

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

lek. Michael Kozłowski

The effects of morphine and analgesic adjuvants on innate and humoral immune response parameters in mice. The role of macrophages.

Praca Doktorska

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Bryniarski

Promotor pomocniczy: dr n. med. Iwona Filipczak-Bryniarska

Pracę wykonano w Katedrze Immunologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Collegium Medicum

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. n. med. Janusz Marcinkiewicz

Kraków, 2019

Abstract

Background. Macrophages are a versatile group of phagocytic cells responsible for fulfilling a variety of immune functions, most notably for mounting the initial anti-microbial response and for the clearance of cellular debris and apoptotic bodies. Thus, macrophages play an important role in innate immunity, as they are able either to activate and promote acute inflammation against pathogen or to counteract immune response against self-antigens. Additionally, macrophages function as antigen presenting and effector cells, helping to induce the adaptive, humoral, and cellular immune response.

Methods. Macrophages from mice treated with morphine with or without an analgesic adjuvant (gabapentin, amitriptyline, or venlafaxine), or from mice treated solely with an antidepressant (imipramine, fluoxetine, or moclobemide), were either subjected to reactive oxygen intermediates chemiluminescence assay, cultured to evaluate the generation of cytokines, or were pulsed with either corpuscular antigen or hapten and transferred to naive recipients to induce humoral or cellular response, respectively. Active contact hypersensitivity was also elicited in drug-treated mice. Phagocytosis assay was performed in the case of mice treated with morphine with or without gabapentin, amitriptyline or venlafaxine. Reactive oxygen intermediates assay was also performed in macrophages from mice treated with the previously unstudied opioids oxycodone and buprenorphine.

Results. We observed that repeatedly administered morphine and analgesic adjuvants reduced antigen phagocytosis by macrophages. Analgesic adjuvants, with the exception of imipramine, tended to decrease the production of reactive oxygen intermediates and nitric oxide, with amitriptyline having the greatest effect. Further, amitriptyline with morphine enhanced basal secretion of cytokines by macrophages, and all analgesic adjuvants,

fluoxetine, and moclobemide tended to decrease LPS-stimulated release of pro-inflammatory cytokines. Morphine and analgesic adjuvants impacted the expression of phagocytosis and antigen-presentation markers on macrophages, which led to the reduced ability of morphine-affected macrophages to induce B-cell secretion of specific antibodies, and the addition of AAs strengthened this effect. Finally, gabapentin, venlafaxine, and imipramine suppressed the contact hypersensitivity reaction, while amitriptyline seemed to have the opposite effect.

Conclusions. Our studies demonstrated a significant anti-inflammatory activity of analgesic adjuvants across a broad spectrum of macrophage immune functions, which is likely critical to their analgesic activity supporting the beneficial effect of morphine.

Streszczenie

Wstęp. Makrofagi są wszechstronną grupą komórek fagocytarnych odpowiedzialnych za wypełnianie różnych funkcji immunologicznych, w szczególności za aktywację wrodzonej odpowiedzi przeciwbakteryjnej i usuwanie resztek komórkowych i ciał apoptotycznych. Odgrywają one ważną rolę we wrodzonej odporności, ponieważ są zdolne do aktywacji i promowania ostrego zapalenia przeciwko patogenowi lub do zahamowania odpowiedzi immunologicznej przeciwko autoantygenom. Ponadto makrofagi działają jako komórki prezentujące antygen i komórki efektorowe, pomagając w indukowaniu antygenowo-swoistej humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej.

Materiały i Metody. Makrofagi od myszy leczonych morfiną z lub bez adiuwantu przeciwbólowego (gabapentyna, amitriptylina lub wenlafaksyna) lub od myszy leczonych

wyłącznie lekiem przeciwdepresyjnym (imipramina, fluoksetyna lub moklobemid), albo poddano testom chemiluminescencji w celu pomiaru syntezy reaktywnych form tlenu reaktywnemu, poddano hodowli by w nadsączach oceniać wytwarzanie cytokin lub też poddawano fagocytozie antygenów erytrocytów barana albo też znakowano haptenem i w przenoszono w transferze adoptywnym do biorców naiwnych, aby odpowiednio indukować odpowiedź humoralną lub komórkową. Aktywna nadwrażliwość kontaktowa była również wywoływana u myszy leczonych lekami. Test fagocytozy przeprowadzono w przypadku myszy leczonych morfiną z, albo bez gabapentyny, amitryptyliny lub wenlafaksyny. Test oznaczenia rodników tlenowych przeprowadzono również w hodowlach makrofagów od myszy leczonych wcześniej nie badanymi opioidami: oksykodonem i buprenorfiną.

Wyniki. Zaobserwowano, że wielokrotnie podawana morfina i adiuwanty przeciwbólowe zmniejszały fagocytozę antygeny przez makrofagi. Adiuwanty przeciwbólowe, z wyjątkiem imipraminy, miały tendencję do zmniejszania wytwarzania reaktywnych związków tlenu i tlenku azotu, przy czym największy wpływ wykazywała amitryptylina. Ponadto amitryptylina z morfiną zwiększała podstawową sekrecję cytokin przez makrofagi a wszystkie adiuwanty przeciwbólowe, fluoksetyna i moklobemid, powodowały zmniejszenie stymulowanego LPS uwalniania cytokin prozapalnych. Morfina i adiuwanty przeciwbólowe wpłynęły na zahamowanie fagocytozy i ekspresji markerów prezentacji antygenów na makrofagach, co doprowadziło do zmniejszenia zdolności makrofagów traktowanych morfiną do aktywacji procesu prezentacji antygeny krwinek barana i zmniejszenia wydzielania przez limfocyty B antygenowo-swoistych przeciwciał, a dodanie AA wzmocniło ten efekt. Wreszcie gabapentyna, wenlafaksyna i imipramina tłumili reakcję nadwrażliwości kontaktowej, podczas gdy amitryptylina aktywowała tą reakcję.

Wnioski. Przedstawione badania wykazały znaczącą aktywność przeciwzapalną adiuwantów przeciwbólowych w szerokim spektrum funkcji immunologicznych makrofagów, co jest prawdopodobnie krytyczne dla ich działania przeciwbólowego wspierającego korzystne oddziaływanie morfiny.

The following articles create this doctoral dissertation:

1. Nazimek K, **Kozłowski M**, Bryniarski P, Strobel S, Bryk A, Mysza M, Tyszka A, Kuzmiersz P, Nowakowski J, Filipczak-Bryniarska I.: Repeatedly administered antidepressant drugs modulate humoral and cellular immune response in mice through action on macrophages. *Exp Biol Med* (Maywood). 2016 Aug;241(14):1540-50.
<https://doi.org/10.1177/1535370216643769> .Epub 2016 Apr 5. PMID:27053354
(IF=2.688, pkt. MNiSW=25) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27053354>
2. **Kozłowski M**, Nazimek K, Wasik M, Filipczak-Bryniarska I, Bryniarski K.: The impact of advanced opioid drugs and analgesic adjuvants on murine macrophage oxygen burst. *Folia Med Cracov*. 2017;57(2):15-30. (IF=0, pkt MNiSW =10)
PMID:29121034.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29121034>
3. **Kozłowski M**, Nazimek K, Nowak B, Filipczak-Bryniarska I, Bryniarski K.: Analgesic adjuvants modulate morphine-induced immune effects in mice, *Pharmacological Reports* (2019)in press (IF=2.787, pkt MNiSW =25)
<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2019.04.016>

This doctoral thesis has a total value of IF=5.431 and 60 MNiSW points.

Introduction

Macrophages are a versatile group of phagocytic cells responsible for fulfilling a variety of immune functions, most notably for mounting the initial anti-microbial response and for the clearance of cellular debris and apoptotic bodies [1]. Thus, macrophages play an important role in innate immunity, as they are able either to activate and promote acute inflammation against pathogen or to counteract immune response against self-antigens. Additionally, macrophages function as antigen presenting and effector cells, helping to induce the adaptive, humoral, and cellular immune response [2]. Due to their ability to release various pro and anti-inflammatory mediators, macrophages also contribute to the orchestration and regulation of immune mechanisms, and their cytotoxic activation is observed in delayed-type hypersensitivity, including the cutaneous contact sensitivity reaction. The key processes for fulfilling this variety of functions include the production of reactive oxygen intermediates and nitric oxide [1]. It is also notable that macrophages express a variety of cell-membrane-associated and intracellular receptors, including opioid, serotonin, and norepinephrine receptors [3,4]. Thus, these cells can react to numerous signaling molecules, including cytokines, hormones, neurotransmitters and bioactive compounds of different medications.

According to the International Association for the Study of Pain, pain is defined as an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage [5]. In palliative care, pain is one of the most commonly occurring and clinically important symptoms, occurring in up to 80% of patients with advanced cancer [6]. In these patients, pain can be difficult to effectively treat due to its often complex etiology. Administration of strong opioids is the mainstay of pain

treatment in patients with advanced cancer, with opioid titration being a common procedure in the management of unrelieved pain. However, opioid drug treatment in the setting of neuropathic pain is significantly less effective, since their analgesic action appears later than exerted severe adverse effects. Accordingly, the use of analgesic adjuvants should be considered for the alleviation of uncontrolled pain, especially of a neuropathic nature and for mitigation of opioid-induced hyperalgesia, which can occur after titration with strong opioids [6,7]. Analgesic adjuvants are drugs, which are not expressly indicated to treat pain, but have been found to be useful in certain clinical situations, such as in the treatment of neuropathic pain [6]. Analgesic properties of opioids, but also analgesic adjuvants, depend on their direct influence on function of immune cells, among other things [8,9]. While the analgesic efficacy of opioids and analgesic adjuvants is well established, much remains to be elucidated about their effects on the immune system.

Aims of Research

- How do morphine and analgesic adjuvants affect the innate and adaptive humoral immune response in murine macrophages?
- How does the addition of an analgesic adjuvant modulate the effects of morphine on murine macrophages?

Summary

Analgesic adjuvants are frequently administered to patients suffering from chronic pain in an effort to achieve adequate analgesia. In patients suffering from cancer-related pain, they are often administered in conjunction with opioid titration [6]. Despite the clinical efficacy of opioids in the treatment of pain, long-term opioid therapy may lead to an intensification of a patient's pain. This phenomenon is referred to as opioid hyperalgesia [7,10,11]. Additionally, the use of opioids is significantly less effective in patients suffering from pain of a neuropathic etiology. Thus, achieving adequate analgesia in patients suffering from chronic pain, including pain caused by advanced neoplastic disease, often presents a challenge for physicians. It is estimated that treatment resistant pain occurs in 10-20% of patients with advanced cancer [12]. When adequate analgesia cannot be achieved through the use of opioids alone, the co-administration of an analgesic adjuvant may help to achieve pain relief, especially in the context of hyperalgesia or neuropathic pain.

While the influence of most opioids on the immune system has been well studied [13-18], the effects of analgesic adjuvants remain unclear. Our study focused on four widely used analgesic adjuvants, amitriptyline, gabapentin, imipramine, and venlafaxine, in the clinical treatment of pain and supports the idea that the analgesic activity of these medicaments is also due to their immunomodulatory activities [MK1,MK2,MK3]. We also investigated the immunomodulatory effects of the antidepressants fluoxetine and moclobemide [MK1]. Our results indicate a significant suppressive effect of analgesic adjuvants and antidepressants on the murine innate immune response. As shown here, analgesic adjuvants reduce phagocytic activity in the case of CD11b⁺ macrophages pulsed with sheep red blood cells [MK3]. In addition, analgesic adjuvants and antidepressants, with the exception of imipramine, lead to decreased synthesis of reactive oxygen intermediates,

which are required to neutralize phagocytosed antigens for their further processing in macrophages [MK2]. Amitriptyline, particularly when administered together with morphine, seems to exert its effect at the stage of phagocytosis and gabapentin and venlafaxine also enhance reactive oxygen intermediates' production [MK2]. However, these effects seem to be compensated by altered expression of cell-surface markers involved in the process of phagocytosis [MK1,MK3].

In our studies, analgesic adjuvants and antidepressants also exhibited an immunosuppressive effect in regards to the secretion of cytokines [MK1,MK3]. In general, the most dramatic effect was seen when amitriptyline was administered with or without morphine, leading to enhanced basal secretion of both pro- and anti-inflammatory cytokines by macrophages, but a significantly decreased secretion of pro-inflammatory cytokines when macrophages were stimulated with LPS. This was also observed after the administration of venlafaxine [MK1,MK3]. The administration of gabapentin decreased basal secretion of pro-inflammatory cytokines by unstimulated macrophages, but had less of an effect in stimulated macrophages. [MK3]

The aforementioned effects are likely responsible for the analgesic adjuvant-induced suppression of the humoral response that was expressed as a decreased number of activated B-cells in recipients of sheep red blood cell-pulsed macrophages. It is of note, however, that venlafaxine and gabapentin seemed to slightly accelerate maturation of B cells producing sheep red blood cell antigen-specific antibodies [MK3]. Additionally analgesic adjuvants appeared to influence the contact hypersensitivity response, with their administration generally leading to decreased ear swelling in hapten-induced mice [MK3].

Our studies also demonstrated that analgesic adjuvants, especially amitriptyline, modulate the pro-inflammatory activity of morphine by hampering the morphine-induced increase in the production of reactive oxygen intermediates and pro-inflammatory cytokines by murine macrophages [MK2,MK3], as well as hampering the increased contact hypersensitivity in mice treated with morphine. Furthermore, many of the pro-inflammatory effects of morphine were modulated by co-administration of naloxone. [MK2,MK3] In addition, supplementary results suggest that the previously unstudied opioid oxycodone has a less immunostimulatory effect on the innate immune response than other opioids by leading to a decrease in the production of reactive oxygen intermediates and nitric oxide by murine macrophages [MK2].

In conclusion, the results of our studies demonstrate significant anti-inflammatory activity of analgesic adjuvants across a broad spectrum of immune functions. Importantly, they support the beneficial, analgesic effects of morphine. Despite the fact that our study was limited to animal subjects, our results may help to explain the exact analgesic mechanism of action of analgesic adjuvants in humans.

Conclusions

- Analgesic adjuvants and antidepressants, particularly amitriptyline, exhibit a generally immunosuppressive effect on murine macrophages, leading to significant decreases in reactive oxygen intermediates and nitric oxide production, pro-inflammatory cytokine secretion, decreased number of effector B-cells activated by sheep red blood cell pulsed-macrophages, and decreased late-phase contact hypersensitivity reaction in hapten-sensitized mice [MK1,MK2,MK3]. Gabapentin and

venlafaxine, however, seem to enhance reactive oxygen intermediates' production and decrease phagocytosis, while altering cell surface marker expression and slightly accelerating maturation of anti-sheep red blood cell antibody-producing B cells.

[MK2,MK3]

- Analgesic adjuvants, particularly amitriptyline, modulate the pro-inflammatory activity of morphine by hampering the morphine-induced increase in the production of reactive oxygen intermediates and pro-inflammatory cytokines by murine macrophages, as well as hampering the increased contact hypersensitivity in mice treated with morphine [MK2,MK3].

Bibliography

1. Bryniarski K., Szczepanik M., Maresz K., Ptak M., Ptak W.: Subpopulations of mouse testicular macrophages and their immunoregulatory function. *Am J Reprod Immunol.* 2004; 52: 27-35.
2. Hughes C.E., Benson R.A., Bedaj M., Maffia P.: Antigen-Presenting Cells and Antigen Presentation in Tertiary Lymphoid Organs. *Front Immunol.* 2016; 7: 481.
3. Vallejo R, de Leon-Casasola O, Benyamin R. Opioid therapy and immunosuppression. *Am J Ther* 2004;11(5):354-65.
4. Nazimek K, Filipczak-Bryniarska I, Bryniarski K. The role of medicaments, exosomes and miRNA molecules in modulation of macrophage immune activity. *Postepy Hig Med Dosw* 2015;69:1114-29.
5. Merskey H, Boduk N. Classification of Chronic Pain, Second Edition, IASP Task Force on Taxonomy. IASP Press, Seattle, 1994.

6. Bruera E., Higginson I., von Guten C., Morita T.: Textbook of Palliative Medicine and Supportive Care. Second Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2016.
7. Stoicea N., Russel D., Weidner G. et al.: Opioid-induced hyperalgesia in chronic pain patients and the mitigating effects of gabapentin. *Front Pharmacol.* 2015; 6: 104.
8. Filipczak-Bryniarska I., Nowak B., Sikora E. et al.: The influence of opioids on the humoral and cell-mediated immune responses in mice. The role of macrophages. *Pharmacol Rep.* 2012; 64: 1200-1215.
9. Marchand F., Peretti M., McMahon S.B.: Role of immune system in chronic pain. *Nature Rev.* 2005; 6:521-32.
10. Eidson LN, Murphy A. Blockade of Toll-Like Receptor 4 Attenuates Morphine Tolerance and Facilitates the Pain Relieving Properties of Morphine. *J Neurosci.* 33 (2013) 15952-15963.
11. Servick K. Why taking morphine, oxycodone can sometimes make pain worse. *Science.* 2016. doi: 10.1126/science.aag0579.
12. Mercadante S. Managing difficult pain conditions in the cancer patient. *Curr Pain Headache Rep.* 18 (2014) 395.
13. Delgado-Velez M, Lugo-Chinchilla A, Lizardo L, Morales I, Robles Y, Bruno N, Rodríguez JW, Ríos-Olivares E, Correa M, Renaud FL. Chronic exposure of human macrophages in vitro to morphine and methadone induces a putative tolerant/dependent state. *J Neuroimmunol.* 196 (2008) 94–100.
14. Tomassini N, Renaud F, Roy S, Loh HH. Morphine inhibits Fc-mediated phagocytosis through mu and delta opioid receptors. *J Neuroimmunol.* 147 (2004) 131–133.
15. Vallejo R, de Leon-Casasola O, Benyamin R. Opioid therapy and immunosuppression. *Am J Ther.* 11 (2004) 354–365.

16. Filipczak-Bryniarska I, Nazimek K, Nowak B, Kozłowski M, Wąsik M, Bryniarski K. Data supporting the understanding of modulatory function of opioid analgesics in mouse macrophage activity. *Data in Brief*. 16 (2018) 950-954.
17. Filipczak-Bryniarska I, Nazimek K, Nowak B, Kozłowski M, Wąsik M, Bryniarski K. In contrast to morphine, buprenorphine enhances macrophage-induced humoral immunity and, as oxycodone, slightly suppress the effector phase of cell-mediated immune response in mice. *Int Immunopharmacol*. 54 (2018) 344-353.
18. Filipczak-Bryniarska I, Nowak B, Sikora E, Nazimek K, Woron J, Wordliczek J, Bryniarski K. The influence of opioids on the humoral and cell-mediated immune responses in mice. The role of macrophages. *Pharmacol Rep*. 64 (2012) 1200-1215.

Kraków, dnia 13. 05. 2019 r.

dr n. med. Katarzyna Nazimek

.....
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Nazimek K, Kozłowski M, Bryniarski P, Strobel S, Bryk A, Myszk A, Tyszk A, Kuzmierz P, Nowakowski J, Filipczak-Bryniarska I. Repeatedly administered antidepressant drugs modulate humoral and cellular immune response in mice through action on macrophages. Exp Biol Med (Maywood). 2016 Aug;241(14):1540-50. oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

planowanie i przeprowadzenie doświadczeń, analiza uzyskanych wyników, przygotowanie wstępnej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek Michała Kozłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Michała Kozłowskiego przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



.....
(podpis współautora)

Kraków, dnia 13. 05. 2019 r.

dr n. med. Katarzyna Nazimek

.....
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

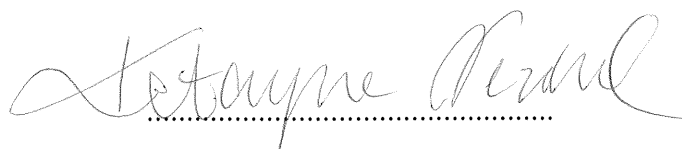
OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Kozłowski M, Nazimek K, Nowak B, Filipeczak-Bryniarska I, Bryniarski K, Analgesic adjuvants modulate morphine-induced immune effects in mice, *Pharmacological Reports* (2019), oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

udział w planowaniu i przeprowadzeniu doświadczeń oraz w analizie wyników, pomoc w przygotowaniu rycin, korekta językowa i merytoryczna manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek Michaela Kozłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Michaela Kozłowskiego przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.


.....
(podpis współautora)

Kraków, dnia 13. 05. 2019 r.

dr n. med. Katarzyna Nazimek

.....
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Kozłowski M, Nazimek K, Wąsik M, Filipczak-Bryniarska I, Bryniarski K. The impact of advanced opioid drugs and analgesic adjuvants on murine macrophage oxygen burst. Folia Med Cracov. 2017;57(2):15-30. oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

udział w przeprowadzeniu doświadczeń oraz korekta językowa i merytoryczna manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek Michaela Kozłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Michaela Kozłowskiego przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



.....
(podpis współautora)

Kraków, dnia.24.05.19 r.

lek. Paweł Bryniarski

.....
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy autorstwa: Nazimek K, Kozłowski M, Bryniarski P, Strobel S, Bryk A, Myszką M, Tyszka A, Kuśmiersz P, Nowakowski J, Filipczak-Bryniarska I.: *Repeatedly administered antidepressant drugs modulate humoral and cellular immune response in mice through action on macrophages*, opublikowanej w *Experimental Biology and Medicine* (Maywood) 2016 Aug; 241 (14): 1540-50. doi: 10.1177/1535370216643769 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: współuczestnictwo w wykonaniu badań eksperymentalnych i analiza wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Michaela Kozłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Michaela Kozłowskiego przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.


.....
(podpis współautora)

Kraków, dnia 21.05.2018

lek. AGATA BRYK
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

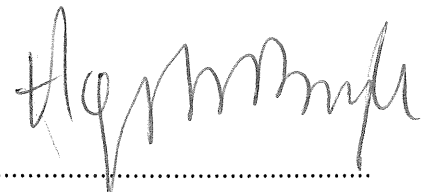
Jako współautor pracy pt. Nazimek K, Kozłowski M, Bryniarski P, Strobel S, Bryk A, Mysza M, Tysza A, Kuzmiersz P, Nowakowski J, Filipczak-Bryniarska I. Repeatedly administered antidepressant drugs modulate humoral and cellular immune response in mice through action on macrophages. Exp Biol Med (Maywood). 2016 Aug;241(14):1540-50.

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

współuczestnictwo w wykonaniu badań eksperymentalnych i analiza wyników

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr/lek. Michała Kozłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr/lek. Michała Kozłowskiego przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



(podpis współautora)

Kraków, dnia.15.05.19 r.

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Bryniarski

.....
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

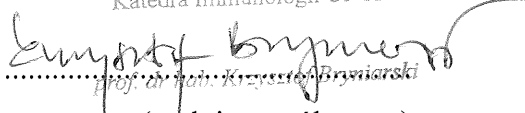
OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy autorstwa: Kozłowski M, Nazimek K, Wąsik M, Filipczak-Bryniarska I, Bryniarski K. pt. *The impact of advanced opioid drugs and analgesic adjuvants on murine macrophage oxygen burst* opublikowanej w Folia Medica Cracoviensia 2017;57(2):15-30 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: konsultowanie i współuczestnictwo w planowaniu, wykonaniu badań eksperymentalnych, poprawa manuskryptu pracy i nadzorowanie pracy doktoranta.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Michaela Kozłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Michaela Kozłowskiego przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Katedra Immunologii UJ CM


.....
prof. dr hab. Krzysztof Bryniarski
(podpis współautora)

Kraków, dnia.15.05.19 r.

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Bryniarski

.....
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

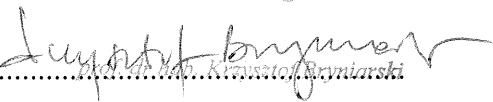
Jako współautor pracy autorstwa: Kozłowski M, Nazimek K, Nowak B, Filipeczak-Bryniarska I, Bryniarski K. pt. *Analgesic adjuvants modulate morphine immune effects induced in mice* publikowanej w Pharmacological Reports 2019 (in press) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

konsultowanie i współuczestnictwo w planowaniu, wykonaniu badań eksperymentalnych, poprawa manuskryptu pracy oraz nadzorowanie pracy doktoranta.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Michaela Kozłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Michaela Kozłowskiego przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Katedra Immunologii UJ CM


.....
Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Bryniarski

(podpis współautora)

Kraków, dnia.15.05.19 r.

mgr Magdalena Wąsik

.....
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy Kozłowski M, Nazimek K, Wąsik M, Filipczak-Bryniarska I, Bryniarski K.: **The impact of advanced opioid drugs and analgesic adjuvants on murine macrophage oxygen burst** Folia Medica Cracoviensia 2017;57(2):15-30 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

pomoc techniczna w wykonywaniu eksperymentów

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Michaela Kozłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Michaela Kozłowskiego przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



(podpis współautora)

Kraków, dnia.15.05.19 r.

dr n. med. Iwona Filipczak-Bryniarska

.....
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy: Kozłowski M, Nazimek K, Nowak B, Filipczak-Bryniarska I, Bryniarski K.: *Analgesic adjuvants modulate morphine immune effects induced in mice* Pharmacological Reports 2019 (w druku) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

konsultowanie i współuczestnictwo w planowaniu, wykonaniu badań eksperymentalnych, nadzorowanie pracy doktoranta oraz pozyskanie środków finansowych na badania.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Michaela Kozłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Michaela Kozłowskiego przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

.....
I. Bryniarska
(podpis współautora)

Kraków, dnia.15.05.19 r.

dr n. med. Iwona Filipczak-Bryniarska

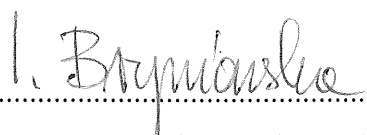
.....
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy autorstwa: Kozłowski M, Nazimek K, Wąsik M, Filipczak-Bryniarska I, Bryniarski K. pt. *The impact of advanced opioid drugs and analgesic adjuvants on murine macrophage oxygen burst* opublikowanej w Folia Medica Cracoviensia 2017;57(2):15-30 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: konsultowanie i współuczestnictwo w planowaniu, wykonaniu badań eksperymentalnych, poprawa manuskryptu pracy i nadzorowanie pracy doktoranta.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Michaela Kozłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Michaela Kozłowskiego przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.


.....
(podpis współautora)

Kraków, dnia.16.05.19 r.

dr n. biol. Bernadeta Nowak

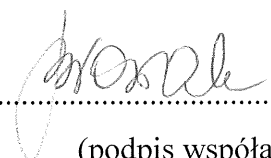
.....
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: Kozłowski M, Nazimek K, Nowak B, Filipczak-Bryniarska I, Bryniarski K. pt. *Analgesic adjuvants modulate morphine immune effects induced in mice* Pharmacological Reports 2019 (w druku) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji dotyczy wykonania pomiarów cytofluorymetrycznych wraz z analizą uzyskanych wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Michaela Kozłowskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Michaela Kozłowskiego przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

.....

(podpis współautora)

Kraków, dnia...15.05.2019

lek. Spencer Strobel
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Nazimek K, Kozłowski M, Bryniarski P, Strobel S, Bryk A, Myszk A, Tyszk A, Kuzmiersz P, Nowakowski J, Filipczak-Bryniarska I. Repeatedly administered antidepressant drugs modulate humoral and cellular immune response in mice through action on macrophages. Exp Biol Med (Maywood). 2016 Aug;241(14):1540-50. oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

współautor
.....
.....

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr/lek Michael Kozłowski jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr/lek Michael Kozłowski przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Spencer Strobel
(podpis współautora)