

**WPŁYW OPIOIDÓW NA STEROIDOGENEZĘ  
W KOMÓRKACH ZIARNISTYCH I OSŁONKI  
WEWNĘTRZNEJ PĘCHERZYKÓW JAJNIKOWYCH  
ŚWIŃ; MECHANIZM DZIAŁANIA AGONISTY  
OPIOIDOWEGO FK 33-824\***

THE INFLUENCE OF OPIOIDS ON STEROIDOGENESIS  
IN GRANULOSA AND THECA INTERNA CELLS FROM PORCINE  
OVARIAN FOLLICLES; THE MECHANISM OF ACTION  
OF OPIOID AGONIST FK 33-824

Tadeusz KAMIŃSKI

Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski  
w Olsztynie

*Streszczenie:* Peptydy opioidowe należą do grupy czynników, wytwarzanych w pęcherzyku jajnikowym świń, wpływających na funkcjonowanie, występujących w nim, komórek ziarnistych i komórek osłonki wewnętrznej. W trakcie krótkiej inkubacji tych komórek z opioidami (agonistami receptorów  $\mu$ ,  $\delta$  lub  $\kappa$ ) przeważa hamowanie steroidogenezy, zaś w obecności LH, czynnika tropowego dla komórek izolowanych z dużych pęcherzyków, dominuje pobudzanie wytwarzania hormonów steroidowych pod wpływem opioidów. Mechanizm hamującego działania opioidów na steroidogenezę pęcherzykową badano wykorzystując agonistę głównie receptorów  $\mu$ , FK 33-824. Pod wpływem FK 33-824 stwierdzono zahamowanie aktywności cykazy adenylanowej, kinaz białkowych A oraz C w komórkach ziarnistych, a także fosfatydyloinozytoloswoistej fosfolipazy C, cykazy adenylanowej, kinaz białkowych A i C w komórkach osłonki wewnętrznej świń.

*Słowa kluczowe:* świnia, opioidy, komórki ziarniste, komórki osłonki wewnętrznej, steroidogeneza, fosfatydyloinozytoloswoista fosfolipaza C, cykaza adenylanowa, kinaza białkowa A, kinaza białkowa C.

*Summary:* Opioid peptides belong to a group of agents, produced in porcine ovarian follicles, which affect functions of granulosa and theca interna cells. During short incubation of the cells with opioids ( $\mu$ ,  $\delta$  or  $\kappa$  agonists) inhibition of steroidogenesis prevails, while in the presence of LH, trophic agent for these cells

\*Praca finansowana z grantu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, projekt nr 020600.0206.

(from large follicles), stimulation of steroid hormones under influence of opioids predominates. The mechanism of inhibitory action of opioids on follicular steroidogenesis was investigated using the agonist of mainly  $\mu$  receptors, FK 33-824. Under influence of FK 33-824 it was found attenuation of adenylyl cyclase, protein kinases A and C activities in granulosa cells as well as phosphoinositide-specific phospholipase C, adenylyl cyclase, protein kinases A and C activities in theca interna cells.

*Key words:* pig, opioids, granulosa cells, theca interna cells, steroidogenesis, phosphoinositide-specific phospholipase C, adenylyl cyclase, protein kinase A, protein kinase C.

Opioidy są grupą związków, zarówno pochodzenia naturalnego jak i syntetycznych, o działaniu zbliżonym do alkaloidów fenantrenowych, głównie morfiny, otrzymanych z maku lekarskiego (*Papaver somniferum*). Endogenne opioidy tworzą trzy główne grupy peptydów pochodzących od trzech prekursorów: proopiomelanokortyny (POMC), proenkefaliny i prodynorfiny. Z POMC powstają peptydy opioidowe  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -endorfina, a także peptydy nieopiodowe: ACTH,  $\alpha$ - i  $\beta$ -MSH, CLIP,  $\beta$ -LPH. Proenkefalina jest prekursorem m.in. Met- i Leu-enkefaliny, zaś prodynorfina – m.in. dynorfin, rimorfiny oraz  $\alpha$ - i  $\beta$ -neoendorfiny. Cechą wspólną wszystkich peptydów opioidowych jest znajdująca się na N-końcu każdego peptydu sekwencja 5 aminokwasów: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met lub Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu, która decyduje o ich aktywności biologicznej. Najlepiej poznanym miejscem syntezy, a także głównym źródłem opioidów w organizmie są różne struktury ośrodkowego układu nerwowego. Opioidy działają poprzez specyficzne dla siebie receptory, spośród których zazwyczaj wyróżnia się trzy podstawowe klasy  $\mu$ ,  $\delta$  i  $\kappa$  oraz podklasy  $\mu_1$  i  $\mu_2$ ,  $\delta_1$  i  $\delta_2$ ,  $\kappa_1$ ,  $\kappa_2$  i  $\kappa_3$ . Z wyjątkiem najstąbiej poznanych endomorfina działających wyłącznie poprzez receptory  $\mu$ , inne opioidy nie wykazują wysokiej selektywności w stosunku do jednego typu receptora, a mają jedynie określone preferencje: endorfiny – do receptorów  $\mu$ , enkefaliny – receptorów  $\delta$ , dynorfiny zaś – do receptorów  $\kappa$ . Endogenne opioidy są dobrze znane jako neuromediatory i neuromodulatory kontrolujące czucie bólu, przyjmowanie pokarmu, temperaturę ciała, krążenie i oddychanie. Sugeruje się, że peptydy opioidowe mogą pełnić funkcje humoralnych przekaźników między ośrodkowym układem nerwowym a układem immunologicznym. Opioidy uczestniczą także w reakcjach stresowych oraz w procesach uczenia się i pamiętania [18].

## UDZIAŁ OPIOIDÓW W REGULACJI STEROIDOGENEZY W PĘCHERZYKACH JAJNIKOWYCH ŚWIŃ

Endogenne peptydy opioidowe mają znaczny udział w regulacji wydzielania podwzgórzowych czynników uwalniających (m.in. somatoliberyny, TRH, GnRH) oraz hormonów przysadkowych, takich jak: GH, prolaktyna, LH, FSH. Dostyć dobrze poznany jest ich wpływ na funkcjonowanie neurosekrecyjnego systemu GnRH/LH u samic różnych gatunków [5, 57, 58]. Opioidy regulując wydzielanie gonadotropin wpływają tym samym, w sposób pośredni, na funkcje układu rozrodczego. Można sądzić, że istnieje również droga bezpośrednia umożliwiająca endogennym opioidom kontrolę tego układu. U podstaw tego przypuszczenia leży fakt obecności peptydów

opiodowych oraz właściwych dla nich informacyjnych kwasów nukleinowych w narządach układu rozrodczego, w tym także w komórkach jajnika.  $\beta$ -Endorfinę zlokalizowano w ciałkach żółtych i płynie pęcherzykowym świń [34, 63], w ciałkach żółtych, komórkach ziarnistych i śródmiąższowych gryzoni [48, 49, 50], w ciałku żółtym krów [20], w płynie pęcherzykowym owiec [45] i kobiet [61] oraz w komórkach osłonki wewnętrznej kobiet [2]. Stwierdzono, że zawartość  $\beta$ -endorfiny w ciałkach żółtych świń wielokrotnie wzrasta w miarę ich rozwoju, osiągając najwyższą wartość między 14–18 dniem cyklu rujowego [63], przy czym za syntezę  $\beta$ -endorfiny są odpowiedzialne głównie duże komórki lutealne, które wydzielają ok. 15 razy więcej tego peptydu w stosunku do komórek małych [64]. Z kolei w płynie pęcherzykowym świń najwyższe stężenie  $\beta$ -endorfiny odnotowano w materiale izolowanym z małych pęcherzyków z pierwszych dni cyklu rujowego [34].

Obecność Met-enkefaliny wykazano w jajnikach gryzoni [13, 43], w ciałkach żółtych kobiet i krów [13] oraz w płynie pęcherzykowym kobiet [61]. Peptydy z grupy dynorfin zidentyfikowano w płynie pęcherzykowym świń [72], w ciałku żółtym krów [20] oraz w komórkach ziarnistych, lutealnych i śródmiąższowych szczurów [49]. Wiele danych wskazuje, że peptydy opiodowe są wytwarzane w gonadach. W jajnikach gryzoni wykazano obecność mRNA dla proopiomelanokortyny [27, 52, 69], proenkefaliny [27] oraz prodynorfiny [17]. Ostatnio, ekspresję genów prekursorów opiodowych stwierdzono też w komórkach lutealnych i komórkach pęcherzyków jajnikowych świń [75, 76]. Dodatkowym źródłem opiodów w jajnikach mogą być zakończenia  $\beta$ -endorfinoergicznych włókien nerwowych, które zlokalizowano w osłonce wewnętrznej i zewnętrznej pęcherzyków jajnikowych świń [26].

Jajnikowa sekrecja opiodów jest prawdopodobnie kontrolowana przez gonadotropiny. W badaniach własnych zaobserwowano, że FSH w sposób zależny od dawki stymuluje uwalnianie  $\beta$ -endorfiny przez komórki ziarniste pochodzące z dużych pęcherzyków jajnikowych świń. Największy, ośmiokrotny, wzrost zanotowano po podaniu do medium FSH w dawce 100 ng/ml. Pobudzające działanie FSH było istotnie ograniczone przez progesteron w dawce  $10^{-5}$  M [34]. Podobne badania, przeprowadzone na komórkach lutealnych świń, pozwoliły zaobserwować stymulujący wpływ hCG na uwalnianie  $\beta$ -endorfiny przez małe i duże komórki lutealne [64]. Kato i wsp. [40] zanotowali zbliżony wpływ hCG na uwalnianie  $\beta$ -endorfiny z komórek lutealnych szczurów. W regulacji uwalniania  $\beta$ -endorfiny przez komórki lutealne świń uczestniczą ponadto: oksytocyna, prolaktyna, progesteron [63] i  $\text{TNF}\alpha$  [64]. Spośród aktywnych endokrynnie komórek jajnika świń, najbardziej autonomiczne, w odniesieniu do sekrecji  $\beta$ -endorfiny, okazały się komórki osłonki wewnętrznej – żaden z badanych hormonów (LH, PRL, steroidy jajnikowe) nie miał statystycznie istotnego wpływu na sekrecję tego opiodu. Obserwowano jedynie tendencje do podwyższania, wskutek działania LH ( $p=0,094$ ), lub hamowania, w przypadku PRL ( $p=0,056$ ), sekrecji  $\beta$ -endorfiny przez komórki osłonki wewnętrznej [30].

Stwierdzenie lokalnej syntezy opiodów oraz wykazanie obecności w jajnikach świń receptorów opiodowych [25, 72] wskazuje na możliwość auto- bądź parakrynnego wpływu peptydów opiodowych na jajnik, w tym także na steroidogenezę jajnikową. Tego rodzaju wpływ zaobserwowano wcześniej w przypadku komórek ziarnistych kobiet [21] oraz komórek lutealnych krów [67, 80] i szczurów [40]. Został on także odnotowany

w odniesieniu do komórek ziarnistych [24, 34, 36], osłonki wewnętrznej [30] i lutealnych [35] świń. Badania te dają jednak jedynie fragmentaryczny obraz wpływu opioidów na sekrecję steroidów, ponieważ używano w nich z reguły tylko jednego spośród ok. 30 opioidów obecnych w organizmie; najczęściej  $\beta$ -endorfinę lub syntetyczny związek działający w sposób zbliżony do niej (FK 33-824). Dokładniejszych danych dostarczyły kolejne badania z wykorzystaniem 9 opioidów, 3 agonistów receptorów  $\mu$  – [D-Ala<sup>2</sup>, N-Me-Phe<sup>4</sup>, Met(O<sup>5</sup>)-ol]-enkefalin (FK 33-824), [D-Ala<sup>2</sup>, N-Me-Phe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol]-enkefalin (DAMGO),  $\beta$ -endorfiny; 3 agonistów receptorów  $\delta$  – met-enkefalin, leu-enkefalin, [D-Pen<sup>2</sup>, Pen<sup>5</sup>]-enkefalin (DPLPE) oraz 3 agonistów receptorów  $\kappa$  – dynorfiny A, dynorfiny B, U-50488. Inkubując komórki ziarniste świń wyizolowane z dużych pęcherzyków z agonistami receptorów opioidowych zanotowano obniżenie podstawowego (niestymulowanego innymi czynnikami) wydzielania androstendionu (A<sub>4</sub>), testosteronu (T) i estradiolu (E<sub>2</sub>) oraz nie stwierdzono ich wpływu na sekrecję progesteronu (P<sub>4</sub>). Obecność w pożywce LH – hormonu tropowego dla komórek ziarnistych w tym stadium rozwoju pęcherzyka jajnikowego – spowodowała zmianę hamującego wpływu opioidów na sekrecję androgenów na pobudzający. Stwierdzono ponadto, że komórki ziarniste poddane działaniu LH zmniejszyły wydzielanie E<sub>2</sub> pod wpływem agonistów receptorów  $\kappa$  [32]. Odnotowano również zbliżone działanie opioidów na steroidogenezę w komórkach osłonki wewnętrznej izolowanych z dużych pęcherzyków jajnikowych, tj. hamowanie podstawowego wydzielania hormonów steroidowych oraz wzmacnianie sekrecji tych steroidów przez komórki stymulowane LH. Obserwowano także różnice między komórkami obu typów w odpowiedzi na opioidy: steroidogeneza w komórkach osłonki wewnętrznej, w odróżnieniu od komórek ziarnistych, na wcześniejszym etapie (tj. wytwarzania P<sub>4</sub>) była podatna na działanie opioidów. Ponadto zarówno podstawowa sekrecja androgenów, jak i stymulowana sekrecja E<sub>2</sub> przez komórki osłonki nie były modulowane przez ligandy receptorów  $\kappa$  (tab. 1) [31].

Wpływ agonistów trzech podstawowych typów receptorów opioidowych na steroidogenezę w komórkach pęcherzykowych był generalnie podobny. Ta prawidłowość w mniejszym stopniu była zachowana w odniesieniu do ligandów receptorów  $\kappa$ . W przeciwieństwie do agonistów receptorów  $\mu$  i  $\delta$  nie zmieniały one podstawowej sekrecji androgenów i pobudzały stymulowaną LH sekrecję P<sub>4</sub> w komórkach osłonki wewnętrznej oraz hamowały wydzielanie E<sub>2</sub> przez komórki ziarniste inkubowane w obecności LH (tab. 1). Inny, szczególnie w porównaniu z receptorami  $\mu$ , efekt pobudzenia receptorów  $\kappa$  jest także widoczny w odniesieniu do funkcjonowania centralnego układu nerwowego, włączając w to kontrolę bólu, pamięć, tolerancję i uzależnienie [59, 77].

Każdy z dziewięciu wykorzystanych w doświadczeniu opioidów użyty został, czy to samodzielnie czy też w kombinacji z LH, w czterech koncentracjach: 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup> i 10<sup>-6</sup> M. W wielu przypadkach, opioidy działały najbardziej efektywnie, kiedy zastosowano je w najniższych dawkach. Może to wynikać z dwufazowego działania opioidów, najlepiej poznanego w przypadku ich wpływu na produkcję cAMP, która jest pobudzana lub hamowana w zależności od dawki użytego związku [70]. Podobne (dwufazowe) działanie opioidów było też obserwowane w zakresie ich wpływu na sekrecję hormonów steroidowych. Stwierdzono mianowicie, że opioidy w niższych

TABELA 1. Wpływ agonistów receptorów opioidowych  $\mu$  (FK 33-824, DAMGO,  $\beta$ -endorfiny),  $\delta$  (met-enkefalin, leu-enkefalin, DPLPE) oraz  $\kappa$  (dynorfiny A, dynorfiny B, U-50488) na steroidogenezę w komórkach ziarnistych i osłonki wewnętrznej izolowanych z dużych pęcherzyków jajnikowych świń podczas 4-godzinnej inkubacji  $\uparrow$  – wzrost wydzielania hormonu pod wpływem agonistów opioidowych; brak – nie stwierdzono wpływu;  $\downarrow$  – zahamowanie wydzielania hormonu; P<sub>4</sub> – progesteron; A<sub>4</sub> – androstendion; T – testosteron; E<sub>2</sub> – estradiol

Rodzaje komórek pęcherzyka jajnikowego	Zmiany w sekrecji hormonów steroidowych pod wpływem											
	agonistów receptorów $\mu$				agonistów receptorów $\delta$				agonistów receptorów $\kappa$			
	P <sub>4</sub>	A <sub>4</sub>	T	E <sub>2</sub>	P <sub>4</sub>	A <sub>4</sub>	T	E <sub>2</sub>	P <sub>4</sub>	A <sub>4</sub>	T	E <sub>2</sub>
Komórki ziarniste inkubowane bez LH	brak	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	brak	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	brak	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$
Komórki ziarniste inkubowane w obecności LH	brak	brak	$\uparrow$	brak	brak	$\uparrow^1$	$\uparrow$	brak	brak	$\uparrow$	$\uparrow^2$	$\downarrow$
Komórki osłonki wewnętrznej inkubowane bez LH	brak	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow^3$	$\downarrow$	$\downarrow$	brak	brak	$\downarrow$
Komórki osłonki wewnętrznej inkubowane w obecności LH	brak	$\uparrow$	$\uparrow$	brak	brak	$\uparrow$	$\uparrow$	brak	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	brak

<sup>1</sup>pod wpływem Leu-enkefalin w dawce  $10^{-9}$  M i Met-enkefalin w dawce  $10^{-6}$  M; <sup>2</sup>pod wpływem dynorfiny A w dawce  $10^{-8}$  M;

<sup>3</sup>pod wpływem DPLPE w dawce  $10^{-7}$  M

koncentracjach ( $10^{-11}$ – $10^{-6}$  M) hamowały, podczas gdy w wyższych ( $10^{-5}$  i  $5 \times 10^{-5}$  M) zwiększały sekrecję kortykosteronu przez komórki kory nadnerczy szczurów [78]. Nie sposób wykluczyć, że po zastosowaniu większej liczby dawek poszczególnych opioidów tego rodzaju efekt byłby obserwowany także w komórkach pęcherzyka jajnikowego.

Odnotowana w doświadczeniu odmienna odpowiedź komórek ziarnistych i osłonki wewnętrznej na opioidy użyte samodzielnie bądź w połączeniu z LH wskazuje na istnienie interakcji pomiędzy tymi czynnikami. Wydaje się, że miejscem interakcji mogą być wewnątrzkomórkowe szlaki transmisji sygnału indukowanego przez LH oraz opioidy. Zaliczamy do nich przede wszystkim szlaki z udziałem cyklicznej adenylanowej (AC) oraz kinazy białkowej A (PKA), a także fosfatydyloinozitoloswoistej fosfolipazy C (PLC) i kinazy białkowej C (PKC), o których wiadomo, że pośredniczą zarówno w działaniu opioidów [41], jak i LH [14, 83] na komórki jajnika świń. Niewykluczony jest również wpływ opioidów na ekspresję genu dla receptora LH. Zostało to stwierdzone w komórkach lutealnych świń, gdzie agonista receptorów  $\mu$ , FK 33-824, stymulował ekspresję tego genu w małych komórkach lutealnych i hamował w dużych [29].

Należy podkreślić, że opisane powyżej wyniki uzyskano w wyniku krótkiej, czterogodzinnej inkubacji komórek pęcherzyka jajnikowego. Wydłużenie inkubacji komórek ziarnistych i osłonki wewnętrznej z FK 33-824 do 24 godzin pociąga za sobą zmianę wpływu opioidu na podstawową sekrecję androgenów z hamującego (podczas czterogodzinnej inkubacji) na stymulującego oraz zanik wpływu na wydzielanie  $E_2$  [30, 34]. Wydłużenie inkubacji przypuszczalnie wpływa również na interakcje opioidów z gonadotropinami, o czym świadczy zahamowanie pod wpływem FK 33-824 sekrecji  $P_4$  przez komórki ziarniste i osłonki wewnętrznej poddane dobowej inkubacji, odpowiednio, z FSH [34] i LH [30]. Przyczyną tych zmian jest prawdopodobnie zróżnicowany, w zależności od czasu ekspozycji, wpływ opioidów na aktywność enzymów pośredniczących w przesyłaniu wewnątrzkomórkowego sygnału inicjowanego połączeniem opioidu z odpowiednim receptorem. Zagadnienie to zostanie dokładniej omówione w drugiej części artykułu.

Opisane powyżej działanie opioidów odnosi się, jak wcześniej zaznaczono, do komórek wyizolowanych z dużych pęcherzyków jajnikowych. Reaktywność komórek na opioidy zmienia się w zależności od fazy rozwoju pęcherzyka, ponieważ ilość receptorów opioidowych w komórkach pęcherzyka jajnikowego świń obniża się w miarę jego wzrostu [25, 72]. Sugestia ta znajduje potwierdzenie w pracy Gregoraszcuk i Słomczyńskiej [24], w której stwierdzono hamujący wpływ  $\beta$ -endorfiny na sekrecję  $P_4$  przez komórki ziarniste z małych i średnich, lecz nie z dużych pęcherzyków jajnikowych. Ponadto hamujący wpływ opioidu na sekrecję  $P_4$  i  $E_2$  przez komórki stymulowane LH był wyraźnie silniej zaznaczony w stosunku do komórek izolowanych z pęcherzyków małych w porównaniu z jego wpływem na komórki pobrane z pozostałych rodzajów pęcherzyków.

Głównym zadaniem pęcherzyka jajnikowego jest stworzenie optymalnych warunków dla rozwijającej się komórki jajowej. Można zatem wnosić, że opioidy zmieniając sekrecję steroidów jajnikowych będą uczestniczyć w selekcji pęcherzyków i kontroli procesu owulacji. Pobudzenie przez opioidy sekrecji androgenów przez komórki ziarniste i



osłonki wewnętrznej w obecności LH (tzn. w warunkach przypominających sytuację *in vivo*) oraz hamowanie wydzielania  $E_2$  przez komórki osłonki pod wpływem ligandów receptorów  $\kappa$  może sugerować ich udział w indukcji atrezji pęcherzyków, a przez to w ich selekcji. Ponadto możliwe jest ich współdziałanie w kontroli dojrzewania oocytów i owulacji pęcherzyków. Hamujący wpływ  $\beta$ -endorfiny na te procesy został zaobserwowany u szczurów [22, 56] i krów [16].

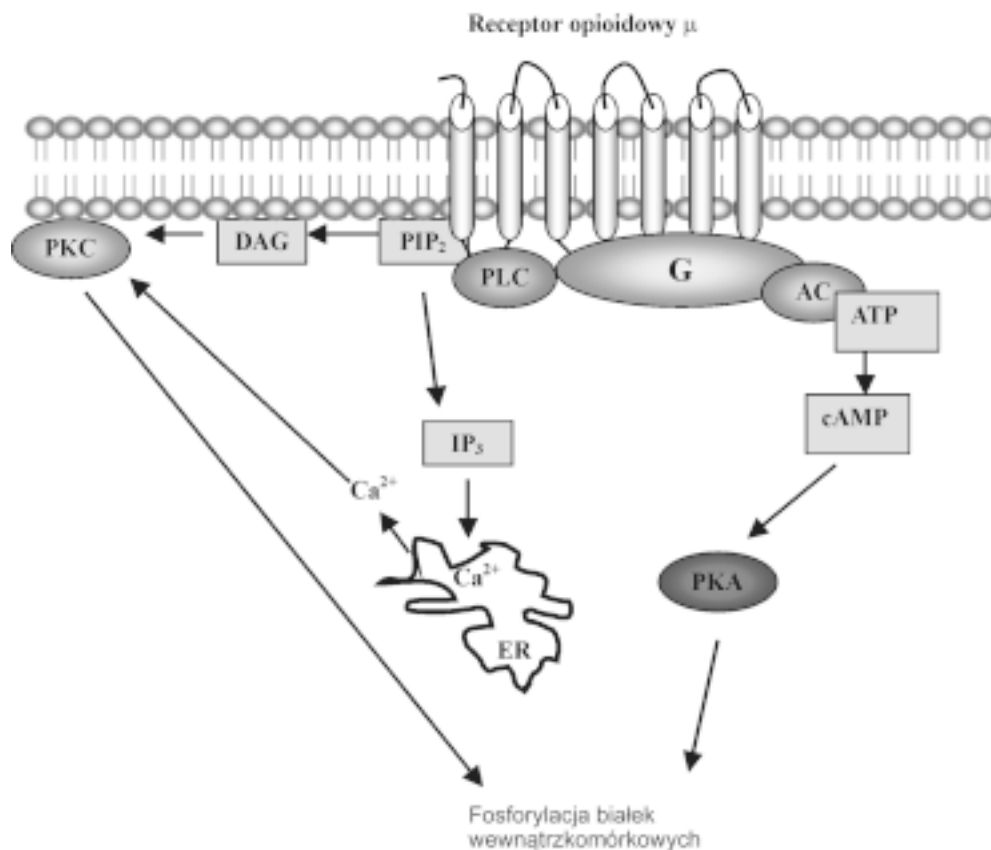
Mimo że oddziaływanie opioidów na sekrecję steroidów płciowych jest filogenetycznie „dobrze zakotwiczone”, o czym świadczy ich udział w regulacji wytwarzania tych hormonów w jajnikach płazów [86] i gadów [62], to różnice pomiędzy gatunkami dotyczące odpowiedzi komórek pęcherzyka jajnikowego na opioidy wydają się dość znaczne. Przykładowo, komórki ziarniste kobiet, u których wywołano superowulację, okazały się niewrażliwe na  $\beta$ -endorfinę, a reagowały wzrostem syntezy  $P_4$  jedynie pod wpływem Met-enkefaliny. Warunkiem skutecznego działania enkefaliny była obecność w pożywce FSH [21].

Po owulacji pęcherzyków jajnikowych i powstaniu ciałek żółtych w dalszym ciągu widoczny jest wpływ opioidów na steroidogenezę jajnikową, głównie wytwarzanie progesteronu. Reaktywność komórek lutealnych na opioidy wydaje się być w istotnym stopniu modulowana przez interakcje komórkowe, przede wszystkim między dużymi i małymi komórkami lutealnymi – inny jest bowiem wpływ opioidów na sekrecję steroidów przez mieszaninę komórek lutealnych, a inny na rozdzielone małe i duże komórki. Nierozdzielone komórki lutealne zarówno z fazy wczesno-, jak i środkowo-lutealnej reagowały na FK 33-824 wzrostem podstawowej (niestymulowanej) sekrecji  $P_4$  [65, 66], podczas gdy po rozdzieleniu mieszaniny komórek widoczny był jedynie hamujący wpływ opioidu na uwalnianie  $P_4$  przez małe komórki z fazy środkowo-lutealnej stymulowane hCG [35]. Ta ostatnia obserwacja wskazuje także na wpływ okresu rozwoju ciała żółtego świni na reaktywność komórek lutealnych na opioidy. Zaangażowanie opioidów w regulację wytwarzania steroidów w ciałkach żółtych potwierdziły również podobne badania przeprowadzone na komórkach lutealnych szczurów [40] i krów [67], w tym pobranych od zwierząt ciężarnych [80].

## **MECHANIZM DZIAŁANIA AGONISTY RECEPTORÓW OPIOIDOWYCH, FK 33-824, W KOMÓRKACH ZIARNISTYCH I OSŁONKI WEWNĘTRZNEJ PĘCHERZYKA JAJNIKOWEGO ŚWIŃ**

Opisany powyżej wpływ opioidów na sekrecję steroidów przez komórki pęcherzyka jajnikowego i inne struktury jajnika wydaje się być znacznie lepiej poznany w porównaniu z wewnątrzkomórkowymi procesami transmisji sygnału inicjowanymi przez opioidy i powodującymi zmianę aktywności steroidogenicznej komórek. Do niedawna mechanizm działania opioidów w jajniku był rozpatrywany na podstawie wyników badań przeprowadzonych głównie na komórkach układu nerwowego lub liniach komórkowych wywodzących się z tego układu, np. NG108-15 lub SH-SY5Y. Uzyskane dane dostar-

czyły dowodów pozwalających stwierdzić, że opioidy w komórkach układu nerwowego, działając poprzez receptory związane z białkami G, wpływają na aktywność przede wszystkim dwóch szlaków przesyłania sygnału: PLC/PKC i AC/PKA, a pośrednio także na kinazy aktywowane mitogenem oraz kanały jonowe dla potasu i wapnia [41]. Pierwszy ze szlaków zaczyna się od PLC, enzymu powodującego rozpad lipidu błonowego – fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforanu do dwóch tzw. wtórnych przekazników: inozytolo(1,4,5)trisfosforanu ( $IP_3$ ) i 1,2-diacylglicerolu (DAG).  $IP_3$ , po dyfuzji do siateczki śródplazmatycznej, powoduje uwolnienie z niej jonów  $Ca^{2+}$ , określanych czasem jako trzeci przekaznik, natomiast DAG pozostaje w błonie komórkowej aktywując specyficzne izoformy PKC (zależne od DAG). Spośród czterech znanych typów PLC ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) najbardziej zaangażowana w mechanizm działania opioidów wydaje się być  $PLC_{\beta}$ , aktywowana przez białka G związane m.in. z

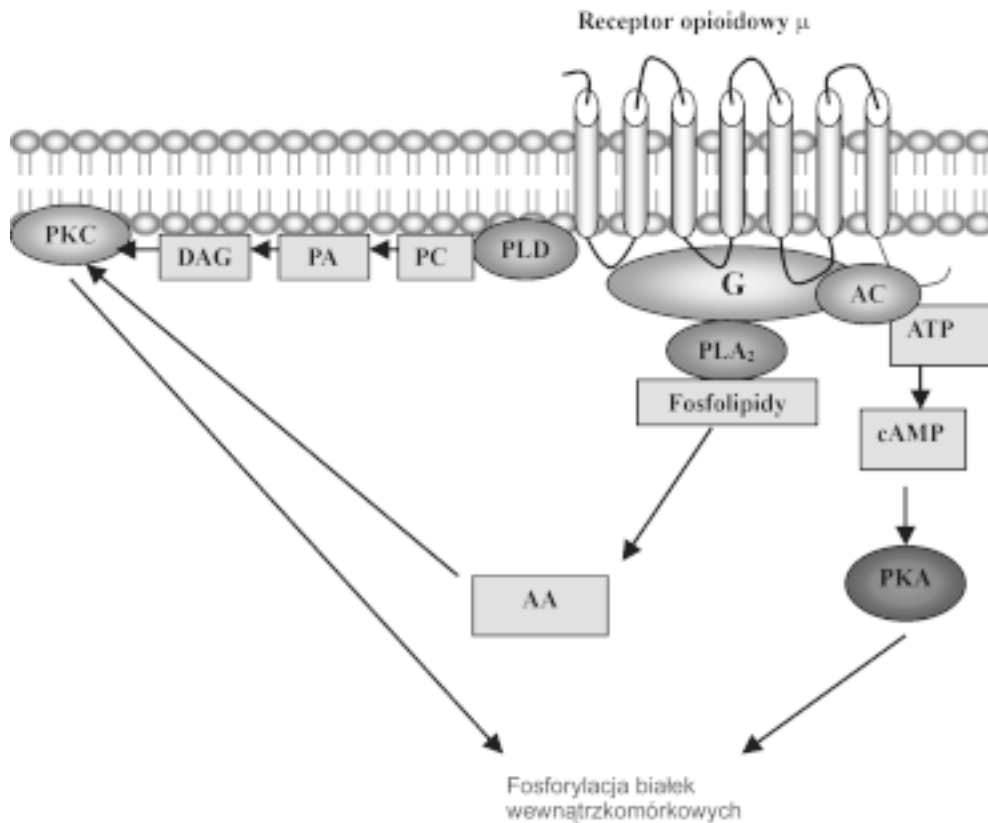


RYCINA 1. Wewnątrzkomórkowe szlaki transmisji sygnału przypuszczalnie wykorzystywane przez FK 33-824, agonistę głównie receptorów  $\mu$ , w komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyków jajnikowych świń (szczegóły w tekście). Objasnienia: **G** – białka G; **PLC** – fosfatydyloinozytolo swoista fosfolipaza C; **AC** – cyklaza adenylanowa; **PKA** – kinaza białkowa A; **PKC** – kinaza białkowa C; **DAG** – 1,2-diacylglicerol; **IP<sub>3</sub>** – inozytolo(1,4,5)trisfosforan; **PIP<sub>2</sub>** – fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforan; **ER** – siateczka śródplazmatyczna



receptorami opioidowymi [41]. Izoformy  $PLC_{\beta}$  ( $\beta_{1-4}$ ) stwierdzono także w jajniku świń [44]. Obecność w komórce kilku izoform  $PLC_{\beta}$  zwiększa spektrum jej możliwych odpowiedzi na działanie opioidów, ponieważ opioidy w różny sposób wpływają na poszczególne rodzaje  $PLC_{\beta}$  [9].

Badając mechanizm działania opioidów w komórkach ziarnistych i osłonki wewnętrznej świń skupiono się na agonistach receptorów  $\mu$ , wykorzystując jeden z ligandów tych receptorów, FK 33-824 – syntetyczny peptyd naśladujący działanie  $\beta$ -endorfiny, ale mniej od niej podatny na enzymatyczny rozkład [68]. Wykazane w komórkach osłonki wewnętrznej w odpowiedzi na FK 33-824 zmniejszone wytwarzanie  $IP_3$  [38], będącego wyznacznikiem aktywności PLC, sugeruje hamujący wpływ opioidu na aktywność tego enzymu. Osłabienie aktywności PLC obserwuje się czasem jako skutek zwrotnego (hamującego) działania pobudzonej PKC [41, 46]. W badaniach własnych,



RYCINA 2. Wewnątrzkomórkowe szlaki transmisji sygnału przypuszczalnie wykorzystywane przez FK 33-824, agonistę głównie receptorów  $\mu$ , w komórkach ziarnistych pęcherzyków jajnikowych świń (szczegóły w tekście). Objaśnienia: **G** – białka G; **PLA<sub>2</sub>** – fosfolipaza A<sub>2</sub>; **PLD** – fosfolipaza D; **AC** – cyklaza adenylnowa; **PKA** – kinaza białkowa A; **PKC** – kinaza białkowa C; **DAG** – 1,2-diacylglicerol; **PC** – fosfatydylocholina; **PA** – kwas fosfatydowy; **AA** – kwas arachidonowy

obniżeniu aktywności PLC towarzyszyło zahamowanie PKC, co wskazuje, że zmniejszenie aktywności PLC było efektem pierwotnym, wynikającym z bezpośredniego działania FK 33-824, a nie wtórnym, związanym z pobudzeniem PKC (rys. 1). W innych komórkach i tkankach obserwuje się tak pobudzenie [53, 73], jak i hamowanie [6, 28, 71] aktywności PLC pod wpływem opioidów. Z kolei w małych i dużych komórkach lutealnych świń nie stwierdzono zmian w sekrecji  $IP_3$  w wyniku działania FK 33-824 [35]. Należy zatem sądzić, że zaangażowanie PLC w przekaznictwo sygnału indukowanego przez opioid łączący się z odpowiednim receptorem (głównie  $\mu$ ) jest specyficzne dla poszczególnych komórek.

Komórki ziarniste świń należą do komórek, które nie odpowiedziały zmianą uwalniania  $IP_3$  na podanie opioidu [38], co – przy jednoczesnym zahamowaniu PKC – sugeruje istnienie innego niż PLC „łącznika” między kompleksem opioid-receptor-białka G a PKC. Kandydatami na tego „łącznika” mogą być fosfolipazy, D (PLD) i  $A_2$  ( $PLA_2$ ), o których wiadomo, że mogą pośredniczyć w działaniu opioidów (rys. 2). PLD powoduje hydrolizę fosfatydylocholiny do kwasu fosfatydowego, który sam może być wtórnym przekaźnikiem sygnału (aktywując zależne od siebie kinazy) bądź stanowi substrat dla fosfohydrolazy kwasu fosfatydowego przekształcając się w DAG. Ilość DAG powstającego w ten sposób przewyższa nawet tę, która powstaje z udziałem PLC [46]. Badania na neuronach embrionów kurzych [51] i komórkach linii CHO  $\kappa 18$  [4] wskazują, że możliwa jest sytuacja, w której opioidy, nie wpływając na aktywność PLC, regulują aktywność odpowiednich kinaz białkowych C (zależnych od DAG) za pośrednictwem PLD. Niektóre izoformy PKC, tzw. konwencjonalne PKC, mogą być też aktywowane przez wolne kwasy tłuszczowe, np. kwas arachidonowy uwalniany przez  $PLA_2$  [46].  $PLA_2$  z kolei może być poddana wpływom, zarówno pobudzającym jak i hamującym, agonistów receptorów opioidowych  $\mu$ . Tego rodzaju działanie opioidów stwierdzono m.in. w niektórych obszarach mózgu szczurów [12, 71], w jelicie biodrowym świnek morskich [7, 8], czy też w komórkach CHO [23]. Nie można jednak wykluczyć, że w doświadczeniu z komórkami ziarnistymi świń FK 33-824 użyty był w dawce zbyt niskiej ( $10^{-9}$  M) by spowodować odpowiedź PLC. Na podstawie badań na komórkach linii COS-7 wiadomo, że dawka opioidu niezbędna do wywołania takiej odpowiedzi jest ok. 50-krotnie wyższa [42] niż ta, która spowodowała zahamowanie aktywności cyklazy adenylnowej w tym doświadczeniu. Brak wpływu FK 33-824 ( $10^{-9}$  M) na komórki ziarniste i hamowanie przez niego aktywności PLC w komórkach osłonki wewnętrznej wskazuje na istnienie różnic w mechanizmie działania opioidu w obu typach komórek pęcherzyka jajnikowego świni (rys. 1 i 2).

Uwolnienie jonów  $Ca^{2+}$  pod wpływem  $IP_3$  i DAG w wyniku działania PLC lub PLD prowadzi do uaktywnienia kinaz białkowych C. Jednocześnie poznanych dotychczas izoform PKC tworzy trzy podrodziny kinaz C: konwencjonalne (cPKC –  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta_{II}$ ,  $\gamma$ ) zależne od jonów  $Ca^{2+}$ , DAG i fosfatydyloseryny; nowe (nPKC –  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) regulowane przez DAG i fosfatydyloserynę oraz atypowe (aPKC –  $\xi$ ,  $\lambda/\tau$ ), zależne jedynie od fosfatydyloseryny [46]. Występowanie PKC w jajniku świń jest niepodważalne [3, 55, 84], nie jest natomiast w pełni zbadane, które izoformy kinazy są w nim obecne. Zahamowanie aktywności PLC przez FK 33-824 w komórkach osłonki wewnętrznej sugeruje, że także aktywność PKC (izoform zależnych od DAG – konwencjonalnych i

nowych) ulega zmniejszeniu. Kolejne doświadczenia z udziałem zarówno komórek ziarnistych, jak i osłonki wewnętrznej wskazują, że ich krótka, kilkugodzinna ekspozycja na opioid może powodować obniżenie aktywności PKC. W pierwszym z nich stwierdzono, że forbol 12-mirystylo-13-acetylowy (PMA, związek z grupy estrów forboli naśladujący działanie DAG) znosi hamujący wpływ FK 33-824 na steroidogenezę w obu typach komórek. Potwierdzeniem swoistości działania PMA (poprzez PKC) jest fakt, że nieaktywny stereoizomer PMA, 4 $\alpha$ -PDD, nie dawał takich efektów [37, 38]. Podobne osłabienie działania agonistów receptorów  $\mu$  (DAMGO i morfiny) przez – zbliżony w działaniu do PMA – ester forbolu (PDBu; forbol 12,13-dibutyrylowy) zanotowano w testach bólowych przeprowadzonych na myszach [54]. W innym doświadczeniu, opartym na wprost proporcjonalnej zależności między stopniem pobudzenia PKC (izoforn konwencjonalnych lub nowych) a ilością związanego przez struktury komórkowe znakowanego trytem PDBu, zanotowano – w wyniku podania FK 33-824 – obniżenie wiązania  $^3\text{H}$ PDBu przez komórki ziarniste i osłonki wewnętrznej (w pierwszym przypadku po upływie 10 min inkubacji, drugim – 3 min). Użyta jako kontrola pozytywna, jonomycyna spowodowała wzrost wiązania  $^3\text{H}$ PDBu przez oba typy komórek. W następnym doświadczeniu stwierdzono, że trzy przebadane inhibitory PKC: staurosporyna (działająca poprzez domenę katalityczną enzymu), D-sfingozyna (łącząca się z domeną regulatorową) i PKCi (będąca pseudosubstratem) hamują steroidogenezę w komórkach pęcherzyka jajnikowego świni, naśladując działanie FK 33-824 [37, 38]. Podobny efekt osiągnięto dezaktywując PKC poprzez 36-godzinną inkubację komórek w obecności dużej dawki PMA (rzędu  $10^{-6}$  M), w wyniku której następuje enzymatyczna degradacja enzymu [46]. Uzyskane w ten sposób komórki (ang. *PKC-deficient cells*) produkowały znacznie mniej hormonów steroidowych niż komórki z aktywną kinazą C. Dodanie opioidu do komórek pozbawionych aktywnej PKC bądź inkubowanych w obecności inhibitorów tego enzymu powodowało dalsze obniżenie sekrecji steroidów [37, 38]. Może to wskazywać na wykorzystanie – oprócz PKC zależnych od DAG (cPKC lub nPKC), na co wskazuje skuteczne działanie PMA i PDBu we wcześniejszych doświadczeniach – także atypowych kinaz C (niezależnych od DAG i estrów forboli). Głębszą analizę tego problemu utrudnia nieznamość izoforn PKC występujących w jajniku świni. Innym wyjaśnieniem opisanego wyżej hamowania steroidogenezy może być zaangażowanie w mechanizm działania opioidu dodatkowego szlaku transmisji sygnału, np. AC/PKA. Wykorzystanie przez opioidy obu kaskad sygnałowych, angażujących kinazy białkowe A i C, zostało wcześniej zaobserwowane w mózgu szczurów [71] oraz komórkach linii COS i CHO [28]. Do podobnych wniosków prowadzą dane opublikowane przez Smitha i wsp. [74] wskazujące, że tolerancja na morfinę u myszy może być w pełni zniesiona jedynie po równoczesnym zastosowaniu inhibitorów PKA i PKC.

Udział szlaku AC/PKA w mechanizmie działania opioidów w komórkach układu nerwowego wydaje się być dobrze poznany, często bywa wręcz wykorzystywany jako rodzaj kontroli doświadczeń ukierunkowanych na badanie działania opioidów na poziomie subkomórkowym [41, 85]. Pierwszym enzymem efektorowym w tym szlaku jest cyklaza adenylanowa przekształcająca ATP w cykliczny 3',5'-adenozyno-mono-fosforan (cAMP), który aktywuje PKA łącząc się z jej jednostkami regulatorowymi i

uwalniając jednostki katalityczne. Obecność enzymów tego szlaku wykazano w strukturach jajnika świni [15]. Zmniejszenie sekrecji cAMP przez komórki ziarniste [33, 37] i osłonki wewnętrznej [38] pod wpływem FK 33-824, w trakcie dwugodzinnej inkubacji, wskazuje na hamowanie aktywności AC w wyniku działania opioidu. Podobny, hamujący wpływ opioidów zanotowano w komórkach lutealnych [1, 40] i kory nadnerczy [39] gryzoni. Wydłużenie do 4 godzin ekspozycji na opioid obu typów komórek pęcherzyka jajnikowego świni spowodowało zanik hamującego wpływu FK 33-824 [33, 37, 38]. Przyczyną tej reakcji może być obserwowana na innych modelach doświadczalnych [10, 19, 79, 81, 82] zmiana odpowiedzi AC z hamującej na pobudzającą w następstwie długotrwałego podawania opioidów. Sugestia, że podobny proces zachodzi w pęcherzyku jajnikowym, znajduje potwierdzenie w wynikach doświadczenia przeprowadzonego na dużych komórkach lutealnych świń, których dwunastogodzinna inkubacja z FK 33-824 doprowadziła do pobudzenia AC [35]. Można zatem przypuszczać, że wydłużenie czasu inkubacji komórek ziarnistych i osłonki wewnętrznej z opioidem powyżej 4 godzin dałoby zbliżony efekt. Z badań przeprowadzonych na komórkach układu nerwowego i komórkach linii COS-7, CHO lub NG 108-15 wiadomo, że minimalny czas ekspozycji komórek na opioidy, wywołujący wzrost aktywności AC, wynosi 6–10 godzin. Przyczyną aktywacji AC może być m.in. oddziaływanie na ten enzym białek  $G_s$  lub podjednostek  $\beta\gamma$  białek  $G_i$  [47, 85].

Obniżenie aktywności AC w komórkach pęcherzyka jajnikowego świni pod wpływem FK 33-824 pozwala sądzić, że także aktywność kolejnego w tej kaskadzie enzymu, PKA ulega zahamowaniu. Doświadczenia z udziałem aktywatora (8BrcAMP) i inhibitora (PKAi) kinazy białkowej A potwierdzają tę sugestię. W pierwszym z nich, FK 33-824 znosił stymulujący wpływ 8BrcAMP na steroidogenezę w komórkach ziarnistych i osłonki wewnętrznej, w następnym – inhibitor PKA, w sposób zbliżony do opioidu, hamował wytwarzanie steroidów. Podobnie jak w przypadku wspólnego użycia FK 33-824 oraz inhibitorów PKC, także po zastosowaniu opioidu z inhibitorem PKA obserwowano silniejsze hamowanie sekrecji steroidów przez inkubowane komórki w porównaniu z efektem odrębnego działania tych czynników [33, 37, 38]. Potwierdza to, wysuniętą wcześniej tezę, zaangażowania w mechanizm działania opioidu więcej niż jednej kaskady sygnałowej.

Jednoczesne uruchomienie dwóch szlaków transmisji sygnału, co – jak się wydaje – ma miejsce w opisywanych badaniach, stanowi podstawę do wystąpienia interakcji (ang. *cross-talk*) między nimi. Istnieją podstawy, by twierdzić, że AC i PKA mogą być fosforylowane przez PKC [46] i odwrotnie – PKC może być substratem dla PKA [11]. Można nawet przypuszczać, że opisywany wcześniej wzrost aktywności AC wskutek długotrwałego podawania opioidów mógł wynikać z fosforylacji cyklazy przez PKC, której aktywność także wzrasta po dłuższej ekspozycji komórek na opioidy. Fosforylacja AC prowadzi z kolei do jej „uwrażliwienia” na białka  $G_{s\alpha}$  i  $G_{\beta\gamma}$  [47]. Przytoczone dane wydają się wskazywać, że interpretacja danych eksperymentalnych wymaga wzięcia pod uwagę możliwości występowania interakcji pomiędzy szlakami uczestniczącymi w mechanizmie przekazywania sygnału indukowanego przez opioidy w komórkach docelowych.

## PODSUMOWANIE

Opioidy, działające za pośrednictwem receptorów  $\mu$ ,  $\delta$  i  $\kappa$ , wpływają na steroidogenezę w komórkach ziarnistych i osłonki wewnętrznej dużych pęcherzyków jajnikowych świń. Podczas krótkiej inkubacji tych komórek z opioidami ma miejsce hamowanie podstawowej, niestymulowanej przez LH steroidogenezy. W obecności LH w środowisku komórkowym generalnie następuje zanik hamującego działania opioidów lub pojawienie się stymulacji sekrecji steroidów pod ich wpływem. Wydaje się, że efekt obniżenia podstawowej steroidogenezy, w przypadku opioidów działających poprzez receptory  $\mu$ , osiągany jest w wyniku hamowania PKC, AC i PKA w komórkach ziarnistych oraz PLC, PKC, AC i PKA w komórkach osłonki wewnętrznej. Można przypuszczać, że w komórkach ziarnistych, w działaniu agonistów receptorów  $\mu$ , pośredniczą (zamiast PLC) inne fosfolipazy – D i A<sub>2</sub>. Pozostaje do wyjaśnienia udział innych szlaków transmisji sygnału w mechanizmie działania opioidów, np. kinaz aktywowanych mitogenem, zbadanie interakcji pomiędzy szlakami, a także stwierdzenie ewentualnych różnic w transmisji sygnału w następstwie łączenia się opioidów z różnymi receptorami ( $\mu$ ,  $\delta$  i  $\kappa$ ).

## Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania prof. dr hab. Jadwidze Przała, prof. dr hab. Stanisławowi Okrasie, dr Gabrieli Sławrysi i dr Iwonie Bogackiej za wszechstronną pomoc, życzliwość oraz stworzenie w pracy bardzo dobrej atmosfery.

## LITERATURA

- [1] ABRAMOWITZ J, CAMPBELL A. Enkephalin-mediated inhibition of forskolin-stimulated rabbit luteal adenylyl cyclase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; **116**: 574–580.
- [2] ALEEM F, OMAR RA, TABBAKH GH. Immunoreactive  $\beta$ -endorphin in human ovaries. *Fertil Steril* 1986; **45**: 507–511.
- [3] ASAKAI R, AKITA Y, TAMURA K, KENMOTSU K, AOYAMA Y. Protein kinase C-dependent down-regulation of basic fibroblast growth factor (FGF-2) receptor by phorbol ester and epidermal growth factor in porcine granulosa cells. *Endocrinology* 1995; **136**: 3470–3479.
- [4] BANERJEE B, CHROMY BA, BERRY-KRAVIS E, HAMMOND D, SINGH JK, DAWSON G. Stable expression and heterologues coupling of the kappa opioid receptor in cell lines of neural and nonneural origin. *Life Sci* 1996; **58**: 1277–1284.
- [5] BARB CR, KRAELING RR, RAMPACEK GB. Opioid modulation of gonadotropin and prolactin secretion in domestic farm animals. *Dom Anim Endocrinol* 1991; **8**: 15–27.
- [6] BARG J, BELCHEVA MM, ZIMLICHMAN R, LEVY R, SAYA D, MCHALE RJ, JOHNSON FE, COSCIA CJ, VOGEL Z. Opioids inhibit endothelin-mediated DNA synthesis, phosphoinositide turnover, and Ca<sup>2+</sup> mobilization in rat C6 glioma cells. *J Neurosci* 1994; **14**(10): 5858–5864.
- [7] CAPASSO A, SORRENTINO L. Arachidonic acid and its metabolites are involved in the expression of morphine dependence in guinea-pig isolated ileum. *Eur J Pharmacol* 1997; **330**: 199–204.



- [8] CAPASSO A. Further studies on the involvement of the arachidonic acid cascade in the acute dependence produced by  $\mu$ ,  $\kappa$  and  $\delta$  opioid agonists in isolated tissues. *Neuropharmacology* 1999; **38**: 871–877.
- [9] CHAKRABARTI S, LIU N-J, GINTZLER AR. Reciprocal modulation of phospholipase C $\beta$  isoforms: adaptation to chronic morphine. *PNAS* 2003; **100** (23): 13686–13691.
- [10] CHAKRABARTI S, WANG L, TANG WJ, GINTZLER AR. Chronic morphine augments adenylyl cyclase phosphorylation: relevance to altered signaling during tolerance/dependence. *Mol Pharmacol* 1998; **54**: 949–953.
- [11] CHIO C-C, CHANG Y-H, HSU Y-W, CHI K-H, LIN W-W. PKA-dependent activation of PKC, p38 MAPK and IKK in macrophage: implication in the induction of inducible nitric oxide synthase and interleukin-6 by dibutyryl cAMP. *Cell Signall* 2004; **16**: 565–575.
- [12] CHRISTIE MJ, CONNOR M, VAUGHAN CW, INGRAM SL, BAGLEY EE. Cellular actions of opioids and other analgesics: implications for synergism in pain relief. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; **27**: 520–523.
- [13] CUPO A, MENEZO Y, BUENO L. Enkephalin production by the corpus luteum. *Neuropeptides* 1987; **9**: 237–245.
- [14] DAVIS J S, MAY JV, KEEL BA. Mechanism of hormone and growth factor action in the bovine corpus luteum. *Theriogenology* 1996; **45**: 1351–1380.
- [15] DeMANNO D, HUNZICKER-DUNN M. cAMP-dependent protein kinase isozymes in porcine follicles and corpora lutea. *Mol Cell Endocrinol* 1991; **80**: 91–104.
- [16] DELL'AQUILA ME, CASAVOLA V, RESHKIN SJ, ALBRIZIO M, GUERRA L, MARITATO F, MINOLA P. Effects of  $\beta$ -endorphin and naloxone on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Develop* 2002; **63**: 210–222.
- [17] DOUGLASS J, COX B, QUINN B, CIVELLI O, HERBERT E. Expression of the prodynorphin gene in male and female mammalian reproductive tissues. *Endocrinology* 1987; **120**: 707–713.
- [18] DUDZIAK M, DZIWIŃSKI T, MAJEWSKI P. Endogenne opioidy – charakterystyka i wybrane funkcje. [w] SOTOWSKA-BROCHOCKA J [red.]. Fizjologia zwierząt. Wybrane zagadnienia. Warszawa, Wydaw. Uniwersytetu Warszawskiego 2001: 125–148.
- [19] ECKHARDT K, NEVO I, LEVY R, MIKUS G, EICHELBAUM M, VOGEL Z. Morphine-related metabolites differentially activate adenylyl cyclase isozymes after acute and chronic administration. *FEBS Lett* 2000; **470**: 309–314.
- [20] EHRENREICH H, STOCK A, SCHULZ R. Opioid in bovinen Luteinzellkulturen. X Veterinar-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, 1985, Berlin.
- [21] FACCHINETTI F, RUSPA M, PETRAGLIA F, SEGRE A, FORABOSCO A, GENAZZANI AR. Met-enkephalin enhances FSH-dependent progesterone production from cultured granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; **63**: 1222–1224.
- [22] FALETTI A, VIGGIANO JM, GIMENO MAF. Beta-endorphin inhibits prostaglandin synthesis in rat ovaries and blocks induced ovulation. *Prostaglandins* 1995; **49**: 93–103.
- [23] FUKUDA K, KATO S, MORIKAWA H, SHODA T, MORI K. Functional coupling of the  $\delta$ -,  $\mu$ -, and  $\kappa$ -opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and arachidonate release in Chinese hamster ovary cells. *J Neurochem* 1996; **67**: 1309–1316.
- [24] GREGORASZCZUK E, SŁOMCZYŃSKA M.  $\beta$ -Endorphin inhibition of progesterone secretion by porcine granulosa cells during follicle development. *Reprod Nutr Dev* 1998; **38**: 227–234.
- [25] HAMADA H, KISHIOKA S, YAMOTO M, NAKANO R. ( $^3$ H)Naloxone binding sites in porcine ovarian follicles and corpora lutea during the ovarian cycle. *Europ J Endocrinol* 1995; **132**: 622–626.
- [26] HAPPOLA O, ŁAKOMY M, YANAIHARA N. Met $^5$ -enkephalin and Met $^5$ -enkephalin-Arg $^6$ -Gly $^7$ -Leu $^8$ -immunoreactive nerve fibers in the pig female reproductive system. *Neurosci Lett* 1989; **101**: 156–162.
- [27] JIN DF, MUFFLY KE, OKULICZ WC, KILPATRICK DL. Estrous cycle- and pregnancy-related differences in expression of the proenkephalin and proopiomeelanocortin genes in the ovary and uterus. *Endocrinology* 1988; **122**: 1466–1471.
- [28] JOHNSON PS, WANG JB, WANG WF, UHL GR. Expressed mu opiate receptor couples to adenylate cyclase and phosphatidylinositol turnover. *Neuroreport* 1994; **5**: 507–509.
- [29] KAMIŃSKI T, GAWRÓŃSKA B, DERECKA K, OKRASA S, PRZAŁA J. Gene expression and peptide localisation for LH/hCG receptor in porcine small and large luteal cells: possible regulation by opioid peptides. *J Physiol Pharmacol* 2000; **51**: 359–368.
- [30] KAMIŃSKI T, OKRASA S, BOGACKA I, SIAWRYS G, PRZAŁA J. Porcine theca cells produce immunoreactive  $\beta$ -endorphin and change steroidogenesis in response to opioid agonist. *Acta Vet Hung* 2001; **49**: 319–329.



- [31] KAMIŃSKI T, SIAWRYS G, BOGACKA I, OKRASA S, PRZAŁA J. The regulation of steroidogenesis by opioid peptides in porcine theca cells. *Anim Reprod Sci* 2003; **78**: 71–84.
- [32] KAMIŃSKI T, SIAWRYS G, BOGACKA I, OKRASA S, PRZAŁA J. The influence of opioid peptides on steroidogenesis in porcine granulosa cells. *Reprod Dom Anim* 2004; **39**: 25–32.
- [33] KAMIŃSKI T, SIAWRYS G, BOGACKA I, OKRASA S, PRZAŁA J. Udział cykazy adenylanowej i kinazy białkowej A w mechanizmie działania opioidów w komórkach ziarnistych pęcherzyka jajnikowego świni. Materiały XXXVIII Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików oraz III Krajowego Zjazdu Towarzystwa Biologii Rozrodu, Międzyzdroje, 2002.
- [34] KAMIŃSKI T, SIAWRYS G, BOGACKA I, PRZAŁA J. The physiological role of  $\beta$ -endorphin in porcine ovarian follicles. *Reprod Nutr Dev* 2000; **40**: 63–75.
- [35] KAMIŃSKI T, SIAWRYS G, OKRASA S, PRZAŁA J. Action of the opioid agonist FK 33-824 on porcine small and large luteal cells from the mid-luteal phase: effect on progesterone, cAMP, cGMP and inositol phosphate release. *Anim Reprod Sci* 1999; **56**: 245–257.
- [36] KAMIŃSKI T, PRZAŁA J, OKRASA S, BIAŁŁOWICZ I, FROL A. Androstenedione and estradiol secretion by porcine granulosa cells from small and medium-sized follicles: effects of morphine and naloxone. Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction, Haga, Holandia 1992; **3**: 1142–1144.
- [37] KAMIŃSKI T. Intracellular changes in porcine granulosa cells following treatment with opioid agonist, FK 33-824. *Anim Reprod Sci* 2005 (w druku);
- [38] KAMIŃSKI T. The response of phospholipase C/protein kinase C and adenylyl cyclase/protein kinase A pathways in porcine theca interna cells to opioid agonist FK 33-824. *Dom Anim Endocrinol* 2004; **27**: 379–396.
- [39] KAPAS S, PURBRICK A, HINSON JP. Action of opioid peptides on the rat adrenal cortex: stimulation of steroid secretion through a specific  $\mu$  opioid receptor. *J Endocrinol* 1995; **144**: 503–510.
- [40] KATO T, KUMAI A, OKAMOTO R. Effect of  $\beta$ -endorphin on cAMP and progesterone accumulation in rat luteal cells. *Endocrine J* 1993; **40**: 323–328.
- [41] LAW P-Y, WONG YH, LOH HH. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000; **40**: 389–430.
- [42] LEE JWM, JOSHI S, CHAN JSC, WONG YH. Differential coupling of  $\mu$ -,  $\delta$ -, and  $\kappa$ -opioid receptors to  $G_{\alpha_c}$ -mediated stimulation of phospholipase C. *J Neurochem* 1998; **70**: 2203–2211.
- [43] LI W-I, WU H, KUMAR AM. Synthesis and secretion of immunoreactive-methionine-enkephalin from rabbit reproductive tissues *in vivo* and *in vitro*. *Biol Reprod* 1991; **45**: 691–697.
- [44] LIEBERHERR M, GROSSE B, MACHELON V. Phospholipase  $C_{\beta}$  and ovarian sex steroids in pig granulosa cells. *J Cell Biochem* 1999; **74**: 50–60.
- [45] LIM AT, LOLAIT S, BARLOW JW, O WS, ZOIS I, TOH BH, FUNDER JW. Immunoreactive  $\beta$ -endorphin in sheep ovary. *Nature* 1983; **303**: 709–711.
- [46] LIU J-P. Protein kinase C and its substrates. *Mol Cell Endocrinol* 1996; **116**: 1–29.
- [47] LIU JG, ANAND KJS. Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res Rev* 2001; **38**: 1–19.
- [48] LOLAIT SJ, AUTELITANO DJ, LIM AT, SMITH AI, TOH BH, FUNDER JW. Ovarian immuno reactive  $\beta$ -endorphin and estrous cycle in the rat. *Endocrinology* 1985; **117**: 161–168.
- [49] LOLAIT SJ, AUTELITANO DJ, MARKWICK AJ, TOH BH, FUNDER JW. Co-expression of vasopressin with  $\beta$ -endorphin and dynorphin in individual cells from the ovaries of Brattleboro and Long-Evans rats: immunocytochemical studies. *Peptides* 1986; **7**: 267–276.
- [50] LOVEGREN ES, ZIMNISKI SJ, PUETT D. Ovarian contents of immunoreactive  $\beta$ -endorphin and  $\alpha$ -N-acetylated opioid peptides in rats. *J Reprod Fertil* 1991; **91**: 91–100.
- [51] MANGOURA D, DAWSON G. Opioid peptides activate phospholipase D and protein kinase C- $\epsilon$  in chicken embryo neuron cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 2915–2919.
- [52] MELNER MH, YOUNG SL, CZERWIEC FS, LYN D, PUETT D, ROBERTS JL, KOOS RD. The regulation of granulosa cell proopiomelanocortin mRNA by androgens and gonadotrophins. *Endocrinology* 1986; **119**: 2082–2088.
- [53] MURTHY KS, MAKHLOUF GM. Opioid  $\mu$ ,  $\delta$ , and  $\kappa$  receptor-induced activation of phospholipase C- $\beta_3$  and inhibition of adenylyl cyclase is mediated by  $G_{12}$  and  $G_0$  in smooth muscle. *Mol Pharmacol* 1996; **50**: 870–877.
- [54] NARITA M, OHSAWA M, MIZOGUCHI H, KAMEI J, TSENG LF. Pretreatment with protein kinase C activator phorbol 12,13-dibutyrate attenuates the antinociception induced by  $\mu$ - but not  $\epsilon$ -opioid receptor agonist in the mouse. *Neuroscience* 1997; **76**: 291–298.

- [55] NOLAND TA, DIMINO MJ. Characterization and distribution of protein kinase C in ovarian tissue. *Biol Reprod* 1986; **35**: 863–872.
- [56] O W-S. The effect of  $\beta$ -endorphin on rat oocyte maturation *in vitro*. *Mol Cell Endocrinol* 1990; **68**: 181–185.
- [57] OKRASA S, KALAMARZ H, ZIECIK A. Gonadotrophin-releasing hormone release *in vitro* from the stalk median eminence of cyclic and ovariectomized gilts in response to naloxone or morphine. *Anim Reprod Sci* 1995; **40**: 151–163.
- [58] OKRASA S. Udział opioidów w regulacji wytwarzania LH u svin w różnych okresach aktywności płciowej. *Endokrynologia Polska* 1997; **48** (2): Suplement 5.
- [59] PAN Z.  $\mu$ -Opposing actions of the  $\kappa$ -opioid receptor. *TiPS* 1998; **19**: 94–98.
- [60] PETRAGLIA F, FACCHINETTI F, M'FUTA K, RUSPA M, BONAVERA JJ, GANDOLFI F, GENAZZANI AR. Endogenous opioid peptides in uterine fluid. *Fertil Steril* 1986; **46**: 247–251.
- [61] PETRAGLIA F, SEGRE A, FACCHINETTI F, CAMPANINI D, RUSPA M, GENAZZANI AR.  $\beta$ -Endorphin and met-enkephalin in peritoneal and ovarian follicular fluids of fertile and postmenopausal women. *Fertil Steril* 1985; **44**: 615–621.
- [62] POLZONETTI-MAGNI A, CARNEVALI O, MOSCONI G, NABISSI M, FACCHINETTI F. The pro-opiomelanocortin-derived peptide,  $\beta$ -endorphin, regulates ovarian function in the reproductive lizard, *Podarcis s. sicula* Raf. *Endocrine* 1994; **2**: 665–668.
- [63] PRZAŁA J, KAMIŃSKI T, OKRASA S, SIAWRYS G, BOGACKA I. The content of  $\beta$ -endorphin-like immunoreactivity in porcine corpus luteum (*in vivo*) and the potential roles of progesterone, oxytocin and prolactin in the regulation of  $\beta$ -endorphin release from luteal cells *in vitro*. *Reprod Dom Anim* 2001; **36**: 107–112.
- [64] PRZAŁA J, KAMIŃSKI T, SIAWRYS G, OKRASA S. Large luteal cells are the source of immunoreactive  $\beta$ -endorphin in the pig: effects of hCG and TNF $\alpha$  on its secretion by luteal cells *in vitro*. *Endocrine Reg* 1999; **33**: 117–123.
- [65] PRZAŁA J, GOŁACKA E, OKRASA S, KAMIŃSKI T, VAN PHAN K. Effect of met-enkephalin, PRL, and LH upon progesterone and androstenedione secretion by porcine luteal cells. Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction, Haga, Holandia 1992; **3**: 1175–1177.
- [66] PRZAŁA J, KAMIŃSKI T, BOGACKA I, SIAWRYS G. The role of opioids in porcine corpus luteum function. *J Physiol Pharmacol* 1996; **47** (Supl. 1): 101–110.
- [67] PRZAŁA J, KAMIŃSKI T, SIAWRYS G, OKRASA S. Effect of met-enkephalin analogue and naloxone on progesterone secretion by bovine luteal cells. *Acta Physiol Pol* 1990; **41** (Supl. 34): 217.
- [68] ROEMER D, BUESCHER HH, HILL RC. A synthetic enkephalin analogue with prolonged parenteral and oral analgesic activity. *Nature* 1977; **268**: 547–549.
- [69] SANDERS SL, MELNER MH, CURRY TE JR. Cellular localization of ovarian proopiomelanocortin mRNA during follicular and luteal development in the rat. *Mol Endocrinol* 1990; **4**: 1311–1319.
- [70] SARNE Y, RUBOVITCH V, FIELDS A, GAFNI M. Dissociation between the inhibitory and stimulatory effects of opioid peptides on cAMP formation in SK-N-SH neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **246**: 128–131.
- [71] SHARMA P, BHARDWAJ SK, SANDHU SK, KAUR G. Opioid regulation of gonadotropin release: role of signal transduction cascade. *Brain Res Bull* 2000; **52**(2): 135–142.
- [72] SŁOMCZYŃSKA M, PIERZCHAŁA-KOZIEC K, GREGORASZCZUK E, MADERSPACH K, WIERZCHOŚ E. The kappa-opioid receptor is present in porcine ovaries: localization in granulosa cells. *Cytobios* 1997; **92**: 195–202.
- [73] SMART D, SMITH G, LAMBERT DG.  $\mu$ -Opioid activates phospholipase C in SH-SY5Y human neuroblastoma cells via calcium-channel opening. *Biochem J* 1995; **305**: 577–582.
- [74] SMITH FL, JAVED RR, ELZEY MJ, DEWEY WL. The expression of a high level of morphine antinociceptive tolerance in mice involves both PKC and PKA. *Brain Res* 2003; **985**: 78–88.
- [75] STASZKIEWICZ J, SKOWROŃSKI MT, OKRASA S, KAMIŃSKI T, SIAWRYS G, PŁONKA KJ, KRAZIŃSKI BE, PRZAŁA J. Ekspresja genu kodującego prodynorfinę w komórkach pęcherzykowych jajnika loszek. XIII Sympozjum Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego, Sekcji Płodności i Niepłodności oraz Towarzystwa Biologii Rozrodu, 2004, Białowieża.
- [76] STASZKIEWICZ J, SKOWROŃSKI MT, PŁONKA KJ, KRAZIŃSKI BE, OKRASA S. Ekspresja genu kodującego proenkefalinę w przysadce, ciałku żółtym i pęcherzyku jajnikowym loszek. XIII Sympozjum Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego, Sekcji Płodności i Niepłodności, oraz Towarzystwa Biologii Rozrodu, 2004, Białowieża.

- [77] SUZUKI T, KISHIMOTO Y, OZAKI S, NARITA M. Mechanism of opioid dependence and interaction between opioid receptors. *Europ J Pain* 2001; **5** (Suppl A): 63–65.
- [78] SZALAY SZ K, STARK E. Effect of  $\beta$ -endorphin on the steroid production of isolated zona glomerulosa and zona fasciculata cells. *Life Sci* 1981; **29**:1355–1361.
- [79] TSO PH, YUNG LY, WONG YH. Regulation of adenylyl cyclase, ERK1/2, and CREB by  $G_i$  following acute and chronic activation of the delta-opioid receptor. *J Neurochem* 2000; **47**: 1685–1693.
- [80] VARSANO JS, IZHAR M, PERK K, SHEMESH M. Effect of  $\beta$ -endorphin on steroidogenesis by bovine luteal cells. *Reprod Fertil Dev* 1990; **2**: 337–343.
- [81] WANG L, GINTZLER AR. Altered mu-opiate receptor-G protein signal transduction following chronic morphine exposure. *J Neurochem* 1997; **68**: 248–254.
- [82] WANG L, GINTZLER AR. Bimodal opioid regulation of cyclic AMP formation: implications for positive and negative coupling of opiate receptors to adenylyl cyclase. *J Neurochem* 1994; **63**: 1726–1730.
- [83] WESTFALL SD, JOSLYN MI, MAU YH, MAY JV, DAVIS JS. LH stimulates phospholipase C activity in cultured porcine granulosa and theca cells. *Biol Reprod* 1994; **51**: 254–261.
- [84] WHEELER MB, VELDHUIS JD. Purification of three forms of chromatographically distinct protein kinase C from the swine ovary. *Mol Cell Endocrinol* 1989; **61**: 117–122.
- [85] WILLIAMS JT, MACDONALD JC, MANZONI O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev* 2001; **81**: 299–343.
- [86] ZERANI M, GOBBETTI A. *In vivo* and *in vitro* studies on effects of  $\beta$ -endorphin and naloxone on sex steroids in the water frog, *Rana esculenta*. *Acta Physiol Scand* 1992; **146**: 271–279.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 01.04.2005 r.*

*Przyjęto: 24.05.2005 r.*

*ul. Oczapowskiego 1A, 10-719 Olsztyn*