

The effect of acute administration of quinidine, dextromethorphan and combination of dextromethorphan/quinidine on pentylenetetrazole-induced clonic and tonic seizure thresholds in mice

Jamali H¹, Heydari A^{2*}

1- Student Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R. Iran.

2- Physiology Research Center, Institute for Basic Sciences, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R. Iran.

Received: 2019/02/13 | Accepted: 2019/05/18

Abstract:

Background: Dextromethorphan (DM) as a non-opioid anti-cough has neuroprotective effects. Combination of DM with quinidine decreases rapid metabolism of DM to dextropropranolol (DX). This study aimed to examine the effects of acute administration of quinidine, DM and combination of dextromethorphan/quinidine (DM/Q) on pentylenetetrazole (PTZ)-induced clonic and tonic seizure thresholds in mice.

Materials and Methods: A total of 84 male mice of the NMRI strain (20-25 g, n=7 in each group) were used in this study. Different doses of DM (5, 10, 25 and 50 mg/kg), quinidine (10, 20, and 30 mg/kg) and DM/Q (5/20, 10/20, 25/20, and 50/20 mg/kg) were intraperitoneally administrated 30 min before the seizure induction. Intravenous infusion of PTZ was used to induce seizure induction and latencies to the occurrence of general clonus and tonic hind limb extension were recorded and converted to the seizure threshold dose.

Results: Quinidine at a dose of 30 mg/kg significantly increased the threshold of tonic seizure ($P<0.05$). DM at doses of 25 and 50 mg/kg significantly increased threshold of clonic ($P<0.05$) and tonic ($P<0.001$) seizures. DM/Q at dose of 50/20 mg/kg significantly decreased the threshold of clonic and tonic seizures ($P<0.001$).

Conclusion: According to the findings of this study, different effects of DM on clonic and tonic seizure thresholds may represent different sensitivities of forebrain and hindbrain seizure circuitry to DM. Also, decreased effect of DM in the presence of quinidine may also be due to a change in the metabolism of DM.

Keyword: Dextromethorphan, Quinidine, Pentylenetetrazole, Seizure, Mice

***Corresponding Author:**

Email: heydariazh@gmail.com

Tel: 0098 315 554 0021

Fax: 0098 315 554 1112

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2019; Vol. 23, No 3, Pages 231-240

Please cite this article as: Jamali H, Heydari A. Effect of acute administration of quinidine, dextromethorphan and combination of dextromethorphan/quinidine on pentylenetetrazole (PTZ)-induced clonic and tonic seizure thresholds in mice. *Feyz* 2019; 23(3): 231-40.

اثر تجویز حادّ دکسترومتورفان، کوئینیدین و ترکیب دکسترومتورفان/ کوئینیدین بر آستانه تشنجات کلونیک و تونیک ناشی از پنتیلن تترازول (PTZ) در موش سوری

حسن جمالی^۱، اژدر حیدری^{۲*}

خلاصه:

سابقه و هدف: دکسترومتورفان به عنوان یک ضدسرفه غیرایپوئیدی، اثرات حفاظت عصبی دارد. ترکیب دکسترومتورفان با کوئینیدین، متابولیزه شدن سریع دکسترومتورفان به دکستروفان را کاهش می دهد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر تجویز حادّ دکسترومتورفان، کوئینیدین و ترکیب دکسترومتورفان/ کوئینیدین بر آستانه تشنجات کلونیک و تونیک ناشی از پنتیلن تترازول (PTZ) در موش سوری می باشد.

مواد و روش ها: در مجموع، ۸۴ سر از موش های سوری نر نژاد NMRI (۲۵-۲۰ گرم، ۷ سر موش در هر گروه) در این مطالعه استفاده شدند. غلظت های مختلف دکسترومتورفان (۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، کوئینیدین (۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و ترکیب دکسترومتورفان/ کوئینیدین (۲۰/۵، ۲۰/۱۰، ۲۰/۲۵ و ۲۰/۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) ۳۰ دقیقه قبل از القای تشنج به صورت داخل صفاقی تجویز شدند. از انفوزیون داخل وریدی PTZ برای القای تشنج استفاده شد و مدت زمان وقوع کلونوس عمومی و کشیدگی تونیک اندام عقبی، ثبت و به دوز آستانه تشنج تبدیل شد.

نتایج: غلظت ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم کوئینیدین آستانه تشنج تونیک را به صورت معنی داری افزایش داد ($P < 0.05$). غلظت های ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم دکسترومتورفان آستانه تشنج کلونیک ($P < 0.05$) و تونیک ($P < 0.001$) را به صورت معنی داری افزایش دادند. غلظت ۲۰/۵۰ دکسترومتورفان/ کوئینیدین آستانه تشنج کلونیک و تونیک را در مقایسه با گروه دکسترومتورفان کاهش داد ($P < 0.001$).

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که اثر متفاوت دکسترومتورفان بر آستانه تشنج کلونیک و تونیک ممکن است به خاطر تفاوت در حساسیت مغز قدامی و مغز خلفی نسبت به دکسترومتورفان باشد. همچنین کاهش اثر دکسترومتورفان در حضور کوئینیدین ممکن است به خاطر تغییر در متابولیسم دکسترومتورفان باشد.

واژگان کلیدی: دکسترومتورفان، کوئینیدین، پنتیلن تترازول، تشنج، موش سوری

دو ماه نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و سوم، شماره ۳، مرداد و شهریور ۹۸، صفحات ۲۴۰-۲۳۱

مقدمه

دکسترومتورفان (۳- متوکسی-۱۷- متیل - مورفینان) یک مشتق غیرایپوئیدی مورفینان است که به طور وسیعی به عنوان یک داروی ضدسرفه مورد استفاده قرار گرفته است [۳]. نتایج مطالعات انجام شده پیشنهاد می کنند که دکسترومتورفان اثرات محافظت کننده در مدل های مختلف آسیب ناشی از ترومای مغزی Traumatic brain injury (TBI)، سکنه، درد و تشنج دارد [۴-۷]. دکسترومتورفان در بدن تحت تأثیر اولین مرحله از متابولیسم، توسط آنزیم کبدی سیتوکروم p450 (CYP2D6) به متابولیت های خود که مهم ترین آن دکسترومتورفان است، تبدیل می شود [۸]. البته اخیراً دکسترومتورفان در ترکیب با کوئینیدین (یک مهارکننده آنزیم CYP2D6) برای درمان اختلالاتی نظیر بی ثباتی عاطفی Pseudobulbar affect (PBA) مورد استفاده قرار گرفته است که دارای تأییدیه از اداره غذا و داروی آمریکا Food and Drug Administration (FDA) می باشد و در حال حاضر نیز شروع به استفاده از ترکیب دکسترومتورفان/ کوئینیدین در انواع آزمایشات بالینی مرتبط با سیستم عصبی مرکزی (CNS) Central nervous system کرده اند [۹]. کوئینیدین با مهار CYP2D6 باعث افزایش غلظت پلاسمایی

صرع، یکی از شایع ترین اختلالات عصبی می باشد که میزان شیوع آن ۱ درصد از جمعیت جهان گزارش شده است. این بیماری با تشنج های خودبه خودی برگشت پذیر (SRS) Spontaneous recurrent seizures همراه است. به همین جهت کنترل تشنج، هدف اولیه در بیماران مبتلا به صرع می باشد [۱]. اکثر داروهای موجود که در حال حاضر مورد استفاده قرار می گیرند، دارای عوارض جانبی می باشند و برای ۳۰ درصد از افراد مبتلا به صرع فاقد اثربخشی هستند. از این رو نیاز به عوامل ضدصرعی جدید با فعالیت ضد تشنجی بهتر و عوارض جانبی کمتر همچنان ضروری است [۲].

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، کمیته تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
۲. دانشیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

تلفن: ۰۳۱ ۵۵۵۴۰۰۲۱ | دورنویس: ۰۳۱ ۵۵۵۴۱۱۱۲

پست الکترونیک: heydariash@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۲۴ | تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۲/۲۸

کلونیک و تونیک ناشی از پنتیلن ترازول (PTZ) شود. با توجه به توزیع متفاوت گیرنده‌های NMDA در مغز قدامی و مغز خلفی، این احتمال وجود دارد که اثر دکسترومتورفان بر تشنج کلونیک که منشأ آن مغز قدامی است، با تشنج تونیک که منشأ آن مغز خلفی است [۳۰]، با یکدیگر متفاوت باشد. از آنجایی که تاکنون مطالعه‌ای جهت بررسی نقش دکسترومتورفان و یا ترکیب دکسترومتورفان/ کوئینیدین بر آستانه تشنج کلونیک و تونیک صورت نگرفته است، بنابراین هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر تجویز حاد غلظت‌های مختلف دکسترومتورفان به‌تنهایی و یا به‌صورت ترکیب با کوئینیدین بر آستانه تشنج کلونیک و تونیک ناشی از PTZ در موش سوری بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ۸۴ سر موش سوری نر نژاد NMRI در محدوده وزنی ۳۰-۲۵ گرم و با سن حدود ۶-۵ هفته استفاده شد. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی- تاریکی با دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۰-۵۰ درصد و در قفس‌های مخصوص ۷ تایی و همچنین با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. حیوانات مورد مطالعه به‌طور تصادفی به ۱۲ گروه ۷ تایی شامل یک گروه کنترل دریافت‌کننده نرمال سالین (به عنوان حلال داروها) و گروه‌های آزمایشی دریافت‌کننده کوئینیدین (۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، دکسترومتورفان (۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و دکسترومتورفان/ کوئینیدین (۲۰/۱۰، ۲۰/۲۵ و ۲۰/۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم شدند. با استفاده از نتایج آزمایشات اثر کوئینیدین بر آستانه تشنج، دوز غیر مؤثر کوئینیدین جهت ترکیب با دکسترومتورفان در حین پژوهش یافته و انتخاب خواهد شد. تجویز نرمال سالین یا داروها در گروه‌های کنترل و آزمایشی به‌صورت داخل صفاقی و ۳۰ دقیقه قبل از انفوزیون PTZ انجام شد. کلیه حیوانات مورد مطالعه از حیوان‌خانه مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان تهیه شد و همه مراحل آزمایش شامل مراحل تکثیر، انجام آزمایشات معدوم‌کردن حیوانات، مطابق با قوانین کار با حیوانات آزمایشگاهی و اصول مصوب کمیته اخلاق معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان صورت گرفت. جهت ایجاد مدل حیوانی تشنج از داروی PTZ استفاده شد که با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در نرمال سالین حل شد و با سرعت ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه در ورید جانبی دم تمام حیوانات گروه‌های کنترل و آزمایش تزریق شد. در شروع هر آزمایش حیوان توزین شده و در زمان آزمایش دم حیوان به‌مدت یک دقیقه در آب گرم

دکسترومتورفان می‌شود، به‌طوری‌که مطالعات فارماکوکینتیک برای ارزیابی این ترکیب (دکسترومتورفان هیدروبروماید/ کوئینیدین سولفات) افزایش قابل توجهی را در کارایی زیستی دکسترومتورفان در حضور کوئینیدین نشان دادند [۱۰]. دکسترومتورفان آگونیستی بر روی گیرنده Sigma-1 دارد که یک گیرنده وابسته به G- پروتئین است و آگونیست‌های با تمایل بالا برای این گیرنده اثر ضد تشنجی نشان داده‌اند [۱۱، ۱۲]. از طرف دیگر دکسترومتورفان آنتاگونیست غیررقابتی گیرنده‌های ان-متیل-دی-آسپاراتات (NMDA) N-methyl-D-aspartate است که سه زیرواحد NR1، NR2 و NR3 دارد و لیگاند اصلی آن گلوتامات است که اتصال آن به گیرنده، سبب افزایش یون کلسیم و فعال شدن کینازهای وابسته به آن می‌شود. به دلیل تحریک‌بودن گیرنده NMDA، بیشتر در مطالعات، مهارکننده‌های این گیرنده اثر ضد تشنجی نشان داده‌اند [۱۳، ۱۴]. اثرات ضد تشنجی دکسترومتورفان در محدوده دوزهای درمانی آن در انواع مختلف مدل‌های حیوانی تشنج از جمله تشنج‌های ناشی از NMDA [۱۵]، پنتیلن ترازول Pentylentetrazole (PTZ) [۱۶، ۱۷]، کاینیک اسید (KA) [۱۸]، ماکزیمال الکتروشوک (MES) Maximal electroshock [۱۹] و کیندلینگ آمیگدال [۲۰] گزارش شده است. با این حال مطالعاتی هم وجود دارند که در آنها استفاده از غلظت‌های بالای دکسترومتورفان برخلاف سایر مهارکنندگان گیرنده NMDA با افزایش حساسیت به تشنج همراه بوده است [۲۴-۲۱]. با توجه به مطالعات انجام‌شده در این زمینه، به نظر می‌رسد دوز مورد استفاده دکسترومتورفان و مدل مورد استفاده در ایجاد تشنج از عوامل مهم در اثر تشنج‌زا یا ضد تشنج دکسترومتورفان باشند. در مطالعاتی که اثر ضد تشنجی دکسترومتورفان را گزارش کرده‌اند، مکانیسم دقیقی برای این اثر ضد تشنجی ذکر نشده است. با این حال ممکن است بخشی از اثرات ضد تشنجی دکسترومتورفان ناشی از مهار گیرنده‌های NMDA یا گیرنده‌های Sigma-1 باشد [۲۷-۲۵] و نیز مشخص شده که پراکندگی زیرواحد‌های گیرنده NMDA در مغز قدامی و مغز خلفی متفاوت است [۲۸]. به نظر می‌رسد بخش دیگری از اثر دکسترومتورفان بر روی تشنج، ممکن است ناشی از متابولیت اصلی آن (دکستروفان) باشد، زیرا در برخی از مطالعات برای دکستروفان اثرات ضد تشنجی گزارش [۱۵، ۱۹] و نیز مشخص شده است که دکستروفان اثر آنتاگونیستی قوی‌تری بر روی گیرنده‌های NMDA دارد [۲۹]. در مجموع این احتمال وجود دارد که ترکیب دکسترومتورفان با کوئینیدین سبب کاهش متابولیسم دکسترومتورفان و متعاقب آن افزایش نسبت دکسترومتورفان به دکستروفان و در نتیجه تغییر آستانه تشنجات

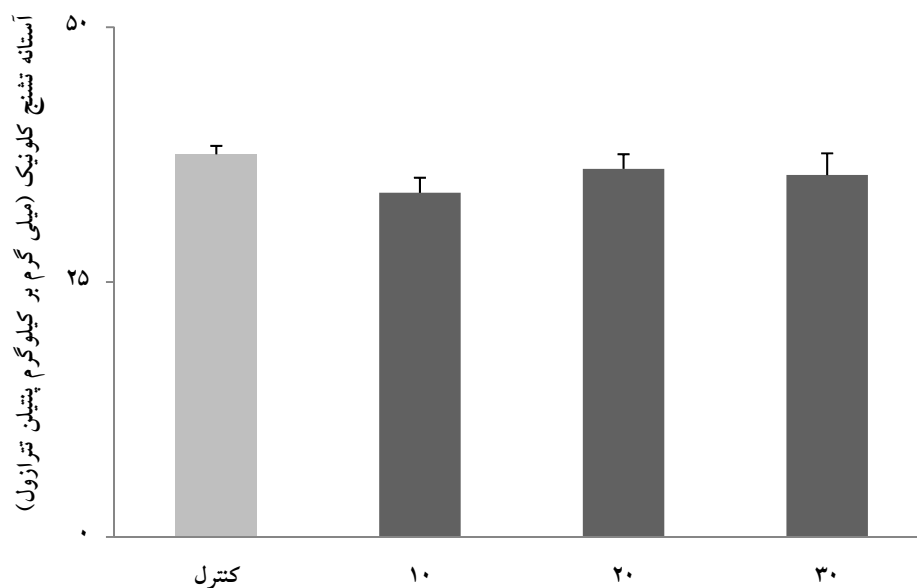
با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شد تا وریدهای دم متسع شوند. سپس، حیوان در مقیدکننده قرار داده شده و سر سوزن دندان‌پزشکی شماره ۳۰ متصل به لوله رابط پلی‌اتیلنی شماره ۱۰ وارد ورید شده، به پمپ تزریق وصل می‌شد. در صورت مشاهده خون و تصدیق محل ورود، سوزن با استفاده از چسب ضد حساسیت به دم حیوان فیکس و به حیوان اجازه داده می‌شد تا در محفظه مخصوص که برای مشاهده حیوان طراحی شده بود، آزادانه حرکت کند. با شروع انفوزیون و به کار افتادن همزمان کرومومتر، محلول ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر PTZ با سرعت ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه به ورید جانبی دم تزریق می‌شد. حیوان در طول مدت آزمایش تحت‌نظر بوده، انفوزیون PTZ پس از مشاهده کلونوس عمومی (کلونوس اندام جلویی و متعاقب آن کلونوس کامل بدن) و شروع کشیدگی تونیک اندام عقبی (سفت شدن و کشیده شدن اندام جلویی و عقبی به سمت عقب) متوقف می‌شد. با در نظر گرفتن زمان ثبت شده، غلظت PTZ، سرعت انفوزیون و وزن بدن حیوان، میزان PTZ مورد نیاز برای ایجاد تشنج کلونیک و تونیک محاسبه شده، به صورت دوز آستانه تشنج گزارش می‌شد [۳۱-۳۳].

تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده و از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و متعاقب آن تست توکی جهت مقایسه گروه‌های کنترل و آزمایش استفاده شد. سطح $P < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

اثر تجویز حاد کوئینیدین بر آستانه تشنج کلونیک ناشی از PTZ نمودار شماره ۱ نتایج مربوط به اثر تجویز حاد غلظت‌های مختلف کوئینیدین (۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر آستانه تشنج کلونیک ناشی از PTZ را نشان می‌دهد. آستانه تشنج کلونیک در گروه کنترل $37/55 \pm 0/82$ میلی‌گرم بر کیلوگرم و در گروه‌های کوئینیدین با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم به ترتیب برابر با $33/77 \pm 1/48$ ، $36/11 \pm 1/44$ و $35/51 \pm 2/13$ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. آستانه تشنج کلونیک در هیچ‌کدام از گروه‌های دریافت‌کننده کوئینیدین تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نداشت.



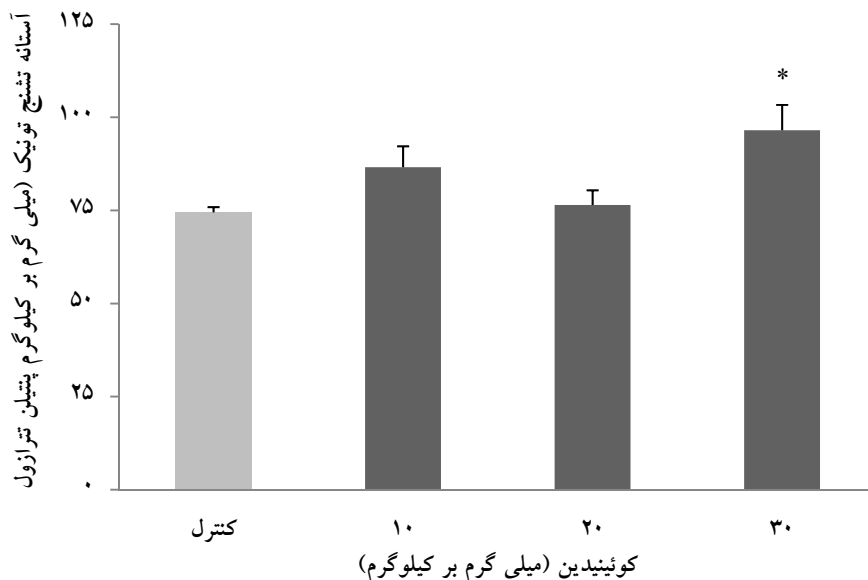
نمودار شماره ۱- اثر تجویز حاد کوئینیدین (۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر آستانه تشنج کلونیک ناشی از پنتیلن ترازول، S.E.M, (Mean \pm n=9)

میلی‌گرم به ترتیب برابر با $86/59 \pm 5/62$ ، $76/46 \pm 3/93$ و $96/52 \pm 6/79$ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. آستانه تشنج تونیک در گروه‌های دریافت‌کننده کوئینیدین با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نداشت. اما کوئینیدین در دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، افزایش معنی‌داری را

اثر تجویز حاد کوئینیدین بر آستانه تشنج تونیک ناشی از PTZ نمودار شماره ۲ نتایج مربوط به اثر تجویز حاد غلظت‌های مختلف کوئینیدین بر آستانه تشنج تونیک ناشی از PTZ را نشان می‌دهد. آستانه تشنج تونیک در گروه کنترل $74/49 \pm 1/39$ میلی‌گرم بر کیلوگرم و در گروه‌های کوئینیدین با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰

مؤثر بر روی تشنج برای ترکیب با غلظت‌های مختلف دکسترومتورفان در نظر گرفته شد.

در آستانه تشنج تونیک نسبت به گروه کنترل از خود نشان داد ($P < 0.05$). بنابراین با توجه به نتایج حاصله از این آزمایش، کوئینیدین با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌عنوان بهترین دوز غیر

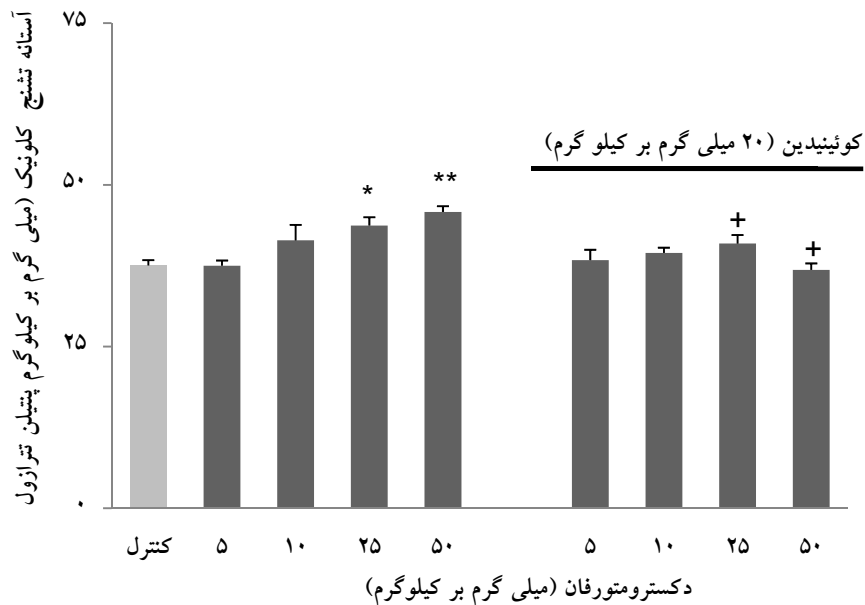


نمودار شماره ۲- اثر تجویز حاد کوئینیدین (۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر آستانه تشنج تونیک ناشی از پنتیلن تترازول، $P < 0.05$ * در مقایسه با گروه کنترل (Mean±S.E.M, n=9).

بر کیلوگرم دکسترومتورفان افزایش معنی‌داری را در آستانه تشنج کلونیک نسبت به گروه کنترل ایجاد کرد (به ترتیب $P < 0.05$ و $P < 0.01$).

آستانه تشنج کلونیک در گروه کنترل $37/55 \pm 0/82$ میلی‌گرم بر کیلوگرم و گروه‌های دکسترومتورفان/ کوئینیدین با غلظت‌های ۲۰/۵، ۲۰/۱۰، ۲۰/۲۵ و ۲۰/۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ترتیب برابر با $36/85 \pm 1/00$ و $40/92 \pm 1/33$ ، $39/46 \pm 0/81$ ، $38/36 \pm 1/59$ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. آستانه تشنج کلونیک در هیچ‌یک از گروه‌های دریافت‌کننده دکسترومتورفان/ کوئینیدین نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد. همچنین غلظت‌های ۲۰/۲۵ و ۲۰/۵۰ دکسترومتورفان/ کوئینیدین آستانه تشنج کلونیک را به‌صورت معنی‌داری در مقایسه با غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دکسترومتورفان کاهش داد (به ترتیب $P < 0.05$ و $P < 0.01$).

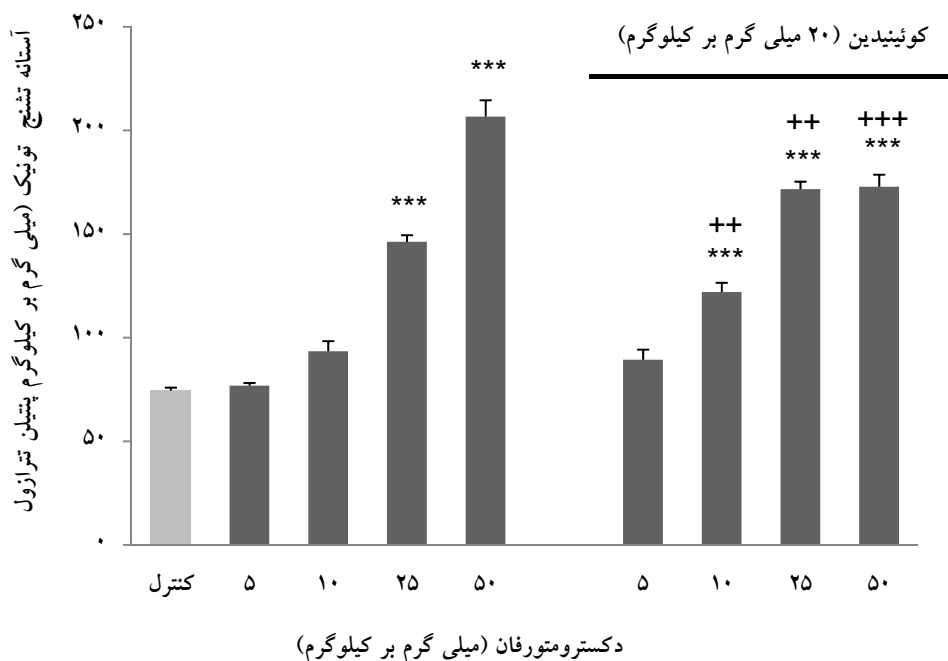
اثر تجویز دکسترومتورفان به‌تنهایی یا به‌صورت ترکیب با کوئینیدین بر آستانه تشنج کلونیک ناشی از PTZ نمودار شماره ۳ نتایج مربوط به اثر تجویز حاد دکسترومتورفان (۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) یا دکسترومتورفان/ کوئینیدین (۲۰/۵، ۲۰/۱۰، ۲۰/۲۵، ۲۰/۵۰ و ۲۰/۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را بر آستانه تشنج کلونیک ناشی از PTZ نشان می‌دهد. آستانه تشنج کلونیک در گروه کنترل $37/55 \pm 0/82$ میلی‌گرم بر کیلوگرم و در گروه‌های دکسترومتورفان با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ترتیب برابر با $43/71 \pm 1/28$ ، $41/42 \pm 2/39$ ، $37/49 \pm 0/80$ و $45/81 \pm 0/90$ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که آستانه تشنج کلونیک در گروه‌های دریافت‌کننده دکسترومتورفان با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نداشت، درحالی‌که غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم



نمودار شماره ۳- اثر تجویز حاد دکسترومتورفان (۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) یا دکسترومتورفان/ کوتینیدین (۲۰/۵، ۲۰/۱۰، ۲۰/۲۵ و ۲۰/۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بر آستانه تشنج کلونیک ناشی از پنتیلین تترازول، $P < 0.05$ * و $P < 0.01$ ** مقایسه با گروه کنترل، $P < 0.05$ + و $P < 0.01$ ++ مقایسه با گروه دکسترومتورفان (Mean±S.E.M, n=9).

تونیک نسبت به گروه کنترل ایجاد کرد ($P < 0.001$). آستانه تشنج تونیک در گروه‌های دکسترومتورفان/ کوتینیدین با غلظت‌های ۲۰/۵، ۲۰/۱۰، ۲۰/۲۵ و ۲۰/۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به ترتیب برابر با $171/70 \pm 3/55$ ، $122/03 \pm 4/43$ ، $89/35 \pm 4/88$ و $172/84 \pm 5/81$ میلی گرم بر کیلوگرم بود. غلظت‌های ۲۰/۱۰، ۲۰/۲۵ و ۲۰/۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم دکسترومتورفان آستانه تشنج تونیک را به صورت معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش داد ($P < 0.001$). همچنین غلظت‌های ۲۰/۱۰ و ۲۰/۲۵ دکسترومتورفان/ کوتینیدین آستانه تشنج تونیک را به صورت معنی داری در مقایسه با غلظت‌های ۱۰ و ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم دکسترومتورفان افزایش داد ($P < 0.01$). در مقابل، غلظت ۲۰/۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم دکسترومتورفان/ کوتینیدین آستانه تشنج تونیک را به صورت معنی داری در مقایسه با غلظت ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم دکسترومتورفان کاهش داد ($P < 0.001$).

اثر تجویز حاد دکسترومتورفان به تنهایی یا ترکیب با کوتینیدین بر آستانه تشنج تونیک ناشی از PTZ نمودار شماره ۴ نتایج مربوط به اثر تجویز دکسترومتورفان (۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) یا دکسترومتورفان/ کوتینیدین (۲۰/۵، ۲۰/۱۰، ۲۰/۲۵ و ۲۰/۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بر آستانه تشنج تونیک ناشی از PTZ را نشان می دهد. آستانه تشنج تونیک در گروه کنترل $74/49 \pm 1/39$ میلی گرم بر کیلوگرم و در گروه‌های دکسترومتورفان با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به ترتیب برابر با $76/84 \pm 1/29$ ، $93/43 \pm 4/89$ ، $146/23 \pm 3/19$ و $206/65 \pm 7/89$ میلی گرم بر کیلوگرم بود. آستانه تشنج تونیک در گروه‌های دریافت کننده غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی گرم دکسترومتورفان تفاوت معنی داری نسبت به گروه کنترل نداشت، در حالی که غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی گرم دکسترومتورفان افزایش معنی داری را در آستانه تشنج



نمودار شماره ۴- اثر تجویز حاد دکسترومتورفان (۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) یا دکسترومتورفان/ کوئینیدین (۲۰/۲۵، ۲۰/۱۰، ۲۰/۵) و ۲۰/۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بر آستانه تشنج تونیک ناشی از پنتیلن ترازول، $***P < 0.001$ مقایسه با گروه کنترل، $++P < 0.01$ و $+++P < 0.001$ مقایسه با گروه دکسترومتورفان (Mean±S.E.M, n=9).

بحث

هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی اثر تجویز حاد دکسترومتورفان، کوئینیدین و دکسترومتورفان/ کوئینیدین بر تشنجات کلونیک و تونیک ناشی از PTZ بود. اتصال PTZ به جایگاهی مجزا از جایگاه اتصال پیکروتوکسین با مهار گیرنده گابا γ -Aminobutyric acid (GABA) نوع A منجر به بروز تشنج می شود. نتایج حاصل از ثبت های الکتروفیزیولوژیک پیشنهاد می کنند که PTZ احتمال تعداد دفعات باز شدن کانال کلری را بدون تأثیر بر طول مدت باز ماندن آن کاهش می دهد. بنابراین تزریق داخل وریدی PTZ به عنوان یک مدل کارآمد حیوانی در ایجاد تشنج مورد استفاده قرار می گیرد [۳۴]. افزایش آستانه تشنج متعاقب تجویز دکسترومتورفان در تأیید یافته هایی است که گزارش کرده اند دکسترومتورفان در مدل های حیوانی اثر ضد تشنجی دارد. هرچند اثر ضد تشنجی دکسترومتورفان قبلاً نیز گزارش شده است، اما تاکنون مطالعه ای در مورد اثر آن بر فازهای تونیک و کلونیک تشنج و همچنین ترکیب آن با کوئینیدین انجام نگرفته است. یکی از مکانیسم های اصلی پیشنهادی برای اثرات ضد تشنجی دکسترومتورفان اثر مهاری آن بر رهایش گلوتامات است. افزایش رهایش گلوتامات در فضای سیناپسی و اثر آن بر گیرنده های گلوتامات، نقش کلیدی را در شروع و گسترش فعالیت

تشنجی دارد [۳۶-۳۴] دکسترومتورفان مهارکننده غیر رقابتی گیرنده های NMDA است [۱۴، ۱۳]. تجویز دکسترومتورفان باعث کاهش رهایش گلوتامات می شود و تشنج ناشی از NMDA را مهار می کند [۳۸، ۳۷، ۱۵]. مطالعات مختلف نیز نشان داده اند که آنتاگونیست های گیرنده NMDA آستانه تشنج را افزایش می دهند [۳۹-۴۱]. در مطالعه حاضر دکسترومتورفان باعث افزایش معنی دار آستانه تشنج کلونیک شد که در تأیید مطالعات گذشته می باشد [۱۷]. با این وجود میزان اثربخشی دکسترومتورفان بر روی تشنج تونیک، شدت بیشتری از خود نشان داد که این اثر ممکن است ناشی از پراکندگی گیرنده های NMDA در قسمت های مختلف مغز موش و احتمالاً اثر متفاوت دکسترومتورفان بر روی زیرواحدهای GluN1، GluN2A و GluN2B گیرنده NMDA باشد. زیرواحدهای GluN1 و GluN2A توزیع گسترده و یکسانی در سرتاسر مغز دارند، در حالی که زیرواحد GluN2B منحصراً در مغز قدامی بیان می شود [۲۸]. با توجه به توزیع متفاوت زیرواحدهای گیرنده NMDA و در نظر گرفتن توزیع بیشتر زیرواحد GluN2B در مغز قدامی می توان نتیجه گرفت که اثر متفاوت دکسترومتورفان بر آستانه تشنج کلونیک و تونیک می تواند مربوط به تفاوت اثر این دارو بر این زیرواحدها باشد. تشنجات کلونیک ناشی از PTZ با منشأ مغز قدامی و تشنجات تونیک آن با

که GluN2B در مغز قدامی بیان می‌شود [۲۸]. می‌توان نتیجه گرفت که کاهش دکستروفان به واسطه برداشته شدن اثر مهارى آن بر گیرنده NMDA در مغز قدامی سبب کاهش آستانه تشنج می‌شود. از طرف دیگر، اثر ترکیب دکستروفان/ کوئینیدین بر آستانه تشنج تونیک دوگانه بود، به شکلی که غلظت‌های ۲۰/۱۰ و ۲۰/۲۵ دکستروفان/ کوئینیدین سبب افزایش آستانه تشنج تونیک شد؛ ولی غلظت ۲۰/۵۰ دکستروفان/ کوئینیدین آستانه تشنج تونیک را کاهش داد. در توجیه اثر ضد تشنج غلظت‌های پایین دکستروفان در ترکیب با کوئینیدین می‌توان به کاهش متابولیته شدن دکستروفان و در نتیجه افزایش غلظت آن در مغز خلفی که منشأ تشنجات تونیک است، اشاره کرد. این احتمال وجود دارد که کوئینیدین با افزایش غلظت پلاسمایی دکستروفان باعث افزایش اثر آگونیستی آن بر گیرنده‌های Sigma-1 شود که پراکندگی بیشتری در مغز خلفی دارد [۴۸] و بدین ترتیب سبب افزایش آستانه تشنج تونیک شده باشد. البته در این مطالعه، کوئینیدین اثر ضد تشنجی دکستروفان را در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور معنی‌داری کاهش داد. این اتفاق شاید به این دلیل باشد که کوئینیدین باعث افزایش بیش از حد غلظت دکستروفان شده و در همین جهت نیز برای غلظت‌های بالای دکستروفان اثرات تشنج‌زا گزارش شده است [۲۴،۲۱]

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که حساسیت مدارهای مربوط به تشنج در نواحی مختلف مغز نسبت به دکستروفان متفاوت است و توجه بر این نکته که استفاده از کوئینیدین در ترکیب با دکستروفان باعث کاهش اثر دکستروفان در تشنج کلونیک و افزایش در تشنج تونیک می‌شود. این تغییرات ممکن است به دلیل تفاوت اثر دکستروفان بر گیرنده‌های مختلف در قسمت‌های مختلف مغز باشد، اما همچنان بررسی مکانیسم‌های دقیق‌تر اثر دکستروفان همانند نقش احتمالی گیرنده‌های NMDA، مسیر L-Arginine-NO-cGMP و گیرنده‌های Sigma-1 در مدل‌های مختلف از تشنج آزمایشگاهی و مطالعات بالینی ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی و پایان‌نامه کارشناسی ارشد با شماره ۹۷۳۹ و کد اخلاقی IR.KAUMS.MEDNT.REC.1397.22 می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی کاشان اجرا شده است. بدین وسیله

منشأ مغز خلفی هستند [۴۲]. این احتمال وجود دارد که اثر دکستروفان بر زیر واحد GluN2B و عدم توزیع این گیرنده در مغز خلفی دلیل اثربخشی بیشتر این دارو بر تشنجات تونیک باشد. در همین زمینه نشان داده شده است که تجویز دوز حاد دکستروفان سبب افزایش بیان زیر واحد GluN2B و افزایش حساسیت به تشنج می‌شود [۲۱]. بخشی دیگر از اثر ضد تشنج دکستروفان ممکن است به واسطه فعال کردن گیرنده Sigma-1 باشد [۲۷-۲۵]. گیرنده‌های Sigma-1 یک گیرنده درون سلولی می‌باشند که بر روی برخی از کانال‌های یونی و بیان ژن‌های خانواده C-fos و C-jun از طریق غیر فعال کردن فاکتور رونویسی AP-1 اثر می‌گذارند [۴۴،۴۳]. به همین جهت در مطالعات مختلف گزارش شده است که آگونیست و آنتاگونیست‌های گیرنده Sigma-1 بر روی تشنج اثرگذار هستند [۴۷-۴۵]. همچنین در برخی مطالعات نشان داده شده که پیش‌درمانی با آنتاگونیست Sigma-1 باعث کاهش اثرات ضد تشنجی دکستروفان در تشنج‌های ناشی از تری‌متیلین (TMT) Trimethyltin و کاینیک اسید (KA) acid Kainic شده است [۲۷-۲۵]. بنابراین به نظر می‌رسد که بخشی از اثرات ضد تشنجی دکستروفان می‌تواند ناشی از فعالیت آگونیستی بر روی گیرنده‌های Sigma-1 باشد. در مطالعه ما دکستروفان اثربخشی بیشتری در تشنج تونیک از خود نشان داد که بخشی از این اثرات می‌تواند ناشی از فعالیت آگونیستی دکستروفان بر روی گیرنده‌های Sigma-1 باشد که احتمالاً به دلیل پراکندگی بیشتر گیرنده‌های Sigma-1 در ناحیه مغز خلفی می‌باشد [۴۸]. ما در این مطالعه نشان دادیم که استفاده همزمان از کوئینیدین در ترکیب با دکستروفان می‌تواند منجر به اثربخشی بیشتر دکستروفان در تشنج تونیک و ختنی کردن اثر آن در تشنج کلونیک شود. همان‌طور که قبلاً گزارش شده، کوئینیدین با مهار آنزیم CYP2D6 سبب افزایش غلظت پلاسمایی دکستروفان و کاهش غلظت دکستروفان می‌شود [۸]. همچنین مشخص شده است که تمایل دکستروفان برای گیرنده‌های Sigma-1 بیشتر از دکستروفان، و در مقابل تمایل دکستروفان برای مهار گیرنده NMDA بسیار بیشتر از دکستروفان است [۴۹،۲۹،۷]. بنابراین به نظر می‌رسد که بخشی از اثرات ضد تشنجی دکستروفان می‌تواند ناشی از متابولیت اصلی آن یعنی دکستروفان باشد. نتایج مطالعه ما این احتمال را مطرح می‌کند که کاهش متابولیته شدن دکستروفان به دکستروفان توسط کوئینیدین، سبب از بین رفتن اثر ضد تشنجی دکستروفان بر تشنج کلونیک می‌شود. با توجه به این موضوع که دکستروفان اثر مهارى بیشتری بر گیرنده NMDA دارد [۲۹] و همچنین این نکته

References:

- [1] Bell GS, Sander JW. The epidemiology of epilepsy: The size of the problem. *Seizure* 2001; 10(4): 306-16.
- [2] Hitiris N, Brodie MJ. Modern antiepileptic drugs: guidelines and beyond. *Curr Opin Neurol* 2006; 19(2): 175-80.
- [3] Romanelli F, Smith KM. Dextromethorphan abuse: clinical effects and management. *J Am Pharm Assoc* 2009; 49(2): e20-e7.
- [4] Pu B, Xue Y, Wang Q, Hua C, Li X. Dextromethorphan provides neuroprotection via anti-inflammatory and anti-excitotoxicity effects in the cortex following traumatic brain injury. *Mol Med Rep* 2015; 12(3): 3704-10.
- [5] Mousavi SA, Saadatian M, Khorvash F, Hoseini T, Sariaslani P. Evaluation of the neuroprotective effect of dextromethorphan in the acute phase of ischaemic stroke. *Arch Med Sci* 2011; 7(3): 465-9.
- [6] King MR, Ladha KS, Gelineau AM, Anderson TA. Perioperative Dextromethorphan as an Adjunct for Postoperative Pain: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Anesthesiology* 2016; 124(3): 696-705.
- [7] Chien YH, Lin MI, Weng WC, Du JC, Lee WT. Dextromethorphan in the treatment of early myoclonic encephalopathy evolving into migrating partial seizures in infancy. *J Formos Med Assoc* 2012; 111(5): 290-4.
- [8] Schmid B, Bircher J, Preisig R, Küpfer A. Polymorphic dextromethorphan metabolism: co-segregation of oxidative O-demethylation with debrisoquin hydroxylation. *Clin Pharmacol Therapeutics* 1985; 38(6): 618-24.
- [9] Nguyen L, Thomas KL, Lucke-Wold BP, Cavendish JZ, Crowe MS, Matsumoto RR. Dextromethorphan: An update on its utility for neurological and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Therapeutics* 2016; 159: 1-22.
- [10] Taylor CP, Traynelis SF, Siffert J, Pope LE, Matsumoto RR. Pharmacology of dextromethorphan: Relevance to dextromethorphan/quinidine (Nuedexta®) clinical use. *Pharmacol Therapeutics* 2016; 170: 82-164.
- [11] Werling LL, Keller A, Frank JG, Nuwayhid SJ. A comparison of the binding profiles of dextromethorphan, memantine, fluoxetine and amitriptyline: treatment of involuntary emotional expression disorder. *Experimental Neurol* 2007; 207(2): 248-57.
- [12] Nguyen L, Robson MJ, Healy JR, Scandinaro AL, Matsumoto RR. Involvement of sigma-1 receptors in the antidepressant-like effects of dextromethorphan. *PLoS One* 2014; 9(2): e89985.
- [13] Netzer R, Pflimlin P, Trube G. Dextromethorphan blocks N-methyl-D-aspartate-induced currents and voltage-operated inward currents in cultured cortical neurons. *European J Pharmacol* 1993; 238(2-3): 209-16.
- [14] Franklin PH, Murray TF. High affinity [3H] dextrophan binding in rat brain is localized to a noncompetitive antagonist site of the activated N-methyl-D-aspartate receptor-cation channel. *Molecular Pharmacol* 1992; 41(1): 134-46.
- [15] Ferkany JW, Borosky SA, Clissold DB, Pontecorvo MJ. Dextromethorphan inhibits NMDA-induced convulsions. *European J Pharmacol* 1988; 151(1): 151-4.
- [16] Laroia N, McBride L, Baggs R, Guillet R. Dextromethorphan ameliorates effects of neonatal hypoxia on brain morphology and seizure threshold in rats. *Developmental Brain Res* 1997; 100(1): 29-34.
- [17] Mohseni G, Ostadhadi S, Akbarian R, Chamanara M, Norouzi-Javidan A, Dehpour AR. Anticonvulsant effect of dextromethorphan on pentylenetetrazole-induced seizures in mice: Involvement of nitric oxide and N-methyl-d-aspartate receptors. *Epilepsy Behav* 2016; 65: 49-55.
- [18] Kim HC, Ko KH, Kim WK, Shin EJ, Kang KS, Shin CY, et al. Effects of dextromethorphan on the seizures induced by kainate and the calcium channel agonist BAY k-8644: comparison with the effects of dextrophan. *Behav Brain Res* 120(2): 169-75.
- [19] Kim HC, Shin CY, Seo DO, Jhoo JH, Jhoo WK, Kim WK, et al. New morphinan derivatives with negligible psychotropic effects attenuate convulsions induced by maximal electroshock in mice. *Life Sci* 2003; 72(16): 1883-95.
- [20] Feeser HR, Kadis JL, Prince DA. Dextromethorphan, a common antitussive, reduces kindled amygdala seizures in the rat. *Neurosci Lett* 1988; 86(3): 340-5.
- [21] Tran HQ, Chung YH, Shin EJ, Tran TV, Jeong JH, Jang CG, et al. MK-801, but not naloxone, attenuates high-dose dextromethorphan-induced convulsive behavior: possible involvement of the GluN2B receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 2017; 334: 158-66.
- [22] Takazawa A, Anderson P, Abraham WC. Effects of dextromethorphan, a nonopioid antitussive, on development and expression of amygdaloid kindled seizures. *Epilepsia* 1990; 31(5): 496-502.
- [23] Löscher W, Hönack D. Differences in anticonvulsant potency and adverse effects between dextromethorphan and dextrophan in amygdala-kindled and non-kindled rats. *Eur J Pharmacol* 1993; 238(2-3): 191-200.
- [24] Thompson KW, Wasterlain CG. Dextromethorphan and its combination with phenytoin facilitate kindling. *Neurology* 1993; 43(5): 992-4.

- [25] Kim HC, Bing G, Jhoo WK, Kim WK, Shin EJ, Im DH, et al. Metabolism to dextrorphan is not essential for dextromethorphan's anticonvulsant activity against kainate in mice. *Life Sci* 2003; 72(7): 769-83.
- [26] Shin EJ, Nah SY, Kim WK, Ko KH, Jhoo WK, Lim YK, et al. The dextromethorphan analog dimemorfan attenuates kainate-induced seizures via σ_1 receptor activation: comparison with the effects of dextromethorphan. *British J Pharmacol* 2005; 144(7): 908-18.
- [27] Shin EJ, Nah SY, Chae JS, Bing G, Shin SW, Yen TPH, et al. Dextromethorphan attenuates trimethyltin-induced neurotoxicity via σ_1 receptor activation in rats. *Neurochemistry Int* 2007; 50(6): 791-9.
- [28] Gonda X. Basic pharmacology of NMDA receptors. *Current Pharmaceutical Design* 2012; 18(12): 1558-67.
- [29] Cole AE, Eccles CU, Aryanpur J, Fisher RS. Selective depression of N-methyl--aspartate-mediated responses by dextrorphan in the hippocampal slice in rat. *Neuropharmacology* 1989; 28(3): 249-54.
- [30] Chen HH, Chan MH. Developmental lead exposure differentially alters the susceptibility to chemoconvulsants in rats. *Toxicology* 2002; 173(3): 249-57.
- [31] Mesdaghinia A, Yazdanpanah H, Seddighi M, Banafshe H, Heydari A. Effect of short-term lead exposure on PTZ-induced seizure threshold in mice. *Toxicology Lett* 2010; 199(1): 6-9.
- [32] Heydari A, Davoudi S. The effect of sertraline and 8-OH-DPAT on the PTZ-induced seizure threshold: Role of the nitrenergic system. *Seizure* 2017; 45: 119-24.
- [33] Esmaili Z, Heydari A. Effect of acute caffeine administration on PTZ-induced seizure threshold in mice: Involvement of adenosine receptors and NO-cGMP signaling pathway. *Epilepsy Res* 2019; 149: 1-8.
- [34] Huang RQ, Bell-Horner CL, Dibas MI, Covey DF, Drewe JA, Dillon GH. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant γ -aminobutyric acid type A (GABAA) receptors: mechanism and site of action. *J Pharmacol Experimental Therapeutics* 2001; 298(3): 986-95.
- [35] Ronne-Engström E, Hillered L, Flink R, Spännare B, Ungerstedt U, Carlson H. Intracerebral microdialysis of extracellular amino acids in the human epileptic focus. *J Cerebral Blood Flow Metabolism* 1992; 12(5): 873-6.
- [36] During MJ, Spencer DD. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet* 1993; 341(8861): 1607-10.
- [37] Ohi Y, Tsunekawa S, Haji A. Dextromethorphan inhibits the glutamatergic synaptic transmission in the nucleus tractus solitarius of guinea pigs. *J Pharmacological Sci* 2011; 116(1): 54-62.
- [38] Annels S, Ellis Y, Davies J. Non-opioid antitussives inhibit endogenous glutamate release from rabbit hippocampal slices. *Brain Res* 1991; 564(2): 341-3.
- [39] Cotton DB, Hallak M, Janusz C, Irtenkauf SM, Berman RF. Central anticonvulsant effects of magnesium sulfate on N-methyl-D-aspartate-induced seizures. *Am J Obstetrics Gynecol* 1993; 168(3): 974-8.
- [40] Freitas R, Sousa F, Viana G, Fonteles M. Effect of gabaergic, glutamatergic, antipsychotic and antidepressant drugs on pilocarpine-induced seizures and status epilepticus. *Neurosci Lett* 2006; 408(2): 79-83.
- [41] Sato K, Morimoto K, Okamoto M. Anticonvulsant action of a non-competitive antagonist of NMDA receptors (MK-801) in the kindling model of epilepsy. *Brain Res* 1988; 463(1): 12-20.
- [42] Gale K. Progression and generalization of seizure discharge: anatomical and neurochemical substrates. *Epilepsia* 1988; 29: S15-S34.
- [43] Su TP, Hayashi T, Maurice T, Buch S, Ruoho AE. The sigma ν -receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacological Sci* 2010; 31(12): 557-66.
- [44] Chu UB, Ruoho AE. Biochemical pharmacology of the sigma-1 receptor. *Molecular Pharmacol* 2016; 89(1): 142-53.
- [45] Matsumoto RR, Nguyen L, Kaushal N, Robson MJ. Sigma (σ) receptors as potential therapeutic targets to mitigate psychostimulant effects. *Advances Pharmacol* 2014; 69: 323-86.
- [46] Guo L, Chen Y, Zhao R, Wang G, Friedman E, Zhang A, et al. Allosteric modulation of sigma-1 receptors elicits anti-seizure activities. *British J Pharmacol* 2015; 172(16): 4052-65.
- [47] Vavers E, Svalbe B, Lauberte L, Stonans I, Misane I, Dambrova M, et al. The activity of selective sigma-1 receptor ligands in seizure models in vivo. *Behav Brain Res* 2017; 328: 13-8.
- [48] Guitart X, Codony X, Monroy X. Sigma receptors: biology and therapeutic potential. *Psychopharmacology* 2004; 174(3): 301-19.
- [49] Quirion R, Bowen WD, Itzhak Y, Junien JL, Musacchio J, Rothman RB, et al. A proposal for the classification of sigma binding sites. *Trends Pharmacological Sci* 1992; 13: 85-6.