

## МЕХАНІЗМИ ЕКСПРЕСІЇ ТА ВИВІЛЬНЕННЯ ЕНДОГЕННИХ ОПОЇДІВ У ПЕРИФЕРИЧНИХ ТКАНИНАХ

Надійшла 15.07.15

В огляді представлено сучасні уявлення щодо механізмів нейроімунної взаємодії, на якій базується інгібування болю ендogenous опіоїдами. Основну увагу приділено подіям, які відбуваються в периферичних тканинах після їх пошкодження, збудження високопорогових аферентних нейронів та генерації ноцицептивної імпульсації. Вивільнення опіоїдних пептидів з імунних клітин, які мігрують до вогнища запалення та локалізуються в ньому, забезпечує (в усякому разі частково) істотне зниження збудливості сенсорних нейронів. Екзогенні опіоїдні ліганди, котрі не проникають крізь гемато-енцефалічний бар'єр, також селективно модулюють збудливість первинних аферентів. Отже, сенсорні нейрони в периферичних тканинах є істотною ціллю для дії ендogenous опіоїдів. Є підстави вважати, що при клінічному застосуванні опіоїдів периферичної дії можна буде в значній мірі уникнути негативних центральних побічних ефектів, викликаних дією звичайних аналгетиків (опіоїдів та антиконвульсантів). Обговорено сучасні уявлення про механізми секреції та вивільнення ендogenous опіоїдів периферичної дії, їх вплив на запалення і біль, роль імунної відповіді в антиноцицепції та перспективи застосування вказаних опіоїдів у терапії больових феноменів.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** опіоїдні рецептори, ендogenous опіоїди, запалення, імунні клітини.

### ВСТУП

Протягом останніх десятиліть накопичено чимало відомостей про антиноцицептивний вплив ендogenous опіоїдів на периферичну нервову систему тварин та людини [1–3]. Цей ефект опосередкований опіоїдними G-білок-спряженими рецепторами трьох типів ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ), котрі локалізовані на мембранах периферичних сенсорних нейронів і нервових закінчень [4, 5]. Зв'язування опіоїдів з даними рецепторами призводить до модуляції активності іонних каналів та іонотропних рецепторів різних типів, викликаючи пригнічення ефектів ноцицептивних стимулів. Відомо, що опіоїди інгібують кальцієві канали [6, 7] та пригнічують активність аденілатциклази [8]. Активація периферичних опіоїдних рецепторів також пригнічує струми че-

рез ТТХ-нечутливі натрієві канали [9], канали пуринаргічних P2X2- та P2X3-рецепторів [2, 10] та TRPV1-опосередковані струми; це відбувається із залученням протеїнкінази А [10, 11]. Показано, що збільшення амплітуди калієвих струмів та гіперполяризація, викликані активацією  $\mu$ -опіоїдних рецепторів, призводять до зменшення частоти генерації потенціалів дії в нейронах неонатальних щурів [12]. Таким чином, агоністи опіоїдних рецепторів можуть пригнічувати збудливість первинних аферентних нейронів і блокувати вивільнення прозапальних нейропептидів із центральних та периферичних терміналей, особливо в пошкоджених тканинах [6, 13].

Як відомо, запалення є важливим патогенетичним компонентом больових синдромів, у тому числі болю при артритах, нейрогенній мігрені, запальних ураженнях периферичної та центральної нервової системи (невропатичний біль), при онкологічних процесах, а також при післяопераційному

---

<sup>1</sup> Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).  
Ел. пошта: Kulyk@biph.kiev.ua (В. Б. Кулик).

болю [14]. Одночасно з цим було ідентифіковано певні ендogenous механізми, що протидіють болю. У периферичних тканинах такі механізми базуються на взаємодії рецепторів на мембранах нервових терміналей з опіоїдними пептидами і протизапальними цитокінами, які продукуються лейкоцитами [13, 15]. Вплив ендogenous опіоїдів на мембранні рецептори та іонні канали описані в численних публікаціях, проте питання стосовно механізмів утворення та вивільнення опіоїдів у периферичних тканинах все ще потребує істотних роз'яснень.

## ОПОЇДНІ ПЕПТИДИ В ІМУННИХ КЛІТИНАХ ТА СЕНСОРНИХ НЕЙРОНАХ

Ендogenous ліганди опіоїдних рецепторів є продуктом експресії трьох незалежних генів. Останні дають початок трьом прекурсорам таких лігандів, відомим як проопіомеланокортин (ПОМК), проенкефалін (ПЕНК) та продинорфін. З цих прекурсорів синтезуються опіоїдні пептиди  $\beta$ -ендорфін (ЕНД), енкефаліни (лейенкефалін – ЛЕК, метенкефалін – МЕТ) та динорфін А відповідно. Дані пептиди та їх похідні різняться між собою спорідненістю та селективністю до опіоїдних рецепторів різних типів –  $\mu$ - ( $\beta$ -ендорфін, МЕТ та ЛЕК),  $\delta$ - (ЛЕК) та  $\kappa$ -рецепторів (динорфін) [16]. Два додаткові ендogenous опіоїдні пептиди (ендоморфін-1 та -2) були виділені із мозку великої рогатої худоби. Обидва ці пептиди вважаються досить селективними лігандами для  $\mu$ -рецепторів [17].

Дані про експресію енкефалінів та динорфінів у гангліях дорсальних корінців (ГДК) і сенсорних терміналях волокон периферичних нервів накопичуються починаючи з 1980 р. Було показано, що ці пептиди транспортуються з гангліїв до центральних та периферичних нейронних терміналей; вони також були виявлені в шкірних та синовіальних нервових закінченнях [18]. Результати деяких досліджень наслідків пошкодження тканин свідчили про відсутність мРНК ПЕНК та продинорфіну в ГДК щурів у нормі та за наявності поліартриту [19]. Проте інші автори неодноразово доводили, що мРНК ПОМК, ПЕНК та продинорфіну можна успішно візуалізувати в ГДК нормальних щурів [20–22]. Окрім того, було виявлено, що рівні мРНК ПЕНК під час запалення задньої кінцівки тимчасово знижувалися, тоді як кількості мРНК ПОМК і продинорфіну залишалися сталими [22].

У моделі ревматоїдного артрити щурів, індукованого ад'ювантом поліартриту, розвиваються ерозійне запалення суглобів та активація кісткової проліферації, що супроводжується хронічним болем. Ці порушення впливають на зміни пластичності аферентних нейронів, особливо тих, що вміщують опіоїди, наприклад енкефаліни, утворені з попередника проенкефаліну А (ПЕНК А) [21]. Уведення рекомбінантного вірусу герпесу в задню кінцівку щурів, у ДНК яких входить ген ПЕНК А, зумовлювало збільшення числа нейронів ГДК, що експресують ПЕНК-мРНК, і підвищення у таких тварин рівня МЕТ. Це сприяло полегшенню локомоції у щурів з поліартритом та зниженню інтенсивності термічної гіпералгезії [21].

У моделі запалення трійчастого ганглія (ТГ), котра відповідає невралгії трійчастого нерва людини, унілатеральна ін'єкція щурам згаданого вище вірусу герпесу в зону вібрисів викликала збільшення експресії мРНК ПЕНК у нейронах цього ганглія [23]. МЕТ, отриманий трансгенним шляхом, накопичувався в численних нейронах ТГ і транспортувався сенсорними волокнами до терміналей волокон інфраорбітального нерва. Гіперсекреція МЕТ нейронами зумовлювала пригнічення алодинії. Місцеве введення антагоніста опіоїдних рецепторів налоксону та периферично діючого аналога останнього (налоксону метіодиду) спричиняли усунення знеболюючого ефекту [23]. Як також було показано, плазмідний вектор, котрий вміщує екзон гена ПЕНК щурів, можна успішно трансфікувати *in vivo* в лейкоцити вищезазначених тварин, що призводить до збільшення експресії енкефалінів у тканинах. Підвищення продукції опіоїдних пептидів імунними клітинами індукує протекторні ефекти щодо міокарда в умовах ішемії – реперфузії [24]. Це пояснюється інгібуючим впливом опіоїдів на аденілатциклазу та зменшенням утворення цАМФ у кардіоміоцитах [25]. Відомо, що цАМФ активує ферменти мітохондрій – сукцинатдегідрогеназу та НАДФ-трансгідрогеназу, задіяні до окислювального фосфорилування. Ці реакції потребують великої затрати кисню, а зниження рівня цАМФ у клітині зменшує потреби в кисні та запобігає активації процесів необоротного пошкодження кардіоміоцитів [25]. Подібні результати вказують на те, що потужних знеболення та кардіопротекції можна досягти завдяки активації периферичних опіоїдних рецепторів. Методики цілеспрямованої доставки ендogenous опіоїдів із використанням вірусних та

плазмідних векторів можуть становити великий інтерес для лікування деяких тяжких форм невропатичного болю [23].

ПОМК-пов'язані пептиди також були виявлені в імунних клітинах людини та багатьох видів тварин [15, 26]. Дві дослідницькі групи одночасно продемонстрували наявність повної мРНК ПОМК, що кодує всі три відповідних екзони в імунних клітинах [27, 28]. Однак результати інших досліджень на лейкоцитах свідчили про наявність тільки усиченої мРНК ПОМК з недостатньою п'ятою нетрансльованою зоною в першому екзоні та сигнальної послідовності – в другому [18]. Відомо, що недостатність сигнальної послідовності порушує напрямок трансляції продуктів та їх переробку в аутентичні ПОМК-пептиди в регульованому секреторному шляху [29, 30]. У деяких дослідженнях було доведено, що у зрілих нестимульованих лейкоцитах експресія повної мРНК ПОМК є пригніченою, проте в умовах патології така експресія зростає в кілька разів [31]. Також було виявлено, що продукція ПОМК-транскриптів, які містяться в сигнальній послідовності, і подальший синтез ЕНД в лімфоцитах у щурів в умовах запалення кінцівки посилюються [32, 33]. В інших роботах доводилося, що продукція ЕНД у периферичних лейкоцитах людини індукується кортикотропін-рилізинг-фактором (КРФ) і пригнічується глюкокортикоїдами [34]. Окрім того, повну ПОМК мРНК було знайдено в зрілих моноцитах, макрофагах та лімфоцитах після стимуляції конкаваліном А, КРФ, інтерлейкінами-1 та -2 або форболефіром *in vitro* [35, 36]. ПЕНК-мРНК, МЕТ і відповідні ензими для посттрансляційного процесінгу ПЕНК були ідентифіковані в лейкоцитах людей та гризунів [37, 38]. Видалення гена, який кодує ПЕНК, спричинює повну відсутність МЕТ в головному мозку і у Т-клітинах. Даний факт свідчить про те, що цей пептид як у нервовій, так і в імунній системі є похідним від одного прекурсора [39]. Експресія ПЕНК мРНК також була помічена у фетальних тимоцитах, а також у цих клітинах після народження [40]. У більш ранніх дослідженнях було виявлено, що експресія ПЕНК мРНК у CD4-позитивних Т-лімфоцитах є обмеженою, а у зрілих цитотоксичних Т-клітинах вона відсутня [41]. Було також показано, що експресія ПЕНК мРНК у зрілих Т-лімфоцитах може індукуватися конкаваліном А та форболміростатацетатом [42], а в периферичних мононуклеарних клітинах крові – інтерлейкіном-4 (ІЛ-4) [43]. Як було встановлено, нейтрофіли

та моноцити/макрофаги мишей експресували ПЕНК мРНК під час зимозан- або тіогліколатіндукованого запалення очеревици *in vivo* [44]. Наявність ЛЕК, динорфіну та ендоморфіну була продемонстрована в імунних клітинах різних типів [43, 45–47], а опіюїдних пептидів – і в периферичних субпопуляціях клітин, включаючи гранулоцити, моноцити/макрофаги та лімфоцити [8, 32, 47, 48–54].

## ТРАНСПОРТ ІМУННИХ КЛІТИН У ВОГНИЩЕ ЗАПАЛЕННЯ ТА ПРОДУКУВАННЯ НИМИ ОПОЇДНИХ ПЕПТИДІВ

Переміщення лейкоцитів, які концентруються в ділянках запалення, починається з «прокатки» цих клітин по ендотеліальній стінці. Даний процес опосередковується переважно селектинами – білками з родини молекул клітинної адгезії [55]. В подальшому лейкоцити активують вивільнення хемокінів з ендотеліоцитів та «запальних» клітин, наявних в ендотелії. Це призводить до збільшення авідності інтегринів, які опосередковують стійку адгезію лейкоцитів до ендотеліальних клітин за допомогою молекул ендотеліальної клітинної адгезії-1 (ЕСАМ-1). Врешті-решт, лейкоцити проникають через ендотелій і потрапляють до міжклітинного простору тканини із запаленням [55]. Як було виявлено у враженій запаленням кінцівці щурів, представники молекул клітинної адгезії, що беруть участь у трансвазальній міграції лейкоцитів (L-селектин, інтегрин  $\beta 2$  та рецептор хемокінів CXCR2), коекспресуються в продукуючих опіюїди лейкоцитах [56–58]. Блокування селективних, ICAM-1, інтегринів  $\alpha 4$  та  $\beta 2$  та/або хемокінів CXCL1 та CXCL2/3 *in vivo* істотно зменшує продукування опіюїдів імунними клітинами в запалених тканинах або пошкоджених нервах [57–61]. Окрім того, набір клітин, що містять в собі опіюїди, залежить від рецепторів нейрокініну-1 (які зв'язують субстанцію Р) в сенсорних та симпатичних нейронах [62, 63] і, взагалі, здатні регулювати адгезію в нервових клітинах [64].

Відомо, що активація центральних механізмів знеболення може призводити до пригнічення функції ендогенної опіюїдної системи. Встановлено, що інтратекальне введення морфіну в аналгетичних дозах викликає зменшення кількості ЕНД-позитивних лейкоцитів у запалених тканинах кінцівки щурів

[26]. Це було підтверджено в клінічних дослідженнях пацієнтів з використанням епідуральної анестезії після оперативного втручання [65]. Таким чином, ефективне центральне пригнічення болю може призводити до обмеження набору продукуючих опіоїди клітин у пошкоджених периферичних тканинах. Також було показано, що інтратекальне введення агоністів аденозинових рецепторів-1 інгібує накопичення нейтрофілів у запаленій шкірі щурів [66]. Цей ефект був опосередкований аденозиніндукованою супресією активності глутаматних рецепторів у спинному мозку. Таке накопичення нейтрофілів не залежало від активності периферичних аферентів та симпатичних нейронів, проте потребувало зв'язку запаленої тканини з інтактними волокнами периферичних нервів [67].

### СИНТЕЗ І ВИВІЛЬНЕННЯ ЕНДОГЕННИХ ОПІОЇДІВ КЛІТИНАМИ ІМУННОЇ СИСТЕМИ

Опіоїдний пептид  $\beta$ -ендорфін (ЕНД) а також мРНК його попередника проопіомеланокортину (ПОМК) зустрічаються не тільки в гіпофізі, але і в імунних клітинах різних типів, котрі інфільтрують запалену тканину [68]. ПОМК-прогормон спрямовується з ендоплазматичного ретикулума до трансмережі комплексу Гольджі завдяки зв'язуванню з рецепторами сортування карбоксипептидази Е. Прогормони конвертаз (РС) РС1/3 та РС2 розщеплюють ПОМК у трансмережі Гольджі. Спочатку РС1 розщеплює ПОМК на молекули адренкортико-тропного та  $\beta$ -ліпотропного гормонів. Неактивний проРС2 зв'язується з білком-шапероном 7B2 і транспортується до ендоплазматичного ретикулума, де він «дозріває» до активного РС2. Після цього РС2 перетворює  $\beta$ -ліпотропний гормон у  $\beta$ -меланоцитстимулюючий гормон та ЕНД [68]. Усі ці молекулярні складові присутні і в імунних клітинах. Було виявлено, що ЕНД та ПОМК локалізуються сумісно з РС1, РС2, карбоксипептидазою Е та 7B2 в лейкоцитах крові та в локусах запалення [68]. Вивільнення опіоїдних пептидів може реалізовуватися спонтанно або після стимуляції прозапальними медіаторами [1, 8, 33, 69]. Як пізніше було встановлено, в клітинах гіпофіза домінуючими факторами в цьому аспекті є КРФ та інтерлейкін-1 $\beta$  (ІЛ-1 $\beta$ ), які можуть стимулювати секрецію опіоїдних пептидів із лейкоцитів рецепторспецифічним та кальційзалежним чином [32,

45, 70]. Згодом було ідентифіковано й інші агенти, що забезпечують вивільнення опіоїдів. Показано, що імунні клітини, що продукують опіоїди, коекспресують на своїх мембранах адренергічні, формілпептидні, хемокінінові рецептори, КРФ та ІЛ-1 $\beta$ -рецептори [69, 71]. Відомо також, що норадреналін стимулює вивільнення ЕНД із лейкоцитів, опосередковане активацією адренергічних рецепторів [68, 71, 72]. Джерелом норадреналіну є симпатичні нервові волокна, локалізовані проксимально щодо цих клітин [71]. Активація СХСР2 (його лігандом СХСР2/3) або формілпептидних рецепторів (мікобактеріями) у гранулоцитах призводить до вивільнення ЕНД та МЕТ. Цей процес залежить від активації IP3 та виходу іонів Ca<sup>2+</sup> з ендоплазматичного ретикулума, а також (частково) від активації IP3-кінази та мітогенактивованої протеїнкінази р38 [52, 69]. Після загальної стимуляції опіоїдні пептиди пакуються у везикулярні структури і транслюкуються до мембран [8, 52, 68]. У гранулоцитах ці структури були ідентифіковані морфологічно як первинні (азурофільні) гранули [52]. Не менш важливі результати були отримані Зауером на моделі запалення кінцівки щурів з використанням повного ад'юванта Фройнда (CFA-модель). Як стверджують дослідники, моноцити, у котрих на мембранах експресуються Толл-подібні рецептори (TLR4), вивільняли ЕНД після стимуляції цих клітин ліпополісахаридом (LPS) [73]. Введення LPS (агоніста TLR4) у підшову запаленої кінцівки викликало дозалежний ефект опіоїдної антиноцицепції, який блокувався налоксоном або антагоністом TLR4. Також було показано, що активація TLR4 збільшує вивільнення опіоїдних пептидів моноцитами *in vitro*. Антагоністи TLR4, котрі розглядаються як нові засоби лікування сепсису, можуть несподівано посилювати біль у результаті пригнічення вивільнення ендогенних опіоїдів у периферичних запалених тканинах [73].

Отже, пригнічення периферичного болю супроводжується вивільненням опіоїдних пептидів з імунних клітин та координується завдяки регуляції їх секреторних шляхів.

### ІНДУКЦІЯ ВИВІЛЬНЕННЯ ЕНДОГЕННИХ ОПІОЇДІВ ІЗ ЗАПАЛЕНИХ КЛІТИН

Усі агенти, відповідальні за вивільнення ендогенних опіоїдів і згадані вище, після їх нанесення на вогнища запалення периферичних тканин можуть

індукувати знеболення в умовах *in vivo*. Залежно від виду агента, а також стадії і типу запалення ці ефекти опосередковуються різними опіоїдними пептидами [47, 57, 61, 71, 74]. Результати недавніх досліджень дозволяють припустити, що  $\alpha_2$ -адренергічні агоністи і серинові протеази можуть також індукувати вивільнення ендогенних опіоїдів у моделі запалення [75, 76]. Серинові протеази (тромбін, трипсин, триптаза тучних клітин) можуть впливати на клітини різних типів, зв'язуючись із протеазоактивуючими рецепторами (ПАР). Впливи на ці рецептори можуть бути задіяні в генез запалення, активацію тромбоцитів, патогенез імунної відповіді та атеросклерозу. Введення агоністів ПАР пригнічувало запальну гіпералгезію, індуковану карагінаном. Знеболення, індуковане агоністами ПАР, повністю усувалось інтраплатантною ін'єкцією налоксону метіодиду [76]. Цей феномен автори пояснюють тим, що агоністи ПАР посилюють експресію мРНК ПЕНК у запальних клітинах. У результаті з ПЕНК утворюються енкефаліни, які діють на кінцеві мішені і забезпечують пригнічення болю [76].

Використання різних імунодепресантних впливів (наприклад, введення циклоспорину А, виснаження гранулоцитів, блокування хемокінів або формілпептидних рецепторів, антиселектину, анти-ICAM1) знижує кількість опіоїдпродукуючих клітин і опосередковану опіоїдами антиноцицепцію та впливає на базовий ноцицептивний поріг у запаленій тканині [57, 59–61, 69, 70, 77]. І навпаки, введення алогенних лімфоцитів або гранулоцитів може відновлювати вищезазначені порушення знеболення [77]. Суперечки спалахнули навколо питання про те, чи справді такі агенти, як цитокіни, хемокіни, норадреналін, можуть викликати гіпералгезію. У зв'язку з цим потрібно враховувати наявність чи відсутність запалення в тканинах. Відомо, що в нормальних (незапалених) тканинах деякі цитокіни (TNF- $\alpha$ , IL-6) можуть викликати гіпералгезію [78]. Крім того, було описано, що деякі хемокіни (CCL22, CXCL12) індукують біль або зменшують знеболюючу дію інших сполук (наприклад, CCL5, CXCL12) [79, 80]. Було відмічено, що норадреналін у принципі не впливав на больову поведінку [71]. Найбільш очевидним поясненням цих результатів є те, що в незапалених тканинах відсутні опіоїдпродукуючі клітини імунної системи. Отже, імунні клітини та їх набір рецепторів у таких умовах діють на інші цілі (нейрони або кро-

воносні судини). Тому й не дивно, що ці агенти можуть впливати на різні ефекти залежно від наявності чи відсутності запалення. Було помічено, що вибіркова популяція гранулоцитів не зумовлює больових відповідей. Припускають, що стан системи гранулоцитів є важливішим для інгібування, ніж для генерації гіпералгезії [81]. Одним з інтригуючих процесів у незапалених клітинах є активація кератиноцитів ендотеліном та канабіноїдними агоністами. Це викликає вивільнення ЕНД, котрий зв'язується з опіоїдними рецепторами та пригнічує біль [82].

Відомо, що стрес може призводити до запуску активності ендогенних знеболюючих механізмів [83]. У щурів з унілатеральним запаленням задньої кінцівки стрес, викликаний примусовим плаванням у холодній воді, зумовлює інтенсивну антиноцицепцію щодо запаленої кінцівки; при цьому больова чутливість у протилежній незапаленій лапі залишається без змін [84, 85]. На даній моделі було показано, що периферичні і центральні опіоїдні рецептори відіграють співставну роль у загальному ендогенному знеболенні на початкових етапах запальної реакції (кілька годин). Проте з прогресуванням і збільшенням тяжкості запалення (кілька днів) периферичні опіоїдні механізми набувають більшого значення в контролі болю [84, 85]. Вплив ендоморфіну на знеболення є найбільш помітним, однак МЕТ, динорфін та ЛЕК також сприяють послабленню ноцицепції в даній моделі [47, 84, 85]. Ендогенними тригерами цього стресіндукованого знеболення є локально продукований КРФ та вивільнення катехоламінів симпатичними нейронами [71, 85]. Результати деяких досліджень вказують на те, що ендогенні знеболюючі ефекти залежать від функціонування імунних клітин; стресіндуковане знеболення в моделі запалення дистальних відділів кінцівки може бути скасоване циклоспорином А, тотальним опроміненням ультрафіолетом або виснаженням системи моноцитів/макрофагів [4, 48]. Доведено, що L-селектин, інтегрин- $\beta 2$  та CXCR2 експресуються в опіоїдпродукуючих лейкоцитах [56–58]. Відповідно, блокування селективних ICAM-1, інтегринів, CXCL1 або CXCL2/3 *in vivo* істотно зменшує кількість клітин, що містять в собі опіоїди в запаленій тканині та ліквідує ендогенне периферичне опіоїдіндуковане знеболення [57–60]. Стресіндуковане знеболення також зменшується при блокуванні NCAM (нейронної молекули клітин-

ної адгезії). Це, ймовірно, запобігає «прилипанню» опіоїдпродукуючих клітин до волокон периферичних нервів у запаленій тканині [64]. Таким чином, молекули адгезії впливають на біль за допомогою модуляції екстравазації опіоїдпродукуючих імунних клітин або їх адгезії до сенсорних нейронів. Окрім того, центральні механізми можуть впливати на міграцію лейкоцитів, що вміщують опіоїди, та на ендогенне знеболення пошкоджених периферичних тканин [65, 74]. Слід зазначити, що в моделях запалення [8, 33, 69], при злоякісних пухлинах кісткової тканини [86] та у людей, котрі зазнавали оперативного втручання на колінному суглобі [1], місцеві ін'єкції опіоїдних антагоністів або антитіл у травмовану тканину призводили до посилення болю. Це свідчить про те, що імунні клітини та клітини запалення постійно вивільнюють опіоїдні пептиди і протидіють гіпералгезії, викликаній багатьма відомими прозапальними агентами [15].

## **ЗНЕБОЛЮВАЛЬНА ДІЯ ПЕРИФЕРИЧНИХ ОПІОЇДІВ І РОЗВИТОК ТОЛЕРАНТНОСТІ ДО НИХ**

У моделях периферичного запалення локальні ін'єкції  $\mu$ -,  $\delta$ - і  $\kappa$ -агоністів у низьких «неактивних» дозах спричинювали помітне знеболення, що залежало від дози і було оборотним після застосування опіоїдних антагоністів [1]. Подібне знеболення також було продемонстроване в моделях невропатичного, вісцерального, термічного болю та болю, спричиненого злоякісним новоутворенням [14, 18]. Згідно з результатами досліджень *in vivo*, спільне введення  $\delta$ - та  $\mu$ -агоністів може зумовлювати синергізм їх дії [87]. Наведені дані стимулювали пошуки щодо створення нових опіоїдних лігандів, які позбавлені центральних ефектів і діють тільки на периферії [14, 18]. Загальний підхід у цьому випадку полягав у конструюванні гідрофільних сполук для зменшення інтенсивності переходу їх молекул через гемато-енцефалічний бар'єр (ГЕБ). Сполуками першого покоління в даному разі були  $\mu$ -агоніст лоперамід (відомий протидіарейний засіб) і  $\kappa$ -агоніст асімадолін (кишковий протизапальний препарат) [88]. У моделі невропатичного болю системне підшкірне введення лопераміду призвело до усунення механічної алодинії завдяки активації периферичних  $\mu$ -опіоїдних рецепторів [89]. Відносно нові екзогенні опіоїди периферичної дії арил-ацетамід морфінан та Tyr-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>

теж зарекомендували себе як ефективні знеболювальні агенти [90].

Результати деяких досліджень показали, що значна частина знеболюючого ефекту, викликаною системним введенням звичайних опіоїдів, опосередкована саме периферичними опіоїдними рецепторами [91, 92]. Нещодавно групою вчених було встановлено, що введений підшкірно агоніст  $\mu$ -опіоїдних рецепторів периферичної дії дерморфін (D-Arg<sup>2</sup>, Lys<sup>4</sup> (1-4)-амід – DALDA) ефективно пригнічував термічний біль у щурів [93]. Цей ефект скасовувався ін'єкцією метилналтрексону – периферичного антагоніста опіоїдних рецепторів. Системно введений DALDA інгібував активність С-волокон, які закінчуються на спінальних нейронах, проте провідникові властивості А-волокон залишалися без змін [93]. Також цікавим є те, що DALDA в експериментах на тваринах (щурях) не пригнічував моторики і не погіршував координації рухів, тобто не викликав істотних центральних моторних побічних ефектів [93]. На моделі запалення сечового міхура щурів було продемонстровано, що антиноцицептивний ефект, викликаний агоністами  $\mu$ - та  $\kappa$ -опіоїдних рецепторів, після застосування антагоніста периферичної дії налоксону метіодиду не послаблювався. Ефекти  $\delta$ -агоністів в аналогічних експериментах усувалися повністю [94]. Умовний нокаут  $\delta$ -опіоїдних рецепторів у первинних аферентних нейронах після застосування  $\delta$ -агоністів теж повністю усував знеболення [92]. Налоксон метіодид зменшував ефект опіоїдного знеболення в моделі гострого вісцерального болю, індукованого внутрішньоочеревинною ін'єкцією оцтової кислоти (у тесті «корчів») [95]. Згідно з результатами інших досліджень, «периферичні» опіоїди можуть забезпечувати таку ж знеболювальну ефективність, що й системно введені, проте в першому випадку побічна дія на ЦНС є відсутньою [96, 97]. Таким чином, периферичні опіоїдні агоністи здатні брати активну участь у пригніченні гострого та хронічного болю. Як відомо, довгострокова терапія з використанням опіоїдних препаратів може призводити до втрати функціональності опіоїдних рецепторів (десенситизації, толерантності) [16].

Концепції опіоїдної толерантності в основному зводяться до особливостей внутрішньоклітинного регулювання трафіку опіоїдних рецепторів на мембранах нервових клітин [98, 99]. Відомі декілька механізмів, які пов'язані з десенситизацією G-білок-зв'язаних рецепторів; це фосфорилуван-

ня таких рецепторів, інтерналізація та зменшення загальної кількості рецепторів після їх деградації. Після зв'язування агоніста відбуваються фосфорилування опіюїдних рецепторів та збільшення спорідненості до молекул внутрішньоклітинного арестину. Утворення арестин-рецепторних комплексів запобігає зчепленню рецепторів з G-білками, що призводить до інтерналізації таких комплексів за допомогою клатринзалежних шляхів [99]. Врешті-решт рецептори або піддаються деградації в лізосомах, або ж дефосфорилуються (ресенситизуються) та повертаються до мембран клітини. Результати дослідження цих процесів дозволили припустити, що інтерналізація та швидке повернення опіюїдних рецепторів до мембран запобігає розвитку толерантності [18, 98]. Експериментальні дослідження толерантності часто виконуються з використанням клітинних культур або за умов відсутності пошкоджених запалених тканин, що унеможлиблює екстраполяцію отриманих результатів на клінічні випадки [8]. Тим не менш, згідно з даними нещодавніх досліджень в умовах запалення кінцівки щурів, яким тривалий час вводили морфін, ознаки толерантності в периферичних  $\mu$ -опіюїдних рецепторах не розвиваються. У нейронах ГДК цих тварин інтерналізація  $\mu$ -опіюїдних рецепторів значно зростала, проте зв'язування останніх з G-білками та обмеження накопичення цАМФ зберігалися. І навпаки, інтерналізація опіюїдних рецепторів та сигналінг від них зменшувались, а толерантність відновлювалась в умовах, коли на ендогенні опіюїдні пептиди в запаленій тканині впливали антитілами або відбувалося виснаження опіюїдпродукуючих гранулоцитів, моноцитів і лімфоцитів під дією циклофосфаміду [8]. Таким чином, постійна наявність ендогенних опіюїдів в запалених тканинах збільшує повернення рецепторів із цитозолу до мембран та зберігає передачу сигналів  $\mu$ -опіюїдними рецепторами в сенсорних нейронах, протидіючи тим самим розвитку толерантності до екзогенних опіюїдів. Результати досліджень *in vitro* на трансфікованих клітинах показали, що ендочитоз рецепторів індукується ЕНД і корелює з інтерналізацією/сенситизацією  $\mu$ -опіюїдних рецепторів [100]. Дані інших досліджень в умовах тривалої активації периферичних опіюїдних рецепторів у присутності запальних стимулів різних типів також вказували на відсутність розвитку толерантності [101, 102]. Таким чином, периферичний вплив опіюїдних агоністів при тривалому лікуванні запального болю не обов'язково супроводжується толерантністю.

## РОЛЬ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ У МОДУЛЯЦІЇ БОЛЮ ПІСЛЯ ПОШКОДЖЕННЯ НЕРВА

У разі інфікування нерва (наприклад, вірусом герпесу) або його механічних пошкоджень (розтягнення нерва, його компресії або ампутації) активація тучних клітин, нейтрофілів, макрофагів і лімфоцитів відбувається як безпосередньо в місці пошкодження нерва, так і у відповідному ганглії [103, 104]. Властивості імунних клітин «генерувати біль» аналізувались у низці оглядових статей [104, 105]. У деяких дослідженнях невропатичний біль послаблювався у тварин з генетичною затримкою припливу макрофагів, після стабілізації нейронних тучних клітин або виснаження циркулюючих нейтрофілів або нейронних макрофагів. Роль Т-лімфоцитів оцінювали у безтимусних голих щурів і мишей з нокаутом гена *CD4* і в комбінації генів активації-1 з нокаутом, а також у мишей з важким комбінованим імунодефіцитом. Ці тварини порівняно з тваринами «дикого» типу після хронічної травми стиснення (CCI), перерізки спинномозкових нервів або їх пошкодження були менш чутливими до дії механічних або теплових стимулів [104, 105]. Пронотицептивна дія імунних клітин в основному зумовлена вивільненням прозапальних цитокінів, таких як TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  та IL-6. Ці цитокіни утворюються в лейкоцитах, шваннівських клітинах, гліоцитах та нейронах, проте відносний внесок клітин різних типів поки що не з'ясований [103, 104]. мРНК TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  та IL-6 і відповідні білки були виявлені в межах місця пошкодження нерва або в нейронах ГДК. Результати електрофізіологічних та поведінкових досліджень вказують на посилення механічної чутливості після аплікацій TNF- $\alpha$  в низьких дозах на пошкоджені ГДК. Застосування талідоміду (інгібітора синтезу TNF- $\alpha$ ) або етанерцепту (що запобігає зв'язуванню TNF- $\alpha$  з його клітинними рецепторами) призводить до послаблення гіперчутливості після пошкодження або перерізання нервів [104, 105].

Загалом немає сумнівів, що активація імунних клітин та вивільнення ними прозапальних медіаторів сприяють розвитку невропатичного болю. Тим не менш послаблення чутливості під дією протизапальних препаратів або імуносупресорів носить помірний характер. Як правило, в істотній мірі воно досягається тільки тоді, коли така терапія застосовується на початкових термінах після пошкодження нерва. Окрім того, підвищення ноцицептивного порога у тварин із дефіцитом Т-клітин не завжди

корелює із збільшенням кількості цих клітин і може бути пов'язано з вторинними змінами у клітинах інших типів [104, 105]. На даний час наукові висновки щодо пригнічення клінічного болю з використанням методів імуносупресії або із застосуванням блокаторів прозапальних медіаторів носять дискусійний характер, і вказаний аспект потребує подальших досліджень.

Докази того, що імунні клітини беруть участь у генерації невропатичного болю, суперечать домінуючим поглядам. Використовуючи модель компресії нерва, численні дослідники доводили, що антиноцицептивний ефект опосередковується опіоїдними пептидами, вивільненими з імунних клітин, а також екзогенними  $\mu$ -,  $\delta$ -,  $\kappa$ -агоністами, введеними в різні ділянки тіла (внутрішньовенно, інтраперитонеально або до ділянок пошкодження нервів) [22, 53, 61, 89]. Заслугує на увагу той факт, що імунні клітини акумулюються безпосередньо біля пошкоджених нервових стовбурів, проте не в периферичних тканинах, іннервованих пошкодженими нейронами [61]. Група вчених [53, 61] виявила велику кількість CD45+-лейкоцитів, що інфільтрували місце пошкодження нерва на ранніх (два-три дні) та пізніх (14–15 днів) стадіях невропатії, викликаної компресією нерва. Моноцити/макрофаги домінували в межах обох стадій; пізніше в зоні запалення з'являлися гранулоцити. Наявність Т-лімфоцитів визначалася лише на пізній стадії. Приблизно 30–40 % клітин CD45+, що вміщують ЕНД, МЕТ або динорфін, тяжіли до сенсорних волокон пошкоджених нервів. Аплікація CRF до місця пошкодження нерва (другий–14-й день після компресії) призводила до повного блокування механічної гіперчутливості. Ці ефекти були опосередковані опіоїдами і залежали від міграції лейкоцитів, що вміщують дані агенти, до місць пошкодження нерва [61]. Окрім того, ЕНД-вміщуючі Т-лімфоцити опосередковували опіоїдну антиноцицепцію під час прогресуючого невриту (14-й день після компресії). Про це свідчили результати експериментів з індукцією складного комбінованого імунодефіциту мишей при наступному додаванні лімфоцитів дико-го типу [53]. Таким чином, дані літератури свідчать про те, що імунні клітини можуть зумовлювати подвійну дію під час запалення – посилення болю через вивільнення прозапальних факторів на стадії ініціації запалення після пошкодження та ослаблення болю, опосередкованого вивільненням ендогенних опіоїдів, після розгортання запального процесу.

## ПЕРСПЕКТИВИ КЛІНІЧНОГО ВИКОРИСТАННЯ ПЕРИФЕРИЧНО ДІЮЧИХ ОПІОЇДІВ

У перебігу вивчення молекулярних механізмів впливу опіоїдів на нервову систему було започатковано два нових напрямки досліджень щодо дії опіоїдів на запалення та загоєння ран. Відомо, що, окрім периферичних сенсорних нейронів, опіоїдні рецептори та їх ліганди експресуються в імунних клітинах, фібробластах, меланоцитах і кератиноцитах [14, 18]. Опіоїди периферичної дії інгібують нейрогенне запалення, зменшуючи вивільнення субстанції Р та CGRP із периферичних терміналей сенсорних нейронів [106]. Опіоїди також можуть інгібувати процеси вивільнення прозапальних цитокінів і молекул клітинної адгезії [107], зменшуючи набряк та екстравазацію плазми [101]. Показано, що у пацієнтів з хронічним артритом інтраартикулярне введення морфіну сприяло зменшенню кількості лейкоцитів у синовіальній рідині [108], а при експериментальному синовіті у коней призводило до зменшення набряку суглобів, вмісту білка та сироваткових показників у синовіальній рідині [109]. Окрім того, опіоїди демонструють мітогенні властивості, прискорюють регенерацію слизової оболонки [110], сприяють реепітелізації та міграції кератиноцитів [111], стимулюють синтез цитокератинів і трансформуючого ростового фактора- $\beta$ , котрі є важливими «діючими особами» в процесах проліферації клітин і загоєння ран [112]. Місцеве застосування опіоїдів до ішемічно пошкоджених тканин прискорює закриття уражених ділянок грануляційною тканиною, стимулює утворення колагену, поліпшує організацію епідермальної та дермальної тканин, посилює ангиогенез [113, 114]. Опіоїди також позитивно впливають на регуляцію вивільнення фактора росту ендотелію судин та оксиду азоту в щурів [113]. Введення відносно нових периферично діючих  $\kappa$ -агоністів пацієнтам із невропатичним болем [115], синдромом подразненого кишківника та після абдомінального хірургічного втручання [102] зумовлювало пригнічення болю без істотних центральних побічних ефектів. Знеболююча дія морфін-6-глюкуроніду (похідного морфіну), що не проникає крізь ГЕБ, була настільки ж ефективною, як і дія звичайного морфіну, але не викликала явищ седації та пригнічення дихання [96, 97].

Однією з перспективних стратегій щодо посилення знеболюючого ефекту ендогенних опіоїдів є

інгібування пептидаз. Із даних ензимів найбільш відомими є ендопептидази та амінопептидази N, локалізовані на поверхні нейронів та імунних клітин. Це протеолітичні ферменти, які здатні каталізувати гідроліз різних пептидів, у тому числі опіоїдних [116]. Раніше було показано, що внутрішньовенні ін'єкції тваринам інгібіторів обох згаданих вище пептидаз посилюють антиноцицепцію, викликану дією периферичних опіоїдів [117]. Цікавими є результати досліджень зі спільним застосуванням ендогенних канабіноїдів та морфіну у тварин з експериментальною невропатією [118]. Автори цитованої роботи стверджують, що ін'єкції морфіну та підвищення рівня ендогенного канабіноїда 2-арахідоніл-гліцеролу, зумовлене селективним інгібуванням гідролітичного ензиму (ліпази моноацилгліцеролу), призводять до комбінованого антиалодинічного ефекту. При цьому описане знеболення не супроводжувалося пригніченням моторики кишківника – феноменом, що є основною побічною дією опіоїдів на периферичну нервову систему [118]. Результати нещодавніх досліджень також показали, що у тварин із цукровим діабетом порушення периферичної опіоїдної анальгезії пов'язане зі зниженням функціонального зв'язку  $\mu$ -опіоїдних рецепторів з G-білками [119]. Крім того, фосфорилування та десенситизація  $\mu$ -опіоїдних рецепторів у сенсорних нейронах залежали від активації рецепторів кінцевих продуктів глікозилування (RAGE); така дія опосередковувалася протеїнкіназою C (PKC). Блокування PKC та RAGE усувало десенситизацію опіоїдних рецепторів і відновлювало анальгетичний ефект *in vivo*. Отримані результати дозволять запропонувати можливі майбутні стратегії профілактики порушення опіоїдного знеболення при цукровому діабеті [119].

Останнім часом з'являються роботи, які стосуються скринінгу білків у продуктах харчування з метою можливого виявлення опіоїдних пептидів у таких продуктах та їх потенціалу в керуванні болем. Не виключено, що подібні дослідження відкриють нові можливості в розробці терапевтичних дієт; їх застосування доповнюватиме основні лікувальні заходи з використанням опіоїдів [120, 121]

Опіати вже давно і широко використовуються як найбільш ефективні препарати для пригнічення важких форм гострого і хронічного болю. Проте їх терапевтична ефективність та клінічна користь обмежені наявністю істотних центральних побічних ефектів. Створення і застосування екзогенних опіоїдів периферичної дії та детальне ви-

вчення особливостей функціонування ендогенної опіоїдної системи в умовах дії таких агентів сприятиме впровадженню нових ефективних молекулярних інструментів для боротьби з болем.

Дана робота, котра являє собою огляд, не була пов'язана з будь-якими дослідженнями на людях або тваринах; тому підтвердження відповідності існуючим етичним нормам для дослідницької роботи не є потрібним.

Автори огляду – В. Б. Кулик, Т. М. Волкова та О. О. Кришталь – підтверджують відсутність будь-яких конфліктів щодо комерційних або фінансових відносин, відносин з організаціями або особами, котрі будь-яким чином могли бути пов'язані з дослідженням, а також взаємовідносин співавторів огляду.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. C. Stein, "Peripheral mechanisms of opioid analgesia," *Anesth. Analg.*, **76**, 182-191 (1993).
2. I. Chizhnikov, V. Kulyk, O. Krishtal, et al., "Molecular mechanism for opioid dichotomy: bidirectional effect of mu-opioid receptors on P2X(3) receptor currents in rat sensory neurones," *Purinerg. Signal.*, **11**, 171-181 (2015).
3. V. B. Kulyk, I. V. Chizhnikov, T. M. Volkova, et al., "Role of phosphoinositid signaling pathway in opioids control of P2X3 receptors in the primary sensory neurons," *Fiziol. Zh.*, **61**, 22-29 (2015).
4. C. Stein, A. H. Hassan, R. Przewlocki, et al., "Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5935-5939 (1990).
5. C. Stein, "The control of pain in peripheral tissue by opioids," *New Engl. J. Med.*, **332**, 1685-1690 (1995).
6. I. A. Khasabova, C. Harding-Rose, D. A. Simone, and V. S. Seybold, "Differential effects of CB1 and opioid agonists on two populations of adult rat dorsal root ganglion neurons," *J. Neurosci.*, **24**, 1744-1753 (2004).
7. H. B. Wang, B. Zhao, Y. Q. Zhong, et al., "Coexpression of delta- and mu-opioid receptors in nociceptive sensory neurons," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 13117-13122 (2010).
8. C. Zollner, S. A. Mousa, O. Fischer, et al., "Chronic morphine use does not induce peripheral tolerance in a rat model of inflammatory pain," *J. Clin. Invest.*, **118**, 1065-1073 (2008).
9. M. S. Gold and J. D. Levine, "DAMGO inhibits prostaglandin E2-induced potentiation of a TTX-resistant Na<sup>+</sup> current in rat sensory neurons *in vitro*," *Neurosci. Lett.*, **212**, 83-86 (1996).
10. I. Chizhnikov, Y. Yudin, N. Mamenko, et al., "Opioids inhibit purinergic nociceptors in the sensory neurons and fibres of rat via a G protein-dependent mechanism," *Neuropharmacology*, **48**, 639-647 (2005).
11. J. Endres-Becker, P. A. Heppenstall, S. A. Mousa, et al., "Mu-opioid receptor activation modulates transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain," *Mol. Pharmacol.*, **71**, 12-18 (2007).

12. M. Takeda, T. Tanimoto, M. Ikeda, et al., "Opioidergic modulation of excitability of rat trigeminal root ganglion neuron projections to the superficial layer of cervical dorsal horn," *Neuroscience*, **125**, 995-1008 (2004).
13. C. Stein, M. Schafer, and H. Machelska, "Attacking pain at its source: new perspectives on opioids," *Nat. Med.*, **9**, 1003-1008 (2003).
14. C. Stein, J. D. Clark, U. Oh, et al., "Peripheral mechanisms of pain and analgesia," *Brain Res. Rev.*, **60**, 90-113 (2009).
15. H. L. Rittner, A. Brack, and C. Stein, "Pain and the immune system," *Br. J. Anaesth.*, **101**, 40-44 (2008).
16. C. Zollner and C. Stein, "Opioids," *Handbook Exp. Pharmacol.*, **177**, 31-63 (2007).
17. J. Fichna, A. Janecka, J. Costentin, and J. C. Do Rego, "The endomorphin system and its evolving neurophysiological role," *Pharmacol. Rev.*, **59**, 88-123 (2007).
18. M. Busch-Dienstfertig and C. Stein, "Opioid receptors and opioid peptide-producing leukocytes in inflammatory pain-basis and therapeutic aspects," *Brain, Behav., Immunol.*, **24**, 683-694 (2010).
19. L. Calza, M. Pozza, M. Zanni, et al., "Peptide plasticity in primary sensory neurons and spinal cord during adjuvant-induced arthritis in the rat: an immunocytochemical and *in situ* hybridization study," *Neuroscience*, **82**, 575-589 (1998).
20. M. Pohl, E. Collin, S. Bourgoin, et al., "Expression of preproenkephalin A gene and presence of Met-enkephalin in dorsal root ganglia of the adult rat," *J. Neurochem.*, **63**, 1226-1234 (1994).
21. J. Braz, C. Beaufour, A. Coutaux, et al., "Therapeutic efficacy in experimental polyarthritis of viral-driven enkephalin overproduction in sensory neurons," *J. Neurosci.*, **21**, 7881-7888 (2001).
22. I. Obara, J. R. Parkitna, M. Korostynski, et al., "Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain," *Pain*, **141**, 283-291 (2009).
23. A. Meunier, A. Latremoliere, A. Mauborgne, et al., "Attenuation of pain-related behavior in a rat model of trigeminal neuropathic pain by viral-driven enkephalin overproduction in trigeminal ganglion neurons," *Mol. Ther.*, **11**, 608-616 (2005).
24. X. Chen, X. Xu, X. Peng, et al., "Construction of PPENK-MIDGE-NLS gene vector and the expression in rat," *Sheng Wu Gong. Cheng Xue. Bao.*, **31**, 258-268 (2015).
25. Ю. Б. Лишманов, Л. Н. Маслов, "Внутриклеточный кальций и цАМФ опосредуют кардиотропные эффекты агонистов опиоидных рецепторов", *Сибир. мед. журн.*, **26**, № 1, 140-144 (2011).
26. E. M. Smith, "Opioid peptides in immune cells," *Adv. Exp. Med. Biol.*, **521**, 51-68 (2003).
27. S. J. Lolait, J. A. Clements, A. J. Markwick, et al., "Pro-opiomelanocortin messenger ribonucleic acid and posttranslational processing of beta endorphin in spleen macrophages," *J. Clin. Invest.*, **77**, 1776-1779 (1986).
28. H. J. Westly, A. J. Kleiss, K. W. Kelley, et al., "Newcastle disease virus-infected splenocytes express the pro-opiomelanocortin gene," *J. Exp. Med.*, **163**, 1589-1594 (1986).
29. A. J. Clark, P. M. Lavender, P. Coates, et al., "*In vitro* and *in vivo* analysis of the processing and fate of the peptide products of the short proopiomelanocortin mRNA," *Mol. Endocrinol.*, **4**, 1737-1743 (1990).
30. D. R. Cool and Y. P. Loh, "Identification of a sorting signal for the regulated secretory pathway at the N-terminus of pro-opiomelanocortin," *Biochimie*, **76**, 265-270 (1994).
31. K. Ohta, M. Shichiri, T. Kameya, et al., "Thymic hyperplasia as a source of ectopic ACTH production," *Endocrinol. J.*, **47**, 487-492 (2000).
32. P. J. Cabot, L. Carter, C. Gaiddon, et al., "Immune cell-derived beta-endorphin. Production, release, and control of inflammatory pain in rats," *J. Clin. Invest.*, **100**, 142-148 (1997).
33. N. Sitte, M. Busch, S. A. Mousa, et al., "Lymphocytes upregulate signal sequence-encoding proopiomelanocortin mRNA and beta-endorphin during painful inflammation *in vivo*," *J. Neuroimmunol.*, **183**, 133-145 (2007).
34. E. M. Smith, A. C. Morrill, W. J. Meyer, et al., "Corticotropin releasing factor induction of leukocyte-derived immunoreactive ACTH and endorphins," *Nature*, **321**, 881-882 (1986).
35. A. Stephanou, R. A. Knight, L. De, et al., "Expression of pro-opiomelanocortin (POMC) mRNA in undifferentiated and *in vitro* differentiated human neuroblastoma cell lines," *Prog. Clin. Biol. Res.*, **366**, 173-180 (1991).
36. P. D. Lyons and J. E. Blalock, "Pro-opiomelanocortin gene expression and protein processing in rat mononuclear leukocytes," *J. Neuroimmunol.*, **78**, 47-56 (1997).
37. O. Vindrola, A. M. Mayer, G. Citera, et al., "Prohormone convertases PC2 and PC3 in rat neutrophils and macrophages. Parallel changes with proenkephalin-derived peptides induced by LPS *in vivo*," *Neuropeptides*, **27**, 235-244 (1994).
38. J. LaMendola, S. K. Martin, and D. F. Steiner, "Expression of PC3, carboxypeptidase E and enkephalin in human monocyte-derived macrophages as a tool for genetic studies," *FEBS Lett.*, **404**, 19-22 (1997).
39. S. Hook, M. Camberis, M. Prout, et al., "Preproenkephalin is a Th2 cytokine but is not required for Th2 differentiation *in vitro*," *Immunol. Cell Biol.*, **77**, 385-390 (1999).
40. K. M. Linner, H. E. Quist, and B. M. Sharp, "Expression and function of proenkephalin A messenger ribonucleic acid in murine fetal thymocytes," *Endocrinology*, **137**, 857-863 (1996).
41. K. M. Linner, H. S. Beyer, and B. M. Sharp, "Induction of the messenger ribonucleic acid for proenkephalin A in cultured murine CD4-positive thymocytes," *Endocrinology*, **128**, 717-724 (1991).
42. A. Rattner, M. Korner, H. Rosen, et al., "Nuclear factor kappa B activates proenkephalin transcription in T lymphocytes," *Mol. Cell Biol.*, **11**, 1017-1022 (1991).
43. S. Kamphuis, A. Kavelaars, R. Brooimans, et al., "T helper 2 cytokines induce preproenkephalin mRNA expression and proenkephalin A in human peripheral blood mononuclear cells," *J. Neuroimmunol.*, **79**, 91-99 (1997).
44. M. Chadzinska, M. Maj, A. Scislawska-Czarnecka, et al., "Expression of proenkephalin (PENK) mRNA in inflammatory leukocytes during experimental peritonitis in Swiss mice," *Pol. J. Pharmacol.*, **53**, 715-718 (2001).
45. P. J. Cabot, L. Carter, M. Schafer, and C. Stein, "Methionine-enkephalin- and dynorphin-A release from immune cells and control of inflammatory pain," *Pain*, **93**, 207-212 (2001).
46. M. Chadzinska, K. Starowicz, A. Scislawska-Czarnecka, et al., "Morphine-induced changes in the activity of proopiomelanocortin and prodynorphin systems in zymosan-induced peritonitis in mice," *Immunol. Lett.*, **101**, 185-192 (2005).
47. D. Labuz, S. Berger, S. A. Mousa, et al., "Peripheral

- antinociceptive effects of exogenous and immune cell-derived endomorphins in prolonged inflammatory pain,” *J. Neurosci.*, **26**, 4350-4358 (2006).
48. R. Przewlocki, A. H. Hassan, W. Lason, et al., “Gene expression and localization of opioid peptides in immune cells of inflamed tissue: functional role in antinociception,” *Neuroscience*, **48**, 491-500 (1992).
  49. S. A. Mousa, Q. Zhang, N. Sitte, et al., “beta-Endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue,” *J. Neuroimmunol.*, **115**, 71-78 (2001).
  50. S. A. Mousa, R. H. Straub, M. Schafer, et al., Met-enkephalin and corresponding opioid receptors within synovium of patients with joint trauma, osteoarthritis and rheumatoid arthritis,” *Ann. Rheum. Dis.*, **66**, 871-879 (2007).
  51. H. L. Rittner, A. Brack, H. Machelska, et al., “Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain,” *Anesthesiology*, **95**, 500-508 (2001).
  52. H. L. Rittner, D. Labuz, J. F. Richter, et al., “CXCR1/2 ligands induce p38 MAPK-dependent translocation and release of opioid peptides from primary granules *in vitro* and *in vivo*,” *Brain, Behav., Immunol.*, **21**, 1021-1032 (2007).
  53. D. Labuz, A. Schreiter, Y. Schmidt, et al., “T lymphocytes containing beta-endorphin ameliorate mechanical hypersensitivity following nerve injury,” *Brain, Behav., Immunol.*, **24**, 1045-1053 (2010).
  54. M. Verma-Gandhu, P. Bercik, Y. Motomura, et al., “CD4+ T-cell modulation of visceral nociception in mice,” *Gastroenterology*, **130**, 1721-1728 (2006).
  55. K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh, “Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated,” *Nat. Rev. Immunol.*, **7**, 678-689 (2007).
  56. S. A. Mousa, H. Machelska, M. Schafer, and C. Stein, “Co-expression of beta-endorphin with adhesion molecules in a model of inflammatory pain,” *J. Neuroimmunol.*, **108**, 160-170 (2000).
  57. A. Brack, H. L. Rittner, H. Machelska, et al., “Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells,” *Pain*, **112**, 229-238 (2004).
  58. H. Machelska, A. Brack, S. A. Mousa, et al., “Selectins and integrins but not platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 regulate opioid inhibition of inflammatory pain,” *Br. J. Pharmacol.*, **142**, 772-780 (2004).
  59. H. Machelska, P. J. Cabot, S. A. Mousa, et al., “Pain control in inflammation governed by selectins,” *Nat. Med.*, **4**, 1425-1428 (1998).
  60. H. Machelska, S. A. Mousa, A. Brack, et al., “Opioid control of inflammatory pain regulated by intercellular adhesion molecule-1,” *J. Neurosci.*, **22**, 5588-5596 (2002).
  61. D. Labuz, Y. Schmidt, A. Schreiter, et al., “Immune cell-derived opioids protect against neuropathic pain in mice,” *J. Clin. Invest.*, **119**, 278-286 (2009).
  62. H. L. Rittner, C. Lux, D. Labuz, et al., “Neurokinin-1 receptor antagonists inhibit the recruitment of opioid-containing leukocytes and impair peripheral antinociception,” *Anesthesiology*, **107**, 1009-1017 (2007).
  63. I. Kager, S. A. Mousa, J. Sieper, et al., “Blockade of intra-articular adrenergic receptors increases analgesic demands for pain relief after knee surgery,” *Rheumatol. Int.*, **31**, 1299-1306 (2011).
  64. S. Hua, S. Hermanussen, L. Tang, et al., “The neural cell adhesion molecule antibody blocks cold water swim stress-induced analgesia and cell adhesion between lymphocytes and cultured dorsal root ganglion neurons,” *Anesth. Analg.*, **103**, 1558-1564 (2006).
  65. M. Heurich, S. A. Mousa, M. Lenzner, et al., “Influence of pain treatment by epidural fentanyl and bupivacaine on homing of opioid-containing leukocytes to surgical wounds,” *Brain, Behav., Immunol.*, **21**, 544-552 (2007).
  66. G. W. Bong, S. Rosengren, and G. S. Firestein, “Spinal cord adenosine receptor stimulation in rats inhibits peripheral neutrophil accumulation. The role of N-methyl-D-aspartate receptors,” *J. Clin. Invest.*, **98**, 2779-2785 (1996).
  67. L. S. Sorkin, J. Moore, D. L. Boyle, et al., “Regulation of peripheral inflammation by spinal adenosine: role of somatic afferent fibers,” *Exp. Neurol.*, **184**, 162-168 (2003).
  68. S. A. Mousa, M. Shakibaei, N. Sitte, et al., “Subcellular pathways of beta-endorphin synthesis, processing, and release from immunocytes in inflammatory pain,” *Endocrinology*, **145**, 1331-1341 (2004).
  69. H. L. Rittner, D. Hackel, P. Voigt, et al., “Mycobacteria attenuate nociceptive responses by formyl peptide receptor triggered opioid peptide release from neutrophils,” *PLoS Pathogens*, **5**, e1000362 (2009).
  70. M. Schafer, L. Carter, and C. Stein, “Interleukin 1 beta and corticotropin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4219-4223 (1994).
  71. W. Binder, S. A. Mousa, N. Sitte, et al., “Sympathetic activation triggers endogenous opioid release and analgesia within peripheral inflamed tissue,” *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 92-100 (2004).
  72. A. Kavelaars, R. E. Ballieux, and C. J. Heijnen, “*In vitro* beta-adrenergic stimulation of lymphocytes induces the release of immunoreactive beta-endorphin,” *Endocrinology*, **126**, 3028-3032 (1990).
  73. R. S. Sauer, D. Hackel, L. Morschel, et al., “Toll-like receptor (TLR)-4 as a regulator of peripheral endogenous opioid-mediated analgesia in inflammation,” *Mol. Pain*, **10**, 10 (2014).
  74. T. K. Schmitt, S. A. Mousa, A. Brack, et al., “Modulation of peripheral endogenous opioid analgesia by central afferent blockade,” *Anesthesiology*, **98**, 195-202 (2003).
  75. O. B. Ansah and A. Pertovaara, “Peripheral suppression of arthritic pain by intraarticular fadolmidine, an alpha 2-adrenoceptor agonist, in the rat,” *Anesth. Analg.*, **105**, 245-250 (2007).
  76. L. Martin, C. Auge, J. Boue, et al., “Thrombin receptor: An endogenous inhibitor of inflammatory pain, activating opioid pathways,” *Pain*, **146**, 121-129 (2009).
  77. H. L. Rittner, D. Labuz, M. Schaefer, et al., “Pain control by CXCR2 ligands through Ca<sup>2+</sup>-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells,” *FASEB J.*, **20**, 2627-2629 (2006).
  78. F. Q. Cunha and S. H. Ferreira, “Peripheral hyperalgesic cytokines,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, **521**, 22-39 (2003).
  79. S. B. Oh, P. B. Tran, S. E. Gillard, et al., “Chemokines and glycoprotein120 produce pain hypersensitivity by directly exciting primary nociceptive neurons,” *J. Neurosci.*, **21**, 5027-5035 (2001).
  80. I. Szabo, X. H. Chen, L. Xin, et al., “Heterologous desensitization of opioid receptors by chemokines inhibits chemotaxis and enhances the perception of pain,” *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA*, **99**, 10276-10281 (2002).
81. H. L. Rittner, D. Hackel, R. S. Yamdeu, et al., "Antinociception by neutrophil-derived opioid peptides in noninflamed tissue – role of hypertonicity and the perineurium," *Brain, Behav., Immunol.*, **23**, 548-557 (2009).
  82. M. M. Ibrahim, F. Porreca, J. Lai, et al., "CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 3093-3098 (2005).
  83. G. W. Terman, Y. Shavit, J. W. Lewis, et al., "Intrinsic mechanisms of pain inhibition: activation by stress," *Science*, **226**, 1270-1277 (1984).
  84. C. Stein, C. Gramsch, and A. Herz, "Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation: local opioid receptors and beta-endorphin," *J. Neurosci.*, **10**, 1292-1298 (1990).
  85. H. Machelska, J. K. Schopohl, S. A. Mousa, et al., "Different mechanisms of intrinsic pain inhibition in early and late inflammation," *J. Neuroimmunol.*, **141**, 30-39 (2003).
  86. A. Baamonde, A. Lastra, L. Juarez, et al., "Endogenous beta-endorphin induces thermal analgesia at the initial stages of a murine osteosarcoma," *Peptides*, **27**, 2778-2785 (2006).
  87. C. L. Schramm and C. N. Honda, "Co-administration of delta- and mu-opioid receptor agonists promotes peripheral opioid receptor function," *Pain*, **151**, 763-770 (2010).
  88. H. Machelska, M. Pfluger, W. Weber, et al., "Peripheral effects of the kappa-opioid agonist EMD 61753 on pain and inflammation in rats and humans," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **290**, 354-361 (1999).
  89. Y. Guan, L. M. Johaneck, T. V. Hartke, et al., "Peripherally acting mu-opioid receptor agonist attenuates neuropathic pain in rats after L5 spinal nerve injury," *Pain*, **138**, 318-329 (2008).
  90. G. H. Chu, M. Gu, J. A. Cassel, et al., "Novel malonamide derivatives as potent kappa opioid receptor agonists," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 1951-1955 (2007).
  91. D. Labuz, S. A. Mousa, M. Schafer, et al., "Relative contribution of peripheral versus central opioid receptors to antinociception," *Brain Res.*, **1160**, 30-38 (2007).
  92. C. Gaveriaux-Ruff, C. Nozaki, X. Nadal, et al., "Genetic ablation of delta opioid receptors in nociceptive sensory neurons increases chronic pain and abolishes opioid analgesia," *Pain*, **152**, 1238-1248 (2011).
  93. V. Tiwari, F. Yang, S. Q. He, et al., "Activation of peripheral mu-opioid receptors by dermorphin [D-Arg2, Lys4] (1-4) amide leads to modality-preferred inhibition of neuropathic pain," *Anesthesiology*, **124**, 706-720 (2016).
  94. R. M. Craft, S. R. Henley, R. C. Haaseth, et al., "Opioid antinociception in a rat model of visceral pain: systemic versus local drug administration," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 1535-1542 (1995).
  95. T. Lewanowitsch and R. J. Irvine, "Naloxone methiodide reverses opioid-induced respiratory depression and analgesia without withdrawal," *Eur. J. Pharmacol.*, **445**, 61-67 (2002).
  96. M. H. Hanna, K. M. Elliott, and M. Fung, "Randomized, double-blind study of the analgesic efficacy of morphine-6-glucuronide versus morphine sulfate for postoperative pain in major surgery," *Anesthesiology*, **102**, 815-821 (2005).
  97. E. L. van Dorp, A. Morariu, and A. Dahan, "Morphine-6-glucuronide: potency and safety compared with morphine," *Expert Opin. Pharmacother.*, **9**, 1955-1961 (2008).
  98. M. Waldhoer, S. E. Bartlett, and J. L. Whistler, "Opioid receptors," *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 953-990 (2004).
  99. C. A. Moore, S. K. Milano, and J. L. Benovic, "Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins," *Annu. Rev. Physiol.*, **69**, 451-482 (2007).
  100. T. Koch, A. Wiedera, K. Bartzsch, et al., "Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance," *Mol. Pharmacol.*, **67**, 280-287 (2005).
  101. R. Borzsei, G. Pozsgai, T. Bagoly, et al., "Inhibitory action of endomorphin-1 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice," *Neuroscience*, **152**, 82-88 (2008).
  102. A. W. Mangel, J. D. Bornstein, L. R. Hamm, et al., "Clinical trial: asimadoline in the treatment of patients with irritable bowel syndrome," *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **28**, 239-249 (2008).
  103. L. R. Watkins and S. F. Maier, "Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states," *Physiol Rev.*, **82**, 981-1011 (2002).
  104. P. J. Austin and G. Moalem-Taylor, "The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines," *J. Neuroimmunol.*, **229**, 26-50 (2010).
  105. H. Machelska, "Control of neuropathic pain by immune cells and opioids," *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.*, **10**, 559-570 (2011).
  106. T. L. Yaksh, "Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids," *Brain Res.*, **458**, 319-324 (1988).
  107. D. Philippe, L. Dubuquoy, H. Groux, et al., "Anti-inflammatory properties of the mu opioid receptor support its use in the treatment of colon inflammation," *J. Clin. Invest.*, **111**, 1329-1338 (2003).
  108. A. Stein, A. Yassouridis, C. Szopko, et al., "Intraarticular morphine versus dexamethasone in chronic arthritis," *Pain*, **83**, 525-532 (1999).
  109. C. Lindegaard, A. B. Frost, M. H. Thomsen, et al., "Pharmacokinetics of intra-articular morphine in horses with lipopolysaccharide-induced synovitis," *Vet. Anaesth. Analg.*, **37**, 186-195 (2010).
  110. C. H. Cho, K. K. Wu, S. Wu, et al., "Morphine as a drug for stress ulcer prevention and healing in the stomach," *Eur. J. Pharmacol.*, **460**, 177-182 (2003).
  111. S. Kuchler, N. B. Wolf, S. Heilmann, et al., "3D-wound healing model: influence of morphine and solid lipid nanoparticles," *J. Biotechnol.*, **148**, 24-30 (2010).
  112. P. L. Bigliardi, D. J. Tobin, C. Gaveriaux-Ruff, and M. Bigliardi-Qi, "Opioids and the skin – where do we stand?" *Exp. Dermatol.*, **18**, 424-430 (2009).
  113. T. Poonawala, B. K. Levay-Young, R. P. Hebbel, and K. Gupta, "Opioids heal ischemic wounds in the rat," *Wound Repair Regen.*, **13**, 165-174 (2005).
  114. E. R. Gross, A. K. Hsu, and G. J. Gross, "Acute methadone treatment reduces myocardial infarct size via the delta-opioid receptor in rats during reperfusion," *Anesth. Analg.*, **109**, 1395-1402 (2009).
  115. M. S. Wallace, D. Moulin, A. J. Clark, et al., "A phase II, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled crossover study of CJC-1008 – a long-acting, parenteral opioid analgesic – in the treatment of postherpetic neuralgia," *J. Opioid. Manag.*, **2**, 167-173 (2006).
  116. B. P. Roques, "Novel approaches to targeting neuropeptide

- systems,” *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 475-483 (2000).
117. R. Maldonado, O. Valverde, S. Turcaud, et al., “Antinociceptive response induced by mixed inhibitors of enkephalin catabolism in peripheral inflammation,” *Pain*, **58**, 77-83 (1994).
118. J. L. Wilkerson, M. J. Niphakis, T. W. Grim, et al., “The selective monoacylglycerol lipase inhibitor MJN110 produces opioid sparing effects in a mouse neuropathic pain model,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **357**, 145-156 (2016).
119. S. A. Mousa, M. Shaqura, J. Winkler, et al., “Protein kinase C-mediated mu-opioid receptor phosphorylation and desensitization in rats and its prevention during early diabetes,” *Pain*, **157**, 910-921 (2015).
120. S. Garg, K. Nurgali, and V. Mishra, “Food proteins as source of opioid peptides – a review,” *Current Med. Chem.*, **23**, 893-910 (2016).
121. Y. W. Park and M. S. Nam, “Bioactive peptides in milk and dairy products: a review,” *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.*, **35**, 831-840 (2015).