

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS
MIKROBIOLOGIJOS IR BIOTECHNOLOGIJOS
KATEDRA

**Cirkadiniai ritmai ir melatoninas reguluoja nuo
T-ląstelių priklausomą ir nuo T-ląstelių nepriklausomą
antikūnų produkciją**

Vitalij Černyšiov

Magistrinis darbas

Darbo vadovė:

Dr. Irutė Girkontaitė

Vilnius 2010

Darbas atliktas Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios
medicinos centro Imunologijos departamente

TURINYS

SANTRUMPOS	4
1. ĮVADAS	5
1.1. Darbo tikslas ir uždaviniai	6
2. LITERATŪROS APŽVALGA	7
2.1. Melatoninas ir jo reikšmė	7
2.1.1. Melatonino gamyba	7
2.1.2. Melatonino fiziologinė reikšmė	9
2.1.3. Melatonino terapinis taikymas	10
2.1.4. Melatoninas ir vėžys	13
2.2. Melatonino receptoriai	16
2.2.1. Ląstelės membranos melatonino receptoriai	16
2.2.3. Branduolio membranos melatonino receptoriai.	20
2.3. Melatoninas ir imuninė sistema	21
2.3.1. Melatonino veiklos tyrimo metodai. Melatonino sintezės sustabdymas	21
2.3.2. Melatonino poveikis monocitams/makrofagams ir granulocitams.	23
2.3.3. Melatonino poveikis limfocitams	24
2.3.3.1. Melatonino poveikis T limfocitams	25
2.3.3.2. Melatonino poveikis B limfocitams	25
2.3.3.3. Melatonino poveikis NK ląstelėms	27
3. TYRIMŲ METODIKA IR PRIEMONĖS	28
3.1. Naudojami reagentai	28
3.1.1. Reagentai	28
3.1.2. Tirpalai	29
3.2. Eksperimentiniai gyvūnai	30
3.3. Pelių kraujo paėmimas	30
3.4. Gyvūnų laikymas nustatant melatonino koncentraciją paros metu	31
3.5. Gyvūnų imunizacija nuo T ląstelių nepriklausomu antigenu	31
3.6. Gyvūnų imunizacija nuo T ląstelių priklausomu antigenu	33
3.7. Eksperimentai su ląstelių kultūra	35
3.8. ELISA metodas	36
3.9. Melatonin ELISA rinkinys	37
4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	39
4.1. Šviesos įtaka melatonino koncentracijai	39
4.2. Melatonino įtaka nuo T ląstelių nepriklausomai antikūnų produkcijai	40
4.3. Melatonino įtaka nuo T ląstelių priklausomų antikūnų produkcijai	44
4.4. Antikūnų produkcijos priklausomybė nuo imunizacijos laiko	48
4.5. Melatoninas moduliuoja antikūnų produkciją per MT2 receptorių	49
5. IŠVADOS	53
6. LITERATŪRA	54
SANTRAUKA	58
SUMMARY	59
PADĖKA	60

SANTRUMPOS

CD40 – (angl. cluster of differentiation – leukocitų diferenciacijos antigenai)

CD40L – CD40 receptoriaus ligandas

DNR - dezoksiribonukleino rūgštis

ELISA – tvirtafazė imunofermentinė analizė (angl. enzyme linked immunosorbend assay)

FCS – (angl. fetal bovine serum – jaučių embrioninis serumas)

GPCR – G baltymais asocijuoti receptoriai (angl. G-protein coupled receptors)

IFN – interferonas

Ig – imunoglobulinas

IL – interleukinas

LPS – lipopolisaharidas

MT1, MT2, MT3 – melatonino receptoriai

4-P-PDOT – (angl. 4-Phenyl-2-propionamidotetralin) – 4-Fenil-2-propionamidotetralinas

MHC – pagrindinis audinių suderinamumo kompleksas (angl. major histocompatibility complex)

NADH – nikotinamidadeninukleotidas

NADP – nikotinamidadeninukleotidas fosfilintas

NK – natūralieji žudikai (angl. natural killers)

REM – greitas akių judėjimas

RPMI medium – (angl. Roswell Park Memorial Institute medium) Rosevel Park atminties instituto terpė

SV – standartiniai vienetai

TCR – T ląstelių receptorius (angl. T cell receptor)

T_H – T ląstelės pagalbininkės

TN – nuo T ląstelių nepriklausomi antigenai

TP – nuo T ląstelių priklausomi antigenai

TNF α – navikų nekrozės faktorius α ;

1. ĮVADAS

Melatoninas – hormonas, kurį produkuoja kankorėžinė liauka, buvo atrastas 1959 metais ir vadinamas “tamsos hormonu“, kadangi jis gaminamas tamsiu paros metu. Maksimalus melatonino kiekis būna vidurnaktį ir iki ryto mažėja, be to šviesa silpnina jo sintezę. Melatoninas reguliuoja biologinį laikrodį, pagerina miegą, stimuliuoja imuninę sistemą, apsaugo nervų sistemą. Literatūriniai duomenys apie melatonino įtaką imuninei sistemai daugiausia yra apie jo poveikį T ląstelėms. Melatoninas padidina čiobrialaukės dydį bei citokinių produkciją, stimuliuoja T ląsteles pagalbininkes (T_H1) bei aktyvuoja NK ląsteles ir makrofagus. Tačiau, šio hormono įtaka B ląstelių funkcijoms nėra iširta.

Mūsų darbo tikslas buvo iširti melatonino įtaką B ląstelių funkcijoms, t.y. antikūnų susidarymui. Kadangi antikūnų produkcija būna nepriklausoma ir priklausoma nuo T ląstelių, buvo nuspręsta imunizuoti BALB/c peles su nuo T ląstelių nepriklausomu (TN) ir nuo T ląstelių priklausomu (TP) antigenu bei stebėti specifinių antikūnų susidarymą. Imunizuojamos pelės eksperimento metu buvo laikomos trijose skirtingose sąlygose: esant normalioms šviesos-tamsos ciklo sąlygoms; esant pastoviam apšvietimui, t.y. esant sumažėjusiai melatonino sintezei; ir esant pastoviam apšvietimui, ir papildomai kiekvieną dieną (arba kasdien) leidžiant melatoniną.

Buvo nustatyta, kad esant sumažėjusiai melatonino sintezei (pastovus apšvietimas) padidėja nuo T ląstelių nepriklausomas antikūnų kiekis. Tuo tarpu, esant pastoviam apšvietimui ir papildomai leidžiant melatoniną, antikūnų kiekis yra panašus kaip ir esant normaliom šviesos-tamsos ciklo sąlygoms. Imunizuojant nuo T ląstelių priklausomu antigenu, imunoglobulino IgM, IgG2a, IgG2b ir IgG3 izotipų antikūnų kiekis padidėja, kai melatonino sintezė yra sutrikusi. Tačiau IgG1 izotipo antikūnų kiekis, priešingai, sumažėja.

Taip pat buvo nustatyta, kad antikūnų produkcija kraujo serume esant normaliom apšvietimo sąlygom priklauso nuo imunizacijos laiko. Antikūnų produkcija yra žymiai didesne imunizuojant peles vakare, lyginant su rytine imunizacija, ką galima būtų susieti su melatonino įtaka.

Melatoninas veikia ląsteles sąveikaudamas su kelių tipo receptoriais. Naudojant selektyvius MT2 melatonino receptoriaus antagonistus, *in vitro* ir *in vivo* metodais buvo nustatyta, kad melatoninas antikūnų produkciją moduliuoja veikdamas B ląsteles per MT2 receptorių.

1.1. Darbo tikslas ir uždaviniai

Šio darbo tikslas:

Nustatyti kaip melatoninas reguliuoja nuo T-ląstelių priklausomą ir nuo T-ląstelių nepriklausomą antikūnų produkciją.

Darbo uždaviniai:

- Nustatyti ar šviesa sukelia melatonino sintezės sutrikimus pelėms.
- Nustatyti melatonino įtaką nuo T ląstelių nepriklausomai antikūnų produkcijai.
- Nustatyti melatonino įtaką nuo T ląstelių priklausomai antikūnų produkcijai.
- Nustatyti ar priklauso antikūnų produkcija nuo imunizacijos laiko.
- Nustatyti per kokį receptorių veikia melatoninas, reguliuodamas antikūnų produkciją.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

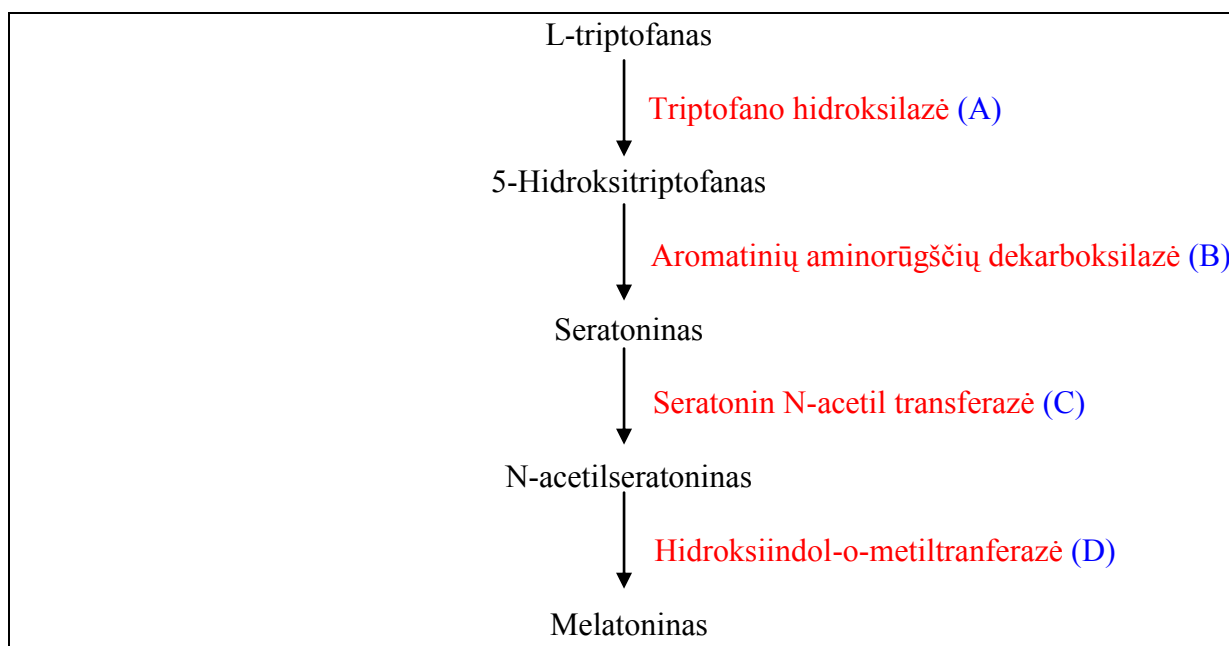
2.1. Melatoninas ir jo reikšmė

Melatoninas (N-acetil-5-metoksitriptaminas) – yra hormonas, kurį gamina kankorėžinė liauka, daugiausia nakties miego metu. Jis lėtina medžiagų apykaitą, slopina skydliaukės funkciją, pasižymi raminančiu poveikiu. Melatonino gamyba daugiausiai vyksta nakties metu, jo sintezė inhibuoja šviesa ir stimuliuoja tamsa. 1958 metais dermatologas A. Lerneris su kolegom atrado melatoniną [1]. Melatoninas randamas daugumoje gyvų organizmų nuo bakterijų iki žmogaus [2]. Kadangi melatonino molekulė sukelia varlių odos pigmento - melanoforo susitraukimą, Lerneris pavadino ją “melatoninu“ [3].

2.1.1. Melatonino gamyba

Stuburiniuose organizmuose melatoninas daugiausiai gaminamas kankorėžinėje liaukoje, kuri laikoma pagrindiniu šio hormono gamybos organu [4]. Tai pat melatoniną gamina akies tinklainėje esančios fotoreceptorinės ląstelės, virškinimo trakto bei odos ląstelės, limfocitai, kaulų čiulpu ląstelės bei trombocitai [2,5,6]. Pagamintas kankorėžinėje liaukoje melatoninas pasisklaido po visą organizmą ir veikia per melatonino receptoriais praturtintus organus. Kitur pagamintas melatoninas pasižymi vietiniu (autokriniu ir parakriniu) poveikiu, ir jo kiekis būna žymiai mažesnis už pagamintą hormoną kankorėžinėse liaukoje [2].

Kankorėžinė liauka (*corpus pineale*) – liauka, esanti galvos smegenyse, trečiajame smegenų skilvelyje (tarp tarpinių smegenų, didžiųjų pusrutulių ir smegenėlių). Tai nedidelis, ovalios formos, neporinis organas, 0,2 g masės. Geriausiai išsivysčiusi yra vaiko kankorėžinė liauka. Liauką sudaro penkių tipų ląstelės, tarp kurių pagrindinėmis ląstelėmis laikomi pinealocitai, kurie ir gamina melatoniną. Žinduolių kankorėžinės liaukos šviesa negali pasiekti, todėl ji gauna informaciją per regos nervą [7]. Melatonino sintezė vyksta iš amino rūgšties triptofano, susidarant tarpiniam produktui, serotoninui (biologiškai aktyvi medžiaga, hormonas, monoamininis neuromediatorius, sintetinamas smegenyse). Centrinėje nervų sistemoje, serotoninas atlieka svarbų vaidmenį reguliuojant psichinius procesus: nuotaiką, miegą, seksualumą bei apetitą. Manoma, kad su serotoninu koncentracijos organizme pokyčiai susijusios įvairios ligos, tokios kaip depresija, migrena, nemiga, šizofrenija ir nerimo sutrikimai [8]. Melatonino biosintezės schemoje pateikta 1 paveiksle. Šiuo hormono biosintezės intensyvumas periodiškai kinta keletą kartų per parą ir priklauso nuo apšvietimo [2].



1 paveikslas. Melatonino sintezė iš triptofano.

Raudona spalva pažymėti fermentai, mėlyna – biosintezės etapai.

A – triptofano oksidacija hidroksilinimo būdu, B – 5-hidroksitriptofano dekarboksilinimas ir serotoninio susidarymas, C – serotoninio acetilinimas, D – N-acetilserotonino metilinimas.

Pagrindiniai melatonino gamybos fermentai yra du: serotonin N-acetil transferazė ir vaidinanti kur kas mažesnę vaidmenį triptofano hidroksilazė [9]. Serotonin N-acetil transferazė laikoma pagrindiniu melatonino gamybos fermentu ir dažniausiai esama akies tinklainėje ir kankorėžinėje liaukoje [2,10]. Žmogaus organizme melatonino kiekis pradeda augti nuo 19.00 iki 23.00 valandos, ir savo pastovų piką pasiekia 02.00 – 04.00 valandą [1]. Dieną regos informacija nuo tinklainės per regos nervą patenka į priešchiazminius branduolius. Signalas keliauja toliau iki kankorėžinės liaukos. O naktį, kada dauguma priešchiazminio branduolio neuronų neišsikrauna, nervinės galūnės išskiria nordadrenaliną, kuris yra tiesioginis melatonino biosintezės dirgiklis. Jis aktyvina pinealocitu membranoje esančius α ir β adrenoreceptorius. α Adenoreceptoriaus stimuliacijos ląstelėse pasekmė – kalcio koncentracijos padidėjimas, β adenoreceptoriaus stimuliacijos ląstelėse pasekmė – kalcio/calmoduliono protein kinazės suaktyvinimas. Minėtų veikslių dėka pinealocitose smarkiai išaugo (žiurkių ląstelėse 100 kartų) ląstelinis atliekančio antrinio nešiklio funkciją cAMP lygis. Nuo cAMP priklauso protein kinazė fosforilina serotonin N-acetil transferazę, ir fermentas tampa katalitiškai aktyvus. Esant mažam cAMP lygiui pinealocitose, serotonin N-acetil transferazė būna neaktyvi [9-14].

Šviesa laikoma pagrindiniu melatonino gamybos veiksnium: nakties metu prie šviesos staigiai sumažėja serotonin N-acetil transferazės aktyvumas, taip pat sumažėja melatonino ir pagrindinio melatonino katabolizmo produkto, 6-sulfoksimeletonino, kiekiai. Melatonino

katabolizmo procesas vyksta kepenyse, o nagrinėjamo hormono gyvavimo pusperiodis nuo 20 iki 60 minučių [15-17]. Siekiant iširti kaip šviesa inhibuoja melatonino gamybą, buvo atlikti tyrimai, kurių rezultatai yra išsamiai išnagrinėti šiame darbe.

Metų laikas, žmogaus amžius bei mitybos įpročiai įtakoja melatonino gamybą. Kadangi dienos trukmė priklauso nuo sezoniškumo, metų laikas gali įtakoti melatonino gamybą. Iš pradžių šis efektas buvo nustatytas tik gyvūnams, tačiau vėliau panašūs rezultatai buvo pastebėti ir pas žmones [18],[19]. Japonų mokslininkas Ueno-Towatari nagrinėjo melatonino pokytį metų bėgyje pas jaunas moteris ir gavo tokius rezultatus: žiemą – $15,8 \pm 8,18$ pg melatonino 1 ml kraujo plazmos; pavasarį - $15,2 \pm 3,3$ pg melatonino 1 ml kraujo plazmos; vasarą – $21,4 \pm 10,5$ pg melatonino 1 ml kraujo plazmos; rudenį – $97,6 \pm 67,5$ pg melatonino 1 ml kraujo plazmos. Gautų tyrimo rezultatai leidžia drąsiai teigti, kad trumpėjant dienai ir ilgėjant naktčiai melatonino gamybos procesas greitėja [20]. Reikia atkreipti dėmesį, kad šie rezultatai tinka Japonijos laiko juostai.

Melatonino gamyba prasideda iškart po žmogaus gimimo. Jau 5-12 savaičių sveiko vaiko šlapime galima aptikti 6-sulfoksimelatoniną. Didžiausias melatonino kiekis aptinkamas nuo vieno iki trijų metų vaiko organizme. Iki 21 metų žmogaus organizme melatonino koncentracija sumažėja iki 80 procentų, ką dauguma mokslininkų aiškina pastoviu melatonino kiekiu, augant žmogaus kūnui [21]. Yra daug duomenų, kad su amžium po paauglystės melatonino koncentracija ir toliau mažėja, kas yra siejama su senatve [1,22]. Kai kurie mokslininkai siūlo naudoti melatonino koncentraciją, kaip organizmo amžiaus (senatvės) rodiklį.

Vitaminas B6, folio rūgštys ir triptofanas reikalingi melatonino gamybai, kas įrodo, kad nagrinėjamo hormono gamybos procesas priklauso nuo maisto medžiagų[23].

2.1.2. Melatonino fiziologinė reikšmė

Melatoninas turi 4 skirtingus veikimo mechanizmus:

1. Jungiasi prie ląstelės membranų receptorių.
2. Jungiasi prie branduolio receptorių.
3. Jungiasi ląstelės viduje prie kalmodulino.
4. Antioksidacinis aktyvumas.

Po jungimosi melatoninas tiesiogiai arba netiesiogiai (per antrinius nešiklius) sukelia ląstelėse/organuose pokyčius ir tokiu būdu atlieka savo fiziologinę vaidmenį [24].

Melatoninas vaidina žinduolių organizme labai svarbų vaidmenį:

- Reguliuoja paros bei sezono bioritmus [25].

- Reguliuoja gonadotropinų sekreciją, slopindamas ląstelių, sintetinančių juos, fermentinį aktyvumą. Taip pat reguliuoja lytinių liaukų aktyvumą, slopindamas gonadoliberino sekreciją. Gonadotropinas – folitotropinas, liotropinas ir gliukoproteinai, kuriuos išskiria moterų ir vyrų adenohipofizės gonadotrofai: vyrų organizme jie išskiriami nuolat, o moterų – periodiškai ir daug didesniais kiekiais. Gonadotropinai reguliuoja gametogenezę ir spermogenezę lytinėse liaukose [8,25].
- Kankorėžinė liauka per melatoniną reguliuoja kitų endokrinių liaukų aktyvumą ir organizmo medžiagų apykaitą dienos ir nakties kaitos metu. Ji padeda organizmui prisitaikyti prie besikeičiančių aplinkos sąlygų [2].
- Mažina smegenų bioelektrinį ir funkcinį aktyvumą, sukeldamas lengvą euforiją, mieguistumą, veikia raminančiai, mažina skausmo jautumą.
- Mažina tiroidinių, antinksčių hormonų bei somatotropino sekreciją.
- Antioksidacinis apsauginis poveikis: veikia kaip aktyvus deguonies radikalų gaudytojas. Dėl savo antioksidacinių savybių melatoninas sumažina kai kurių Parkinsono ligos tipų žalą, gali sustabdyti širdies aritmiją.
- Melatoninas turi sisteminį poveikį citoskeletui (per kalmoduliną kaip jo antagonistas) ir azoto oksido gamybai (slopina azoto oksido sintezę).
- Melatonino sumažėjimas sukelia depresiją.
- Melatonino sumažėjimas skatina priešlaikinį lytinį brendimą.
- Melatoninas yra svarbus imuninei sistemai [1,2].

2.1.3. Melatonino terapinis taikymas

Klinikiniai tyrimai ir ryšys tarp melatonino ir kai kurių ligų parodo melatonino terapinį potencialą. Melatoninas, kaip vaistas, buvo pradėtas naudoti visai neseniai ir, laikui bėgant, jo panaudojimas gali padidėti. Tai patvirtino mokslininkų susidomėjimas melatoninu kaip terapiniu agentu. Šiuo metu vyksta daug melatonino terapinio potencialo tyrimų ir, jiems pasibaigus, hormonas gali būti taikomas dažniau [26].

Melatoninas, kaip vaistinis preparatas, gali būti taikomas šiais atvejais:

- ✓ Miego sutrikimai.

Tyrimai [27,28] parodė, kad yra ryšys tarp miego sutrikimo, kankorėžinės liaukos funkcijos ir melatonino lygio. Sumažėjus naktiniam melatonino lygiui, pablogėjo ir miego kokybė [27]. Tai patvirtino vyresnio amžiaus žmonių grupės, kur aptinkamas ryšys tarp

melatonino kiekio sumažėjimo ir miego kokybės pablogėjimo [26]. Kontroliniai klinikiniai tyrimai patvirtino, kad melatonino naudojimas pašalina miego sutrikimus.

- ✓ Paros ritmo sutrikimai, atsiradę dėl laiko zonos pokyčio (išvykstant į kitą šalį).

Melatoninas gali sureguliuoti biologinių ritmų pakitimus, atsiradusius dėl greito normalaus šviesos-tamsos paros pokyčio. Svarbu pažymėti, kad melatoninas kur kas efektyviau sureguliuoja sutrikimus (miego sutrikimai, nuovargis, protinis nuovargis), jeigu jis buvo panaudotas tarp 22.00 ir 24.00 valandos ir jau įvykus kelionei. Melatoniną reikia naudoti tik po kelionės, nes melatoninas panaudotas prieš kelionę tik pablogino situaciją [29].

- ✓ Nemiga.

Naktinis melatonino kiekis sumažėja, esant pirminei nemigai. Papildomai naudojamas melatoninas veikia kaip migdomasis. Vartojant melatoniną 22.00 valandą, užmiego trukmė sumažėja apie 1,5 valandą, taip pat 30 minučių sumažėja miego trukmė t.y. sumažėjus miego trukmė, padidėja miego kokybė [30].

- ✓ Narkolepsija.

Narkolepsija – tai neurologinis sutrikimas, pažeidžiantis miego ir budrumo kontrolę. Jis yra labai didelio mieguistumo dieną priežastis. Žmonės, kuriems šis sutrikimas pasireiškia, gali nevalingai užmigti dienos metu. Melatoninas gali veikti kaip miego reguliatorius esant narkolepsijai, kai miego metu sumažėja REM (greitas akių judėjimas) stadija. REM sutrikimai pastebėti žmonėms ir gyvūnams, pašalinant jiems kankorėžinę liauką. Papildomai naudojant melatoniną, patikimai padidėja REM laikas sergantiems narkolepsija ir pagerėja subjektyvus svajonių fenomenas [31]. Taip pat pastebėta, kad melatoninas teigiamai veikia miego metu, nepažeidžiant atminties, skirtingai nuo benzodiazepano [32].

- ✓ Vaikų miego sutrikimai.

Melatoninas sėkmingai naudojamas esant vaikų miego sutrikimams, dėl kurių vaikai tampa labai aktyvūs ir jų neurologinė būklė sukelia pavojų. Melatoninas greitai nuramino ir pagerino miego kokybę visiems, eksperimente dalyvavusiems, vaikams, be pašalinių efektų. Pagerėjo jų bendravimas, vystymasis, sumažėjo irzlumas [33].

- ✓ Smegenų funkcijos, neuropsichiatrija ir elgesys.

Yra nuomonių, kad kankorėžinė liauka yra “raminantis organas“, kuri veikdama per melatoniną, palaiko organizme homeostatinę pusiausvyrą. Melatoninas stabilizuoja elektrinį

aktyvumą centrinėje nervų sistemoje. Pašalinus kankorėžinę liauką, gyvūnams padažnėja priepuoliai. Melatoninas taip pat turi antikonvulsinį aktyvumą epilepsijos metu. Melatoninas gali slopinti priepuolius, kuriuos sukelia glutamatas, N-metil-D-aspartatas, cianidas, geležies chloridas, tačiau melatoninas neįtakoja pentilenertazolio sukeltų epilepsinių priepuolių. Pastebėta, kad pacientai, sergantys sunkia epilepsija, turi sumažėjusį melatonino kiekį. Eksperimentas su vaikais, sergančiais sunkia epilepsijos forma, parodė labai gerus rezultatus, bet melatoninas nėra rekomenduojamas naudoti, esant kitoms epilepsijos formoms [26].

✓ Depresija.

Depresijos metu yra sutrikusi melatonino sintezė. Pas žmones kenčiančiu nuo sunkios depresijos, naktinis melatonino lygis yra žemas. Priešingai, hiperaktyvūs žmonės turi padidėjusį melatonino lygį. Svarbu yra tai, kad taikant melatoniną sergantiems depresija, jų melatonino lygis po gydymo atitinka sveikų žmonių normą [26].

✓ Širdies kraujagyslių sistema.

Dėl antioksidacinių savybių, melatoninas turi terapinį poveikį, sergant širdies ligomis. Tai patvirtino eksperimentiniai modeliai širdies miokardo ir išemijos atveju. Melatonino naudojimas prailgino gyvenimą, sumažino infarkto dydį. Melatonino poveikyje tapo retesnis širdies dažnis tachikardijos atveju [26].

Melatoninas gali sumažinti cholesterolio kiekį, kraujo spaudimą ir katecholamino kiekį. Paskutinis melatonino-širdies ryšio įrodymas yra tas, kad, ištyrus 5X širdies sindromo pacientus, jų naktinė melatonino norma buvo patikimai sumažėjusi [26].

✓ Virškinimo trakto sistema.

Melatonino terapinis poveikis virškinimo sistemai buvo pastebėtas keliuose laboratorijose, tiriančiose skrandžio opos modelius. Šis poveikis taip pat susijęs su antioksidaciniu melatonino efektu. Melatoninas gali būti papildomai naudojamas, esant diarėjai [26].

✓ Inkstų ligos.

Melatoninas, kaip antioksidantas, turi terapinį poveikį esant inkstų ligoms. Tai patvirtino eksperimentas, kai inkstų veiklos sutrikimus sukelia glicerolis [26].

2.1.4. Melatoninas ir vėžys

Sąsają tarp melatonino ir vėžio ligos, rodo tas faktas, kad per paskutinius 100 metų labai padidėjo elektros šviesos panaudojimas ir vėžinių susirgimų skaičius: netgi buvo sukurtas specialus terminas “šviesos užterštumas“ [41]. Miegant naktį prie šviesos, sutrinka melatonino sintezė, kas stimuliuoja vėžinius susirgimus. Buvo atlikti tyrimai, kurie patvirtina šį faktą. Gyvūnams papildomai leidžiant melatoniną, inhibuojamas auglio augimas, kuris buvo dirbtinai stimuliuotas, pašalinus kankorėžinę liauką arba inhibuojant melatonino sintezę (esant pastoviam apšvietimui) [42]. Kankorėžinės liaukos pašalinimas stimuliuoja, o melatoninas sustabdo auglių augimą arba metastazes prie tam tikrų vėžio formų – kepenų, plaučių, hipofizės, prostatų, melanomų ir leukemijos [42]. Vertingi tyrimų rezultatai buvo gauti taikant melatoniną prieš krūtinės, tiesiosios žarnos ir prostatos vėžio formas.

- Krūtinės vėžys.

Klinikiniai tyrimai rodo melatonino reikšmę prevencijos metu ir gydant krūtinės vėžį [34]. Pavyzdžiui, melatonino koncentracija ligoniams 50% mažesnė palyginus su sveikais žmonėmis. Ligonų rytiniame šlapime buvo rastas aukštas melatonino lygis, kas parodo, jog melatonino sintezė yra sutrikusi [35]. Melatoninas įtakoja estrogeno receptorių sumažėjimą, tokiu būdu stabdydamas vėžio augimą. Tai leidžia daryti prielaidą, kad melatoninas yra “natūralus antiestrogenas”. Be to, veikdamas kartu su tretinoinu, leidžia sumažinti tretinoino dozę ir išvengti sukeliančių tretinoino pašalinių efektų [36]. Melatonino molekuliniai mechanizmai tampa daugiau aiškesni. Jis pakeičia forskulino ir cAMP lygius į 43% ir 57%, tokiu būdu, veikiant transdukcijos signalo mechanizmus žmogaus krūtinės vėžio ląstelėse [26].

- Prostatos ir tiesiosios žarnos vėžys.

Melatonino kiekio sumažėjimas (66% palyginus su sveikais žmonėmis) aptiktas pacientams, sergantiems prostatos vėžiu. Ta pati tendencija pastebėta ir tiesiosios žarnos vėžio atveju [37]. Prostatinėje karcinomoje melatoninas sąveikauja su androgeno receptoriais ir įtakoja viduląstelinius pokyčius, bet melatoninas neįtakoja ląstelės augimo, jeigu nėra dihidrotesterono [38]. Atliekant melatonino injekcijas, labai svarbus laikas. Jeigu melatonino injekcija daroma ryte – tai stimuliuoja auglio augimą, dieną – neturi efekto, vakare – sustabdo augimą [26].

- Melatoninas ir oksidacinis stresas.

Oksidacinis stresas – tai procesas, kurio metu susidarę laisvieji radikalai atakuoja ląsteles ir sukelia dažnai negrįžtamus pakitimus. Laisvieji deguonies radikalai – tai deguonies atomai, susidarantys oksidacijos-redukcijos reakcijų metu. Laisvieji radikalai skirstomi į

deguonies radikalus, azoto radikalus ir tiolio radikalus, ir dažniausiai jie atsiranda mitochondrijose, vykstant kvėpavimo grandinės elektronų pernašos reakcijoms. Savo išoriniame sluoksnyje laisvieji radikalai turi vieną nesuporuotą elektroną ir yra labai kenksmingi. Jie reaguoja su ląstelių membrana, kuri yra labai jautri laisviesiems radikalams. Be to, jie pažeidžia lipidus, baltymus ir genetinę medžiagą – dezoksiribonukleino rūgštį (DNR), gali sukelti joje mutacijas, kurios ateityje gali tapti vėžio priežastimi. Taip pat pakeičia ląstelės fiziologinius procesus. Esant normalioms sąlygoms, laisvųjų radikalų kiekis būna nedidelis, ką neutralizuoja ląstelės antioksidacinė sistema (katalazė, superoksidazė, glutationas ir kiti). Dėl įvairių priežasčių sutrikus organizmo veiklai atsiranda mitochondrijos kvėpavimo sistemos sutrikimai, padidėja ne tik riebalų rūgščių koncentracija mitochondrijose, bet ir laisvųjų radikalų skaičius. Pavojingiausiu radikalų, nuodijančiu organizmą, laikomas peroksinitrilas, kuris atsiranda reaguojant azoto monooksido radikalui su superoksidu. Peroksinitrilas pažeidžia baltymus, lipidus ir DNR, sukeldamas ląstelių nekrozę arba apoptozę. Taip pat jis aktyvina transkripcijos faktorius, kurie sukelia prouždegiminių citokinų produkciją (navikų nekrozės faktorių α (TNF α) ir interleukiną 1 β (IL1 β)). Molekulės, sugebančios neutralizuoti superoksidą ir peroksinitrolą, yra labai svarbios ląstelės gynybai [39,40].

Melatoninas stiprus antioksidantas [41], sugebantį reaguoti ne tik su deguonies, bet ir su azoto radikalais. Reaguojant su peroksinitrilu susidaro 1-nitromelatoninas [40]. Melatoninas yra pranašesnis už kitus antioksidantus nes:

- Vienintelis kuris gali pašalinti “velnio trikampį“ (superoksidą, azoto monooksidą ir peroksinitrilą [42,43].
- Neturi anatominių blokuojančių jo difuziją barjerų [44].
- Jo antioksidacinė jėga žymiai stipresnė už vitamino C ir E, ir 5-15 kartų stipresnė už glutationą [40].
- Dauguma antioksidantų po elektrono atidavimo, naudoja glutationą elektrono redukcijai. Melatoninas neturi poveikio glutationo koncentracijai, kadangi hormonas degraduoja iškart po oksidacijos [45].

Melatoninas gerina ląstelės gynybos mechanizmą – aktyvina antioksidacinius fermentus ir slopina oksidacinius. Hormonas apsaugo branduolio ir mitochondrijos DNR nuo pažeidimo, esant jonizuojančiai spinduliuotei arba kancerogeninėms medžiagoms, kas buvo aptikta išmatavus DNR oksidacinės degradacijos markerį – 8-hidroksi-2'-deoksiganosiną.

Šalinant iš ląstelės peroksinitrilą, melatoninas blokuoja prouždegiminių citokinų gamybą (TNF α ir IL1 β), t.y. tokiu būdu blokuoja šalutines uždegimines reakcijas [39].

2.1.5. Melatonino vieta pagal hormonų klasifikaciją

Melatoninas, pagal veikimo poveikį, priskiriamas hormonų klasei. Hormonai yra medžiagos, kurių mažą kiekį išskiria ląstelės, juos perneša kraujas iki ląstelių taikinių, kuriuose reguliuoja metabolizmą, ląstelių bei audinių augimą, širdies susitraukimo dažnį, kraujospūdį, inkstų funkciją, virškinamojo kanalo peristaltiką, laktaciją ir reprodukcinės sistemos aktyvumą [46].

Hormonams būdingi tam tikri biologinio poveikio ypatumai:

1. Endokrininės liaukos ir jų išskiriami hormonai sudaro vieningą sistemą, kurią reguliuoja tiesioginis ir grįžtamasis ryšiai.
2. Hormonams būdingas didelis biologinis aktyvumas: veiklios mažos jų koncentracijos (10^{-6} - 10^{-9} mol/l).
3. Hormonai reguliuoja medžiagų apykaitą, keisdami fermentų kiekį, jų aktyvumą arba membranų laidumą jonams ir mažoms molekulėms ląstelėse taikiniuose.
4. Hormonai biologiškai veikia per receptorius – specifinius baltymus, esančius ląstelės viduje arba membranose.
5. Hormonams būdingas absoliutus specifiskumas, t.y. vienas hormonas negali būti pakeistas kitu [46].

Terminą “hormonas“ (gr. horman – sukelti, sužadinti) 1905 metais pirmą kartą pavartojo anglų mokslininkas E.H. Starlingas. Atsižvelgiant į atstumą, kurį hormonams reikia įveikti nuo sintezės vietos iki ląstelės taikinio, hormonai gali būti skirstomi į endokrininius, parakrininius ir autokrininius. Endokrininiai hormonai yra medžiagos, kurios sintetamos viename audinyje arba liaukoje, pernešamos dideliu atstumu per kraują ir sąveikauja su specifiniais receptoriais ląstelėse taikiniuose. Parakrininiai hormonai išskiriami iš ląstelių, pernešami santykinai nedideliu atstumu ir sąveikauja su kaimyninių ląstelių specifiniais receptoriais. Autokrininius hormonus išskiria ląstelės, turinčios specifinius receptorius šiems. Šie hormonai sąveikauja su juos išskyrusiomis ląstelėmis, taip pat gali sąveikauti su kaimyninėmis ląstelėmis, jei jose yra receptorių. Melatoninas – endokrininis, parakrininis ir autokrininis hormonas [46].

Atsižvelgiant į cheminę struktūrą, hormonai skirstomi į tris klases:

1. Aminorūgščių darinius.
2. Peptidus ir baltymus.
3. Steroidus.

Melatoninas priklauso aminorūgščių dariniams [46].

2.2. Melatonino receptoriai

Tarpląstelinės signalinės molekulės – neorganinės ir organinės molekulės, kuriomis ląstelės bendrauja. Jiems priklauso – hormonai, eikozanoidai, neurosiuntikliai, citokinai. Kiekviena ląstelė turi savitus baltymus, atrankiai pažįstančius ir sąveikaujančius su tarpląstelinėmis signalinėmis molekulėmis. Šie baltymai vadinami receptoriais. Pagrindinė receptorių funkcija – tarpląstelinius signalus paversti viduląstelinių procesų grandine. Atsižvelgiant į padėtį ląstelėje, receptoriai skirstomi į membranos ir viduląstelinius (branduolio) receptorius.

Branduolio receptoriai – tai viduląsteliniai baltymai, savitai sąveikaujantys su lipofilinėmis molekulėmis, prasiskverbiančiomis į citozolį. Stuburinių gyvūnų ląstelėse žinoma per 60 branduolio receptorių šeimos baltymų. Visi jie yra neaktyvinti transkripcijos veiksniai. Jų yra citozolyje ir branduolyje. Hormono prisijungimas sukelia receptorių dimerizaciją ir pernašą į branduolį arba aktyvina ant DNR esančių receptorių transkripcinį aktyvumą. Visi branduolio receptoriai signalus perduoda keisdami genų raišką.

Membranos receptoriai – tai receptoriai, esantys plazminėje membranoje ir ją kertantys nuo vieno iki kelių kartų. Jiems būdingas išoriniai domenai, reikalingi sąveikai su ligandu, ir vidiniai domenai, svarbūs ryšiams su viduląsteliniais signalo tarpininkais sudaryti. Atsižvelgiant į signalo perdavimo būdus į ląstelės vidų, membranos receptoriai toliau skirstomi į **jonotropinius** ir **metabotropinius**. **Jonotropiniai** receptoriai signalus perduoda keisdami jonų srautą pro plazminę membraną. Šiai receptorių grupei priklauso jonų kanalai. **Metabotropiniai** receptoriai signalus perduoda keisdami citozolinių baltymų fermentinį aktyvumą [47].

Melatonino receptoriai aptinkami įvairių rūšių imuninės sistemos audiniuose ir ląstelėse. Tai patvirtina melatonino vaidmenį imuninėje sistemoje [48]. Melatonino receptoriai yra ląstelės membranoje, branduolio ir mitochondrijos membranoje [49]. Jie randami žmogaus T limfocituose, granulocituose, neutrofiluose, pelių bei žiurkių blužnyse ir čiobrialiaukose, taip pat pelių makrofaguose. Žiurkių čiobrialaukėje yra MT1 receptoriai aptikti visu limfocitų subpopuliacijose (CD4+, CD8+, CD4+CD8+, CD4-CD8-, B limfocituose) [24,50].

2.2.1. Ląstelės membranos melatonino receptoriai

Melatoninas turi trijų tipų receptorius, esančius ląstelių membranose. Melatonino membranos receptoriai MT1 ir MT2 priklauso GPCR šeimai [1]. Ši signalus priimanti ir perduodanti sistema sudaryta iš trijų pagrindinių dalių:

1. Ląstelių paviršiaus receptoriaus, kurio sudėtyje yra septyni, membraną perveriantys, segmentai.

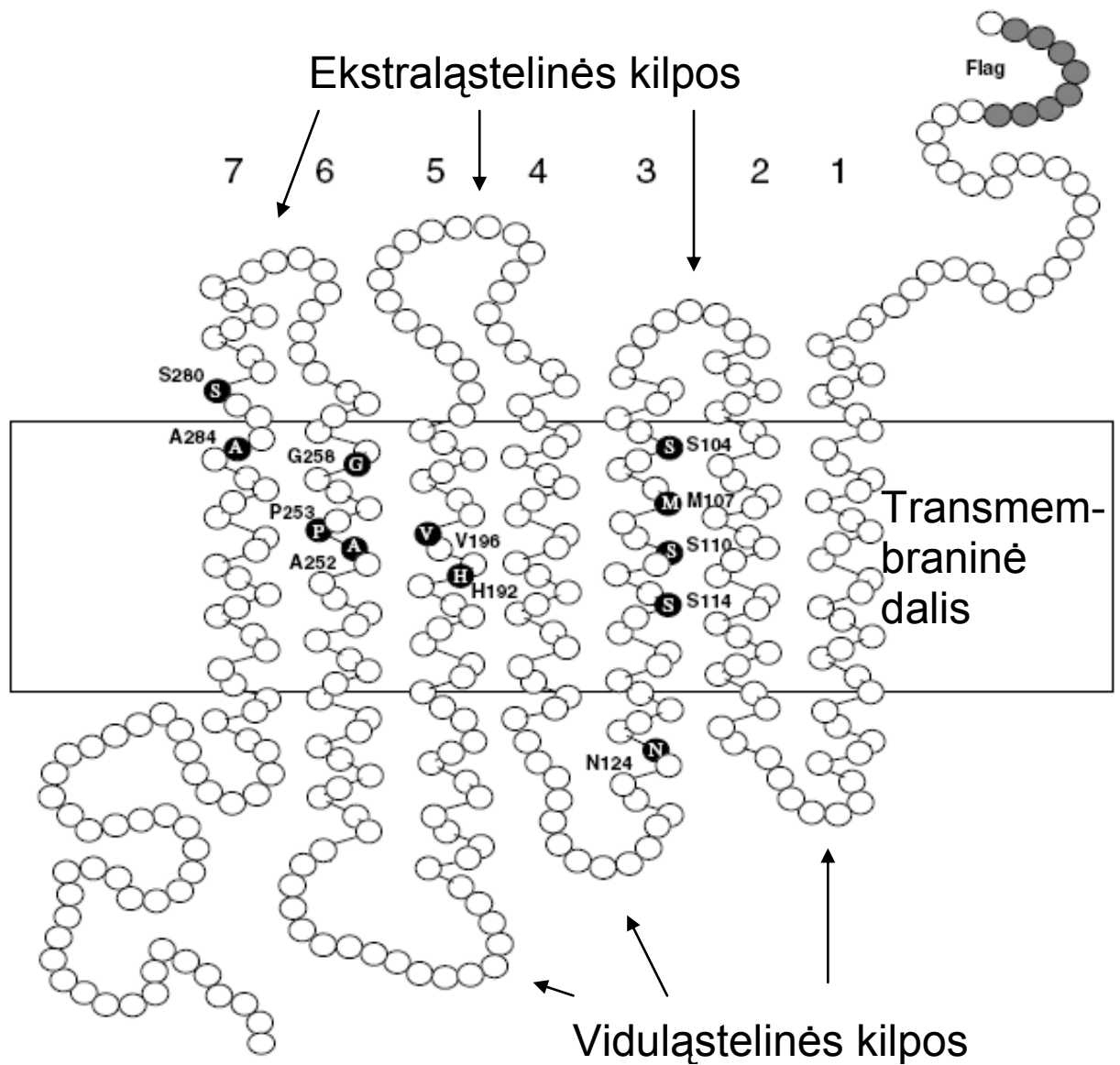
2. Su receptoriumi susijusio, guanidino nukleotidus prijungiančio, heterotrimerinio G baltymo ir mažųjų G baltymų.

3. Antrinių informacijos nešėją gaminančio signalo viduląstelinio priėmėjo.

MT1 receptoriaus struktūra pavaizduota 2 paveiksle. Paveiksle pažymėta transmembraninė dalis, ekstraląstelinės ir viduląstelinės kilpos GPCR buvo aptiktas kaip monomeras, bet paskutiniai duomenys rodo, kad dažniausiai jis veikia kaip dimeras arba oligomeras. Tokioje būsenoje jis būna aktyvesnis. Eksperimentai parodė, kad prie oligomero, kuris sudarytas iš MT1 ir MT2, melatoninas jungiasi šimtą kartų aktyviau negu prie monomero MT2. Melatoninas jungiasi prie GPCR šešto segmento [32].

Daugiausia MT1 tipo receptorių yra hipofizyje ir priešchiazminiuose branduoliuose, o MT2 – tinklainėje. MT1 receptoriaus dydis – 350 aminorūgščių, o MT2 receptoriaus – 362 aminorūgštis. Jų funkcijoms nustatyti naudojamos dvejų tipų melatonino receptorių ligandai: luzindolas ir 4-P-PDOT. Luzindolas nėra selektyvus MT1 arba MT2, bet jo afiniškumas MT2 yra 15-26 kartus didesnis negu MT1. 4P-PDOT yra selektyvus MT2 receptoriaus ligandas, ir jo afiniškumas MT2 yra 300 kartų didesnis negu MT1. Luzindolas ir 4P-PDOT yra MT2 receptoriaus antagonistai [51].

Trečias membranos receptorių MT3 nepriklauso GPCR šeimai. Daugiausiai jo būna tinklainėje. Tai receptorinis fermentas, kuris grįžtamai katalizuoja NADH ir NADPH oksidaciją chinonais. Fermento poveikį stabdo kofeinas. Pagrindinės membranos receptorių funkcijos ir savybės pateiktos lentelėje Nr. 1 [24,32,51-57].



2 paveikslas. MT1 melatonīna receptora struktūra [51].

1 Lentelė. Ląstelės membranos melatonino receptoriai

Membranoje esantys melatonino receptoriai			
Pavadinimas	MT1 (Mel 1a)	MT2 (Mel 1b)	MT3 (quinone reductase2)
Ekspresija	Smegenys, širdis, inkstai, centrinė nervų sistema, plaučiai, žmogaus prostata, periferiniai audiniai, žiurkių kasa.	Žmogaus ir pelių smegenys bei plaučiai, žiurkės kasa, inkstai, pelių centrinė nervų sistema.	Žiurkėno inkstai. Žiurkėnų, pelių, šuns, beždžionių: kepenys, smegenys, širdis.
Ekspresija imuninėje sistemoje	Pelių, žiurkių blužnis ir čiobrialiaukė, T limfocitai.	Pelių, žiurkių blužnis ir čiobrialiaukė.	Silpna ekspresija aptikta blužnyje.
Funkcijos	Dalyvauja centrinės nervų sistemos reguliavime. Sustabdo prostaglandino E2 poveikį, kuris blokuoja IL-2 gamybą limfocituose. Mažina insulino sekreciją bei didina leptino produkciją. Mažina kortisolio ir testosterono gamybą. Slopina vėžinių ląstelių proliferaciją. Skatina vazokonstrukciją.	Blokuoja dopamino patekimą į tinklainę, sukeltą vazodiliaciją (kraujagyslių išplatėjimą). Skatina blužnies ląstelių proliferaciją, mažina limfocitų migravimą. Slopina vėžinių ląstelių proliferaciją.	Mažina leukocitų adheziją.
Signalų perdavimas	Per G baltymą, kalcio – kalmodulino kelią, per kalio jono kanalą ir cAMP priklausomus kelius.	Per G baltymą.	Nežinomas.
Jeigu priklauso GPCR, su kokiais G baltymais sąveikauja	Su Cq, G13, G14, G16, Gi2, Gi3 Cq/11 baltymais.	Su Gi, Go, Gz, G12, G14 baltymais.	Nepriklauso.
Ypatybės	Šių receptorių turi visi žinduoliai, taip pat ir žmogus.	Receptorius MT ₂ ne pas visus žinduolius egzistuoja kaip funkcionalus receptorius. Pvz., avis visai neturi šio receptoriaus geno, bet palaiko sezoninius ir cirkadinius ritmus.	Tai fermentas, kuris grįžtamai katalizuoja NADH ir NADPH oksidaciją chinonais. Fermento poveikį stabdo kofeinas.

Lentelė sudaryta pagal: [24,32,51-57]

2.2.3. Branduolio membranos melatonino receptoriai.

Pirmą kartą melatonino receptorių vietą branduolyje aptiko Liu ir Pangas 1993 metais. Fabricus homogeniniame preparate 50% melatonino sujungimo vietų aptikta branduolyje ir tik 15% membranoje. Po metų, Rafii-El Idrissi ir kolegos aprašė branduolio receptorių žiurkės blužnyje ir čiobrialiaukėje [1].

Melatonino branduolio receptoriai tai yra RZR/ROR receptorių klasė, kurią sudaro trijų genų produktai:

- ROR α (yra keli skirtingi variantai ROR α 1, ROR α 2, ROR α 3, ROR α) – šie receptoriai aptinkami smegenyse, kepenyse, odoje, širdyje, inkstuose, plaučiuose, čiobrialiaukėje, blužnyje [24].

ROR α 1 ir ROR α 2 atlieka tam tikra vaidmenį imuninėje sistemoje.

- RZR β - šis receptorių randamas neuroendokrininėje ir limfinėje sistemose.
- ROR γ – skeleto raumenyse, kepenyse, inkstuose, čiobrialiaukėje (T limfocituose).

Pagrindinės funkcijos – gerina IL-2, IL-6, ir IFN γ produkciją T_H ląstelėse [58].

Anksčiau egzistavo nuomonė, kad melatoninas turi veikią imuninę sistemą tik per membranos receptorių. Tačiau, pastaruoju metu vis daugėja įrodymų, kad šis teiginys klaidingas. Liu su kolegom įrodė, kad pelių čiobrialiaukėje daugiau branduolinių receptorių melatoninui negu membranos receptorių. Vėliau buvo aptikti žiurkių čiobrialiaukės ir blužnies branduoliniai melatonino receptoriai. Eksperimentuose buvo pradėtos naudoti branduolinių receptorių agonistai – CGP 52608 ir CGP 55644. Žmogaus kraujo ląstelėse aptiktos MT1 ir ROR α 1 ir ROR α 2 receptoriai. Pridėjus prie žmogaus kraujo ląstelių branduolinio receptoriaus agonisto, pastarasis sukelia stimuliuojantį efektą IL-2 ir IL-6. Tuo tarpu, MT1 agonistas nesugebėjo paskatinti IL-2 ir IL-6 gamybą. Panašūs rezultatai buvo aptikti ir su JURKAT ląstelėmis. Yra ir kitokių įrodymų, kad MT1 ir branduolinių ląstelių receptorių agonistai turi sinergetinį poveikį IL-6 gamybai. Vėliau Carrillo-Vico su kolegom parodė, kad priklausomai nuo ląstelės fiziologinės būklės melatoninas gali skatinti IL-2 gamybą per membranas arba per branduolio receptorių, arba jei per juos abudu [24]. Visi pateikti įrodymai parodo, kad melatoninas veikia imuninę sistemą ir per membranas ir per branduolių receptorių. Ateities eksperimentai padės geriau suprasti dominančio proceso veikimo mechanizmus.

2.3. Melatoninas ir imuninė sistema

Imunitetas – tai organizmo apsaugos būdas, kurio pagrindinė užduotis – išsaugoti organizmo vidinę homeostazę, apginti nuo visko, kas jam genetiškai svetima. Imuniteto veiklos pagrindas – atpažinti „sava“ ir „svetimą“. Šią užduotį atlieka speciali imuninė sistema, sauganti organizmą nuo mikroorganizmų, virusų, parazitų, persodintų svetimų audinių, ląstelių bei kitų genetiškai svetimų medžiagų – antigenų. Imuninė sistema pašalina mirusias ir pakitusias organizmo ląsteles, saugo nuo vėžio. Sveikas organizmas nuo mikroorganizmų ir svetimų aplinkos makromolekulių ginasi įvairiais būdais. Vienus apsigynimo mechanizmus jis turi dar prieš kontaktuodamas su patogenais. Šis apsaugos mechanizmas vadinasi įgimtu, arba nespecifiniu, imunitetu. Kiti apsaugos mechanizmai pradeda veikti tik organizmui kontaktavus su svetimomis medžiagomis ir yra toms makromolekulėms specifiniai. Tai įgytas, arba specifinis, imunitetas. Jis yra svarbus apsaugos nuo svetimų medžiagų komponentas. Kad jis būtų efektyvus, įvairios ląstelės ir makromolekulės turi veikti kartu, o svetimiems antigenams pašalinti jis pasitelkia ir įgimto imuninio atsako mechanizmais [59].

Surinkta nemažai įrodymų, kurie teigia, kad melatoninas turi kaip teigiamą, taip ir neigiamą poveikį imuninei sistemai. Kai kurie mokslininkai mano, kad melatoninas yra pagrindinis imuninės sistemos reguliatorius ir tam turi pagrindą.

Pagrindiniai įrodymai, kad melatoninas gali įtakoti imuninę sistemą, būtų šie:

1. melatonino sintezės sustabdymo įtaka imuninės sistemos organams ir ląstelėms;
2. melatonino poveikis monocitams/makrofagams ir granulocitams;
3. melatonino poveikis T , B , ir NK ląstelėms.

2.3.1. Melatonino veiklos tyrimo metodai. Melatonino sintezės sustabdymas

Melatonino reikšmė organizmui (*in vivo*) tiriama 2 būdais: tai papildomas melatonino įvedimas į organizmą (injekcijomis (arba injekcijų pagalba) ar oraliniu būdu) ir melatonino sintezės stabdymas. Melatonino sintezę sustabdyti galima trimis būdais: pašalinus kankorėžinę liauką, laikant gyvūnus prie pastovaus apšvietimo ir veikiant propranololiu (melatonino sintezės inhibitorius).

Pašalinus kankorėžinę liauką, įvyksta tokie pokyčiai:

- **Imuninės sistemos organų dydžio pakitimai:** Sumažėja masė pagrindinių imuninės sistemos organų – čiobrialiaukės, blužnies, limfinių mazgų pelėse, žiurkėse ir žiurkėnuose [48,60].
- **Imuninės sistemos organų struktūros pakitimai:**
 - Atsiranda čiobrialiaukės disorganizacija [48].
 - Blužnyje sumažėja gemalinių centrų skaičius [60].
 - Limfiniuose mazguose - folikulų skaičiaus sumažėjimas B ląstelių zonoje ir bendras limfocitų sumažėjimas. Kortikalinėje srityje (B limfocitų zona) lieka tik pirminiai folikulai, o parakortikalinėje srityje (T limfocitų zona) sumažėja bendras limfocitų skaičius [60].
- **Ląstelių kiekio pakitimai:** limfocitų skaičiaus sumažėjimas BALB/c linijos pelių čiobrialiaukėje [60].
- **Citokinių sekrecijos pakitimai:** IL-2 produkcijos sumažėjimas [60].
- **Ląstelių aktyvacijos ir funkcijų pakitimas:**
 - Sutrinka B ląstelių aktyvavimas ir antikūnų susidarymas.
 - BALB/c linijos pelių naujagimiams, pašalinus kankorėžinę liauką, tapo blogesnis nuo antikūnų priklausomas CD8⁺ T ląstelių citotoksiškumas [60].
 - Sumažėjo NK (natūralių kilerių) ląstelių aktyvumas pelėse ir žiurkėse [60].

Laikant gyvūnus prie pastovaus apšvietimo, įvyksta tokie pokyčiai:

- **Imuninės sistemos organų dydžio pakitimai:** žiurkėnams sumažėjo blužnies svoris [1].
- **Ląstelių kiekio pakitimai:**
 - Ląstelių skaičiaus sumažėjimas pelių blužnyje ir čiobrialiaukėje [1].
 - Žiurkėnams blužnyje sumažėja limfocitų bei makrofagų skaičius [1].
- **Ląstelių aktyvacijos ir funkcijų pakitimas:**
 - Pelių limfocitų reaktyvumo sumažėjimas [1].
 - Sumažėjo limfocitų proliferacija ir NK ląstelių aktyvumas [48].

Veikiant propranoliliu, buvo pastebėti tokie pokyčiai:

- Antikūnų produkcijos sumažėjimas pirminio ir antrinio imuninio atsako metu. Požymiai, atsiradę sutrikus melatonino sintezei, pranyksta papildomai leidžiant melatoniną [60].

2.3.2. Melatonino poveikis monocitams/makrofagams ir granuliocitams.

Monocitai/makrofagai tai vienabranduoliai fagocitai. Monocitai diferencijuojasi kaulų čiulpuose iš granuliocitų ir monocitų bendro pirmtako. Migravę iš kraujo į audinius, jie diferencijuojasi į specifinius audinių makrofagus. Virsdami makrofagais, monocitai gerokai pasikeičia: 5-10 kartų padidėja, sustiprėja jų sugebėjimas fagocituoti, citoplazmoje padaugėja organėlių, jie pradeda išskirynėti biologiškai aktyvias medžiagas. Makrofagai pasklindą visuose audiniuose. Pagrindinės funkcijos – atlikti fagocitozę, pateikti T limfocitams antigeną, išskirti biologiškai aktyvias medžiagas [59].

Melatoninas veikia monocitus/makrofagus taip:

➤ **Diferenciacija:**

- Stimuliuoja granuliocito-monocito pirmtakus, ir yra pagrindinis jų hemopoezės stimulatorius [60].
- Aktyvindamas monocitus pagreitina jų vartimą makrofagais (žmogaus makrofagai).

➤ **Citokinų ir NO produkcija:**

- Veikiant melatoninui, makrofagai išskiria daugiau IL-1, TNF α , M-CSF, kamieninių ląstelių faktorių (SCF) (C57BL/10 linijos pelių makrofagai) [58].
- Nėra duomenų, kad melatoninas aktyvintų pelių makrofagus išskirti IL-12.
- Padidina išskiriamą IL-1, TNF α , IL-6 produkciją ir NO kiekį, *in vitro* pirmą dieną kultivuotuose monocituose, bet 3 ir 15 dieną pokyčių nebuvo (žmogaus makrofagai).
- Makrofagai ir monocitai išskiria daugiau IL-12 (žmogaus makrofagai) [58].
- Monocitai ir makrofagai išskiria daugiau IL-12 ir NO (žmogaus makrofagai) [61].
- Statistiškai patikimai sumažina NO (azoto oksido) išskiriamą kiekį. Ir tai parodo, kad melatoninas gali veikti kaip imunoregulatorius, ne tik aktyvinti imuninę sistemą uždegimo metu, bet ją ir slopinti [60].

➤ **Antigeno prezentacija**

- Padidina MHC II molekulių ekspresiją makrofaguose (C57BL/10 linijos pelių makrofagai) [58].
- Pagerina antigeno prezentaciją T ląstelėms (C57BL/10 linijos pelių makrofagai) [58].
- Mažina kostimuliatorinių molekulių B7-1 ekspresiją, bet neturi poveikio B7-2 (BALB/c linijos pelių peritoniumo makrofagams) [1].

Neutrofilai - tai pirmosios ląstelės, atsirandančios ūminio uždegimo židinyje. Cirkuliuojančių neutrofilų migravimas į audinius vadinamas ekstravazacija. Uždegimo židinyje neutrofilai susikaupia, reaguodami į chemotaksinius veiksnius. Pagrindinis chemotaksinis neutrofilų veiksnys IL-8. Pagrindinė neutrofilų funkcija – fagocitozė. Pirminių ir antrinių granulių fermentai, reaktyvūs deguonies ir azoto junginiai fagocituotus objektus sunaikina, o jų degranuliacijos produktai pašalinami egzocitozės būdu [59].

Melatoninas veikia neutrofilus taip:

- **Diferenciacija:** stimuliuoja granulocito-monocito pirmtaką, ir yra pagrindinis jų hemopoezės stimulatorius [60].
- **Aktyvacija:**
 - Aktyvina neutrofilus [58].
 - Nedidelė melatonino dozė (10 nM) padidina neutrofilų aktyvumą, reaguojant į antigeną, o 2 mM dozė slopina neutrofilų aktyvumą [60].
- **Migracijos slopinimas:** melatoninas sumažina TNF α ir IL-8 produkciją neutrofilams [60]. Šie citokinai kartu skatino neutrofilų migraciją į uždegimo vietą.

2.3.3. Melatonino poveikis limfocitams

Limfocitai – pagrindinės specifinio imuninio atsako ląstelės, nes organizme jos vienintelės gali specifiskai atpažinti ir atskirti įvairias antigenines determinantines (epitopus). Jie lemia imuninio atsako įvairovę, specifiskumą, imuninę atmintį. Pagal funkciją ir ląstelės membranoje ekspresuojamas molekules, limfocitai skirstomi į tris populiacijas: T limfocitai, B limfocitai ir NK ląstelės.

T limfocitai skirstomi į dvi subpopuliacijas: T helperiai (CD4) ir T citotoksiniai (CD8⁺). T helperiai skirstomi į dvi subpopuliacijas: T_{H1} ir T_{H2}, kurios skiriasi sekretuojamais citokiniais. T_{H1} ląstelių sekretuojamas IFN γ aktyvina makrofagus ir aktyvina T_C limfocitus ir NK ląstelių funkcijas. T_{H1} ląstelės taip pat slopina T_{H2} ląstelių diferencijavimąsi ir aktyvumą. T_{H2} ląstelės sekretuoja citokinus IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 ir aktyvina B limfocitus, bet slopina T_{H1} ląstelės. T citotoksiniai limfocitai naikina virusais infekuotas ląsteles [59].

T ląstelės aktyvinimui reikia 2-jų signalų: TCR – MHC II komplekso ir kostimulatorinio signalo. Be šių pagrindinių signalų, ląstelių aktyvinime (aktyvacijos procese) dalyvauja kiti faktoriai, dažnai vadinami trečiuoju signalu. Tai įvairios tirpios molekulės: citokinai, fosfolipidai, lipidai, neuropeptidai. Melatoninas taip pat vadinamas trečiu limfocitų aktyvacijos faktoriumi [62]. Molekulės, kurios veikia kaip trečias aktyvacijos faktorius, modifikuoja (susilpnina ar sustiprina) pirmųjų dviejų signalų veikimą. Dažnai jų

modifikacijos pobūdis priklauso nuo koncentracijos, t.y. mažesnės koncentracijos gali veikti aktyvuojančiai, didesnės slopinančiai, arba atvirkščiai. Tokiu veikimu pasižymi fosfolipidai, melatoninas [62].

2.3.3.1. Melatonino poveikis T limfocitams

Melatoninas turi įtakos T ląstelių diferenciacijai. Būtent, jis žmogaus T ląsteles nukreipia diferencijuotis T_H1 kryptimi. Tai tiesiogiai rodo daugelio mokslininkų duomenys, kur melatoninas padidina T_H1 citokinų (IL-2, IFN_γ , IL-6) [49,60,63] bei sumažina T_H2 citokino IL-10 produkciją [60,63] arba T_H2 citokinams neturi įtakos [49].

Priešingai žmogaus T ląstelėms, pelių T ląsteles melatoninas skatina diferencijuotis T_H2 kryptimi. Melatoninas skatina $CD4^+$ T ląstelių proliferaciją, slopina IL-2, $TNF\alpha$, IFN_γ produkciją, stimuliuoja IL-10, IL-4 produkciją [62]. Melatoninas sumažina IL-2, IL-6, IFN_γ , $TNF\alpha$, IL-1 koncentraciją kraujo serume bei padidina T_H2 išskiriamų citokinų (IL-10) kiekį [64]. Dauguma mokslininkų pateikia duomenis, kad pelių sistemoje melatoninas nukreipia T ląstelių diferenciaciją T_H2 kryptimi. Tačiau literatūroje yra duomenų, kad melatoninas tam neturi įtakos [48,60].

Skirtingas melatonino poveikis žmogaus ir pelės T limfocitams gali būti paaiškintas skirtingu melatonino veikimu į makrofagus ir dendritines ląsteles, t.y. melatoninas stimuliuoja IL-12 sekreciją žmogaus makrofaguose ir dendritinėse ląstelėse [49]. Kaip žinoma, IL-12 yra svarbus citokinas, reguliuojantis T ląstelių diferenciaciją T_H1 kryptimi [59]. Iki šiol literatūroje nėra duomenų, bylojančių, kad melatoninas indukuotų IL-12 sekreciją pelių makrofaguose ar dendritinėse ląstelėse.

2.3.3.2. Melatonino poveikis B limfocitams

B limfocitai subręsta kaulų čiulpuose. Įgytas imunitetas būna dviejų tipų: humoralinis ir ląstelinis. Vykstant humoralinio imuniteto reakcijoms, B limfocitai, atsakydami į antigeną, virsta antikūnus gaminančiomis ląstelėmis, o antikūnai specifiskai atpažįsta antigeną ir jį pašalina. Ląstelinis imunitetas susijęs su T ląstelių aktyvacija ir T_H1 tipo citokinų sekrecija, monocitų/makrofagų aktyvacija. Pakartotinis kontaktas su antigenu, vadinamas antriniu imuniniu atsaku, kuris kiekybiškai ir kokybiškai skiriasi nuo pirminio. Ši įgyto imuniteto savybė vadinama imunine atmintimi. Ją sąlygoja atminties ląstelės, tai yra po pirminio imuninio atsako tam tikras savybes įgiję T ir B limfocitai.

B limfocitų efektorinės ląstelės yra plazminės ląstelės. Jų gaminami antikūnai specifiskai jungiasi su antigenu, jį opsonizuodami ir/arba aktyvindami komplementą, ir taip

sustiprina, pagreitina antigeno fagocitozę arba lizę. Kiti antikūnai jungiasi kartu su antigenu, sąveikauja su putliųjų ląstelių Fc receptoriais ir sukelia jų degranuliaciją. Išsiskyrę mediatoriai, sukelia vietinį uždegimą [59].

Antigenui patekus į organizmą pirmą kartą, atsaką į jį inicijuoja naivieji B limfocitai (pirminis humoralinis imuninis atsakas), patekus pakartotinai – atminties B limfocitai (antrinis humoralinis imuninis atsakas). Pagrindiniai skirtumai, tarp pirminio ir antrinio humoralinio atsako pateikti 2 lentelėje [59].

2 Lentelė. Pirminio ir antrinio humoralinio atsako palyginimas [59].

Savybė	Pirminis humoralinis atsakas	Antrinis humoralinis atsakas
Į antigeną reaguojanti ląstelė	naivusis B limfocitas	atminties B limfocitas
Atsaką sukelia	visi imunogenai	tik baltyminiai antigenai
Inkubacinis periodas po antigeno patekimo	~ 4-7 dienos	~ 1-3 dienos
Atsako maksimumas	7-10 dieną	3- 5 dieną
Antikūnai :		
izotipas	ankstyvojoje fazėje dominuoja IgM., vėliau atsiranda IgG	įvairių izotipų antikūnai
afiniškumas	nedidelis	gerokai didesnis
kiekis	įvairus, priklauso nuo patogeno	~ 100-1000 kartų didesnis

Antikūnų sintezei ir izotipo persijungimui, didelę įtaką turi citokinai. Proliferaciją skatina tokie citokinai, kaip IL-2, IL-4, IL-5. Antikūnų sintezę stiprinantieji citokinai yra IL-2, IL-6, IL-10 [59].

Melatoninas veikia pelių B limfocitus per T_H ląsteles, stimuliuodamas IL-4 produkciją, jis skatina B limfocitus sekretuoti IgG1 ir slopina IgG2a [64]. Kitas autorius pateikia priešingus rezultatus, teigdamas, kad melatoninas neturi įtakos pelių B limfocitams, nesikeičia IgG1, IgG2a, IgM, IgA titrai [62]. Ju ir kolegos parodė melatonino poveikį kaulų čiulpų ląstelėms. Jie įrodė, kad melatoninas ryškiai padidino B ląstelių pirmtakų išgyvenimą kaulų čiulpuose [1]. Kitą eksperimentą, parodantį melatonino poveikį humoraliniam imunitetui, atliko Akbulut ir kolegos. Jie palygino antikūnų IgM ir IgG1 kiekį senų ir jaunų žiurkių organizmuose, kurių dalis buvo paveiktos melatoninu. Žiurkės buvo imunizuotos avies eritrocitais, kurie sukelia humoralinį imuninį atsaką. Tyrimų metu buvo nustatyta, kad

melatoninas statistiškai patikimai padidino IgG1 ir IgM antikūnų titrą senų žiurkių ir IgG1 titrą jaunų žiurkių kraujo serume [65].

2.3.3.3. Melatonino poveikis NK ląstelėms

NK ląstelės subręsta kaulų čiulpuose ir naikina virusais infekuotas ir auglių ląsteles.

Melatoninas veikia NK ląsteles taip:

- Veikdamas per T limfocitus ir skatindamas juos išskirti IL-2, IL-6, IL-12 IR INF_{γ} , jis aktyvina NK ląstelių produkciją [1].
- Padidina NK ląstelių aktyvumą *in vivo* ir *in vitro* [1].
- Pagerina citotoksinį NK ląstelių aktyvumą [48].

3. TYRIMŲ METODIKA IR PRIEMONĖS

Mūsų eksperimentų pagrindas – melatonino sintezės inhibicija naudojant šviesą. Pirmas uždavinys buvo išaiškinti kaip šviesa blokuoja melatonino sintezę. Tam pelės buvo suskirstytos į dvi grupės: viena gyveno natūraliom apšvietimo sąlygomis, kita prie pastovaus apšvietimo. Po dviejų savaičių, skirtingų paros metu buvo paimtas pelių kraujas. Kraujas buvo ištirtas, naudojant IBL įmonės rinkinį, kurio pagalba nustatoma melatonino koncentracija.

Kitas uždavinys – išsiaiškinti melatonino poveikį humoraliniam imunitetui (antikūnų gamyboje), naudojant eksperimentinius modelius su BALB/c linijos pelėmis. Tuo tikslu, pelės buvo imunizuotos nuo T ląstelių nepriklausomu (5 eksperimentai) ir nuo T ląstelių priklausomu (4 eksperimentai) antigenu. Pelės buvo laikomos skirtingomis apšvietimo sąlygomis, t.y. esant normaliai melatonino sintezei, ir, inhibuojant melatonino sintezę. Arba pelės buvo laikomos prie natūralaus apšvietimo, tik vienai grupei buvo kasdien leidžiamas melatonino receptoriaus inhibitorius. Po tam tikro laiko, buvo renkamas pelių kraujas ir tiriamas ELISA metodu.

Taip pat buvo kitaip nustatomas melatonino vaidmuo antikūnų gamyboje – pelės buvo imunizuojamos skirtingos paros metu: viena grupė vakare, prieš melatonino sintezės pradžią, kita – ryte, pasibaigus melatonino sintezei. Vėliau jų imuninis atsakas buvo tirtas ELISA metodu.

Paskutinis uždavinys – buvo išsiaiškinti, per kokį receptorių melatoninas veikia humoralinį imunitetą imunizuojant T priklausomu antigenu. Tam buvo atlikti eksperimentai *in vivo* su pelėmis ir *in vitro* su ląstelių kultūra.

3.1. Naudojami reagentai

3.1.1. Reagentai

Rinkinys skirtas nustatyti melatonino koncentracija pelių serume:

1. ELISA melatonin kit – IBL, Vokietija

Monokloniniai antikūnai prieš pelių imonoglobulinų izotipus naudojami ELISA metode:

2. IgG1 žymėti biotinu – Pharmigen, Vokietija
3. IgG2a žymėti biotinu – Pharmigen, Vokietija
4. IgG2b žymėti biotinu – Pharmigen, Vokietija
5. IgG3 žymėti biotinu – Pharmigen, Vokietija

6. IgM žymėti biotin – Pharmigen, Vokietija

Kiti reagentai:

7. NaCl – Lach-Ner, Čekija
8. Na₂HPO₄ – Sigma, Vokietija
9. KCl – Lach-Ner, Čekija
10. KH₂PO₄ – Sigma, Vokietija
11. Nuo T ląstelių nepriklausomas antigenas TNP-Fikolis (TNP(89)-AECM-Ficoll, Cat No. F-1300, Biosearch Technologies) – JAV
12. Nuo T ląstelių nepriklausomas antigenas LPS – Sigma, Vokietija
13. Nuo T ląstelių priklausomas antigenas TNP-Ovalbumin (TNP(11)-oval, Cat No. T-5051 Biosearch Technologies) – JAV
14. Melatoninas – Sigma, Vokietija
15. H₂SO₄ - Lachema, Čekija
16. Streptavidinas-POD – Pierce, JAV
17. Alu-gel-S – Serva, Vokietija
18. Vandensilio peroksidas – Reanal, Vengrija
19. Natrio azidas – Merck, JAV
20. Natrio acetatas – Reanal, Vengrija
21. Ortofenilendiaminas – Merck, JAV
22. Jaučio albuminas – Reanal, Vengrija
23. RPMI medium – Hyclone, JAV
24. 4-P-PDOT – Tocris, JAV
25. Lizindoles – Sigma, Vokietija
26. FCS – Hyclone, JAV
27. Amonio chloridas – Penta, Čekija

3.1.2. Tirpalai

1. PBS buferinis tirpalas (8g/l NaCl, 0,2g/l KCl, 1,14g/l Na₂HPO₄, 0,2g/l KH₂PO₄, pH 7,2).
2. ELISA plovimo buferis: PBS su 0,05% Tween-20 (500 ml PBS buferio ir 0,25 ml TWEEN-20).

3. ELISA blokavimo tirpalas: 0,5 % jaučio serumo albumino tirpalas PBS buferiniame tirpale (5 g jaučio albumino ištirpinti 500 ml PBS).
4. ELISA stabdymo tirpalas: 10 % sieros rūgštis (0.104 ml 96 % H₂SO₄ ir 0.9 ml H₂O).
5. 0,025 mol/l natrio acetatinis buferinis tirpalas (3,402 g natrio acetato (CH₃COONa · 3H₂O) ištirpinti 1000 ml distiliuoto vandens). pH vertės koreguotos acto rūgštimi (pH 5,5)).
6. ELISA substratinis buferinis tirpalas: 5 mg ortofenilendiamino ištirpinami 10 ml 0,025 mol/l natrio acetatinio buferinio tirpalo (pH 5,5) ir pripilama 0,03 ml 19 % H₂O₂. Substratinis buferinis tirpalas ruošiamas prieš pat naudojimą.
7. Dažymo buferinis tirpalas: PBS buferinis tirpalas, kuriame yra 2 % jaučio serumo ir 0,1 % natrio azido - (2 g jaučio serumo ir 0,1 g natrio azido buvo ištirpinti 1000 ml PBS).

3.2. Eksperimentiniai gyvūnai

Melatonino efektas B ląstelių imuniniam atsakui buvo tiriamas ant BALB/c ir C57Bl/6 linijos pelių. Eksperimentai su pelėmis buvo atliekami Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centro Imunologijos departamento vivariume, pagal valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos suteiktą leidimą naudoti laboratorinius gyvūnus mokslo tiriamajam darbui Nr.0127. Visos pelės buvo laikomos, esant pastoviai kambario temperatūrai, ir, esant pakankamam maisto ir vandens kiekiui (*ad libitum*).

3.3. Pelių kraujo paėmimas

Kraujas buvo imamas iš pelių uodegos. Kad pagerinti kraujo apytaką, pelės buvo šildytos po raudona lempa (infra-raudonaisiais spinduliais). Skalpelio buvo prapjauta uodegos šoninė vena ir į ependorfinius mėgintuvėlius surinkta apie 0,05-0,10 ml kraujo. Kraujui sukrešėjus, ependorfiniai mėgintuvėliai buvo centrifuguojami 15 min 3000 aps./min. mikro-centrifugoje. Kraujo serumai perkelti į švairius mėgintuvėlius ir iki analizės laikomi – 20°C temperatūroje. Specifinių antikūnų kiekis kraujo serume buvo tirtas ELISA metodu.

3.4. Gyvūnų laikymas nustatant melatonino koncentraciją paros metu

Eksperimentas nustatant šviesos poveikį melatonino koncentracijai buvo atliktas vieną kartą. Buvo paimta 50 pelių (patelių) 8-9 savaičių amžiaus BALB/c linijos. Pelės buvo suskirstytos į dvi grupes po 25 vnt. Viena pelių grupė buvo kontrolinė ir gyveno natūralaus apšvietimo sąlygomis (12 val šviesa, 12 val tamsa), kita gyveno prie pastovaus apšvietimo (šviesa 24 val per parą). Po dviejų savaičių buvo pradetas kraujo rinkimas. Kraujas buvo renkamas paros bėgyje – 21, 24, 1:30, 3, 6, 9, 13 ir 17 valandomis. Tamsos periodas buvo nuo 21.00 val. vakaro iki 6 val. ryto. Kiekvieną kartą imant kraują buvo nužudytos 3 pelės iš kiekvienos grupės ir paimtas visas jų kraujas. Kraujui sukrešėjus, ependorfiniai mėgintuvėliai buvo centrifuguojami 15 min 3000 aps/min mikro-centrifugoje. Kraujo serumai perkelti į švarius mėgintuvėlius ir iki analizės laikomi -20°C temperatūroje. Melatonino koncentracija kraujo serume buvo nustatoma, naudojant Melatonin ELISA rinkinį.

3.5. Gyvūnų imunizacija nuo T ląstelių nepriklausomu antigenu

Eksperimentai, imunizuojant nuo T ląstelių nepriklausomu antigenu, buvo atlikti penkis kartus. Pirmo eksperimento metu buvo paimta 30 BALB/c linijos pelių (patelių) 8-9 savaičių amžiaus. Pelės buvo suskirstytos į tris grupes po 10 vnt. Viena pelių grupė buvo kontrolinė ir gyveno natūralaus apšvietimo sąlygomis (12 val. šviesa, 12 val. tamsa) ir jų melatonino sekrecija buvo natūrali. Kitos dvi pelių grupės gyveno pastovaus apšvietimo sąlygomis (šviesa 24 valandos per parą) ir jų melatonino sekrecija buvo minimali arba jos visai nebuvo. Norint įsitikinti, kad išsaukti pakitimai yra susiję su melatonino sintezės sutrikimu (o ne dėl kitų priežasčių, būnant pastovaus apšvietimo sąlygomis), vienai, pastoviam apšvietime gyvenančiai, pelių grupei kas vakarą į pilvo ertmę buvo leidžiamas melatoninas (po 5mg/kg svorio). Kitai prie pastovaus apšvietimo gyvenančiai, pelių grupei tuo pat metu buvo leidžiamas atitinkamas tūris PBS buferio, kuriame buvo 0,6 % etanolio (nes melatoninas buvo tirpintas PBS buferyje, esant 0,6 % etanolio). Praėjus savaitei nuo eksperimento pradžios (adaptacijos laikotarpis), pelės buvo imunizuotos nuo T ląstelių nepriklausomu antigenu TNP-fikoliu. Tuo tikslu, kiekvienai pelei į pilvo ertmę buvo suleista 10μg TNP-fikolio, kuris buvo ištirpintas 100μl PBS buferio. Imunizacija vykdavo 18-20

valandą. Kraujas buvo imtas prieš imunizaciją (neimuninis kraujas) bei 7 ir 14 dieną po imunizacijos. Pelės buvo nužudytos, praėjus 14 dienų nuo imunizacijos pradžios.

Panašiomis sąlygomis buvo atliktas analogiškas antras eksperimentas, kuris nuo pirmojo skyrėsi tuo, kad:

- pelių lytis – patinai
- pelių amžius 22 savaitės
- kraujas buvo imtas du kartus – prieš imunizaciją ir 7 dieną po imunizacijos
- pelės buvo nužudytos 7 dieną po imunizacijos

Trečiasis eksperimentas buvo skirtas turimu rezultatu patvirtinimui. Todėl buvo paimta 16 pelių, kurios buvo suskirstytos į dvi grupes - gyvenančios prie natūralaus apšvietimo ir prie pastovaus apšvietimo. Trečios grupės nereikėjo, nes mes jau įsitikinome, kad iššaukti pakitimai yra susiję su melatonino sintezės sutrikimu. Kraujas buvo imamas du kartus – prieš imunizaciją ir 7 dieną po imunizacijos. Pelės buvo nužudytos 7 dieną po imunizacijos.

Ketvirtas eksperimentas buvo skirtas gautų rezultatų patvirtinimui (patikrinimui), naudojant kitą antigeną – TNP-LPS. Šiam tikslui buvo paimta 30 BALB/c linijos pelių (patelių) 7-8 savaičių amžiaus. Pelės buvo suskirstytos į tris grupes po 10 vnt. Viena pelių grupė buvo kontrolinė ir gyveno natūralaus apšvietimo sąlygomis (12 val. šviesa, 12 val. tamsa). Kitos dvi pelių grupės gyveno pastovaus apšvietimo sąlygomis (šviesa 24 val. per parą). Norint įsitikinti, kad iššaukti pakitimai yra susiję su melatonino sintezės sutrikimu (o ne dėl kitų priežasčių, esant pastovaus apšvietimo sąlygomis), vienai pastoviam apšvietime gyvenančiai pelių grupei kas vakarą į pilvo ertmę buvo leidžiamas melatoninas (po 5 mg/kg svorio). Praėjus adaptaciniam periodui, t.y. savaitei nuo eksperimento pradžios, pelės buvo imunizuotos nuo T ląstelių nepriklausomu antigenu TNP-LPS. Imunizacija vykdavo 20-21 valandą vakaro. Kraujas buvo paimtas prieš imunizacijos procesą (neimuninis kraujas) bei 7 dieną po imunizacijos.

Penktas eksperimentas buvo skirtas gautų rezultatų patvirtinimui (patikrinimui) imunizuojant TNP-LPS antigeną. Šiam tikslui buvo paimta 16 BALB/c linijos pelių (patelių) 8-9 savaičių amžiaus. Pelės buvo suskirstytos į tris grupes po 10 vnt. Viena pelių grupė buvo kontrolinė ir gyveno natūralaus apšvietimo sąlygomis (12 val. šviesa, 12 val. tamsa). Kita pelių grupė gyveno pastovaus apšvietimo sąlygomis (šviesa 24 val. per parą). Praėjus adaptaciniam periodui, t.y. savaitei nuo eksperimento pradžios, pelės buvo imunizuotos nuo T ląstelių nepriklausomu antigenu TNP-LPS. Imunizacija vykdavo 20-21 valandą vakaro. Kraujas buvo imtas 7 dieną po imunizacijos. Visų penkių eksperimentų schemas yra pateiktos 3 lentelėje.

3 Lentelė. Eksperimentiniai gyvūnai ir jų grupės imunizuojant nuo T ląstelių nepriklausomai antigenais (TNP-LPS ir TNP-fikolis).

Nr.	Pelių linija, lytis, amžius	Eksp. grupė	Pelių skaičius	Apšvietimas	Papildomos injekcijos	Antigenas
I eksp.	BALB/c, patelės, 8-9 savaičių amžiaus	I	10	normalus	–	TNP-fikolis
		II	10	24 val.	PBS	
		III	10	24 val.	melatoninas	
II eksp.	BALB/c, patinai, 22 savaičių amžiaus	I	10	normalus	–	TNP-fikolis
		II	10	24 val.	PBS	
		III	10	24 val.	melatoninas	
III eksp.	BALB/c, patelės, 8-9 savaičių amžiaus	I	8	normalus	–	TNP-fikolis
		II	8	24 val.	–	
IV eksp.	BALB/c, patelės, 7-8 savaičių amžiaus	I	10	normalus	–	TNP-LPS
		II	10	24 val.	–	
		III	10	24 val.	melatoninas	
V eksp.	BALB/c, patelės, 8-9 savaičių amžiaus	I	8	normalus	–	TNP-LPS
		II	8	24 val.	–	

3.6. Gyvūnų imunizacija nuo T ląstelių priklausomu antigenu

Eksperimentai, imunizuojant peles nuo T ląstelių priklausomu antigenu, buvo atlikti keturis kartus. Pirmo eksperimento metu buvo paimta 30 BALB/c linijos pelių (patelių), 7-8 savaičių amžiaus. Visos pelės buvo suskirstytos į tris grupes po 10 vnt., taip pat kaip ir nuo T ląstelių nepriklausomos imunizacijos eksperimente. Po vienos savaitės adaptacinio periodo atitinkamo apšvietimo sąlygomis, visos pelės buvo imunizuotos T priklausomu antigenu TNP-ovalbuminu. TNP-ovalbuminas imunizacijai buvo paruoštas ir naudojamas sekančiu būdu:

- sumaišyti: 0,2 ml 5 mg/ml TNP-ovalbumino, 0,2 ml PBS ir 0,4 ml alu-gel-S

- inkubuoti purtant 1 val. kambario temperatūroje ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$)
- pridėti 5 ml PBS buferinio tirpalo, sumaišyti, centrifugoti 5 min. 2000 aps./min. greičiu
- resuspenduoti nuosėdas 5 ml PBS (mišinys turi būti geltonos spalvos)
- imunizacija po 0,5 ml į kiekvienos pelės pilvo ertmę.

Kiekvienai pelei į pilvo ertmę buvo suleista po 100 μg (0,1 mg) TNP-ovalbumino. Imunizacija vykdavo 19-20 valandą bei buvo atlikta 0, 14 ir 28 dieną. Kraujas buvo paimtas prieš pirmą imunizaciją (0 dieną), 7, 14, 21 ir 28 dieną nuo pirmos imunizacijos. Eksperimento schema yra pateikta 4 lentelėje.

Antro eksperimento metu buvo paimta 30 pelių BALB/c linijos 12 savaičių amžiaus patinai. Eksperimentas buvo atliktas pagal ta pačią, 4 lentelėje, pateiktą schemą.

Atliekant pirmą ir antrą eksperimentus, dominavo pagrindiniai skirtumai: pelių lytis – patinai, pelių amžius – 12 savaičių. Siekiant įsitikinti, kad humoralinis imunitetas priklauso nuo melatonino sekrecijos sutrikimo bei šiuose procesuose nedalyvauja lytiniai hormonai: testosteronas ir estrogenas, imunizuojant T priklausomu taip ir T nepriklausomu antigenu buvo naudoti patinai.

Trečio eksperimento metu buvo paimta 20 pelių (patelių) BALB/c linijos 8-9 savaičių amžiaus. Visos pelės buvo suskirstytos į dvi grupes po 10 vnt. ir laikomos esant natūraliam apšvietimui. Eksperimento metu buvo naudotas melatonino MT2 receptoriaus inhibitorius – 4-P-PDOT, kuris vienai pelių grupei buvo leidžiamas viso eksperimento laikotarpiu, kitai – visiškai neleidžiamas. Kiekvieną dieną 19-20 valandą, pelėms buvo leidžiami po 250 μl (0,25 ml) inhibitoriaus. Praėjus savaitės adaptaciniam periodui, prie inhibitoriaus įvyko imunizacija. Kiekvienai pelei į pilvo ertmę buvo leidžiami po 100 μg (0,1 ml) TNP-ovalbumino. Imunizacija vykdavo 20-21 valandą vakaro bei atlikta 0 ir 14 dieną. Kraujas buvo imamas 7, 14 ir 21 dieną nuo pirmos imunizacijos.

Ketvirto eksperimento metu buvo paimta 12 pelių (patelių) BALB/c linijos 8-9 savaičių amžiaus. Visos pelės buvo suskirstytos į dvi grupes po 6 vnt. bei laikomos esant natūraliam apšvietimui. Pagrindinis skirtumas nuo kitų eksperimentų – tai kad pelės buvo imunizuojamos skirtingu laiku, t.y. viena pelių grupė 21 valandą vakaro, kitą 9 valandą ryto. Imunizacija buvo atlikta 0, 14 ir 21 dieną. Kraujas buvo imamas 7 ir 28 dieną nuo pirmos imunizacijos. Visu keturių eksperimentų schemas yra pateiktos 4 lentelėje.

4 Lentelė. Eksperimentiniai gyvūnai ir jų grupės vykstant nuo T ląstelių priklausomu antigenu (TNP-ovalbuminu) imunizacijai.

Nr.	Linija, lytis, amžius	Grupė	Pelių skaičius	Apšvietimas	Papildomos injekcijos
I eksp.	BALB/c, patelės, 6-7 savaičių amžiaus	I	10	normalus	–
		II	10	24 val.	PBS
		III	10	24 val.	melatoninas
II eksp.	BALB/c, patinai, 12 savaičių amžiaus	I	10	normalus	–
		II	10	24 val.	PBS
		III	10	24 val.	melatoninas
III eksp.	BALB/c, patelės, 6-7 savaičių amžiaus	I	10	normalus	–
		II	10	normalus	4-P-PDOT
IV eksp.	BALB/c, patelės, 6-7 savaičių amžiaus	I	6	normalus	–
		II	6	normalus	–

3.7. Eksperimentai su ląstelių kultūra

Eksperimentai skirti nustatyti antikūnų gamybą *in vitro* (mėgintuvėlyje), ir tokiu būdu įrodyti melatonino vaidmuo antikūnų gamyboje. Blužnies ląstelės buvo išskiriamos iš imunizuotų T ląstelių priklausomų antigenų (TNP-ovalbuminu) pelių. Ląstelės buvo išskiriamos vieną savaitę po paskutinės imunizacijos arba 35 dieną po pirmos imunizacijos. Blužnies ląstelės buvo centrifuguojamos 5 min. 2000 aps./min. greičiu esant +4°C temperatūrai, vėliau palaikomos 4 min. amonio chlorido tirpale (tuo metu sprogdinami eritrocitai) ir centrifuguojamos pradinėmis sąlygomis. Išskirtos ląstelės išsėtos į apvaliadugnę 96 šulinėlių plokštelę, RPMI terpėje. Ląstelių koncentracija kiekviename šulinėlyje sudarė $2,2 \cdot 10^5$ vnt./į šulinėlį. RPMI terpė buvo praturtinta 10 % FCS. RPMI terpė naudojama ląstelių ir audinių kultūrų metoduose. Ląstelės buvo stimuliuojamos 10 µg/ml koncentracijos TNP-ovalbuminu. Priklausomai nuo eksperimento tikslo papildomai buvo dedama 10 µmol/l melatonino, 10 µmol/l luzindolo, 1-10000 nmol/l 4-P-PDOT. Ląstelės buvo inkubuojamos

termostate esant +37°C temperatūrai ir 5% CO₂ 9-10 dienų, po to surinktas ląstelių supernatantas ir jame nustatytas produkuojamų antikūnų kiekis ELISA metodu.

3.8. ELISA metodas

TNP-specifinių antikūnų nustatymui buvo pritaikytas ELISA metodas, įtraukantis sekančiais etapais:

- Antigeno sorbcija ELISA plokštelėje. Imunizuojant TNP-fikoliu (nuo T ląstelių nepriklausomas antigenas) ir TNP-ovalbuminu (nuo T ląstelių priklausomas antigenas), buvo stebimas antikūnų susidarymas prieš haptenu – TNP. Tuo tikslu ELISA plokštelėje buvo imobilizuotas TNP-albuminas, t.y baltymas, kuris nebuvo naudotas imunizacijai, bet yra konjuguotas su tuo pačiu haptenu – TNP. Eksperimentams buvo naudotos 96-šulinėlių maxisorp ELISA plokštelės (Nunc). TNP-albuminas buvo praskiestas PBS buferiniu tirpalu iki 4 µg/ml koncentracijos ir išpilstytas į plokštelės šulinėlius po 50 µl (arba 0,05 ml). Plokštelės buvo inkubuojamos 16-18 val. +4°C temperatūroje.
- Laisvo šulinėlių ploto blokavimas. Blokavimui buvo panaudotas 0,5 % jaučio serumo albumino tirpalas. Plokštelėse esantis tirpalas buvo išpiltas ir į kiekvieną šulinėlį buvo įpilama po 100 µl (arba 0,1 ml) albumino tirpalo. Inkubuojama 30 min. +20°C temperatūroje.
- Inkubacija su testuojamais serumais. Serumai buvo skiedžiami 1:100, 1:300, 1:900, 1:2700, 1:8100 PBS buferiniame tirpale su 0,05 % Tween-20 (Serva), ir išpilstomi į plokštelės šulinėlius po 50 µl (arba 0,05 ml). Siekiant palyginti antikūnų kiekį serumuose, buvo įvestas sutartinis standartas – imuninių serumų mišinys, kuriame antikūnų kiekis buvo prilygintas 100 sutartinių vienetų (SV). Standartinis serumas buvo skiedžiamas 1:100, 1:300, 1:900, 1:2700, 1:8100, 1:24300, 1:72900 ir išpilstomas į plokštelės šulinėlius po 50 µl (arba 0,05 ml). Į du šulinėlius buvo įpilama po 50 µl (arba 0,05 ml) PBS buferinio tirpalo esant 0,05 % Tween-20. Plokštelės buvo inkubuojamos valandą +20°C temperatūroje. Vėliau plokštelės turinys buvo išpilamas, o pačios plokštelės buvo praplaunamos tris kartus distiliuotu vandeniu.
- Inkubacija su antikūnais prieš pelių imunoglobulinius. Detaliam B ląstelių imuniniam atsakui įvertinti, buvo matuojami IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b bei IgG3 klasių specifiniai antikūnai. Šiam tikslui plokštelės buvo inkubuotos su antikūnais prieš minėtų klasių imunoglobulinius, žymėtais biotinu. Antikūnai buvo skiedžiami 1:1000 PBS buferiniame tirpale su 0,05 % Tween-20 ir išpilstomos į plokštelės šulinėlius po 50 µl (arba 0,05 ml).

Inkubacijos trukmė sudarė 30 min. +20°C temperatūroje. Vėliau plokštelės turinys buvo išpilamas, o pačios plokštelės buvo praplaunamos tris kartus distiliuotu vandeniu.

- Inkubacija su streptavidinu konjuguotu su krienų peroksidaze (streptavidinas-POD). Streptavidinas-POD buvo skiedžiamas 1000 kartų PBS buferiniame tirpale esant 0,05 % Tween-20 ir išpilstomas į plokštelės šulinėlius po 50 µl (arba 0,05 ml). Plokštelės buvo inkubuojamos 30 min. +20°C temperatūroje. Vėliau plokštelės turinys buvo išpilamas, o pačios plokštelės buvo praplaunamos 10 kartų distiliuotu vandeniu.
- Peroksidazės aktyvumo nustatymas. Mūsų eksperimentuose naudotas substratas yra ortofenilendiaminas. Substratinis buferinis tirpalas buvo ruošiamas prieš pat naudojimą. 5 mg substrato buvo ištirpinami 10 ml 0,025 mol/l natrio acetatinio buferinio tirpalo (pH 5,5) ir pripilama 30 µl (arba 0,03 ml) 19 % H₂O₂. Į šulinėlius buvo įpilama po 100 µl (arba 0,1 ml) substratinio buferinio tirpalo. Vykstant fermentinei reakcijai, šulinėliuose esantis bespalvis tirpalas per 5-15 min. nusidažo geltona spalva. Fermentinė reakcija buvo sustabdoma įpilant į šulinėlius po 50 µl (arba 0,05 ml) 10 % H₂SO₄. Šulinėlių optinis tankis buvo matuojamas "BioTek" firmos daugiakanaliniu spektrofotometru Elx 800, esant 492 nm šviesos bangos ilgiui.
- Rezultatų skaičiavimas. Rezultatai buvo apdoroti naudojantis SOFTmaxPro programą.

3.9. Melatonin ELISA rinkinys

ELISA rinkinio veikimo pagrindą sudaro konkurencinė ELISA – esant konkurencijai tarp biotilinto (tarp melatonino ir standartas) ir nebiotilinto antigeno (mėginių serumo, kuriame irgi yra melatoninas) dėl antikūnų (melatonino antiserumo). Biotilintų antigenų kiekis, kuris prisijungia prie antikūnų yra atvirkštai proporcingas melatonino koncentracijai mėginyje. Biotilinto antigeno kiekis ir būna matuojamas: kuo mažesnė yra jo koncentracija, tuo daugiau aptinkama ieškomo melatonino mėginyje. Laisvas biotilintas antigenas būna nuplaunamas praplovimo metu, o prisijungę prie biotilinto antigeno antikūnai būna matuojami naudojant anti-biotin alkan-fosforą, kaip fermentą, bei p-nitrofenil fosforą, kaip substratą. Melatonino koncentracija buvo įvertinta, palyginant gautus rezultatus su gauta standartus kreive su naudojant pavyzdžius su žinomomis melatonino koncentracijomis.

Į melatonino ELISA rinkinį įeina microtiter plokštelė, ekstrakcijos epindorfai, standartai, biotilintas melatoninas, melatonino antiserumas, fermentų konjugatas – anti-biotin

alkan-fosfotazė, metanolis, substratinis tirpalas (P-nitrofenil fosfatas), fermentinės reakcijos stabdymo tirpalas, praplovimo buferinis tirpalas.

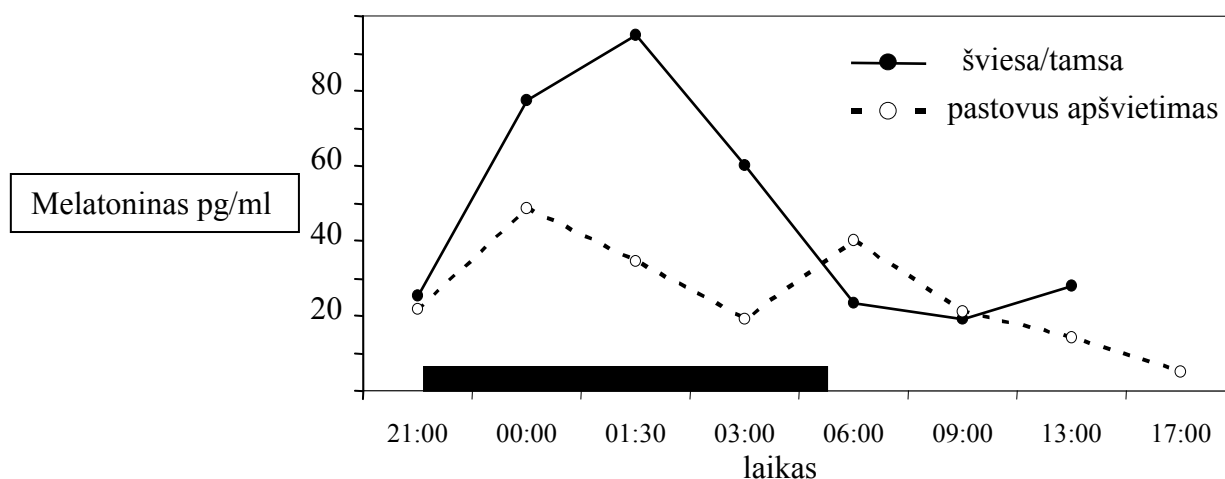
ETAPAI :

1. Ekstraktų išskyrimas. Iš visų eksperimentinių mėginių, iš kontrolės ir iš standartų išskiriamas ekstraktas, naudojant ekstrakcijos epindorfus, metanolį ir centrifuguojant. Sausus ekstraktus galima laikyti esant +2-6°C temperatūrai iki 24 valandų.
2. Microtiter plokštelės antigenų padengimas. Į kiekvieną šulinėlį buvo įpilama po 50 µl (arba 0,05 ml) mėginio ekstrakto, arba standarto arba kontrolės ekstrakto bei biotilinto melatonino. Tokių būdu du antigenai patenka į vieną šulinėlį.
3. Inkubacija su antikūnais prieš melatoniną. Į kiekvieną šulinėlį buvo įpilama po 50 µl (arba 0,05 ml) melatonino antiserumo bei inkubuojama 14-20 valandų esant +2-8°C temperatūrai. Vyksta antigenų konkurencija dėl antikūnų. Vėliau plokštelės turinys buvo išpilamas, ir plokštelės praplaunamos tris kartus praplovimui skirtu buferiniu tirpalu.
4. Inkubacija su fermento konjugatu. Į kiekvieną šulinėlį buvo įpilama po 150 µl (arba 0,15 ml) fermento konjugato bei inkubuojama 120 min. esant +18-25°C temperatūrai. Vėliau plokštelės turinys buvo išpilamas, ir plokštelės praplaunamos tris kartus praplovimui skirtu buferiniu tirpalu.
5. Fosfotazės aktyvumo nustatymas. Siekiant nustatyti fosfotazės aktyvumą, buvo naudojamas substratas – P-nitrofenil fosfatas. Substratinis buferinis tirpalas buvo ruošiamas prieš pat naudojimą. Į šulinėlius buvo įpilama po 200 µl (arba 0,20 ml) substrato bei inkubuojama 20-40 min. esant +18-25°C temperatūrai. Fermentinė reakcija buvo sustabdoma, įpilant į šulinėlius po 50 µl (arba 0,05 ml) reakcijos stabdymo tirpalo. Šulinėlių optinis tankis buvo matuojamas po valandos paveikus stabdymo tirpalu. Optinio tankio matavimai buvo atlikti naudojant “BioTek“ firmos daugiakanalinį spektrofotometrą Elx 800, esant 405 nm šviesos bangos ilgiui.
6. Rezultatų skaičiavimas. Melatonino koncentracija buvo nustatoma, palyginant gautus rezultatus su gauta naudojant žinomus standartus kreive.

4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

4.1. Šviesos įtaka melatonino koncentracijai

Eksperimentas nustatant šviesos poveikį melatonino koncentracijai buvo atliktas vieną kartą. Buvo paimta 50 BALB/c linijos pelių (patelių) 8-9 savaičių amžiaus. Pelės buvo suskirstytos į dvi grupes po 25 vnt. Viena pelių grupė buvo kontrolinė ir gyveno natūralaus apšvietimo sąlygomis (12 val. šviesa, 12 val. tamsa), kita gyveno prie pastovaus apšvietimo (šviesa 24 val. per parą). Po dviejų savaičių buvo pradėtas kraujo rinkimas. Kraujas buvo renkamas paros bėgyje – 21 ir 24 val. nakties, 1,30 ir 3 val. nakties, 6 ir 9 val. ryto, 13 ir 17 val. dienos. Kiekvieną kartą imant kraują, buvo nugalabintos 3 pelės iš kiekvienos grupės ir paimtas visas jų kraujas. Melatonino koncentracija kraujo serume buvo nustatoma, naudojant Melatonin ELISA rinkinį. Gauti rezultatai pateikti 3 paveiksle.



3 paveikslas. Melatonino koncentracija kraujo serume, kai pelės laikomos skirtingomis apšvietimo sąlygomis.

BALB/c pelės (patelės) buvo suskirstytos į dvi grupes. Viena grupė gyveno prie natūralaus apšvietimo, kita prie pastovaus apšvietimo. Kraujas buvo renkamas skirtingu laiku vienos paros bėgyje. Buvo imamas kraujas iš 3 pelių. Melatonino koncentracija kraujo serume buvo nustatoma, naudojant Melatonin ELISA rinkinį.

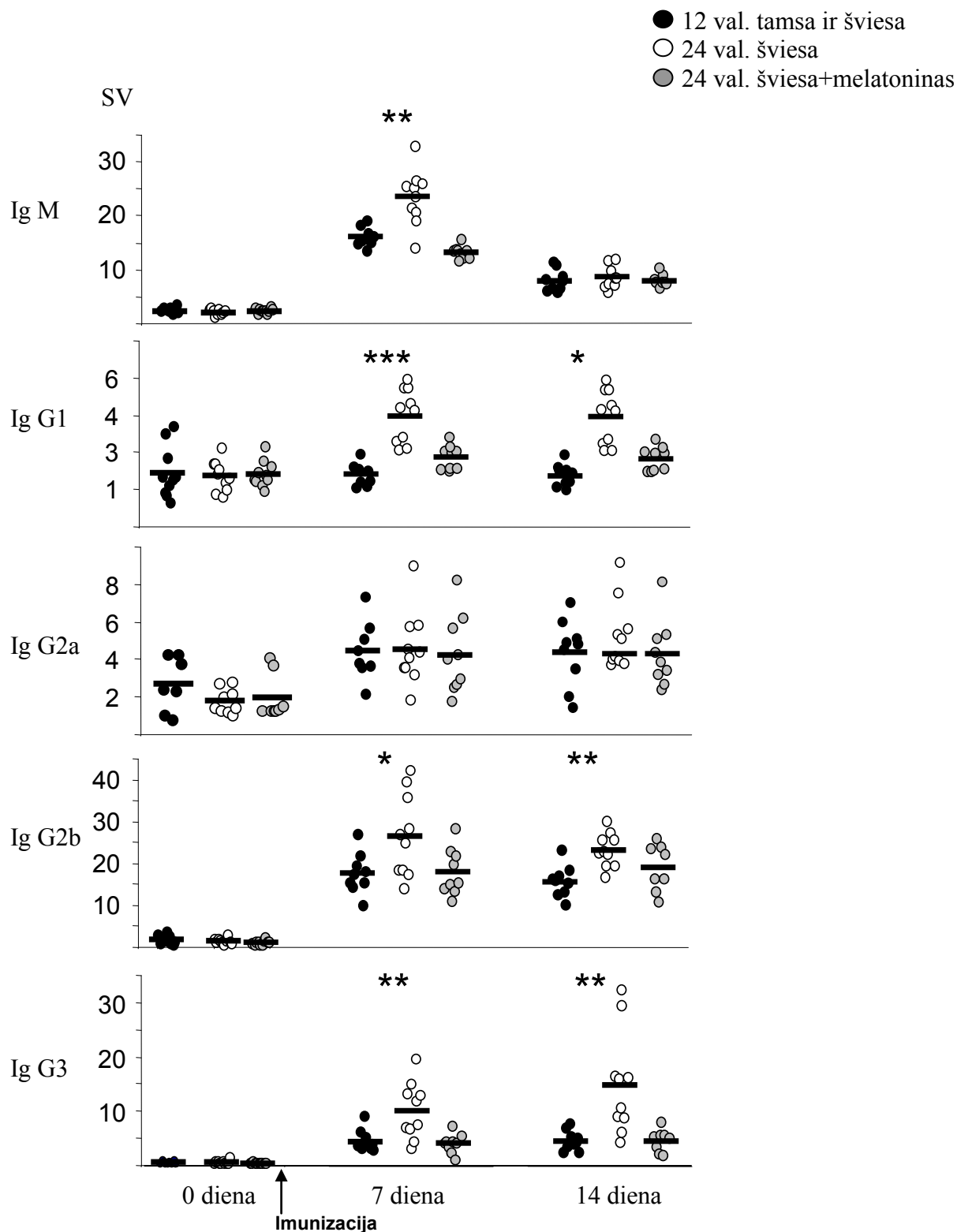
Tyrimų metu buvo gauti sekantys rezultatai: gyvenančioms natūraliomis apšvietimo sąlygomis pelėms melatonino sintezės sekrecija prasidėjo 9 valandą. Savo piką hormono koncentracija pasekė 1,30 val. nakties. Pelių, gyvenančių prie pastovaus apšvietimo, dienos ir ryto hormono koncentracija atitiko pelių, gyvenančių prie natūralaus apšvietimo. Tačiau, naktį, kada prasideda melatonino sintezė, pasireiškė šviesos melatonino sintezės inhibicija, ir hormono koncentracija kraujo serume buvo 2-3 kartus mažesnė negu gyvenančioms natūraliomis apšvietimo sąlygomis pelėms.

4.2. Melatonino įtaka nuo T ląstelių nepriklausomai antikūnų produkcijai

Nuo T ląstelių nepriklausomai antikūnų produkcijai tirti, BALB/c pelės buvo imunizuotos nuo T ląstelių nepriklausomais antigenais – TNP-fikoliu ir TNP-LPS. Pirmi trys eksperimentai buvo atlikti su TNP-fikoliu, o ketvirtas ir penktas su TNP-LPS. Šie antigenai stimuliuoja tik B ląsteles ir iššaukia antikūnų produkciją. Tuo tarpu jie nestimuliuoja T ląstelių, todėl šios ląstelės neįtakoja B ląstelių funkcijų. TNP-specifiniai antikūnai kraujo serume buvo tirti prieš imunizaciją ir 7-tą bei 14-tą dienomis po imunizacijos pirmo eksperimento metu ir 7-tą dieną antro, trečio, ketvirto ir penkto eksperimentų metu.

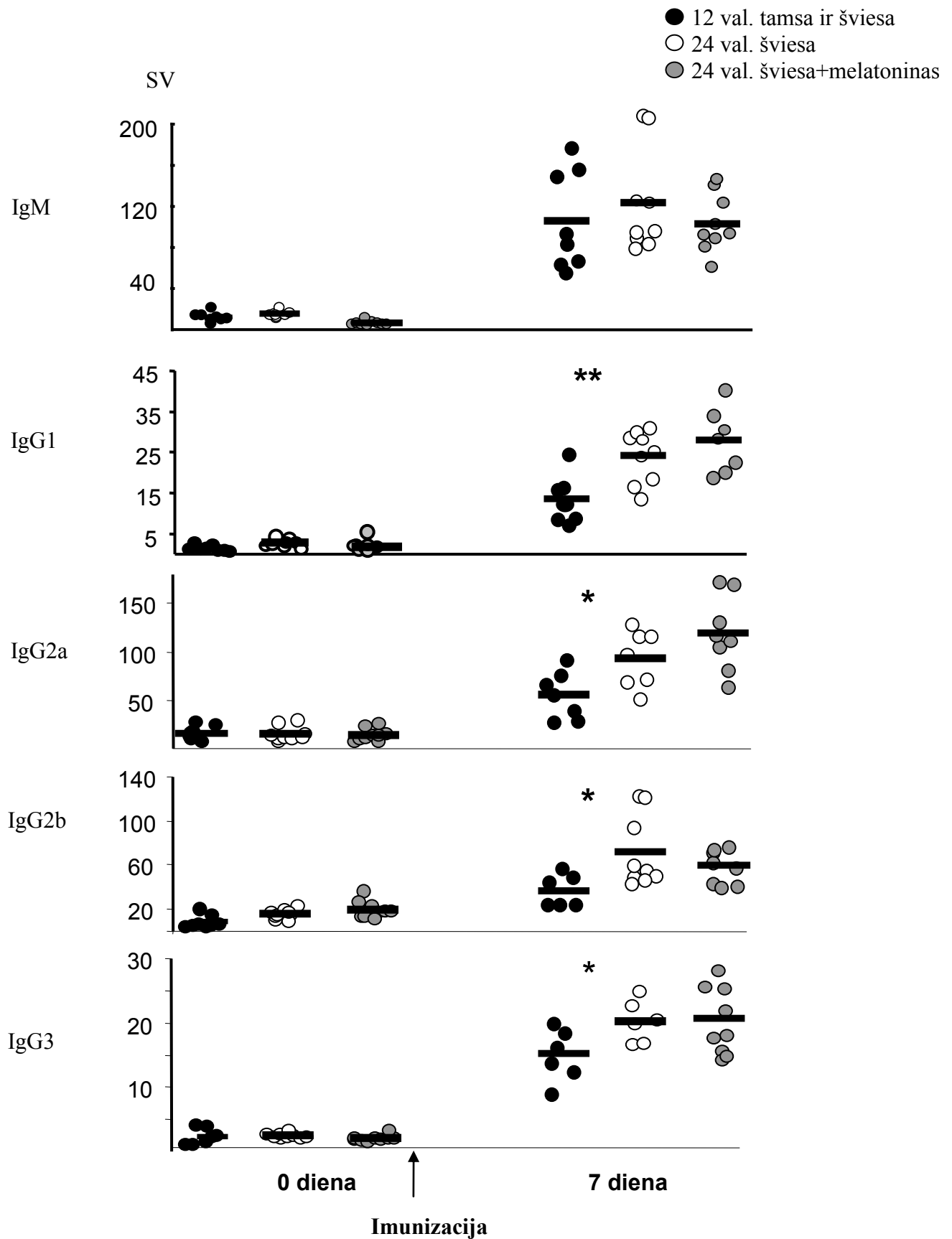
Antikūnų funkcijos priklauso ne tik nuo antikūno-antigeno sąveikos, bet ir nuo antikūno efektorinių funkcijų, kurias apsisprendžia antikūno izotipas. Siekiant detaliau įvertinti B ląstelių imuninį atsaką, mes nagrinėjome IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b ir IgG3 izotipų TNP-specifinių antikūnų kiekį kraujo serumuose. Pirmo eksperimento TNP-specifinių antikūnų produkcija yra apibendrinta 4 paveiksle, antro ir ketvirto – atitinkamai 5 ir 6 paveiksluose. Keturių eksperimentų rezultatai yra apibendrinti 5 lentelėje.

Imunizuojant peles nuo T ląstelių nepriklausomais antigenais (TNP-fikoliu ir TNP-LPS) formuojasi IgM, IgG1, IgG2b, IgG3 bei IgG2a izotipo antikūnai. Esant sutrikusiai melatonino sintezei (II gr. – pelės laikomos pastovaus apšvietimo sąlygomis), visų izotipų TNP-specifinių antikūnų kiekis yra didesnis, t.y. melatoninas kaip tik inhibuoja nuo T ląstelių nepriklausomų antikūnų susidarymą. Tuo tarpu, laikant peles pastovaus apšvietimo sąlygomis, bet kas vakarą leidžiant melatoniną, antikūnų kiekis yra panašus kaip ir kontrolinėje grupėje (pelės gyvenančios 12 val. šviesos ir 12 val. tamsos sąlygomis). Remiantis gautais duomenimis, galima teigti, kad melatonino trūkumas stimuliuoja nuo T ląstelių nepriklausomų antikūnų susidarymą. Literatūroje yra duomenų, kad melatoninas aktyvuoja T ląsteles, NK ląsteles, makrofagus [48]. Tačiau, B ląstelėms melatonino tiesioginis efektas nebuvo stebimas. Iki šiol antikūnų produkcijos pakitimai buvo tirti tik dalyvaujant T ląstelėms. Mūsų tyrimų metu buvo įrodyta, kad melatoninas tiesiogiai (nedalyvaujant T ląstelėms) gali veikti B ląstelių aktyvavimą ir antikūnų sekreciją. Kadangi stabdant melatonino sintezę, antikūnų produkcija sumažėja, galime teigti, kad melatoninas inhibuoja nuo T ląstelių nepriklausomą antikūnų produkciją.



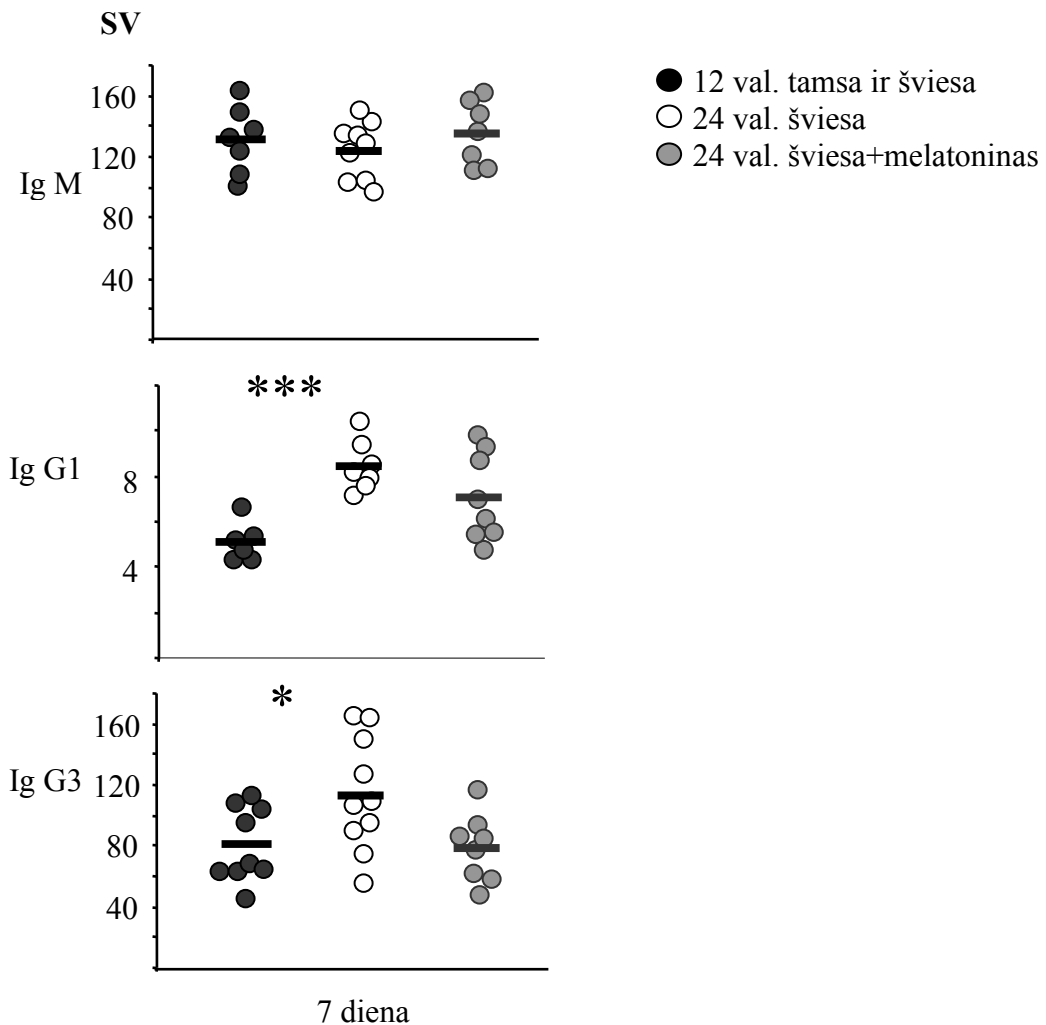
4 paveikslas. TNP-specifinių antikūnų produkcija imunizuojant nuo T ląstelių nepriklausomu antigenu – TNP-fikoliu. I eksperimentas.

BALB/c pelės (patelės) buvo imunizuotos T nepriklausomu antigenu – TNP-fikoliu. Kraujas buvo paimtas prieš imunizaciją (0 diena) ir 7, 14 dienomis po imunizacijos. TNP specifinių antikūnų kiekis buvo nustatytas ELISA metodu. Vienas rutuliukas – antikūnų kiekis sutartiniais vienetais (SV) vienos pelės kraujo serume. Statistiškai patikimi skirtumai tarp I ir II grupių pažymėti žvaigždutėmis: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.



5 paveikslas. TNP-specifinių antikūnų produkcija imunizuojant T nepriklausomu antigenu – TNP-fikoliu. II eksperimentas.

BALB/c pelės (patinai) buvo imunizuotos T nepriklausomu antigenu – TNP-fikoliu. Kraujas buvo paimtas prieš imunizaciją (0 diena) ir 7 dieną po imunizacijos. TNP specifinių antikūnų kiekis buvo nustatytas ELISA metodu. Vienas rutuliukas – antikūnų kiekis sutartiniais vienetais (SV) vienos pelės kraujo serume. Statistiškai patikimi skirtumai tarp I ir II grupių pažymėti žvaigždutėmis: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.



6 paveikslas. TNP-specifinių antikūnų produkcija imunizuojant T nepriklausomu antigenu – TNP-LPS. IV eksperimentas.

BALB/c pelės (patelės) buvo imunizuotos T nepriklausomu antigenu – TNP-LPS. Kraujas buvo paimtas prieš imunizaciją (0 diena) ir 7 dieną po imunizacijos. TNP specifinių antikūnų kiekis buvo nustatytas ELISA metodu. Vienas rutuliukas – antikūnų kiekis sutartiniais vienetais (SV) vienos pelės kraujo serume. Statistiškai patikimi skirtumai tarp I ir II grupių pažymėti žvaigždutėmis: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

5 Lentelė. TNP-specifinių antikūnų produkcija imunizuojant T nepriklausomu antigenu.

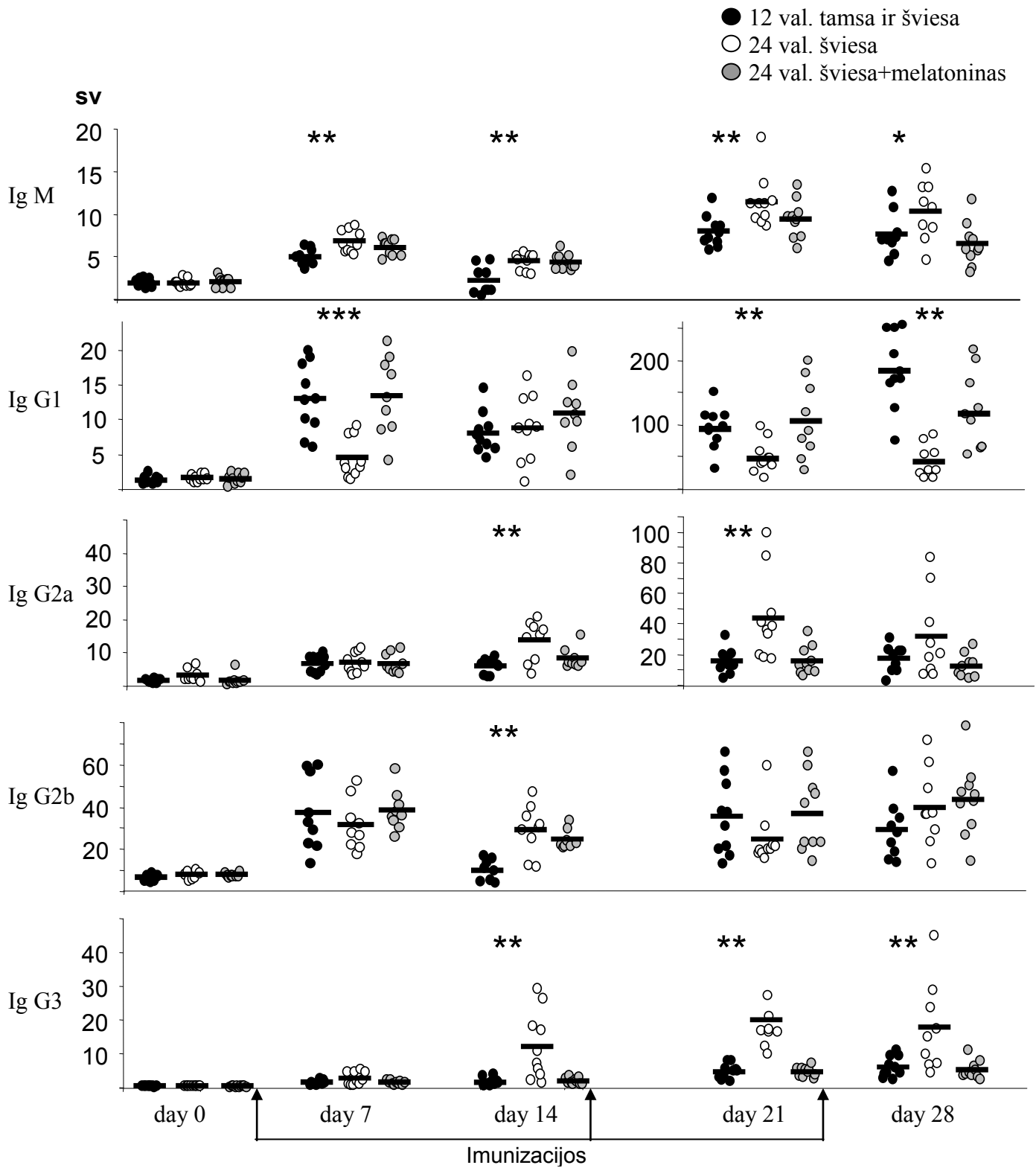
TNP-specifinių antikūnų izotipas	1 eksp. 7 diena	2 eksp. 7 diena	4 eksp. 7 diena	5 eksp. 7 diena
	Patelės	Patinai	Patelės	Patelės
IgM	△△	-	-	△△
IgG1	△△△	△△	△△△	△
IgG2a	-	△	ND	ND
IgG2b	△	△	ND	ND
IgG3	△△	△	△	↑

TNP specifinių antikūnų kiekis buvo nustatytas ELISA metodu. Patikimi skirtumai tarp natūralaus apšvietimo sąlygų ir prie pastovaus apšvietimo sąlygų gyvenančių pelių grupių pažymėti trikampaiais: △ - prie pastovaus apšvietimo statistiškai patikimas padidėjimas. 1 trikampis $p \leq 0.05$, 2 trikampiai $p \leq 0.005$, trys trikampiai $p \leq 0.0005$. ↑ – statistiškai patikimumo skirtumo nebuvo, bet buvo didėjimo tendencija, „-“, statistiškai patikimų rezultatų nebuvo; ND – nedaryta

4.3. Melatonino įtaka nuo T ląstelių priklausomų antikūnų produkcijai

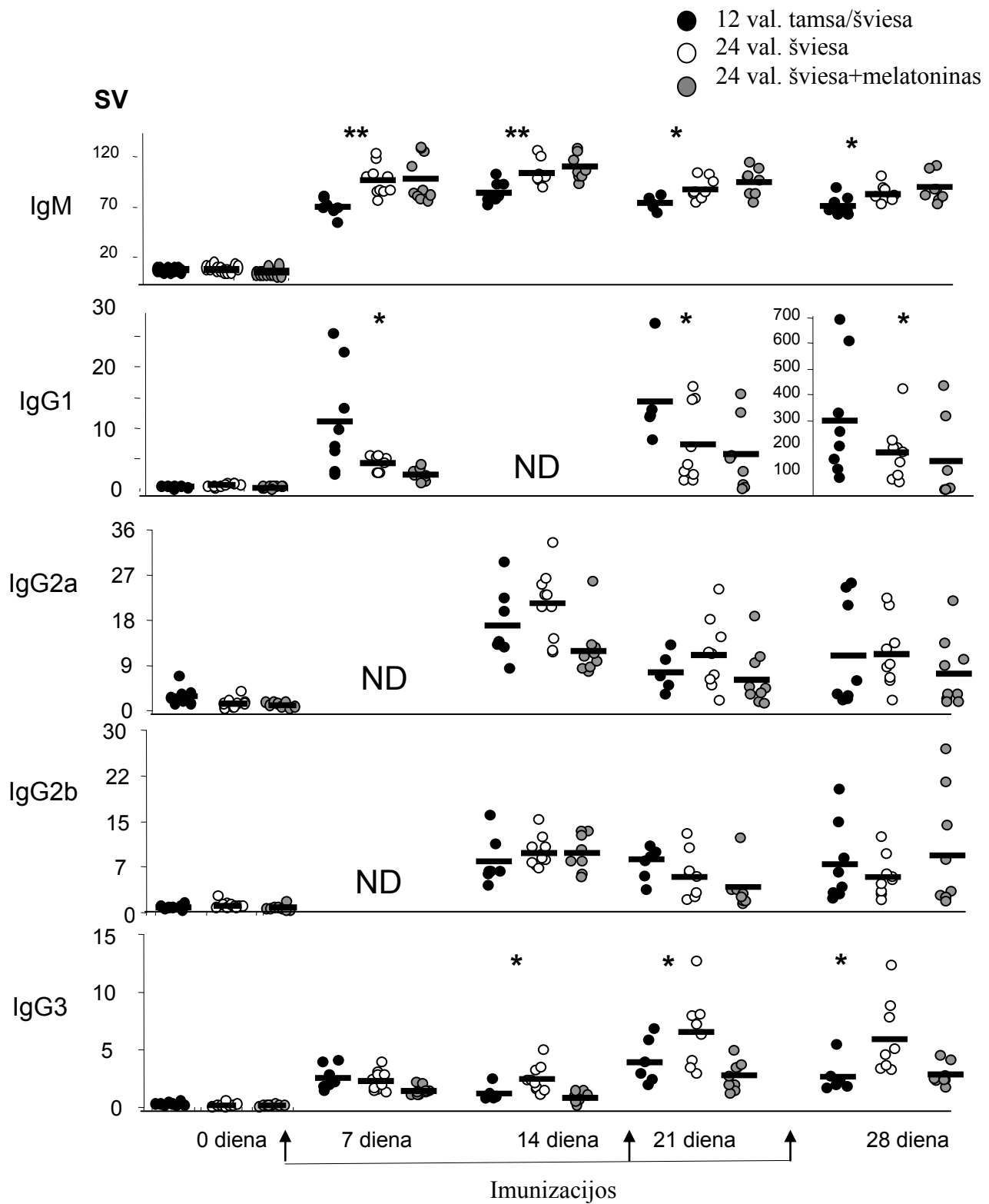
Nuo T ląstelių priklausomų antikūnų produkcijai tirti, BALB/c pelės buvo imunizuotos nuo T ląstelių priklausomu antigenu – TNP-ovalbuminu. Ovalbuminas aktyvuoja CD4⁺ T ląsteles, kurios „padeda“ B ląstelių aktyvacijai. Todėl imuninis atsakas susidaro stipresnis, lyginant su nuo T ląstelių nepriklausomu imuniniu atsaku. Proceso metu susidaro taip vadinamos atminties ląstelės ir, pakartotinai imunizavus tuo pačiu antigenu, imuninis atsakas formuojasi daug greičiau, antikūnų kiekis būna didesnis, o afiniškumas – aukštesnis. Pirminio ir antrinio imuninio atsako analizei, pelės buvo imunizuotos tris kartus. Antra imunizacija buvo po 14 dienų nuo pirmos imunizacijos, trečia 21 dieną nuo pirmos imunizacijos. Kraujas antikūnų kiekiui tirti buvo imamas prieš imunizaciją, 7, 14, 21 bei 28 dieną po imunizacijos. Pirmo ir antro eksperimentų rezultatai yra pateikti 7 bei 8 paveiksluose, atitinkamai. Abiejų tyrimų rezultatai apibendrinanti 6 lentelėje.

Kaip ir nuo T ląstelių nepriklausomų antikūnų produkcijos atveju, pirmame ir antrame eksperimentuose matosi padidėjusi IgM, IgG2a, IgG3 izotipų antikūnų produkcija, kai melatonino sintezė yra sutrikusi (II gr.), lyginant su kontroline grupe, kai melatonino sintezė yra normali (I gr.). Tačiau, IgG1 izotipo TNP-specifinių antikūnų kiekis, sutrikus melatonino sintezei, yra patikimai mažesnis. Žymus mažėjimas stebimas po trečios imunizacijos, kai imuninis atsakas susidaro dėka atminties ląstelių. IgG1 izotipas sudaro didžiausią IgG imunoglobulinų dalį ir yra svarbus vystančiam antriniam imuniniam atsakui.



7 paveikslas. TNP-specifinių antikūnų produkcija imunizuojant nuo T ląstelių priklausomu antigenu.

BALB/c pelės (patelės) buvo imunizuotos T priklausomu antigenu – TNP-ovalbuminu. Kraujas buvo paimtas prieš imunizaciją (0 diena) ir 7, 14, 21, 28 dienomis skaičiuojant nuo pirmos imunizacijos. TNP specifinių antikūnų kiekis buvo nustatytas ELISA metodu. Vienas rutuliukas – antikūnų kiekis sutartiniais vienetais (SV) vienos pelės kraujo serume. Statistiškai patikimi skirtumai tarp I ir II grupių pažymėti žvaigždutėmis: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.



8 paveikslas. TNP-specifinių antikūnų produkcija imunizuojant T priklausomu antigenu.

BALB/c pelės (patinai) buvo imunizuotos T priklausomu antigenu – TNP-ovalbuminu. Kraujas buvo paimtas prieš imunizaciją (0 diena) ir 7, 14, 21, 28 dienomis skaičiuojant nuo pirmos imunizacijos. TNP specifinių antikūnų kiekis buvo nustatytas ELISA metodu. Vienas rutuliukas – antikūnų kiekis sutartiniais vienetais (SV) vienos pelės kraujo serume. Statistiškai patikimi skirtumai tarp I ir II grupių pažymėti žvaigždutėmis: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$; ND – nedaryta.

6 Lentelė. TNP-specifinių antikūnų produkcija imunizuojant T nepriklausomu antigenu. (Visų eksperimentų suvestinė.)

TNP- specifinių antikūnų izotipas	1 Eksperimentas				2 Eksperimentas			
	7 diena	14 diena	21 diena	28 diena	7 diena	14 diena	21 diena	28 diena
IgM	△△	△△	△△	△	△△	△△	△	△
IgG1	▼▼▼	-	▼▼	▼▼	▼	ND	▼	▼
IgG2a	-	△△	△△	↑	ND	↑	↑	-
IgG2b	↓	△△	↓	↑	ND	-	↓	↓
IgG3	-	△△	△△	△△	ND	△	△	△

TNP specifinių antikūnų kiekis buvo nustatytas ELISA metodu. Patikimi skirtumai tarp natūralaus apšvietimo sąlygų ir prie pastovaus apšvietimo sąlygų gyvenančių grupių pažymėti trikampiais: ▼ – prie pastovaus apšvietimo statistiškai patikimas sumažėjimas; △ – prie pastovaus apšvietimo statistiškai patikimas padidėjimas; ↑ – statistiškai patikimumo skirtumo nebuvo, bet buvo stebima didėjimo tendencija; ↓ – statistiškai patikimumo skirtumo nebuvo, bet buvo stebima mažėjimo tendencija; – statistiškai patikimų rezultatų nebuvo; ND – nedaryta. 1 trikampis atitinka $p \leq 0.05$, 2 trikampiai – $p \leq 0.005$, trys trikampiai – $p \leq 0.0005$.

Remiantis literatūrinėmis duomenimis, galima teigti, kad melatoninas stimuliuoja T ląsteles: pelėse, su pašalinta kankorėžine liauka, yra sumažėjusi IL-2 citokino produkcija (citokiną produkuoja aktyvuotos T ląstelės). Veikiant melatoninu limfocitus, padidėja IL-2 sekrecija ir IL-2 receptorių ekspresija [32], be to, proceso metu makrofagai geriau pateikia antigeną T ląstelėms, kadangi padidėja MHC II ekspresija, citokinių produkcija. Antigenu aktyvuotos CD4⁺ T ląstelės, priklausomai nuo aplinkos sąlygų, gali diferencijuotis į T_H1 ar T_H2 ląsteles. T_H1 ląstelės produkuoja tokius citokinus kaip IFN- γ , stimuliuoja uždegiminius procesus bei ląstelinį imuninį atsaką. T_H2 ląstelės sekretuoja priešuždegiminius citokinus IL-4, IL-10 ir yra atsakingos už humoralinį imuninį atsaką [66]. Priklausomai nuo to, kurių T ląstelių yra daugiau (T_H1 ar T_H2), gali būti modifikuojami ir B ląstelių produkuojamu antikūnu izotipai. T_H1 ląstelės stimuliuoja izotipų persijungimą į IgG2a, o T_H2 ląstelės – į IgG1 izotipą: kiek T_H1, tiek T_H2 sąlygoja IgM ir IgG3 antikūnų susidarymą [67,68]. Literatūroje yra duomenų, kad melatoninas įtakoja T_H1/T_H2 ląstelių diferenciaciją, nors šie duomenys yra gana priešaringi. Pagal vienus šaltinius [48,60] melatoninas neturi įtakos diferenciacijai, pagal kitus – skatina diferencijavimą į T_H2 [62].

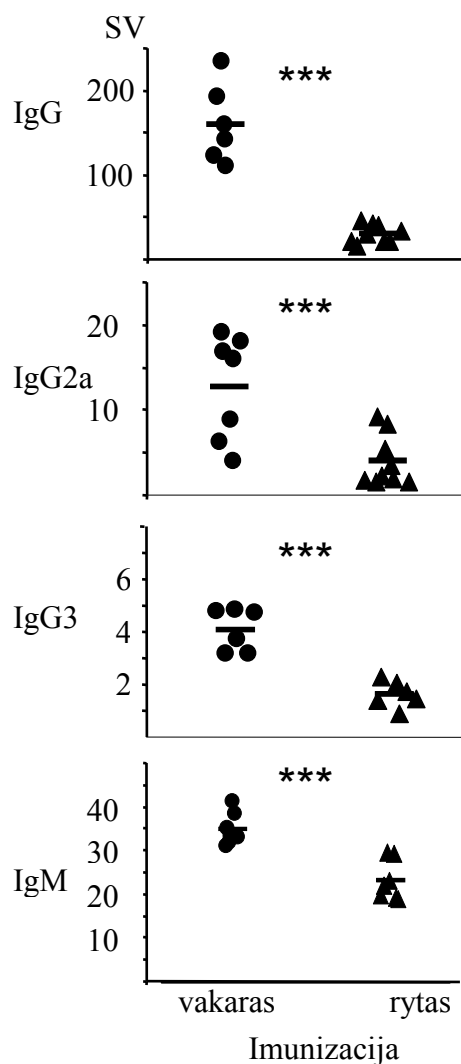
Pagal mūsų duomenis, trūkstant melatoninui, padidėja IgM, IgG2a ir IgG3 antikūnų kiekiai, bei sumažėja IgG1 izotipo antikūnų kiekis, ką galima būtų netiesiogiai susieti su T_H2 T-ląstelių funkcijomis.

Jimenez-Caliani ir kt. [69] pastebėjo, kad, melatoninu gydant peles Mrl/Mpj-Faslpr, efektas priklausė nuo gyvūnų lyties. Mrl/Mpj-Faslpr pelės – tai modelinės pelės, kurioms su amžiumi išsivysto žmogaus sisteminės vilkligės požymiai: uždegiminiai procesai, autoantikūnų sekrecija. Gydant melatoninu pateles, sumažėja uždegiminiai procesai, T_H1 ląstelių sekretuojamų citokinų bei autoantikūnų kiekiai. Priešingai, gydant patinėlius, padidėja T_H1 ląstelių sekretuojamų citokinų bei autoantikūnų kiekiai. Tokį reiškinį galima būtų paaiškinti lytinių hormonų veikimu. Remiantis nagrinėtų eksperimentų su T priklausomu ir T nepriklausomu antigenu rezultatais galima teigti, kad melatonino sintezės sutrikimai nepriklauso nuo pelių lyties, t.y. veikia vienodai patelės ir patinus. Antikūnų sekrecijos pakitimai dėl sumažėjusios melatonino sintezės nepriklauso nuo lytinių hormonų.

4.4. Antikūnų produkcijos priklausomybė nuo imunizacijos laiko

Siekiant įvertinti, kaip cirkadiniai ritmai įtakoja antikūnų produkciją, tyrimų metu pelės buvo imunizuotos ryte (9 val.) ir vakare (9 val.). Eksperimentui buvo paimtos 12 BALB/c linijos pelių, kurios buvo suskirstytos į dvi grupes. Visos pelės buvo imunizuotos nuo T ląstelių priklausomu antigenu – TNP-ovalbuminu. Pirminio ir antrinio imuninio atsako analizei pelės buvo imunizuotos du kartus. Antra imunizacija buvo atlikta po 14 dienų nuo pirmos imunizacijos. Kraujas antikūnų kiekiui tirti buvo imamas 7 ir 21 dieną po imunizacijos. IgM izotipo specifiniai antikūnai buvo tiriami 7 dieną po imunizacijos, IgG1, IgG2A, IgG3 izotipų specifiniai antikūnai - 21 dieną po imunizacijos. Eksperimento rezultatai yra pateikti 9 paveiksle.

Remiantis literatūros duomenimis, limfocitų kiekis žmonių kraujyje priklauso nuo cirkadinių ritmų ir būna didžiausias 22-23 valandą vakaro [70]. Makrofagų/monocitų skaičius pelių peritoniume irgi priklauso nuo cirkadinių ritmų, ir didžiausias jo kiekis būna naktį [71]. Eksperimento metu nustatyta, kad didžiausia visų tirtų antikūnų izotipų koncentracija kraujo serume yra 9 valandą vakaro imunizuotose pelėms. Tai įrodo, kad ir antikūnų titras priklauso nuo imunizacijos laiko. Siekiant iširti kokie procesai lemia gautą reiškinį, planuojama ateityje atlikti papildomus tyrimus.



9 paveikslas. TNP-specifinių antikūnų produkcija imunizuojant T priklausomu antigenu skirtingos paros metu.

BALB/c pelės (patelės) buvo suskirstytos į dvi grupes po 6 peles. Viena pelių grupė buvo imunizuota 9 valandą vakaro, kitą 9 valandą ryto. Visos pelės buvo imunizuotos T priklausomu antigenu – TNP-ovalbuminu. Kraujas buvo paimtas prieš imunizaciją (0 dieną) ir 7, 21 dieną skaičiuojant nuo pirmos imunizacijos. Su 7 dieną po imunizacijos paimtu krauju buvo tirtas IgM izotipas, su 21 dieną po imunizacijos IgG1, IgG2A, IgG3. TNP specifinių antikūnų kiekis buvo nustatytas ELISA metodu. Vienas rutuliukas – antikūnų kiekis sutartiniais vienetais (SV) vienos pelės kraujo serume. Statistiškai patikimi skirtumai tarp grupių pažymėti žvaigždutėmis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$.

4.5. Melatoninas moduliuoja antikūnų produkciją per MT2 receptorių

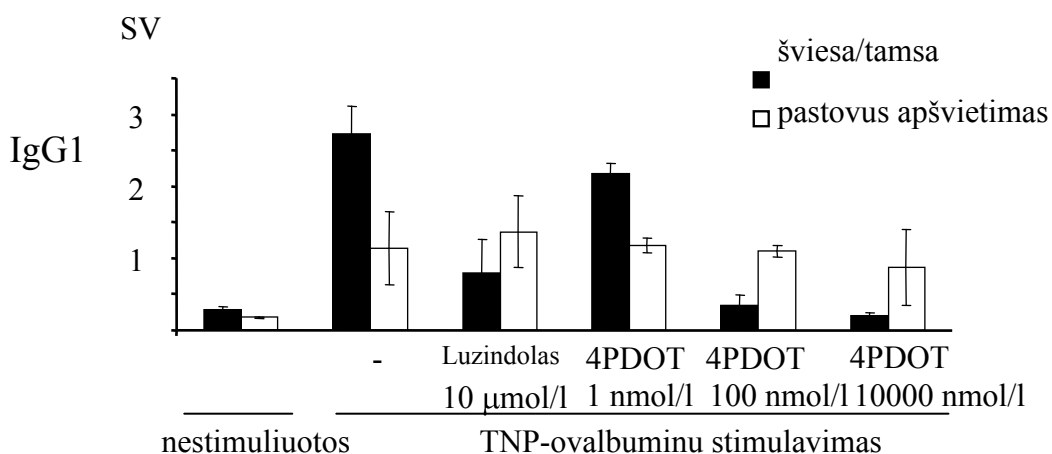
MT1 ir MT2 geriausiai ištirti melatonino receptoriai. Remiantis pateiktais literatūroje rezultatais, galima teigti, kad melatonino MT1 receptorių nedalyvauja T ir B limfocitų funkcijų moduliavime. Pašalinus pelėms MT1 melatonino receptoriaus geną, ir stimuliuojant ląsteles concanavulinu A, kuris yra laikomas limfocitų mitogenu, endogeninis melatoninas

padidino blužnies ląstelių proliferaciją ir IgG koncentracijos padidėjimą [72]. Tai įrodo, kad melatoninas moduliuoja pelių antikūnų produkciją per kitokius receptorių.

Mūsų eksperimentų metu buvo nustatyta, kad melatoninas moduliuoja antikūnų produkciją per MT2 receptorių. Buvo atlikti eksperimentai *in vitro* ir *in vivo* bei panaudoti MT2 receptoriaus inhibitoriai – luzindolas ir 4-P-PDOT. Luzindolas nėra selektyvus MT1 arba MT2, bet jo afiniškumas MT2 yra 15-26 kartus didesnis negu MT1. 4P-PDOT yra selektyvus MT2 receptoriaus ligandas, ir jo afiniškumas MT2 yra 300 kartų didesnis negu MT1. Luzindolas ir 4P-PDOT yra MT2 receptoriaus antagonistai [51].

Eksperimente *in vitro* buvo naudojamos blužnies ląstelės, kurios buvo išskiriamos iš imunizuotų su T ląstelių priklausomų antigenų – TNP-ovalbuminu pelių. Blužnies ląstelės buvo išskiriamos tris savaites po paskutinės imunizacijos arba 42 dienos po pirmos imunizacijos, stimuliuojamos *in vitro* 10 µg/ml TNP-ovalbuminu ir papildomai kai kur pridėjus 10 µmol/l luzindolo ir 1-10000 nmol/l 4-P-PDOT. Ląstelės buvo imamos iš pelių, gyvenančių skirtingomis apšvietimo sąlygomis, t.y. esant pastovaus ir natūralaus apšvietimo sąlygoms. Ląstelės buvo laikomos termostate esant +37°C temperatūrai ir 5% CO₂ koncentracijai 9-10 dienų, ir kiekvieno šulinėlio antikūnų koncentracija ląstelių kultūrų supernatante buvo tiriama ELISA metodu. Ląstelių kultūrų supernatante rasti tik IgG1 izotipo antikūnai. Kitų izotipų antikūnų blužnies ląsteles *in vitro* arba negamino arba gamino labai mažomis koncentracijoms.

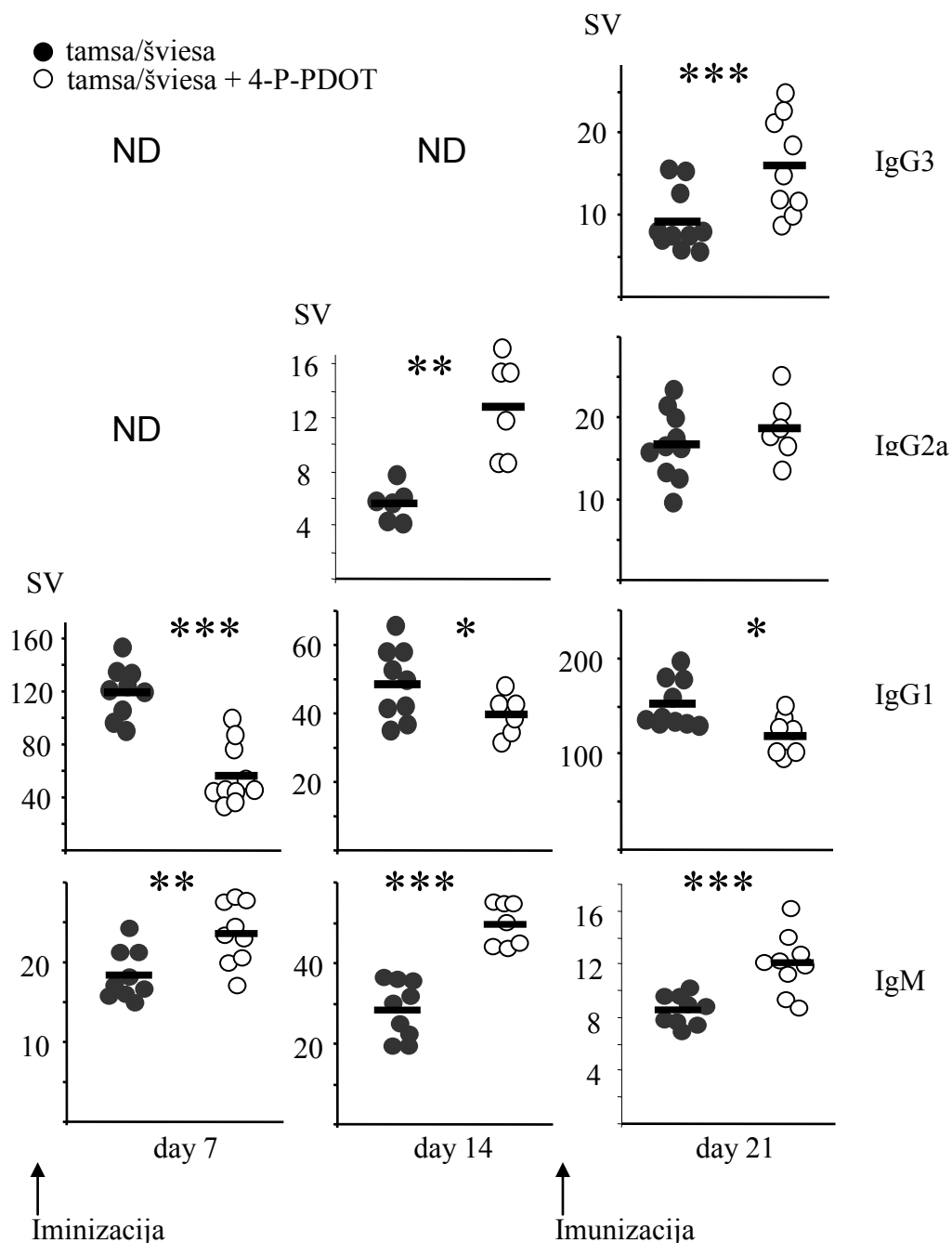
Eksperimentų metu buvo nustatyta, kad pelių, gyvenančių natūraliomis apšvietimo sąlygomis, neaktyvuotos ląstelės produkavo daugiau IgG1 specifinių antikūnų, palyginus su pelių, gyvenančių pastovaus apšvietimo sąlygomis. Ląsteles stimuliuojant TNP-ovalbuminu, padidėjo IgG1 specifinių antikūnų koncentracija ląstelių supernatante. Tačiau, ląstelės išskirtos iš pelių, gyvenančių pastovaus apšvietimo sąlygomis, antikūnų produkavo patikimai mažiau. Ląsteles paveikus luzindolu (10 µmol/l), produkuojamas IgG1 kiekis sumažėjo, kai ląstelės buvo izoliuotos iš pelių, laikomų normaliausių apšvietimo sąlygomis. Ląstelių kultūrose gautose iš pelių, gyvenančių prie pastovaus apšvietimo, ląstelių supernatante IgG1 koncentracija nepakito. Panašus efektas stebimas ir ląsteles veikiant MT2 antagonistu 4-P-PDOT. Gauti rezultatai leidžia teigti, kad melatoninas *in vitro* veikia antikūnų gamybą per MT2 receptorių. Eksperimento rezultatai pateikti 10 paveiksle.



10 paveikslas. **TNP-spezifinių antikūnų produkcija *in vitro* naudojant blužnies ląsteles.**

*Luzindolas ir 4PDOT slopina IgG1 antikūno produkciją naudojant blužnies ląsteles, išskirtos iš gyvenančių natūralaus apšvietimo sąlygomis pelių. Pelės buvo laikomos esant natūraliam bei pastoviam apšvietimui ir imunizuotos TNP-ovalbuminu. Blužnies ląstelės buvo išskiriamos 3 savaites po paskutinės imunizacijos arba 42 dienos po pirmos imunizacijos, stimuliuojamos *in vitro* 10 μg/ml TNP-ovalbuminu ir papildomai pridėjus 10 μmol/l luzindolo arba 1-10000 nmol/l 4-P-PDOT. Po 9 dienų IgG1 antikūnų koncentracija buvo tiriama ELISA metodu.*

Sekantis eksperimentas buvo atliktas *in vivo* siekiant įrodyti, kad melatoninas veikia antikūnų gamybą per MT2 receptorių. Šiam tikslui buvo paimta 20 BALB/c linijos pelių (patelių) 8-9 savaičių amžiaus. Visos pelės buvo suskirstytos į dvi grupes po 10 vnt. ir laikomos esant natūraliam apšvietimui. Eksperimento metu buvo naudotas melatonino MT2 receptoriaus inhibitorius – 4-P-PDOT, kuris vienai pelių grupei buvo leidžiamas viso eksperimento laikotarpį, kitai – visiškai neleidžiamas. Kiekvieną dieną 19-20 valandą, pelėms buvo leidžiami po 0,25 ml (0,25 mg/kg) inhibitoriaus. Praėjus savaitės adaptaciniam periodui, pelės buvo imunizuotos. Kiekvienai pelei į pilvo ertmę buvo leidžiami po 100 μg TNP-ovalbumino. Imunizacija vykdavo 20-21 valandą vakaro bei atlikta 0 ir 14 dienomis. Kraujas buvo imamas 7, 14, 21 dieną nuo pirmos imunizacijos. Eksperimento rezultatai pateikti 11 paveiksle. Pelių grupė, kuriai kasdien buvo leidžiamas 4-P-PDOT, gamino statistiškai patikimai mažiau IgG1 ir daugiau IgM, IgG3 ir IgG2A. Rezultatai slopinant melatonino sintezę bei naudojant MT2 receptoriaus inhibitorių – 4-P-PDOT atitiko rezultatams naudojant šviesą, kaip melatonino inhibitorių. 4-P-PDOT turėjo antikūnų gamybai tą patį poveikį kaip šviesa. Rezultatai *in vivo* ir *in vitro* leidžia teigti, kad melatoninas moduliuoja antikūnų gamybą per MT2 receptorių.



11 paveikslas. MT2 receptoriaus inhibitoriaus – 4-P-PDOT įtaka TNP-specifinių antikūnų produkcijai imunizuojant T priklausomu antigenu – TNP-ovalbuminu.

Buvo paimta 20 BALB/c linijos pelių (patelių) 8-9 savaičių amžiaus. Visos pelės buvo suskirstytos į dvi grupes po 10 vnt. ir laikomos esant natūraliam apšvietimui. Eksperimento metu buvo naudotas melatonino MT2 receptoriaus inhibitorius – 4-P-PDOT, kuris vienai pelių grupei buvo leidžiamas viso eksperimento laikotarpį, kitai – visiškai neleidžiamas. Kiekvieną dieną 19-20 valandą, pelėms buvo leidžiami po 0,25 ml inhibitoriaus. Praėjus savaitės adaptaciniam periodui prie inhibitoriaus įvyko imunizacija. Kiekvienai pelėi į pilvo ertmę buvo leidžiami po 100 µg TNP-ovalbumino. Imunizacija buvo atlikta 0 ir 14 eksperimento dienomis. Kraujas buvo imamas 7, 14, 21 dienų nuo pirmos imunizacijos. TNP specifinių antikūnų kiekis buvo nustatytas ELISA metodu. Vienas rutuliukas – antikūnų kiekis sutartiniais vienetais (SV) vienos pelės kraujo serume. Statistiškai patikimi skirtumai tarp I ir II grupių pažymėti žvaigždutėmis: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$; ND – nedaryta.

5. IŠVADOS

Tiriant melatonino įtaką humoraliniam imunitetui buvo nustatyta:

- Šviesa sukelia melatonino sintezės sutrikimus pelių organizme.
- Esant melatonino sintezės sutrikimams (gyvūnams esant pastovaus apšvietimo sąlygoms) padidėja nuo T ląstelių nepriklausomų antikūnų sintezė. Padidėja visų izotipų (IgM, IgG1, IgG2b ir IgG3) antikūnų kiekis.
 - Melatonino sintezės sutrikimai, esant pastovaus apšvietimo sąlygoms, padidina nuo T ląstelių priklausomų IgM, IgG2a, IgG3 izotipų antikūnų sintezę. Tačiau IgG1 izotipo kiekis yra ryškiai sumažėjęs. Tai yra būdinga pirminiam, o taip pat ir antriniam imuniniam atsakui, kuris yra susijęs su atminties ląstelėmis.
 - Imunizacijos laikas įtakoja antikūnų produkciją. Imunizuojant peles vakare, gaunamas žymiai didesnis antikūnų titras, lyginant su imunizuotomis pelėmis ryte.
 - Eksperimentiškai *in vivo* ir *in vitro* buvo įrodyta, kad melatoninas reguliuoja antikūnų produkciją veikdamas per MT2 receptorių.

Vitalij Černyšiov

6. LITERATŪRA

1. Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Esquifino AI, Perumal SR, Miller SC. Melatonin, immune function and aging. *Immun Ageing* 2005;2:17.
2. Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol Rep* 2009;61:383-410.
3. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y. Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J Biol Chem* 1960;235:1992-7.
4. Paulis L, Simko F. Blood pressure modulation and cardiovascular protection by melatonin: Potential mechanisms behind. *Physiol Res* 2007;56:671-84.
5. Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, *et al.* Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: Possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J* 2004;18:537-9.
6. Naranjo MC, Guerrero JM, Rubio A, *et al.* Melatonin biosynthesis in the thymus of humans and rats. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:781-90.
7. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol* 2004;25:177-95.
8. Abraitis R, Gibas P, Gronow G, *et al.* Žmogaus fiziologija. Kaunas, KMU, 2004.
9. Iuvone PM, Brown AD, Haque R, *et al.* Retinal melatonin production: Role of proteasomal proteolysis in circadian and photic control of arylalkylamine n-acetyltransferase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:564-72.
10. Iuvone PM, Tosini G, Pozdeyev N, Haque R, Klein DC, Chaurasia SS. Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine n-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog Retin Eye Res* 2005;24:433-56.
11. Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA, Weller JL, Klein DC. Melatonin production: Proteasomal proteolysis in serotonin n-acetyltransferase regulation. *Science* 1998;279:1358-60.
12. Rosiak J, Zawilska JB. [14-3-3 proteins--a role in the regulation of melatonin biosynthesis]. *Postepy Biochem* 2006;52:35-41.
13. Schomerus C, Laedtke E, Korf HW. Activation of arylalkylamine n-acetyltransferase by phorbol esters in bovine pinealocytes suggests a novel regulatory pathway in melatonin synthesis. *J Neuroendocrinol* 2004;16:741-9.
14. Ganguly S, Gastel JA, Weller JL, *et al.* Role of a pineal camp-operated arylalkylamine n-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:8083-8.
15. Korf HW. Evolution of melatonin-producing pinealocytes. *Adv Exp Med Biol* 1999;460:17-29.
16. Skene DJ, Timbers SE, Middleton B, *et al.* Mice convert melatonin to 6-sulphatoxymelatonin. *Gen Comp Endocrinol* 2006;147:371-6.
17. Thapan K, Arendt J, Skene DJ. An action spectrum for melatonin suppression: Evidence for a novel non-rod, non-cone photoreceptor system in humans. *J Physiol* 2001;535:261-7.
18. Garidou ML, Vivien-Roels B, Pevet P, Miguez J, Simonneaux V. Mechanisms regulating the marked seasonal variation in melatonin synthesis in the european hamster pineal gland. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:R1043-52.
19. Honma S, Kanematsu N, Katsuno Y, Honma K. Light suppression of nocturnal pineal and plasma melatonin in rats depends on wavelength and time of day. *Neurosci Lett* 1992;147:201-4.
20. Ueno-Towatari T, Norimatsu K, Blazejczyk K, Tokura H, Morita T. Seasonal variations of melatonin secretion in young females under natural and artificial light conditions in fukuoka, japan. *J Physiol Anthropol* 2007;26:209-15.

21. Waldhauser F, Kovacs J, Reiter E. Age-related changes in melatonin levels in humans and its potential consequences for sleep disorders. *Exp Gerontol* 1998;33:759-72.
22. Zhao ZY, Xie Y, Fu YR, Bogdan A, Touitou Y. Aging and the circadian rhythm of melatonin: A cross-sectional study of chinese subjects 30-110 yr of age. *Chronobiol Int* 2002;19:1171-82.
23. Luboshitzky R, Ophir U, Nave R, Epstein R, Shen-Orr Z, Herer P. The effect of pyridoxine administration on melatonin secretion in normal men. *Neuro Endocrinol Lett* 2002;23:213-7.
24. Haldar C, Ahmad R. Photoimmunomodulation and melatonin. *J Photochem Photobiol B*;98:107-17.
25. Wu YH, Swaab DF. The human pineal gland and melatonin in aging and alzheimer's disease. *J Pineal Res* 2005;38:145-52.
26. Malhotra S, Sawhney G, Pandhi P. The therapeutic potential of melatonin: A review of the science. *MedGenMed* 2004;6:46.
27. Lieberman HR. Behavior, sleep and melatonin. *J Neural Transm Suppl* 1986;21:233-41.
28. Herxheimer A, Petrie KJ. Melatonin for the prevention and treatment of jet lag. *Cochrane Database Syst Rev* 2002:CD001520.
29. Parry BL. Jet lag: Minimizing it's effects with critically timed bright light and melatonin administration. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2002;4:463-6.
30. Riemann D, Klein T, Rodenbeck A, *et al.* Nocturnal cortisol and melatonin secretion in primary insomnia. *Psychiatry Res* 2002;113:17-27.
31. Pavel S, Goldstein R, Petrescu M. Vasotocin, melatonin and narcolepsy: Possible involvement of the pineal gland in its patho-physiological mechanism. *Peptides* 1980;1:281-4.
32. Barrett P, Conway S, Morgan PJ. Digging deep--structure-function relationships in the melatonin receptor family. *J Pineal Res* 2003;35:221-30.
33. Jan JE, Espezel H, Appleton RE. The treatment of sleep disorders with melatonin. *Dev Med Child Neurol* 1994;36:97-107.
34. Coleman MP, Reiter RJ. Breast cancer, blindness and melatonin. *Eur J Cancer* 1992;28:501-3.
35. Bartsch H, Buchberger A, Franz H, *et al.* Effect of melatonin and pineal extracts on human ovarian and mammary tumor cells in a chemosensitivity assay. *Life Sci* 2000;67:2953-60.
36. Nowfar S, Teplitzky SR, Melancon K, *et al.* Tumor prevention by 9-cis-retinoic acid in the n-nitroso-n-methylurea model of mammary carcinogenesis is potentiated by the pineal hormone melatonin. *Breast Cancer Res Treat* 2002;72:33-43.
37. Kos-Kudla B, Ostrowska Z, Marek B, *et al.* Circadian rhythm of melatonin in postmenopausal asthmatic women with hormone replacement therapy. *Neuro Endocrinol Lett* 2002;23:243-8.
38. Rimler A, Lupowitz Z, Zisapel N. Differential regulation by melatonin of cell growth and androgen receptor binding to the androgen response element in prostate cancer cells. *Neuro Endocrinol Lett* 2002;23 Suppl 1:45-9.
39. Solis Herruzo JA, Solis Munoz P. Melatonin and oxidative stress. *Rev Esp Enferm Dig* 2009;101:453-9.
40. Peyrot F, Houee-Levin C, Ducrocq C. Melatonin nitrosation promoted by no*2; comparison with the peroxyxynitrite reaction. *Free Radic Res* 2006;40:910-20.
41. Cruz A, Tasset I, Ramirez LM, *et al.* Effect of melatonin on myocardial oxidative stress induced by experimental obstructive jaundice. *Rev Esp Enferm Dig* 2009;101:460-3.

42. Dong WG, Mei Q, Yu JP, Xu JM, Xiang L, Xu Y. Effects of melatonin on the expression of inos and cox-2 in rat models of colitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1307-11.
43. Rodriguez MI, Escames G, Lopez LC, *et al.* Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 2007;42:272-9.
44. Antolin I, Rodriguez C, Sainz RM, *et al.* Neurohormone melatonin prevents cell damage: Effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* 1996;10:882-90.
45. Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, *et al.* Chemical and physical properties and potential mechanisms: Melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem* 2002;2:181-97.
46. Praškevičius A, Ivanovienė L, Stasiūnienė N, *et al.* *Biochemija*. Kaunas, KMU leidykla, 2003.
47. Mildažienė V, Jarmalaitė S, Daugelavičius R. *Laštelės biologija*. Kaunas, VDU leidykla, 2004.
48. Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem* 2002;2:167-79.
49. Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Goberna R, Guerrero JM. Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation of il-2 and il-6 production by human blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol* 1998;92:76-84.
50. Garcia-Perganeda A, Guerrero JM, Rafii-El-Idrissi M, Paz Romero M, Pozo D, Calvo JR. Characterization of membrane melatonin receptor in mouse peritoneal macrophages: Inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive g protein. *J Neuroimmunol* 1999;95:85-94.
51. Dubocovich ML, Markowska M. Functional mt1 and mt2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005;27:101-10.
52. Carrillo-Vico A, Garcia-Perganeda A, Naji L, Calvo JR, Romero MP, Guerrero JM. Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mrna and protein in the mouse immune system. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:2272-8.
53. Naji L, Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Calvo JR. Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. *Life Sci* 2004;74:2227-36.
54. Pozo D, Delgado M, Fernandez-Santos JM, *et al.* Expression of the mella-melatonin receptor mrna in t and b subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen. *FASEB J* 1997;11:466-73.
55. Brydon L, Roka F, Petit L, *et al.* Dual signaling of human mella melatonin receptors via g(i2), g(i3), and g(q/11) proteins. *Mol Endocrinol* 1999;13:2025-38.
56. Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F, Delagrangé P, Canet E, Boutin JA. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: Mt1, mt2 and mt3/qr2. Tissue distribution of mt3/qr2. *Biochem Pharmacol* 2001;61:1369-79.
57. Nosjean O, Ferro M, Coge F, *et al.* Identification of the melatonin-binding site mt3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* 2000;275:31311-7.
58. Barjavel MJ, Mamdouh Z, Raghbate N, Bakouche O. Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *J Immunol* 1998;160:1191-7.
59. Adomaitienė D, Janulevičiūtė N, Kazakevičius R, Vaičiuvėnas V. *Klinikinės imunologijos įvadas*. Kaunas, Šviesa, 2001.
60. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 2005;27:189-200.
61. Cutolo M, Villaggio B, Candido F, *et al.* Melatonin influences interleukin-12 and nitric oxide production by primary cultures of rheumatoid synovial macrophages and thp-1 cells. *Ann N Y Acad Sci* 1999;876:246-54.

62. Raghavendra V, Singh V, Kulkarni SK, Agrewala JN. Melatonin enhances th2 cell mediated immune responses: Lack of sensitivity to reversal by naltrexone or benzodiazepine receptor antagonists. *Mol Cell Biochem* 2001;221:57-62.
63. Kuhlwein E, Irwin M. Melatonin modulation of lymphocyte proliferation and th1/th2 cytokine expression. *J Neuroimmunol* 2001;117:51-7.
64. Shaji AV, Kulkarni SK, Agrewala JN. Regulation of secretion of il-4 and igg1 isotype by melatonin-stimulated ovalbumin-specific t cells. *Clin Exp Immunol* 1998;111:181-5.
65. Akbulut KG, Gonul B, Akbulut H. The effects of melatonin on humoral immune responses of young and aged rats. *Immunol Invest* 2001;30:17-20.
66. Golding B, Zaitseva M, Golding H. The potential for recruiting immune responses toward type 1 or type 2 t cell help. *Am J Trop Med Hyg* 1994;50:33-40.
67. Kracker S, Radbruch A. Immunoglobulin class switching: In vitro induction and analysis. *Methods Mol Biol* 2004;271:149-59.
68. Stevens TL, Bossie A, Sanders VM, *et al.* Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper t cells. *Nature* 1988;334:255-8.
69. Jimenez-Caliani AJ, Jimenez-Jorge S, Molinero P, *et al.* Sex-dependent effect of melatonin on systemic erythematosus lupus developed in mrl/mpj-faslpr mice: It ameliorates the disease course in females, whereas it exacerbates it in males. *Endocrinology* 2006;147:1717-24.
70. Ritchie AW, Oswald I, Micklem HS. Circadian variation of lymphocyte subpopulations: A study with monoclonal antibodies. *Br Med J* 1983;286:1773.
71. Cernysiov V, Gerasimcik N, Mauricas M, Girkontaite I. Regulation of t-cell-independent and t-cell-dependent antibody production by circadian rhythm and melatonin. *Int Immunol*;22:25-34.
72. Drazen DL, Nelson RJ. Melatonin receptor subtype mt2 (mel 1b) and not mt1 (mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity. *Neuroendocrinology* 2001;74:178-84.

SANTRAUKA

Melatoninas – hormonas, kurį produkuoja kankorėžinė liauka, buvo atrastas 1959 metais ir vadinamas “tamsos hormonu“, kadangi jis gaminamas tamsiu paros metu. Maksimalus melatonino kiekis būna vidurnaktį ir iki ryto mažėja, be to šviesa silpnina jo sintezę. Melatoninas reguliuoja biologinį laikrodį, pagerina miegą, stimuliuoja imuninę sistemą bei apsaugo nervų sistemą. Literatūriniai duomenys apie melatonino įtaką imuninei sistemai daugiausia yra apie jo poveikį T ląstelėms. Melatoninas padidina čiobrialaukės dydį bei citokinų produkciją, stimuliuoja T ląsteles pagalbininkes (T_H1) bei aktyvuoja NK ląsteles ir makrofagus. Tačiau, šio hormono įtaka B ląstelių funkcijoms nėra iširta.

Mūsų darbo tikslas buvo iširti melatonino įtaką B ląstelių funkcijoms, t.y. antikūnų susidarymui. Kadangi antikūnų produkcija būna nepriklausoma ir priklausoma nuo T ląstelių, buvo nuspręsta imunizuoti BALB/c peles nuo T ląstelių nepriklausomu ir priklausomu antigenais, bei stebimas specifinių antikūnų susidarymas. Imunizuojamos pelės eksperimento metu buvo laikomos trijose skirtingose sąlygose: esant normalioms šviesos-tamsos ciklo sąlygoms; esant pastoviam apšvietimui ir esant pastoviam apšvietimui, ir papildomai kasdien leidžiant melatoniną.

Buvo nustatyta kad, esant melatonino sintezės sutrikimams (gyvūnams esant pastovaus apšvietimo sąlygoms) padidėja nuo T ląstelių nepriklausomų antikūnų sintezė. Padidėja visų izotipų (IgM, IgG1, IgG2b ir IgG3) antikūnų kiekis.

Melatonino sintezės sutrikimai, esant pastovaus apšvietimo sąlygoms, padidina nuo T ląstelių priklausomų IgM, IgG2a, IgG3 izotipų antikūnų sintezę. Tačiau IgG1 izotipo kiekis yra ryškiai sumažėjęs. Tai yra būdinga pirminiam, o taip pat ir antriniam imuniniam atsakui, kuris yra susijęs su atminties ląstelėmis.

Šviesa sukelia melatonino sintezės sutrikimus pelių organizme.

Imunizacijos laikas turi įtaką antikūnų produkcijai. Imunizuojant peles vakare, gaunamas žymiai didesnis antikūnų titras, lyginant su imunizuotomis pelėmis ryte.

Eksperimentiškai *in vivo* ir *in vitro* buvo įrodyta, kad veikdamas per MT2 receptorių melatoninas reguliuoja antikūnų produkciją pelių organizme.

SUMMARY

Melatonin is a hormone produced by the pineal gland that is secreted during the night in response to the darkness. It reaches a maximum level in the middle of the night, then decrease until the morning. The light inhibits the melatonin synthesis: it is the hormone of the circadian rate/rhythm. When people are exposed to frequent artificial light and they do not get enough sleep, melatonin level is suppressed. The production of melatonin decreases with age. Melatonin regulates and controls biological clock: it improves sleep, stimulates the immune system, and protects the central nervous system. This hormone is an extremely powerful antioxidant. The literature data about melatonin effect on immune system are mostly about the T cells and macrophages. Melatonin increases the thymus weight. It stimulates the function of T_{H1} T cells, increases cytokine production by T cells. Melatonin also activates NK cells and macrophages. However, the role of melatonin on the function of B cells is not investigated very well.

We have investigated the role of melatonin on the function of B cells, e.g. production of specific antibodies. For this purpose, BALB/c mice were immunized with T independent and T dependent antigen. We looked for production of specific antibodies in animals living at three different conditions. The first group of mice was kept on the normal light/night cycle conditions. The second group of mice was exposed all the time to artificial light, which causes decreased synthesis of melatonin. The third group of mice was exposed to the light (as the second group), but the animals were treated daily with melatonin.

We obtained that decreased synthesis of melatonin (expose to artificial light for 24 h per day) correlates with increased titre of antibodies after immunization with T independent antigen. The level of T dependent antibodies of IgM, IgG2a, IgG2b and IgG3 isotypes were also increased when the melatonin synthesis was disrupted. However, the antigen specific antibodies of IgG1 isotype were significantly decreased when the mice were exposed to the light. The daily treatment with melatonin reversed the antibody level to normal. The antibody concentration in the sera of mice kept at normal lighting was significantly higher when the immunizations were performed in the evening. The action of melatonin on B cells via MT2 receptor was shown *in vitro* and *in vivo*.

PADĖKA

Dėkoju darbo vadovei dr. Irutei Girkontaitei už kantrybę, pagalbą, vertingus patarimus, atkaklumą bei pamokymus.

Tai pat – dr. Nataljai German už kritines pastabas, pagalbą, moralinę paramą ir vertingus patarimus.

Tai pat – Natalijai Gerasimčik už pagalbą.

Tai pat – Jurgitai Juršėnaitei už taiklias pastabas ir pagalbą, bei Zeniai Valockienei už tai, kad sukūrė pačią draugiškiausią atmosferą.

Dėkoju Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centro Imunologijos departamento Biomodelių laboratorijos darbuotojams (ypač Dianai Kazlauskaitei) už pelių priežiūrą.

Dėkoju Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centro Imunologijos departamento vadovui dr. M. Mauricui už suteiktas galimybes ir pagalbą, ruošiant šį darbą.

Mokslo ir studijų fondui už suteiktą finansavimą.