

MORPHINE ET MESOTHERAPIE

P. Lecomte



P. Lecomte

RÉSUMÉ

La présence de récepteurs opioïdes sur les voies de la douleur dans le SNC, justifie l'utilisation des opioïdes par voie générale

dans un but antalgique. Les effets secondaires de la morphine en limitent l'utilisation. Dans le but de limiter ces effets indésirables, de nombreuses équipes ont tenté de démontrer la présence de récepteurs opioïdes périphériques impliqués dans la transmission de la douleur. Les 3 types de récepteurs sont retrouvés dans le tissu sous cutané et dans les tissus périarticulaires, à la condition qu'il existe une inflammation préalable des tissus. En périphérie, les substances opioïdes ont une action de régulation présynaptique par une augmentation du calcium intra cellulaire, une inhibition des canaux calciques voltages dépendants et une diminution du calcium nécessaire à une exocytose des substances algogènes (SP, CGRP). Les substances opioïdes agissent aussi sur les courants potassiques mais n'ont pas d'effet sur les courants sodiques ni d'effet direct sur la fibre nerveuse.

La présence de récepteurs opioïdes dans les tissus périphériques est secondaire à la présence d'un processus inflammatoire local. Les mécanismes immuns responsables de l'apparition des récepteurs opioïdes et des ligands opioïdes dans les tissus périphériques inflammés ont été décrits en différentes étapes. L'action de la morphine semble plus efficace à la phase intermédiaire et tardive après la lésion. Le bénéfice antalgique reste modéré mais la tolérance est satisfaisante.

Les opioïdes pourraient être utilisés à faible dose et en périphérie grâce à une technique permettant une diffusion locale limitée, sans effet indésirable lié à la diffusion plasmatique. De nombreuses études cliniques ont permis de démontrer l'effet antalgique d'injections intra articulaires de morphine dans les suites immédiates d'une chirurgie du genou.

La mésothérapie épidermique est un mode d'injection adapté à l'utilisation périphérique des opioïdes car elle permet une faible diffusion systémique de la molécule et une forte concentration locale.

Après une revue de la littérature, nous envisageons les modalités pratiques de l'usage de la morphine en mésothérapie épidermique. La morphine peut être utilisée

seule ou associée à différents médicaments injectables comme les anesthésiques locaux, le magnésium, la pentoxiphylline, un anti-H1, un agoniste alpha2 adrénergique.

Le mélange synergique composé de Morphine à 4 %, à raison de 3cc soit 120 mg, Pentoxiphylline et Atarax semble le plus adapté.

Resume

The presence of opioid receptors in the CNS explain the systemic effect of Morphin for the treatment of Pain. The frequent side-effects of morphine are a limit for the use of this analgesic drug.

Recent studies have identified opioid receptors on peripheral nerve terminals of primary afferent neurons. All three types of opioid receptors (mu, delta, kappa) are expressed whithin sensory neurons, in the periar-ticular tissue, the sub-cutaneous tissue, in the dorsal root ganglia and in the spinal cord. A prerequisite for the manifestation of such effects seems to be a tissue inflammation. Opioid receptors are present on peripheral terminals of sensory neurons and up regulated in inflammation. Their endogenous ligants, opioid peptides are synthetized in circulating immune cells which migrate to injured tissue.

Opioids produce analgesia by different mechanisms. They can inhibit the release of excitatory neuro-transmitters like Pain Substance SP from peripheral sensory nerve endings. Opioids can inhibit the calcium curenents on primary sensory neurons and influence the potassium currents, but have no effect on sodium curenents.

An increasing number of in vivo experiments have confirmed the analgesic effect of intraarticular injection of morphine, reversed by the intraarticular injection of naloxone, after a knee surgery. The largest analgesic effect is found at the intermediate and later stages (6 hours and 4days) after the development of inflammation.

To justify the peripheral injection of morphine, we performed a revue of the literature, using experimental studies and in vivo experiments. Intra epidermic injection of morphine can be use like a local treatment of hyperalgesia. Different drugs associated with morphine could have direct antinociceptive effects on peripheral

nerve endings. We propose an analgesic drug mesclun for Mesotherapy and a case report to explain the way of using morphine via intraepidermic injections (Morphine 4%, pentoxiphylline, histamine antagonist).

INTRODUCTION

La douleur par excès de nociception a pour origine la stimulation des terminaisons nerveuses de petit calibre, non myélinisées ou faiblement myélinisées.

La stimulation directe déclenche le potentiel d'action (ex : mécanorécepteur), cependant il ne faut pas négliger le rôle de l'inflammation secondaire à la lésion initiale. L'inflammation peut stimuler directement un récepteur membranaire (R-H+) ou provoquer une sensibilisation de la terminaison nerveuse. Une multitude de produits, issus de la « soupe inflammatoire », peuvent entraîner la synthèse de récepteurs par le corps cellulaire des neurones nociceptifs et la diminution des seuils perceptifs.

Les AINS ayant une action sur la cascade inflammatoire auront indirectement une action antalgique. Tous ces éléments chimiques sont autant de cibles thérapeutiques potentielles.

La morphine, antalgique central, a un intérêt en périphérie car de nombreux travaux ont mis en évidence l'apparition de récepteurs opioïdes dans les tissus périphériques et dans la corne postérieure de la moelle. Le but de cette revue de la littérature est de justifier l'utilisation de la morphine en périphérie, grâce à des travaux fondamentaux et cliniques réalisés chez l'homme et l'animal. Nous envisagerons également les différents mélanges synergiques utilisables en mésothérapie épidermique.

La morphine est une molécule de petite taille qui diffuse aisément dans les tissus cutanés. Des dispositifs à délivrance percutanée de fentanyl ont montré leur efficacité.

L'usage de la morphine par mésothérapie est donc envisageable.

LES RÉCEPTEURS OPIOÏDES EN PÉRIPHÉRIE

Les récepteurs aux opioïdes sont présents dans la corne dorsale de la moelle ainsi que dans les structures supra segmentaires intervenant dans la perception douloureuse. De nombreux travaux mettent en évidence des récepteurs opioïdes dans les tissus périphériques.

La présence des récepteurs opioïdes en périphérie permet d'expliquer certains effets indésirables de la morphine. Ainsi, l'usage d'un antagoniste purement périphérique de la morphine, ne passant pas la barrière hémato-encéphalique (MNTX), permet de diminuer les nausées et la constipation induite par la morphine (36, 32, 4). Il existe aussi des récepteurs opioïdes sur les terminaisons sensibles des tissus périphériques impliqués dans la nociception. Cependant ces récepteurs apparaissent dans certaines conditions.

En 1990, Christopher Stein met en évidence des récepteurs opioïdes dans le tissu sous cutané d'un rat, dont la patte a préalablement été lésée par une injection de Caragénine (20).

Ces résultats sont confirmés en 2003 par le même auteur dans une étude montrant l'apparition de RNA messagers de récepteurs opioïdes dans le ganglion de la racine dorsale (25). Cet événement est secondaire à une inflammation tissulaire périphérique expérimentale.

L'immunomarquage a permis d'identifier, dans les tissus périphériques, les 3 récepteurs opioïdes kappa mu et dans une moindre mesure delta (31, 6, 18). En périphérie, les différents récepteurs sont retrouvés sur le neurone afférent en distal et proximal ainsi que sur le ganglion de la racine dorsal (29).

Les récepteurs opioïdes, révélés par immunomarquage, sont présents dans le tissu sous cutané, préalablement lésé dans le but de générer un état inflammatoire local (20).

La pharmacologie de ces différents récepteurs opioïdes est identique à ceux retrouvés en central.

LES OPIOÏDES ENDOGÈNES, LIGANDS DES RÉCEPTEURS PÉRIPHÉRIQUES

Une lésion tissulaire périphérique est responsable de l'apparition de récepteurs opioïdes sur les nocicepteurs. L'inflammation secondaire induit l'extravasation de leucocytes qui vont libérer des substances opioïdes endogènes (Bêta endorphines), ayant un rôle antalgique. L'immunomarquage de la Bêta endorphine et de la Metenkephaline se projette sur les cellules immunitaires présentes dans les tissus inflammés. Les neurones et les cellules immunitaires communiquent grâce à des cytokines et des neuropeptides (19).

Dans un modèle expérimental d'inflammation de la patte d'un rat, par l'injection d'une solution de Freund, Stein montre qu'à t+60 minutes, l'injection de CRF Corticotropin releasing factor entraîne une analgésie réductible par l'injection de naloxone. Le CRF entraîne la libération des peptides opioïdes par les leucocytes. Au contraire, la déplétion en leucocyte réduit l'analgésie opioïde périphérique. L'étude des leucocytes présents dans le tissu lésé montre une augmentation de l'expression des récepteurs aux cytokines sur les cellules immunitaires. Le blocage de ces récepteurs diminue l'analgésie et le nombre de leucocytes dans le tissu lésé (22).

PHARMACODYNAMIE

Mode d'action

Ces substances opioïdes permettent une régulation présynaptique.

Effets sur les courants calciques : (1, 2, 3, 34)

- augmentation du calcium intracellulaire
- inhibition des canaux calciques voltages dépendants (diminution de la phase de dépolarisation et diminution de l'excitabilité)
- diminution du calcium nécessaire à l'exocytose des neurotransmetteurs, diminution de la libération des substances algogènes (SP, CGRP)

Effets sur les courants potassiques :

- activation (hyperpolarisation / agonistes μ , δ) (17, 35)
- augmentation de la conductance potassique (agonistes κ , μ , δ) :
- augmente la repolarisation neuronale (10)
- diminue la durée du potentiel d'action calcium dépendant (diminue l'excitabilité) (33)

Pas d'effet sur les courants sodiques

Pas d'effet direct sur la fibre nerveuse :

En dehors de cette action sur les nocicepteurs, la morphine a été testée en bloc périnerveux. L'étude de Likar en 2001 conclue à l'inefficacité de la morphine en bloc tronculaire lors d'un geste de chirurgie dentaire (15).

Les différentes étapes de l'analgésie opioïde périphérique

Les mécanismes complexes de cette analgésie ont été décrits en différentes étapes dites précoces, intermédiaires et tardives. Les cellules immunocompétentes présentes dans les tissus périphériques ont un rôle fondamental dans ces différentes étapes. (23, 24, 26)

- Le temps précoce défini à t+1h et t+2h

Dans un article publié dans Pain en 2004, Christopher Stein montre qu'il existe, à t+1h, dans un modèle d'inflammation par injection d'une solution de Freund dans une patte de rat, une réduction de l'analgésie par déplétion en leucocyte de l'animal (27). L'étude des leucocytes dans le tissu lésé montre une augmentation de l'expression membranaire des récepteurs aux cytokines. Le blocage de ces récepteurs diminue l'analgésie et le nombre des leucocytes dans le tissu lésé.

Dans un second article publié en 2004, la même équipe montre le rôle des macrophages qui entraîneraient une augmentation secondaire des leucocytes, synthétisant les peptides opioïdes. Cependant, à ce temps précoce t+2h, on ne note pas d'augmentation des récepteurs μ et δ et pas d'augmentation de l'analgésie (28, 30).

- Le temps intermédiaire t+6h

Machelska publie, en 2003, dans Journal of Neuroimmunology, la description du temps intermédiaire, notant qu'il existe les 3 types de récepteurs kappa, mu

et delta, ainsi que des peptides opioïdes endogènes : bêta endorphine, metenkephaline et dynorphine. Ces opioïdes endogènes stimulent les récepteurs présents sur les nocicepteurs (16).

- Le temps tardif t+4 jours

A ce temps tardif, on ne retrouve que les récepteurs mu et delta, ainsi que le marqueur de la bêta endorphine (16).

Efficacité antalgique

La stimulation des sous unités delta 1 et 2 a un effet antalgique dans les douleurs neuropathiques (18).

Les modèles expérimentaux d'inflammation d'un tissu périphérique mettent en évidence une augmentation des récepteurs périphériques (Mu), mais pas des récepteurs opioïdes, dans les différentes zones segmentaires et supra segmentaires du contrôle de la douleur : deutoneurone médullaire et la région de l'hypothalamus (29).

Plusieurs modèles cliniques ont été étudiés et, en particulier, l'action de la morphine injectée en intra-articulaire IA et en périnerveux.

C. Stein montre la supériorité antalgique de la morphine IA versus IV à dose égale et à demi dose chez des patients ayant bénéficié d'une arthroscopie (0,5mg et 1 mg) (21).

Cet effet antalgique du système opioïde périphérique a été étudié par de très nombreuses équipes. Une Méta-analyse, réalisée en 2001 par Gupta et al. (7), compare 45 études prospectives et randomisées d'injection de Morphine intra-articulaire (Modèle de chirurgie du genou), dont 32 études contre placebo et 13 études contre anesthésiques locaux, morphine IV ou IM.

Les 3 questions retenues étaient :

- L'effet de la morphine en intra-articulaire est-il supérieur à l'effet placebo ?
- Existe-t-il un effet dose dépendant ?
- L'effet antalgique est-il d'origine systémique ou locale ?

L'effet de la morphine en intra-articulaire est-il supérieur à l'effet placebo ?

Trois phases ont été étudiées : précoce de 0 à 2h, intermédiaire de 2h à 6h, tardive de 6 à 24h.

Les variables étudiées sont l'EVA et la consommation antalgique post opératoire.

Sur les 27 études contre placebo retenues, 19 études sont incluses soit 1748 patients. Parmi ces 19 études, 13 ont montré un bénéfice antalgique.

On note une réduction de l'EVA de 11,6/100 au temps précoce, de 17/100 au temps intermédiaire et de 14,7/100 au temps tardif.

Dans cette étude, nous observons que l'effet antalgique

La revue de Mésothérapie

maximum est obtenu entre 2 et 6h, mais qu'il se maintient au temps tardif.

Effet dose dépendant

Il existe probablement un effet dose dépendant (12), mais les études sont très partagées comme le montre la méta-analyse réalisée par Gupta en 2001 (7) portant sur 7 études soit 613 patients. Les résultats sont contradictoires avec 3 études favorables, 3 études ne montrant pas de différences significatives et une seule étude consacrée à l'effet dose-réponse.

L'effet antalgique est-il d'origine systémique ou local ?

La Meta analyse de Gupta retrouve 3 études ne montrant pas de différences entre morphine IA et IV et 2 études montrant une antalgie supérieure en IA. La différence est surtout visible pour les temps tardifs post-opératoires. Le dosage de la morphine IV est non nul après une injection IA, cela ne permet pas de conclure sur l'action purement périphérique de la morphine injectée en IA. (7, 13, 8, 11, 14)

Phénomène de tolérance ?

Les opioïdes endogènes n'entraînent pas de diminution du nombre de récepteurs opioïdes. (21)
Stein a comparé 2 groupes de patients opérés par arthroscopie. Des biopsies sont réalisées permettant de classer les sujets en 2 populations, en fonction de l'existence ou non des récepteurs opioïdes. Les patients bénéficient alors d'une injection de morphine IA ou IV. Il n'existe pas de différence entre les 2 populations et la morphine IA est plus efficace que la morphine IV, donc la présence de ligands opioïdes n'entraîne pas de régulation négative des récepteurs opioïdes.
L'usage de morphine en périphérie est possible, ce traitement antalgique peut être répété tant qu'une inflammation existe.

No pain, no gain...

L'effet antalgique de la morphine IA apparaît significativement plus fort après la deuxième heure (post arthroscopie) et semble durer 24 H. Cependant, le gain d'antalgie n'est significatif en IA que si les patients ont une EVA > 3/10. L'inflammation préopératoire, source de douleurs, conditionne la présence des récepteurs opioïdes articulaires et donc l'analgésie par les opioïdes en périphérie. (9)

Ces différents travaux apportent la preuve que la morphine est un antalgique périphérique car l'inflammation induit l'apparition de récepteurs opioïdes dans les tissus périphériques, et les ligands opioïdes ont une action antalgique.

L'injection intra-articulaire associée à un anesthésique local donne un gain d'antalgie significatif par rapport à un anesthésique local seul ou une dose égale voire supérieure de morphine IV.

L'efficacité périphérique est liée à une action sur les canaux calciques et potassiques des nocicepteurs, dont la résultante est une moindre excitabilité présynaptique.

MORPHINE EN MÉSOTHÉRAPIE

L'utilisation de la morphine par mésothérapie mérite d'être testée au vue de cette analyse de la littérature, pour le traitement d'une hyperalgésie primaire.

La technique de mésothérapie

Le mode d'injection ne doit autoriser qu'une faible diffusion systémique de la molécule.

La technique de mésothérapie la plus appropriée semble être l'intra épidermique.

Le Chlorhydrate de morphine injectable

Le Chlorhydrate de morphine injectable existe en 3 concentrations 1% , 2% ou 4%. Le pH est acide entre 3,5 et 4,5.

La quantité de morphine injectée peut être de 120 mg soit 3cc à 4 %. Cette dose est calculée en tenant compte de la dose journalière efficace (supérieure à 60mg/j) et de la plus faible biodisponibilité en IED par rapport à l'IDP.

La morphine peut être utilisée seule ou associée à d'autres molécules.

La morphine peut être associée à :

- Anesthésique local (lidocaïne)
- Magnésium, connu en mésothérapie pour son chimiotropisme vers les terminaisons nerveuses (pidolate de Mg)
- Vasodilatateur (ex. Pentoxiphylline)
- Anti-H1 (Atarax)
- Agoniste alpha2 adrénergique (clonidine)

Synergie des différents mélanges

Morphine et Anesthésiques locaux :

Dans un article publié en 1997, Kalso et al. ont réalisé une revue systématique de la littérature comparant des injections intra-articulaires de Morphine avec ou sans Bupivacaine versus solution saline, ou Bupivacaine seule versus solution saline (8). Les résultats sur l'antalgie sont les suivants :

- Injection ia Morphine > solution saline
 - Injection ia Morphine + Bupi > solution saline
 - Injection ia Bupivacaine > solution saline
- Malheureusement cette étude ne compare pas l'injection

de Morphine à une injection ia de Morphine associée à la Bupivacaine.

Néanmoins, l'association de ces deux molécules complémentaires sur le plan théorique ne nuit pas à l'efficacité thérapeutique

Morphine et Pentoxiphylline :

La Pentoxiphylline a été étudiée pour ses propriétés antalgiques par Przewolcka [Life Sciences 2001]. Cette étude montre une élévation du seuil de nociception par l'injection de pentoxiphylline, avec une diminution de la consommation d'antalgiques post-opératoires. L'injection de Pentoxiphylline entraîne une diminution des taux sériques de TNF alpha et d'interleukine 6. Rappelons que ces deux cytokines sont présentes dans la « soupe inflammatoire » responsable de la sensibilisation des nocicepteurs.

L'association de morphine et pentoxiphylline paraît intéressante en mésothérapie.

Morphine et anti-H1

Les anti-H1 ont été étudiés par Couteaux et al. (5), et jouent un rôle dans la nociception. Les antihistaminiques agissent sur les macrophages et limitent ainsi le réflexe d'axone et les phénomènes de sensibilisation des nocicepteurs .

Par ailleurs dans notre expérience l'injection de morphine en IED entraîne une réaction cutanée à type d'urticaire et l'adjonction d'Atarax permet de minorer cet effet désagréable pour le patient.

Morphine et Clonidine

Cette molécule a été étudiée pour ses effets antalgiques. Il a été démontré qu'elle limitait l'action noradrénergique périphérique du système orthosympathique. Hors, la noradrénaline, ainsi libérée, stimule les récepteurs spécifiques présents sur les leucocytes qui libèrent alors la bêta endorphine. Cette bêta endorphine a ensuite une action antalgique locale sur les récepteurs opioïdes périphériques induits par l'inflammation tissulaire.(26)

L'association entre Morphine et clonidine ne paraît donc pas souhaitable.

Le mélange que l'on peut proposer comprend de la Morphine 4%, à raison de 3CC, soit 120mg. La Morphine sera utilisée seule ou associée à Pentoxiphylline et/ ou Atarax , en technique IED Stricte.

Cas Clinique

Patient âgé de 44 ans, porteur d'une spondylarthrite et suivi par le CETD du CHU de Rennes et un rhumatologue hospitalier. Ce patient bénéficie d'un traitement classique rhumatologique par Butazolidine

à la dose maximale et Tramadol (800mg/j). Il utilise quotidiennement une électrostimulation trans cutanée. Sont ajoutées, pendant les crises, des cures courtes de CTC orales ou injections cortisonées par voie épidurale.

Le patient bénéficie, toutes les 5 à 6 semaines, de séances de mésothérapie complémentaires avec lidocaïne, piroxicam et calcitonine 100U. Ce premier traitement, réalisé pendant un an, permettait d'obtenir un surcroît d'antalgie pendant environ 2 semaines. Puis les douleurs reprenaient leur rythme et leur intensité habituelle.

La réalisation au cours de la même séance de l'IDP avec le premier mélange et un second mélange en IED comprenant Morphine / Pentoxiphylline / Atarax, ont permis en dehors des crises de prolonger ce surcroît d'antalgie pendant 4 semaines.

L'utilisation de la morphine en mésothérapie est donc limitée à la présence d'une inflammation tissulaire importante, dans un but d'antalgie

BIBLIOGRAPHIE

1. Attaff et al J Neurochem 1989
2. Bixby & Spitzer J Neuro Sci 1983
3. Bolt et al. Eur J Anaesth 1987
4. Conor P Delaney , the annales of pharmacol. 2005. Sept vol 29-1507
5. Couteaux et al. Revue du rhumatisme 2005
6. Gupta. Anesthesiology 1980
7. Gupta et al. A Systematic Review of peripheral analgesic effects of intra articular morphine. Anesth. Analg. 2001 ;93 :761-70
8. Kalso et al. Pain relief from intra-articular morphin after knee surgery : a quantitative systematic review. Pain 71 (1997) 127-134
9. Kalso et al. No Pain No Gain :clinical excellence and scientific rigour-lessons learned from IA morphine. Pain 98 (2002) 269-275.
10. Kelly et al. Neuroendocrinol 1990
11. LIKAR et al. Peripheral morphine analgesia in dental surgery Pain 1998. 145-150.
12. Likar BJA 99
13. Likar et al The effects of intradermal fentanyl and ketamine on capsaicin-induced secondary hyperalgesia and flare reaction. Anesth Analg. 1999 ; 89 :1521-7
14. Likar et al. Intraarticular morphine analgesia in chronic pain patients with osteoarthritis. Anesth Analg 1997 ;84 :1313-7
15. Likar et al. Efficacy of Peripheral Morphine Analgesia in inflamed, non inflamed and perineural tissue of dental surgery patients. Journal of Pain and Symptom Management. Vol.21 No.4 april 2001
16. Machelska et al. Different mechanisms of intrinsic pain inhibition in early and late inflammation. J of Neuroimmunology 141(2003) 30-39
17. North et al. Proc Nat Acad Sci USA 1987
18. Przewolcka et al. The Role of delta-opioïd receptor subtypes in neuropathic pain. EJP 2001.31-37.
19. Przewlocki, Machelska. Anesth. Analg.2002
20. Stein C. et al . Opioids from immunocytes interact

with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proced. Nat. Am. Soc.* 1990,87, 5935-5939.

21. Stein C. et al. No tolerance to peripheral morphine analgesia in presence of opioid expression in inflamed synovia. *J. Clin. Invest.* 1996
22. Stein et Machelska. *Clinical and Experimental Pharmacology*, 2000
23. Stein C, Machelska H. Immune Mechanisms in Pain Control *Anesth Analg* 2002 ;95 :1002-8
24. Stein C. et al . Different mechanisms of intrinsic pain inhibition in early and late inflammation. *Journal of Neuroimmunology* 141. 2003. 30-39
25. Stein C. et al . Attacking Pain at its source : new perspectives on opioids. *Nature Med.* 2003. 1003-1008.
26. Stein et al, *European Journal of Neuroscience* 2004
27. Stein C. et al . Endogenous peripheral antinociception in early inflammation is not limited by the number of opioid-containing leukocytes but by opioid receptor expression. *Pain* 2004
28. Stein C. et al . Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. *Pain* 2004
29. Stein et al . Characterization of Mu Opioid Receptor Binding and G Protein Coupling in Rat Hypothalamus, Spinal Cord, and Primary Afferent Neurons during Inflammatory Pain. *JPET* 308 :712-718, 2004
30. Stein C. et al. Tissue Monocytes/Macrophages in Inflammation. Hyperalgesia versus opioid-mediated peripheral antinociception. *Anesthesiology* 2004 ; 101 :204-11
31. Stein C. et al. *Anesthesiology* 2005
32. Taguchi. *New England Journal of Medecine* 2001.
33. Wertz et al *Neuro Sci Lett* 1983
34. Werz & McDonald *Neuro Sci Lett* 1984
35. Williams et al. *Nature* 1982
36. Yuan et al. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1996