

UKŁAD OPIOIDOWY A ODPORNOŚĆ WRODZONA – BADANIA PORÓWNAWCZE II. OPIOIDY A ODCZYN ZAPALNY*

OPIOID SYSTEM AND INNATE IMMUNITY –
COMPARATIVE STUDIES. II. OPIOIDS AND INFLAMMATION

Magdalena CHADZIŃSKA

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

Streszczenie: Utrzymanie homeostazy organizmu wymaga sprawnego współdziałania układów odpornościowego, hormonalnego i nerwowego, w tym także układu opioidowego. Opioidy mogą wpływać na funkcjonowanie układu odpornościowego zarówno bezpośrednio poprzez receptory opioidowe zlokalizowane na leukocytach, albo pośrednio poprzez pobudzenie wydzielania kortykosterydów i katecholamin. Leukocyty są również zdolne do syntezy i wydzielania peptydów opioidowych, które działają przeciwbólowo podczas toczącego się odczynu zapalnego. Wiele wyników wskazuje, że podczas zapalenia spełniają one również funkcje immunomodulacyjne, wpływając między innymi na migrację leukocytów, ich aktywność bakteriobójczą czy apoptozę. Badania porównawcze układu opioidowego bezkręgowców i kręgowców wskazują na konserwatywność tego systemu, ale co ciekawe, również zdają się potwierdzać teorię, że opioidy pierwotnie spełniały funkcję przeciwbakteryjną i immunomodulującą, a dopiero wraz ze skomplikowaniem systemu nerwowego i pojawieniem się bólu jako czynnika ostrzegania wyewoluowała ich funkcja przeciwbólowa. Obecna praca stanowi przegląd najnowszej literatury dotyczącej powiązań pomiędzy opioidami a odpornością wrodzoną, w szczególności odczynem zapalnym pojawiającym się zarówno u kręgowców, jak i bezkręgowców.

Słowa kluczowe: opioidy, fagocyty, zapalenie, leukocyty.

Summary: Homeostasis is critically dependent on communication between the immune, endocrine and nervous systems, and also the opioid system. Opioids can affect immune processes directly through the activation of opioid receptors on leukocytes or indirectly through the stimulation of the corticosteroid and catecholamine release. Leukocytes can also synthesize and release opioid peptides, which act as analgesic factors during inflammatory process. Many data indicate that opioids are also immunomodulators, and

*Źródło finansowania: FP6-2002-Human Resources and Mobility-5-number 024034, BW/IZ/18/2005.

can affect leukocyte migration, killing activity and apoptosis. The comparative studies of invertebrates and vertebrates indicate that the opioid system is strongly conserved. Moreover, it has been proposed that opioids arose as antibacterial and immunomodulatory peptides and that the analgesic properties were developed later in evolution, when the nervous system become more complicated and the pain appeared to be an alerting process. The present work is a review of the papers concerning the connection between opioids and innate immunity, in particular inflammatory reactions.

Key words: opioids, phagocytes, inflammation, leukocytes.

Jak wspomniano na wstępie do cz. I. „Opioidy i receptory opioidowe”, istnieje hipoteza, że opioidy początkowo spełniały funkcję immunomodulacyjną, a ich funkcja przeciwbólowa wyewoluowała później wraz ze skomplikowaniem układu nerwowego. Obecnie nie ulega już wątpliwości, że opioidy wpływają na przebieg reakcji odpornościowych. Dzieje się tak poprzez zlokalizowane na leukocytach receptory opioidowe, których obecność wykryto metodami biochemicznymi i potwierdzono technikami biologii molekularnej zarówno u ssaków, jak i kręgowców zmiennocieplnych, a także u bezkręgowców [35, 85, 93]. Opioidy wiążąc się z receptorami opioidowymi w centralnym systemie nerwowym mogą również pobudzać wydzielanie kortykosteroidów i katecholamin i w ten sposób pośrednio modulować reakcje odpornościowe [8].

1. WPŁYW OPIOIDÓW NA FAGOCYTY

1.1. Rozpoznanie antygeny i fagocytoza

Stwierdzono, że agoniści receptorów opioidowych typu MOR i DOR wykazują tendencję do hamowania fagocytozy. Przykładowo, morfina i selektywny agonista receptorów opioidowych typu MOR – DAMGO (Tyr-D-Ala-Gly-N-methyl-Phe-Glyol-enkefalina) hamują fagocytozę *Candida albicans* przez makrofagi [95]. Również inni selektywni agoniści tego samego typu receptora – endomorfina-1 i -2 hamują fagocytozę opsonizowanych bakterii *Escherichia coli* przez makrofagi [1, 2]. Co ciekawe zarówno endomorfina-1, jak i -2 nie wpływają na fagocytozę nieopsonizowanych bakterii [1, 2, 31]. Wyniki te pozostają w sprzeczności z zaobserwowanym przez tych samych autorów stymulującym wpływem endomorfiny-1 i -2 na ekspresję integriny Mac-1, będącej receptorem czynnika C3b dopełniacza (inna nazwa receptora to CR3) [1, 2, 31]. Z kolei wyniki wskazujące na hamujący wpływ agonistów receptorów typu MOR na ekspresję receptorów zaangażowanych w fagocytozę: CR1, CR3 i FcγR można znaleźć w pracy Weltersa i współpracowników [102]. W zgodzie z tym pozostają, otrzymane przez Lugo-Chinchilla i współpracowników [51], wyniki pokazujące, że morfina hamuje zależną od FcγR fagocytozę w makrofagach, a zjawisko to jest hamowane przez toksynę krztuśca, co wskazuje na zaangażowanie w tym procesie receptorów związanych z białkami Gi. Podobne zjawisko obniżenia ekspresji receptora CR3 stwierdzono również w przypadku inkubacji neutrofilów szpiku kostnego myszy z agonistą receptorów typu KOR – U50,488H [46]. Przeciwnie, tzn. wskazujące na wzrost ekspresji receptorów CR1, CR3 i FcγR wyniki otrzymano z kolei inkubując neutrofile z agonistami receptorów typu DOR [57].

Wpływ morfiny na fagocytozę zależy od czasu inkubacji komórek z opioidem oraz od sposobu jego podania. I tak na przykład morfina hamuje pochłanianie przez makrofagi zopsonizowanych erytrocytów w 30. minucie inkubacji, ale nasila ten proces po 17 godzinach inkubacji [48]. W przypadku jednorazowego, ostrego podania morfiny lub selektywnych agonistów receptorów opioidowych typu DOR wykazano zahamowanie fagocytozy erytrocytów owcy (SRBC, ang. *sheep red blood cells*) przez mysie makrofagi otrzewnowe i zjawisko to było odwracane przez naltrekson. Z kolei chroniczne podawanie morfiny powodowało u zwierząt rozwój tolerancji, co skutkowało zanikiem hamującego działania morfiny na fagocytozę [14]. Inne ciekawe wyniki wskazujące na kooperację receptorów opioidowych typu DOR i MOR w hamowaniu fagocytozy uzyskali Tomassini i współpracownicy [96]. Wykazali oni mianowicie, że u myszy nieposiadających receptora typu MOR hamujący efekt działania agonistów receptora DOR na fagocytozę był mniejszy aniżeli obserwowany u myszy z czynnym receptorem MOR. Ci sami autorzy nie stwierdzili wpływu agonistów receptorów typu KOR na fagocytozę [96]. Z kolei Ichinose i współpracownicy [30] stwierdzili, że dynorfina A, a w nieco mniejszym stopniu także α -neoendorfina, dynorfina B, dynorfina A(1-13) i dynorfina A(6-17), powodują nasilenie fagocytozy w makrofagach otrzewnowych. Podobnego zjawiska nie obserwowali natomiast w przypadku zastosowania leu-enkefaliny, met-enkefaliny, β -neoendorfiny i dynorfiny A(9-17).

1.2. Zabijanie zależne od tlenu

Wpływ opioidów na wybuch tlenowy (ang. *respiratory burst*) zależy zarówno od tego, jakiego typu agonistę wybrano do badań, jak i od tego, na jakich komórkach badania przeprowadzono. I tak na przykład Menzebach i współpracownicy [58] stwierdzili, że morfina hamuje wybuch tlenowy w ludzkich monocytach i zjawisko to jest odwracane przez N-nitro-L-argininę (inhibitor syntazy tlenu azotu), jak również nalokson. Podobne wyniki wskazujące na hamujący wpływ morfiny na wybuch tlenowy w stymulowanych estrem forbolu (PMA) monocytach człowieka otrzymali Peterson i współpracownicy [67]. Również wyniki wskazujące na hamowanie wybuchu tlenowego uzyskano badając wpływ endomorfiny-1 i -2 na stymulowane PMA neutrofile [1, 2, 31]. Ci sami autorzy stwierdzają, że zarówno endomorfina-1, jak i -2 pobudzają niestymulowane neutrofile do wybuchu tlenowego. Ciekawe wyniki dotyczące wpływu opioidów na produkcję wolnych rodników tlenowych otrzymali również Billert i współpracownicy [6]. Stwierdzili oni, że β -endorfina hamuje wybuch tlenowy w stymulowanych PMA makrofagach płucnych królika, a pobudza go w tych samych komórkach, ale stymulowanych opsonizowanym zymosanem [6]. Kilka prac wskazuje na stymulujące działanie dynorfiny i β -endorfiny, ale nie morfiny, na wybuch tlenowy w ludzkich makrofagach [84]. Mazenbach i współpracownicy [57] stwierdzili, że inkubacja neutrofili krwi z agonistami receptorów opioidowych typu DOR powoduje wzrost poziomu wolnych rodników tlenowych produkowanych przez te komórki. Również inkubacja stymulowanych PMA makrofagów otrzewnowych szczura z met-enkefaliną pobudza wydzielanie z tych komórek nadtlenu wodoru i reakcja ta jest odwracana przez antagonistów receptora DOR1 [98].

Z kolei wyniki naszego zespołu wskazują na silne pobudzenie produkcji rodników tlenowych w wysiękowych leukocytach otrzewnowych pobranych od ryb i myszy potraktowanych morfiną [15]. Podobne zjawisko nasilenia wybuchu tlenowego w komórkach wysiękowych od zwierząt potraktowanych morfiną obserwowano również u kurcząt [53].

1.3. Produkcja cytokin pro- i przeciwzapalnych oraz tlenu azotu

Szereg badań wskazuje, że opioidy zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro* wpływają na syntezę i wydzielanie cytokin pro- i przeciwzapalnych i w ten sposób mogą modyfikować rozwój zapalenia. Okazuje się, na przykład, że morfina hamuje wydzielania czynnika martwicy nowotworu typu alfa (TNF- α , ang. *tumor necrosis factor*) oraz interleukin 1 i 6 (IL-1 i IL-6) z makrofagów myszy, a zjawisko to zależne jest od receptorów opioidowych typu MOR, co wykazano w badaniach na myszach genetycznie pozbawionych tego receptora [80]. Podobne, tzn. wskazujące na hamowanie wydzielania TNF- α wyniki otrzymano działając endomorfina-1 i -2 na stymulowane PMA i lipopolisacharydem (LPS) makrofagi. Co jednak zaskakujące, w tym samym układzie eksperymentalnym endomorfiny hamowały również produkcję przeciwzapalnej IL-10, a stymulowały syntezę IL-1 [1, 2, 31]. Tak jak we wspomnianych już poprzednio przypadkach również wpływ opioidów na syntezę cytokin zależy od sposobu podania opioidu. Stwierdzono na przykład, że chroniczne podawanie morfiny myszom powoduje wzrost produkcji TNF- α , IL-1 oraz tlenu azotu (NO) i dzieje się to za pośrednictwem receptora MOR, bowiem efekt ten nie pojawia się u myszy pozbawionych tego receptora [101]. Natomiast domózgowe podanie morfiny powoduje u szczurów obniżenie poziomu tlenu azotu wydzielanego przez niestymulowane i stymulowane interferonem gamma (IFN- γ) lub LPS makrofagi śledziony. Ponadto morfina podana tą drogą powoduje też spadek produkcji TNF- α w makrofagach stymulowanych LPS [26].

W warunkach *in vitro* selektywny agonista receptorów typu MOR – DAMGO powoduje podniesienie poziomu chemokin: MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 i IP-10/CXCL10 w monocytach krwi zarówno na poziomie mRNA, jak i białka [103]. W przypadku inkubacji stymulowanych LPS mysich makrofagów RAW 264.7 z agonistami receptorów opioidowych typu DOR (DADLE - [D-Ala², D-Leu⁵]-enkefalina, DPDPE – [D-Pen^{2,5}]-enkefalina i deltorfina) stwierdzono, że deltorfina (selektywny agonista receptorów DOR2), ale nie DADLE (nieselektywny agonista receptorów typu DOR) oraz DPDPE (selektywny agonista receptorów DOR1) zmniejszają produkcję TNF- α i MIP-2/CCL1. Co ciekawe, agonista ten nie wpływa na poziom czynników transkrypcyjnych NF- κ B (jądrowy czynnik transkrypcyjny κ B, ang. *nuclear factor kappa B*) lub AP-1, ale znacząco obniża aktywację p38 MAPK [29]. Z kolei wpływ met-enkefaliny na produkcję tlenu azotu wydzielanego przez stymulowane LPS makrofagi szczura odwracany jest przez antagonistów receptorów DOR1 i MOR [98]. Kowalski i współpracownicy [44] wykazali, że inkubacja *in vitro* stymulowanych IL-1 lub IFN- γ mysich makrofagów otrzewnowych z met-enkefalina powoduje wzrost poziomu IL-6 w hodowli [44]. Podobne efekty uzyskano, kiedy te same komórki stymulowano IFN- γ i LPS w obecności selektywnych agonistów receptorów typu MOR, DOR i KOR. Natomiast, kiedy opioidy zostały dodane

8 godzin po stymulacji makrofagów, nie obserwowano zmian w poziomie wydzielonego przez komórki tlenu azotu, co może świadczyć, iż działają one w tym wypadku na poziomie transkrypcji genów [44].

Agonista receptora KOR – dynorfina A(1-13) powoduje spadek poziomu tlenu azotu w stymulowanych LPS i IFN- γ mysich makrofagach linii J774, ale efekt ten nie jest odwracany przez antagonistę tych receptorów – norbinaltorfinę [25]. Również obniżenie poziomu IL-6 obserwowano po inkubacji stymulowanych LPS mysich monocytów linii P388D1 z syntetycznym agonistą receptorów opioidowych typu KOR – U50,488 [66].

Inkubacja *in vitro* mysich makrofagów ze specyficznymi agonistami receptorów MOR – DAMGO i KOR - U-50488 powoduje spadek syntezy IL-12, ale nie IL-10. W warunkach *in vivo* jednorazowe podanie myszom morfiny powoduje spadek poziomu zarówno IL-12, jak i IL-10. Jeżeli natomiast morfina podawana była zwierzętom chronicznie, po trzech dniach zanikał hamujący efekt morfiny na produkcję IL-12, a po 10–12 dniach efekt obniżający poziom IL-10 [81].

Ciekawe wyniki dotyczące powiązań pomiędzy produkcją cytokin prozapalnych a opioidami otrzymali Greeneltch i współpracownicy [27]. Stwierdzili oni mianowicie, że podanie myszom BALB/c antagonisty receptorów opioidowych – naltreksonu powoduje u nich obniżenie poziomu TNF- α podczas posocznicy wywołanej LPS i D-galaktozaminą (LPS+D-gal), ale nie w przypadku, gdy była ona wywołana gronkowcową enterotoksyną B (SEB+D-gal). Jednak w przypadku potraktowania naltreksonem *in vitro* stymulowanych LPS makrofagów szpiku, śledziony i otrzewnej nie stwierdzono podobnego zjawiska [27]. Świadczyć to może o tym, że endogenne opioidy działające za pośrednictwem receptorów zlokalizowanych w centralnym systemie nerwowym działać mogą przeciwzapalnie, poprzez hamowanie wydzielania cytokin. Fakt ten potwierdzać też mogą wyniki uzyskane przez Refojo i współpracowników [77], którzy wykazali, że makrofagi śledziony pozyskane od myszy nieposiadających β -endorfiny po stymulacji LPS wydzielają więcej IL-6 i TNF- α aniżeli myszy zdolne do produkcji tego peptydu [77].

1.4. Chemotaksja

Met-enkefalina, β -endorfina i morfina działają jak chemoatraktanty na wiele typów leukocytów [20, 28, 59]. Jednak te same opioidy hamują migrację komórek w kierunku chemoatraktantów (np. TNF- α , RANTES/CCL5, C5a, fMLP) [28, 59]. Stwierdzono, że agoniści receptorów opioidowych, w tym także morfina, powodują zjawisko heterologicznego odwrócenia receptorów chemokin i innych czynników o charakterze chemoatrakcyjnym, np. składników C3a i C5a dopełniacza [28, 50, 79]. Najogólniej rzecz ujmując aktywacja jednego typu receptora związanego z białkami G (GPCR, ang. *G protein-coupled receptor*), w tym przypadku receptora opioidowego, może prowadzić do fosforylacji cytoplazmatycznego C-końca innego receptora z rodziny GPCR, np. receptora chemokin. Fosforylacja taka przeprowadzana jest przez kinazy białkowe PKA lub PKC. Ufosforylowany receptor traci zdolność do ponownego utworzenia kompleksu heterodimeru z podjednostkami białka G, a przez to staje się niewrażliwy na stymulację

[79]. Zjawisko osłabienia migracji w kierunku chemoatraktantów w obecności morfiny, DAMGO i met-enkefaliny zaobserwowano w przypadku neutrofili i monocytów krwi obwodowej małp *Macaca mulatta* i człowieka [28, 59]. Podobnego zjawiska zahamowania chemotaksji nie zaobserwowano po zadziałaniu dynorfiny A – agonisty receptorów typu KOR [28]. Również w przypadku leukocytów szpiku kostnego myszy i nerki główowej karasia srebrzystego inkubacja *in vitro* komórek z agonistami receptorów opioidowych typu MOR i DOR (odpowiednio z morfiną i deltorfiną) osłabia migrację tych komórek w kierunku surowicy aktywowanej zymosanem, będącej źródłem chemotaktycznych składników dopełniacza. Z kolei U50,488H – selektywny agonista receptorów opioidowych typu KOR nie wywołuje podobnego osłabienia migracji komórek myszy i ryb. Żaden z zastosowanych ligandów receptorów opioidowych nie wpływa na migrację leukocytów szpiku kostnego żaby wodnej [20]. Podobne zjawisko osłabienia migracji w kierunku aktywowanej zymosanem surowicy zaobserwowano w przypadku potraktowania otrzewnowych makrofagów szczura selektywnymi agonistami receptorów opioidowych typu MOR – endomorfina-1 i -2 [1, 2, 31].

1.5. Apoptoza

W przypadku mysich i szczurzych makrofagów otrzewnowych, mysich makrofagów linii J774.16 oraz monocytów krwi człowieka stwierdzono, że w warunkach *in vitro* morfina, a także inni agoniści receptorów opioidowych typu MOR, ale nie DOR, w sposób zależny od dawki i czasu powodują wzrost liczby komórek apoptotycznych [5, 86, 87]. Również w warunkach *in vivo*, po jednorazowym dootrzewnowym podaniu myszom i szczurom morfiny zaobserwowano wzrost apoptozy makrofagów otrzewnowych [5]. Ci sami autorzy stwierdzają, że morfina zwiększa ekspresję indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS, ang. *inducible nitric oxide synthase*) i wydzielanie tlenu azotu zarówno w niestymulowanych, jak i stymulowanych LPS makrofagach i zjawisko to jest odwracane przez inhibitory syntazy tlenu azotu – L-NAME (N^w -Nitro-L-arginina) i L-NMMA (N^G -Methyl-L-arginina). Co ciekawe, obydwie te substancje hamują również zależną od morfiny apoptozę makrofagów, co wskazuje na istotną rolę tlenu azotu w tym przypadku. Badania tego samego zespołu sugerują również, że morfina aktywuje oksydazę NADPH, co z kolei powoduje wzrost poziomu wolnych rodników tlenowych. Podobnie jak to miało miejsce w przypadku tlenu azotu, również zablokowanie oksydazy NADPH znosi proapoptotyczne działanie morfiny [5]. Podobne wyniki wskazujące na zaangażowanie tlenu azotu i wolnych rodników w indukowaną przez morfinę apoptozę makrofagów znaleźć można w pracy Kapasi i współpracowników [36]. Autorzy ci stwierdzają, że morfina wzmaga apoptozę mysich makrofagów i zjawisko to jest odwracane zarówno przez inhibitory syntazy tlenu azotu (L-NAME i L-NMMA), jak również zmiatacze wolnych rodników (np. dysmutaza ponadtlenkowa i katalaza) [36]. Kolejnym czynnikiem zaangażowanym w procesie stymulowanej przez morfinę apoptozy makrofagów okazał się być czynnik wzrostu TGF- β i znowu podanie przeciwciał anti-TGF przeciwdziało wywoływanej przez morfinę apoptozie [86].

Stwierdzono ponadto, że zarówno niestymulowane, jak i stymulowane TNF- α ludzkie neutrofile krwi obwodowej hodowane w obecności met-enkefaliny i β -endorfiny

TABELA 1. Wpływ opioidów na niektóre przejawy aktywności fagocytów: ↑ – pobudzenie, ↓ – zahamowanie, ~ – brak wpływu

Opioide	Receptor	Efekt
Morfina	MOR>KOR>DOR	↑↓ Fagocytoza [48, 51, 95] ↓↑ Wybuch tlenowy [15, 53, 58, 67] ↓ Chemotaksja [20, 28, 50, 59, 79] ↑ Apoptoza [5, 86, 87] ↑↓ IL-1 [80, 101] ↑↓ TNF-α [80, 101] ↓ IL-6 [80] ↓ IL-10 [81] ↓ IL-12 [81] ↑ NO [5, 36, 101]
α-endorfina	MOR>DOR>KOR	↑↓ Wybuch tlenowy [6, 84] ↓ Chemotaksja [28, 59] ↑ Apoptoza [94]
Endomorfina-1 i -2	MOR	↓~ Fagocytoza [1, 2] ↑↓ Wybuch tlenowy [1, 2, 31] ↓ Chemotaksja [1, 2, 31] ↑ IL-1 [1, 2, 31] ↓ TNFα [1, 2, 31] ↓ IL-10 [1, 2, 31]
DAMGO	MOR	↓ Fagocytoza [95] ↓ Chemotaksja [28, 59] ~ IL-10 [81] IL-12 [81] ↑ MCP-1/CCL2 [103] ↑ RANTES/CCL5 [103] ↑ IP-10/CXCL10 [103]
Met-enkefalina	DOR>MOR>>KOR	↓~ Fagocytoza [14, 96] ↓ Wybuch tlenowy [98] ↓ Chemotaksja [28, 59] ↑ Apoptoza [94] ↑ IL-6 [44] ↑ NO [44, 98]
Deltorfina	DOR	↓ Chemotaksja [20] ↓ TNF-α [29] ↓ MIP-2/CCL1 [29]
U50,488H	KOR	~ Chemotaksja [20] ↓ IL-6 [66] ~ IL-10 [81] ↓ IL-12 [81]
Dynorfina A	KOR>MOR> DOR	↑ Fagocytoza [30] ↓ Wybuch tlenowy [84] ~ Chemotaksja [28] ↓ NO [25]

wykazują wyższą apoptozę aniżeli komórki hodowane bez opioidów, a efekt ten odwracany jest przez naltrekson [94].

1.6. Prezentacja antygeny

Bardzo mało wiadomo na temat wpływu opioidów na zdolność komórek APC (komórki dendrytyczne, limfocyty B i makrofagi) do prezentacji antygeny. W warunkach *in vivo* nie stwierdzono wpływu morfiny podanej jednorazowo na ekspresję cząsteczek głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy II (MHC-II, ang. *major histocompatibility complex*) w monocytach szczura. Takie potraktowanie zwierząt w sposób istotny statystycznie obniżyło natomiast ekspresję MHC-II na limfocytach B [3]. Z kolei w warunkach *in vitro* agonści receptorów opioidowych typu KOR – dynorfina A i U50,488H hamują zdolność komórek dendrytycznych do pobudzenia proliferacji limfocytów T, podczas gdy zdolność do pochłaniania antygeny przez te komórki pozostaje niezmieniona [39].

W tabeli 1 podjęto próbę usystematyzowania danych na temat wpływu opioidów na aktywność fagocytów. W tym miejscu trzeba jednak zaznaczyć, że każde takie zestawienie będzie ułomne, bowiem nie uwzględnia różnych sposobów podania opioidów, różnych ich dawek, a także gatunkowej specyfiki odpowiedzi.

2. OPIOIDY A ODCZYN ZAPALNY

2.1. Wpływ opioidów na zapalenie

Wszystkie wymienione aktywności fagocytów składają się na odczyn zapalny, którego celem jest napływ komórek immunokompetentnych do ogniska zapalnego i efektywna eliminacja czynnika, który reakcję wywołał [54]. W pierwszym etapie zapalenia, w wyniku aktywacji osiadłych makrofagów i komórek tucznych dochodzi do uwolnienia czynników naczyniowoaktywnych (histaminy, leukotrienów cysteinowych itp.) i do wzrostu przepuszczalności lokalnych naczyń krwionośnych, co wiąże się z wynaczynieniem do ogniska zapalenia szeregu białek osocza [43, 54]. Drugim niezwykle istotnym etapem zapalenia jest migracja leukocytów z łożyska naczyniowego do miejsca reakcji. W ostrym odczynie zapalnym są to najpierw neutrofile, które poprzedzają monocyty/makrofagi [43, 54]. Ważnymi mediatorami tego zjawiska są cytokiny i chemokiny prozapalne, takie jak: IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8 /CXCL8, MCP-1/CCL2 [43, 54].

Najwięcej danych dotyczących wpływu opioidów na odczyn zapalny otrzymano stosując różnego typu zwierzęce modele zapalenia, takie jak: zapalenie stawów, zapalenie łapy, jelita grubego i zapalenie jamy otrzewnej. W badaniach z wykorzystaniem tego ostatniego modelu stwierdzono między innymi, że równoczesne dootrzewnowe podanie morfiny wraz ze stymulantem wywołującym odczyn zapalny (tioglikolatem, zymosanem) powoduje w wielu przypadkach osłabienie napływu leukocytów do miejsca zapalenia [15, 16, 19, 42, 64, 70]. Zjawisko takie zaobserwowano u kilku szczepów myszy (Swiss, C57/Bl, Balb/c, CB6, C3H) [15, 19, 42, 64, 70], u królików [97], a także u przedstawicieli

ryb kostnoszkieletowych (łososia atlantyckiego, karasia srebrzystego i karpia królewskiego) [15, 17, 19, Chadzińska i wsp., w przygotowaniu]. Przypuszczalnie jest to konsekwencją obniżenia poziomu czynników chemotaktycznych [15, 16, Chadzińska i wsp., w przygotowaniu]. Podobne zjawisko obniżenia migracji leukocytów do ogniska zapalenia obserwowano również po chronicznym podaniu morfiny u zwierząt z zakażeniem *S. pneumoniae*. Było to związane z zahamowaniem zależnej od NF- κ B transkrypcji genów kodujących chemokinę MIP-2/CXCL1 i cytokiny prozapalne [100]. Wywołane opioidami osłabienie migracji leukocytów do ogniska zapalenia może mieć również związek ze zmianami we wrażliwości receptorów chemoatraktantów, o którym to zjawisku była już mowa wcześniej (rozdział 1.4.). W przypadku myszy Swiss stwierdzono ponadto, że lokalne podanie morfiny do ogniska zapalenia wzmacnia zależną od kaspaz apoptozę komórek wysiękowych [Natorska i wsp., w przygotowaniu]. Najprawdopodobniej zwiększona apoptoza leukocytów u zwierząt potraktowanych morfiną jest konsekwencją podniesienia u nich poziomu tlenu azotu [Natorska i wsp., w przygotowaniu]. O podobnym zjawisku proapoptotycznego działania morfiny wspomniano już w rozdziale dotyczącym apoptozy (rozdział 1.5). Być może na osłabienie migracji leukocytów do ogniska zapalnego w przypadku modulowanego morfiną zapalenia otrzewnej myszy wpływać może również poziom enzymów odpowiedzialnych za trawienie macierzy zewnątrzkomórkowej – metaloproteinaz. Z jednej strony Kołaczowska i współpracownicy [40] wykazali, że metaloproteinaza 9 bierze udział w migracji leukocytów podczas wywołanego zymosanem zapalenia jamy otrzewnej, a z drugiej strony istnieją doniesienia, że morfina może wpływać na obniżenie poziomu metaloproteinaz [82]. Wywołane morfiną zmniejszenie migracji leukocytów do ogniska zapalenia można również tłumaczyć wpływem tego opioidu na interakcje leukocyty – śródbłonek. Warto w tym miejscu przypomnieć, że na skutek działania mediatorów prozapalnych dochodzi do aktywacji komórek śródbłonka i leukocytów w naczyniach i do wzmożonej ekspresji białek przylegania [54]. Istnieją doniesienia, że chroniczne podawanie morfiny powoduje u myszy obniżenie interakcji leukocytów ze śródbłonkiem (zmniejszenie toczenia się i przylegania komórek), a zjawisko to odwracane jest przez inhibitory syntazy tlenu azotu [65].

Trzeba jednak zaznaczyć, że hamujące działanie morfiny na odczyn zapalny jamy otrzewnej nie jest zjawiskiem ogólnobiologicznym, nie zaobserwowano go bowiem u płazów [19, 41], kurcząt [53], niektórych szczepów szczurów [23], a także u myszy szczepu CBA [64, 88, 89, Natorska i wsp., w przygotowaniu]. Szczególnie to ostatnie wydaje się ciekawe, bo wiele danych wskazuje, iż w tym przypadku wyjątkowość myszy CBA polega na występowaniu w ich otrzewnej znacznie większej liczby mastocytów, niż ma to miejsce u myszy szczepów wrażliwych na działanie morfiny [90]. Na zaangażowanie komórek tucznych w wywołany przez morfinę zahamowaniu odczynu zapalnego wskazują również wyniki uzyskane przez Kołaczowską i współpracowników [42]. Wykazali oni, że u myszy pozbawionych komórek tucznych (zarówno farmakologicznie przez użycie czynnika degranulującego 48/80, jak i genetycznie) nie dochodzi do zależnego od morfiny zahamowania odczynu zapalnego. Podobnych rezultatów nie uzyskano po eksperymentalnym pozbawieniu zwierząt makrofagów

otrzewnowych [19]. Inną przyczyną braku zahamowania napływu leukocytów do jamy otrzewnej podczas zapalenia u myszy CBA potraktowanych morfiną może być zaobserwowana u nich niższa ekspresja receptorów opioidowych na leukocytach w porównaniu do tej obserwowanej np. u myszy Swiss [Natorska i wsp., w przygotowaniu].

Na zależne od szczepu różnice we wrażliwości na opioidy wskazują również badania na szczurach. Stwierdzono mianowicie, że lokalne podanie met-enkefalinę do łapy szczurów DA (Dark Aguti) z zapaleniem wywołanym konkanawaliną A (Con A) powoduje zmniejszenie obrzęku, natomiast zjawisko przeciwne, tj. nasilenie obrzęku obserwowano w tym samym układzie eksperymentalnym u szczurów szczepu AO (Albino Oxford). W przypadku tego pierwszego zjawiska było ono odwracane przez nalokson (nieselektywny antagonist receptorów opioidowych) i naltrindol (selektywny antagonist receptorów DOR). Natomiast zjawisko wywołanego met-enkefaliną nasilenia obrzęku blokowały nalokson, nor-binaltorfina (antagonista receptorów KOR) i β -funaltreksamina (antagonista receptorów MOR) [91].

Z kolei w pracy dotyczącej wpływu morfiny na odczyn zapalny jamy otrzewnej u kurcząt wykazano, że kierunek zadziałania morfiny zależy od płci zwierząt [53]. Przeciwnie niż w opisywanych poprzednio przypadkach, u kurcząt morfiną nasilała zapalenie wywołane dootrzewnowym podaniem tioglikolatu, ale działało się tak tylko u samców, podczas gdy u samic nie obserwowano wpływu morfiny na odczyn zapalny [53]. Podobne zjawisko nasilenia nacieku neutrofilów do otrzewnej zwierząt potraktowanych podskórnie morfiną stwierdzono również podczas odczynu zapalnego jamy otrzewnej u szczurów Lewis [23].

Ciekawych informacji na temat wpływu opioidów na odczyn zapalny dostarczyły również prace Pol i Puig, opierające się na modelu zapalenia jelit u myszy [np. 71–75]. Pol i Puig stwierdziły między innymi, że zmiany przepuszczalności naczyniowej w tym modelu zapalenia są w większym stopniu modulowane przez agonistów receptorów opioidowych typu DOR i MOR niż przez agonistów receptorów KOR [73]. Wyniki potwierdzające przeciwzapalne działanie agonistów receptora MOR pochodzą również z pracy Philippe i współpracowników [69]. Zaobserwowali oni, że podskórne podanie selektywnych agonistów receptorów MOR – DALDA i DAMGO powoduje redukcję eksperymentalnego zapalenia jelita grubego, a efekt ten jest odwracany przez nalokson. O przeciwzapalnym działaniu ligandów receptorów opioidowych typu MOR świadczy też znacznie wyższa niż u normalnych myszy śmiertelność obserwowana podczas zapalenia jelita w przypadku zwierząt z zablokowanym genem kodującym MOR. Najprawdopodobniej endogenne peptydy opioidowe wiążąc się z receptorami typu MOR wpływają na produkcję cytokin i proliferację leukocytów [69]. Warto jednak wspomnieć, że istnieją też dowody wskazujące na udział agonistów receptorów KOR w hamowaniu zapalenia jelit [34]. Zaobserwowano, że agonista receptorów KOR – U50,488H hamuje zmiany w przepuszczalności naczyń krwionośnych podczas ostrego i chronicznego zapalenia jelit, przy czym hamowanie to jest znacznie silniejsze podczas zapalenia chronicznego i zjawisko to jest odwracane przez inhibitory syntazy tlenu azotu [34]. Również silny hamujący wpływ agonistów receptorów KOR na zapalenie stawów zaobserwował Walker [99]. Zauważył on, że związki te powodują obniżenie ekspresji

białek przylegania, zahamowanie migracji leukocytów oraz redukcję ekspresji i wydzielania TNF [99].

Również lokalne podanie nietypowych peptydów opioidowych, jak endomorfina-1 czy hemorfina hamuje ostry odczyn zapalny i zjawisko to jest odwracane przez nalokson [38]. Na przykład u myszy perfuzja stawów, objętych zapaleniem endomorfina-1, spowodowała zmniejszenie przepuszczalności naczyń i zjawisko to było blokowane przez antagonistę receptorów MOR – CTOP [56]. Z kolei na udział nocycptyny w modulacji zapalenia wskazują badania z użyciem myszy z genetycznie zablokowanym genem kodującym receptor nocycptyny, u których obserwowano zmniejszoną ekspresję adresyny MAdCAM-1 oraz zmniejszony naciek leukocytów do ogniska zapalnego [37].

2.2. Wpływ zapalenia na układ opioidowy

2.2.1. Zmiany endogennych peptydów opioidowych

Jak już wspomniano, niezwykle pomocne w rozszyfrowaniu powiązań pomiędzy opioidami a odczynem zapalnym są różnego rodzaju zwierzęce modele zapalenia. W każdym z zastosowanych modeli w ognisku zapalenia, jak również w narządach limfatycznych i strukturach neuroendokrynnych obserwuje się zmiany poziomu endogennych peptydów opioidowych. I tak na przykład u szczurów z eksperymentalnym zapaleniem stawów obserwuje się w śledzionie i grasicy wzrost poziomu endomorfiny-1, ale nie endomorfiny-2. U niektórych z tych szczurów występuje również podniesienie poziomu obydwóch endomorfina w stawach, podczas gdy nie stwierdza się obecności tych opioidów w tkankach pobranych ze stawów zdrowych zwierząt [33]. Ci sami autorzy donoszą ponadto, że zarówno endomorfina-1, jak i -2 (w mniejszej ilości) obecne są w leukocytach krwi obwodowej zdrowych ludzi [33]. W tym samym typie odczynu zapalnego dochodzi również do podniesienia w ognisku zapalenia poziomu dynorfiny B i met-enkefaliny-Arg⁶-Phe⁷ [88]. Metodami immunohistochemicznymi wykazano obecność enkefalin, ale nie dynorfin podczas stanu zapalnego w maziówce, szpiku kostnym, okostnej i kościach w okolicy stawów [4]. W maziówce pacjentów z zapaleniem stawów zwiększa się też poziom nocycptyny [24]. Podobne zjawisko, podniesienia poziomu nocycptyny stwierdzono również u myszy podczas eksperymentalnego zapalenia jelita grubego [37].

Bardzo wiele istotnych informacji na temat zmian w układzie opioidowym przyniosły prace wykorzystujące model wywołanego podaniem adjuwantu Freund'a zapalenia łapy u szczura. Są to głównie prace pochodzące z zespołu Christopha Steina. Stwierdzili oni między innymi, że po podaniu szczurom do łapy czynnika prozapalnego obserwuje się pojawienie leukocytów wysiękowych zawierających β -endorfinę, met-enkefalinę, dynorfinę A [52], a także endomorfina-1 i -2 [47, 62]. We wczesnych stadiach odczynu zapalnego leukocytami zawierającymi opioidy są granulocyty, później (96 h po podaniu adjuwantu Freund'a) są to monocyty i makrofagi [78]. Stwierdzono ponadto, że w czwartym dniu zapalenia liczba komórek wysiękowych zawierających peptydy opioidowe wzrasta prawie 6-krotnie w stosunku do stanu wyjściowego [78]. Zahamowanie migracji leukocytów do ogniska zapalnego poprzez zablokowanie obecnej na śródbłonku cząsteczki przylegania ICAM-1 (CD54) powoduje dramatyczny spadek poziomu opioidów w

ognisku zapalenia, co powoduje obniżenie analgezji, wywołanej stresem lub podaniem kortykoliberyny [52]. Podobną do ICAM-1 rolę w migracji do ogniska zapalnego komórek zawierających β -endorfinę spełniają ponadto selektyny L, P i E, oraz PECAM-1 [61]. Także równoczesne zablokowanie receptorów chemokin MIP-2/CCL1 i KC/CXCL1 powoduje obniżenie migracji leukocytów zawierających opioidy [10].

Czynnikami bardzo silnie pobudzającymi uwalnianie opioidów w ognisku zapalnym są stres oraz lokalne podanie noradrenaliny. Spowodowane podaniem noradrenaliny uwalnianie opioidów hamowane jest przez antagonistów receptorów adrenergicznych alfa(1), alfa(2) i beta(2) [7]. Podobne zjawisko zwiększonego uwalniania β -endorfiny z leukocytów wysiękowych obserwuje się po podaniu kortykoliberyny szczurom z eksperymentalnym zapaleniem łapy. Immunohistochemicznie stwierdzono wysoką koekspresję β -endorfiny i obydwu typów receptorów kortykoliberyny (CRHR1 i CRHR2) w makrofagach/monocytach, granulocytach i limfocytach zarówno we krwi, jak i w ognisku zapalenia [60]. Kortykoliberyna powoduje również uwalnianie z leukocytów met-enkefaliny i dynorfin. Lokalnie podana IL-1 powoduje również uwolnienie z leukocytów β -endorfiny i dynorfiny, ale nie met-enkefaliny [11, 12].

Podobne zjawisko wzrostu poziomu endogennych peptydów opioidowych obserwuje się u myszy z wywołanym zymosanem zapaleniem jamy otrzewnej [19, 21]. Zjawisko to jest szczególnie wyraźne w przypadku poziomu met-enkefaliny, której poziom drastycznie wzrasta już 30 minut po podaniu zymosanu w płynie wysiękowym, przy równoczesnym spadku tego peptydu w leukocytach, prążkowi i podwzgórzu [17, 18]. Ponadto stwierdzono, iż w czwartej godzinie zapalenia w leukocytach otrzewnowych dochodzi do zwiększenia poziomu mRNA kodującego prodynorfinę i do wzrostu poziomu dynorfiny w płynie wysiękowym [22]. W badanych punktach czasowych poziom ekspresji proopiomelanokortyny w leukocytach pozostawał niezmienny, wzrastał natomiast poziom β -endorfiny w płynie wysiękowym [22].

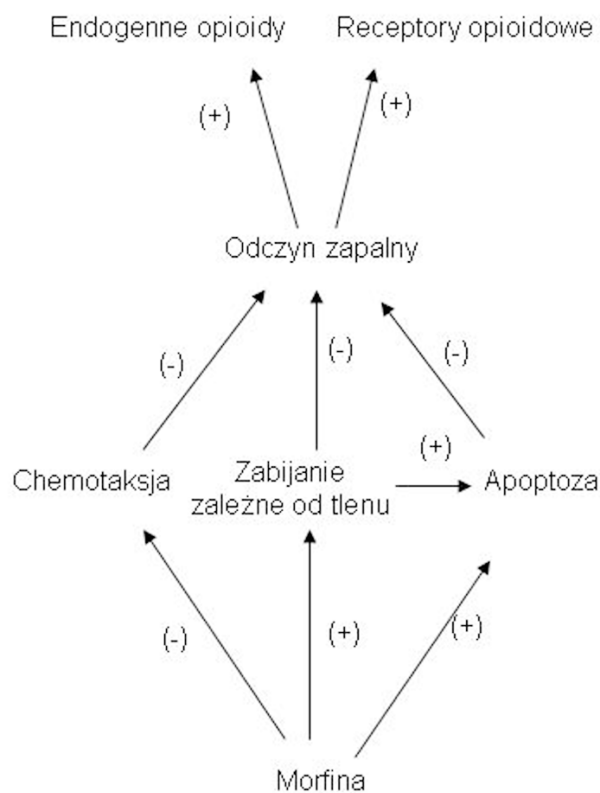
Uważa się, że interakcja endogennych peptydów opioidowych pochodzących z leukocytów zapalnych z obwodowymi receptorami opioidowymi może skutkować silną analgezą obwodową, a immunosupresja może całkowicie znosić to zjawisko [32].

2.2.2. Zmiany ekspresji receptorów opioidowych

Podczas toczącego się odczynu zapalnego dochodzi również do zmian w ekspresji receptorów opioidowych. Na przykład u pacjentów z zapaleniem jelit stwierdza się podniesienie poziomu mRNA kodującego receptory opioidowe typu MOR [68]. Podobne zjawisko wzrostu ekspresji receptorów opioidowych MOR obserwuje się również w zwojach korzeni grzbietowych u szczurów z zapaleniem łapy [61, 62]. Dodatkowo w tym modelu zapalenia stwierdzono, że podczas odczynu zapalnego dochodzi do wzrostu transportu aksonalnego receptorów opioidowych do zakończeń włókien czuciowych [63]. W tym samym modelu zapalenia stwierdzono wzrost w rdzeniu kręgowym ekspresji mRNA kodującego receptory DOR [13] i KOR [76]. Podobny efekt wzrostu ekspresji receptorów opioidowych typu DOR uzyskano również podając szczurom IL-1. Natomiast lokalne podanie antagonisty receptora IL-1 blokuje to zjawisko, ale nie wpływa na infiltrację miejsca zapalenia przez leukocyty [76]. Z kolei po potraktowaniu *in vitro* komórek ludzkiej neuroblastomy SH SY5Y IL-6 dochodzi do wzrostu ekspresji receptora

opiodowego MOR, ale nie DOR i zjawisko to zależne jest od czynników transkrypcyjnych STAT1 i STAT3 [9]. Z kolei w zjawisko stymulacji ekspresji receptorów MOR przez $\text{TNF-}\alpha$ zaangażowany jest $\text{NF-}\kappa\text{B}$, ale nie AP-1 [45]. Również podczas chronicznego zapalenia jelit u myszy dochodzi w jelicie czczym i śluzówce do wzrostu poziomu receptorów opiodowych DOR i KOR [34] oraz MOR [74]. Co ciekawe zjawisko zwiększonej ekspresji receptorów MOR występuje tylko u myszy mających sprawny gen kodujący iNOS [74]. Sądzi się, że wyższa ekspresja receptorów opiodowych w miejscu zapalenia powoduje, iż działanie przeciwbólne miejscowo stosowanych opiodów, jak również tych dostarczanych przez leukocyty jest silniejsze w warunkach toczącego się odczynu zapalnego [32]. Nie można

jednak zapominać, że istnieją prace, które nie wykazują zmian w ekspresji receptorów opiodowych typu MOR, DOR i KOR podczas toczącego się odczynu zapalnego [88] oraz takie, w których stwierdzono wręcz spadek ekspresji receptorów [49]. Trzeba również pamiętać, że zmiany w ekspresji receptorów opiodowych podczas zapalenia dotyczyć mogą nie tylko zakończeń nerwowych, ale również leukocytów. I tak na przykład w 24. godzinie zapalenia jamy otrzewnej myszy wywołanego podaniem zymosanu stwierdzono wzrost ekspresji mRNA kodującego receptor MOR i spadek mRNA dla receptorów KOR na leukocytach wysiękowych [22].



RYCINA 1. Uproszczony schemat prawdopodobnych oddziaływań pomiędzy opiodami a odczynem zapalnym. (+) – stymulacja, (-) – hamowanie (opis w tekście)

4. PODSUMOWANIE

Model odczynu zapalnego jamy otrzewnej wywołanego podaniem sterylnego stymulanta, np. zymosanu lub tioglikolatu okazał się niezwykle przydatny w badaniach oddziaływań pomiędzy opiodami a odpornością nieswoistą. Pozwolił między innymi na

wykazanie, że u większości przebadanych pod tym kątem szczepów myszy oraz u ryb kostnoszkieletowych podana lokalnie morfina hamuje napływ do ogniska zapalnego leukocytów [np. 15, 16, 19]. Dzieje się tak między innymi na skutek obniżenia syntezy/wydzielania czynników chemotaktycznych, jak również poprzez heterologiczne odwrażliwienie receptorów dla tych czynników [20]. Wstępne wyniki dotyczące wpływu morfiny na produkcję cytokin nie są jednoznaczne, u myszy Swiss nie stwierdzono bowiem zmian w ich poziomie [17], natomiast zmiany takie obserwuje się u karpia [Chadzinska i wsp., w przygotowaniu]. Ponadto morfina w ognisku zapalenia powoduje wzmożone wydzielanie rodników tlenowych i tlenu azotu, co z kolei indukuje zależną od kaspaz apoptozę komórek zapalnych (ryc. 1). Wykorzystując ten sam model stwierdzono ponadto, że znajdujące się w ognisku zapalenia leukocyty zdolne są do produkcji i wydzielania peptydów opioidowych, które spełniają funkcje zarówno przeciwbólowe, jak i immunomodulacyjne [17, 18, 21, 22]. Dodatkowo stwierdzono, że podczas zapalenia otrzewnej dochodzi do zmian ekspresji receptorów opioidowych na powierzchni komórek wysiękowych [22] (ryc. 1).

A zatem współpraca układu opioidowego i odpornościowego w utrzymaniu równowagi albo też w dostosowaniu się do stanu zaburzonej równowagi (allostaza) podczas toczącego się odczynu zapalnego nie ulega już wątpliwości. Jednak wiele elementów tej „układanki” nie zostało jeszcze odkrytych, a wiele wymaga dalszych badań.

Podziękowanie

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

LITERATURA

- [1] AZUMA Y, OHURA K, WANG PL, SHINOHARA M. Endomorphins delay constitutive apoptosis and alter the innate host defense functions of neutrophils. *Immunol Lett* 2002; **81**: 31–40.
- [2] AZUMA Y, OHURA K. Endomorphins 1 and 2 inhibit IL-10 and IL-12 production and innate immune functions, and potentiate NF- κ B DNA binding in THP-1 differentiated to macrophage-like cells. *Scand J Immunol* 2002; **56**: 260–269.
- [3] BEAGLES K, WELLSTEIN A, BAYER B. Systemic morphine administration suppresses genes involved in antigen presentation. *Mol Pharmacol* 2004; **65**: 437–442.
- [4] BERGSTROM J, AHMED M, LI J, AHMAD T, KREICBERGS A, SPETEA M. Opioid peptides and receptors in joint tissues: study in the rat. *J Orthop Res* 2006; **24**: 1193–1199.
- [5] BHAT RS, BHASKARAN M, MONGIA A, HITOSUGI N, SINGHAL PC. Morphine-induced macrophage apoptosis: oxidative stress and strategies for modulation. *J Leukoc Biol* 2004; **75**: 1131–1138.
- [6] BILLERT H, FISZER D, DROBNIK L, KURPISZ M. Influence of beta-endorphin on the production of reactive oxygen and nitrogen intermediates by rabbit alveolar macrophages. *Gen Pharmacol* 1998; **31**: 393–397.
- [7] BINDER W, MOUSA SA, SITTE N, KAISER M, STEIN C, SCHAFFER M. Sympathetic activation triggers endogenous opioid release and analgesia within peripheral inflamed tissue. *Eur J Neurosci* 2004; **20**: 92–100.
- [8] BLALOCK JE. The immune system as the sixth sense. *J Intern Med* 2005; **257**: 126–138.
- [9] BORNER C, KRAUS J, SCHRODER H, AMMER H, HOLLT V. Transcriptional regulation of the human mu-opioid receptor gene by interleukin-6. *Mol Pharmacol* 2004; **66**: 1719–1726.
- [10] BRACK A, RITTNER HL, MACHELSKA H, LEDER K, MOUSA SA, SCHAFFER M, STEIN C. Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. *Pain* 2004; **112**: 229–238.

- [11] 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.
- [12] CABOT PJ. Immune-derived opioids and peripheral antinociceptin. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; **28**: 230–232.
- [13] CAHILL CM, MORINVILLE A, HOFFERT C, O'DONNELL D, BEAUDET A. Up-regulation and trafficking of delta opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control. *Pain* 2003; **101**: 199–208.
- [14] CASELLAS AM, GUARDIOLA H, RENAUD FL. Inhibition by opioids of phagocytosis in peritoneal macrophages. *Neuropeptides* 1991; **18**: 35–40.
- [15] CHADZINSKA M, KOLACZKOWSKA E, SELJELID R, PLYTYCZ B. Morphine modulation of peritoneal inflammation in Atlantic salmon and CB6 mice. *J Leukoc Biol* 1999; **65**: 590–596.
- [16] CHADZINSKA M, SCISLOWSKA-CZARNECKA A, PLYTYCZ B. Inhibitory effects of morphine on some inflammation-related parameters in the goldfish *Carassius auratus* L. *Fish Shellfish Immunol* 2000; **10**: 531–542.
- [17] CHADZINSKA M, MAJ M, SCISLOWSKA-CZARNECKA A, PRZEWLOCKA B, PLYTYCZ B. Expression of proenkephalin (PENK) mRNA in inflammatory leukocytes during experimental peritonitis in Swiss mice. *Pol J Pharmacol* 2001; **53**: 715–718.
- [18] CHADZINSKA M, SCISLOWSKA-CZARNECKA A, PIERZCHALA-KOZIEC K, PLYTYCZ B. Inflammation-induced alternations in local and central Met-enkephalin in mice. *Pol J Pharmacol* 2003; **55**: 467–470.
- [19] CHADZINSKA M, KOLACZKOWSKA E, SCISLOWSKA-CZARNECKA A, PLYTYCZ B. Effects of macrophage depletion on peritoneal inflammation in Swiss mice, edible frogs and goldfish. *Folia Biol (Krakow)* 2004; **52**: 225–231.
- [20] CHADZINSKA M, PLYTYCZ B. Differential migratory properties of mouse, fish, and frog leukocytes treated with agonists of opioid receptors. *Dev Comp Immunol* 2004; **28**: 949–958.
- [21] CHADZINSKA M, SCISLOWSKA-CZARNECKA A, PIERZCHALA-KOZIEC K, PLYTYCZ B. Met-enkephalin involvement in morphine-modulated peritonitis in swiss mice. *Mediators Inflamm* 2005; **2005**: 112–117.
- [22] CHADZINSKA M, STAROWICZ K, SCISLOWSKA-CZARNECKA A, BILECKI W, PIERZCHALA-KOZIEC K, PRZEWLOCKI R, PRZEWLOCKA B, PLYTYCZ B. Morphine-induced changes in the activity of proopiomelanocortin and prodynorphin systems in zymosan-induced peritonitis in mice. *Immunol Lett* 2005; **101**: 185–192.
- [23] FECHO K, LYSLE DT. Morphine-induced enhancement in the granulocyte response to thioglycollate administration in the rat. *Inflammation* 2002; **26**: 259–271.
- [24] 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.
- [25] GABRILOVAC J, BALOG T, ANDREIS A. Dynorphin-A(1-17) decreases nitric oxide release and cytotoxicity induced with lipopolysaccharide plus interferon-gamma in murine macrophage cell line J774. *Biomed Pharmacother* 2003; **57**: 351–358.
- [26] GOMEZ-FLORES R, SUO JL, WEBER RJ. Suppression of splenic macrophage functions following acute morphine action in the rat mesencephalon periaqueductal gray. *Brain Behav Immun* 1999; **13**: 212–224.
- [27] GREENELTCH KM, HAUDENSCHILD CC, KEEGAN AD, SHI Y. The opioid antagonist naltrexone blocks acute endotoxic shock by inhibiting tumor necrosis factor-alpha production. *Brain Behav Immun* 2004; **18**: 476–484.
- [28] GRIMM MC, BEN-BARUCH A, TAUB DD, HOWARD OM, RESAU JH, WANG JM, ALI H, RICHARDSON R, SNYDERMAN R, OPPENHEIM JJ. Opiates transdeactivate chemokine receptors: delta and mu opiate receptor-mediated heterologous desensitization. *J Exp Med* 1998; **188**: 317–325.
- [29] HUSTED TL, GOVINDASWAMI M, OELTGEN PR, RUDICH SM, LENTSCH AB. A delta2-opioid agonist inhibits p38 MAPK and suppresses activation of murine macrophages. *J Surg Res* 2005; **128**: 45–49.
- [30] ICHINOSE M, ASAI M, SAWADA M. Enhancement of phagocytosis by dynorphin A in mouse peritoneal macrophages. *J Neuroimmunol* 1995; **60**: 37–43.
- [31] INUI Y, AZUMA Y, OHURA K. Differential alteration of functions of rat peritoneal macrophages responsive to endogenous opioid peptide endomorphin-1. *Int Immunopharmacol* 2002; **2**: 1133–1142.
- [32] JANSON W, STEIN C. Peripheral opioid analgesia. *Curr Pharm Biotechnol* 2003; **4**: 270–274.

- [33] JESSOP DS, RICHARDS LJ, HARBUZ MS. Opioid peptides endomorphin-1 and endomorphin-2 in the immune system in humans and in a rodent model of inflammation. *Ann NY Acad Sci* 2002; **966**: 456–463.
- [34] JIMENEZ N, PUIG MM, POL O. Antiexudative effects of opioids and expression of kappa- and delta-opioid receptors during intestinal inflammation in mice: involvement of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; **316**: 261–270.
- [35] JOZEFOWSKI S, PLYTYCZ B. Characterization of opiate binding sites on the goldfish (*Carassius auratus* L.) pronephric leukocytes. *Pol J Pharmacol* 1997; **49**: 229–237.
- [36] KAPASI AA, COSCIA SA, PANDYA MP, SINGHAL PC. Morphine modulates HIV-1 gp160-induced murine macrophage and human monocyte apoptosis by disparate ways. *J Neuroimmunol* 2004; **148**: 86–96.
- [37] KATO S, TSUZUKI Y, HOKARI R, OKADA Y, MIYAZAKI J, MATSUZAKI K, IWAI A, KAWAGUCHI A, NAGAO S, ITOH K, SUZUKI H, NABESHIMA T, MIURA S. Role of nociceptin/orphanin FQ (Noc/oFQ) in murine experimental colitis. *J Neuroimmunol* 2005; **161**: 21–28.
- [38] KHALIL Z, SANDERSON K, MODIG M, NYBERG F. Modulation of peripheral inflammation by locally administered endomorphin-1. *Inflamm Res* 1999; **48**: 550–556.
- [39] KIRST A, WACK C, LUTZ WK, EGGERT A, KAMPGEN E, FISCHER WH. Expression of functional kappa-opioid receptors on murine dendritic cells. *Immunol Lett* 2002; **84**: 41–48.
- [40] KOLACZKOWSKA E, CHADZIŃSKA M, SCISŁOWSKA-CZARNECKA A, PLYTYCZ B, OPDENAKKER G, ARNOLD B. Gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 contributes to cellular infiltration in a murine model of zymosan peritonitis. *Immunobiology* 2006; **211**: 137–148.
- [41] KOLACZKOWSKA E, MENASZEK E, SELJELID R, PLYTYCZ B. Experimental peritonitis in anuran amphibians is not suppressed by morphine treatment. *Pol J Pharmacol* 2000; **52**: 323–326.
- [42] KOLACZKOWSKA E, SELJELID R, PLYTYCZ B. Critical role of mast cells in morphine-mediated impairment of zymosan-induced peritonitis in mice. *Inflamm Res* 2001; **50**: 415–421.
- [43] KOLACZKOWSKA E, SELJELID R, PLYTYCZ B. Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell-deficient WBB6F1 mice. *J Leukoc Biol* 2001; **69**: 33–42.
- [44] KOWALSKI J, MAKOWIECKA K, BEŁOWSKI D, HERMAN ZS. Augmenting effect of methionine-enkephalin on interleukin-6 production by cytokine-stimulated murine macrophages. *Neuropeptides* 2000; **34**: 187–192.
- [45] KRAUS J, BORNER C, GIANNINI E, HOLLT V. The role of nuclear factor kappaB in tumor necrosis factor-regulated transcription of the human mu-opioid receptor gene. *Mol Pharmacol* 2003; **64**: 876–884.
- [46] KULKARNI-NARLA A, WALCHECK B, BROWN DR. Opioid receptors on bone marrow neutrophils modulate chemotaxis and CD11b/CD18 expression. *Eur J Pharmacol* 2001; **414**: 289–294.
- [47] LABUZ D, BERGER S, MOUSA SA, ZOLLNER C, RITTNER HL, SHAQURA MA, SEGOVIA-SILVESTRE T, PRZEWŁOCKA B, STEIN C, MACHELSKA H. Peripheral antinociceptive effects of exogenous and immune cell-derived endomorphins in prolonged inflammatory pain. *J Neurosci* 2006; **26**: 4350–4358.
- [48] LAZARO MI, TOMASSINI N, GONZALEZ I, RENAUD FL. Reversibility of morphine effects on phagocytosis by murine macrophages. *Drug Alcohol Depend* 2000; **58**: 159–164.
- [49] LI Z, PROUD D, ZHANG C, WIEHLER S, McDOUGALL JJ. Chronic arthritis down-regulates peripheral mu-opioid receptor expression with concomitant loss of endomorphin 1 antinociception. *Arthritis Rheum* 2005; **52**: 3210–3219.
- [50] LIU Y, BLACKBOURN DJ, CHUANG LF, KILLAM KF JR, CHUANG RY. Effects of *in vivo* and *in vitro* administration of morphine sulfate upon rhesus macaque polymorphonuclear cell phagocytosis and chemotaxis. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; **263**: 533–539.
- [51] LUGO-CHINCHILLA AM, BAEZ D, VELEZ M, ILDEFONSO C, RENAUD FL. Altered subcellular signaling in murine peritoneal macrophages upon chronic morphine exposure. *J Neuroimmunol* 2006; **176**: 86–94.
- [52] MACHELSKA H, SCHOPHL JK, MOUSA SA, LABUZ D, SCHAFFER M, STEIN C. Different mechanisms of intrinsic pain inhibition in early and late inflammation. *J Neuroimmunol* 2003; **141**: 30–39.
- [53] MAJEWSKI P, MARKOWSKA M, LASKOWSKA H, WALOCH M, SKWARLO-SONTA K. Effect of morphine on thioglycollate-induced peritonitis in chickens. *Neuro Endocrinol Lett* 2002; **23**: 161–167.
- [54] MAJNO G, JORIS I. Cells, Tissues and disease. Principles of general pathology. Boston, Blackwell Science, Inc., Cambridge, 1996.

- [55] MCCARTHY L, WETZEL M, SLIKER JK, EISENSTEIN TK, ROGERS TJ. Opioids, opioid receptors, and the immune response. *Drug Alcohol Depend* 2001; **62**: 111–123.
- [56] McDOUGALL JJ, BAKER CL, HERMANN PM. Attenuation of knee joint inflammation by peripherally administered endomorphin-1. *J Mol Neurosci* 2004; **22**: 125–137.
- [57] MENZEBACH A, HIRSCH J, HEMPELMANN G, WELTERS ID. Effects of endogenous and synthetic opioid peptides on neutrophil function *in vitro*. *Br J Anaesth* 2003; **91**: 546–550.
- [58] MENZEBACH A, HIRSCH J, NOST R, MOGK M, HEMPELMANN G, WELTERS ID. Morphine inhibits complement receptor expression, phagocytosis and oxidative burst by a nitric oxide dependent mechanism. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2004; **39**: 204–211.
- [59] MIYAGIT, CHUANG LF, LAM KM, KUNG H, WANG JM, OSBURN BI, CHUANG RY. Opioids suppress chemokine-mediated migration of monkey neutrophils and monocytes – an instant response. *Immunopharmacology* 2000; **47**: 53–62.
- [60] MOUSA SA, BOPALAH CP, STEIN C, SCHAFER M. Involvement of corticotropin-releasing hormone receptor subtypes 1 and 2 in peripheral opioid-mediated inhibition of inflammatory pain. *Pain* 2003; **106**: 297–307.
- [61] MOUSA SA, MACHELSKA H, SCHAFER M, STEIN C. Co-expression of beta-endorphin with adhesion molecules in a model of inflammatory pain. *J Neuroimmunol* 2000; **108**: 160–170.
- [62] MOUSA SA, MACHELSKA H, SCHAFER M, STEIN C. Immunohistochemical localization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in immune cells and spinal cord in a model of inflammatory pain. *J Neuroimmunol* 2002; **126**: 5–15.
- [63] MOUSA SA, ZHANG Q, SITTE N, JI R, STEIN C. beta-Endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. *J Neuroimmunol* 2001; **115**: 71–78.
- [64] NATORSKA J, PLYTYCZ B. Strain-specific differences in modulatory effects of morphine on peritoneal inflammation in mice. *Folia Biol (Krakow)* 2005; **53**: 189–195.
- [65] NI X, GRITMAN KR, EISENSTEIN TK, ADLER MW, ARFORS KE, TUMA RF. Morphine attenuates leukocyte/endothelial interactions. *Microvasc Res* 2000; **60**: 121–130.
- [66] PARKHILL AL, BIDLACK JM. Reduction of lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production by the kappa opioid U50,488 in a mouse monocyte-like cell line. *Int Immunopharmacol* 2006; **6**: 1013–1019.
- [67] PETERSON PK, GEKKER G, BRUMMITT C, PENTEL P, BULLOCK M, SIMPSON M, HITT J, SHARP B. Suppression of human peripheral blood mononuclear cell function by methadone and morphine. *J Infect Dis* 1989; **159**: 480–487.
- [68] PHILIPPE D, CHAKASS D, THURU X, ZERBIB P, TSICOPOULOS A, GEBOES K, BULOIS P, BREISSE M, VORNG H, GAY J, COLOMBEL JF, DESREUMAUX P, CHAMAILLARD M. Mu opioid receptor expression is increased in inflammatory bowel diseases: implications for homeostatic intestinal inflammation. *Gut* 2006; **55**: 815–823.
- [69] PHILIPPE D, DUBUQUOY L, GROUX H, BRUN V, CHUOI-MARIOT MT, GAVERIAUX-RUFF C, COLOMBEL JF, KIEFFER BL, DESREUMAUX P. Anti-inflammatory properties of the mu opioid receptor support its use in the treatment of colon inflammation. *J Clin Invest* 2003; **111**: 1329–1338.
- [70] PLYTYCZ B, NATORSKA J. Morphine attenuates pain and prevents inflammation in experimental peritonitis. *Trends Immunol* 2002; **23**: 345–346.
- [71] POL O, ALAMEDA F, PUIG MM. Inflammation enhances mu-opioid receptor transcription and expression in mice intestine. *Mol Pharmacol* 2001; **60**: 894–899.
- [72] POL O, PALACIO JR, PUIG MM. The expression of delta- and kappa-opioid receptor is enhanced during intestinal inflammation in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; **306**: 455–462.
- [73] POL O, PUIG MM. Expression of opioid receptors during peripheral inflammation. *Curr Top Med Chem* 2004; **4**: 51–61.
- [74] POL O, SASAKI M, JIMENEZ N, DAWSON VL, DAWSON TM, PUIG MM. The involvement of nitric oxide in the enhanced expression of mu-opioid receptors during intestinal inflammation in mice. *Br J Pharmacol* 2005; **145**: 758–766.
- [75] POL O, VALLE L, PUIG MM. Antisense oligodeoxynucleotides to mu- and delta-opioid receptor mRNA block the enhanced effects of opioids during intestinal inflammation. *Eur J Pharmacol* 2001; **428**: 127–136.
- [76] PUEHLER W, RITTNER HL, MOUSA SA, BRACK A, KRAUSE H, STEIN C, SCHAFER M. Interleukin-1 beta contributes to the upregulation of kappa opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation. *Neuroscience* 2006; **141**: 989–998.

- [77] REFOJO D, KOVALOVSKY D, YOUNG JI, RUBINSTEIN M, HOLSBOER F, REUL JM, LOW MJ, ARZT E. Increased splenocyte proliferative response and cytokine production in beta-endorphin-deficient mice. *J Neuroimmunol* 2002; **131**: 126–134.
- [78] RITTNER HL, BRACK A, MACHELSKA H, MOUSA SA, BAUER M, SCHAFER M, STEIN C. Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. *Anesthesiology* 2001; **95**: 500–508.
- [79] ROGERS TJ, PETERSON PK. Opioid G protein-coupled receptors: signals at the crossroads of inflammation. *Trends Immunol* 2003; **24**: 116–121.
- [80] ROY S, BARKE RA, LOH HH. Mu-opioid receptor-knockout mice: role of mu-opioid receptor in morphine mediated immune functions. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; **61**: 190–194.
- [81] SACERDOTE P. Effects of *in vitro* and *in vivo* opioids on the production of IL-12 and IL-10 by murine macrophages. *Ann NY Acad Sci* 2003; **992**: 129–140.
- [82] SAGAR S, SORBI D, ARBEIT LA, SINGHAL PC. Morphine modulates 72-kDa matrix metalloproteinase. *Am J Physiol* 1994; **267**: F654–659.
- [83] SALZET M. Neuropeptide-derived antimicrobial peptides from invertebrates for biomedical applications. *Curr Med Chem* 2005; **12**: 3055–3061.
- [84] SHARP BM, KEANE WF, SUH HJ, GEKKER G, TSUKAYAMA D, PETERSON PK. Opioid peptides rapidly stimulate superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes and macrophages. *Endocrinology* 1985; **117**: 793–795.
- [85] SHARP BM. Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling. *Brain Behav Immun* 2006; **20**: 9–14.
- [86] SINGHAL PC, BHASKARAN M, PATEL J, PATEL K, KASINATH BS, DURAISAMY S, FRANKIN, REDDY K, KAPASI AA. Role of p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and Fas-Fas ligand interaction in morphine-induced macrophage apoptosis. *J Immunol* 2002; **168**: 4025–4033.
- [87] SINGHAL PC, KAPASI AA, FRANKIN, REDDY K. Morphine-induced macrophage apoptosis: the role of transforming growth factor-beta. *Immunology* 2000; **100**: 57–62.
- [88] SPETEA M, RYDELIUS G, NYLANDER I, AHMED M, BILEVICIUTE-LJUNGARI I, LUNDEBERG T, SVENSSON S, KREICBERGS A. Alteration in endogenous opioid systems due to chronic inflammatory pain conditions. *Eur J Pharmacol* 2002; **435**: 245–252.
- [89] STANKIEWICZ E, WYPASEK E, PLYTYCZ B. Mast cells are responsible for the lack of anti-inflammatory effects of morphine in CBA mice. *Mediators Inflamm* 2004; **13**: 365–368.
- [90] STANKIEWICZ E, WYPASEK E, PLYTYCZ B. Opposite effects of mast cell degranulation by compound 48/80 on peritoneal inflammation in Swiss and CBA mice. *Pol J Pharmacol* 2001; **53**: 149–155.
- [91] STANOJEVIC S, RADULOVIC J, KOVACEVIC-JOVANOVIC V, VUJIC V, DIMITRIJEVIC M. Different effects of methionine-enkephalin on paw edema in two inbred rat strains. *Peptides* 2002; **23**: 1597–1605.
- [92] STEFANO GB, SALZET B, FRICCHIONE GL. Enkelytin and opioid peptide association in invertebrates and vertebrates: immune activation and pain. *Immunol Today* 1998; **19**: 265–268.
- [93] STEFANO GB, SCHARER B. The presence of the mu3 opiate receptor in invertebrate neural tissues. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1996; **113**: 369–373.
- [94] SULOWSKA Z, MAJEWSKA E, KRAWCZYK K, KLINK M, TCHORZEWSKI H. Influence of opioid peptides on human neutrophil apoptosis and activation *in vitro*. *Mediators Inflamm* 2002; **11**: 245–250.
- [95] SZABO I, ROJAVIN M, BUSSIÈRE JL, EISENSTEIN TK, ADLER MW, ROGERS TJ. Suppression of peritoneal macrophage phagocytosis of *Candida albicans* by opioids. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; **267**: 703–706.
- [96] TOMASSINI N, RENAUD FL, ROY S, LOH HH. Mu and delta receptors mediate morphine effects on phagocytosis by murine peritoneal macrophages. *J Neuroimmunol* 2003; **136**: 9–16.
- [97] TUBARO E, BORELLI G, CROCE C, CAVALLO G, SANTIANGELI C. Effect of morphine on resistance to infection. *J Infect Dis* 1983; **148**: 656–666.
- [98] VUJIC V, STANOJEVIC S, DIMITRIJEVIC M. Methionine-enkephalin stimulates hydrogen peroxide and nitric oxide production in rat peritoneal macrophages: interaction of mu, delta and kappa opioid receptors. *Neuroimmunomodulation* 2004; **11**: 392–403.
- [99] WALKER JS. Anti-inflammatory effects of opioids. *Adv Exp Med Biol* 2003; **521**: 148–160.
- [100] WANG J, BARKE RA, CHARBONEAU R, ROY S. Morphine impairs host innate immune response and increases susceptibility to *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *J Immunol* 2005; **174**: 426–434.

- [101] WANG J, CHARBONEAU R, BALASUBRAMANIAN S, BARKE RA, LOH HH, ROY S. The immunosuppressive effects of chronic morphine treatment are partially dependent on corticosterone and mediated by the mu-opioid receptor. *J Leukoc Biol* 2002; **71**: 782–790.
- [102] WELTERS ID, MENZEBACH A, GOUMON Y, LANGEFELD TW, TESCHEMACHER H, HEMPELMANN G, STEFANO GB. Morphine suppresses complement receptor expression, phagocytosis, and respiratory burst in neutrophils by a nitric oxide and mu(3) opiate receptor-dependent mechanism. *J Neuroimmunol* 2000; **111**: 139–145.
- [103] WETZEL MA, STEELE AD, EISENSTEIN TK, ADLER MW, HENDERSON EE, ROGERS TJ. Mu-opioid induction of monocyte chemoattractant protein-1, RANTES, and IFN-gamma-inducible protein-10 expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 2000; **165**: 6519–6524.

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