

모르핀 정맥 투여시 척수 진통 작용 기전에 기여하는 Nitric Oxide

가톨릭대학교 의과대학 마취과학교실

송 호 경 · 박 수 석 · 김 정 태

= Abstract =

IV Morphine Produced Spinal Antinociception Partly by Nitric Oxide

Ho-Kyung Song, M.D., Soo Seog Park, M.D. and Jung Tae Kim, M.D.

Department of Anesthesiology, Catholic University Medical College, Seoul, Korea

Background: The role of nitric oxide(NO) in analgesia from opioids is controversial. On the one hand, IV morphine analgesia is enhanced by IV injection of NO synthase inhibitors. On the other hand, IV morphine results in increased release of NO in the spinal cord. There have been no behavioral studies examining the interaction between IV morphine and intrathecal injection of drugs which affect NO synthesis.

Method: Rats were prepared with chronic lumbar intrathecal catheters and were tested withdrawal latency on the hot plate after 3~5 days of surgery. Antinociception was determined in response to a heat stimulus to the hind paw before and after IV injection of morphine, 2.5 mg/kg. Twenty minutes after morphine injection, rats received intrathecal injection of saline or the NO synthase inhibitors, L-NMMA or TRIM, the NO scavenger, PTIO, or the NO synthase substrate, L-Arginine. Intrathecal injections, separated by 15 min, were made in each rats and measurements were obtained every 5 min.

Result: Morphine produced a 60~70% maximal antinociceptive response to a heat stimulus in all animals for 60 min in control experiments. Intrathecal injection of idazoxane decreased antinociception of IV morphine. The NO synthase inhibitors and the NO scavenger produced dose-dependent decreases in antinociceptive effect of morphine, whereas saline as a control group and L-Arginine as the NO substrate had no effect on antinociception of morphine.

Conclusion: The present study supports the evidences that systemic morphine increase the nitrite in cerebrospinal fluid and dorsal horn. These data suggest that the synthesis of NO in the spinal cord may be important to the analgesic effect of IV morphine and increased NO in spinal cord has different action from the supraspinal NO.

Key Words: Analgesics: intravenous; morphine. Pharmacology: intrathecal; nitric oxide synthase inhibitor

서 론

임상적으로 아편양 제제의 정맥 투여는 통증 치

*본 논문은 가톨릭중앙의료원 학술 연구조성비로 이루어 졌음.

료를 위하여 빈번히 이용되는 방법으로 경막 혹은 척수 내로 투여되는 경로에 비해 소양증, 요저류, 저혈압 등의 부작용이 적은 장점이 있다.¹⁾ 정맥 투여된 아편양 제제의 작용 기전은 뇌간에서 척수로의 아드레날린성, 세로토닌성 내림 투사를 활성화시키는 것으로^{2,3)} 특히 아드레날린성 내림 투사는 척

수 등쪽별의 α_2 수용체를 활성화시키고, 콜린성 중간 신경원에 의해 연결되어^{4,5} 척수내 아세틸콜린 농도를 증가시켜서 진통 작용에 기여한다. 그런데 이 콜린성 중간 신경원의 흥분은 NO합성효(nitric oxide synthase, 이하 NOS)도 활성화시켜^{6,7} 중추 신경계의 신경 전달 매체, 혹은 조절 요소으로써 중요한 역할을 하는 nitric oxide(NO)를 증가시킨다는 것이 밝혀졌다.⁸ 이 NO는 척수를 비롯, 중추 신경계에 존재하는 NOS 에 의해 L-Arginine 으로부터 합성되어 침해 자극이 척수에서 중추로 전달되는 과정을 조절하는 중요한 역할을 한다.^{9,10}

그러나 아직 아편양 제제에 의해 척수에서 생성되는 NO가 통증 전달에 어떤 역할을 하는지에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다. 정맥 투여된 모르핀에 의해 얻는 진통 효과는 NO를 감소시키는 NOS 저해제에 의해 증강된다고도 하지만,¹¹ 투여되는 경로에 따라 여러 보고가 있다.

그러므로 본 연구에서는 모르핀 정맥 투여후 지주막하강내로 NO 합성과 그의 약물 역동학에 영향을 미치는 약들을 투여하여 유해 자극에 대항하는 행동을 관찰함으로써 모르핀의 척수 진통 기전과 척수 내에서 합성된 NO의 관계에 대해 알아보았다.

대상 및 방법

1) 동물 및 카테터 삽입

수컷 Sprague-Dawley쥐(325~350 gm)를 12시간씩 낮과 밤의 주기로 사육하여 지주막하 약물 주입을 위한 카테터를 삽입하기 위해 2% Halothane과 100% 산소로 마취후 정위 장치에서 머리를 고정시켰다. 후두부위의 정중선으로 접근하여 피부절개를 하고 후두골과 제 1경추 사이의 경막을 노출시킨 후 경막과 지주막을 절개한 뒤, 8.5 cm의 polyethylene 카테터(PE-10 tubing)를 삽입하여 카테터의 끝을 요추 부위의 지주막하강에 위치시켰다. 카테터의 다른 한 쪽 끝은 목뒤로 꺼내어 입구를 막아놓았다. 또 모르핀의 정맥 주사를 위한 카테터(PE-50 tubing)를 외경 정맥에 삽입, 피하로 터널을 만들어 역시 목 뒤로 꺼내어 피부에 고정후 입구를 봉하였다. 이후 회복을 위하여 3~5일 동안 기다리며 자유로이 물과 사료를 먹게 하고 이 기간동안 감각 신경이나 운동

신경의 이상을 보이거나 염증 반응을 보이는 쥐는 실험 대상에서 제외시켰다.

2) 유해 자극에 대한 행동 관찰

우선 약물을 채운 주사기를 이미 삽입되어 있던 정맥 혹은 지주막하강내 카테터에 연결한 후, 쥐를 열이 진도되는 유리(두께 0.7 cm) 위에 올려놓고, 한 마리씩 투명한 플라스틱 상자로 격리시켰다. 30분 정도 쥐들이 환경에 적응하고 안정되기를 기다려 복사 열원을 이용, 5분 간격으로 유리를 밟고 있는 쥐의 뒷 발바닥 족저궁에 맞추어 오른쪽, 왼쪽의 순서로 열 유해자극을 가했다(hind paw thermo-withdrawal test). 전구의 열 발생 정도는 처음의 기본 반응시간이 10~15초가 되도록 하였고, 화상으로 인한 조직 손상을 막기 위해 자극의 차단 시간(cut-off time)은 30초로 하였다.

3) 약물 투여

모르핀 2.5 mg/kg을 0.3 ml의 용적으로 만들어 정맥 주사후 다시 0.3 ml의 생리식염수로 밀어 넣었다. 이후 20분 동안 열 유해자극에 대해 모르핀의 최대 진통 효과를 얻으면 다음의 각 약제들을 누적되는 용량(cumulative dose)으로 지주막하강에 주사하였다. 즉 첫 번째 용량의 2배, 3배가 되도록 하여 15분마다 주사되되 용적을 5 μ l로 통일하고 역시 10 μ l의 생리식염수로 밀어 넣었다. 투여한 약제로는 α_2 수용체 길항제인 idazoxane, NOS 저해제인 TRIM (1-(2-trifluoromethylphenyl)imidazole), NO저제제인 Carboxy-PTIO(2-(4-carboxyphenyl)4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide)로서 2.5, 5, 15, 45 μ g씩을 주사하였다. 또 다른 NOS 저해제인 L-NMMA(*N*^G-Monomethyl-L-arginine) 2, 4, 12, 36 μ g과 NO 합성 원료인 L-Arginine 20, 60, 100, 500 μ g도 각각 주사하였으며 모든 약제는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)에서 구하였다. 15분마다 약물이 주사되는 동안에도 역시 시간 경과에 따라 5분 간격으로 반응 시간을 관찰하고 각 누적된 용량에서의 반응 시간을 평균 내어 측정치로 하였다.

모든 측정치는 평균 \pm 표준오차로 표시하였고 구간 비교로는 시간 변화에 따른 반응 시간의 변화를 반복 측정 분산 분석(ANOVA)을 사용하였으며, ANOVA test의 의미 있는 variance의 위치는 Dunnett's post

hoc test를 이용하였다. P 값이 0.05이하인 경우 통계적으로 의의가 있는 것으로 하였고 분석은 Sigma-Stat(version 2.0, Jandel Scientific Software, San Rafael, CA.)을 이용하였다.

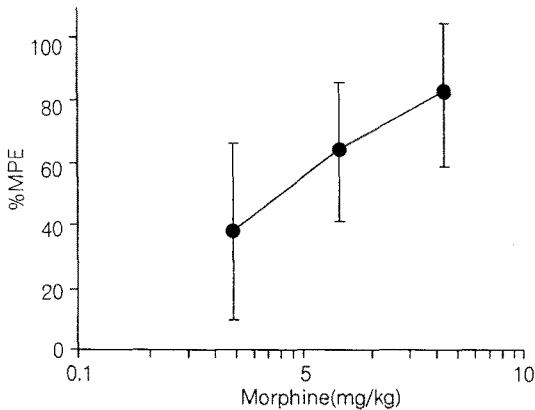


Fig. 1. Percent maximal possible antinociceptive effect after intravenous injection of morphine alone. Morphine produced a 60~70% maximal antinociceptive effect in all animals.

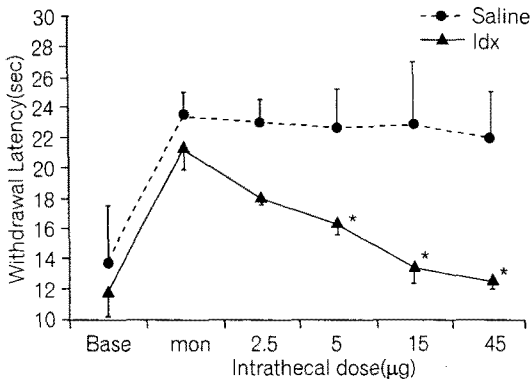


Fig. 2. Effect of intrathecal injection of saline and IDX (dose 2.5, 5, 15 and 45 µg) at the lumbar level on antinociceptive response to systemic morphine (2.5 mg/kg, iv). Note that intrathecal saline itself had no effect on antinociceptive response to systemic morphine which is obtained from hot plate test, whereas IDX produced dose-dependent decrease in morphine antinociception ($p < 0.05$). Each value represents the mean \pm S.E. of both hindpaws of 7 rats. IDX: idazoxane, Base: baseline response latencies. *: $p < 0.05$ vs maximal effect of morphine.

결 과

1) 모르핀의 진통 효과

본 실험의 약물 반응 검사에 사용된 모든 동물에서 실험 환경에 적응하기를 기다리는 30분 동안 열 유해자극에 대한 기본 반응 시간 10~15초를 얻을 수 있었다. 또 준비 과정에서 얻어진 결과로 정맥 투여된 모르핀 2.5 mg/kg의 용량은 20분후 최대 진통 효과를 보였으며 로그 용량 반응 곡선에서 유해 자극에 대해 60~70%(%MPE)로 증가된 진통 작용을 보였다(Fig. 1).

2) α_2 수용체 길항제의 영향

전신적인 모르핀 투여에 의한 척수로의 내림 투사 활성화가 α_2 수용체와 관련되어 있음을 확인하기 위해 α_2 수용체 길항제인 idazoxane을 지주막하강에 투여한 결과, 5, 15, 45 µg에서 의미 있게($p < 0.05$) 모르핀의 진통 효과를 감소시키는 행동 반응을 볼 수 있었다(Fig. 2).

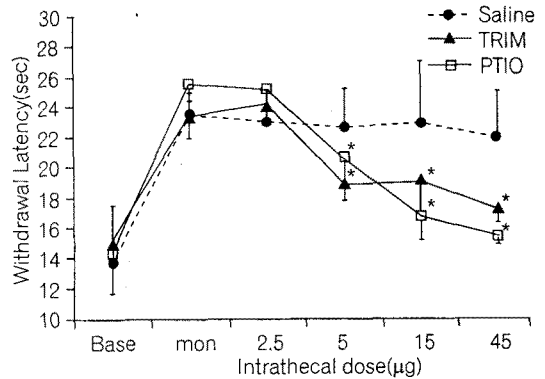


Fig. 3. Cumulative intrathecal injection (dose 2.5, 5, 15 and 45 µg) of the NO synthase inhibitor, TRIM and the NO scavenger, PTIO separated by 15 minutes interval at the level of lumbar enlargement produced dose-dependent decreases in antinociceptive response of systemic morphine (2.5 mg/kg, iv) ($p < 0.05$). Values are expressed as mean \pm S.E. evaluated by hot plate test from 7 rats. TRIM: 1-(2-trifluoromethylphenyl)imidazole, PTIO: 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide. *: $p < 0.05$ vs maximal effect of morphine.

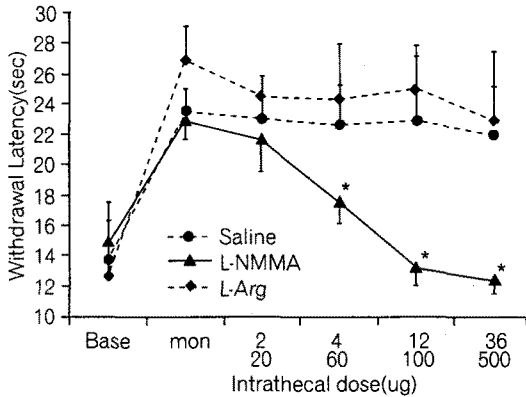


Fig. 4. Cumulative intrathecal injection (dose 2, 4, 12, 36 μ g) of the NO synthase inhibitor, L-NMMA resulted in dose-dependent antagonism of antinociception of systemic morphine (2.5 mg/kg, iv) ($p < 0.05$), whereas saline and L-Arginine (dose 20, 60, 100, 500) had no effect. Values are expressed as mean \pm S.E. evaluated by hot-plate test from both hindpaws of 7 rats. L-NMMA: *N*^G-Monomethyl-L-arginine *: $p < 0.05$ vs maximal effect of morphine.

3) NOS 저해제와 NO 제거제의 영향

모르핀을 2.5 mg/kg 정맥 투여후 최대 진통 효과가 나타난 다음 지주막하강내로 생리식염수 주사한 대조군(n=7)에서는 모르핀 진통 효과의 변화가 관찰되지 않았으나(Fig. 2), NOS 저해제인 TRIM 혹은 NO 제거제인 PTIO처럼 척수의 NO 농도를 감소시키는 약제를 투여한 군들(n=7)에서는 5, 15, 45 μ g ($p < 0.05$)로 모두 누적되는 용량에 비례하여 의미있게 열 유해자극에 대한 반응 시간이 짧아지는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 또다른 NOS 저해제인 L-NMMA군(n=7)에서도 역시 생리식염수 대조군에 비해 4, 12, 36 μ g ($p < 0.05$)로 의미 있는 감소를 보였다(Fig. 4)

4) L-Arginine의 영향

L-Arginine군(n=7)에서는 20, 60, 100, 500 μ g의 모든 용량에서 대조군과 마찬가지로 의미있는 반응 시간의 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 4)

고 찰

전신적으로 투여된 아편양 제제의 주된 진통 기

전은 척수내의 opioid sensitive system과는 별도로 존재하는 뇌간으로부터 척수로의 노르아드레날린성, 세로토닌성 내림투사의 활성화라는 것은 이미 많이 보고되어 왔다.^{2,3,12)} 그 예로 사람과 동물에서 전신적으로 투여된 아편양 제제에 의해 요추 부위의 뇌척수 액이나 척수 후각의 부위 미세 투석액에서 노르에피네프린이 증가하는데 naloxone이나 경추 부위의 횡절제로 뇌간과 척수를 분리하였을 때는 노르에피네프린의 증가가 없다는 것으로 증명할 수 있다.¹³⁾ 이 노르에피네프린은 척수 후각의 α_2 수용체를 활성화시켜 일차 구심성 신경원의 유해 자극에 대한 반응에 관여, 중추로의 통증 전달을 조절한다.⁸⁾ 본 실험에서도 α_2 수용체 길항제인 idazoxane을 지주막하강에 주사한 후 모르핀에 의한 진통 작용이 감소되는 것을 볼 수 있어 모르핀의 척수 진통 기전에는 α_2 수용체가 연관되어 있음을 확인할 수 있었다.

최근 콜린성 중간신경원도 역시 전신적으로 투여된 아편양 제제의 진통 작용에 기여한다는 것이 알려졌는데 콜린성 중간 신경원은 척수의 후근이나 중심관 주위에 세포체가 존재하여¹⁴⁾ 지주막하강내로 투여된 clonidine에 의한 저혈압을 막을 뿐 아니라¹⁵⁾ 지주막하강내로 투여된 콜린성 효능제에 의해 진통 작용을 보이고,¹⁶⁾ 정맥 주사된 모르핀의 작용도 증강시킨다.¹⁷⁾ 이러한 기전으로 전신적으로 투여된 모르핀은 노르에피네프린에 의해 유도된 α_2 수용체와 함께 콜린성 중간신경원의 역할로 척수 후근의 substantia gelatinosa에 위치하는 일차 구심성 섬유 종말에서의 흥분 전달 물질 유리를 감소시켜 결과적으로 오름 투사되는 척수 시상로의 이차 신경원 세포의 흥분을 막을 수 있게 된다.

척수에서 콜린성 중간 신경원의 muscarinic 수용체의 역할은 방해성 중간 신경원(inhibitory interneuron)을 흥분(탈분극)시키고 침해성 일차 신경원의 흥분은 저해(과분극)하는 이중성의 조절 작용을 함으로서 통증 전달의 조절에 한 역할을 한다.^{7,18)} 그런데 이때 muscarinic 수용체의 자극은 nitric oxide합성체(NOS)를 활성화시켜 nitric oxide(NO)합성과⁷⁾ 세포내 c-guanethidine monophosphate(cGMP)를 증가시키며¹⁰⁾ 이 NO는 중추 신경 세포에서 생물학적 전달 매체로서 신경 전달 물질이나 조절 물질로 중요한 역할을 한다. 중추 신경계에서는 hippocampus나 소뇌에 NOS가 많이 존재하여 유해 자극 전달에 관여하고, 말초

에서는 염증이나 통각 과민 반응의 정도를 조절하는 역할을 한다.¹⁹⁾

척수에서 NO의 작용은 유해 자극의 전달에 두 가지의 상반된 작용을 하는데¹⁰⁾ 첫째는 진통 작용(antinociception)으로 NO는 전기적, 화학적으로 발생된 침해 자극에 대한 척추 후근의 A β 나 C섬유의 흥분을 방해하여 유해자극의 전달을 막는 작용이 있다.⁹⁾ 실험적으로 지주막하강에 L-Arginine을 투여하면 침해 자극에 대한 역치를 증가시키고 이 진통 효과는 atropine에 의해 차단되는 것으로 보아 내인성 콜린성 기전에 NO/c-GMP system이 관여되어 있음을 알 수 있다. 그러나 한편 NO가 1 pmol-1 nmol 정도의 아주 낮은 농도로 존재하는 통증을 더 잘 느끼게(pronociception) 만든다고도 한다.²⁰⁾ 역시 실험적으로 L-Arginine은 침해 자극에 대한 역치를 일시적으로 감소시켜 통각 과민을 만들고²¹⁾ 신경병증 통증모델에서도 지주막하강로 투여된 NOS 저해제나 Methylene Blue등으로 통각 과민이 차단되는 것으로 보아 NO는 신경 손상후 생기는 통각 과민의 기전으로 설명되어 왔다.²⁰⁾

이렇게 상반된 신경 약리학적인 기전은 아직 밝혀져 있지 않다. 이를 Brignola²²⁾는 모르핀과 NOS 저해제인 L-NAME을 동시에 투여할 경우 이 두 가지 약제의 비율에 의해 morphine의 진통 작용이 증가 혹은 감소되는 것을 보고 이는 실험 동물의 종류와 침해 자극의 차이 때문이라고 설명하였다. 또 하나 이러한 NO의 역설적인 작용에는 산화 혹은 환원된 두 가지형의 NO가 동시에 존재하여 이들이 각각의 약리학적 작용을 가지고 있다는 의견도 있으므로²³⁾ 추후 더 많은 연구가 필요할 것이다. 이와 같이 척수 내에서 아주 적은 량의 NO는 통각 과민을 만들지만 신경병증이나 통증 모델 같은 만성 통증의 경우를 제외한 실험에서 L-Arginine(2.5~10 nmol), NMDA, muscarinic 효능제들을 지주막하강 주사로 NO의 농도를 높이면 진통 작용을 보인다.

본 연구에서는 전신적으로 투여된 모르핀에 의한 α_2 수용체- muscarinic 수용체- NO system의 단계적인 활성화로 척수 내 NO가 증가됨으로서 열 유해 자극에 대해 진통 작용을 보인다고 생각하여 실험을 한 결과, L-Arginine의 지주막하강 주사로는 별 변화가 없었으나 NOS 저해제를 주사한 경우는 그 진통 작용이 감소됨을 볼 수 있었다. 즉 NOS 저해

제나 NO 제거제인 L-NMMA, TRIM, PTIO등에 의해 NO를 감소시키면 모르핀의 작용이 길항된다는 것을 알 수 있었다. 한편, 모르핀을 정맥 투여가 아닌 두개강 내로 직접 투여했을 경우 척수내 NO를 증가시키면 모르핀의 진통 효과가 감소되고 반대로 L-NAME을 주사 시에는 진통 효과가 증가된다는 보고도 있다.⁶⁾

사실 지금까지 보고된 NO연구에서는 주로 NO의 pronociception에 관한 것으로 NO가 척수 진통에 관여하기는 하지만 'antimorphine'의 성질로써 NOS 저해제에 의해 모르핀에 의한 진통 작용이 강화되거나 내성이나 의존성을 감소된다는 것들이었다.²⁴⁾ 여기서 NOS 저해제의 정맥 투여나 두개강내 투여가 지주막하강내 투여와 달리 정맥 투여된 모르핀의 작용을 강화시킨다는 것은 supraspinal NO 합성의 증가는 아편양 제제의 작용을 방해한다는 것을 시사한다고도 할 수 있다.

그러므로 이같은 약제들의 투여 방법, 경로의 차이는 중추 신경계의 어느 부분에 어느 정도 영향을 주는지 알 수 없으므로 작용 부위가 선택적이라 할 수 없다. 특히 정맥 투여된 L-Arginine이나 NOS 저해제는 역시 말초, 척수, 뇌의 모든 부분의 NO 농도에 영향을 줄 수 있다. 그러나 본 연구에서의 투여 경로는 정맥 투여로써 주사된 모르핀이 중추에서 척수로의 내림 투사에 의해 일단 척수의 NO를 증가시킨 다음 L-Arginine, NOS 저해제를 지주막하강 내로 투여함으로써 NO가 supraspinal에 미치는 영향을 배제한 비교적 선택적인 경로라 생각된다.

결론적으로 NOS 저해제나 NO 제거제등으로 지주막하강내 NO농도를 낮추면 정맥 투여된 모르핀의 진통 효과가 감소되는 것으로 보아 척수내 NO의 합성의 증가는 morphine의 척수 진통 기전에 중요한 요소라고 볼 수 있다. 그러나 아직 NO/c-GMP system이 어떤 작용을 하여 척수에서 정맥 투여된 모르핀의 작용을 조절하는지는 중요한 연구 과제이며 척수 진통에서 NO의 이중적인 역할에 대해서도 추후 연구가 필요할 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Cousins MJ, Mather LE: Intrathecal and epidural administration of opioids. *Anesthesiology* 1984; 61:

- 276-310.
- 2) Yaksh TL: Direct evidence that spinal serotonin and noradrenaline terminals mediate the spinal antinociceptive effects of morphine in the periaqueductal gray. *Brain Res* 1979; 160: 180-5.
 - 3) Siddall PJ, Polson JW, Dampney RAL: Descending antinociceptive pathway from the rostral ventrolateral medulla: A correlative anatomical and physiological study. *Brain Res* 1994; 645: 61-8.
 - 4) Zhuo M, Gebhart GF: Spinal cholinergic and monoaminergic receptors mediate descending inhibition from the nuclei reticularis gigantocellularis and gigantocellularis pars alpha in the rat. *Brain Res* 1990; 535: 67-78.
 - 5) Kawamata M, Omote K, Namiki A, Ishtani K: Contribution of descending inhibitory and spinal cholinergic system to visceral antinociception of morphine. *Anesthesiology* 1993; 79: A701.
 - 6) Xu JY, Tseng LF: Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate system in the spinal cord differentially modulates intracerebroventrically administered morphine and β -endorphine-induced antinociception in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274: 8-16.
 - 7) Xu Z, Tong C, Eisenach JC: Acetylcholine stimulates the release of nitric oxide from rat spinal cord. *Anesthesiology* 1996; 85: 107-11.
 - 8) Lothe A, Li P, Tong C, Yoon Y, Detweiler DJ, Eisenach JC: Spinal cholinergic alpha-2 adrenergic interaction in analgesia and hemodynamic control: role of muscarinic receptor subtypes and nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270: 1301-6.
 - 9) Zhou M, Meller ST, Gebhart GF: Endogenous nitric oxide required for tonic cholinergic inhibition of spinal mechanical transmission. *Pain* 1993; 54: 71-8.
 - 10) Iwamoto ET, Marion L: Pharmacologic evidence that spinal muscarinic analgesia is mediated by an L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP cascade in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271: 601-8.
 - 11) Yamaguchi H, Naito H: Antinociceptive synergic interaction between morphine and n^G -nitro L-arginine methyl ester on thermal nociceptive tests in the rats. *Can J Anaesth* 1996; 43: 975-81.
 - 12) Shiomi H, Takagi H: Morphine analgesia and the bulbospinal noradrenergic system: Increase in the concentration of normethanephrine in the spinal cord of the rat caused by analgesics. *Br J Pharmacol* 1974; 52: 519-26.
 - 13) Bouaziz H, Tong C, Eisenach JC: Systemic opioid stimulate norepinephrine release from sheep spinal cord: An in vivo microdialysis study. *Anesthesiology* 1994; 81: A988.
 - 14) Borges LF, Iverson SD: Topography of choline acetyltransferase immunoreactive neurons and fibers in the rat spinal cord. *Brain Res* 1986; 362: 140-8.
 - 15) Williams JS, Tong C, Eisenach JC: Neostigmine counteracts spinal clonidine-induced hypotension in sheep. *Anesthesiology* 1993; 78: 301-7.
 - 16) Yaksh TL, Dirksen R, Harty GJ: Antinociceptive effects of intrathecally injected cholinomimetic drugs in the rat and cat. *Eur J Pharmacol* 1985; 117: 81-8.
 - 17) Hood DD, Eisenach JC, Tuttle R: Phase I safety assessment of intrathecal neostigmine in humans. *Anesthesiology* 1995; 82: 331-43.
 - 18) Urban L, Willetts J, Murase K: Cholinergic effects on spinal dorsal horn neurons in vitro: An intracellular study. *Brain Res* 1989; 500: 12-20.
 - 19) Ferreira SH, Duarte IDG, Lorenzetti BB: The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur J Pharmacol* 1991; 201: 121-2.
 - 20) Meller ST, Pechman PS, Gebhart GF, Maves TJ: Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. *Neuroscience* 1992; 50: 7-10.
 - 21) Kolhekar R, Meller ST, Gebhart GF: Characterization of the role of spinal N-methyl-D-aspartate receptors in thermal nociception in the rat. *Neuroscience* 1993; 57: 385-95.
 - 22) Brignola G, Calignano A, Rosa MD: Modulation of morphine antinociception in the mouse by endogenous nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1994; 113: 1372-6.
 - 23) Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Chen HSV, Sucher NJ, Loscalzo J, et al: A redox based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature(Lond.)* 1993; 364: 626-32.
 - 24) Kolesnikov YA, Pick CG, Pasternak GW: N^G -nitro-L-arginine prevents morphine tolerance. *Eur J Pharmacol* 1992; 221: 399-400.