

## ВПЛИВ АГОНІСТІВ $\mu$ -ОПІОЇДНИХ РЕЦЕПТОРІВ НА КАЛЬЦІЄВІ КАНАЛИ Р-ТИПУ В НЕЙРОНАХ ПУРКІН'Є МОЗОЧКА ЩУРІВ

Надійшла 11.02.14

Кальцієві канали Р-типу відіграють важливу роль у синаптичній передачі в ЦНС ссавців; значна частина кальцію, який потрапляє до пресинаптичної терміналі, надходить саме через ці канали. Використовуючи метод „петч-клемп” у конфігурації „ціла клітина”, ми вивчали вплив  $\mu$ -опіоїдів на кальцієві канали Р-типу в свіжеізольованих нейронах Пуркін'є мозочка щурів. Селективний агоніст  $\mu$ -опіоїдних рецепторів DAMGO (10 нМ) викликав у більшості нейронів стійку помірну (в середньому  $10 \pm 1\%$ ), але вірогідну ( $P < 0.001$ ;  $n = 27$ ) потенціацію Р-струму. Вплив DAMGO ставав помітним уже при його концентрації 1 нМ та досягав насичення при 100 нМ. Ефект розвивався швидко (менш ніж за 10 с) і був потенціалзалежним та повністю оборотним. Ендогенний селективний агоніст  $\mu$ -опіоїдних рецепторів ендоморфін-1 викликав дуже подібний ефект (інкремент  $8 \pm 1\%$ ,  $n = 6$ ;  $P < 0.01$ ). Спричинене DAMGO збільшення амплітуди Р-струму повністю усувалось у разі аплікації антагоніста опіоїдних рецепторів налоксону (100 нМ). Ці дані свідчать про те, що агоністи  $\mu$ -опіоїдних рецепторів навіть у наномолярних концентраціях здатні викликати помітну потенціацію кальцієвого струму Р-типу, опосередковану взаємодією з опіоїдними рецепторами відповідного типу.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:**  $\mu$ -опіоїдні рецептори, потенціація, кальцієві канали Р-типу, нейрони Пуркін'є.

### ВСТУП

Згідно з існуючими даними, розрізняють три основних типи опіоїдних рецепторів (ОР) –  $\mu$ -,  $\delta$ - та  $\kappa$ -ОР. У фармакологічних дослідженнях було встановлено, що агоністи ОР впливають на нейронну активність та синаптичну передачу із залученням низки механізмів. На клітинному рівні опіоїди модулюють функції потенціал- та хемокерованих іонних каналів, змінюють активність аденілатциклази (AD), протеїнкінази С (РКС), фосфоліпаз С і D (PLC і PLD відповідно) та викликають мобілізацію кальцію з внутрішньоклітинних депо. Відомо, що опіоїди впливають на активність практично всіх високопорогових кальцієвих каналів (L-, N-, P/Q- та R-типів [1]), а також низькопорогових каналів Т-типу [2]. Одним із найвідоміших наслідків активації ОР є модуляція кальцієвих каналів N- та P/Q-типів [3], що призводить до зменшення кальційзалежного вивільнення нейротрансмітерів із пресинаптичних терміналей. Навіть ледве по-

мітні зміни у функціонуванні цих каналів можуть істотно впливати на характеристики синаптичної передачі. Було продемонстровано, що в нейронах Пуркін'є  $\kappa$ -ОР задіяні в пригнічення струму через кальцієві канали Р-типу [4]. В згаданій роботі, проте, не було з'ясовано, чи беруть участь у модуляції функції цих каналів інші ОР ( $\delta$ - та  $\mu$ -типів).

Ми дослідили впливи агоністів  $\mu$ -ОР на кальцієві струми Р-типу в ізольованих нейронах Пуркін'є щура і виявили, що зазначені агенти навіть у наномолярних концентраціях здатні спричинювати помітну потенціацію даних струмів.

### МЕТОДИКА

Ізоляцію нейронів Пуркін'є з мозочка білих щурів віком 10–12 діб проводили за описаною раніше методикою [5]. Мозочок швидко виділяли та готувляли з нього тонкі поперечні зрізи (від 300 до 400 мкм завтовшки). Ферментативну обробку тривалістю 30–35 хв при температурі 22 °С проводили в середовищі, що вміщувало 2.4 мг/мл протеїнази XXIII з *Aspergillus oryzae*. Після інактивації фер-

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

менту нейрони ізолювали механічно, використовуючи піпетки Пастера з отворами різного діаметра (від 1 до 0.1 мм) у розчині Рінгера наступного складу (в мілімолях на 1 л): NaCl – 150, KCl – 5, CaCl<sub>2</sub> – 2, MgCl<sub>2</sub> – 1, HEPES – 20, глюкоза – 10 (pH 7.4). Така послідовність обробки зрізів мозочка дозволяла отримувати цілком життєздатні ізолювані нейрони Пуркін'є, які ідентифікували за характерними морфологічними ознаками.

Струми через потенціалкерівані кальцієві канали реєстрували при кімнатній температурі (20–22 °C), використовуючи метод “петч-клемп” у конфігурації “ціла клітина” [6], із застосуванням підсилювача А-М Systems 2400 („Bio-Medical”, США) та плати Lab Master DMA (10<sup>5</sup> с<sup>-1</sup>; „Scientific Solutions”, США). Для реєстрації іонних струмів через плазматичну мембрану досліджуваних нейронів був застосований метод внутрішньоклітинної перфузії [7] у модифікації, що дозволяє використовувати скляні мікропіпетки. Останні виготовляли за методом Нера та співавт. [8] із легкоплавких скляних капілярів діаметром 1.5 мм („Sutter Instruments”, США) на пулері P97 Flaming/Brown („Sutter Instruments”, США). Опір мікропіпетки становив від 2 до 4 МОм; піпетки заповнювали внутрішньоклітинним розчином наступного складу (в мілімолях на 1 л): Tris-PO<sub>4</sub> – 70, EGTA – 5, TEA-Cl – 40, Tris-Cl – 20, Mg-ATP – 5, GTP – 0.5 (pH 7.3).

Високопороговий кальцієвий струм Р-типу реєстрували при мембранному потенціалі, підтримуваному на рівні –70 мВ. Це забезпечувало повну інактивацію низькопорогового кальцієвого струму Т-типу, також присутнього в нейронах Пуркін'є [5]. Струм, який був зареєстрований у згаданих вище умовах, повністю блокувався селективним блокатором кальцієвих каналів Р-типу ω-Aga-IVA-токсинном у концентрації 200 нМ [9]. В усіх проведених експериментах з реєстрацією струмів Р-типу для усунення ефектів, пов'язаних із впливом змін концентрації іонів Ca<sup>2+</sup> на активність потенціалкеріваних кальцієвих каналів [10, 11], як основні проникні катіони були використані іони Ba<sup>2+</sup>. Таким чином, реєстровані феномени були зумовлені барієвим струмом через кальцієві канали Р-типу. Всі виміри проводили згідно з попередньо визначеним максимумом вольт-амперної характеристики цього струму. Максимальні значення амплітуди досліджуваного струму становили від 800 до 2500 пА при деполяризуючих потенціалах від –35 до –20 мВ. Наявність у внутрішньоклітинному розчині 5 мМ АТФ і 0.5 мМ ГТФ дозволяла нам реє-

струвати Р-струми протягом 1–2 год.

Зовнішньоклітинний розчин, що використовувався, мав наступний склад (у мілімолях на 1 л): TEA-Cl – 40, холіну хлорид – 100, BaCl<sub>2</sub> – 2, MgCl<sub>2</sub> – 2 та Tris-Cl – 20. Зовнішньоклітинну аплікацію розчинів, що вміщували фармакологічно активні речовини, виконували за методом швидкої фіксації концентрації за допомогою пристрою “столик, що плигає” („Pharma Robot”, Україна). Кальцієві струми Р-типу фільтрували з частотою зрізу 3 кГц та оцифровували з періодом 140 мкс. Аналіз отриманих даних проводили з використанням аналітичних програмних засобів “Jumping table” („Pharma Robot”, Україна) та „Microcal Origin” („Microcal”, США).

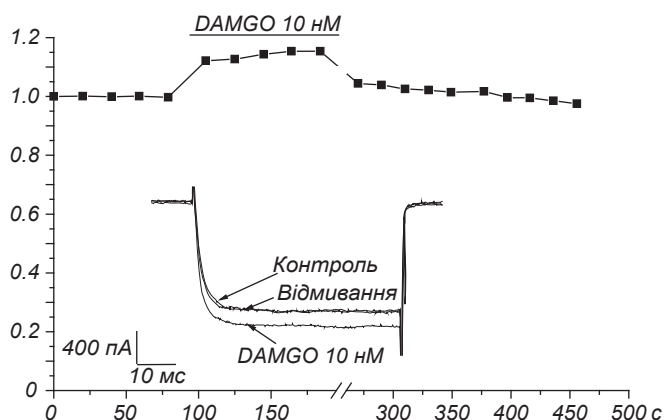
Амплітуду струмів вимірювали від базової лінії до пікового значення. Ефекти аплікації речовин характеризували відношенням  $(I - I_k)/I_k$ , де  $I$  – амплітуда струму після аплікації, а  $I_k$  – амплітуда в контрольному розчині. Числові дані представлені як середні ± похибка середнього. Для міжгрупових порівнянь використовували критерій  $t$  Ст'юдента або односторонній дисперсійний аналіз (ANOVA) з наступним застосуванням *post-hoc*-тесту Тьюкі-Крамера для порівняння більш ніж двох груп. Розбіжності вважали вірогідними при  $P < 0.05$ . Усі хімічні речовини були придбані у „Sigma” (США).

## РЕЗУЛЬТАТИ

Зовнішньоклітинна аплікація селективного агоніста μ-OP DAMGO [12, 13] у концентраціях від 1 нМ до 1.0 мкМ викликала вірогідне збільшення амплітуди Р-струму в 76 % досліджених нейронів ( $n = 37$ ); у 24 % нейронів ( $n = 12$ ) цей агент у згаданих концентраціях не спричинював значних ефектів.

Аплікація 10 нМ DAMGO призводила до швидкого (менш ніж за 10 с) збільшення амплітуди Р-струму в середньому на  $10 \pm 1$  % ( $n = 27$ ;  $P < 0.001$ ). У разі відмивання від агоніста амплітуда цього струму поверталася до контрольного рівня, тобто ефект був цілком оборотним (рис. 1). Повторне прикладання DAMGO зумовлювало практично аналогічний вплив на амплітуду Р-струму (інкремент  $9 \pm 3$  %,  $n = 6$ ;  $P < 0.05$ ), що вказує на відсутність десенситизації при дії даного агента.

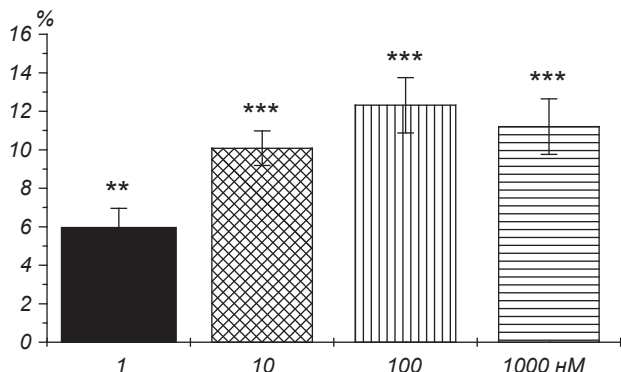
У наступній серії експериментів ми вивчали залежність потенціалізації Р-струму від концентрації використаного агоніста. Дані, представлені на



**Рис. 1.** Зміни амплітуди Р-струмів під впливом DAMGO. Бар'єві струми крізь кальцієві канали Р-типу (див. вставку) викликалися деполяризаційними поштовхами струму тривалістю 50 мс, що прикладалися кожні 20 с та деполяризували клітинну мембрану від  $-70$  до  $-20$  мВ. Тривалість аплікації 10 нМ DAMGO позначена відрізком лінії над графіком. Значення амплітуд струмів протягом експерименту нормовані щодо амплітуди першого контрольного струму, прийнятої за одиницю.

рис. 2, свідчать про певну дозозалежність ефекту потенціації Р-струму в умовах дії DAMGO, хоча й слабку та, вірогідно, нелінійну. При концентрації агоніста 1 нМ приріст амплітуди Р-струму складав у середньому  $6 \pm 1\%$  ( $n = 10$ ;  $P < 0.001$ ), при 10 нМ –  $10 \pm 1\%$  ( $n = 27$ ;  $P < 0.001$ ), при 100 нМ –  $12 \pm 1\%$  ( $n = 12$ ;  $P < 0.001$ ), а при 1 мкМ –  $11 \pm 1\%$  ( $n = 6$ ;  $P < 0.001$ ).

Викликана дією DAMGO модуляція Р-струму проявлялась у досить широкому діапазоні підтримуваних потенціалів. У серії експериментів, в яких досліджували залежність впливу DAMGO на Р-струм від мембранного потенціалу, результати

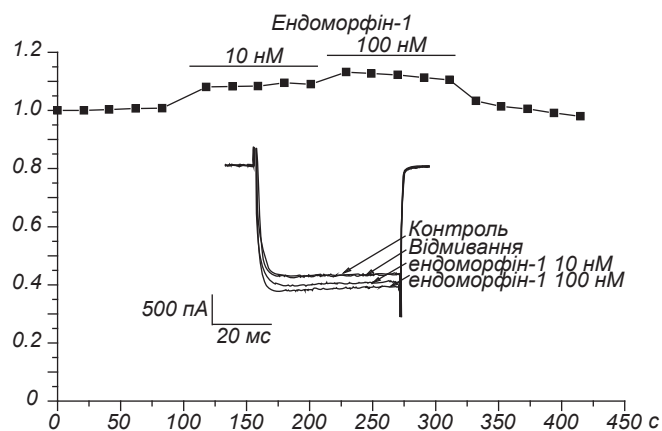


**Рис. 2.** Діаграма середніх значень нормованих приростів амплітуди Р-струмів (%), зумовлених аплікацією DAMGO у різних концентраціях (позначені під стовпчиками, нМ). За 100 % прийнята середня амплітуда Р-струмів у контролі. Двома та трьома зірочками позначені випадки вірогідної відмінності від контролю з  $P < 0.01$  та  $P < 0.001$  відповідно.

використання ANOVA ( $F(7; 80) = 3.15$ ,  $P < 0.01$ ) та *post-hoc*-тесту Тьюкі–Крамера показали, що ефект DAMGO був вірогідно більшим при мембранному потенціалі  $-40$  мВ ( $29 \pm 7\%$ ), ніж при менших потенціалах ( $-20$  мВ,  $8 \pm 2\%$ ;  $-15$  мВ,  $7 \pm 1.5\%$ ;  $-10$  мВ,  $6 \pm 1\%$ ;  $-5$  мВ,  $6 \pm 1\%$ ).

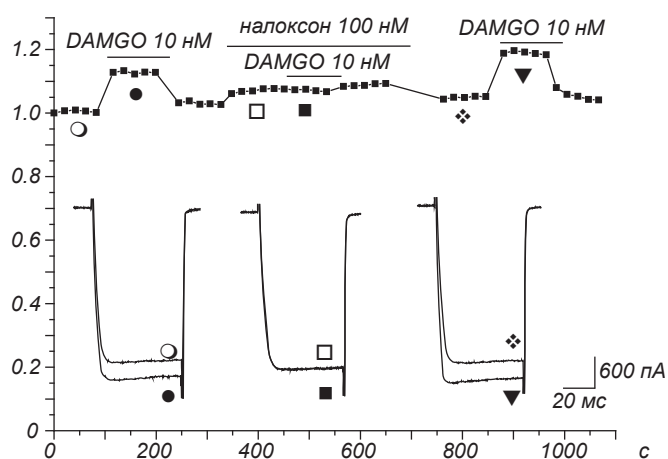
Потенціація Р-струму під впливом DAMGO не виявляла залежності від попередньої стимуляції клітини. Ініціація такого ефекту не потребувала прикладання деполяризуючих поштовхів струму. Аплікація DAMGO також не впливала на кінетику активації та інактивації Р-струму.

Ендогенний високоселективний агоніст  $\mu$ -ОР ендоморфін-1 [14] у наномолярних концентраціях також зумовлював збільшення амплітуди Р-струму в 71 % досліджених нейронів ( $n = 10$ ), у той час як у решті нейронів ( $n = 4$ ) ця речовина не спричинювала помітного ефекту. Потенціація Р-струму при аплікації 10 нМ ендоморфін-1 становила в середньому  $8 \pm 1\%$  ( $n = 6$ ;  $P < 0.01$ ), а при дії 100 нМ –  $10 \pm 1\%$  ( $n = 8$ ;  $P < 0.001$ ). У разі відмивання від даного агоніста, як і після аплікації DAMGO, відбувалося відновлення амплітуди струму до контрольного рівня. На рис. 3 видно, що на відміну від ефекту селективного агоніста  $\mu$ -ОР DAMGO, потенціація в умовах дії ендоморфін-1 була дещо слабшою та розвивалася повільніше (протягом близько 50 с).



**Рис. 3.** Зміни амплітуди Р-струму під впливом ендоморфін-1. Експериментальний протокол був подібним до того, що використовувався при тестуванні впливу DAMGO (рис. 1), але застосовувалися дві концентрації ендоморфін-1 – 10 та 100 нМ. Позначення аналогічні таким на рис. 1.

Для з'ясування можливої участі саме ОР у модуляції Р-струму під дією тестованих опіоїдів ми провели серію експериментів із використанням найбільш поширеного антагоніста цих рецепто-



**Рис. 4.** Усунення потенціюючого впливу DAMGO на Р-струми під дією налоксону.

Тривалість аплікацій 10 нМ DAMGO та 100 нМ налоксону відмічена відрізками ліній над графіком. Оригінальні записи струмів позначені відповідними символами на графіку. Решта позначень ті ж самі, що й на рис. 1 та 3.

рів налоксону. В даних експериментах ізольоване прикладання налоксону в концентрації 100 нМ викликало збільшення амплітуди Р-струму в середньому на  $5 \pm 1\%$  ( $n = 5$ ;  $P < 0.01$ ) у п'яти досліджених нейронах, тоді як у трьох нейронах жодного ефекту не спостерігалось. В наступній серії експериментів клітини, в яких відмічалася потенціація Р-струму в присутності 10 нМ DAMGO ( $10 \pm 2.5\%$ ,  $n = 5$ ;  $P < 0.05$ ), інкубували в розчині, що вміщував 100 нМ налоксону. Як видно з рис. 4, при наступній аплікації 10 нМ DAMGO на тлі дії 100 нМ налоксону додаткового ефекту агоніста  $\mu$ -ОР не було виявлено (інкремент становив у середньому  $4.9 \pm 0.5\%$ ;  $n = 5$ ;  $P < 0.001$  порівняно з ефектом власне налоксону, що склав  $5 \pm 1\%$ ,  $n = 5$ ;  $P < 0.01$ ). Таким чином, можна дійти висновку, що DAMGO та налоксон, скоріш за все, взаємодіють з одним і тим самим високоафінним центром зв'язування  $\mu$ -ОР.

## ОБГОВОРЕННЯ

Результати наших експериментів продемонстрували, що агоністи  $\mu$ -ОР у наномолярних концентраціях викликають помітну, хоча й не дуже інтенсивну потенціацію кальцієвого струму Р-типу. Аплікація 10 нМ селективного агоніста  $\mu$ -ОР DAMGO призводила до швидкого (менше ніж за 10 с) зростання амплітуди Р-струму приблизно на одну десяту вихідного значення ( $P < 0.001$ ). Ефект був більш

вираженим при від'ємніших значеннях мембранного потенціалу, не залежав від попередньої стимуляції клітини та був повністю оборотним (цілком зникав у разі усунення агоніста із зовнішньоклітинного розчину). Результати цих експериментів відрізняються від даних, отриманих Канемаса та співавт. [4] у роботі, де вони досліджували модулюючу дію агоністів  $\kappa$ -ОР на кальцієвий струм Р-типу в нейронах Пуркін'є. Згадані автори показали, що цей струм пригнічується селективним агоністом  $\kappa$ -ОР U50488, причому такий ефект розвивається значно повільніше (протягом приблизно 1 хв) та залежить від частоти стимуляції клітини. Подібні результати дають підстави для припущення, що вплив опіоїдів на потенціалізовані кальцієві канали Р-типу може бути зумовлений взаємодією цих агентів з ОР різних типів, причому відповідні ефекти істотно розрізняються.

Визначення залежності ефекту аплікації DAMGO від концентрації останнього свідчило про те, що амплітуда Р-струму помітно збільшувалася вже в разі прикладання 1 нМ цього агоніста, досягаючи насичення при концентрації 100 нМ. Відповідно до результатів цих дослідів, можна зазначити, що напівмаксимальна ефективна концентрація даного ліганду ( $EC_{50}$ ) знаходиться в межах 1–10 нМ. Такі значення  $EC_{50}$  співставні з отриманими Мінамі та співавт. [12] (0.87 нМ) і Райнором та співавт. [13] (2 нМ) в експериментах з вивчення зв'язування DAMGO з  $\mu$ -ОР. Таким чином, отримані нами дані свідчать про те, що центр зв'язування агоніста з рецептором має таку ж саму чутливість до агоніста, як і центр зв'язування класичного опіоїдного рецептора.

Відомо, що ендоморфін-1 у наномолярних концентраціях ( $EC_{50} = 7.7$  нМ) здатний істотно модулювати функцію потенціалізованих кальцієвих каналів [15]. У наших експериментах ендоморфін-1 у згаданих концентраціях викликав збільшення амплітуди Р-струму. Потенціація цього струму під дією ендоморфіну-1 була дещо слабшою, ніж аналогічний ефект DAMGO в тих самих концентраціях, та розвивалася значно повільніше. Отже, є підстави вважати, що всі (або майже всі) селективні агоністи  $\mu$ -ОР при взаємодії з високоафінним центром зв'язування даних рецепторів викликають потенціацію Р-струму, тоді як ефекти агоністів  $\kappa$ -ОР, вірогідно, є відмінними.

Раніше було встановлено, що агоніст  $\mu$ -ОР алкалоїд морфін у мікромольних концентраціях взаємодіє з  $\kappa$ - та  $\delta$ -ОР [12, 13]. У наших експеримен-

тах аплікація морфіну в концентраціях від 1 до 100 мкМ у двох досліджених клітинах викликала пригнічення Р-струму, в той час як у п'яти клітинах жодного ефекту не спостерігалось, а у 10 клітинах (тобто 59 % досліджених) цей струм потенціювався. Пригнічення Р-струму в певній частині клітин у присутності морфіну, можливо, було спричинено переважною активацією  $\kappa$ -ОР [4], а збільшення амплітуди таких струмів могло бути зумовлено домінуванням взаємодії зазначеного агоніста з  $\mu$ -ОР. Випадки, коли дія морфіну була практично відсутньою (29 % клітин), могли спостерігатися тоді, коли протилежні ефекти (потенціація та інгібування Р-струму) при активації ОР різних типів взаємно компенсувалися. Таким чином, видається вірогідним, що морфін у мікромолярному діапазоні концентрацій не є селективним агоністом  $\mu$ -ОР; можливо, він впливає на кальцієві канали Р-типу по-різному – залежно від того, рецептори якого типу переважно активуються [4].

Налоксон є антагоністом ОР з високою спорідненістю до  $\mu$ -ОР, помірною щодо  $\kappa$ -ОР і відносно низькою щодо  $\delta$ -ОР [12]. Встановлено [16], що ця речовина може виступати як нейтральний антагоніст у клітинах, котрі попередньо не перебували під дією агоніста. У клітинах, що були раніше проінкубовані з морфіном, налоксон проявляє себе як зворотний агоніст, пригнічуючий базальну активність  $\mu$ -ОР [16]. Подібний вплив налоксону як агоніста  $\mu$ - та  $\kappa$ -ОР також було виявлено в клітинах яєчника китайського хом'ячка [17]. Таким чином, впливи налоксону як агоніста  $\mu$ -ОР є досить різними [16].

У наших експериментах аплікація 100 нМ налоксону спричинювала швидке, але не дуже значне (в середньому  $5 \pm 1$  %,  $n = 5$ ;  $P < 0.01$ ) збільшення амплітуди Р-струму; в той же час подібна аплікація цілком усувала ефект 10 нМ DAMGO. Ці дані вказують, що модуляція DAMGO і налоксоном Р-струмів зумовлена взаємодією з одним і тим самим високоафінним центром зв'язування; вірогідно, останній є компонентом  $\mu$ -ОР.

Таким чином, отримані нами результати дають підстави вважати, що агоністи ОР викликають амбівалентні ефекти щодо кальцієвих каналів Р-типу. Струми через ці канали потенціюються в разі взаємодії опіоїдів  $\mu$ -ОР та інгібуються внаслідок активації  $\kappa$ -ОР або безпосередньої взаємодії опіоїдів із Р-каналами [4]. Наші дані (експерименти з неспецифічним агоністом ОР морфіном) свідчать про здатність опіоїдів одночасно взаємодіяти в одній і

тій самій клітині з  $\mu$ - та  $\kappa$ -ОР, що призводить до виникнення конкурентних ефектів щодо кальцієвих каналів Р-типу. Внутрішньоклітинні механізми передачі сигналу від  $\mu$ -ОР до кальцієвих Р-каналів, очевидно, потребують подальшого вивчення.

Експерименти на тваринах проводилися згідно з існуючими міжнародними та національними нормативними актами щодо використання піддослідних тварин, зокрема Конвенції Ради Європи від 18.03.1986 та Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV.

Під час виконання роботи не виникало будь-яких конфліктів, які стосувалися комерційних або фінансових відношень, відношень з організаціями або особами, будь-яким чином пов'язаними з дослідженням, а також взаємовідносин співавторів статті – О. В. Єгорової, О. І. Фісюнова та О. О. Кришталя.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. C. J. Kim, J. S. Rhee, and N. Akaike, "Modulation of high-voltage activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the rat periaqueductal gray neurons by  $\mu$ -type opioid agonist," *J. Neurophysiol.*, **77**, 1418-1424 (1997).
2. F. A. Abdulla and P. A. Smith, "Nociceptin inhibits T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel current in rat sensory neurons by a G-protein-independent mechanism," *J. Neurosci.*, **17**, 8721-8728 (1997).
3. V. Carabelli, I. Carra, and E. Carbone, "Localized secretion of ATP and opioids revealed through single  $\text{Ca}^{2+}$  channel modulation in bovine chromaffin cells," *Neuron*, **20**, 1255-1268 (1998).
4. T. Kanemasa, K. Asakura, and M. Ninomiya, "Kappa-opioid agonist U50488 inhibits P-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by two mechanisms," *Brain Res.*, **702**, 207-212 (1995).
5. V. A. Panchenko, O. A. Krishtal, F. Tegtmeier, and A. Y. Tsyndrenko, "R56865 as  $\text{Ca}(2+)$ -channel blocker in Purkinje neurons of rat: comparison with flunarizine and nimodipine," *Neuroscience*, **54**, 587-594 (1993).
6. O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, et al., "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches," *Pflügers Arch.*, **391**, 85-100 (1981).
7. P. G. Kostyuk, N. S. Veselovsky, and S. A. Fedulova, "Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-II. Calcium currents," *Neuroscience*, **6**, 2439-2444 (1981).
8. E. Neher and B. Sakmann, "The patch clamp technique," *Sci. Am.*, **266**, 44-51 (1992).
9. I. M. Mintz, V. J. Venema, K. M. Swiderek, et al., "P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Ag-IVA," *Nature*, **355**, 827-829 (1992).
10. C. Romanin, P. Grosswagen, and H. Schindler, "Calpastatin and nucleotides stabilize cardiac calcium channel activity in excised patches," *Pflügers Arch.*, **418**, 86-92 (1991).
11. S. P. Robertson, J. D. Johnson, and J. D. Potter, "The time-course of  $\text{Ca}^{2+}$  exchange with calmodulin, troponin, parvalbumin, and myosin in response to transient increases

- in Ca<sup>2+</sup>,” *Biophys. J.*, **34**, 559-569 (1981).
12. M. Minami and M. Satoh, “Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions,” *Neurosci. Res.*, **23**, 121-145 (1995).
13. K. Raynor, H. Kong, Y. Chen, et al., “Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors,” *Mol. Pharmacol.*, **45**, 330-334 (1994).
14. J. Gong, J. A. Strong, S. Zhang, et al., “Endomorphins fully activate a cloned human mu opioid receptor,” *FEBS Lett.*, **439**, 152-156 (1998).
15. H. Higashida, N. Hoshi, R. Knijnik, et al., “Endomorphins inhibit high-threshold Ca<sup>2+</sup> channel currents in rodent NG108-15 cells overexpressing mu-opioid receptors,” *J. Physiol.*, **507**, 71-75 (1998).
16. D. Wang, K. M. Raehal, E. J. Bilsky, and W. Sadee, “Inverse agonists and neutral antagonists at mu opioid receptor (MOR): possible role of basal receptor signaling in narcotic dependence,” *J. Neurochem.*, **77**, 1590-1600 (2001).
17. K. Fukuda, S. Kato, T. Shoda, et al., “Partial agonistic activity of naloxone on the opioid receptors expressed from complementary deoxyribonucleic acids in Chinese hamster ovary cells,” *Anesth. Analg.*, **87**, 450-455 (1998).