



Analgesic effect of morphine microinjected into the nucleus raphe magnus after electrolytic lesion of nucleus cuneiformis in tail-flick and formalin tests in rat

Leila Ahmad-Molaei, Mehdi Ordikhani-Seyedlar, Maryam Ziaei, Raha Khademi, Pegah Rouzmeh, Abbas Haghparast *

Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 6 Jun 2011

Accepted: 2 Sept 2011

Abstract

Introduction: The antinociceptive effect of morphine is, in part, mediated through the activation of a descending pathway. One of the major components of this pathway is the nucleus raphe magnus (NRM). Our previous study demonstrated the involvement of NRM in the analgesic effect of morphine microinjected into the nucleus cuneiformis (NCF) in a descending manner. The aim of the current study was to investigate another aspect of the interaction between these two nuclei in both acute and chronic inflammatory pain models.

Methods: In order to calculate 50% effective dose (ED₅₀) of morphine, animals received bilateral morphine injections (1, 2.5, 5 and 10 µg/0.5 µl saline) into the NRM. The obtained ED₅₀ of morphine was applied into the NRM with/without bilateral electrolytic lesion (500 µA, 30 sec) of the NCF. Tail-flick and formalin tests were applied as behavioral analgesic tests in this study.

Results: Results interestingly showed that the intra-NRM morphine injection (ED₅₀; 1 µg/0.5 µl saline) resulted in an increase in tail flick latencies (morphine-induced antinociception) at 30-min intervals, while bilateral electrolytic lesions in the NCF could notably decreased the morphine-induced antinociception during 30-90 min after the injection of morphine. Data also showed that bilateral morphine microinjected into the NRM, dose-dependently increases the antinociceptive responses during both early and late phases of formalin test. The antinociceptive effect of morphine microinjected into the NRM was significantly attenuated at the late phase but not early phase following the bilateral destruction of NCF in formalin test.

Conclusion: It could be concluded that there is a reciprocal interaction between NRM and NCF during morphine - induced antinociception in both acute and chronic inflammatory pain models in rat.

Key words: Nucleus raphe magnus, Nucleus cuneiformis, Tail-flick test, Formalin test, Electrolytic lesion, Pain

* Corresponding author e-mail: Haghparast@yahoo.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

اثر ضد دردی مورفین تزریق شده در هسته سجافی بعد از تخریب الکتریکی هسته میخی شکل در آزمون پس کشیدن دم و فرمالین در موش صحرایی

لیلا احمد مولایی، مهدی اوردیخانی سیدلر، مریم ضیائی، رها خادمی، پگاه روزمه، عباس حق پرست*

مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

پذیرش: ۱۱ شهریور ۹۰

دریافت: ۱۶ خرداد ۹۰

چکیده

مقدمه: اثر ضد دردی مورفین، بخشی با واسطه فعال شدن مسیر نزولی تعدیل درد صورت می گیرد. یکی از اجزاء مهم این مسیر هسته سجافی (Nucleus Raphe Magnus; NRM) است. در مطالعه قبلی ما نقش NRM را در ایجاد بی دردی ناشی از تزریق مورفین در هسته میخی شکل (Nucleus Cuneiformis; NCF) در مسیر نزولی تعدیل درد نشان دادیم. هدف از این مطالعه، بررسی جنبه دیگری از برهمکنش بین این دو هسته در دو مدل درد التهابی حاد و مزمن می باشد.

روش ها: برای محاسبه دوز موثر ۵۰ درصد مورفین (ED50)، حیوانات دوزهای مختلف مورفین (۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکروگرم در ۰/۵ میکرولیتر سالیان) را به صورت دو طرفه در داخل NRM دریافت کردند. ED50 مورفین بدست آمده در حضور و عدم حضور هسته NCF (تخریب الکتریکی دو طرفه، ۵۰۰ میکروآمپر به مدت ۳۰ ثانیه) به داخل NRM تزریق شد. آزمون های پس کشیدن دم و فرمالین بعنوان مدل های سنجش درد در این بررسی بکار گرفته شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که ED50 مورفین (۱ میکروگرم مورفین در ۰/۵ میکرولیتر سالیان) به داخل NRM موجب افزایش معنی دار در میانگین زمان پس کشیدن دم (اثر ضددردی مورفین) در فاصله های زمانی ۳۰ دقیقه ای بعد از تزریق شد و تخریب الکتریکی دوطرفه هسته NCF، اثر ضددردی مورفین را در فواصل زمانی ۳۰-۹۰ دقیقه بعد از تزریق مورفین کاهش داد. بعلاوه، در آزمون فرمالین، مورفین درون هسته ای NRM بصورت وابسته به دوز موجب اثرات ضد دردی در مراحل اولیه و تأخیری شد، در ضمن تخریب الکتریکی دو طرفه NCF بطور معنی داری موجب کاهش اثر ضددردی مورفین درون هسته ای NRM در فاز تأخیری و نه فاز اولیه شد.

نتیجه گیری: بنظر می رسد که برهمکنش دو جانبه بین NRM و NCF در ایجاد اثرات ضد دردی مورفین در مدل های التهابی درد حاد و مزمن نقش مهمی دارد.

واژه های کلیدی: هسته سجافی، هسته میخی شکل، آزمون پس کشیدن دم، آزمون فرمالین، تخریب الکتریکی، درد

مقدمه

مورفین می باشد [۳۳]. به بیانی دیگر، نورون های موجود در NRM بعنوان ایستگاه ارتباطی بین مراکز بالاتر سیستم عصبی و نورون های درد زا در سطح طناب نخاعی عمل می کنند. تحریک الکتریکی NRM اثر ضد دردی ایجاد می کند [۴۶، ۴۷] و پاسخ نورون های شاخ خلفی نخاع را نیز کاهش می دهد [۵۷]. این اثر همچنین به وسیله تزریق مواد اپیوئیدی به داخل NRM نیز ایجاد می شود [۱۴]. بررسی های متعدد نشان می دهد که تخریب این هسته بطور معنی داری اثر ضد دردی مورفین را کاهش می دهد [۲۷، ۲۸، ۵۱، ۵۸]. بعلاوه،

مطالعات متعددی نشان داده اند که هسته سجافی (Nucleus Raphe Magnus; NRM)، واقع در ناحیه بصل النخاع، نقش مهمی در تعدیل درد دارد [۴۲]. مطالعات پیشین همچنین نشاندهنده نقش این هسته در اثرات ضد دردی

Haghparast@yahoo.com

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

های NRM صورت می گیرد [۵، ۹، ۲۶، ۲۷، ۲۸، ۶۰]. هدف از مطالعه حاضر بررسی بر همکنش بین هسته های NRM و NCF می باشد. بعلاوه، این بر همکنش توسط آزمون های ارزیابی کننده مختلف دردهای حاد و مزمن انجام می شود که ماهیت متفاوت مسیرهای پردازش کننده درد را مشخص می کند، بنابراین در این مطالعه، ما سعی بر آن داریم که اثر ضددردی مورفین تزریق شده بدخل NRM را بدنبال تخریب الکتریکی NCF بوسیله آزمون پس کشیدن دم و فرمالین به عنوان مدل های حیوانی درد حاد و درد التهابی مزمن مورد ارزیابی قرار دهیم.

مواد و روش ها

در این مطالعه از ۱۴۲ سر موش صحرایی بالغ نژاد ویستار (انستیتو پاستور تهران) در محدوده وزنی ۲۸۰-۳۲۰ گرم استفاده شد. حیوانات تحت شرایط مناسب درجه حرارت 22 ± 1 درجه سانتیگراد و دوره روشنایی-تاریکی (دوره روشنایی ۷-۱۹) ۱۲ ساعته در دسته های سه تایی نگهداری شده و آب و غذا به مقدار کافی در دسترسشان قرار گرفت. حیوانات حداقل به مدت یک هفته بطور روزانه قبل از جراحی برای قرار گیری کانول و الکتروُد، handle شدند. همه آزمایشات طی مجوز شماره ۲۳-۸۰ کمیته اخلاق و پژوهش دانشکده پزشکی دانشگاه شهید بهشتی انجام شد.

در روز جراحی حیوانات با کتامین (۱۰۰ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلین (۱۰ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن) بصورت داخل صفاقی بیهوش و بلافاصله در دستگاه استریوتاگس (Stoelting, USA) ثابت می شدند. در حین جراحی سطح ثابتی از بیهوشی در حیوانات وجود داشت، بطوری که هیچگونه حرکت خودبخودی در پاسخ به محرک دردزا وجود نداشت؛ رفلکس پلک زدن مشاهده نشد، همچنین تنفس حیوانات منظم و آهسته بود. مختصات NCF نسبت به برگما: قدامی-خلفی $-8/4$ ، جانبی $1/9 \pm$ و عمق $6/3$ و NRM، نسبت به برگما: قدامی-خلفی -11 ، جانبی $0/0 \pm$ و عمق $9/3$ (کانول راهنما ۱ میلیمتر بالاتر از محل اصلی تزریق) بر اساس اطلس پاکسینوس-واتسون تعیین و علامتگذاری شد [۴۹]. در مطالعه فوق جهت تخریب الکتریکی (۵۰۰ میکروآمپر جریان

مطالعات الکتروفیزیولوژی نشان داده است که فعالیت نورون-های NRM تحت تاثیر محرک های آسیب رسان احشایی [۱۴، ۲۵، ۴۳] و مورفین [۲۰، ۴۲] قرار می گیرند، لیکن نتایج متناقضی در رابطه با اثرات مورفین تزریق شده در NRM بدنبال فعالیت شاخ خلفی نخاع در پاسخ به محرک های آسیب رسان گزارش شده است. Du و همکاران نشان دادند، متعاقب تزریق مورفین در NRM گربه، پاسخ نورون های شاخ خلفی نخاع، متعاقب گرمای آسیب رسان پوست و تحریک الکتریکی اعصاب تضعیف می شود [۱۵]. در حالیکه Le Bars و همکاران (۱۹۸۰) مشاهده کردند که بدنبال فعال شدن فیبرهای نوع C متعاقب تزریق مورفین به داخل NRM موش صحرایی، پاسخ نورون های شاخ خلفی نخاع تقویت می شود [۳۶]. از سوی دیگر Anderson و همکاران دریافتند که بخش بزرگی از نورون های موجود در این هسته بدنبال تزریق مورفین فعال می شوند [۳]. در حالیکه محققین دیگر [۱۲، ۲۰، ۵۵] مشاهده کردند که مورفین موجب مهار نورون های این هسته می شود و یا اینکه بندرت فعالیت این نورون ها را تحت تاثیر قرار می دهد. در مجموع متعاقب تحریکات آسیب رسان، حالت های مختلف مهار [۲۳]، تسهیل [۳۶] و عدم تاثیر [۳۸] برروی فعالیت نورون های شاخ خلفی نخاع گزارش شده است.

هسته میخی شکل (Nucleus Cuneiformis; NCF)، هسته ای در ناحیه مزانسفال واقع در تشکیلات مشبک می باشد. یافته های رفتاری و آناتومیک نشان داده اند که NCF نقش مهمی در یکپارچگی حسی-حرکتی در ارتباط با انتقال درد دارد [۲۶، ۲۸، ۶۰]. بنظر می رسد NCF که بیشتر فیبرهای آوران را از مغز قدامی و میانی دریافت می کند، نقش یک ایستگاه ارتباطی را در تعدیل درد بازی می کند [۶۰]. مطالعات گذشته همچنین نشان داده اند که ورودی های مهمی از NCF مغز میانی به NRM بصل نخاع وجود دارد. علاوه بر این، آزمایشات الکتروفیزیولوژیک در موش های صحرایی که بطور عمیق بیهوش شده بودند، نشان داد که این ورودی ها عمدتاً تحریکی هستند. این یافته ها نشان می دهد که در موش های صحرایی که بصورت خفیف بیهوش شده بودند تحریک الکتریکی یا فارماکولوژیکی NCF می تواند مسیر نزولی تعدیل درد را با واسطه NRM فعال کند و بنظر می رسد این برهمکنش بصورت غیر اختصاصی با فعال شدن نورون

می شوند که از فرمول زیر محاسبه می شود:

$$\% \text{ MPE} = \frac{\text{Post-drug latency (sec)} - \text{Baseline latency (sec)}}{\text{Cut-off value (sec)} - \text{Baseline latency (sec)}} \times 100$$

که در این فرمول میزان تأخیر بعد از تزریق دارو به داخل NRM در فاصله های زمانی ۳۰ دقیقه ای (۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه) ثبت می شود. برای ارزیابی و محاسبه میزان حساسیت حیوانات به محرک دردزا، زمان پس کشیدن دم بعنوان آستانه درد قبل از دارو درمانی اندازه گیری می شود.

آزمون درد التهابی مزمن: در این مطالعه از آزمون فرمالین استفاده گردید. برای انجام آزمون فرمالین، هر حیوان در یک محفظه که از جنس پلکسی گلاس (به ابعاد ۳۰ × ۳۰ × ۳۰ cm) بود قرار داده می شد. در زیر این محفظه، آینه ای با زاویه ۴۵ درجه قرار داشت تا وضعیت کف پای حیوان کاملاً مشخص باشد. ۵ دقیقه بعد از تزریق مورفین و یا حلال آن به داخل NRM، تزریق فرمالین (۵٪، ۵۰ میکرولیتر) بصورت زیر جلدی به کف پنجه یک پای حیوان انجام می شد. زمان کل پاسخ دردزایی ناشی از تزریق فرمالین هر ۵ دقیقه اندازه گیری می شد. ثبت پاسخ رفتاری بلافاصله بعد از تزریق فرمالین آغاز می شد و برای مدت ۶۰ دقیقه ادامه داشت. جهت ارزیابی رفتارهای وابسته به درد در این آزمون، رفتارهای مشاهده شده با استفاده از روش وزن دهی، به صورت کمی محاسبه شد. [۱۳، ۱۶، ۳۰، ۳۹]. میزان درد هر ۵ دقیقه با توجه به زمانی که موش در هر مقیاس از شدت درد سپری می کرد ثبت می گردید: ۰) زمانی که حیوان بدون توجه به پای تزریق شده پای خود را روی زمین قرار می داد، ۱) حیوان پای تزریق شده را روی زمین قرار داده در حالی که وزن بدن خود را بیشتر بر روی پای سالم می گذاشت، ۲) حیوان پای تزریق شده را کاملاً از سطح زمین بلند می کرد، ۳) حیوان پای تزریق شده را می لیسید، گاز می گرفت یا به شدت تکان می داد. در گروه کنترل حجم مساوی از نرمال سالین در همان کف پای راست یا چپ به صورت زیر جلدی تزریق می شد. سپس شدت درد ۰ تا ۳ محاسبه می شد به این صورت که هر درجه از شدت درد در زمان سپری شده در آن شدت ضرب می شد، سپس مجموع آنها بخش بر کل زمان یعنی ۳۰۰ ثانیه می شد تا شدت درد برای هر ۵ دقیقه محاسبه شود.

$$\text{Nociceptive score} = (t_0 \times 0) + (t_1 \times 1) + (t_2 \times 2) + (t_3 \times 3) / t_0 + t_1 + t_2$$

DC بمدت ۳۰ ثانیه) دو طرفه از میکروالکتروود آنودی در NCF استفاده شد، درضمن کانول های راهنما نیز برای تزریق دو طرفه در ناحیه NRM قرار گرفتند. دوره بهبودی (Recovery) یک هفته در نظر گرفته شد. در طول دوره بهبودی حیوانات بصورت روزانه handle شدند. این شیوه بدین منظور انجام می شد که استرس رت ها در روز تزریق کاهش یابد و بالطبع اطلاعات بدست آمده از آزمون های درد دچار خطا نشوند. جهت تزریق مواد در گروه های مورد آزمایش از سرسوزنهای دندانپزشکی ۳۰G متصل به لوله پلی اتیلن شماره ۲۰ با استفاده از سرنگ هاملتون با حجم ۱ میکرولیتر استفاده می شد. کانول های تزریق قبل از انجام آزمایشات از نظر وجود انسداد یا نشتی مورد بررسی و تأیید قرار می گرفتند. طول کانولی که برای تزریق درون هسته ای NRM استفاده می شد، یک میلیمتر بیشتر از طول کانول راهنما بود. دارو و مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایشات مورفین سولفات (شرکت تماد، ایران) و فرمالدئید (Merck, Germany) بوده که پس از حل شدن در محلول استریل نرمال سالین تزریقی بلافاصله قبل از کاربرد، تهیه می شد. حجم و سرعت مورفین تزریقی در این هسته به ترتیب ۵/۰ میکرولیتر و با سرعت تزریقی ۰/۱ میکرولیتر در مدت ۱۵ ثانیه بوده است. زمان انجام آزمون ها در ساعت مشخصی از روز بین فاصله زمانی ۱۰ صبح تا ۴ بعد از ظهر بوده است. فرمالین ۲/۵٪ بصورت یک حجم فرمالدئید (۳۶/۶٪ درصد فرمالدئید، Merck) و ۱۳/۶۴ حجم سالین به صورت زیر پوستی به کف پنجه یک پای حیوان تزریق می شد.

آزمون درد حاد: آستانه درد حاد بوسیله دستگاه درد سنجی پس کشیدن دم، (USA, Harvard) اندازه گیری می شد. این دستگاه دارای یک منبع نورانی بوده که نور را بصورت متمرکز با شدت های متفاوت بر روی دم موش در فاصله های ۳، ۵ و ۷ سانتیمتری از انتهای دم به حیوان تابانده می شد. شدت نور در حدود ۳۵٪ تنظیم می شد بطوری که در این شدت نور زمان تأخیر پایه دم در آزمون پس کشیدن دم در محدوده زمانی ۳ - ۴ ثانیه قرار می گرفت. اگر در هر زمان حیوان به هر دلیل در محدوده ۱۲ ثانیه (نقطه cut-off) دم خود را حرکت نداد، بلافاصله دم حیوان را برای جلوگیری از آسیب از منبع نورانی دور می کردیم [۲۷]. زمان پس کشیدن دم (ثانیه) بصورت داده های خام یا حداکثر درصد پاسخ دهی (%MPE) بیان

داده های پس کشیدن دم در فاصله های زمانی ۳۰ دقیقه محاسبه شد. در آزمون فرمالین، میانگین شدت درد بدست آمده برای ۵ دقیقه اول بعنوان مرحله اول (فاز اولیه) در نظر گرفته شد و سطح زیرمنحنی (Area Under Curve; AUC) شدت درد بدست آمده با استفاده از قانون دوزنقه برای ۱۵-۶۰ دقیقه بعد از تزریق فرمالین محاسبه و بعنوان مرحله دوم (فاز تأخیری) در نظر گرفته شد.

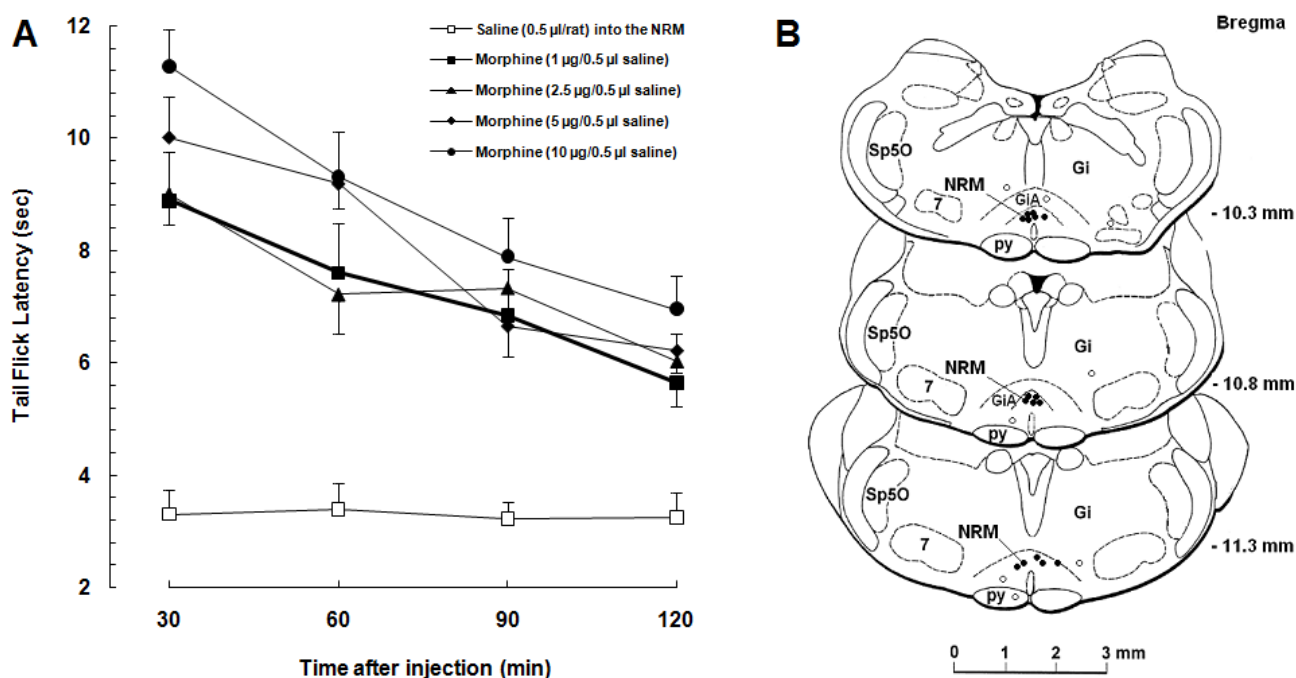
داده ها با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism 5.0 (version) آنالیز شد. میانگین داده ها در آزمون پس کشیدن دم محاسبه شد و مساحت زیر سطح منحنی نرمالایز شده (با گروه کنترل مقایسه شد) و در تمام گروه ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) یکطرفه یا دو طرفه محاسبه شد و در صورت معنی دار بودن به ترتیب از پس آزمونهای Tukey's یا Bonferroni's برای مقایسه بین گروه ها استفاده شد. سطح معنی داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. پس از اتمام آزمایشات رفتاری، حیوانات از طریق قلب و با استفاده از محلول سالین و متعاقب آن فرمالین بافر شده ۱۰٪، پرفیوژن شدند. در مرحله بعدی مغز حیوان بیرون آورده شد و در فرمالین ۱۰٪ نگهداری شد. سپس از مغز آن حیوانات با استفاده از دستگاه ویراتورم (Campden Instrument Ltd, UK) برش تهیه شد و صحت محل کانول گذاری با استفاده از اطلس پاکسینوس و واتسون [۴۹]، در گروههای کنترلی و آزمونی تزریق ماده و تخریب الکتریکی با استفاده از میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند. چنانچه محل کانول گذاری جهت تزریق و یا تخریب الکتریکی درست نبود، اطلاعات بدست آمده کنار گذاشته می شد.

یافته ها

میانگین زمان تأخیر پایه در آزمون پس کشیدن دم در این مطالعه در گروه کنترل سالین (saline control)، $0.37 \pm$ و ۳/۵۱ ثانیه بود. تزریق دوزهای مختلف مورفین (۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکروگرم در ۰/۵ میکرولیتر سالین) به داخل NRM موجب افزایش زمان پس کشیدن دم در فاصله های ۳۰ دقیقه ای شد. شکل ۱A اثر دوزهای مختلف مورفین را در فواصل زمانی ۳۰-۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق آن بر زمان تأخیر پس کشیدن دم

با اعمال این روش، مقیاس رتبه ای شدت درد در محدوده ۳-۰ بدست می آمد [۲۳]. ۵ دقیقه اول بعنوان مرحله اولیه (۰-۵) و مرحله تأخیری از ۱۵-۶۰ دقیقه بعد از تزریق فرمالین در پنجه پای حیوان در نظر گرفته می شد.

روش اجراء آزمایشات در این مطالعه در دو بخش بوده است: در بخش اول بصورت دوز-پاسخ و بوسیله آزمون پس کشیدن دم، دوز موثر ۵۰ درصد (ED50) مورفین تعیین شد. سپس، ED50 مورفین، در حضور و عدم حضور NCF (تخریب الکتریکی دو طرفه هسته)، به داخل NRM تزریق می شد و متعاقب آن ارزیابی درد حاد با استفاده از آزمون پس کشیدن دم بعنوان مدل درد حاد انجام می شد. در بخش دوم مطالعه، برای تعیین اثر مورفین تزریق شده در NRM متعاقب تخریب NCF در آزمون فرمالین، ابتدا ED50 مورفین بوسیله آزمون فرمالین تعیین و در مرحله بعدی ED50 مورفین متعاقب تخریب NCF به حیوان تزریق می شد. بدین منظور در بخش اول مطالعه ۴۲ حیوان در ۵ گروه طبقه بندی شدند، یک گروه از حیوانات سالین (۱ میکرولیتر) و چهار گروه دوزهای مختلف مورفین (۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکروگرم در ۰/۵ میکرولیتر سالین) را دریافت کردند. در پایان این مرحله، ED50 مورفین برای تزریق داخل NRM تعیین شد. سپس حیوانات در ۴ گروه آزمایشی شامل ED50 NCF sham lesion و NCF lesion، سالین و یا ED50 مورفین را دریافت کرده و با استفاده از آزمون پس کشیدن دم ارزیابی درد حاد انجام شد. در بخش دوم تحقیق، منحنی دوز-پاسخ مورفین تزریق شده در NRM در آزمون فرمالین در ۳۶ سر موش صحرایی مانند حیواناتی که برای آزمون پس کشیدن دم در نظر گرفته شده بودند، انجام شد. به عبارت دیگر، یک گروه از این حیوانات، سالین (۱ میکرولیتر) و چهار گروه دیگر، دوزهای مختلف مورفین (۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکروگرم در ۰/۵ میکرولیتر سالین) را دریافت کردند. در پایان این بخش از مطالعه، ED50 مورفین برای تزریق به داخل NRM تعیین شد. سپس در ۴ گروه ۶ تایی که به گروه های NCF sham lesion و NCF lesion دسته بندی شده بودند و بمدت یک هفته دوره بهبودی را گذرانده بودند، ۱ میکرولیتر سالین یا ED50 مورفین به داخل NRM تزریق و با استفاده از آزمون فرمالین ارزیابی درد التهابی مزمن انجام شد. داده ها به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار (mean $\pm$ SEM) بیان گردید. میانگین



شکل ۱- (A) اثر دوزهای مختلف مورفین در هسته سجافی (Nucleus raphe magnus; NRM) در دوره زمانی ۳۰-۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق. یک کاهش وابسته به دوز در میانگین زمان پس کشیدن دم (Tail flick latency) بعد از تزریق مورفین رخ داد. دوز مؤثر ۵۰ درصد مورفین نزدیک ۱ میکروگرم در ۰/۵ میکرولیتر سالین (خط درشت و تیره) بوده است. داده ها (n=7-10 در هر گروه) بصورت Mean $\pm$ SEM نمایش داده شده است. (B) سه برش شماتیک کروئال نشان دهنده محل تزریق مورفین (۱ میکروگرم در ۰/۵ میکرولیتر سالین؛ دایره توپر؛ ●) در ناحیه NRM هستند و دایره تو خالی (○) گروه کنترل کانول گذاری (cannula placement controls) هستند که مورفین در نواحی مجاور NRM تزریق شده است.

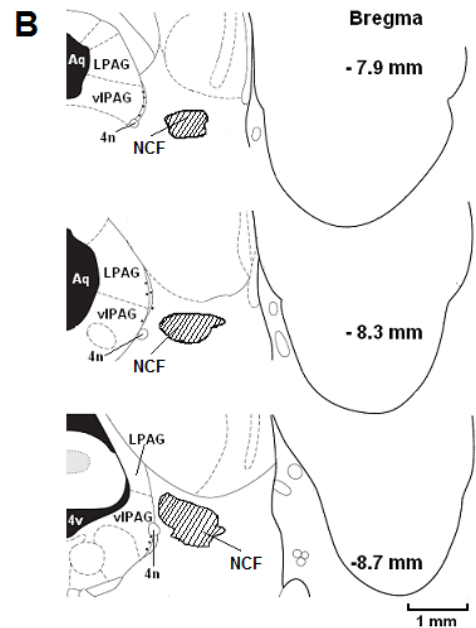
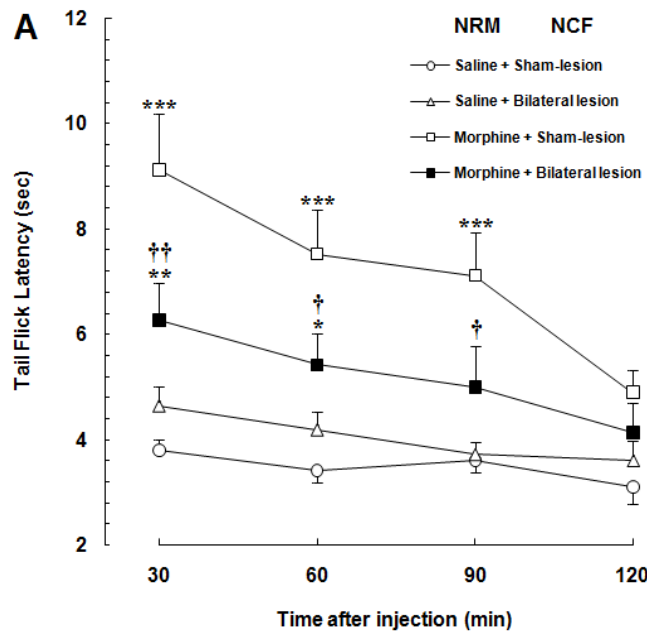
7؛ Facial nucleus Gi؛ Gigantocellular reticular nucleus GiA؛ (alpha part) Gigantocellular reticular nucleus NRM؛ Nucleus raphe magnus py؛ Pyramidal tract؛ Sp50؛ Spinal trigeminal nucleus oralis

کشیدن دم در گروه کنترل کانول گذاری (شکل ۱B؛ Placement control group; n=8) در ناحیه NRM پس از تزریق مورفین، $4/33 \pm 0/76$ ثانیه بود. میانگین زمان پس کشیدن دم در گروه saline+sham-lesion متعاقب تزریق سالین داخل NRM، $3/63 \pm 0/23$ ثانیه بوده است.

در بخش دوم از آزمایشات، اثر تخریب الکتریکی دو طرفه هسته NCF بر پاسخ ضددردی مورفین تزریق شده به داخل NRM مورد بررسی قرار گرفت. ANOVA دوطرفه مدل repeated measures و متعاقب آن تست Bonferroni در شکل ۲A، اختلاف معنی داری را در دو فاکتور مورفین و تخریب الکتریکی (شکل ۲B) بین گروههای آزمونی در فواصل زمانی ۳۰ دقیقه بعد از تزریق نشان داد. [treatment main effect: $F(3,112)=34.45$, $P<0.0001$, time main effect $F(3,112)=9.024$, $P<0.0001$, treatment $\times$ time interaction $F(9,112)=1.481$, $P=0.1635$]. این بخش نشان داد که تزریق مورفین در هسته NRM بطور

نشان می دهد. ANOVA دو طرفه و متعاقب آن تست Bonferroni تفاوت معنی داری در این دو فاکتور یعنی، پاسخ دوزهای مختلف مورفین و فاصله های زمانی پس از تزریق در مقایسه با گروهی که سالین دریافت کرده بودند را نشان داد. [Factor morphine vs saline: $F(4,12)=18.54$, $P<0.0001$; Factor post-injection time: $F(3,142)=7.621$, $P<0.0001$; Interaction: $F(12,142)=0.6612$, $P=0.768$].

حداکثر پاسخ ضددردی مورفین در دوز ۱۰ میکروگرم، ۳۰ دقیقه بعد از تزریق (زمان پس کشیدن دم $11/27 \pm 0/65$ ثانیه، شکل ۱A) آشکار شد. لیکن به منظور بررسی رابطه بین تخریب الکتریکی NCF و ضددردی ایجاد شده توسط مورفین در NRM، دوز ۱ میکروگرم مورفین نزدیک به ED50 مورفین ($1/12 \pm 0/52$ میکروگرم در ۰/۵ میکرولیتر سالین) بدلیل معنی داری ($MPE = 61/1 \pm 4/87\%$) و نه حداکثر اثر ضددردی آن به داخل NRM تزریق شد. میانگین زمان پس



شکل ۲- (A) اثر تخریب الکتریکی هسته میخی شکل (Nucleus cuneiformis; NCF) بصورت دو طرفه بر پاسخ ضد دردی مورفین در هسته سجافی (Nucleus raphe magnus; NRM) اختلاف معنی داری در میانگین زمان پس کشیدن دم بین گروه های sham-lesion و lesion در دقایق ۳۰، ۶۰ و ۹۰ و نه ۱۲۰ بعد از تزریق مشاهده می شود. داده ها (n=8 در هر گروه) بصورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نمایش داده شده است. (B) سه برش شماتیک کروئال که نشان دهنده نواحی تخریب در NCF می باشد (نواحی هاشور دار).

4n, Trochlear nerve; 4v, Fourth ventricle; Aq, Aqueduct; LPAG, Lateral periaqueductal gray; vLPAG, Ventrolateral periaqueductal gray

Tukey برای مقادیر نرمالایز شده سطوح زیر منحنی در شکل ۳B نشان داد که تزریق دو طرفه مورفین به داخل NRM بصورت وابسته به دوز سبب افزایش پاسخ ضد دردی آن در فاز اولیه [$F(4,35)=35.8, P<0.0001$] و فاز تأخیری [$F(4,35)=20.61, P<0.0001$] می شود.

با این وجود، شکل ۳B نشان داد که درصد کاهش یافته مقادیر نرمالایز شده سطوح زیر منحنی بعنوان ایندکس بی دردی بین دوز های پایین مورفین (۱ و ۲/۵ میکروگرم) در هیچکدام از مراحل اولیه و تأخیری معنی دار نبوده است. علاوه بر این، هیچگونه اختلاف معنی داری در مقادیر سطوح زیر منحنی بین دوز های ۵ و ۱۰ میکروگرم مورفین تزریق شده در NRM نیز مشاهده نشد. لذا به منظور بررسی نقش گیرنده های اپیوئیدی در هسته NRM، دوز ۱ میکروگرم مورفین نزدیک ED50 مورفین در NRM بدلیل معنی داری و نه حداکثر اثر ضددردی در هر دو مرحله آزمون فرمالین، تزریق شد.

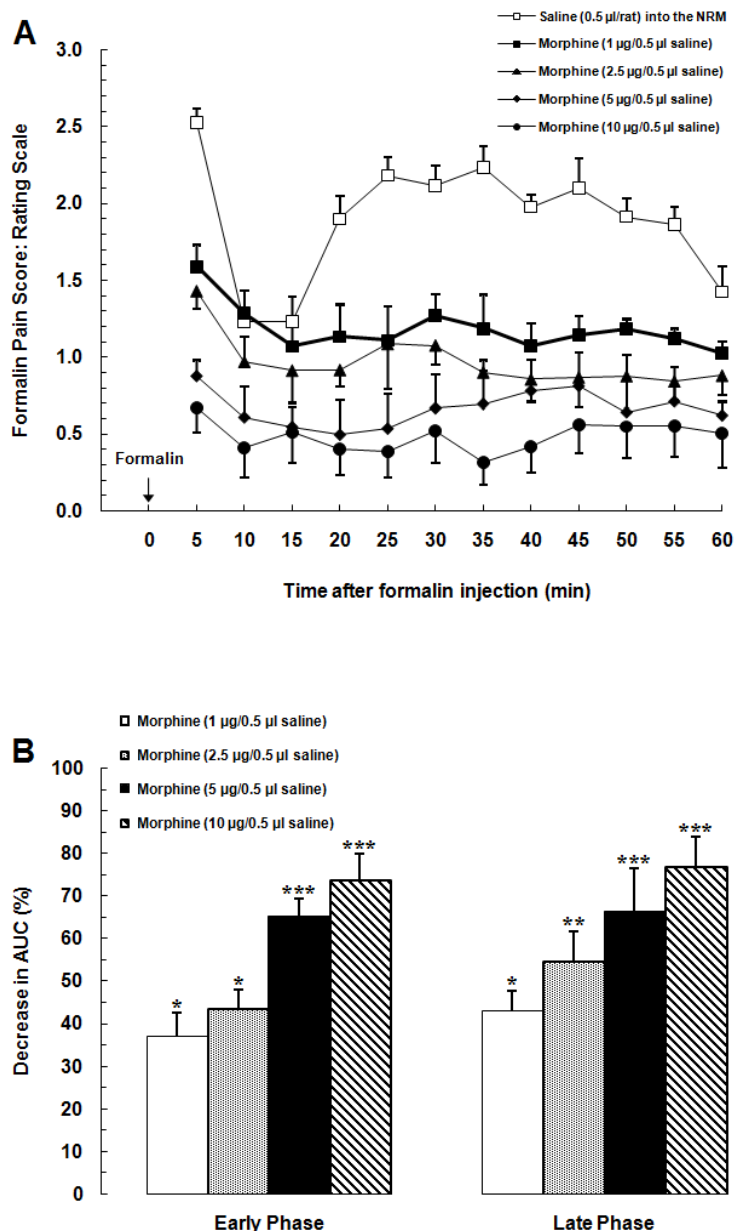
در بررسی حاضر، گروه saline-NRM (saline control + sham-lesion NCF) بعنوان گروهی که هیچگونه پاسخ

معنی داری میانگین زمان پس کشیدن دم را در فاصله زمانی ۳۰-۹۰ دقیقه بعد از تزریق افزایش داده است و تخریب الکتریکی دو طرفه NCF موجب کاهش اثر ضددردی مورفین شد (شکل ۲A). علاوه بر این، تفاوت معنی داری در میانگین زمان پس کشیدن دم بین گروه های sham-lesion و lesion در حیواناتی که سالین داخل NRM دریافت کرده بودند، وجود نداشت (شکل ۲A).

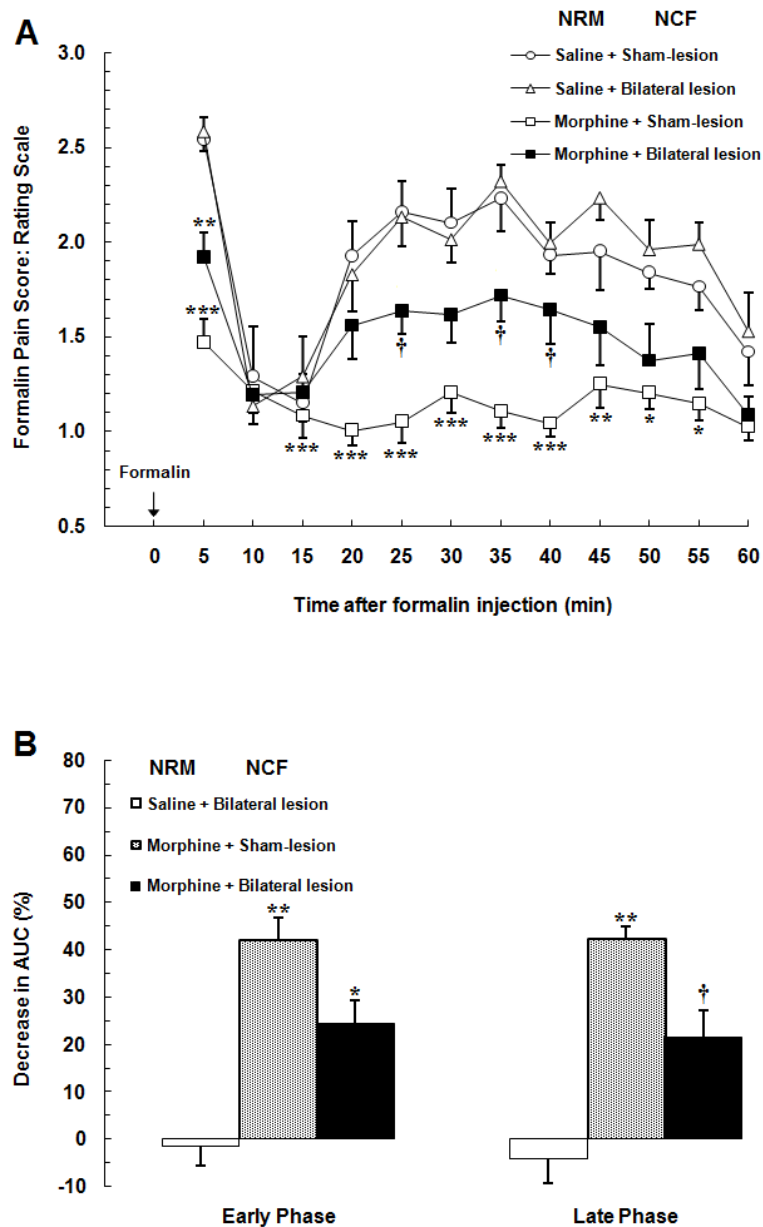
در مطالعه مربوط به آزمون فرمالین، اثرات دوزهای مختلف مورفین تزریق شده به داخل NRM مورد ارزیابی قرار گرفت. ANOVA دو طرفه مدل repeated measures و متعاقب آن تست Bonferroni برای میزان شدت درد بدست آمده [$\text{treatment main effect: } F(4,417)=116.4, P<0.0001$; $\text{time main effect } F(11,417)=3.936, P<0.0001$; $\text{treatment} \times \text{time interaction effect: } F(44,417)=1.548, P<0.05$] در شکل ۳A اختلاف معنی داری را در رفتارهای القاء شده توسط فرمالین در دوز های مختلف مورفین در مقایسه با گروه saline control نشان داد. به عبارت دیگر ANOVA یکطرفه و متعاقب آن تست

دارو موجب بی‌دردی می‌شد در فازهای اولیه و تأخیری در نظر گرفته شد. در این بخش از آزمایشات حیوانات سالیان (۰/۵ میکرولیتر) یا مورفین (۱ میکروگرم در ۰/۵ میکرولیتر سالیان) ۲ دقیقه قبل از آزمون فرمالین به داخل NRM دریافت کردند. ANOVA دو طرفه مدل repeated measures و متعاقب آن تست Bonferroni برای مقادیر شدت درد بدست آمده در شکل ۴B نشان داد که اختلاف معنی‌دار در رفتارهای القاء

ضد‌دردی نشان‌دهنده در نظر گرفته شد و سطوح زیر منحنی برای شدت دردهای بدست آمده در فازهای اولیه و تأخیری در همه گروه‌ها بوسیله مقادیر نرمالایز شده سطوح زیر منحنی (مقایسه با گروه کنترل سالیان) محاسبه شد. بنابراین میزان پایه درد در گروه کنترل سالیان بر اساس مقادیر نرمالایز شده در گروه‌های تحت آزمایش، برابر صفر در نظر گرفته شد. بعبارت دیگر درصد کاهش در سطوح زیر منحنی بعنوان ایندکسی که



شکل ۳- (A) رفتارهای القاء شده توسط فرمالین در طول زمان بعد از تزریق سالیان یا دوزهای مختلف مورفین در هسته سجافی (Nucleus Raphe Magnus; NRM). دوز مؤثر ۵۰ درصد مورفین نزدیک ۱ میکروگرم در ۰/۵ میکرولیتر سالیان (خط درشت و تیره) بوده است. داده‌ها (n=6-8 در هر گروه) بصورت Mean $\pm$ SEM نمایش داده شده است. (B) درصد کاهش (اثر ضد‌دردی مورفین) سطح زیر منحنی (Area under curve; AUC) محاسبه شده در فازهای اولیه (۰-۵ دقیقه) و تأخیری (۱۵-۶۰ دقیقه) از منحنی زمان-پاسخ (Time-response curve) به تزریق فرمالین در شکل A برای حیواناتی که دوزهای مختلف مورفین را داخل NRM دریافت کرده‌اند. داده‌های نرمالایز شده (n=6-8) به صورت Mean $\pm$ SEM ارائه شده‌اند. $P < 0.05$ *؛ $P < 0.01$ **؛ $P < 0.001$ *** در مقایسه با گروه کنترل سالیان



شکل ۴- اثر تخریب الکتریکی هسته میخی شکل (Nucleus cuneiformis; NCF) بر پاسخ ضد درد مورفین در هسته سجافی (Nucleus raphe magnus; NRM) درآزمون فرمالین. حیوانات بصورت دوطرفه مورفین (۱ میکروگرم در ۰/۵ میکرولیتر سالیین) را دریافت کردند. اختلاف معنی داری در (A) میانگین شدت درد (رفتارهای درد) بین گروه های sham-lesion و lesion مشاهده شد، همچنین در شکل (B) درصد کاهش (اثر ضد درد) سطح زیر منحنی (Area under curve; AUC) محاسبه شده در فازهای اولیه (۵-۱۵ دقیقه) و تأخیری (۶۰-۱۵ دقیقه) از منحنی زمان-پاسخ (Time-response curve) به تزریق فرمالین در شکل A نشان داده شده است. داده های نرمالایز شده (n=6) به صورت Mean $\pm$ SEM ارائه شده اند. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل سالیین (Saline-NRM + Sham-lesion NCF) † $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل مورفین (Morphine-NRM + Sham-lesion NCF)

بعبارت دیگر ANOVA یکطرفه و متعاقب آن تست Tukey برای مقادیر نرمالایز شده سطوح زیر منحنی در شکل ۴B نشان داد که تزریق مورفین در NRM در گروه sham-lesion بطورمعنی داری اثر ضد درد مورفین را بصورت درصد کاهش یافته مقادیر نرمالایز شده سطوح زیرمنحنی شده در فازهای اولیه و تأخیری افزایش داد ($P < 0.01$). با این وجود این شکل

شده توسط فرمالین بین گروه کنترل مورفین (morphine-) Morphine-NRM + (NRM + sham-lesion NCF) و lesion-NCF [treatment main effect: $F(3,240) = 65.1$, $P < 0.0001$; time main effect $F(11,240) = 13.11$, $P < 0.0001$; treatment $\times$ time interaction effect: $F(33,240) = 1.56$, $P < 0.05$].

موجب فعال شدن مسیر نزولی کنترل درد می شود [۲۱]. برعکس، تخریب الکتریکی NRM مانع اثرات ضد دردی مورفین می شود [۳، ۱۱، ۵۰، ۵۸]. همچنین گزارش شده است که نالوکسان تزریق شده به داخل NRM اثر ضددردی ایجاد شده توسط تحریک الکتریکی این هسته و یا تجویز سیستمیک مورفین را کاهش می دهد [۴۳، ۵۷]. بنابراین نقش گیرنده های اپیوئیدی در NRM بطور واضح نشان داده شده است. داده های قبلی ما همچنین نشان داد که تخریب NRM اثر ضددردی مورفین تزریق شده به داخل NCF را کاهش می دهد [۲۷].

مطالعات قبلی نشان داده اند که تخریب NRM اثری بر روی درد پایه نداشته است [۳۷]. علاوه بر این، در مطالعه حاضر، تخریب الکتریکی NCF، هیچگونه اثری بر روی آستانه درد پایه نشان نداد. اگرچه در برخی بررسی ها گزارش شده است که تخریب ناحیه سری شکمی-میانی بصل النخاع (RVM) پردردی ایجاد کرده است [۱۴، ۲۹]، این اختلافات ممکن است ناشی از تفاوت در تکنیک های ارزیابی سنجش درد و یا وسعت تخریب باشد. ثابت شده است که یک خروجی اصلی از ماده خاکستری دور قنات مغزی (Periaqueductal gray; PAG) به NRM و دیگر تشکیلات مشبک در بصل النخاع وجود دارد [۲۰، ۲۲] و این ناحیه بعنوان یک پل ارتباطی مهم در نظر گرفته شده که به وسیله آن ناحیه فوقانی ساقه مغز نقش مهمی در مسیر کنترل نزولی درد بر روی انتقال درد نخاعی اعمال می کند [۱۹، ۵۶]. مطالعاتی که در ارتباط با محل عملکرد اپیوئیدها بوده نشان داده است که بی دردی ناشی از اپیوئیدها توسط PAG و ناحیه RVM نه تنها بعد از تحریک الکتریکی [۴۰، ۵۲]، بلکه توسط تجویز موضعی مورفین نیز رخ می دهد [۳۳]. بعبارت دیگر، تحریک الکتریکی و تزریق مورفین به داخل PAG موجب فعال شدن مسیر های نزولی با واسطه NRM شده است [۸، ۴۶]. با توجه به تشابهات نسبی خصوصیات ساختاری [۲۴]، عملکردی [۲۶، ۲۸] و آناتومیکی خروجی ها از PAG و NCF به ناحیه NRM [۳۱، ۳۲، ۳۴]، ما پیشنهاد می کنیم که احتمال دارد مکانیسم های مشابهی در ایجاد خصوصیات بی دردی در هسته NCF نقش داشته باشند [۲۷]. علاوه بر این، بر اساس یک گزارش اخیر، فیبرهای خروجی سروتونرژیک از ناحیه PAG، به ناحیه

مؤید این موضوع است که درصد کاهش مقادیر زیر سطح منحنی بعنوان ایندکس بی دردی در تخریب الکتریکی دوطرفه NCF که تزریق درون هسته ای سالیان را در NRM دریافت کرده بودند، اختلاف معنی داری را در مقایسه با سطح پایه نشان نداد و مؤید این موضوع است که پاسخ پردردی در هر دو فاز اولیه و تأخیری وجود دارد. بعلاوه یافته های بدست آمده در این بررسی نشان داد که تخریب الکتریکی NCF بصورت دوطرفه بطور معنی داری می تواند اثرات بی دردی مورفین را در فاز اولیه ($P < 0.01$) و نه فاز ثانویه (تأخیری) در آزمون فرمالین کاهش دهد. شکل ۴B همچنین آشکار کرد که درصد کاهش یافته سطح زیر منحنی بعنوان ایندکس بی دردی در گروهی که مورفین به داخل هسته NRM متعاقب تخریب الکتریکی هسته NCF دریافت کرده بودند، بطور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل مورفین (morphine-control) کاهش نشان می دهد ($P < 0.05$).

بحث

یافته های اصلی در این مطالعه نشان داد که (الف) اثرات دوزهای مختلف مورفین تزریق شده در هسته NRM در آزمون پس کشیدن دم و فرمالین بصورت وابسته به دوز است (ب) اثرات ضد دردی مورفین در هسته NRM متعاقب تخریب الکتریکی NCF در آزمون پس کشیدن دم و در فاز دوم (مرحله تأخیری) آزمون فرمالین کاهش پیدا کرد. داده های بدست آمده در مطالعه حاضر شواهد بیشتری در رابطه با نقش NRM و NCF در تنظیم درد نشان می دهد. بررسی حاضر از دو سو در ادامه تحقیق پیشین ما بوده است، اولاً، ارتباط دو جانبه بین NRM و NCF را نشان می دهد و ثانیاً با ارائه پروتکل متفاوت برای ارزیابی سنجش درد، ارتباط عمیق بین این دو هسته را نشان می دهد. با توجه به میزان پایین تر ED50 مورفین در ناحیه NRM در این مطالعه، در مقایسه با هسته NCF در بررسی پیشین [۲۷]، می توان استنباط کرد که گیرنده های اپیوئیدی بیشتری در ناحیه NRM در مقایسه با هسته NCF وجود دارد. NRM یکی از نواحی مهم در ساقه مغز می باشد که آکسون های آن به نخاع می روند [۴، ۲۱]. مطالعات نشان داده اند که تزریق مورفین در سطح فوق نخاعی

که تخریب NRM و بخش دمی PAG اثر مورفین را در آزمون پس کشیدن دم و نه در آزمون فرمالین تضعیف می کند [۱]. نتایج پیشین نشان داده اند که مکانیسم ها نوروئی مختلفی ممکن است در بروز اثر ضددردی مورفین در انواع متفاوت درد نقش داشته باشند. در مقابل در مطالعه حاضر، نتایج مشابهی در هر دو آزمون فرمالین و پس کشیدن دم متعاقب تخریب الکتریکی NCF مشاهده شد. این یافته پیشنهاد کننده این مطلب است که علیرغم نقش مهم NRM در مسیر تعدیلی در درد ایجاد شده توسط فرمالین، نواحی دیگر مانند NCF ممکن است با این اثر NRM بر همکنش داشته باشند و اینکه بعد از تخریب آنها، اثر ضددردی مورفین کاهش نشان دهد و یا از بین برود، در حالی که کاهش عملکرد NCF ویژگی افراد مبتلا به میگرن بعنوان یک درد مزمن در طول مرحله بین حمله ای [۴۵] شناخته شده است؛ این موضوع منعکس کننده عدم عملکرد صحیح مسیر نزولی تعدیل درد می باشد. تحقیق حاضر این موضوع را نشان می دهد که عملکرد ناحیه NRM در لقاء اثر ضددردی مورفین احتمالاً بخشی از آن توسط هسته NCF تعدیل می شود و با توجه به بررسی های گذشته بنظر می رسد که این بر همکنش در درد مزمن در مقایسه با درد حاد برجسته تر باشد. بطور خلاصه ما پیشنهاد می کنیم که با تلفیقی از تکنیک های مختلف مانند تصویربرداری ناحیه مغز میانی، الکتروفیزیولوژی، میکرودیالیز میانجی های عصبی و تکنیک های مولکولی و فارماکولوژیکی نقش واقعی هسته های مزانسفالیک مغز میانی مشخص تر شود.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از اعتبارات مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (۳۴۹/ع/الف) به انجام رسید که بدینوسیله از حمایت های مادی و معنوی آن مرکز سپاسگزاری می شود.

NRM و تشکیلات مشبک مجاور وجود دارد [۵۹]. تجویز مورفین به داخل NRM ممکن است بطور مستقیم این پایانه ها و یا محل های اتصال اپیوئیدها را بر روی سلول های سروتونرژیک در ناحیه NRM فعال کند، و متعاقب آن سیستم مهاري NRM-نخاعی را فعال کند [۱۵]. از طرفی، هسته NCF از بعد بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده شده که این هسته دارای چند فاکتور اعم از انکفالین [۴۴، ۵۴] و سروتونین [۶] نیز می باشد، که نشاندهنده شواهد بیشتری برای وجود تشابهات نوروشیمیایی بین دو هسته مذکور می باشد.

در بررسی حاضر، این موضوع باید مورد توجه قرار گیرد که اثر تخریب NCF برروی تضعیف پاسخ ضددردی مورفین تزریق شده به داخل NRM ممکن است دو احتمال را مطرح کند: (۱) یک مسیر صعودی از ناحیه NRM به هسته NCF وجود دارد؛ بدین معنی که NRM می تواند علیرغم نقش مهمش در مسیر نزولی، در مسیر بالارو سیگنال های دردآور نیز نقش داشته باشد. در راستای این فرضیه این مطلب بیان شده است که ارتباطات وایران از NCF به طناب نخاعی [۱۰] وجود دارد و علاوه بر این بعضی آوران ها به این هسته از طناب نخاعی [۳۵، ۴۱] نشأت می گیرند و (۲) احتمال دارد که یک ارتباط دو طرفه بین این دو هسته وجود داشته باشد که برهمکنش آنها بر روی پاسخ های ضددردی تاثیرگذار باشد. بعبارت دیگر، علیرغم نقش شناخته شده NRM در مسیر نزولی تعدیل درد، برخی سیگنال های تنظیمی از NCF عملکرد NRM را در اثرات ضددردی تقویت می کنند. مطالعات پیشین همچنین این موضوع که ارتباطات هسته NCF با ناحیه NRM وجود دارد را تأیید کرده اند [۲، ۷]. Edwards و همکارانش ارتباطات وایران هسته NCF که در هسته های نخاعی-مشبک ختم می شود مانند نواحی Reticularis pontis، caudalis و Reticularis gigantocellularis را مورد بررسی قرار دادند [۱۷، ۱۸]. گزارش شده است

References

- [1] Abbott FV, Melzack R, Samuel C, Morphine analgesia in tail-flick and formalin pain tests is mediated by

- different neural systems. *Exp Neurol* 75 (1982) 644-51.
[2] Abols IA, Basbaum AI, Afferent connections of the rostral medulla of the cat: a neural substrate for midbrain-medullary interactions in the modulation of

- pain. *J Comp Neurol* 201 (1981) 285-97.
- [3] Anderson SD, Basbaum AI, Fields HL, Response of medullary raphe neurons to peripheral stimulation and to systemic opiates. *Brain Res* 123 (1977) 363-8.
- [4] Basbaum AI, Fields HL, Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* 7 (1984) 309-38.
- [5] Behbehani MM, Zemlan FP, Response of nucleus raphe magnus neurons to electrical stimulation of nucleus cuneiformis: role of acetylcholine. *Brain Res* 369 (1986) 110-18.
- [6] Beitz AJ, The nuclei of origin of brainstem serotonergic projections to the rodent spinal trigeminal nucleus. *Neurosci Lett* 32 (1982a) 223-8.
- [7] Beitz AJ, The sites of origin brain stem neurotensin and serotonin projections to the rodent nucleus raphe magnus. *J Neurosci* 2 (1982b) 829-42.
- [8] Bennett GJ, Mayer DJ, Inhibition of spinal cord interneurons by narcotic microinjection and focal electrical stimulation in the periaqueductal central gray matter. *Brain Res* 172 (1979) 243-57.
- [9] Bringmann A, Klingberg F, Electrical stimulations of the basal forebrain and the nucleus cuneiformis differently modulate behavioural activation of freely moving rat. *Biomed Biochim Acta* 48 (1989) 781-91.
- [10] Castiglioni AJ, Gallaway MC, Coulter JD, Spinal projections from the midbrain in monkey. *J Comp Neurol* 178 (1978) 329-46.
- [11] Chance WT, Krynock GM, Rosecrans JA, Effects of medial raphe and raphe magnus lesions on the analgesic activity of morphine and methadone. *Psychopharmacol (Berl)* 56 (1978) 133-7.
- [12] Chiang CY, Gao B, The modification by systemic morphine of the responses of serotonergic and non-serotonergic neurons in nucleus raphe magnus to heating the tail. *Pain* 26 (1986) 245-57.
- [13] Coderre TJ, Fundytus ME, McKenna JE, Dalal S, Melzack R, The formalin test: a validation of the weighted-scores method of behavioural pain rating. *Pain* 54 (1993) 43-50.
- [14] Dickenson AH, Oliveras JL, Besson JM, Role of the nucleus raphe magnus in opiate analgesia as studied by the microinjection technique in the rat. *Brain Res* 170 (1979) 95-111.
- [15] Du HJ, Kitahata LM, Thalhammer JG, Zimmermann M, Inhibition of nociceptive neuronal responses in the cat's spinal dorsal horn by electrical stimulation and morphine microinjection in nucleus raphe magnus. *Pain* 19 (1984) 249-57.
- [16] Dubuisson D, Dennis SG, The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4 (1977) 161-74.
- [17] Edwards SB, Autoradiographic studies of the projections of the midbrain reticular formation: descending projections of nucleus cuneiformis. *J Comp Neurol* 161 (1975) 341-58.
- [18] Edwards SB, de Olmos JS, Autoradiographic studies of the projections of the midbrain reticular formation: ascending projections of nucleus cuneiformis. *J Comp Neurol* 165 (1976) 417-31.
- [19] Engberg I, Lundberg A, Ryall RW, Reticulospinal inhibition of interneurons. *J Physiol* 194 (1968) 225-36.
- [20] Fields HL, Anderson SD, Evidence that raphe-spinal neurons mediate opiate and midbrain stimulation-produced analgesia. *Pain* 5 (1978) 333-49.
- [21] Fields HL, Basbaum AI, Central Nervous system mechanisms of pain modulation. In R Melzack (Ed.), *Central Nervous system mechanisms of pain modulation*, Edinburgh 1999, 4th ed., pp. 309-29.
- [22] Gallager DW, Pert A, Afferents to brain stem nuclei (brain stem raphe, nucleus reticularis pontis caudalis and nucleus gigantocellularis) in the rat as demonstrated by microiontophoretically applied horseradish peroxidase. *Brain Res* 144 (1978) 257-75.
- [23] Gebhart GF, Jones SL, Effects of morphine given in the brain stem on the activity of dorsal horn nociceptive neurons. *Prog Brain Res* 77 (1988) 229-43.
- [24] Gioia M, Bianchi R, Ultra structural study of the nucleus Cuneiformis in the cat. *J Hirnforsch* 28 (1987) 375-83.
- [25] Guilbaud G, Peschanski M, Gautron M, Binder D, Responses of neurons of the nucleus raphe magnus to noxious stimuli. *Neurosci Lett* 17 (1980) 149-54.
- [26] Haghighparast A, Gheitisai IP, Lashgari R, Involvement of glutamatergic receptors in the nucleus cuneiformis in modulating morphine-induced antinociception in rats. *Eur J Pain* 11 (2007) 855-62.
- [27] Haghighparast A, Ordikhani-Seyedlar M, Ziaei M, Electrolytic lesion of the nucleus raphe magnus reduced

- the antinociceptive effects of bilateral morphine microinjected into the nucleus cuneiformis in rats. *Neurosci Lett* 438 (2008) 351-55.
- [28] Haghparast A, Soltani-Hekmat A, Khani A, Komaki A, Role of glutamatergic receptors located in the nucleus raphe magnus on antinociceptive effect of morphine microinjected into the nucleus cuneiformis of rat. *Neurosci Lett* 427 (2007) 44-49.
- [29] Handwerker HO, Iggo A, Zimmermann M. Segmental and supraspinal actions on dorsal horn neurons responding to noxious and non-noxious skin stimuli. *Pain* 1 (1975) 147-165.
- [30] Hasanein P, Parviz M, Keshavarz M, Javanmardi K, CB1 receptor activation in the basolateral amygdala produces antinociception in animal models of acute and tonic nociception. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34 (2007) 439-49.
- [31] Haws CM, Williamson AM, Fields HL, Putative nociceptive modulatory neurons in the dorsolateral pontomesencephalic reticular formation. *Brain Res* 483 (1989) 272-82.
- [32] Hudson PM, Lumb BM, Neurones in the midbrain periaqueductal grey send collateral projections to nucleus raphe magnus and the rostral ventrolateral medulla in the rat. *Brain Res* 733 (1996) 138-41.
- [33] Jensen TS, Yaksh TL, Comparison of the antinociceptive action of mu and delta opioid receptor ligands in the periaqueductal gray matter, medial and paramedial ventral medulla in the rat as studied by the microinjection technique. *Brain Res* 372 (1986) 301-12.
- [34] Jiang M, Behbehani MM, Physiological characteristics of the projection pathway from the medial preoptic to the nucleus raphe magnus of the rat and its modulation by the periaqueductal gray. *Pain* 94 (2001) 139-47.
- [35] Kerr FW, The ventral spinothalamic tract and other ascending systems of the ventral funiculus of the spinal cord. *J Comp Neurol* 159 (1975) 335-56.
- [36] Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM, Microinjection of morphine within nucleus raphe magnus and dorsal horn neurone activities related to nociception in the rat. *Brain Res* 189 (1980) 467-81.
- [37] Liu X, Zhu B, Zhang SX, Relationship between electroacupuncture analgesia and descending pain inhibitory mechanism of nucleus raphe magnus. *Pain* 24 (1986) 383-96.
- [38] Llewellyn MB, Azami J, Roberts MH, Brainstem mechanisms of antinociception. Effects of electrical stimulation and injection of morphine into the nucleus raphe magnus. *Neuropharmacol* 25 (1986) 727-35.
- [39] Manning BH, Franklin KB, Morphine analgesia in the formalin test: reversal by microinjection of quaternary naloxone into the posterior hypothalamic area or periaqueductal gray. *Behav Brain Res* 92 (1998) 97-102.
- [40] Mayer DJ, Wolfle TL, Akil H, Carder B, Liebeskind JC, Analgesia from electrical stimulation in the brainstem of the rat. *Science* 174 (1971) 1351-4.
- [41] Menetrey D, Chaouch A, Binder D, Besson JM, The origin of the spinomesencephalic tract in the rat: an anatomical study using the retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 206 (1982) 193-207.
- [42] Mohrland JS, Gebhart GF, Effect of selective destruction of serotonergic neurons in nucleus raphe magnus on morphine-induced antinociception. *Life Sci* 27 (1980) 2627-32.
- [43] Moolenaar GM, Holloway JA, Trough CO, Responses of caudal raphe neurons to peripheral somatic stimulation. *Exp Neurol* 53 (1976) 304-13.
- [44] Moss MS, Glazer EJ, Basbaum AI, The peptidergic organization of the cat periaqueductal gray. I. The distribution of immunoreactive enkephalin-containing neurons and terminals. *J Neurosci* 3 (1983) 603-16.
- [45] Moulton EA, Burstein R, Tully S, Hargreaves R, Becerra L, Borsook D, Interictal dysfunction of a brainstem descending modulatory center in migraine patients. *PLoS One* 3 (2008) e3799.
- [46] Oliveras JL, Besson JM, Guilbaud G, Liebeskind JC, Behavioral and electrophysiological evidence of pain inhibition from midbrain stimulation in the cat. *Exp Brain Res* 20 (1974) 32-44.
- [47] Oliveras JL, Hosobuchi Y, Redjemi F, Guilbaud G, Besson JM, Opiate antagonist, naloxone, strongly reduces analgesia induced by stimulation of a raphe nucleus (centralis inferior). *Brain Res* 120 (1977) 221-29.
- [48] Oliveras JL, Redjemi F, Guilbaud G, Besson JM, Analgesia induced by electrical stimulation of the inferior centralis nucleus of the raphe in the cat. *Pain* 1 (1975) 139-145.

- [49] Paxinos G, Watson CR. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005, p. 99-103, 122-32.
- [50] Proudfit HK, Effects of raphe magnus and raphe pallidus lesions on morphine-induced analgesia and spinal cord monoamines. *Pharmacol Biochem Behav* 13 (1980) 705-14.
- [51] Proudfit HK, Anderson EG, Morphine analgesia: blockade by raphe magnus lesions. *Brain Res* 98 (1975) 612-18.
- [52] Reynolds DV, Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science* 164 (1969) 444-5.
- [53] Rivot JP, Chaouch A, Besson JM, The influence of naloxone on the C fiber response of dorsal horn neurons and their inhibitory control by raphe magnus stimulation. *Brain Res* 176 (1979) 355-64.
- [54] Sar M, Stumpf WE, Miller RJ, Chang KJ, Cuatrecasas P, Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol* 182 (1978) 17-37.
- [55] Toda K, Responses of raphe magnus neurons to systemic morphine in rats. *Brain Res Bull* 8 (1982) 101-3.
- [56] Willis WD, Control of nociceptive transmission in the spinal cord. In: Autrum H, Ottoson D, editors. *Progress in Sensory Physiology*. Berlin: Springer, 1982, p. 1-159.
- [57] Willis WD, Haber LH, Martin RF, Inhibition of spinothalamic tract cells and interneurons by brain stem stimulation in the monkey. *J Neurophysiol* 40 (1977) 968-81.
- [58] Yaksh TL, Plant RL, Rudy TA, Studies on the antagonism by raphe lesions of the antinociceptive action of systemic morphine. *Eur J Pharmacol* 41 (1977) 399-408.
- [59] Yeziarski RP, Bowker RM, Kevetter GA, Westlund KN, Coulter JD, Willis WD, Serotonergic projections to the caudal brain stem: a double label study using horseradish peroxidase and serotonin immunocytochemistry. *Brain Res* 239 (1982) 258-64.
- [60] Zemlan FP, Behbehani MM, Nucleus cuneiformis and pain modulation: anatomy and behavioral pharmacology. *Brain Res* 453 (1988) 89-102.