giusto numero e la funzionalità delle piastrine sono essenziali per un'efficiente circolazione sanguinea e per i normali scambi cellula-endotelio. L'azione antiaggregante e piastrinogenica della Melatonina supplisce a tutto ciò, preservando l'integrità della membrana piastrinica, aumentando la loro emivita e regolando il rilascio dei componenti presenti all'interno dei corpi densi piastrinici, fra cui il Pdgf, verso l'endotelio sottostante [86, 15, 42, 8]. Quest'ultimo assumerebbe, così, una sua funzione endocrina attraverso l'Edcf e l'Edrf; funzione influenzata, a sua volta, dalla Mlt che agirebbe in tal modo anche sulla permeabilità capillare [65, 33].

c) comportamento delle piastrine simile ai neurotrasmettitori serotoninergici. Le piastrine possono essere considerate gli elementi mobili, itineranti, multifattoriali e onnipresenti di un sistema Apud (Amine Precursor Uptake Decarboxylation) plastico ed ubiquitario, con tutto il

loro contenuto di 5ht, Norepinefrina, Acetilcolina, Epinefrina, Mlt, Nat, Hiomt, nonché di Amp, Adp, Atp [Di Bella⁴] [77, 53]. Le Plt quindi si comporterebbero di volta in volta come propagazioni serotoninergiche, melatoninergiche, dopaminergiche secondo le diverse situazioni locali e/o la natura delle cellule cui vengono in contatto. Questa tipica, intrinseca funzione di rilascio di 5ht o Mlt può essere assimilata al rilascio di neurotrasmettitori da parte dei neuroni centrali. Il ciclo sonno/veglia può modulare questi scambi cellulari, come è stato dimostrato eliminando parzialmente o totalmente le fasi del sonno, con coinvolgimento della proteina C-fos (immediate-early gene); similmente, la ritmicità della Mlt può influenzare la funzionalità del nucleo soprachiasmatico [92, 45, 89]. Infine, considerando che la 5ht può promuovere l'espressione della proteina C-fos nella corteccia cerebrale di ratto [9, 58, 93], si può ipotizzare l'inizio di un nuovo capitolo nello studio della fisiologia del sistema nervoso centrale, dove la Melatonina, non come statica molecola ma nel suo dinamismo chimico, eserciterà un ruolo complesso fino ad intervenire nell'eziopatogenesi dei tumori [21, 18, 79].

In molti protocolli chemioterapici, l'agente oncostatico è spesso affiancato da altre sostanze che ne possono intensificare l'effetto, da questo presupposto abbiamo dedotto l'affermazione che la Mlt, da sola, non guarisce alcun tumore, ma che senza Mlt è difficile guarire qualsiasi tumore [Di Bella⁶] [11, 60, 48].

DISCUSSIONE

La Melatonina è principalmente considerata un neuroormone prodotto dalla ghiandola pineale con influenza sui ritmi circadiani. Noi riteniamo che la Melatonina sia una molecola dagli effetti multidisciplinari, la cui intima potenzialità non sia stata ancora completamente chiarita. Pensiamo, comunque, che le seguenti considerazioni possano essere utili a questo scopo.

La sintesi della Melatonina non è limitata alla ghiandola pineale ma trova spazio anche nei megacariociti e nelle piastrine, sempre che gli enzimi Nat e Hiomt siano presenti [28, 39, 84, 19]. I megacariociti formano le piastrine dal Dms, ma con modalità diverse alla periferia rispetto alla zona perinucleare. La piastrinogenesi è condizionata dai sistemi micrombulari e dalle reti actomiosiniche, la cui attivazione dipende dalla concentrazione serotoninica, a sua volta dipendente dalla sintesi

melatoninica [25, 39, 12, 72].

La Melatonina, trasportata dalle piastrine, è in grado di raggiungere i più remoti distretti, e in virtù delle sue caratteristiche di solubilità lipofila, può attraversare tutte le membrane biologiche. Può regolare gli scambi emo-tissutali, con tutte le conseguenze sul trofismo dei tessuti, assicurare un'ottima crasi ematica ed esercitare la più fisiologica delle attività antiaggreganti [Di Bella³] [86, 52]. Di conseguenza può allungare l'emivita delle piastrine ed influire sul rilascio di Pdgf, Edrf e Edcf [Di Bella²] [42, 65, 33]. La cessione di Melatonina da parte delle piastrine può essere assimilata al rilascio dei neurotrasmettitori e, attraverso la sua azione sui canali ionici tramite le "outward currents", può intervenire direttamente sulla fisiologia cellulare [Di Bella⁴] [22, 30, 99].

Non fu possibile per gli autori di queste ricerche dimostrare in modo conclusivo l'influenza della Melatonina sull'accrescimento tumorale. Numerosi altri reviews hanno, comunque, cercato di fare luce sui meccanismi implicati in questa correlazione [79, 43, 10, 62]. L'ubiquità della Melatonina, trasportata dalle piastrine, è per noi un dato indispensabile per agire sui tumori ovunque essi si trovino, ulteriori studi saranno necessari per meglio chiarire questo aspetto dell'azione della Melatonina.

Da una prospettiva clinica, numerosi sono gli studi che documentano l'azione antiossidante ed oncostatica della Melatonina [74, 46, 7], o riassumono i dati sul suo potenziale uso come antiblastico [100, 11, 48]. Sulla base della letteratura disponibile, la Melatonina mentre sembra risultare utile nel trattamento sia dei disordini neurovegetativi [73] che trombocitici [Di Bella³] [21, 63], è di giovamento nella prevenzione e/o terapia di numerosi tipi di tumore [18, 87, 55].

CONCLUSIONI

Noi riteniamo che il metabolismo della Melatonina possa rappresentare il mezzo principale di realizzazione di una integrazione neurovegetativa. La Melatonina, molecola multifattoriale, potrà essere la nuova porta di accesso alla comprensione dell'eziopatogenesi dei tumori e alla introduzione di una terapia neoplastica biologica e preventiva. Sebbene numerosi studi siano già disponibili, riteniamo che siano indispensabili ulteriori ricerche.

Note

- 1) Di Bella L, Gualano L, Minuscoli GC. Platelet production by megakaryocytes following intra or extra cytoplasmatic injection of mediators. 4° Int Congr of Comp Phys Bioch, Birmingham, United Kingdom, Aug 6-11, 1995.
- 2) Di Bella L, Rossi MT, Gualano L, Scalera G. Molecular mechanism of bone marrow thrombocytopoiesis by melatonin. EPSG 2nd Colloq., Giessen, Germany, Jul 1-4, 1981.
- 3) Di Bella L, Rossi MT, Scalera G. Physiological basis for a rational therapy of bone marrow diseases. The 16th International Congress of Hematology, Kyoto, Japan, Sept 5-11, 1976.
- 4) Di Bella L, Rossi MT. Nervous control of thrombocytopoiesis. IUPS 26° Int Congress, New Delhi, India, Oct 20-26, 1974.
- 5) Di Bella L, Scalera G, Rossi MT, Gualano L. L'aggregazione piastrinica in presenza di Melatonina (MLT). SIF, Firenze, Italy, May 25-26, 1979.
- 6) Di Bella L, Scalera G, Rossi MT. Melatonin: an essential factor for the treatment and recovery from leukemia and cancer. Int Symp on Melatonin, Bremen, Germany, Sept 28-30, 1980.
- 7) Gualano L, Bruschi C, Ghiaroni V, Di Bella L. Further clinical and experimental data on platelet production by melatonin (MLT). Pineal Cell Biology, Oxford, United Kingdom, Aug 27- Sept 1, 2000.
- 8) Gualano L, Di Bella L, Rossi MT, Scalera G. Fluorescenza di megacariociti di ratto in presenza di melatonina (MLT). SIBS, Caserta, Italy, Oct 2-4, 1980.
- 9) Rossi MT, Di Bella L, Gualano L. Bone marrow platelet production after Melatonin i.v. infusion. III° Colloquium of the European Pineal Study Group, Pécs, Hungary, Aug 13-17, 1984.
- 10) Rossi MT, Di Bella L, Scalera G, Gualano L. Platelet turnover as influenced by melatonin. Int Symp on Melatonin, Bremen, Germany, Sept 28-30, 1980.

Bibliografia

1. Axelrod J. The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science*. 1974; **184**:1341-1348.
2. Bartsch C, Bartsch H. Significance of melatonin in malignant diseases. *Wien Klin Wochenschr*. 1997; **109**(18):722-729.
3. Baumgartner HR, Muggli R. Adhesion and aggregation. In Gordon JL, editor. *Platelets in Biology*. Amsterdam: North Holland Publ.Co.; 1976. p. 23.
4. Behnke O. An electron microscope study of the rat megakaryocyte. II. Some aspects of platelet release and microtubules. *J Ultrastr Res*. 1969; **26**:111-129.
5. Benesch R, Benesch RE, Enoki Y. The interaction of hemoglobin and its subunits with 2,3-diphosphoglycerate. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1968; **61**:1102-1106.
6. Benitez-King G, Anton-Tay F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia*. 1993; **49**:635-641.
7. Benot S, Gobena R, Reiter RJ, Garcia-Maurino S, Osuna C, Guerrero JM. Physiological levels of melatonin contribute to the antioxidant capacity of human serum. *J Pineal Res*. 1999; **8**(1): 59-64.
8. Betsholtz C, Raines EW. Platelet-derived growth factor: a key regulator of connective-tissue cells in embryogenesis and pathogenesis. *Kidney Int*. 1997; **51**:1361-1369.
9. Bhat RV, Baraban JM. Activation of transcription factor gene in striatum by cocaine: role of both serotonin and dopamine system. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993; **267**(1):496-505.
10. Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT, Holowachuk EW, Ruhoff MS, Kopff HS. Melatonin Inhibition of Cancer Growth in Vivo Involves Suppression of Tumor Fatty Acid Metabolism via Melatonin Receptor-mediated Signal Transduction Events. *Cancer Research*. 1999; **59**:4693-4701.
11. Bubenik GA, Blask DE, Brown GM, Maestroni CJ, Pang SF, Reiter RJ, et al. Prospects of the clinical utilization of melatonin. *Biol Signals Recept*. 1998; **7**(4):195-219.
12. Cardinali DP. Molecular Biology of Melatonin: Assessment of the "Microtubule Hypothesis of Melatonin Action". In Birau N et al., editors. *Melatonin: Current Status and Perspective*. Pergamon Press; 1980. p. 247-256.
13. Cardinali DP, Del Zar MM, Vacas MI. The effects of melatonin in human platelets. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam*. 1993; **43**(1-2):1-13.
14. Champier J, Claustrat B, Besancon R, Eymon C, Killer C, Jouvet A, et al. Evidence for tryptophan hydroxylase and hydroxy-indol-O-methyl-transferase mRNAs in human blood platelets. *Life Sci*. 1997; **60**(24):2191-2197.
15. Chernoff A, Levine RF, Goodman DS. Origin of Platelet-derived Growth Factor in Megakaryocytes in

- Guinea Pigs. *J Clin Invest.* 1980; **65**:926-930.
16. Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res.* 2000; **28**(4):193-202.
 17. Coronati R, Di Bella L, Scalera G, Rossi MT, Tarozzi G. Contributo alla natura delle interazioni tra nucleotidi e aril-ammine nella fisiologia delle piastrine. *Boll Soc It Biol Sper.* 1975; **51**:20.
 18. Cos S, Garcia-Bolado A, Sanchez-Barcelo EJ. Direct antiproliferative effects of melatonin on two metastatic cell sublines of mouse melanoma (B16BL6 and PG19). *Melanoma Res.* 2001; **11**(2):197-201.
 19. Cramer EM, Norol F, Guichard J, Breton-Corius J, Vanckenker W, Masse JM, et al. Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand. *Blood.* 1997; **89**:2336-2346.
 20. Da Prada M, Pletscher A, Trauzer JP, Knuchel H. Subcellular localization of 5hydroxytryptamine and histamine in blood platelets. *Nature.* 1967; **216**(122):1315-1317.
 21. Di Bella L. Orientamenti fisiologici nella terapia delle emopatie. *Bull Sc Med.* 1974; **145**:1-3.
 22. Di Bella L, Bruschi C, Gualano L. Melatonin effects on megakaryocyte membrane patch-clamp outward K⁺ current. *Med Sci Monit.* 2002; **8**(12):527-531.
 23. Di Bella L, Gualano L, Bruschi C, Minuscoli S, Tarozzi G. Cytochalasin B influence on megakaryocyte patch-clamp. *Adv Exp Med Biol.* 1999; **460**:373-376.
 24. Di Bella L, Gualano L, Rossi MT, Scalera G. Effetti dell'azione simultanea della melatonina (MLT) e dell'ADP sui megacariociti in vivo. *Boll Soc It Biol Sper.* 1979; **55**:389-393.
 25. Di Bella L, Gualano L, Rossi MT, Scalera G. Sul meccanismo della piastrinogenesi in vitro. *Boll Soc It Biol Sper.* 1978; **54**:5.
 26. Di Bella L, Rossi MT, Gualano L, Scalera G. Ulteriore contributo al meccanismo di produzione delle variazioni del 2,3-DPG intraeritrocitario dopo trattamento con melatonina (MLT). *Boll Soc It Biol Sper.* 1976; **52**:21.
 27. Di Bella L, Rossi MT, Lancellotti L, Zini I. Alcuni aspetti dei rapporti fra leucopoiesi e piastrinopoiesi. *Arch Fisiol.* 1972; **69**:75-76.
 28. Di Bella L, Rossi MT, Pellegrino N, Grimaldi A, Santoro V. Ruolo del sistema abenulo-epifisario nella regolazione del tasso-piastrinamico. *Boll Soc It Biol Sper.* 1969; **45**:171.
 29. Di Bella L, Rossi MT, Scalera G. Perspectives in Pineal Function. *Prog Brain Res.* 1979; **52**: 475-478.
 30. Eck KM, Yuan L, Duffy L, Ram PT, Ayettey S, Chen L et al. A sequential treatment regimen with melatonin and all-trans retinoic acid induces apoptosis in MCF-7 tumour cells. *Br J Cancer.* 1998; **77**(12):2129-2137.
 31. Eviukova EV, Petrishchev NN. The effect of melatonin on thrombocyte aggregation in healthy subjects. *Fiziol Cheloveka.* 1998; **24**(6):122-125.
 32. Finin VS, Volotovskii ID, Konev SV. Role of acetylcholinesterase in the transmembrane transfer of anions in erythrocytes. *Biofizika.* 1979; **24**(1):96-100.
 33. Furchgott RF. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Biosci Rep.* 1999; **19**(4):235-251.
 34. Gimeno MF, Ritta MN, Bonacossa A, Lazzari M, Gimeno AL, Cardinali DP. Inhibition by melatonin of prostaglandin synthesis in hypothalamus, uterus and platelets. In Birau N et al., editors. *Melatonin: Current Status and Perspective.* Pergamon Press; 1980. Vol 29: p. 147-150.
 35. Godin DV, Au T, Garnett ME. Acetylcholinesterase: a probe for the study of antiarrhythmic drug-membrane interactions. *Biochim Biophys Acta.* 1978; **512**(2):388-396.
 36. Godman GC, Miranda AF. Cellular contractility and the visible effects of cytochalasins. In Tanenbaum, editor. *Cytochalasins. Biochemical and cell biological aspects.* Amsterdam: North Holland Publishing Company; 1978. p. 279-429.
 37. Grant BW, Solberg L, Nichols W, Mann KG. Proliferation and maturation of human megakaryocytes in vitro. *Ann NY Acad Sci.* 1987; **509**:34-40.
 38. Gualano L, Di Bella L, Rossi MT, Scalera G. Aspetti funzionali dei megacariociti in vitro. *Boll Soc It Biol Sper.* 1978; **54**:4.
 39. Gualano L, Di Bella L, Rossi MT, Scalera G. Contributo alle tecniche di studio in vitro dei megacariociti I-III. *Boll Soc It Biol Sper.* 1979; **55**:318-330.
 40. Gualano L, Di Bella L, Rossi MT, Scalera G. Effetti della melatonina sui megacariociti viventi di midollo di ratto. *Boll Soc It Biol Sper.* 1977; **53**:44.
 41. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 1981; **391**:85-100.

42. Heldin CH, Westermark B. Platelet-derived growth factor and autocrine mechanisms of oncogenic processes. *Crit Rev Oncog*. 1991; **2**:109-124.
43. Hill SM, Blask DE. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Research*. 1983; **43**(21):6121-6126.
44. Hou SW, Zheng P, Sun FY. Melatonin inhibits outward delayed rectifier potassium currents in hippocampal CA1 pyramidal neuron via intracellular indole-related domains. *J Pineal Res*. 2004; **36**(4):242-249.
45. Illnerova H, Sumova A. Photoc entrainment of the mammalian rhythm in melatonin production. *J Biol Rhythms*. 1997; **12**(6):547-555.
46. Kajdaniuk D, Marek B, Kos-Kudla B, Ciesielska-Kopacz N, Bunner B. Oncostatic effect of melatonin action-facts and hypotheses. *Med Sci Monit*. 1999; **5**(2):350-356.
47. Kapural L, Fein A. Changes in the expression of voltage-gated K⁺ currents during development of human megakaryocytic cells. *Biochim Biophys Acta*. 1997; **1326**:319-328.
48. Karasek M, Reiter RJ, Cardinali DP, Pawlikowski M. Future of melatonin as a therapeutic agent. *Neuro Endocrinol Lett*. 2002; **23**(1):118-121.
49. Kawa K. Voltage-gated calcium and potassium currents in megakaryocytes dissociated from guinea-pig bone marrow. *Journal of Physiology*. 1990; **431**:187-206.
50. Keyserlingk DC, Albrecht M. On the pseudopodia of megakaryocytes and their importance for the liberation of thrombocytes. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 1968; **39**(3):320-327.
51. Kopin IJ, Pare CMB, Axelrod J, Weisbach H. The Fate of Melatonin in Animals. *J Biol Chem*. 1961; **236**:3072-3075.
52. Korubliht LI, Finocchiaro L, Molinas FC. Inhibitory effect of melatonin on platelet activation induced by collagen and arachidonic acid. *J Pineal Res*. 1993; **14**(4):184-191.
53. Kvetnoi IM, Raikhlid NT. Clinical pathology of the APUD system (apudopathy). *Klin Med (Mosk)*. 1978; **56**(11):15-22.
54. Launay JM, Lamaitre BJ, Husson HP, Dreux C, Dry J. Melatonin synthesis by rabbit platelets. *Life Sci*. 1982; **31**(14):1487-1494.
55. Lenoir V, de Jonage-Canonico MB, Perrin MH, 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.
56. Leone AM, Francis PL, Silman RE. The isolation, purification, and characterisation of the principal urinary metabolites of melatonin. *J Pineal Res*. 1987; **4**(3):253-266.
57. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y. Isolation of Melatonin and 5-Methoxyindole-3-acetic Acid from Bovine Pineal Glands. *J Biol Chem*. 1960; **235**:1992-1997.
58. Leslie RA, Moorman JM, Coulson A, Grahaime-Smith DG. Serotonin₂/1C receptor activation causes a localized expression of the immediate-early gene *c-fos* in rat brain: evidence for involvement of dorsal raphe nucleus projection fibres. *Neuroscience*. 1993; **53**(2):457-463.
59. Lissoni P, Barni S, Cattaneo G, Tancini G, Esposti G, Esposti D, et al. Clinical result with the pineal hormone melatonin in advanced cancer resistant to standard antitumor therapies. *Oncology*. 1991; **48**(6):48-50.
60. Lissoni P, Barni S, Mandala M, Ardizzoia A, Paolorossi F, Vaghi M, et al. Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status. *Eur J Cancer*. 1999; **35**(12):1688-1692.
61. Lissoni P, Mandala M, Rossini F, Fumagalli L, Barni S. Growth Factor: Thrombopoietic Property of the Pineal Hormone Melatonin. *Hematol*. 1999; **4**(4):335-343.
62. Lissoni P, Rovelli F, Malugani F, Bucovec R, Conti A, Maestroni GJ. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuro Endocrinol Lett*. 2001; **22**(1):45-47.
63. Lissoni P, Tancini G, Barni S, Paolorossi F, Rossini F, Maffe P, et al. The pineal hormone melatonin in hematology and its potential efficacy in the treatment of thrombocytopenia. *Recent Prog Med*. 1996; **87**(12):582-585.
64. Lovenberg W, Jequier E, Sjoerdsma A. Tryptophan hydroxylation in mammalian systems. *Adv Pharmacol*. 1968; **6**(PtA):21-36.
65. Lüscher TF, Boulanger CM, Dohi Y, Yang ZH. Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension*. 1992; **19**(2):117-130.
66. MacPherson GC. Origin and development of the demarcation system in megakaryocytes of rat bone marrow. *J Ultrastruct Res*. 1972; **40**(1):167-177.
67. MacPherson GC. Synthesis and localization of sulphated mucopolysaccharide in megakaryocytes and

- platelets of the rat, an analysis by electron-microscope autoradiography. *J Cell Sci.* 1972; **10**(3):705-717.
68. Majerus PW, Smith MB, Clamon GH. Lipid metabolism in human platelets. I. Evidence for a complete fatty acid synthesizing system. *J Clin Invest.* 1969; **48**(1):156-164.
 69. Marcus AJ, Zucher MB. The physiology of blood platelets. Grune and Stratton editors. New York: 1965.
 70. Marmaras VJ, Mimikos N. Enzymic formation of serotonin in mammalian blood platelets and red cells. *Experientia.* 1971; **27**(2):196-197.
 71. Martha E, Fedorko ME. The functional capacity of guinea pig megakaryocytes. *Laboratory Investigation.* 1977; **36**:310-320.
 72. Melendez J, Maddonado V, Ortega A. Effect of melatonin on beta-tubulin and MAP2 expression in NIE-115 cells. *Neurochem Res.* 1996; **21**(6):653-658.
 73. Olakowska E, Marcol W, Kotulska K, Lewin-Kowalik J. The role of melatonin in the neurodegenerative diseases. *Bratisl Lek Listy.* 2005; **106**(4-5):171-174.
 74. Panzer A, Viljoen M. The validity of melatonin as an oncostatic agent. *J Pineal Res.* 1997; **22**:184-202.
 75. Pletscher A, Da Prada M, Bernis KH, Tranzer JP. New aspects on the storage of 5-hydroxytryptamine in blood platelets. *Experientia.* 1971; **27**(9):993-1002.
 76. Radley JM, Scurfield G. The mechanism of platelet release. *Blood.* 1980; **56**:996-999.
 77. Raikhlil NI, Kvetnoi IM. APUD system and neuroendocrine tumors ("apudomas"). *Arkh Patol.* 1997; **39**(5):74-80.
 78. Reiter RJ, Oh CS, Fujimori O. Melatonin: Its intracellular and genomic actions. *Trends Endocrinol Metab.* 1996; **7**:22-27.
 79. Reiter RJ. Mechanisms of cancer inhibition by melatonin. *J Pineal Res.* 2004; **37**(3):213-214.
 80. Reiter RJ. Neuroendocrinology of melatonin. In: Miles et al., editors. *Melatonin-Clinical Perspectives.* Oxford University Press; 1988. p. 1-42.
 81. Reiter RJ. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev.* 1991; **12**:151-180.
 82. Romero R, Sullivan R. Complexity of the outward K⁺ current of the rat megakaryocyte. *Am J of Physiol.* 1997; **272**:1525-1531.
 83. Rossi MT, Di Bella L, Gualano L, Scalera G. Il sistema megacariociti-piastrine, organo bersaglio della melatonina (MLT). *Boll Soc It Biol Sper.* 1981; **57**:25-26.
 84. Rossi MT, Di Bella L. Melatonin in thrombocytopoiesis. In Gupta D et al., editors. *The pineal gland and cancer.* Brain Research Promotion; 1988. p. 183-194.
 85. Rossi MT, Lancellotti L, Zini I, Di Bella L. Ricerche di dinamica midollare nel Mus Rattus. *Arch Fisiol.* 1972; **69**:113-114.
 86. Rossi MT, Scalera G, Di Bella L. Azione mielotropa della melatonina (MLT). *Boll Soc It Biol Sper.* 1976; **52**:26.
 87. Saez MC, Barriga C, Garcia JJ, Rodriguez AB, Ortega E. Effect of the preventive-therapeutic administration of melatonin on mammary tumour-bearing animals. *Mol Cell Biochem.* 2005; **268**(1-2):25-31.
 88. Scalera G, Di Bella L, Rossi MT, Gualano L. Effetto della melatonina (MLT) sopra il 2,3-DPG degli eritrociti circolanti di ratto. *Boll Soc It Biol Sper.* 1976; **52**:24.
 89. Semo M, Lupi D, Peirson SN, Butler JN, Foster RG. Light-induced c-fos in melanopsin retinal ganglion cells of young and aged rodless/coneless (rd/rd cl) mice. *Eur J Neurosci.* 2003; **18**(11):3007-3017.
 90. Steffens F, Zhou XB, Sausbier U, Sailer C, Motejlek K, Ruth P, et al. Melatonin receptor signaling in pregnant and nonpregnant rat uterine myocytes as probed by large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activity. *Mol Endocrinol.* 2003; **17**(10):2103-2115.
 91. Stenberg PE, McDonald TP, Jackson CW. Disruption of microtubules in vivo by vincristine induces large membrane complexes and other cytoplasmic abnormalities in megakaryocytes and platelets of normal rats those in human and Wistar Furth rat hereditary macrothrombocytopenias. *J Cell Physiol.* 1995; **162**:86-102.
 92. Sumova A, Illnerova H. Melatonin instantaneously resets intrinsic circadian rhythmicity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett.* 1996; **218**(3):181-184.
 93. Sumova A, Vanacek J. Melatonin inhibits GnRH-induced increase of cFOS immunoreactivity in neonatal rat pituitary. *J Neuroendocrinol.* 1997; **9**(2):135-139.
 94. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Zhang M, Weintraub ST, et al. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochimica et Biophysica Acta.*

- 1999; **1472**(1-2):206-214.
95. Topp KS, Tablin F, Levin J. Culture of isolated bovine megakaryocytes on reconstituted basement membrane matrix leads to proplatelet process formation. *Blood*. 1990; **76**:912-924.
 96. Vacas MI, Del Zar MM, Martinuzzo M, Cardinali DP. Binding sites for [³H]-melatonin in human platelets. *J Pineal Res*. 1992; **13**(2):60-65.
 97. Vacas MI, Del Zar MM, Martinuzzo M, Falcon C, Carreras LO, Cardinali DP. Inhibition of human platelet aggregation and thromboxane B2 production by melatonin. Correlation with plasma melatonin levels. *J Pineal Res*. 1991; **11**(3-4):135-139.
 98. Valevski A, Modai I, Jerushalmy Z, Kikinson L, Weizman A. Effect of melatonin on active transport of serotonin into blood platelets. *Psychiatry Res*. 1995; **57**(2):193-196.
 99. Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev*. 1998; **78**(3):687-721.
 100. Vijayalaxmi, Thomas CR Jr, Reiter RJ, Herman TS. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol*. 2002; **20**(10):2575-2601.
 101. White JC. Platelet Morphology. In Johnson editor. *The circulating platelet*. New York & London: Academic Press; 1971. p. 46.
 102. Young IM, Leone RM, Francis P, Stovell P, Silman RE. Melatonin is metabolised to N-acetyl serotonin and 6-hydroxymelatonin in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985; **60**:114-119.
 103. Young RW. The role of the Golgi complex in sulfate metabolism. *J Cell Biol*. 1973; **5**(1):175-189.
 104. Zini I, Di Bella L, Rossi MT, Lancellotti L. Dinamica megacariocitica e piastrinemia dopo trattamento con melatonina. *Arch Fisiol*. 1972; **69**:129-130.
 105. Zucker MB, Borrelli J. Quantity, assay and release of serotonin in human platelets. *J Appl Physiol*. 1955; **7**(4):425-431.