

Роль фосфоінозитидного сигнального шляху в опіоїдному контролі $P2X_3$ -рецепторів первинних сенсорних нейронів

В.Б. Кулик, І.В. Чижмаков, Т.М. Волкова, О.П. Максимюк, О.О. Кришталь

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ; E-mail: Kulyk@biph.kiev.ua

Методом patch-clamp у конфігурації ціла клітина, досліджено вплив опіоїдів на $P2X_3$ -рецептори у нейронах задньокорінцевих гангліїв (ЗКГ). Показано, що активація опіоїдних G-білоксполучених рецепторів ендogenousним лігандом – лейенкефаліном, призводить до подвійного впливу на $P2X_3$ -рецепторопосередковані струми ($P2X_3$ -струми). Аплікація лейенкефаліну (1 мкмоль/л) повністю пригнічувала амплітуди $P2X_3$ -струмів. Проте після преінкубації нейронів у токсині коклюшу – блокаторі інгібувальних $G_{i/o}$ -білків, та сама концентрація лейенкефаліну викликала стимулювання $P2X_3$ -струмів. Блокування активності фосфоліпази C повністю усувало як стимулювальний, так і пригнічувальний ефекти лейенкефаліну на $P2X_3$ -струми. Таким чином, нами вперше показано, що агоністи опіоїдних рецепторів викликають два протилежно спрямовані впливи на $P2X_3$ -рецептори нейронів ЗКГ щурів, обидва з яких опосередковані активацією фосфоліпази C. Результати цих досліджень відкривають можливий молекулярний механізм добре відомого переходу від пригнічувальної дії опіоїдів (аналгезії) до стимулювальної (гіпералгезії).

Ключові слова: $P2X_3$ -рецептори; опіоїдні рецептори; лейенкефалін; фосфоліпаза C; токсин коклюшу; G-білки.

ВСТУП

Важливою складовою системи пуринергічної сигналізації ссавців є іонотропні $P2X$ -рецептори, котрі активуються зовнішньоклітинним аденозинтрифосфатом і беруть участь у генерації больового сигналу. Численні дослідження свідчать, що гомомерні $P2X_3$ - та гетеромерні $P2X_{2/3}$ -рецептори експресуються у нейронах задньокорінцевих гангліїв (ЗКГ) ссавців і беруть участь у процесах ініціації гострої больової поведінки, гіпералгезії та алодинії [1,2].

Відомо, що рецептори таких прозапальних медіаторів, як простагландин, брадикінін і субстанція P, коекспресуються з $P2X_3$ -рецепторами в периферичних терміналях сенсорних нейронів і стимулюють активність останніх, внаслідок чого посилюється больовий сигнал [3,4]. Ці рецептори сполучені з G_q -білками, що активують фосфоліпазу C

(ФЛС), котра гідролізує фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат (ФІФ₂) і призводить до утворення діацилгліцеролу (ДАГ) та інозитол-1,4,5-трифосфату (ІФ₃) [5]. Інші G-білоксполучені рецептори є представниками ендogenousної опіоїдної системи (рецептори μ , δ , κ), активація яких призводить до пригнічення больового сигналу [6 – 8]. Встановлено, що активація опіоїдних рецепторів впливає на $P2X_{2/3}$ -рецептори у нейронах нижнього шийного ганглію, спричинюючи знеболення [9]. Відомо, що опіоїдна аналгетична система може модулювати больові відчуття як на рівні ЦНС, так і на периферії. Периферична опіоїдноіндукована аналгезія має перевагу над центральною, оскільки вона позбавлена таких побічних ефектів, як пригнічення дихання, депресія, наркотична залежність тощо [10].

© В.Б. Кулик, І.В. Чижмаков, Т.М. Волкова, О.П. Максимюк, О.О. Кришталь

Метою нашої роботи був пошук молекулярних механізмів взаємодії опіоїдної та пуринергічної систем у первинних ноцицепторах.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на культивованих, протягом 24 год, нейронах ЗКГ щурів, діаметром 10–30 мкм. У дослідженнях використовували білих щурів лінії Вістар віком 8 діб. Після декапітації тварини розтинали спинномозковий канал та видаляли грудні і поперекові ЗКГ. Виділені ганглії вміщували у чашку Петрі з розчином (нормальний розчин) такого складу (ммоль/л): NaCl – 130; KCl – 5; CaCl₂ – 2; MgCl₂ – 2; HEPES – 10; (рН доводили до 7,3 за допомогою NaOH). Ферментацію гангліїв проводили в середовищі MEM з додаванням колагенази (тип IV) – 1,3 мг/мл і трипсину – 4мг/мл, інкубували протягом 30 хв, при 34 °С. Ферментативну реакцію інгібували розчином середовища MEM, що містив 10 ммоль/л HEPES та 10% ембріональної сироватки крові телят, при 20 – 22 °С протягом 5 хв. Ізольовані клітини отримували механічно, застосовуючи піпетки Пастера різних діаметрів. Клітинну суспензію висівали на покривне скельце, що знаходилось у стерильних чашках Петрі, які містили 2 мл середовища MEM. Отримані в такий спосіб нейрони інкубували при 37 °С та 5% CO₂ протягом 24 год. Ці нейрони використовували у подальших електрофізіологічних дослідженнях.

Реєстрацію струмів проводили з застосуванням методу patch-clamp у конфігурації ціла клітина при кімнатній температурі (20 – 22°С). Трансмембранні струми вимірювали з використанням підсилювача Axopatch 200B (“Axon Instruments”, США), фільтрували з частотою зрізу 2 кГц за допомогою двополюсного фільтра Бесселя та оцифровували аналого-цифровим перетворювачем – Digidata 1200B (“Axon Instruments”, США). Мікропіпетки заповнювали стандартним

внутрішньоклітинним розчином, що містив (ммоль/л): KCl – 130; Hepes – 10; EGTA – 10; ГТФ – 0,5; АТФ – 5; (рН доводили до 7,3 за допомогою КОН). P2X₃-струми викликали прикладанням 30 мкмоль/л агоніста (α,β-Ме-АТФ) протягом 250 мс кожні 2 хв. Це дало змогу отримувати відтворювані P2X₃-струми протягом усього експерименту. Підтримуваний потенціал становив –80 мВ. Для з'ясування впливу опіоїдів на активність P2X₃-рецепторів, їх аплікували на досліджувані нейрони, поки зумовлений ними ефект не сягав стаціонарного рівня. Вплив опіоїду на P2X₃-рецептори виражали як відношення амплітуди струму за даної концентрації ліганда – I (після досягнення стаціонарного рівня) до амплітуди контрольного струму – I₀. Значення представлені як середнє ± стандартне відхилення. Статистичний аналіз проводили за допомогою критерію t Стьюдента. Різницю вважали значущою при P < 0,05. Статистичну обробку одержаних результатів проводили в програмному пакеті Origin 8.0 (OriginLab Corporation, США). Діючі речовини (агоністи P2X₃- та опіоїдних рецепторів, налоксон) додавали до нормального розчину. Всі хімічні сполуки, вироблені компанією “Sigma” (США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Прикладений α,β-Ме-АТФ (30 мкмоль/л) на досліджувані нейрони ЗКГ, при підтримуваному потенціалі –80 мВ, викликав появу трансмембранного P2X₃-струму у 62% клітин (n=56). Ендогенний опіоїд – лейенкефалін, аплікований у концентрації 1 мкмоль/л, призводив до повного інгібування P2X₃-струмів на (99 ± 1%; n = 6; P < 0,001; див. рис. 1,а,б; 2,2) у 25,8% від загальної кількості протестованих нейронів. Клітини, не чутливі до впливу опіоїдів, не використовувались у подальших дослідженнях.

Антагоніст опіоїдних рецепторів налоксон у концентрації 50 нмоль/л прикладений на тлі лейенкефаліну протягом 6–8 хв пра-

критично повністю усував пригнічувальний ефект останнього ($95 \pm 6\%$; $n = 5$, $P < 0,05$; див. рис. 2,3). Цей результат вказує на те, що вплив вищезазначеного опіоїду на P2X₃-струми здійснюється внаслідок активації його рецепторів.

Останні дослідження на високопорогових кальцієвих каналах N-типу у нейронах ЗКГ показали, що опіоїдні рецептори можуть існувати у двох конформаційних станах і бути зв'язаними з інгібувальними ($G_{i/o}$) або стимулювальними (G_s та G_q) гетеротримерними G-білками [4,5,11]. Токсин коклюшу вибірково блокує $G_{i/o}$ -білки, при цьому не впливаючи на активність G_s -білків [11]. Отже, якщо інгібувальний вплив лейенкефаліну на P2X₃-рецептори опосередкований $G_{i/o}$ -білками, то блокування останніх повинно призвести до стимулювання P2X₃-струму.

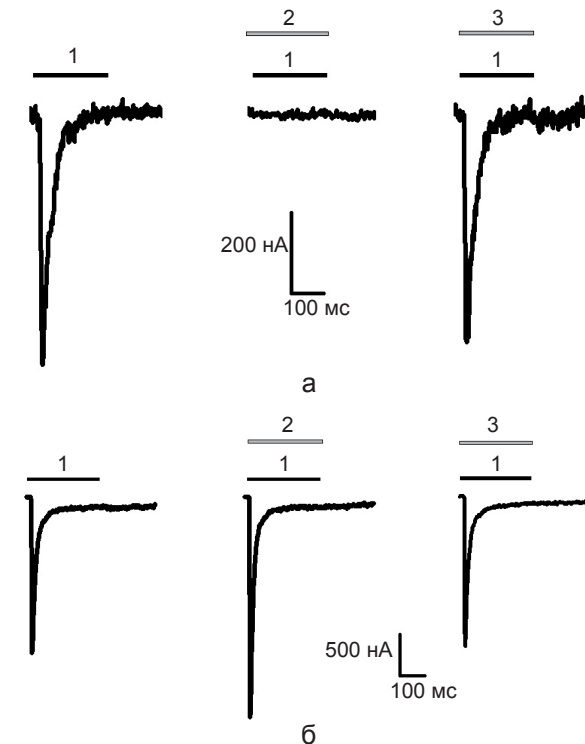


Рис 1. Подвійний вплив лейенкефаліну на P2X₃-струми в нейронах задньокорінцевих гангліїв: 1 - α, β -Me-АТФ (30 мкмоль/л); 2 – лейенкефалін (1 мкмоль/л); 3 – відмивка; а – інгібування, б – стимулювання (після інкубації з токсином коклюшу)

Для перевірки цього припущення ЗКГ нейрони інкубували з 250 нг/мл токсину коклюшу протягом 24 год. Після такої інкубації 1 мкмоль/л лейенкефаліну призводив до діаметрально протилежного ефекту: відбувалося стимулювання P2X₃-струмів на 11 – 45% ($n = 5$; див. рис. 1,б; 2,4) у всіх опіоїдчутливих нейронах. Таким чином, наші дослідження вказують на те, що активація опіоїдних рецепторів викликає подвійний вплив на P2X₃-струми і цей ефект опосередкований G-білками. Вочевидь, висока ефективність пригнічувального шляху ($G_{i/o}$ -білки) маскує стимулювальний вплив білків G_s - та G_q - типу у нормальних умовах.

Відомо, що активація $G_{i/o}$ -білків призводить до зменшення вмісту внутрішньоклітинного циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ), що може впливати на активність P2X₃-рецепторів. За цих умов внутрішньоклітинний розчин не містив цАМФ. Більше того, висока концентрація в клітині цАМФ (0,5 ммоль/л) не запобігала пригніченню активності P2X₃-струмів лейенкефаліном (див. рис. 2,5). Тому малоймовірно, що пригнічення P2X₃-струмів пов'язане зі зниженням

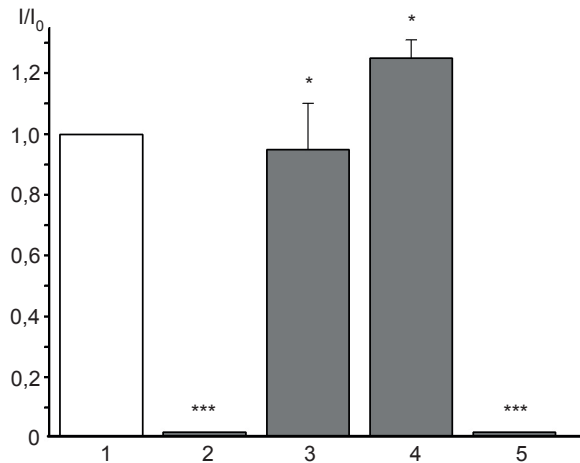


Рис 2. Вплив лейенкефаліну (1 мкмоль/л) на P2X₃-струми в нейронах задньокорінцевих гангліїв: 1 – контроль; 2 – лейенкефалін; 3 - лейенкефалін і налоксон (50 нмоль/л); 4 – лейенкефалін після інкубації нейронів у токсиці коклюшу (250 нг/мл); 5 – лейенкефалін за умов внутрішньоклітинного підвищення вмісту цАМФ (0,5 ммоль/л), * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ порівняно з контролем

вмісту цАМФ, внаслідок опіоїдіндукованого інгібування активності аденілатциклази (АЦ) [12]. Отже, класичного внутрішньоклітинного шляху опіоїдної сигналізації, котрий пов'язаний з пригніченням АЦ гетеротримерними $G_{i/o}$ -білками наразі не спостерігається.

Відомо, що ліпідний компонент плазматичної мембрани -фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат (ФІФ₂) чинить регуляторний вплив на мембранні протеїни та іонні канали, в тому числі і на P2X₃-рецептори. Виснаження пулу ФІФ₂ призводить до інгібування активності останніх, а додавання його до цитозолу має зворотний ефект [13]. Тому опіоїдіндукована активація ФЛС [14] і в свою чергу гідроліз ФІФ₂ може лежати в основі інгібування P2X₃-струмів. Для перевірки цієї гіпотези, нами було застосовано селективний інгібітор ФЛС – U-73122, який усував інгібувальну дію лейенкефаліну на $87 \pm 11\%$ ($n = 4$; $P < 0,05$; рис. 3,а; в,2). Цей феномен міг би виявити прихований стимулювальний компонент подвійного впливу опіоїду на P2X₃-струми. Проте U-73122 відновлював амплітуди P2X₃-

струмів, інгібовані лейенкефаліном, лише до контрольного рівня. Це спостереження дало змогу припустити, що викликані опіоїдом інгібування та стимулювання P2X₃-струмів опосередковані ФЛС. Результат експерименту (див. рис. 3,б, в,3) доводить, що стимулювальний вплив ендogenous опіоїду на P2X₃-струми у оброблених токсином коклюшу нейронах повністю інгібується U-73122.

Цей парадоксальний висновок добре узгоджується з даними [15], стосовно регуляції P2X₃-рецепторів іншими метаболічними шляхами. Наприклад, активація P2Y₂-рецепторів чинить інгібувальний вплив на P2X₃-рецептори через чутливі до токсину коклюшу $G_{i/o}$ -білки та ФЛС [15]. З іншого боку, активація не чутливих до токсину коклюшу G_q -білків, сполучених з рецепторами брадикиніну та субстанції P, лежить в основі стимулювання P2X₃-струмів через каскад ФЛС/ФІФ₂/ДАГ/ПКС [16,17]. Таким чином, різні типи метаболічних, G-білоксполучених рецепторів може викликати як інгібування, так і стимулювання P2X₃-струмів. Взаємодія опіоїдних

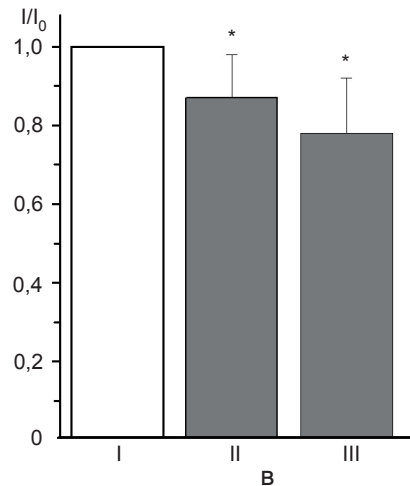
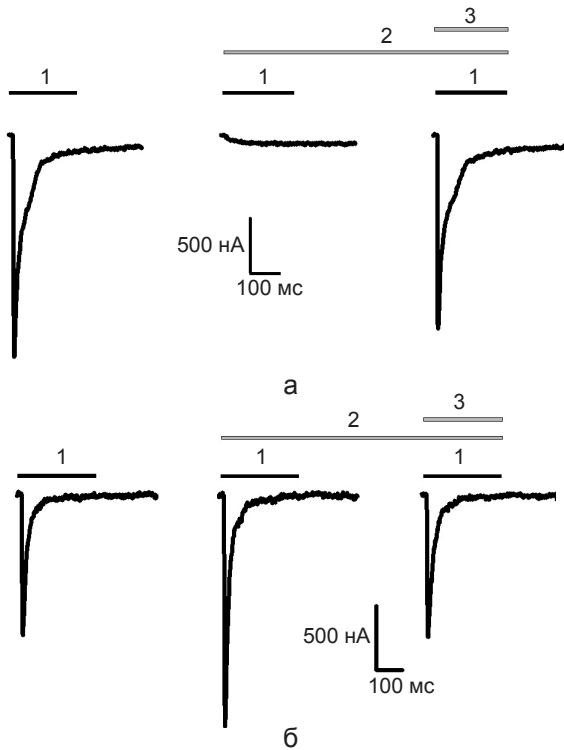


Рис 3. Усунення інгібувального (а) та стимулювального (б) впливів лейенкефаліну на P2X₃-струми блокаторм фосфоліпази С (U – 73122): 1 – α, β -Me-АТФ (30 мкмоль/л); 2 – лейенкефалін (1 мкмоль/л); 3 – U – 73122 (1 мкмоль/л), прикладений на тлі дії лейенкефаліну; в – узагальнювальні результати впливу блокатора фосфоліпази С на модуляцію P2X₃-струмів опіоїдом: 1 – контроль; 2 – лейенкефалін і U – 73122; 3 - лейенкефалін і U – 73122 після інкубації з токсином коклюшу; *P<0,05 порівняно з контролем

рецепторів з G_q-білками та активація ФЛС-опосередкованого шляху, продемонстрована в клітинах нейробластоми, що були оброблені токсином коклюшу [18].

Активация ФЛС призводить до гідролізу мембранного фосфоліпиду ФІФ₂ на дві сигнальні молекули: ІФ₃, котрий мобілізує Ca²⁺ з внутрішньоклітинних депо і діацилгліцерол, який активує протеїнкіназу С (ПКС) [19]. З іншого боку відомо, що остання, ймовірно, впливає на активність P2X₃-рецепторів [20]. Отже, ФЛС може бути залучена до модуляторного впливу лейенкефаліну на P2X₃-струми через ПКС у оброблених і необроблених токсином коклюшу нейронах ЗКГ. Ми виявили, що інгібітор ПКС – стауроспорин повністю усуває опіоїдіндукований стимулювальний вплив на P2X₃-струми у нейронах ЗКГ, інкубованих з токсином коклюшу (рис. 4).

Показано, що ПКС може активуватися діацилгліцеролом або збільшенням Ca²⁺ у цитоплазмі [19]. Оскільки концентрація останнього була стабільною в експериментальних умовах (внутрішньоклітинний ЕГТА – 10 ммоль/л), імовірно, що ФЛС/ФІФ₂/ДАГ/ПКС-шлях залучений до стимулювального

впливу опіоїдів на P2X₃-струми. Тобто викликана опіоїдом активація ФЛС призводить як до інгібування, так і до стимулювання P2X₃-рецепторів. Такий подвійний вплив, викликаний гідролізом ФІФ₂, обговорювався раніше. Авторами було висунуто гіпотезу, що молекули ФЛС можуть просторово відокремлюватися мікродоменами [21], і розміщуватися поруч з ФІФ₂-пулами, котрі асоційовані з P2X₃-рецепторами або не асоційовані. Останні були ідентифіковані в плазматичній мембрані електронною мікроскопією [22]. Виснаження ФІФ₂-пулу, асоційованого з P2X₃-рецепторами, призводить до інгібування P2X₃-струмів [13], а гідроліз іншого ФІФ₂, відокремленого від P2X₃-рецепторів, викликає їх стимулювання через ДАГ/ПКС-шлях (рис. 5).

Ми припускаємо, що в нормі ДАГ з'являється в обох мікродоменах, однак інгібування P2X₃-струмів, спричинене виснаженням пулу ФІФ₂, настає швидше і пересильніше інтенсивність синтезу ДАГ, а отже і ПКС – залежне стимулювання.

Залучення ПКС до механізму стимулювального впливу опіоїдних рецепторів на ноцицептори було показано *in vitro* та

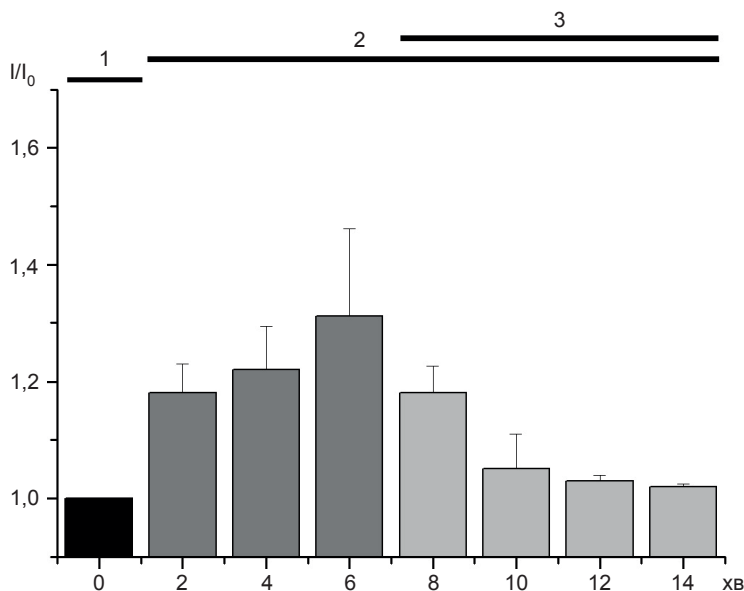


Рис.4 Усунення блокатром протеїнкінази С стимулювального впливу лейенкефаліну на P2X₃-струми: 1 – контроль; 2 – лейенкефалін (1мкмоль/л) після інкубації з токсином коклюшу, 3 – стауроспорин (1мкмоль/л) прикладений на тлі дії лейенкефаліну

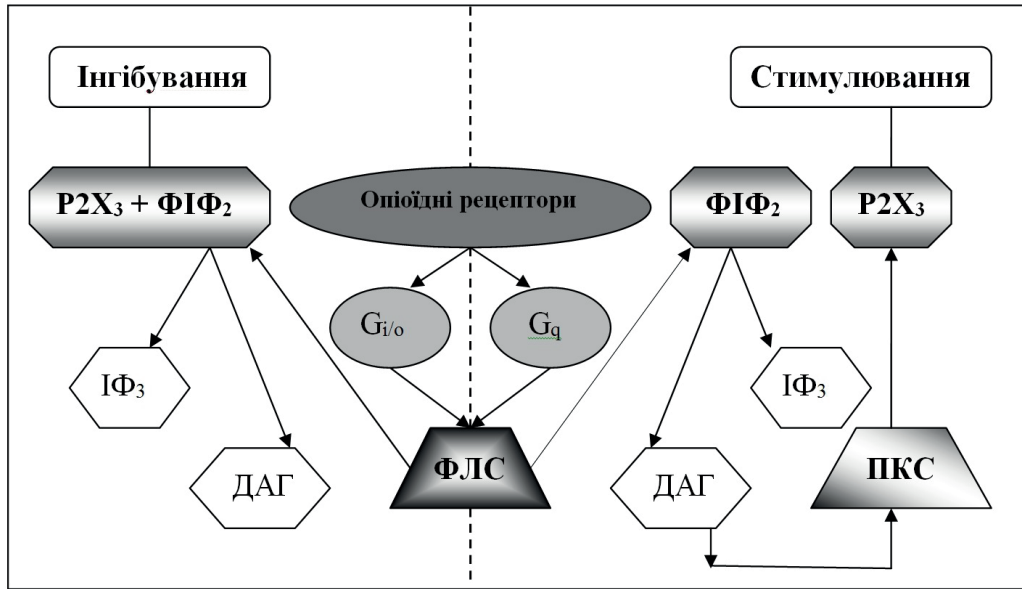


Рис.5. Загальна схема внутрішньоклітинного механізму подвійного впливу опіоїдів на P2X₃-рецептори в нейронах задньокорінцевих гангліїв (пояснення в тексті)

концептуально узгоджено з *in vivo*, згідно з якими, опіоїдіндукований ФЛС/ПКС-сигнал викликає гіпералгезію у дослідних тварин. Наприклад, супраспинальний анагетичний ефект морфіну підсилювався в нокаутних за ПКС гена мишей [23]. В інших дослідженнях застосування опіоїдів у низьких концентраціях призводить до гіпералгезії в поведінковому тесті з нагрітою пластиною [24]. Автори стверджують, що до цього ефекту залучений ФЛС/ПКС-сигнальний шлях.

Таким чином, активація опіоїдних рецепторів лейенкефаліном, викликає два протилежно спрямовані ефекти на P2X₃-рецептори. Вони реалізуються різними G-білками (G_{i/o}- або G_s-, чи G_q-), проте обидва опосередковані ФЛС. Існування цих різноспрямованих шляхів можна розглядати як молекулярну основу добре відомого переходу інгібувальної дії опіоїдів (аналгезії) до стимулювальної (гіпералгезії). З'ясування біохімічних шляхів, що змінюють чутливість до опіоїдів є важливим завданням для майбутніх досліджень у галузі фізіології та фармакології болю.

В.Б. Кулик, І.В. Чижмаков, Т.М. Волкова, А. П. Максимюк, О.А. Крышталь

РОЛЬ ФОСФОИНОЗИТОЛЬНОГО СИГНАЛЬНОГО ПУТИ В ОПИОИДНОМ КОНТРОЛЕ P2X₃-РЕЦЕПТОРОВ ПЕРВИЧНЫХ СЕНСОРНЫХ НЕЙРОНОВ

Методом patch-clamp в модификации целая клетка продемонстрировано влияние опиоидов на P2X₃-рецепторы в нейронах заднекорешковых ганглиев (ЗКГ). Нами доказано, что активация опиоидных G-белкоопосредованных рецепторов эндогенным опиоидом – лейенкефалином, приводит к двойному влиянию на P2X₃-опосредованные токи (P2X₃-токи). Последние вызывались приложением α,β-Ме-АТФ. Аппликация лейенкефалина (1 мкмоль) приводит к полному ингибированию P2X₃-токов. Однако, инкубация нейронов в токсине коклюша – блокатора ингибирующих G_{i/o}-белков, вызвала стимулирующее влияние лейенкефалина (1 мкмоль). Известно, что активация опиоидных рецепторов стимулирует фосфолипазу C (ФЛС). Блокатор последней U - 73122 (1 мкмоль) полностью устранял как стимулирующий, так и ингибирующий эффекты лейенкефалина на P2X₃-токи. Таким образом, агонисты опиоидных рецепторов вызывают два противоположно направленные эффекты на P2X₃-рецепторы. Оба эффекта опосредованные активацией ФЛС. Результаты этих исследований откроют возможный молекулярный механизм хорошо известного перехода ингибирующего действия опиоидов (аналгезии) к стимулирующему (гипералгезии).

Ключевые слова: P2X₃-рецепторы; опиоидные рецепторы; лейэнкефалин; фосфолипаза C; токсин коклюша; G-белки.

**V.B.Kulyk, I.V.Chizhnikov, T.M. Volkova,
O.P. Maximyuk, O.A.Krishtal**

ROLE PHOSPHOINOSITID SIGNALING PATHWAY IN OPIOIDS CONTROL OF P2X3 RECEPTORS IN THE PRIMARY SENSORY NEURONS

Homomeric P2X₃ receptors expressed in primary nociceptive neurons are crucial elements in the pain signal generation. In turn, opioid system regulates the intensity of this signal in both CNS and PNS. Here we describe the effects of opioids on P2X₃ receptors in DRG neurons studied by using patch clamp technique. Activation of G-protein coupled opioid receptors by endogenous opioid Leu-enkephalin (Leu), resulted in the two opposite effects on P2X₃ receptor-mediated currents (P2X₃ currents). In particular, application of 1 μM Leu lead to the complete inhibition of P2X₃ currents. However, after pretreatment of the neurons with a Gi/o-protein inhibitor pertussis toxin (PT), the same concentration of Leu caused facilitation of P2X₃ currents. PLC inhibitor U-73122 at concentration of 1 μM completely eliminated both facilitating and inhibitory effects of Leu on P2X₃ currents. Thus, opioid receptor agonists cause two oppositely directed effects on P2X₃ receptors in DRG neurons of rats and both of them are mediated through PLC signaling pathway. Our results point to a possible molecular basis of the mechanism for the well-known transition inhibitory action of opioids (analgesia) to facilitating (hyperalgesia).

Key words: P2X₃-receptors; opioid receptors; Leu-enkephalin; phospholipase C; pertussis toxin; G-proteins.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Ueno S, Tsuda M, Iwanaga T, Inoue K. Cell type-specific ATP-activated responses in rat dorsal root ganglion neurons. *Br J Pharmacol.* 1999;126(2): 429-36.
2. Xiang Z, Bo X, Burnstock G. Localization of ATP-gated P2X receptor immunoreactivity in rat sensory and sympathetic ganglia. *Neurosci Lett.* 1998; 256(2):105-8.
3. Steranka LR, Manning DC, DeHaas CJ, Ferkany JW, Borosky SA, Connor JR, Vavrek RJ, Stewart JM, Snyder SH. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;85(9):3245-9.
4. Prado FC, Araldi D, Vieira AS, Oliveira-Fusaro MC, Tambeli CH, Parada CA. Neuronal P2X₃ receptor activation is essential to the hyperalgesia induced by prostaglandins and sympathomimetic amines released during inflammation. *Neuropharmacology.* 2013; 67 (8): 252-8.

5. Thayer SA, Perney TM, Miller RJ. Regulation of calcium homeostasis in sensory neurons by bradykinin. *J Neurosci.* 1988; 8(11):4089-97.
6. Reichert JA, Daughters RS, Rivard R, Simone DA. Peripheral and preemptive opioid antinociception in a mouse visceral pain model. *Pain.* 2001;89(2-3): 221-27.
7. Shannon HE, Lutz EA. Comparison of the peripheral and central effects of the opioid agonists looperamide and morphine in the formalin test in rats. *Neuropharmacology.* 2002; 42(2):253-61.
8. Stein C, Lang LJ. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Curr Opin Pharmacol.* 2009; 9(1): 3-8.
9. Chizhnikov I, Yudin Y, Mamenko N, Prudnikov I, Tamarova Z, Krishtal O. Opioids inhibit purinergic nociceptors in the sensory neurons and fibres of rat via a G protein-dependent mechanism. *Neuropharmacology.* 2005; 48(5): 639-47.
10. Sverdlov Y. Modern pain problem. *Medical scientific and educational - methodical journal.* 2001; 1(3) : 31-40.
11. Crain SM, Shen KF. Antagonists of excitatory opioid receptor functions enhance morphine's analgesic potency and attenuate opioid tolerance/dependence liability. *Pain.* 2000; 84(2-3):121-31.
12. Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M. Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977; 74(8): 3365-9.
13. Mo G, Bernier LP, Zhao Q, Chabot-Dore AJ, Ase AR, Logothetis D, Cao CQ, Seguela P. Subtype-specific regulation of P2X₃ and P2X_{2/3} receptors by phosphoinositides in peripheral nociceptors. *Mol Pain.* 2009; 5 (2): 47-56.
14. Xie W, Samoriski GM, McLaughlin JP, Romoser VA, Smrcka A, Hinkle PM, Bidlack JM, Gross RA, Jiang H, Wu D. Genetic alteration of phospholipase C beta3 expression modulates behavioral and cellular responses to mu opioids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(18):10385-90.
15. Mo G, Peleshok JC, Cao CQ, Ribeiro-da-Silva A, Seguela P. Control of P2X₃ channel function by metabotropic P2Y₂ utp receptors in primary sensory neurons. *Mol Pharmacol.* 2013; 83(3):640-47.
16. Park CK, Bae JH, Kim HY, Jo HJ, Kim YH, Jung SJ, Kim JS. Substance P sensitizes P2X₃ in nociceptive trigeminal neurons. *J Dent Res.* 2010; 89 (5):1154-59.
17. Paukert M, Osteroth R, Geisler HS, Brandle U, Glowatzki E, Ruppertsberg JP, Grunder S. Inflammatory mediators potentiate ATP-gated channels through the P2X₃ subunit. *J Biol Chem.* 2001;276 (6): 21077-82.
18. Rubovitch V, Gafni M, Sarne Y. The mu opioid agonist DAMGO stimulates cAMP production in SK-N-SH cells through a PLC-PKC-Ca⁺⁺ pathway. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003; 110(2): 261-6.
19. Rebecchi MJ, Pentylala SN. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev.* 2000; 80(4):1291-1335.
20. Brown DA, Yule DI. Protein kinase C regulation of P2X₃ receptors is unlikely to involve direct re-

- ceptor phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*. 2007;173(9):166-75.
21. Delmas P, Crest M, Brown DA. Functional organization of PLC signaling microdomains in neurons. *Trends Neurosci*. 2004; 27(3):41-47.
22. Fujita A, Chend J, Tauchi-Sato K. A distinct pool of phosphatidylinositol 4,5 – bisphosphate in caveolae revealed by a nanoscale labeling technique. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(2): 9256-61.
23. Newton PM, Kim JA, McGeehan AJ, Paredes JP, Messing RO. Increased response to morphine in mice lacking protein kinase C epsilon. *Genes Brain Behav*. 2007;6(4):329-38.
24. Galeotti N, Stefano GB, Guarna M, Bianchi E, Ghelardini C. Signaling pathway of morphine induced acute thermal hyperalgesia in mice. *Pain*. 2006;123(3):294 -305.

*Матеріал надійшов
до редакції 09.09.2014*