

Düşük doz morfin hidroklorürün rat böbrekleri üzerindeki histolojik etkisi *

Ahmet ÖZTÜRK*, Ahmet SALBACAK**, İlhami ÇELİK***

* S.Ü.T.F. Üroloji Anabilim Dalı

** S.Ü.T.F. Anatomi Anabilim Dalı

*** S.Ü.V.F. Histoloji Anabilim Dalı, KONYA

ÖZET

Bu çalışmada, düşük doz morfin hidroklorür'ün rat böbreği üzerindeki etkileri ışık mikroskopik seviyede belirlendi. Çalışmada 15'i erkek ve 15'i dişi olmak üzere 30 adet Sprague Dawley ırkı rat kullanıldı. Her iki cinsten 5'er adedi kontrol grubu, 10'ar adedi ise deney grubu olarak ayrıldı. Kontrol grubu hayvanlara gūnaşırı derialtı yoluyla serum fizyolojik (5mg/kg dozunda), deney grubu hayvanlara ise 5 mg/kg dozunda morfin hidroklorür verildi. Deney sonunda hayvanlar genel anestezi altında tamponlu formolle (pH=7.4) perfūze edildi ve böbrekler çıkarılarak morfometrik ölçümleri (en, boy, kalınlık) yapıldı. Takiben, böbrek dokusu örneklerinden rutin histolojik tekniklerle preparatlar hazırlanarak 7µm kalınlığında kesitler alındı ve boyandı. Preparatlar ışık mikroskopuyla incelendi. Yapılan incelemelerde, düşük dozda verilen morfin hidroklorürün glomerüler yıkımlanma, proksimal ve distal tubuluslarda epitel nekrozu ve deskuamasyonuna, damarlarda hiperemi ve hemorajilere neden olduğu tespit edildi. Tespit edilen bozuklukların, böbrek tubulus epitel hücrelerinde detoksifikasyon enzimlerine sahip olmayan ratlara özgü olabileceği ve metabolizması insana yakın olan bir türde benzer bir çalışmanın yapılmasının yararlı olacağı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Morfin hidroklorür, rat böbreği, nefrotoksisite

SUMMARY

Histological influences of low-dose-morphine hydrochlorur on rat kidneys

In this study the effects of low-dose morphine hydrochlorur on rat kidney were determined at light microscopical level. A total of 30 Sprague Dawley rats from both sexes (15 male and 15 female) were used. Five rats from both sexes were served as controls, whereas 10 rats from each sex were used as experimental group. Control animals were injected subcutaneously with physiological saline (5mg/kg), the animals of experimental group were given morphine hydrochlorur at a dose of 5 mg/kg in every other day. At the end of the experiment, the animals were perfused with buffered formaline (pH=7.4) under anaesthesia, and kidneys were extirpated, and morphometrical measurements (thickness, height, length) were taken. Following, kidney samples were processed by means of routine histological techniques and the sections were taken at 7µm thickness, and stained. Slides were then examined using light microscope. The investigations have revealed that the low-dose-morphine hydrochlorur caused to glomerular destruction, epithelial necrosis and desquamation in both proximal and distal tubuli, vascular hyperemia and hemorrhagies. Based on the findings, it was concluded that the results of this study might be specific to the rat kidney which is devoid of detoxification enzymes in tubular epithelial cells and a study should be performed on an animal having similar metabolism with human.

Key Words: Morphine hydrochlorur, rat kidney, nephrotoxicity

Güçlü bir narkotik analjezik madde olan morfin, günümüzde ağrının kontrolünde yaygın olarak kullanılan ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından da

tavsiye edilen bir opioid'dir (1). Bu madde aynı zamanda uyuşturucu bağımlıları tarafından da yaygın olarak kullanılmaktadır.

Haberleşme Adresi: Yrd.Doç.Dr. Ahmet ÖZTÜRK, S.Ü.T.F. Üroloji Anabilim Dalı, 42080-KONYA

* Bu çalışma XVIII. Gevher Nesibe Tıp Günleri, III. Deneysel ve Klinik Araştırma Kongresinde 18-20 Mayıs 2000 tarihinde poster olarak sunulmuştur.

Morfinin asıl metabolize edildiği organ karaciğerdir. Ağırlıklı olarak morfin-3-glukronat (M3G) ve morfin-6-glukronat (M6G) metabolitlerine dönüştürülmekle birlikte, demetilasyon ile oluşan nor-morfin de yine glukronid konjugasyonu ile nor-morfin glukronat'a dönüştürülmektedir. İnsanlarda sülfat konjugatlarının da sentezlendiği (2) ve alınan tek dozluk morfinin %10 kadarının ise metabolize olmadan, idrarla atıldığı bildirilmiştir (3)

Memeli türleri arasında morfinin metabolizması bakımından önemli farklılıklar bulunmaktadır (4). Çoğu memeli türlerinin böbrek tubulus epitel hücrelerinde detoksifikasyon enzimlerinden UDP-glukronozil-transferaz, sülfotransferaz ve sitokrom P-450' nin varlığı bilinmektedir (5). Köpeklerde yapılan bir çalışmada Merrel ve arkadaşları (4), böbrekte de önemli oranda morfin glukuronidasyonunun gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Koyun böbreğinde de morfin hem metabolize edilmekte hem de ekskrete edilmektedir (6). Ratlarda ise böbrekte morfinin metabolize edilip edilmediği konusu henüz açıklığa kavuşmamıştır. Horton ve Pollack (7), rat böbreğinde morfinin metabolize edildiğini ileri sürmekte iseler de, bu türün izole böbrekleri üzerinde yapılan perfüzyon çalışmalarında (1) ve böbrek tubulus epitelinden hazırlanan mikrozomlarda yapılan çalışmalarda glukronat reaksiyonlarının gerçekleştiği gösterilememiştir (8). Bazı araştırmacılar ise, rat böbreğinde morfinin, glukronat teşkili yoluyla detoksifiye edilmesinden ziyade, nor-morfin ve diğer metabolitlere dönüştüğünü ileri sürmektedirler (9). Rat böbrek tubulus epitel hücrelerinden hazırlanan mikrozomlarla yapılan çalışma bulguları da bu görüşü desteklemektedir (10, 11).

Ratlarda morfinin metabolizması üzerinde çalışan Yamano ve arkadaşları (12) rat karaciğerinde, toksik bir morfin metaboliti olan morfinon'un oluştuğunu, bunun da glutatyon ile birleştirilerek safra ile atıldığını göstermişlerdir. Bu toksik metabolitin hangi oranda böbreklerden itrah edildiği konusunda ise yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Morfin ve türevlerinin en önemli atılım yolları safra ve idrardır. İdrar yoluyla böbreklerden atılımda glomerüler filtrasyon ve reabsorbsiyon, tübüler sekresyon ve hücre içi birikim olayları rol oynamaktadır (9). Böbrek yetmezliği olanlarda, metabolitlerden özellikle M6G' in plazma düzeyi yükselir. Kan-beyin

bariyerini de aşabilen bu metabolit, hala aktif bir türev olduğundan, opioid etkilerin ortaya çıkmasına ve so-lunum depresyonuna neden olmaktadır (1, 13, 14).

Morfin ve türevlerinin böbrekler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, uzun süre morfin kullanmak zoru-nda olanlar ile morfin bağımlıları için önemli olmakla birlikte; bu konudaki bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada karaciğer, sinir sistemi ve immün sistem (21,23) üzerinde de önemli zararlı etkilerinin olduğu bi-linen morfinin, ratların böbrek dokusu üzerindeki za-rarlı etkileri ışık mikroskopik seviyede araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hayvan Materyali: Aynı yaştaki (60-65 günlük) erkek ve dişi (15' er adet) Sprague Dawley Ratlar kontrollü aydınlatma (12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık) ve sıcaklıkta ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$) standart rat yemi ve sınırsız içme suyu verilerek, bir haftalık adaptasyon dönemine alındı. Süre sonunda erkek ve dişilerden rastgele seçilen 5' er hayvan kontrol grubu olarak ayrılırken, kalan 10 erkek ve 10 dişi rat da deney grubunu oluşturdu. Deney grubu hayvanlara 30 günlük deney süresi boyunca, subkütan yolla Morfin Hidroklorür 5mg/kg. dozunda gün aşırı olarak enjekte edildi. Kontrol grubuna ise aynı yolla aynı hacimde serum fizyolojik uygulandı.

Doku örneklerinin alınması ve incelenmesi

Eter anestezisi altında laparatomiyi takiben vena cava inferior'un bifurkasyon noktasından girilerek hayvanlar %10' luk tamponlu formol (pH:7.4) ile perfüze edildi. Takiben alınan sağ ve sol böbrekler yine tamponlu formol salin içine alınarak 24 saat süreyle tespit edildi. Her böbreğin en, boy ve kalınlıkları kumpas ile aynı kişi tarafından ölçüldü. Ölçüm sonunda böbrekler, hilustan geçen koronal kesitlerle ikiye ayrıldı. Elde edilen parçalar histolojik yöntemlerle dehidre edilerek parafinde bloklandı. Bloklardan alınan 7µm kalınlığındaki kesitler Periodic Asit Schiff (PAS) ve Crosmann' ın üçlü boyama yöntemleri (15) ile ayrı ayrı boyanarak, hazırlanan preparatlar Leitz Laborlux model ışık mikroskobu ile incelendi. Leitz Ortho Lux II model araştırma mikroskobuyla da gerekli görülen bölgelerin fotoğrafları çekildi.

BULGULAR

Çalışmada deney ve kontrol gruplarındaki böbreklerden elde edilen en, boy ve kalınlık ölçüm sonuçları Tablo 1' de sunulmuştur. Yapılan student-t

testine göre deney ve kontrol hayvanlarının böbrek boyutları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 1).

Yapılan ışık mikroskopik incelemelerde; kontrol grubu hayvanların böbreklerinde belirgin histolojik değişiklikler gözlenmemiş (Şekil 1) ve hem deney hem de kontrol grubu hayvanlarda amiloidozis tespit edilmemiştir. Morfin verilen hayvanlarda özellikle glomerüler dejenerasyon, atrofi ve yıkımlanma (Şekil 2,3), böyle glomeruluslarda, kontrol grubundakilerle (Şekil 4) karşılaştırıldığında glomerüler bazal membranın belirgin kalınlaşması (Şekil 5), proksimal ve distal tubulusların epitel hücrelerinde vakuoler dejenerasyon, nekroz ve deskuamasyon (Şekil 6), az sayıdaki korpuskulum renalis etrafında mononükleer hücre infiltrasyonu ile kortikal ve medüller kan damarlarında da hiperemi ve hemorajiler (Şekil 7) gözlemlendi. Özellikle subkortikal bölge glomeruluslarındaki dejenerasyon ve yıkımlanma daha fazla idi. Bazı vakalarda tubulus lümenlerinde retansiyona bağlı olarak ultrafiltrat birikimi izlendi. Etkilenen vakalarda kortikal bölgede bağ dokusunda kısmi artış dikkati çekti. Az sayıdaki vakada pelvis renalisin lamina propriyasında mononükleer hücre infiltrasyonu gözlemlendi. Anılan değişikliklerle bunların izlendiği vaka sayısı Tablo 2' de verilmiştir.

TARTIŞMA

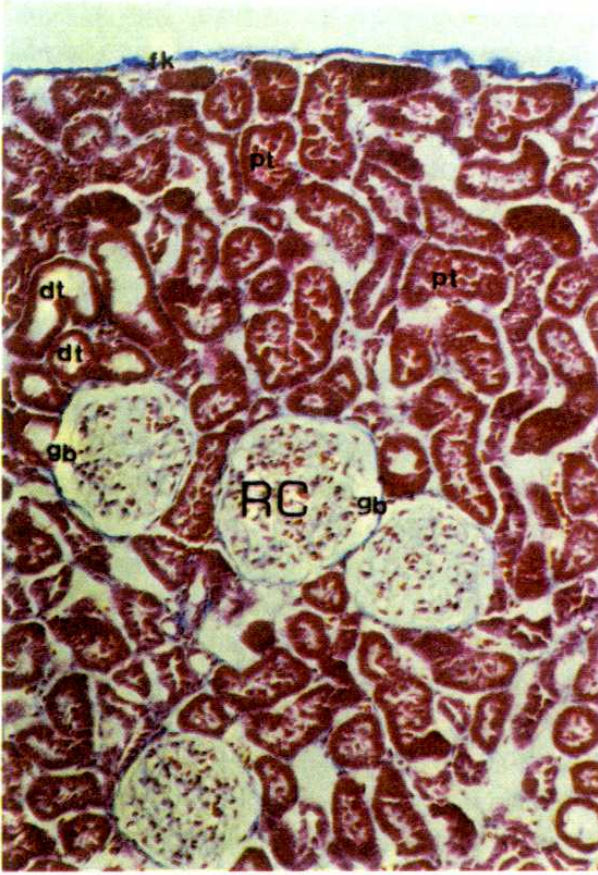
Hem fetal (16) hem de erişkin (17) insan böbrek epitel hücrelerinden hazırlanan mikrozomlarda, koyun böbreğinde (6) ve tavşanların izole böbrek proksimal tubulus epitel hücrelerinde (18) yapılan çalışmalarda,

bu türlerin böbreklerinde glukronit konjugasyon reaksiyonlarının gerçekleştiği tesbit edilmiştir. Köpeklerde de böbreklerde glukronit teşkili yoluyla detoksifikasyon gerçekleşmektedir(19). Rat böbreğinde yapılan çalışma bulguları ise, bu türde, glukronitlerin oluşmadığını göstermektedir(8,9). Bu sonuçlar, ratlarda morfinin nefrotoksitesinin diğer türlerden daha şiddetli olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim insanlarda tek doz halinde alınan morfinin %10' unun metabolize olmadan böbreklerle atıldığı (3) halde, Sprague-Dawley ratlarında total sistemik morfin atılımının %28,5' inin böbrekler yoluyla gerçekleştiği hesaplanmıştır (7). Her ne kadar Yamano ve ark. (12), rat karaciğerinde oluşan toksik bir morfin metaboliti olan morfinonun, glutatyon-adduct'u halinde safra ile ekskrete edildiğini bildirmekte iseler de, bunun böbreklerle itrah edilip edilmediği hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

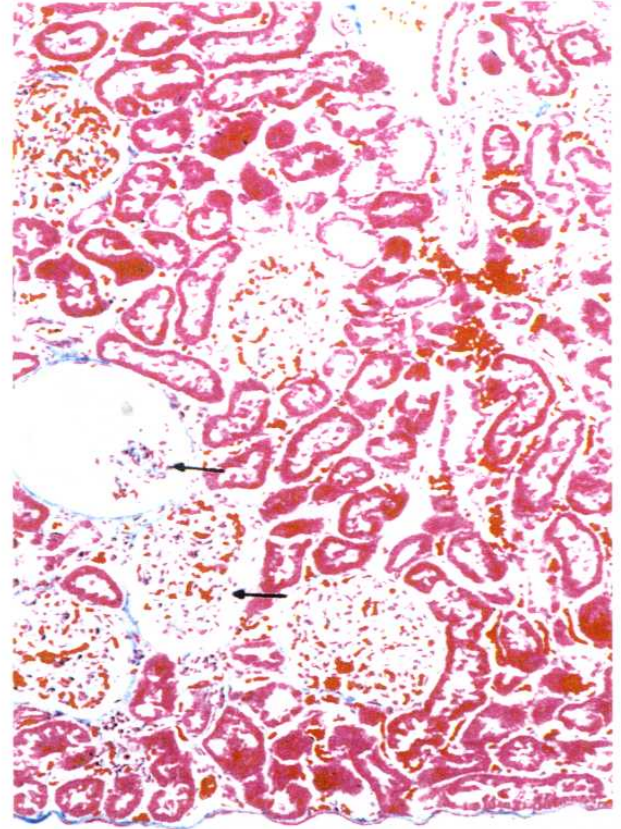
Bu çalışmada elde edilen ışık mikroskopik bulgular, 5 mg/kg dozunda gün aşırı 20 gün süreyle morfin verilen ratlarda böbreğin idrarın yapımında rol oynayan nefronlarının başlangıç bölümlerinde önemli dejenerasyon ve yıkımlanmaların meydana geldiğini ortaya koymaktadır. Bozuklukların glomeruluslar ile proksimal ve distal tubuluslarda yoğunlaşması, muhtemelen bu bölgelerin, daha yüksek yoğunluktaki morfin ve metabolitlerine maruz kalan bölgeler olmaları; reabsorbsiyon ve sekresyon olayları ile idrar oluşumunda aktif olarak rol almalarının bir sonucu olabilir. Bilindiği gibi morfinin renal klirensinde ultrafiltrasyon, reabsorbsiyon, sekresyon ve int-

Tablo 1. Çalışmada kullanılan ratlardan elde edilen böbrek boyutları ölçüm sonuçları.

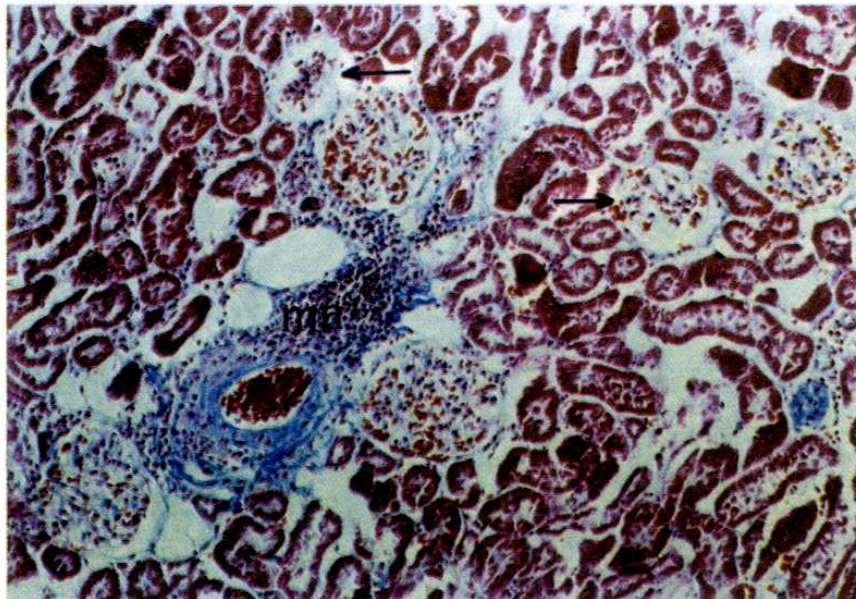
| GRUPLAR | En (mm ±SD) | | Boy (mm ±SD) | | Kalınlık(mm ±SD) | |
|-----------|-------------|----------|--------------|-----------|------------------|---------|
| | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ |
| n=10 | | | | | | |
| Kontrol | 11,3 ±2,4 | 9,8 ±0,5 | 17,2±1,1 | 16,7±1,0 | 8,4 ±0,4 | 7,9±0,5 |
| Deney | 9,7 ±0,7 | 9,3±0,6 | 17,2±0,7 | 16,8 ±0,5 | 8,3±0,5 | 7,8±0,3 |
| Student-t | p=0,41 | p=0,12 | p=0,94 | p=0,84 | p=0,84 | p=0,38 |
| | t=0,9 | t=1,7 | t=0,1 | t=0,21 | t=0,20 | t=0,92 |



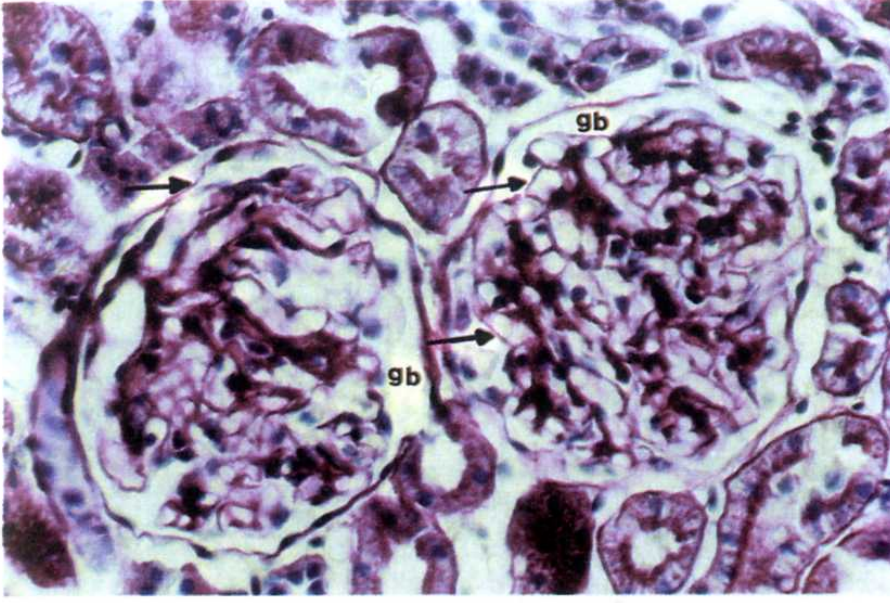
Şekil 1. Kontrol grubu bir ratın böbrek korteksi: Fibröz kapsül (fk) altında proksimal tubulus (pt) ve distal tubulus (dt)' lardan oluşan dar bir bölge ve normal yapıdaki korpuskulum renisler (RC) ile bunların geniş glomeruler boşlukları (gb), glomerulusları izlenmekte. Üçlü boyama., x205.



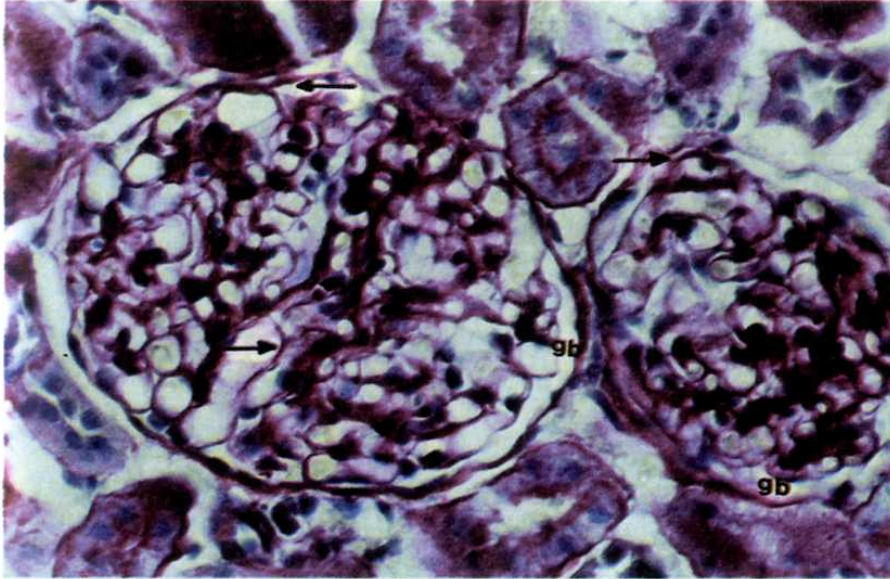
Şekil 2. Deney grubu bir ratın böbrek korteksi. Genel bir hiperemi ve lokal hemoraji odakları ile birlikte bazı glomeruluslarda dejenerasyon ve atrofi (oklar) izlenmekte. Tubulus lümenleri, nekroze epitel hücreleri döküntüleri içermekte ve bağ dokusunda kısmi bir artış dikkati çekmekte. Üçlü boyama., x205.



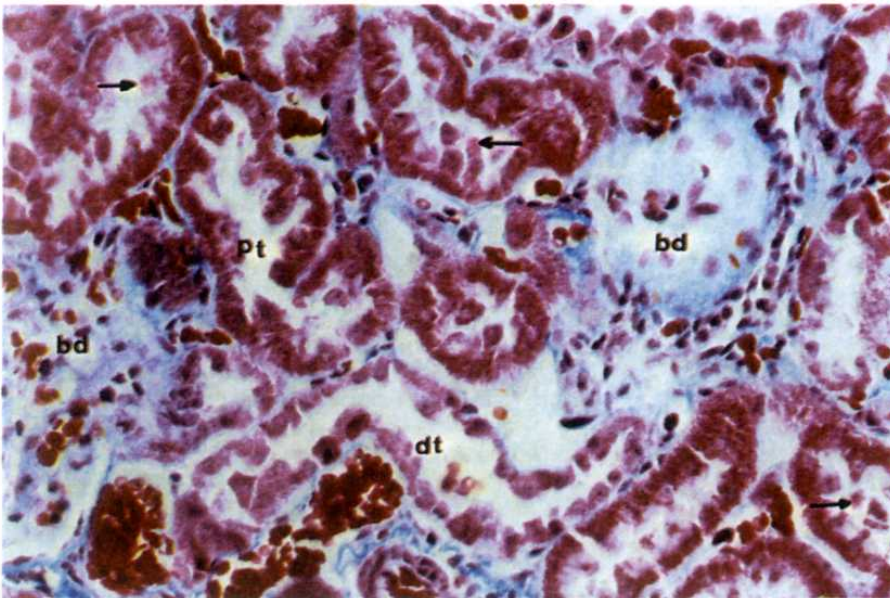
Şekil 3. Deney grubu bir ratın böbreğinin korteks bölümü. Dejenere glomeruluslar (oklar) ve mononükleer hücre infiltrasyonu (mn) görülmekte. Üçlü boyama., x205.



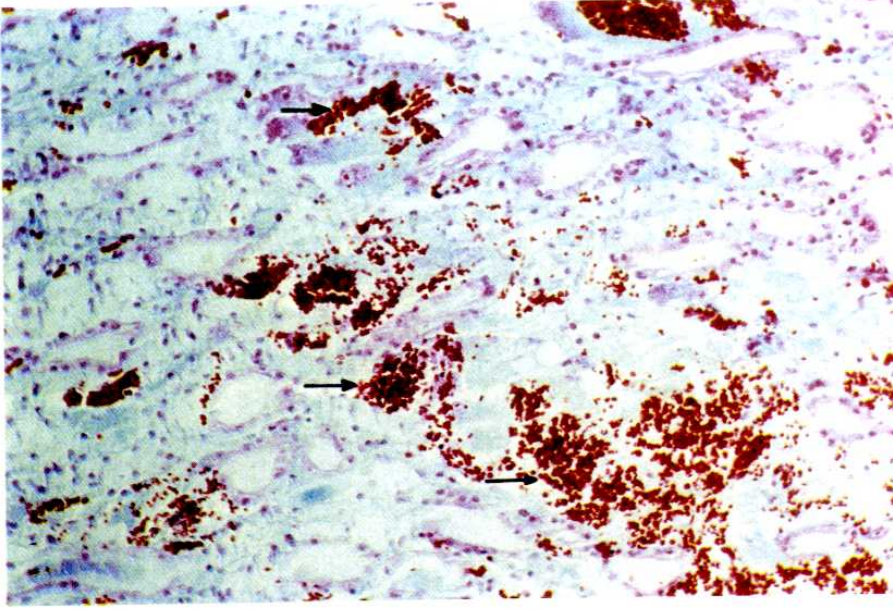
Şekil 4. Kontrol grubu bir ratın böbreğinin korteks bölümü. Normal şekil ve yapıdaki korpuskulum renisler ve bunların geniş glomeruler boşlukları (gb) ile ince glomeruler bazal membranlar (oklar) ayırt edilmekte. PAS reaksiyonu., x640.



Şekil 5. Deney grubu bir ratın böbreğinin korteks bölümü. Her iki korpuskulum renislerde bazal membranlar kalınlaşmış (oklar), glomeruler boşluklar (gb) daralmış durumda. Sağdaki korpuskulum reniste kısmi atrofi belirgin. PAS reaksiyonu., x640.



Şekil 6. Deney grubu bir ratın böbreğinin korteks bölümü. Proksimal tubuluslar(pt) ve distal tubulusların (dt) lümenlerindeki dejenere epitel döküntüleri (oklar) ile genel bir hiperemi tablosu ve yıkılanan glomeruler boşluklara bağ dokusunun (bd) infiltrasyonu izlenmektedir. Üçlü boyama., x460.



Şekil 7. Deney grubu bir ratın böbreğinin medullası. Yaygın kanama odakları (oklar) izlenmekte. Üçlü boyama., x205.

Tablo 2. Deney grubu hayvanlarda böbreklerde saptanan histolojik değişiklikler ve bunların görülme sıklıkları.

| Histolojik Bulgular | Erkek | Dişi |
|--|-------|------|
| 1.Distal tubuluslarda deskuamasyon | 3 | 4 |
| 2.Distal tubuluslarda nekroz | 3 | 4 |
| 3.Proksimal tubulus içinde yoğun bazofilik içerik | 1 | 4 |
| 4.Proksimal tubuluslarda deskuamasyon | 4 | 4 |
| 5.Proksimal tubuluslarda nekroz | 3 | 3 |
| 6.Glomerüler bazal membran düzensizliği | 5 | 7 |
| 7.Glomerüler bazal membranda kalınlaşma | 8 | 8 |
| 8.Glomerüler nekroz | 4 | 4 |
| 9.Korpuskulum renalis çevresinde MNH infiltrasyonu | 2 | 0 |
| 10.Korteks medulla sınırında hemoraji | 6 | 3 |
| 11.Kortekste bağ dokusu artışı | 1 | 4 |
| 12.Kortekste incelme | 1 | 1 |
| 13.Kortikal kanlanmada artış | 8 | 5 |
| 14.Medüller kanlanmada artış | 5 | 7 |
| 15.Papilla renalisteki kollektör tüp lümeninde ağimsı obstrüksiyon | 2 | 0 |
| 16.Pelvis renalis epitelinde yangı hücresi infiltrasyonu | 5 | 5 |
| 17.Distal tübülüs epitelinde yassılma | 1 | 0 |
| 18.Glomerulitis | 2 | 3 |
| 19. Distal tubuluslarda dilatasyon | 0 | 1 |
| 20. Proksimal tubuluslarda dilatasyon | 0 | 2 |

rasellüler akümülyasyon olayları önemli rol oynamaktadır (9, 1).

Morfin metabolizması üzerinde yapılan bir çalışmada (9), ratlarda safra ile elimine edilen türevlerin %72,8' inin M3G; %21,6 sının ise morfinin bir N-demetil türevi olan nor-morfinin glukronit'le konjüge formu olduğu tesbit edilmiştir. Bu sonuca göre bu türde oluşan M6G' nin önemli bir kısmının böbrekler yolu ile atılımı söz konusudur. Gerek böbrek yetmezliğinin bulunması, gerekse de uzun süreli kullanım sonucu morfin ve türevlerinin böbrekte neden olduğu hasar, M6G' nin birikimine neden olabilir. M6G, morfinin merkezi sinir sistemi üzerindeki etkilerinden sorumlu olan metabolitidir ve özellikle respiratuar sistem üzerinde depresyona neden olmaktadır (1, 20).

Morfinin immün sistem üzerinde de önemli depressif etkilerinin bulunduğu bilinmektedir. Etkisi, immün sistem hücrelerinin fonksiyonları üzerinde daha belirgindir. Hilburger ve ark. (21), morfin verilen hayvanlarda dalaktaki makrofaj ve B-Lenfosit oranlarında önemli düşüşler belirlerken; T lenfosit oranlarında belirgin artışlar gözlemişlerdir. CD4+ ve CD8+ T-Lenfosit oranlarında ise değişiklik saptanmamıştır. Periton sıvısındaki makrofaj sayısında artış olurken, B-Lenfosit sayısında azalma meydana gelmektedir. Fecho ve ark. (22) morfinin,

dalak lenfositlerinin ConcanalinA 'ya (ConA) karşı mitojenik yanıtlarında belirgin düşüşlere neden olduğunu, Fecho ve Lysle (23) ise, mitojenlere karşı oluşan lenfosit yanıtının düşmesiyle birlikte, doğal katil hücrelerin (NK) sitotoksitelerinde de belirgin düşüşlerin oluştuğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada deney grubundaki 16 hayvanda, önemli bir kısmı pelvis renaliste yoğunlaşan enfeksiyon bulgularına rastlanmıştır. Bu durum, morfinin immünodepressif etkilerinin sonucu olarak ortaya çıkmış olabilir.

SONUÇ

Bu çalışmada elde edilen bulgular, ratlarda morfinin düşük dozlarda bile nefrotoksitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu durum, rat böbrek tubulus epitellerinde detoksifikasyon enzimlerinin bulunmamasıyla açıklanabilir. Diğer memeli türlerinde, morfinin doğal formunun ve metabolitlerinin nefrotoksitesilerinin olup olmadığının belirlenmesi, uzun süreli ağrı tedavisinde ve bağımlılarda oldukça önem arz etmektedir. Bu nedenle farklı dozlarda alınan morfinin böbrekler üzerindeki etkilerinin belirlenebilmesi için metabolizması insana yakın olan ve böbrek tubulus epitellerinde detoksifikasyon enzim sistemlerine sahip olan diğer memeli türlerinde de benzer çalışmaların yapılmasının yararlı olacağını düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Somogyi AA, Nation RL, Olweny C, Tsirgiotis P, van Crugten J, Milne RW ve ark. Plasma concentrations and renal clearance of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in cancer patients receiving morphine. *Clinic Pharmacokinetics* 1993;24(5):413-20.
2. Kayaalp SO. Tıbbi Farmakoloji: Opioid analjeziklerin sınıflandırması, 2. Cilt, 8. Baskı, Hacettepe-Taş Kitabevi; 1998:p. 986-87.
3. Milne R, Nation RL, Somogyi AA, Bochner F and Griggs WM. The influence of renal function on the renal clearance of morphine and its glucuronide metabolites in intensive care patients. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1992; 34: 53-59.
4. Merrel WJ, Gordon L, Wood MB, Shay S, Jackson EK and Wood M. The effect of halothane on morphine disposition: Relative contributions of the liver and kidney to morphine glucuronidation in the dog. *Anesthesiology* 1990; 72: 308-14.
5. Hjelle JT, Hazelton GA, Klaassen CD and Hjelle JJ. Glucuronidation and sulfation in rabbit kidney. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1986; 236: 150-6.
6. Milne RW, Mc Lean CF, Nation RL, Runciman WB, Rutten AJ and Somogyi AA. Comparative disposition of morphine-3-glucuronide during separate intravenous infusions of morphine and morphine-3-glucuronide in sheep. Importance of the kidney. *Drog Metab Dispos* 1995; 23: 334-42.
7. Horton TL and Pollack GM. Enterohepatic recirculation and renal metabolism of morphine in the rat. *J Pharm Sci* 1991; 80 : 1147-52.
8. Van Crugten JT, Sallustio BC, Nation RL and Somogyi AA. Renal tubular transport of morphine, morphine-6-glucuronide and morphine-3-glucuronide in the isolated perfused rat kidney. *Drog Metab Dispos* 1991;19: 1087-92.
9. Shanahan KM, Evans AM and Nation RL. Disposition of morphine in the isolated perfused kidney: Concentration ranging studies. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1997;282: 1518-25.
10. Rush GF and Hook JB. Characteristics of renal UDP-Glucuronyltransferase. *Life Sciences* 1984; 35: 145-53.

11. Ratcliffe PJ, Sear JW, Hand CT and Moore RA. Morphine transport in the isolated perfused rat kidney. *Kidney Int.* 1985; 28: 280-5.
12. Yamano S, Takahashi A, Todaka T and Toki S. In vivo and in vitro formation of morphinone from morphine in rat. *Xenobiotica* 1997;27(7): 645-56.
13. Bodd E, Jacobsen D, Lund E, Ripel A, Morland J and Wiik-Larsen E. Morphine-6-glucuronide might mediate the prolonged opioid effect of morphine in acute renal failure. *Human and Experimental Toxicology* 1990; 9:317-21.
14. Osborne R, Joel S and Slevin M. Morphine intoxication in renal failure: The role of morphine-6-glucuronide. *British Medical Journal* 1986;292: 1548-9.
15. Bradbury P, Gordon KC. "Connective tissues and stains" in Theory and practice of histological techniques, In: Bancroft JD, Stevens A editors. 3rd Edition, Churchill Livingstone, Medical Division of Longman Groupe UK. 1990.
16. Pacifici GM and Rane A. Renal glucuronidation of morphine by the human foetus. *Acta Pharmacol Toxicol* 1982; 50: 155-60.
17. Cappiello M, Giullani L and Pacifici GM. Distribution of UDP-glucuronosyltransferase and its endogenous substrate uridine 5'-diphosphoglucuronic acid in human tissues. *European Journal of Clinical Pharmacology* 1991; 41:345-50.
18. Schali C and Roch-Ramel F. Transport and metabolism of [3H] morphine in isolated, nonperfused proximal tubular segments of the rabbit kidney. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1982;223: 811-5.
19. Jacqs E, Ward S, Johnson R, Schenker S, Gerkens J and Branch RA. Extrahepatic glucuronidation of morphine in the dog. *Drog Metab Dispos* 1986;14: 627-30.
20. Milne RW, Mc Lean CF, Mather LE, Nation RL, Runciman WB, Rutten AJ ve ark. Influence of renal failure on the disposition of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in sheep during intravenous infusion with morphine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1997;282: 779-86.
21. Hilburger ME, Adler MW, Rogers TJ and Eisenstein TK. Morphine alters macrophage and lymphocyte populations in the spleen and peritoneal cavity. *Journal of Neuroimmunology* 1997;80: 106-14.
22. Fecho K, Maslonek KA, Dykstra LA and Lysle DT. Mechanisms whereby macrophage-derived nitric oxide is involved in morphine-induced suppression of splenic lymphocyte proliferation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1995;272: 477-83.
23. Fecho K and Lysle DT. Phenotypic analysis of splenocyte subsets following acute morphine treatment in the rat. *Cellular Immunology* 1999;195:137-46.