

VILNIAUS UNIVERSITETAS

VITALIJ ČERNYŠIOV

MELATONINO GAMYBOS SUTRIKIMO POVEIKIS BALB/c
LINIJOS PELIŲ ANTIKŪNŲ GAMYBAI IR LEUKOCITŲ
MIGRAVIMUI

Daktaro disertacija,
Biomedicinos mokslai, Biologija (01 B)

Vilnius, 2014 metai

Disertacija rengta 2010-2014 metais Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakultete, Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje ir Valstybiniame mokslinių tyrimų institute Inovatyvios medicinos centre.

Mokslinis vadovas:

Doc. dr. Irutė Girkontaitė (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas, Inovatyvios medicinos centras, biomedicinos mokslai, biologija - 01B).

Konsultantė:

Prof. dr. Lilija Kalėdienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B).

Turinys

SANTRUMPOS.....	6
1. ĮVADAS	8
1.1. Problemos aktualumas	8
1.2. Darbo tikslas	9
1.3. Darbo uždaviniai.....	9
1.4. Ginamieji teiginiai	9
1.5. Darbo mokslinis naujumas ir reikšmė	10
2. LITERATŪROS APŽVALGA	11
2.1. Melatoninas ir jo reikšmė	11
2.1.1. Melatonino istorinė apžvalga.....	11
2.1.2. Pagrindinė melatonino gamyba	12
2.1.3. Papildoma melatonino gamyba.....	14
2.1.4. Įvairių veiksnių įtaka melatonino koncentracijai organizme.....	15
2.1.4.1. Melatonino koncentracijos priklausomybė nuo metų laiko.....	15
2.1.4.2. Melatonino koncentracijos priklausomybė nuo amžiaus.....	15
2.1.4.3. Melatonino koncentracijos priklausomybė nuo mitybos įpročių .	16
2.1.4.4. Melatonino koncentracijos priklausomybė nuo darbo sąlygų	16
2.2. Melatonino fiziologinė reikšmė	18
2.3. Melatonino veikimo mechanizmai	21
2.3.1. Melatonino membraniniai MT1 ir MT2 receptoriai	21
2.3.1.1. Melatonino membraninių receptorių MT1 ir MT2 raiška ir funkcijos, susijusios su imunine sistema	23
2.3.2. <i>MT3/CR2</i> receptoriai.....	25
2.3.3. Melatonino branduoliniai receptoriai ir ROR γ receptoriai	25
2.3.3.1. ROR α receptoriaus raiška ir funkcijos, susijusios su imunine sistema	27
2.3.3.2. ROR γ receptoriaus raiška ir funkcijos, susijusios su imunine sistema	29
2.4. Melatoninas ir imuninė sistema	30
2.4.1. Melatonino poveikis imuninei sistemai, atliekant eksperimentus gyvame organizme	31
2.4.2. Melatonino gamybos slopinimo poveikis imuninei sistemai	33
2.4.3. Melatonino poveikis įgimtam imunitetui	34
2.4.4. Melatonino poveikis T limfocitams.....	38
2.4.5. Melatonino poveikis B limfocitams	40
3. METODAI	42
3.1. Eksperimentiniai gyvūnai	42
3.2. Gyvūnų kraujo paėmimas ir serumo gavimas	42
3.3. BALB/c linijos pelių imunizacija nuo T ląstelių nepriklausomu ir nuo T ląstelių priklausomu antigenais.....	43

3.4. Antikūnų produkcijos tyrimas <i>in vitro</i> sąlygomis	43
3.5. TNP-specifinių antikūnų nustatymas ELISA metodu	44
3.6. Ląstelių išskyrimas iš pelių organų.....	45
3.7. Tėkmės citometrija	45
3.8. Ląstelių sukibimo metodas	47
3.9. Ląstelių gryninimas.....	48
3.10. RNR išskyrimas	48
3.11. Komplementarios DNR sintezė	49
3.12. Tikrojo laiko polimerazinė grandininė reakcija.....	49
3.13. Plazmidinės DNR gryninimas	51
3.14. Endonukleazinis skaldymas	52
3.15. DNR elektroforezė.....	52
3.16. Ligavimas.....	53
3.17. Kompetentinių <i>E.coli</i> ląstelių paruošimas transformacijai.....	53
3.18. „Karščio šoko“ transformacija.....	53
3.19. GST chimerinių baltymų ekspresija	54
3.20. GST chimerinių baltymų gryninimas	54
3.21. Monokloninių antikūnų gavimas	55
3.22. Imunoblotingas	57
3.23. Statistiniai metodai	57
4. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	59
4.1. Pastovaus apšvietimo įtaka melatonino koncentracijai BALB/c linijos pelių kraujo serume.....	59
4.2. Melatonino poveikis humoraliniam imunitetui	60
4.2.1. Melatonino įtaka nuo T ląstelių nepriklausomai antikūnų produkcijai	61
4.2.2. Melatonino įtaka nuo T ląstelių priklausomai antikūnų produkcijai ...	64
4.2.3. Antikūnų produkcijos priklausomybė nuo imunizacijos paros laiko ..	67
4.2.4. MT2 receptoriaus vaidmuo melatoninui moduluojant antikūnų produkciją	69
4.2.5. Melatonino membraninių receptorių transkriptų raiška blužnies B220 ⁺ B limfocituose ir limfinių mazgų T _H 0 limfocituose.....	72
4.3. MT1 ir MT2 melatonino receptorių tyrimas limfocituose naudojant monokloninius antikūnus.....	75
4.3.1. MT1 ir MT2 receptorių baltymų fragmentų klonavimas.....	75
4.3.2. Monokloninių antikūnų prieš MT1 ir MT2 receptorius charakterizavimas	77
4.3.3. MT1 ir MT2 melatonino receptorių raiškos tyrimas tėkmės citometrijos metodu	79
4.4. Melatonino branduolinių ir MT3/CR2 receptorių transkriptų raiška limfocituose	81
4.5. Melatonino sintezės sutrikimo poveikis imuninės sistemos organų ląstelių skaičiui ir leukocitų migravimui į uždegimo vietą	84

4.5.1. Leukocitų migravimo į uždegimo vietą priklausomybė nuo imunizacijos paros laiko	88
4.5.2. MT2 receptoriaus slopiklio 4P-PDOT įtaka leukocitų migravimui. ...	90
4.6. Melatonino gamybos sutrikimo poveikis granulocitų migracijai	92
4.6.1. Granulocitų migracijos priklausomybė nuo fMLP injekcijos paros laiko	93
4.6.2. Melatonino receptorių transkriptų raiška granulocituose	94
4.6.3. MT2 receptoriaus vaidmuo melatoninui reguliuojant granulocitų migravimą	96
4.6.4. CD18 molekulių raiškos granulocituose priklausomybė nuo paros laiko ir melatonino gamybos ciklo	97
4.6.5. Melatonino poveikis granulocitų sukibimo savybėms	99
4.7. Rezultatų apibendrinimas	101
5. IŠVADOS	107
6. LITERATŪROS SĄRAŠAS	108
7. PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS	128
7.1 Straipsniai	128
7.2 Tezės	128
8. KONFERENCIJOS, SEMINARAI	130
8.1. Konferencijos	130
8.2. Seminarai	132
9. PADĖKA	134

SANTRUMPOS

- 4P-PDOT – (angl. *4-Phenyl-2-propionamidotetralin*) - 4-Fenil-2-propionamidotetralinas;
- APC – (angl. *Allophycocyanin*) – alofikocianinas;
- cGMP – (angl. *Cyclic guanosine monophosphate*) – ciklinis guanozino monofosfatas
- CR2 – (angl. *Quinone reductase 2*) – chinono reduktazė 2;
- ELISA – (angl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) – imunofermentinė analizė;
- ERK – (angl. *Extracellular-signal-regulated kinases*) – tarpląstelinio signalo reguliuojamos kinazės;
- FCS – (angl. *Fetal calf serum*) – fetalinis veršelių serumas;
- FITC – (angl. *Fluorescein isothiocyanate*) – fluoresceino izotiocianatas;
- fMLP – (angl. *Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine*) – formyl-metionil-leucil-fenilalaninas;
- GABA – (angl. *Gamma - aminobutyric acids*) – gama-amino sviesto rūgštis;
- G-CSF – (angl. *Granulocyte colony stimulating factor*) – granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius;
- GM-CSF – (angl. *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) – granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius;
- ICAM – (angl. *Intercellular adhesion molecule*) – tarpląstelinė sukibimo molekulė;
- IUPHAR – (angl. *International Union of Basic and Clinical Pharmacology*) – tarptautinė pagrindinės ir klinikinės farmakologijos sąjunga;
- kDNR – (angl. *Complementary deoxyribonucleic acid*) – papildoma deoksiribonukleorūgštis;

LFA – (angl. *Lymphocyte function-associated antigen*) – su limfocitų funkcija susijęs antigenas;

LPS – (angl. *Lipopolysaccharides*) – lipopolisaharidas;

MAP2K – (angl. *Mitogen-activated protein kinase kinase*) – mitogenu aktyvuotos baltymų kinazės kinazė;

MHC – (angl. *Major histocompatibility complex*) – pagrindinis audinių suderinamumo kompleksas;

MT1R, MT2R, MT3/HR2R, ROR α R, ROR β R – melatonino receptoriai;

NADH – (angl. *Reduced nicotinamide adenine dinucleotide*) – redukuotas nikotinamido adenino dinukleotidas;

NADP – (angl. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) – nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas;

NK – (angl. *Natural killer cells*) – ląstelė – natūralus žudikas;

PE – (angl. *Phycoerythrin*) – fikoeritinas;

PerCP – (angl. *Peridinin chlorophyll*) – peridininio chlorofilo baltymas;

PHA – (angl. *Phytohemagglutinin*) – fitohemagliutinas;

T_C – (angl. *T cytotoxic*) – citotoksiniai T limfocitai;

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

TLR – (angl. *Toll-like receptors*) – Toll receptoriai;

TNF α – (angl. *Tumor necrosis factor alpha*) – navikų nekrozės faktorius alfa;

T_{regs} – T reguliatoriniai limfocitai;

DMEM – (angl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) – Dulbecco modifikuota Eagle terpė;

HT – (angl. *hypoxanthine-thymidine*) – hipoksantino, timidino terpė;

HAT – (angl. *hypoxanthine-aminopterin-thymidine*) – hipoksantino, aminopterin, timidino terpė;

ŠT – apšvietimo sąlygos: 12 val. šviesa/12 val. tamsa;

ŠŠ – apšvietimo sąlygos: 24 val. šviesa.

1. ĮVADAS

1.1. Problemos aktualumas

Melatoninas – tamsiuoju paros metu kankorėžinėje liaukoje gaminamas hormonas [1]. Šviesa nakties metu slopina melatonino produkciją [2]. Melatoninas yra svarbus organizmo biologinis reguliatorius. Jis reguliuoja paros ir sezono bioritmus, gliukozės metabolizmą, lytinių liaukų aktyvumą, širdies ir kraujagyslių sistemos veiklą, virškinimo trakto veiklą, kitų endokrininių liaukų aktyvumą, imuninės sistemos veiklą [3-9]. Sukaupta daug duomenų apie žalingą pamaininio darbo poveikį melatonino gamybos reguliacijai ir žmogaus organizmo homeostazei. 2007 metais Pasaulinei Sveikatos Organizacijai priklausanti Tarptautinė vėžio tyrimų agentūra priskyrė pamaininį darbą prie tikėtinų kancerogenų grupės (A2 grupė) [10]. Tai pat žinoma, kad dirbant pamaininį darbą padidėja rizika susirgti širdies ir kraujagyslių sistemos ligomis, metabolinio sindromo liga ir diabetu [11].

Literatūroje paskelbta nemažai duomenų apie imunoreguliacines melatonino savybes. Melatoninas panaikina su amžiumi susijusias užkrūčio liaukos ir blužnies involiucijas, skatina imuninės sistemos ląstelių proliferaciją, pagerina humoralinį imuninį atsaką [12-14]. Taip pat panaikina dėl intoksikacijų sukeltą imunosupresiją: atstato limfocitų skaičių, blužnies ir užkrūčio liaukos aktyvumą [15]. Pašalinus pagrindinę melatonino gamybos vietą – kankorėžinę liauką: sumažėja imuninės sistemos organų masė, sutrinka imuninės sistemos organų raida ir imuninis atsakas [16-18]. Tyrinėjant imunoreguliacines melatonino savybes daugeliu atvejų taikomi tyrimo metodai, kurių metu atliekamos melatonino injekcijos arba pašalinama pagrindinė melatonino gamybos vieta - kankorėžinė liauka. Visgi, ankstesnių eksperimentų metu melatonino gamyba retai buvo slopinama natūraliai, laikant gyvūnus pastovaus apšvietimo sąlygomis. Iki šiol nebuvo įvertintas melatonino poveikis imuninei sistemai natūraliai melatonino

gamybą slopinančioje aplinkoje. Literatūroje nėra duomenų, kaip gyvūnų laikymas natūraliai melatonino gamybą slopinančioje aplinkoje veikia antikūnų gamybą, ląstelių skaičių imuninės sistemos organuose ir uždegimo vietoje bei granulocitų migravimą. Taip pat literatūroje nėra duomenų apie antikūnų gamybos priklausomybę nuo imunizacijos paros laiko. Žinoma, kad melatoninas slopina granulocitų migraciją veikdamas per endotelio ląsteles, tačiau nėra aišku, ar melatoninas galėtų reguliuoti granulocitų migraciją veikdamas per pačius granulocitus.

1.2. Darbo tikslas

Nustatyti melatonino gamybos sutrikimo poveikį BALB/c linijos pelių imuninei sistemai.

1.3. Darbo uždaviniai

1. Nustatyti melatonino vaidmenį reguliuojant nuo T ląstelių priklausomą antikūnų produkciją.
2. Nustatyti melatonino vaidmenį reguliuojant nuo T ląstelių nepriklausomą antikūnų produkciją.
3. Pagaminti monokloninius antikūnus prieš pelių MT1 ir MT2 receptorius ir nustatyti melatonino membraninių receptorių raišką BALB/c linijos pelių limfocituose.
4. Nustatyti melatonino įtaką leukocitų migravimui į uždegimo vietą.
5. Nustatyti melatonino vaidmenį fMLP indukuotam granulocitų migravimui.

1.4. Ginamieji teiginiai

1. Melatoninas reguliuoja BALB/c linijos pelių humoralinį imuninį atsaką.
2. Melatoninas slopina BALB/c linijos pelių leukocitų migravimą į uždegimo vietą veikdamas per MT2 receptorių.

3. Melatoninas slopina fMLP indukuotą BALB/c linijos pelių granuliocitų migravimą iš kraujo į pilvo ertmę veikdamas per MT2 ir *MT3/CR2* receptorius.

1.5. Darbo mokslinis naujumas ir reikšmė

Pirmą kartą buvo nustatyta, kad melatoninas moduliuoja nuo T ląstelių priklausomą antikūnų gamybą veikdamas per blužnies B limfocitų MT2 receptorių.

Pirmą kartą buvo nustatyta, kad melatoninas tiesiogiai (nedalyvaujant T ląstelėms) gali veikti B ląstelių aktyvinimą ir antikūnų sekreciją.

Pagaminti monokloniniai antikūnai prieš pelių MT1 ir MT2 receptorius. Naudojant šiuos monokloninius antikūnus, blužnies B limfocituose nustatyta MT2 melatonino receptoriaus raiška.

Pirmą kartą buvo nustatyta antikūnų gamybos priklausomybė nuo imunizacijos paros laiko.

Pirmą kartą buvo nustatyta, kad melatoninas, veikdamas per granuliocitų *MT3/CR2* receptorių, slopina granuliocitų sukibimo savybes.

Šio darbo rezultatai papildė dabartines turimas žinias apie melatonino poveikį imuninei sistemai ir padeda suprasti jo veikimo mechanizmus.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Melatoninas ir jo reikšmė

2.1.1. Melatonino istorinė apžvalga

1958 metais dermatologas Aaron Bunsen Lerneris su kolegomis atrado kankorėžinėje liaukoje gaminamą hormoną ir pavadino jį melatoninu [1]. Profesorius A.B. Lerneris dirbo Jeilio universitete ir domėjosi odos pigmentacija. 1955 metais vienas iš Lernerio grupės narių Yoshijata Takahashi perskaitė 1917 metų straipsnį, kuris paskatino pradėti tyrimus, svarbius melatonino atradimui [19]. Šiame straipsnyje du mokslininkai, C.P. McCordas ir P.P. Allenas, paskelbė, kad dėl karvių kankorėžinės liaukos ekstrakto poveikio buožgalvių oda tampa permatoma [20]. A.B. Lerneris susidomėjo, koks cheminis junginys kankorėžinėje liaukoje lemia šiuos procesus. Tais pačiais metais prasidėjo keturis metus trukęs projektas. Projekto metu buvo ištirta daugiau nei 250000 jaučių kankorėžinių liaukų [19]. Šio tyrimo rezultatas - 1958 metais gegužės 20 dieną pirmą kartą moksliniame leidinyje buvo paminėtas melatoninas, kurio pirmoji ištirta savybė – gebėjimas slopinti melanocitų gamybą stimuliuojantį hormoną [1].

Pavadinimas „melatoninas“ sudarytas iš dviejų žodžių:

(mela-) dėl jo poveikio melanocitams,

(-toninas) žodžio „serotoninas“ dalis, nes būtent iš serotonino gaminamas melatoninas [21].

Kitos svarbios melatonino tyrinėjimo datos:

1960 m. – kankorėžinėje liaukoje vykstančios melatonino biosintezės etapų nustatymas [22].

1963 m. – aptikta, kad melatonino gamybą kankorėžinėje liaukoje slopina šviesa [2].

1965 m. – pateikti duomenys, kad pagrindinis melatonino gamybos laikas – naktis, o cirkadinis melatonino gamybos ritmas priklauso nuo šviesaus ir tamsaus paros laiko [23].

1967 m. – kankorėžinės liaukos pašalinimas skatina auglių augimą [24].

1968 m. – pirmoji publikacija apie melatonino reikšmę miegui [25].

1972 m. – nustatyta, kad melatoniną gali gaminti ne tik kankorėžinės liaukos ląstelės, bet ir kitos organizmo ląstelės, pvz.: eritrocitai [26].

1983 m. – melatoninas reguliuoja cirkadinius ritmus [27].

1986 m. – melatoninas gali daryti poveikį imuninei sistemai [28].

1993 m. – nustatyta, kad melatoninui būdingos antioksidacinės savybės [29].

1994-1995 m. – klonuoti ir aprašyti melatonino membraniniai receptoriai - MT1 ir MT2 [30, 31].

1994 m. – aptikti melatonino branduoliniai receptoriai [32].

1996 m. – identifikuotas *MT3* melatonino receptorių [33]. Pirmiausiai jis buvo aptiktas žiurkėno audiniuose, vėliau buvo atrastas *MT3* analogas žmogaus organizme – fermentas chinono reduktazė 2 (CR2) [34].

2.1.2. Pagrindinė melatonino gamyba

Melatonino gamyba pagal gamybos vietą skirstoma į du tipus:

- pagrindinė – vyksta kankorėžinėje liaukoje;
- papildoma – vyksta kitose organizmo ląstelėse.

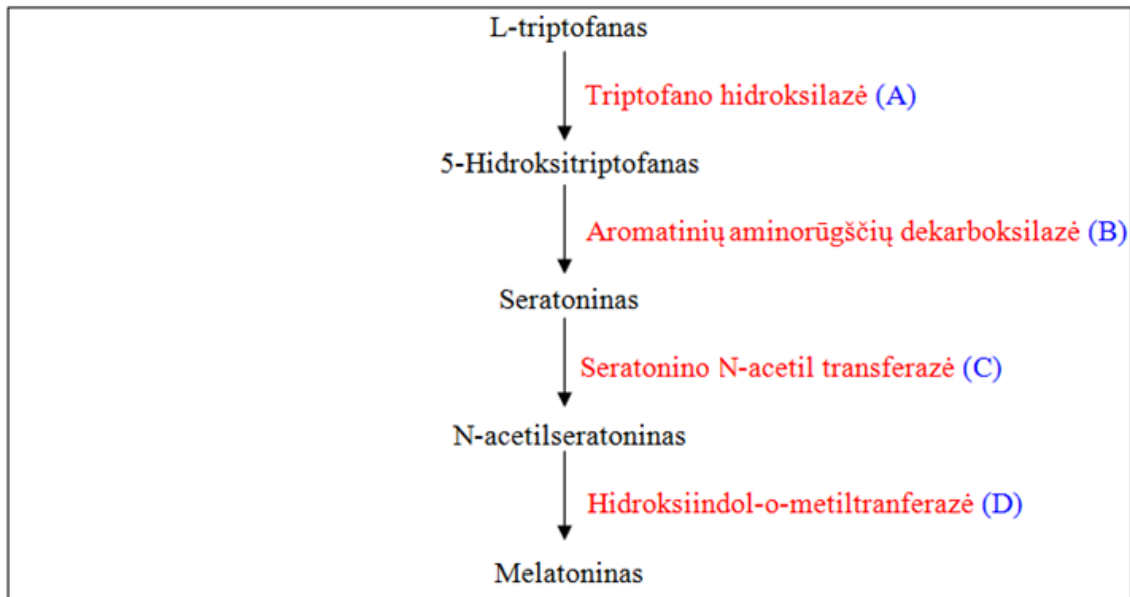
Pagrindinė melatonino gamyba vyksta kankorėžinės liaukos ląstelėse [35]. Ji priklauso nuo dienos ir nakties paros ciklo [35]. Šviesa dienos metu slopina melatonino gamybą [2]. Nakties metu, tamsoje vyksta melatonino sintezė [23]. Kankorėžinėje liaukoje sintetintas melatoninas su krauju išnešiojamas po visą organizmą ir veikia organus, kuriuose yra melatonino receptoriai [36].

Organizmo sritys, kurios dalyvauja melatonino gamyboje: akies tinklainė, pagumburyje esantys priešchiazminiai branduoliai, kankorėžinė liauka. Dienos

metu šviesos informacija nuo akies tinklainės per regos nervą patenka į pagumburio priešchiazminius branduolius. Pagumburio priešchiazminiai branduoliai – pagrindiniai organizmo cirkadinių ritmų reguliatoriai. Po šviesos signalo pagumburio priešchiazminiai branduoliai išskiria gama-amino sviesto rūgštį (GABA), kuri slopina paraventriculiniuose branduoliuose L-glutamato išskyrimą. Dėl šio slopinimo stuburo smegenų intramidolateraliniai branduoliai neišskiria noradrenalino, dėl to kankorėžinėje liaukoje nevyksta melatonino gamyba. Naktį, kai nėra šviesos signalo, priešchiazminiai branduoliai produkuoja glutamatą, kuris skatina paraventriculinius branduolius taip pat gaminti glutamatą, nervinis signalas keliauja į stuburo smegenų intramidolateralinius branduolius ir pasiekia viršutinį kaklinį mazgą. Viršutiniame kakliniame mazge nervinės galūnės produkuoja noradrenaliną, kuris yra tiesioginis melatonino gamybos aktyvintojas. Jis aktyvina kankorėžinės liaukos ląstelių membranoje esančius α ir β adrenoreceptorius. α adrenoreceptoriaus stimuliavimo pasekmė kankorėžinės liaukos ląstelėse – kalcio koncentracijos padidėjimas, β adrenoreceptoriaus – fermento kalcio ir kalmodulino baltymų kinazės aktyvinimas. Dėl šių procesų kankorėžinės liaukos ląstelėse smarkiai išauga (žiurkių ląstelėse iki 100 kartų) cAMP lygis. Nuo cAMP priklausoma baltymų kinazė fosforilina serotonin-N-acetiltransferazę ir fermentas tampa katalitiškai aktyvus. Serotonino-N-acetiltransferazė – pagrindinis melatonino gamybos fermentas, po jo aktyvinimo prasideda melatonino sintezė. Esant mažam cAMP lygiui kankorėžinės liaukos ląstelėse, serotonino-N-acetiltransferazė būna neaktyvi [37-43].

Melatonino biosintezės schema pateikta 1 paveiksle. Melatoninas sintetinamas iš amino rūgšties triptofano, susidarant tarpiniam produktui – serotoninui (biologiškai aktyvi medžiaga, hormonas, monoamininis neuromediatorius, sintetinamas smegenyse) [44]. Pagrindiniai du fermentai, dalyvaujantys melatonino gamyboje - serotonino-N-acetiltransferazė ir triptofano hidroksilazė [39]. Melatonino katabolizmo procesas vyksta kepenyse, o

nagrinėjamo hormono gyvavimo pusperiodis yra nuo 20 iki 60 minučių. Pagrindinis melatonino katabolizmo produktas – 6-sulfoksimelatoninas [45-47].



1 pav. Melatonino sintezė iš triptofano.

Raudona spalva pažymėti fermentai, mėlyna – biosintezės etapai.

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

2.1.3. Papildoma melatonino gamyba

Papildoma arba nekankorėžinė melatonino gamyba vyksta skirtinguose stuburinių gyvūnų organuose. Ląstelės, gaminančios melatoniną, turi tuos pačius melatonino biosintezės fermentus kaip ir kankorėžinės liaukos ląstelės [48]. Papildoma melatonino gamyba buvo aptikta šiuose organuose: akies tinklainėje [49], virškinimo trakte [50], odoje [51], Harderian liaukoje [52], vidinės ausies ląstelėse [53], kiaušidėse [54], sėklidėse [55]. Taip pat papildoma melatonino gamyba aptikta imuninės sistemos ląstelėse: žmogaus limfocituose [56], putliosiose ląstelėse [57], Jurkat linijos ląstelėse [58], kaulų čiulpų ląstelėse [59] ir timocituose [60]. Melatonino gamyba akies tinklainėje priklauso nuo šviesos signalo, kituose organuose melatonino gamyba nepriklauso nuo apšvietimo [61]. Virškinimo trakto ląstelėse melatonino gamyba didėja ilgai nevalgčius [62]. Papildomu būdu pagamintas melatoninas pasižymi intrakriniu, parakriniu ir

autokriniu poveikiu [61]. Kiti autoriai nurodo, kad nekankorėžinėje liaukoje pagamintas melatoninas veikia tik autokriniu ir parakriniu būdu [48, 63]. Papildoma melatonino gamyba neturi įtakos melatonino koncentracijai kraujyje. Melatonino koncentracija virškinimo trakto audiniuose 10-100 kartų pranoksta melatonino koncentraciją kraujyje [62].

2.1.4. Įvairių veiksnių įtaka melatonino koncentracijai organizme

Pagrindinis išorinis veiksnys, reguliuojantis melatonino produkciją, yra šviesos signalas. Taip pat melatonino koncentracija žmogaus organizme priklauso nuo amžiaus, mitybos įpročių ir darbo sąlygų.

2.1.4.1. Melatonino koncentracijos priklausomybė nuo metų laiko

Nakties, kai gaminamas melatoninas, trukmė priklauso nuo sezoniškumo, todėl nuo sezoniškumo priklauso ir melatonino gamybos trukmė. Iš pradžių šis efektas buvo nustatytas tik gyvūnuose, tačiau vėliau panašūs rezultatai gauti ir žmogaus organizme [64, 65]. 1991 metais Veihras atliko tai patvirtinantį eksperimentą. Naudojant dirbtiną šviesą mokslininkas vieną savaitę laikė šešis savanorius prie „vasaros“ apšvietimo sąlygų (16 val. šviesa/8 val. tamsa) ir keturias savaites prie „žiemos“ apšvietimo sąlygų (10 val. šviesa/14 val. tamsa). „Vasaros“ apšvietimo sąlygomis žmonių melatonino gamybos trukmė buvo $10,3 \pm 0,8$ valandų. „Žiemos“ apšvietimo sąlygomis melatonino gamybos trukmė padidėjo iki $12,5 \pm 1,8$ valandų [66].

2.1.4.2. Melatonino koncentracijos priklausomybė nuo amžiaus

Melatonino gamyba prasideda tuojau po gimimo. Jau 5-12 savaičių sveiko vaiko šlapime galima aptikti 6-sulfoksimelatoniną. Didžiausias melatonino kiekis aptinkamas nuo vienerių iki trejų metų vaiko organizme. Iki 21 metų žmogaus organizme melatonino koncentracija sumažėja iki 80 proc. Tokius pokyčius daugelis mokslininkų aiškina remdamiesi prielaida, jog pastovus melatonino

kiekis išlieka nepriklausomai nuo augančios žmogaus organizmo masės vystymosi eigoje [67]. Nustatyta, kad praėjus paauglystei, melatonino koncentracija ir toliau mažėja, senatvėje šis procesas siejamas su senėjimu [68, 69]. Kai kurie mokslininkai siūlo naudoti melatonino koncentraciją kaip organizmo amžiaus (senatvės) rodiklį.

2.1.4.3. Melatonino koncentracijos priklausomybė nuo mitybos įpročių

Mitybos įpročiai gali dvejopai reguliuoti melatonino koncentraciją organizme. Maitinantis organizmas gauna būtinų medžiagų melatonino gamybai, tokių kaip vitaminas B6, folio rūgštis ir triptofanas [70]. Antra vertus, kai kuriuose maisto produktuose aptinkama melatonino, todėl jis gali būti gaunamas tiesiogiai su maistu. Didžiausia melatonino koncentracija nustatyta graikiškuose riešutuose, viename grame yra 3-4 ng melatonino ir pomidoruose - 3-114 ng/g. Taip pat didelė melatonino koncentracija yra karvės piene. Nakties metu paimto karvės pieno viename mililitre nustatyta 10-40 ng melatonino [71].

Maisto medžiagų svarbą melatonino koncentracijai organizme patvirtino keletas eksperimentų. Vieno iš jų metu žmonės savanoriai laikėsi dietos, per parą gaudami 300 kalorijų mažiau. Tiriamųjų grupėje melatonino koncentracija sumažėjo 20 proc., bet papildomas gliukozės vartojimas atstatė jo koncentraciją iki pradinio lygio [72].

2.1.4.4. Melatonino koncentracijos priklausomybė nuo darbo sąlygų

Naktį būnant šviesoje slopinama melatonino gamyba [73, 74]. Pamaininiu darbu vadinamas toks darbo paskirstymas, kai žmogus 3 ar daugiau kartų per mėnesį dirba nakties metu [75]. Žmonėms, dirbantiems pamaininį darbą, sutrinka melatonino gamyba. Naktį, pabuvus 30 minučių 2500 liuksų šviesoje, naktinė melatonino produkcija sumažėjo 61±6 procentais [74], arba naktį žmonėms būnant 150 vatų (elektrinės galios vienetas, kuris atitinka 2500 liuksų šviesos

stiprumą, taip pat atitinka šviesos stiprumą esantį pavasario dieną pastate prie lango) lemputės šviesoje, po 10-20 minučių sumažėjo melatonino koncentracija, po 1 valandos melatonino koncentracija nakties metu buvo tokia pat kaip dienos metu [73].

Sukaupta daug duomenų, apie pamaininio darbo žalą žmogui. 2007 metais Pasaulinė Sveikatos Organizacijai priklausanti Tarptautinė vėžio tyrimų agentūra pamaininį darbą priskyrė prie tikėtinų kancerogenų grupės (A2 grupė) [10]. Norint nustatyti moterų, dirbančių pamaininį darbą, riziką susirgti krūties vėžiu buvo atlikta 15 epidemiologinių tyrimų: 5 kohortiniai tyrimai, 10 atvejų ir kontroliniai tyrimai [76]. Vertinant visų studijų rezultatus, buvo atlikta statistinė metaanalizė [76]. Nustatyta kad, moterų dirbančių pamaininį darbą, santykinė rizika susirgti krūties vėžiu - 1,21 (95% pasitikėjimo intervalai 1,00-1,47, statistinis reikšmingumas $p=0,056$) [76]. Norint įvertinti vyrų, dirbančių pamaininį darbą, riziką susirgti prostatos vėžiu, buvo atlikta 14 epidemiologinių tyrimų. Visi jie patvirtina, kad, dirbant pamaininį darbą, rizika susirgti prostatos vėžiu padidėja, 10-tyje iš 14 darbų pateikiami statistiškai patikimi rezultatai [77]. Pamaininis darbas padidina riziką susirgti gimdos gleivinės, gaubtinės ir tiesiosios žarnos vėžiu, ir net Hodžkino limfoma [78-80].

Kiti žalingi pamaininio darbo poveikiai organizmui:

- Trys iš keturių epidemiologinių tyrimų parodė, kad dirbant pamaininį darbą padidėja rizika susirgti širdies ir kraujagyslių sistemos ligomis [81-84].
- Aštuoni epidemiologiniai darbai patvirtino, kad dirbant pamaininį darbą padidėjo galimybė susirgti metaboliniu sindromu (nutukimas, padidėjęs kraujospūdis ir trigliceridų kiekis) [11].
- Šeši epidemiologiniai darbai parodė, kad dirbant pamaininį darbą padidėja galimybė susirgti diabetu [11].

2.2. Melatonino fiziologinė reikšmė

Melatonino cheminė formulė – $C_{13}H_{16}N_2O_2$, molekulinė masė – 232,278 g/mol. Melatoninas aptiktas stuburiniuose ir bestuburiuose gyvūnuose, augaluose, bakterijose, dumbliuose ir vienaląsčiuose organizmuose [85-87]. Dėl savo mažo dydžio ir amfifilinių savybių melatoninas gali patekti į ląstelės vidų ir sąveikauti su skirtingais ląstelės kompartmentais [63].

Pagrindinės melatonino funkcijos:

- reguliuoja paros bioritmus [7];
- skatina mieguistumą ir mažina kūno temperatūrą [88];
- reguliuoja sezoninius bioritmus [7], praneša organizmui apie dienos ilgumo pokyčius ir, tokiu būdu, reguliuoja nuo metų laiko priklausomas funkcijas: reprodukciją, gyvūnų kailio pokyčius (plaukų augimą ir spalvą), apetitą, kūno svorį ir miegą [36];
- kankorėžinė liauka per melatoniną reguliuoja kitų endokrininių liaukų aktyvumą. Melatoninas stimuliuoja oksitocino sekreciją ir skatina progesterono gamybą [5], slopina kortizolio produkciją [89];
- reguliuoja gliukozės metabolizmą. Kankorėžinės liaukos pašalinimas skatina gliukozės produkciją [9], mažina riebalinio audinio atsaką insulinui [90]. Insulino gamyba didėja dienos metu, kai melatonino koncentracija būna sumažėjusi [91];
- reguliuoja lytinių liaukų aktyvumą, slopindamas folikulino ir liuteinizuojančio hormono sekreciją [6], slopina ląstelių, sintetinančių gonadotropinus, fermentinį aktyvumą [92]. Moterų ir vyrų adenohipofizės gonadotropinai – folitropinas, liutropinas ir gliukoproteinai. Vyrų organizme jie išskiriami nuolat, o moterų – periodiškai ir daug didesniais kiekiais. Gonadotropinai reguliuoja gametogenezę ir spermatogenezę lytinėse liaukose [44];

- mažina diastolinį ir sistolinį kraujo spaudimą [93-95];
- skatina leptino gamybą, tokiu būdu reguliuodamas metabolizmą [96];
- reguliuoja kraujagyslių susitraukimą. Veikdamas per MT1 receptorių, skatina kraujagyslių susitraukimą, veikdamas per MT2 receptorių skatina kraujagyslių praplėtimą [4];
- kiaušidėse melatoninas slopina estrogeno receptoriaus α , ir progesterono receptoriaus β raišką [97];
- slopina dopamino išskyrimą iš tinklainės amakrininių ląstelių ir padidina horizontalių ląstelių jautrumą šviesai [98];
- melatonino poveikis odai:
 - apsaugo fibroblastus ir keratinocitus nuo ultravioletinių spindulių poveikio [99];
 - atstato α -melanocitus stimuliuojančio hormono (α -MSH) pigmentacijos poveikį [100];
 - melatonino vartojimas gali slopinti odos pigmento melanino sintezę [101];
 - priklausomai nuo koncentracijos slopina arba stimuliuoja keratinocitų proliferaciją [102, 103].
- stimuliuoja plaukų augimą [104];
- apsaugo ląsteles veikdamas kaip antioksidantas ir antiapoptotinis agentas [105]. Melatoninas stiprus antioksidantas, surišantis ne tik deguonies, bet ir azoto radikalus [106]. Reaguojant su peroksinitrilu susidaro 1-nitromelatoninas [107]. Melatoninas yra pranašesnis už kitus antioksidantus, nes:
 - vienintelis antioksidantas, kuris gali pašalinti “velnio trikampį” (superoksidadą, azoto monoksidadą ir peroksinitrilą) [108, 109];
 - neturi jo difuziją blokuojančių anatominių barjerų [110];

- jo antioksidacinė jėga žymiai stipresnė už vitamino C ir E, ir 5-15 kartų stipresnė už glutationą [107];
- glutationas naudojamas daugumos oksiduotų antioksidantų redukcijai. Melatoninas neturi poveikio glutationo koncentracijai, kadangi hormonas degraduoja iškart po oksidacijos [111].
- melatonino poveikis virškinimo sistemai:
 - didindamas kalcio išsiskyrimą iš enterochromafino ląstelių, gleivinėje skatina bikarbonato sekreciją [112];
 - veikdamas per MT2 receptorių, skatina kasos liauką gaminti amilazę ir cholecistokininę [3];
 - mažina spontaniškus susitraukimus žarnyne [113];
 - slopina serotonino poveikį virškinimo sistemoje [114].
- melatonino poveikis kaulams:
 - skatina osteoblastų diferenciaciją, stiprina kaulus [115];
 - slopina osteoklastus ir skatina osteoblastinio baltymo osteoprotegerino gamybą [116].
- melatonino poveikis inkstams:
 - apsaugo nuo uždegiminės reakcijos pažaidų [117];
 - gali apsaugoti inkstus nuo gyvsidabrio chlorido sukkelto oksidacinio šoko [118].
- mitochondrijose melatoninas slopina laisvųjų radikalų formavimąsi ir, tokiu būdu, apsaugo vidinę mitochondrijų membraną. Tai skatina elektronų srautą ir energijos vartojimo efektyvumą [105]. Tokiu būdu melatoninas gali reguliuoti kūno svorį. Vyresnio amžiaus nutukusioms moterims ilgalaikis melatonino vartojimas skatino svorio kritimą [119];
- priešvėžinės savybės:
 - skatina vėžinių ląstelių apoptozę [120-122];

- slopina ar blokuoja vėžinių ląstelių ciklą, slopindamas proliferaciją [123, 124];
- skatina vėžinių ląstelių diferenciaciją [125];
- stiprus antioksidantas [106];
- imuninės sistemos stimuliavimas [8];
- melatoninas krūties vėžio MCH-7 ląstelių linijoje slopina estrogeno receptoriaus α raišką, tokiu būdu slopina nuo estrogeno priklausomą proliferaciją [126];
- slopina krūties vėžio ląstelių invaziją ir metastazavimą [127];
- reguliuoja imuninės sistemos veiklą [8].

2.3. Melatonino veikimo mechanizmai

Melatoninas veikia kaip neurosiuntiklis, hormonas, citokinas ir biologinių atsakų modifikatorius [128]. Jis veikia keturiais skirtingais mechanizmais [129]:

1. Jungiasi prie ląstelės membranų receptorių.
2. Ląstelės viduje jungiasi prie branduolio receptorių.
3. Jam būdingas antioksidacinis aktyvumas.
4. Ląstelės viduje jungiasi prie baltymo kalmodulino.

Melatoninas, sąveikaudamas su kalmodulinu, slopina kalcio (Ca^{2+}) prisijungimą prie kalmodulino ir, tokiu būdu, reguliuoja ląstelėje vykstančius procesus [130]. Žinoma, kad melatoninas gali sąveikauti su MT1, MT2, MT3/CR2, ROR α ir ROR β receptoriais [105].

2.3.1. Melatonino membraniniai MT1 ir MT2 receptoriai

Kiekviena ląstelė turi savitus baltymus, atrankiai atpažįstančius ir sąveikaujančius su tarpląstelinėmis signalinėmis molekulėmis. Šie baltymai vadinami receptoriais. Pagrindinė receptorių funkcija – tarpląstelinis signalus paversti viduląsteliniais procesų grandine. Pagal padėtį ląstelėje, receptoriai skirstomi į membraninius ir viduląstelinis (branduolio) receptorius [131].

Membraniniai receptoriai – tai receptoriai, esantys plazminėje membranoje ir ją perveriantys vieną ar daugiau kartų. Jiems būdingi išoriniai domenai, reikalingi sąveikai su ligandu, ir vidiniai domenai, skirti perduoti signalą antrinėms signalinėms molekulėms [131].

Melatoninas turi du membraninius receptorių: MT1 (anksčiau vadintas Mel_{1a}, MEL_{1A}, ML_{1A}) ir MT2 (anksčiau vadintas Mel_{1b}, MEL_{1B}, ML_{1B}). MT1 ir MT2 receptoriai priklauso su G baltymais sąveikaujančių receptorių superšeimai [69]. MT1 receptorių sąveikauja su G_{i2}, G_{i3} ir G_{q/11}, G_{os}, G_{oz} ir G_{α16} baltymais [132-134]. MT2 receptorių sąveikauja su G_i, G_o, G_z, G₁₂ ir G₁₄ baltymais [135]. Receptoriai sudaryti iš septynių membraną perveriančių segmentų, turinčių amino grupę ekstraląsteliniam domeniui ir karboksilinę grupę viduląsteliniam domeniui [136]. MT1 ir MT2 receptorių aminorūgščių homologija yra apie 60 procentų [136].

MT1 receptoriaus baltymo grandinės ilgis – 350 aminorūgščių, jo molekulinė masė – 39,374 kDa [136]. Signaliniai keliai, atsirandantys ląstelėje po MT1 receptoriaus aktyvinimo:

1. Sumažėja cAMP gamyba, todėl sumažėja fermento baltymų kinazės A aktyvumas ir slopinamas nuo cAMP priklausančios baltymų grupės fosforilinimas [137].
2. Padidėja viduląstelinio kalcio koncentracija [138].
3. Stimuliuojamas MAP2K1/2-ERK1/2 signalinis kelias (visose ląstelėse išskyrus neuronus) [139].

MT2 receptoriaus baltymą sudaro – 362 aminorūgštys, jo molekulinė masė – 40,188 kDa. Signaliniai keliai, atsirandantys ląstelėje po MT2 receptoriaus aktyvinimo:

1. Sumažėja cAMP gamyba, tokiu būdu sumažėja fermento baltymų kinazės A aktyvumas ir slopinamas nuo cAMP priklausančios baltymų grupės fosforilinimas [140].

2. Slopinama cGMP gamyba [140].
3. Priešchiazminiuose branduoliuose stimuliuojamas baltymų kinazės C aktyvumas [141].

MT2 receptoriaus funkcijoms nustatyti dažniausiai naudojami du receptoriaus slopikliai (antagonistai) - luzindolas ir 4P-PDOT. Luzindolas nėra selektyvus MT1 arba MT2 receptorių slopiklis, bet jo giminingumas MT2 receptoriui yra 15-26 kartus didesnis nei MT1. 4P-PDOT – selektyvus MT2 receptoriaus slopiklis, jo giminingumas MT2 receptoriui yra 311 kartų didesnis nei MT1 [142].

MT1 ir MT2 receptoriai buvo aptikti skirtingose centrinės nervų sistemos ląstelėse, taip pat periferiniuose organuose – virškinimo sistemoje, kepenyse, plaučiuose, odoje, Harderiano liaukoje, antinksčiuose, lytinėse liaukose, krūties audiniuose, inkstuose, širdyje, kraujagyslėse, riebaliniame audinyje ir imuninės sistemos organuose [105]. Melatoninas per MT1 receptorių atlieka šias funkcijas: cirkadinių ritmų reguliavimą, mažina prolaktino, testosterono ir kortizolio sekreciją, padidina leptino produkciją, slopina vėžinių ląstelių proliferaciją, skatina kraujagyslių susitraukimą [136]. Melatoninas per MT2 receptorių atlieka šias funkcijas: cirkadinių ritmų reguliavimą, slopina insulino gamybą, slopina dopamino išskyrimą iš akies tinklainės, skatina kraujagyslių praplėtimą, slopina vėžinių ląstelių proliferaciją [136].

2.3.1.1. Melatonino membraninių receptorių MT1 ir MT2 raiška ir funkcijos, susijusios su imunine sistema

MT1 ir MT2 receptoriai plačiai ekspresuojami imuninės sistemos ląstelėse ir organuose. MT1 receptorių buvo aptiktas: paukščių *Perdicula asiatica* blužnyje [143], Swiss linijos pelių užkrūčio liaukoje ir blužnyje [144], laukinių voverių *Funambulus pennanti* užkrūčio liaukoje ir blužnyje [145, 146], HI linijos vištų užkrūčio liaukoje ir blužnyje [147], visose tyrinėtose Wistar linijos žiurkių

užkrūčio liaukos ląstelių populiacijose (T_H0 limfocituose, T_C limfocituose, B limfocituose, dvigubai teigiamuose $CD4^+CD8^+$ limfocituose, dvigubai neigiamuose $CD4^-CD8^-$ limfocituose) ir blužnyje [148], RBL-2H3 linijos žiurkių putliosiose ląstelėse [57], žmogaus Jurkat linijos limfocituose [58], žmogaus leukocituose: monocituose, T_H0 limfocituose, T_C limfocituose, B limfocituose, NK ląstelėse [149].

MT2 receptorių buvo aptiktas: paukščių *Perdicula asiatica* blužnyje [143], Swiss linijos pelių užkrūčio liaukoje [144], pelių blužnies ląstelėse [150], laukinių voverių *Funambulus pennanti* užkrūčio liaukoje ir blužnyje [146], HI linijos vištų užkrūčio liaukoje ir blužnyje [147], Wistar linijos žiurkių užkrūčio liaukoje ir blužnyje [151], RBL-2H3 linijos žiurkių putliosiose ląstelėse [57], žiurkių limfocituose [152], žmogaus Jurkat linijos limfocituose [58].

MT1 receptorių svarbus IL-2 citokino gamyboje. Blokavus MT1 receptorių, patikimai sumažėjo IL-2 gamyba žmogaus Jurkat linijos ląstelėse [153].

Veikiant per MT1 receptorių melatoninas pagerino laukinės voverės *Funambulus pennanti* blužnies ląstelių proliferaciją. Tyrinėjant melatonino receptorių poveikį blužnies ląstelių proliferacijai buvo naudojamas MT1 ir MT2 receptorių slopiklis luzindolas ir selektyvus MT2 receptoriaus slopiklis 4P-PDOT. Fiziologinė melatonino koncentracija stimuliuo laukinės voverės *Funambulus pennanti* blužnies ląstelių proliferaciją ir MT1 bei MT2 receptorių raišką. Papildomai pridėjus luzindolo, jis bloko melatonino sukeltą blužnies ląstelių proliferaciją. Priešingai, 4P-PDOT neturėjo įtakos melatonino sukeltai blužnies proliferacijai [154].

Drazen su kolegom nustatė, kad veikdamas per MT2 receptorių melatoninas stimuliuoja blužnies ląstelių proliferaciją laukinio tipo pelėse, taip pat MT1 receptoriaus neturinčiose pelėse. Tuo tarpu MT1 ir MT2 receptorių slopiklis luzindolas sumažino melatonino sukeltą proliferaciją [150].

Naudojant selektyvų MT2 receptoriaus slopiklį 4P-PDOT nustatyta, kad melatoninas, veikdamas per MT2 receptorių, slopina žiurkių leukocitų riedėjimo savybes [152].

2.3.2. *MT3/CR2* receptoriaus

Pirmosiose publikacijose *MT3* (anksčiau vadintas ML_2) receptoriaus buvo apibūdinamas kaip membraninis receptoriaus [155], vėliau – kaip citozolinis fermentas chinono reduktazė 2 (*CR2*). Pelių, neturinčių chinono reduktazės 2 geno, smegenų ir inkstų membranos neturėjo sąveikos su specifiniu *MT3* receptoriaus ligandu (2-125I-5-metoksi-karbonilamino-N-acetiltriptaminu) [156]. Atsižvelgiant į tai, kad receptoriaus baltymo struktūra dar nėra galutinai nustatyta, jis rašomas didžiosiomis raidėmis pasvirusiu kursyvu, pagal IUPHAR taisyklės [136]. *MT3/CR2* receptoriaus buvo aptiktas skirtinguose žiurkėnų, triušių, beždžionių ir pelių organuose [99, 157]. Jis gali aktyvinti chinonus, o tai skatina reaktyvių deguonies formų gamybą [158, 159]. Melatoninas, veikdamas mikromoliariniais kiekiais, slopina *MT3/CR2* fermentinį aktyvumą ir, tokiu būdu, apsaugo ląsteles nuo reaktyvių deguonies formų [160]. *MT3/CR2* receptoriaus raiška imuninės sistemos organuose anksčiau nebuvo tyrinėta. Naudojant *MT3/CR2* receptoriaus aktyvatorių GR135531 buvo nustatyta, kad melatoninas, veikdamas per *MT3/CR2* receptorių, slopina žiurkių leukocitų sukibimą su kraujagyslių endotelio ląstelėmis. GR135531 ir melatoninas slopina leukocitų sukibimo su kraujagyslių endotelio ląstelėmis savybes, tuo tarpu luzindolas ir 4P-PDOT sukibimo savybėms įtakos neturėjo [152].

2.3.3. Melatonino branduoliniai receptoriai ir ROR γ receptoriaus

Branduoliniai receptoriai – tai viduląsteliniai baltymai, savitai sąveikaujantys su lipofilinėmis molekulėmis, prasiskverbiantėmis į citozolį. Visi branduoliniai receptoriai 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 [131].

Šiuo metu žinomi 49 pelių ir 48 žmogaus branduolinių receptorių superšeimos nariai [161, 162]. Branduolinių receptorių superšeimos nariai suskirstyti į dvi dideles grupes: (1) transkripcijos veiksniai, kurių fiziologinis ligandas nustatytas, ir (2) transkripcijos veiksniai, kurių fiziologinis ligandas nėra nustatytas [163]. Melatoninas jungiasi prie retino rūgšties receptorių grupės [105]. Retino rūgšties receptoriai priklauso grupei branduolinių receptorių, kurių fiziologinis ligandas nėra nustatytas [164], todėl pilnas pošeimos pavadinimas – su retino rūgštimi susiję receptoriai našlaičiai (angl. *retinoid orphan receptors* (ROR)). Anksčiau naudotas kitas pavadinimas – su retino rūgštimi susiję Z receptoriai (angl. *retinoid Z receptors* (RZR)) [165]. Branduolinis receptorius sudarytas iš 4 pagrindinių domenų: N-galinis domenas, už jo – labai konservatyvus DNR surišantis domenas, lankstusis domenas ir C-galinis domenas, prie kurio jungiasi ligandas [166]. Su retino rūgštimi susijusių receptorių našlaičių grupę sudaro trys receptoriai: ROR α , RZR β ir ROR γ [167]. Kiekvienas receptorius turi skirtingas izoformas, kurios skiriasi N-galinėmis aminorūgštimis. Žmogaus organizme ROR α turi 4 izoformas (ROR α 1-4), pelių organizme ROR α turi 2 izoformas: ROR α 1 ir ROR α 4 (kitas šios izoformos pavadinimas RZR α). ROR β pelių organizme turi 2 izoformas (ROR β 1-2), žmogaus organizme yra tik viena izoforma – ROR β 1. Ir žmonių, ir pelių ROR γ receptorius turi 2 izoformas: ROR γ 1 ir ROR γ 2 (kitas pavadinimas ROR γ t) [167]. Melatoninas jungiasi prie ROR α 1, ROR α 2 ir ROR α 4, taip pat prie ROR β baltymo (kitas pavadinimas RZR β) [105]. Nors nėra įrodymų, kad melatoninas gali jungtis prie ROR γ , kai kurie autoriai įvardija jį kaip melatonino receptorių [60].

ROR α ir ROR γ receptoriai imuninės sistemos ląstelėse atlieka daug funkcijų, jose vyksta intensyvi šių receptorių raiška. Tuo tarpu ROR β raiška imuninės

sistemos ląstelėse nebuvo aptikta, taip pat nėra ir duomenų apie šio receptoriaus funkcijas imuninės sistemos organuose ir ląstelėse.

2.3.3.1. ROR α receptoriaus raiška ir funkcijos, susijusios su imunine sistema

ROR α receptorius buvo aptiktas daugelyje žmogaus periferinio kraujo ląstelių. ROR α 2 ir ROR α 4 (RZR α) izoformos nustatytos visose tyrinėtose ląstelėse: monocituose, B limfocituose, T_H0 limfocituose, T_C limfocituose ir NK ląstelėse [149]. ROR α 1 aptiktas tik T_C limfocituose, ROR α 3 nebuvo rastas tyrinėtose ląstelėse [149]. ROR α 1, ROR α 2 ir ROR α 4 receptoriai ekspresuojami žmogaus Jurkat linijos limfocituose [168]. ROR α 4 aptiktas RPMI1788 (B limfocitų) ir P16 (B limfocitų klonu) ląstelių linijose [169]. ROR α 2 ir ROR α 3 raiška aptikta RPMI1788, P16, HL-60 (granulocitų) ir Mono Mac 6 (monocitų) ląstelių linijose [169]. ROR α 1 raiškos nebuvo RPMI1788, P16, HL-60 ir Mono Mac 6 ląstelių linijose [169]. ROR α 1 ekspresuojamas Swiss linijos pelių užkrūčio liaukos ir blužnies ląstelėse [170]. ROR α raiška vyksta žmogaus lygiųjų raumenų ląstelėse [171]. Visos keturios ROR α izoformos ekspresuojamos makrofaguose, išaugintuose iš pelių kaulų čiulpų [172].

Melatoninas, veikdamas per ROR α 4 (RZR α), bet ne per ROR α 1, ROR α 2 ar ROR α 3, slopina 5-lipoksigenazės geno raišką RPMI1788 (B limfocitų) ir P16 (B limfocitų) žmogaus ląstelių linijose [169]. 5-lipoksigenazė katalizuoja arachidono rūgšties transformaciją į leukotrienus, kurie dalyvauja organizmo gynybos reakcijose ir vaidina svarbų vaidmenį vystantis astmai, uždegiminei žarnų ligai, artritui [173]. Slopinant 5-lipoksigenazę melatoninas veikia kaip prieš uždegiminę medžiaga [105].

ROR α yra svarbus timocitų diferenciacijai į subrendusius T limfocitus. ROR α geno raiškos stiprumas skiriasi skirtingose užkrūčio liaukos ląstelių populiacijose: silpna CD4⁺CD8⁺ timocituose, padidėja CD4⁺ ir CD8⁺

timocituose, dar didesnė subrendusiuose T_H0 limfocituose, bet sumažėja subrendusiuose T_C limfocituose. $ROR\alpha$ geno neturinčioms pelėms sumažėja užkrūčio liaukos svoris ir bendras ląstelių skaičius, palyginus su $ROR\alpha$ geną turinčiomis pelėmis [172].

$ROR\alpha$ receptorius svarbus reguliuojant citokinų gamybą. $ROR\alpha$ receptorius slopina citokinų gamybą, skatindamas $I\kappa B-\alpha$ gamybą [172]. Nestimuliuotose ląstelėse $NF-\kappa B$ citoplazmoje yra prisijungęs prie savito slopiklio $I\kappa B-\alpha$. Po ląstelės stimuliacijos $I\kappa B-\alpha$ degradoja, $NF-\kappa B$ atsiskiria nuo jo ir patenka į branduolį, kur jungiasi prie uždegiminių citokinų genų promotorių ir, tokiu būdu, skatina uždegiminių citokinų raišką [174]. Padidinus $ROR\alpha$ raišką pirminėse lygiųjų raumenų ląstelėse, patikimai sumažėjo $IL-6$, $IL-8$ ir $COX-2$ citokinų raiška po $TNF-\alpha$ stimuliacijos [171]. Pelių, neturinčių $ROR\alpha$ geno, makrofagai ir putliosios ląstelės po LPS stimuliacijos gamino patikimai didesnius kiekius $IL-6$ ir $TNF\alpha$ citokinų nei $ROR\alpha$ turinčių pelių makrofagai ir putliosios ląstelės [172]. Pelių, neturinčių $ROR\alpha$ geno, T_C limfocitai pagamino patikimai didesnius kiekius $IFN\gamma$ nei šį geną turinčių pelių T_C limfocitai [172].

Melatoninas jungiasi prie $ROR\alpha$ ir panaikina šio receptoriaus sukeltą neigiamą citokinų gamybos reguliaciją. Buvo įrodyta, kad Jurkat linijos T limfocituose gaminamas melatoninas palaipsniui jungiasi prie $ROR\alpha$ branduolyje, mažina jų koncentraciją ir, tokiu būdu, slopina $ROR\alpha$ aktyvumą ir, galbūt, $I\kappa B-\alpha$ gamybą [175]. Tai patvirtina eksperimentiniai rezultatai. Melatoninas, veikdamas per $ROR\alpha$ receptorių, po fitohemaglutinino stimuliacijos pagerino $IL-2$ ir $IL-6$ citokinų gamybą žmogaus limfocitų (Jurkat) ir monocitų (U937) ląstelių kultūrose ir $IL-2$ gamybą Jurkat linijos T limfocituose [175, 176].

$ROR\alpha$ skatina T_H0 limfocitų diferenciaciją į T_H17 limfocitų populiaciją. $ROR\alpha$ raiška T_H17 limfocitų populiacijoje kur kas didesnė nei T_H1 ar T_H2 limfocitų populiacijose [177]. Padidinta $ROR\alpha$ ekspresija skatina $IL-17$, $IL-17F$ ir $IL-23R$ ekspresiją ir teigiamai veikia T_H17 diferenciaciją [177]. $ROR\alpha$ geno

neturinčių pelių IL-17 gamyba sumažėja, lyginant su ROR α geną turinčiomis pelėmis. Taip pat esant ROR α trūkumui sumažėja IL-17 gamyba *in vitro* sąlygomis [177].

2.3.3.2. ROR γ receptoriaus raiška ir funkcijos, susijusios su imunine sistema

ROR γ 1 receptorius buvo aptiktas pelių užkrūčio liaukos ląstelėse, tačiau neaptiktas pelių blužnies ir kaulų čiulpų ląstelėse [178]. ROR γ 2 (ROR γ t) raiška buvo aptikta pelių užkrūčio liaukos ląstelėse. Raiškos stiprumas skiriasi skirtingose užkrūčio liaukos ląstelių populiacijose: CD4⁻CD8⁻ timocituose – silpna raiška, CD4⁺CD8⁺ timocituose – kur kas stipresnė, CD4⁺CD8⁻ ir CD4⁻CD8⁺ timocituose – raiška neaptikta. Pelių blužnies ir kaulų čiulpų ląstelėse ROR γ 2 (ROR γ t) receptoriaus raiška nebuvo aptikta [178].

ROR γ t atlieka labai svarbų vaidmenį užkrūčio liaukos vystymuisi, reguliuojant timocitų diferenciaciją, proliferaciją ir apoptozę. Laikina ROR γ t raiška vyksta diferenciacijos metu, kai timocitai diferencijuojasi iš nesubrendusių vienąkart teigiamų timocitų į CD4⁺CD8⁺ timocitus. ROR γ t raiška vėl nuslopinama, kai CD4⁺CD8⁺ timocitai diferencijuojasi į subrendusius T limfocitus [179]. ROR γ t CD4⁺CD8⁺ timocituose aktyvina antiapoptotinį geną Bcl-X_L ir, tokiu būdu, apsaugo juos nuo apoptozės [180, 181]. ROR γ t geno neturinčių pelių užkrūčio liauka yra daug mažesnė, lyginant su ROR γ t geną turinčiomis pelėmis [180, 181].

ROR γ t svarbus antrinių limfinių organų vystymuisi. ROR γ t geno neturinčios pelės visiškai neturi limfinių mazgių ir Pejerio plokštelių, bet šių pelių blužnies struktūra išlieka nepakitusi [55, 56]. ROR γ t geno neturinčios pelės neturi CD3⁻CD4⁺CD45⁺IL-7R α ⁺ ląstelių populiacijos [56]. Ši ląstelių populiacija buvo atrasta pelių embrionuose ir atlieka svarbų vaidmenį formuojantis limfiniams

organams [182]. $ROR\gamma_t$, panašiai kaip ir $ROR\alpha$, skatina T_H0 limfocitų diferenciaciją į T_H17 limfocitų populiaciją [183].

2.4. Melatoninas ir imuninė sistema

Surinkta daug duomenų apie melatonino poveikį imuninei sistemai. Žinoma, kad melatonino gamyba ir jo receptorių raiška vyksta daugelyje imuninės sistemos organų ir ląstelių, melatoninas svarbus imuninės sistemos organų vystymuisi ir imuninio atsako metu. Kai kurie mokslininkai mano, kad melatoninas – pagrindinis imuninės sistemos reguliatorius.

Pagrindinės tyrimų kryptys, kuriomis įvertinamas melatonino poveikis imuninei sistemai:

1. melatonino gamybos slopinimo poveikis imuninės sistemos organams ir ląstelėms;
2. melatonino injekcijų poveikis imuninei sistemai *in vivo* ir *in vitro* eksperimentinių sąlygų metu;
3. pelių imuninės sistemos funkcijų, organų ir ląstelių pokyčiai pašalinus melatonino receptorių genus.

Tarp kankorėžinės liaukos (pagrindinės melatonino gamybos vietos) ir imuninės sistemos egzistuoja grįžtamasis ryšys, t.y. ne tik melatoninas gali veikti imuninę sistemą, bet ir imuninės sistemos komponentai, veikdami kankorėžinę liauką, gali reguliuoti melatonino gamybą.

Citokinas $IFN\gamma$ [184], granuliocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius (G-CSF) bei granuliocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius (GM-CSF) *in vitro* sąlygomis skatina melatonino gamybą [185].

Priešingai, citokinas TNF α veikia kaip melatonino gamybą slopinantis imuninės sistemos komponentas. Nustatyta, kad:

- *In vitro* sąlygomis kultivuojant žiurkių kankorėžinę liauką, TNF α stimuliacija slopina fermento serotonino N-acetiltransferazės transkripciją, todėl sumažėja N-acetilserotonino ir melatonino koncentracija [186].
- Moterų, sergančių mastitu, TNF α padidėjimas koreliuoja su melatonino koncentracijos sumažėjimu [187].
- TNF α padidėjimas po cezario pjūvio operacijos lemia melatonino koncentracijos sumažėjimą naktį [188].

2.4.1. Melatonino poveikis imuninei sistemai, atliekant eksperimentus gyvame organizme

Vertinant melatonino poveikį imuninei sistemai, melatonino injekcijos buvo atliekamos esant skirtingai imuninės sistemos būsenai:

- Natūrali būseną – jauno arba vidutinio amžiaus gyvūnas, jo imuninės sistemos pusiausvyrą nėra pažeista.
- Imuninė sistema sutrikusi dėl gyvūno vyresnio amžiaus. Vyresniame amžiuje įvyksta imuninės sistemos organų involiucija, sumažėja imuninės sistemos ląstelių skaičius, sutrinka imuninis atsakas.
- Imuninė sistema sutrikusi dėl išorinio kūno sužeidimo arba dėl intoksikacijos – įvyksta imuninės sistemos organų involiucija, sumažėja imuninės sistemos ląstelių skaičius, sutrinka citokinų gamyba.

Atliktų eksperimentų rezultatai pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. Melatonino poveikis imuninei sistemai, atliekant eksperimentus gyvame organizme.

Imuninės sistemos būseną	Gyvūnų rūšys	Papildomų melatonino injekcijų poveikis	Literatūros šaltinis
Natūrali	Voverės	Padidino limfocitų skaičių kraujyje, kaulų čiulpuose, užkrūčio liaukoje ir blužnyje	[14]
Natūrali	Pelės	Padidino NK ląstelių ir monocitų skaičių	[189]
Natūrali	Pelės	Padidino blužnies ląstelių proliferaciją, IL-2 ir IL1β gamybą	[190]
Natūrali	Žiurkės	Smegenyse paskatino mikroglijos ląstelių ir makrofagų skaičiaus padidėjimą, tai pat skatino MHC I ir II klasės molekulių, bei CD4 antigeno raišką mikroglijos ląstelių ir makrofagų paviršiuje	[191]
Sutrikusi dėl vyresnio amžiaus	Žiurkės	Atstatė užkrūčio liaukoje ir blužnyje su amžium susijusią involiuciją, padidino užkrūčio liaukos ir blužnies svorį, timocitų ir blužnies ląstelių skaičių ir NK ląstelių aktyvumą	[12]
Sutrikusi dėl vyresnio amžiaus	Žiurkės	Sustiprino humoralinį imuninį atsaką po avies eritrocitų injekcijos	[13]
Sutrikusi dėl vyresnio amžiaus	Voverės	Padidino bendrą leukocitų ir limfocitų skaičių, pagerino imuninį atsaką konkanavalinui A	[192]
Sutrikusi dėl vyresnio amžiaus	Voverės	Sukėlė blužnies hipertrofią	[193]
Sutrikusi dėl vyresnio amžiaus ir kiaušidžių pašalinimo	Žiurkės	Pagerino imuninės sistemos ląstelių chemotaksį, imuninį atsaką mitogeniniams antigenams, IL-2 produkciją ir NK ląstelių aktyvumą	[194]
Sutrikusi dėl vyresnio amžiaus	Pelės	Padidino B ląstelių proliferaciją, IL-2 ir IFNγ koncentraciją ir sumažino IL-4 ir IL-10 koncentraciją	[195]
Sutrikusi dėl minkštųjų audinių traumos	Pelės	Atstatė sutrikusią IL-1, IL-2, ir IL-6 gamybą ir blužnies ląstelių proliferaciją	[196]
Sutrikusi dėl švino injekcijų	Pelės	Atstatė užkrūčio liaukos svorį, T _H 0 ir B limfocitų skaičių blužnyje, NK ląstelių ir periferinio kraujo limfocitų skaičių	[15]

Apibendrinant rezultatus galima teigti, kad melatonino injekcijos stimuliuoja imuninę sistemą. Imuninei sistemai esant pusiausvyros būsenoje, melatoninas skatina limfocitų skaičiaus padidėjimą kraujyje, kaulų čiulpuose, užkrūčio liaukoje, blužnyje, smegenyse, MHC I ir II klasės molekulių, bei CD4 antigeno raišką mikroglijos ląstelių ir makrofagų ląstelių paviršiuje. Melatoninas panaikina su amžiumi susijusios užkrūčio liaukos ir blužnies involiuciją, skatina imuninės sistemos ląstelių proliferaciją, pagerina chemotaksį ir humoralinį imuninį atsaką. Melatoninas panaikina dėl išorinio kūno sužeidimo arba dėl intoksikacijų sukeltą

imonosupresiją: atstato limfocitų skaičių, blužnies ir užkrūčio liaukos aktyvumą, pagerina ląstelinį imuninį atsaką.

2.4.2. Melatonino gamybos slopinimo poveikis imuninei sistemai

Pagrindinę melatonino gamybą sustabdyti ir (ar) sumažinti galima trimis būdais: pašalinus kankorėžinę liauką, laikant gyvūnus pastovaus apšvietimo sąlygomis ir paveikus melatonino sintezės slopikliais (propranololiu). Dažniausiai taikomas metodas: pagrindinės melatonino gamybos vietos – kankorėžinės liaukos pašalinimas.

Pašalinus kankorėžinę liauką buvo įrodyta, kad melatonino trūkumas sukelia imuninės sistemos organų dydžio pakitimus ir imuninės sistemos ląstelių skaičiaus sumažėjimą. Be kankorėžinės liaukos pelėms [197, 198], žiurkėms [199] ir žiurkėnams [16] sumažėja imuninės sistemos organų – užkrūčio liaukos, blužnies ir limfinių mazgų, masė. Taip pat žiurkėms sumažėja bendras eritrocitų ir leukocitų skaičius [200].

Pašalinus kankorėžinę liauką melatonino trūkumas skatina gyvūnų imuninės sistemos organų struktūros ir raidos sutrikimus. BALB/c linijos pelių blužnyje sumažėja gemalinių centrų skaičius [201], limfinių mazgų kortikalinėje srityje (B limfocitų zona) lieka tik pirminiai folikulai, o parakortikalinėje srityje (T limfocitų zona) sumažėja bendras limfocitų skaičius [28], užkrūčio liaukoje įvyksta involiucija, beveik visiškai neaptinkama limfocitų, sumažėja limfoblastų skaičius [201]. Žiurkių užkrūčio liaukoje įvyksta struktūros dezorganizacija [202], padidėja putliųjų ląstelių skaičius [203]. Paukščiams sutrinka užkrūčio liaukos, blužnies ir Fabricijaus maišelio raida [17].

Pašalinus pagrindinę melatonino gamybos vietą sutrinka įvairių gyvūnų imuninis atsakas. Pelių organizme sumažėja IL-2 produkcija [204, 205], NK ląstelių aktyvumas [204, 205] ir sutrinka nuo antikūnų priklausomas ląstelių citotoksiškumas [206]. Viščiukams sutrinka humoralinis imuninis atsakas [17],

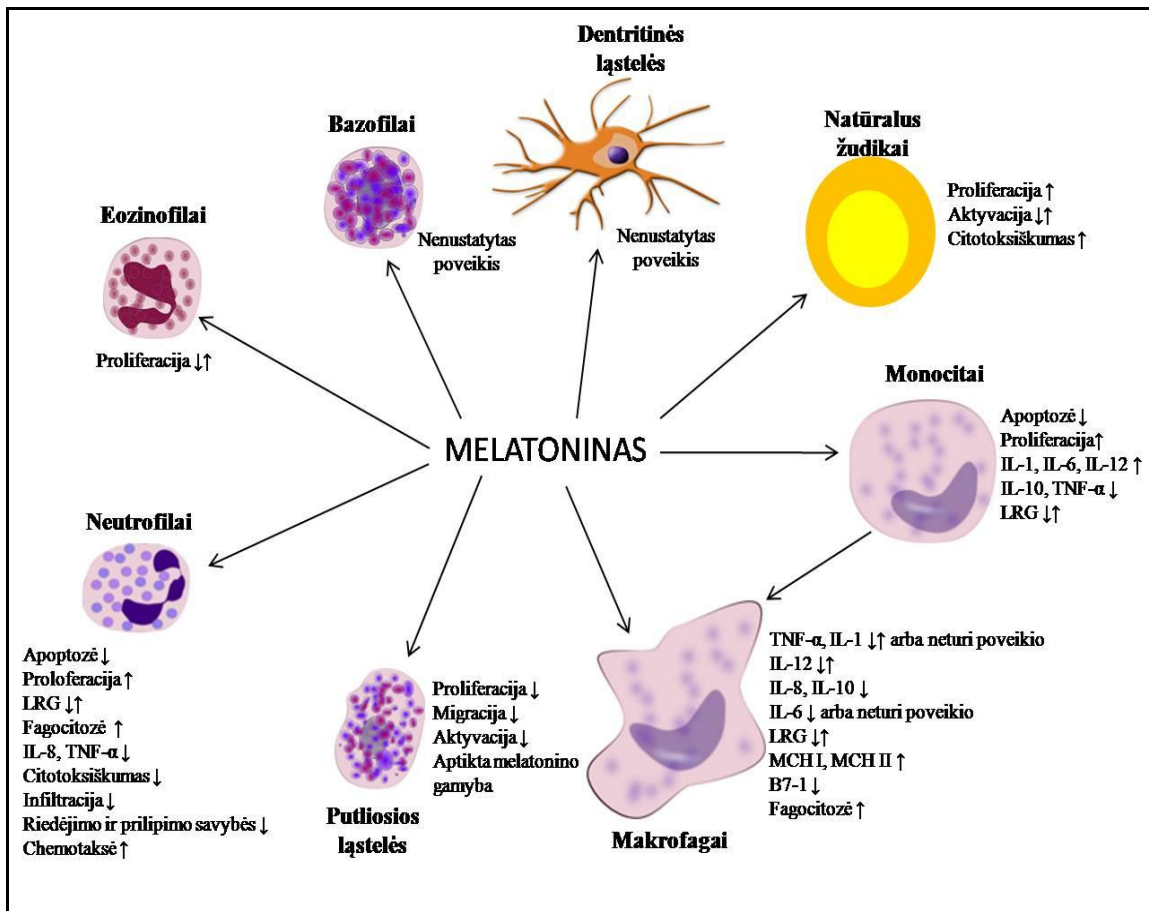
Japonijos putpelėms – humoralinis ir ląstelinis imuninis atsakas [18], vištoms – nespecifinis imuninis atsakas [207].

Slopinant melatonino gamybą kitais būdais, buvo atlikta kur kas mažiau tyrimų. Laikant žiurkes pastovaus apšvietimo sąlygomis užkrūčio liaukoje sumažėja timozino $\alpha 1$ ir timulino produkcija [208], pagerėja $\alpha 2$ -adrenoreceptorių katecholaminų sukelta periferinio kraujo limfocitų imunosupresija [209] ir 30 % sumažėja neutrofilų fagocitinės savybės [210]. Nuslopinus melatonino gamybą propranololiu, sumažėja pelių antikūnų produkcija pirminio ir antrinio humoralinio imuninio atsako metu [28].

Apibendrinant šio skyriaus rezultatus, melatonino trūkumas neigiamai veikia imuninę sistemą: sumažėja imuninės sistemos organų masė, imuninės sistemos ląstelių skaičius, sutrinka imuninis atsakas ir imuninės sistemos organų raida. Požymiai, atsiradę sutrikus melatonino sintezei, pranyksta po melatonino injekcijų [201].

2.4.3. Melatonino poveikis įgimtam imunitetui

Imuninė sistema veikia kaip koordinuojamas tinklas, apimantis didelį skaičių ląstelių, baltymų ir molekulių, skirtų apsaugoti šeimininko organizmą nuo svetimų veiksnių. Imuninis atsakas yra dviejų pagrindinių imuniteto tipų veiklos rezultatas: įgimto ir įgyto. Įgimtam imunitetui būdingas imuninis atsakas, kuris atsiranda iškart patekus svetimam veiksniai, ir jo intensyvumas nesikeičia pakartotinių infekcijų metu. Pagrindinės ląstelės, dalyvaujančios įgimto imuninio atsako reakcijose: neutrofilai, makrofagai, eozinofilai, bazofilai, putliosios ląstelės ir NK ląstelės bei įvairūs citokinai, tokie kaip TNF- α , IL-1 β , IL-6 ir IL-8 [8]. Melatonino poveikis visoms įgimto imuniteto ląstelėms pateiktas 2 paveiksle.



2 pav. Melatonino poveikis įgimto imuniteto ląstelėms.
LRG – laisvųjų radikalų gamyba.

Melatoninas įvairiai veikia įgimto imuniteto ląsteles ir jų funkcijas, priklausomai nuo ląstelių tipo, melatonino koncentracijos ir gyvūno rūšies.

Putliosiose ląstelėse, kuriose buvo aptikta vidinė melatonino gamyba, melatoninas slopina šių ląstelių proliferaciją, migravimą ir aktyvinimą [57, 211-213].

Priešingai, NK ląstelėse melatoninas skatina proliferaciją, aktyvinimą ir nuo antikūnų priklausomą citotoksiškumą [12, 15, 189, 204, 214-217]. Tik viename iš penkių darbų pateikiami duomenys, kad melatoninas gali slopinti NK ląstelių aktyvumą [218]. Manoma, kad, veikdamas per T limfocitus ir monocitus, melatoninas stimuliuoja IL-2, IL-6, IL-12 ir $INF\gamma$ gamybą, ir taip aktyvina NK ląstelių proliferaciją ir skatina jų aktyvumą [189, 219].

Melatoninas skatina neutrofilų fagocitozę, apsaugo juos nuo apoptozės, bet slopina neutrofilų citotoksiškumą [220-226]. Melatoninas skirtingai veikia (priklausomai nuo koncentracijos) žmogaus neutrofilų oksidacinį sproginimą. Esant 10 nM koncentracijai, jis stimuliuoja oksidacinį sproginimą, bet kai melatonino koncentracija buvo padidinta iki 2 mM, oksidacinis sproginimas sumažėjo [227].

Melatonino poveikis neutrofilų migravimui yra dvejopas: iš vienos pusės, jis slopina neutrofilų patekimą į pažeistus organus, iš kitos pusės, melatoninas veikia kaip chemotaktinė medžiaga [152, 228-236]. Iki šiol dauguma melatonino poveikio neutrofilų migravimui tyrimų buvo atliekami su endotelio ląstelėmis. Melatoninas slopina sukibimo molekulių raišką endotelio ląstelėse ir jų sukibimo savybes ir, tokiu būdu, slopina neutrofilų migraciją [237, 238].

Melatoninas skatina monocitų proliferaciją ir apsaugo monocitus nuo apoptozės [189, 201, 239]. Šis hormonas gali skirtingai veikti monocitų ir makrofagų laisvųjų radikalų gamybą [240-245]. Melatoninas skatina laisvųjų radikalų gamybą žmogaus monocituose [240], tačiau slopina superoksido radikalo gamybą ir DNR pažeidimus po naftalino sukkelto oksidacinio streso makrofagų ląstelių linijoje J774A.1 [243].

Neaiškus melatonino poveikis laisvųjų radikalų gamybai U937 linijos monocituose. Vienų mokslininkų darbai parodė, kad melatoninas slopina vandenilio peroksido (H_2O_2) gamybą monocitų ląstelių linijos U937 ląstelėse [241], kiti pateikė priešingus rezultatus: melatoninas skatina laisvųjų radikalų gamybą U937 ląstelėse [242].

Melatonino poveikis reguliuojant azoto oksido gamybą priklauso nuo gyvūno rūšies. Melatoninas skatina azoto oksido gamybą reumatoidiniu artritu sergančių žmonių sąnarių makrofaguose ir žmogaus mieloidinėje monocitinėje ląstelių linijoje THP-1 [244]. Priešingai, melatoninas slopina azoto oksido gamybą po aktyvinimo LPS-u RAW 264.7 žiurkių ląstelių linijos ląstelėse ir pelių makrofaguose [245, 246].

Melatoninas svarbus citokinų gamybos reguliatorius monocituose ir makrofaguose. Žmogaus monocituose, kaip ir žmogaus, pelių ir RAW 264.7 linijos makrofaguose, melatoninas slopina pagrindinio uždegimą skatinančio citokino TNF α gamybą ir, tokiu būdu, veikia kaip priešuždegiminė medžiaga [247-251]. Šis hormonas skatina žmogaus monocitus ir makrofagus gaminti IL-12 ir slopina IL-10 gamybą, o tai labai svarbu T_H0 ląstelių aktyvinimui ir diferenciacijai į skirtingas subpopuliacijas [219, 240, 244, 250, 252, 253]. Kita vertus, yra duomenų, kad makrofaguose, išskirtuose iš žmonių, sergančių reumatoidiniu artritu, po LPS stimuliacijos melatoninas slopina IL-12 gamybą [244]. Melatonino poveikis IL-6 ir IL-1 gamybai monocituose ir makrofaguose yra skirtingas: žmogaus monocituose melatoninas stimuliuoja IL-1, IL-6 gamybą, tuo tarpu RAW 264.7 linijos makrofaguose šis hormonas slopina IL-1b, IL-6 ir IL-8 gamybą [219, 250, 252].

Makrofaguose melatoninas reguliuoja molekulių, atsakingų už antigeno pateikimą ir T limfocitų aktyvaciją, raišką. Hormonas, skatindamas MHC I ir II klasės molekulių raišką makrofaguose, stimuliuoja antigeno pateikimą T ląstelėms [191, 254]. Kita vertus, pelių makrofaguose melatoninas slopina kostimuliatorių molekulių B7-1 raišką [255]. Publikacijos autoriai tai sieja, su tuo, kad B7-1 molekulės yra atsakingos už T_H1 limfocitų ir ląstelinio imuninio atsako aktyvaciją. Tokiu būdu, slopinant B7-1 molekulių raišką, melatoninas galėtų skatinti pelių organizme humoralinį imuninį atsaką [255].

Melatonino poveikis eozinofilų proliferacijai priklauso nuo gyvūnų rūšies. Žmogaus organizme melatoninas skatina eozinofilų proliferaciją: dėl IL-2 ir melatonino injekcijų onkologiniams ligoniams patikimai išaugo eozinofilų skaičius [256]. Kita vertus, atlikus eksperimentus su žiurkėmis, gauti priešingi rezultatai. Tiriamiesiems gyvūnams pašalinus pagrindinį melatonino gamybos organą – kankorėžinę liauką, patikimai išaugo eozinofilų skaičius [257].

2.4.4. Melatonino poveikis T limfocitams

Įgytas imunitetas yra dviejų tipų: humoralinis ir ląstelinis. Vykstant humoralinio imuniteto reakcijoms, B limfocitai, susidūrę su antigenu, virsta antikūnus gaminančiomis ląstelėmis, antikūnai specifiskai atpažįsta antigeną ir jį pašalina. Ląstelinis imunitetas susijęs su T ląstelių aktyvinimu ir T_H1 tipo citokinių sekrecija, monocitų ir (ar) makrofagų aktyvinimu. Pakartotinis kontaktas su antigenu sukelia antrinį imuninį atsaką, kuris kiekybiškai ir kokybiškai skiriasi nuo pirminio. Ši įgyto imuniteto savybė vadinama imunine atmintimi. Ją sąlygoja atminties ląstelės, t.y. yra po pirminio imuninio atsako tam tikras savybes įgiję T ir B limfocitai [258].

T limfocitai skirstomi į tris subpopuliacijas: pagalbininkai (T_H0), citotoksiniai (T_C) ir reguliaciniai limfocitai (T_{regs}). T citotoksiniai limfocitai naikina virusais infekuotas ir naviko ląsteles. T naivieji limfocitai pagalbininkai (T_H0) po kontakto su antigenu (priklausomai nuo antigeno) gali diferencijuotis į tris populiacijas: T_H1 , T_H2 ir T_H17 . Jie skiriasi gaminamais citokiniais. T_H1 išskiria $IFN\gamma$, IL-2, $TNF\alpha$ ir skatina ląstelinį imunitetą, T_H2 ląstelės išskiria IL-4, IL-1, IL-6, IL-10 citokinius ir aktyvina B limfocitus, kurie gamina antikūnus. T_H17 pagamintas IL-17 skatina uždegimines reakcijas. Labai stiprus T_H1 , T_H2 ar T_H17 imuninis atsakas gali sukelti audinio uždegimą. T reguliaciniai limfocitai reguliuoja efektorinių limfocitų imuninį atsaką ir apsaugo organizmą nuo audinių uždegimo ir autoimuninių ligų [259]. T reguliaciniai limfocitai susiformuoja užkrūčio liaukoje diferenciacijos metu arba periferijoje iš T_H0 limfocitų [260].

Remiantis literatūros duomenimis, melatoninas, priklausomai nuo T limfocitų subpopuliacijos, skirtingai veikia jų proliferaciją. Nekankorėžinė melatonino gamyba buvo aptikta žmogaus T limfocituose, kur, veikdamas autokrininiu ir parakrininiu būdu, hormonas stimuliuoja IL-2 gamybą ir skatina T ląstelių proliferaciją [261]. Šiuos rezultatus patvirtino *in vitro* ir *in vivo* sąlygom

atlikti eksperimentai, kuriuose nustatyta, kad melatoninas tai pat stimuliuoja ir pelių T_H0 limfocitų proliferaciją [15, 255].

Priešingai nuo T_H0 limfocitų proliferacijos, T_{regs} limfocitų proliferaciją melatoninas slopina. Onkologiniams ligoniams su kontroliuojama ligos eiga melatoninas slopina T reguliacinių ląstelių skaičių [262]. Pelėms sukėlus skrandžio karcinomą, melatoninas naviko audinyje taip pat sumažino T_{regs} ląstelių skaičių [263].

Melatoninas skirtingai veikia žmonių ir pelių T limfocitų diferenciaciją. Žmogaus T_H0 limfocitus melatoninas skatina diferencijuotis T_H1 kryptimi. Tą tiesiogiai patvirtina daugumos eksperimentų duomenys. Remiantis jais, melatoninas padidina T_H1 populiacijos citokinų (IL-2, $IFN\gamma$, IL-6) gamybą [219], bet sumažina (IL-10) [264] arba neturi įtakos (IL-4) [219] T_H2 populiacijos citokinų gamybai.

Tyrinėjant melatonino vaidmenį pelių T_H0 limfocitų diferenciacijos reguliavime, gauti prieštaringi rezultatai. Dauguma atvejų melatoninas padidina T_H2 populiacijos citokinų (IL-4, IL-10) gamybą [265-267] bei sumažina T_H1 populiacijos (IL-12, IL-2, $INF\gamma$) produkciją [267-269], tokiu būdu skatindamas T_H0 limfocitus diferencijuotis į T_H2 populiaciją. Kita vertus, yra duomenų, kad melatoninas skatina $INF\gamma$ gamybą [270] ir slopina IL-4 produkciją [269].

Skirtingas melatonino poveikis žmogaus ir pelių T limfocitų diferenciacijai gali būti paaiškintas skirtingu melatonino poveikiu monocitams. Melatoninas stimuliuoja IL-12 sekreciją žmogaus monocituose [271], o IL-12 – svarbus citokinas, reguliuojantis T_H0 diferenciaciją T_H1 kryptimi [258]. Iki šiol literatūroje nėra duomenų, bylojančių, kad melatoninas indukuotų IL-12 sekreciją pelių monocituose.

2.4.5. Melatonino poveikis B limfocitams

B limfocitai subręsta kaulų čiulpuose. B limfocitų efektorinės ląstelės – plazminės ląstelės. Jų gaminami antikūnai specifiškai jungiasi su antigenu jį opsonizuodami ir (arba) aktyvindami komplementą ir taip sustiprina, pagreitina antigeno fagocitozę arba lizę. 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). Antrinis imuninis atsakas žymiai greitesnis ir stipresnis [258].

Melatonino vaidmuo B limfocitų proliferacijos reguliacijoje nėra aiškus. Tiriant melatonino poveikį žiurkių B limfocitų proliferacijai buvo gauti skirtingi rezultatai. Jaunoms ir senoms žiurkėms melatoninas skatina B limfocitų proliferaciją [195]. Kito eksperimento metu žiurkės buvo imunizuotos parazitiniu pirmuonimi *Trypanosoma cruzi*. Izoliavus šių žiurkių blužnį ir blužnies ląsteles stimuliuojant konkavalinu A, nustatyta, kad melatoninas slopina blužnies ląstelių proliferaciją [272].

Tiriant melatonino poveikį pelių B limfocitų proliferacijai taip pat buvo gauti prieštaringi rezultatai. Wu ir kolegos atliko eksperimentą, kurio metu pelėms sukėlė idiopatinę membranos nefropatiją naudojant katijoninį galvijų serumo albuminą. Šio eksperimento rezultatai rodo, kad melatoninas slopina blužnies B (CD19+) limfocitų proliferaciją [273]. Tuo tarpu kita mokslininkų grupė, atlikusi eksperimentą *in vitro* sąlygomis, nustatė, kad melatoninas pelių B limfocitų proliferacijai poveikio neturi [255].

Melatoninas moduliuoja pelių humoralinį imuninį atsaką reguliuodamas citokinų gamybą T_H0 ląstelėse. Stimuliuodamas IL-4 ir IL-10 produkciją ir slopindamas IFN γ , jis skatina B limfocitus sekretuoti IgG1 ir slopina IgG2a gamybą [266, 267]. Šiuos teiginius patvirtino eksperimentas, kurį atliko Akbulut su kolegomis. Jie nustatė teigiamą melatonino poveikį IgM ir IgG1 antikūnų titrui senų ir jaunų žiurkių kraujo serume. Žiurkės buvo imunizuotos avies eritrocitais,

kurie sukelia humoralinį imuninį atsaką. Tyrimų metu buvo nustatyta, kad melatoninas statistiškai patikimai padidina IgG1 ir IgM antikūnų titrą senų žiurkių ir IgG1 titrą jaunų žiurkių kraujo serume [13].

Apibendrinant literatūros duomenis apie melatonino poveikį įgytam imunitetui, galime teigti, kad melatoninas skatina T_H0 ir slopina T_{regs} limfocitų proliferaciją. Tuo tarpu tyrimų duomenys apie šio hormono poveikį B limfocitų proliferacijai yra prieštaringi. Taip pat nustatyta, kad melatoninas skirtingai reguliuoja žmonių ir pelių įgytą imuninį atsaką: žmonėms skatina ląstelinį, o pelėms – humoralinį imuninį atsaką.

Literatūros apžvalgoje pateikti duomenys rodo, kad melatoninas – svarbus imunoregulatorius. Tyrinėjant melatonino poveikį imuninei sistemai daugeliu atvejų taikyti tyrimo metodai, kurių metu buvo atliktos melatonino injekcijos arba pašalinta pagrindinė melatonino gamybos vieta – kankorėžinė liauka. Pašalinus kankorėžinę liauką, sumažėja imuninės sistemos organų masė, imuninės sistemos ląstelių skaičius, sutrinka imuninis atsakas ir imuninės sistemos organų raida [17, 18, 28, 197-200, 207]. Melatonino injekcijos panaikina su amžiumi susijusios užkrūčio liaukos ir blužnies involiuciją, skatina imuninės sistemos ląstelių proliferaciją, pagerina chemotaksį ir humoralinį imuninį atsaką [12, 13, 192, 194, 195]. Kita vertus, eksperimentų metu melatonino gamyba retai buvo slopinama natūraliai, t.y. laikant gyvūnus pastovaus apšvietimo sąlygomis. Tyrinėjant melatonino poveikį natūraliai slopinančioje aplinkoje, sudaromos galimybės tirti melatonino trūkumo poveikį pamaininį darbą dirbančių žmonių imuninei sistemai. Literatūroje nėra duomenų, kaip pastovus apšvietimas galėtų lemti: nuo T limfocitų priklausomą ir nepriklausomą antikūnų gamybą, ląstelių skaičių imuninės sistemos organuose, leukocitų migraciją į uždegimo vietą, chemoatraktantu indukuotą granuliocitų migraciją.

3. METODAI

3.1. Eksperimentiniai gyvūnai

Eksperimentams buvo naudojamos C57BL/6 RAG2^{-/-} linijos pelės, BALB/c linijos pelės ir Lewis linijos žiurkės. Eksperimentai buvo atliekami Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centro Biomodelių skyriaus vivariume, pagal Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos suteiktą leidimą naudoti laboratorinius gyvūnus mokslo tiriamajam darbui Nr.0161. Gyvūnai buvo laikomi esant pastoviai kambario temperatūrai ir pakankamam maisto ir vandens kiekiui (*ad libitum*). Priklausomai nuo eksperimentų tikslų pelės buvo laikomos skirtingo apšvietimo sąlygomis: esant natūraliam (12 valandų šviesa/12 valandų tamsa) arba pastoviam apšvietimui (24 valandos šviesa). Pelių amžius buvo 6-11 savaičių, žiurkių amžius 11 savaičių.

3.2. Gyvūnų kraujo paėmimas ir serumo gavimas

Sukibimo eksperimentams ir tiriant kraują tėkmės citometrijos metodu kraujas buvo imamas iš pelės širdies po cervikalinės dislokacijos. Tam, kad kraujas nesukrešėtų, prieš pjaunant širdį, ant širdies buvo užpilama 10 µl heparino. Prapjaunant širdį buvo surenkama apie 300-600 µl kraujo.

Serumo gavimui kraujas buvo imamas iš pelių ir žiurkių uodegų. Kraujo apytakos pagerinimui, gyvūnai buvo laikomi infraraudonųjų spindulių lempos šviesoje. Skalpelio buvo prapjaunama uodegos šoninė vena ir surenkama apie 50-100 µl kraujo. Kraujui sukrešėjus, mėgintuvėliai buvo centrifuguojami 720 g 15 min.

Melatonino koncentracija kraujo serume buvo nustatoma naudojant Melatonin ELISA rinkinį (IBL) pagal gamintojo rekomendacijas.

3.3. BALB/c linijos pelių imunizacija nuo T ląstelių nepriklausomu ir nuo T ląstelių priklausomu antigenais

Eksperimentų metu buvo naudojami du nuo T ląstelių nepriklausomi antigenai – TNP-fikolis (Biosearch Technologies) ir TNP-LPS (Sigma). Imunizacijai naudojome 10 µg TNP-fikolio, ištirpinto 100 µl PBS tirpale ir 50 µg TNP-LPS, kuris taip pat ištirpintas 100 µl PBS tirpale. Pelės buvo imunizuotos nuo T ląstelių nepriklausomu antigenu vieną kartą. TNP-specifiniai antikūnai kraujo serume buvo tirti dieną prieš imunizaciją ir 7-tą bei 14-tą dienomis po imunizacijos.

Nuo T ląstelių priklausomo antigeno imunizacijai buvo naudojamas TNP-ovalbuminas (Biosearch Technologies). Antigenas buvo paruoštas ir naudojamas tokiu būdu:

- sumaišyta: 0,2 ml 5 mg/ml TNP-ovalbumino, 0,2 ml PBS ir 0,4 ml alu-gel-S;
- inkubuota 1 val. kambario temperatūroje;
- pridėta 5 ml PBS buferinio tirpalo, sumaišyta, centrifuguota 720 g 5 min;
- nuosėdos resuspenduotos 5 ml PBS;
- imunizacija po 0,5 ml į kiekvienos pelės pilvo ertmę.

Pirminio ir antrinio imuninio atsako analizei pelės buvo imunizuotos TNP-ovalbuminu 3 kartus: 0, 14 ir 21 eksperimento dieną. Kraujo serumas buvo renkamas dieną prieš imunizaciją bei 7, 14, 21 ir 28 dienomis po imunizacijos.

3.4. Antikūnų produkcijos tyrimas *in vitro* sąlygomis

Blužnies ir pilvo ertmės ląstelės išskiriamos iš TNP-ovalbuminu imunizuotų pelių praėjus savaitei po paskutinės imunizacijos. Ląstelės centrifuguojamos 720 g 5 min. 4°C temperatūroje. Eritrocitai lizuojami 0,16 M amonio chlorido tirpalu. Po to ląstelės resuspenduojamos RPMI terpėje (Hyclone) su 10 % FCS (Hyclone) ir išpilstomos į 96 šulinėlių apvaliadugnes plokšteles po $2,2 \cdot 10^5$ ląstelių kiekviename šulinėlyje. Priklausomai nuo eksperimento tikslo ląstelės buvo

stimuliuojamos TNP-ovalbuminu 10 µg/ml, melatoninu 10 µM (Sigma), luzindolu 10 µM (Sigma) ir 4P-PDOT 1-10000 nM (Tocris). Ląstelės kultivuojamos inkubatoriuje 37°C temperatūroje 9-10 dienų. Pasibaigus kultivavimui antikūnų koncentracija kiekviename plokštelės šulinėlyje buvo tiriama ELISA metodu.

3.5. TNP-specifinių antikūnų nustatymas ELISA metodu

Antigenas TNP-ovalbuminas skiedžiamas PBS buferiniu tirpalu iki 4 µg/ml koncentracijos ir išpilstomas į plokštelės šulinėlius. Plokštelės inkubuojamos 16-18 val. 4°C temperatūroje. Visuose kituose ELISA etapuose plokštelės inkubuojamos 30 min. 20°C temperatūroje. Tuščios antigenų neužimtos šulinėlių vietos padengiamos 0,5 % jaučio serumo albumino tirpalu. Testuojami serumai buvo skiedžiami 1:100, 1:300, 1:900, 1:2700, 1:8100 PBS tirpale su 0,05 % Tween-20 (Serva). B ląstelių imuniniam atsakui įvertinti, buvo matuojami IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b bei IgG3 klasių specifiniai antikūnai. Šiam tikslui plokštelės inkubuojamos su antikūnais prieš minėtų klasių imunoglobulinus (Pharmigen), žymėtais biotinu. Streptavidinas-POD (Pierce) praskiedžiamas 1000 kartų PBS buferiniame tirpale su 0,05 % Tween-20 ir išpilstomas į plokštelės šulinėlius. Prisijungęs konjugatas nustatomas pagal spalvinę reakciją naudojant ortofenilendiamino/vandenilio peroksido substratą. Fermentinė reakcija sustabdoma įpilant į šulinėlius 10 % sieros rūgšties tirpalo. Optinis tankis matuojamas "BioTek" firmos daugiakanaliniu spektrofotometru Elx 800, esant 492 nm šviesos bangos ilgiui. Rezultatai apdorojami naudojant SOFTmaxPro programą. Analizuojant rezultatus, visų ELISA eksperimentų metu buvo naudojamas tas pats standartinis serumo mišinys, kuriame esanti kiekvienos klasės specifinių antikūnų koncentracija buvo įvertinta kaip 100 sutartinių vienetų (SV). Kiekvienos pelės kraujo serume specifinių antikūnų koncentracija buvo nustatoma sutartiniais vienetais (SV), lyginant tiriamuosius pavyzdžius su standartiniu serumo mišiniu.

3.6. Ląstelių išskyrimas iš pelių organų

Pilvo ertmės ląstelių išskyrimas. Pelių pilvo ertmė plaunama šaltu PBS tirpalu. Surinktos ląstelės centrifuguojamos 720 g 5 min. 4°C temperatūroje ir suspenduojamos PBS tirpale.

Užkrūčio liaukos, limfmazgių bei Pejerio plokštelių ląstelės išskiriamos iš minėtų organų pertrinant juos per sietelį į PBS tirpalą ir centrifuguojant 720 g 5 min. 4°C temperatūroje. Ląstelės suspenduojamos PBS tirpale.

Blužnies ląstelių išskyrimas. Blužnis pertrinama per sietelį į PBS tirpalą. Ląstelės suspenduojamos, surenkamos į mėgintuvėlį ir centrifuguojamos 720 g 5 min. 4°C temperatūroje. Eritrocitai lizuojami 0,16 M amonio chlorido tirpalu. Ląstelės suspenduojamos PBS tirpale.

Smegenų ląstelių išskyrimas. Skalpeliumi išpjauinama nedidelė smegenų dalis (40 mg), kuri iškart homogenizuojama, naudojant Daunso tipo homogenizatorių. Iškart po homogenizacijos smegenų ląstelės naudojamos RNR skyrimui.

3.7. Tėkmės citometrija

Imuninės sistemos ląstelės inkubuojamos su antikūnais, atpažįstančiais ląstelių specifinius paviršiaus žymenis. Naudojami antikūnai žymėti fluorescenciniais dažais: FITC, PE ar PerCP. Ląstelių suspensija žymėjimo buferiniame tirpale (PBS buferinis tirpalas su 2 % FCS ir 0,1 % natrio azido) sumaišoma su antikūnais ir inkubuojama 30 min. ant ledo. Ląstelės praskiedžiamos žymėjimo buferiniu tirpalu ir analizuojamos BD FACScan tėkmės citometru. Skirtingų leukocitų populiacijų identifikavimui naudoti antikūnų deriniai pateikti 2 lentelėje. Ląstelės buvo vertintos ne tik kokybiškai, bet ir kiekybiškai. Atsižvelgiant į paimtą ląstelių kiekį analizei, jų skiedimą prieš matavimą bei suskaičiuotas ląsteles (prietaiso parodymas), buvo paskaičiuota, koks vienos ar kitos populiacijos ląstelių kiekis ($\times 10^6$) yra atitinkamame organe.

2 lentelė. Imuninės sistemos ląstelių identifikavimas tėkmės citometrijos metodu.

Organas	Dažymui naudoti antikūnai	Ląstelių identifikavimas
Užkrūčio liauka	CD8-FITC (Miltenyi Biotec) CD4-PE (Miltenyi Biotec)	CD8 ⁻ CD4 ⁻ - ankstyviausios brendimo stadijos ląstelės CD8 ⁺ CD4 ⁺ - nesubrendusios T ląstelės CD8 ⁺ CD4 ⁻ ir CD8 ⁻ CD4 ⁺ - T ląstelės, kurios palieka užkrūčio liauką ir keliauja į periferinius organus
Blužnis, Limfiniai mazgai, Pejerio plokštelės	CD8-FITC CD4-PE B220-PerCP (Pharmigen)	CD8 ⁺ CD4 ⁻ B220 ⁻ - T _C ląstelės CD8 ⁻ CD4 ⁺ B220 ⁻ - T _{H0} ląstelės CD8 ⁻ CD4 ⁻ B220 ⁺ - B ląstelės
Blužnis	CD21-FITC (Pharmigen) CD23-PE (Pharmigen) B220-PerCP	CD21 ⁻ CD23 ⁻ B220 ⁺ - nesubrendusios B ląstelės CD21 ⁺ CD23 ⁺⁺ B220 ⁺ - subrendusios, folikulinės B ląstelės CD21 ⁺⁺ CD23 ^{+/+} B220 ⁺ - marginalinės zonos B ląstelės
Blužnis	CD3-FITC (Pharmigen) DX5-PE (Pharmigen)	CD3 ⁺ DX5 ⁻ - T ląstelės CD3 ⁺ DX5 ⁺ - NK, T ląstelės CD3 ⁻ DX5 ⁺ - NK ląstelės
Kaulų čiulpai	IgM-PE B220-FITC	IgM ⁻ B220 ⁻ - ląstelės, dar neturinčios B ląstelėms specifinių žymenų IgM ⁻ B220 ⁺ - ankstyviausia B ląstelių vystymosi fazė IgM ⁺ B220 ⁺ - antra B ląstelių vystymosi fazė IgM ⁺⁺ B220 ⁺ - trečia B ląstelių vystymosi fazė IgM ⁺⁺⁺ B220 ^{+/+} - B ląstelės, paliekančios kaulų čiulpus IgM ⁺⁺ B220 ⁺⁺ - B ląstelės, sugrįžusios iš periferijos
Pilvo ertmė	Gr1-FITC (Miltenyi Biotec) Mac1-PE (Miltenyi Biotec)	Gr1 ⁺ Mac1 ⁺ - granulocitai Gr1 ⁻ Mac1 ⁻ - monocitai Gr1 ⁻ Mac1 ⁺⁺ - makrofagai
Pilvo ertmė	IgM-FITC CD5-PE	IgM ⁺⁺ CD5 ⁻ - B1b B ląstelės IgM ⁺⁺ CD5 ⁺ - B1a B ląstelės IgM ⁺ CD5 ⁻ - B2 B ląstelės IgM ⁻ CD5 ⁺ - T ląstelės
Kraujas	Gr1-FITC Mac1-PE	Gr1 ⁺ Mac1 ⁺ - granulocitai Gr1 ⁻ Mac1 ⁻ - monocitai Gr1 ⁻ Mac1 ⁺⁺ - makrofagai

3.8. Ląstelių sukibimo metodas

Sukibimo metodo etapai:

1. 96-šulinėlių ELISA plokštelės padengiamos su rmICAM-1Fc (R&D Systems). rmICAM-1Fc skiedžiamas PBS buferiniu tirpalu iki 4 µg/ml koncentracijos ir išpilstomas į plokštelės šulinėlius.
2. Laisvo šulinėlių ploto blokavimui naudojamas 1 % jaučio serumo albumino tirpalas.
3. Iš pelių kraujo išgryninami leukocitai ir inkubuojami 15 min. su melatonino receptorių aktyvatoriais ir slopikliais: MT2 ir MT1 receptorių slopiklis lizindolas (10 µM), MT2 receptoriaus slopiklis 4P-PDOT (1 µM), MT3/CR2 receptoriaus slopiklis Prazosino chydrochloridas (10 µM) (Tocris Bioscience), MT3/CR2 receptoriaus aktyvatorius GR135531 (10 nM) (Tocris Bioscience), RORα receptoriaus aktyvatorius CGP 52608 (10 µM) (Sigma-Aldrich). Po inkubavimo pridedamas melatoninas (10 pM) ir inkubuojama dar 15 minučių. Pasibaigus inkubavimui ląstelės perkeliama į plokštelę. Įpiltas ląstelių skaičius kiekviename šulinėlyje buvo $0,3-0,5 \cdot 10^6$.
4. Ląstelių nuėmimui į šulinėlius įpilama po 50 µl ledo šaltumo terpės (RPMI + 5 mM EDTA + 0,1 % Na azido), kurioje yra antikūnų prieš ląstelių specifinius paviršiaus žymenis. Po 15 minučių inkubavimo ant ledo, ląstelės suspenduojamos ir papildomai įpilama dar 150 µl (RPMI + 5 mM EDTA + 0,1 % Na azido) terpės. Inkubuojama dar 15 minučių ir ląstelės surenkamos į srautinės citometrijos mėgintuvėlius. Ląstelės praskiedžiamos žymėjimo buferinių tirpalų ir analizuojamos BD FACScan srautiniu citometru.
5. Ląstelių prikibimas vertinamas procentais. Prikibusių ląstelių % = ląstelių skaičius iš vieno šulinėlio/pradinis ląstelių skaičius • 100%.

3.9. Ląstelių gryninimas

B220⁺ B ląstelės iš blužnies ląstelių buvo išgrynintos teigiamos selekcijos būdu naudojant anti-R-Phycoerythrin (PE) Magnetic Particles (BD Biosciences) rinkinį, pagal gamintojo rekomendacijas.

CD4⁺ T ląstelės iš limfmazgių ląstelių buvo išgrynintos teigiamos selekcijos būdu naudojant anti-R-Phycoerythrin (PE) Magnetic Particles (BD Biosciences) rinkinį, pagal gamintojo rekomendacijas.

Granulocitai iš pilvo ertmės ląstelių buvo išgrynintos neigiamos selekcijos būdu naudojant anti-R-Phycoerythrin (PE) Magnetic Particles (BD Biosciences) rinkinį, pagal gamintojo rekomendacijas.

Leukocitų gryninimas iš kraujo. Kraujas sumaišomas su eritrocitų lizės buferiniu tirpalu (1 litre distiliuoto vandens: 8,99 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, 37 mg Na₄EDTA,) santykiu 1:14, ir 5 min. laikomas kambario temperatūroje. Centrifuguojama 720 g 5 min. 18°C temperatūroje, nuosėdos resuspenduojamos 3 ml šalto PBS ir vėl centrifuguojamos 4°C temperatūroje. Gautas tirpalas įpilamas į Petri lėkštelę ir paliekamas 30 minučių kambario temperatūroje (taip pašalinami prilipę makrofagai). Suspensinės ląstelės centrifuguojamos 720 g 5 min. 18°C temperatūroje ir suspenduojamos RPMI terpėje su priedais (10 mM HEPES (Hyclone), 0,25 % jaučio albumino serumas).

3.10. RNR išskyrimas

RNR iš organų ir ląstelių buvo išskiriama naudojant „GeneJET™ RNA Purification Kit“ (Thermo Fisher Scientific) ir „GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit“ (SIGMA-ALDRICH) rinkinius pagal gamintojų rekomendacijas. RNR priemaišos pašalinamos prie 8 µl išgrynintos RNR pridedant 1 µl DNR-azės (1 u/ml), 1 µl DNR-azės buferinio tirpalo, 0,5 µl (20 u/µl) ribonukleazės slopiklio. Tirpalas inkubuojamas 30 min. 37°C temperatūroje. Gauta RNR buvo naudojama kDNR sintezei, arba saugoma -70°C.

3.11. Komplementarios DNR sintezė

Atvirkštinės transkriptazės reakcija (pirmos komplementarios DNR (kDNR) grandinės sintezė) buvo atliekama naudojant “Thermo Fisher Scientific“ reagentus. Mėgintuvėlyje sumaišyta 5 µl RNR, 6 µl dejonizuoto vandens, 4 µl 5x reakcijos buferinio tirpalo, 0,5 µl (20 u) ribonukleazės slopiklio, 2 µl 10 mM dNTP ir 1 µl 100 pmol dT pradmenų. Paruoštas tirpalas inkubuojamas 5 min. kambario temperatūroje. Pasibaigus inkubavimui pridedamas 0,1 µl atvirkštinės transkriptazės fermentas. Komplementarios DNR sintezė atliekama naudojant (Eppendorf AG Mastercycler epgradient) termociklerį. kDNR sintezės temperatūros ciklai: 10 minučių 25°C, 30 minučių 50°C ir 5 minutės 85°C. Gauta kDNR laikoma -20°C kol atliekama tikrojo laiko PGR.

3.12. Tikrojo laiko polimerazinė grandininė reakcija

Tikrojo laiko polimerazinė grandininė reakcija buvo atliekama naudojant CORBETT research Rotor-Gene RG 6000 prietaisą ir “Thermo Fisher Scientific“ reagentus. Norint apsisaugoti nuo pašalinės DNR priemaišų, buvo naudojamas fermentas Uracil-DNR glikozilazė ir dNTP/dUTP mišinys. Vykstant PGR reakcijai į DNR inkorporuojami dUTP. Tokias DNR grandines (bet ne kDNR) 37-50°C temperatūroje skaldo Uracil-DNR glikozilazė. Mėgintuvėlyje sumaišyta: 2 µl komplementarios DNR, 2 µl (10 µM) tiriamųjų genų pradmenų, 2 µl (25 mM) MgCl₂, 4 µl (5 M) betaino, 2 µl (2 mM) dNTP/dUTP mišinio, 2 µl 10x reakcijos buferinio tirpalo, 1 µl (26,6 µM) fluorescencinio nukleorūgšties dažo Syto 9 (Invitrogen), 0,1 µl (5 u/µl) Hot start Taq polimerazės, 0,4 µl (1 u/µl) Uracil-DNR glikozilazės ir 4,5 µl vandens. Bendras tūris 20 µl. PGR reakcijoje po 2 minučių inkubacijos 50°C ir 5 minučių inkubacijos 95°C sekė 40-45 PGR ciklai:

95°C – 45 sek.

54-61°C (priklausomai nuo pradmenų poros) – 45 sek.

72°C – 45 sek.

Reakcijos produktai buvo nustatomi pagal jų lydymosi temperatūrą nuo 60°C iki 90°C, ir atlikus DNR elektroforezę agaroziniame gelyje. Kaip neigiama kontrolė naudojamas PGR mišinys be kDNR. Naudojami PGR pradmenys pateikti 3 lentelėje. ROR α pradmenys tinka visiems keturiems ROR α izotipams, ROR γ pradmenys tinka abiem ROR γ izotipams.

3 lentelė. PGR pradmenys.

Receptorius	Ta (°C)	Amplifikuoto produkto dydis, bp	Pradmenų sekos
MT1 (A)	58	352	T: GGGCCCCACTCAACCTCATAG P: AGCAGTAAGACCCCAACCAGTGTG
MT1 (B)	59	374	T: ATCGCCATCATGCCAACCT P: TAACTAGCCACGAACAGCCACTCT
MT1(C)*	59	248	T: CCGCAACAAGAAGCTCAGGAACTC P: TCGTACTTGAGGCTGTGGCAAATG
MT2	58	341	T: AACCGCTACTGCTGCATCTGTCAT P: AAAGTGGCGAAATCACTCGGTCTC
MT3/CR2	59	396	T: CAATGGGTCCCTGAAGAAAGTGG P: CCCGTGGTTAAGGAAAGGAGAGC
ROR α *	59	417	T: GGAAGAGCTCCAGCAGATAACG P: GCTGACATCAGTACGAATGCAG
ROR β	58	373	T: TGGGGATATCAGAACAGCAGAGGA P: AATCAAGGCGTATCAAAGCAAGTC
ROR γ	59	423	T: GGCCCCCTGGACCTCTGTTTTG P: CGCCGCAGCCAGCAGTGTAAATG
NRG	54	249	T: GCT GGT GAA AAG GAC CTC T P: CAC AGG ACT AGA ACA CCT GC

Ta(°C) – PGR hibridizacijos fazės temperatūra; T – tiesioginis pradmuo; P – atvirkštinis pradmuo; NRG "namų ruošos genai" (*angl. house keeping gene*): hipoksantinganino fosforiboziltransferazės.

* Pradmenų sekos parinktos pagal [144].

Tikrojo laiko PGR buvo analizuojama pagal K.J. Livak ir T.D. Schmittgen aprašytą metodiką [274]. PGR buvo atliekama 2 pakartojimais. Teigiama kontrolė ir santykinis standartas – smegenų kDNR. Neskiesta smegenų kDNR įvertinta kaip 1000 santykinų vienetų. Iš penkiakartinių smegenų kDNR skiedimų sudaroma kalibracinė kreivė. Tiriamųjų pavyzdžių kDNR neskiedžiama.

Naudojant programą Rotor-Gene RG 6000 Ver. 1.7, braižomos PGR produktų amplifikavimo kreivės, kur X ašis nurodo ciklus, o Y – fluorescenciją. Kiekvienam PGR produktui paskaičiuojamos Ct reikšmės. Ct – PGR ciklo skaičius, kai amplifikuojamo produkto kilimo kreivė kerta nustatytą atskaitos liniją. Pagal smegenų Ct reikšmes braižoma kalibracinė kreivė, pagal kurią paskaičiuojamas tiriamųjų pavyzdžių transkriptų kiekis santykiniais vienetais. Tiriamas genas normalizuojamas pagal "namų ruošos geno" reikšmes. Norint palyginti PGR produktų kiekį tarpusavyje, visos normalizuotos reikšmės padalijamos iš smegenų normalizuotos reikšmės. Šios reikšmės yra pateiktos rezultatuose.

3.13. Plazmidinės DNR gryninimas

Plazmidinės DNR gryninimas endonukleaziniam skaldymui.

Bakterijų kolonijos inokuliuojamos į 3 ml LB terpę su 50 µg/ml ampicilino (Hyclone) ir auginamos per naktį 37°C temperatūroje, purtyklėje. Dalis bakterijų suspensijos (1,5 ml) nucentrifuguojama ir nuosėdos suspenduojamos 100 µl šalto DNR gryninimo tirpalo I (50 mM gliukozės, 25 mM TrisHCl (pH 8), 10 mM EDTA (pH 8)). Pridedama 200 µl DNR gryninimo tirpalo II, (2N NaOH, 1% SDS), sumaišoma ir pridedama 150 µl ledo šaltumo DNR gryninimo tirpalo III (600 ml 5 M kalio acetato, 115 ml ledinės acto rūgšties, 280 ml distiliuoto vandens). Vėl sumaišoma ir centrifuguojama 5600 g 5 min. Supernatantas perkeliamas į naują mėgintuvėlį ir DNR išsodinama 3 tūriais etanolio. Išsodinta DNR centrifuguojama ir nuosėdos tirpinamos 50 µl TE buferinio tirpalo su 20 µg/ml RN Razės. Endonukleaziniam skaldymui naudojam 5 µl DNR.

Plazmidinės DNR gryninimas DNR saugojimui, klonavimui, bakterijų transformavimui.

Bakterijos inokuliuojamos į 25 ml LB terpę su 50 µg/ml ampicilino (Hyclone) ir auginamos per naktį 37°C temperatūroje, purtyklėje. Bakterijos

centrifuguojamos 5600 g 1 min. ir resuspenduojamos 0,5 ml šalto DNR gryninimo tirpalo I. Pridedama 1 ml DNR gryninimo tirpalo II, sumaišius pridedama 0,75 ml šalto DNR gryninimo tirpalo III, vėl sumaišoma ir inkubuojama 10 min. ant ledo. Centrifuguojama 5600 g 5 min., supernatante esanti DNR išsodinama pridėjus 0,6 supernatanto tūrio izopropanolio. DNR centrifuguojama 5600 g 5 min. ir ištirpinama 0,2 ml TE buferinio tirpalo. Stambios molekulinės masės RNR priemaišos pašalinamos jas nusodinant ličio chloridu. Šiuo tikslu prie DNR tirpalo pridedamas toks pats tūris 5M LiCl, sumaišoma ir centrifuguojama 3350 g 10 min. Supernatantas perkeliamas į naują mėgintuvėlį ir DNR nusodinama tuo pačiu tūriu izopropanolio. Po centrifugavimo DNR tirpinama 500 µl TE buferinio tirpalo su 20 µg/ml RNRazės ir inkubuojama 30 min. 37°C temperatūroje. Pasibaigus inkubavimui DNR papildomai gryninama ekstrakcijos fenoliu-chloroformu būdu ir nusodinus 70 % etanoliu. Centrifuguojama 5600 g 5 min, nuosėdos tirpinamos 500 µl sterilaus vandens.

3.14. Endonukleazinis skaldymas

Endonukleaziniam skaldymui buvo naudojami Thermo Fisher Scientific reagentai. Mėgintuvėlyje paruoštas DNR skaldymo mišinys: DNR (25 µl) + 1/10 bendro tūrio restrikcijos endonukleazių buferinio tirpalo ir H₂O iki bendro tūrio (150 µl). Į mišinį įpilama po 1µl atitinkamų nukleazių ir inkubuojama 2 val. CO₂ inkubatoriuje. Reikalingų fragmentų išskyrimui naudojamas DNR elektroforezės metodas.

3.15. DNR elektroforezė

DNR elektroforezė buvo atliekama 0,6 – 2 % agaroziniame gelyje (priklausomai nuo skiriamų DNR fragmentų). DNR vizualizavimui į gelį pridedama 0,5 µg/ml etidžio bromido. Elektroforezė buvo atlikta BioRad horizontalioje elektroforezės kameroje. Reikalingi DNR fragmentai iš gelio buvo

išskiriami naudojant „DNA Extraction Kit“ (Thermo Fisher Scientific) rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas.

3.16. Ligavimas

Ligavimui buvo naudojami Thermo Fisher Scientific reagentai. Mėgintuvėlyje paruošiamas ligavimo tirpalas: vektorius 1 µl, insertas – 10 µl, PEG 4000 – 4 µl, ligavimo buferinis tirpalas – 2 µl, T4 DNR ligazė – 1 µl, vanduo – 2 µl. Tirpalas inkubuojamas 2 valandas kambario temperatūroje.

3.17. Kompetentinių *E.coli* ląstelių paruošimas transformacijai

E. coli kolonijos inokuliuojamos į 250 ml SOB terpės (2 % triptonas, 0,5 % mielių ekstraktas, 8,5 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) be antibiotiko ir 1-2 dienas auginamos 18-25°C temperatūroje (kol ląstelių kultūros tankis pasiekia 0,6-1 optinio vieneto 600 nm bangos ilgyje). Auginimą nutraukus ląstelės atšaldomos ant ledo (visos tolesnės procedūros atliekamos ant ledo) ir surenkamos centrifuguojant 720 g 10 min. 4°C temperatūroje. Surinktos ląstelės resuspenduojamos 80 ml šalto TB tirpalo ir vėl inkubuojamos 10 min. Pasibaigus inkubavimui ląstelės vėl surenkamos centrifuguojant 720 g 5 min. 4°C temperatūroje. Po to ląstelės resuspenduojamos 20 ml TB tirpalo su 7 % DMSO ir inkubuojamos 10 min. ant ledo. Bakterijos išpilstomos po 20 µl į 1,5 ml centrifuginius mėgintuvėlius, užšaldomos skystame azote ir saugomos –80°C.

3.18. „Karščio šoko“ transformacija

Kompetentinės ląstelės atšildomos ant ledo, sumaišomos su 1-5 µl ligavimo produkto (arba 0,1 - 1 µl plazmidinės DNR) ir inkubuojamos 30 min. ant ledo. Atliekamas „karščio šokas“, t.y. 1,5 min. inkubuojama 42°C temperatūroje. Pasibaigus inkubavimui bakterijos atšaldomos ant ledo, pridedama 300-500 µl SOC terpės (2 % triptonas, 0,5 % mielių ekstraktas, 8,5 mM NaCl, 2,5 mM KCl,

10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM gliukozės) ir inkubuojama 45-60 min. 37°C purtyklėje. Pasibaigus inkubavimui ląstelės centrifuguojamos 720 g 5 min. 4°C temperatūroje, resuspenduojamos 100 µl terpės ir pasėjamos į Petri lėkštes su LB-agaru ir 50 µg/ml ampicilinu (Hyclone).

3.19. GST chimerinių baltymų ekspresija

GST, GST-MT1 ir GST-MT2 baltymų ekspresija buvo vykdoma DH5α ir BL21 *E.coli* kamienuose. Bakterijų kolonija inokuliuojama į 5 ml LB terpės su 50 µg/ml ampicilinu ir inkubuojama per naktį 37°C temperatūros purtyklėje. Iš ryto bakterijų suspensija praskiedžiama iki 500 ml LB terpėje ir toliau auginamos 20°C temperatūroje kol ląstelių kultūros tankis pasiekia 1-1,2 optinio vieneto 600 nm bangos ilgyje. Pasiekus reikalingą optinį tankį bakterijų suspensija indukuojama su 1 mM IPTG (Thermo Fisher Scientific). Praėjus 4 valandoms po indukcijos bakterijos centrifuguojamos 720 g 20 min. 4°C temperatūroje. Surinktos bakterijos naudojamos GST baltymų gryninimui.

3.20. GST chimerinių baltymų gryninimas

Bakterijos suspenduojamos 20-25 ml šaltame PBS tirpale su 1 mg/ml PMSF (Thermo Fisher Scientific), 100 mM EDTA ir inkubuojamos 30 minučių ant ledo. Bakterijos ardamos ultragarsu laikant jas ant ledo (5 x 30 sekundžių, 750 impulsų.). Pasibaigus bakterijų ardymui pridedama iki 1 % Triton-x100 (Sigma). Inkubuojama purtant 30 min., 4°C temperatūroje. Pasibaigus inkubacijai centrifuguojama 5600 g 30 min. 4°C temperatūroje. GST chimeriniai baltymai, esantys supernatante, surišami su imobilizuotu glutationu: pridedama 665 µl glutation-sefarozės (Pierce) ir inkubuojama švelniai purtant 4-16 val. 4°C temperatūroje. Surenkamas supernatantas, centrifuguojama 720 g 5 min. 4°C temperatūroje, nuosėdos resuspenduojamos šaltame plovimo buferiniame tirpale (50 mM Tris HCl pH 7,5; 100 mM Na₂EDTA; 0,1 % Tween-20) ir vėl centrifuguojamos 720 g 5 min. 4°C temperatūroje. Nuosėdos resuspenduojamos

eliucijos buferiniame tirpale (50 mM Tris HCl pH 7,5; 0,1% Tween-20, 100 mM glutationo; pH 7) ir inkubuojamos 2 - 4 val. ant ledo. Centrifuguojama 720 g 5 min. 4°C temperatūroje. GST chimeriniai baltymai esantys supernatante gryninami, supernatantą dializuojant PBS buferiniame tirpale. Baltymų grynumas įvertinamas naudojant SDS-PAGE elektroforezę (12 % poliakrilamidiniame gelyje). Baltymai saugomi -20°C temperatūroje.

3.21. Monokloninių antikūnų gavimas

Žiurkių imunizavimas. Monokloninių antikūnų gavimui 11 savaičių amžiaus Lewis linijos žiurkių patelės buvo imunizuotos pagal 4 lentelėje pateiktą schemą.

4 lentelė. Lewis linijos žiurkių imunizavimo etapai.

	MT1	MT2
I imunizacija	Apie 50 µg baltymo (GST-MT1), su pilnu Freundo adjuvantu. Imunizuota po oda ir į pilvo ertmę.	Apie 100 µg baltymo (GST-MT2), su pilnu Freundo adjuvantu. Imunizuota po oda ir į pilvo ertmę.
Laiko tarpas iki kitos imunizacijos	3 savaitės	3,5 mėnesiai
II imunizacija	Apie 50 µg baltymo (GST-MT1), su nepilnu Freundo adjuvantu. Imunizuota po oda ir į pilvo ertmę.	Apie 100 µg baltymo (GST-MT2), su nepilnu Freundo adjuvantu. Imunizuota po oda ir į pilvo ertmę.
Laiko tarpas iki kitos imunizacijos	3 mėnesiai	2,5 mėnesiai
III imunizacija	Apie 50 µg baltymo (GST-MT1), su nepilnu Freundo adjuvantu. Imunizuota po oda ir į pilvo ertmę.	-
Laiko tarpas iki kitos imunizacijos	1 mėnuo	
Paskutinė imunizacija	40 µg GST-MT1 PBS buferiniame tirpale (3 dienos prieš hibridizaciją); 125 µg GST-MT1 PBS buferyje (2 dienos prieš hibridizaciją).	100 µg GST-MT21 PBS buferiniame tirpale (3 dienos prieš hibridizaciją); 100 µg GST-MT2 PBS buferyje (2 dienos prieš hibridizaciją).

Hibridizacija: imunizuotos žiurkės blužnies ląstelių suliejimas su mielominėmis ląstelėmis. Prieš suliejimą mielominės SP2/0 linijos ląstelės ir imunizuotos žiurkės blužnies ląstelės du kartus praplaunamos RPMI terpėje, sumaišomos santykiu nuo 1:1 iki 1:10 ir centrifuguojamos 720 g 5 min. Pasibaigus centrifugavimui ant ląstelių sulašinama 0,5 ml PEG-o tirpalo (42 % PEG 4000 DMEM terpėje ir 15 % DMSO). Ląstelių suspensija spenduojama 1 min., suspendavus, per 10 min. sulašinama 10 ml DMEM (HyClon) terpės. Sulašinus 10 ml terpės, ląstelių suspensija atsargiai spenduojama ir pripilama DMEM terpės iki 50 ml. Centrifuguojama 720 g 10 min. Taip plaunama du kartus. Ląstelės suspenduojamos HAT terpėje ($0.5 \cdot 10^6 - 1 \cdot 10^6$ ląstelių/ml) ir pasėjamos į 96-ių šulinėlių plokšteles - 200 μ l ląstelių suspensijos į šulinėlį. Plokštelės inkubuojamos CO₂ inkubatoriuje. Po penkių dienų pusė HAT terpės keičiama į HT terpę.

Praėjus 10 dienų po hibridizacijos, mikroskopu peržiūrimi visi šulinėliai ir pažymimi tie, kuriuose auga klonai. Antikūnų prieš imunogeną produkcija tikrinama netiesioginės ELISA metodu. Teigiamais klonais buvo laikomi tie, kurių produkuojami antikūnai jungiasi su imunogenu ir nesijungia su GST baltymu. Teigiami klonai klonuojami riboto praskiedimo metodu [275, 276]. Padaugintos ląstelės šaldomos bei naudojamos antikūnų produkcijai *in vitro* ir *in vivo* sąlygomis.

Monokloninių antikūnų produkcija *in vitro* ir *in vivo* sąlygomis.

In vitro. Ląstelės kultivuojamos RPMI auginimo terpėje. Kai ląstelių prisidaugina, ląstelių suspensija centrifuguojama 720 g 5 min. Ląstelių kultūrų supernatantas su antikūnais saugomas steriliuose mėgintuvėliuose 4°C temperatūroje.

In vivo. C57BL/6 RAG2^{-/-} linijos pelės (šios pelės neturi T ir B ląstelių, todėl nėra transplantanto atmetimo reakcijos) sensibilizuojamos, įleidžiant į pilvo ertmę 0,5 ml pristano. Po 4 - 10 dienų į pilvo ertmę suleidžiama $10^4 - 10^5$ ląstelių 2-5 ml RPMI terpėje. Ascitas susiformuoja per 8 - 20 dienų. Ascitinis skystis

išsiurbiamas iš pelės pilvo ertmės, nucentrifuguojamos hibridominės ląstelės, atskiriamas viršuje susidaręs riebalinis sluoksnis ir ascitinio skysčio baltymai išsodinami 45 % prisotinimo amonio sulfatu.

Antikūnų testavimui buvo naudoti ELISA ir imunoblotingo metodai.

3.22. Imunoblotingas

Imunoblotingas atliekamas pusiau sausu būdu, naudojant BioRad firmos aparatą. GST-MT1, GST-MT2 rekombinantiniai baltymai ar ląstelių lizatas praleidžiami 15 % poliakrilamidiniame gelyje. Baltymų pernaša ant PDF membranos atliekama pagal BioRad kompanijos rekomendacijas. Membranos blokuojamos 2-18 val. 5 % pieno miltelių tirpalu PBS buferiniame tirpale, plaunamos PBS buferiniame tirpale su 0,05 % Tween-20 ir inkubuojamos 2-18 val. su monokloniniais antikūnais, atpažįstančius pelių MT1 ar MT2 baltymus. Membranos vėl plaunamos PBS buferiniame tirpale su 0,05 % Tween-20, po to inkubuojamos 1 val. su krienų peroksidaze žymėtais antikūnais, atpažįstančiais žiurkių imunoglobulinus (GE Healthcare). Visi antikūnų skiedimai daromi PBS buferiniame tirpale su 5 % pieno miltelių ir 0,05 % Tween-20. Trumpos inkubacijos (1-2 val.) atliekamos kambario temperatūroje, ilgesnės (18 val.) - 4°C temperatūroje. Prisijungę antikūnai, išryškunami naudojant netirpų substratą – TMB (Thermo Fisher Scientific).

3.23. Statistiniai metodai

Melatonino poveikio humoraliniam imunitetui tyrimo statistinis reikšmingumas tarp grupių buvo vertinamas pagal suporuotą dvipusį Stjudento (Student's) t testą. Skirtumai laikomi statistiškai patikimi, kai $p < 0,05$.

Nustatant melatonino poveikį granulocitų sukibimui su ICAM molekule statistinis reikšmingumas tarp grupių buvo vertinamas pagal nesuporuotą dvipusį Stjudento (Student's) t testą. Skirtumai laikomi statistiškai patikimi, kai $p < 0,05$.

Melatonino sintezės sutrikimų įtaką imuninės sistemos organų ląstelių skaičiui ir melatonino poveikį granulocitų migracijai, skirtumų statistinis reikšmingumas tarp grupių buvo vertinamas pagal neparametrinį Mano ir Vitnio (Mann-Whitney) U testą. Skirtumai laikomi statistiškai patikimi, kai $p < 0,05$.

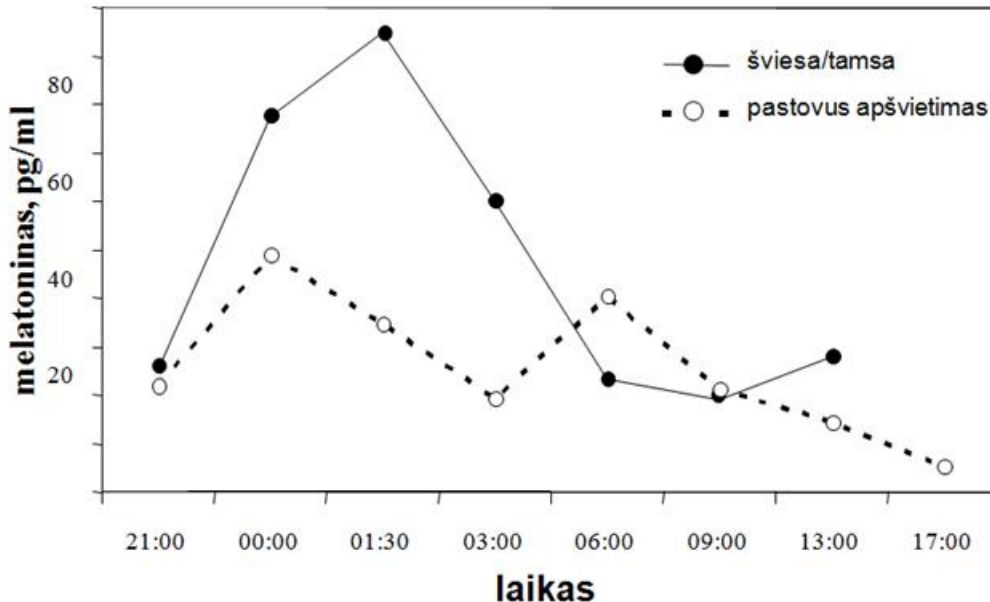
Nustatant melatonino receptorių raiškos imuninės sistemos ląstelėse priklausomybę nuo paros laiko ar cirkadinio ritmo sutrikimo, statistinis reikšmingumas tarp grupių buvo vertinamas pagal post hoc Tukey's Multiple Comparison Test. Skirtumai laikomi statistiškai patikimi, kai $p < 0,05$.

4. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

4.1. Pastovaus apšvietimo įtaka melatonino koncentracijai

BALB/c linijos pelių kraujo serume

Tyrimuose mes naudojome šviesą kaip melatonino gamybos slopiklį, todėl pirmiausiai buvo nustatytas pastovaus apšvietimo poveikis BALB/c linijos pelių melatonino gamybai. Šiuo tikslu tiriamieji gyvūnai buvo suskirstyti į dvi grupes: viena pelių grupė buvo laikoma natūralaus apšvietimo sąlygomis, o kita pastovaus apšvietimo sąlygomis. Praėjus dviem savaitėms nuo eksperimento pradžios, skirtingu paros metu, buvo imami pelių kraujo pavyzdžiai ir nustatoma jame esančio melatonino koncentracija. 3 pav. pateikti rezultatai rodo, kad natūraliomis apšvietimo sąlygomis gyvenančioms pelėms melatonino gamyba prasidėjo devintą valandą vakaro, o maksimali hormono koncentracija užregistruota 1-2 val. nakties.



3 pav. Skirtingomis apšvietimo sąlygomis laikytų pelių melatonino koncentracija kraujo serume. BALB/c pelės buvo suskirstytos į dvi grupes. Viena grupė laikyta natūralaus, kita pastovaus apšvietimo sąlygomis. Kraujo mėginiai buvo renkami skirtingu laiku paros bėgyje. Melatonino koncentracija kraujo serume buvo nustatoma naudojant Melatonin ELISA rinkinį.

Taip pat nustatyta, kad pelių, gyvenančių pastovaus apšvietimo sąlygomis, melatonino koncentracija dieną ir ryte atitiko pelių, gyvenančių natūralaus apšvietimo sąlygomis, hormono koncentraciją. Naktį, kai įprastai prasideda melatonino sintezė, esant šviesai, pasireiškė melatonino sintezės slopinimas. Pelių, gyvenančių prie pastovaus apšvietimo, hormono koncentracija kraujo serume buvo 2-3 kartus mažesnė nei pelių, gyvenančių natūralaus apšvietimo sąlygomis.

4.2. Melatonino poveikis humoraliniam imunitetui

Antikūnų produkcija gali būti nuo T ląstelių priklausoma ir nepriklausoma, todėl, siekiant nustatyti specifinių antikūnų susidarymą, BALB/c linijos pelės buvo imunizuojamos tiek nuo T ląstelių priklausomu, tiek nuo T ląstelių nepriklausomu antigenu. Vykdamas eksperimentą imunizuojamos pelės, atsižvelgiant į apšvietimo sąlygas, buvo suskirstytos į tris grupes:

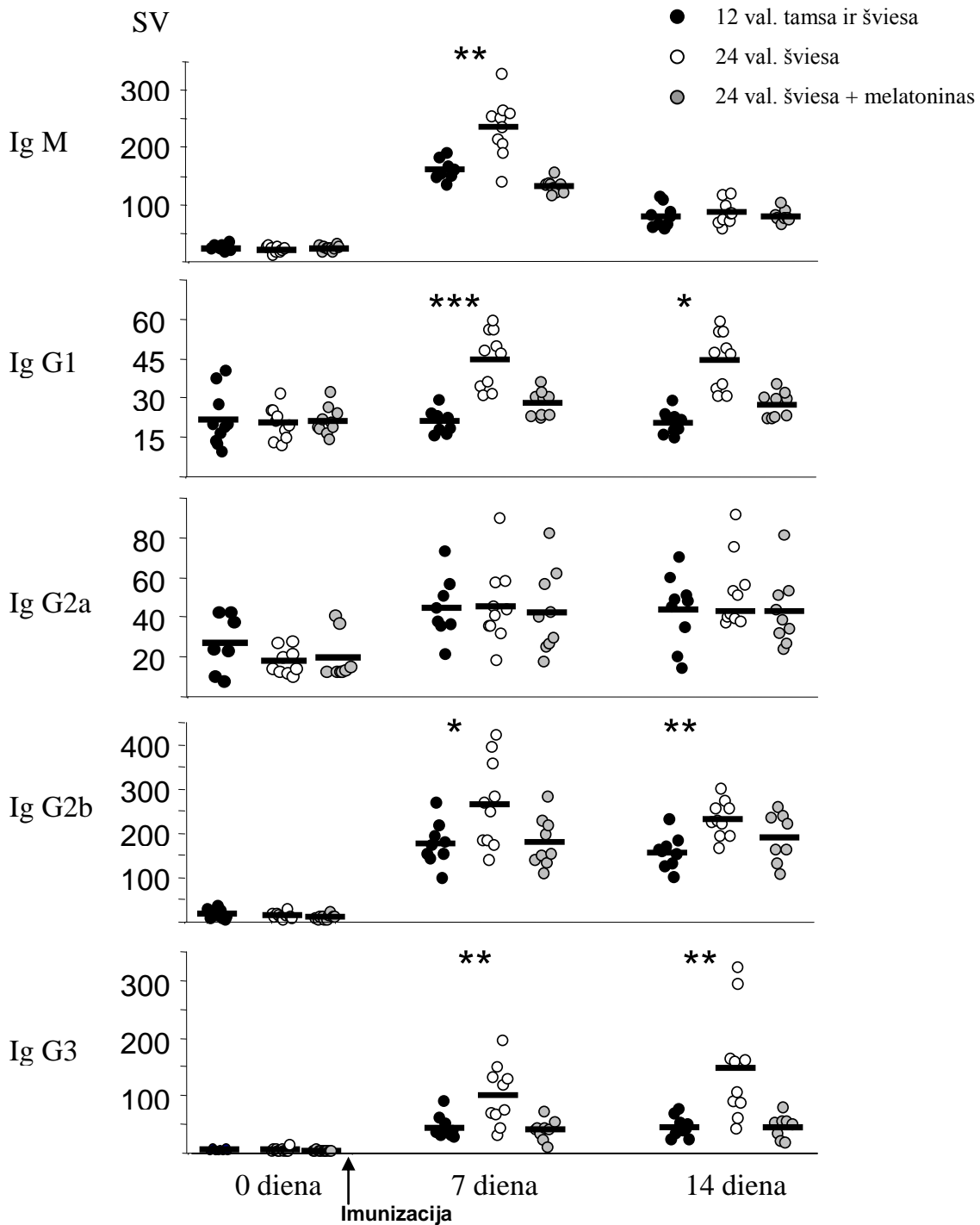
1. Natūralaus apšvietimo sąlygomis laikytos pelės (12 val. šviesa/12 val. tamsa), natūrali melatonino gamyba;
2. Pastovaus apšvietimo sąlygomis laikytos pelės (24 val. šviesa), sutrikusi melatonino gamyba;
3. Pastovaus apšvietimo sąlygomis laikytos pelės (24 val. šviesa), kurioms prasidėjus tamsos periodui į pilvo ertmę buvo atliekamos melatonino (5 mg/kg svorio) injekcijos. Pastaroji pelių grupė tirta norint įsitikinti, kad humoralinį imunitetą reguliuoja melatoninas, o ne kiti cirkadinio ritmo komponentai.

4.2.1. Melatonino įtaka nuo T ląstelių nepriklausomai antikūnų produkcijai

Nuo T ląstelių nepriklausomai antikūnų produkcijai tirti, BALB/c linijos pelės buvo imunizuotos nuo T ląstelių nepriklausomais antigenais – TNP-fikoliu ir TNP-LPS. Šie antigenai stimuliuoja tik B ląsteles ir skatina antikūnų sintezę, tačiau TNP-fikolis ir TNP-LPS nestimuliuoja T ląstelių, todėl šios ląstelės neturi įtakos B ląstelių funkcijoms. Darbo metu eksperimentai su TNP-fikoliu ir TNP-LPS atlikti po du kartus, jų rezultatai pateikti 4 ir 5 pav. bei 5 lentelėje.

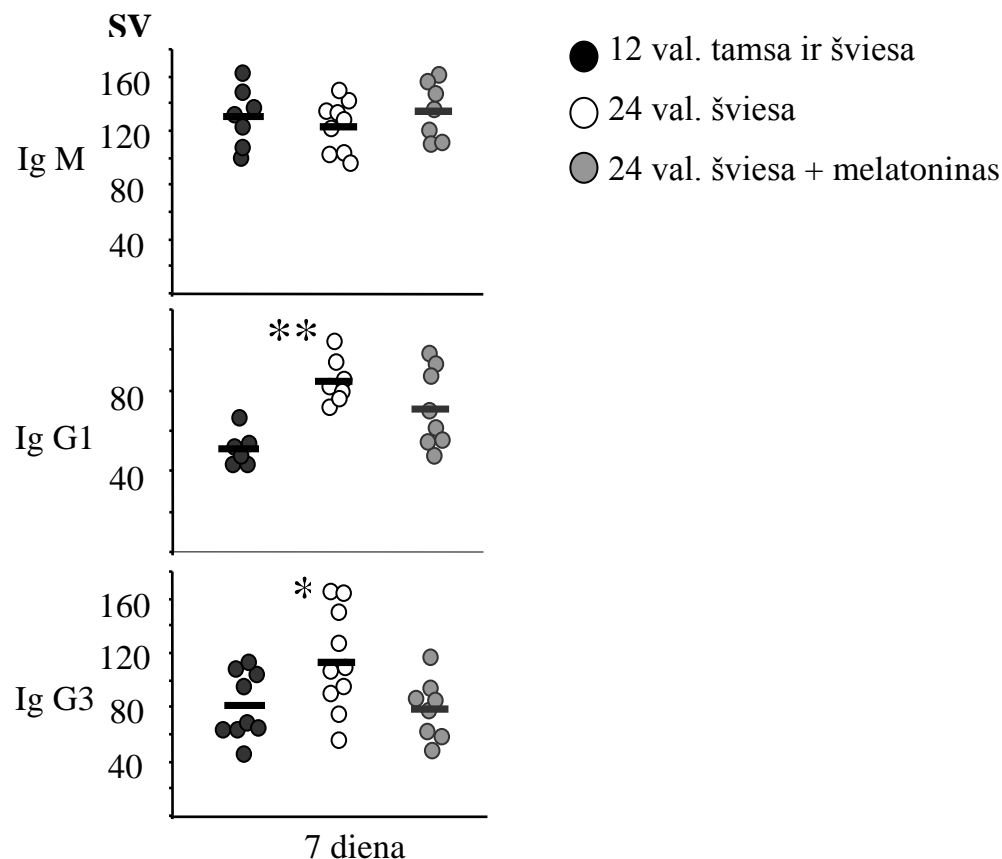
Imunizuojant peles nuo T ląstelių nepriklausomais antigenais (TNP-fikoliu ir TNP-LPS), formuojasi IgM, IgG1, IgG2b, IgG3 bei IgG2a izotipo antikūnai. Esant sutrikusiai melatonino sintezei, visų izotipų TNP-specifinių antikūnų kiekis yra didesnis, t.y. melatoninas slopina nuo T ląstelių nepriklausomą antikūnų gamybą. Laikant peles pastovaus apšvietimo sąlygomis, bet kas vakarą leidžiant melatoniną, antikūnų kiekis panašus į kontrolinės grupės (pelės, gyvenančios 12 val. šviesos ir 12 val. tamsos sąlygomis). Remiantis gautais duomenimis, galima teigti, kad melatonino trūkumas stimuliuoja nuo T ląstelių nepriklausomą antikūnų produkciją.

Literatūros duomenimis, melatoninas neturi poveikio BALB/c linijos pelių B limfocitų proliferacijai ir antikūnų (IgM, IgA, IgG2a, IgG3) gamybai nesant ir esant LPS stimuliacijai [255]. Mūsų tyrimų metu buvo įrodyta, kad melatoninas gali aktyvuoti B ląsteles ir moduluoti antikūnų sekreciją. Slopinant melatonino sintezę, antikūnų produkcija padidėja.



4 pav. TNP-specifinių antikūnų produkcija imunizuojant nuo T ląstelių nepriklausomu antigenu – TNP-fikoliu.

Atskiras rutuliukas – antikūnų kiekis sutartiniais vienetais (SV) vienos pelės kraujo serume. Standartiniame pelių kraujo serumo mišinyje esanti kiekvienos klasės antikūnų koncentracija buvo įvertinta 100 sutartinių vienetų (SV). Statistinis patikimumas tarp grupių buvo vertinamas pagal Stjudento T testą. Statistiškai patikimi skirtumai tarp 12 val. šviesa/tamsa ir 24 val. šviesa grupių pažymėti žvaigždutėmis: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$.



5 pav. TNP-specifinių antikūnų produkcija imunizuojant nuo T ląstelių nepriklausomu antigenu – TNP-LPS.

Atskiras rutuliukas – antikūnų kiekis sutartiniais vienetais (SV) vienos pelės kraujo serume. Standartiniame pelių kraujo serume mišinyje esanti kiekvienos klasės antikūnų koncentracija buvo įvertinta 100 sutartinių vienetų (SV). Statistinis patikimumas tarp grupių buvo vertinamas pagal Stjudento T testą. Statistiškai patikimi skirtumai tarp 12 val. šviesa/tamsa ir 24 val. šviesa grupių pažymėti žvaigždutėmis: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$.

5 lentelė. TNP-specifinių antikūnų produkcijos priklausomybė nuo pelių laikymo apšvietimo sąlygų, imunizuojant nuo T ląstelių nepriklausomais antigenais.

TNP-specifinių antikūnų izotipas	I eksp. 7 diena	II eksp. 7 diena	III eksp. 7 diena	IV eksp. 7 diena
IgM	ΔΔ	-	-	ΔΔ
IgG1	ΔΔΔ	ΔΔ	ΔΔ	Δ
IgG2a	-	Δ	ND	ND
IgG2b	Δ	Δ	ND	ND
IgG3	ΔΔ	Δ	Δ	↑

Δ - pastovaus apšvietimo sąlygomis gyvenančios pelių grupės statistiškai patikimas antikūnų produkcijos padidėjimas lyginant su natūralaus apšvietimo sąlygomis gyvenančia pelių grupe. Vienas trikampis $p \leq 0,05$, du trikampiai $p \leq 0,005$, trys trikampiai $p \leq 0,0005$. ↑ – statistiškai patikimo skirtumo nebuvo, bet buvo didėjimo tendencija. „–“, statistiškai patikimų rezultatų nebuvo; ND – nebuvo daryta.

4.2.2. Melatonino įtaka nuo T ląstelių priklausomai antikūnų produkcijai

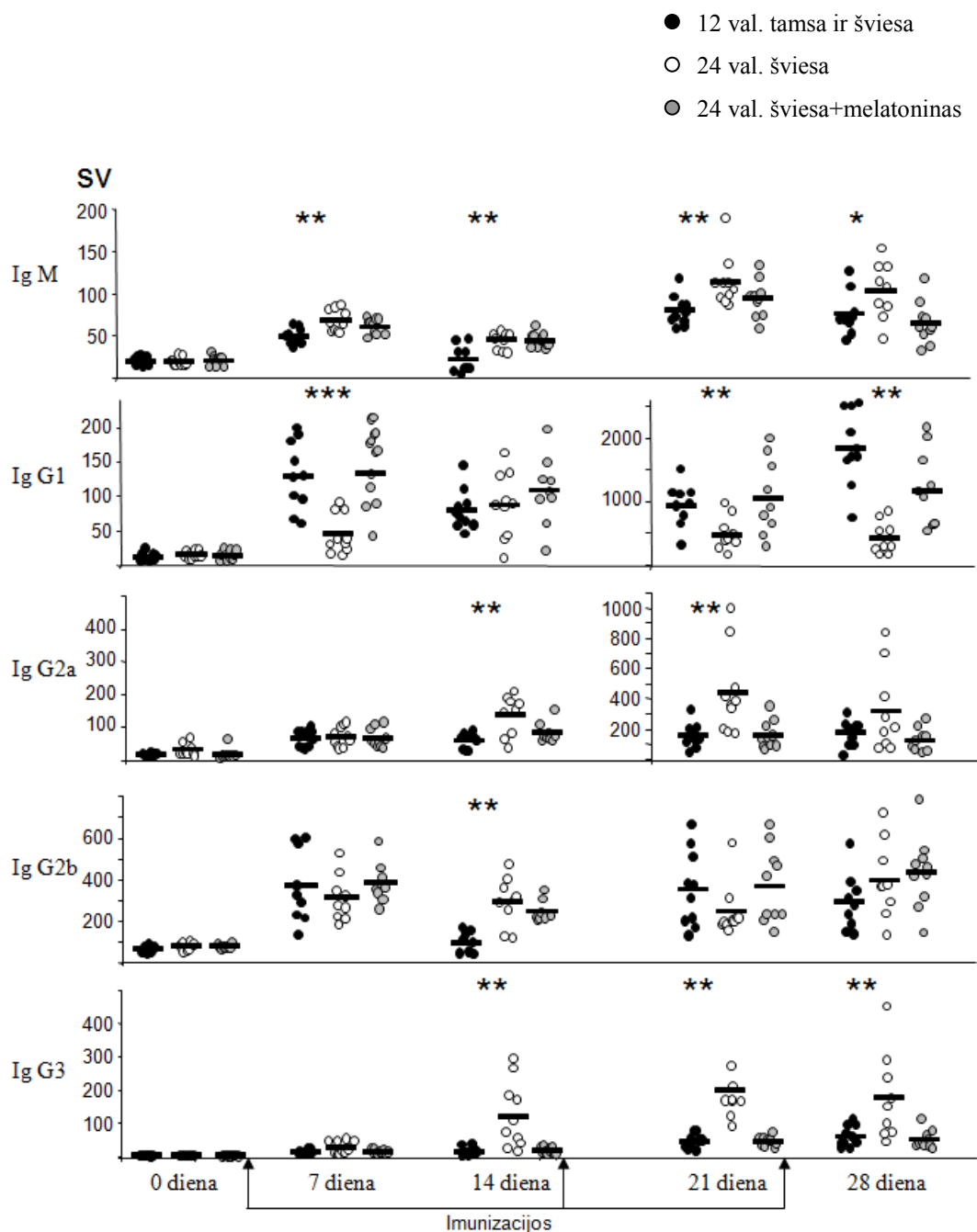
Tiriant nuo T ląstelių priklausomų antikūnų produkciją pelių organizme, BALB/c pelės buvo imunizuotos TNP-ovalbuminu. Ovalbuminas aktyvuoja T_H0 ląsteles, kurios išskiria citokinus ir aktyvina B limfocitus. B limfocitai po aktyvacijos virsta antikūnus gaminančiomis ląstelėmis, antikūnai specifiskai atpažįsta antigeną ir jį pašalina. Imunizuojant nuo T ląstelių priklausomu antigenu susidaro stipresnis imuninis atsakas, lyginant su nuo T ląstelių nepriklausomo antigeno imunizacija. Vystantis imuniniam atsakui susidaro atminties ląstelės ir, pakartotinai imunizavus tuo pačiu antigenu, imuninis atsakas formuojasi daug greičiau, antikūnų kiekis būna didesnis, o giminingumas – aukštesnis. Pirminio ir antrinio imuninio atsako analizei, pelės buvo imunizuotos tris kartus. Antra imunizacija atlikta po 14 dienų nuo pirmos imunizacijos, trečia – 21 dieną nuo pirmos imunizacijos. Pirmo eksperimento rezultatai yra pateikti 6 paveiksle. Abiejų tyrimų rezultatai apibendrinanti 6 lentelėje.

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

Remiantis literatūriniais duomenimis, galima teigti, kad melatoninas stimuliuoja T ląsteles: pelėse, su pašalinta kankorėžine liauka, yra sumažėjusi IL-2 produkcija (citokinas produkuojamas aktyvintomis T ląstelėmis). T ląstelėse melatoninas stimuliuoja IL-2 sekreciją ir IL-2 receptorių ekspresiją [135].

Antigenu aktyvintos T_H0 ląstelės, priklausomai nuo aplinkos sąlygų, gali diferencijuotis į T_H1 ar T_H2 ląsteles. T_H1 ląstelės produkuoja IFN- γ ir skatina ląstelinį imuninį atsaką. T_H2 ląstelės gamina IL-4, IL-10 citokinus, kurie skatina humoralinį imuninį atsaką [277]. Priklausomai nuo to, kurių T ląstelių yra daugiau (T_H1 ar T_H2), gali būti modifikuojami ir B ląstelių produkujamų antikūnų izotipai. T_H1 ląstelės stimuliuoja izotipų persijungimą į IgG2a, o T_H2 ląstelės – į IgG1 izotipą. Tiek T_H1 , tiek T_H2 lemia IgM ir IgG3 antikūnų susidarymą [278, 279]. Mūsų duomenimis, trūkstant melatonino, padidėja IgM, IgG2a ir IgG3 antikūnų kiekiai bei sumažėja IgG1 izotipo antikūnų kiekis. Tai galima būtų susieti su T_H2 T ląstelių funkcijomis.

Jimenez-Caliani ir kt. pastebėjo, kad, gydant Mrl/Mpj-Faslpr pelės melatoninu, gydymo efektas priklausė nuo gyvūnų lyties [280]. Mrl/Mpj-Faslpr pelės – tai modelinės pelės, kurioms su amžiumi išsivysto žmogaus sisteminės vilkligės požymiai: uždegiminiai procesai, autoantikūnų sekrecija. Melatoninu gydant 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 mūsų eksperimentų su T priklausomu ir T nepriklausomu antigenu rezultatais, galima teigti, kad antikūnų sekrecijos pakitimai dėl sumažėjusios melatonino sintezės nepriklauso nuo lytinių hormonų.



6 pav. TNP-specifinių antikūnų produkcija imunizuojant nuo T ląstelių priklausomu antigenu. Atskiras rutuliukas – antikūnų kiekis sutartiniais vienetais (SV) vienos pelės kraujo serume. Standartiniame pelių kraujo serume mišinyje esanti kiekvienos klasės antikūnų koncentracija buvo įvertinta 100 sutartinių vienetų (SV). Statistinis patikimumas tarp grupių buvo vertinamas pagal Stjudento T testą. Statistiškai patikimi skirtumai tarp I ir II grupių pažymėti žvaigždutėmis: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$.

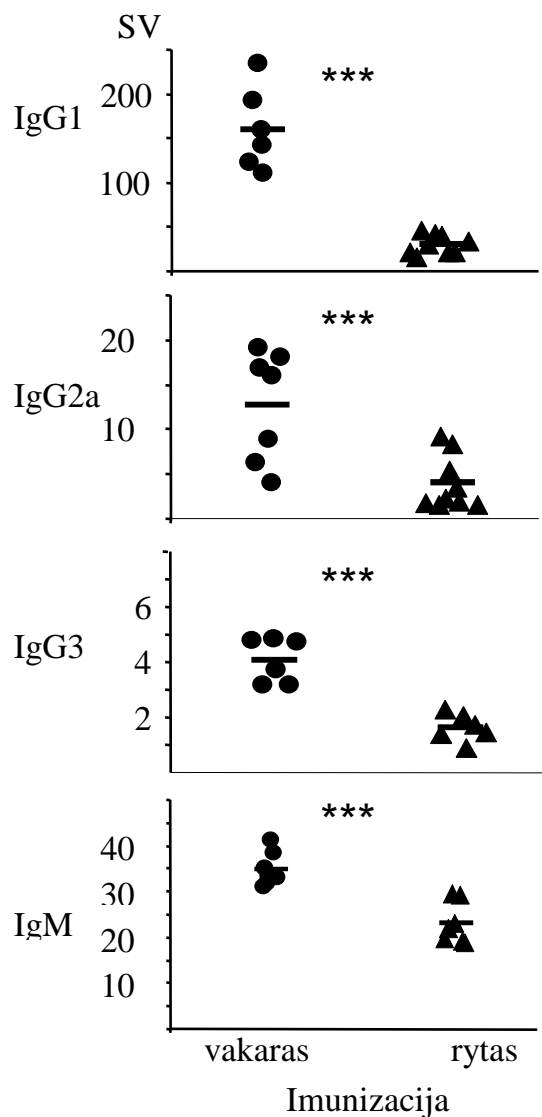
6 lentelė. TNP-specifinių antikūnų produkcijos priklausomybė nuo pelių laikymo apšvietimo sąlygų, imunizuojant nuo T ląstelių priklausomu antigenu – TNP-ovalbuminu.

TNP-specifinių antikūnų izotipas	I Eksperimentas				II 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	△	△	△

Patikimi skirtumai tarp natūralaus apšvietimo sąlygomis ir pastovaus apšvietimo sąlygomis gyvenančių pelių grupių pažymėti trikampiais: ▼ – pastovaus apšvietimo sąlygomis gyvenančios pelių grupės statistiškai patikimas antikūnų produkcijos sumažėjimas; △ – pastovaus apšvietimo sąlygomis gyvenančios pelių grupės statistiškai patikimas antikūnų produkcijos padidėjimas; ND – nebuvo daryta. Statistinis patikimumas tarp grupių buvo vertinamas pagal Stjudento T testą. Vienas trikampis atitinka $p \leq 0,05$, du trikampiai – $p \leq 0,005$, trys trikampiai – $p \leq 0,0005$.

4.2.3. Antikūnų produkcijos priklausomybė nuo imunizacijos paros laiko

Siekiant įvertinti antikūnų gamybos priklausomybę nuo paros laiko, pelės buvo imunizuojamos TNP-ovalbuminu skirtingu paros metu: viena grupė vakare, prieš pat melatonino gamybos pradžią, kita – ryte, pasibaigus melatonino sintezei. Pirminio ir antrinio imuninio atsako analizei pelės buvo imunizuotos du kartus. Antra imunizacija atlikta praėjus 14 dienų nuo pirmos imunizacijos. Kraujas antikūnų kiekio tyrimams buvo imamas 7 ir 21 dieną po imunizacijos. 7 dieną po imunizacijos imtuose kraujo mėginiuose buvo tirtas IgM izotipas, 21 dieną tirti IgG1, IgG2a, IgG3 izotipai. Eksperimento rezultatai pateikti 7 paveiksle. Eksperimento metu didžiausia visų tirtų antikūnų izotipų koncentracija nustatyta kraujo serume, imtame iš vakare imunizuotų pelių. Tai įrodo, kad antikūnų titras priklauso nuo imunizacijos paros laiko.



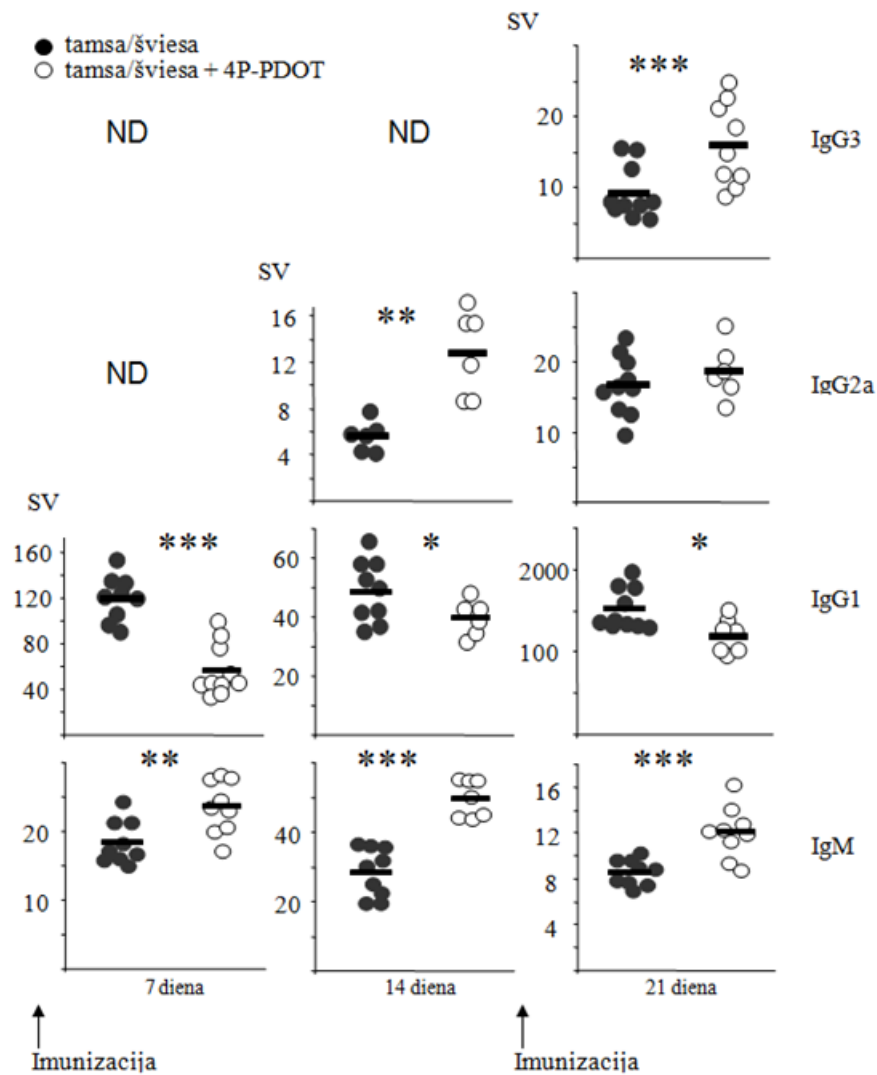
7 pav. TNP-spezifinių antikūnų produkcija imunizuojant pelės nuo T ląstelių priklausomu antigenu skirtingu paros metu.

BALB/c pelės (patelės) buvo suskirstytos į dvi grupes. Viena pelių grupė buvo imunizuota 21 valandą vakaro, kitą 9 valandą ryto. Kraujas buvo paimtas prieš imunizaciją (0 dieną), 7 ir 21 dieną skaičiuojant nuo pirmos imunizacijos. 7 dieną po imunizacijos paimo kraujo mėginiuose buvo tirtas IgM izotipas, 21 dieną po imunizacijos tirti IgG1, IgG2a, IgG3 izotipai. Atskiras rutuliukas – antikūnų kiekis sutartiniais vienetais (SV) vienos pelės kraujo serume. Standartiniame pelių kraujo serumo mišinyje esanti kiekvienos klasės antikūnų koncentracija buvo įvertinta 100 sutartinių vienetų (SV). Statistinis reikšmingumas tarp grupių buvo vertinamas pagal Stjudento T testą. Statistiškai patikimi skirtumai tarp grupių pažymėti žvaigždutėmis: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$.

4.2.4. MT2 receptoriaus vaidmuo melatoninui moduluojant antikūnų produkciją

Norint išsiaiškinti, per kokius receptorius melatoninas reguliuoja T priklausomą humoralinį imunitetą, buvo naudotas selektyvus MT2 receptoriaus slopiklis – 4P-PDOT. Tuo tikslu visos pelės buvo laikomos natūraliomis apšvietimo sąlygomis: vienai pelių grupei viso eksperimento laikotarpį kasdien apie 19-20 valandą buvo suleidžiamas melatonino MT2 receptoriaus slopiklis – 4P-PDOT, tuo tarpu antroji pelių grupė slopiklio negavo. Adaptacinis periodas prie slopiklio truko vieną savaitę. Pasibaigus adaptaciniam periodui, pelės buvo imunizuojamos TNP-ovalbuminu. Imunizacija vyko 0 bei 14 eksperimento dieną. Eksperimento rezultatai pateikti 8 paveiksle.

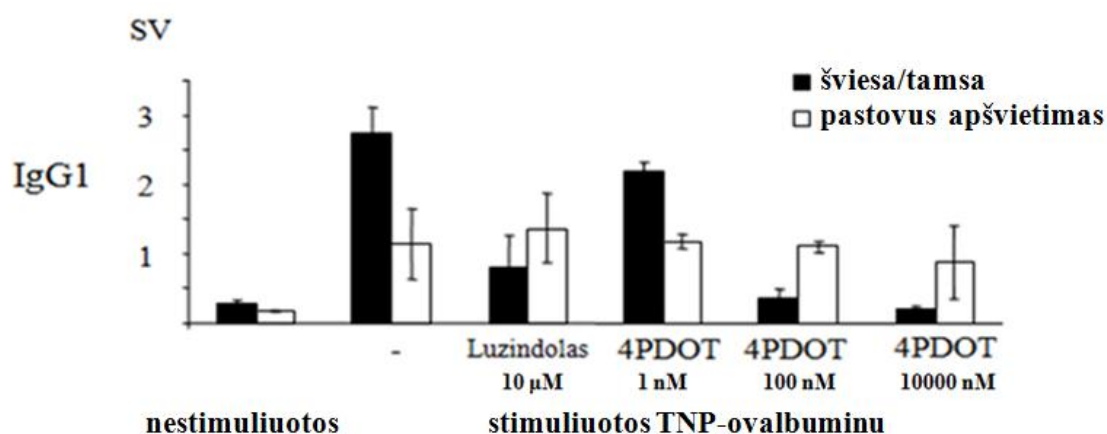
Pelių grupė, kuriai kasdien buvo leidžiamas 4P-PDOT, gamino statistiškai patikimai mažiau IgG1, bet daugiau IgM, IgG3 ir IgG2A. Ankstesnių eksperimentų metu, laikant peles pastovaus apšvietimo sąlygomis, buvo gauti tokie patys rezultatai. Laikant peles pastovaus apšvietimo sąlygomis (esant sutrikusiai melatonino gamybai) taip pat padidėja IgM, IgG2a ir IgG3 antikūnų kiekiai bei sumažėja IgG1 izotipo antikūnų kiekis. Gauti duomenys leidžia teigti, kad melatoninas *in vivo* sąlygomis moduluoja antikūnų produkciją per MT2 receptorių.



8 pav. MT2 receptoriaus slopiklio (4P-PDOT) įtaka TNP-specifinių antikūnų produkcijai vakare imunizuojant T priklausomu antigenu – TNP-ovalbuminu.

*Pelės buvo suskirstytos į dvi grupes ir laikomos natūralaus apšvietimo sąlygomis. Eksperimento metu buvo naudotas melatonino MT2 receptoriaus slopiklis – 4P-PDOT, kuris vienai pelių grupei buvo leidžiamas viso eksperimento laikotarpį, kitai – visiškai neleidžiamas. Kiekvieną dieną 19-20 valandą, pelėms buvo leidžiama po 0,25 mg/kg slopiklio. Atskiras rutuliukas – antikūnų kiekis sutartiniais vienetais (SV) vienos pelės kraujo serume. Standartiniame pelių kraujo serumo mišinyje esanti kiekvienos klasės antikūnų koncentracija buvo įvertinta 100 sutartinių vienetų (SV). Statistinis patikimumas tarp grupių buvo vertinamas pagal Stjudento T testą. Statistiškai patikimi skirtumai tarp I ir II grupių pažymėti žvaigždutėmis: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$; ND – nedaryta.*

Melatonino veikimas per MT2 receptorių buvo parodytas ne tik *in vivo*, bet ir *in vitro*, naudojant TNP-ovalbuminu (nuo T ląstelių priklausomu antigenu) imunizuotų pelių blužnies ląstelių kultūras. Ląstelės buvo imamos iš pelių, laikytų skirtingomis apšvietimo sąlygomis, t.y. esant pastoviam arba natūraliam apšvietimui. Eksperimento rezultatai pateikti (9 pav.).



9 pav. TNP-spezifinių antikūnų produkcija *in vitro* naudojant blužnies ląsteles.

Pelės buvo laikomos natūralaus bei pastovaus apšvietimo sąlygomis ir imunizuotos TNP-ovalbuminu. Blužnies ląstelės buvo išskiriamos 42 dieną po pirmos imunizacijos, stimuliuojamos *in vitro* 10 μg/ml TNP-ovalbuminu, papildomai pridėdant 10 μM luzindolo arba 1-10000 nM 4P-PDOT. Standartiniame pelių kraujo serume esanti IgG1 klasės antikūnų koncentracija buvo įvertinta 100 sutartinių vienetų (SV).

Gauti rezultatai rodo, kad *in vitro* sąlygomis blužnies ląstelės gamina tik IgG1 klasės antikūnus. Natūralaus apšvietimo sąlygomis augintų pelių ląstelės, kurios nebuvo aktyvios, gamina daugiau IgG1, lyginant su ląstelėmis, izoliuotomis iš pastovaus apšvietimo sąlygomis laikytų pelių. Po aktyvacijos TNP-ovalbuminu labai padidėjo IgG1 koncentracija. Ląstelės, išskirtos iš pelių, laikytų natūralaus apšvietimo sąlygomis, sintetino daugiau IgG1. Pridėjus prie ląstelių 10 μM luzindolo, IgG1 kiekis ląstelėse, išskirtose iš natūralaus apšvietimo sąlygomis laikytų pelių, sumažėjo kelis kartus. Tuo tarpu ląstelėse, išskirtose iš pelių, augintų esant pastoviam apšvietimui, IgG1 koncentracija nepakito. Panašų efektą sukėlė ir ląstelių stimuliavimas skirtingomis 4P-PDOT koncentracijomis.

Gauti rezultatai leidžia teigti, kad melatoninas *in vitro* sąlygomis veikia antikūnų sintezę per MT2 receptorių.

In vivo ir *in vitro* eksperimentuose naudojant melatonino membraninių receptorių slopiklius įrodyta, kad melatoninas moduliuoja nuo T ląstelių priklausomą humoralinį imuninį atsaką veikdamas per MT2 receptorių.

4.2.5. Melatonino membraninių receptorių transkriptų raiška blužnies B220⁺ B limfocituose ir limfinių mazgų T_H0 limfocituose.

Norint išsiaiškinti, per kokių ląstelių MT2 receptorių melatoninas moduliuoja nuo T ląstelių priklausomą humoralinį imuninį atsaką, buvo nustatyti melatonino receptorių iRNR transkriptai blužnies B limfocituose ir limfinių mazgų T_H0 limfocituose. Taip pat buvo nustatyta melatonino receptorių raiškos priklausomybė nuo paros laiko ir melatonino koncentracijos.

Šiems tikslams pasiekti, pelės, atsižvelgiant į organų (blužnies, limfinių mazgų) izoliavimo laiką, apšvietimo sąlygas ir papildomas melatonino injekcijas, buvo suskirstytos į penkias grupes:

1. „ŠT“ naktis – pelės laikytos natūralaus apšvietimo sąlygomis (12 val. šviesa/12 val. tamsa), organai buvo išimti naktį (po 4 val. nuo tamsos periodo pradžios);
2. „ŠŠ“ diena – pelės laikytos pastovaus apšvietimo sąlygomis (24 val. šviesa), organai buvo išimti dieną (po 4 val. nuo šviesos periodo pradžios);
3. „ŠT“ diena – pelės laikytos natūralaus apšvietimo sąlygomis (12 val. šviesa/12 val. tamsa), organai buvo išimti dieną (po 4 val. nuo šviesos periodo pradžios);
4. „ŠŠ“ naktis – pelės laikytos pastovaus apšvietimo sąlygomis (24 val. šviesa), organai buvo išimti naktį (po 4 val. nuo tamsos periodo pradžios);
5. „ŠŠ“ naktis + melatoninas – pelės laikytos pastovaus apšvietimo sąlygomis (24 val. šviesa), organai buvo išimti naktį (po 4 val. nuo tamsos periodo

pradžios). Savaitę iki eksperimento pradžios pelėms į pilvo ertmę kasdien buvo leidžiamas melatoninas (5 mg/kg svorio). Melatonino injekcijos buvo atliekamos prasidėjus tamsos periodui.

Melatonino membraninių receptorių transkriptų raiška buvo nustatinėjama limfinių mazgų T_H0 limfocituose ir blužnies $B220^+$ B limfocituose. Limfinių mazgų ir blužnies ląstelės buvo išskirtos iš atitinkamų pelių organų. Iš limfocitų išskirta iRNR, kuri buvo naudojama kDNR sintezei. Taikant tikrojo laiko polimerazinės grandininės reakcijos metodą ir naudojant savitus melatonino receptorių RNR pradmenis, buvo nustatyta melatonino membraninių receptorių raišką RNR lygmeniu. Eksperimentų rezultatai pateikti 7 lentelėje.

MT1 ir MT2 receptorių transkriptų raiška limfmazgių T_H0 ląstelėse aptikta tik „ŠT“ diena grupėje. MT1 receptoriaus raiška nustatyta tik viename iš dviejų atliktų eksperimentų (vienas teigiamas mėginys iš dešimties). Panašūs rezultatai gauti ir tiriant MT2 receptoriaus raišką: iš dviejų atliktų eksperimentų MT2 receptoriaus raiška nustatyta taip pat tik viename (vienas teigiamas mėginys iš keturių). Remiantis mūsų rezultatais, galima daryti prielaidą: limfinių mazgių T_H0 ląstelėse silpna membraninių melatonino receptorių raiška vyksta tik dienos metu.

Tuo tarpu blužnies B limfocituose buvo nustatyta žymiai intensyvesnė melatonino membraninių receptorių raiška, lyginant su vykusia limfinių mazgų T_H0 limfocituose. Blužnies B limfocituose membraninių receptorių raiška priklauso nuo paros laiko – vyksta tik nakties metu. Dėl pastovaus apšvietimo sutrikus melatonino gamybai MT1 ir MT2 receptorių transkriptų raiška nakties metu nevyksta, tačiau papildomos melatonino injekcijos atstatė blužnies B limfocituose melatonino membraninių receptorių raišką.

7 lentelė. Melatonino membraninių receptorių nukleotidų raiška blužnies B220⁺ B limfocituose ir limfinių mazgų T_H0 limfocituose.

B220 ⁺ limfocitai išskirti iš blužnies								
Receptorių pavadinimas	Eksp. Nr.	kDNA šaltinis	Pradmenys	ŠT naktis	ŠT diena	ŠŠ diena	ŠŠ naktis	ŠŠ naktis + Mel
MT1	I	1	MT1 (A)	+/-	-	-	ND	ND
			MT1 (B)	+/-	-	+	ND	ND
	II	2	MT1 (A)	+/-	ND	ND	ND	ND
			MT1 (B)	-	ND	ND	ND	ND
	III	3	MT1 (A)	+/-	ND	ND	-	+/-
			MT1 (B)	+/-	ND	ND	-	+/-
			MT1 (C)	-	ND	ND	-	-
		4	MT1 (A)	+/-	ND	ND	-	+/-
			MT1 (B)	+/-	ND	ND	-	+/-
			MT1 (C)	-	ND	ND	-	-
		5	MT1 (A)	-	ND	ND	-	-
			MT1 (B)	-	ND	ND	-	+/-
MT1 (C)			-	ND	ND	-	-	
MT2	I	1	MT2	+/-	-	+/-	ND	ND
	II	2	MT2	+	ND	ND	ND	ND
	III	3	MT2	+/-	ND	ND	-	+/-
		4	MT2	+/-	ND	ND	-	+
		5	MT2	+/-	ND	ND	-	+/-
T _H 0 limfocitai išskirti iš limfinių mazgų								
Receptorių pavadinimas	Eksp. Nr.	kDNA šaltinis	Pradmenys	ŠT naktis	ŠT diena	ŠŠ diena		
MT1	I	1	MT1 (A)	-	-	-		
		2	MT1 (B)	-	-	-		
		3	MT1 (C)	-	-	-		
	II	1	MT1 (A)	ND	-	-		
		2	MT1 (B)	ND	+/-	-		
MT2	I	1	MT2	-	-	-		
	II	2	MT2	ND	+/-	-		

„ŠT“ naktis – pelės laikytos natūralaus apšvietimo sąlygomis (12 val. šviesa/12 val. tamsa), organai buvo išimti naktį (po 4 val. nuo tamsos periodo pradžios); „ŠŠ“ diena – pelės laikytos pastovaus apšvietimo sąlygomis (24 val. šviesa), organai buvo išimti dieną (po 4 val. nuo šviesos periodo pradžios); „ŠT“ diena – pelės laikytos natūralaus apšvietimo sąlygomis (12 val. šviesa/12 val. tamsa), organai buvo išimti dieną (po 4 val. nuo šviesos periodo pradžios); „ŠŠ“ naktis – pelės laikytos pastovaus apšvietimo sąlygomis (24 val. šviesa), organai buvo išimti naktį (po 4 val. nuo tamsos periodo pradžios); „ŠŠ“ naktis + mel – pelės laikytos pastovaus apšvietimo sąlygomis (24 val. šviesa), organai buvo išimti naktį (po 4 val. nuo tamsos periodo pradžios), savaitę iki eksperimento pradžios šios grupės pelėms į pilvo ertmę kasdien buvo leidžiamas melatoninas (5 mg/kg svorio). Melatonino receptorių raiška analizuojama tLPCR metodu. + abu teigiami mėginiai, +/- vienas teigiamas, vienas neigiamas mėginys, - abu neigiami mėginiai, ND - nebuvo daryta.

Remiantis mūsų rezultatais, melatoninas, veikdamas per blužnies B limfocitų MT2 receptorių, moduliuoja nuo T ląstelių priklausomą humoralinį imuninį atsaką. Dėl pastovaus apšvietimo sutrikus melatonino gamybai, sutrinka ir MT2 receptoriaus ekspresija B limfocituose. Dėl šios priežasties buvo stebimas IgGI izotipo antikūnų kiekio statistiškai patikimas sumažėjimas ir IgG2a antikūnų titro padidėjimas, tačiau papildomos melatonino injekcijos atstato MT2 receptoriaus ekspresiją blužnies B limfocituose, statistiškai patikimai padidino IgGI izotipo antikūnų kiekį ir sumažino IgG2a antikūnų titrą.

4.3. MT1 ir MT2 melatonino receptorių tyrimas limfocituose naudojant monokloninius antikūnus

Norint iširti membraninių receptorių raišką imuninės sistemos organuose ir ląstelėse baltymų lygmenyje, buvo pagaminti monokloniniai antikūnai, atpažįstantys pelių melatonino membraninius receptorių.

Monokloninių antikūnų prieš pelių membraninius receptorių gamybos etapai:

- MT1 ir MT2 receptorių baltymų fragmentų klonavimas ir ekspresija *E. coli*;
- Gyvūnų imunizacija MT1-GST ir MT2-GST chimeriniais baltymais ir monokloninių antikūnų prieš MT1 ir MT2 kūrimas;
- Monokloninių antikūnų atranka ir charakteristika;

4.3.1. MT1 ir MT2 receptorių baltymų fragmentų klonavimas

MT1 ir MT2 melatonino receptoriai priklauso su G baltymais sukibusių receptorių grupei, kurie 7 kartus perveria membraną ir formuoja vidines ir išorines membranos kilpas. Pelių MT1 ir MT2 receptorių aminorūgščių sekos turi labai didelę homologiją su žiurkių bei žmogaus sekomis. Antigeno ruošimui buvo pasirinkta N-galinė ekstraląstelinė baltymo dalis, kur yra didžiausi skirtumai tarp

pelės ir žiurkės aminorūgščių sekų. Ši dalis buvo klonuota kaip GST chimerinis baltymas, kuriuo buvo imunizuotos žiurkės.

MT1 (96 bp.) ir MT2 (126 bp.) N-galinės sekos su pridėtais STOP kodonais buvo užsakytos kaip sintetiniai genai iš Operon firmos - pPCR Script Mel vektorius. Sekos buvo sukonstruotos taip, kad vėliau būtų galima lengvai iškirpti MT1 ir MT2 sekas. Klonavimui taip pat naudotas GST baltymo geną turintis vektorius pGEX-4T-3 (GE Healthcare). Darbo tikslas buvo pagaminti plazmidės, turinčias GST-MT1 ir GST-MT2 genus.

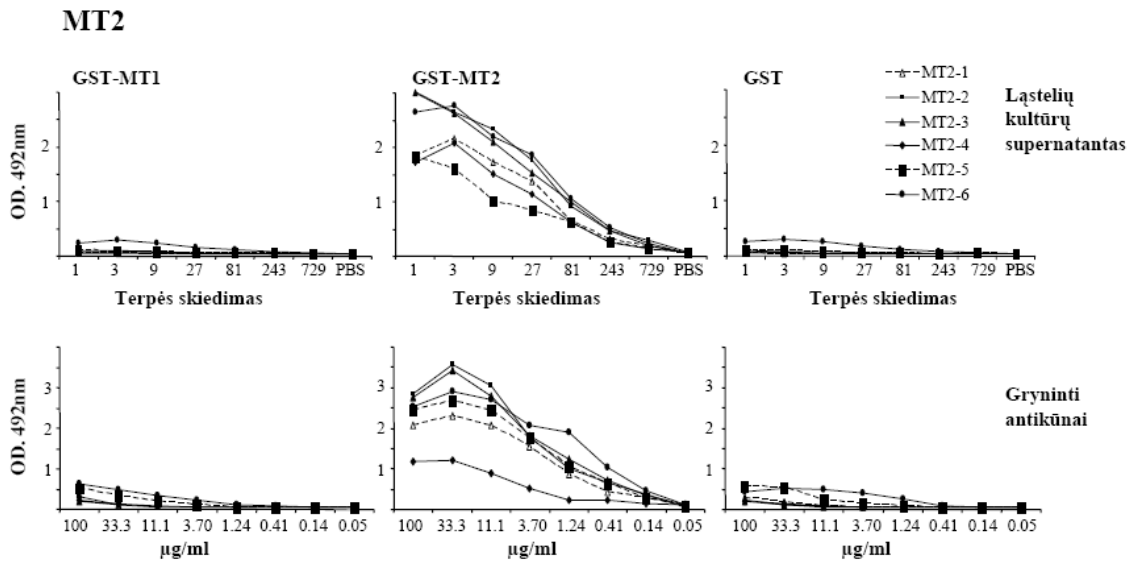
GST-MT1 klonavimas. 109 bp MT1 N-galas buvo iškirptas iš pPCR Script Mel vektoriaus EcoRI/SalI restrikcijos endonukleazėmis ir klonuotas į pGEX-4T-3 vektorių, kirptą tomis pačiomis restrikcijos endonukleazėmis. MT1 fragmentas klonuojamas po GST geno taip, kad ekspresuojant baltymus būtų gautas GST-MT1 chimerinis baltymas. Sukonstruotas vektorius pavadintas MT1 pGEX. MT1 pGEX vektorius tikrintas naudojant EcoRI/SalI (gaunami 4958 ir 106 bp fragmentai) ir BamHI/XhoI (gaunami 4945 ir 119 bp fragmentai) restrikcijos endonukleazes.

GST-MT2 klonavimas. 136 bp MT2 N-galas buvo iškirptas iš pPCR Script Mel vektoriaus EcoRI/XhoI restrikcijos endonukleazėmis ir klonuotas į pGEX-4T-3 vektorių, kirptą tomis pačiomis restrikcijos endonukleazėmis. MT2 fragmentas klonuojamas po GST geno taip, kad ekspresuojant baltymus būtų gautas GST-MT2 chimerinis baltymas. Sukonstruotas vektorius pavadintas MT2 pGEX. MT2 pGEX vektorius tikrintas naudojant EcoRI/XhoI (gaunami 4953 ir 136 bp fragmentai) ir BamHI/SmaI (gaunami 4972 ir 117 bp fragmentai) restrikcijos endonukleazes.

Patikrintos teigiamos plazmidės buvo transfekuotos į *E.coli* BL21 kamieną, kuriame, naudojant IPTG reagentą, buvo indukuota GST chimerinių baltymų raiška. Lewis linijos žiurkių imunizavimas GST-MT1 ir GST-MT2 chimeriniais baltymais bei hibridominių ląstelių gavimas aprašyti methoduose.

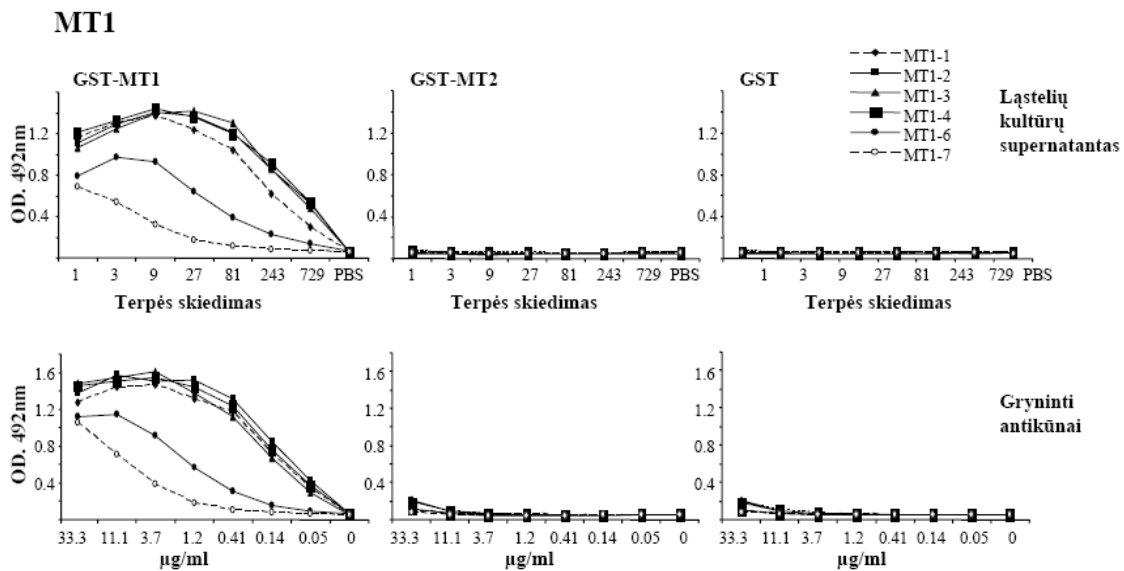
4.3.2. Monokloninių antikūnų prieš MT1 ir MT2 receptorių charakterizavimas

Gautų hibridominių ląstelių produkuojamų antikūnų specifiskumas tikrintas ELISA metodu, naudojant GST antigenus bei GST-MT1 ir GST-MT2 rekombinantinius baltymus. Buvo atrinktos hibridominės ląstelės, produkuojančios monokloninius antikūnus prieš MT1 (klonai MT1-1, MT1-2, MT1-3, MT1-4, MT1-5, MT1-6, MT1-7) ir MT2 (klonai: MT2-1, MT2-2, MT2-3, MT2-4, MT2-5, MT2-6, MT2-7). Monokloniniai antikūnai, atpažįstantys MT2, reagavo tik su GST-MT2 ir nereagavo su GST ir GST-MT1 baltymais (10 pav.).



10 pav. Monokloninių antikūnų prieš pelių MT1 melatonino receptorių specifiskumas ir titras. Monokloniniai antikūnai, atpažįstantys MT1 melatonino receptorių (ląstelių kultūrų terpės ar išgryninti iš ascito antikūnai), titruoti ELISA plokštelėse su imobilizuotais GST-MT1, GST-MT2 ar GST rekombinantiniais baltymais. MT1-1, MT1-2, MT1-3, MT1-4, MT1-5, MT1-6, MT1-7 – skirtingi antikūnų klonai.

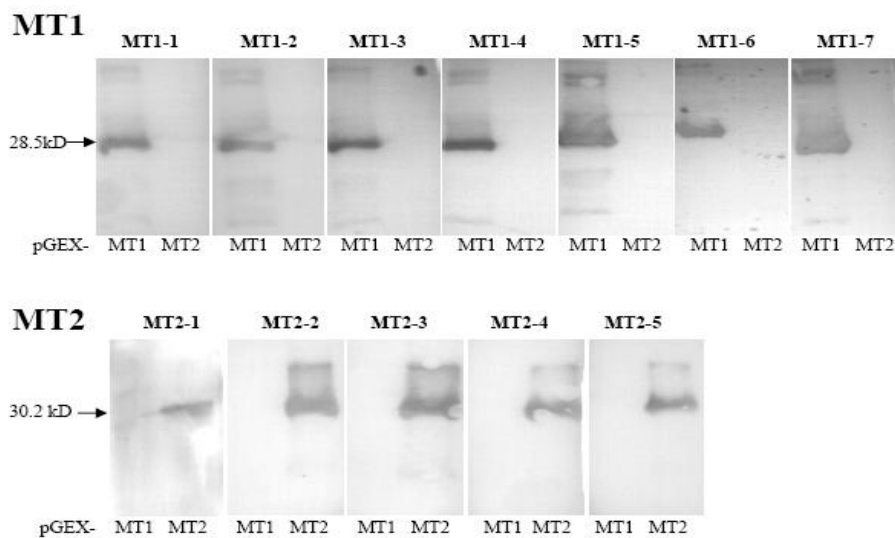
Tuo tarpu monokloniniai antikūnai, atpažįstantys MT2, reagavo tik su GST-MT2 ir nereagavo su GST ir GST-MT1 rekombinantiniais baltymais (11 pav.).



11 pav. Monokloninių antikūnų, atpažįstančių pelių MT2 melatonino receptorių, specifškumas ir titras.

Monokloniniai antikūnai, atpažįstantys MT1 melatonino receptorių (ląstelių kultūrų terpės ar išgryninti iš ascito antikūnai), titruoti ELISA plokštelėse su imobilizuotais GST-MT1, GST-MT2 ar GST rekombinantiniais baltymais. MT2-1, MT2-2, MT2-3, MT2-4, MT2-5, MT2-6, MT2-7 – skirtingi antikūnų klonai.

Antikūnų specifškumas tikrintas ir imunoblotingo metodu (12 pav.).



12 pav. Monokloninių antikūnų, atpažįstančių pelių MT1 ir MT2 melatonino receptorius, specifškumo tyrimas imunoblotingo metodu.

GST-MT1 ir GST-MT2 rekombinantiniai baltymai buvo frakcionuojami 15 % SDS poli-akrilamidiniame gelyje. PDF membranos buvo inkubuotos su 8 kartus skiestomis hibridomų kultūrų terpėmis MT1 (1-7) ir MT2-(1-5). Prisijungę peroksidaze žymėti antriniai antikūnai buvo išryškinti naudojant netirpų substratą – TMB.

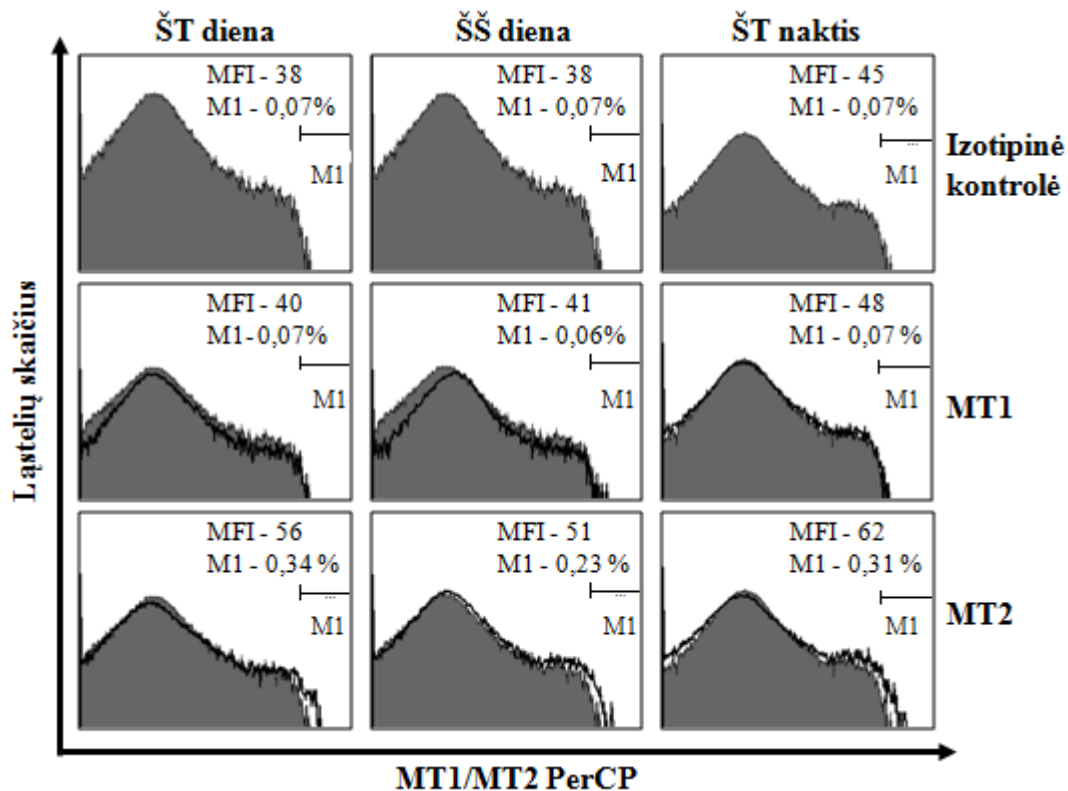
Antikūnai, atpažįstantys MT1, sąveikavo tik su GST-MT1, bet nesąveikavo su GST-MT2 baltymu, o antikūnai, atpažįstantys MT2 reagavo tik su GST-MT2, bet ne su GST-MT1.

4.3.3. MT1 ir MT2 melatonino receptorių raiškos tyrimas tėkmės citometrijos metodu

MT1 ir MT2 melatonino receptoriai buvo nustatomi BALB/c linijos pelių blužnies, užkrūčio liaukos, limfinių mazgų ir kaulų čiulpų ląstelių membranose. Norint iširti melatonino membraninių receptorių raiškos priklausomybę nuo apšvietimo ir sutrikusios melatonino gamybos, organai buvo imti skirtingu paros metu iš gyvūnų, gyvenančių skirtingomis apšvietimo sąlygomis. Pirmoji pelių grupė gyveno esant natūraliam apšvietimui, jų organai buvo imti naktį. Antroji grupė gyveno natūralaus apšvietimo sąlygomis, tačiau organai buvo imti dieną. Trečiosios grupės pelės gyveno esant pastoviam apšvietimui (melatonino gamyba sutrikusi), jų organai buvo imti dienos metu. Kiekvienoje grupėje buvo po 5 pelės. Eksperimentai kartoti 3 kartus.

Darbų metu MT1 receptoriaus raiškos tirtuose organuose (blužnies, užkrūčio liaukos, limfinių mazgų ir kaulų čiulpų) limfocitų membranose aptikti nepavyko. Taip pat nebuvo nustatyta ir MT2 receptoriaus raiška užkrūčio liaukos, limfinių mazgų ir kaulų čiulpų ląstelėse, tačiau MT2 receptoriaus raiška buvo aptikta blužnies ląstelėse (13 pav.). Atsižvelgiant į gautus rezultatus, galime teigti, kad MT2 receptoriaus raiška nepriklauso nuo apšvietimo sąlygų ir melatonino gamybos ciklo.

Analizuojant ląsteles tikrojo laiko PGR metodu, nustatyta, kad melatonino MT2 receptoriaus raiška blužnies B limfocituose priklauso nuo paros laiko ir melatonino gamybos sutrikimo. Naudojant tėkmės citometrijos metodą, šios priklausomybės nepavyko aptikti. Skirtumas galėjo atsirasti dėl metodų jautrumo.



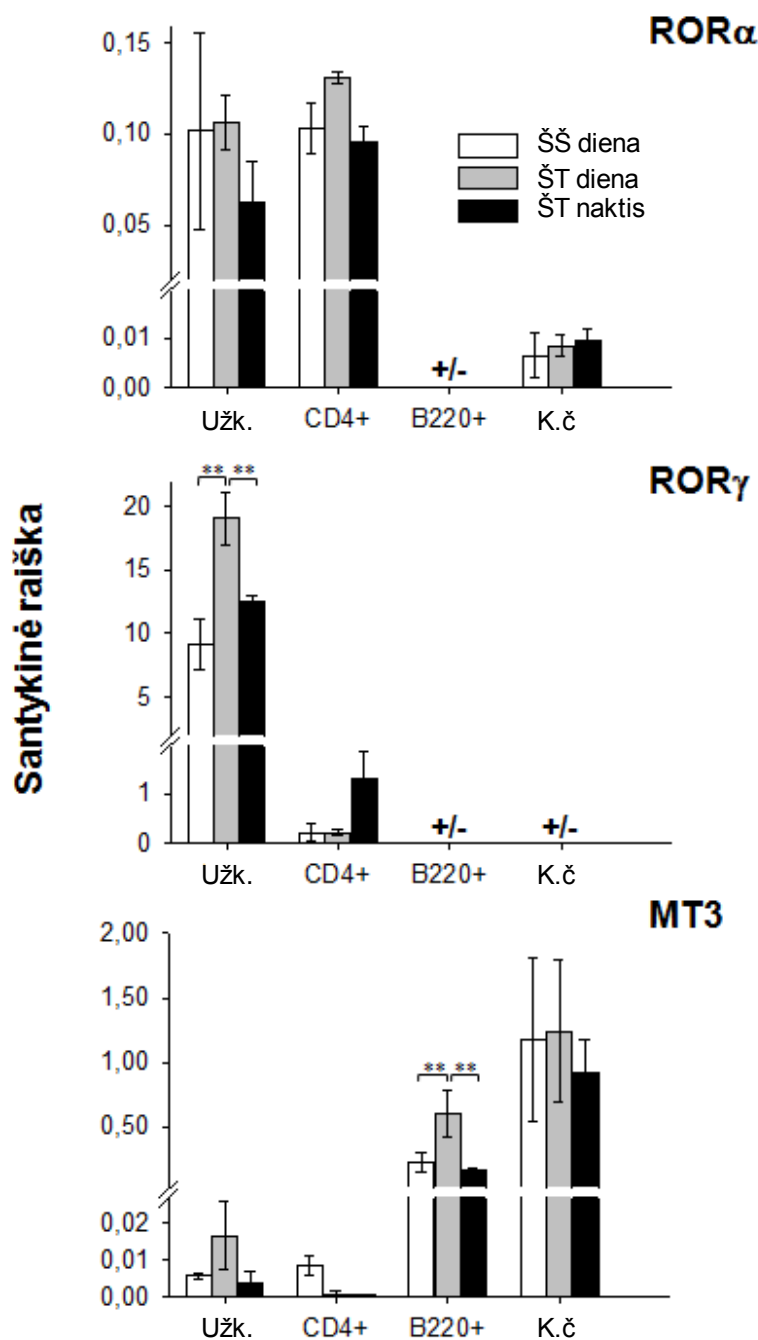
13 pav. MT2 melatonino receptorių raiška blužnies ląstelėse naudojant tėkmės citometrijos metodą. „ŠT“ naktis – pelės laikytos natūralaus apšvietimo sąlygomis (12 val. šviesa/12 val. tamsa), ląstelės buvo išskirtos nakties metu. „ŠŠ“ diena – pelės laikytos pastovaus apšvietimo sąlygomis (24 val. šviesa), ląstelės buvo išskirtos dienos metu. „ŠT“ diena – pelės laikytos natūralaus apšvietimo sąlygomis (12 val. šviesa/12 val. tamsa), ląstelės buvo išskirtos dienos metu. Parodytos reprezentacinės histogramos iš trijų nepriklausomų eksperimentų.

4.4. Melatonino branduolinių ir *MT3/CR2* receptorių transkriptų raiška limfocituose

Remiantis literatūros duomenimis, melatoninas sąveikauja su ROR α , ROR β ir *MT3/CR2* receptoriais. Nors nėra įrodymų, kad melatoninas gali jungtis prie ROR γ , kai kurie autoriai įvardija jį kaip melatonino receptorių [60]. Literatūroje nėra duomenų apie ROR β ir *MT3/CR2* receptorių raišką imuninės sistemos ląstelėse. Taip pat nėra aišku ar ROR α ir ROR γ receptorių raiška limfocituose gali priklausyti nuo paros laiko ir melatonino gamybos sutrikimo. Norint tai išaiškinti, melatonino receptorių raiška buvo tirta imuninės sistemos ląstelėse, izoliuotose įvairiu paros laiku iš BALB/c linijos pelių, laikomų skirtingose apšvietimo sąlygose:

1. „ŠT“ naktis – pelės laikytos natūralaus apšvietimo sąlygomis (12 val. šviesa/12 val. tamsa), organai buvo išimti naktį (po 4 val. nuo tamsos periodo pradžios);
2. „ŠŠ“ diena – pelės laikytos pastovaus apšvietimo sąlygomis (24 val. šviesa), organai buvo išimti dieną (po 4 val. nuo šviesos periodo pradžios);
3. „ŠT“ diena – pelės laikytos natūralaus apšvietimo sąlygomis (12 val. šviesa/12 val. tamsa), organai buvo išimti dieną (po 4 val. nuo šviesos periodo pradžios).

Melatonino branduolinių ir *MT3/CR2* receptorių transkriptų raiška buvo nustatinėjama užkrūčio liaukos limfocituose, kaulų čiulpų limfocituose, limfinių mazgų T_H0 limfocituose ir blužnies B220⁺ B limfocituose. Iš limfocitų išskirta iRNR, kuri buvo naudojama kDNR sintezei. Taikant tikrojo laiko polimerazinės grandininės reakcijos metodą ir naudojant savitus melatonino receptorių RNR pradmenis, buvo nustatyta melatonino branduolinių ir *MT3/CR2* receptorių raiška RNR lygmeniu. Eksperimentų rezultatai pateikti 14 paveiksle.



14 pav. ROR α , ROR γ ir MT3/CR2 receptorių nukleotidų raiška BALB/c linijos limfocituose.

„ŠT“ naktis – pelės laikytos natūralaus apšvietimo sąlygomis (12 val. šviesa/12 val. tamsa), organai buvo išimti naktį., „ŠŠ“ diena – pelės laikytos pastovaus apšvietimo sąlygomis (24 val. šviesa), organai buvo išimti dieną., „ŠT“ diena – pelės laikytos natūralaus apšvietimo sąlygomis (12 val. šviesa/12 val. tamsa), organai buvo išimti dieną. Užk. – užkrūčio liaukos limfocitai, CD4+ – limfmazgių T_H0 limfocitai, B220+ – blužnies B limfocitai, K.č. – kaulų čiulpų ląstelės. Santykinės raiškos dydis buvo nustatytas pagal K.J.Livak ir T.D.Schmittgen aprašytą metodiką [274]. +/- aptikti teigiami rezultatai su pakankamai didelėmis Ct reikšmėmis (Ct:36-40). Statistiškai patikimi skirtumai tarp grupių pažymėti žvaigždutėmis: ** p≤0,005.

ROR β receptorių transkriptų raiškos BALB/c linijos pelių limfocituose aptikti nepavyko.

ROR α geno transkriptų raiška buvo nustatyta visuose tyrinėtuose organuose (14 pav.). Remiantis mūsų duomenimis, ROR α transkriptų raiška nepriklauso nuo paros laiko ir cirkadinio ritmo sutrikimo. Raiškos dydis skiriasi skirtinguose BALB/c linijos pelių imuninės sistemos organų limfocituose. Didžiausia raiška nustatyta užkrūčio liaukos limfocituose ir išgrynintuose iš limfinių mazgų T_H0 limfocituose, mažesnė – kaulų čiulpų limfocituose. Blužnies B limfocituose ROR α yra transkribuojamas, tačiau ROR α geno iRNR nustatyta nedaug, skirtinguose eksperimentuose ne visada pavykdavo gauti teigiamus rezultatus. Mūsų rezultatai panašūs į duomenis, kuriuos pateikė Dzhagalov su kolegom [281]. Jie tyrinėjo ROR α receptoriaus transkriptų raišką skirtingose pelių užkrūčio liaukos ir blužnies limfocitų populiacijose. Didžiausia ROR α raiška buvo nustatyta užkrūčio liaukos T_H0 limfocituose, mažesnė užkrūčio liaukos T_C limfocituose ir vos aptinkama blužnies B limfocituose [281].

ROR γ geno transkriptų raiška buvo nustatyta visuose tyrinėtuose organuose (14 pav.). Raiškos intensyvumas skiriasi skirtinguose BALB/c linijos pelių imuninės sistemos organų limfocituose. Didžiausia raiška nustatyta užkrūčio liaukos limfocituose, mažesnė limfinių mazgų T_H0 limfocituose, ir vos aptinkama kaulų čiulpų ir blužnies B limfocituose. Užkrūčio liaukos limfocituose ROR γ transkriptų raiška priklauso nuo paros laiko ir cirkadinio ciklo sutrikimo. Dieną raiška didesnė nei naktį. Sutrikus cirkadiniam ciklui, ekspresija dienos metu statistiškai patikimai sumažėjo.

MT3/CR2 receptoriaus raiška buvo nustatyta visuose tyrinėtuose organuose (14 pav.). Skirtingai nuo kitų receptorių, *MT3/CR2* receptoriaus raišką visuose tirtuose limfocituose buvo galima įvertinti kiekybiškai. Didžiausia *MT3/CR2* receptoriaus raiška aptikta kaulų čiulpų ir blužnies B limfocituose. Blužnies B limfocituose aptikta raiškos priklausomybė nuo paros laiko ir cirkadinio ciklo

sutrikimo. Dieną raiška didesnė nei naktį. Sutrikus cirkadiniam ciklui, ekspresija dienos metu statistiškai patikimai sumažėjo.

Apibendrinant rezultatus – ROR β raiška nebuvo aptikta tyrinėtuose limfocituose. ROR α , ROR γ , *MT3/CR2* melatonino receptorių transkriptai plačiai ekspresuojami BALB/c linijos limfocituose. Užkrūčio liaukos limfocitų receptoriaus ROR γ ir blužnies B limfocituose receptoriaus *MT3/CR2* raiška dieną statistiškai patikimai didesnė nei naktį. Dėl pelių laikymo pastovaus apšvietimo sąlygomis (sutrikus cirkadiniam ciklui) šių genų raiška dieną sumažėja.

4.5. Melatonino sintezės sutrikimo poveikis imuninės sistemos organų ląstelių skaičiui ir leukocitų migravimui į uždegimo vietą

Norint nustatyti melatonino gamybos slopinimo įtaką ląstelių skaičiui imuninės sistemos organuose ir leukocitų migravimui į uždegimo vietą, pelės, atsižvelgiant į apšvietimo sąlygas, buvo suskirstytos į tris grupes:

1. Pelės laikytos natūralaus apšvietimo sąlygomis (12 val. šviesa/12 val. tamsa), natūrali melatonino gamyba;
2. Pelės laikytos pastovaus apšvietimo sąlygomis (24 val. šviesa), sutrikusi melatonino gamyba;
3. Pelės laikytos pastovaus apšvietimo sąlygomis (24 val. šviesa), prasidėjus tamsos periodui tiriamiesiems gyvūnams į pilvo ertmę buvo atliekamos melatonino (5 mg/kg svorio) injekcijos. Pastaroji pelių grupė tirta norint įsitikinti, kad ląstelių skaičių imuninės sistemos organuose ir uždegimo vietoje reguliuoja melatoninas, o ne kiti cirkadinio ritmo komponentai.

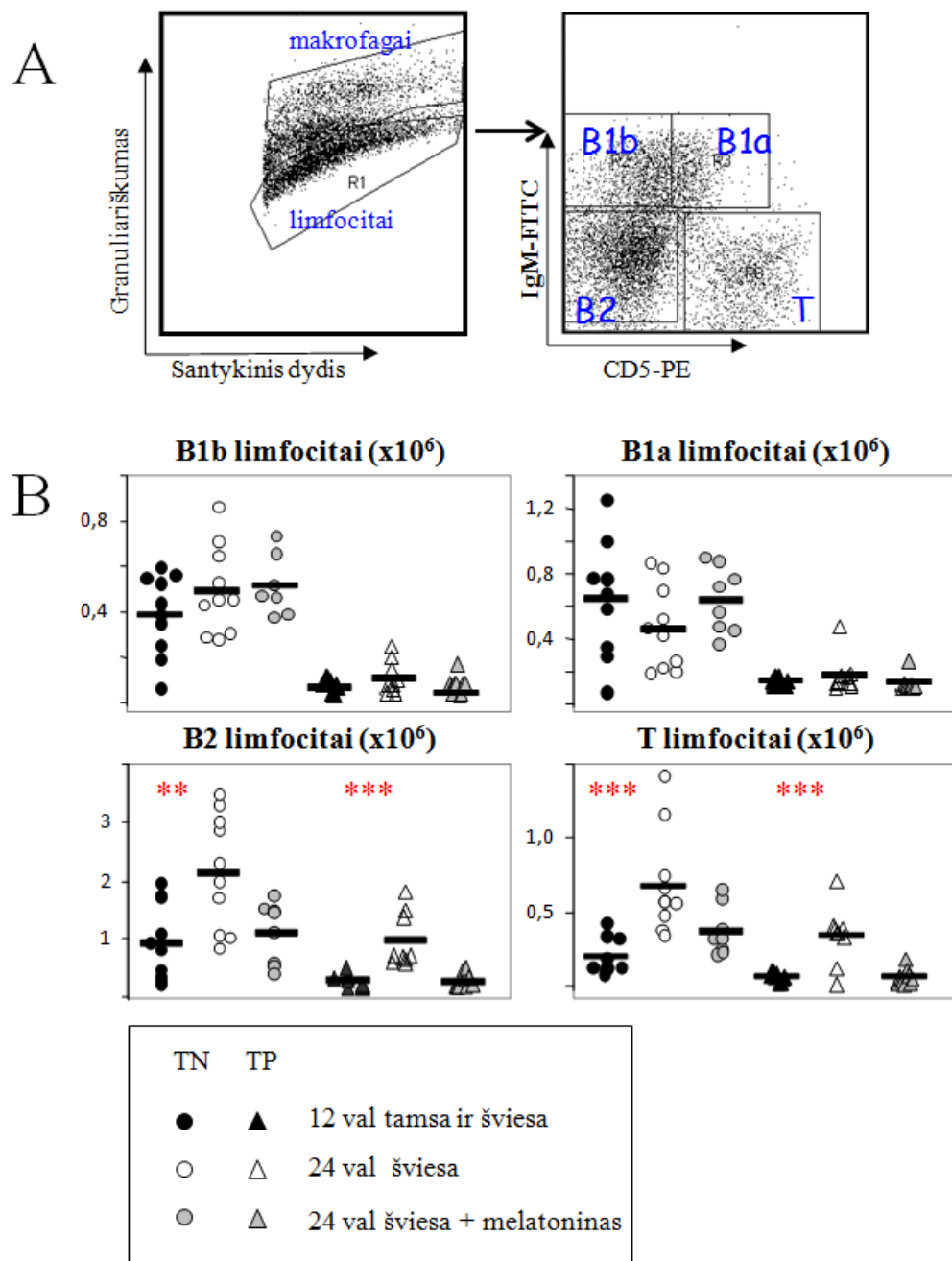
Pelės vakarais buvo imunizuojamos nuo T ląstelių priklausomu ir nuo T ląstelių nepriklausomu antigenais. Imunizuojant peles T priklausomu ir T nepriklausomu antigenais, ląstelės skaičiuotos tokiuose organuose kaip užkrūčio

liauka, blužnis, limfmazgiai, kaulų čiulpai, Pejerio plokštelės, o taip pat pilvo ertmėje (kur buvo atliekama imunizacija).

Pagal literatūros duomenis, pašalinus pagrindinį melatonino gamybos organą – kankorėžinę liauką, gyvūnams sumažėja imuninės sistemų organų masė. Žiurkėnams sumažėja blužnies masė [16], pelėms – užkrūčio liaukos masė [197, 198], žiurkėms sumažėja blužnies ir užkrūčio liaukos masė [199]. Remiantis mūsų rezultatais, įvairių tipų ląstelių skaičius užkrūčio liaukoje, blužnyje, Pejerio plokštelėse, limfmazgiuose bei kaulų čiulpuose nesiskyrė visose trijose pelių grupėse. Melatonino sintezės sutrikimas, atsiradęs dėl gyvenimo pastovaus apšvietimo sąlygomis, nesukelia ląstelių skaičiaus pakitimų BALB/c linijos pelių imuninės sistemos organuose.

Iš kitos pusės, vertinant pilvo ertmės ląstelių skaičių, buvo aptiktas statistiškai patikimas T ląstelių, B2 tipo B ląstelių, makrofagų, monocitų ir granulocitų skaičiaus padidėjimas pelių grupėse, laikytose pastovaus apšvietimo sąlygomis (15B ir 16B pav.). Pilvo ertmės T ir B limfocitų identifikavimas tėkmės citometrijos metodu pateiktas 15A pav. Be B2 tipo B ląstelių (šio tipo ląstelės aptinkamos jau minėtuose organuose) pilvo ertmėje yra tik tam organui būdingų B1 tipo B ląstelių, kurios dar skirstomos į B1a ir B1b ląsteles. Pilvo ertmės makrofagų, monocitų ir granulocitų identifikavimas tėkmės citometrijos metodu pateiktas 16A paveiksle.

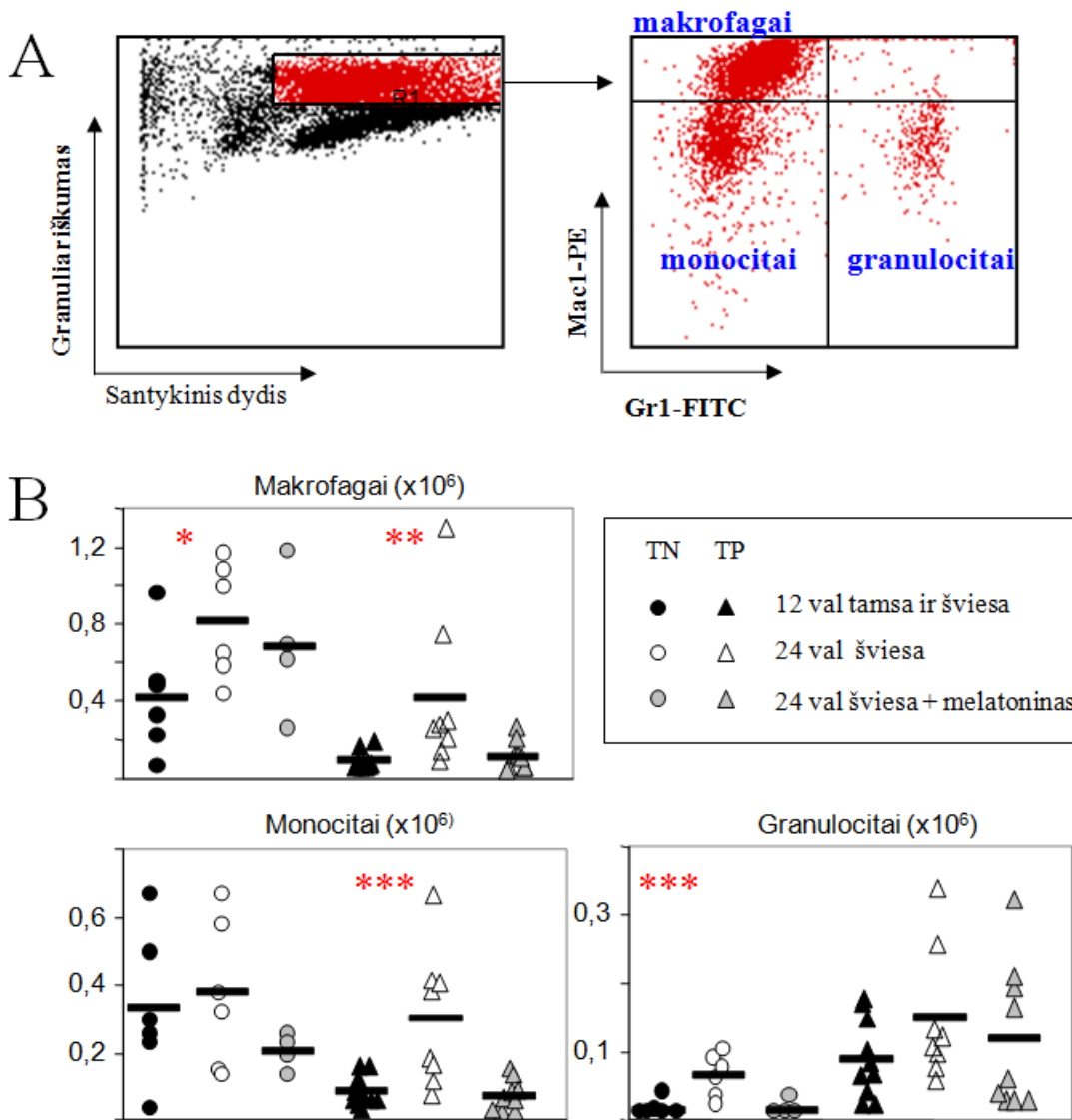
Pelių grupėse, laikytose pastovaus apšvietimo sąlygomis, bet kurioms kas vakarą buvo atliekamos papildomos melatonino injekcijos, leukocitų skaičius buvo panašus į nustatytąjį pelėse, laikytose natūralaus apšvietimo sąlygomis.



15 pav. Pilvo ertmės limfocitų skaičiaus pakitimai po TP ir TN vakarinės imunizacijos, esant sumažėjusiai melatonino koncentracijai.

A. Pilvo ertmės skirtingų limfocitų populiacijų identifikavimas tėkmės citometrijos metodu.

B. T, B2, B1a, B1b limfocitų skaičius ($\times 10^6$) pilvo ertmėje. TN – nuo T ląstelių nepriklausomo antigeno imunizacija, TP – nuo T ląstelių priklausomo antigeno imunizacija. Atskiras rutuliukas ar trikampis nurodo ląstelių skaičių vienos pelės pilvo ertmėje. Statistinis patikimumas tarp grupių buvo vertinamas pagal Mann-Whitney U testą. Statistiškai patikimi skirtumai tarp I ir II grupių pažymėti žvaigždutėmis: ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$.



16 pav. Pilvo ertmės makrofagų-granulocitų skaičiaus pakitimai po TP ir TN vakarinės imunizacijos, esant sumažėjusiai melatonino koncentracijai.

A. Pilvo ertmės monocitų, makrofagų ir granulocitų identifikavimas tėkmės citometrijos metodu.

*B. Makrofagų, monocitų ir granulocitų skaičius ($\times 10^6$) pilvo ertmėje. TN – nuo T ląstelių nepriklausomo antigeno imunizacija, TP – nuo T ląstelių priklausomo antigeno imunizacija. Atskiras rutuliukas ar trikampis nurodo ląstelių skaičių vienos pelės pilvo ertmėje. Statistinis patikimumas tarp grupių buvo vertinamas pagal Mann-Whitney U testą. Statistiškai patikimi skirtumai tarp I ir II grupių pažymėti žvaigždutėmis: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$.*

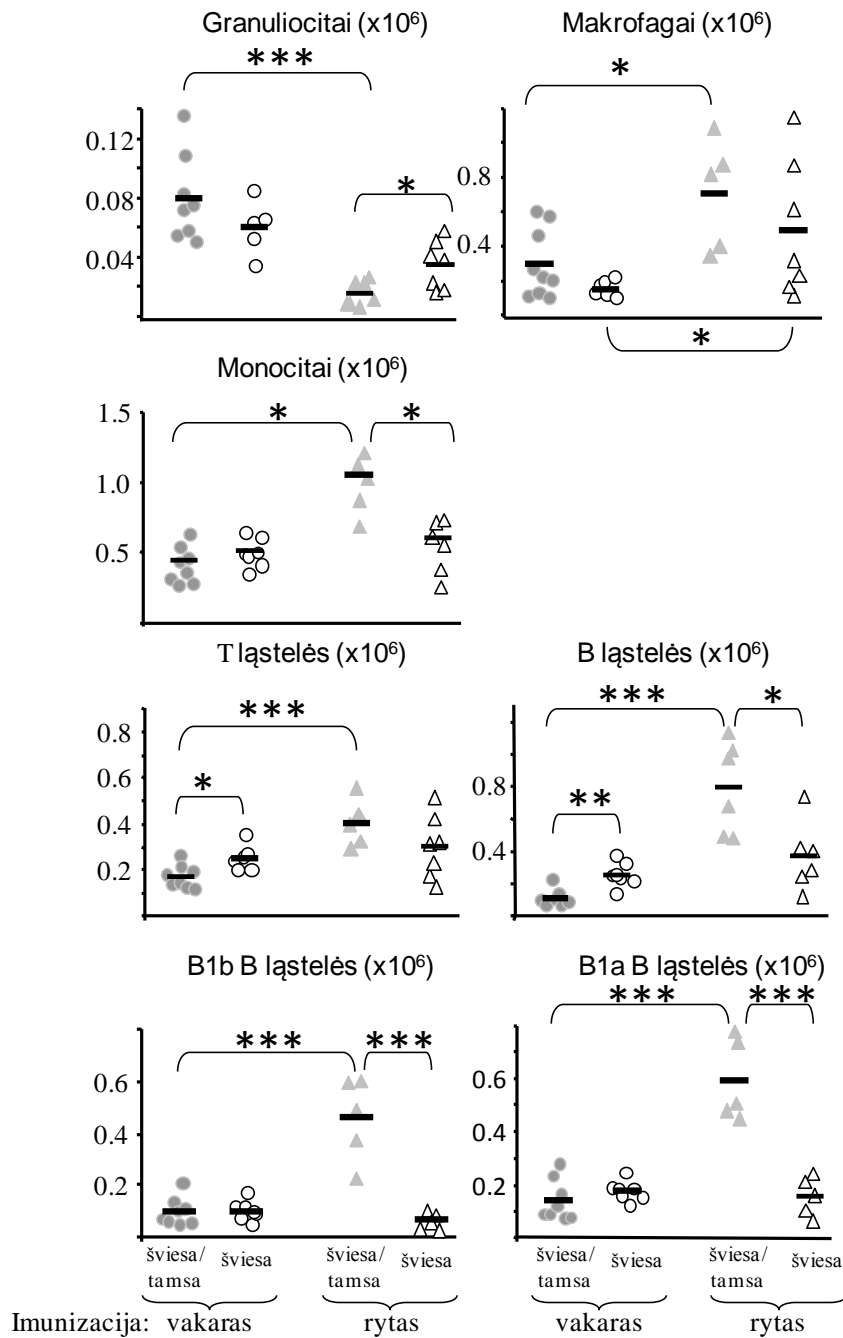
Apibendrinat gautus rezultatus galime teigti, kad melatonino sintezės slopinimas nesukelia drastiško ląstelių skaičiaus sumažėjimo pagrindiniuose imuninės sistemos organuose: užkrūčio liaukoje, limfmazgiuose, blužnyje. Kita vertus, melatonino sintezės sumažėjimas imunizuotose pelėse skatina leukocitų migraciją į uždegimo vietą (pilvo ertmę).

Mūsų rezultatai atitinka 2007 metais Markus ir kolegų iškelta hipotezę [282]: leukocitai migruoja į uždegimo vietą (pilvo ertmę) dėl chemotaktinių medžiagų. Nakties metu pagamintas melatoninas slopina leukocitų riedėjimo ir sukibimo savybes ir, tokiu būdu, slopina leukocitų migravimą [152]. Melatonino gamybos sutrikimas, atsiradęs dėl pastovaus apšvietimo, pagerina leukocitų migravimą.

4.5.1. Leukocitų migravimo į uždegimo vietą priklausomybė nuo imunizacijos paros laiko

Norint nustatyti leukocitų migravimo į uždegimo vietą priklausomybę nuo imunizacijos paros laiko, pelės buvo suskirstytos į keturias grupes pagal apšvietimo sąlygas ir TNP-ovalbumino imunizacijos paros laiką. Dvi pelių grupės buvo laikomos pastoviam apšvietime (melatonino sintezė sutrikusi) bei imunizuojamos skirtingu paros metu – viena ryte, kita – vakare. Kitos dvi grupės gyveno esant natūraliam apšvietimui (melatonino sintezė normali) bei imunizuotos skirtingu paros metu – viena ryte, kita – vakare. Rezultatai pateikti 17 paveiksle.

Pelių grupėse, gyvenančiose pastovaus apšvietimo sąlygomis, skirtingas imunizacijos paros laikas neturėjo įtakos ląstelių skaičiui pilvo ertmėje. Priešingai, natūraliomis sąlygomis gyvenančioms pelėms leukocitų migravimas į uždegimo vietą priklauso nuo imunizacijos paros laiko. Po vakarinės imunizacijos sumažėjo makrofagų, monocitų, T, B2, B1a, B1b limfocitų skaičius pilvo ertmėje, lyginant su rytine imunizacija (17 pav.).



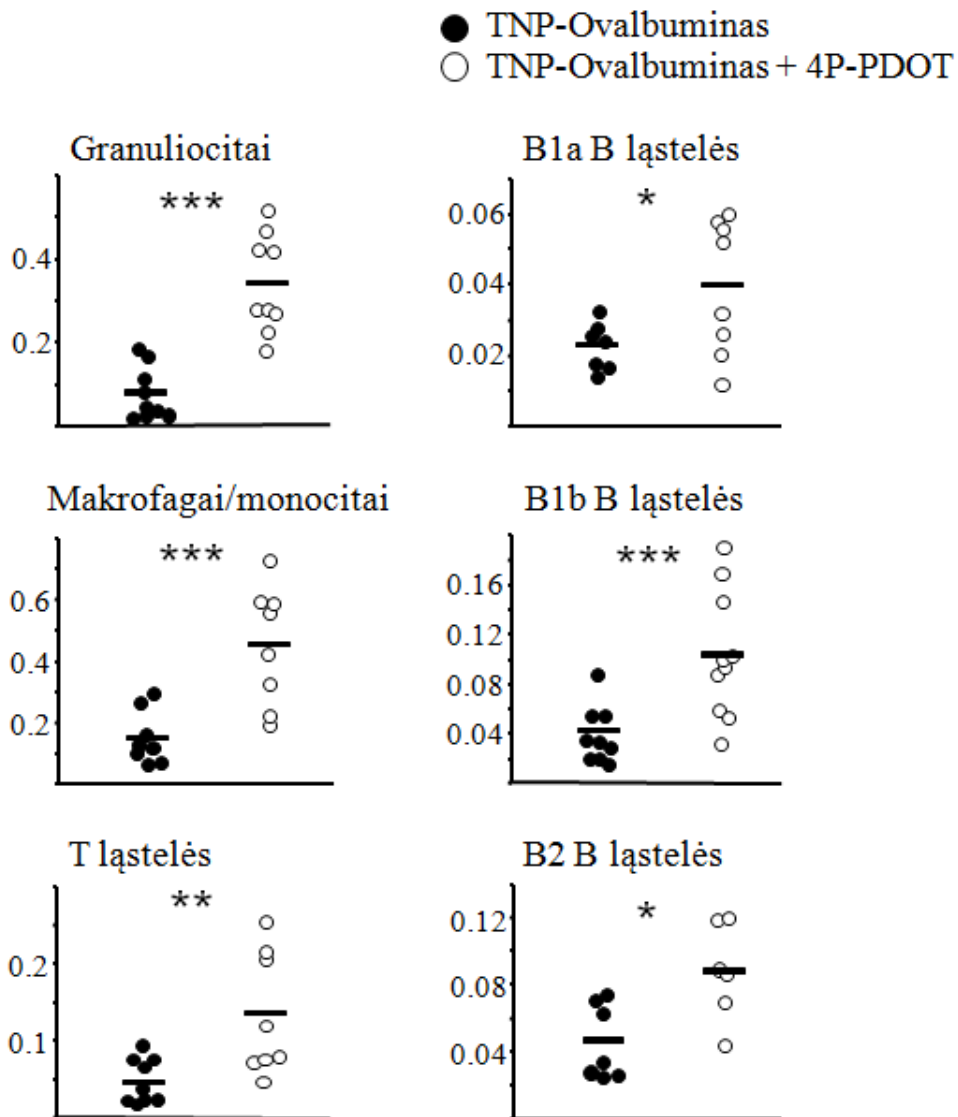
17 pav. Pilvo ertmės ląstelių skaičiaus pakitimai po TP antigeno rytinės ir vakarinės imunizacijos, esant sumažėjusiai melatonino sintezei.

Llimfocitų, makrofagų, monocitų ir granulocitų skaičius ($\times 10^6$) pilvo ertmėje. TP – T priklausomo antigeno imunizacija. Atskiras rutuliukas ar trikampis nurodo ląstelių skaičių vienos pelės pilvo ertmėje. Statistinis patikimumas tarp grupių buvo vertinamas pagal Mann-Whitney U testą. Statistiškai patikimi skirtumai tarp grupių pažymėti žvaigždutėmis: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$.

Hayashi ir kolegos nustatė, kad C57BL/6J linijos pelių pilvo ertmės makrofaguose dienos metu padidėja MCP-1 ir jo receptoriaus CCR2 raiška RNR lygmenyje [283]. CCR2 ir MCP-1 dalyvauja antigeną pateikiančių ląstelių migravime į uždegimo vietą [284]. Tai gali būti didesnės limfocitų, monocitų ir makrofagų migracijos po rytinės imunizacijos priežastis.

4.5.2. MT2 receptoriaus slopiklio 4P-PDOT įtaka leukocitų migravimui.

Norint nustatyti MT2 receptoriaus vaidmenį melatonino reguliuojamam leukocitų migravimui, buvo naudotas selektyvus MT2 receptoriaus slopiklis – 4P-PDOT. Pelės buvo suskirstytos į dvi natūraliomis apšvietimo sąlygomis laikomos grupes. Pirmajai pelių grupei viso eksperimento laikotarpį kasdien 19-20 valandą buvo suleidžiamas melatonino MT2 receptoriaus selektyvus slopiklis 4P-PDOT, tuo tarpu antroji pelių grupė slopiklio negavo. Adaptacinis periodas prie slopiklio truko vieną savaitę. Pasibaigus adaptaciniam periodui, pelės buvo imunizuojamos TNP-ovalbuminu. Eksperimento rezultatai pateikti 18 paveiksle. Pelių grupei, kuriai kasdien buvo leidžiamas 4P-PDOT, nustatytas statistiškai patikimas makrofagų, monocitų, granuliocitų, T, B2, B1a ir B1b tipo limfocitų skaičiaus padidėjimas, lyginant su pelių, kurioms 4P-PDOT nebuvo leidžiamas. Galima teigti, kad melatoninas, veikdamas per MT2 receptorių, slopina makrofagų, monocitų, granuliocitų, T ir B2 limfocitų migravimą į uždegimo vietą. Šie duomenys patvirtina ankstesnius literatūroje skelbiamus teiginius, kad melatoninas, veikdamas per MT2 receptorių, silpnina leukocitų riedėjimo savybes (slopina leukocitų migravimą) [152].



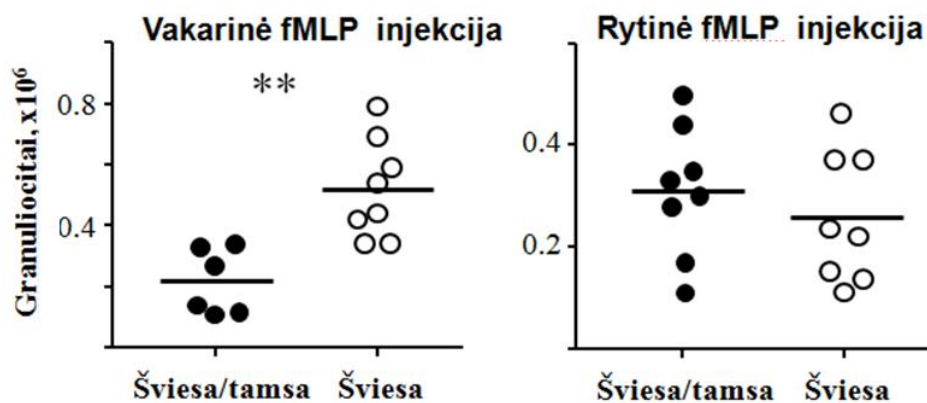
18 pav. MT2 receptoriaus slopiklio (4P-PDOT) įtaka leukocitų migravimui.

*Limfocitų, makrofagų, monocitų ir granulocitų skaičius ($\times 10^6$) pilvo ertmėje. Vienai pelių grupei viso eksperimento laikotarpiu kasdien 19-20 valandą buvo suleidžiamas melatonino MT2 receptoriaus selektyvus slopiklis – 4P-PDOT, antroji pelių grupė slopiklio negavo. Atskiras rutuliukas nurodo ląstelių skaičių vienos pelės pilvo ertmėje. Statistinis patikimumas tarp grupių buvo vertinamas pagal Mann-Whitney U testą. Statistiškai patikimi skirtumai tarp I ir II grupių pažymėti žvaigždutėmis: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$;*

4.6. Melatonino gamybos sutrikimo poveikis granulocitų migracijai

Norint iširti melatonino vaidmenį granulocitų migracijos reguliacijoje, pelėms buvo atliekamos fMLP (N-formyl-MET-Leu-Phe) injekcijos į pilvo ertmę. fMLP receptorių aktyvavimas skatina granulocitų chemotaksį [285]. Siekiant nustatyti optimalų granulocitų migracijos į pilvo ertmę laiką, buvo parinkta optimali trukmė nuo fMLP injekcijos į pelių pilvo ertmę iki dekapitacijos. Gauti rezultatai parodė, kad didžiausia granulocitų koncentracija pelių pilvo ertmėje buvo praėjus 4 valandoms po fMLP injekcijos.

Siekiant kiekybiškai įvertinti melatonino poveikį granulocitų migravimui, pelės, atsižvelgiant į apšvietimo sąlygas, buvo suskirstytos į dvi grupes. Pirmosios grupės gyvūnai buvo laikomi normalaus apšvietimo sąlygomis (šviesa 12val./tamsa 12 val.), antrosios - savaitę iki fMPL injekcijos laikyti esant pastoviam apšvietimui (šviesa 24 val.). Eksperimento metu fMLP injekcijos atliktos prieš tamsos periodo pradžią (20 val. vakaro) ir ryte (10 val. ryto). Rezultatai pateikti (19 pav.).



19 pav. Pilvo ertmės granulocitų skaičiaus pakitimai, esant sutrikusiai melatonino gamybai, po rytinės ir vakarinės fMLP injekcijos.

Pelės buvo suskirstytos į dvi grupes po 8 vnt. atsižvelgiant į apšvietimo sąlygas. Norint sukelti granulocitų migravimą pelėms buvo atliekamos fMLP injekcijos į pilvo ertmę. Atskiras rutuliukas nurodo granulocitų skaičių vienos pelės pilvo ertmėje. Statistinis patikimumas tarp grupių buvo vertinamas pagal Mann Whitney testą. Statistiškai patikimi skirtumai tarp grupių pažymėti žvaigždutėmis: ** $p \leq 0,005$.

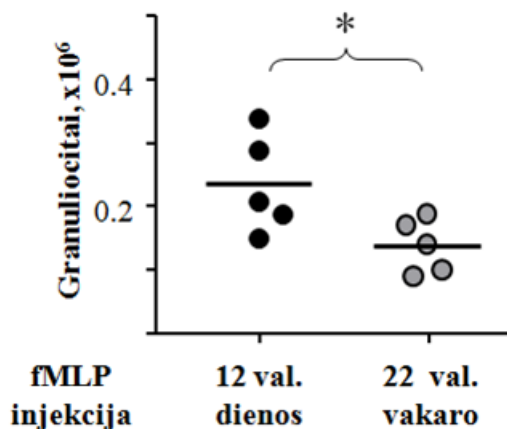
Pelių su sutrikusia melatonino gamyba, t.y. laikytų pastovaus apšvietimo sąlygomis, granulocitų migravimas į pilvo ertmę po vakarinės fMLP injekcijos (kai melatonino koncentracija skirtinga abiejose grupėse) padidėja, lyginant su normalaus apšvietimo sąlygomis laikytų pelių granulocitų migracija. Tuo tarpu po rytinės fMLP injekcijos (kai melatonino koncentracija vienoda abiejose grupėse) granulocitų migravimo į pilvo ertmę skirtumo tiriamosiose pelių grupėse nebuvo aptikta. Remiantis šiais rezultatais, galime teigti, kad melatoninas slopina granulocitų migraciją.

4.6.1. Granulocitų migracijos priklausomybė nuo fMLP injekcijos paros laiko

Norint įvertinti melatonino vaidmenį reguliuojant granulocitų migraciją esant natūraliai sumažėjusiai melatonino koncentracijai, eksperimentinės pelės buvo suskirstytos į dvi natūraliomis apšvietimo sąlygomis gyvenusias grupes, kurioms fMLP injekcijos atliktos skirtingu paros metu. Pirmosios grupės gyvūnams fMLP injekcija buvo atlikta dienos metu – 12 val. (esant sumažėjusiai melatonino koncentracijai), kitai – tamsos metu – 22 val. vakaro (prasidėjus melatonino gamybai). Rezultatai pateikti 20 paveiksle.

Atliekant fMLP injekciją dieną (neprasidėjus melatonino gamybai ir esant natūraliai sumažėjusiai melatonino koncentracijai), padidėja granulocitų migravimas į pilvo ertmę, palyginus su pelių grupe, kuriai fMLP injekcija buvo daroma vakare (prasidėjus melatonino gamybai ir esant natūraliai padidėjusiai melatonino koncentracijai).

Remiantis mūsų rezultatais, dirbtinai ar natūraliai sumažėjus melatonino koncentracijai, padidėja granulocitų migracija. Šio darbo rezultatai patvirtina ankstesnius literatūros duomenis, kuriuose teigiama, kad melatoninas neigiamai reguliuoja granulocitų migraciją [228-232, 286].



20 pav. Pilvo ertmės granulocitų skaičiaus pakitimai, esant natūraliai sumažėjusiai melatonino koncentracijai.

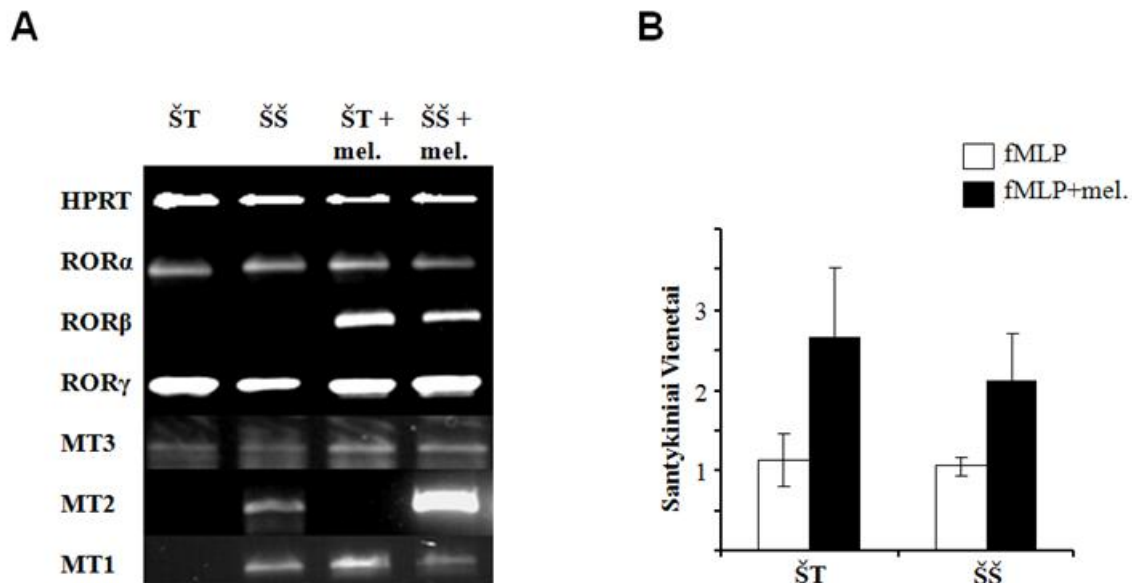
*Pelės buvo suskirstytos į dvi grupes po 6 vnt. Pirmajai pelių grupei fMLP injekcija buvo atlikta dieną, antrajai - naktį. Atskiras rutuliukas nurodo granulocitų skaičių vienos pelės pilvo ertmėje. Statistinis patikimumas tarp grupių buvo vertinamas pagal Mann Whitney testą. Statistiškai patikimi skirtumai tarp grupių pažymėti žvaigždutėmis: * $p \leq 0,05$.*

4.6.2. Melatonino receptorių transkriptų raiška granulocituose

Literatūroje nėra duomenų apie melatonino receptorių raišką granulocituose. Taip pat nėra duomenų apie receptorių raiškos priklausomybę nuo paros laiko ir melatonino koncentracijos. Norint tai išsiaiškinti, praėjus 3 valandoms po fMLP injekcijos, iš pelių pilvo ertmės buvo išgryninti granulocitai ir, taikant tikrojo laiko polimerazinės grandininės reakcijos metodą bei naudojant savitus melatonino receptorių RNR pradmenis, nustatyta melatonino receptorių raiška RNR lygmenyje.

Granulocitai išgryninti iš pelių, laikytų skirtingomis apšvietimo sąlygomis. Taip pat iš pelių, laikytų skirtingomis apšvietimo sąlygomis ir kurioms kartu su fMLP buvo leidžiamas melatoninas (5 mg/kg). Rezultatai pateikti 21 paveiksle.

MT1 ir MT2 receptorių transkriptai aptikti tik pastovaus apšvietimo sąlygomis laikytų pelių granulocituose. Papildomai suleistas melatoninas membraninių receptorių raiškos pastovaus apšvietimo sąlygomis laikytų pelių granulocituose neslopino, bet skatino MT1 receptoriaus transkripto raišką natūralaus apšvietimo sąlygomis laikytų pelių granulocituose.



21 pav. Melatonino receptorių raiška granulocituose.

Granulocitai išgryninti naktį, praėjus 3 valandoms po fMLP injekcijos. „ŠT“ - pelės laikytos natūralaus apšvietimo sąlygomis (12 val. šviesa/12 val. tamsa). „ŠŠ“ - pelės laikytos pastovaus apšvietimo sąlygomis (24 val. šviesa). „ŠT“+mel. - pelės laikytos natūralaus apšvietimo sąlygomis (12 val. šviesa/12 val. tamsa), kartu su fMLP buvo leidžiamas melatonininas (5 mg/kg). „ŠŠ“+mel. - pelės laikytos pastovaus apšvietimo sąlygomis (24 val. šviesa), kartu su fMLP buvo leidžiamas melatonininas (5 mg/kg). A. Agarozės gelio nuotrauka po 40 PGR ciklų. B. Kiekybinė MT3/CR2 receptorių raiškos analizė. Santykinė raiška buvo nustatyta pagal K.J.Livak ir T.D.Schmittgen aprašytą metodiką [274].

MT3/CR2 receptoriaus transkripcija nustatyta visų pelių grupių granulocituose. MT3/HR2R genų raiška nepriklauso nuo apšvietimo sąlygų, bet papildomos melatonino injekcijos skatino šių genų transkripcijos padidėjimą (21B pav.).

ROR α R transkripcija buvo aptikta visose pelių grupėse. Šių genų raiška nepriklauso nuo apšvietimo sąlygų ar papildomų melatonino injekcijų.

ROR β R raiška vyko tik pelių grupėse, kurioms buvo papildomai leistas melatonininas. Papildomos melatonino injekcijos skatino ROR β receptoriaus raišką.

ROR γ R transkripcija nustatyta visose pelių grupėse. Šių genų raiška nepriklauso nuo apšvietimo sąlygų ir papildomų melatonino injekcijų.

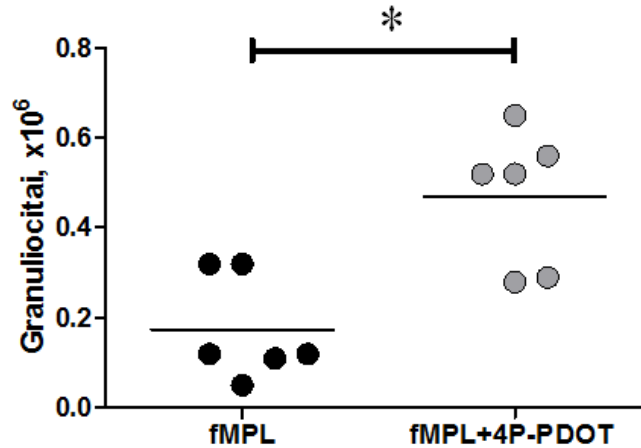
Apibendrinant galime teigti, kad granulocituose aptiktos visos tirtosios melatonino receptorių grupės. Membraninių receptorių transkriptų raiška vyksta

tik pelių, laikomų pastovaus apšvietimo sąlygomis granulocituose. Papildomos melatonino injekcijos skatino MT1 receptoriaus raišką natūralaus apšvietimo sąlygomis laikytų pelių granulocituose, ROR β receptoriaus ekspresiją ir MT3/CR2 receptorių raiškos padidėjimą.

4.6.3. MT2 receptoriaus vaidmuo melatoninui reguliuojant granulocitų migravimą

Norint nustatyti MT2 receptoriaus vaidmenį melatonino reguliuojamame granulocitų migravime, buvo naudotas selektyvus MT2 receptoriaus slopiklis – 4P-PDOT. Eksperimento metu pelės gyveno natūralaus apšvietimo sąlygomis. Pirmajai pelių grupei 4P-PDOT (0,25 mg/kg) buvo suleistas likus 3 valandoms iki fMLP injekcijos, antrajai pelių grupei 4P-PDOT leidžiamas nebuvo. fMLP injekcijos buvo atliktos prasidėjus tamsos periodui (kai prasideda melatonino gamybai) – 20 val. vakaro. Rezultatai pateikti 22 paveiksle.

Pelių grupėje, kuriai buvo suleistas 4P-PDOT, granulocitų skaičius pilvo ertmėje buvo statistiškai patikimai padidėjęs, palyginus su pelių grupe, kuriai buvo suleistas tik fMLP. Šio darbo metu buvo nustatyta, kad melatoninas, veikdamas per MT2 receptorių, slopina granulocitų migravimą. Iki šiol literatūroje buvo skelbiama tik apie tai, kad melatoninas, veikdamas per MT2 receptorių, silpnina leukocitų riedėjimo savybes ir, tokiu būdu, slopina leukocitų migravimą [152]. Tuo tarpu duomenų, kad melatoninas slopina granulocitų migravimą, veikdamas per MT2 receptorių, mokslinėje spaudoje iki šiol nebuvo pateikta.



22 pav. MT2 receptoriaus slopiklio (4P-PDOT) įtaka granulocitų migracijai.

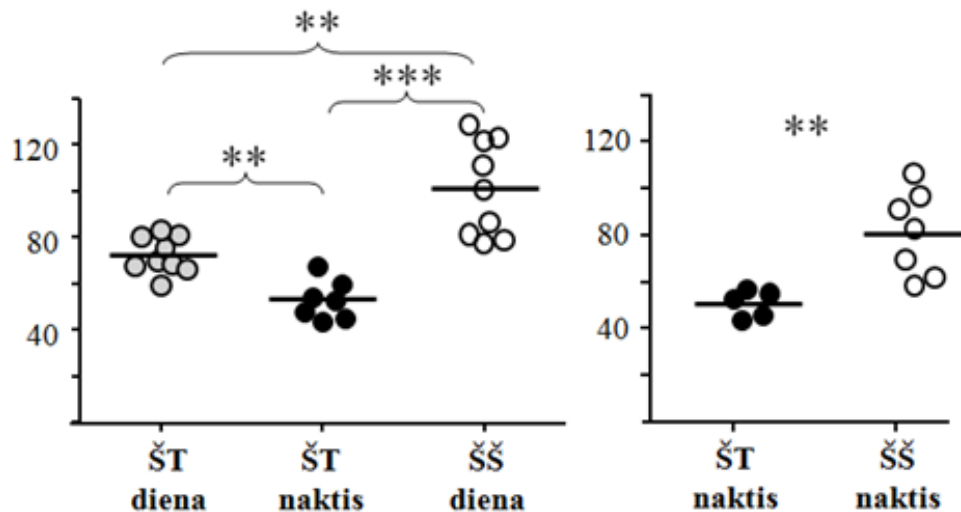
*Pelės suskirstytos į dvi grupes po 7 vnt. ir laikytos natūralaus apšvietimo sąlygomis. Eksperimento metu naudotas melatonino MT2 receptoriaus slopiklis – 4P-PDOT, kuris pirmajai pelių grupei buvo leidžiamas 3 val. prieš fMPL injekciją, antrajai pelių grupei 4P-PDOT nebuvo leidžiamas. Vienas rutuliukas – granulocitų skaičius vienos pelės pilvo ertmeje. Statistinis reikšmingumas tarp grupių buvo vertinamas pagal Mann Whitney testą. Statistiškai patikimi skirtumai tarp I ir II grupių pažymėti žvaigždutėmis: * $p \leq 0,05$.*

4.6.4. CD18 molekulių raiškos granulocituose priklausomybė nuo paros laiko ir melatonino gamybos ciklo

ICAM-1 – tarpląstelinio sukibimo molekulė, aptinkama ant endotelinų ląstelių paviršiaus. Manoma, kad ICAM molekulių grupė – pagrindinės sukibimo molekulės, dalyvaujančios leukocitams patenkant į uždegimo vietą. ICAM sąveikauja kaip ligandas su LFA-1 molekule, esančia ant leukocitų paviršiaus [287]. LFA-1 – heterodimerinis integrinas, sudarytas iš αL ir $\beta 2$ subvienetų (arba CD11, CD18 molekulių) [288]. Šio darbo metu buvo tiriama CD18 molekulių raiškos ant granulocitų paviršiaus priklausomybė nuo paros laiko ir melatonino gamybos sutrikimo. Rezultatai pateikti 23 paveiksle.

Mažiausia CD18 molekulių raiška nustatyta natūralaus apšvietimo sąlygomis laikytų pelių granulocituose, kurie buvo išgryninti naktį (esant didžiausiai melatonino koncentracijai). Statistiškai patikimai padidėjusi CD18 molekulių raiška buvo natūralaus apšvietimo sąlygomis laikytų pelių granulocituose, kurie išgryninti dieną (esant sumažėjusiai melatonino koncentracijai). Pelių, laikytų

pastovaus apšvietimo sąlygomis (esant sutrikusiai melatonino gamybai), granulocituose aptikta didžiausia CD18 molekulių raiška, nepriklausomai nuo ląstelių gryninimo paros laiko.



23 pav. CD18 molekulių raiška granulocitų paviršiuje.

*CD18 molekulės fluorescencijos intensyvumas granulocitų paviršiuje. Pelės buvo suskirstytos į 4 grupes atsižvelgiant į apšvietimo sąlygas ir kraujo ėmimo paros laiką. „ŠT“ diena – pelės laikytos natūraliomis apšvietimo sąlygomis, kraujas imtas dienos metu, „ŠT“ naktis – pelės laikytos natūraliomis apšvietimo sąlygomis, kraujas imtas nakties metu, „ŠŠ“ diena - pelės laikytos esant pastoviam apšvietimui, kraujas imtas dienos metu, „ŠŠ“ naktis - pelės laikytos esant pastoviam apšvietimui, kraujas imtas nakties metu. Statistinis patikimumas tarp grupių buvo vertinamas pagal Mann Whitney testą. Statistiškai patikimi skirtumai tarp grupių pažymėti žvaigždutėmis: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$.*

Apibendrinant gautus rezultatus, galime teigti, kad CD18 molekulių raiška BALB/c linijos pelių granulocituose priklauso nuo paros laiko ir melatonino koncentracijos organizme. Esant sutrikusiai melatonino gamybai, granulocituose padidėja CD18 molekulių kiekis. Remiantis šio eksperimento rezultatais, galima teigti, kad melatoninas slopina CD18 molekulių raišką granulocitų paviršiuje.

Šio darbo metu gauti rezultatai yra svarbūs patvirtinant/paneigiant šiuo metu literatūroje skelbiamus prieštarigus duomenis apie melatonino poveikį CD18 molekulių raiškai. Iš vienos pusės, mūsų darbo duomenys patvirtina Chen ir kolegų rezultatus, kurie rodo, kad melatoninas slopina CD18 molekulių ekspresiją sunkia ir lengva ūminio pankreatito forma sergančių pacientų granulocituose

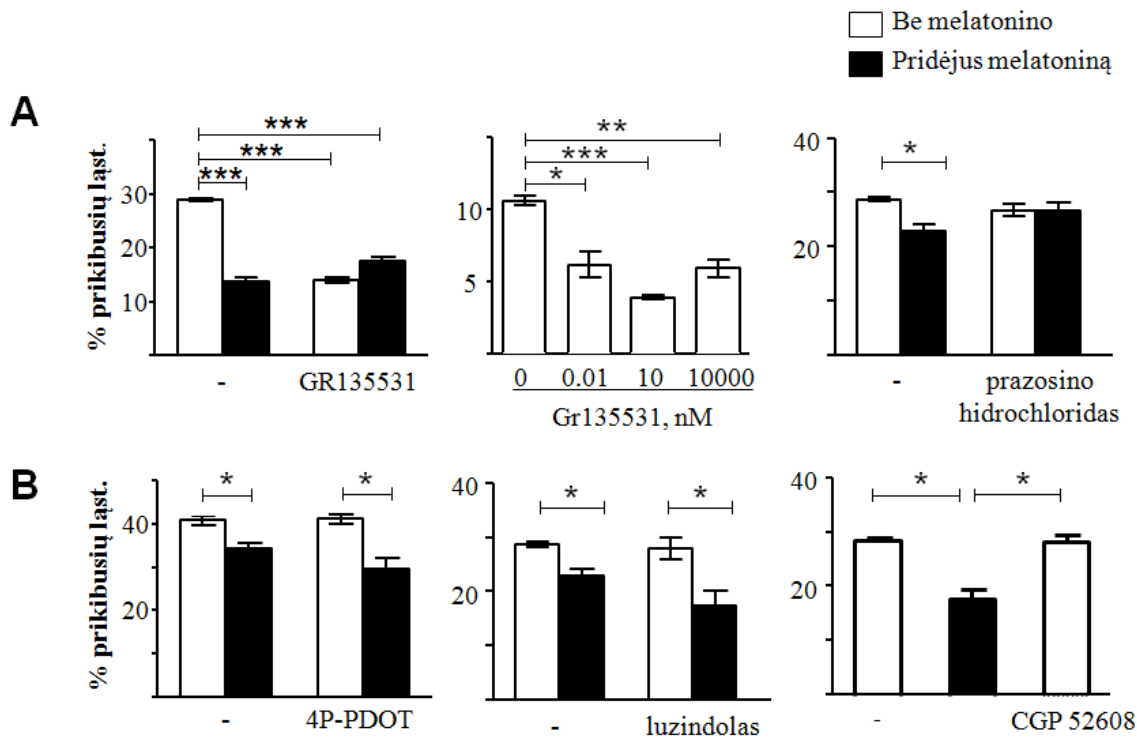
[289]. Kita vertus, gauti rezultatai paneigia Lotufo ir kolegų teiginius, kad Wistar linijos žiurkių granulocitų kultivavimas su melatoninu neturi įtakos CD18 molekulių raiškai esant leukotrieno B4 ir fMPL stimuliacijai [235].

4.6.5. Melatonino poveikis granulocitų sukibimo savybėms

Nustačius, kad CD18 molekulių raiška BALB/c linijos pelių granulocituose yra padidėjusi esant sutrikusiai melatonino gamybai, iškelta hipotezė, kad melatoninas slopina sukibimo molekulių raišką granulocituose. Norint patvirtinti šį teiginį, buvo pritaikytas sukibimo metodas. Norint iširti, per kokius receptorius melatoninas gali moduluoti granulocitų sukibimo savybes, eksperimentuose naudotas melatoninas bei jo receptorių slopikliai ir aktyvatoriai: MT1 ir MT2 receptorių slopiklis lizindolas (10 μ M), MT2 receptoriaus slopiklis 4P-PDOT (1 μ M), MT3/CR2 receptoriaus slopiklis prazosino hidrochloridas (10 μ M), MT3/CR2 receptoriaus aktyvatorius GR135531 (0,1, 10, 10000 nM), ROR α receptoriaus aktyvatorius CGP 52608 (10 μ M). Melatonino ir jo receptorių poveikis granulocitų sukibimo molekulių raiškai buvo įvertintas remiantis prie ICAM-1 molekulių prikibusių granulocitų skaičiumi. Darbo rezultatai pateikti 24 paveiksle.

Atlikus prikibusių prie ICAM-1 granulocitų skaičiaus analizę, nustatyta, kad melatoninas, kaip ir MT3/CR2 receptoriaus aktyvatorius GR135531, slopino granulocitų sukibimo savybes. Tuo tarpu ROR α receptoriaus aktyvatorius CGP 52608 granulocitų sukibimo savybėms poveikio neturėjo.

Siekiant nustatyti, per kuriuos granulocitų receptorius melatoninas slopina granulocitų sukibimą, blokuoti skirtingi granulocitų receptoriai. Prazosino hidrochloridu užblokavus MT3/CR2 receptorių, melatoninas granulocitų sukibimo savybių nebeslopino. Tuo tarpu lizindolu užblokavus MT1 ir MT2 receptorius, melatoninas vis tiek slopino granulocitų sukibimą. Remiantis šiais rezultatais, galima teigti, kad melatoninas slopina granulocitų sukibimo savybes veikdamas per MT3/CR2 receptorių.



24 pav. Melatonino poveikis granulocitų sukibimui su ICAM-1 molekulėmis veikiant per *MT3/CR2* receptorių.

Pelės buvo laikomos natūralaus apšvietimo sąlygomis (12val. tamsa/12 val. šviesa). Granulocitų sukibimas su ICAM-1 molekule tirtas be melatonino (balti stulpeliai) ir pridėjus melatonino (juodi stulpeliai).

*A. *MT3/CR2* receptoriaus aktyvatoriaus GR135531 ir slopiklio prazosino poveikis granulocitų sukibimo savybėms.*

*B. *MT1* ir *MT2* receptorių slopiklio luzindolo, *MT2* receptoriaus slopiklio 4P-PDOT bei *RORα* aktyvatoriaus CGP 52608 poveikis granulocitų sukibimo savybėms.*

*Statistinis patikimumas tarp grupių buvo vertinamas pagal Studento *T* testą. Statistiškai patikimi skirtumai pažymėti žvaigždutėmis: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$;*

Šio darbo rezultatai yra svarbūs nustatant melatonino poveikį granulocitų migravimui, kadangi iki šiol literatūroje buvo skelbiama tik apie tai, kad melatoninas, veikdamas per endotelio ląsteles, slopina sukibimo molekulių raišką endotelio ląstelėse ir jų sukibimo savybes [237]. Taip pat nustatyta, kad melatoninas, veikdamas per *MT3/CR2* receptorių, slopina leukocitų sukibimo savybes [152]. Tuo tarpu duomenų, kad melatoninas slopina granulocitų sukibimo savybes, mokslinėje spaudoje iki šiol nebuvo pateikta.

Apibendrinant rezultatus, buvo nustatyta, kad melatoninas, moduluojant granulocitų migraciją, veikia per pačius granulocitus. Jis skatina *MT3/CR2* receptoriaus raišką granulocituose ir, veikdamas per *MT3/CR2* receptorių, slopina granulocitų sukibimo savybes. Šiuos teiginius patvirtina duomenys, kad dieną (esant sumažėjusiai melatonino koncentracijai) arba laikant peles pastovaus apšvietimo sąlygomis (esant sutrikusiai melatonino gamybai), padidėja CD18 molekulių raiška granulocituose.

4.7. Rezultatų apibendrinimas

Remiantis literatūros duomenimis, melatonino gamyba skirtingose pelių linijose (C57BL/6J, BALB/c, AKR/J, CBA, C57BL/6) priklauso nuo cirkadinių ritmų ir didžiausia melatonino koncentracija kraujo serume nustatoma tamsos fazės viduryje [290, 291]. Tiriant melatonino trūkumo poveikį BALB/c linijos pelių imuninei sistemai, pirmiausiai buvo nustatytas pastovaus apšvietimo poveikis melatonino sintezei. Naktį, kai įprastai prasideda melatonino gamyba, esant šviesai pasireiškė melatonino sintezės slopinimas. Pelių, gyvenančių pastovaus apšvietimo sąlygomis, tiriamo hormono koncentracija kraujo serume buvo 2-3 kartus mažesnė nei pelių, gyvenančių natūralaus apšvietimo sąlygomis. Mūsų rezultatai patvirtino ankstesnius literatūros duomenis, kad šviesa nakties metu slopina melatonino gamybą [2]. Sekančiuose tyrimuose, taikant pastovaus apšvietimo metodą ir, tokiu būdu slopinant melatonino gamybą, buvo iširtas melatonino poveikis BALB/c linijos pelių imuninei sistemai.

Kadangi antikūnų produkcija gali būti nuo T limfocitų priklausoma ir nepriklausoma, siekiant nustatyti melatonino poveikį antikūnų gamybai, imunizacijai naudoti skirtingi antigenai. Nuo T ląstelių nepriklausomai antikūnų produkcijai tirti BALB/c linijos pelės buvo imunizuotos nuo T ląstelių nepriklausomais antigenais – TNP-fikoliu ir TNP-LPS. Šie antigenai stimuliuoja tik B ląsteles ir skatina antikūnų sintezę, tačiau TNP-fikolis ir TNP-LPS

nestimuliuoja T ląstelių, todėl šios ląstelės neturi įtakos B ląstelių funkcijoms. Remiantis literatūros duomenimis, melatoninas neturi poveikio BALB/c linijos pelių B limfocitų proliferacijai ir antikūnų (IgM, IgA, IgG2a, IgG3) gamybai nesant ir esant LPS stimuliacijai [255]. Atlikus eksperimentus, nustatyti priešingi rezultatai – melatonino trūkumas stimuliuoja nuo T ląstelių nepriklausomą antikūnų produkciją. Kita vertus, laikant peles pastovaus apšvietimo sąlygomis, bet kas vakarą leidžiant melatoniną, antikūnų kiekis buvo panašus į kontrolinės grupės (pelės, gyvenančios 12 val. šviesos ir 12 val. tamsos sąlygomis). Remiantis šiais rezultatais, galime teigti, kad melatoninas slopina nuo T ląstelių nepriklausomą antikūnų produkciją. Mūsų tyrimų metu pirmą kartą įrodyta, kad melatoninas tiesiogiai (nedalyvaujant T ląstelėms) gali veikti B ląstelių aktyvinimą ir antikūnų sekreciją.

T naivieji limfocitai pagalbininkai (T_H0) po kontakto su antigenu gali diferencijuotis į tris populiacijas: T_H1 , T_H2 ir T_H17 . Jie skiriasi gaminamais citokinais. T_H1 išskiria $IFN\gamma$, IL-2, $TNF\alpha$ ir skatina ląstelinį imunitetą, T_H2 ląstelės išskiria IL-4, IL-1, IL-6, IL-10 citokinus ir aktyvina B limfocitus, kurie virsta antikūnus gaminančiomis ląstelėmis. Priklausomai nuo to, kurių T ląstelių yra daugiau (T_H1 ar T_H2), gali būti modifikuojami produkuojamų antikūnų izotipai. T_H1 ląstelės stimuliuoja izotipų persijungimą į IgG2a, o T_H2 ląstelės – į IgG1 izotipą. Tiek T_H1 , tiek T_H2 lemia IgM ir IgG3 antikūnų susidarymą [278, 279]. Literatūros duomenimis, melatoninas moduliuoja nuo T ląstelių priklausomą pelių antikūnų gamybą, stimuliuodamas T_H0 limfocitus diferencijuotis į T_H2 populiaciją [255, 265, 267, 268]. Hormonas T_H0 limfocituose skatina IL-4 ir IL-10 citokinų produkciją ir slopina IL-2 ir $IFN\gamma$ gamybą. Tokiu būdu melatoninas stimuliuoja IgG1 ir slopina IgG2a gamybą [266, 267]. Šiame darbe atliktų eksperimentų rezultatai taip pat rodo, kad, trūkstant melatonino, padidėja IgM, IgG2a ir IgG3 antikūnų kiekiai bei sumažėja IgG1 izotipo antikūnų kiekis. Mūsų

rezultatai patvirtino literatūros duomenis, kad melatoninas skatina pelių T_H0 limfocitus diferencijuotis į T_H2 populiaciją.

Iki šiol literatūroje nebuvo skelbiama duomenų, apie tai, per kurias ląsteles ir jų receptorius melatoninas reguliuoja nuo T ląstelių priklausomą pelių antikūnų gamybą. Šiame darbe atlikti *in vivo* ir *in vitro* eksperimentai, kuriuose naudotas MT2 receptoriaus slopiklis, parodė, kad melatoninas reguliuoja nuo T ląstelių priklausomą antikūnų gamybą veikdamas per MT2 receptorių. Atlikus tikrojo laiko PGR, blužnies B limfocituose nustatyta žymiai intensyvesnė melatonino membraninių receptorių transkriptų raiška, lyginant su limfinių mazgų T_H0 limfocitais. Taip pat nustatyta, kad blužnies B limfocituose membraninių receptorių transkriptų raiška priklauso nuo paros laiko – vyksta tik nakties metu. Dėl pastovaus apšvietimo sutrikus melatonino gamybai, MT1 ir MT2 receptorių raiška nakties metu nevyksta, tačiau papildomos melatonino injekcijos atstato blužnies B limfocituose melatonino membraninių receptorių raišką. Apibendrinant visus rezultatus, galime teigti, kad šio darbo metu pirmą kartą buvo įrodyta, kad melatoninas, veikdamas per blužnies B limfocitų MT2 receptorių, moduliuoja nuo T ląstelių priklausomą antikūnų gamybą. Dėl pastovaus apšvietimo sutrikus melatonino gamybai, sutrinka ir MT2 receptoriaus ekspresija B limfocituose, statistiškai patikimai sumažėja IgG1 ir padidėja IgG2a antikūnų kiekis. Kita vertus, papildomos melatonino injekcijos atstato MT2 receptoriaus ekspresiją blužnies B limfocituose, statistiškai patikimai padidina IgG1 ir sumažina IgG2a antikūnų kiekį.

Tiriant antikūnų produkcijos priklausomybę nuo imunizacijos paros laiko (cirkadinių ritmų) buvo nustatyta, kad, atlikus vakarinę (prasadėjus melatonino gamybai) imunizaciją, aptiktas statistiškai patikimas visų tirtų antikūnų izotipų (IgM, IgG2a, IgG3, IgG1) koncentracijos padidėjimas, lyginant su rytinės imunizacijos rezultatais. Šio tyrimo rezultatai pirmą kartą parodė, kad antikūnų produkcija priklauso nuo imunizacijos paros laiko. Didesnė melatonino

koncentracija imunizacijos metu turėjo teigiamą poveikį antikūnų produkcijai. Remiantis literatūros duomenimis, melatoninas pagerino antikūnų produkciją, atlikus ožkų vakcinavimą prieš *Dichelobacter nodosus* [292] ir *Clostridium perfringens* [293]. Ar galima taikyti melatoniną kaip adjuvantą vakcinavimo metu? Remiantis mūsų ir kitų mokslininkų rezultatais, melatoninas teigiamai veikia antikūnų produkciją atliekant gyvūnų (pelių, ožkų) imunizaciją. Tačiau nėra žinomas jo poveikis antikūnų produkcijai žmogaus organizme ir norint tai nustatyti, reikalingi papildomi tyrimai.

Literatūros duomenimis, pašalinus pagrindinį melatonino gamybos organą – kankorėžinę liauką, gyvūnams sumažėja imuninės sistemų organų masė. Sumažėja žiurkėnų blužnies masė [16], pelių užkrūčio liaukos masė [197, 198], žiurkių blužnies ir užkrūčio liaukos masė [199]. Tyrinėjant melatonino poveikį BALB/c linijos pelių leukocitų migravimui mes nustatėme, kad melatonino sintezės slopinimas nesukelia statistiškai patikimo ląstelių skaičiaus sumažėjimo imuninės sistemos organuose: užkrūčio liaukoje, limfmazgiuose, blužnyje. Kita vertus, melatonino sintezės sumažėjimas skatina leukocitų migraciją į uždegimo vietą (pilvo ertmę), bet laikant peles pastovaus apšvietimo sąlygomis ir kas vakarą leidžiant melatoniną, leukocitų skaičius buvo panašus į kontrolinės grupės (pelės, gyvenančios 12 val. šviesos ir 12 val. tamsos sąlygomis). Remiantis šiais rezultatais, galime teigti, kad melatoninas slopina leukocitų migraciją į uždegimo vietą.

Žmonių ir graužikų imuninės sistemos komponentų (ląstelių, citokinų) skaičius kraujyje priklauso nuo cirkadinių ritmų (paros laiko). Žmonių T (T_H0 , T_C , T atminties) ir B limfocitų didžiausias skaičius būna naktį [294, 295]. Priešingai, įgimto imuninio atsako ląstelių (granulocitų, monocitų, NK ląstelių) pikas būna dieną [296-298]. Graužikų (pelių, žiurkių) kraujyje beveik visų leukocitų populiacijų (limfocitų, granulocitų, monocitų) pikas būna dienos metu [222, 299-301]. Išimtį sudaro NK ląstelės, kurių pikas būna naktį [299]. Tyrinėjant leukocitų

migracijos priklausomybę nuo paros laiko, mes nustatėme, kad daugiau leukocitų migruoja imunizuojant peles ryte, lyginant su vakarine imunizacija (prasidėjus melatonino gamybai). Didesnė melatonino koncentracija imunizacijos metu slopina leukocitų migravimą į uždegimo vietą. Remiantis literatūros duomenimis, melatoninas gali reguliuoti leukocitų migravimą į uždegimo vietą keturiais būdais. Veikiant per leukocitus, slopina leukocitų riedėjimo ir sukibimo savybes [152]. Veikiant per endotelio ląsteles, slopina sukibimo molekulių (PECAM, ICAM1) raišką [237, 238]. Uždegimo metu slopina padidėjusį kraujagyslių pralaidumą [235]. Žmogaus monocituose, kaip ir žmogaus, pelių ir RAW 264.7 linijos makrofaguose, melatoninas slopina pagrindinio uždegimą skatinančio citokino TNF α gamybą ir, tokiu būdu, veikia kaip priešuždegiminė medžiaga [247-251]. Vykdamas tolimesnius tyrimus, buvo nustatyta, kad melatoninas slopina leukocitų migraciją veikdamas per MT2 receptorių. Šie duomenys patvirtina ankstesnius literatūroje skelbiamus teiginius, kad melatoninas, veikdamas per MT2 receptorių, silpnina leukocitų riedėjimo savybes, ir tokiu būdu, mažina leukocitų migravimą [152].

Remiantis mūsų rezultatais, dirbtinai ar natūraliai sumažėjus melatonino koncentracijai, padidėja fMLP indukuota granulocitų migracija. Šio darbo rezultatai patvirtina ankstesnius literatūros duomenis, kuriuose teigiama, kad melatoninas neigiamai reguliuoja granulocitų migraciją. Žiurkėms α -naftilisotiocianatais sukėlus kepenų pažeidimus, melatoninas susilpnino granulocitų infiltraciją į kepenis [228]. Žiurkėms zymozan preparatu sukėlus neseptinį šoką, melatoninas susilpnino granulocitų infiltraciją į plaučius, plonąsias žarnas ir kepenis [286]. Žiurkėms aklosios žarnos perrišimu ir pradūrimu sukėlus sepsinį šoką, melatoninas sumažino granulocitų infiltraciją į plaučius ir kepenis [229]. Žiurkėms sužalojus nugaros smegenis, melatoninas sumažino granulocitų infiltraciją į nugaros smegenų audinius [231]. Žiurkėms ir

pelėms bleomicinu sukėlus plaučių pažaidas, melatoninas slopino granulocitų infiltraciją į plaučius [230, 232].

Literatūros duomenimis, melatoninas, veikdamas per endotelio ląsteles, slopina sukibimo molekulių raišką endotelio ląstelėse ir jų sukibimo savybes [237]. Taip pat nustatyta, kad melatoninas, veikdamas per *MT3/CR2* receptorių, slopina leukocitų sukibimo savybes [152]. Tuo tarpu duomenų, kad melatoninas susilpnintų granulocitų sukibimo savybes, mokslinėje spaudoje iki šiol nebuvo pateikta. Mūsų tyrimų metu pirmą kartą įrodyta, kad melatoninas slopina granulocitų migraciją, veikdamas per granulocitus. Hormonas skatina *MT3/CR2* receptoriaus raišką granulocituose ir, veikdamas per *MT3/CR2* receptorių, silpnina granulocitų sukibimo savybes, tokiu būdu mažindamas jų migraciją.

Disertacijos darbe buvo taikytas pastovaus apšvietimo metodas modelinėje pelių sistemoje. Taip siekta atkurti pamaininio darbo sąlygas ir ištirti galimą melatonino trūkumo poveikį žmonių, dirbančių pamaininį darbą, imuninei sistemai. Gauti rezultatai rodo, kad laikant peles pastovaus apšvietimo sąlygomis, sutrinka jų imuninės sistemos homeostazė: antikūnų gamyba, leukocitų, granulocitų migravimas. Dirbant pamaininį darbą reikėtų atkreipti dėmesį į jo poveikį imuninei sistemai ir įvertinti galimus sveikatos sutrikimus.

5. IŠVADOS

1. Melatoninas moduliuoja nuo T ląstelių priklausomą antikūnų produkciją per blužnies ląstelių MT2 receptorių. Kai melatonino sintezė yra sutrikusi - IgM, IgG2a, IgG2b ir IgG3 izotipų antikūnų kiekis padidėja, o IgG1 izotipo antikūnų kiekis sumažėja.
2. Melatoninas slopina nuo T ląstelių nepriklausomą antikūnų produkciją. Kai melatonino sintezė yra sutrikusi, padidėja visų izotipų (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b ir IgG3) antikūnų kiekiai.
3. Pagaminti monokloniniai antikūnai prieš pelių MT1 ir MT2 receptorių. Naudojant šiuos monokloninius antikūnus, blužnies B limfocituose nustatyta MT2 melatonino receptoriaus raiška.
4. Melatoninas slopina leukocitų migravimą į uždegimo vietą, veikdamas per MT2 receptorių.
5. Melatoninas slopina fMLP indukuotą granulocitų migravimą, veikdamas per MT2 ir *MT3/CR2* receptorių.

6. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Lerner A, Case J, Takahashi Y et al. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society* 1958; 80: 2587.
2. Wurtman RJ, Axelrod J, Phillips LS. Melatonin synthesis in the pineal gland: control by light. *Science* 1963; 142: 1071-1073.
3. Jaworek J, Nawrot-Porabka K, Leja-Szpak A et al. Melatonin as modulator of pancreatic enzyme secretion and pancreatoprotector. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58 Suppl 6: 65-80.
4. Masana MI, Doolen S, Ersahin C et al. MT(2) melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 1295-1302.
5. Schaeffer HJ, Sirotkin AV. Melatonin and serotonin directly regulate oxytocin, insulin-like growth factor-I and progesterone secretion by cultured human granulosa cells. *Adv Exp Med Biol* 1995; 395: 547-548.
6. Lang U, Aubert ML, Conne BS et al. Influence of exogenous melatonin on melatonin secretion and the neuroendocrine reproductive axis of intact male rats during sexual maturation. *Endocrinology* 1983; 112: 1578-1584.
7. Wu YH, Swaab DF. The human pineal gland and melatonin in aging and Alzheimer's disease. *J Pineal Res* 2005; 38: 145-152.
8. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Alvarez-Sanchez N et al. Melatonin: buffering the immune system. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 8638-8683.
9. Gorry KC, Quay WB. Effects of pinealectomy and of sham-pinealectomy on blood glucose levels in the alloxan-diabetic rat. *Horm Metab Res* 1978; 10: 389-392.
10. Straif K, Baan R, Grosse Y et al. Carcinogenicity of shift-work, painting, and fire-fighting. *Lancet Oncol* 2007; 8: 1065-1066.
11. Wang XS, Armstrong ME, Cairns BJ et al. Shift work and chronic disease: the epidemiological evidence. *Occup Med (Lond)* 2011; 61: 78-89.
12. Tian YM, Zhang GY, Dai YR. Melatonin rejuvenates degenerated thymus and redresses peripheral immune functions in aged mice. *Immunol Lett* 2003; 88: 101-104.
13. 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.
14. Rai S, Haldar C. Pineal control of immune status and hematological changes in blood and bone marrow of male squirrels (*Funambulus pennanti*) during their reproductively active phase. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2003; 136: 319-328.
15. Kim YO, Pyo MY, Kim JH. Influence of melatonin on immunotoxicity of lead. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22: 821-832.

16. Brainard GC, Watson-Whitmeyer M, Knobler RL, Lublin FD. Neuroendocrine regulation of immune parameters. Photoperiod control of the spleen in Syrian hamsters. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 540: 704-706.
17. Jankovic BD, Knezevic Z, Kojic L, Nikolic V. Pineal gland and immune system. Immune functions in the chick embryo pinealectomized at 96 hours of incubation. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 719: 398-409.
18. Moore CB, Siopes TD, Steele CT, Underwood H. Pineal melatonin secretion, but not ocular melatonin secretion, is sufficient to maintain normal immune responses in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Gen Comp Endocrinol* 2002; 126: 352-358.
19. Lerner AB. My 60 years in pigmentation. *Pigment Cell Res* 1999; 12: 131-144.
20. McCord C, Allen F. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. 1917; 23: 207-224.
21. Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res* 2010; 181: 127-151.
22. Axelrod J, Weissbach H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science* 1960; 131: 1312.
23. Axelrod J, Wurtman RJ, Snyder SH. Control of hydroxyindole o-methyltransferase activity in the rat pineal gland by environmental lighting *J Biol Chem* 1965; 240: 949-954.
24. Das Gupta TK, Terz J. Influence of pineal gland on the growth and spread of melanoma in the hamster. *Cancer Res* 1967; 27: 1306-1311.
25. Barchas J. Studies on the relation of melatonin to sleep. *Proc West Pharmacol Soc* 1968; 11: 22.
26. Rosengarten H, Meller E, Friedhoff AJ. In vitro enzymatic formation of melatonin by human erythrocytes. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1972; 4: 457-465.
27. Redman J, Armstrong S, Ng KT. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* 1983; 219: 1089-1091.
28. Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J Neuroimmunol* 1986; 13: 19-30.
29. Tan DX, Chen LD, Chen B, Poeggeler et al. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J.* 1993; 1: 57-60.
30. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 1994; 13: 1177-1185.
31. Reppert SM, Godson C, Mahle CD et al. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 8734-8738.

32. Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N et al. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 1994; 269: 28531-28534.
33. Molinari EJ, North PC, Dubocovich ML. 2-[125I]iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML2 binding sites. *Eur J Pharmacol* 1996; 301: 159-168.
34. 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: 31311-31317.
35. Paulis L, Simko F. Blood pressure modulation and cardiovascular protection by melatonin: potential mechanisms behind. *Physiol Res* 2007; 56: 671-684.
36. Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol Rep* 2009; 61: 383-410.
37. Iuvone PM, Tosini G, Pozdeyev N et al. Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog Retin Eye Res* 2005; 24: 433-456.
38. Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA et al. Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 1998; 279: 1358-1360.
39. 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: 564-572.
40. Rosiak J, Zawilska JB. [14-3-3 proteins--a role in the regulation of melatonin biosynthesis]. *Postepy Biochem* 2006; 52: 35-41.
41. 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: 741-749.
42. 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: 8083-8088.
43. Borjigin J, Zhang LS, Calinescu AA. Circadian regulation of pineal gland rhythmicity. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 349: 13-19.
44. Abraitis R, Gibas P, Gronow G et al. *Žmogaus fiziologija*. Kaunas: KMU 2004.
45. Korf HW. Evolution of melatonin-producing pinealocytes. *Adv Exp Med Biol* 1999; 460: 17-29.
46. Skene DJ, Timbers SE, Middleton B et al. Mice convert melatonin to 6-sulphatoxymelatonin. *Gen Comp Endocrinol* 2006; 147: 371-376.
47. 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: 261-267.

48. Tan DX, Manchester LC, Hardeland R et al. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res* 2003; 34: 75-78.
49. Cardinali DP, Rosner JM. Metabolism of serotonin by the rat retina in vitro. *J Neurochem* 1971; 18: 1769-1770.
50. Raikhlin NT, Kvetnoy IM. Melatonin and enterochromaffine cells. *Acta Histochem* 1976; 55: 19-24.
51. Slominski A, Fischer TW, Zmijewski MA et al. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. *Endocrine* 2005; 27: 137-148.
52. Djeridane Y, Vivien-Roels B, Simonneaux V et al. Evidence for melatonin synthesis in rodent Harderian gland: a dynamic in vitro study. *J Pineal Res* 1998; 25: 54-64.
53. Biesalski HK, Welker HA, Thalmann R, Vollrath L. Melatonin and other serotonin derivatives in the guinea pig membranous cochlea. *Neurosci Lett* 1988; 91: 41-46.
54. Itoh MT, Ishizuka B, Kudo Y et al. Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activities in rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 136: 7-13.
55. Tijmes M, Pedraza R, Valladares L. Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. *Steroids* 1996; 61: 65-68.
56. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Fernandez-Santos JM et al. Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 992-1000.
57. Maldonado MD, Mora-Santos M, Naji L et al. Evidence of melatonin synthesis and release by mast cells. Possible modulatory role on inflammation. *Pharmacol Res* 2010; 62: 282-287.
58. Lardone PJ, Carrillo-Vico A, Naranjo MC et al. Melatonin synthesized by Jurkat human leukemic T cell line is implicated in IL-2 production. *J Cell Physiol* 2006; 206: 273-279.
59. Conti A, Conconi S, Hertens E et al. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res* 2000; 28: 193-202.
60. Naranjo MC, Guerrero JM, Rubio A et al. Melatonin biosynthesis in the thymus of humans and rats. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 781-790.
61. Kvetnoy IM. Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *Histochem J* 1999; 31: 1-12.
62. Bubenik GA. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 2336-2348.
63. Slominski A, Tobin DJ, Zmijewski MA et al. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19: 17-24.
64. 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: 201-204.

65. Garidou ML, Vivien-Roels B, Pevet P et al. Mechanisms regulating the marked seasonal variation in melatonin synthesis in the European hamster pineal gland. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284: R1043-1052.
66. Wehr TA. The durations of human melatonin secretion and sleep respond to changes in daylength (photoperiod). *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 1276-1280.
67. 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: 759-772.
68. Zhao ZY, Xie Y, Fu YR et al. Aging and the circadian rhythm of melatonin: a cross-sectional study of Chinese subjects 30-110 yr of age. *Chronobiol Int* 2002; 19: 1171-1182.
69. Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP et al. Melatonin, immune function and aging. *Immun Ageing* 2005; 2: 17.
70. Luboshitzky R, Ophir U, Nave R et al. The effect of pyridoxine administration on melatonin secretion in normal men. *Neuro Endocrinol Lett* 2002; 23: 213-217.
71. Peuhkuri K, Sihvola N, Korpela R. Dietary factors and fluctuating levels of melatonin. *Food Nutr Res* 2012; 56.
72. S. Rojdmarm, Wetterberg. L. Short-term fasting inhibits the nocturnal melatonin secretion in healthy man. *Clin Endocrinol* 1989; 30: 451-457.
73. Lewy AJ, Wehr TA, Goodwin FK et al. Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science* 1980; 210: 1267-1269.
74. Lockley SW, Skene DJ, Thapan K et al. Extraocular light exposure does not suppress plasma melatonin in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3369-3372.
75. Smith MR, Eastman CI. Shift work: health, performance and safety problems, traditional countermeasures, and innovative management strategies to reduce circadian misalignment. *Nat Sci Sleep* 2012; 4: 111-132.
76. Kamdar BB, Tergas AI, Mateen FJ et al. Night-shift work and risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 138: 291-301.
77. Sigurdardottir LG, Valdimarsdottir UA, Fall K et al. Circadian disruption, sleep loss, and prostate cancer risk: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; 21: 1002-1011.
78. Viswanathan AN, Hankinson SE, Schernhammer ES. Night shift work and the risk of endometrial cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 10618-10622.
79. Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE et al. Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 825-828.
80. Lahti TA, Partonen T, Kyronen P et al. Night-time work predisposes to non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 2008; 123: 2148-2151.
81. Knutsson A, Akerstedt T, Jonsson BG, Orth-Gomer K. Increased risk of ischaemic heart disease in shift workers. *Lancet* 1986; 2: 89-92.

82. Haupt CM, Alte D, Dorr M et al. The relation of exposure to shift work with atherosclerosis and myocardial infarction in a general population. *Atherosclerosis* 2008; 201: 205-211.
83. Brown DL, Feskanich D, Sanchez BN et al. Rotating night shift work and the risk of ischemic stroke. *Am J Epidemiol* 2009; 169: 1370-1377.
84. Hermansson J, Gillander Gadin K, Karlsson B et al. Ischemic stroke and shift work. *Scand J Work Environ Health* 2007; 33: 435-439.
85. Hardeland R, Poeggeler B. Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res* 2003; 34: 233-241.
86. Iriti M, Varoni EM, Vitalini S. Melatonin in traditional Mediterranean diets. *J Pineal Res* 2010; 49: 101-105.
87. Stehle JH, Saade A, Rawashdeh O et al. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *J Pineal Res* 2011; 51: 17-43.
88. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol* 2004; 25: 177-195.
89. Aoyama H, Mori W, Mori N. Anti-glucocorticoid effects of melatonin in young rats. *Acta Pathol Jpn* 1986; 36: 423-428.
90. Lima FB, Machado UF, Bartol I et al. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *Am J Physiol* 1998; 275: E934-941.
91. Boden G, Ruiz J, Urbain JL, Chen X. Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. *Am J Physiol* 1996; 271: E246-252.
92. Balik A, Kretschmannova K, Mazna P et al. Melatonin action in neonatal gonadotrophs. *Physiol Res* 2004; 53 Suppl 1: S153-166.
93. Kawashima K, Miwa Y, Fujimoto K et al. Antihypertensive action of melatonin in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens A* 1987; 9: 1121-1131.
94. Lusardi P, Preti P, Savino S et al. Effect of bedtime melatonin ingestion on blood pressure of normotensive subjects. *Blood Press Monit* 1997; 2: 99-103.
95. Paulis L, Pechanova O, Zicha J et al. Melatonin interactions with blood pressure and vascular function during L-NAME-induced hypertension. *J Pineal Res* 2010; 48: 102-108.
96. Alonso-Vale MI, Andreotti S, Peres SB et al. Melatonin enhances leptin expression by rat adipocytes in the presence of insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E805-812.
97. Chuffa LG, Seiva FR, Favaro WJ et al. Melatonin reduces LH, 17 beta-estradiol and induces differential regulation of sex steroid receptors in reproductive tissues during rat ovulation. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9: 108.
98. Wiechmann AF, Sherry DM. Role of melatonin and its receptors in the vertebrate retina. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013; 300: 211-242.

99. Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N et al. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 351: 152-166.
100. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* 2004; 84: 1155-1228.
101. Slominski A, Wortsman J, Plonka PM et al. Hair follicle pigmentation. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 13-21.
102. Fischer TW, Zbytek B, Sayre RM et al. Melatonin increases survival of HaCaT keratinocytes by suppressing UV-induced apoptosis. *J Pineal Res* 2006; 40: 18-26.
103. Slominski A, Pisarchik A, Zbytek B et al. Functional activity of serotonergic and melatonergic systems expressed in the skin. *J Cell Physiol* 2003; 196: 144-153.
104. Ibraheem M, Galbraith H, Scaife J, Ewen S. Growth of secondary hair follicles of the Cashmere goat in vitro and their response to prolactin and melatonin. *J Anat* 1994; 185 (Pt 1): 135-142.
105. Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V et al. Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol* 2011; 93: 350-384.
106. 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: 460-463.
107. Peyrot F, Houee-Levin C, Ducrocq C. Melatonin nitrosation promoted by NO²; comparison with the peroxynitrite reaction. *Free Radic Res* 2006; 40: 910-920.
108. Dong WG, Mei Q, Yu JP et al. Effects of melatonin on the expression of iNOS and COX-2 in rat models of colitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1307-1311.
109. 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: 272-279.
110. Antolin I, Rodriguez C, Sainz RM et al. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* 1996; 10: 882-890.
111. 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: 181-197.
112. Sjoblom M, Safsten B, Flemstrom G. Melatonin-induced calcium signaling in clusters of human and rat duodenal enterocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G1034-1044.
113. Quastel MR, Rahamimoff R. Effect of melatonin on spontaneous contractions and response to 5-hydroxytryptamine of rat isolated duodenum. *Br J Pharmacol Chemother* 1965; 24: 455-461.

114. Bubenik GA. Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59 Suppl 2: 33-51.
115. Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem* 1999; 274: 22041-22047.
116. Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V et al. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. *J Pineal Res* 2003; 34: 81-87.
117. Quiroz Y, Ferrebuz A, Romero F et al. Melatonin ameliorates oxidative stress, inflammation, proteinuria, and progression of renal damage in rats with renal mass reduction. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294: F336-344.
118. Drew JE, Williams LM, Hannah LT et al. Melatonin receptors in the human fetal kidney: 2-[125I]iodomelatonin binding sites correlated with expression of Mel1a and Mel1b receptor genes. *J Endocrinol* 1998; 156: 261-267.
119. Nachtigal MC, Patterson RE, Stratton KL et al. Dietary supplements and weight control in a middle-age population. *J Altern Complement Med* 2005; 11: 909-915.
120. Eck-Enriquez K, Kiefer TL, Spriggs LL, Hill SM. Pathways through which a regimen of melatonin and retinoic acid induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 61: 229-239.
121. Dong C, Yuan L, Dai J et al. Melatonin inhibits mitogenic cross-talk between retinoic acid-related orphan receptor alpha (RORalpha) and ERalpha in MCF-7 human breast cancer cells. *Steroids* 2010; 75: 944-951.
122. Czczuga-Semeniuk E, Wolczynski S, Anchim T et al. Effect of melatonin and all-trans retinoic acid on the proliferation and induction of the apoptotic pathway in the culture of human breast cancer cell line MCF-7. *Pol J Pathol* 2002; 53: 59-65.
123. Lissoni P, Rovelli F, Frassinetti A et al. Oncostatic activity of pineal neuroendocrine treatment with the pineal indoles melatonin and 5-methoxytryptamine in untreatable metastatic cancer patients progressing on melatonin alone. *Neuro Endocrinol Lett* 2000; 21: 319-323.
124. Tam CW, Chan KW, Liu VW et al. Melatonin as a negative mitogenic hormonal regulator of human prostate epithelial cell growth: potential mechanisms and clinical significance. *J Pineal Res* 2008; 45: 403-412.
125. Di Bella G, Mascia F, Gualano L, Di Bella L. Melatonin anticancer effects: review. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 2410-2430.
126. Molis TM, Spriggs LL, Hill SM. Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 1681-1690.
127. Cos S, Fernandez R, Guezmes A, Sanchez-Barcelo EJ. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58: 4383-4390.
128. Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 79: C153-158.

129. Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomed Pharmacother* 2006; 60: 97-108.
130. Benitez-King G, Anton-Tay F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 1993; 49: 635-641.
131. Mildažienė V, Jarmalaitė S, Daugelavičius R. *Laštelės biologija*. Kaunas: VDU leidykla.2004.
132. Brydon L, Roka F, Petit L et al. Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 2025-2038.
133. Ho MK, Yung LY, Chan JS et al. G α (14) links a variety of G(i)- and G(s)-coupled receptors to the stimulation of phospholipase C. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 1431-1440.
134. Chan AS, Lai FP, Lo RK et al. Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal* 2002; 14: 249-257.
135. Barrett P, Conway S, Morgan PJ. Digging deep--structure-function relationships in the melatonin receptor family. *J Pineal Res* 2003; 35: 221-230.
136. Dubocovich ML, Delagrangé P, Krause DN et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev* 2010; 62: 343-380.
137. Witt-Enderby PA, Masana MI, Dubocovich ML. Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mt1 melatonin receptor. *Endocrinology* 1998; 139: 3064-3071.
138. Brydon L, Petit L, de Coppet P et al. Polymorphism and signalling of melatonin receptors. *Reprod Nutr Dev* 1999; 39: 315-324.
139. Radio NM, Doctor JS, Witt-Enderby PA. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. *J Pineal Res* 2006; 40: 332-342.
140. Petit L, Lacroix I, de Coppet P et al. Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem Pharmacol* 1999; 58: 633-639.
141. McArthur AJ, Hunt AE, Gillette MU. Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology* 1997; 138: 627-634.
142. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005; 27: 101-110.
143. Yadav SK, Haldar C, Singh SS. Variation in melatonin receptors (Mel(1a) and Mel(1b)) and androgen receptor (AR) expression in the spleen of a seasonally breeding bird, *Perdicula asiatica*. *J Reprod Immunol* 92: 54-61.

144. Carrillo-Vico A, Garcia-Perganeda A, Naji L et al. Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 2272-2278.
145. Ahmad R, Gupta S, Haldar C. Age dependent expression of melatonin membrane receptor (MT1, MT2) and its role in regulation of nitrosative stress in tropical rodent *Funambulus pennanti*. *Free Radic Res* 2012; 46: 194-203.
146. Ahmad R, Haldar C. Photoperiodic regulation of MT1 and MT2 melatonin receptor expression in spleen and thymus of a tropical rodent *Funambulus pennanti* during reproductively active and inactive phases. *Chronobiol Int* 2010; 27: 446-462.
147. Wronka M, Maleszewska M, Stepinska U, Markowska M. Diurnal differences in melatonin effect on intracellular Ca²⁺ concentration in chicken spleen leukocytes in vitro. *J Pineal Res* 2008; 44: 134-140.
148. Pozo D, Delgado M, Fernandez-Santos JM et al. Expression of the Mel1a-melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen. *Faseb J* 1997; 11: 466-473.
149. Pozo D, Garcia-Maurino S, Guerrero JM, Calvo JR. mRNA expression of nuclear receptor RZR/RORalpha, melatonin membrane receptor MT, and hydroxindole-O-methyltransferase in different populations of human immune cells. *J Pineal Res* 2004; 37: 48-54.
150. 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: 178-184.
151. Sanchez-Hidalgo M, Guerrero Montavez JM, Carrascosa-Salmoral Mdel P et al. Decreased MT1 and MT2 melatonin receptor expression in extrapineal tissues of the rat during physiological aging. *J Pineal Res* 2009; 46: 29-35.
152. Lotufo CM, Lopes C, Dubocovich ML et al. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol* 2001; 430: 351-357.
153. Lardone PJ, Rubio A, Cerrillo I et al. Blocking of melatonin synthesis and MT(1) receptor impairs the activation of Jurkat T cells. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67: 3163-3172.
154. Ahmad R, Haldar C, Gupta S. Melatonin Membrane Receptor Type MT1 Modulates Cell-Mediated Immunity in the Seasonally Breeding Tropical Rodent *Funambulus pennanti*. *Neuroimmunomodulation* 19: 50-59.
155. Dubocovich ML. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16: 50-56.
156. Mailliet F, Ferry G, Vella F et al. Organs from mice deleted for NRH:quinone oxidoreductase 2 are deprived of the melatonin binding site MT3. *FEBS Lett* 2004; 578: 116-120.

157. Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F et al. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem Pharmacol* 2001; 61: 1369-1379.
158. Long DJ, 2nd, Iskander K, Gaikwad A et al. Disruption of dihydronicotinamide riboside:quinone oxidoreductase 2 (NQO2) leads to myeloid hyperplasia of bone marrow and decreased sensitivity to menadione toxicity. *J Biol Chem* 2002; 277: 46131-46139.
159. Ferry G, Hecht S, Berger S et al. Old and new inhibitors of quinone reductase 2. *Chem Biol Interact* 2010; 186: 103-109.
160. Mailliet F, Ferry G, Vella F et al. Characterization of the melatonergic MT3 binding site on the NRH:quinone oxidoreductase 2 enzyme. *Biochem Pharmacol* 2005; 71: 74-88.
161. Bookout AL, Jeong Y, Downes M et al. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 2006; 126: 789-799.
162. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995; 83: 835-839.
163. Escriva H, Bertrand S, Laudet V. The evolution of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem* 2004; 40: 11-26.
164. Alaynick WA. Nuclear receptors, mitochondria and lipid metabolism. *Mitochondrion* 2008; 8: 329-337.
165. Smirnov AN. Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry (Mosc)* 2001; 66: 19-26.
166. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240: 889-895.
167. Jetten AM. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal* 2009; 7: e003.
168. Garcia-Maurino S, Pozo D, Calvo JR, Guerrero JM. Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *J Pineal Res* 2000; 29: 129-137.
169. Steinhilber D, Brungs M, Werz O et al. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 7037-7040.
170. Naji L, Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Calvo JR. Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. *Life Sci* 2004; 74: 2227-2236.
171. Delerive P, Monte D, Dubois G et al. The orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO Rep* 2001; 2: 42-48.

172. Dzhagalov I, Giguere V, He YW. Lymphocyte development and function in the absence of retinoic acid-related orphan receptor alpha. *J Immunol* 2004; 173: 2952-2959.
173. Ford-Hutchinson AW, Gresser M, Young RN. 5-Lipoxygenase. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 383-417.
174. Choi EY, Jin JY, Lee JY et al. Melatonin inhibits Prevotella intermedia lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and interleukin-6 in murine macrophages by suppressing NF-kappaB and STAT1 activity. *J Pineal Res* 2011; 50: 197-206.
175. Lardone PJ, Guerrero JM, Fernandez-Santos JM et al. Melatonin synthesized by T lymphocytes as a ligand of the retinoic acid-related orphan receptor. *J Pineal Res* 2011; 51: 454-462.
176. Carrillo-Vico A, Garcia-Maurino S, Calvo JR, Guerrero JM. Melatonin counteracts the inhibitory effect of PGE2 on IL-2 production in human lymphocytes via its mt1 membrane receptor. *Faseb J* 2003; 17: 755-757.
177. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 2008; 28: 29-39.
178. He YW, Deftos ML, Ojala EW, Bevan MJ. RORgamma t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells. *Immunity* 1998; 9: 797-806.
179. Guo J, Hawwari A, Li H et al. Regulation of the TCRalpha repertoire by the survival window of CD4(+)CD8(+) thymocytes. *Nat Immunol* 2002; 3: 469-476.
180. Kurebayashi S, Ueda E, Sakaue M et al. Retinoid-related orphan receptor gamma (RORgamma) is essential for lymphoid organogenesis and controls apoptosis during thymopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 10132-10137.
181. Sun Z, Unutmaz D, Zou YR et al. Requirement for RORgamma in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science* 2000; 288: 2369-2373.
182. Mebius RE, Rennert P, Weissman IL. Developing lymph nodes collect CD4+CD3- LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity* 1997; 7: 493-504.
183. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; 126: 1121-1133.
184. Withyachumnarnkul B, Nonaka KO, Santana C et al. Interferon-gamma modulates melatonin production in rat pineal glands in organ culture. *J Interferon Res* 1990; 10: 403-411.
185. Zylinska K, Komorowski J, Robak T et al. Effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and granulocyte colony stimulating factor on melatonin secretion in rats in vivo and in vitro studies. *J Neuroimmunol* 1995; 56: 187-190.

186. Fernandes PA, Cecon E, Markus RP, Ferreira ZS. Effect of TNF-alpha on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a 'feedback' of the immune response on circadian timing. *J Pineal Res* 2006; 41: 344-350.
187. Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MM, Markus RP. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J Pineal Res* 2006; 41: 136-141.
188. Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MM, Markus RP. Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-alpha increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *J Pineal Res* 2007; 43: 365-371.
189. Currier NL, Sun LZ, Miller SC. Exogenous melatonin: quantitative enhancement in vivo of cells mediating non-specific immunity. *J Neuroimmunol* 2000; 104: 101-108.
190. Arias J, Melean E, Valero N et al. [Effect of melatonin on lymphocyte proliferation and production of interleukin-2 (IL-2) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in mice splenocytes]. *Invest Clin* 2003; 44: 41-50.
191. Kaur C, Ling EA. Effects of melatonin on macrophages/microglia in postnatal rat brain. *J Pineal Res* 1999; 26: 158-168.
192. Rai S, Halder C, Singh R. Modulation of immunity in young-adult and aged squirrel, *Funambulus pennanti* by melatonin and p-chlorophenylalanine. *Immun Ageing* 2009; 6: 5.
193. Vaughan MK, Hubbard GB, Champney TH et al. Splenic hypertrophy and extramedullary hematopoiesis induced in male Syrian hamsters by short photoperiod or melatonin injections and reversed by melatonin pellets or pinealectomy. *Am J Anat* 1987; 179: 131-136.
194. Baeza I, Alvarado C, Alvarez P et al. Improvement of leucocyte functions in ovariectomised aged rats after treatment with growth hormone, melatonin, oestrogens or phyto-oestrogens. *J Reprod Immunol* 2009; 80: 70-79.
195. Inserra P, Zhang Z, Ardestani SK et al. Modulation of cytokine production by dehydroepiandrosterone (DHEA) plus melatonin (MLT) supplementation of old mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 218: 76-82.
196. Wichmann MW, Zellweger R, DeMaso et al. Melatonin administration attenuates depressed immune functions trauma-hemorrhage. *J Surg Res* 1996; 63: 256-262.
197. Vaughan MK, Reiter RJ. Transient hypertrophy of the ventral prostate and coagulating glands and accelerated thymic involution following pinealectomy in the mouse. *Tex Rep Biol Med* 1971; 29: 579-586.
198. McKinney TD, Vaughan MK, Reiter RJ. Pineal influence on intermale aggression in adult house mice. *Physiol Behav* 1975; 15: 213-216.

199. Cunnane SC, Horrobin DF, Manku MS, Oka M. Alteration of tissue zinc distribution and biochemical analysis of serum following pinealectomy in the rat. *Endocr Res Commun* 1979; 6: 311-319.
200. Beskonakli E, Palaoglu S, Aksaray S et al. Effect of pinealectomy on immune parameters in rats with *Staphylococcus aureus* infection. *Neurosurg Rev* 2001; 24: 26-30.
201. 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.
202. Csaba G, Barath P. Morphological changes of thymus and the thyroid gland after postnatal extirpation of pineal body. *Endocrinol Exp* 1975; 9: 59-67.
203. Susko I, Mornjakovic Z. [Effect of pinealectomy on mastocyte count in the thymus of rats]. *Med Arh* 2003; 57: 7-8.
204. del Gobbo V, Libri V, Villani N et al. Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. *Int J Immunopharmacol* 1989; 11: 567-573.
205. Libri V, Del Gobbo V, Villani N et al. Influence of pineal gland lesion on interleukin-2 production and natural killer activity in C57BL/6 mice. *Pharmacol Res* 1990; 22 Suppl 3: 52.
206. Vermeulen M, Palermo M, Giordano M. Neonatal pinealectomy impairs murine antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Neuroimmunol* 1993; 43: 97-101.
207. Rosolowska-Huszcz D, Thaela MJ, Jagura M et al. Pineal influence on the diurnal rhythm of nonspecific immunity indices in chickens. *J Pineal Res* 1991; 10: 190-195.
208. Molinero P, Soutto M, Benot S et al. Melatonin is responsible for the nocturnal increase observed in serum and thymus of thymosin alpha1 and thymulin concentrations: observations in rats and humans. *J Neuroimmunol* 2000; 103: 180-188.
209. Liebmann PM, Hofer D, Felsner P et al. Beta-blockade enhances adrenergic immunosuppression in rats via inhibition of melatonin release. *J Neuroimmunol* 1996; 67: 137-142.
210. Hriscu M, Saulea G, Ostriceanu S, Baciuc I. Circadian phagocytic activity in rats under light-dark and constant light regimens. *Rom J Physiol* 2002; 39-40: 17-26.
211. Izzo G, d'Istria M, Serino I, Minucci S. Inhibition of the increased 17beta-estradiol-induced mast cell number by melatonin in the testis of the frog *Rana esculenta*, in vivo and in vitro. *J Exp Biol* 2004; 207: 437-441.
212. Cikler E, Ercan F, Cetinel S et al. The protective effects of melatonin against water avoidance stress-induced mast cell degranulation in dermis. *Acta Histochem* 2005; 106: 467-475.

213. Cetinel S, Ercan F, Cikler E et al. Protective effect of melatonin on water avoidance stress induced degeneration of the bladder. *J Urol* 2005; 173: 267-270.
214. Kim YO, Ahn YK, Kim JH. Influence of melatonin on immunotoxicity of cadmium. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22: 275-284.
215. Giordano M, Palermo MS. Melatonin-induced enhancement of antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Pineal Res* 1991; 10: 117-121.
216. Giordano M, Vermeulen M, Palermo MS. Seasonal variations in antibody-dependent cellular cytotoxicity regulation by melatonin. *Faseb J* 1993; 7: 1052-1054.
217. Lissoni P, Barni S, Ardizzoia A et al. Immunological effects of a single evening subcutaneous injection of low-dose interleukin-2 in association with the pineal hormone melatonin in advanced cancer patients. *J Biol Regul Homeost Agents* 1992; 6: 132-136.
218. Lewinski A, Zelazowski P, Sewerynek E et al. Melatonin-induced suppression of human lymphocyte natural killer activity in vitro. *J Pineal Res* 1989; 7: 153-164.
219. Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR et al. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol* 1997; 159: 574-581.
220. Espino J, Bejarano I, Redondo PC et al. Melatonin reduces apoptosis induced by calcium signaling in human leukocytes: Evidence for the involvement of mitochondria and Bax activation. *J Membr Biol* 2010; 233: 105-118.
221. Espino J, Bejarano I, Paredes SD et al. Protective effect of melatonin against human leukocyte apoptosis induced by intracellular calcium overload: relation with its antioxidant actions. *J Pineal Res* 2011; 51: 195-206.
222. Hriscu ML. Modulatory factors of circadian phagocytic activity. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1057: 403-430.
223. Terron Mdel P, Paredes SD, Barriga C et al. Oral administration of melatonin to old ring doves (*Streptopelia risoria*) increases plasma levels of melatonin and heterophil phagocytic activity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005; 60: 44-50.
224. Rodriguez AB, Ortega E, Lea RW, Barriga C. Melatonin and the phagocytic process of heterophils from the ring dove (*Streptopelia risoria*). *Mol Cell Biochem* 1997; 168: 185-190.
225. Rodriguez AB, Terron MP, Duran J et al. Physiological concentrations of melatonin and corticosterone affect phagocytosis and oxidative metabolism of ring dove heterophils. *J Pineal Res* 2001; 31: 31-38.
226. Boulanger V, Zhao X, Lacasse P. Protective effect of melatonin and catalase in bovine neutrophil-induced model of mammary cell damage. *J Dairy Sci* 2002; 85: 562-569.
227. Pieri C, Recchioni R, Moroni F et al. Melatonin regulates the respiratory burst of human neutrophils and their depolarization. *J Pineal Res* 1998; 24: 43-49.

228. Calvo JR, Reiter RJ, Garcia JJ et al. Characterization of the protective effects of melatonin and related indoles against alpha-naphthylisothiocyanate-induced liver injury in rats. *J Cell Biochem* 2001; 80: 461-470.
229. Wu JY, Tsou MY, Chen TH et al. Therapeutic effects of melatonin on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. *J Pineal Res* 2008; 45: 106-116.
230. Genovese T, Di Paola R, Mazzon E et al. Melatonin limits lung injury in bleomycin treated mice. *J Pineal Res* 2005; 39: 105-112.
231. Genovese T, Mazzon E, Muia C et al. Attenuation in the evolution of experimental spinal cord trauma by treatment with melatonin. *J Pineal Res* 2005; 38: 198-208.
232. Serin M, Gulbas H, Gurses I et al. The histopathological evaluation of the effectiveness of melatonin as a protectant against acute lung injury induced by radiation therapy in a rat model. *Int J Radiat Biol* 2007; 83: 187-193.
233. Pena C, Rincon J, Pedreanez A et al. Chemotactic effect of melatonin on leukocytes. *J Pineal Res* 2007; 43: 263-269.
234. Recchioni R, Marcheselli F, Moroni F et al. Melatonin increases the intensity of respiratory burst and prevents L-selectin shedding in human neutrophils in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252: 20-24.
235. Lotufo CM, Yamashita CE, Farsky SH, Markus RP. Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4. *Eur J Pharmacol* 2006; 534: 258-263.
236. Silva SO, Rodrigues MR, Ximenes VF et al. Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release. *J Neuroimmunol* 2004; 156: 146-152.
237. Marcola M, da Silveira Cruz-Machado S, Fernandes PA et al. Endothelial cell adhesiveness is a function of environmental lighting and melatonin level. *J Pineal Res* 2013; 54: 162-169.
238. Tamura EK, Fernandes PA, Marcola M et al. Long-lasting priming of endothelial cells by plasma melatonin levels. *PLoS One* 2010; 5: e13958.
239. Luchetti F, Canonico B, Curci R et al. Melatonin prevents apoptosis induced by UV-B treatment in U937 cell line. *J Pineal Res* 2006; 40: 158-167.
240. Morrey KM, McLachlan JA, Serkin CD, Bakouche O. Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J Immunol* 1994; 153: 2671-2680.
241. Romero MP, Osuna C, Garcia-Perganeda A et al. The pineal secretory product melatonin reduces hydrogen peroxide-induced DNA damage in U-937 cells. *J Pineal Res* 1999; 26: 227-235.
242. Radogna F, Paternoster L, De Nicola M et al. Rapid and transient stimulation of intracellular reactive oxygen species by melatonin in normal and tumor leukocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 239: 37-45.

243. Bagchi M, Balmoori J, Ye X et al. Protective effect of melatonin on naphthalene-induced oxidative stress and DNA damage in cultured macrophage J774A.1 cells. *Mol Cell Biochem* 2001; 221: 49-55.
244. 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: 246-254.
245. Gilad E, Wong HR, Zingarelli B et al. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation. *Faseb J* 1998; 12: 685-693.
246. Mayo JC, Sainz RM, Tan DX et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol* 2005; 165: 139-149.
247. Fjaerli O, Lund T, Osterud B. The effect of melatonin on cellular activation processes in human blood. *J Pineal Res* 1999; 26: 50-55.
248. Lissoni P, Barni S, Tancini G et al. Role of the pineal gland in the control of macrophage functions and its possible implication in cancer: a study of interactions between tumor necrosis factor-alpha and the pineal hormone melatonin. *J Biol Regul Homeost Agents* 1994; 8: 126-129.
249. Shin S, Hur GH, Kim YB et al. Dehydroepiandrosterone and melatonin prevent *Bacillus anthracis* lethal toxin-induced TNF production in macrophages. *Cell Biol Toxicol* 2000; 16: 165-174.
250. Xia MZ, Liang YL, Wang H et al. Melatonin modulates TLR4-mediated inflammatory genes through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *J Pineal Res* 2012; 53: 325-334.
251. Huang SH, Cao XJ, Wei W. Melatonin decreases TLR3-mediated inflammatory factor expression via inhibition of NF-kappa B activation in respiratory syncytial virus-infected RAW264.7 macrophages. *J Pineal Res* 2008; 45: 93-100.
252. Garcia-Maurino S, Pozo D, Carrillo-Vico A et al. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci* 1999; 65: 2143-2150.
253. Lissoni P, Pittalis S, Rovelli F et al. Modulation of cytokine production from TH2-lymphocytes and monocytes by the pineal neurohormone melatonin. *Oncol Rep* 1996; 3: 541-543.
254. Pioli C, Caroleo MC, Nistico G, Doria G. Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation. *Int J Immunopharmacol* 1993; 15: 463-468.
255. Raghavendra V, Singh V, Shaji AV et al. Melatonin provides signal 3 to unprimed CD4(+) T cells but failed to stimulate LPS primed B cells. *Clin Exp Immunol* 2001; 124: 414-422.

256. Lissoni P, Ardizzoia A, Tisi E et al. Amplification of eosinophilia by melatonin during the immunotherapy of cancer with interleukin-2. *J Biol Regul Homeost Agents* 1993; 7: 34-36.
257. Dair EL, Simoes RS, Simoes MJ et al. Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. *Fertil Steril* 2008; 89: 1299-1305.
258. Adomaitienė D, Janulevičiūtė N, Kazakevičius R, Vaičiuvėnas V. *Klinikinės imunologijos įvadas*. Kaunas: Šviesa 2001.
259. Miyake K, Akahoshi M, Nakashima H. Th subset balance in lupus nephritis. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 980286.
260. Peterson RA. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol* 2012; 40: 186-204.
261. 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: 537-539.
262. Vigore L, Messina G, Brivio F et al. Psychoneuroendocrine modulation of regulatory T lymphocyte system: in vivo and in vitro effects of the pineal immunomodulating hormone melatonin. *In Vivo* 2010; 24: 787-789.
263. Liu H, Xu L, Wei JE et al. Role of CD4+ CD25+ regulatory T cells in melatonin-mediated inhibition of murine gastric cancer cell growth in vivo and in vitro. *Anat Rec (Hoboken)* 2011; 294: 781-788.
264. Kuhlwein E, Irwin M. Melatonin modulation of lymphocyte proliferation and Th1/Th2 cytokine expression. *J Neuroimmunol* 2001; 117: 51-57.
265. Maestroni GJ. T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *J Pineal Res* 1995; 18: 84-89.
266. 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.
267. 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: 181-185.
268. Majewska M, Zajac K, Zemelka M, Szczepanik M. Influence of melatonin and its precursor L-tryptophan on Th1 dependent contact hypersensitivity. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58 Suppl 6: 125-132.
269. Kim TH, Jung JA, Kim GD et al. Melatonin inhibits the development of 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *J Pineal Res* 2009; 47: 324-329.
270. Colombo LL, Chen GJ, Lopez MC, Watson RR. Melatonin induced increase in gamma-interferon production by murine splenocytes. *Immunol Lett* 1992; 33: 123-126.

271. Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR et al. 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.
272. Santello FH, Frare EO, dos Santos CD et al. Suppressive action of melatonin on the TH-2 immune response in rats infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Pineal Res* 2008; 45: 291-296.
273. Wu CC, Lu KC, Lin GJ et al. Melatonin enhances endogenous heme oxygenase-1 and represses immune responses to ameliorate experimental murine membranous nephropathy. *J Pineal Res* 2012; 52: 460-469.
274. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
275. Kohler G, Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol* 1976; 6: 511-519.
276. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-497.
277. 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.
278. Kracker S, Radbruch A. Immunoglobulin class switching: in vitro induction and analysis. *Methods Mol Biol* 2004; 271: 149-159.
279. Stevens TL, Bossie A, Sanders VM et al. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 1988; 334: 255-258.
280. 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: 1717-1724.
281. Dzhagalov I, Zhang N, He YW. The roles of orphan nuclear receptors in the development and function of the immune system. *Cell Mol Immunol* 2004; 1: 401-407.
282. Markus RP, Ferreira ZS, Fernandes PA, Cecon E. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation* 2007; 14: 126-133.
283. Hayashi M, Shimba S, Tezuka M. Characterization of the molecular clock in mouse peritoneal macrophages. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 621-626.
284. Peters W, Dupuis M, Charo IF. A mechanism for the impaired IFN-gamma production in C-C chemokine receptor 2 (CCR2) knockout mice: role of CCR2 in linking the innate and adaptive immune responses. *J Immunol* 2000; 165: 7072-7077.
285. Matheson M, Rynell AC, McClean M, Berend N. Cigarette smoking increases neutrophil formyl methionyl leucyl phenylalanine receptor numbers. *Chest* 2003; 123: 1642-1646.

286. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Costantino G, Caputi AP. Protective effect of melatonin in a non-septic shock model induced by zymosan in the rat. *J Pineal Res* 1998; 25: 24-33.
287. Hua S. Targeting sites of inflammation: intercellular adhesion molecule-1 as a target for novel inflammatory therapies. *Front Pharmacol* 2013; 4: 127.
288. Hu X, Wohler JE, Dugger KJ, Barnum SR. beta2-integrins in demyelinating disease: not adhering to the paradigm. *J Leukoc Biol* 2010; 87: 397-403.
289. Chen HM, Hsu JT, Chen JC et al. Delayed neutrophil apoptosis attenuated by melatonin in human acute pancreatitis. *Pancreas* 2005; 31: 360-364.
290. Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity: II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism. *Clin Exp Immunol* 1987; 68: 384-391.
291. Vivien-Roels B, Malan A, Rettori MC et al. Daily variations in pineal melatonin concentrations in inbred and outbred mice. *J Biol Rhythms* 1998; 13: 403-409.
292. Regodon S, Ramos A, Morgado S et al. Melatonin enhances the immune response to vaccination against A1 and C strains of *Dichelobacter nodosus*. *Vaccine* 2009; 27: 1566-1570.
293. Regodon S, Ramos A, Miguez MP et al. Vaccination prepartum enhances the beneficial effects of melatonin on the immune response and reduces platelet responsiveness in sheep. *BMC Vet Res* 2012; 8: 84.
294. Dimitrov S, Benedict C, Heutling D et al. Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets. *Blood* 2009; 113: 5134-5143.
295. Cermakian N, Lange T, Golombek D et al. Crosstalk between the circadian clock circuitry and the immune system. *Chronobiol Int* 2013; 30: 870-888.
296. Ackermann K, Revell VL, Lao O et al. Diurnal rhythms in blood cell populations and the effect of acute sleep deprivation in healthy young men. *Sleep* 2012; 35: 933-940.
297. Mazzoccoli G, Vendemiale G, La Viola M et al. Circadian variations of cortisol, melatonin and lymphocyte subpopulations in geriatric age. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010; 23: 289-296.
298. Born J, Lange T, Hansen K et al. Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *J Immunol* 1997; 158: 4454-4464.
299. Kawate T, Abo T, Hinuma S, Kumagai K. Studies of the bioperiodicity of the immune response. II. Co-variations of murine T and B cells and a role of corticosteroid. *J Immunol* 1981; 126: 1364-1367.
300. Pelegri C, Vilaplana J, Castellote C et al. Circadian rhythms in surface molecules of rat blood lymphocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: C67-76.
301. Oishi K, Ohkura N, Kadota K et al. Clock mutation affects circadian regulation of circulating blood cells. *J Circadian Rhythms* 2006; 4: 13.

7. PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA

SĄRAŠAS

7.1 Straipsniai

1. V. Černyšiov, N. Gerasimcik, M. Mauricas, I. Girkontaite. Regulation of T-cell-independent and T-cell-dependent antibody production by circadian rhythm and melatonin. *International Immunology*, 2010, 22(1): 25-34.
2. V. Černyšiov, M. Mauricas, I. Girkontaitė. Leukocyte infiltration in lymphoid organs and peritoneal cavity upon immunization: dependence on circadian rhythmicity and melatonin 24-h profile. *European Journal of Inflammation*, 2011, 9(3): 219-229.
3. V. Černyšiov, R. Bozaitė, M. Mauricas, I. Girkontaitė. The expression of MTNR3 and nuclear receptors in murine leucocytes. *In Vivo*, 2014, 09-10; 28(5): 827-830.
4. V. Černyšiov, R. Bozaitė, M. Mauricas, I. Girkontaitė. Influence of circadian time and lighting conditions on expression of melatonin receptors MT1 and MT2 in murine lymphocytes. *In Vivo*, 2014, 09-10; 28(5): 831-835.
5. V. Černyšiov, M. Mauricas, I. Girkontaitė. Melatonino fiziologinė reikšmė organizmui. *Sveikatos mokslai*, 2014, 3(94): 5-10.
6. V. Černyšiov, M. Mauricas, I. Girkontaitė. Melatonino poveikis imuninei sistemai. *Žurnalas - Lietuvos endokrinologija*. Įteiktas žurnalo redakcijai, yra recenzuotas ir priimtas spausdinimui.

7.2 Tezės

ISI Web of Science ir ISI proceedings:

1. V. Černyšiov, M. Mauricas, I. Girkontaitė. Regulation of T-cell-independent and T-cell-dependent antibody production by circadian rhythm and melatonin. *European journal of immunology*. 2009, vol. 39, issue S1: abstracts from the 2nd European Congress of Immunology.
2. V. Černyšiov, R. Bozaitė, M. Mauricas, I. Girkontaitė. Expression of melatonin receptors in the cells of immune system. *Immunology*, 2012, 137 Special Issue: Abstracts of the European Congress of Immunology, 5-8 September 2012, Glasgow, Scotland): 296.

Straipsnis recenzuojamoje Lietuvos konferencijos medžiagoje:

1. R. Bozaitė, V. Černyšiov. Melatonino receptorių raiška imuninės sistemos ląstelėse ir organuose. Septintoji mokslinė konferencija „Mokslas Gamtos mokslų fakultete“. Konferencijos pranešimų rinkinys, 2012: 173-174.

Tezės kituose recenzuojamuose leidiniuose:

1. V. Černyšiov, M. Mauricas, I. Girkontaitė. Melatonino vaidmuo reguliuojant neutrofilų migravimą. The 5-th conference of Lithuanian neuroscience association: program and abstract, 2013: 23.
2. V. Černyšiov, M. Mauricas, I. Girkontaitė. Melatonin regulates the migration of granulocytes into mouse peritoneal cavity via MT2 receptor. *Frontiers Immunology journal*. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI), 2013: 398

Konferencijų tezės nerecenzuotuose leidiniuose:

1. V. Černyšiov. Melatonino poveikis humoraliniam imunitetui. Vilniaus Universiteto Gamtos Mokslų Fakulteto Mokslinių darbų konkursas. Konferencijos tezių rinkinys, 2008: 8.
2. V. Černyšiov, M. Mauricas, I. Girkontaitė. The role of melatonin and circadian time on the migration of leukocytes into peritoneal cavity upon immunization. 10th international conference of Lithuanian chemists „Chemistry 2011“. Konferencijos pranešimų rinkinys, 2011: 39.
3. V. Černyšiov, M. Mauricas, I. Girkontaitė. Melatonino įtaka antikūnų susidarymui ir ląstelių migravimui. Lietuvos mokslų akademijos jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“. Pranešimo santrauka, 2011: 8.
4. V. Černyšiov, M. Mauricas, I. Girkontaitė. Melatonino įtaka antikūnų susidarymui ir ląstelių migravimui. Lietuvos mokslų akademijos jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“. Konferencijos tezių rinkinys, 2011: 8.
5. V. Černyšiov, M. Mauricas, I. Girkontaitė. Melatonino receptorių raiška limfocituose. Penktoji nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“. Konferencijos tezių rinkinys, 2012: 32-33.
6. V. Černyšiov. Pamaininis darbas, cirkadinių ritmų sutrikimas ir krūties vėžio rizika. Ketvirtoji Lietuvos neuromokslų asociacijos konferencija. Konferencijos tezių rinkinys, 2012: 8
7. V. Černyšiov, M. Mauricas, I. Girkontaitė. Melatonino receptorių raiška limfocituose. Penktoji nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“. Konferencijos tezių rinkinys, 2012: 32-33.

8. V. Černyšiov, R. Bozaitė, M. Mauricas, I. Girkontaitė. Melatonino receptorių, esančių pelių imuninės sistemos ląstelėse, raiškos priklausomybė nuo melatonino koncentracijos ir stimuliavimo. Lietuvos mokslų akademijos jaunųjų mokslininkų konferencija “Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos” Konferencijos tezių rinkinys, 2012: 8.
9. V. Černyšiov, M. Mauricas, I. Girkontaitė. Melatonino vaidmuo reguliuojant neutrofilų migravimą. Lietuvos mokslų akademijos jaunųjų mokslininkų konferencija “Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos”. Konferencijos tezių rinkinys, 2013: 9
10. V. Černyšiov, M. Mauricas, I. Girkontaitė. The immunoregulatory action of melatonin. Tarptautinė Gamtos ir Gyvybės mokslų konferencija „COINS 2014“. Konferencijos tezių rinkinys, 2014: 68-69.
11. V. Černyšiov, M. Mauricas, I. Girkontaitė. Melatonino svarba reguliuojant neutrofilų migravimą. Šeštoji nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“. Konferencijos tezių rinkinys, 2013: 51-53.
12. V. Černyšiov, M. Mauricas, I. Girkontaitė. Melatonino receptorių iRNR transkriptų raiška iš BALB/c linijos pelių kaulų čiulpų diferencijuotuose makrofaguose ir dendritinėse ląstelėse esant ir nesant LPS (*lipopolisacharido*) stimuliacijai. Septintoji nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“. Konferencijos tezių rinkinys, 2014: 11-12.

8. KONFERENCIJOS, SEMINARAI

8.1. Konferencijos

Disertacijos tema rezultatai buvo pristatyti 15-oje konferencijų, iš kurių šešios tarptautinės.

Tarptautinės konferencijos:

1. The second European congress of immunology, Berlin, Germany, 13-16 September, 2009. Stendinis pranešimas: „Regulation of T-cell-independent and T-cell-dependent antibody production by circadian rhythm and melatonin“.
2. The third European congress of immunology, Glasgow, Scotland, 5-8 September, 2012. Stendinis pranešimas: „Expression of melatonin receptors in the cells of immune system“.

3. The tenth international conference of Lithuanian chemists, Vilnius, 14-15 October, 2011. Stendinis pranešimas: „The role of melatonin and circadian time on the migration of leukocytes into peritoneal cavity upon immunization“.
4. The fifth international congress of immunology, Milan, Italy, 22-27 August, 2013. Stendinis pranešimas: „Melatonin regulates the migration of granulocytes into mouse peritoneal cavity via MT2 receptor“.
5. The fifth conference of Lithuanian neuroscience association, Vilnius, Lithuania, 6-7 December, 2013. Stendinis pranešimas: „The role of melatonin in the inflammatory process“.
6. The ninth International Conference of Natural and Life sciences „COINS 2014“, Vilnius, Lithuania, 3-8 March, 2014. Stendinis pranešimas: „The immunoregulatory action of melatonin“.

Konferencijose ir moksliniuose konkursuose, kuriuose buvo pristatyti disertacijos darbo rezultatai, suteikti apdovanojimai:

1. 2008 m. VU Gamtos mokslų fakultetas. „Studentų mokslinių darbų konkursas“. Žodinis pranešimas „Melatonino poveikis humoraliniam imunitetui“ apdovanotas pirma vieta.
2. 2009-2010 m. Lietuvos mokslų akademijos rengiamas „Lietuvos studentų mokslinių darbų konkursas“. Darbas „Cirkadiniai ritmai ir melatoninas reguliuoja nuo T ląstelių priklausomą ir nuo T ląstelių nepriklausomą antikūnų produkciją“ apdovanotas pirma vieta.
3. 2011 m. Ketvirtoji nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“. Žodinis pranešimas „Melatonino vaidmuo pelių humoraliniam imunitetui“ apdovanotas specialiu įmonės „Thermo Fisher Scientific“ prizū.
4. 2012 m. Penktoji nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“. Pranešimas „Melatonino receptorių raiška limfocituose“ apdovanotas

specialiu įmonės „Thermo Fisher Scientific“ prizų, taip pat pranešimų sekcijoje „Pulmonologija ir alergologija“ apdovanotas pirma vieta.

5. 2013 m. Lietuvos mokslų akademija. Jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“. Žodinis pranešimas „Melatonino vaidmuo reguliuojant neutrofilų migravimą“ apdovanotas pirma vieta.

6. 2014 m. Septintoji nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“. Žodinis pranešimas „Melatonino receptorių iRNR transkriptų raiška iš BALB/c linijos pelių kaulų čiulpų diferencijuotuose makrofaguose ir dendritinėse ląstelėse esant ir nesant LPS (*lipopolisacharido*) stimuliacijai“ apdovanotas specialiu įmonės „Thermo Fisher Scientific“ prizų, taip pat pranešimų sekcijoje „Bio- ir nanotechnologijos“ apdovanotas antra vieta.

8.2. Seminarai

1. 2011 m. birželio mėnesį Lietuvos Jaunųjų mokslininkų sąjungos susitikime skaitytas pranešimas „Melatoninas – biologinis reguliatorius“.

2. 2011 m. lapkričio mėnesį VU Onkologijos institute skaitytas pranešimas „Pamaininio darbo žala, melatoninas ir jo priešvėžinės savybės“.

Gyvenimo aprašymas

Vardas, pavardė: Vitalij Černyšiov

Gimimo data: 1981-01-18

El. pašto adresas: vitalij.cernysiov@gmail.com

Išsilavinimas:

2004-2008 Vilniaus Universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, molekulinės biologijos specialybė, bakalauro laipsnis.

2008-2010 Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, mikrobiologo specialybė, biologijos magistras. Suteiktas magistro diplomą „Magna Cum Laude“.

Nuo 2010 metų Vilniaus Universiteto, Gamtos mokslo fakulteto, Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros doktorantas.

Darbinė veikla:

2013.12. – Vilniaus Universiteto Ligoninės, Santariškių klinika, Hematologijos, onkologijos ir tranfuziologijos centras – medicinos biologas.

2011.04. – Valstybinis mokslinių tyrimų institutas, Inovatyvios medicinos centras, Imunologijos skyrius – jaunesnysis mokslo darbuotojas.

2008.02-2011.04. – Vilniaus Universitetas, Imunologijos Institutas, Imunotechnologijos laboratorija - inžinierius-mikrobiologas.

2007.08-10. – „Lietuvos mokslo praktika“ projekto dalyvis. Praktika atlikta Vilniaus Universiteto Imunologijos institute. Darbo pavadinimas „Antikūnų gryninimas ir panaudojimas imunologiniuose metoduose“.

2006.08-10. – „Lietuvos mokslo praktika“ projekto dalyvis. Vilniaus Universiteto Imunologijos institute. Darbo pavadinimas „Hibridomų auginimo bei antikūnų produkcija“.

Mokslinės stažuotės:

2012.05.01 – 2012.07.31. Mokslinė stažuotė Ispanijoje, Sevilijoje, Virgen del Rocío universiteto ligoninėje, prof. Carrilo-Vico laboratorijoje.

9. PADĖKA

Norėčiau padėkoti visiems, kurie prisidėjo prie šio darbo atsiradimo. Ypač norėčiau padėkoti:

- darbo vadovei dr. Irutei Girkontaitei už idėjas, pastabas ir vertingus patarimus;
- darbo konsultantei prof. habil. dr. Lilijai Kalėdienei už nuolatinį rūpestį ir vertingus patarimus;
- dr. Natalijai German už paramą, supratimą ir nuolatinį pozityvų skatinimą;
- dr. M. Mauricui už suteiktas galimybes, vertingus patarimus ir padrąšinimus;
- dr. Raimondai Kvietkauskaitei, Eugenijui Šimoliūnui, Mildai Naciūtei ir Danutei Davidonienei už pagalbą sunkiais momentais;
- Kolegei Rūtai Bozaitei už pagalbą atliekant eksperimentus;

Ir didžiausia padėka mano Šeimai – už tikėjimą manimi, kantrybę ir paskatinimą. Be Jų šis darbas būtų neįmanomas.

Finansinė parama

- Lietuvos mokslo ir studijų fondo remiamas projektas „Melatonino įtaka imuninio atsako vystymuisi“. Sutarties Nr. T–50/09.
- Lietuvos mokslo tarybos remiamas projektas. „Farmakologiškai aktyvios medžiagos – melatonino imuno-modulatoriniai tyrimai“. Sutarties Nr. MIP-42/2010.
- Lietuvos mokslo tarybos stipendija (2011-2014).
- Nacionalinės kompleksinės programos doktorantūros finansavimas.