

## 우유속 락토페린의 NMDA 수용체를 통한 진통효과

전용준 · 윤재석 · 임화경 · 박기숙 · 나한광 · 김동섭 · 김주일 · 윤여창\* · 최기환#

국립독성연구원 약리연구부, \*진국대학교 자연대학

(Received May 10, 2005; Revised June 28, 2005)

### Effect of NMDA Receptor on Analgesic Effect of Bovine Milk-derived Lactoferrin (BLF)

Yong-Joon Jeon, Jae-Suk Yun, Hwa-Kyung Lim, Ki-Suk Park, Han-Kang Na,  
Dong-Sup Kim, Joo-il Kim, Yea-Chang Yoon\* and Ki Hwan Choi#

Pharmacological Research Department, National Institute of Toxicological Research, Seoul 122-704, Korea

\*Department of Dairy Science Graduate School of Kon-kuk University, Seoul 143-701, Korea

**Abstract** — Lactoferrin is a multifunctional protein that is found in milk, neutrophils, and other biological fluids, and its receptors have also been identified in the central nervous system. Recently, it was reported that bovine milk-derived lactoferrin (BLF) produced analgesia via a  $\mu$ -opioid receptor-mediated response in the spinal cord. However the precise mechanism of this analgesic effect is remains unclear. In Randall-Selitto paw pressure study, each single administration of morphine (10 mg/kg) and BLF (50, 100 and 200 mg/kg) induced analgesia, however, NMDA receptor antagonist MK-801 (0.1, 0.2 and 0.3 mg/kg), inhibited analgesia induced by BLF (100 mg/kg). Intracerebroventricular infusion (I.C.V.) of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) (0.3  $\mu$ g/8.0  $\mu$ l/hr/day), as a NMDA receptor agonist, reversed inhibition of MK-801 (0.3 mg/kg) on analgesia induced by BLF (100 mg/kg). These results suggest that BLF have analgesic effect, through NMDA receptor activation.

**Keywords** □ morphine, lactoferrin, MK-801, NMDA, analgesia

물핀 등의 마약성 진통제는 말기 암환자 등의 만성 통증환자의 통증완화를 위하여 필수적인 약물이나, 반복 사용으로 내성이 형성되어 동일한 진통효과를 유지하기 위해서 용량을 증가시켜야 한다. 또한, 환각 망상 등의 부작용이 발생하며 정신적·신체적 의존성을 형성하여 탐닉현상을 유발하고 투약을 중단하면 금단현상을 일으킨다. 따라서 진통효과를 유지시키면서 중독 및 부작용을 감소시키는 약물의 개발이 요구되고 있다.<sup>1,2)</sup>

최근 들어 천연 glucoprotein인 락토페린의 진통작용에 대하여 연구가 진행되고 있다. 주로 모유나 우유, 혈액, 침, 눈물, 점액 분비물 등에 존재하고 있는 transferrin의 일종인 락토페린은 세균에 대한 감염억제와 면역조절, 보통 세포의 성장에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>3)</sup> 그러나 락토페린과 그것의 수용체가 감각

기관인 중추신경계에 존재하는 것으로 알려졌지만, 그것의 역할이 명확하지는 않다.<sup>4,6)</sup>

우유 속 락토페린(BLF)은 SD 랫드의 척수내의 물핀 수용체 중  $\mu$ -opioid 수용체가 매개하는 진통작용을 일으키고,<sup>7)</sup> nitric oxide synthase(NOS) 억제제인 NG-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)와 7-nitroindazole의 투여는 formalin test 및 tail-flick test를 이용한 연구에서 BLF 유발 진통력을 억제하였다.<sup>8)</sup>

BLF은 수용체 매개 transcytosis를 통해 혈액뇌관문을 통과하여 뇌척수액으로 이행하고,<sup>9)</sup> 정맥투여 시 혈압강하효과를 나타내는데 이 효과는 말초작용만 있는 naloxone methiodide에 의해 억제되지 않고 중추작용이 있는 naloxone hydrochloride에 의해 서만 억제되는 등 중추신경계의 opioidergic system을 매개로하여 나타난다.<sup>10)</sup> 더구나 BLF은 복강투여로 뇌 조직으로 이행되고 심리적 스트레스를 억제하는 중추신경계작용효과를 가지고 있으며, NOS 활성을 매개로하여 opioidergic system을 활성화시키는 것으로 보고되었다.<sup>11)</sup>

단백질을 구성하는 아미노산 중 glutamate(Glu)는 뇌에서 신

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-380-1804/5 (팩스) 02-380-1806  
(E-mail) hyokwa@kfda.go.kr

경과 신경사이의 정보를 전달하는 흥분성 신경전달물질이다. Glu 수용체의 경우 N-methyl-D-aspartic acid 수용체와 non-N-methyl-D-aspartic acid 수용체로 나누어지며, N-methyl-D-aspartic acid 수용체가 활성화 되면서 유입된  $Ca^{2+}$ 에 의해 NOS가 자극되고 아미노산인 L-arginine으로부터 nitric oxide(NO)가 생성된다.<sup>12,13)</sup> Glu 신경의 흥분성 신경말단은 뇌내 여러 부위에 뻗어 있는 것으로 알려져 있는데,<sup>14)</sup> Glu 신경은 뇌간(brainstem)에서 척추 등쪽뿔(dorsal horn)로 이어지는 통증 억제성 하행신경경로(descending inhibition of nociception pathway)를 활성화 시켜서 진통효과를 나타내고,<sup>15-17)</sup> NO 선구물질(L-arginine)은 아편양 신경계의 작용과 연관된 진통력을 나타낸다.<sup>18)</sup> 즉, Glu 신경 자체와 NMDA 수용체 흥분을 통해 유리되는 NO가 단독 혹은 협력하여 진통력을 일으킬 수 있을 것으로 생각된다.

BLF는  $\mu$ -opioid 수용체와 NO의 작용을 통해서 진통효과를 나타내고, NO는 NMDA 수용체 흥분으로 생성되는 것에 착안하여 BLF의 진통력에 대한 NMDA 수용체의 역할을 규명하는 데에 이 실험의 목적이 있다.

## 실험 방법

### 실험동물

국립독성연구원 AAALAC International(2001)의 기준에 따라 실험동물자원실로부터 5주령의  $180 \pm 20$  g의 Sprague-Dawley (SD) 랫드를 분양 받아 최소한 일주일이상 본 동물실에서 온도  $23 \pm 2^\circ C$ , 습도  $55 \pm 10\%$ , 환기횟수 10~18회/hr, 명암 12시간 조명주기(7시 전등~19시 소등), 조도 150~300 Lux의 조건에서 유지 하에서 순화시킨 후 실험에 사용하였으며, 물과 사료는 자유롭게 섭취할 수 있도록 충분히 공급하였다.

### 시약 및 기기

Morphine sulfate, ( $\pm$ )-Ketamine hydrochloride, N-Methyl-D-aspartic acid(NMDA), (+)-MK-801 hydrogen maleate은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 Bovine milk-derived of Lactoferrin은 Wako Chemical Ltd.(Sankyo, Tokyo, Japan) 제품으로 주사용생리식염수에 용해하여 사용하였다. 모든 시약은 투여용량을 염의 상태로 계산하여 사용하였으며 실험동물에 kg당 1 ml의 volume으로 복강투여 하였다. Randall-Selitto 기기는 foot pedal로 조작되는 Columbus Instrument Int. Corp.(USA)의 제품을 사용하였다. Osmotic pump는 alzet, model 2001D( $8.0 \mu\text{g/hr/day}$ )을 ALZET Corp.(USA)에서 구입하였다.

### 진통력 측정

약물의 진통내성은 Randall-Selitto paw pressure 법을 이용하

여 측정하였다.<sup>19)</sup> 기계적 압자극은 초당 16g씩 증가시켜 발을 피하는 시점에서의 압자극을 기록하였다. 기본반응시간을 측정하고 물핀 또는 BLF를 투여한 후 30분 간격으로 180분까지 진통효과를 측정하고, AUC로 환산하여 비교분석하였다. 조직의 손상을 피하기 위해 최대 반응압력을 250 g으로 하였다. 시험에 사용된 랫드의 기본반응압력은 대략  $70 \pm 10$  g이었다.

단회투여로 진통효과가 뚜렷하게 나타나는 물핀( $10 \text{ mg/kg}$ )<sup>2)</sup>을 대조군으로 하여 BLF(50, 100, 200 mg/kg)을 랫드에 복강 단회투여로 인한 진통효과를 측정하였으며 진통효과 억제를 유도하기 위하여 BLF( $100 \text{ mg/kg}$ )을 대조군으로 NMDA 수용체의 길항제인 MK-801(0.1, 0.2, 0.3 mg/kg)을 랫드의 복강에 BLF과 병행투여 및 단독투여 하여 진통효과를 측정하였다. 억제된 효과를 완화하기 위해서 NMDA를  $0.3 \mu\text{g}/8.0 \mu\text{g/hr/day}$ <sup>20)</sup>의 용량으로 SD Rat의 뇌실에 osmotic pump를 이용하여 진통효과 측정 12시간 전부터 투여한다. NMDA 투여시작 12시간 후 BLF( $100 \text{ mg/kg}$ )과 MK-801( $0.3 \text{ mg/kg}$ )을 병행투여 및 단독투여 하여 3시간 동안 30분 간격으로 진통효과를 측정하였다.

### 뇌실관 삽입 수술

NMDA의 혈액뇌관문 안으로의 투여를 위해 실험동물의 외과적 수술이 요구된다. 랫드에 뇌실 내 약물주입을 위한 뇌실관(bregma에서 우측 3.4 mm, 후측 0.5 mm, brain bone에서 깊이 4.5 mm)을 삽입<sup>20)</sup>하고 4일 뒤 수술한 랫드에 NMDA( $0.3 \mu\text{g}/8.0 \mu\text{g/hr/day}$ )로 충전된 Osmotic pump를 고정된 뇌실관에 연결한 뒤 피하에 넣는다.

### 통계처리

모든 실험결과는 평균과 표준오차를 사용하여 나타내었고, 각 군간의 비교는 one-way 분산분석을 실행하고 Dunnett's t-test를 사용하였으며, 대조군과 비교하여 p value가 0.05 미만일 때에 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

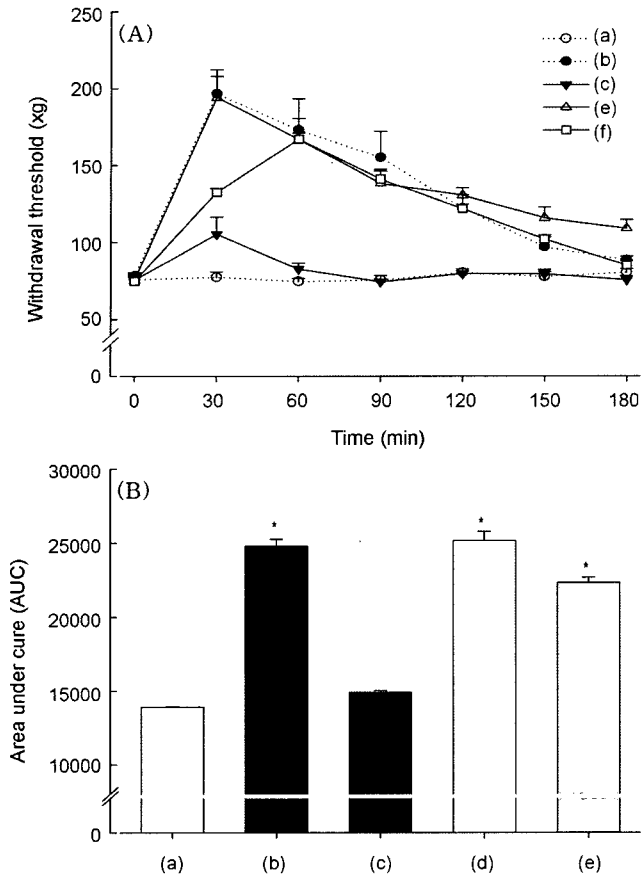
## 실험 결과

### BLF의 진통효과

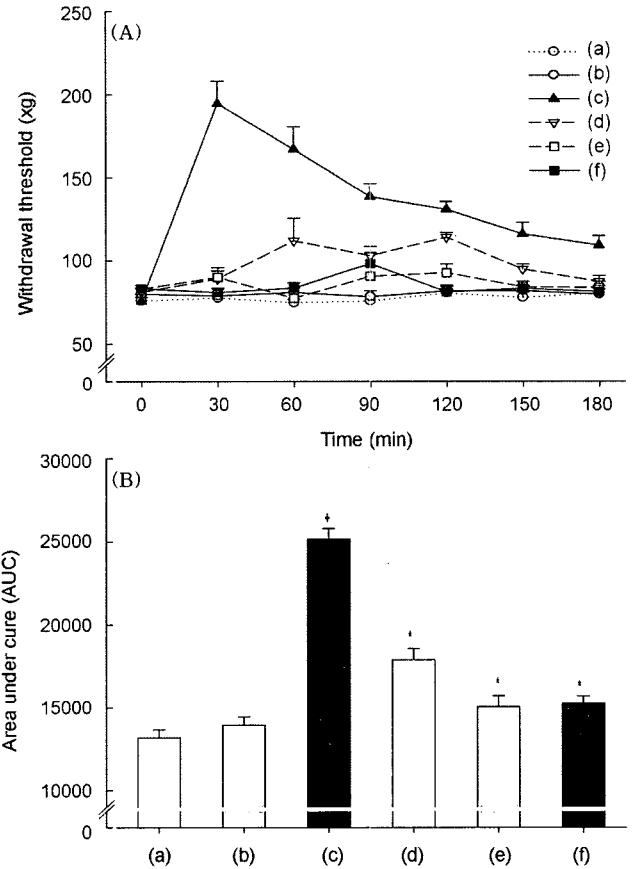
물핀 및 BFL을 복강투여 후 3시간 동안 30분 간격으로 진통효과를 측정한 결과 BLF  $100 \text{ mg/kg}$ 이 물핀(AUC : 24801)과 가장 유사한 진통효과(AUC : 25149)를 나타내었다(Fig. 1).

### NMDA 수용체 antagonist의 영향

MK-801의 단독투여로는 별다른 반응이 없었고, BLF와 병행투여 시 진통력의 억제효과에 대한 용량별 결과를 얻을 수 있었다. 그 결과 MK-801  $0.3 \text{ mg/kg}$ 을 진통력 억제용량(AUC : 15258)으로 선택하였다(Fig. 2).



**Fig. 1** – (A), (B) - Analgesic effect of bovine milk-derived lactoferrin. The threshold of paw withdrawal was determined at be every 30 min upto 180 min after injection of saline (kg/ml, ip), morphine (10 mg/kg, ip) and bovine milk-derived lactoferrin (50, 100 and 200 mg/kg, ip) and calculated with the AUC method. Data are expressed as mean±S.E. (n=5). \*p<0.05, compared with the saline group by One way ANOVA followed by Dunnett's test. (a); saline, (b); Morphine, (c); bovine milk-derived lactoferrin 50, (d); bovine milk-derived lactoferrin 100, (e); bovine milk-derived lactoferrin 200.



**Fig. 2** – (A), (B) - Inhibition of MK-801 on bovine milk-derived lactoferrin-induced analgesia. The threshold of paw withdrawal was determined at be every 30 min upto 180 min after injection of saline (kg/ml, ip), bovine milk-derived lactoferrin (100 mg/kg, ip) and/or MK-801 (0.1, 0.2 and 0.3 mg/kg, ip) and calculated with the AUC method. Data are expressed as mean±S.E. (n=5). +p<0.05, compared with the saline group and \*p<0.05, compared with the bovine milk-derived lactoferrin group by One way ANOVA followed by Dunnett's test. (a); saline, (b); MK-801 0.3, (c); bovine milk-derived lactoferrin, (d); bovine milk-derived lactoferrin+MK-801 0.1, (e); bovine milk-derived lactoferrin+MK-801 0.2, (f); bovine milk-derived lactoferrin+MK-801 0.3.

**MK-801로 억제된 진통효과에 대한 NMDA 수용체 agonist의 영향**

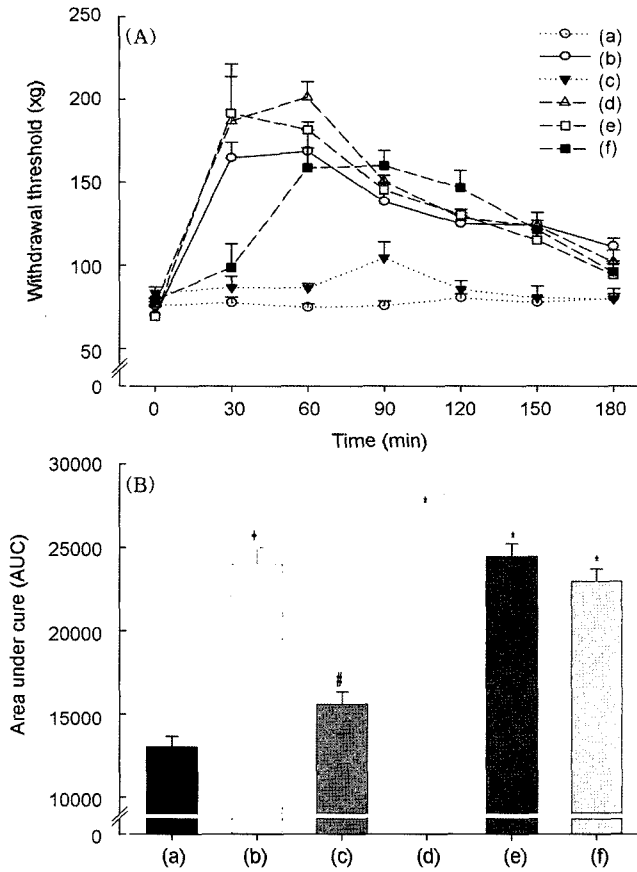
NMDA의 단독투여로는 별다른 반응이 없음을 알 수 있었고, MK-801에 의한 BLF의 진통효과의 저하는 NMDA의 뇌실 내 전 처리로 회복(AUC : 23185)되는 것을 알 수 있었다. 이를 통해 NMDA 수용체를 매개체로 하여 BLF이 진통효과를 나타나는 것을 알 수 있다(Fig. 3).

**고 찰**

마약성 진통제 수용체 중  $\mu$ -opioid 수용체는 진통작용과 의존성형성을 유발시키는 주요 작용 부위이다.<sup>2)</sup> 지금까지 통증을 감

소시키는 물질들인 몰핀 등 마약성 진통제는 대부분이  $\mu$ -opioid 수용체를 경유하여 진통효과를 나타냄으로써, 단일투여 시 효과는 있으나 같은 효능을 나타내기 위해 용량을 계속 증가시켜야 하는 내성과 마약성진통제에 대한 신체적, 정신적 · 의존성형성, 그리고 약물투여 중단 시 나타나는 급단증상등의 약물 오 · 남용 문제를 일으키고 있다.<sup>1,2)</sup> 따라서, 몰핀 등의 내성 및 의존성 등 부작용을 최소화하고 진통작용을 유지시킬 수 있는 물질 및 방법에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있다.<sup>1,2)</sup>

지금까지 락토페린은 철과 결합하는 특이한 성질을 가진 단백질로 항균작용 및 면역작용에 대해서만 연구되어 왔다.<sup>3)</sup> 그러나, 최



**Fig. 3 - (A), (B) - Effect of NMDA on inhibition of MK-801 on bovine milk-derived lactoferrin-induced analgesia.** The infusion of NMDA (0.3  $\mu$ g/8.0  $\mu$ l/hr, icv) or saline (8.0  $\mu$ l/hr, icv) was started 12 hr before injection of other agents. The threshold of paw withdrawal was determined at be every 30 min upto 180 min after injection of saline (kg/ml, ip), bovine milk-derived lactoferrin (100 mg/kg, ip) and/or MK-801 (0.3 mg/kg, ip) and calculated with the AUC method. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. (n=5). +p<0.05, compared with the saline group, #p<0.05, compared with the bovine milk-derived lactoferrin group and \*p<0.05, compared with the bovine milk-derived lactoferrin+MK-801 group by One way ANOVA followed by Dunnett's test. (a); saline, (b); bovine milk-derived lactoferrin, (c); bovine milk-derived lactoferrin+MK-801, (d); saline+bovine milk-derived lactoferrin, (e); NMDA+ bovine milk-derived lactoferrin, (f) NMDA+bovine milk-derived lactoferrin+MK-801.

근 마약성 진통제인 몰핀의 주요 작용부위인  $\mu$ -opioid 수용체를 매개로하는 락토페린의 진통효과가 보고되었다.<sup>4,5)</sup> 특히, 락토페린이  $\mu$ -opioid 수용체 뿐만 아니라 NO를 매개하여 opioid 수용체를 활성화시키는 경로가 연구되어 오고 있으며, 락토페린은 생체내 천연연물질로서 마약성 진통제에 대한 문제해결책 중 하나로 생각된다.

이번 연구에서는 현재까지 알려진 BLF의 진통작용기전이  $\mu$ -opioid와 연관이 있고,<sup>7)</sup> 그 진통작용에 대해 NO가 매개체 역할을 하는 것과<sup>8)</sup> Glu 수용체중 하나인 NMDA 수용체가 활성화

되면 NO의 생성이 증가<sup>12,13)</sup>하는 두 가지 사실을 기반으로 BLF의 진통작용기전을 규명하고자 하였다.

BLF을 랫드에 복강투여 시 100 mg/kg에서 최고의 진통효과를 나타냈으며, NMDA 수용체의 비경쟁적 길항제인 MK-801은 0.3 mg/kg에서 BLF 유발 진통작용을 유의성 있게 억제하였다. 그와는 반대로, MK-801의 진통작용 억제효과는 NMDA 수용체의 효능제인 N-methyl-D-aspartic acid(NMDA)의 뇌실내 12시간(0.3  $\mu$ g/8.0  $\mu$ l/hr/day) 연속투여로 인해서 없어지고 BLF의 진통작용이 회복되는 것으로 나타났다. 이 결과로 미루어, NMDA 수용체는 BLF의 진통작용을 매개하는 것으로 생각된다.

이와는 반대로 Glu 신경계의 활성화는 척추의 등쪽 뿔로 투사되는 통각전달체계의 흥분성 하행신경을 활성화시킴으로써 통증의 민감성을 증가시키고,<sup>17,21)</sup> NMDA 수용체 길항제인 ketamine이 진통작용이 있는 것으로 보고 되어있다.<sup>22-24)</sup> 그러나, Glu 신경계는 척추의 등쪽 뿔로 투사되는 통각전달체계의 억제성 하행신경에 대한 활성화 작용도 같이 가지고 있으며,<sup>15-17)</sup> Glu 신경계길항제의 투여는 진통작용을 억제한다.<sup>25,26)</sup> 이런 NMDA 수용체의 상반된 작용은 앞으로 더 논의 될 필요가 있으나, 본 실험에서 BLF 진통작용을 매개하는 NMDA 수용체는 억제성 하행신경과 관련이 있는 것으로 추정된다.

BLF의 NO가 매개하는 진통작용은  $\mu$ -opioid 수용체와 연관이 있으며,<sup>7,8)</sup> NO는 NMDA 수용체의 활성화로 유리가 된다.<sup>12,13)</sup> 그리고, NMDA 수용체가 BLF의 진통작용을 매개하는 것을 이번 연구에서 알 수 있었다.

이상의 결과로 BLF은 첫째, NMDA 수용체가 매개하는  $\mu$ -opioid 수용체에 대한 작용경로와 둘째, NMDA 수용체에서 유리된 NO가 매개하는  $\mu$ -opioid 수용체에 대한 작용경로가 있으며, BLF는 이 두 경로를 통하여 단독 혹은 협력하여 진통작용을 나타내는 것으로 추정할 수 있다.

락토페린은 여러 경로를 통해 진통효과를 나타내므로, 이를 통해 몰핀과 같은 마약성 진통작용 물질 및 중추신경계의 감작 통증 작용을 조절할 수 있는 물질과 병행하여 사용한다면, 적은 양으로 같은 진통효과를 볼 수 있으며, 현재 문제가 되고 있는 마약물질의 특징인 내성 및 의존성 형성을 최소 및 극복할 수 있다고 추정해 본다.

**문 헌**

- 1) Yaksh, T. L. : Tolerance: Factors involved in changes in the dose-effect relationship with chronic drug exposure. In: *Towards a New Pharmacotherapy of Pain* (Basbaum, A. I., Bessan, J.-M., Eds.), Wiley, Chichester, UK, p. 157 (1991).
- 2) Chung, M. W., Lim, H.-K., Jeon, Y.-J., Kim, H. J., Park, I.-S., Oh, W.-Y., Wang, S.-Y., Park, Y., Kang, J.-H., Kim, D.-S., Kim, J.-I., Oh, S. and Choi, K. H. : The development of tolerance to

- and dependence on morphine are reduced by co-administration of nalbuphine in rat. *Biochem Cell Biol.* **80**, 1 (2002).
- 3) Brock, J. H. : The physiology of lactoferrin. *Yakhak Hoeji* **46**, 276 (2002).
  - 4) Faucheux, B. A., Nillesse, N., Damier, P., Spik, G., Mouatt-Prigent, A., Pierce, A., Leveugle, B., Kubis, N., Hauw, J. J. and Agid, Y. L. : Expression of lactoferrin receptors is increased in the mesencephalon of patients with Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 9603 (1995).
  - 5) Leveugle, B., Faucheux, B. A., Bouras, C., Nillesse, N., Spik, G., Hirsch, E. C., Agid, Y. and Hof, P. R. : Cellular distribution of the iron-binding protein lactotransferrin in the mesencephalon of Parkinson's disease cases. *Acta Neuropathol.* (Berl) **91**, 566 (1996).
  - 6) Maffei, F. A., Heine, R. P., Whalen, M. J., Mortimer, L. F. and Carcillo, J. A. : Levels of antimicrobial molecules defensin and lactoferrin are elevated in the cerebrospinal fluid of children with meningitis. *Pediatrics.* **103**, 987 (1999).
  - 7) Hayashida, K., Takeuchi, T., Shimizu, H., Ando, K. and Harada, E. : Novel function of bovine milk-derived lactoferrin on antinociception mediated by  $\mu$ -opioid receptor in the rat spinal cord. *Brain Res.* **965**, 239 (2003).
  - 8) Hayashida, K., Takeuchi, T., Shimizu, H., Ando, K. and Harada, E. : Lactoferrin enhances opioid-mediated analgesia via nitric oxide in the rat spinal cord. *Am. J. Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **285**, 306 (2003).
  - 9) Fillebeen, C., Ruchoux, M. M., Mitchell, V., Vincent, S., Benaissa, M. and Pierce, A. : Lactoferrin is synthesized by activated microglia in the human substantia nigra and its synthesis by the human microglial CHME cell line is upregulated by tumor necrosis factor alpha or 1-methyl-4-phenylpyridinium treatment. *Brain Res Mol Brain Res.* **96**, 103 (2001).
  - 10) Hayashida, K., Takeuchi, T., Ozaki, T., Shimizu, H., Ando, K., Miyamoto, A. and Harada, E. : Bovine lactoferrin has a nitric oxide-dependent hypotensive effect in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr Comp. Physiol.* **286**, 359 (2004).
  - 11) Kamemori, N., Takeuchi, T., Hayashida, K. and Harada, E. : Suppressive effects of milk-derived lactoferrin on psychological stress in adult rats. *Brain Res.* **10;1029**(1), 34 (2004).
  - 12) Garthwaite, J., Garthwaite, G., Palmer, R. M. and Moncada, S. : NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.* **172**, 413 (1989).
  - 13) Garthwaite, J. : Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* **14**, 60 (1991).
  - 14) Millan, M. J. : Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* **66**, 355 (2002).
  - 15) Fields, H. L. and Basbaum, A. I. : Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: Wall, P. D., Melzack, R. (Eds.), Textbook of Pain, 4th Edition. Churchill Livingstone, Edinburgh 309-29 (1999).
  - 16) Somogy, J. and Llewellyn-Smith, I. J. : Patterns of colocalization of GABA, glutamate and glycine immunoreactivities in terminals that synapse on dendrites of noradrenergic neurons in rat locus coeruleus. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 219 (2001).
  - 17) Yaksh, T. L. : Central pharmacology of nociceptive transmission. In: Wall, P. D. and Melzack, R. (Eds.), Textbook of Pain, 4th Edition. Churchill Livingstone, Edinburgh. 253-308 (1999a).
  - 18) Kawabata, A., Fukuzumi, Y., Fukushima, Y. and Takagi, H. : Antinociceptive effect of L-arginine on the carrageenin-induced hyperalgesia of the rat: possible involvement of central opioidergic systems. *Eur. J. Pharmacol.* **21**, 153 (1992).
  - 19) Kaye, V. and Guilbaud, G. : The analgesic effects of morphine, but not those of the enkephalinase inhibitor thiorphan, are enhanced in arthritic rats. *Brain Res.* **267**, 131 (1983).
  - 20) Sharma, A. C., Kulkarni, S. K. and Nayar, U. : Effect of NMDA-receptor ligands on neocortical and hippocampal EEG activity of rat brain. *Indian J. Exp. Biol.* **29**, 744 (1991).
  - 21) Millan, M. J. : The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: focus on receptor multiplicity. In: Dickenson, A. and Besson, J. M. (Eds.), The Pharmacology of Pain. *Handbook of Experimental Pharmacology.* **130** Springer, Berlin. 385-446 (1997).
  - 22) Choe, H., Choi, Y. S., Kim, Y. H., Ko, S. H., Choi, H. G., Han, Y. J. and Song, H. S. : Epidural morphine plus ketamine for upper abdominal surgery: improved analgesia from preincisional versus postincisional administration. *Anesth. Anal.* **84**, 560 (1997).
  - 23) Abdel-Ghaffar, M. E., Abdulatif, M., Al-Ghamdi, A., Mowafi, H. and Anwar, A. : Epidural ketamine reduces postoperative epidural PCA consumption of fentanyl/bupivacaine. *Can. J. Anaesth.* **45**, 103 (1998).
  - 24) Himmelseher, S., Ziegler-Pithamitsis, D., Argiriadou, H., Martin, J., Jelen-Esselborn, S. and Kocks, E. : Small-dose S(+)-ketamine reduces postoperative pain when applied with ropivacaine in epidural anesthesia for total knee arthroplasty. *Anesth. Anal.* **92**, 1290 (2001).
  - 25) Cheng, Z. F., Fields, H. L. and Heinricher, M. M. : Morphine microinjected into the periaqueductal gray has differential effects on 3 classes of medullary neurons. *Brain Res.* **375**, 57 (1986).
  - 26) Osborne, P. B., Vaughan, C. W., Wilson, H. I. and Christie, M. J. : Opioid inhibition of rat periaqueductal grey neurones with identified projections to rostral ventromedial medulla *in vitro*. *J. Physiol.* **490**, 383 (1996).