

UKŁAD OPIOIDOWY A ODPORNOŚĆ WRODZONA – BADANIA PORÓWNAWCZE I. OPIOIDY I RECEPTORY OPIOIDOWE*

OPIOID SYSTEM AND INNATE IMMUNITY –
COMPARATIVE STUDIES. I. OPIOIDS AND OPIOID RECEPTORS

Magdalena CHADZIŃSKA

Zakład Immunobiologii Ewolucyjnej, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński,
Kraków; Cell Biology and Immunology Group, Wageningen University, Wageningen,
Holandia

Streszczenie: Obecność receptorów, prohormonów i peptydów opioidowych stwierdzono zarówno u zwierząt bezkręgowych, jak i u kręgowców. Porównanie sekwencji nukleotydów i aminokwasów pozwoliło na wysunięcie wniosku, że wszystkie prohormony opioidowe powstały w wyniku kilkakrotnej duplikacji genu kodującego proenkefalinę. Najprawdopodobniej najpierw powstała proopiomelanokortyna, następnie pronocyceptyna, a w wyniku trzeciej i ostatniej duplikacji prodynorfina. Proopiomelanokortyna jest prohormonem hormonu adrenokortykotropowego, melanotropowego, lipotropin i β -endorfiny. Z proenkefaliny powstają leu- i met-enkefalina, met-enkefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸, met-enkefalina-Arg⁶-Phe⁷ oraz peptydy E i F. Prodynorfina jest natomiast prekursorem dynorfin oraz neoendorfin. Oprócz tego w ostatnich latach odkryto jeszcze nietypowe peptydy opioidowe: endomorfiny, nocycęptynę oraz hemorfiny i kazomorfiny. Peptydy opioidowe są naturalnymi ligandami receptorów opioidowych, wśród których wyróżnia się 4 typy: MOR, DOR, KOR, NOR. Analizy porównawcze sekwencji wykazały bardzo wysoką konserwatywność receptorów opioidowych i potwierdziły przypuszczalną kolejność ich ewoluowania: od receptorów KOR, poprzez DOR, aż do najmłodszych receptorów MOR. Ponadto stwierdzono, że organizmy zwierząt w warunkach stresu zdolne są do produkcji opiatów – alkaloidów opioidowych, między innymi morfiny.

Słowa kluczowe: peptydy opioidowe, opiaty, receptory opioidowe.

Summary: Existence of the opioid receptors, prohormones and peptides is recorded both in invertebrates and vertebrates. The comparative molecular studies of nucleotide and amino acid sequences rose a hypothesis that all opioid prohormones originated by a duplication of proenkephalin gene. Probably, as a first originated proopiomelanocortin, then pronociceptin and after the third and last duplication prodynor-

*Praca finansowana z projektu: FP6-2002-Human Resources and Mobility-5-number 024034, DS773/UJ/2006.

phin. Proopiomelanocortin is the prohormon for adrenocorticotropin and melanocyte stimulating hormone, lipotropins and β -endorphin. From proenkephalin originate leu- and met-enkephalin, met-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸, met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ and peptides E and F. Prodynorphin is a precursor for dynorphins and neoendorphins. Moreover, in last years atypical opioid peptides (endomorphins, nociceptins, hemorphins and casomorphins) were discovered. Those peptides are the natural ligands for opioid receptors. There are four types of opioid receptors: MOR, DOR, KOR and NOR. Comparative analysis of sequence similarities of opioid receptors indicated that they are highly conserved and confirmed supposed evolution order from KOR, through DOR, till to the youngest MOR receptors. Moreover, it was indicated that in stress conditions animal body could also produce opiates – opioid alkaloids, including morphine.

Key words: opioid peptides, opiates, opioid receptors.

Wykopaliska archeologiczne wskazują, że już 4000 lat przed naszą erą alkaloidy, uzyskiwane z maku lekarskiego *Papaver somniferum* L., były znane pod nazwą opium i używane jako środek uśmierzający ból oraz wywołujący stany euforii. W Europie opium rozpowszechniło się w dobie renesansu, a wiek XVII i XVIII to okres badań nad jego wpływem na fizjologię i zachowanie człowieka i zwierząt. Główny aktywny składnik opium, morfina został wyizolowany 1804 roku przez Sterturnera. Kolejnym milowym krokiem w badaniach opioidów było odkrycie na początku lat siedemdziesiątych, że substancje te działają za pośrednictwem specyficznych receptorów zlokalizowanych w mózgu. Logiczną konsekwencją tego odkrycia były poszukiwania ich endogennych ligandów. Dwa pierwsze endogenne ligandy receptorów opioidowych (met- i leu-enkefalina), zostały wyizolowane w 1975 przez Kosterlitz i Hughesa. W latach osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych udało się natomiast zidentyfikować geny kodujące cząsteczki prekursorowe peptydów i receptorów opioidowych [25]. Obecnie w skład układu opioidowego zalicza się cztery typy receptorów opioidowych (MOR, DOR, KOR i NOR) oraz szereg peptydów opioidowych, wśród których najlepiej poznane to: enkefaliny, endorfiny i dynorfiny (tab. 1).

Ostatnie lata przynoszą również bardzo ciekawe hipotezy dotyczące ewolucji układu opioidowego. Przypuszcza się bowiem, że układ ten funkcjonował u zwierząt bezkręgowych początkowo jako część systemu odpowiedzialnego za immunomodulację, a następnie, wraz z pojawieniem się bólu jako czynnika ostrzegania przed zagrożeniem, wyewoluowała jego funkcja przeciwbólowa [41]. Teorię tę uwiarygodnia występowanie zarówno u bezkręgowców, jak i kręgowców takich substancji, jak ekelityny i peptyd B, które powstają z tych samych prohormonów, co peptydy opioidowe, a spełniają funkcje przeciwbakteryjne [38]. Jednak potwierdzenie tej tezy wymaga intensywnych badań zarówno ewolucji układu opioidowego, jak i oddziaływań między tym układem a odpornością ze szczególnym uwzględnieniem organizmów starszych ewolucyjnie niż ssaki. Obecny stan wiedzy w tym zakresie zostanie omówiony w dwóch kolejnych artykułach [Chadzińska 2007].

1. RECEPTORY OPIOIDOWE

Obecnie wyróżnia się trzy typy klasycznych receptorów opioidowych: receptory MOR, DOR i KOR oraz jeden receptor nieklasyczny – ORL1 (ang. *opioid receptor like*), a w ich obrębie szereg podtypów [25]. W związku z zamieszczeniem powstałym w

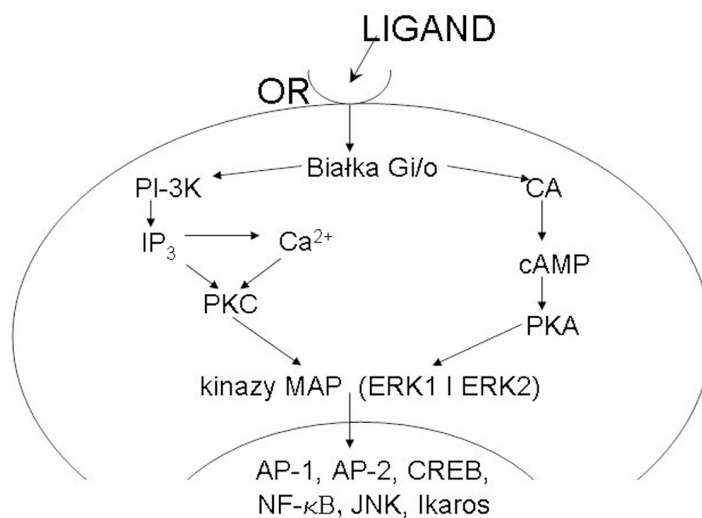
TABELA 1. Pochodzenie, sekwencja aminokwasowa i powinowactwo do receptorów opioidowych kilku peptydów

Pro-hormon	Peptyd	Sekwencja aminokwasowa	Receptor
Proopiomelano-kortyna	β -endorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu	MOR>DOR>KOR
*	Endomorfina-1 Endomorfina-2	Tyr-Pro-Trp-Phe Tyr-Pro-Phe-Phe	MOR MOR
Proenkefalina	Met-enkefalina Leu-enkefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	DOR>MOR>>KOR DOR>MOR>>KOR
Prodynorfina	Dynorfina A	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln	KOR>MOR>DOR
	Rimorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr	KOR>MOR>DOR
	α -neoendorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys	KOR>>DOR
	β -neoendorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro	KOR>>DOR
Pronocyceptyna	Nocyceptyna	Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ile-Arg-Lys-Ala-Asn-Gln	NOR

*Do tej pory nie udało się odnaleźć prohormonu wyjściowego endomorfina

nazewnictwie, podjęto próby jego ujednolicenia i obecnie powszechnie akceptowane są nazwy MOR (μ , μ), DOR (δ , δ), KOR (κ , κ) i NOR (ORL1) [11]. Początkowy podział wynikający z badań biochemicznych i farmakologicznych potwierdzony został sklonowaniem w latach dziewięćdziesiątych wszystkich czterech typów receptorów opioidowych. Bardzo wysokie podobieństwo sekwencji aminokwasowej oraz organizacji genów poszczególnych typów receptorów opioidowych wskazuje na ich wspólne pochodzenie. Geny kodujące KOR i DOR mają trzy egzony, natomiast gen kodujący MOR na końcu 3' – jeszcze dodatkowy czwarty egzon [25]. Receptory opioidowe należą do rodziny receptorów związanych z białkami G, zbudowane są z siedmiu hydrofobowych domen transbłonowych (TMI-VII), trzech pętli hydrofobowych (i1-i3) i C-końcowego fragmentu znajdującego się wewnątrz komórki, natomiast pozostałe trzy pętli (e1-e3) oraz glikozylowany N-koniec znajdują się na zewnątrz komórki [30]. Domeny transbłonowe V-VII odpowiedzialne są za wiązanie ligandów w receptorach DOR, w MOR funkcję taką spełnia pętla e1, a w KOR pętla e2 i TMIV [10]. W przypadku wszystkich trzech receptorów opioidowych zewnątrzkomórkowa część receptora, jak również I domena transbłonowa kodowane są przez egzon pierwszy, domeny transbłonowe II-IV w egzonie drugim, natomiast domeny transbłonowe V-VII i C-końcowy fragment wewnątrzkomórkowy przez egzon trzeci [25]. Pierwsza i trzecia pętla wewnątrz-

komórkowa (i1, i3), domena TMV i C-koniec receptora odpowiedzialne są za transdukcję sygnału za pośrednictwem białek G [9]. Współczesne badania molekularne oraz fakt hamowania działania opioidów przez toksynę krztuśca sugerują, że receptory opioidowe sprzężone są z białkami G_i/G_o , chociaż pojawiają się doniesienia, że także białka G_s mogą pośredniczyć w działaniu opioidów. Jednak w większości modeli doświadczalnych, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, przyłączenie agonisty do receptora opioidowego powoduje aktywację białka G_i i zahamowanie aktywności cyklazy adenylanowej, w wyniku czego w cytoplazmie komórki maleje stężenie cyklicznego adenosynomonofosforanu (cAMP). Opisano również wpływ opioidów na przemianę fosfoinozytoli. Obok bezpośredniego działania na wtórne przekaźniki, opioidy wpływają również na przewodnictwo jonowe. Sądzi się, że mogą hamować przewodnictwo Ca^{2+} oraz nasilać przewodnictwo K^+ . Kluczową rolę w opisanych procesach odgrywają kinazy: kinaza białkowa A (PKA, ang. *protein kinase A*), kinaza białkowa C (PKC, ang. *protein kinase C*), kinaza zależna od wapnia i kalmoduliny (CAMK, ang. *calmodulin dependent kinase*) oraz kinazy MAP (ERK1 i 2, kinazy aktywowane przez sygnały zewnątrzkomórkowe, ang. *extracellularly regulated protein kinases*). W wyniku ich działalności dochodzi do fosforylacji wielu czynników obecnych w cytoplazmie i jądrze komórkowym, np. cząsteczek CREB (czynnik transkrypcyjny aktywowany cAMP, ang. *cAMP response element binding protein*) (ryc. 1) [30].



RYCINA 1. Uproszczony schemat transdukcji sygnału przez receptory opioidowe: OR – receptor opioidowy, PI-3K – kinaza fosfatydylinozytoli, IP_3 – inozytolo-1,4,5-trifosforan, PKA – kinaza białkowa A, PKC – kinaza białkowa C, ERK – kinaza aktywowana przez sygnały zewnątrzkomórkowe, CA – cyklaza adenylowa, cAMP – cykliczny adenosynomonofosforan, NF- κ B – jądrowy czynnik transkrypcyjny κ B, AP – czynnik transkrypcyjny AP, CREB – czynnik transkrypcyjny aktywowany cAMP, JNK – N-końcowa kinaza c-jun, Ikaros – czynnik transkrypcyjny swoisty dla komórek limfoidalnych

Badania receptorów opioidowych komplikuje fakt możliwości ich oligomeryzacji. W obrębie receptorów opioidowych formować się mogą kompleksy zarówno homo-, jak i heteromeryczne [23, 32], ale istnieją również doniesienia o ich łączeniu się z innymi typami receptorów np. adrenergicznymi [11] czy receptorami chemokin [45]. Tworzenie heterodimerów między receptorami opioidowymi może wpływać na zachowanie receptora – jego powinowactwo do ligandów, internalizację czy transdukcję sygnału. I tak na przykład po ekspozycji na agonistów receptory MOR i DOR, ale nie KOR ulegają internalizacji, natomiast w przypadku dimeru DOR-KOR „natura” receptora KOR przeważa i do internalizacji nie dochodzi [11].

Obecność receptorów opioidowych MOR o sekwencji zaskakująco wprost zgodnej z występującą u człowieka stwierdzono w tkance nerwowej i komórkach immunokompetentnych homara [7]. Podobne wyniki, wskazujące na obecność receptorów opioidowych u bezkręgowców, otrzymano dla pijawek [38] i mięczaków [6]. Nie stwierdzono natomiast sekwencji nukleotydowych podobnych do tych kodujących receptory opioidowe u muszki z gatunku *Drosophila* i nicienia *Caenorhabditis elegans* [28, 29]. W przypadku zwierząt kręgowych pełną sekwencję cDNA receptorów opioidowych udało się uzyskać jedynie dla 4 gatunków: myszy, szczura, człowieka oraz ryby – danio pręgowanego (*Danio rerio*), istnieją jednak albo częściowe sekwencje, albo dane farmakologiczne świadczące o obecności receptorów opioidowych również u innych kręgowców [2, 37, 44]. I tak udało się stwierdzić obecność receptorów opioidowych typu KOR, MOR i DOR u ptaków, płazów oraz ryb chrzęstno- i kostnoszkieletowych [44]. Badania molekularne pozwoliły też odnaleźć u bezzuchwowców trzy różne sekwencje nukleotydowe, podobne do tych, które kodują receptory opioidowe żuchwowców. Analizy porównawcze wykazały wysoką konserwatywność sekwencji aminokwasowych praktycznie całej cząsteczki receptorów opioidowych z wyjątkiem zewnątrzkomórkowego N-końca [28, 29]. Badania te potwierdziły również przypuszczalną kolejność ewoluowania receptorów od KOR, poprzez DOR, aż do najmłodszych receptorów MOR [44].

1.1. Receptory opioidowe na komórkach immunokompetentnych

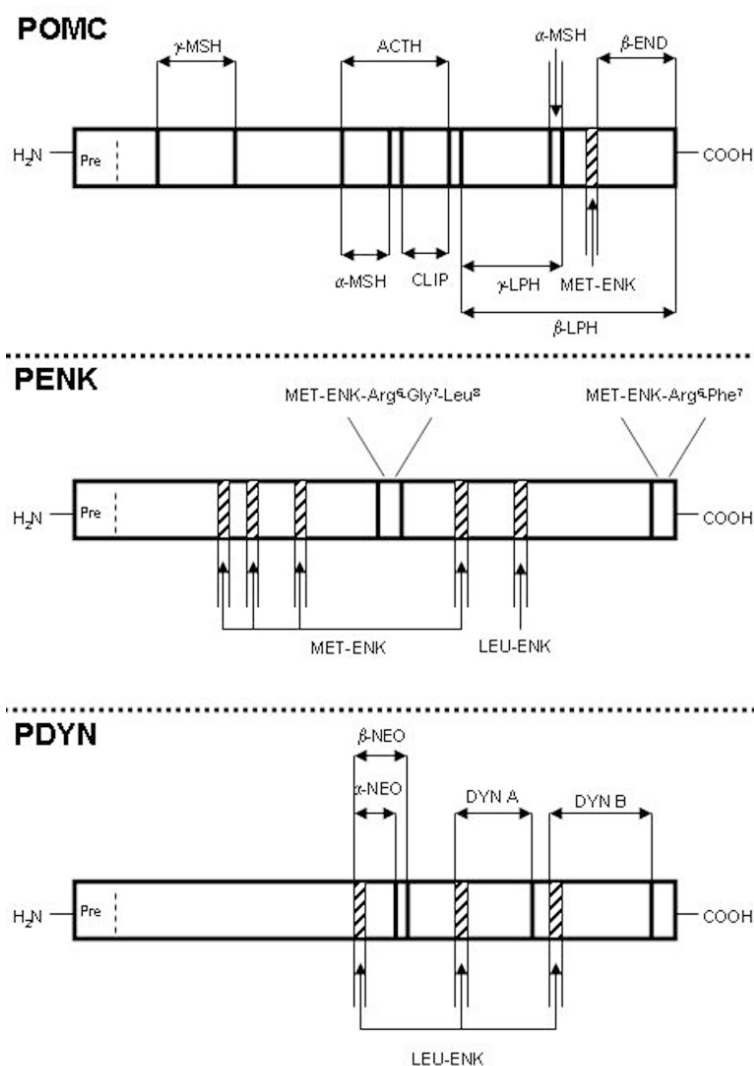
Występowanie receptorów opioidowych na komórkach układu odpornościowego stwierdzono początkowo wykorzystując techniki wiązania radioligandów, co pozwoliło na wykrycie szeregu nietypowych miejsc wiążących [39]. Na przykład na limfocytach krwi obwodowej człowieka stwierdzono obecność miejsca selektywnie wiążącego morfinę. Występowanie podobnego receptora o niskim powinowactwie do peptydów opioidowych, wiążącego natomiast specyficznie morfinę stwierdzono też na makrofagach linii komórkowych J774.2, BAC1.2F-5, RAW 264 [39], a także na leukocytach ryb [24] i w tkankach bezkręgowców [43]. Co ciekawe, wskazuje się na rolę tego receptora w zależnym od morfiny wydzielaniu tlenu azotu [39]. Inny nietypowy receptor opioidowy silnie wiążący β -endorfinę, ale niewrażliwy na morfinę i nalokson znaleziono na splenocytach myszy, monocytarnej linii komórkowej U937 oraz na ludzkiej linii promonocytarnej. Wyniki wskazujące na obecność receptorów opioidowych na leukocytach zostały potwierdzone przy wykorzystaniu techniki RT-PCR (ang. *real-time*

polymerase chain reaction). Początkowo metoda ta pozwoliła na stwierdzenie obecności mRNA kodującego receptor DOR w monocytach krwi małop, a następnie w limfocytach T i B człowieka i wielu ludzkich i mysich monocytarnych i limfocytarnych liniach komórkowych. Obecność mRNA kodującego receptor MOR stwierdzono między innymi w szczurzych makrofagach otrzewnowych, monocytach krwi człowieka i małop, natomiast ekspresja receptorów DOR miała miejsce na przykład w ludzkich limfocytach krwi i niedojrzałych tymocytach [39].

W tym miejscu należy wspomnieć, że tylko część immunomodulacyjnego działania opioidów odbywa się za pośrednictwem receptorów zlokalizowanych na leukocytach, natomiast za część odpowiedzialne są receptory zlokalizowane w centralnym systemie nerwowym [22]. Działając za pośrednictwem tych ostatnich opioidy mogą wpływać na wydzielanie zarówno kortykosteroidów, jak i katecholamin [3]. Zagadnienie wzajemnych oddziaływań między opioidami a odpornością zostanie szerzej omówione w części II. „Opioidy a odczyn zapalny”.

2. PEPTYDY OPIOIDOWE I OPIATY

Jak już wspomniano na wstępie, odkrycie na początku lat siedemdziesiątych przez Goldsteina i współpracowników obecności miejsc specyficznie wiążących egzogenną morfinę w homogenatach mózgów szczurów zasugerowało istnienie w organizmach zwierząt endogennych ligandów tych receptorów. Okazały się nimi peptydy opioidowe produkowane zarówno przez struktury centralnego i obwodowego systemu nerwowego, jak również przez inne układy, np. układ hormonalny, pokarmowy oraz odpornościowy [22]. Powstają one w wyniku zmian potranslacyjnych z prohormonów opioidowych przy udziale podobnych do subtilizyny konwertaz prohormonów – PC (ang. *subtilisin-like prohormone convertase*). I tak na przykład od obecnej w przednim płacie przysadki mózgowej proopiomelanokortyny (POMC, ang. *proopiomelanocortin*) przy udziale konwertazy I-PC1 (inna nazwa SPC3) odcinane są hormon adrenokortykotropowy (ACTH, ang. *adrenocorticotrophin*) i β -lipotropina (β -LPH, ang. *β -lipotropin*). Z kolei w środkowym płacie przysadki PC2 (SPC2) z POMC odcina hormon melanotropowy (α -MSH, ang. *α -melanocyte stimulating hormone*), peptyd kortykotropowopodobny (CLIP, ang. *corticotropin-like intermediate-lobe peptide*), γ LPH i β -endorfinę [26]. Proenkefalina (PENK, ang. *proenkephalin*) jest prekursorem leu-enkefaliny, met-enkefaliny, met-enkefaliny-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸, met-enkefaliny-Arg⁶-Phe⁷, peptydu E i F, ale także wykazujących działanie antybakteryjne enkefitaliny i peptydu B [4, 26]. Z prodynorfiny (PDYN, ang. *prodynorphin*) natomiast powstają: dynorfiny A i B (rimorfiny) oraz α - i β -neoendorfiny (ryc. 2) [26]. Typowe peptydy opioidowe na N-końcu łańcucha polipeptydowego mają charakterystyczną sekwencję: H-Tyr-Gly-Gly-Phe. Sekwencji tej nie mają natomiast atypowe peptydy opioidowe, takie jak: endomorfiny wiążące się z dużym powinowactwem do receptorów MOR, nocycetyna – ligand receptora ORL1 (NOR) oraz hemorfiny i kazomorfiny. Dwie ostatnie grupy opioidów są również nietypowe ze względu na swoje pochodzenie; kazomorfiny (eksorfiny) pochodzą z trawienia glutenu



RYCINA 2. Prohormony opioidowe jako źródło peptydów opioidowych i hormonów: ACTH – hormon adrenokortykotropowy, CLIP – peptyd kortykotropowopodobny, DYN – dynorfina, END – endorfina, ENK – enkefalina, LPH – lipotropina, MSH – hormon melanotropowy, NEO – neoendorfina, POMC – proopiomelanokortyna, PENK – proenkefalina, PDYN – prodynorfina

i α -kazeiny i przez niektórych badaczy podejrzewane są o to, iż spełniają istotną rolę w rozwoju autyzmu [36]. Z kolei źródłem hemorfin jest hemoglobina [34]. W tabeli 1 zestawiono sekwencje aminokwasowe kilku peptydów opioidowych oraz ich powinowactwo do różnego typu receptorów opioidowych.

Jak już wspomniano, prohormony i peptydy opioidowe produkowane są głównie przez komórki nerwowe centralnego i obwodowego systemu nerwowego [22], teraz jednak istnieją już niezbite dowody na to, że mogą być także produkowane w innych tkankach, w tym także przez komórki układu odpornościowego. Pierwsze doniesienia

na temat zdolności komórek immunokompetentnych do produkcji opioidów pochodzą z prac grupy J. Edwina Blalocka [3]. Wykazali oni między innymi, że stymulacja leukocytów lipopolisacharydem (LPS) czy wirusami (np. NDV, ang. *Newcastle Disease Virus*), a także kortykoliberyną pobudza komórki do syntezy *de novo* ACTH i endorfin [3]. Ci sami autorzy stwierdzili, że w zależności od typu stymulanta leukocyty wytwarzają różne peptydy, np. stymulacja kortykoliberyną lub NDV powoduje powstanie ACTH(1-39) i β -endorfiny, podczas gdy stymulacja LPS przyczynia się do powstania ACTH(1-22) i γ -endorfiny, co najprawdopodobniej związane jest z aktywacją różnego typu proteaz [3]. Lata późniejsze potwierdziły wyniki uzyskane przez Blalocka i metodami biologii molekularnej stwierdzono w leukocytach najpierw obecność mRNA kodującego proopiomelanokortynę, proenkefalinę i prodynorfinę [5], a następnie nocycęptynę [17].

Większość badań dotyczących budowy i funkcji peptydów opioidowych prowadzona jest na ssakach, jednak dla prześledzenia ewolucji tego układu istotne jest również zbadanie obecności tych peptydów u innych kręgowców i u bezkręgowców. Wyniki te sugerują, że wszystkie prohormony opioidowe powstały w wyniku kilkakrotnej duplikacji genu kodującego proenkefalinę [12]. Najprawdopodobniej w wyniku pierwszej duplikacji doszło do powstania proopiomenalokortyny, następnie pronocycęptyny, a w wyniku trzeciej i ostatniej duplikacji powstała prodynorfina. Hipotezę tę potwierdza analiza podobieństw sekwencji aminokwasowych poszczególnych prohormonów w stosunku do proenkefaliny: dla prodynorfiny wynosi ona 26,4–30,1%, dla pronocycęptyny 15,8–19,4%, a dla POMC 14,8–16,8% [12].

Do tej pory obecność peptydów opioidowych powstałych z proenkefaliny stwierdzono w tkance nerwowej i hemolimfie pierścienic [38] i mięczaków [41], a także w tkankach ryb kostnoszkieletowych i dwudysznych, płazów, gadów i ssaków [14, 40]. Stwierdzono, że podobieństwo sekwencji proenkefaliny pierścienic i kręgowców jest niewielkie, np. do proenkefaliny płazów wynosi ono 26,2% [38]. Z kolei cząsteczka wyizolowana od morskiego małża (*Mytilus edulis*) wykazuje zaskakująco duże, bo 50% podobieństwo sekwencji do proenkefaliny świnki morskiej [41].

Stosunkowo najwięcej wiadomo o ewolucji i występowaniu proopiomelanokortyny. Podobnie, jak to miało miejsce w przypadku proenkefaliny, produkty pochodzące z POMC odnaleziono w hemolimfie mięczaków [42] i pijawek [38]. U tych ostatnich spośród sześciu wykrytych peptydów pochodzących z prohormonu podobnego do POMC (ang. *POMC-like prohormone*), trzy: met-enkefalina, α -MSH i ACTH wykazują bardzo wysokie podobieństwo sekwencji do swoich odpowiedników występujących u kręgowców (odpowiednio 100, 84,6 i 70%). Natomiast trzy pozostałe: γ -MSH, β -endorfina i γ -LPH wykazują tylko 45, 20 i 10% podobieństwa [38]. Nie stwierdzono natomiast występowania podobnych cząsteczek u obleńców, owadów i osłonicy [15]. Co ciekawe u bezzuchwowców (*Agnatha*) stwierdzono ekspresję 2 różnych prohormonów odpowiadających funkcjonalnie POMC: proopiokortyny (POC, ang. *proopiocortin*), z której powstaje ACTH, α -MSH i β -endorfina oraz proopio-melanotropiny (POM, ang. *proopiomelanotropin*), z której odcinane są cząsteczki podobne do α - i β -MSH i β -endorfina o nieco odmiennej sekwencji [49]. Spośród zuchwowców (*Gnathostomata*) do tej pory obecność POMC stwierdzono zarówno u ryb chrzęstnoszkieletowych, kostnoszkieletowych, dwudysznych oraz płazów, gadów, ptaków i oczywiście ssaków [12, 19, 48, 49]. Nieomal we wszystkich przypadkach

N-końcowy fragment POMC jest bardzo konserwatywny, natomiast fragment C-końcowy wydaje się bardziej zmienny [19]. Zarówno u kręgowców lądowych, jak i u ryb dwudysznych stwierdzono w POMC występowanie sekwencji odpowiadających α -, β - i γ -MSH, u ryb chrzęstnoszkieletowych występuje jeszcze dodatkowo unikatowa sekwencja δ -MSH, podczas gdy u ryb kostnoszkieletowych nie stwierdzono obecności γ -MSH [47]. Ponadto u niektórych ryb stwierdzono występowanie dwóch, a nawet trzech różnych podtypów proopiomelanokortyny [46].

Porównanie sekwencji prodynorfiny w różnych gromadach zwierząt wydaje się potwierdzać tezę o powstaniu genu prodynorfiny w wyniku duplikacji genu kodującego proenkefalinę. W genie prodynorfiny zarówno u płazów, jak i ryb dwudysznych odnaleziono sekwencje kodujące met- i leu-enkefalinę, co wskazuje na homologię do ssaczego genu kodującego proenkefalinę [1]. Do tej pory obecność prodynorfiny i cząsteczek wywodzących się z tego prohormonu stwierdzono u pierścienic (obecna u nich prodynorfina wykazuje 22% podobieństwa do prodynorfiny człowieka i świni) [37], u ryb kostnoszkieletowych i dwudysznych, płazów i ssaków [1, 12, 16]. Nie stwierdzono natomiast do tej pory występowania peptydów wywodzących się z prodynorfiny u bezzuchwoców [12].

Sklonowano również gen kodujący pronocyceptynę u ssaków, a także ryb chrzęstno- i kostnoszkieletowych [13, 18]. Ponadto obecność nocyceptyny została stwierdzona metodami immunohistochemicznymi u ślimaka *Helix aspersa* [27].

U płazów stwierdzono natomiast występowanie dwóch unikatowych grup peptydów opioidowych: dermorfin i deltorfin, wiążących się z dużym powinowactwem odpowiednio do receptorów opioidowych MOR i DOR [33].

2.1. Opiaty

Duże powinowactwo do receptorów opioidowych wykazują również alkaloidy opioidowe – opiaty, pozyskiwane albo z maku lekarskiego, albo półsyntetyczne (heroina, hydromorfina) lub syntetyczne ich pochodne (meperydyna, metadon, fencyklidyna, fentanyl). Znane są dwa typy występujących w opium alkaloidów: fenantrenowe, do których należą tebaina, kodeina i morfina oraz izochinolinowe: papaweryna, narkotyna, narceina [35]. W tabeli 2 zestawiono często używane w badaniach opioidy będące agonistami lub antagonistami receptorów opioidowych.

Zjawisku syntezy retikuliny, tebainy, kodeiny i innych prekursorów morfiny, a także samej morfiny w komórkach bezkręgowców i kręgowców poświęcono więcej miejsca w kilku zagranicznych pracach przeglądowych [np. 21, 43], a także w opublikowanej na łamach Postępów Biologii Komórki pracy na temat wpływu morfiny na układ odpornościowy kręgowców [8]. W tym miejscu więc tylko dla porządku zaznaczę, że pierwsze doniesienia na temat syntezy morfiny i kodeiny w komórkach zwierząt pochodzą z prac grupy Spector. Odkryli oni występowanie morfiny w mózgu myszy i bydła domowego, następnie u szczurów i królików oraz w skórze ropuch [21, 43]. Dalsze badania pozwoliły również na wykrycie tego alkaloidu w mózgach szczurów, a potem człowieka, w tkance nerwowej i hemolimfie homara oraz w osoczu węgorza [21, 43]. Ciekawe zjawisko związane z endogenną produkcją morfiny przez komórki zwierząt opisano w przypadku glisty świńskiej *Ascaris suum*. Przy pomocy techniki

TABELA 2. Przykłady agonistów i antagonistów receptorów opioidowych

Receptor	Agonista	Antagonista
MOR	Morfina; DAMGO; Endorfina-1, Endomorfina-2	CTOP; TCTAP
DOR	DPDPE; Deltorfina I i II; SNC80	Naltrindol; BNTX, NTB
KOR	U50,488H; U69,593	nor-BNI

HPLC (wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa, ang. *high performance liquid chromatography*) stwierdzono, że gatunek ten zdolny jest do produkcji i wydzielania do środowiska morfiny, nie ma natomiast receptorów opioidowych zdolnych do wiązania tego alkaloidu. Autorzy pracy przypuszczają zatem, że główna funkcja produkowanej przez glistę ludzką morfiny polega na tłumieniu bólu i poczucia dyskomfortu gospodarza [20].

3. PODSUMOWANIE

Przez szereg lat badania układu opioidowego ograniczały się niemal wyłącznie do ssaków, jednak w ostatnich latach rozwój nowych metod badawczych umożliwił scharakteryzowanie tego układu również u kręgowców zmiennocieplnych i bezkręgowców. Badania te pozwoliły nie tylko na prześledzenie ewolucji prohormonów i receptorów opioidowych, ale także spowodowały pojawienie się intrygującej hipotezy o pierwotnych antybakteryjnych i immunomodulujących funkcjach opioidów. Hipotezę tę potwierdzają również dane o występowaniu na powierzchni leukocytów receptorów opioidowych oraz fakt, że komórki te po odpowiedniej stymulacji są zdolne do syntezy i wydzielania peptydów opioidowych. Wydaje się ponadto, że produkowane przez leukocyty opioidy spełniają szczególną rolę podczas toczącego się zapalenia [22], co szczegółowo zostanie omówione w drugiej części niniejszej pracy.

Podziękowanie

Bardzo dziękuję Pani Prof. dr hab. Barbarze Płytycz za dyskusję i uwagi.

LITERATURA

- [1] ALRUBAIAN J, LECAUDE S, BARBA J, SZYNSKIE L, JACOBS N, BAUER D, BROWN C, KAMINER I, BAGROSKY B, DORES RM. Trends in the evolution of the prodynorphin gene in teleosts: cloning of eel and tilapia prodynorphin cDNAs. *Peptides* 2006; **27**: 797–804.
- [2] BARRALLO A, GONZALEZ-SARMIENTO R, ALVAR F, RODRIGUEZ RE. ZFOR2, a new opioid receptor-like gene from the teleost zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res Mol Brain Res* 2000; **84**: 1–6.
- [3] BLALOCK JE. The immune system as the sixth sense. *J Intern Med* 2005; **257**: 126–138.

- [4] BROGDEN KA, GUTHMILLER JM, SALZET M, ZASLOFF M. The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. *Nat Immunol* 2005; **6**: 558–564.
- [5] CABOT PJ, CARTER L, SCHAFER M, STEIN C. Methionine-enkephalin-and dynorphin A-release from immune cells and control of inflammatory pain. *Pain* 2001; **93**: 207–212.
- [6] CADET P, ZHU W, MANTIONE KJ, BAGGERMAN G, STEFANO GB. Cold stress alters *Mytilus edulis* pedal ganglia expression of mu opiate receptor transcripts determined by real-time RT-PCR and morphine levels. *Brain Res Mol Brain Res* 2002; **99**: 26–33.
- [7] CASARES FM, MCELROY A, MANTIONE K, BAGGERMANN G, ZHU W, STEFANO GB. The American lobster, *Homarus americanus*, contains morphine that is coupled to nitric oxide release in its nervous and immune tissues: Evidence for neurotransmitter and hormonal signaling. *Neuro Endocrinol Lett* 2005; **26**: 89–97.
- [8] CHADZINSKA M. Wpływ morfiny na układ odpornościowy kręgowców. *Post Biol Kom* 2002; **29**: 637–655.
- [8a] CHADZINSKA M. Układ opioidowy a odporność wrodzona – badania porównawcze. II. Opioidy a odczyn zapalny. *Post Biol Kom* 2007; **34**: 263–281.
- [9] CHAN AS, LAW PY, LOH HH, HO PN, WU WM, CHAN JS, WONG YH. The first and third intracellular loops together with the carboxy terminal tail of the delta-opioid receptor contribute toward functional interaction with Galphal6. *J Neurochem* 2003; **87**: 697–708.
- [10] CHATURVEDI K, CHRISTOFFERS KH, SINGH K, HOWELLS RD. Structure and regulation of opioid receptors. *Biopolymers* 2000; **55**: 334–346.
- [11] CORBETT AD, HENDERSON G, MCKNIGHT AT, PATERSON SJ. 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. *Br J Pharmacol* 2006; **147** Suppl 1: S153–162.
- [12] DANIELSON PB, DORES RM. Molecular evolution of the opioid/orphanin gene family. *Gen Comp Endocrinol* 1999; **113**: 169–186.
- [13] DANIELSON PB, HOVERSTEN MT, FITZPATRICK M, SCHRECK C, AKIL H, DORES RM. Sturgeon orphanin, a molecular „fossil” that bridges the gap between the opioids and orphanin FQ/nociceptin. *J Biol Chem* 2001; **276**: 22114–22119.
- [14] DORES RM, COSTANTINO D, WALNUTT J, DANIELSON PB, LECAUDE S. Analyzing the radiation of the proenkephalin gene in tetrapods: cloning of a *Bombina orientalis* proenkephalin cDNA. *Peptides* 2001; **22**: 2021–2025.
- [15] DORES RM, LECAUDE S. Trends in the evolution of the proopiomelanocortin gene. *Gen Comp Endocrinol* 2005; **142**: 81–93.
- [16] DORES RM, SOLLARS C, LECAUDE S, LEE J, DANIELSON P, ALRUBAIAN J, LIHRMAN I, JOSS JM, VAUDRY H. Cloning of prodynorphin cDNAs from the brain of Australian and African lungfish: implications for the evolution of the prodynorphin gene. *Neuroendocrinology* 2004; **79**: 185–196.
- [17] FISET ME, GILBERT C, POUBELLE PE, POULIOT M. Human neutrophils as a source of nociceptin: a novel link between pain and inflammation. *Biochemistry* 2003; **42**: 10498–10505.
- [18] GONZALEZ-NUNEZ V, GONZALEZ-SARMIENTO R, RODRIGUEZ RE. Cloning and characterization of a full-length pronociceptin in zebrafish: evidence of the existence of two different nociceptin sequences in the same precursor. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1629**: 114–118.
- [19] GONZALEZ-NUNEZ V, GONZALEZ-SARMIENTO R, RODRIGUEZ RE. Identification of two proopiomelanocortin genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res Mol Brain Res* 2003; **120**: 1–8.
- [20] GOUMON Y, CASARES F, PRYOR S, FERGUSON L, BROWNAWELL B, CADET P, RIALAS CM, WELTERS ID, SONETTI D, STEFANO GB. *Ascaris suum*, an intestinal parasite, produces morphine. *J Immunol* 2000; **165**: 339–343.
- [21] GUARNA M, GHELARDINI C, GALEOTTI N, STEFANO GB, BIANCHI E. Neurotransmitter role of endogenous morphine in CNS. *Med Sci Monit* 2005; **11**: 190–193.
- [22] JANSON W, STEIN C. Peripheral opioid analgesia. *Curr Pharm Biotechnol* 2003; **4**: 270–274.
- [23] JORDAN BA, CVEJIC S, DEVI LA. Opioids and their complicated receptor complexes. *Neuropsychopharmacology* 2000; **23**: S5–S18.
- [24] JOZEFOWSKI S, PLYTYCZ B. Characterization of opiate binding sites on the goldfish (*Carassius auratus* L.) pronephric leukocytes. *Pol J Pharmacol* 1997; **49**: 229–237.
- [25] KIEFFER BL, GAVERIAUX-RUFF C. Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol* 2002; **66**: 285–306.
- [26] LAURENT V, JAUBERT-MIAZZA L, DESJARDINS R, DAY R, LINDBERG I. Biosynthesis of proopiomelanocortin-derived peptides in prohormone convertase 2 and 7B2 null mice. *Endocrinology* 2004; **145**: 519–528.
- [27] LEON-OLEA M, MILLER-PEREZ C, CRUZ R, ANTON B, VEGA R, SOTO E. Immunohistochemical localization and electrophysiological action of nociceptin/orphanin-FQ in the snail (*Helix aspersa*) neurons. *Neurosci Lett* 2001; **316**: 141–144.

- [28] LI X, KEITH DE JR, EVANS CJ. μ -opioid receptor-like sequences are present throughout vertebrate evolution. *J Mol Evol* 1996; **43**: 179–184.
- [29] LI X, KEITH DE JR, EVANS CJ. Multiple opioid receptor-like genes are identified in diverse vertebrate phyla. *FEBS Lett* 1996; **397**: 25–29.
- [30] MARTIN-KLEINER I, BALOG T, GABRILOVAC J. Signal transduction induced by opioids in immune cells: a review. *Neuroimmunomodulation* 2006; **13**: 1–7.
- [31] McCARTHY L, WETZEL M, SLIKER JK, EISENSTEIN TK, ROGERS TJ. Opioids, opioid receptors, and the immune response. *Drug Alcohol Depend* 2001; **62**: 111–123.
- [32] MILLIGAN G, MURDOCH H, KELLETT E, WHITE JH, FENG GJ. Interactions between G-protein-coupled receptors and periplakin: a selective means to regulate G-protein activation. *Biochem Soc Trans* 2004; **32**: 878–880.
- [33] NEGRI L, MELCHIORRI P, LATTANZI R. Pharmacology of amphibian opiate peptides. *Peptides* 2000; **21**: 1639–1647.
- [34] NYBERG F, SANDERSON K, GLAMSTA EL. The hemorphins: a new class of opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin. *Biopolymers* 1997; **43**: 147–156.
- [35] PRAJAPATI S, BAJPAI S, SINGH D, LUTHRA R, GUPTA MM, KUMAR S. Alkaloid profiles of the Indian land races of the opium poppy *Papaver somniferum* L. *Gen Resc Crop Evol* 2002; **49**: 158–180.
- [36] REICHELTL KL, KNIVSBERG AM. Can the pathophysiology of autism be explained by the nature of the discovered urine peptides? *Nutr Neurosci* 2003; **6**: 19–28.
- [37] RODRIGUEZ RE, BARRALLO A, GARCIA-MALVAR F, McFADYEN IJ, GONZALEZ-SARMIENTO R, TRAYNOR JR. Characterization of ZFOR1, a putative delta-opioid receptor from the teleost zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Lett* 2000; **288**: 207–210.
- [38] SALZET M. Neuropeptide-derived antimicrobial peptides from invertebrates for biomedical applications. *Curr Med Chem* 2005; **12**: 3055–3061.
- [39] SHARP BM. Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling. *Brain Behav Immun* 2006; **20**: 9–14.
- [40] SOLLARS C, DANIELSON P, JOSS JM, DORES RM. Deciphering the origin of Met-enkephalin and Leu-enkephalin in Lobe-finned fish: cloning of australian lungfish proenkephalin. *Brain Res* 2000; **874**: 131–136.
- [41] STEFANO GB, SALZET B, FRICCHIONE GL. Enkephalin and opioid peptide association in invertebrates and vertebrates: immune activation and pain. *Immunol Today* 1998; **19**: 265–268.
- [42] STEFANO GB, SALZET-RAVEILLON B, SALZET M. *Mytilus edulis* hemolymph contains pro-opiomelanocortin: LPS and morphine stimulate differential processing. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; **63**: 340–350.
- [43] STEFANO GB, SCHARRER B, SMITH EM, HUGHES TK JR, MAGAZINE HI, BILFINGER TV, HARTMAN AR, FRICCHIONE GL, LIU Y, MAKMAN MH. Opioid and opiate immunoregulatory processes. *Crit Rev Immunol* 1996; **16**: 109–144.
- [44] STEVENS CW. Opioid research in amphibians: an alternative pain model yielding insights on the evolution of opioid receptors. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; **46**: 204–215.
- [45] SUZUKI S, CHUANG LF, YAU P, DOI RH, CHUANG RY. Interactions of opioid and chemokine receptors: oligomerization of mu, kappa, and delta with CCR5 on immune cells. *Exp Cell Res* 2002; **280**: 192–200.
- [46] TAKAHASHI A, AMANO M, AMIYA N, YAMANOME T, YAMAMORI K, KAWAUCHI H. Expression of three proopiomelanocortin subtype genes and mass spectrometric identification of POMC-derived peptides in pars distalis and pars intermedia of barfin flounder pituitary. *Gen Comp Endocrinol* 2006; **145**: 280–286.
- [47] TAKAHASHI A, AMEMIYA Y, NOZAKI M, SOWER SA, KAWAUCHI H. Evolutionary significance of proopiomelanocortin in agnatha and chondrichthyes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2001; **129**: 283–289.
- [48] TAKAHASHI A, ITOHT, NAKANISHI A, AMEMIYA Y, IDA H, MEGURO H, KAWAUCHI H. Molecular cloning of proopiomelanocortin cDNA in the ratfish, a holocephalan. *Gen Comp Endocrinol* 2004; **135**: 159–165.
- [49] TAKAHASHI A, NAKATA O, KASAHARA M, SOWER SA, KAWAUCHI H. Structures for the proopiomelanocortin family genes proopiocortin and proopiomelanotropin in the sea lamprey *Petromyzon marinus*. *Gen Comp Endocrinol* 2005; **144**: 174–181.

Redaktor prowadzący – Janusz Kubrakiewicz

Otrzymano: 24.10. 2006 r.

Przyjęto: 02.02. 2007 r.

Cell Biology and Immunology Group, Wageningen University

Marijkeweg 40, Wageningen, 6709 PG, The Netherlands

e-mail: Magda.Chadzinska@wur.nl