[Article in Persian] Physiology and Pharmacology Vol. 10, Winter 2007, 267-274

Effect of nitric oxide on skin blood flow of intact and morphine- dependent rats

Fatemeh Safari, Sohrab Hajizadeh*, Yaghoub Fathollahi, Hossein Azizi

Dept. Physiology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares Univ., Tehran, Iran.

Abstract

Introduction: The relation between morphine and nitric oxide release has been shown. Due to important role of nitric oxide in regulation of skin blood flow, the aim of this study was to investigate the effect of nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME) and nitric oxide synthesis precursor (L-arginine) on skin blood flow of intact and morphine-dependent rats.

Methods: Skin blood flow of hind paw was measured using Laser Doppler Flowmetry (LDF) technique. Animals became morphine dependent by a well established protocol.

Results: Subcutaneous injection of L-arginine (10 or 20 mg/kg) respectively increased skin blood flow by 39% and 64% in intact rats and by 37% and 65% in morphine-dependent rats. There was no significant difference between blood flow in intact and morphine-dependent rats. L-NAME (1 or 5 mg/kg) diminished skin blood flow of intact rats by 35% and 58.7% and skin blood flow of morphine-dependent rats by 29.1% and 60.5%, respectively. There was no significant difference between these two groups. The effect of L-arginine was abolished by pretreatment with L-NAME in morphine-dependent as well as intact groups.

Conclusion: Our results suggest that changes in the level of nitric oxide, cause the same skin blood flow alterations in both morphine-dependent and intact rats. More experiments are needed to elucidate the level of nitric oxide release in skin vascular system following dependency.

Keywords: Morphine-dependent rats, Skin Blood Flow, Nitric Oxide, L-arginine, L-NAME

* Corresponding Author Email: Hajizads@modares.ac.ir

فیزیولوژی و فارماکولوژی
جلد ۱۰، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۵

اثر نیتریک اکساید بر جریان خون پوست در موش‌های سالم و وابسته به مرفین

فاطمه صفری، سهراب حاجی زاده *، یعقوب فتح الهی، حسین عزیزی
دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی

دریافت: مرداد ۸۵ بازبینی: دی ۸۵ پذیرش: بهمن ۸۵

چکیده

مقدمه: با توجه به نقش نیتریک اکساید در تنظیم جریان خون پوست در این تحقیق اثر تغییر سطح نیتریک اکساید -با تزریق مهارکننده نیتریک اکساید سنتاز (L-NAME) و نیز پیش ساز تولید نیتریک اکساید (ال-آرژینین) بر جریان خون پوستی پایه در موش‌های دست نخورده با موش‌های وابسته به مرفین مقایسه گردید.

روشها: وابستگی به مرفین در موش‌های صحرایی نر به روش خوراکی ایجاد شد. ثبت جریان خون پوستی با تکنیک جریان سنجی لیزری از کف پای حیوانات صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تزریق زیر جلدی ال-آرژینین (mg/kg ۱۰ و ۲۰) جریان خون پوست را در موش‌های دست نخورده به ترتیب تا ۳۹٪ و۶۴٪ و در موش‌های معتاد تا ۳۷٪ و ۶۵٪ افزایش داد که درصد افزایش در موش‌های دست نخورده با معتاد تفاوت معنی داری ندارد. تزریق L-NAME (mg/kg ۱ و۵) باعث کاهش جریان خون پوست در موش‌های دست نخورده به ترتیب تا ۳۵٪ و ۵۸/۷٪ و در موش‌های معتاد تا ۲۹/۱٪ و ۶۰/۵٪ شد که درصد کاهش، اختلاف معنی داری با هم نداشت. زمانی که ابتدا L-NAME و سپس ال-آرژینین تزریق شد، L-NAME توانست در موش‌های دست نخورده و وابسته به یک اندازه اثر ال-آرژینین را مهار کند.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند که تغییر سطح نیتریک اکساید پایه سبب تغییر جریان خون پوست موش‌های دست نخورده و وابسته می‌شود و سطح این تغییرات در حیوانات وابسته با دست نخورده تفاوتی ندارد.

واژه‌های کلیدی: وابستگی به مرفین، جریان خون پوست، نیتریک اکساید، ال-آرژینین، L-NAME.

مقدمه

ارتباط بین عمل مرفین و رهایش نیتریک اکساید در بدن به خوبی نشان داده شده است [۲۲و۲۳]. نیتریک اکساید در بروز اثر ضددردی [۱۱] پدیده‌های تحمل و وابستگی [۱۲و۲۶] مهار تکثیر لوکوسیت‌ها [۱۳و۲۵] و شل شدگی آئورت ناشی از مرفین نقش مهمی دارد [۲۰و۲۳]. مطالعات نشان داده است که مرفین از طریق گیرنده μ_3 در سلولهای ایمنی و سلولهای اندوتلیال باعث رهایی نیتریک اکساید می‌گردد [۲۳و۲۵]. مولکول نیتریک اکساید از اسید آمینه ال-آرژینین و تحت اثر گروهی از آنزیم‌ها

* پست الکترونیک نویسندهٔ مسئول مکاتبات:
Hajizads@modares.ac.ir

به نام نیتریک اکساید سنتاز در بدن تولید می‌شود. از مهمترین اعمال این مولکول نقش تنظیم کننده تون عروقی و در نتیجه تنظیم جریان خون موضعی اندام‌ها می‌باشد [۱۶و۱۸]. این اثر به ویژه در تنظیم جریان خون پوستی هم در دمای طبیعی و هم در شرایط تغییر دما نشان داده شده است [۴و۶و۸].

مطالعات گذشته به خوبی نشان داده‌اند که با افزایش رهایی نیتریک اکساید پایه در عروق پوستی می‌توان جریان خون پوستی پایه را افزایش داد و در مقابل با مهار رهایی نیتریک اکساید پایه که توسط تزریق مهارکننده‌های نیتریک اکساید سنتاز صورت می‌گیرد می‌توان جریان خون پوستی را کم کرد [۴]. با توجه به نقش نیتریک اکساید در تنظیم جریان خون پوست و از طرفی با توجه به ارتباط بین عمل مرفین و رهایش نیتریک اکساید به ویژه در بروز وابستگی به مرفین، هدف از این تحقیق بررسی اثر تغییر سطح نیتریک اکساید بر جریان خون پوستی پایه در موش‌های وابسته به مرفین در مقایسه با موش‌های دست نخورده است.

مواد و روشها

حیوانات مورد آزمایش

برای انجام این تحقیق از موشهای صحرائی نر نژاد Sprague-Dawley در محدوده وزنی ۳۵۰-۲۵۰ گرم استفاده شد. این موشها از مؤسسه رازی تهیه شده و در شرایط استاندارد از نظر نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ساعت تاریکی)، دسترسی آزاد به آب و غذا و درجه حرارت ۲۲°C-۲۰ قرار داشتند. حیوانات را با تزریق داخل صفاقی داروی اورتان با دوز g/kg ۱/۵ بیهوش کرده و برای جلوگیری از انسداد راه هوایی حیوان در طول آزمایش، عمل تراکوتومی صورت می‌گرفت. به منظور اطمینان از عمیق ماندن سطح بیهوشی در زمان آزمایش از دوز تقویتی اورتان ،معادل یک پنجم دوز اولیه، استفاده گردید.

داروها

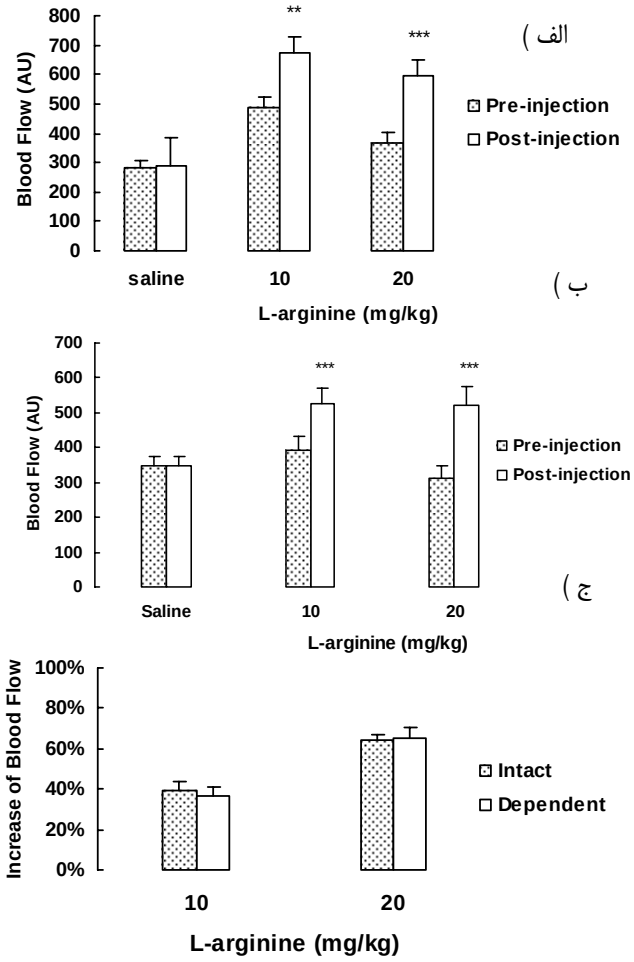
مرفین سولفات (تماد-ایران)، نالوکسان هیدروکلراید (سیگما)، ال-آرژینین (سیگما)، ال-ان آرژینین متیل استر یا L-NAME (سیگما) و اورتان (Merck) در سالین با حجم ۰/۱ سی سی حل گردیدند.

روش ها

روش ثبت جریان خون پوستی

برای ثبت جریان خون پوستی (SBF)، دستگاه جریان سنج لیزری ساخت شرکت Moor Instrument به کار گرفته شد. استفاده از این روش غیر تهاجمی برای اندازه‌گیری جریان خون پوستی مناسب می‌باشد [۱۰و۱۷]. کاوند (پروب) دستگاه لیزر داپلر روی پوست کف پای حیوان در ناحیه metatarsi plantaris ثابت می‌گردید [۹]. به منظور پیش‌گیری از ایجاد اختلال در ثبت جریان خون در طی مراحل آزمایش، از جابجایی سوزن تزریق و یا کاوند جلوگیری می‌شد. زمانی که جریان خون به سطح پایداری رسید حدود ۳۰ دقیقه ثبت را ادامه داده [۱۰و۲۴] سپس دارو با سرعت ۵۰ میکرولیتر در دقیقه و با حجم ۰/۱ سی سی توسط پمپ تزریق به زیر پوست تزریق می‌شد، در حالیکه همزمان جریان سنج لیزری، جریان خون را اندازه‌گیری می‌کند. تا حدود ۶۰ دقیقه بعد از تزریق داروها، همچنان ثبت جریان خون ناحیه بدون تغییر محل کاوند ادامه می‌یافت. در کل مراحل آزمایش، SBF توسط LDF ثبت و همزمان اطلاعات به کامپیوتر منتقل می‌گردید. در پایان آزمایش حیوان با تزریق KCl اشباع کشته شده و جریان خون ثبت شده به عنوان صفر زیستی[1] (BZ) در LDF ثبت می‌شد. مقادیر صفر زیستی از مقادیر جریان خون ثبت شده قبلی کسر شده و سپس درصد تغییرات جریان خون محاسبه می‌شد.

[1] - Bilogical Zero



شکل۱- اثر تزریق ال-آرژینین با دوزهای mg/kg ۱۰ و ۲۰ بر جریان خون پوستی حیوانات دست نخورده (الف) و وابسته به مرفین (ب) و مقایسه آنها با یکدیگر (ج). مقادیر به صورت Mean ± SEM می‌باشند. ** P<0.01 و ***P<0.001 نسبت به قبل از تزریق سنجیده شده است.

ایجاد وابستگی به مرفین

به منظور ایجاد وابستگی، موش‌ها مرفین را با غلظت‌های متوالی mg/ml ۱/. و ۲/. و ۳/. به مدت ۴۸ ساعت و در طی روزهای بعد به غلظت mg/ml ۴/. در آب آشامیدنی دریافت کردند و پس از ۲۱ روز حیوان دچار وابستگی بوده و آماده انجام آزمایش است. به منظور اطمینان از ایجاد وابستگی در یک گروه از این حیوانات که به طور تصادفی انتخاب می‌شدند نالوکسان با دوز ۳mg/ml و به صورت زیرجلدی در ناحیه گردن تزریق شد. بروز علائم سندروم ترک در این گروه نشان دهنده ایجاد وابستگی در حیوانات بود.

تحلیل آماری

برای مقایسه تغییرات SBF در هر گروه از Student's paired t-test و برای مقایسه بین دو گروه مختلف از Student's Unpaired t-test استفاده شد. در همه نمودارها اطلاعات بصورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده و سطح معنی دار در مقایسه‌ها P<0.05 در نظر گرفته شده است.

گروه‌های آزمایش

الف- تزریق زیر جلدی ال-آرژینین (mg/kg ۱۰ و ۲۰) به عنوان پیش ساز مولکول نیتریک اکساید با سرعت ۵۰ میکرولیتر در دقیقه در موشهای دست نخورده و وابسته انجام شده و اثر آن بر جریان خون پوستی این حیوانات مورد بررسی قرار گرفت.

ب- L-NAME (mg/kg ۱و ۵) به عنوان مهار کننده نیتریک اکساید سنتاز با سرعت ۵۰ میکرولیتر در دقیقه در موشهای دست نخورده و وابسته به صورت زیرجلدی تزریق شده و اثر آن بر جریان خون پوستی موش‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

ج- اثر استفاده توأم از L-NAME و ال-آرژینین بر جریان خون پوستی حیوانات دست نخورده و وابسته بررسی شد. به طوریکه به این گروه از حیوانات ابتدا L-NAME با دوز mg/kg ۵ به صورت زیر جلدی تزریق شد در حالی که همزمان جریان خون ناحیه ثبت می‌شد. یک دقیقه بعد از شروع تزریق، داروی ال-آرژینین را با مقدار ۲۰mg/kg و با همان سرعت ۵۰µl/min تزریق کردیم. در طی تزریق و تا ۶۰ دقیقه بعد از آن ثبت جریان خون ناحیه ادامه یافت.

د- آزمایش رفتاری برای اطمینان از وابستگی به مرفین

در یک گروه ابتدا سولفات مرفین و ساکاروز را داخل آب آشامیدنی دریافت نموده و سپس نالوکسان (mg/kg ۳) به طور زیرجلدی در ناحیه گردن به آنها تزریق شده و علائم سندروم محرومیت مورد بررسی قرار گرفت. گروه دیگر تنها ساکاروز را

داخل آب آشامیدنی دریافت نموده و سپس نالوکسان به آنها تزریق شد.

یافته‌ها

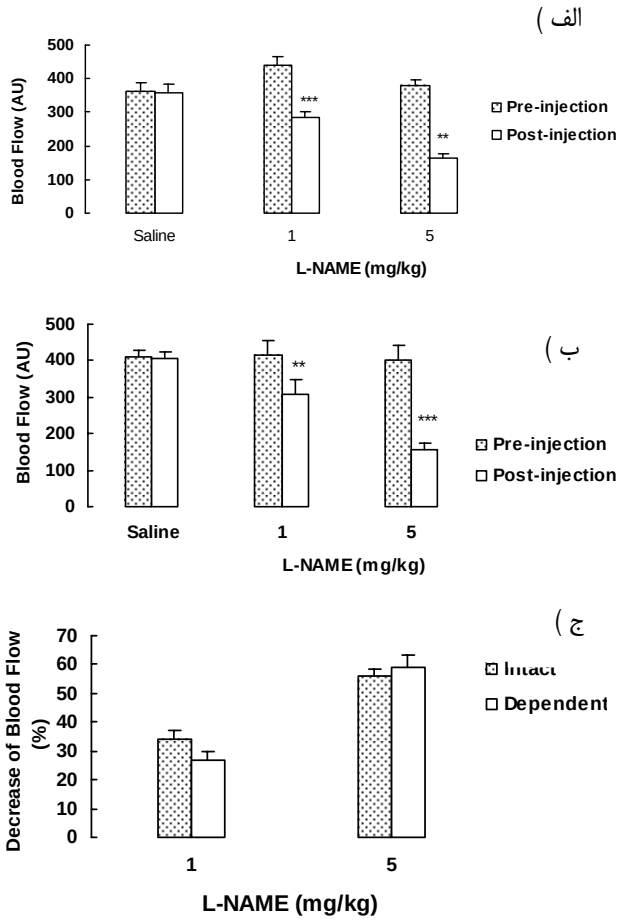
مقایسه اثر تزریق دوزهای مختلف ال-آرژینین بر جریان خون پوستی حیوانات دست نخورده و حیوانات وابسته به مرفین

در این آزمایش اثر تزریق دوزهای ۱۰ mg/kg و ۲۰ ال-آرژینین به صورت زیرجلدی بر جریان خون پوستی حیوانات دست نخورده بررسی شد. مقایسه جریان خون بعد از تزریق دارو با جریان خون پوستی قبل از تزریق نشان داد که تزریق دوز ۱۰ mg/kg ال-آرژینین به میزان ۳۹٪ و با دوز ۲۰ mg/kg حدود ۶۴٪ افزایش در جریان خون پوستی کف پای موشها ایجاد می‌کند که به ترتیب با P<0.01 و P<0.001 معنی دار می‌باشد (شکل۱-الف).

همچنین تزریق ال-آرژینین در موش‌های وابسته به مرفین با دوز ۱۰ mg/kg باعث افزایش ۳۷٪ و با دوز ۲۰ mg/kg باعث افزایش جریان خون به میزان ۶۵٪ می‌شود که با P<0.001معنی دار می‌باشند (شکل۱-ب). مقایسه نتایج حاصل از موش‌های وابسته با حیوانات دست نخورده که ال-آرژینین را با دوزهای فوق دریافت کرده بودند، تفاوت معنی داری را نشان نمی‌دهد (شکل۱-ج).

مقایسه اثر تزریق دوزهای مختلف L-NAME بر جریان خون پوست حیوانات دست نخورده و حیوانات وابسته به مرفین

در این آزمایش داروی L-NAME با دوزهای ۱mg/kg و ۵ به روش زیرجلدی به موش‌های دست نخورده تزریق شد نتایج حاصل نشان می‌دهد که تزریقL-NAME با دوز ۱mg/kg باعث کاهش جریان خون پوستی به میزان ۳۵٪ و با دوز ۵mg/kg حدود ۵۸/۷٪ کاهش در جریان خون پوست ایجاد



شکل۲- اثر تزریق L-NAME با دوزهای ۱ mg/kg و ۵ بر جریان خون پوستی حیوانات دست نخورده (الف) و وابسته به مرفین (ب) و مقایسه نتایج حاصله با یکدیگر (ج). مقادیر به صورت Mean ± SEM می‌باشند. (n. P<0.01۷) = ** و P<0.001*** نسبت به قبل از تزریق سنجیده شده است.

می‌کند که به ترتیب با P<0.001 و P<0. 01 معنی دار می‌باشد (شکل ۲-الف).

در حیوانات وابسته به مرفین تزریق L-NAME با دوز ۱mg/kg باعث کاهش جریان خون پوستی به میزان ۲۹/۱٪ و با دوز ۵mg/kg باعث کاهش۶۰/۵٪ در جریان خون پوستی می‌گردد که به ترتیب با P<0.01 وP<0.001 معنی دار می‌باشد (شکل۲-ب).

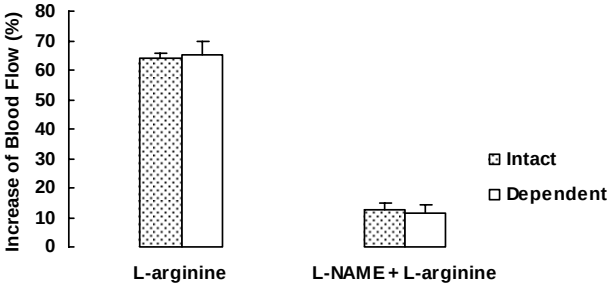
مقایسه نتایج حاصل از گروه حیوانات وابسته با گروه حیوانات دست نخوردهٔ دریافت کننده L-NAME تفاوت معنی داری نشان نداد (شکل۲-ج).

مقایسه اثر تزریق ال-آرژینین پس از تزریق L-NAME بر جریان خون پوستی حیوانات دست نخورده و وابسته به مرفین

نتایج حاصل از این آزمایش نشان می‌دهد که تزریق ال-آرژینین با دوز ۲۰ mg/kg یک دقیقه بعد از شروع تزریق L-NAME با دوز ۵mg/kg در موش‌های دست نخورده به طور میانگین ۱۲/۱٪ افزایش در جریان خون پوست ایجاد می‌کند که هر چند با $P<0.05$ معنی دار می‌باشد، اما در مقایسه با موش‌های دست نخورده‌ای که فقط ال- آرژینین با دوز ۲۰ mg/kg را دریافت کردند، اختلاف معنی داری بین درصد افزایش جریان خون ایجاد شده توسط ال- آرژینین در دو گروه نشان می‌دهد ($P<0.01$).

از طرفی وقتی این آزمایش بر روی حیوانات وابسته به مرفین انجام شد، نتایج نشان داد که تزریق ال-آرژینین با دوز ۲۰ mg/kg بلافاصله بعد از تزریقL-NAME با دوز ۵ mg/kg تنها باعث افزایش جریان خون به میزان ۱۱/۵٪ می‌شود که هر چند از نظر آماری معنی دار می‌باشد ($P<0.05$) اما با موشهای وابسته‌ای که فقط ال-آرژینین را دریافت کرده بودند اختلاف معنی داری را نشان می‌دهد ($P<0.01$).

مقایسه درصد افزایش جریان خون پوست ایجاد شده توسط تزریق ال-آرژینین به دنبال L-NAME، در موشهای وابسته به مرفین با موشهای دست نخورده تفاوت معنی داری را نشان نمی‌دهد (شکل ۳).



شکل۳- مقایسه تغییرات جریان خون پوستی ناشی از تزریق ال-آرژینین به تنهایی و به دنبال L-NAME در موشهای دست نخورده و وابسته. مقادیر به صورت Mean ± SEM می‌باشند (n=۶) .

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تغییر سطح نیتریک اکساید پایه باعث ایجاد تغییراتی در جریان خون پوستی می‌گردد که در موش‌های صحرایی دست نخورده با موش‌های وابسته به مرفین تفاوت معنی داری ندارد.

مطالعات گذشته همواره ارتباط بین تولید نیتریک اکساید و ایجاد اثرات مختلفی از مرفین را در سیستم‌های مختلف بدن نشان داده است [۲۲و۲۳]. این اثرات را می‌توان در دو گروه اثرات ناشی از مصرف حاد و مزمن مرفین جای داد. تزریق حاد دوز ضد دردی مرفین با افزایش رهایی نیتریک اکساید در مغز سطح cGMP را افزایش می‌دهد [۳و۱۵]. تزریق حاد یک دوز از مرفین با رهایی نیتریک اکساید فعالیت لوکوسیت‌ها را مهار می‌کند [۱۳و۲۵]. اهمیت این ارتباط در بروز اثرات هیپرترمی [۱و۲] و شل شدگی آئورت ناشی از تزریق حاد مرفین [۲۰و۲۳] نیز نشان داده شده است.

مرفین اعمال خود را از طریق گیرنده‌های مختلفی ایجاد می‌کند. تحقیقات نشان داده است که مرفین با اثر بر یک گیرنده مخصوص، باعث رهایی نیتریک اکساید و بروز اثرات ویژه می‌گردد. این گیرنده که μ3 نام دارد دارای میل ترکیبی بالا برای مرفین بوده و نسبت به پپتیدهای اوپیوئیدی غیر حساس می‌باشد و توسط نالوکسان آنتاگونیزه می‌شود. وجود این گیرنده بر سلولهای اندوتلیال عروقی، سلولهای ایمنی و میکروگلیاها به خوبی نشان داده شده است [۲۱و۲۳].

در استفاده مزمن مرفین که می‌تواند منجر به ایجاد پدیده‌های تحمل و وابستگی گردد نیز رهایی نیتریک اکساید از اهمیت خاصی برخوردار است. مطالعات نشان داده است که در شرایط وابستگی به مرفین بیان [۱۵] و فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سنتاز در بعضی از نواحی مغز افزایش می‌یابد [۱۲] و استفاده از مهارکننده‌های این آنزیم که تولید نیتریک اکساید را کاهش می‌دهند می‌توانند ایجاد تحمل و وابستگی را مهار کنند [۵و۱۴].

اما در مصرف مزمن مرفین، مغز تنها هدف اصلی برای مرفین نمی‌باشد و این آلکالوئید پپتیدی اثرات وسیعی را در بدن ایجاد می‌کند [۲۰]. تحقیقات Stefano و همکارانش نشان داده است که سلول‌های اندوتلیال شریان انسانی و عروق کوچک موش صحرایی دارای توزیع وسیعی از گیرنده μ3 هستند که مرفین را با رهایی نیتریک اکساید مزدوج می‌کند [۲۳]. مطالعه بر روی بافت اندوتلیال و حلقه آئورتی موش صحرایی که به صورت In vitro کشت داده شده اند، نشان می‌دهد که مرفین با اثر مستقیم بر این سلول‌ها باعث رهایی نیتریک اکساید و گشادی عروقی می‌گردد، فرآیندی که هم به نالوکسان حساس است و هم به مهارکننده‌های نیتریک اکساید سنتاز [۲۰]. نیتریک اکساید علاوه بر ایجاد گشادی عروقی در پاسخ به میانجی مثل مرفین، به عنوان یک تنظیم کننده جریان خون موضعی به ویژه در پوست معرفی شده است و روشن است که با تزریق ال-آرژینین به عنوان پیش ساز نیتریک اکساید جریان خون پوست افزایش و با تزریق مهارکننده نیتریک اکساید سنتاز مثل L-NAME کاهش می‌یابد [۴و۸]. اما با توجه به تعامل بین مرفین و نیتریک اکساید در بدن، اثبات وجود گیرنده‌های μ3 بر سلول‌های اندوتلیال عروقی و از طرفی نقش نیتریک اکساید در تنظیم جریان خون پوست، باید به دنبال پاسخ به این سوال بود که آیا مصرف مزمن مرفین و ایجاد وابستگی باعث تغییری در تولید نیتریک اکساید در سیستم عروقی پوست می‌گردد؟ و یا به عبارتی آیا میزان تولید نیتریک اکساید در سیستم عروق پوست یک موش دست نخورده با یک موش وابسته به مرفین تفاوتی دارد؟ در این مطالعه مشاهده شد که افزایش سطح نیتریک اکساید در عروق پوست با تزریق موضعی ال-آرژینین و یا کاهش آن با تزریقL-NAME در کف پای موش‌های صحرایی وابسته به مرفین باعث بروز تغییراتی در جریان خون پوست می‌شود که با موش‌های غیر وابسته تفاوت معنی داری ندارد. اما آیا طبق آزمایش ما، در شرایط وابستگی، واقعا مرفین سطح نیتریک اکساید در عروق پوست را تغییر نداده و یا با شروع مصرف، تغییراتی در میزان تولید نیتریک اکساید عروقی موش ایجاد شده اما تا پایان دوره وابسته شدن حیوان (بیش از ۲۱ روز) به سطح یک موش دست نخورده رسیده است، با به کار بردن تکنیک‌های دقیق اندازه‌گیری میزان رهایی نیتریک اکساید می‌توان با این مساله نیز پی برد.

منابع

[1] Afify EA, Dabess TT, Gabra BH, Abouceit MS, Role of nitric oxide in catalepsy and hyperthermia in morphine dependent rats. ***Pharmacol Res*** 44 (2001) 233-239.

[2] Barry C, Marylouise A, Wesley C, Morphine hyperthermia in the rat: an action on the central thermostats. ***Eur J Pharmacol*** 36 (1976) 33-39.

[3] Carlos J, Lizasoain I, Lorenzo P, Morphine-induced changes in cerebral and cerebellar nitric oxide synthase activity. ***Eur J Pharmacol*** 285 (1995) 95-98.

[4] Clough GF, Role of nitrc oxide in the regulation of microvascular Perfusion in human Skin in vivo. ***J Physiol*** 516 (1999) 49-57.

[5] Dambisya Y, Lee TL, Role of the nitric oxide in the induction and expression of morphine tolerance and dependence in mice. ***Brit J Pharmacol*** 117 (1996) 914-918.

[6] Gerharz DB, Ruzicka T, Bachofen VK, Nitric oxide in human skin: Current status and future prospects. ***J Invest Dermatol*** 110 (1998) 1-7.

[7] Goldsmith PC, Leslie TA, Hayes NA, Levell NJ, Dowd PM, Foreman JC, Inhibitors of Nitric Oxide Synthase in

Human Skin. ***J Invest Dermatol*** 106 (1996) 113-118.

[8] Kellogg DL, Crandall CG, Johnson JM, Nitric oxide and cutaneous active vasodilation during heat stress in humans. ***J Appl Physiol*** 85 (1998) 824-829.

[9] Kurvers HAJ, Tangelder GT, Demey JGR, Wildenberg FAJM, Skin blood flow disturbances in the contralateral limb in a peripheral mononeuropathy in the rat. ***Neuroscience*** 74 (1996) 935-943.

[10] Kvanda P, Stefnovska A, Veber M, Kvermmo H, Regulation of human cutaneous circulation evaluated by laser Doppler flwmetry, iontophoresis, and spectral analysis: importance of nitric oxide and prostaglandins. ***Microvasc Res*** 65 (2003) 160-171.

[11] Li X, Cark D, Spinal cord nitric oxide synthase and heme oxygenase limit morphine induced analgesia. ***Mol Brain Res*** 95 (2001) 6-10.

[12] Lue WM, Su MT, Lin WB, Tao PL, The role of nitric oxide in the development of morphine tolerance in rat hippocampal slices. ***Eur J Pharmacol*** 383 (1999) 129-135.

[13] Magazine HI, Liu Y, Bilfinger TV, Stefano GB, Morphine-induced conformational changes in human monocytes, granulocytes, and endothelial cells and in invertebrate immunocytes and microglia are mediated by nitric oxide. ***J Immunol*** 156 (1996) 4845-4850.

[14] Majeed N, Przewlocka B, Machelska H, Inhibition of nitric oxide synthase attenuates the development of morphine tolerance and dependence in mice. ***Neuropharmacology*** 33 (1994) 189.

[15] Melichar JK, Daglish M, Nutt D, Addiction and withdrawal-current views. ***Curr Opin Pharmacol*** 1 (2001) 84-90.

[16] Moncada S, Higgs A, The L-Arginine-Nitric Oxide pathway. ***N Eng J Med*** 329 (1993) 2002-2012.

[17] Pugsley MK, Tabrizchi R, The vascular system: An overview of structure and function. ***J Pharmacol Toxicol Meth*** 44 (2000) 333-340.

[18] Robbins RA, Grisham MB, Molecules in focus: Nitric Oxide. ***Int J Biochem Cell B*** 29 (1997) 857-860.

[19] Sils IV, Szlyk-Modrow PC, Tartarini C, Matthew B, Effect of nitric oxide synthase inhibition on regional blood flow during hyperthermia***. J Therm Biol*** *26 (2001) 1-7.*

[20] Stefano GB, Autoimmunovascular regulation: morphine and ancondamide and ancondamide stimulated nitric oxide release**. J Neuroimmunol** 83 (1998) 70-76.

[21] Stefano GB, Goumon Y, Bilfinger TV, Welters I, Basal nitric oxide limits immune, nervous and cardiovascular excitation: human endothelia express a mu-opiate receptor. ***Prog Neurobiol*** 60 (2000) 513-530.

[22] Stefano GB, Goumon Y, Casares F, Cadet P, Fricchione GL, Endogenous morphine. ***Trends Neurosci*** 23 (2000) 436-442.

[23] Stefano G, Hartman A, Liu Y, Presence of the μ3 opiate receptor in endothelial cells. ***J Biol Chem*** 270 (1995) 30290-30293.

[24] Tsujii Y, Koeda T, Sato J, Suzuki S, Sympathetically induced paradoxical increases of the cutaneous blood flow in

chronically inflamed rats. ***J Auton Nerv Sys*** 59 (1996) 103-112.

[25] Welters ID, Menzebach A, Goumon Y, Morphine suppresses complement receptor expression, phagocytosis, and respiratory burst in neutrophils by a nitric oxide and μ3 opiate receptor-dependent mechanism. ***J Neuroimmunol*** 111 (2000) 139-145.

[26] Williams JT, Christle MJ, Manzoni O, Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. ***Physiol Rev*** 81 (2001) 299-331.