

Katarzyna van Marke de Lumen¹, Kornelia Kędziora-Kornatowska², Jolanta Czuczejko¹, Karolina Szewczyk-Golec¹, Hanna Pawluk¹, Jadwiga Motyl², Tomasz Kornatowski³, Józef Kędziora¹

¹Katedra i Zakład Biochemii w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy,

²Katedra i Klinika Geriatrii w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy,

³Katedra i Zakład Farmakologii i Terapii w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy,

Wpływ melatoniny na wybrane parametry stresu oksydacyjnego u osób w podeszłym wieku z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym (badania wstępne)

Effect of melatonin on the chosen markers of oxidative stress in the elderly patients with essential arterial hypertension (a preliminary study)

Abstract

Background. Oxidative stress and the pineal hormone — melatonin — are involved in the pathogenesis of aging and aging-related diseases. The aim of our study was determination of the effect of melatonin administration on malonyldialdehyde (MDA) and melatonin concentrations and the cellular Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD-1) activity in the elderly patients with essential arterial hypertension.

Material and methods. The study was carried out on 10 patients with essential arterial hypertension, who were cured with thiazide diuretic (average 80.2 ± 10 years) and on 8 normotensive patients, who constituted the reference group (average 79.4 ± 6 years). They were given 5 mg melatonin (LE-KAM) in one hour before sleep for 30 days. The material of study was blood, taken at 08.00 am before the beginning of experiment and after 30 days of the melatonin administration. The melatonin concentration was determined in serum, and MDA content and SOD-1 activity were determined in erythrocytes.

Results. Lower melatonin concentration (6.06 ± 4.9 and 7.07 ± 3.6 pg/ml, respectively) and higher MDA content (0.293 ± 0.03 and 0.275 ± 0.04 $\mu\text{mol/gHb}$, respectively) and lower SOD-1 activity (2557.1 ± 300 and 2745.5 ± 279 U/gHb, respectively) were observed in patients with hypertension in comparison to the reference group. These differences were statistically non-significant. After supplementation in the patients with hypertension and in reference group statistically lower MDA concentration (0.219 ± 0.05 $\mu\text{mol/gHb}$, $p < 0.001$ and 0.225 ± 0.04 $\mu\text{mol/gHb}$, $p < 0.02$) and higher SOD-1 activity (2974.8 ± 532 U/gHb, $p < 0.01$ and 3227.1 ± 37 U/gHb,

Źródło finansowania badań: grant studiów doktoranckich CM UMK: SD-47/03

Adres do korespondencji:
mgr Katarzyna van Marke de Lumen
tel.: (052) 585 37 55
faks: (052) 585 37 53
e-mail: kasiamarke@wp.pl

$p < 0.01$) were indicated. In examined groups higher melatonin content (15.8 ± 11.1 i 14.37 ± 12.41 pg/ml) after administration was noted, but these changes were significant only in the patients with hypertension ($p < 0.02$).

Conclusions. The antioxidative properties of melatonin were confirmed in the study. The supplementation of this hormone may be used as supportive therapy in the hypertensive treatment of the elderly people.

key words: melatonin, oxidative stress, essential hypertension, aging

Wstęp

W wyniku starzenia się dochodzi do zaburzenia homeostazy prooksydacyjno-antyoksydacyjnej organizmu, które prowadzi do podwyższenia stężenia reaktywnych form tlenu i powstania stresu oksydacyjnego. Obserwacje te stały się podstawą tak zwanej wolnorodnikowej teorii starzenia się Harmana [1]. Melatonina jest hormonem szyszynki, wykazującym działanie antyoksydacyjne, którego stężenie obniża się w organizmie wraz z wiekiem. Badania wskazują na jej udział w patogenezie starzenia i chorób związanych z wiekiem podeszłym [2–6].

W warunkach nasilonego stresu oksydacyjnego dochodzi do obniżenia aktywności układu antyoksydacyjnego, którego funkcją jest obrona przed skutkami działania reaktywnych form tlenu. Do tego układu zalicza się między innymi enzymy antyoksydacyjne: dysmutazę ponadtlenkową (SOD) (E.C.1.15.1.1), katalazę (CAT) (E.C.1.11.1.6) i peroksydazę glutationową (GSH-Px) (E.C.1.11.1.9) oraz antyoksydanty niskocząsteczkowe, takie jak zredukowany glutation (GSH), witamina E i A oraz melatonina. Wskutek przewagi procesów prooksydacyjnych w organizmie wzrasta stężenie produktów, które powstały w wyniku reakcji reaktywnych form tlenu ze składnikami komórek, z jednoczesnym nagromadzeniem uszkodzeń powstałych w czasie tych reakcji. Jednym z takich związków jest dialdehyd malonowy (MDA), wskaźnik peroksydacji lipidów i uszkodzeń błon komórkowych [7].

Melatonina jest inhibitorem peroksydacji lipidów, zapobiega uszkodzeniom DNA wywołanym przez czynniki fizyczne, a także ogranicza wolnorodnikowe uszkodzenia białek. Może być donorem elektronów i reaguje bezpośrednio z reaktywnymi formami tlenu, powodując ich inaktywację, ale także współdziała z innymi antyoksydantami niskocząsteczkowymi oraz zwiększa liczbę komórkowego mRNA kodującego enzymy antyoksydacyjne i stymuluje ich aktywność [7–9].

Nadciśnienie tętnicze jest jedną z chorób związanych z wiekiem podeszłym, ponieważ występowanie tego schorzenia stwierdza się u około 65% osób w tym okresie życia [10]. Wielokrotnie sugerowano, że w patogenezie nadciśnienia tętniczego niezależnie od wieku istotną

rolę może odgrywać zwiększony stres oksydacyjny [11, 12]. W nielicznych jak dotychczas badaniach zaobserwowano, że suplementacja preparatem hormonu szyszynki (melatoniną) może być pomocna w leczeniu chorób wieku podeszłego, w tym nadciśnienia tętniczego [13]. Celem badań była ocena wpływu suplementacji melatoniną na wybrane parametry stresu oksydacyjnego: stężenia MDA i melatoniny oraz aktywność SOD-1 we krwi osób z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym w podeszłym wieku.

Materiał i metody

W badaniach wzięło udział 10 pacjentów w podeszłym wieku z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym, leczonych diuretykiem (indapamid, w dawce 1,5 mg/d., firmy Servier) (średnia wieku $80,2 \pm 10$ lat). Grupę odniesienia stanowiło 8 osób w starszym wieku, z prawidłowym ciśnieniem tętniczym bez chorób o poznanej etiologii wolnorodnikowej (średnia wieku $79,4 \pm 6$ lat). Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej UMK w Toruniu przy CM im. L. Rydygiera w Bydgoszczy (KB.158/03). Kwalifikacja osób do badań odbywała się na podstawie badań: przedmiotowego i podmiotowego oraz laboratoryjnych, których celem było wykrycie nierozpoznanych wcześniej chorób mogących mieć wpływ na stan antyoksydacyjny organizmu. Z badań wyłączono osoby przyjmujące leki, o których wiadomo, że posiadają właściwości antyoksydacyjne, oraz z innymi chorobami układu sercowo-naczyniowego, cukrzycą, hipercholesterolemią, nadwagą, chorobami nowotworowymi, a także osoby palące tytoń i osoby nadużywające alkoholu.

Zarówno pacjenci z nadciśnieniem tętniczym, jak i z ciśnieniem prawidłowym przez 30 dni przyjmowali preparat melatoniny (5 mg firmy LE-KAM) na godzinę przed snem. Oznaczenia wykonano przed rozpoczęciem suplementacji i po 30 dniach przyjmowania melatoniny. Materiał do badań stanowiła krew pobierana z żyły odłokciowej o godzinie 8.00 do probówek z heparyną oraz do probówek pozbawionych antykoagulantu w celu uzyskania surowicy, w której oznaczano stężenie melatoniny metodą ELISA z użyciem przeciwciał.

Tabela 1. Wpływ suplementacji melatoniną na stężenie MDA i melatoniny oraz aktywność SOD-1 u osób w podeszłym wieku z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym w porównaniu z grupą odniesienia
Table 1. The effect of melatonin administration on MDA and melatonin concentrations and the SOD-1 activity in the elderly patients with essential arterial hypertension in comparison to the reference group

	Grupa odniesienia n = 10		Pacjenci z nadciśnieniem tętniczym n = 8	
	Przed rozpoczęciem suplementacji melatoniną	Po 30 dniach suplementacji melatoniną	Przed rozpoczęciem suplementacji melatoniną	Po 30 dniach suplementacji melatoniną
MDA [$\mu\text{mol/gHb}$]	0,275 \pm 0,04	0,225 \pm 0,04 ^a	0,293 \pm 0,03	0,219 \pm 0,05 ^c
Melatonina [pg/ml]	7,07 \pm 3,6	14,37 \pm 12,41	6,06 \pm 4,9	15,8 \pm 11,1 ^a
SOD-1 [U/gHb]	2745,5 \pm 279	3227,1 \pm 377 ^b	2557,1 \pm 300	2974,8 \pm 532 ^b

^ap < 0,02, ^bp < 0,01, ^cp < 0,001, różnice statystyczne przed suplementacją i po niej w obrębie grupy

Z krwi pobieranej do próbek z antykoagulantem uzyskiwano hemolizat, w którym oznaczano stężenie związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (głównie dialdehydu malonowego — MDA) metodą według Placera i wsp. [14] oraz aktywność wewnątrzkomórkowej cynkowo-miedziowej dysmutazy nadadtlenkowej (SOD-1) z użyciem adrenaliny jako substratu metodą według Misra i Fridovicha [15].

Wyniki przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe. Obliczeń statystycznych dokonano z użyciem testu *t*-Studenta. Za różnice istotne statystycznie przyjęto prawdopodobieństwo $p < 0,05$.

Wyniki

Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1. Przed rozpoczęciem suplementacji melatoniną u osób z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu z grupą odniesienia stwierdzono niższe stężenie melatoniny oraz wyższe stężenie MDA i niższą aktywność SOD-1. Nie były to jednak różnice znamienne statystycznie. Po 30 dniach suplementacji wykazano znamienne statystycznie obniżenie stężenia MDA zarówno w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym ($p < 0,001$), jak i w grupie odniesienia ($p < 0,02$) oraz wzrost aktywności SOD-1 w grupie z nadciśnieniem tętniczym ($p < 0,01$) i z prawidłowym ciśnieniem ($p < 0,01$). Zaobserwowano także wzrost stężenia melatoniny, znamienne statystycznie tylko w wypadku grupy z nadciśnieniem tętniczym ($p < 0,02$). W przypadku stężenia melatoniny wykazano wysokie odchylenie standardowe świadczące o dużych różnicach osobniczych.

Dyskusja

Przyczyną pierwotnego nadciśnienia tętniczego jest między innymi upośledzenie czynności śródbłonka naczyń krwionośnych, który jest odpowiedzialny za utrzymanie odpowiedniego napięcia ścian tętnic [16].

Obniżenie stężenia tlenu azotu (NO) — śródbłonkowego czynnika relaksującego (EDRF, *endothelium-derived relaxing factor*), który jest podstawowym endogennym czynnikiem rozkurczającym naczynia, może być spowodowane jego inaktywacją w wyniku reakcji z reaktywnymi formami tlenu, w tym głównie z anionorodnikiem nadadtlenkowym ($\text{O}_2^{\bullet-}$), ale także z rodnikiem wodorotlenowym (HO^{\bullet}) i rodnikiem lipidowym (ROO^{\bullet}) [6, 12, 17]. Powoduje to przewagę efektu naczynioskurczowego i wzrost ciśnienia tętniczego [18]. Poza tym reaktywne formy tlenu inicjując, poprzez reakcję bezpośrednią, peroksydację lipidów, zwiększają tym samym przepuszczalność śródbłonka dla białek osocza i innych makroelementów, takich jak cytokiny prozapalne, które osłabiają jego funkcję [12].

Z wiekiem dochodzi do obniżenia wydzielania melatoniny w organizmie [19]. Ponadto choroby układu sercowo-naczyniowego są najczęstszymi schorzeniami i głównymi przyczynami śmiertelności u osób w podeszłym wieku [20]. Wyniki badań własnych wskazują, że nadciśnieniu tętniczemu towarzyszy spadek stężenia hormonu szyszynki, co potwierdzają wcześniejsze sugestie o możliwości jego udziału w patogenezie nadciśnienia tętniczego. W ciągu ostatniej dekady wielokrotnie opisywano wpływ melatoniny na układ krążenia [5]. W sercu i naczyniach krwionośnych znaleziono receptory MT_1 i MT_2 wiążące hormon szyszynki [21]. Brugger i wsp. [22] oraz Yaprak i wsp. [23] stwierdzili mniejsze wydzielanie melatoniny, a Girotti i wsp. [24] jej głównego metabolitu, 6-hydroksymelatoniny, u osób z chorobą wieńcową w porównaniu z grupą kontrolną. Nocnemu wzrostowi stężenia melatoniny towarzyszy obniżenie ciśnienia tętniczego [5, 25]. Obserwacje te mogą wskazywać na udział melatoniny w regulacji czynności układu serco-

wo-naczyniowego. Potwierdzają to badania, w których wykazano, że podawanie tego hormonu obniża ciśnienie tętnicze [26–28].

Ze względu na krótki okres półtrwania melatoniny we krwi, który wynosi około 30–50 minut [3], zaobserwowany w badaniach własnych wzrost jej endogenego stężenia po suplementacji wskazuje na to, że hormon pochodzenia egzogenne stymuluje jego syntezę w organizmie, co ma duże znaczenie u osób w podeszłym wieku, u których obserwuje się jego niskoamplitudowy rytm wydzielania [19].

Uzyskane w badaniach własnych wyższe stężenie MDA i niższa aktywność SOD-1 u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym są zgodne z wcześniejszymi wynikami badań, wskazującymi na występowanie stresu oksydacyjnego u osób z nadciśnieniem tętniczym, które uzyskali między innymi Donmez i wsp. [6], Krouft i wsp. [29], Harnandez-Hernandez i wsp. [30]. Kędziora-Kornatowska i wsp. [31] zaobserwowali, że u osób z prawidłowym ciśnieniem tętniczym w podeszłym wieku występuje nasilony stres oksydacyjny w porównaniu z osobami dorosłymi młodszymi, a jeszcze bardziej nasilone są procesy prooksydacyjne u osób w starszym wieku z samoistnym nadciśnieniem tętniczym.

Procesowi starzenia się oraz wielu chorobom, w tym także układu sercowo-naczyniowego, towarzyszy nagromadzenie produktów utleniania lipidów [18, 32]. Melatonina charakteryzuje się wysoką lipofilnością i ma zdolność reagowania z rodnikiem lipidowym i wodorotlenowym, a także z innymi wolnymi rodnikami. Dzięki temu jest inhibitorem peroksydacji lipidów i chroni błony komórkowe przed uszkodzeniami spowodowanymi przez reaktywne formy tlenu [7]. Świadczy o tym uzyskane w badaniach własnych obniżenie stężenia MDA pod wpływem suplementacji melatoniną. Obserwacje te potwierdzają wyniki badań, które prowadzili na szczurach Akbulut i wsp [33], gdzie suplementacja hormonem szyszynki spowodowała obniżenie stężenia MDA,

a także Mizrak i wsp. [34], którzy zaobserwowali wzrost stężenia MDA w przypadku wycięcia szyszynki.

Wielokrotnie donoszono, że melatonina stymuluje aktywność SOD oraz zwiększa liczbę cząsteczek mRNA kodującego ten enzym [7–9], a Liu i Ng [35] stwierdzili wzrost aktywności SOD pod wpływem suplementacji melatoniną u szczurów. SOD to kluczowy enzym antyoksydacyjny organizmu, uczestniczący w pierwszej linii obrony organizmu przed działaniem reaktywnych form tlenu, katalizujący reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$). Reakcja ta odgrywa szczególnie ważną rolę w naczyniach krwionośnych, gdyż chroni NO przed jego inaktywacją w reakcji z $O_2^{\cdot-}$. Tym samym SOD zapobiega uszkodzeniom śródbłonna, wywoływanym przez bardzo reaktywny nadtlenoazotyn ($NOO^{\cdot-}$), powstający w wyniku reakcji $O_2^{\cdot-}$ z NO [36]. W badaniach własnych zaobserwowano wzrost aktywności tego enzymu po suplementacji melatoniną, co może odgrywać ważną rolę w leczeniu wspomagającym nadciśnienia tętniczego oraz wielu schorzeń związanych z występowaniem stresu oksydacyjnego w tym okresie życia.

Wnioski

Zaobserwowane w badaniach własnych nasilenie peroksydacji lipidów i zmniejszenie aktywności kluczowego enzymu antyoksydacyjnego w połączeniu z obniżonym stężeniem hormonu szyszynki we krwi u starszych osób z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym w porównaniu z grupą z ciśnieniem prawidłowym, wskazują, że stres oksydacyjny i melatonina mogą uczestniczyć w patogenezie samoistnego nadciśnienia tętniczego. Stwierdzone korzystne zmiany w zakresie poprawy parametrów obrony antyoksydacyjnej w wyniku 30-dniowej suplementacji melatoniną mogą wskazywać, że hormon ten może być wykorzystywany jako terapia wspomagająca w leczeniu nadciśnienia tętniczego w wieku podeszłym. Aby potwierdzić dotychczasowe obserwacje, konieczne są jednak dalsze badania w tym zakresie.

Streszczenie

Wstępn. Stres oksydacyjny oraz hormon szyszynki — melatonina — są związane z patogenezą starzenia się i chorób związanych z wiekiem podeszłym. Celem badań było oznaczenie wpływu suplementacji melatoniną na stężenie dialdehydu malonowego (MDA) i melatoniny oraz aktywności wewnątrzkomórkowej Cu, Zn-dysmutazy ponadtlenkowej (SOD-1) we krwi osób w podeszłym wieku z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym.

Materiał i metody. W badaniach udział wzięło 10 pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym, leczonych diuretykiem (śr. 80,2 ± 10 lat) oraz 8 osób z prawidłowym ciśnieniem bez chorób o poznanej etiologii wolnorodnikowej, które stanowiły grupę odniesienia (średnia wieku 79,4 ± 6 lat). Badani przez 30 dni na godzinę przed snem przyjmowali 5 mg melatoniny (firmy LE-KAM). Materiał do badań stanowiła krew pobierana o godzinie 8.00 przed rozpoczęciem eksperymentu i po 30 dniach suplementacji. W surowicy oznaczano stężenie melatoniny, a w hemolizacie stężenie MDA oraz aktywność SOD-1.

Wyniki. U osób z nadciśnieniem tętniczym stwierdzono niższe stężenie melatoniny (odpowiednio $6,06 \pm 4,9$ i $7,07 \pm 3,6$ pg/ml) oraz wyższe stężenie MDA ($0,293 \pm 0,03$ i $0,275 \pm 0,04$ $\mu\text{mol/gHb}$) i niższą aktywność SOD-1 ($2557,1 \pm 300$ i $2745,5 \pm 279$ U/gHb) niż w grupie pacjentów z prawidłowym ciśnieniem. Nie były to jednak różnice znamienne statystycznie. Po suplementacji w grupie zarówno z nadciśnieniem tętniczym, jak i odniesienia stwierdzono znamienne statystycznie spadek stężenia MDA (odpowiednio $0,219 \pm 0,05$ $\mu\text{mol/gHb}$, $p < 0,001$ i $0,225 \pm 0,04$ $\mu\text{mol/gHb}$, $p < 0,02$) oraz wzrost aktywności SOD-1 ($2974,8 \pm 532$ U/gHb, $p < 0,01$ i $3227,1 \pm 37$ U/gHb, $p < 0,01$), a także wzrost stężenia melatoniny ($15,8 \pm 11,1$ i $14,37 \pm 12,41$ pg/ml), znamienne statystycznie w grupie z nadciśnieniem tętniczym ($p < 0,02$).

Wnioski. Wyniki badań potwierdzają antyoksydacyjne właściwości melatoniny. Suplementację tym hormonem można wykorzystać jako terapię wspomagającą leczenie hipotensyjne u osób w podeszłym wieku.

słowa kluczowe: melatonina, stres oksydacyjny, nadciśnienie tętnicze, starzenie się

PIŚMIENNICTWO

1. Harman D.: *Free radical theory of aging*. Mutat. Res. 1992; 275: 257–266.
2. Reiter R.J.: *The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and of the data*. Exp. Gerontol. 1995; 30: 199–212.
3. Olde-Rikkert M.G.M., Rigaud A.S.P.: *Melatonin in elderly patients with insomnia*. Z. Gerontol. Geriatr. 2001; 34: 491–497.
4. Ozcankaya R., Delibas N.: *Malonyldialdehyde, superoxide dismutase, melatonin, iron, copper and zinc blood concentrations in patients with Alzheimer disease: cross-sectional study*. Croat Med. J. 2002; 43: 28–32.
5. Sewerynek E.: *Melatonin and the cardiovascular system*. Neuroendocrinol. Lett. 2002; 23 (supl. 1): 79–83.
6. Donmez G., Derici U., Erbas D. i wsp.: *The effects of losartan and enalapril therapies on levels of nitric oxide, malondialdehyde, and glutathione in patients with essential hypertension*. Jpn. J. Physiol. 2002; 52: 435–440.
7. Reiter R. J., Tan D.X., Mayo J.C., Sainz R.M., Leon J., Czarnecki Z.: *Melatoninas an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans*. Acta Biochem. Pol. 2003; 50: 1129–1146.
8. Pappolla M.A., Chyan Y.J., Poeggeler B. i wsp.: *An assessment of the antioxidant and antiamyloidogenic properties of melatonin: implications for Alzheimer's disease*. J. Neural. Transm. 2000; 107: 203–231.
9. Antunes F., Barclay L.R.C., Ingold K.U. i wsp.: *On the antioxidant activity of melatonin*. Free Radical Biol. Med. 1999; 26: 117–128.
10. Hajjar L., Kotchen TA.: *Trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the United States, 1988–2000*. JAMA 2003; 290: 199–206.
11. Johnson P.: *Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension*. Comp. Biochem. Physiol. C. 2002; 133: 493–505.
12. Touyz R.M.: *Oxidative stress and vascular damage in hypertension*. Curr. Hypertens. Rep. 2000; 2: 98–105.
13. Karasek M., Reiter R.J., Cardinali D.P., Pawlikowski M.: *Future of melatonin as therapeutic agent*. Neuroendocrinol. Lett. 2002; 23 (supl. 1): 118–121.
14. Placer Z., Cushman L., Johnson B.: *Estimation of product of lipid peroxidation malondialdehyde in biochemical systems*. Anal. Biochem. 1966; 16: 359–354.
15. Misra H.P., Fridovich J.: *The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase*. J. Biol. Chem. 1972; 247: 3170–3175.
16. Opie L.H.: *Inhibitory konwertazy angiotensyny: postępowanie*. Via Medica, Gdańsk 2000.
17. Cai H., Harrison D.G.: *Endothelial dysfunction in cardiovascular disease: the role of oxidant stress*. Circ. Res. 2000; 87: 840–844.
18. Maytin M., Leopold J., Loscalzo J.: *Oxidant stress in the vasculature*. Curr. Atheroscler. Rep. 1999; 1: 156–164.
19. Toutou Y.: *Human aging and melatonin. Clinical relevance*. Exp. Gerontol. 2001; 36: 1083–1100.
20. Lewington S., Clarke R., Qizilbash N., Peto R., Collins R. Prospective Studies Collaboration: *Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies*. Lancet. 2002; 360: 1903–1913.
21. Ekmekcioglu C., Thalhammer T., Humpeler S. i wsp.: *The melatonin receptor subtype MT2 is present in the human cardiovascular system*. J. Pineal. Res. 2003; 35: 40–44.
22. Brugger P., Markt W., Herold M.: *Impaired nocturnal secretion of melatonin in coronary heart disease*. Lancet 1995; 345: 1408.
23. Yaprak M., Altun A., Vardar A., Aktoz M., Ciftici S., Ozbay G.: *Decreased nocturnal synthesis in patients with coronary artery disease*. Int. J. Cardiol. 2003; 89: 103–107.
24. Girotti L., Lago M., Ivanovsky O. i wsp.: *Low urinary 6-sulphatoxymelatonin in patients with coronary artery disease*. J. Pineal. Res. 2000; 29: 138–142.
25. Walters J.F., Skene D.J., Hampton S.M., Ferns G.A.: *Biological rhythms, endothelial health and cardiovascular disease*. Med. Sci. Monit. 2003; 9: RA1–8.
26. Cagnacci A., Arangino S., Angiolucci M., Maschio E., Melis G.B.: *Influences of melatonin administration on the circulation of women*. Am. J. Physiol. 1998; 274: R335–338.
27. Arangino S., Caganacci A., Angiolucci M. i wsp.: *Effects of melatonin on vascular reactivity, catecholamine levels, and blood pressure in healthy men*. Am. J. Cardiol. 1999; 83: 1417–1419.
28. Kitajima T., Kanbayashi T., Saitoh Y. i wsp.: *The effect of oral melatonin on the autonomic function in healthy subjects*. Psychiatry Clin. Neurosci. 2001; 55: 299–300.
29. Krouft D., Bouchenak M., Mahammedi B., Cherrad A., Belleville J., Prost J.: *Changes in serum lipids and antioxidant status in west Algerian patients with essential hypertension treated with acebutolol compared to healthy subjects*. Med. Sci. Monit. 2003; 9: 109–115.
30. Hernandez-Hernandez R., Armas-Padilla M.C., Cammarata R. i wsp.: *Nitric oxide and malondialdehyde levels in healthy normotensive subjects and hypertensive patients*. AHJ 2004; 17 cz. 2: 71A.
31. Kędziora-Kornatowska K., Czuczejko J., Pawluk H. i wsp.: *The markers of oxidative stress and activity of the antioxidant system in the blood of elderly patients with essential arterial hypertension*. Cell. Mol. Biol. Lett. 2004; 9: 635–641.
32. Spiteller G.: *Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases*. Exp. Gerontol. 2001; 36: 1425–1457.
33. Akbulut K.G., Gönül B., Akbulut H.: *Differential effects of pharmacological doses of melatonin on malondialdehyde and glutathione levels in young and old rats*. Gerontology 1999; 45: 67–71.
34. Mizrak B., Parlakpinar H., Acet A., Turkoz Y.: *Effect of pinealectomy and exogenous melatonin on rat hearts*. Acta Histochem. 2004; 106: 29–36.
35. Liu F., Ng T.B.: *Effect of pineal indoles on activities of the antioxidant defense enzymes superoxide dismutase, catalase, and glutathione reductase, and levels of reduced and oxidized glutathione in rat tissues*. Biochem. Cell Biol. 2000; 78: 447–453.
36. Fukai T., Folz R.J., Landmesser U., Harrison D.G.: *Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease*. Cardiovas. Res. 2002; 55: 239–249.