

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2025

Kateřina Zeminová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Antioxidační role melatoninu
Bakalářská

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

The Antioxidant Role of Melatonin
Bachelor Thesis

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina Zeminová**
Osobní číslo: **C22453**
Studijní program: **B0914P360019 Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Antioxidační role melatoninu**
Téma práce anglicky: **The Antioxidant Role of Melatonin**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

- Vypracujte literární rešerši, ve které bude popsána role melatoninu jako antioxidantu.
- V hlavní části práce podrobně popište biosyntézu a metabolismus melatoninu. Dále se věnujte zevrubnému popisu antioxidačního systému buňky (antioxidační enzymy aj.), rozdělení antioxidantů a popisu reaktivních forem kyslíku a dusíku. V hlavní části práce se věnujte popisu antioxidačního účinku melatoninu.
- Jako zdroj informací pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce využijte odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech. Informace přehledně zpracujte podle pokynů a doporučení školitele.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Jan Čapek, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **RNDr. Jiří Handl, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2025**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

prof. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Antioxidační role melatoninu jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 26. 06. 2025

Kateřina Zeminová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Janu Čapkovi, Ph.D. a konzultantovi RNDr. Jiřímu Handlovi, Ph.D. za jejich odborné vedení, cenné rady a vstřícný přístup po celou dobu psaní bakalářské práce, který mi věnovali. Dále bych chtěla poděkovat své mamince, která mi byla velkou oporou v průběhu celého studia. A v neposlední řadě mému partnerovi a přátelům, kteří mi vnesli nadhled, pozitivní myšlení a nastavení do posledního ročníku.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá antioxidantními účinky melatoninu a poskytuje obecný přehled účinků tohoto hormonu, který hraje důležitou roli nejen v regulaci cirkadiálních rytmů, ale také v ochraně buněk před oxidačním stresem. V úvodní části práce jsou popsány mechanismy účinku melatoninu, jeho biosyntéza a procesy spojené s oxidačním poškozením buněk. Hlavní část bakalářské práce se věnuje antioxidantním účinkům melatoninu, mechanismu účinku v buňkách, tkáních i v reakcích, které způsobují oxidační poškození. Závěr práce se zaměřuje na přehled metod používaných ke stanovení melatoninu v buněčných vzorcích.

KLÍČOVÁ SLOVA

Melatonin, antioxidanty, oxidanty

TITLE

The antioxidant effects of melatonin

ANNOTATION

This bachelor's thesis focuses on the antioxidant effects of melatonin and provides a general overview of the effects of this hormone, which plays an important role not only in the regulation of circadian rhythms but also in the protection of cells against oxidative stress. The introductory part of the thesis describes the mechanisms of melatonin action, its biosynthesis, and the processes associated with oxidative damage to cells. The main part of the thesis is devoted to the antioxidant effects of melatonin, its mechanism of action in cells, tissues, and in reactions that lead to oxidative damage. The conclusion of the thesis focuses on an overview of the methods used for the determination of melatonin in cellular samples.

KEYWORDS

Melatonin, antioxidants, oxidants

OBSAH

1 ÚVOD.....	13
2 ANTIOXIDAČNÍ ÚČINKY MELATONINU	14
2.1 Melatonin	14
2.1.1 Biosyntéza Melatoninu	14
2.1.2 Metabolismus melatoninu	15
2.1.3 Účinek melatoninu	16
2.2 Oxidační stres.....	18
2.2.1 Reaktivní formy kyslíku a dusíku	18
2.3 Antioxidanty	21
2.3.1 Rozdělení antioxidantů	22
2.3.1.1 Superoxiddismutáza.....	22
2.3.1.2 Glutathion peroxidáza.....	23
2.3.1.3 Vitamin E.....	24
2.3.1.4 Vitamín C	25
2.4 Přehled antioxidačních účinků melatoninu	26
2.4.1 Přímé antioxidační účinky melatoninu	27
2.4.1.1 Antioxidační kaskáda melatoninu	28
2.4.2 Nepřímé antioxidační účinky melatoninu	29
2.4.3 Antioxidační ochrana melatoninem, mitochondrie a genetická informace.....	29
2.4.3.1 Mitochondrie	29
2.4.3.2 Ochrana DNA	30
2.4.4 Orgánově specifická antioxidační ochrana melatoninem	31
2.4.4.1 Mozek	31
2.4.4.2 Placenta.....	32
2.4.5 Biochemické mechanismy antioxidační ochrany melatoninem.....	33
2.4.5.1 Lipidová peroxidace	33
2.4.5.2 Chelatace kovů	34
2.4.6 Terapeutické účinky melatoninu	35
2.4.6.1 Alzheimerova choroba.....	35
2.4.6.2 Parkinsonova choroba	36
2.4.6.3 Ateroskleróza.....	36
2.4.6.4 Onkologické onemocnění	37
2.5 Stanovení melatoninu a jeho metabolitů.....	38
2.5.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	39
2.5.2 Kapalinová chromatografie.....	39
2.5.3 Radioimunoanalýza.....	40
2.5.4 Enzymová imunoanalýza	40
3 ZÁVĚR.....	43
4 POUŽITÁ LITERATURA	44

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1. Metabolismus melatoninu	15
Obrázek 2. Účinek melatoninu	17
Obrázek 3. Různé koncentrace melatoninu ve fosfolipidové membráně	18
Obrázek 4. Elektronová konfigurace atomu kyslíku	20
Obrázek 5. Tvorba a detoxikace ROS	21
Obrázek 6. Revitalizace vitamínu E pomoví vitamínu C	25
Obrázek 7. Antioxidační ochrana melatoninu a jeho ochrana před oxidačním poškozením ...	27
Obrázek 8. Některé důsledky oxidačního poškození DNA pro lidské zdraví	31
Obrázek 9. Sendvičová ELISA	41
Tabulka 1. Typy reaktivních forem kyslíku a dusíku	19
Tabulka 2. Rozdělení metod dle typu buněčného vzorku	38

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

SNC	Suprachiasmatická jádra
GABA	Kyselina gama-aminomáselná
AFMK	N1-acetyl-N2-formyl-methoxykynuramin
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RNS	Reaktivní formy dusíku
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
GSH	Glutation
SOD	Superoxiddismutáza
KAT	kataláza
H ₂ O ₂	Peroxid vodíku
O ₂ ^{•-}	Superoxidový radikál
O ₃	Ozon
O ₂ [•]	Superoxid
OH [•]	Hydroxylový radikál
ROOH	Hydrogenperoxid
HOCl	Kyselina chlorná
HO ₂	Hydroperoxidový radikál
HNO ₂	Kyselina dusná
NO	Oxid dusnatý
OONO ⁻	Peroxynitrit
NO ₂ Cl	Nitrylchlorid
N ₂ O ₃	Oxid dusitý
NO ⁻	Nitroxylový iont
NO ₂	Oxid dusičitý
GPx	Glutathionperoxidáza
O ₂	Molekulární kyslík
H ⁺	proton
e ⁻	elektron
Cl ⁻	chloridový aniont
Fe ²⁺	železnatý kationt
Fe ³⁺	železitý kationt
H ₂ O	voda

MPO	myeloperoxidáza
ONOOH	kyselina peroxydusitá
AMK	N-acetyl-5-methoxykynuramin
3OHM	3-hydroxymelatonin
6OHM	6-hydroxymelatonin
ATP	Adenosintrifosfát
NS	Nervový systém
AD	Alzheimer's disease
PD	Parkinson's disease
AS	Ateroskleróza
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC	Kapalinová chromatografie
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie s tuhající spektrofotometrickou detekcí
RIA	Radioimunoanalýza
ELISA	Enzymová imunoanalýza
Mol%	Molové procento
NF- κ B	Nukleární faktor kappa
IL	Interleukiny
4-HNE	4-hydroxy-2-nonenal

1 ÚVOD

Cílem práce je shrnout aktuální vědecké poznatky o mechanismech účinku melatoninu a jeho potenciálním využití v prevenci či terapii onemocnění spojených s oxidačním poškozením.

Melatonin je významný hormon pro koordinaci cirkadiánních rytmů, který je mimo jiné řízen systémem světla a tmy. Mimo cirkadiánních rytmů má melatonin spoustu dalších účinků, jako je regulace uvolňování hormonů, termoregulace, potlačení mitochondriální dysfunkce, regulaci imunitní odpovědi, regulaci metabolismu a mimo jiné také antioxidační účinky. Antioxidanty se účastní v několika reakcích, které se podílejí proti oxidačnímu poškození buněk a melatonin patří mezi právě nejúčinnější antioxidanty. Melatoninová antioxidační ochrana závisí na několika mechanismech, které reagují přímo i nepřímo. Mezi přímé antioxidační účinky patří neutralizace reaktivních forem kyslíku, ale nejen melatoninem, ale i jeho metabolity. Nepřímým antioxidačním účinkem melatoninu je stimulace dalších antioxidačních enzymů, jako je superoxiddismutáza a glutathionperoxidáza a zabraňuje vzniku prooxidačních enzymů a také neutralizuje reaktivní formy dusíku.

Nejvýznamnějším antioxidačním účinkem melatoninu je eliminování oxidačního stresu, který je častým problémem, kdy v jeho důsledku může docházet k apoptóze mitochondrií či poškození DNA. Vlivem těchto poškození dochází k neurodegenerativním onemocněním, jako je Alzheimerova choroba a Parkinsonova choroba, dále může docházet k ateroskleróze i k onkologickým onemocněním. Melatonin díky svým významným antioxidačním účinkům dokáže předcházet a zpomalovat příznaky onemocnění a v budoucnu by to mohla být složka terapie.

Metody pro stanovení melatoninu jsou rozsáhlé a některé jsou i běžně dostupné. Pro stanovení se používají buněčné vzorky, jako je krev, moč a sliny, které jsou nejpoužívanějším vzorkem, protože odběr je neinvazivní. Metody se dělí na dva druhy. Analytické a imunologické. Mezi analytické metody patří různé druhy kapalinové chromatografie. Příkladem je vysokoúčinná kapalinová chromatografie a kapalinová chromatografie s tandemovou spektrofotometrickou detekcí, tyto metody jsou vysoce citlivé a spotřebuje se malé množství vzorku i mobilní fáze. Dalšími metodami jsou imunoanalytické metody a nejpoužívanější je enzymatická imunoanalýza, která je běžně používaná v každé laboratoři pro své jednoduché provedení a velkou specifitu.

2 ANTIOXIDAČNÍ ÚČINKY MELATONINU

2.1 Melatonin

Melatonin pod chemickým názvem N-acetyl-5-methoxytryptamin je syntetizován, a hlavně také vylučován výhradně epifýzou v noci za podmínky světla a tmy. Rytmus endogenní sekrece je vytvářen suprachiasmatickými (SCN) jádry, což jsou sídla zodpovědná za kontrolu a koordinaci cirkadiánních rytmů v celém těle. Tento endogenní rytmus je strháván cyklem světla a tmy. (Claustrat et al, 2015). Světlo inhibuje nejen syntézu melatoninu, ale i jeho sekreci. Naopak absence světla jeho syntézu stimuluje (Chen, D. et al, 2020).

Tento rytmus syntézy a sekrece je přísně řízen SCN hypotalamu a přenáší na epifýzu dva typy regulačních signálů. Prvním regulačním signálem je cirkadiální rytmus, jenž omezuje syntézu a sekreci melatoninu v noční fázi. Druhým je inhibiční signál, který přerušuje uvolňování melatoninu (Begemann et al, 2025).

Tato látka má i jiné funkce než hormonální, může mít funkci autokrinní, ale i parakrinní, například ve střevě nebo v sítnici (Claustrat et al, 2015)

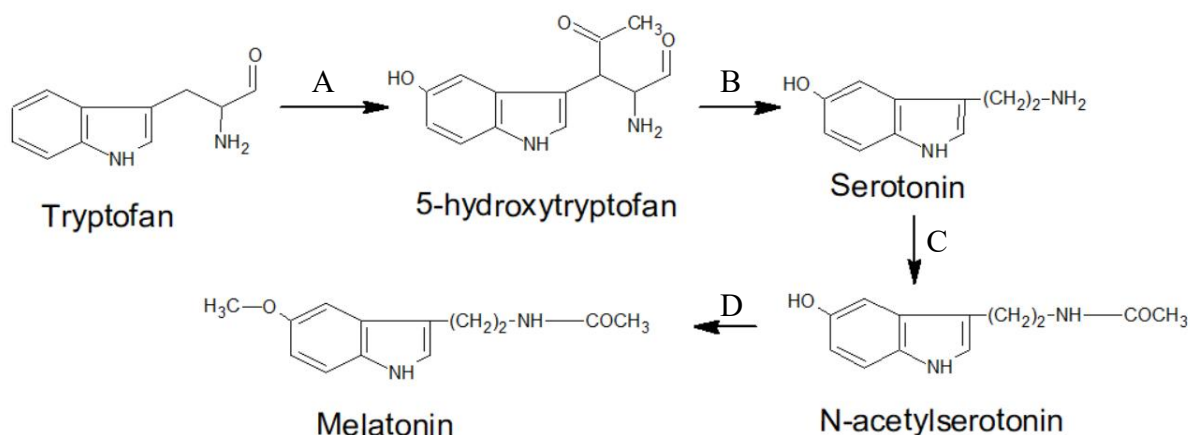
Cirkadiánní rytmus je biologický cyklus organismu s dobou trvání přibližně od 23,5 do 24,5 hodiny (Kim et al., 2022).

Biologicky je využíván také u termoregulace, motorické aktivity, ale především u spánku. Tyto rytmy se přizpůsobují prostředí, ve kterém se organismus nachází, i přesto že se jedná o endogenní stav. Hlavním faktorem pro synchronizaci endogenních rytmů je cyklus den/noc nebo světlo/tma, ale podílejí se na něm i další faktory. Cirkadiánní systém má tři hlavní složky: centrální, periferní a cirkadiánní hodiny. Koordinace cirkadiánních rytmů probíhá v hypotalamu, konkrétně v SNC. Neurony v SNC zapřičiňují syntézu kyseliny gama-aminomáselné (GABA; *Gamma-aminobutyric acid*). Periferní cirkadiánní systém se nachází v mozkové kůře, ledvinách, játrech, srdci, kůži i v sítnici. Tyto rytmy jsou koordinovány právě SCN (Poza et al., 2022).

2.1.1 Biosyntéza Melatoninu

Melatonin je syntetizován z aminokyseliny tryptofanu. Tryptofan je vychytáván z oběhu a přeměňuje se na serotonin. Aminokyselina tryptofan je v reakci s enzymem tryptofanhydroxylázou přeměněna na aminokyselinu 5-hydroxytryptofan, ze které se dekarboxylací vzniká serotonin. Serotonin se dále přeměňuje na melatonin dvoustupňovým procesem, který zahrnuje sekvenční aktivitu dvou enzymů. Prvním enzymem pro syntézu melatoninu je serotonin-N-acetyl transferáza, tento enzym přeměňuje serotonin na N-acetylserotonin. Druhý enzym zastoupený v této reakci je

hydroxyindol-o-methyltransferáza. (obrázek 1). Syntéza melatoninu je přímo závislá na tryptofanu a jeho dostupnosti (Cardinali et al., 1981).



Obrázek 1: Metabolismus melatoninu. (A – enzym tryptofan hydroxyláza, B – enzym aminokyselinová dekarboxyláza, C – enzym *N*-acetyltransferáza, D – enzym 5-hydroxyindol-*O*-methyltransferáza) upraveno dle (Cardinali et al., 1981).

2.1.2 Metabolismus melatoninu

Melatonin je lipofilní látka, to zapříčiňuje vysokou rozpustností v tucích. Tento stav umožňuje melatoninu procházet přes buněčné membrány a po uvolnění do oběhu prostupuje do tkání, např. mozkomíšní mok, moč, sliny. V mozku je hormon melatonin oxidován na látku zvanou N1-acetyl-N2-formyl-methoxykynuramin (AFMK), melatoninový metabolit, který vzniká reakcí melatoninu a reaktivních forem kyslíku (ROS; *Reactive oxygen species*). Oxidovaná forma melatoninu, AFMK uplatňuje antioxidační kapacitu, díky tomu je společně s melatoninem inkudována do procesu vychytávání ROS. Tato reakce je označena jako vychytávání volných radikálů. Primárním metabolismem melatoninu jsou játra, která odstraňují cirkulující melatonin z více jak 90 % (Claustrat et al., 2015).

V játrech je melatonin jako první hydrolyzován na 6-hydroxymelatonin za pomoci cytochromu, konkrétně jednoho z enzymů této skupiny CYP1A2. Enzym CYP1A2 usnadňuje oxidaci látek a zvyšuje jejich rozpustnost ve vodě, tak dojde ke snadnějšímu vylučování látek z těla ven. Cytochrom CYP1A2 je nedílnou součástí pro metabolismus větší skupiny léčiv, které jsou běžně v populaci využívány. Interakce melatoninu se substrátovými sloučeninami v mnoha případech vede k biologické dostupnosti melatoninu. Příkladem tohoto tvrzení může být kofein. Při požití kofeinu se dramaticky zvyšuje biologická dostupnost melatoninu, důsledkem inhibice jaterního metabolismu. Neoxidovaný 6-hydroxymelatonin je vylučován močí, a to ve formě sulfátu nebo jako glukuronidové konjugáty, ty se ale vylučují v menší míře. Vylučování 6-sulfatomelatoninu močí odpovídá profilu vylučování melatoninu v krevní plazmě (Claustrat et al., 2015).

2.1.3 Účinek melatoninu

Účinek melatoninu díky regulátoru biologických rytmů na SCN podporuje spánek. Tento hormon má ale i vliv na termoregulační a kardiovaskulární centra. Cirkadiánní cyklus, který je tedy regulován SCN, synchronizuje syntézu melatoninu. Pokud je v krvi zvýšená hladina melatoninu, je to signál pro orgány a tkáně, že je noc. Tento proces pomáhá regulovat homeostázu. Funkce melatoninu v organismu není pouze určena pro spánek, ale melatonin se také podílí na sexuálním dospívání, kdy rapidně klesá hladina melatoninu v krevní plazmě u dospívajících jedinců (Poza et al., 2022).

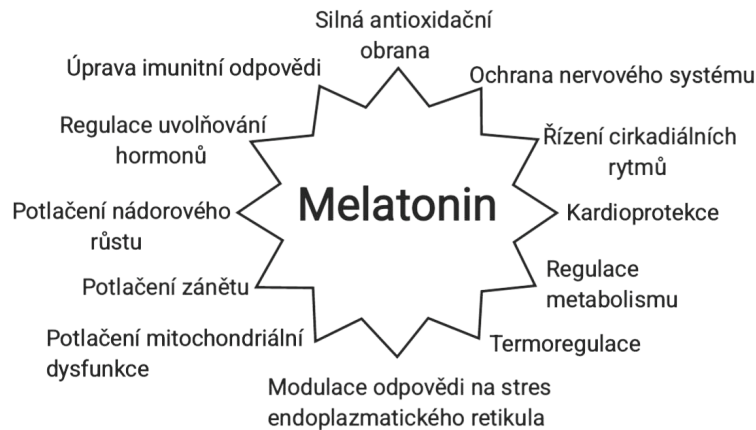
Melatonin také účinkuje jako efektivní protizánětlivá látka, která blokuje nukleární faktor kappa B (NF- κ B; *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Jahanban-Esfahlan et al., 2018). Za patologických podmínek NF- κ B spouští tvorbu zánětlivých látek a proto, aby zánětlivé procesy proběhli, musí se NF- κ B přesunout z cytoplazmy do jádra buňky (Cho et al., 2021). Inhibice NF- κ B dráhy silně ovlivňuje zánětlivé signální molekuly, hlavně cytokiny, a tak tlumit zánět i při chronických a autoimunitních procesech v organismu (Jahanban-Esfahlan et al., 2018). Melatonin na genetické úrovni brání translokaci NF- κ B do jádra, a tak brání zvýšené regulaci transkripce a translace zánětlivých cytokinů, včetně interleukinu (IL) IL-1 a IL-6 a faktoru nekrózy nádorů (Cho et al., 2021)

Rozsáhlé melatoninové účinky zasahují také do energetického metabolismu, kde působí v každém kroku energetické bilance. Ovlivňuje tělesnou hmotnost, citlivost na inzulin a toleranci na glukózu. Melatonin se podílí na řízení příjmu potravy, ukládání energie a zároveň synchronizuje metabolismus s cirkadiánními rytmy. Cílovým místem v regulaci metabolismu melatoninem je v hypotalamu, kde ovlivňuje rovnováhu mezi signály hladu a sytosti. Melatonin tak může vést i ke snížení tukové hmoty také hraje důležitou roli při udržování funkce beta-buněk pankreatu. Naopak snížená syntéza melatoninu v nočních hodinách má za následek zvýšené riziko vzniku inzulinové rezistence, což může být příčinou diabetu 2. typu. Melatonin tedy vykazuje potencionální terapeutické účinky při metabolických poruchách (Cipolla-Neto et al., 2018).

Další fyziologický vliv melatoninu je ovlivňování imunitní odpovědi, která je zprostředkovaná T-lymfocyty. Melatonin hraje důležitou roli v aktivaci a proliferaci T-lymfocytů. Jejich aktivace začíná při setkání se specifickým antigenem a po aktivaci se začínají rychle množit a produkovat IL-2, který podporuje jejich funkci. Melatonin tuto aktivaci podporuje zvýšením počtu T-lymfocytů, protože produkuje molekuly, které jsou s aktivací spojené a hojně podporuje jejich dělení. Z klinických studií vyplývá, že koncentrace melatoninu

značně ovlivňuje hladiny T-lymfocytů v krvi. To zjištění naznačuje, že melatonin je nezbytný pro aktivaci T-lymfocytů a že má stimulační vliv na imunitní odpověď (Ren et al., 2017).

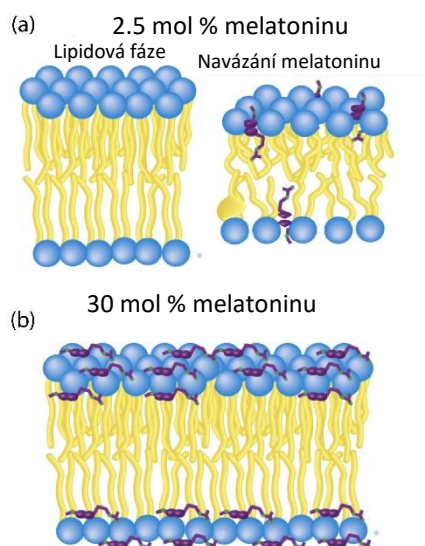
Další důležitou funkcí melatoninu je ochrana buněk. Melatonin má vysoce antioxidantní účinky (obrázek 2) (Poza et al., 2022).



Obrázek 2: Účinky melatoninu. (upraveno dle Kopustinskiene, 2021).

Melatonin chrání buňky tím, že dokáže snižovat peroxidaci lipidů (García et al., 2014). Tato schopnost byla prokázána jak v rostlinných, tak i v živočišných tkáních při různých oxidačních podmínkách, kterými je například ionizující záření, toxicita těžkých kovů anebo intenzivní fyzická aktivita. K peroxidaci lipidů dochází v důsledku oxidačního rozkladu polynasycených mastných kyselin, tedy těch uhlíkových řetězců, které mají dvě a více dvojných vazeb v řetězci mezi atomy uhlíku (Dies et al., 2015).

Nejvyšší zastoupení polynasycených mastných kyselin najdeme ve vnějších membránách buněk, konkrétně v mitochondriích či lysozomech. Melatonin se navazuje na polární hlavičku fosfolipidu (obrázek 3) a zabraňuje navázání volného radikálu (Reiter et al., 2014). Při vyšších koncentracích melatoninu dochází k homogenizaci v celé membráně tak, že se mezi dva lipidy ve fosfolipidové membráně naváže melatonin. Proto interakce melatoninu v membránách úzce souvisí s jeho koncentrací (Dies et al., 2015).



Obrázek 3: Různé koncentrace melatoninu ve fosfolipidové membráně. (a) Navázání melatoninu na lipidovou fázi při koncentraci 2,5 mol% melatoninu, b) Rovnoběžné zarovnání melatoninu mezi lipidovou fází při koncentraci 30 mol% melatoninu (mol% - molové procento) (upraveno dle Dies et al., 2015).

2.2 Oxidační stres

Oxidační stres je klasifikován jako nedostatečná rovnováha mezi reaktivními formami dusíku a kyslíku a také neefektivní schopností organismu neutralizovat jejich účinky pomocí antioxidačních obranných systémů (Pisoschi et al., 2015).

Účinky volných radikálů mají nepříznivé následky a způsobují biologické poškození ve všech biologických systémech (Rahal et al., 2014).

Biologické poškození nejčastěji postihuje ty tkáně, které kyslík spotřebovávají ve velké míře. Obzvláště citlivý na účinky ROS bude především řídicí centrum nervové soustavy, mozek. Mozek ke své správné funkci potřebuje vyšší koncentrace kyslíku a disponuje větším množstvím lipidových buněk, které jsou náchylné k peroxidaci. Oxidační stres tedy napomáhá tvorbě neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba, v důsledku poškození buněk, nebo dysfunkcí mitochondrií. U Alzheimerovi choroby můžeme pozorovat souvislost s oxidační nerovnováhou, díky které se mohou trvale poškodit neurony, což může vést k vzestupu nemoci (Kim et al., 2015).

2.2.1 Reaktivní formy kyslíku a dusíku

Reaktivní formy dusíku (RNS, *reactive nitrogen species*) a kyslíku zahrnují dvě skupiny chemicky reaktivních molekul, které obsahují reaktivní kyslíkové a dusíkové sloučeniny (tabulka 1). Tyto třídy jsou označovány jako ROS a RNS a většina z nich nese nespárované

elektrony, konkrétně volné radikály. Reaktivní formy jsou tvořeny v malém množství pomocí specializovaných enzymů a slouží jako součást vrozené imunity pro odstraňování nežádoucích patogenů z organismu (Weidinger et al., 2015).

Tabulka 1: Typy reaktivních forem kyslík. (upraveno dle Nene et al., 2020).

ROS	RNS
Ozon (O ₃)	Kyselina dusitá (HNO ₂)
Superoxid (O ₂ [•])	Oxid dusný (NO)
Peroxid vodíku (H ₂ O ₂)	Peroxyinitrit (OONO ⁻)
Hydroxylový radikál (OH [•])	Nitrylchlorid (NO ₂ Cl)
Hydrogenperoxid (ROOH)	Oxid dusitý (N ₂ O ₃)
Kyselina chlorná (HOCl)	Nitroxylový iont (NO ⁻)
Hydroperoxidový radikál (HO ₂ [•])	Oxid dusičitý (NO ₂)

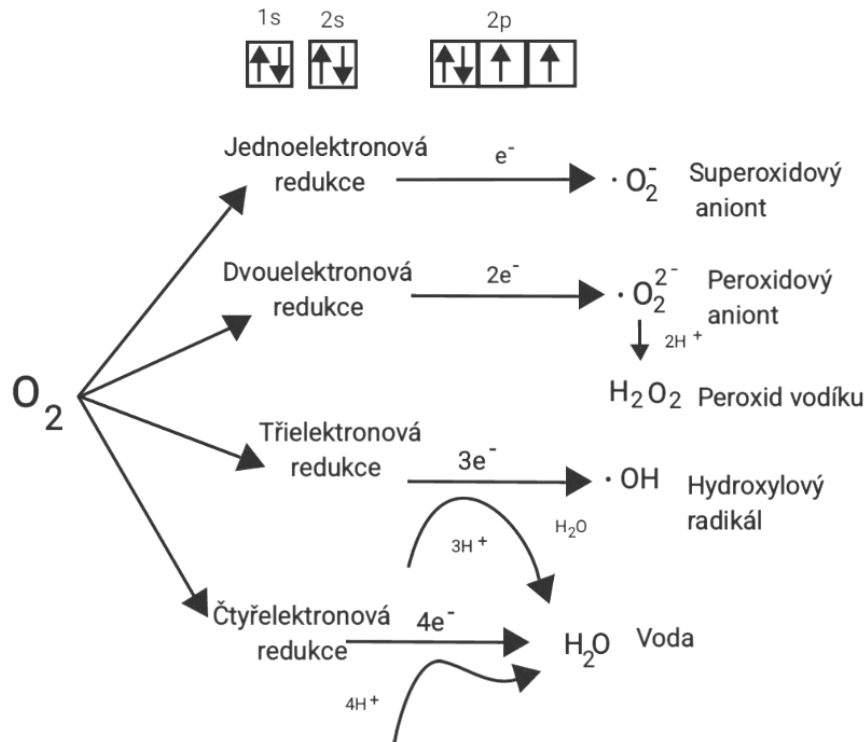
Reaktivní kyslíkové formy se podílejí na řadě procesů, ať už fyziologických nebo patologických (Nickel et al., 2014). Patologicky působí na kardiovaskulární systém, přispívají k rozvoji Alzheimerovy choroby, dále mohou vyvolat respirační onemocnění, jako je například astma nebo akutní plicní fibróza (Checa et al., 2020). Jejich vznik má mnoho původců, ale mezi hlavní zdroje ROS jsou považovány mitochondrie (Nickel et al., 2014).

Nejen v mitochondriích, ale i v žírných buňkách jsou ROS vyplavovány jako přirozený vedlejší buněčný metabolický produkt. V malém množství mohou fungovat jako signální molekuly, ale pokud jejich hladina vzroste, dojde ke zpuštění oxidačního stresu a k samotnému zániku buňky vlivem apoptózy. V první linii obrany jsou antioxidanty, enzymatické i neenzymatické, které působí proti volným radikálům (He et al., 2017).

Příkladem RNS je oxid dusnatý a společně s dalšími deriváty se vyskytují nejen v živých systémech, ale i v abiotickém prostředí. V biologických systémech je jejich tvorba silně regulována, i přestože se reaktivní formy dusíku podílejí na mnoha biologických mechanismech, jako jsou například imunitní reakce. Pokud hladina RNS překročí fyziologickou intracelulární hladinu, může to negativně ovlivnit organismus tím, že dojde k nežádoucí interakci s proteiny, sacharidy i s deoxyribonukleovou kyselinou (DNA) (Alhasawi et al., 2018).

Volné radikály nebo molekuly schopné generovat volné radikály jsou ROS (Herb et al., 2021). Volné radikály jsou definované jako molekuly s vysokou reaktivitou a s jedním nebo s více nespárovanými elektrony ve vnějším elektronovém obalu. Mohou vznikat, když kyslík zreaguje v biologických procesech např. enzymatické reakce, zánětlivé

procesy, ultrafialové záření, nebo neúplná redukce kyslíku během dýchacího řetězce v mitochondriálním řetězci (obrázek 4). Tyto formy radikálů mohou být tvořeny v buňkách při již zmíněné elektronové ztrátě anebo elektronového přijetí. Z toho důvodu se chovají jako redukční nebo oxidační činidla (Liguori et al., 2018).

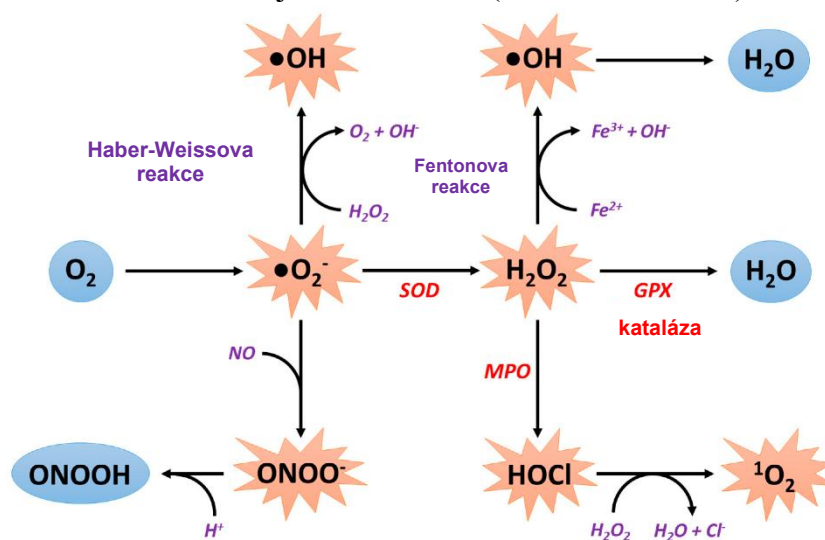


Obrázek 4: Elektronová konfigurace atomu. (H^+ – proton, e^- – elektron, O_2 – kyslík) (upraveno dle Macovei et al., 2015).

Nestabilita a vysoká reaktivita volných radikálů nastává kvůli lichému počtu elektronů a díky tomu, volné radikály mohou odebírat elektrony jiným sloučeninám, pro získání stability. Ta molekula, která přišla o svůj elektron se naopak stává dalším volným radikálem, a tak se spustí řetězová reakce, která zapříčiňuje poškození živých buněk (Phaniendra et al., 2015).

V aerobních organismech se stále vytvářejí malá množství ROS, jako je peroxid vodíku, ale také různé radikály (obrázek 5). Tvoří se hydroxylové radikály a superoxidové anionty, a to hlavně v reakci na vnější i vnitřní podněty v mitochondriálním dýchacím řetězci. I přestože velká tvorba, nebo nedostatečná eliminace ROS má za důsledek oxidační stres, který může způsobit vážné metabolické poruchy, jeho malá produkce je obzvláště důležitá pro intracelulární přenos vzruchu, metabolické procesy a dále i pro obranu organismu vůči mikroorganismům, jako je *Escherichia coli* nebo *Staphylococcus aureus* (Matés et al., 1999).

Velmi důležitou roli v produkci hydroxylových radikálů je Fentonova reakce. Do Fentonovy reakce vstupují dva druhy redoxních kovů, které jsou obecně důležité pro fungování biologických systémů, ale při vyšších koncentracích představují velké riziko oxidačního stresu. Uvnitř buněk mohou tyto kovy podporovat tvorbu škodlivých hydroxylových radikálů, právě prostřednictvím Fentonovy reakce. Hydroxylové radikály způsobují oxidační poškození buněk, a dokonce i DNA. Do Fentonovy reakce vstupují redoxní kovy, výhradně železnaté ionty nebo měďné ionty. Metabolity melatoninu, konkrétně 3OHM, 6OHM a AFMK chelatují tyto redoxní kovy a tím inhibují produkci hydroxylových radikálů, a tak snižují oxidační stres (Galano et al. 2018).



Obrázek 5: Tvorba a detoxikace ROS. (O_2 – kyslík, Cl^- – chloridový aniont, Fe^{2+} – železnatý kationt, Fe^{3+} – železitý kationt, GPx – glutathionperoxidáza, H^+ – proton, H_2O – voda, H_2O_2 – peroxid vodíku, HOCl – kyselina chlorná, MPO – myeloperoxidáza, NO – oxid dusnatý, $O_2^{\bullet-}$ – superoxidový aniont, $\bullet OH$ – hydroxylový radikál, $ONOO^-$ – peroxyinitrit, $ONOOH$ – kyselina peroxydusitá, SOD – superoxidodismutáza) (upraveno dle Dubois-Deruy et al., 2020).

2.3 Antioxidanty

Antioxidanty jsou sloučeniny, které inhibují, zabraňují nebo snižují oxidační procesy. Dělí se do mnoha skupin dle způsobu vzniku, chemických vlastností a podle enzymatických a neenzymatických pochodů v organismu. Antioxidanty vykazují aktivitu založenou na hlavních třech mechanismech. Jsou schopny přenášet vodík, dále přenášet elektrony a také dokážou chelatovat kovy (Kotha et al., 2022).

Antioxidanty mají široké zastoupení v různém ovoci, zelenině, oříšcích a v různých potravinách. V lidském organismu mají antioxidanty charakteristickou funkci, jako je detekce a stabilizace vzniklého volného radikálu, čímž se snižuje oxidační poškození (Sánchez et al, 2019).

Volné radikály nejsou stabilní molekuly a mohou způsobit oxidační stres, který může být doprovodnou příčinou srdečních chorob, rakoviny a spoustu dalších chronických onemocnění (Matás et al., 1999).

2.3.1 Rozdělení antioxidantů

Antioxidanty rozlišujeme do dvou základních typů. A to na enzymové a neenzymové. Mezi enzymatické antioxidanty patří superoxiddismutáza, glutation peroxidáza i kataláza. Antioxidanty tohoto typu pomáhají s oxidačním stresem. Druhým typem jsou neenzymatické antioxidanty, konkrétně kyselina askorbová (Vitamín C), α -tokoferol (Vitamín E), glutation (GSH), karotenoidy, flavonoidy a melatonin (Valko et al., 2007).

Dále se antioxidanty dělí podle rozpustnosti ve vodě na lipofilní (Vitamín E) a hydrofilní (Vitamín C), podle velikosti molekul na malomolekulární (Glutathion) a velkomolekulární (superoxiddismutáza) a podle původu na přírodní antioxidanty a syntetické (Aziz et al., 2019).

2.3.1.1 Superoxiddismutáza

Superoxiddismutáza (SOD; *Superoxide Dismutase*) je druhem enzymatických antioxidantů, je to ale také metaloproteiny, které dismutují superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$) na peroxid vodíku (H_2O_2) a molekulární kyslík (O_2). Následně H_2O_2 , který se liší od $O_2^{\cdot-}$ může snadno procházet buněčnými membránami, musí být účinně přeměněn na vodu katalázou (KAT), hemovým proteinem umístěným převážně v peroxizomech a ve vnitřní mitochondriální membráně, a glutationperoxidázami (GPx; *Glutathione peroxidase*) (Mruk et al., 2002).

Tento proces má zásadní vliv pro ochranu proti poškození buněčných struktur výhradně lipidů a proteinů. Další antioxidační funkcí SOD je ochrana NO, ten funguje jako signální molekula před reakcí se superoxidem. Tato reakce vede ke vzniku $ONOO^-$, je to toxická molekula, která způsobuje neuropatologické změny, které narušují fyziologické procesy. Enzym SOD je považován za hlavní antioxidant, který se účastní obranné linie při oxidačním poškození a udržování buněčné homeostázy. Má také protizánětlivé účinky a inhibuje růst nádorových buněk (Chidambaram et al., 2024).

Enzym SOD se rozděluje do tří typů, a to podle toho, jaký iont kovu se nachází na aktivním místě. Prvním typem je Cu/Zn SOD, ten se nachází v cytosolu eukaryot, v chloroplastech, a i u některých druhů bakterií. Druhým typem je MnSOD, tento typ najdeme uvnitř mitochondrií eukaryot i prokaryot a poslední je železo, tedy FeSOD, který se nachází pouze u prokaryot (Mruk et al., 2002).

Antioxidační enzym Cu/Zn SOD je intracelulární enzym, který efektivně odstraňuje superoxidový radikál, ten svým působením přeměňuje na H_2O_2 , a O_2 . Měď a zinek jsou

důležitými kofaktory pro enzymatickou aktivitu SOD, hlavním kovem je zde měď, ten právě antioxidační aktivitu zajišťuje a zinek zde působí spíše jako stabilizátor struktury enzymů. Enzym Cu/Zn SOD se podílí mimo antioxidační působení, také při modulaci buněčného dýchání, posttranskripčních úprav proteinů a na energetickém metabolismu (Chidambaram et al., 2024).

Antioxidační účinky MnSOD, který je manganem vázaný enzym má vliv na dýchací řetězec mitochondrií. V mitochondriích aktivně neutralizuje superoxidy, které jsou produkty enzymů v dýchacím řetězci. Nejvýznamnější roli hraje MnSOD při neurozánětech (Chidambaram et al., 2024).

2.3.1.2 Glutation peroxidáza

Enzym GPx patří mezi enzymatické antioxidanty, které patří do skupiny intracelulárních enzymů, tedy enzymů, které jsou aktivovány uvnitř buňky. Enzym GPx rozkládá peroxid vodíku na vodu a lipidové peroxidy na určité alkoholy, tyto reakce se odehrávají konkrétně v mitochondriích a v určitých případech také v cytosolu. Tento enzym a jeho aktivita je závislá na prvku z řad polokovů, konkrétně selenu. Aktivovaný enzym GPx je zásadní pro inhibiční proces peroxidázy lipidů, tím chrání buňky před oxidačním stresem. Glutation peroxidáza má celkem osm forem GPx1 – GPx8, většina z nich má tetrametrickou strukturu, až na GPx4, což je monomer, který se liší substrátem a jako jediný rozkládá fosfolipidové hydroperoxidázy (Ighodaro et al., 2018).

Kromě této schopnosti také kompletně redukuje cholesterol, čemuž dopomáhá daná nepřítomnost vnitřních 20 aminokyselin. Tyto aminokyseliny u ostatních GPx fungují jako filtr, který určuje pořadí, v jakém se substrát dostane k aktivnímu místu enzymu. Tím, že u GPx4 tedy aminokyseliny chybí, tak se do aktivního místa dostanou pouze konkrétní substráty, a to vede ke snížení specifity. Snížená substrátová specifita souběžně umožňuje neutralizovat větší množství peroxidových lipidů, a to tehdy, i když je v okolních buňkách malá koncentrace GSH. Takový mechanismus neutralizace u GPx4 je důležitým procesem, který chrání buňky během oxidačního stresu (Cardoso et al., 2016).

Nejčastějším zástupcem je GPx1, tento enzym je přítomen prakticky ve všech buňkách (Ighodaro et al., 2018). Díky své redoxně citlivé aminokyselině selenocysteinu dokáže aktivně vyvolat enzymatickou redukci H_2O_2 a rozpustných lipidových hydroperoxidů. Dokáže ovlivňovat redoxní stav thiolových skupin, které jsou některých aminokyselin a pomáhá udržovat redoxní rovnováhu mezi potřebnou a škodlivou úrovní oxidačních látek v buňce (Handy et al., 2022).

GPx2 je nejvíce zastoupen v gastrointestinálním traktu, konkrétně ve střevech. Nežádoucí vlastností GPx enzymů je vysoká náchylnost k oslabení antioxidační obrany, toto vede k oxidačnímu poškození membrán mastných kyselin a funkčních proteinů. Oxidační poškození ve velké míře může vést až k neurodegenerativním onemocněním. (Ighodaro et al., 2018).

2.3.1.3 Vitamin E

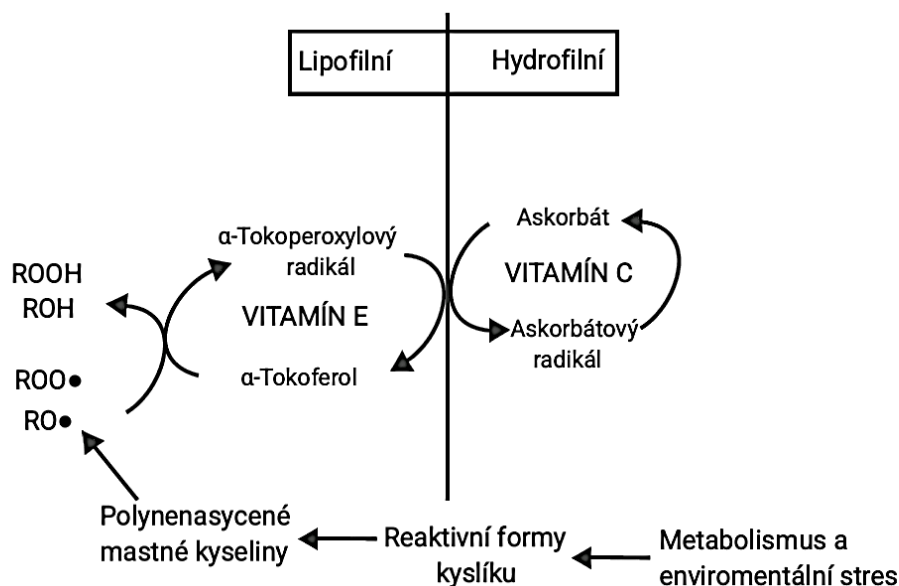
Vitamín E a jeho všechny formy, jsou neenzymatickými antioxidanty, díky schopnosti vychytávat lipidové peroxylové radikály. Tyto radikály se vyváží tak, že vitamín E je donorem vodíku z fenolické skupiny na chromanolovém kruhu. Celé spektrum vitamínů E má podobné fenolické skupiny a jsou považované za látky s velice silnými antioxidačními aktivitami (Jiang, 2014).

Tokoferoly mají silný inhibiční účinek při peroxidaci lipidů v lidských erythrocytech. Schopnost zachytávat peroxidové radikály, chrání polynasyčené mastné kyseliny v membránových fosfolipidech a plazmatických lipoproteinech. Při této reakci vznikají tokoferolové radikály, které mohou oxidovat jiné lipidy, produkovat nebo oxidovat tokoferylchinony, tvořit nereaktivní dimery tokoferolu s reakcí s jiným tokoferolovým radikálem a v poslední řadě se mohou redukovat v reakci s jinými antioxidanty zpět na tokoferol (Rizvi et al., 2014).

Tokoferoly se výhradně redukují pomocí vitamínu C, nebo jinými redukčními sloučeninami za účelem regenerace vitamínu E (Niki, 2015).

Obnovení antioxidačních funkcí vitamínu E pomocí vitamínu C probíhá redukcí oxidované formy α -tokoferolu (obrázek 6). Příkladem reakce je α -tokoferolového radikálu, je redukovaný zpět na α -tokoferol (Grădinaru et al., 2025). Touto reakcí se minimalizují prooxidační účinky vitamínu E v situacích, kdy organismu chybí další antioxidanty minimalizují prooxidační účinky vitamínu E v situacích, kdy organismu chybí další antioxidanty (Grădinaru et al., 2025).

Vitamín E je také důležitým antioxidantem pro ochranu mastných kyselin a membránových struktur, a tak přispívá pro udržení funkční integrity buněk, a to hlavně v tkáních bohatých na lipidy jako je nervová tkáň (Gulcin, 2025).



Obrázek 6: Revitalizace vitamínu E pomocí vitamínu C. (upraveno dle Shastak et al., 2023).

2.3.1.4 Vitamín C

Kyselina askorbová, také známá jako vitamín C je organická sloučenina s antioxidačními účinky, která se vyskytuje přirozeně ve všech živých organismech. Je dobře rozpustná ve vodě a je dobrým zdrojem elektronů. Vitamín C má vysokou oxidační schopnost a je proto silným oxidačním činidlem, tak dokáže vychytávat volné radikály z biologických systémů a podílí se při antioxidační obranně, specificky na ochranu lipidové membrány a proteinů proti oxidačnímu stresu. Kvůli své dobré rozpustnosti ve vodě neutralizuje volné radikály, dále volným radikálům poskytne volný elektron pro získání ztracené stability. Výsledkem celého procesu je vytvoření relativně stabilního volného radikálu bez askorbylu. Kyselina askorbová tedy snižuje oxidační poškození, a tak snižuje riziko některých chronických onemocnění, například kardiovaskulární poruchy (Pehlivan, 2017).

Kromě přímé neutralizace volných radikálů také působí jako chelatační činidlo pro přechodné kovy, jako je železo a měď, a tak zabraňuje vzniku nežádoucího hydroxylového radikálu, který je produktem Fentonovy reakce. Také se podílí na obnově účinku dalších antioxidantů, a to hlavně vitamínu E. Všestrannost vitamínu C pomáhá chránit biologické makromolekuly, hlavně lipidy a proteiny před oxidačním poškozením. Dále podporuje udržování redoxní rovnováhy v organismu a pomáhá odstraňovat reaktivní metabolity. Vitamín C přispívá k ochraně proti chronickým onemocněním, jako je rakovina, ateroskleróza, diabetes mellitus a neurodegenerativní onemocnění (Gulcin, 2025).

Důsledkem nedostatku antioxidantů zvláště pak kyseliny askorbové, může vzrůstat i rozvoj také neurodegenerativních onemocnění, protože vitamín C je považován za

neuronového ochránce. Vitamín C inhibuje vazbu neurotransmiteru glutamátu na synaptické receptory, a tak i snižuje hladinu volných radikálů uvolňovaných z glutamátu (Kaźmierczak-Barańska et al., 2020).

2.4 Přehled antioxidačních účinků melatoninu

Nejen melatonin, ale i jeho deriváty jsou silnými antioxidanty, kteří dokážou vychytávat ROS, volné radikály, nebo neutralizovat oxidační látky, jako jsou velice nebezpečné hydroxylové radikály. Dokáže také odstraňovat singletový kyslík, superoxidový aniont, peroxid vodíku či kyselinu chlornou. (Hacışevki et al., 2018). Již zmíněné metabolity melatoninu, konkrétně cyklický 3OHM (3-hydroxymelatonin), AMK (N-acetyl-5-methoxykynuramin) a AFMK fungují na synergickém principu antioxidační melatoninové kaskády, kdy dochází k nepřetržité neutralizaci volných radikálů (Manchester et al., 2015). Melatonin dokáže stimulovat antioxidační enzymy, jako například SOD, GPx nebo KAT, ale také podporuje produkci neenzymatických antioxidantů, konkrétně glutationu (GSH; *Glutathione*) (Hacışevki et al., 2018).

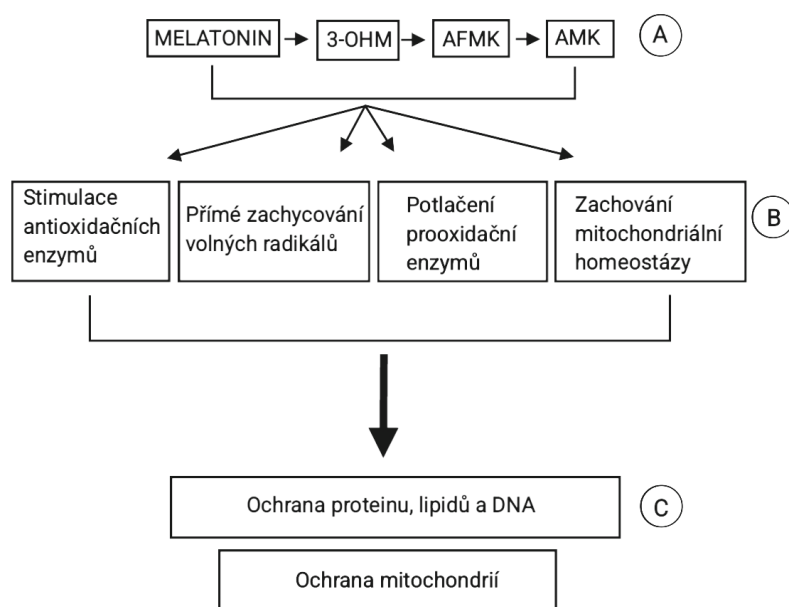
Účinek melatoninového antioxidantu, je označován za podstatně silnější než například vitamín E, vitamín C, a dokonce i GSH, kvůli rozsáhlému množství vychytávaných druhů ROS. Melatonin dokáže vyvážit až deset druhů, zatím co klasické antioxidanty neutralizují podstatně menší množství, v mnoha případech pouze jeden ROS (Chrustek, 2021).

Melatonin také působí prostřednictvím komplexních regulačních mechanismů, které zahrnují modulaci mitochondriální funkce a ochranu buněčných struktur před poškozením. Melatonin díky této funkci ovlivňovat mitochondriální membránový potenciál podporuje efektivní přenos elektronů, což snižuje nadprodukcí ROS přímo u zdroje vzniku. Jako další antioxidační aktivita melatoninu je řazena zprostředkovaná aktivace specifických receptorů, které vedou k regulaci enzymatických systémů zodpovědných za potlačení oxidačních enzymů. Tento mechanismus, který je závislý na receptorech významně přispívá k celkové rovnováze oxidačně-redukčních procesů v buňce, která tak nepodlehne oxidačnímu poškození (Chitimus et al., 2020).

Role účinku melatoninu se dělí na dva typy, na typ přímý a nepřímý (Monterio et al., 2024).

2.4.1 Přímé antioxidační účinky melatoninu

Přímý účinek melatoninu je spojován s vysokou schopností melatoninu neutralizovat vysoce toxické hydroxylové radikály, a to jak v řízených a kontrolovaných podmínkách, tak i buňkách za běžných podmínek. Během detoxikace hydroxylového radikálu se melatonin syntetizuje na cyklický 3OHM, který je silným lapačem radikálu a také je to intermediální metabolit melatoninu. Při oxidaci 3OHM vzniká AFMK, následně dochází k deformylaci, tedy k odstranění formylové skupiny, a to je příčinou tvorby AMK. Sloučeniny jako jsou AFMK a AMK jsou hlavními metabolity melatoninu a mají obdobnou účinnost pro odstraňování ROS. Tato neutralizační reakce melatoninem, je označována jako antioxidační kaskáda melatoninu (obrázek 7). Reakce melatoninu s volnými radikály funguje na fyzikálně-chemickém principu, pomocí třech hlavních mechanismů. Prvním mechanismem je přenos jednoho elektronu, druhým je přenos vodíkového atomu a posledním mechanismem je tvorba radikálových aduktů. Pro přenos hydroxylových radikálů se využívá poslední mechanismus, který je pro tuto reakci primární, a to je tvorba radikálových aduktů. Pro peroxinitrit nebo alkoxylový radikál se využívají první dva mechanismy, které jsou také typické pro přímé účinky melatoninu a pro jeho antioxidační aktivitu. (Zhang et al., 2014).



Obrázek 7: Antioxidační ochrana melatoninu. (A – antioxidační kaskáda, B – mechanismus, C – buněčné účinky, AFMK – *N1-acetyl-N2-formyl-methoxykynuramin*, AMK – *N-acetyl-5-methoxykynuramin*, 3-OHM – *3-hydroxymelatonin*) (Zhang et al., 2014).

2.4.1.1 Antioxidační kaskáda melatoninu

Antioxidační kaskáda pojednává o vychytávání radikálů pomocí melatoninu a jeho metabolitů. Melatonin má tři hlavní metabolity, který mi jsou AFMK, AMK a 3OHM. Tyto metabolity, stejně jako melatonin vykazují antioxidační kapacitu. Kaskádový proces výrazně zvyšuje melatoninové vychytávání volných radikálů, a tak snižuje oxidační poškození okolních tkání a buněk (Renina et al., 2018).

Hlavním produktem melatoninu při reakci se dvěma hydroxylovými radikály je cyklický 3OHM a byl také detekován jako první produkt při reakci melatoninu s jinými oxidanty. Tento melatoninový metabolit podléhá další přeměně a vzniká AFMK a AMK. AFMK může být přímo produkována melatoninem enzymaticky nebo dalšími chemickými procesy ale vždy se deformylací přemění na AMK. Melatonin má i jiné významné metabolity, jako je 6OHM (6-hydroxymelatonin), který je hlavním jaterním metabolitem melatoninu, ale může se tvořit také v mozku, či kůži. Nejen 6OHM, ale také 4-hydroxymelatonin a 2-hydroxymelatonin jsou produkovány výhradně během metabolismu melatoninu vyvolaného ultrafialovým zářením. Nejvíce všestranným antioxidantem melatoninového metabolitu je 3OHM, který vychytává hydroxylové radikály a peroxylové radikály. Melatoninový metabolit 3OHM využívá všechny tři mechanismy pro odstranění oxidačního stresu, konkrétně přenos elektronů, tvorbu radikálových aduktů a přenos atomu vodíku (Galano et al., 2018).

Dalším melatoninovým metabolitem, který vzniká ze 3OHM je AFMK, který snižuje oxidační poškození DNA, peroxidaci lipidů a zabraňuje poškození neuronových buněk. Dále dokonale vyvazuje hydroxylové radikály a je také rovněž účinným metabolitem pro vychytávání halogenových peroxylových radikálů a hydroxyperoxylových radikálů. Při reakci melatoninového metabolitu AFMK s volnými radikály záleží na chemické povaze radikálů. Při reakci AFMK s hydroxylovým radikálem nastupuje mechanismus tvorby radikálových aduktů a přenosy atomů vodíku (Galano et al., 2018).

Z melatoninového metabolitu AFMK vzniká další metabolit, konkrétně AMK. Tento metabolit je univerzálním zachytávač volných radikálů a také deaktivuje většinu ROS a RNS. Také stejně jako AFMK skvěle vyvazuje hydroxylové radikály a také halogenové peroxylové radikály. Naopak AMK není nejúčinnější proti hydroperoxylovým radikálům a dalším nehalogenovým peroxylovým radikálům oproti AFMK. Nejčastějšími mechanismy, jak AMK vyvazuje volné radikály je tvorba radikálových aduktů a přenos elektronů (Galano et al., 2018).

2.4.2 Nepřímé antioxidační účinky melatoninu

Melatonin je neobvykle účinný při odstraňování molekul způsobující oxidační stres, a to nejen přímou formou, ale i nepřímou. Melatonin nepřímo stimuluje antioxidační enzymy, a to hlavně GPx. Kromě aktivace enzymů, také stimuluje syntézu glutationu, který je účinným antioxidantem. Dalším nepřímým účinkem melatoninu je potlačování prooxidačních enzymů a také neutralizovat RNS, hlavně oxid dusnatý a peroxynitritový aniont. Tyto reaktivní formy podporují nitrosativní poškození, které může vést až k poškození DNA. Melatonin se také nepřímo zapojuje do chelataci kovů, chelatuje tak přechodné kovy, které jsou potřebné pro Fentonovy reakce a Haber-Weissovy reakce. Chelataci tak snižuje tvorbu toxických a pro buňky škodlivých hydroxylových radikálů (Reiter et al., 2016).

Mezi nepřímé antioxidační účinky melatoninu patří také homeostáza. Melatonin je klíčovým regulátorem a ochráncem homeostatické rovnováhy v organismu. Mechanismus jejího udržování spočívá v regulaci cirkadiálních rytmů, tím melatonin zajišťuje správnou synchronizaci jako metabolických, tak i hormonálních funkcí (Chitimus et al., 2020).

2.4.3 Antioxidační ochrana melatoninem, mitochondrie a genetická informace

2.4.3.1 Mitochondrie

Důležitým produktem mitochondrií je ATP (Adenosintrifosfát), který vzniká v cyklu kyseliny trikarboxylové a oxidační fosforylace, známý pod názvem dýchací řetězec (Bliek et al., 2017).

Melatonin i jeho metabolity mají silné antioxidační účinky, snižují oxidační stres, který úzce souvisí s oxidačním poškozením, vlivem volných radikálů, které jsou produkovány v buňkách, zejména v mitochondriích. Melatonin se může nacházet přímo v mitochondrii, a to ve větší koncentraci, než najdeme v jiných organelách (Reiter, 2018).

Mitochondriální membrány jsou vybaveny transportéry peptidového charakteru, konkrétně PEPT1 a PEPT2, které urychlují přesuny melatoninu do dalších organel (Reiter, 2018). Tyto oligopeptidové transportéry jsou zodpovědné za vstřebávání malých peptidů a peptidům podobných molekul, které jsou ve střevě, ledvinách a mozku. Tyto transportéry PEPT1 a PEPT2 jsou zodpovědné i za přenos melatoninu do buněk, ale také přímo do mitochondrií, a to výhradně při vyšších melatoninových koncentracích v organismu. Tento transportní přenos aktivně zvyšuje schopnost buněk využívat melatonin (Liu et al., 2019).

Melatonin má amfifilní vlastnosti, což je chemická vlastnost, která umožňuje melatoninu být hydrofobní i lipofilní a interagovat jak s vodou, tak i s nepolárními rozpouštědly. Snáze pak

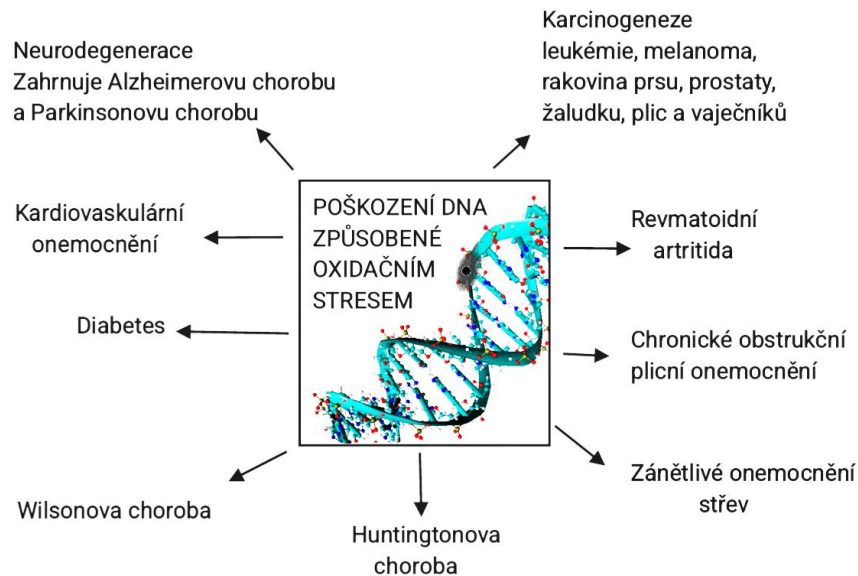
proniká přes buněčné membrány a melatonin se může hromadit uvnitř mitochondrie (Hardeland, 2017). Díky své schopnosti akumulace, melatonin efektivně snižuje tvorbu ROS přímo v jejich místě vzniku, tak efektivněji zabraňuje oxidačnímu poškození mitochondriální struktury. Do toho podporuje aktivitu oddělovacích proteinů, které pomáhají regulovat únik elektronů a tím snižují produkci ROS, aniž by negativně ovlivnili, nebo dokonce zastavili produkci ATP. Melatonin, mimo jiné, dokáže stabilizovat mitochondriální membrány, a tak zabraňuje jejich destrukci apoptickou cestou. K tomu chrání specifické mitochondriální lipidy, které jsou obsaženy v membráně, jako je kardilipin, před peroxidací, což vede k zachování integrity mitochondrie. Tyto antioxidační vlastnosti činí z melatoninu významnou protektivní složku mitochondrií, a to hlavně v energeticky náročných tkáních (Tan et al., 2016).

2.4.3.2 Ochrana DNA

Oxidační poškození DNA může narušit genomickou integritu a tím může mít zásadní dopad na lidské zdraví (obrázek 8). Oxidační poškození obecně patří mezi klíčové faktory při rozvoji mnoha onemocnění, například Alzheimerovy choroby, Parkinsonovi choroby apod. U oxidačního poškození u DNA, kdy vzrůstá hladina oxidačního stresu, vzniká rapidní nerovnováha mezi produkcí, regulací a eliminací oxidantů. Mezi nezávažnější oxidanty patří volné radikály, které se v lidském organismu vyskytují v mnoha formách (Galano et al., 2018).

Ke zvýšení hladin volných radikálů dochází různými endogenními a exogenními vlivy, jako je například infekce, dlouhodobý jak fyzický, tak i psychický stres, nezdravý životní styl, do kterého patří nadměrné požívání alkoholu i kouření, nebo také stárnutí. Ochrana DNA před oxidačním poškozením probíhá různými způsoby. Prevence zahrnuje neutralizaci a inhibici tvorby volných radikálů, aby se zabránilo interakci s buňkami včetně DNA. Oprava poškozené DNA probíhá enzymaticky a musí proběhnout ještě před replikací, aby se zachovala genetická integrita (Galano et al., 2018)

Potenciální ochranu DNA představují antioxidanty, které efektivně regulují a neutralizují volné radikály. Takovým to antioxidantem je i melatonin. Melatonin mimo jiné vykazuje silné antioxidační účinky, které jsou důležité i pro ochranu DNA. Melatonin může chránit DNA přímo, a to přímou neutralizací volných radikálů nebo nepřímo, kdy stimuluje antioxidační enzymy a pomocí vlastních metabolitů. Schopnost melatoninu prostupovat biologickými a jeho nízká toxicita, spolu s širokým spektrem účinku, z něj činí vysoce účinnou molekulu v boji proti oxidačnímu poškození DNA (Galano et al., 2018).



Obrázek 8: Některé důsledky oxidačního poškození DNA pro lidské zdraví.
(upraveno dle Galano et al., 2018).

Mimo jiné se melatonin podílí na reparaci molekul DNA, které jsou poškozené fyzikálními nebo chemickými faktory. Melatonin moduluje exprese klíčových genů pro reparační dráhy DNA, konkrétně zasahuje do oprav nukleotidů, homologní rekombinace a do nehomologního spojování konců. Melatonin je také regulátorem pro proteiny, které se na opravě DNA podílejí při chemickém poškození. Melatonin díky antioxidačním a reparačním účinkům snižuje míru apoptózy, oxidační stres a celý proces poškozování DNA a zvyšuje kapacitu buněk pro opravení DNA zlomů, které jsou vyvolané genotoxickými látkami, příkladem může být olovo nebo cytostatika (Majidinia et al., 2017).

2.4.4 Orgánově specifická antioxidační ochrana melatoninem

2.4.4.1 Mozek

Mozek je nejkomplikovanější orgán a je složen ze dvou hlavních buněk, neuronů a glií. Glie jsou podpůrné buňky v NS (nervovém systému). Jak neurony, tak i glie používají různé metabolické dráhy k produkci energie. Mozek, který je řídicím centrem nervové soustavy, řídí mnoho procesů, které jsou nezbytně důležité nejen pro udržení homeostázy těla, ale i pro udržení fyziologie a řízení metabolismu. Mozek proto sám o sobě může podléhat stárnutí. Stárnutí mozku je nevratný proces a může být zapříčiněn geneticky, traumatem, léky nebo také vlivem neurotoxinů a může zde dojít k patologickým změnám na tkáňové i buněčné úrovni a způsobit kognitivní nebo motorické postižení či ztrátu paměti (Bocheva, 2024).

Během procesu stárnutí se zvyšuje počet a velikost mikroglíí a může tak docházet ke značným morfologickým změnám. Atypicky aktivované mikroglie produkují nadměrné

množství ROS a RNS. Zvýšená produkce těchto reaktivních forem podporuje poškození neuronů a buněčnou smrt (Bocheva, 2024).

Melatonin a jeho metabolity, jako je AMK a AFMK vykazují významnou roli jako neuroprotektivní a antioxidační molekuly. V mozku se melatonin váže na melatoninové receptory (MT1 a MT2), které jsou distribuovány v mnoha oblastech konkrétně v hypotalamu, hipokampu a v kůře mozkové. Melatoninové receptory regulují cirkadiální rytmy i neurogenezi. Jakmile dojde k aktivaci melatoninových receptorů, tak souběžně dochází k vyrovnání rovnováhy mezi antioxidanty a oxidanty. Mozek je velice náchylný k oxidačnímu poškození kvůli velké spotřebě kyslíku a velmi nízké kapacitě antioxidačních enzymů, ale melatonin díky svému vyplavování v epifýze je jeho koncentrace v mozkomíšním moku nejvyšší. Melatonin proto nejaktivněji chrání mozkovou tkáň před ROS mechanismem neutralizace, dále stabilizuje mitochondriální funkci a zachovává integritu hematoencefalické bariéry (Alghamdi, 2018).

2.4.4.2 Placenta

Placenta je velice složitý orgán, který v průběhu těhotenství zastupuje funkci plic, střev, ledvin i jater. Placenta má pozoruhodné endokrinní účinky, díky kterým poskytuje bezpečné prostředí, ve kterém se může plod vyvinout (Turco et al., 2019).

I přesto že melatonin působí jako regulátor cirkadiálních rytmů, má schopnost regulovat spánek a vychytává volné radikály, má také funkci jako antioxidant nezbytný pro těhotenství obzvláště v placentě. Placenta si sama zvládá syntetizovat melatonin, a to bez podpory epifýzy. Během těhotenství melatonin působí protizánětlivě, aby se zajistilo stabilní prostředí pro matku a vývoj plodu. Melatonin udržuje integritu placenty tím, že neustále eliminuje volné radikály, a tak snižuje oxidační stres. Melatonin může procházet placentární bariérou a projít do fetálního oběhu. Díky tomu pomáhá plodu nastavovat cirkadiální rytmy (Joseph et al., 2024).

Během těhotenství se hladina melatoninu zvyšuje a je na vrcholu v gestačním období, toto navýšení podporuje přežití a reguluje hormonální produkci. Melatoninový antioxidant s protizánětlivými účinky kompenzuje účinky volných radikálů, a tak odstraňuje ROS. V placentě melatonin na oxidační stres působí dvěma mechanismy. Působí přímo na volné radikály anebo nepřímo stimuluje antioxidační enzymy. Díky své hydrofobní a lipofilní povaze velice snadno proniká přes buněčné membrány a snáze se dostává k ROS, které jsou produkovány mitochondriemi. Melatonin snižuje hladiny ROS výhradně neutralizací a zvýšením aktivity antioxidačních enzymů SOD a GPx. Melatonin také chrání trofoblasty před apoptózou vlivem oxidačního stresu (Joseph et al., 2024). Trofoblasty se tvoří při ranném stádiu těhotenství a každá subpopulace má klíčovou funkci. Buď se diferencují do polárních

buněk a mají tedy epitelovou funkci nebo také do buněk, které přizpůsobují děložní stěnu pro těhotenství (Gauster et al., 2022).

Výzkumy poukazují, že podáváním melatoninu během těhotenství může být prospěšné. Příklady na zvířecích modelech objasňují pozitivní vliv na snížení krevního tlaku, zvýšení děložní arteriální průtok či celkovou antioxidační kapacitu. Při podání melatoninu by se tedy mohlo předejít různým komplikacím během těhotenství, jako je například preeklampsie, nebo omezení růstu plodu. Tyto dvě komplikace úzce souvisí se zvýšeným oxidačním stresem (Fantasia et al., 2022).

2.4.5 Biochemické mechanismy antioxidační ochrany melatoninem

2.4.5.1 Lipidová peroxidace

Biosyntéza lipidových peroxidů probíhá jak enzymaticky i neenzymaticky. Mechanismus lipidové peroxidace probíhá v mnoha případech podobně. Nejprve se oxidují polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem a s více než jednou dvojnou vazbou. Příkladem takových mastných kyselin je kyselina linolová a arachidonová. Při první fázi oxidace dojde k tomu, že volný radikál, například hydroxylový, odtrhne atom vodíku z methylového uhlíku, který se nachází mezi dvěma dvojnými vazbami. Tento methylový uhlík má pouze jednoduchou vazbu, která je slabší a tím i snadnější k odtržení. Vzniklý radikál umožňuje lipidu izomerovat na stabilnější izomer za vzniku konjugovaného dimeru, který reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku lipidového peroxidu (Gaschler, 2017).

Konečným a stabilním produktem lipidové peroxidace je malondialdehyd, tento aldehyd je nepřímým ukazatelem zvýšené produkce ROS (Monterio et al., 2024).

Malondialdehyd se používá jako biomarker oxidačního stresu a jeho zvýšené hladiny poukazují na závažné poškození buněk. Toto poškození je spojeno s následnou buněčnou smrtí, ať už apoptózou nebo nekrotózou (Faggiano et al., 2023).

Lipidová peroxidace má také přímý negativní dopad na funkci a celkovou strukturu buněčných membrán. K tomuto důsledku dochází vlivem fyzikálních a chemických vlastností fosfolipidové membrány, jako je zvýšení polarity a narušení její struktury, kdy se zvětší povrch membrány a dojde k jejímu ztenčení. Zhoršuje také propustnost membrány a v extrémních případech dochází ke ztrátě integrity. Všechny tyto změny mohou vést k buněčné smrti (Valgimigli, 2023).

Důsledky lipidové peroxidace také hrají významnou roli při vzniku a rozvoji u nádorových onemocnění a u neurodegenerativních onemocnění. Obecně nádorové buňky mají narušenou vlastní redoxní rovnováhu a vysoké hladiny ROS, které podporují ke zvýšené

lipidové peroxidaci, která přispívá k růstu a přežití nádorových buněk. Dalším produktem lipidové peroxidace je toxický produkt 4-hydroxy-2nonenal (4-HNE), který je detekován u pacientů rakoviny, jako marker pro oxidační poškození. Tento produkt 4-HNE může aktivovat programovanou buněčnou smrt, a i rozvoj nádorového onemocnění, tyto účinky poukazují na komplexní roli v patogenezi tohoto onemocnění (Valgimigli, 2023).

Lipidová peroxidace má také důležitou roli při rozvoji neurodegenerativních chorob, konkrétně u Alzheimerovy choroby, Parkinsonovi choroby a diabetu. Přímou u Alzheimerovi choroby působí lipidová peroxidace přímo spojena s tvorbou beta-amyloidových plaků, které sami o sobě podporují oxidační stres. Je prokázáno, že antioxidantní látky pomáhají snižovat hladiny lipidové peroxidace, a tak mírnit projevy a průběh neurodegenerativních onemocnění (Valgimigli, 2023).

Melatonin dokáže modulovat lipidovou peroxidaci a zabránit tak řízenému zániku buňky, protože chrání polynasyčené mastné kyseliny před oxidací v různých tkáních. Melatonin snižuje enzymatickou lipidovou peroxidaci, kdy tlumí lipidoperoxidové enzymy, a právě tak chrání buňky před apoptózou (Zhang et al., 2023).

Melatoninová antioxidantní ochrana tak významně snižuje hladiny malondialdehydu tím, že přímo neutralizuje ROS a inhibuje tak oxidační stres (Faggiano et al., 2023).

2.4.5.2 Chelatace kovů

Kovy jsou nedílnou součástí biologických procesů, ale je zde skupina toxických kovů, příkladem může být hliník, kadmium, olovo i rtuť, které nemají v organismu patřičné funkce a mohou interagovat s biologickými makromolekulami a způsobovat tak oxidační poškození buněk. Toxické kovy v organismu podporují tvorbu ROS a RNS, což narušuje redoxní rovnováhu. Tvorba ROS a RNS může poškodit buněčnou strukturu či zahájit aktivaci zánětlivých procesů. Při intoxikaci toxickými kovy se používá antioxidantní terapie, kde melatonin hraje důležitou roli. Jeho mechanismus působení souvisí s neutralizací volných radikálů a zvýšením exprese antioxidantních enzymů (Romero et al., 2014).

Melatoninové chelatační vlastnosti, omezují biologickou dostupnost toxických kovů. Tento proces zabraňuje toxickým kovům reagovat s molekulami DNA (Romero et al., 2014). Jeho antioxidantní aktivita prostřednictvím chelatace kovových iontů, hlavně tedy železitých iontů a měďných iontů. Tato řízená chelatace je klíčová pro inhibici Fentonovy reakce, jejími produkty jsou hydroxylové radikály. Vazbou na kovové ionty melatonin skvěle snižuje dostupnost kovových iontů pro tuto reakci, a tak omezuje produkci škodlivých radikálů a následnou lipidovou peroxidaci (Galano et al., 2015).

Oproti toxickým kovům i těžké kovy jako je měď a zinek mohou vyvolat akutní otravu, onemocnění nebo dokonce i usmrcení organismu (Hodzić et al., 2021).

Melatonin i jeho metabolity (AFMK) jsou prokazatelně schopné tvořit stabilní komplexy s měďnatými ionty. Účinně potlačují oxidační stres vyvolaný směsí měďnatých iontů s askorbáty. Melatonin tedy vyvazuje měď a brání v její další účasti při oxidačních reakcích (Galano et al., 2015).

Tento mechanismus nejenže snižuje poškození lipidů, proteinů a DNA, ale také dopomáhá k detoxikaci přebytečných kovových iontů, které mohou způsobovat, mimo jiné i neurodegenerativní poruchy (Reiter et al., 2016).

2.4.6 Terapeutické účinky melatoninu

2.4.6.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD; *Alzheimer's disease*) je hlavní příčinou kognitivních poruch a demence u starší populace. Toto onemocnění má dlouhý a postupný průběh, kdy začíná patologickými změnami v mozku, které jsou bez viditelných příznaků a některé se objevují až ve starším stádiu onemocnění. Mezi patologické změny patří hromadění toxických forem beta-amyloidu, což může být důsledkem nekontrolované aktivace mikroglií v mozku. Aktivace mikroglií vedou k uvolňování neurotoxických látek a zánětlivých faktorů. Jedinci s těmito změnami mohou být bez příznaků, ale u většiny z nich se mohou projevit klinické symptomy, které zahrnují drobné výpadky paměti, zmatenost, dezorientace, změny nálad až halucinace (Monfared et al., 2022).

Hlavní příčinou patogenních vlivů je oxidační stres. Pokud dochází k nadprodukcí volných radikálů v mozku, kde se hromadí i beta-amyloid, může dojít k narušení antioxidační rovnováhy, čímž se vytváří koloběh mezi oxidačním stresem a neurozánětem. Tyto faktory razantně stěžují návrat k fyziologické rovnováze (Rosales-Corral et al., 2014).

Nadměrný oxidační stres má za následek ukládání amyloidových plaků beta-amyloidu, tento fakt je brán jako nejčastější příčina vzniku AD. Pro prokázání AD se u pacienta sledují markery pro oxidační stres, které jsou výrazně zvýšené (Tchekalarova et al., 2023).

Melatonin při AD vykazuje anti-amyloidogenní účinky. Melatonin inhibuje tvorbu amyloidového prekurzorového proteinu *in vitro* a tím, může bránit produkci beta-amyloidu. Melatonin při AD pracuje na několika mechanismech. Nejdůležitějším je především antioxidační aktivita melatoninu, kdy melatonin vychytává volné radikály a aktivuje antioxidační enzymy. Melatonin u AD má protizánětlivý účinek, kdy potlačuje aktivaci mikrogliie a podporuje produkci cytokinů a také interaguje s beta-amyloidem, kdy narušuje

konformaci tohoto peptidu a zabraňuje tak tvorbu amyloidních plaků a snižuje hladiny lipidové peroxidace. Melatonin díky svým účinkům při AD, by mohl být potenciální terapeutický nástroj pro zpomalení tohoto neurodegenerativního onemocnění (Alghamdi, 2018).

2.4.6.2 Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba (PD; *Parkinson's disease*) se řadí mezi neurodegenerativní onemocnění s rychlým spádem. Má snadno rozpoznatelné klinické projevy. Zhruba 5 % populace trpí PD vlivem genetických mutací u konkrétních genů. Tato forma PD se označuje jako monogenní forma. Naopak forma nemonogenní, která se vyskytuje z 16-36 % je způsobena dědičností. Je zde 90 variant, které sami o sobě onemocnění nezpůsobují, ale jedinci s touto formou jsou k tomuto onemocnění náchylnější vlivem prostředí a častým kontaktem například s pesticidy (Bloem et al., 2021).

Onemocnění PD souvisí s vlivem stárnutí a značnými ztrátami dopaminu. Ztráty dopaminu vedou k deregulaci okruhů bazálních ganglií, a tak vznikají motorické příznaky, jako je zpomalení pohybů (bradykineze), ztuhlost svalů a poruchy stability postoje. Dalšími projevy mohou být deprese či poruchy spánku. Přesné mechanismy, které vedou k rozvoji onemocnění nejsou zcela objasněny, existují ale dva typy, familiární, ten je způsoben genetickými mutacemi. Druhým typem je sporadická forma, která nemá stanovenou jasnou genetickou příčinu. U obou forem, ale hraje roli mitochondriální disfunkce, neurozánět a enviromentální faktory, které jsou spouštěčem oxidačního stresu (Tchekalarova et al., 2023).

Melatonin snižuje lipidovou peroxidaci, zvyšuje hladiny antioxidantních enzymů např. SOD, také má neuroprotektivní účinek díky inhibici hydroxylových radikálů a brání poklesu glutationu. Melatonin potlačuje účinky oxidačního stresu, působí jako silný antioxidant, který by mohl zlepšit prognózu PD (Alghamdi, 2018).

2.4.6.3 Ateroskleróza

Ateroskleróza (AS) je zánětlivé onemocnění, která postihuje velké tepny. Jedná se o nejrozšířenější formu kardiovaskulárního onemocnění, kde příčinou zánětu je hromadění lipidů ve velkých tepnách a důsledkem může být mrtvice, nebo infarkt myokardu (Björkegren et al., 2022).

Melatonin, který vykazuje silné antioxidantní účinky disponuje klíčovou rolí, odstraňuje poškozené mitochondrie. Tímto procesem melatonin snižuje ROS a omezuje oxidační stres v buňkách, který mimo jiné napomáhá i k AS. Tento pokles oxidačního stresu vede k významnému snížení zánětlivé odpovědi s tvorbou aterosklerotických lipidových plátů. Studie, které pracovali se zvířecími modely uvádí, že melatonin vede ke zmenšení, již

zmíněných lipidových plátů ve stěnách cév, a dokonce snižuje k jejich náchylnosti k uvolnění (Ma et al., 2018).

Antioxidační účinky melatoninu vynikají také v neutralizaci volných radikálů a zvyšuje aktivitu antioxidačních enzymů. Tyto účinky posilují antioxidační obranu a ochranu buněk. Přesněji chrání endotelové buňky před oxidačním stresem a zachovává fyziologickou funkci cév (Reiter et al., 2016).

2.4.6.4 Onkologické onemocnění

Onkologické onemocnění je život ohrožující onemocnění, které každoročně připraví o život spoustu pacientů. Kvalita života pacientů, kteří se potýkají s rakovinou je stále velmi nízká. Mnoho výzkumů cílí v onkologickém odvětví na kontrolou růstu nádorů, jejich likvidaci nebo prevenci před jejich vytvořením. Mezi hlavní léčbu rakoviny patří chemoterapeutická léčba, radioterapie či chirurgické zákroky. Chemoterapie i radioterapie mají i přes své hojné používání omezenou účinnost a v mnoha případech velice závažné vedlejší účinky. Do popředí se postupně dostávají výzkumy, které jsou zaměřené na hledání nové účinné protinádorové léčby založené na rostlinných extraktech a přírodních sloučeninách. Melatonin vykazuje spoustu terapeutických účinků při léčbě různých druhů onemocnění a prokazuje také protinádorové účinky proti rakovině kůže, rakovině plic, gastrointestinálním nádorům, gynekologickým nádorům a hematologickým malignitám (Mehrzadi et al., 2021).

Onkologické onemocnění je charakterizováno rychlým a nekontrolovatelným množением abnormálních buněk, které vykazují abnormální změny v buněčném růstu, dělení a apoptóze. Rakovinné buňky se takto nekontrolovatelně šíří a napadají sousední tkáně a orgány. Rakovina ovlivňuje fyziologickou homeostázu a správné fungování organismu. Účinky melatoninu mohou fungovat jako protinádorová činidla, které ukazují jeho schopnosti snižovat progresi nádorů. Melatoninové antioxidační účinky hrají důležitou roli při modulaci nádorových onemocnění. Působí přímou neutralizací ROS a RNS, čímž chrání buněčné struktury, jako je DNA, lipidy a proteiny před oxidačním poškozením. Kromě toho melatonin zvyšuje aktivitu důležitých antioxidačních enzymů, například SOD, katalázy a zároveň podporuje tvorbu GSH. Působením těchto účinků pomáhá snižovat oxidační stres v mitochondriích. Při nádorovém bujení melatonin vykazuje dvojitý účinek. U zdravých buněk melatonin působí jako antioxidant, kdežto v nádorových buňkách může melatonin působit za určitých podmínek zvyšovat ROS, což vede k apoptóze a tím přispívá k protinádorovému bujení. Tento selektivní mechanismus je klíčová k jeho potenciálnímu využití při onkologické terapii (Fernández-Lázaro, 2024).

2.5 Stanovení melatoninu a jeho metabolitů

Melatonin se po svém vyplavení z epifyzy neukládá, ale okamžitě difunduje do krve a do mozkomíšního moku. Koncentrace melatoninu je ale vyšší ve vzorcích mozkomíšního moku než v krvi. Melatonin díky svým amfifilním vlastnostem snadno prochází přes buněčné membrány, a proto ho můžeme detekovat i v jiných tělních tekutinách. Stanovení koncentrace melatoninu a jeho metabolitů se může provádět z moči, spermatu, plodové vody, a dokonce i ze slin. Syntéza melatoninu neprobíhá pouze v epifyze, ale jeho syntéza je také detekovatelná v gastrointestinálním traktu, vaječnicích, lymfocytech či v sítnici (Rzepka-Migut et al., 2020).

Používanými stanovovacími metodami jsou imunologické, spektrofotometrické a chromatografické (tabulka 2) (Kennaway, 2019).

Tabulka 2: Rozdělení metod dle typu buněčného vzorku. (RIA – *Radioimunoanalýza*, ELISA – *Enzymatická imunoanalýza*, HPLC – *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*, LC – *Kapalinová chromatografie*) (upraveno dle Kennaway, 2019., Benloucif, 2008., Kennaway, 2020).

Buněčný vzorek	Metoda stanovení	Výhody	Nevýhody
Krev	RIA	Vysoká specifita a citlivost	Používání radioaktivně značených látek, náročná manipulace
	ELISA	Jednoduchá, rychlá, vhodná pro rutinní analýzu	Méně specifická než LC-MS/MS
Plazma	HPLC	Dobrá separace, možnost stanovení metabolitů	Nutné speciální vybavení, nižší citlivost, složitá příprava vzorku
	LC-MS/MS	Vysoká citlivost a specifita	Vyšší náklady na vybavení
Moč	RIA	Vysoká citlivost, vhodná pro sledování exkrece	Radioaktivita, potřeba speciálního vybavení
	ELISA	Snadná manipulace, nevyžaduje radioaktivitu	Nižší specifita, možné interferující látky
	HPLC	Možnost separace metabolitů, kvalitní kvantifikace	Nutné speciální vybavení, nižší citlivost, složitá příprava vzorku
	LC-MS/MS	Vysoká citlivost a specifita	Vyšší náklady na vybavení
Sliny	RIA	Vysoká citlivost, vhodná pro neinvazivní odběr	Radioaktivita, potřeba speciálního vybavení
	LC-MS/MS	Nejvyšší citlivost a specifita, přesná kvantifikace	Vyšší náklady a nároky na vybavení
	ELISA	Dobrá separace, možnost stanovení metabolitů	Nižší specifita, možné interferující látky
	HPLC	Nejvyšší citlivost a specifita, přesná kvantifikace	Nutné speciální vybavení, nižší citlivost, složitá příprava vzorku

Každý buněčný vzorek pro stanovování melatoninu a jeho metabolitů má jiný poločas rozpadu, což je doba, za kterou se melatoninová koncentrace v těle sníží na polovinu ze své původní hodnoty. Melatonin se stanovuje z krve, kde se poločas rozpadu pohybuje mezi 30-60 minutami. Ze vzorku krve se posuzuje aktuální syntéza hormonu a jeho množství v době odběru. Melatonin se stanovuje také ze vzorku mozkomíšního moku. Toto stanovení pro vyšetření cirkadiánní sekrece jsou nyní pouze experimentální, ale stanovení, z poznatků ze studií, jsou velmi přesné (Rzepka-Migut et al., 2020).

Hlavním metabolitem, který se vylučuje v moči je 6-sulfatoxymelatonin, který je skvělým markerem plazmatické hladiny melatoninu a stejně jako stanovení melatoninu ze vzorku krve je dobrým ukazatelem cirkadiánních rytmů (Rzepka-Migut et al., 2020).

2.5.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC; High performance liquid chromatography) má mnoho výhod a využití. Výhodou HPLC je bezpochyby menší spotřeba vzorku, nižší objem rozpouštědla a menší spotřeba mobilní fáze. Snížení objemů urychluje stanovení a nutné prodlevy mezi jednotlivým měřením. Pro metodu HPLC je nejdůležitější částí čerpadlo, které umožňuje mobilní fázi plynulý průtok a udržuje konstantní tlak. Čerpadel je několik druhů a nejpoužívanějším je pístové. Další částí u HPLC je vstřikovač, kolona a detektor. Detektory jsou navrženy tak, aby třídili specifické sloučeniny a nejpoužívanějšími jsou absorpční, elektrochemické, vodivostní detektory a mnoho dalších (Lynch et al., 2018).

Pro stanovení melatoninu ve vzorcích slin a plazmy se může použít HPLC s detektory s UV, s detektory s fotodiodovým polem, nebo s fluorescenčním detektorem. Obecně metody založené na kapalinové chromatografii jsou nepostradatelnou součástí pro stanovení melatoninu v biologických vzorcích (Rzepka-Migut et al., 2020).

2.5.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrofotometrií (LS-MS/MS; *Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*) je vysoce citlivá a selektivní metoda, která se používá pro kvalifikaci a kvantifikaci (Monga et al., 2024). Tato analytická technika kombinuje chromatografickou separaci analytů a detekci na základě jejich hmotnosti. Využívá se pro stanovení nanomolárních až pikomolárních koncentrací (Rao et al., 2024) a můžeme stanovovat více analytů najednou (Yu et al., 2024).

Pro stanovení melatoninu se používají buněčné vzorky, jako jsou sliny, plazma a moč. Metoda je kvantifikační, a i přes náročnost melatoninového stanovení je tato metoda velice spolehlivá a přesná. Pro stanovení melatoninu pomocí metody LC-MS/MS se nejčastěji

používají vzorky slin, výhradně kvůli neinvazivnímu a bezbolestnému odběru. Vzorek slin má také prokazatelně stejnou hladinu melatoninu, jako vzorek séra (Monga et al., 2024).

2.5.3 Radioimunoanalýza

Radioimunoanalýza (RIA; *Radioimmunoassay*) je kvantitativní metoda, která stanovuje množství antigenů ve vzorku pacienta. Tato technika využívá antigeny, které jsou značené radioizotopy. Laboratoře, které využívají metodu RIA musí zajišťovat vysoká bezpečnostní opatření, a proto se často zaměňuje za metodu ELISA, která nahrazuje značený radioizotop za značený enzym (Alhabbab, 2018).

Ke stanovení melatoninu se používají vzorky slin, krve a moči. Tato metoda umožňuje kvantitativní stanovení, které se vyznačuje vysokou specifitou a citlivostí. Pro stanovení melatoninu se používá značený radioizotop melatoninu a nezačený melatonin. Tyto složky soutěží o vazebné místo protilátky. Čím více je ve stanovovaném systému nezačného melatoninu, tím méně značeného melatoninu tvoří komplex s protilátkou. Dalším krokem je oddělení melatoninu od komplexů pomocí druhé protilátky, která je navázaná na pevnou fázi. V poslední fázi se měří radioaktivita vybraného úseku. Pokud je naměřená radioaktivita vysoká, tím je nižší koncentrace nezačného melatoninu ve vzorku a naopak (Rzepka-Migut et al., 2020).

Pro stanovení koncentrace melatoninu pomocí metody RIA se mohou použít vzorky slin. Tato matrice je populární alternativou vzorku krve, protože melatonin se v krvi váže na protein albumin a glykoproteiny, kdežto ve slinách je melatonin považován za odraz nenavázaného melatoninu v plazmě. I přestože koncentrace melatoninu ve slinách a v plazmě jsou téměř shodné, metoda pro stanovení musí být velice citlivá, proto je RIA vhodnou metodou (Rzepka-Migut et al., 2020).

2.5.4 Enzymová imunoanalýza

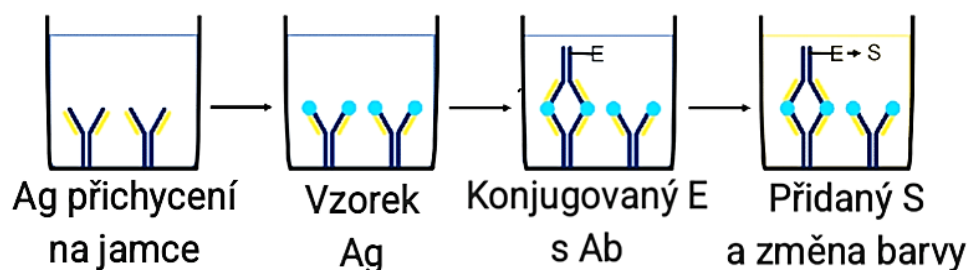
Enzymová imunoanalýza (ELISA; *Enzyme-linked immunosorbent assay*) patří mezi hojně používané laboratorní techniky a slouží k detekci specifických antigenů, protilátek, hormonů, peptidů, proteinů i glykoproteinů v biologických vzorcích. Používanými biologickými vzorky jsou například vzorky moči, krve a slin. Princip metody spočívá v navázání protilátky na cílovou molekulu, která je navázaná na pevný povrch. Po navázání se přidá enzym, který je značený konjugátem. Dále se přidá substrát, ten způsobí barevnou změnu, která se měří pomocí spektrofotometru. V současné době existuje několik typů této metody. ELISA může být heterogenní, homogenní, kompetitivní a nekompetitivní (sendvičová). Všechny

typy jsou vysoce citlivé a přesné. Aby výsledky byli kvalitní musí se přísně dodržovat laboratorní postupy (Aydin et al., 2025).

Heterogenní ELISA, známá také pod názvem „Přímá“ se využívá pro detekci protilátek. Jedná se o metodu, kde se testuje přítomnost antigenu pomocí specifických protilátek. Nepřímá, tedy homogenní ELISA se používá pro detekci a specifikaci rozpustných antigenů. Homogenní ELISA se liší od heterogenní tím, že antigen není rozpoznán a není zachycen na primární protilátce, ale je přichycen na protilátku sekundární. Sekundární protilátka se poté naváže na tu primární prostřednictvím enzymu. Sendvičová ELISA je skvělá metoda pro kvantitativní stanovení antigenu v neznámých vzorcích. Tato ELISA využívá dvě různé protilátky, které se váží na odlišné epitopy daného antigenu. První protilátka je přichycená na mikrotitrační destičku a slouží k navázání antigenu, druhá protilátka, na které je navázaný enzym, se aplikuje až po promytí. Následně se aplikuje substrát, který vyvolá barevnou změnu, jejíž intenzita odpovídá množství daného antigenu (Aydin et al., 2025).

Sendvičová ELISA je vysoce citlivá, specifická a je ideální pro detekci nízkých koncentrací cílové látky v biologickém vzorku. Kompetitivní ELISA se používá běžně pro měření protilátek (Aydin et al., 2025).

Využívá se zde princip kompetice, nebo také soutěže, kde známý a značený antigen enzymem, soutěží s antigenem, který je přítomný ve vzorku pacienta, o vazebné místo na specifické protilátce (obrázek 9). Při vyšší koncentraci antigenu ve vzorku je menší podíl značeného antigenu navázaný na protilátku, což vede k nižší intenzitě barevné reakce. Měření je tedy nepřímé, což znamená, že čím méně barvy se vytvoří, tím více antigenu je ve vzorku a naopak. Tato metoda se využívá výhradně pro stanovení nízkých koncentrací antigenu v biologických vzorcích. Tato metoda je principem podobná jako RIA, je ale více používaná, díky absenci radioaktivně značených látek (Aydin et al., 2025).



Obrázek 9: Sendvičová ELISA. (E – enzym, Ab – protilátka, Ag – antigen, S – substrát) (upraveno dle Boguszewska et al., 2019).

Pro stanovení melatoninu metodou ELISA musí využívat citlivý a specifický přístup k detekci tohoto hormonu v biologických tekutinách. Vhodným biologickým materiálem pro stanovení melatoninu je krev a sliny. Komerčně prodávané ELISA kity určené pro stanovení melatoninu jsou přesné, ale velice nákladné a omezuje to jejich využívání v praxi. Výhodnou a levnější alternativou je vlastní vývoj testu z komerčně dostupných komponentem jako jsou monoklonální protilátky proti melatoninu a konjugát, kterým je například melatonin-křenová peroxidáza (Li et al., 2015).

Při stanovování melatoninu, z alternativně složených komponent, se používá kompetitivní ELISA, kde protilátka proti melatoninu je imobilizována na dno mikrotitrační destičky a enzymaticky značený melatonin soutěží se vzorkem melatoninu o navázání na protilátku. Množství navázaného enzymem značeného melatoninu je následně indikováno intenzitou barevné reakce, která je nepřímo úměrná koncentraci melatoninu v buněčném vzorku (Li et al., 2015).

3 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se věnuje podrobnému přehledu antioxidačních účinků melatoninu, přičemž jejím hlavním cílem je zhodnotit dostupné vědecké poznatky o pozitivní roli tohoto důležitého hormonu při ochraně organismu před oxidačním stresem. V úvodních kapitolách je melatonin představen nejen jako velmi klíčový regulátor cirkadiánních rytmů, ale také jako významná molekula s mnoha biologickými funkcemi, z nichž antioxidační působení patří mezi nejvýznamnější.

Z literární rešerše jednoznačně vyplývá, že hormon melatonin uplatňuje obranné antioxidační mechanismy hned několika výraznými způsoby. Působí především jako přímý a efektivní lapač reaktivních forem kyslíku a dusíku, čímž účinně neutralizuje volné radikály v počátku jejich vzniku, ještě dříve, než mohou závažně poškodit buňky. Kromě toho melatonin stimuluje aktivitu antioxidačních enzymů, jako je superoxiddismutáza, glutationperoxidáza a kataláza, významně přispívá tak k udržení redoxní rovnováhy v buněčných strukturách. Jeho schopnost snadno pronikat buněčnými membránami a akumulovat se v mitochondriích, které jsou hlavním zdrojem reaktivních forem, z něj vytváří mimořádně účinný a nepostradatelný antioxidant.

Antioxidační účinky melatoninu mají velký a nenahraditelný potenciál v oblasti terapie, která má za cíl pozitivně vylepšit průběh onemocnění nebo duševní zdraví. Na základě dostupných údajů lze melatonin jednoznačně považovat za perspektivní látku vhodnou nejen k prevenci, ale i k podpoře léčby u celé řady závažných onemocnění, jako jsou kardiovaskulární poruchy, neurodegenerativní onemocnění, ateroskleróza i dokonce onkologické onemocnění, u kterých oxidační stres hraje významnou negativní roli.

Závěr práce je zaměřený především na jednotlivé vědecké metody ke stanovení melatoninu v biologických vzorcích. Jsou zde popsány nejčastější využívané analytické techniky, mezi které patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie a imunoanalytické metody, jako je radioimunoanalýza a enzymatická imunoanalýza. Tyto metody jsou klíčové pro klinickou praxi, protože umožňují sledovat přesné koncentrace melatoninu z různých vzorků tělních tekutin, jako jsou sliny, moč i krev a určit tak nebezpečné patologické stavy úzce spojené s oxidačním poškozením.

4 POUŽITÁ LITERATURA

1. AHLASAWI, A., LEGENDRE, F., JAGADEESAN, S., APPANNA, V., et al. **2018**. Biochemical Strategies to Counter Nitrosative Stress: Nanofactories for Value-Added Products. *Microbial Diversity in the Genomic Era, Academic Press*, 169(153), DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00010-1>.
2. ALGHAMDI, B. S. **2018**. The neuroprotective role of melatonin in neurological disorders. *Journal of neuriscience research*, 96(7), 1136-1149. DOI: <https://doi.org/10.1002/jnr.24220>.
3. ALHABBAB, R. Y., ALHABBAB, R. Y. **2018**. Radioimmunoassay (RIA). *Basic Serological Testing*, 77-81. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-77694-1>.
4. AYDIN, S., EMRE, E., UGUR, K., et al. **2025**. An overview of ELISA: a review and update on best laboratory practices for quantifying peptides and proteins in biological fluids. *Journal of International Medical Research*, 53(2). DOI:10.1177/03000605251315913.
5. AZIZ, M. A., DIAB, A. S. **2019**. Antioxidant Categories and Mode. *Antioxidants*, 3. DOI:10.5772/intechopen.83544.
6. BEGEMANN, K., RAWASHDEH, O., OLEJNICZAK, I., PILORZ, V., et al. **2025**. Endocrine regulation of circadian rhythms. *npj Biological Timing and Sleep*, 2(1), 10. DOI: <https://doi.org/10.1038/s44323-025-00024-6>.
7. BENLOUCIF, S., BURGESS, H. J., KLERMAN, E. B., LEWY, A. J. **2008**. Measuring melatonin in humans. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 4(1), 66-69. DOI: <https://doi.org/10.5664/jcsm.27083>.
8. BJÖRKEGREN, J. L., LUSIS, A. J. **2022**. Atherosclerosis: recent developments. *Cell*, 185(10), 1630-1645. DOI: 10.1016/j.cell.2022.04.004.
9. BLIEK, A. M., SEDENSKY, M. M. MORGAN, P. G. **2017**. Cell biology of the mitochondrion. *Genetics*, 207(3), 843-871. DOI: <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300262>.
10. BLOEM, B. R., OKUN, M. S., & KLEIN, C. **2021**. Parkinson's disease. *The Lancet*, 397(10291), 2284-2303. DOI:10.1016/S0140-6736(21)00218-X.
11. BOGUSEZEWSKA, K., SZEWCZUK, M., URBANIAK, S., KARWOWSKI, B. T. **2019**. Immunoassays in DNA damage and instability detection. *Cellular and molecular life sciences*, 76(23), 4689-4704. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03239-6>.
12. BOCHEVA, G., BAKALOV, D., ILIEV, P., TAFRADJIISKA-HADJIOLOVA, R. **2024**. The Vital Role of Melatonin and Its Metabolites in the Neuroprotection and Retardation of Brain Aging. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(10), 5122. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25105122>.

13. CARDINALI, D. P., & VACAS, M. I. **1981**. Molecular endocrinology of melatonin: Receptor sites in brain and peripheral organs. *Melatonin: current status and perspectives*, 237-246. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-026400-4.50036-0>.
14. CARDOSO, B. R., HARE, D. J., BUSH, A. I., ROBERTS, B. R. **2017**. Glutathione peroxidase 4: a new player in neurodegeneration?. *Molecular Psychiatry*, 22(3), 328-335. DOI: <https://doi.org/10.1038/mp.2016.196>.
15. CIPOLLA-NETO, J., AMARAL, F. G. D. **2018**. Melatonin as a hormone: new physiological and clinical insights. *Endocrine reviews*, 39(6), 990-1028. DOI: <https://doi.org/10.1210/er.2018-00084>.
16. CLAUSTRAT, B., LESTON, J. **2015**. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie*, 61(2-3), 77-84. DOI: 10.1016/j.neuchi.2015.03.002.
17. DIES, H., CHEUNG B., TANG, J., RHEINSTÄDTER, C. M. **2015**. The organization of melatonin in lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*, 1848(4). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.01.006>.
18. DUBOIS-DERUY, E., PEUGNET, V., TURKIEH, A., PINET, F. **2020**. "Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases" *Antioxidants*, 9: 864. DOI:<https://doi.org/10.3390/antiox9090864>.
19. E – JIANG, Q. **2014**. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 72, 76-90. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.035>.
20. FAGGIANO, A., GHERBESI, E., AVAGIMYAN, A., RUSCICA, M. et al., **2023**. Melatonin mitigates oxidative damage induced by anthracycline: a systematic-review and meta-analysis of murine models. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 10, 1289384. DOI:<https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1289384>.
21. FANTASIA, I., BUSSOLARO, S., STAMPALIJA, T., ROLNIK, D. L. **2022**. The role of melatonin in pregnancies complicated by placental insufficiency: A systematic review. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 278, 22-28. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2022.08.029>.
22. FERNÁNDEZ-LÁZARO, D., SAN MIGUEL, A. M. C., ROCHE, E. **2024**. The role of melatonin as an adjuvant therapeutic strategy in the modulation of carcinogenesis. A narrative review. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 10, N-A. DOI:10.20517/2394-4722.2024.05.
23. GALANO, A., MEDINA, M. E., TAN, D. X., REITER, R. J. **2015**. Melatonin and its metabolites as copper chelating agents and their role in inhibiting oxidative stress: a physicochemical analysis. *Journal of pineal research*, 58(1), 107-116. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpi.12196>.
24. GALANO, A., REITER, R. J. **2018**. Melatonin and its metabolites vs oxidative stress: From individual actions to collective protection. *Journal of Pineal Research*, 65(1), e12514. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpi.12514>.

25. GALANO, A., TAN, D. X., REITER, R. J., **2018**. Melatonin: a versatile protector against oxidative DNA damage. *Molecules*, 23(3), 530. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23030530>.
26. GARCÍA, J. J., LÓPEZ-PINGARRÓN, L., ALMEIDA-SOUZA, P., TRE, A., et al. **2014**. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review. *Journal of pineal research*, 56(3), 225-237. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpi.12128>.
27. GASCHLER, M. M., STOCKWELL, B. R. **2017**. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 482(3), 419-425. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>.
28. GAUSTER, M., MOSER, G., WERNITZNIG, S., KUPPER, N., HUPPERTZ B. **2022**. Early human trophoblast development: from morphology to function. *Cell Mol Life Sci*, 79(6), 345. DOI:10.1007/s00018-022-04377-0.
29. GRĂDINARU, A. C., POPA, S. **2025**. Vitamin C: From Self-Sufficiency to Dietary Dependence in the Framework of Its Biological Functions and Medical Implications. *Life*, 15(2), 238. DOI:10.3390/life15020238.
30. GULCIN, İ. **2025**. Antioxidants: a comprehensive review. *Archives of Toxicology*, 1-105. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-025-03997-2>.
31. HACIŞEVKI, A., BABA, B. **2018**. An overview of melatonin as an antioxidant molecule: a biochemical approach. *IntechOpen*, DOI:10.5772/intechopen.79421.
32. HANDY, D. E., LOSCALZO, J. **2022**. The role of glutathione peroxidase-1 in health and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 188, 146-161. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.06.004>.
33. HARDELAND, R. **2017**. Melatonin and the electron transport chain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74, 3883-3896. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2615-9>.
34. HE, L., HE, T., FARRAR, S., JI, L., et al. **2017**. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(2), 532-553. DOI: <https://doi.org/10.1159/000485089>.
35. HODZIC, E., GALIJASEVIC, S., BALABAN, M., REKANOVIC, S., et al. **2021**. The protective role of melatonin under heavy metal-induced stress in *Melissa Officinalis* L. *Turkish journal of chemistry*, 45(3), 737-748. DOI:10.3906/kim-2012-7.
36. CHECA, J., ARAN, J. M. **2022**. Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes. *J Inflamm Res*, 1057-1073. DOI:10.2147/JIR.S275595.
37. CHEN, D., ZHANG, T., LEE, T. H. **2020**. Cellular mechanisms of melatonin: insight from neurodegenerative diseases. *Biomolecules*, 10(8), 1158. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10081158>.

38. CHIDAMBARAM, S. B., ANAND, N., VARMA, S. R., RAMAMURTHY, S. **2024**. Superoxide dismutase and neurological disorders. *IBRO Neuroscience Reports*, 16, 373. DOI: 10.1016/j.ibneur.2023.11.007.
39. CHO, J. H., BHUTANI, S., KIM, C. H., IRWIN, M. R. **2021**. Anti-inflammatory effects of melatonin: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Brain, behavior, and immunity*, 93, 245-253. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.01.034>.
40. CHRUSTEK, A., OLSZEWSKA-SŁONINA, D. **2021**. Melatonin as a powerful antioxidant. *Acta Pharmaceutica*, 71(3), 335-354. DOI: <https://doi.org/10.2478/acph-2021-0027>.
41. IGHODARO, O. M., AKINLOVE, O. A. **2018**. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287-293. DOI:10.1016/j.ajme.2017.09.001.
42. JAHANBAN-ESFAHLAN, R., MEHRZADI, S., REITER, R. J., SEIDIM K., et al., **2018**. Melatonin regulation of inflammatory pathways in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: involvement of circadian clock genes. *British journal of pharmacology*, 175(16), 3230-3238. DOI: <https://doi.org/10.1111/bph.13898>.
43. JOSEPH, TT., SUCH, V., HOSSACK, DJ., CHAKRABORTY, R., et al., **2024**. Melatonin: the placental antioxidant and anti-inflammatory. *Front. Immunol*, 15, 1339304. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1339304.
44. KAŻMIERZAK-BRAŃSKA, J., BOGUSZEWSKA, K., ADAMUS-GRABICKA, A., KARWOWSKI, B. T. **2020**. Two faces of vitamin C—antioxidative and pro-oxidative agent. *Nutrients*, 12(5), 1501. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12051501>.
45. KENNAWAY, D. J. **2019**. A critical review of melatonin assays: Past and present. *Journal of pineal research*, 67(1), 12572. DOI:<https://doi.org/10.1111/jpi.12572>.
46. KENNAWAY, D. J. **2019**. A critical review of melatonin assays: Past and present. *Journal of Pineal Research*, 66(3), 12572. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpi.12572>.
47. KENNAWAY D. J. **2020**. Melatonin-measurement methods and the factors modifying the results. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(6), 1916. DOI:<https://doi.org/10.3390/ijerph17061916>.
48. KIM, J. H., ELKHADEM, A. R., DUFFY, J. F. **2022**. Circadian Rhythm Sleep-Wake Disorders in Older Adults. *Sleep Medicine Clinics*, 17(2), 241-252. DOI:doi:10.1016/j.jsmc.2022.02.003.
49. KIM, G. H., KIM J. E., RHIE, S. J., YOON, S. **2015**. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental neurobiology*, 24(4), 325-40. DOI:10.5607/en.2015.24.4.325.
50. KOPUSTINSKIENE, D. M., BERNATONIENE, J. **2021**. Molecular mechanisms of melatonin-mediated cell protection and signaling in health and disease. *Pharmaceutics*, 13(2), 129. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020129>.

51. KOTHA, R. R., TAREG, F. S., YILDIZ, E., LUTHRIA, D. L. **2022**. Oxidative Stress and Antioxidants – A Critical Review on in vitro Antioxidant assays. *Antioxidants*, 11(12), 2388. DOI:10.3390/antiox11122388.
52. LI, Y., CASSONE, V. M. **2015**. A simple, specific high-throughput enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitative determination of melatonin in cell culture medium. *International immunopharmacology*, 28(1), 230. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.06.012.
53. LIGUORI, I., RUSSO, G., CRUCIO, F., BULLI, G., et al. **2018**. Oxidative stress, aging, and disease. *Clinical interventions in aging*, DOI:https://doi.org/10.2147/CIA.S158513.
54. LIU, L., LABANI, N. CECON, E., JOCKERS, R. **2019**. Melatonin target proteins: too many or not enough? *Frontiers in endocrinology*, 10, 791. DOI: https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00791.
55. LYNCH, K. B., CHEN, A., LIU, S. **2018**. Miniaturized high-performance liquid chromatography instrumentation. *Talanta*, 177, 94-103. DOI: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.016.
56. MANCHESTE, L. C., COTO-MONTES, A., BOGA, J. A., ANDERSEN, L. P. H., et al., **2015**. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *Journal of pineal research*, 59(4), 403-419. DOI:https://doi.org/10.1111/jpi.12267.
57. MATÉS, J. M., PERÉZ-GÓMEZ, C., & DE CASTRO, I. **1999**. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*, 32(8), 595-603. DOI:10.1016/s0009-9120(99)00075-2.
58. MONGA, G., YERRAM, S., KOPPULA, S., SINDHU, R. K. et al., **2024**. A Brief Assessment of the Bioanalytical Methods by using LC-MS/MS for the Quantitation of Melatonin: A Potential Biomarker for Sleep-Related Disorders. *Brazilian Journal of Analytical Chemistry*, 11(42), 12-32. DOI:10.30744/brjac.2179-3425.RV-143-2022.
59. MA, S., CHEN, J., FENG, J., ZHANG, R., et al. **2018**. Melatonin ameliorates the progression of atherosclerosis via mitophagy activation and NLRP3 inflammasome inhibition. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 9286458. DOI: https://doi.org/10.1155/2018/9286458.
60. MACOVEJ, L. A., DEBITA, M., ILIE, M., MOISEI, M. et al., **2015**. The role of antioxidative enzyme mechanisms and of oxygen free radicals in reumatoid inflammatory processes. *Rev. Chim. (Bucharest)*, 66, 1645-1650. DOI:pre Rev. Chim.: 10.37358/Rev.Chim.1949.
61. MAJIDINIA, M., SADEGHPOUR, A., MEHRZADI, S., REITER, R. J, et al. **2017**. Melatonin: A pleiotropic molecule that modulates DNA damage response and repair pathways. *Journal of pineal research*, 63(1), e12416. DOI: https://doi.org/10.1111/jpi.12416.

62. MEHRZADI, S., POURHANIFEH, M. H., MIZAEI, A., MORADIAN, F., et al. **2021**. An updated review of mechanistic potentials of melatonin against cancer: pivotal roles in angiogenesis, apoptosis, autophagy, endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. *Cancer Cell Int*,21(1), 188. DOI:10.1186/s12935-021-01892-1.
63. MONTERIO, K. K. A. C., SHIROMA, M. E., DAMOUS, L. L., SIMÕES, M. D. J. **2024**. Antioxidant Actions of Melatonin: A Systematic Review of Animal Studies. *Antioxidants*, 13(4), 439. DOI:https://doi.org/10.3390/antiox13040439.
64. MRUK, D. D., SILVESTRINI, B., MO, M. Y., CHNG, C. Y. **2002**. Antioxidant superoxide dismutase-a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*, 65(4), 305-311. DOI:https://doi.org/10.1016/S0010-7824(01)00320-1.
65. NENE, A. G., XUEFENG, Y., HONGRONG, L., RAMAKRISHNA, S. **2020**. Antioxidant Functionality in Plants and Plant Sourced Biomaterials. *Austin Journal of Nutrition & Metabolism*, 7(3), 1081-1081. 2573-5330. DOI časopisu: 10.26420/austinjntrmetab.
66. NICKEL, A., KOHLHAAS, M., MAACK, C. **2014**. Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 73, 26-33. DOI:https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.03.011.
67. NIKI, E. **2015**. Evidence for beneficial effects of vitamin E. *Korean J Intern Med*, 30(5), 571-579. DOI:10.3904/kjim.2015.30.5.571.
68. PEHLIVAN. F. E. **2017**. Vitamin C: An Antioxidant Agent. *Vitamin C*, 2, 23-35. DOI: 10.5772/intechopen.69660.
69. PHANIENDRA, A., JESTADI, D. B., PERIYASAMY, L. **2015**. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry*, 30, 11-26. DOI: https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0.
70. PISOSCHI. MAGDALENA, A., POP, A. **2015**. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040.
71. POZA, J. J., PUJOL, M., ORTEGA ALBÁS, J. J., ROMERO, O. **2022**. Melatonin in sleep disorders. *Neurología (English Edition)*, 37(7), 575-585. DOI: https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2018.08.004.
72. RAHAL, A., KUMAR, A., SINGH, V., YADAV, B., et al. **2014**. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*, 2014(1), 761264. DOI:10.1155/2014/761264.
73. RAO, T. R., YASHWANTH, T., USHA, B. **2024**. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: A Review. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 14(9). DOI: 10.22270/jddt.v14i6.6669.

74. REINA, M., MARTÍNEZ, A. **2018**. A new free radical scavenging cascade involving melatonin and three of its metabolites. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1123, 111-118. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.comptc.2017.11.017>.
75. REITER, R. J., DUN-XIAN T., GALANO, A. **2014**. Melatonin reduces lipid peroxidation and membrane viscosity. *Frontiers in physiology*, 377. DOI: 10.3389/fphys.2014.00377.
76. REITER, R. J., MAYO, J. C., TAN, D. X., SAINZ, R. M. **2016**. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *Journal of pineal research*, 61(3), 253-278. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpi.12360>.
77. REITER, R. J., TAN, D. X., ROSALES-CORRAL, S., GALANO, A., **2018**. Mitochondria: Central Organelles for Melatonin's Antioxidant and Anti-Aging Actions. *Molecules*, 23(2), 509. DOI:<https://doi.org/10.3390/molecules23020509>.
78. REN, W., LIU, G., CHEN, S., YIN, J. et al., **2017**. Melatonin signaling in T cells: Functions and applications. *Journal of pineal research*, 62(3), 12394. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpi.12394>.
79. RIZVI, S., RAZA, S. T., AHMED, F., AHMED, F. **2014**. The role of vitamin e in human health and some diseases. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 14(2), 157-65. DOI: 10.18295/2075-0528.1566 .
80. ROMERO, A., RAMOS, E., DE LOS RIOS, C., EGEEA, J., et al., **2014**. A review of metal-catalyzed molecular damage: protection by melatonin. *Journal of Pineal Research*, 56(4), 343-370. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpi.12132>.
81. ROSALES-CORRAL, S. A., REITER, R. J., TAN, D. X., MANCHESTER, L. C. **2014**. Antioxidant and anti-inflammatory role of melatonin in Alzheimer's neurodegeneration. *Aging. Academic Press*. 177-193. DOI:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405933-7.00018-4>.
82. RYNKOWSKA, A., STEPNIAK, J., KARBOWNIK-LEWIŃSKA, M. **2021**. Melatonin and indole-3-propionic acid reduce oxidative damage to membrane lipids induced by high iron concentrations in porcine skin. *Membranes*, 11(8), 571. DOI: <https://doi.org/10.3390/membranes11080571>.
83. RZEPKA-MIGUT, B., PAPROCKA, J. **2020**. Melatonin-measurement methods and the factors modifying the results. *A systematic review of the literature, international journal of enviromental reaserch and public health*, 17(6), 1916. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph17061916>.
84. SANTOS-SÁNCHEZ, N. F., SALAS-CORONADO, R., VILLANUEVA-CAÑONGO, C., HERNÁNDEZ-CARLOS, B. **2019**. Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. *IntechOpen*, DOI: 10.5772/intechopen.85270.
85. SHASTAK, Y., OBERMUELLER-JEVIC, U., PELLETIER, W. **2023**. A century of vitamin E: Early milestones and future directions in animal nutrition. *Agriculture Vitamin C*, 13(8), 1536. DOI:<https://doi.org/10.3390/agriculture13081526>.

86. TAHAMI ahami Monfared, Amir Abbas et al. **2022**. Alzheimer's Disease: Epidemiology and Clinical Progression. *Neurology and therapy*, 11(2), 553-569. DOI:10.1007/s40120-022-00338-8.
87. TCHEKALAROVA, J., TZONEVA, R. **2023**. Oxidative stress and aging as risk factors for Alzheimer's disease and Parkinson's disease: the role of the antioxidant melatonin. *International journal of molecular sciences*, 24(3), 3022. DOI:https://doi.org/10.3390/ijms24033022.
88. TURCO, M. Y., MOFFETT, A. **2019**. Development of the human placenta. *Development*, 146(22). DOI: https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.07.050.
89. VALGIMIGLI, L. **2023**. Lipid peroxidation and antioxidant protection. *Biomolecules*, 13(9), 1291. DOI: https://doi.org/10.3390/biom13091291.
90. VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T., et al. **2007**. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001.
91. WEIDINGER, A., KOZLOV, A. V. **2015**. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules*, 5(2), 472-484. DOI:https://doi.org/10.3390/biom5020472.
92. YU, S., ZOU, Y., MA, X., WANG, D. et al. **2024**. Evolution of LC-MS/MS in clinical laboratories. *Clinica Chimica Acta*, 555, 117797. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cca.2024.117797.
93. ZHANG, D., JIA, X., LIN, D., MA, J. **2023**. Melatonin and ferroptosis: mechanisms and therapeutic implications. *Biochemical pharmacology*, 218, 115909. DOI:https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115909.
94. ZHANG, H. M., ZHANG, Y. **2014**. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *Journal of pineal research*, 57(2), 131-146. DOI:https://doi.org/10.1111/jpi.12162.