

## АМБІВАЛЕНТНИЙ ВПЛИВ ОПОЇДІВ НА P2X3-РЕЦЕПТОРИ СЕНСОРНИХ НЕЙРОНІВ ЩУРА В ПРИСУТНОСТІ АНТАГОНІСТІВ ОПОЇДНИХ РЕЦЕПТОРІВ

Надійшла 09.07.2014

На культивованих нейронах спінальних гангліїв (СГ) щурів показано, що інкубація цих нейронів у присутності 50 нМ налоксону (антагоніста опіоїдних рецепторів – ОР) істотно збільшувала ефективність блокуючої дії лей-енкефаліну (ЛЕК, ендогенного опіоїдного пептида) на P2X3-струми, викликані аплікацією  $\alpha, \beta$ -Me-АТФ. Попередня інкубація нейронів з налоксоном (2–4 хв) призводила до повного блокування P2X3-струмів протягом 2 хв при концентрації ЛЕК 10 нМ. У контрольних умовах (без інкубації) аналогічний ефект спостерігався лише в разі значно вищих концентрацій ЛЕК (1 мкМ). Отже, IC<sub>50</sub> інгібуючої дії ЛЕК при застосуванні налоксону зменшувалася від 10 до 1 нМ. Застосування налоксону у високій концентрації (1 мкМ), після розвитку інгібуючої дії ЛЕК вплило амбівалентність його впливу на амплітуду P2X3-струмів. Амплітуда останніх тимчасово (протягом 2–4 хв) перевищувала контрольні значення, після чого поверталася до початкового рівня. Такий амбівалентний вплив опіоїда пояснюється тим, що G-білки, зв'язуючись з ОР, можуть утворювати комплекси у двох конформаціях – інгібуючій (Gi/o) та стимулюючій (Gq/s). Відомо, що налоксон посилює знеболюючу дію морфіну завдяки прямому конкурентному антагонізму Gq/s-зв'язаної конформації. Таким чином, в основі подвійного впливу опіоїдів на P2X3-рецептори лежить антагоністіндуковане зміщення рівноваги між конформаціями комплексів G-білків.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** опіоїдні рецептори, P2X3-рецептори, лей-енкефалін (ЛЕК), налоксон, Gi/o- та Gq/s-білки.

### ВСТУП

Доведено, що опіоїдні рецептори (ОР) експресуються за межами ЦНС і можуть слугувати ціллю для дії анагетиків [1]. Згідно з численними даними клінічних досліджень, опіоїди, котрі не здатні проникати через гемато-енцефалічний бар'єр, демонструють анагетичний потенціал, аналогічний такому «звичайних опіоїдів» [2, 3].

Відомо, що  $\mu$ -опіоїдні рецептори ( $\mu$ -ОР) спряжені з пертусистоксинчутливими Gi/o-білками. Активація цих рецепторів призводить до інгібування аденілатциклази (АС) та активації фосфоліпази С (PLC); дані ефекти опосередковуються Ga- та G $\beta\gamma$ -субодиницями відповідно [4]. Опіоїдіндуковане інгібування АС і цАМФ-залежної активності протекінази А (РКА) зумовлює зменшення перехідного рецепторного потенціалу TRPV1-рецепторів у нейронах спінальних гангліїв (СГ) [5, 6]. Крім того,

було показано, що агоністи  $\mu$ -ОР інгібують активність потенціалзалежних кальцієвих каналів та стимулюють G-білок-опосередковані калієві канали внутрішнього випрямлення [7–9]. Всі ці процеси призводять до зменшення інтенсивності ноцицептивних сигналів і лежать в основі периферичної дії опіоїдів [10, 11].

Результати дослідження впливу опіоїдів на кальцієві струми в нейронах СГ дозволили дійти висновку, що ОР можуть існувати у двох конвертованих станах, пов'язаних з дією інгібуючих (Gi/o) або стимулюючих (Gq/s) G-білків. Ці стани характеризуються різною чутливістю до опіоїдних антагоністів (налоксону, налтрексону та ін.) [12]. Згідно з даними клінічних досліджень, комбінування опіоїдних агоністів з антагоністами в ультранизьких (піко- або нанограми на 1 кг) дозах може підвищувати знеболюючу ефективність опіоїдів [13].

Показано, що дія токсину коклюшу (пертусистоксину – РТХ) – блокатора Gi/o-білків, котрі зв'язані з ОР, призводить до посилення потенціалізації P2X2/3-опосередкованих струмів у нейронах нижніх ший-

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

них гангліїв [14]. P2X<sub>2/3</sub>- та P2X<sub>3</sub>-рецептори експресуються у субпопуляції нейронів СГ, що відповідають за сприйняття ноцицептивних впливів та передачу больової імпульсації [15, 16]. Отже, ці рецептори є перспективними мішенями для нових знеболювальних препаратів. Подальше дослідження даних рецепторів становить практичний інтерес ще й тому, що АТФ як ендogenousний ліганд може вивільнюватися з клітин у різних фізіологічних станах (як нормальних, так і патологічних), активуючи відповідні рецептори [17]. Сприйняття болю істотно пригнічується під дією опіоїдних пептидів, проте тривале застосування опіоїдів може спричинювати розвиток гіпералгезії та аллодинії [18, 19]. Вивчення механізмів відповідних процесів може мати неабияке значення для клінічної медицини.

У нашій роботі ми намагались оцінити внесок активності P2X<sub>3</sub>-рецепторів у низку процесів, котрі ініціюються в периферичній нервовій системі в умовах опіоїдіндукованого знеболення.

## МЕТОДИКА

Експерименти проводили на культивованих протягом 24 год нейронах СГ щурів, діаметр сом яких варіював у межах 10–30 мкм. Використовували білих щурів лінії Вістар WAG/GSto віком вісім діб, котрих утримували в стандартних умовах віварію. Для виділення нейронів СГ тварину декапітували, розтинали спинномозковий канал та видаляли грудні й поперекові СГ. Виділені ганглії вміщували в чашку Петрі із зовнішньоклітинним розчином (надалі нормальний розчин) такого складу (у мілімолях на 1 л): NaCl – 130, KCl – 5, CaCl<sub>2</sub> – 2, MgCl<sub>2</sub> – 2, NERES – 10 (рН доводили до 7.3, використовуючи NaOH). Після цього ганглії переносили в камеру з розчином для ферментативної обробки – середовищем MEM, до якого було додано 1.3 мг/мл колагенази (тип IV) та 4 мг/мл трипсину. Ганглії інкубували в термостаті протягом 30 хв при 34 °С, після чого відмивали при кімнатній температурі (20–22 °С) середовищем MEM із доданням 10 мМ NERES та 10 % сироватки крові ембріонів телят. Ганглії витримували в даному розчині протягом 5 хв, що забезпечувало інгібування активності ферментів. Для виділення ізольованих клітин тканину гангліїв пропускали через скляні піпетки Пастера різних діаметрів. Отриману клітинну суспензію висівали на покривні скельця, вміщені в стерильні чашки Петрі з 2 мл середовища MEM. Отримані в такий

спосіб нейрони інкубували протягом 24 год при 37 °С в атмосфері з 5 % CO<sub>2</sub>, після чого використовували для електрофізіологічних вимірювань.

Реєстрацію іонних струмів проводили із застосуванням фіксації потенціалу (“петч-клемп”) у режимі відведення від цілої клітини. Струми вимірювали при 22 ± 2 °С з використанням підсилювача Axopatch 200B (“Axon Instruments”, США), фільтрували за допомогою двополюсного фільтра Бесселя (частота зрізу 2 кГц) та оцифровували із застосуванням АЦП Digidata 1200B (“Axon Instruments”, США). Мікропіпетки для внутрішньоклітинної перфузії та відведення електричних сигналів виготовляли з боросилікатних скляних капілярів. Кінчики мікропіпеток оплавляли під мікроскопом, наближаючи їх до розжареної платинової спіралі. Піпетки заповнювали стандартним внутрішньоклітинним розчином, що містив у собі (у мілімолях на 1 л): KCl – 130, NERES – 10, EGTA – 10, ГТФ – 0.5, АТФ – 5 (рН доводили до 7.3, використовуючи KOH). Діаметр кінчиків таких мікропіпеток складав 3–6 мкм, а опір – 2–4 МОм.

P2X<sub>3</sub>-опосередковані струми (P2X<sub>3</sub>-струми) характеризуються надзвичайно швидкою кінетикою десенситизації та відносно повільним виходом із десенситизованого стану. Це зумовлювало необхідність максимально швидкого прикладання та відмивання агоністів. Ми використовували модифікований метод фіксації концентрації, що дозволяв протягом 10 мс повністю замінювати розчин, омиваючий досліджувану клітину. P2X<sub>3</sub>-струми викликали прикладанням 30 мкМ агоніста відповідних рецепторів  $\alpha, \beta$ -Me-АТФ протягом 250 мс з інтервалами 2 хв. Це дозволяло отримувати добре відтворювані P2X<sub>3</sub>-струми протягом усього часу проведення експерименту. Підтримуваний потенціал становив –80 мВ. Діючі речовини (агоністи P2X<sub>3</sub>-рецепторів, агоністи ОР, налоксон) розчиняли в нормальному розчині. Всі реактиви були вироблені компанією “Sigma” (США).

Опіоїдні пептиди прикладали до досліджуваної клітини, додаючи їх або до нормального розчину, або до розчину з агоністом. Аплікація тривала, поки зумовлений дією опіоїда ефект не досягав стаціонарного рівня. Вплив тестованого агента на амплітуду P2X<sub>3</sub>-струмів виражали як відношення стаціонарної амплітуди струму при даній концентрації агента ( $I$ ) до амплітуди контрольованого струму ( $I_c$ ). Числові значення подані нижче як середні ± стандартне відхилення. Аналіз

міжгрупових розбіжностей проводили з використанням *t*-тесту Ст'юдента; різниці вважали значущими при  $P < 0.05$  (програмний пакет «Origin 8.0»; «OriginLab Co.», США).

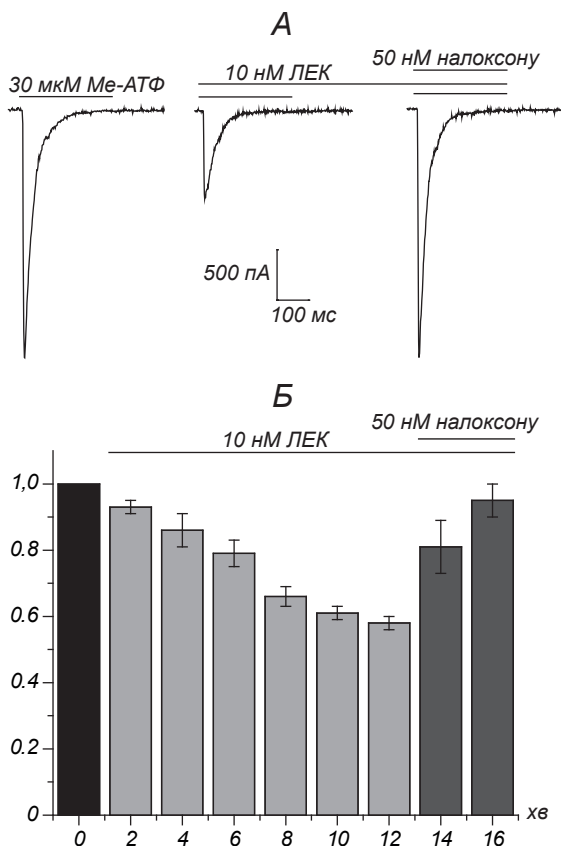
## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Прикладання лей-енкефаліну (ЛЕК) до сом нейронів СГ призводило до пригнічення P2X3-струмів, причому ефекти залежали від часу та дози. Для впевненості в тому, що пригнічення P2X3-рецепторів опіоїдом здійснюється завдяки активації ОР, ми застосовували налоксон – антагоніст цих рецепторів (інверсний агоніст). Після визначення інгібуючого впливу ЛЕК на P2X3-струми до позаклітинного розчину додавали 50 нМ налоксону разом із 10 нМ ЛЕК. У таких умовах налоксон викликав майже повне повернення P2X3-струмів до вихідного рівня (відновлення в середньому на  $95 \pm 4\%$ ;  $n = 5$ , протягом 6 хв) (рис. 1).

Результати такого експерименту доводять, що інгібуючий вплив ЛЕК на P2X3-струми опосередкований виключно активацією ОР. У перебігу численних досліджень *in vivo* було показано, що хронічне

застосування опіоїдів антагоністів (наллоксону, налтрексону) збільшує ефективність дії агоністів ОР [20–22]. Прояви такої функціональної надчутливості були пояснені здатністю антагоністів інгібувати базальну активність ОР. У наших експериментах інкубація нейронів з налоксоном (50 нМ – 1 мкМ) протягом 2–6 хв практично не викликала змін амплітуди P2X3-опосередкованих струмів ( $I/I_K = 97 \pm 6\%$ ,  $n = 5$ ). Таким чином, принаймні в умовах експерименту, агоністнезалежна (базальна) активність ОР не впливає на P2X3-опосередковані струми, проте попередня інкубація нейронів СГ з налоксоном призводила до збільшення чутливості P2X3-струмів до опіоїда. Ми виявили, що в таких умовах налоксон драматично підвищував ефективність інгібуючої дії ЛЕК на P2X3-струми. Як правило, ЛЕК у низькій концентрації (10 нМ) забезпечував інгібуння P2X3-струму приблизно на 50% протягом 10–12 хв (рис. 1). Після попередньої інкубації з 1 мкМ налоксону ЛЕК у тій самій дозі (10 нМ) призводив до повного блокування P2X3-струму протягом 2 хв (рис. 2, А, В). У нормальних умовах (без інкубації з налоксоном) такий швидкий інгібуючий ефект відмічається лише в разі значно вищих концентрацій ЛЕК (1 мкМ; В). Посилення інгібуючого ефекту ЛЕК під впливом налоксону (1 мкМ) спостерігається при всіх протестованих концентраціях опіоїдів (1–100 нМ); це вказує на зменшення  $IC_{50}$  інгібуючої дії ЛЕК від 10 до 1 нМ (В).

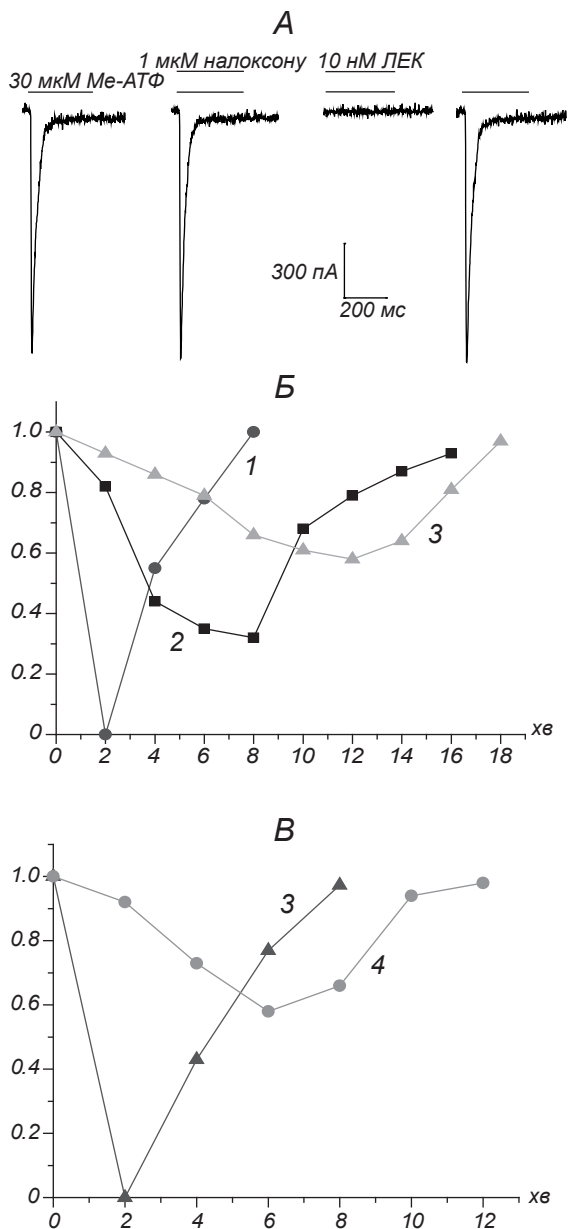
Результати численних досліджень доводять, що ОР, як і інші G-білокспряжені рецептори, здатні у разі зв'язку з різними G-білками набувати декількох активних конформацій [23]. Конформаційні стани гетерогенних комплексів з інгібуючими (Gi/o) та стимулюючими (Gq/s) G-білками є посередниками активації різних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, що забезпечують протилежні ефекти [24]. Антагоністи ОР (наллоксон, налтрексон) підвищують ефективність знеболення морфіном через прямий конкурентний антагонізм Gq/s-зв'язаної конформації [12]. Ці дані узгоджуються з нашими результатами і свідчать про вплив налок-



**Р и с. 1.** Пригнічення інгібуючої дії лей-енкефаліну (ЛЕК) на P2X3-струми в нейронах спінальних гангліїв під впливом налоксону.

А – оригінальні записи струмів; Б – часовий перебіг експерименту. По осі абсцис – час, хв; по осі ординат – середня нормована амплітуда P2X3-струмів (за одиницю прийнятий струм, викликаний аплікацією  $\alpha, \beta$ -Me-ATP без додаткової дії якихось агентів). Тут і надалі періоди прикладання речовин відмічені відрізками прямих над записами.

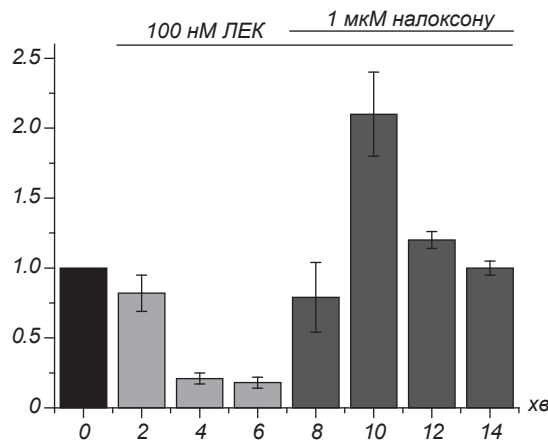
сону на стабілізацію значної частини комплексів ОР та G-білків, що знаходяться в інгібуючій конформації. Заміна налоксону опіоїдом призводить до посилення інгібуючої дії отриманого комплексу на P2X3-струми (рис. 2, А, В). У такому випадку можна було б очікувати, що зворотний обмін (опі-



**Рис. 2.** Зміни інгібуючого впливу лей-енкефаліну (ЛЕК) на P2X3-струми після інкубації нейронів у присутності налоксону в різних концентраціях. А – оригінальні записи струмів; Б, В – динаміка впливу ЛЕК залежно від концентрації (Б – у нормі, В – після інкубації в присутності налоксону). 1–4 – при концентрації налоксону 1, 10, 100 нМ та 1.0 мкМ відповідно. Решта позначень аналогічні таким на рис. 1.

оїда на налоксон) виявить збуджуючий ефект опіоїдів, зазвичай прихований. Щоб переконатись у такому припущенні, ми аплікували налоксон у досить високій концентрації (1 мкМ) після зареєстрованої нами інгібуючої дії ЛЕК на P2X3-струми. Це виявляло амбівалентність впливу опіоїда на такі струми. Їх амплітуда в цьому разі тимчасово збільшувалася більш ніж у два рази ( $I/I_K = 210 \pm 30 \%$ ;  $n = 4$ ) перед тим, як досягала контрольного рівня (рис. 3). Вплив налоксону на P2X3-струми в нейронах СГ не пов'язаний з його властивістю зворотного агоніста. Якщо в аналогічних експериментах замість налоксону ми використовували СТОР, тобто селективний антагоніст  $\mu$ -ОР, то отримували ідентичні результати.

Інтерпретація отриманих фактів може бути наступною. Ми вважаємо, що в субпопуляції ноцицептивних нейронів СГ ОР контролюють активність P2X3-рецепторів, зумовлюючи амбівалентні впливи (інгібування/стимуляцію). Ці процеси опосередковуються G-білками ОР, котрі можуть перебувати в різних конформаційних станах; Gi/o-стан є інгібуючим, а Gq/s-стан – стимулюючим. У звичайних фізіологічних умовах інгібуючий вплив опіоїдів на P2X3-струми переважає і маскує стимуляційний ефект, хоча обидва процеси відбуваються одночасно. Проте коли антагоністи  $\mu$ -ОР (налоксон або СТОР) застосовуються в досить високих дозах, стимуляція P2X3-рецепторів стає тимчасово очевидною (рис. 3). Це може відображати більш високий рівень взаємодії антагоністів ОР з «інгібуючою» конформацією  $\mu$ -ОР-комплексу. Такий феномен якісно узгоджується з нашими результатами, де якраз і виявилось підвищення ефектив-



**Рис. 3.** Тимчасове посилення P2X3-струмів у нейронах спінальних гангліїв, індуковане антагоністом опіоїдних рецепторів в умовах дії лей-енкефаліну (ЛЕК). Позначення ті ж самі, що й на рис. 1, Б.

ності інгібуючої дії опіюда на P2X3-струми після інкубації нейронів СГ у присутності налоксону (рис. 2, А, В). Антагоністи, як правило, зв'язуються з  $\mu$ -ОР, G-білки яких знаходяться в інгібуючій конформації. Цікаво відмітити, що після відмивання налоксону нормальним розчином відмічається феномен, котрий можна розглядати як аналог короткочасної пам'яті, – підвищений інгібуючий ефект опіюда зберігається близько 6 хв. Аналогічна ситуація була описана в іншому експерименті, в якому спорідненість  $\mu$ -ОР до агоністів різко зростала після попередньої експозиції з антагоністом [25]. Результати наших експериментів показують, що взаємодія агоністів і антагоністів  $\mu$ -ОР може формувати довгострокові зміни в конформації G-білків, зв'язаних з цими рецепторами.

Активация  $\mu$ -ОР зазвичай пригнічує P2X3-струми в ноцицептивних нейронах. Можливе функціональне значення протилежної, стимулюючої, дії опіюдів потребує подальшого дослідження. Ці ефекти можуть мати місце в таких патологічних станах, пов'язаних із болем, як опіюдіндукована гіпералгезія та алодинія. Інші побічні ефекти опіюдів, а саме антагоністіндукована опіюдна гіперчутливість та посилення болю, спостерігались *in vivo* після тривалого застосування опіюдів [26].

Отже, результати нашого дослідження свідчать про те, що інгібуючий вплив ЛЕК на P2X3-рецептори опосередковується активацією  $\mu$ -ОР. Інкубація нейронів СГ у присутності налоксону призводить до посилення блокуючої дії опіюда на P2X3-струми. Проте активация ОР може зумовлювати амбівалентні (як інгібуючі, так і стимулюючі) впливи на P2X3-струми залежно від конформаційного стану комплексів з Gi/o- та Gq/s-білками.

Пошук фармакологічних інструментів для контролю механізмів, що впливають на зміну конформацій G-білків, є важливим завданням на шляху розвитку терапії болю.

Всі стадії дослідження відповідали положенням Європейської Конвенції щодо захисту тварин, які використовувалися для дослідів (86/609/ЄЕС, 1986, Страсбург), та нормативам Комітету з біоетики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Автори даної роботи – В. Б. Кулик, І. В. Чижмаков, Т. М. Волкова та О. О. Кришталь – підтверджують відсутність жодних конфліктів щодо комерційних або фінансових відношень, відношень з організаціями чи особами, будь-яким чином пов'язаними з дослідженнями, та взаємовідносин співавторів статті.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. A. Lesniak and A. W. Lipkowski, "Opioid peptides in peripheral pain control," *Acta Neurobiol. Exp.*, **71**, 129-138 (2011).
2. M. H. Hanna, K. M. Elliott, and M. Fung, "Randomized, double-blind study of the analgesic efficacy of morphine-6-glucuronide versus morphine sulfate for postoperative pain in major surgery," *Anesthesiology*, **102**, 815-821 (2005).
3. H. E. Shannon and E. A. Lutz, "Comparison of the peripheral and central effects of the opioid agonists loperamide and morphine in the formalin test in rats," *Neuropharmacology*, **42**, 253-261 (2002).
4. K. S. Murthy and G. M. Makhlof, "Opioid mu, delta, and kappa receptor-induced activation of phospholipase C-beta 3 and inhibition of adenylyl cyclase is mediated by Gi2 and G(o) in smooth muscle," *Mol. Pharmacol.*, **50**, 870-877 (1996).
5. J. Endres-Becker, P. A. Heppenstall, S. A. Mousa, et al., "Mu-opioid receptor activation modulates transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain," *Mol. Pharmacol.*, **71**, 12-18 (2007).
6. I. Vetter, B. D. Wyse, G. R. Monteith, et al., "The mu opioid agonist morphine modulates potentiation of capsaicin-evoked TRPV1 responses through a cyclic AMP-dependent protein kinase A pathway," *Mol. Pain*, **2**, 22-28 (2006).
7. J. E. Schroeder and E. W. McCleskey, "Inhibition of Ca<sup>2+</sup> currents by a mu-opioid in a defined subset of rat sensory neurons," *J. Neurosci.*, **13**, 867-873 (1993).
8. Z. Z. Wu, S. R. Chen, and H. L. Pan, "Differential sensitivity of N- and P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel currents to a mu opioid in isolectin B4-positive and negative dorsal root ganglion neurons," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **311**, 939-947 (2004).
9. C. L. Marker, R. Lujan, H. H. Loh, et al., "Spinal G-protein-gated potassium channels contribute in a dose-dependent manner to the analgesic effect of mu- and delta- but not kappa-opioids," *J. Neurosci.*, **25**, 3551-3559 (2005).
10. C. Stein, M. Schafer, and H. Machelska, "Attacking pain at its source: new perspectives on opioids," *Nat. Med.*, **9**, 1003-1008 (2003).
11. C. Stein and L. J. Lang, "Peripheral mechanisms of opioid analgesia," *Current Opin. Pharmacol.*, **9**, 3-8 (2009).
12. S. M. Crain and K. F. Shen, "Antagonists of excitatory opioid receptor functions enhance morphine's analgesic potency and attenuate opioid tolerance/dependence liability," *Pain*, **84**, 121-131 (2000).
13. L. H. Burns and Hoau-Yan Wang, "Ultra-low-dose naloxone or naltrexone to improve opioid analgesia: The history, the mystery and a novel approach," *Clin. Med. Insights: Therapeutics*, **2**, 857-868 (2010).
14. I. Chizhnikov, Y. Yudin, N. Mamenko, et al., "Opioids inhibit purinergic nociceptors in the sensory neurons and fibres of rat via a G protein-dependent mechanism," *Neuropharmacology*, **48**, 639-647 (2005).
15. P. M. Dunn, Y. Zhong, and G. Burnstock, "P2X receptors in peripheral neurons," *Prog. Neurobiol.*, **65**, 107-134 (2001).
16. O. A. Krishtal, S. M. Marchenko, and V. I. Pidoplichko, "Receptor for ATP in the membrane of mammalian sensory neurones," *Neurosci. Lett.*, **35**, 41-45 (1983).
17. B. A. Chizh and P. Illes, "P2X receptors and nociception," *Pharmacol. Rev.*, **53**, 553-568 (2001).
18. L. F. Chu, M. S. Angst, and J. D. Clark, "Opioid-induced

- hyperalgesia in humans: molecular mechanisms and clinical considerations”, *Clin. J. Pain*, **24**, No. 6, 479-496 (2008).
19. M. S. Angst and J. D. Clark, “Opioid-induced hyperalgesia: a qualitative systematic review,” *Anesthesiology*, **104**, No. 3, 570-587 (2006).
  20. S. Sirohi, P. Kumar, and B. C. Yoburn, “Mu-opioid receptor up-regulation and functional supersensitivity are independent of antagonist efficacy,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **323**, 701-707 (2007).
  21. B. C. Yoburn and C. E. Inturrisi, “Modification of the response to opioid and nonopioid drugs by chronic opioid antagonist treatment,” *Life Sci.*, **42**, 1689-1696 (1988).
  22. B. C. Yoburn, S. Shah, K. Chan, et al., “Supersensitivity to opioid analgesics following chronic opioid antagonist treatment: relationship to receptor selectivity,” *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **51**, 535-539 (1995).
  23. P. Sanchez-Blazquez, P. Gomez-Serranillos, and J. Garzon, “Agonists determine the pattern of G-protein activation in mu-opioid receptor-mediated supraspinal analgesia,” *Brain Res. Bull.*, **54**, 229-235 (2001).
  24. B. D. Hudson, T. E. Hebert, and M. E. Kelly, “Ligand- and heterodimer-directed signaling of the CB(1) cannabinoid receptor,” *Mol. Pharmacol.*, **77**, 1-9 (2010).
  25. W. T. Birdsong, S. Arttamangkul, M. J. Clark, et al., “Increased agonist affinity at the mu-opioid receptor induced by prolonged agonist exposure,” *J. Neurosci.*, **33**, 4118-4127 (2013).
  26. B. Kest, C. A. Palmese, E. Hopkins, et al., “Naloxone-precipitated withdrawal jumping in 11 inbred mouse strains: evidence for common genetic mechanisms in acute and chronic morphine physical dependence,” *Neuroscience*, **115**, 463-469 (2002).