

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Biologie



**Leona Hrubcová**

Vliv melatoninu na imunitní systém  
The effect of melatonin on the immune system

Bakalářská práce

Školitel:

Mgr. Simona Moravcová

Praha, 2019

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 5. 2019

Leona Hrubcová

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Simoně Moravcové za cenné rady, opravy práce a trpělivost. Zároveň bych ráda poděkovala rodině a přátelům za podporu během psaní práce.

## **Abstrakt**

Melatonin je důležitý hormon mající velice rozmanité funkce. Původně byl nalezen jako produkt epifyzy s 24 hodinovým rytmem syntézy, ale v pozdějších studiích začalo být zřejmé, že k jeho syntéze dochází také v mnoha dalších tkáních. Melatonin je důležitou součástí cirkadiálního systému a jeho účinky na rytmus spánku jsou také dobře známé. V této práci jsou účinky melatoninu na cirkadiální systém stručně popsány v úvodních kapitolách.

Dále je v této práci popsán základní mechanismus zánětu a rozmanité interakce melatoninu s imunitním systémem. Melatonin vykazuje jak protizánětlivé tak prozánětlivé účinky, a proto je součástí mnoha výzkumů věnujících se například léčbě nemocí asociovaných s chronickými záněty. V práci jsou uvedeny studie týkající se účinků melatoninu na patologické stavy, jako jsou neurodegenerativní onemocnění, revmatoidní artritida a sepse.

Tato práce zároveň popisuje, jak změny v aktivitě imunitního systému mohou ovlivňovat expresi melatoninu, jelikož je známo, že se nejedná o jednosměrné působení. Tato interakce však v současné době není zatím příliš známá.

*Klíčová slova:* melatonin, cirkadiální systém, imunitní systém, zánět

## **Abstract**

Melatonin is an important hormone which is known to have very diverse functions. It was originally discovered as a product of the pineal gland synthesized in a 24 hour rhythm, but in later studies was found to be synthesized in many different tissue types. Melatonin is an important part of the circadian system and its effects on sleep rhythm are well known. The effects of melatonin on the circadian system are briefly covered in the opening chapters of this thesis.

Furthermore, the basic mechanism of inflammation and the diverse effects of melatonin on the immune system are described in this thesis. Melatonin acts in an anti-inflammatory as well as pro-inflammatory manner and is part of many research projects focusing on curing for example diseases associated with chronic inflammation. This thesis presents studies regarding the effects of melatonin on pathological conditions like neurodegenerative diseases, rheumatoid arthritis and sepsis.

This thesis also describes how changes in immune system activity can change the expression of melatonin, as it is not a one way effect. However, this interaction is not well known yet.

*Key words:* melatonin, circadian system, immune system, inflammation

## Seznam zkratek

- ASMT - N-acetylserotonin-O-methyltransferáza
- ATP - adenosintrifosfát
- cAMP - cyklický adenosinmonofosfát
- c3OHM - cyklický 3-hydroxymelatonin
- DAG - diacylglycerol
- DAMP - molekulární struktury asociované s poškozením
- ERK - extracelulární signálem regulované kinázy
- HIOMT - hydroxyindol-O-methyltransferáza
- IDO - indolamin 2,3- dioxygenáza
- IFN $\gamma$  - interferon  $\gamma$
- IL - interleukin
- IRF-3 - interferon regulační faktor 3
- LPS - lipopolysacharid
- MAPK - mitogenem aktivovaná proteinkináza
- MHC gp I - hlavní histokompatibilní komplex glykoprotein I. třídy
- NAT - N-acetyltransferáza
- nNOS - neuronální syntetáza oxidu dusnatého
- PAMP - molekulární struktury asociované s patogeny
- PKA - proteinkináza A
- PKC - proteinkináza C
- RHT - retinohypotalamický trakt
- RNS - reaktivní formy dusíku
- ROS - reaktivní formy kyslíku
- SCG - horní cervikální ganglia
- SCN - suprachiasmatické jádro
- TLR - toll-like receptor
- TNF $\alpha$  - tumor nekrotizující faktor  $\alpha$

# Obsah

1. Úvod .....	1
2. Melatonin .....	2
2.1 Syntéza melatoninu .....	2
2.2 Pineální melatonin.....	3
2.3 Extrapineální melatonin .....	5
2.4 Melatoninové receptory.....	6
2.5 Antioxidační vlastnosti melatoninu .....	7
3. Cirkadiánní systém .....	8
3.2 Rytmus exprese NAT a ASMT .....	9
4. Melatonin v kontextu cirkadiánního rytmu.....	9
4.1 Vliv ročního období na hladinu melatoninu .....	10
5. Imunitní systém .....	11
5.1 Zánět.....	11
5.2 Nespecifická imunitní odpověď.....	11
5.3 Specifická imunitní odpověď.....	12
5.4 Cytokiny .....	14
6. Vliv melatoninu na imunitní systém .....	15
6.1 Protizánětlivé účinky melatoninu .....	16
6.1.1 Protizánětlivý účinek v neurodegenerativních onemocněních .....	18
6.2 Prozánětlivé účinky melatoninu .....	19
6.2.1 Prozánětlivý účinek při revmatoidní artritidě .....	21
7. Vliv imunitního systému na regulaci syntézy melatoninu .....	22
8. Závěr .....	23
9. Seznam literatury .....	24

## 1. Úvod

Melatonin má mnoho různých funkcí a působí na mnoha místech v těle mnohobuněčných organismů, jeho syntéza však byla pozorována také u některých mikroorganismů. Je produkován především v epifýze, odkud se projevuje jako regulátor cirkadiálních hodin, avšak jeho exprese je pozorována také v sítnici a jiných orgánech. Melatonin také patří mezi silné antioxidanty a hraje významnou roli v regulaci imunitního systému (Wurtman et al., 1963; Hardeland, 2018).

Nejznámější rolí melatoninu je regulace spánku. V epifýze se začíná serotonin přeměňovat v melatonin ve chvíli, kdy z retiny do suprachiasmatických jader (SCN) přichází signál o absenci světla a SCN přestane blokovat sympatickými nervy produkci melatoninu v epifýze. Tak se melatonin stává pro tělo indikátorem denní doby nebo i ročního období v závislosti na délce dne.

V posledních několika desetiletích probíhají mnohé studie týkající se role melatoninu v imunitním systému. Melatonin vykazuje jak prozánětlivé, tak protizánětlivé účinky. Během zánětu má schopnost regulovat expresi cytokinů, a tak regulovat průběh imunitní reakce. Tato interakce je obousměrná, aktivita imunitního systému také ovlivňuje expresi melatoninu. Detaily tohoto působení nejsou zatím příliš známé.

Cílem této práce je shrnout jak nové, tak již dobře známé informace týkající se regulační role melatoninu v imunitním systému a poznatky ze studií zabývajících se výzkumem možností léčby melatoninem.

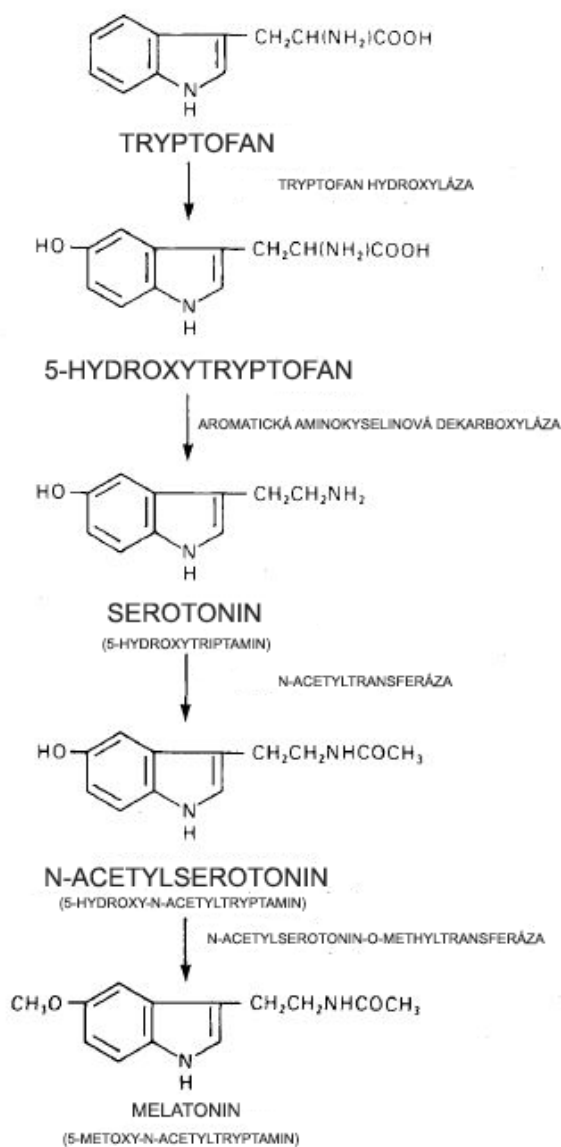
## 2. Melatonin

Melatonin, neboli 5-methoxy-N-acetyl-tryptamin, je malá, lipofilní molekula (Stankov a Reiter, 1990), která se řadí mezi indolaminové hormony. Na začátku 20. století byla studována schopnost extraktů připravených z epifýz zesvětlovat kůži pulců a žab působením na melanocyty. Roku 1958 byl z hovězích epifýz, ve snaze popsat látku s tímto zesvětlovacím účinkem, izolován melatonin a také pojmenován (Lerner et al., 1958).

### 2.1 Syntéza melatoninu

Syntéza melatoninu (obr. č. 1) začíná přeměnou tryptofanu enzymem nazývaným tryptofan hydroxyláza na 5-hydroxytryptofan. Jeho následnou dekarboxylací pomocí aromatické aminokyselinové dekarboxylázy vznikne serotonin, který je poté N-acetyltransferázou (NAT) acetylován na N-acetylserotonin (Weissbach et al., 1960). Reakce přeměny N-acetylserotoninu na melatonin je katalyzována enzymem N-acetylserotonin-O-methyltransferáza (ASMT), také známým pod označením hydroxyindol-O-methyltransferáza (HIOMT) (Sugden, 1989).



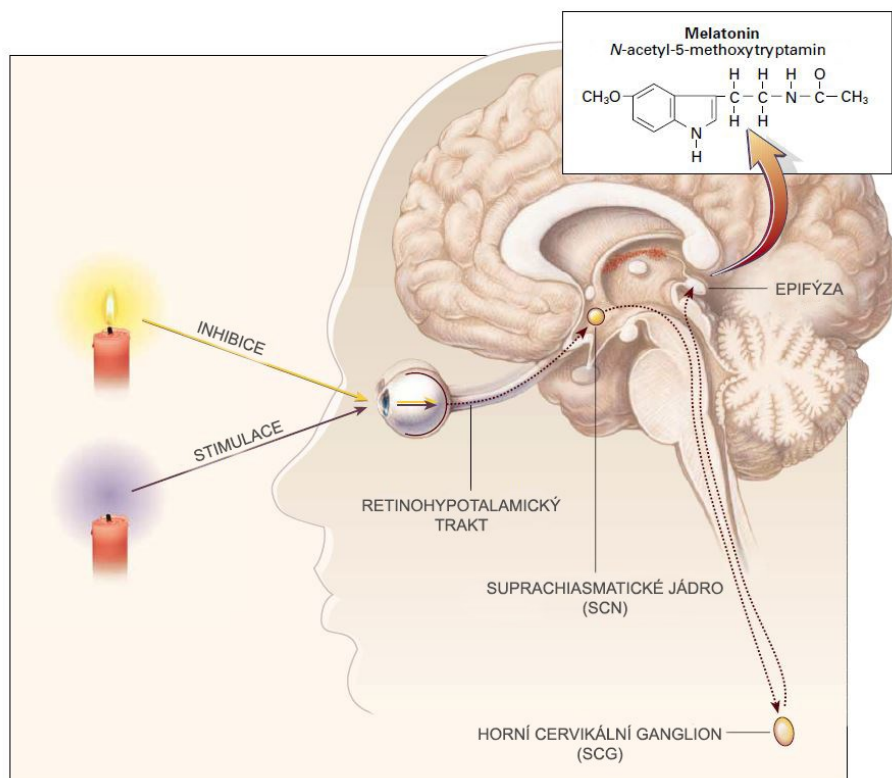


**Obr. č. 1:** Schéma syntézy melatoninu (popis obrázku viz kapitola 2.1). Převzato a upraveno ze Sugden, 1989.

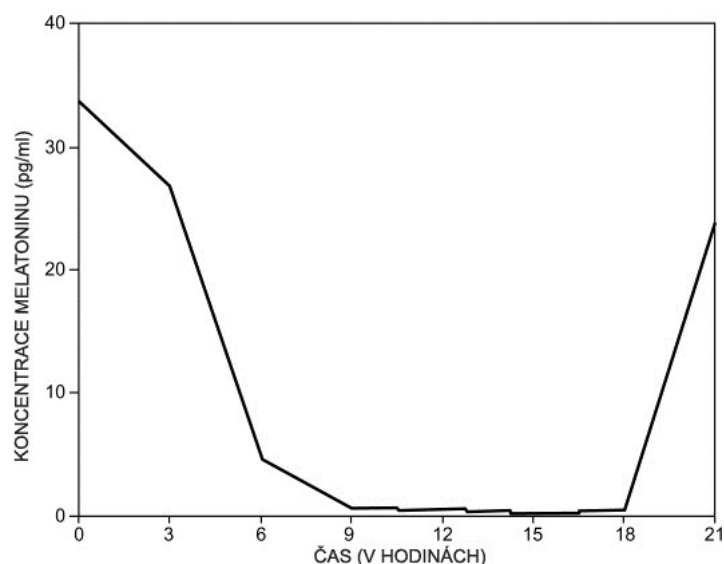
## 2.2 Pineální melatonin

Epifýza, endokrinní žláza produkující melatonin, také známá pod označením pineální žláza, se nachází v oddílu mezimozku zvaném epithalamus. Historicky je epifýza důležitý orgán v mnoha kulturách. Ve starověkém Egyptě byla považována za oko boha Hora a v hinduistické víře za třetí oko (Nichols, 2018). Epifýza ryb, obojživelníků, mihulí, plazů a ptáků je fotosensitivní, a několik druhů ji dokonce využívá jako fotorecepční orgán (Mano a Fukada, 2007). Buňky produkující melatonin se nazývají pinealocyty. Pineální melatonin je regulován přítomností a absencí světla ve vnějším prostředí (Wurtman et al., 1963). Ze sítnice

je vedena informace o světle prostřednictvím retinohypotalamického traktu (RHT). U RHT bylo dokázáno, že vede signál ze sítnice do několika částí mozku včetně laterálního i anteriorního hypotalamu a také SCN (Costa et al., 1999), která fungují jako oscilátor cirkadiálního rytmu. Signál je dále vedený z SCN přes sympatické neurony horního cervikálního ganglia (SCG), na které působí inhibičně (Nishino et al., 1976) (obr. č. 2). Za tmy dochází k aktivaci sympatických nervů a uvolnění noradrenalinu, hlavního neurotransmiteru podporujícího syntézu melatoninu v epifýze, na synapsích s pinealocyty. Noradrenalin se na postsynaptické membráně pinealocytů váže na  $\alpha_1$  a  $\beta_1$  adrenergní receptory, které další signalizací způsobují přeměnu adenosintrifosfátu (ATP) na cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) (Strada et al., 1972; McLeod a Cairncross, 1995). Ten aktivuje cAMP dependentní proteinkinázu A (PKA), která dále fosforyluje a aktivuje NAT. Na N-terminální konec fosforylované NAT může navázat dimer proteinu 14-3-3, který NAT chrání před proteasomální proteolýzou (Klein et al., 1983, Ganguly et al., 2001). Pineální melatonin je tedy během 24 hodin produkován rytmicky pod vlivem cirkadiálního systému (obr. č. 3). Po syntéze je melatonin uvolněn do krevního řečiště.



**Obr. č. 2:** Stimulace sítnice světlem, která vede k inhibici produkce melatoninu. Převzato a upraveno z Brzezinski, 1997.



**Obr. č. 3:** Znárodnění rytmičké produkce melatoninu závislé na denní době. Nejvyšší koncentrace je dosaženo kolem půlnoci a nejnižší kolem třetí hodiny odpolední. Převzato a upraveno podle Hikichi et al., 2011.

### 2.3 Extrapineální melatonin

Melatonin není syntetizován pouze v epifýze. Několik let po jeho izolaci z epifýzy se začaly nacházet důkazy jeho syntézy a výskytu také v jiných orgánech (Tab. č.1). V 70. letech 20. století byl nalezen v sítnici u potkana jeden z enzymů syntézy melatoninu, ASMT (Cardinali et al., 1971) a nedlouho poté byl objeven melatonin a N-acetylserotonin v potkaním, opičím a lidském mozečku (Bubenik et al., 1974). Dále byla potvrzena přítomnost enzymů NAT a ASMT v gastrointestinálním a reprodukčním traktu, míše, mozkové kůře a striatu (Stefulj et al., 2001). Melatonin je syntetizován také v buňkách imunitního systému, jak bude popsáno dále (viz kapitola 6). Je tedy patrné, že melatonin působí jako hormon s mnoha různými funkcemi v různých tkáních v těle. Výsledky některých studií ukazují, že melatonin syntetizovaný v sítnici a čočce také vykazuje cirkadiánní rytmus (Tosini et al., 1998, Abe et al., 2000). V jiných tkáních jako je například mozková kůra a játra melatonin vykazuje oscilaci během periody 24 hodin, ale tento rytmus není považován za cirkadiánní (Venegas et al., 2012).

**Tab. č. 1:** Extrapineální tkáně schopné syntézy melatoninu.

<b>Tkáň</b>	<b>Subjekt</b>	<b>Literární zdroje</b>
orální mukóza	potkan	Ortiz et al., 2015
slezina, thymus, kostní dřev	křeček zlatý	Vishwas a Haldar, 2014
cerebellum	potkan, makak, člověk	Bubenik et al., 1974
mozková kůra, striatum, gastrointestinální trakt	potkan	Stefulj et al., 2001
lymfocyty, monocyty	člověk	Carrillo-Vico et al., 2004
makrofág	potkan	Martins et al., 2004
kostní dřev	člověk, myš	Conti et al., 2000
choroidní plexus	potkan	Quintela et al., 2018
kůže	křeček zlatý	Slominski et al., 1996
vaječníky	člověk	Itoh et al., 1999
mitochondrie	myš	Suofu et al., 2017
játra, ledviny, srdce	potkan	Sanchez-Hidalgo et al., 2009
retina	potkan	Sahamoto a Ishida, 1998

## 2.4 Melatoninové receptory

Dosud bylo objeveno několik typů receptorů pro melatonin. MT1 a MT2 jsou vysokoafinitní transmembránové receptory spřažené s G-proteiny, jejichž primární struktura je z 60 % shodná (Reppert et al., 1994; Reppert et al., 1995). Hlavní cesta signalizace melatoninu přes oba tyto receptory vede k inhibici adenylátcyklázy, tím k poklesu tvorby cAMP a následně ke snížení aktivity cAMP dependentní PKA (Capsoni et al., 1994). Díky vysoké citlivosti PKA k nízkým koncentracím cAMP není tato kaskáda melatoninem plně inhibována (Hazlerigg et al., 1991). Snížení aktivity PKA vede k poklesu fosforylace určitých proteinů, například transkripčního faktoru CREB (McNulty et al., 1994).

I přes velkou strukturní podobnost se MT1 a MT2 receptory od sebe funkčně odlišují. MT1 receptory jsou schopny regulovat kanály pro draslíkové kationty,  $K_{ir3}$  a  $BK_{Ca}$ .  $K_{ir3}$  kanály jsou aktivovány  $\beta\gamma$  podjednotkou G-proteinů. Skrz  $K_{ir3}$  aktivované kanály se vylévá  $K^+$  z cytoplasmy a způsobuje hyperpolarizaci cytoplasmatické membrány neuronů. Melatonin je takto schopen inhibovat signalizační aktivitu neuronů SCN navázáním na MT1 receptory (Jiang et al., 1995). Druhý draslíkový kanál,  $BK_{Ca}$ , reguluje vasodilataci v artériích (Zhao et al., 2017). Studie ukazují, že MT1 má vasokonstrikční účinky a signalizace prostřednictvím

MT2 receptoru naopak vykazuje účinky vasodilatační (Masana et al., 2002). MT2 receptor je dále spřažen se signalizační kaskádou vedoucí přes diacylglycerol a proteinkinázu C (DAG/PKC) a dochází k regulaci mnoha procesů v závislosti na typu buněk (Hunt et al., 2001). MT1 a MT2 receptory mohou fungovat samostatně jako monomery, ale častěji tvoří heterodimery nebo homodimery, což je typické pro receptory spřažené s G-proteiny (Ayoub et al., 2002). Před popsáním obou vysokoafinitních receptorů byl nalezen jejich kompetitivní antagonist, luzindol, který je i dnes využíván při studiích melatoninu k blokaci těchto receptorů (Dubocovich, 1988).

V 80. letech minulého století byl nalezen, při studii na křečcích, třetí receptor pro melatonin, MT3 (Duncan et al., 1988). V pozdější studii na přelomu století bylo ale ukázáno, že nízkoafinitní receptor MT3 je křeččí homolog pro lidskou chinon reduktázu 2 (Nosjean et al., 2000). Je tedy nutné mít na vědomí afinitu melatoninu k tomuto enzymu, kontroverzním tématem však zůstává, jestli se jedná o melatoninový receptor či ne.

Díky své lipofilní povaze a malé velikosti je melatonin schopný proniknout do cytosolu přes cytoplasmatickou membránu a melatoninové receptory byly tedy nalezeny také v buněčném jádru. Například v buňkách sleziny morčete bylo 65,6 % vazebných míst pro melatonin nalezeno v jaderné části v relativním množství k počtu vazebných míst na mikrozomech, mitochondriích a v cytosolu (Poon a Pang, 1992). V další studii bylo popsáno, že tento jaderný receptor patří do skupiny ROR/RZR, které se jako monomery váží k lidské DNA, a vazba melatoninu způsobuje inhibici exprese 5-lipoxygenázy, která funguje jako klíčový enzym v syntéze prozánětlivých mediátorů leukotrienů v B lymfocytech (Steinhilber et al., 1995). Melatonin je navázáním na jaderné receptory například schopen zvyšovat produkci prozánětlivých cytokinů IL-2 a IL-6 v lidských lymfocytech a monocytech (García-Maurino et al., 2000). Zatímco membránové receptory melatoninu regulují cirkadiánní rytmy organismu, receptor z rodiny ROR/RZR má pravděpodobně větší funkci v regulaci imunitního systému. Výsledky novější studie však popisují, že melatonin a jeho metabolity nemají na receptory ROR $\alpha$  a ROR $\gamma$  účinek. Status melatoninu jako ligandu těchto receptorů zůstává tedy kontroverzním tématem (Slominski et al., 2014).

## **2.5 Antioxidační vlastnosti melatoninu**

Melatonin vykazuje výjimečné antioxidační vlastnosti přímou detoxifikací reaktivních forem kyslíku (ROS). ROS je produkován během aerobní respirace v mitochondriích a jeho hlavními producenty jsou komplexy I, II a III (Holzerová a Prokisch, 2015). Vysoké koncentrace ROS při patologických a zánětlivých stavech poškozují proteiny, DNA a lipidy, a

způsobují mitochondriální dysfunkce. Melatonin je schopen ROS přímo neutralizovat také pomocí svých metabolitů a ty tak tvoří antioxidační kaskádu melatoninu (Manchester et al., 2015). Cyklický 3-hydroxymelatonin (c3OHM) vzniká po interakci melatoninu s některými radikály, například hydroxylovým radikálem \*OH. Metabolit c3OHM má také antioxidační účinky, a to převážně k peroxylovému radikálu \*OOH (Galano et al., 2014). Metabolity vznikající po reakci c3OHM s radikály \*OOH nebo \*OH jsou N-acetyl-N-formyl-5-methoxykynuramin a N-acetyl-5-methoxykynuramin. Oba tyto metabolity vykazují antioxidační aktivitu (Tan et al., 2001; Ressmeyer et al., 2003). Studie na modelu akutní sepse u potkanů prezentovala výsledky, kde podání exogenního melatoninu způsobilo snížení oxidačního stresu a snížení dysfunkce orgánů a mitochondrií (Lowe et al., 2013). Další studie byla provedena u pacientů na jednotce intenzivní péče se sníženým krevním objemem a s vyšším rizikem poškození tkání oxidativním stresem. Přidání exogenního melatoninu k léčbě ulevilo pacientům od septického stavu a orgánové dysfunkce a zároveň zvýšilo antioxidační kapacitu krve pacientů (Mistraletti et al., 2017).

Antioxidační účinky melatoninu mohou být prospěšné také při ulevování od následků radiační terapie. Během radiační terapie vznikají volné radikály, které mohou poškozovat tkáň. Studie na potkanech ukázala, že podávání exogenního melatoninu před radiační terapií snížilo oxidativní stres v kostní tkáni a zabránilo degradaci kostní tkáně (Köse et al., 2016).

### **3. Cirkadiánní systém**

Cirkadiánní rytmus je oscilace fyziologických dějů v periodě, která se blíží 24 hodinám. Tento rytmus je endogenní a synchronizuje se fyzikálními faktory vnějšího prostředí, které se nazývají zeitgeber, tedy udavatelé času. Hlavním synchronizátorem cirkadiánního rytmu je světlo. Endogenní rytmus u lidí byl sledován ve studii z 60. let 20. století. Subjektům byla odepřena jakákoliv známka o denní době, denní světlo, či kontakt s vnějším světem. I přes omezení povědomí o čase byl u subjektů pozorován rytmus spánku a bdění blížící se 24 hodinám. Výsledky studie tedy potvrdily Aschoffovu hypotézu biologických hodin, které udávají rytmus organismu (Aschoff, 1965).

Hlavním oscilátorem cirkadiánního rytmu je SCN, jehož neurony řídí cirkadiánní rytmus změnou exprese hodinových genů. Rytmus je udáván zpětnovazebnou transkripčně-translační smyčkou, která dále určuje frekvenci pálení akčního potenciálu neuronem (Konopka a Benzer, 1971). Tato smyčka je tvořena proteiny CLOCK, BMAL1, CRY a PER.

CLOCK a BMAL1 tvoří v jádře heterodimer a působí jako transkripční faktor pro geny *Per* a *Cry*. Heterodimer CLOCK/BMAL1 se váže na E-box sekvenci v promotoru *Per* a *Cry* a iniciuje jejich transkripci. V cytoplasmě spolu proteiny PER a CRY tvoří heterodimery, které translokují zpět do jádra a inhibují zde aktivitu CLOCK a BMAL1 heterodimeru, a tedy i svou vlastní transkripci. PER a CRY nakonec degradují a uzavírají tak smyčku, která trvá zhruba 24 hodin (Gekakis et al., 1998).

Cirkadiální rytmus je schopen se synchronizovat s denním rytmem přes RHT, který neurologicky propojuje SCN se sítnicí (Costa et al., 1999). Díky tomu se projevují rytmy sekrece hormonů, chování, metabolismu a jiných fyziologických projevů v synchronizaci s denní dobou. SCN tyto signály přenáší dál ve formě akčních potenciálů, jejichž frekvence je větší přes den než v noci (Green a Gillette, 1982). Jiné tkáně jsou také schopny generování vlastních cirkadiálních rytmů, avšak tyto rytmy jsou stále synchronizovány s rytmy SCN (Yoo et al., 2004).

### **3.2 Rytmus exprese NAT a ASMT**

NAT je významný enzym podílející se na syntéze melatoninu, jehož aktivita vykazuje cirkadiální rytmus. V noci se aktivita NAT mnohonásobně zvyšuje a tím dochází k rytmické syntéze melatoninu. Ve stálé tmě nebo při slepotě je rytmus NAT zachován a při stálém světle je potlačen (Klein a Weller, 1970). Mechanismus rytmu exprese NAT byl popsán v kapitole 2.2.

U syntézy dalšího enzymu podílejícího se na produkci melatoninu, ASMT, byl také popsán cirkadiální rytmus produkce ASMT mRNA s nejvyšší koncentrací zaznamenanou v noci, avšak nevykazoval tak výrazné rozdíly mezi noční a denní koncentrací (Gauer a Craft, 1996). V novější studii se ukázalo, že ASMT je limitující enzym noční produkce melatoninu, jelikož NAT v noci produkuje velký nadbytek N-acetylserotoninu, který ASMT nedokáže všechen přeměnit na melatonin. Ve dne je ale limitujícím enzymem NAT, jelikož jeho produkce výrazně klesá a s ním i produkce N-acetylserotoninu (Liu a Borjigin, 2005).

## **4. Melatonin v kontextu cirkadiálního rytmu**

Zajímavým důkazem vlivu melatoninu na fyziologické změny v průběhu cyklu spánku-bdění je jeho efekt na změnu tělesné teploty. Teplota lidského těla se během spánku snižuje až o 0,5 °C v prostředí o teplotě v rozmezí 24,4-27,2 °C, při probuzení je tělesná teplota nejnižší (Day, 1941). U subjektů vystavených intenzivnímu světlu (>2500 lux) po

celou noc, inhibovalo světlo produkci melatoninu a zvyšovalo ranní tělesnou teplotu zhruba o 0,5 °C oproti subjektům spícím nebo spánkově deprivovaným při nízké intenzitě (<100 lux). Při podání exogenního melatoninu subjektům vystaveným stálému intenzivnímu světlu se ale ranní tělesná teplota opět přiblížila hodnotám pozorovaným u spánkově deprivovaných subjektů při nízké intenzitě (Strassman et al., 1991). Snížení tělesné teploty při vyšších koncentracích melatoninu je dáno jeho vasodilatačním působením v periferních částech těla, což má za následek ztrátu tělesného tepla (Van der Helm-van Mil et al., 2003).

Noční stimulace nízkou intenzitou světla v rozmezí 50-130 lux snižuje produkci melatoninu v epifýze o polovinu a stimulace světlem v rozmezí 90-180 lux podporuje bdělost u lidských subjektů (Cajochen et al., 2000). Sekrece melatoninu ovlivňuje také délku spánku. Vysoké hladiny melatoninu působící po delší dobu znamenají pro lidské tělo delší biologickou noc a tedy delší přirozenou dobu spánku. Opak platí pro lidi, kteří přirozeně spí kratší dobu (Aeschenbach et al., 2003).

Poruchy spánku jsou pozorovatelné u několika neurodegenerativních onemocnění. Například u Parkinsonovy choroby dochází ke ztrátě bdělosti a ostražitosti a je také pozorována špatná kvalita spánku v noci, což může zhoršovat symptomy nemoci. V jedné studii byly pacientům s Parkinsonovou chorobou podávány 3 mg melatoninu 1 hodinu před spánkem. Jejich subjektivní kvalita spánku se výrazně zlepšila, nebylo však dokázáno zlepšení poruchy motorických schopností a snížení ospalosti přes den (Medeiros et al., 2007). Zhoršená kvalita spánku je také pozorována u pacientů s Alzheimerovou chorobou, což také negativně ovlivňuje kognitivní funkci a míru aktivity pacienta přes den. Po podávání 2 mg melatoninu na noc po dobu 24 týdnů se objektivní kvalita spánku u pacientů s Alzheimerovou chorobou výrazně zlepšila. Kognice se u pacientů léčených melatoninem nezměnila oproti pacientům, kterým bylo podáváno placebo a jimž se kognice zhoršila (Wade et al., 2014).

#### **4.1 Vliv ročního období na hladinu melatoninu**

Hladina melatoninu je ovlivňována také ročním obdobím, jelikož reaguje na délku světlé části dne a ovlivňuje tím tedy i fyziologické změny živočichů během roku. Tyto změny se týkají nárůstu tělesného tuku, zvýšené spotřeby kyslíku a zvýšeného příjmu potravy při krátké fotoperiodě u Syrských křečků (Bartness et al., 1984). Kratší fotoperioda má také vliv na snížení reprodukční aktivity zvířat. Při poškození SCN zvířete není epifýza schopna vnímat délku fotoperiody a zvíře se vrací do svého reprodukčně aktivního stavu (Rusak a Morin, 1976). Regulace sezónních změn melatoninu je důležitou součástí přežívání zimních podmínek a vyvádění mláďat v ročním období, kdy mají největší pravděpodobnost přežití.



## 5. Imunitní systém

Funkcí imunitního systému je rozpoznávat a zničit škodlivé buňky, viry a cizí látky v těle organismu. Imunitní systém musí také zajistit, aby neškodil vlastním zdravým buňkám, a musí být tedy správně regulován, aby nedošlo ke vzniku autoreaktivních T lymfocytů, nebo chronickému zánětu, který vede k poškození vlastní tkáně živočicha. Imunitní systém se skládá ze skupin imunitních a podpůrných buněk a humorální složky zprostředkovávající imunitní odpověď. Tyto buňky jsou zařazeny do nespecifického a specifického imunitního systému. Nespecifický systém je aktivován při prvním styku s patogenem a aktivuje antigenně nespecifickou imunitní odpověď. Po stimulaci specifického imunitního systému antigeny z patogenu se aktivuje antigenně specifická imunitní odpověď, která je zprostředkována protilátkami a může docházet k tvorbě paměťových T a B lymfocytů (Santori, 2015).

### 5.1 Zánět

Patogen může být v těle zneškodněn mnoha způsoby, například enzymy v žaludku a slinách nebo kyselým pH žaludečních šťáv. Důležitým mechanismem zneškodnění patogenu je fyziologický zánět. Fyziologický zánět je odpověď na škodlivé podmínky nebo infekci. Je tělu prospěšný, pokud je správně řízený a působí proti patogenům, toxickým látkám nebo poškozeným buňkám vlastního těla. Při špatné regulaci se může stát tělu škodlivý a přejít například v septický šok, anafylaktický šok nebo chronický zánět. Důležitým mechanismem zánětu je po vyřešení patogenní situace vrátit tělo do homeostatického stavu. Pokud zánět trvá déle než šest týdnů, jedná se o chronický zánět, který může vzniknout z akutního zánětu nebo během autoimunitního onemocnění. Chronický zánět je nebezpečný, protože při něm dochází k dlouhodobému poškození tkání (Carlberg et al., 2016). Na chronickém i akutním zánětu se podílí nespecifická a specifická imunitní odpověď (Lo et al., 1999).

### 5.2 Nespecifická imunitní odpověď

Vrozená imunita funguje antigenně nespecificky a její aktivace je nutná k aktivaci antigenně specifické imunity. Na nespecifické imunitní odpovědi se podílí mnoho různých typů buněk. Jsou jimi například makrofágy diferencované z monocytů, které přešly z krve do tkáně. Makrofágy mají schopnost fagocytózy a pohlcují cizí substance, cizí buňky i vlastní mrtvé buňky (Ebert a Florey, 1939). Fagocytózy se také účastní neutrofilní granulocyty. Tyto buňky pracují na základě rozeznávání patogenně specifických membránových struktur PAMP

(podle anglického „pathogen-associated molecular patterns“) pomocí Toll-like receptorů (TLR). TLR byly nalezeny u obratlovců jako homology Toll receptorů identifikovaných u *Drosophily melanogaster* (Medzhitov et al., 1997). Tyto Toll receptory byly popsány jako transmembránové proteiny s extracelulárními doménami obsahujícími repetitivní sekvence bohaté na leucin (Hashimoto et al., 1988). Při kontaktu TLR s ligandem dochází k aktivaci transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B, které umožňují transkripci prozánětlivých cytokinů IL-1, IL-6 a IL-8. TLR aktivuje také transkripci proteinu CD80, který poté aktivuje T lymfocyty navázáním na jejich CD28 receptor (Medzhitov et al., 1997). NF- $\kappa$ B také zprostředkovává expresi inflamazómu NLRP3, který katalyzuje přeměnu prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$  a IL-18 do aktivních forem (Bauernfeind et al., 2009). TLR rozeznávají a váží různé PAMP, například endotoxin lipopolysacharid (LPS) přítomný na vnější membráně gram-negativních bakterií, a zprostředkovávají signalizaci přímo do leukocytu (Yang et al., 1998). Funkci makrofágů v centrálním nervovém systému zprostředkovávají mikroglie (Perry et al., 1985).

Dalším typem buněk nespecifické imunity jsou NK buňky (podle anglického „natural killer“). Tyto buňky zabíjí patogeny nebo vlastní buňky prezentující málo MHC (hlavní histokompatibilní komplex) glykoproteinů I. třídy (MHC gp I) na svém povrchu. MHC gp I prezentují ve velkém množství všechny zdravé lidské buňky. Zabití buněk NK buňky nezprostředkovávají fagocytózou, ale přímou cytotoxicitou (Herberman et al., 1975).

Vrozená imunita je nutná k aktivaci specifické imunitní odpovědi. Buňky, které se na aktivaci specifické imunitní odpovědi podílejí, jsou dendritické buňky, které mají roli buňky prezentující antigen. Tyto buňky aktivují nezralé lymfocyty, které rozeznávají antigen prezentovaný na dendritických buňkách a tím spouštějí specifickou imunitní odpověď (Steinman a Witmer, 1978).

### **5.3 Specifická imunitní odpověď**

Specifická imunitní odpověď funguje na principu velkého počtu klonů T a B lymfocytů, z nichž každý má afinitu k jiným antigenům. Při prezentaci antigenu lymfocytu s dostatečnou afinitou se lymfocyt začne množit a specificky působit proti původci antigenu. Pro T lymfocyty se tato maturace odehrává v thymu, pro B lymfocyty ve slezině (Miller, 1961; Christensen et al., 1978). Aktivní T lymfocyty se dělí na pomocné a cytotoxické. Pomocné T lymfocyty působí pomocí cytokinové odpovědi zatímco cytotoxické přímým kontaktem likvidují napadené nebo jinak poškozené buňky. Pomocné T lymfocyty se dělí na Th1, Th2 a Th17. Th1 zprostředkovávají buněčnou odpověď proti intracelulárním parazitům, Th2 se účastní humorální odpovědi proti extracelulárním parazitům a odpověď Th17

lymfocytů je založena na produkci cytokinu IL-17, který má prozánětlivé účinky, a bojují také proti extracelulárním bakteriím a plísním (Rendon a Choudhry, 2012). Aktivované B lymfocyty zprostředkovávají protilátkovou imunitní odpověď. Specifické protilátky pak mohou antigeny neutralizovat nebo způsobit aktivaci makrofágů a podnítit tak zneškodnění patogenu.

## 5.4 Cytokiny

Cytokiny jsou tkáňové hormony sekretované jak buňkami imunitního systému, tak buňkami s ním spřaženými jako jsou endoteliální buňky a fibroblasty, a váží se na receptory produkované buňkami imunitního systému. Regulují proliferaci, diferenciaci nebo apoptózu cílových buněk, a také v buňkách imunitního systému indukují syntézu jiných cytokinů nebo látek účastnících se imunitní odpovědi jako jsou adhezní molekuly nebo proteiny akutní fáze. Hrají proto roli velice významných regulátorů imunitního systému a zánětlivé odpovědi. Většina cytokinů má více různých účinků napříč buňkami imunitního systému. Cytokiny nazývané chemokiny působí jako atraktanty buněk imunitního systému (Dinarello, 2007). V následující tabulce jsou popsány cytokiny dále zmiňované v této práci (tab. č. 2).

**Tab. č. 2:** Vybrané cytokiny, jejich funkce a buňky, jimiž jsou produkovány.

Zkratky: IL (interleukin), TNF $\alpha$  (tumor nekrotizující faktor  $\alpha$ ), IFN $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ), NO (oxid dusnatý)

<b>Cytokin</b>	<b>Hlavní zdroje</b>	<b>Hlavní funkce</b>	<b>Literární zdroje</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	makrofágy a monocyty	zvýšení tělesné teploty (pyrogen); zvýšení hladiny NO v krvi; zvýšená proliferace neutrofilů	Dinarello, 1996
<b>IL-2</b>	aktivované T lymfocyty	podpora proliferace; diferenciaci a aktivace T lymfocytů	Malek, 2008
<b>IL-6</b>	monocyty a T lymfocyty	aktivace T lymfocytů; regulace proteinů akutní fáze; diferenciaci B lymfocytů; inhibice oxidativního stresu a některých zánětlivých cytokinů	Unver a McAllister, 2018
<b>IL-8</b>	monocyty a epitelální buňky	chemotaktický faktor pro neutrofile	Matsushima et al., 1988
<b>IL-10</b>	většina leukocytů	inhibice produkce TNF $\alpha$ a IFN $\gamma$ ; inhibice aktivity makrofágů a dendritických buněk	Saxena et al., 2015
<b>IL-12</b>	dendritické buňky; monocyty; makrofágy; B lymfocyty	podpora diferenciaci Th1 lymfocytů; stimulace NK buněk	Lee et al., 1998
<b>IL-18</b>	makrofágy a dendritické buňky	indukce IFN $\gamma$ ve spolupráci s IL-15 nebo IL-12; indukce produkce adhezních molekul a chemokinů	Dinarello, 2018
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	většina leukocytů	aktivace NF- $\kappa$ B; indukce apoptózy	Varfolomeev a Vucic, 2016
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	T lymfocyty; NK buňky; makrofágy	indukce protivirové odpovědi; aktivace makrofágů	Kak et al., 2018
<b>IL-17A</b>	Th17 lymfocyty	indukce produkce IL-6 a IL-8 u fibroblastů	Yao et al., 1995

## 6. Vliv melatoninu na imunitní systém

Melatonin syntetizovaný v epifýze má významný účinek na vývoj a fungování imunitního systému. Je součástí nyní rozsáhle studované neuro-endokrinní-imunologické osy. Jeden způsob, jak identifikovat jeho různé funkce je odstranění epifýzy (pinealektomie) a tak odstranění melatoninu v ní produkovaného. Tento zákrok má u myši za následek snížení hmotnosti primárních i sekundárních imunitních orgánů jako jsou thymus a slezina (McKinney et al., 1975). Stimulací růstu thymu tak melatonin posiluje imunitní aktivitu (Fraschini et al., 1980). Jak bylo zjištěno již dříve, pinealektomie u potkanů ve věku šesti týdnů způsobuje zhoršení imunitní odpovědi při vpichu hovězího sérového albuminu a kožní edém v místě vpichu je výrazně menší oproti kontrole. Byla také zjištěna zpožděná reakce proti alogennímu štěpu, která vzniká, když imunitní systém hostitele nepřijme štěp od dárce stejného druhu a zničí ho zánětlivou reakcí (Janković et al., 1970). Neonatální odstranění epifýzy tyto důsledky nevyvolává, avšak v jiné studii tento zásah způsobil méně intenzivní odpověď mozku na infekci *Staphylococcus aureus*, snížil koncentraci plazmatického zinku, který hraje roli v mnoha aspektech imunitního systému a jeho nedostatek měl za následek velké imunitní nedostatky projevující se snížením počtů erytrocytů, lymfocytů a leukocytů v krvi (Beskonakli et al., 2001).

Jelikož melatonin je syntetizovaný v epifýze během noci a má kladný účinek na aktivitu imunitního systému, můžeme předpokládat, že sezónní střídání krátkých a dlouhých dnů bude mít vliv na kvalitu a intenzitu imunitní odpovědi. To bylo ukázáno například ve studii, kde mladí hraboši chovaní v konstantní tmě vykazovali inhibici involuce thymu oproti kontrolám chovaným v rytmu 18 hodinového světla a 6 hodinové tmy. Tato adaptace mohla být odpovědí na těžké zimní podmínky, které imunitní systém oslabují (Vaughan et al., 1973).

Melatonin je také syntetizován buňkami imunitního systému. Během studie vedené Carrillo-Vico a kol. byly nalezeny vysoké koncentrace melatoninu v kulturách lidských lymfocytů a monocytů společně s enzymy spojenými s jeho syntézou, NAT a ASMT. Ve stejné studii bylo popsáno, že melatonin může mít autokrinní účinky a může se podílet na regulaci exprese prozánětlivého cytokinu IL-2. Inhibice syntézy melatoninu způsobila pokles hladiny IL-2, který byl po následné administraci exogenního melatoninu navrácen na bazální hladinu (Carrillo-Vico et al., 2004). Syntéza melatoninu byla také potvrzena v potkaních makrofázích (Martins et al., 2004) a lidské a myší hematopoetické kostní dřeni (Conti et al., 2000).

Nejen, že je melatonin v buňkách imunitního systému syntetizován, ale byly také v jejich plazmatické membráně nalezeny receptory pro melatonin. Poprvé byla zmínka o melatoninových receptorech potvrzena u lidských lymfocytů ve studii, která popsala, že interakce melatoninu a lymfocytů přímo způsobuje akumulaci cAMP v buňce (Lopez-Gonzalez et al., 1992). Později byly vysokoafinitní receptory nalezeny mimo jiné i na cytoplasmatické membráně buněk sleziny (Calvo et al., 1995) a thymu u potkana (Lopez-Gonzalez et al., 1993). Je tedy zřejmé, že melatonin je jak sekretován, tak rozpoznáván receptory buněk imunitního systému.

Během studování účinků melatoninu na imunitní systém bychom ale měli mít na vědomí, že imunitní systém je velice složitý a účinky některých látek na něj jsou pleiotropní. Vliv melatoninu je tedy různorodý a u mnohých experimentů, které jsou prováděny *in vitro* na buněčných kulturách, mohou stejné postupy mít jiný výsledek než experimenty prováděné *in vivo*.

## 6.1 Protizánětlivé účinky melatoninu

Protizánětlivý účinek melatoninu je velice zajímavý, jelikož by mohl být klíčem k léčbě patologických zánětů, jako jsou právě autoimunitní onemocnění, a k potlačení mírných zánětů, které doprovází patologii závažných depresivních poruch (Maes et al., 1990), neurodegenerativních onemocnění a stárnutí (Hackett et al., 1960).

Melatonin zprostředkovává své protizánětlivé účinky různými způsoby. Jeden způsob je schopnost melatoninu zabránit aktivaci prozánětlivých buněk inhibicí sestavení inflamazómu NLRP3. Inflamazómy jsou soubory kaspáz a jsou buněčnou odpovědí na signály poškození tkáně, jako jsou molekulární struktury asociované s poškozením (DAMP), patogeny a ROS. Aktivací inflamazomu se kaspáza-1 přemění na svou aktivní formu a katalyzuje přeměnu prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$  a IL-18 na jejich aktivní formy (Lamkanfi a Dixit, 2012). Při akutním poranění plic (doprovázeno plicním edémem, poruchou výměny plynů a krvácením) způsobeným LPS u myši je NLRP3 aktivován díky zvýšenému extracelulárnímu množství histonů, které jsou významné DAMP molekuly. Melatonin zabraňuje aktivaci inflamazómů přímo, ale také zamezením uvolňování histonů do extracelulárního prostoru. Podání melatoninu tak zlepšuje průběh léčby při akutním poranění plic zabráněním poškození tkáně silným zánětem (Allam et al., 2013; Zhang et al., 2016).

Dále byla prokázána závislost aktivace NLRP3 na přítomnosti NF- $\kappa$ B (Bauernfiend et al., 2009). Během studie orální mukozitidy způsobené radiací na potkaních jazycích se ukázalo, že NLRP3 a NF- $\kappa$ B se společně podílejí na zánětu a zároveň zvýšená hladina

mitochondriálních ROS je alternativní cestou aktivace NLRP3. Lokální podání gelu obsahujícího melatonin zmírnilo zánět jazyku a zabránilo tvorbě vředů snížením hladiny ROSa následnou inhibicí NLRP3 a NF- $\kappa$ B prozánětlivé signalizace (Ortiz et al., 2015). Během sepse je inhibice propojení NF- $\kappa$ B a NLRP3 a následného prozánětlivého signalizování zprostředkována aktivací proteinu sirtuin 1 pomocí jaderného receptoru ROR $\alpha$ , což vede k narušení transkripční aktivity NF- $\kappa$ B (García et al., 2015). Toto pozorování bylo potvrzeno v novější studii prováděné na myších adipocytech. Hypertrofní adipocyty jsou imunologicky aktivní a jsou schopny produkovat aktivní inflamazomy, které podporují chronické záněty vedoucí k inzulinové resistenci způsobené obesitou. Exogenní melatonin tuto kaskádu ovlivňuje narušením aktivity NF- $\kappa$ B. Melatonin je touto cestou také schopen zamezit pyroptické buněčné smrti, během které se naruší cytoplasmatická membrána a do extracelulárního prostoru se vylíje obsah buňky, včetně prozánětlivých cytokinů, což dále podporuje průběh zánětu tkáně. Důležitý mediátor pyroptózy, gasdermin D, je aktivován kaspázou 1 v inflamazómu NLRP3, jehož sestavení melatonin inhibuje (Liu et al., 2017).

Samotná inhibice aktivity NF- $\kappa$ B melatoninem má také protizánětlivé účinky. Během traumatického poranění mozku se při zánětlivé odpovědi exprimují prozánětlivé cytokiny IL-6, TNF $\alpha$  a IL-1 $\beta$ , které působí tkáni dlouhodobě další poškození jako edém mozku a narušení hematoencefalické bariéry a je také aktivován protizánětlivý cytokin IL-10. Podání exogenního melatoninu potkanům má za následek snížení koncentrace prozánětlivých cytokinů v důsledku inhibice NF- $\kappa$ B a naopak zvýšení koncentrace protizánětlivého cytokinu IL-10. Důsledkem je také menší mozkový edém v porovnání s kontrolní skupinou, která exogenní melatonin nedostala (Dehghan et al., 2018).

Účinek melatoninu na expresi prozánětlivých cytokinů je doložen v mnoha výzkumech prováděných na mnoha různých typech buněk. V neutrofilech vystavených LPS inhibuje exogenně podaný melatonin produkci prozánětlivých cytokinů IL-8 a TNF $\alpha$ , účinek na TNF $\alpha$  je méně výrazný (Silva et al., 2004). K aktivaci NF- $\kappa$ B a dalšího transkripčního faktoru, interferon regulačního faktoru 3 (IRF-3), dochází také během signalizace prostřednictvím TLR3. Ligandem TLR3 jsou virové dvouvláknové RNA. Myší makrofágy infikované respiračním syncytiálním virem vykazovaly po aktivaci TLR3 zvýšenou produkci NF- $\kappa$ B, TNF $\alpha$  a iNOS. Makrofágy předem ošetřené melatoninem zvýšenou aktivitu NF- $\kappa$ B inhibovaly a s ní i produkci TNF $\alpha$  a iNOS (Huang et al., 2008). Dále melatonin snižuje aktivitu TLR4, což inhibuje signalizační dráhy vedoucí k aktivaci NF- $\kappa$ B a transkripci prozánětlivých cytokinů. Tento vliv melatoninu na TLR4 způsobuje u potkanů při rakovině vaječníků zmenšení nádorů (Chuffa et al., 2015). TLR9 signalizační dráha je inhibována

melatoninem v myších makrofázích nezávisle na membránových receptorech, což inhibuje produkci prozánětlivých cytokinů TNF $\alpha$ , IL-6 a IL-12 (Xu et al., 2018).

Melatonin vykazuje antioxidační a protektivní účinky v mitochondriích, což vede ke snížení hladiny volných radikálů. Sepse je intenzivní zánětlivá odpověď, během které dochází k nefunkčnosti mitochondrií, velkému oxidačnímu stresu a masivní produkci prozánětlivých cytokinů. Melatonin při sepsi snižuje mitochondriální membránový potenciál, což vede k snížené produkci mitochondriálních ROS a iniciaci transkripce prozánětlivých cytokinů přes NF- $\kappa$ B a MAPK (mitogenem aktivovaná proteinkináza) (Galley et al., 2014). Jedna z novějších studií navrhuje, že poškození mitochondrií je během LPS indukované sepse v myších játrech způsobováno vysokými koncentracemi iNOS. Podání melatoninu inhibovalo expresi iNOS a navrátilo mitochondrie do homeostatického stavu a potlačilo tak selhání jater (García et al., 2017). Díky svým antioxidačním a protizánětlivým vlastnostem a schopnosti přejít přes mitochondriální membránu se melatonin stává kandidátem na terapeutické využití při sepsi a mitochondriálním poškození.

### **6.1.1 Protizánětlivý účinek v neurodegenerativních onemocněních**

V průběhu procesu stárnutí se mění imunitní systém a mimo postupné zhoršování funkce obranyschopnosti se přiklání více ke své zánětlivé stránce (Candore et al., 2010). Ve stáří to znamená zvýšené riziko autoimunitních onemocnění a zvýšení hladiny mediátorů zánětlivé reakce. Neurodegenerativní onemocnění jako je Parkinsonova choroba a Alzheimerova choroba vykazují velice zvýšené hladiny zánětlivých mediátorů a také dysfunkci mitochondrií (Polyakova et al., 2018). V posledních letech se uvažuje o melatoninu jako o potenciálním přípravku k léčbě těchto neurodegenerativních onemocnění s využitím jeho antioxidačních účinků, ale také pro jeho protizánětlivé účinky. Během Parkinsonovy choroby je zánět mozku podporován aktivními mikroglie (McGeer et al., 1988). Navíc u pacientů s Parkinsonovou chorobou byly nalezené zvýšené koncentrace IL-6 a IL-1 $\beta$  v mozku a TNF $\alpha$  v mozku a mozkomíšním moku, které mohou být sekretovány aktivními mikroglie a mohou mít cytotoxický účinek na dopaminergní neurony (Mogi et al., 1994a; Mogi et al., 1994b). Klíčovou součástí patologie Alzheimerovy choroby jsou senilní plaky tvořené oligopeptidy amyloid  $\beta$ . Amyloid  $\beta$  se nejen agregují v nervové tkáni, ale poškozují tkáň také indukci produkce několika zánětlivých mediátorů aktivovanými mikroglie a astrocyty. Podání exogenního melatoninu zabraňuje aktivaci glií a redukuje i amyloid  $\beta$ -indukovanou tvorbu prozánětlivých cytokinů TNF $\alpha$  a IL-6 (Clapp-Lily et al., 2001; Hoppe et al., 2010). Recentně bylo na myších modelech Alzheimerovy choroby prokázáno, že podání melatoninu



zlepšuje kognitivní funkci během behaviorálních testů a ulevuje tak od symptomů choroby (Gong et al., 2017).

## 6.2 Prozánětlivé účinky melatoninu

Prozánětlivý účinek melatoninu se neprojevuje tak často, jako protizánětlivý a studie na toto téma jsou také méně časté. Melatonin působí prozánětlivě stimulací produkce ROS a reaktivních forem dusíku (RNS), nebo některých prozánětlivých cytokinů. Prozánětlivý účinek se vyskytuje často v rakovinných buňkách a také se pravděpodobně účastní průběhu revmatoidní artritidy.

Jeden způsob, kterým melatonin může vykazovat prozánětlivé účinky je jeho schopnost v některých podmínkách působit jako pro-oxidant. V 90. letech minulého století se začaly objevovat první studie, které ukázaly i pro-oxidační funkci melatoninu. Při studii lidských monocytů se ukázalo, že melatonin je schopen zvyšovat hladinu ROS, aktivovat monocyty působící proti nádorovým buňkám a zvyšovat jejich reaktivitu k LPS. (Morrey et al., 1994). Dále byla pro-oxidační vlastnost nalezena u buněčné linie U937, což jsou lidské rakovinné myeloidní buňky. Pro-oxidační vlastnost se projevuje zvýšenou koncentrací intracelulárního ROS (Albertini et al., 2006). Ve studii vedené Radogna a kol. se pro-oxidační vliv projevil v nerakovinných leukocytech, ale také v buněčné linii U937. ROS dosáhly nejvyšší koncentrace 2-3 hodiny po podání melatoninu, a nejmenší koncentrace melatoninu nutná na vyvolání reakce byla 10  $\mu$ M. Jelikož luzindol, antagonist MT1 a MT2 receptorů, nijak neovlivnil zvýšení koncentrace ROS, bylo stanoveno, že zvýšení produkce ROS melatoninem není výsledkem jeho vázání na tyto membránové receptory. V této studii bylo navrženo, že zvýšení produkce ROS je zapříčiněno vazbou melatoninu na calmodulin, který funguje jako signalizační enzym a může být tudíž schopen aktivace prooxidačních enzymů (Radogna et al., 2009). V lidských trombocytech vykazuje melatonin pro-oxidativní a také pro-apoptotický účinek (Girish et al., 2013). Experimenty vedené Albertini a kol. (2006), Radogna a kol. (2009) a Girish a kol. (2013) pracovaly s vysokými koncentracemi melatoninu v rozmezí 0,01-1 mM. Je tedy důležité říci, že důkazy pro-oxidativních účinků melatoninu byly získány při použití vysokých koncentrací *in vitro* v buněčných kulturách. Studie na buněčné linii lidských keratinocytů HaCaT používala oproti jiným studiím krevní fyziologickou koncentraci melatoninu (1 nM), který způsobil zvýšenou expresi neuronální syntetázy oxidu dusnatého (nNOS) s dosažením nejvyšší koncentrace zhruba 8 hodin po podání. nNOS katalyzuje produkci NO, což je volný radikál (Sarti et al., 2013). ROS mohou mít v buňkách antiapoptotickou vlastnost díky jejich funkci jako druží poslové, a mohou

způsobovat aktivaci transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B, které kromě indukce exprese prozánětlivých cytokinů indukují i expresi genů zapojených v antiapoptotickém působení (Schreck et al., 1991; Wu et al., 1998). Melatonin může tedy tuto kaskádu inicializovat a fungovat tak jako důležitý faktor v přežití buněk ve stresových podmínkách, jak bylo ukázáno ve studii u buněčné linie U937 (Cristofanon et al., 2009). Vliv melatoninu na aktivitu NF- $\kappa$ B je determinován stavem buňky. Buňky mozečku u potkanů stimulované pomocí LPS na melatonin reagovaly snížením aktivity NF- $\kappa$ B. Opačný vliv měl melatonin na naivní buňky. Díky působení NF- $\kappa$ B na produkci NO byl u LPS stimulovaných buněk pozorován protektivní účinek melatoninu, zatímco u naivních buněk byl účinek toxický (Franco a Marcus, 2014). Novější studie na buněčné linii lidského adenokarcinomu ukázala, že je melatonin schopný pomocí indukce produkce ROS naopak způsobit vzrůstem oxidačního stresu v buňkách apoptózu (Fan et al., 2015). Takovéto objevy jsou důležité při výzkumu melatoninu jako onkostatku.

Další prozánětlivá aktivita melatoninu se týká regulace prozánětlivých cytokinů. Mnoho studií ukázalo, že je melatonin schopný zvyšovat tvorbu některých cytokinů v mnoha různých buněčných typech imunitního systému. V monocytech melatonin zvyšuje produkci cytokinu IL-12, který je následně schopný navození diferenciaci Th1 lymfocytů, a tedy podpory Th1 typu imunitní odpovědi (García-Mauriño et al., 1999). Při aktivaci monocytů bylo pozorováno i zvýšení produkce cytokinů IL-6 a TNF $\alpha$  a zároveň protizánětlivého cytokinu IL-10. V této studii byla pozorována schopnost melatoninu zlepšit regenerativní potenciál a celkový stav pacienta po transplantaci malých jaterních štěpů prostřednictvím regulace těchto cytokinů (Song et al., 2018). IL-6 je známý svými prozánětlivými účinky a pro podporu regenerace tkání, a melatonin tedy přes jeho zvýšenou produkci může poskytovat tkáňově protektivní účinky (Garbers et al., 2015). Zvýšená produkce IL-6 vlivem exogenního melatoninu byla pozorována také u monocytů u pacientů trpících onemocněním systémový lupus erythematosus. U zdravých subjektů byla produkce naopak snížena. Tento různorodý efekt může být důsledkem toho, že vliv melatoninu na NF- $\kappa$ B je determinován stavem buňky (Medrano-Campillo et al., 2015). V leukemických T lymfocytech byla potvrzena vyšší koncentrace prozánětlivého cytokinu IL-2 v přítomnosti endogenního melatoninu, který podporuje produkci IL-2 vazbou na jaderné i membránové receptory. Melatonin může mít tedy v tomto případě funkci autokrinní, endokrinní i parakrinní (Lardone et al., 2006). Novější studie zjistila, že melatonin vyvolává zvýšenou aktivitu T lymfocytů při reakci oddáleného typu (imunitní reakce zprostředkována makrofágy a Th1 lymfocyty) tím, že podporuje zvýšení koncentrací prozánětlivých cytokinů IL-2 a IFN $\gamma$ . Toto může být

zprostředkováno nejspíše působením melatoninu na svůj membránový receptor MT1. Melatonin také podporuje zánětlivou odpověď působením na proliferaci splenocytů, thymocytů a monocytů kostní dřeně (Lardone et al., 2010; Vishwas a Haldar, 2014). Působení melatoninu na Th17 lymfocyty je závislé na dávkování. Zatímco fyziologické koncentrace melatoninu pohybující se v rozmezí 10-100 pg/ml podporovaly diferenciaci Th17 lymfocytů a expresi prozánětlivého cytokinu IL-17A, farmakologická dávka o koncentraci 200 ng/ml expresi IL-17A naopak výrazně potlačovala (Kuklina et al., 2016).

Melatonin je také schopen aktivací prozánětlivých a antiapoptotických drah zprostředkovávat kardioprotekci v průběhu myokardiální ischemie. Podání melatoninu před navozením myokardiální ischemie u potkanů způsobuje aktivaci TLR4. Aktivace TLR4 iniciuje tvorbu prozánětlivého cytokinu TNF $\alpha$ , který působením přes svůj membránový receptor TNFR2 aktivuje transkripční faktor STAT3. Účinky STAT3 jsou antiapoptotické a chrání ischemickou tkáň před buněčnou smrtí. Melatonin tedy představuje nový terapeutický prostředek pro léčbu kardiovaskulárních onemocnění (Nduhirabandi et al., 2015).

### **6.2.1 Prozánětlivý účinek při revmatoidní artritidě**

Melatonin je intenzivně studovaná látka díky svým protizánětlivým účinkům a potenciálně by mohla figurovat při léčbě různých autoimunitních onemocněních. Její známé nežádoucí účinky na revmatoidní artritidu tento pokrok ale komplikují. Ve starších studiích je popsána melatoninem stimulovaná aktivace lidských synoviálních makrofágů, které produkovaly zvýšené koncentrace NO a IL-12, což by v revmatoidní artritidě mohlo podporovat zánětlivý proces a aktivitu Th1 lymfocytů (Cutolo et al., 1999). V porovnání se zdravými lidmi mají lidé s revmatoidní artritidou vyšší hladiny melatoninu a navíc v noci, kdy je koncentrace melatoninu nejvyšší, jim byla naměřena také nejvyšší hladina zánětlivého cytokinu TNF $\alpha$ , který hraje zásadní roli v patologii revmatoidní artritidy (Cutolo et al., 2005). Nová studie však ukázala schopnost melatoninu tlumit produkci prozánětlivých cytokinů TNF $\alpha$  a IL-1 $\beta$  v synoviálních fibroblastech, které jsou důležitými producenty těchto látek a podporují tak výrazně průběh revmatoidní artritidy (Huang et al., 2019).

## 7. Vliv imunitního systému na regulaci syntézy melatoninu

Působení melatoninu na imunitní systém není jednosměrné. Mnoho mediátorů zánětlivé odpovědi ovlivňuje také syntézu melatoninu. Důležitou molekulou v tomto vzájemném působení je  $\text{IFN}\gamma$ . V lidských T lymfocytech a makrofázích zvyšuje  $\text{IFN}\gamma$  příjem tryptofanu a serotoninu, což jsou prekurzory melatoninu, a také zvyšuje syntézu melatoninu (Finocchiaro et al., 1988). Další studie ukázala stejný efekt v pinealocytech.  $\text{IFN}\gamma$  zvyšuje v pinealocytech reaktivitu  $\beta$  adrenergických receptorů vůči svému agonistovi isoproterenolu a zesiluje tak produkci melatoninu. Stejná studie zjistila, že  $\text{IFN}\gamma$  paradoxně nezvyšuje aktivitu NAT. Vyšší produkce melatoninu bez zvýšené aktivity NAT může být způsobena příjmem většího množství prekurzorů melatoninu (Withyachumnarnkul et al., 1990). Prozánětlivé cytokiny mohou také syntézu melatoninu inhibovat. Prozánětlivý cytokin  $\text{TNF}\alpha$  dokáže během zánětu zabránit tvorbě melatoninu v epifýze a podporovat tak zánětlivou reakci, která by byla protizánětlivými účinky melatoninu inhibována (Pontes et al., 2007).

Dalším mechanismem inhibice produkce melatoninu je zvýšená koncentrace prozánětlivých cytokinů  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$  a  $\text{IL-18}$ . Tyto cytokiny indukují sekreci indolamin2,3-dioxygenázy (IDO), která směřuje metabolisme tryptofanu dráhou kyseliny kynurenové a tak odvádí prekurzor melatoninu od jeho biosyntézy a snižuje jeho koncentraci (Anderson a Ojala, 2010). Vliv IDO na melatonin je spojován s neurodegenerativními onemocněními, jelikož poklesem koncentrace melatoninu vlivem zánětlivé reakce způsobené tkáňovým stresem klesá i jeho protekční schopnost mitochondrií. Dysfunkce mitochondrií je významnou součástí patologie neurodegenerativních onemocnění (Polyakova et al., 2018).

Novější studie prezentují další způsoby regulace melatoninu imunitním systémem. Studie s použitím potkaních epifýz ukázala, že amyloid  $\beta$  peptidy, které při Alzheimerově chorobě tvoří senilní plaky, inhibují tvorbu melatoninu. Mechanismus vede přes aktivaci  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  a navození zánětlivé odpovědi. Během kultivace pinealocytů s amyloid  $\beta$  peptidy se projevovala také snížená aktivace signální dráhy extracelulárních signálem regulovaných kináz (ERK) spouštěné melatoninovými receptory (Cecon et al., 2015). Na potkaních makrofázích bylo zjištěno, že při aplikaci LPS zprostředkovává  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  ve spolupráci s transkripčním faktorem STAT3 transkripci enzymu NAT, který se následně účastní biosyntézy melatoninu (Muxel et al., 2016).

## 8. Závěr

Existuje mnoho patologických stavů, jako jsou poranění nebo infekce, které přirozeně doprovází zánět. Tento zánět ve většině případů organismu svědčí a zprostředkovává boj proti invazním mikroorganismům či vlastním dysfunkčním buňkám, a zajišťuje následné navrácení postižené tkáně do homeostázy. Tento zánět však může v některých případech tkáním škodit ať už v chronické nebo silné akutní formě, což se například projevuje v autoimunitních onemocněních nebo při akutních infekcích. Již od druhé poloviny minulého století se provádí studie zaměřené na účinky melatoninu na imunitní systém ve snaze zlepšit prognózu pacientů s těmito stavy. Melatonin je silným antioxidantem, ale také molekulou s dobře prokázanými protizánětlivými účinky, a dokáže tedy působit protektivně na zanícené tkáně. Stále se však ukazuje, že účinek melatoninu na tkáně je velice komplexní.

Melatonin má také prokázané prozánětlivé účinky. Známý je jeho vliv na patologii revmatoidní artritidy, u které nejspíš podporuje průběh nemoci. Tento fakt ukazuje, že účinky melatoninu na imunitní systém jsou velice různorodé. Z uvedených studií je navíc zřejmé, že melatonin působí různě na tkáně v závislosti na dávkování a stavu buněk. Není tedy zatím možné zcela předpovídat vliv této molekuly na různé typy a stavy tkání.

Melatonin má velký potenciál být součástí léčby mnoha různých onemocnění, kde je potřeba modifikace chování imunitního systému. Je o něm uvažováno jako o potenciálním léčivu pro pacienty s rakovinou, autoimunitními onemocněními nebo akutní infekcí. Je však potřeba provést ještě mnoho dalších studií zaměřujících se na jeho rozmanité účinky, různé dávkování a za různých stavů tkáně, než budeme schopni využívat melatonin jako účinnou terapii.

## 9. Seznam literatury

\*Review jsou označena hvězdičkou

Abe, M., Itoh, M. T., Miyata, M., Shimizu, K., & Sumi, Y. (2000). Circadian rhythm of serotonin N-acetyltransferase activity in rat lens. *Experimental eye research*, 70(6), 805-808.

Aeschbach, D., Sher, L., Postolache, T. T., Matthews, J. R., Jackson, M. A., & Wehr, T. A. (2003). A longer biological night in long sleepers than in short sleepers. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(1), 26-30.

Aeschbach, D., Sher, L., Postolache, T. T., Matthews, J. R., Jackson, M. A., & Wehr, T. A. (2003). A longer biological night in long sleepers than in short sleepers. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(1), 26-30.

Albertini, M. C., Radogna, F., Accorsi, A., Uguccioni, F., Paternoster, L., Cerella, C., De Nicola, M., D'Alessio, M., Bergamaschi, A., Magrini, A., & Ghibelli, L. (2006). Intracellular pro-oxidant activity of melatonin deprives U937 cells of reduced glutathione without affecting glutathione peroxidase activity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1091(1), 10-16.

Allam, R., Darisipudi, M. N., Tschopp, J., & Anders, H. J. (2013). Histones trigger sterile inflammation by activating the NLRP3 inflammasome. *European journal of immunology*, 43(12), 3336-3342.

\* Anderson, G., & Ojala, J. O. (2010). Alzheimer's and seizures: interleukin-18, indoleamine 2, 3-dioxygenase and quinolinic Acid. *International Journal of Tryptophan Research*, 3, IJTR-S4603.

Aschoff, J. (1965). Circadian rhythms in man. *Science*, 148(3676), 1427-1432.

Ayoub, M. A., Couturier, C., Lucas-Meunier, E., Angers, S., Fossier, P., Bouvier, M., & Jockers, R. (2002). Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21522-21528.

Bartness, T. J., & Wade, G. N. (1984). Photoperiodic control of body weight and energy metabolism in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*): role of pineal gland, melatonin, gonads, and diet. *Endocrinology*, 114(2), 492-498.

Bauernfeind, F. G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E. S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B. G., Fitzgerald, K. A., Latz, E., & Hornung, V. (2009). Cutting edge: NF- $\kappa$ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *The Journal of Immunology*, 183(2), 787-791.

Beskonakli, E., Palaoglu, S., Aksaray, S., Alanoglu, G., Turhan, T., & Taskin, Y. (2001). Effect of pinealectomy on immune parameters in rats with *Staphylococcus aureus* infection. *Neurosurgical review*, 24(1), 26-30.

\* Brzezinski, A. (1997). Melatonin in humans. *New England journal of medicine*, 336(3), 186-195.

Bubenik, G. A., Brown, G. M., Uhler, I., & Grota, L. J. (1974). Immunohistological localization of N-acetyldoylealkylamines in pineal gland, retina and cerebellum. *Brain research*, 81(2), 233-242.

Cajochen, C., Zeitzer, J. M., Czeisler, C. A., & Dijk, D. J. (2000). Dose-response relationship for light intensity and ocular and electroencephalographic correlates of human alertness. *Behavioural brain research*, 115(1), 75-83.

Calvo, J. R., Pozo, D., & Harmouch, A. (1995). Specific binding of 2-[125I] iodomelatonin by rat splenocytes: characterization and its role on regulation of cyclic AMP production. *Journal of neuroimmunology*, 57(1-2), 171-178.

\* Candore, G., Caruso, C., & Colonna-Romano, G. (2010). Inflammation, genetic background and longevity. *Biogerontology*, 11(5), 565-573.

Capsoni, S., Viswanathan, M., De Oliveira, A. M., & Saavedra, J. M. (1994). Characterization of melatonin receptors and signal transduction system in rat arteries forming the circle of Willis. *Endocrinology*, 135(1), 373-378.

Cardinali, D. P., & Rosner, J. M. (1971). Retinal localization of the hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the rat. *Endocrinology*, 89(1), 301-303.

\* Carlberg, C., Ulven, S. M., & Molnár, F. (2016). Chronic Inflammation and Metabolic Stress. In *Nutri-genomics* (pp. 121-137). Springer, Cham.

Carrillo-Vico, A., Calvo, J. R., Abreu, P., Lardone, P. J., García-Mauriño, S., Reiter, R. J., & Guerrero, J. M. (2004). Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *The FASEB Journal*, 18(3), 537-539.

Cecon, E., Chen, M., Marçola, M., Fernandes, P. A., Jockers, R., & Markus, R. P. (2015). Amyloid  $\beta$  peptide directly impairs pineal gland melatonin synthesis and melatonin receptor signaling through the ERK pathway. *The FASEB Journal*, 29(6), 2566-2582.

Christensen, B. E., Jønsson, V., Matre, R., & Tønder, O. (1978). Traffic of T and B lymphocytes in the normal spleen. *Scandinavian journal of haematology*, 20(3), 246-257.

Chuffa, L. G. A., Fioruci-Fontanelli, B. A., Mendes, L. O., Seiva, F. R. F., Martinez, M., Fávaro, W. J., Domeniconi, R. F., Pinheiro, P. F. F., Delazari dos Santos, L., & Martinez, F. E. (2015). Melatonin attenuates the TLR4-mediated inflammatory response through

MyD88-and TRIF-dependent signaling pathways in an in vivo model of ovarian cancer. *BMC cancer*, 15(1), 34.

Clapp-Lilly, K. L., Smith, M. A., Perry, G., & Duffy, L. K. (2001). Melatonin reduces interleukin secretion in amyloid- $\beta$  stressed mouse brain slices. *Chemico-biological interactions*, 134(1), 101-107.

Conti, A., Conconi, S., Hertens, E., Skwarlo- Sonta, K., Markowska, M., & Maestroni, G. J. (2000). Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *Journal of pineal research*, 28(4), 193-202.

Costa, M. S. M. O., Santee, U. R., Cavalcante, J. S., Moraes, P. R. A., Santos, N. P., & Britto, L. R. G. (1999). Retinohypothalamic projections in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): a study using cholera toxin subunit B. *Journal of Comparative Neurology*, 415(3), 393-403.

Cristofanon, S., Uguccioni, F., Cerella, C., Radogna, F., Dicato, M., Ghibelli, L., & Diederich, M. (2009). Intracellular prooxidant activity of melatonin induces a survival pathway involving NF- $\kappa$ B activation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1171(1), 472-478.

Cutolo, M., Maestroni, G. J. M., Otsa, K., Aakre, O., Villaggio, B., Capellino, S., Montagna, P., Fazzuoli, L., Veldi, T., Peets, T., Sulli, A., & Hertens, E. (2005). Circadian melatonin and cortisol levels in rheumatoid arthritis patients in winter time: a north and south Europe comparison. *Annals of the rheumatic diseases*, 64(2), 212-216.

Cutolo, M., Villaggio, B., Candido, F., Valenti, S., Giusti, M., Felli, L., Sulli, A., & Accardo, S. (1999). Melatonin Influences Interleukin- 12 and Nitric Oxide Production by Primary Cultures of Rheumatoid Synovial Macrophages and THP- 1 Cells a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 876(1), 246-254.

Day, R. (1941). Regulation of body temperature during sleep. *American Journal of Diseases of Children*, 61(4), 734-746.

Dehghan, F., Shahrokhi, N., Khaksari, M., Soltani, Z., Asadikorom, G., Najafi, A., & Shahrokhi, N. (2018). Does the administration of melatonin during post-traumatic brain injury affect cytokine levels? *Inflammopharmacology*, 26(4), 1017-1023.

\* Dinarello, C. A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87(6), 2095-2147.

\* Dinarello, C. A. (2007). Historical insights into cytokines. *European journal of immunology*, 37(S1), S34-S45.

\* Dinarello, C. A. (2018). Overview of the IL- 1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological reviews*, 281(1), 8-27.



- Dubocovich, M. L. (1988). Luzindole (N-0774): a novel melatonin receptor antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 246(3), 902-910.
- Duncan, M. J., Takahashi, J. S., & Dubocovich, M. L. (1988). 2-[125I] iodomelatonin binding sites in hamster brain membranes: pharmacological characteristics and regional distribution. *Endocrinology*, 122(5), 1825-1833.
- Ebert, R. H., & Florey, H. W. (1939). The extravascular development of the monocyte observed in vivo. *British journal of experimental pathology*, 20(4), 342.
- Fan, C., Pan, Y., Yang, Y., Di, S., Jiang, S., Ma, Z., Li, T., Zhang, Z., Li, W., Li, X., Yan, X., & Reiter, R. J. (2015). HDAC 1 inhibition by melatonin leads to suppression of lung adenocarcinoma cells via induction of oxidative stress and activation of apoptotic pathways. *Journal of pineal research*, 59(3), 321-333.
- Finocchiaro, L. M., Arzt, E. S., Fernández-Castelo, S., Criscuolo, M., Finkielman, S., & Nahmod, V. E. (1988). Serotonin and Melatonin Synthesis in Peripheral Blood Mononuclear Cells: Stimulation by Interferon-7 as Part of an Immunomodulatory Pathway. *Journal of interferon research*, 8(6), 705-716.
- Franco, D. G., & Markus, R. P. (2014). The cellular state determines the effect of melatonin on the survival of mixed cerebellar cell culture. *PloS one*, 9(9), e106332.
- Fraschini, F., Ferioli, M. E., Nebuloni, R., & Scalabrino, G. (1980). Pineal gland and polyamines. *Journal of neural transmission*, 48(3), 209-221.
- Galano, A., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2014). Cyclic 3-hydroxymelatonin, a key metabolite enhancing the peroxy radical scavenging activity of melatonin. *RSC Advances*, 4(10), 5220-5227.
- Galley, H. F., Lowes, D. A., Allen, L., Cameron, G., Aucott, L. S., & Webster, N. R. (2014). Melatonin as a potential therapy for sepsis: a phase I dose escalation study and an ex vivo whole blood model under conditions of sepsis. *Journal of pineal research*, 56(4), 427-438.
- Ganguly, S., Gastel, J. A., Weller, J. L., Schwartz, C., Jaffe, H., Namboodiri, M. A. A., Coon, S. L., Hickman, A. B., Rollag, M., Obsil, T., Ferry, G., Boutin, J.A., Klein, D. C., & Beauverger, P. (2001). Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(14), 8083-8088.
- \* Garbers, C., Aparicio-Siegmund, S., & Rose-John, S. (2015). The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition. *Current opinion in immunology*, 34, 75-82.

- García, J. A., Ortiz, F., Miana, J., Doerrier, C., Fernández-Ortiz, M., Rusanova, I., Escames, G., García, J. J., & Acuña-Castroviejo, D. (2017). Contribution of inducible and neuronal nitric oxide synthases to mitochondrial damage and melatonin rescue in LPS-treated mice. *Journal of physiology and biochemistry*, 73(2), 235-244.
- García, J. A., Volt, H., Venegas, C., Doerrier, C., Escames, G., López, L. C., & Acuña-Castroviejo, D. (2015). Disruption of the NF- $\kappa$ B/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor- $\alpha$  and blocks the septic response in mice. *The FASEB Journal*, 29(9), 3863-3875.
- García- Mauriño, S., Pozo, D., Calvo, J. R., & Guerrero, J. M. (2000). Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *Journal of pineal research*, 29(3), 129-137.
- García-Mauriño, S., Pozo, D., Carrillo-Vico, A., Calvo, J. R., & Guerrero, J. M. (1999). Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life sciences*, 65(20), 2143-2150.
- Gauer, F., & Craft, C. M. (1996). Circadian regulation of hydroxyindole-O-methyltransferase mRNA levels in rat pineal and retina. *Brain research*, 737(1-2), 99-109.
- Geary, G. G., Duckles, S. P., & Krause, D. N. (1998). Effect of melatonin in the rat tail artery: role of K<sup>+</sup> channels and endothelial factors. *British journal of pharmacology*, 123(8), 1533-1540.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S., & Weitz, C. J. (1998). Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, 280(5369), 1564-1569.
- Girish, K. S., Paul, M., Thushara, R. M., Hemshekhar, M., Sundaram, M. S., Rangappa, K. S., & Kemparaju, K. (2013). Melatonin elevates apoptosis in human platelets via ROS mediated mitochondrial damage. *Biochemical and biophysical research communications*, 438(1), 198-204.
- Gong, Y. H., Hua, N., Zang, X., Huang, T., & He, L. (2017). Melatonin ameliorates A $\beta$ 1-42-induced Alzheimer's cognitive deficits in mouse model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(1), 70-80.
- Green, D. J., & Gillette, R. (1982). Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain research*, 245(1), 198-200.
- Hackett, E., Beech, M., & Forbes, I. (1960). Thyroglobulin antibodies in patients without clinical disease of the thyroid gland. *The Lancet*, 276(7147), 402-404.
- \* Hardeland, R. (2018). Melatonin and inflammation—Story of a double-edged blade. *Journal of pineal research*, 65(4), e12525.

Hashimoto, C., Hudson, K. L., & Anderson, K. V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 52(2), 269-279.

Hazlerigg, D. G., Morgan, P. J., Lawson, W., & Hastings, M. H. (1991). Melatonin inhibits the activation of cyclic AMP- dependent protein kinase in cultured pars tuberalis cells from ovine pituitary. *Journal of neuroendocrinology*, 3(6), 597-603.

Herberman, R. B., Nunn, M. E., Holden, H. T., & Lavrin, D. H. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *International journal of cancer*, 16(2), 230-239.

Hikichi, T., Tateda, N., & Miura, T. (2011). Alteration of melatonin secretion in patients with type 2 diabetes and proliferative diabetic retinopathy. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)*, 5, 655.

\* Holzerová, E., & Prokisch, H. (2015). Mitochondria: much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production?. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 63, 16-20.

Hoppe, J. B., Frozza, R. L., Horn, A. P., Comiran, R. A., Bernardi, A., Campos, M. M., Battastini, A. M. O., & Salbego, C. (2010). Amyloid-  $\beta$  neurotoxicity in organotypic culture is attenuated by melatonin: involvement of GSK- 3 $\beta$ , tau and neuroinflammation. *Journal of pineal research*, 48(3), 230-238.

Huang, C. C., Chiou, C. H., Liu, S. C., Hu, S. L., Su, C. M., Tsai, C. H., & Tang, C. H. (2019). Melatonin attenuates TNF-  $\alpha$  and IL- 1 $\beta$  expression in synovial fibroblasts and diminishes cartilage degradation: Implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Journal of pineal research*, 66(3), e12560.

Huang, S. H., Cao, X. J., & Wei, W. (2008). Melatonin decreases TLR3- mediated inflammatory factor expression via inhibition of NF-  $\kappa$ B activation in respiratory syncytial virus- infected RAW264. 7 macrophages. *Journal of pineal research*, 45(1), 93-100.

Hunt, A. E., Al-Ghoul, W. M., Gillette, M. U., & Dubocovich, M. L. (2001). Activation of MT2 melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 280(1), C110-C118.

Itoh, M. T., Ishizuka, B., Kuribayashi, Y., Amemiya, A., & Sumi, Y. (1999). Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Molecular human reproduction*, 5(5), 402-408.

Janković, B. D., Isaković, K., & Petrović, S. (1970). Effect of pinealectomy on immune reactions in the rat. *Immunology*, 18(1), 1.

Jiang, Z. G., Nelson, C. S., & Allen, C. N. (1995). Melatonin activates an outward current and inhibits Ih in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain research*, 687(1-2), 125-132.

\* Kak, G., Raza, M., & Tiwari, B. K. (2018). Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomolecular concepts*, 9(1), 64-79.

Klein, D. C., & Weller, J. L. (1970). Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science*, 169(3950), 1093-1095.

Klein, D. C., Sugden, D., & Weller, J. L. (1983). Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(2), 599-603.

Konopka, R. J., & Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(9), 2112-2116.

Köse, O., Arabaci, T., Kizildag, A., Erdemci, B., Özkaleminoğlu, D., Gedikli, S., Özkanlar, S., Zihni, M., Albayrak, M., Kara, A., & Kermen, E. (2016). Melatonin prevents radiation-induced oxidative stress and periodontal tissue breakdown in irradiated rats with experimental periodontitis. *Journal of periodontal research*, 52(3), 438-446.

Kuklina, E. M., Glebezdina, N. S., & Nekrasova, I. V. (2016). Role of melatonin in the regulation of differentiation of T cells producing interleukin-17 (Th17). *Bulletin of experimental biology and medicine*, 160(5), 656-658.

\* Lamkanfi, M., & Dixit, V. M. (2012). Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annual review of cell and developmental biology*, 28, 137-161.

Lardone, P. J., Carrillo- Vico, A., Naranjo, M. C., De Felipe, B., Vallejo, A., Karasek, M., & Guerrero, J. M. (2006). Melatonin synthesized by Jurkat human leukemic T cell line is implicated in IL- 2 production. *Journal of cellular physiology*, 206(1), 273-279.

Lardone, P. J., Rubio, A., Cerrillo, I., Gómez-Corvera, A., Carrillo-Vico, A., Sanchez-Hidalgo, M., Guerrero, J. M., Fernandez-Riejos, P., Sanchez-Margalet, V., & Molinero, P. (2010). Blocking of melatonin synthesis and MT 1 receptor impairs the activation of Jurkat T cells. *Cellular and molecular life sciences*, 67(18), 3163-3172.

\* Lee, S. M., Suen, Y., Qian, J., Knoppel, E., & Cairo, M. S. (1998). The regulation and biological activity of interleukin 12. *Leukemia & lymphoma*, 29(5-6), 427-438.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86(6), 973-983.

- Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, T. H., & Mori, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyteS1. *Journal of the American Chemical Society*, 80(10), 2587-2587.
- Liu, T., & Borjigin, J. (2005). N- acetyltransferase is not the rate- limiting enzyme of melatonin synthesis at night. *Journal of pineal research*, 39(1), 91-96.
- Liu, Z., Gan, L., Xu, Y., Luo, D., Ren, Q., Wu, S., & Sun, C. (2017). Melatonin alleviates inflammasome- induced pyroptosis through inhibiting NF-  $\kappa$ B/GSDMD signal in mice adipose tissue. *Journal of pineal research*, 63(1), e12414.
- Lopez-Gonzalez, M. A., Calvo, J. R., Osuna, C., Rubio, A., & Guerrero, J. M. (1992). Melatonin potentiates cyclic AMP production stimulated by vasoactive intestinal peptide in human lymphocytes. *Neuroscience letters*, 136(2), 150-152.
- Lopez-Gonzalez, M. A., Martin-Cacao, A., Calvo, J. R., Reiter, R. J., Osuna, C., & Guerrero, J. M. (1993). Specific binding of 2-[125I] melatonin by partially purified membranes of rat thymus. *Journal of neuroimmunology*, 45(1-2), 121-126.
- \* Lo, D., Feng, L., Li, L., Carson, M. J., Crowley, M., Pauza, M., Nguyen, A., & Reilly, C. R. (1999). Integrating innate and adaptive immunity in the whole animal. *Immunological reviews*, 169(1), 225-239.
- Lowes, D. A., Webster, N. R., Murphy, M. P., & Galley, H. F. (2013). Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *British journal of anaesthesia*, 110(3), 472-480.
- Maes, M. (1999). Major depression and activation of the inflammatory response system. *Cytokines, stress, and depression*, 25-46.
- Maes, M., Bosmans, E., Suy, E., Vandervorst, C., De Jonckheere, C., & Raus, J. (1990). Immune disturbances during major depression: upregulated expression of interleukin-2 receptors. *Neuropsychobiology*, 24(3), 115-120.
- \* Malek, T. R. (2008). The biology of interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol.*, 26, 453-479.
- \* Manchester, L. C., Coto- Montes, A., Boga, J. A., Andersen, L. P. H., Zhou, Z., Galano, A., Vrlend, J., Tan, D., & Reiter, R. J. (2015). Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *Journal of pineal research*, 59(4), 403-419.
- \* Mano, H., & Fukada, Y. (2007). A median third eye: pineal gland retraces evolution of vertebrate photoreceptive organs. *Photochemistry and photobiology*, 83(1), 11-18.
- Martins Jr, E., Ferreira, A. C. F., Skorupa, A. L., Afeche, S. C., Cipolla- Neto, J., & Costa Rosa, L. F. B. P. (2004). Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. *Journal of leukocyte biology*, 75(6), 1116-1121.

Masana, M. I., Doolen, S., Ersahin, C., Al-Ghoul, W. M., Duckles, S. P., Dubocovich, M. L., & Krause, D. N. (2002). MT2 melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(3), 1295-1302.

Matsushima, K., Morishita, K., Yoshimura, T., Lavu, S., Kobayashi, Y., Lew, W., Apella, E., Kung, H. F., Leonard, E. J., & Oppenheim, J. J. (1988). Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *Journal of Experimental Medicine*, 167(6), 1883-1893.

McGeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E., & McGeer, E. G. (1988). Reactive microglia are positive for HLA- DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 38(8), 1285-1285.

McKinney, T. D., Vaughan, M. K., & Reiter, R. J. (1975). Pineal influence on intermale aggression in adult house mice. *Physiology & behavior*, 15(2), 213-216.

McLeod, S. D., & Cairncross, K. D. (1995). Preliminary evidence of a synergistic  $\alpha 1$ - and  $\beta 1$ -adrenoceptor regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase. *General and comparative endocrinology*, 97(3), 283-288.

McNulty, S., Rosst, A. W., Barrettt, P., Hastings, M. H., & Morgan, P. J. (1994). Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis. *Journal of neuroendocrinology*, 6(5), 523-532.

Medeiros, C. A. M., De Bruin, P. F. C., Lopes, L. A., Magalhães, M. C., de Lourdes Seabra, M., & de Bruin, V. M. S. (2007). Effect of exogenous melatonin on sleep and motor dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of neurology*, 254(4), 459-464.

Medrano- Campillo, P., Sarmiento- Soto, H., Álvarez- Sánchez, N., Álvarez- Ríos, A. I., Guerrero, J. M., Rodríguez- Prieto, I., Casillo-Palma, M. J., Lardone, P. J., & Carrillo- Vico, A. (2015). Evaluation of the immunomodulatory effect of melatonin on the T- cell response in peripheral blood from systemic lupus erythematosus patients. *Journal of pineal research*, 58(2), 219-226.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway Jr, C. A. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640), 394.

Miller, J. F. (1961). Immunological function of the thymus. *The Lancet*, 278(7205), 748-749.

Mistraletti, G., Paroni, R., Umbrello, M., D'Amato, L., Sabbatini, G., Taverna, M., Formenti, P., Finati, E., Favero, G., Bonomini, F., Reiter, R. J., Iapichino, G., & Rezzani,

R. (2017). Melatonin pharmacological blood levels increase total antioxidant capacity in critically ill patients. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 759.

Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Riederer, P., Inagaki, H., Minami, M., & Nagatsu, T. (1994a). Interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neuroscience letters*, 180(2), 147-150.

Mogi, M., Harada, M., Riederer, P., Narabayashi, H., Fujita, K., & Nagatsu, T. (1994b). Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neuroscience letters*, 165(1-2), 208-210.

Morrey, K. M., McLachlan, J. A., Serkin, C. D., & Bakouche, O. (1994). Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *The Journal of Immunology*, 153(6), 2671-2680.

Muxel, S. M., Laranjeira- Silva, M. F., Carvalho- Sousa, C. E., Floeter- Winter, L. M., & Markus, R. P. (2016). The RelA/c $\tau$  nuclear factor-  $\kappa$ B (NF-  $\kappa$ B) dimer, crucial for inflammation resolution, mediates the transcription of the key enzyme in melatonin synthesis in RAW 264.7 macrophages. *Journal of pineal research*, 60(4), 394-404.

Nduhirabandi, F., Lamont, K., Albertyn, Z., Opie, L. H., & Lecour, S. (2016). Role of toll- like receptor 4 in melatonin- induced cardioprotection. *Journal of pineal research*, 60(1), 39-47.

\* Nichols, D. E. (2018). N, N-dimethyltryptamine and the pineal gland: Separating fact from myth. *Journal of Psychopharmacology*, 32(1), 30-36.

Nishino, H., Kiyomi, K., & Brooks, C. M. (1976). The role of suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus in the production of circadian rhythm. *Brain Research*, 112(1), 45-59.

Nosjean, O., Ferro, M., Cogé, F., Beauverger, P., Henlin, J. M., Lefoulon, F., Fauchere, J., Delagrangé, P., Canet, E., & Boutin, J. A. (2000). Identification of the Melatonin-binding SiteMT 3 as the Quinone Reductase 2. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31311-31317.

Ortiz, F., Acuña- Castroviejo, D., Doerrier, C., Dayoub, J. C., López, L. C., Venegas, C., García, J. A., López, A., Volt, H., Luna-Sánchez, M., & Escames, G. (2015). Melatonin blunts the mitochondrial/NLRP 3 connection and protects against radiation- induced oral mucositis. *Journal of pineal research*, 58(1), 34-49.

Perry, V. H., Hume, D. A., & Gordon, S. (1985). Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience*, 15(2), 313-326.

\* Polyakova, V. O., Kvetnoy, I. M., Anderson, G., Rosati, J., Mazzoccoli, G., & Linkova, N. S. (2018). Reciprocal interactions of mitochondria and the neuroimmunoendocrine system in neurodegenerative disorders: An important role for melatonin regulation. *Frontiers in physiology*, 9, 199.

Pontes, G. N., Cardoso, E. C., Carneiro- Sampaio, M. M., & Markus, R. P. (2007). Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-  $\alpha$  increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *Journal of pineal research*, 43(4), 365-371.

Poon, A. M. S., & Pang, S. F. (1992). 2 [125I] iodomelatonin binding sites in spleens of guinea pigs. *Life sciences*, 50(22), 1719-1726.

Quintela, T., Gonçalves, I., Silva, M., Duarte, A. C., Guedes, P., Andrade, K., Freitas, F., Talhada, D., Albuquerque, T., Tavares, S., Cipolla-Neto, J., Santos, C. R. A., & Passarinha, L. A. (2018). Choroid plexus is an additional source of melatonin in the brain. *Journal of pineal research*, 65(4), e12528.

Radogna, F., Paternoster, L., De Nicola, M., Cerella, C., Ammendola, S., Bedini, A., Tarzia, G., Aquilano, K., Ciriolo, M., & Ghibelli, L. (2009). Rapid and transient stimulation of intracellular reactive oxygen species by melatonin in normal and tumor leukocytes. *Toxicology and applied pharmacology*, 239(1), 37-45.

Rath, M. F., Coon, S. L., Amaral, F. G., Weller, J. L., Møller, M., & Klein, D. C. (2016). Melatonin synthesis: Acetylserotonin O-methyltransferase (ASMT) is strongly expressed in a subpopulation of pinealocytes in the male rat pineal gland. *Endocrinology*, 157(5), 2028-2040.

\* Rendon, J. L., & Choudhry, M. A. (2012). Th17 cells: critical mediators of host responses to burn injury and sepsis. *Journal of leukocyte biology*, 92(3), 529-538.

Reppert, S. M., Godson, C., Mahle, C. D., Weaver, D. R., Slaugenhaupt, S. A., & Gusella, J. F. (1995). Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(19), 8734-8738.

Reppert, S. M., Weaver, D. R., & Ebisawa, T. (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*, 13(5), 1177-1185.

Ressmeyer, A. R., Mayo, J. C., Zelosko, V., Sáinz, R. M., Tan, D. X., Poeggeler, B., Antolín, I., Zsizsik, B. K., Reiter, R. J., & Hardeland, R. (2003). Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox report*, 8(4), 205-213.



- Rusak, B., & Morin, L. P. (1976). Testicular responses to photoperiod are blocked by lesions of the suprachiasmatic nuclei in golden hamsters. *Biology of Reproduction*, *15*(3), 366-374.
- Sakamoto, K., & Ishida, N. (1998). Circadian expression of serotonin N-acetyltransferase mRNA in the rat retina. *Neuroscience letters*, *245*(2), 113-116.
- Sanchez-Hidalgo, M., De La Lastra, C. A., Carrascosa-Salmoral, M. D. P., Naranjo, M. C., Gomez-Corvera, A., Caballero, B., & Guerrero, J. M. (2009). Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Experimental gerontology*, *44*(5), 328-334.
- Santori, F. R. (2015). The immune system as a self-centered network of lymphocytes. *Immunology letters*, *166*(2), 109-116.
- Sarti, P., Magnifico, M., Altieri, F., Mastronicola, D., & Arese, M. (2013). New evidence for cross talk between melatonin and mitochondria mediated by a circadian-compatible interaction with nitric oxide. *International journal of molecular sciences*, *14*(6), 11259-11276.
- \* Saxena, A., Khosraviani, S., Noel, S., Mohan, D., Donner, T., & Hamad, A. R. A. (2015). Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine*, *74*(1), 27-34.
- Schröder, M., Danielsson, C., Wiesenberg, I., & Carlberg, C. (1996). Identification of natural monomeric response elements of the nuclear receptor RZR/ROR. They also bind COUP-TF homodimers. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(33), 19732-19736.
- Schreck, R., Rieber, P., & Baeuerle, P. A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1. *The EMBO journal*, *10*(8), 2247-2258.
- Silva, S. D. O., Rodrigues, M. R., Ximenes, V. F., Bueno-da-Silva, A. E. B., Amarante-Mendes, G. P., & Campa, A. (2004). Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release. *Journal of neuroimmunology*, *156*(1-2), 146-152.
- Slominski, A. T., Kim, T. K., Takeda, Y., Janjetovic, Z., Brozyna, A. A., Skobowiat, C., Wang, J., Postlethwaite, A., Li, W., Tuckey, R. C., & Jetten, A. M. (2014). ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$  are expressed in human skin and serve as receptors for endogenously produced noncalcemic 20-hydroxy- and 20, 23-dihydroxyvitamin D. *The FASEB Journal*, *28*(7), 2775-2789.
- Slominski, A., Baker, J., Rosano, T. G., Guisti, L. W., Ermak, G., Grande, M., & Gaudet, S. J. (1996). Metabolism of serotonin to N-acetylserotonin, melatonin, and 5-methoxytryptamine in hamster skin culture. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(21), 12281-12286.

Song, Z., Humar, B., Gupta, A., Maurizio, E., Borgeaud, N., Graf, R., Clavien, P., & Tian, Y. (2018). Exogenous melatonin protects small- for- size liver grafts by promoting monocyte infiltration and releases interleukin- 6. *Journal of pineal research*, 65(1), e12486.

\* Stankov, B., & Reiter, R. J. (1990). Melatonin receptors: current status, facts, and hypotheses. *Life sciences*, 46(14), 971-982.

Stefulj, J., Hörtner, M., Ghosh, M., Schauenstein, K., Rinner, I., Wölfler, A., Semmler, J., & Liebmann, P. M. (2001). Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *Journal of pineal research*, 30(4), 243-247.

Steinhilber, D., Brungs, M., Werz, O., Wiesenberg, I., Danielsson, C., Kahlen, J. P., Nayeri, S., Schröder, M., & Carlberg, C. (1995). The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 270(13), 7037-7040.

Steinman, R. M., & Witmer, M. D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(10), 5132-5136.

Strada, S. J., Klein, D. C., Weller, J., & Weiss, B. (1972). Effect of norepinephrine on the concentration of adenosine 3', 5'-monophosphate of rat pineal gland in organ culture. *Endocrinology*, 90(6), 1470-1475.

Strassman, R. J., Qualls, C. R., Lisansky, E. J., & Peake, G. T. (1991). Elevated rectal temperature produced by all-night bright light is reversed by melatonin infusion in men. *Journal of Applied Physiology*, 71(6), 2178-2182.

Sugden, D. (1989). Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia*, 45(10), 922-932.

Suofu, Y., Li, W., Jean-Alphonse, F. G., Jia, J., Khattar, N. K., Li, J., Baranov, S. V., Leronni, D., Mihalik, A. C., He, Y., Wehbi, V. L., Kim, J., Heath, B. E., Baranova, O. V., Wang, X., Gable, M. J., Kretz, E. S., Di Benedetto, G., Lezon, T. R., Ferrando, L. M., Larkin, T. M., Sullivan, M., Yablonska, Z., Wang, J., Minnigh, M. B., Guillaumet, G., Suzenet, F., Richardson, R. M., Poloyac, S. M., Stolz, D. B., Jockers, R., Witt-Enderby, P. A., Carlisle, D. L., Vilardaga, J., Friedlander, R. M., & Cecon, E. (2017). Dual role of mitochondria in producing melatonin and driving GPCR signaling to block cytochrome c release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(38), E7997-E8006.

Tan, D. X., Manchester, L. C., Burkhardt, S., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Kohen, R., Shohami, E., Huo, Y., Hardeland, R., & Reiter, R. J. (2001). N 1-acetyl-N 2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *The FASEB Journal*, 15(12), 2294-2296.

Tosini, G., & Menaker, M. (1998). The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain research*, 789(2), 221-228.

\* Unver, N., & McAllister, F. (2018). IL-6 family cytokines: key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets. *Cytokine & Growth Factor Reviews*.

van der Helm-van Mil, A. H., van Someren, E. J., van den Boom, R., van Buchem, M. A., de Craen, A. J., & Blauw, G. J. (2003). No influence of melatonin on cerebral blood flow in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(12), 5989-5994.

\* Varfolomeev, E., & Vucic, D. (2018). Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine*, 101, 26-32.

Vaughan, M. K., Vaughan, G. M., & Reiter, R. J. (1973). Effect of ovariectomy and constant dark on the weight of reproductive and certain other organs in the female vole, *Microtus montanus*. *Reproduction*, 32(1), 9-14.

Venegas, C., García, J. A., Escames, G., Ortiz, F., López, A., Doerrier, C., García-Corzo, L., López, L. C., Reiter, R. J., & Acuña-Castroviejo, D. (2012). Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *Journal of pineal research*, 52(2), 217-227.

Vishwas, D. K., & Haldar, C. (2014). MT1 receptor expression and AA-NAT activity in lymphatic tissue following melatonin administration in male golden hamster. *International immunopharmacology*, 22(1), 258-265.

Wade, A. G., Farmer, M., Harari, G., Fund, N., Laudon, M., Nir, T., Frydman-Marom, A., & Zisapel, N. (2014). Add-on prolonged-release melatonin for cognitive function and sleep in mild to moderate Alzheimer's disease: a 6-month, randomized, placebo-controlled, multicenter trial. *Clinical interventions in aging*, 9, 947.

Weissbach, H., Redfield, B. G., & Axelrod, J. (1960). Biosynthesis of melatonin: enzymic conversion of serotonin to N-acetylserotonin. *Biochimica et biophysica acta*, 43, 352-353.

Withyachumnarnkul, B., Nonaka, K. O., Santana, C., Attia, A. M., & Reiter, R. J. (1990). Interferon- $\gamma$  modulates melatonin production in rat pineal glands in organ culture. *Journal of interferon research*, 10(4), 403-411.

Wu, M. X., Ao, Z., Prasad, K., Wu, R., & Schlossman, S. F. (1998). IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF- $\kappa$ B-mediated cell survival. *Science*, 281(5379), 998-1001.

Wurtman, R. J., Axelrod, J., & Phillips, L. S. (1963). Melatonin Synthesis in the pineal gland: control by light. *Science*, 142(3595), 1071-1073.

Xu, X., Wang, G., Ai, L., Shi, J., Zhang, J., & Chen, Y. X. (2018). Melatonin suppresses TLR9-triggered proinflammatory cytokine production in macrophages by inhibiting ERK1/2 and AKT activation. *Scientific reports*, 8.

Yang, R. B., Mark, M. R., Gray, A., Huang, A., Xie, M. H., Zhang, M., Goddard, A., Wood, W. I., Gurney, A. L., & Godowski, P. J. (1998). Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature*, *395*(6699), 284.

Yao, Z., Painter, S. L., Fanslow, W. C., Ulrich, D., Macduff, B. M., Spriggs, M. K., & Armitage, R. J. (1995). Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *The Journal of Immunology*, *155*(12), 5483-5486.

Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Slepka, S. M., Hong, H., Oh, W. J., Yoo, O. J., Takahashi, J. S., & Menaker, M. (2004). PERIOD2:: LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(15), 5339-5346.

Zhang, Y., Li, X., Grailer, J. J., Wang, N., Wang, M., Yao, J., Zhong, R., Gao, G. F., Ward, P. A., Tan, D., & Li, X. (2016). Melatonin alleviates acute lung injury through inhibiting the NLRP3 inflammasome. *Journal of pineal research*, *60*(4), 405-414.

Zhao, T., Zhang, H., Jin, C., Qiu, F., Wu, Y., & Shi, L. (2017). Melatonin mediates vasodilation through both direct and indirect activation of BKCa channels. *Journal of molecular endocrinology*, *59*(3), 219-233.