



Check for updates

Экспериментальные статьи

УДК 612.826 + 612.884

EDN VDCPTA

<https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-3-312-323>

Дифференцированные реакции нейронов большого и дорсального ядер шва крысы на висцеральные и соматические болевые сигналы

Б. М. Сушкевич ^{✉1}, А. А. Михалкин ¹, О. А. Любашина ¹

¹ Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

Сведения об авторах

Борис Михайлович Сушкевич, SPIN-код: 9154-4183, ORCID: 0000-0003-1359-439X, e-mail: bob-jn@mail.ru

Александр Александрович Михалкин, SPIN-код: 9942-9379, Scopus AuthorID: 55210047400, ORCID: 0000-0003-2342-6357, e-mail: mikhalkin@infran.ru

Ольга Анатольевна Любашина, SPIN-код: 5257-4057, Scopus AuthorID: 6505777191, ResearcherID: A-6241-2017, ORCID: 0000-0002-6296-4628, e-mail: lyubashinaoa@infran.ru

Для цитирования: Сушкевич, Б. М., Михалкин, А. А., Любашина, О. А. (2023) Дифференцированные реакции нейронов большого и дорсального ядер шва крысы на висцеральные и соматические болевые сигналы.

Интегративная физиология, т. 4, № 3, с. 312–323. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-3-312-323> EDN VDCPTA

Получена 5 июля 2023; прошла рецензирование 22 августа 2023; принята 23 августа 2023.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00151 (ИФ РАН).

Права: © Б. М. Сушкевич, А. А. Михалкин, О. А. Любашина (2023). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

Аннотация. Ключевыми структурами серотонинергической системы мозга, вовлеченными в механизмы регуляции болевой чувствительности, являются большое (БЯШ) и дорсальное (ДЯШ) ядра шва. Рядом исследований продемонстрированы отличающиеся эффекты висцеральных и соматических болевых раздражений на функциональную активность нейронов этих ядер, что указывает на возможные различия в механизмах обработки ими болевых сигналов разной природы. Однако до настоящего времени специальное исследование таких механизмов никем не проводилось, поэтому целью наших экспериментов на анестезированных самцах крыс линии Вистар являлось сравнительное изучение нейрональных реакций БЯШ и ДЯШ на висцеральное (колоректальное растяжение) и соматическое (сдавливание хвоста) болевые раздражения. Работа выполнена с использованием иммуногистохимического метода определения экспрессии c-fos белков и микроэлектродной регистрации импульсной активности нейронов. В обеих структурах не было выявлено различий в локализации c-fos-синтезирующих клеток, активируемых применяемыми раздражениями, однако реактивные к соматической стимуляции нейроны содержали более крупные клеточные ядра. По импульсным реакциям на болевые воздействия ноцицептивные нейроны БЯШ и ДЯШ были разделены на три группы: 1) отвечающие активацией только на колоректальное растяжение (висцеральные); 2) возбуждающиеся только при сдавливании хвоста (соматические); 3) реагирующие возбуждением на оба раздражения (общие). При этом ДЯШ содержало большее, чем БЯШ, количество висцеральных ноцицептивных клеток при меньшей доле соматических. Однако в обоих ядрах общие ноцицептивные нейроны проявляли более выраженные реакции на соматический стимул, чем на висцеральный, а ответы соматических клеток на сдавливание хвоста были интенсивнее, чем у висцеральных нейронов на колоректальное растяжение. Полученные данные свидетельствуют, что БЯШ и ДЯШ содержат отличающиеся по морфо-функциональным характеристикам популяции нейронов, которые могут дифференцированным образом реагировать на активацию висцерального или соматического болевых входов, способствуя специфичной для каждого вида боли активности серотонинергической системы мозга.

Ключевые слова: ядра шва, висцеральная боль, соматическая боль, экспрессия c-fos белков, нейрональная активность

Differential reactions of neurons in the rat raphe magnus and dorsal raphe nuclei to visceral and somatic pain signals

B. M. Sushkevich ¹, A. A. Mikhalkin¹, O. A. Lyubashina¹

¹ Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

Authors

Boris M. Sushkevich, SPIN: 9154-4183, ORCID: 0000-0003-1359-439X, e-mail: bob-jn@mail.ru

Aleksandr A. Mikhalkin, SPIN: 9942-9379, Scopus AuthorID: 55210047400, ORCID: 0000-0003-2342-6357, e-mail: mikhalkin@infran.ru

Olga A. Lyubashina, SPIN: 5257-4057, Scopus AuthorID: 6505777191, ResearcherID: A-6241-2017, ORCID: 0000-0002-6296-4628, e-mail: lyubashinaoa@infran.ru

For citation: Sushkevich, B. M., Mikhalkin, A. A., Lyubashina, O. A. (2023) Differential reactions of neurons in the rat raphe magnus and dorsal raphe nuclei to visceral and somatic pain signals. *Integrative Physiology*, vol. 4, no. 3, pp. 312–323. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-3-312-323> EDN VDCPTA

Received 5 July 2023; reviewed 22 August 2023; accepted 23 August 2023.

Funding: The study was supported by the Russian Science Foundation, project No. 23-25-00151.

Copyright: © B. M. Sushkevich, A. A. Mikhalkin, O. A. Lyubashina (2023). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under CC BY-NC License 4.0.

Abstract. The key structures of the brain serotonergic system involved in the mechanisms of pain regulation are the raphe magnus (RMg) and dorsal raphe (DR) nuclei. Some studies have demonstrated dissimilar effects of visceral and somatic pain stimuli on the neuronal activity of these nuclei. This suggests differences in the local mechanisms of visceral and somatic pain processing. However, to date, no one has specifically studied these mechanisms. The aim of our experiments on anesthetized male Wistar rats was comparative evaluation of RMg and DR neuronal responses to visceral (colorectal distension) and somatic (tail squeezing) noxious stimulations. The study was performed using c-fos immunohistochemistry and extracellular microelectrode recording of neuronal impulse activity. In both structures, the distributions of c-fos-synthesizing cells activated by different stimuli coincided, however, somatic stimulation-reactive neurons contained larger cellular nuclei. Based on response properties, RMg and DR nociceptive neurons were divided into three groups: 1) responding with activation only to colorectal distension (visceral); 2) excited only by tail squeezing (somatic); 3) activated by both stimuli (general). DR contained a larger number of visceral nociceptive cells than RMg, with smaller proportion of somatic cells. However, in both nuclei, general nociceptive neurons showed more pronounced responses to somatic stimulation than to visceral one, and somatic cell reactions to tail squeezing were more intense than colorectal distension-evoked visceral neuron responses. The obtained data indicate that RMg and DR contain morphologically and functionally distinct neuronal populations that can selectively respond to visceral or somatic pain stimuli, thus contributing to the pain type-specific activity of serotonergic system.

Keywords: raphe nuclei, visceral pain, somatic pain, c-fos expression, neuronal activity

Введение

Серотонинергическая система головного мозга, играющая важную роль в эндогенных механизмах регуляции болевой чувствительности, берет свое начало в ядрах шва. Из них ключевыми в церебральном контроле боли являются большое (БЯШ) и дорсальное (ДЯШ) ядра шва (Martins, Tavares 2017; Wang, Nakai 1994). Нисходящие проекции локализованного в ростральной вентромедиальной области продолговатого мозга БЯШ на спинальный задний рог способны опосредовать как торможение, так и облегчение в нем ноцицептивной трансмиссии (Bardoni 2019; Martins, Tavares 2017; Wei

et al. 2012). В свою очередь, восходящие пути от ДЯШ среднего мозга к гипоталамусу, таламусу, лимбическим и кортикальным структурам переднего мозга модулируют поведенческие, эмоционально-аффективные и когнитивные реакции организма на боль (Hao et al. 2023; Mercer Lindsay et al. 2021; Wang, Nakai 1994). Продемонстрированы также тормозные эффекты стимуляции ДЯШ на спинальные ноцицептивные рефлексы, которые, как полагают, реализуются через его нисходящие проекции на БЯШ (Wang, Nakai 1994).

Активация БЯШ и ДЯШ с последующей реализацией ими анти- или проноцицептивных влияний происходит при поступлении

периферических болевых сигналов, которые восходят к ним непосредственно по спиноретикулярному и спинотааламическому трактам, либо через парабрахиальный комплекс моста (Almeida et al. 2004; 2006; Chen, Heinricher 2022). Ранее полагали, что эти ядра одинаковым образом вовлечены в контроль разных видов ноцицепции и их нейрональные реакции на болевые стимулы не зависят от происхождения последних (Fields et al. 1991). Между тем, более подробные исследования выявили различные по своему характеру ответы нейронов БЯШ на болевую стимуляцию разных частей тела (Ellrich et al. 2001). В дальнейшем в целом ряде работ были выявлены отличающиеся эффекты висцеральных и соматических болевых раздражений на *c-fos*-синтезирующую (Chen et al. 2003) и импульсную активности нейронов БЯШ и ДЯШ (Brink, Mason 2003; Brink et al. 2006; Pinto-Ribeiro et al. 2011; Sikandar, Dickenson 2011). Эти данные указывают на возможные различия в нейрональных процессах, обеспечивающих обработку этими ядрами болевой информации от внутренних органов и поверхностных тканей тела. Однако до настоящего времени специальное исследование таких нейрональных процессов никем не проводилось.

Поэтому целью проведенных нами экспериментов на крысах являлось сравнительное изучение нейрональных реакций БЯШ и ДЯШ на висцеральные и соматические болевые сигналы.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 26 взрослых самцах крыс линии Вистар (285–340 г) из ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем». Животные были внутрибрюшинно анестезированы смесью уретана (Sigma-Aldrich, США; 800 мг/кг) и альфа-хлоралозы (ICN Biomedicals, США; 60 мг/кг). Висцеральная болевая стимуляция состояла в растяжении колоректальной области толстой кишки (КРР) резиновым баллоном, раздуваемым до 80 мм рт. ст. (шприцевой насос ДШ-09, Висма-Планар, Беларусь). Для соматического болевого раздражения применяли механическое сдавливание основания хвоста пинцетом алгезиметра (нагрузка 650–900 г; BIO-RP-R, Bioseb SAS, Франция).

Иммуногистохимическое исследование

Для иммуногистохимических экспериментов девять анестезированных крыс были случайным образом разделены на три равные группы:

1) контрольная (без стимуляции); 2) с висцеральным болевым раздражением; 3) с соматической болевой стимуляцией. Оба болевых раздражения осуществляли в течение 60 с каждые пять минут в течение часа. После транскардиальной перфузии животных 4% раствором параформальдегида в 0,01 М фосфатном буфере с pH 7,4 (ФБ), их мозг извлекали и выдерживали по 24 ч в 20% и 30% растворах сахарозы в 0,01 М ФБ при 4 °С. В дальнейшем на санном микротоме (Reichert, Германия) с замораживающим столиком ОЛ-ЗСО 30 (Россия) были изготовлены фронтальные серийные срезы мозга (40 мкм) через области исследуемых структур.

Срезы первой серии окрашивали по методу Ниссля крезилковым фиолетовым (Merck, Германия). Вторая серия срезов была подвергнута иммуногистохимической обработке для визуализации клеток с *c-fos*-позитивными ядрами. Для этого срезы обрабатывали по авидин-биотин-пероксидазному методу с использованием первичных поликлональных антител к белку *c-fos* (ABE457, Sigma-Aldrich, США; 1:10000) и вторичных биотинилированных антител (goat anti-rabbit IgG, PK-4001 kit, Vector Laboratories, США; 1:600). Изображения препаратов получали на микроскопе Olympus CX41 (Япония) с видеокамерой Nikon (Япония). Далее с помощью авторского программного пакета Cell Annotation Software (Nurzynska et al. 2017) на каждом из срезов в пределах БЯШ и ДЯШ определяли количество, реферированную к фону оптическую плотность и площадь *c-fos*-позитивных клеточных ядер.

Нейрофизиологическое исследование

В экспериментах использованы 17 крыс, у которых изучали импульсную активность БЯШ (девять животных) или ДЯШ (восемь крыс). Для этого голову анестезированного животного закрепляли в стереотаксическом приборе (Медикор, Венгрия) и после хирургического обеспечения доступа просверливали отверстие в зоне проекции на кости черепа исследуемого ядра по атласу мозга крысы (Paxinos, Watson 1998). Отверстие для регистрации нейронов БЯШ располагалось 9,0–12,0 мм каудальнее брегмы и 0,0–2,0 мм от средней линии, ДЯШ — 7,0–9,0 мм каудальнее брегмы и 0,2–2,0 мм от средней линии. Внеклеточную регистрацию нейрональной активности осуществляли вольфрамовыми микроэлектродами (1 мкм, 1 МОм; WPI, США), перемещаемыми при помощи микропогружателя (МП-2, Россия) с шагом в четыре мкм. У каждого животного регистрацию осуществляли в 7–15 точках внутри исследуемого ядра

на расстоянии не менее 150 мкм друг от друга. Регистрируемый сигнал после усиления (DAM 80, WPI, США) подавали на звуковую карту компьютера с визуализацией и записью в программе Audition 3 (Adobe Corp, США).

Запись нейрональных реакций на болевые раздражения производили поочередно с интервалом не менее трех минут, сначала на висцеральное и затем на соматическое. В каждом случае запись осуществляли на трехминутном интервале: 60 с до стимуляции (фоновый показатель), 30 с во время воздействия болевого стимула и 90 с после него. Согласно проведенным ранее исследованиям (Lyubashina et al. 2019), индикатором ноцицептивного характера применяемого раздражения являлось вызываемое им понижение или повышение уровня системного артериального давления, которое регистрировали при помощи датчика MLT0670 (ADInstruments, Великобритания) через канюлю в бедренной артерии. Последующую селекцию нейрональных разрядов по форме и определение их средней частоты до, во время и после болевой стимуляции выполняли в программе Spike2 (CED, Великобритания). Нейроны считали реагирующими, если частота их разрядов во время раздражения изменялась от фонового значения не менее чем на 15%. По завершении эксперимента животное подвергали эвтаназии внутривенным введением трехкратной дозы анестезирующей смеси, после чего выполняли электролитическое разрушение ткани мозга пропусканием через регистрирующий электрод постоянного тока отрицательной полярности (0,5–1,2 мА; 40 с). Мозг извлекали и фиксировали (10% раствор параформальдегида в 0,01 М ФБ). Локализацию мест регистрации производили на обработанных по методу Ниссля срезах мозга (40 мкм) с помощью атласа мозга крысы (Paxinos, Watson 1998).

Статистическую обработку, сравнение и графическое оформление полученных в разных экспериментах результатов производили с помощью программных пакетов Origin 2017 (OriginLab, США) и GraphPad InStat 3.02 (GraphPad Software, США). В связи с отклонением полученных данных от нормального распределения (тест Шапиро — Вилка), при их анализе применяли непараметрические методы для зависимых (парный тест Вилкоксона) и независимых измерений (тесты Крускала — Уоллиса и Манна — Уитни — Вилкоксона). Для сравнения количественного представительства нейронов в исследуемых ядрах шва использовали χ^2 -критерий и точный тест Фишера. Данные в зависимости от их вида были представ-

лены как абсолютное значение, среднее \pm стандартная ошибка среднего или как медиана (25-й процентиль; 75-й процентиль). Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Эффекты висцерального и соматического болевых раздражений на c-fos-синтезирующую активность нейронов большого и дорсального ядер шва

При иммуногистохимическом исследовании БЯШ в нем было отмечено существенное по сравнению с контрольным уровнем ($7,1 \pm 1,1$ клеток/срез) увеличение числа c-fos-синтезирующих нейронов как после КРР ($p < 0,001$, $U = 75$, тест Манна — Уитни — Вилкоксона), так и после сдавливания хвоста ($p < 0,001$, $U = 70$) (рис. 1 А). Различий в локализации активируемых разными ноцицептивными входами клеток в пределах ядра не выявлено. Однако в целом для соматической стимуляции было характерным вовлечение значительно большего количества клеток БЯШ, чем для висцеральной ($p = 0,04$, $U = 135$) (рис. 1 А). Плотности иммуногистохимического окрашивания c-fos-синтезирующих клеточных ядер в БЯШ контрольной и подверженных разным болевым воздействиям групп не различались ($p = 0,7$, $KW = 0,59$, тест Крускала — Уоллиса). Однако анализ их площади показал, что реактивные к соматическому раздражению нейроны имели более крупные ядра, чем реагирующие на КРР ($p = 0,001$, $U = 83$, тест Манна — Уитни — Вилкоксона) (рис. 1 В). Последнее указывает на возможную нейрорхимическую и/или функциональную разнородность этих клеток.

Число c-fos-синтезирующих нейронов ДЯШ в контроле составляло $37,7 \pm 7,4$ клеток/срез. Этот показатель существенно увеличивался после КРР ($p = 0,03$, $U = 69$, тест Манна — Уитни — Вилкоксона) и сдавливания хвоста ($p = 0,002$, $U = 88$) (рис. 1 С). Не было выявлено различий в локализации и количестве ($p = 0,4$, $U = 108$) нейронов ДЯШ, активируемых разными стимулами. Однако как и в БЯШ выявленные после соматической болевой стимуляции клетки ДЯШ содержали более крупные c-fos-позитивные ядра, чем таковые после висцеральной ($p < 0,0001$, $U = 32$, тест Манна — Уитни — Вилкоксона) (рис. 1 D), свидетельствуя в пользу их принадлежности к различным нейрональным популяциям. При этом оптические плотности иммунопозитивных клеточных ядер в ДЯШ в контроле и после

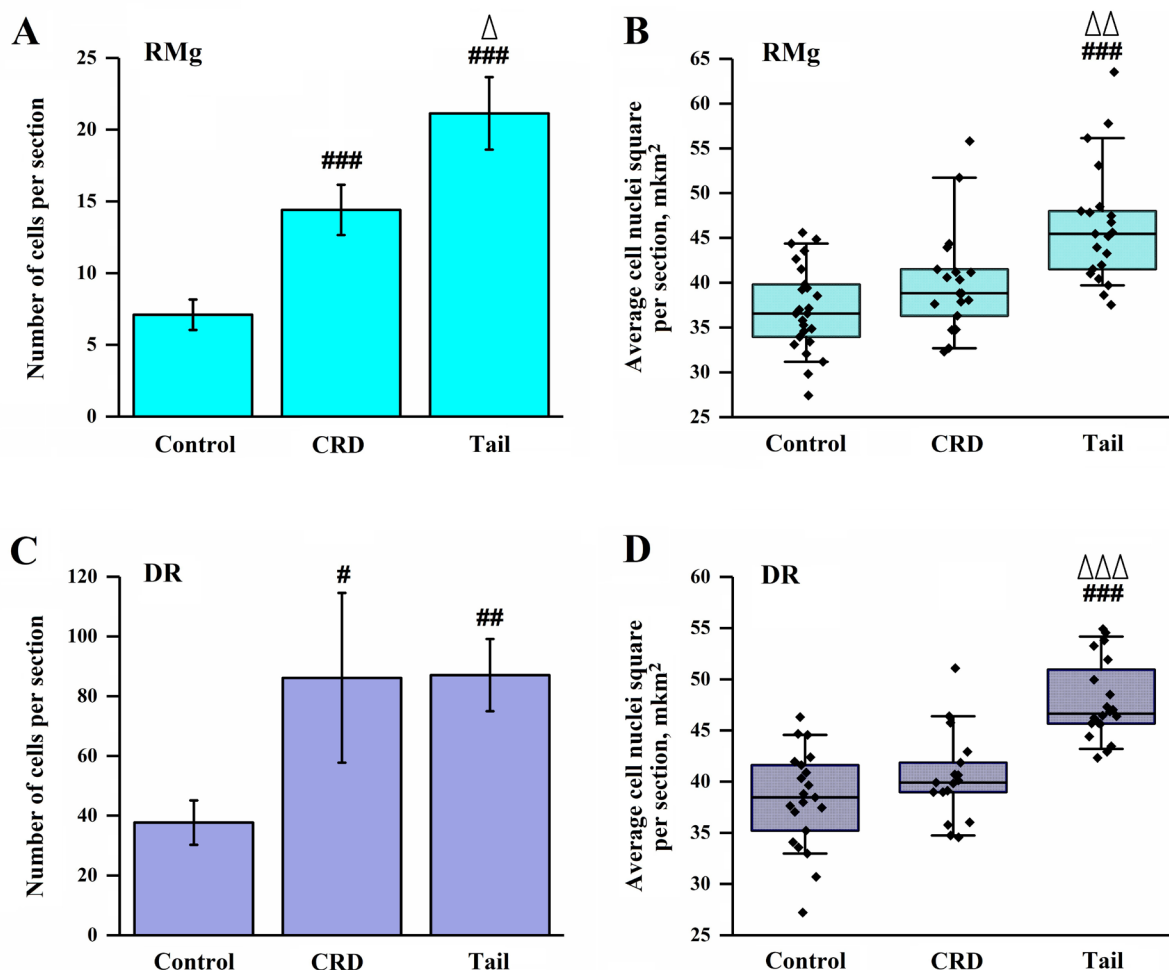


Рис. 1. Количество *c-fos*-позитивных нейронов (A, C) и средняя площадь их клеточных ядер (B, D) в большом (RMg) и дорсальном (DR) ядрах шва у крыс без стимуляции (Control), после КРП (CRD) и сдавливания хвоста (Tail). На (A, C) высота колонки — среднее значение, концы отрезков — стандартные ошибки среднего. На (B, D) верхняя и нижняя границы каждого прямоугольника — первый и третий квартили (25-й и 75-й процентиля соответственно), горизонтальная линия внутри — медиана (50-й процентиль), концы отрезков — 10-й и 90-й процентиля, ромбы — индивидуальные значения в выборке. Значимые различия (тест Манна — Уитни — Вилкоксона): # — $p < 0,05$, ## — $p < 0,01$, ### — $p < 0,001$ — по сравнению с контролем; ^ — $p < 0,05$, ^^ — $p < 0,01$ и ^^ — $p < 0,001$ — по сравнению с КРП (CRD)

Fig. 1. Numbers of *c-fos*-positive neurons (A, C) and average area of their cell nuclei (B, D) in the raphe magnus (RMg) and dorsal raphe (DR) of rats without stimulation (Control), after noxious colorectal distension (CRD) and squeezing of the tail (Tail). In (A, C), each column — the mean value, the ends of the segments — standard errors of the mean. In (B, D), the upper and lower edges of the box — the first and third quartile values (25th and 75th percentiles, respectively), horizontal line inside — the median (50th percentile), the ends of the segments — the 10th and 90th percentiles, diamonds — individual values in the sample. Significant differences (Mann — Whitney — Wilcoxon test): # — $p < 0,05$, ## — $p < 0,01$, ### — $p < 0,001$ — vs. control; ^ — $p < 0,05$, ^^ — $p < 0,01$ и ^^ — $p < 0,001$ — vs. colorectal distension (CRD)

разных видов болевой стимуляции не различались ($p = 0,5$, KW = 1,37, тест Крускала — Уоллиса).

Полученные иммуногистохимические данные позволили нам предположить, что реципиентами разных видов болевых сигналов в исследуемых ядрах шва являются отличающиеся по морфо-функциональным характеристикам популяции нейронов. Поэтому основной целью последующих нейрофизиологических экспериментов было выяснение особенностей импульс-

ных реакций нейронов в пределах этих ядер на висцеральное и соматическое болевые раздражения.

Импульсные реакций нейронов большого и дорсального ядер шва на висцеральные и соматические болевые сигналы

В ходе нейрофизиологических экспериментов была зарегистрирована активность 422 нейронов в левой части БЯШ (рис. 2 А)

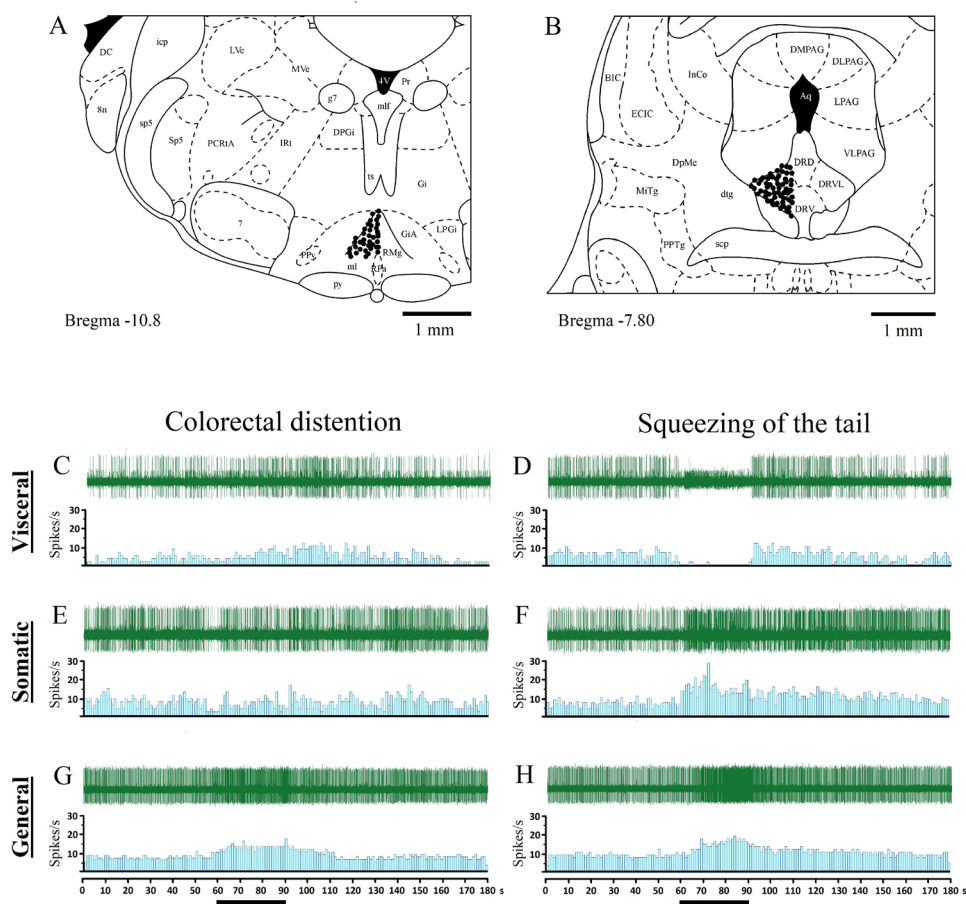


Рис. 2. Локализация мест регистрации нейронов в большом (А) и дорсальном (В) ядрах шва и примеры реакций нейронов висцерального (С, D), соматического (Е, F) и общего (G, H) типов на КРП (Colorectal distension) и сдавливание хвоста (Squeezing of the tail). На (А, В) каждый символ (черная точка) соответствует локализации нескольких зарегистрированных нейронов. Схемы срезов адаптированы из атласа мозга крысы (Paxinos, Watson 1998). Обозначения на (А): 4V — IV желудочек мозга, 7 — ядро лицевого нерва, DPGi — дорсальное парагигантоклеточное ядро, Gi — гигантоклеточное ретикулярное ядро, GiA — часть альфа гигантоклеточного ретикулярного ядра, IRt — промежуточное ретикулярное ядро, LPGi — латеральное парагигантоклеточное ядро, ml — медиальный лемниск, РРy — парапирамидное ядро, py — пирамидный тракт, RMg — большое ядро шва, RPa — бледное ядро шва. Обозначения на (В): Aq — Сильвиев водопровод, DRD — дорсальная часть дорсального ядра шва, DRV — вентральная часть дорсального ядра шва, DRVL — вентролатеральная часть дорсального ядра шва, dtg — пучок дорсального ядра покрывки, DLPAG — дорсолатеральная колонка околотоводопроводного серого вещества, DMPAG — дорсомедиальная колонка околотоводопроводного серого вещества, LPAG — латеральная колонка околотоводопроводного серого вещества, VLPAG — вентролатеральная колонка околотоводопроводного серого вещества, scp — верхняя ножка мозжечка. На (С-Н) в верхней части каждого фрагмента — нативные записи импульсной активности, в нижней — соответствующие частотные гистограммы с бином в 1 с. По оси абсцисс — время в секундах (s), по оси ординат — частота разрядов (Spikes/s). Горизонтальные отрезки — время действия раздражения

Fig. 2. Localization of neuronal recording sites in the raphe magnus (A) and dorsal raphe (B) nuclei and typical examples of responses of visceral (C, D), somatic (E, F) and general (G, H) neurons to noxious colorectal distension (C, E, G) and squeezing of the tail (D, F, H). In (A, B), each symbol (black dot) corresponds to the localization of several studied neurons. The brain section diagrams are adopted from a rat brain atlas (Paxinos, Watson 1998). Designations in (A): 4V — 4th ventricle, 7 — facial nucleus, DPGi — dorsal paragigantocellular nucleus, Gi — gigantocellular reticular nucleus, GiA — gigantocellular reticular nucleus, alpha part, IRt — intermediate reticular nucleus, LPGi — lateral paragigantocellular nucleus, ml — medial lemniscus, РРy — parapyramidal nucleus, py — pyramidal tract, RMg — raphe magnus nucleus, RPa — raphe pallidus nucleus. Designations in (B): Aq — aqueduct (Sylvius), DRD — dorsal raphe nucleus, dorsal part, DRV — dorsal raphe nucleus, ventral part, DRVL — dorsal raphe nucleus, ventrolateral part, dtg — dorsal tegmental bundle, DLPAG — dorsolateral periaqueductal gray, DMPAG — dorsomedial periaqueductal gray, LPAG — lateral periaqueductal gray, VLPAG — ventrolateral periaqueductal gray, scp — superior cerebellar peduncle. In (C-H), top — native records of impulse activity, below — corresponding rate histograms, bin is 1 s. Abscissa — time in seconds (s), ordinate — discharge rate (spikes/s). Horizontal lines — duration of the stimulations

и 764 нейронов в левой вентролатеральной части ДЯШ (рис. 2 В), которые демонстрировали существенное по сравнению с исходной фоновой активностью увеличение частоты разрядов в ответ на висцеральное и/или соматическое болевое раздражения (для разных реакций: $p < 0,001$, парный тест Вилкоксона). По особенностям реакций на разные болевые стимулы зарегистрированные нейроны обоих ядер были разделены на три группы: 1) отвечающие учащением разрядов только на висцеральный болевой стимул (рис. 2 С, D); 2) усиливающие свою активность только при соматическом болевом раздражении (рис. 2 Е, F); 3) реагирующие возбуждением на оба болевых воздействия (рис. 2 G, H). Мы обозначили такие нейроны как висцеральные ноцицептивные, соматические ноцицептивные и общие ноцицептивные соответственно. Эти нейрональные популяции не демонстрировали каких-либо различий локализации в пределах изученных ядер шва.

В обоих ядрах шва около половины зарегистрированных ноцицептивных нейронов относились к соматической группе, около трети — к общей и меньшая часть — к висцеральной (рис. 3 А). Однако χ^2 -критерием были выявлены существенные различия между БЯШ и ДЯШ в процентном соотношении нейронов этих групп ($p = 0,0001$, $\chi^2 = 17,92$). При этом в ДЯШ отмечено значительно большее содержание висцеральных ноцицептивных клеток при меньшей доле соматических, чем в БЯШ ($p < 0,0001$, точный тест Фишера) (рис. 3 А).

Средняя частота фоновых разрядов всех зарегистрированных нейронов БЯШ была выше, чем у таковых в ДЯШ ($p < 0,0001$, $U = 87326$, тест Манна — Уитни — Вилкоксона). При этом разные группы ноцицептивных нейронов в первом ядре характеризовались сходными частотами фоновой импульсной активности ($p = 0,3$, $KW = 2,28$, тест Крускала — Уоллиса), тогда как в ДЯШ они по данному показателю различались ($p < 0,0001$, $KW = 19,50$). Минимальным уровнем фоновой импульсации обладали общие ноцицептивные нейроны ДЯШ (для сравнений с висцеральными и соматическими соответственно: $p = 0,005$, $U = 18228$ и $p = 0,0003$, $U = 37175$, тест Манна — Уитни — Вилкоксона), тогда как висцеральные и соматические характеризовались сопоставимыми частотами фоновых разрядов ($p = 0,85$, $U = 27278$) (рис. 3 В).

В обоих исследуемых ядрах шва общие ноцицептивные нейроны проявляли более выраженные реакции на сдавливание хвоста, чем на КРР ($p = 0,011$ для БЯШ, $p < 0,0001$ для ДЯШ, парный тест Вилкоксона), и ответы соматических

клеток на этот же стимул были интенсивнее, чем у висцеральных нейронов на специфическое для них КРР ($p < 0,0001$, $U = 4272$ для БЯШ, $p < 0,0001$, $U = 17825$ для ДЯШ, тест Манна — Уитни — Вилкоксона). Наряду с этим были отмечены и межструктурные различия в ноцицептивной нейрональной активности. Так, БЯШ отличалось более слабыми реакциями общих ноцицептивных нейронов на оба болевых стимула, чем ДЯШ ($p = 0,03$, $U = 15821$ для висцерального, $p = 0,02$, $U = 15588$ для соматического, тест Манна — Уитни — Вилкоксона), а также соматических нейронов — на сдавливание хвоста ($p = 0,009$, $U = 33764$) (рис. 3 С, D). В свою очередь, соматические нейроны ДЯШ при неспецифическом для них КРР демонстрировали торможение импульсной активности, которое было более выражено, чем у сходной группы клеток в БЯШ ($p = 0,04$, $U = 34821$).

Обсуждение

Результаты проведенного исследования впервые продемонстрировали, что БЯШ и ДЯШ содержат совместно локализованные, но различающиеся по морфометрическим и импульсным характеристикам популяции нейронов, которые избирательно активируются в ответ на висцеральные или соматические болевые стимулы. Выявленные в иммуногистохимических экспериментах различия в размерах c-fos-позитивных ядер таких нервных клеток указывают на их принадлежность к разным нейрохимическим и/или функциональным группам. Последнее согласуется с полученными нами нейрофизиологическими данными, которые свидетельствуют о наличии в БЯШ и ДЯШ, по крайней мере, трех групп нейронов, различающихся по ноцицептивным свойствам. Помимо неселективных клеток, реагирующих возбуждением на оба болевых раздражения (общих ноцицептивных), были зарегистрированы нейроны, селективно отвечающие усилением импульсации только на висцеральное или соматическое болевое воздействие (соответственно, висцеральные и соматические ноцицептивные). Такие избирательно реагирующие на разные болевые входы нейроны могут обеспечивать дифференцированную обработку ядрами шва висцеральных и соматических ноцицептивных сигналов, способствуя специфичной для каждого вида боли активности серотонинергической системы мозга.

Ранее в области БЯШ также было продемонстрировано существование разных групп ноцицептивных нейронов, но их классификация была

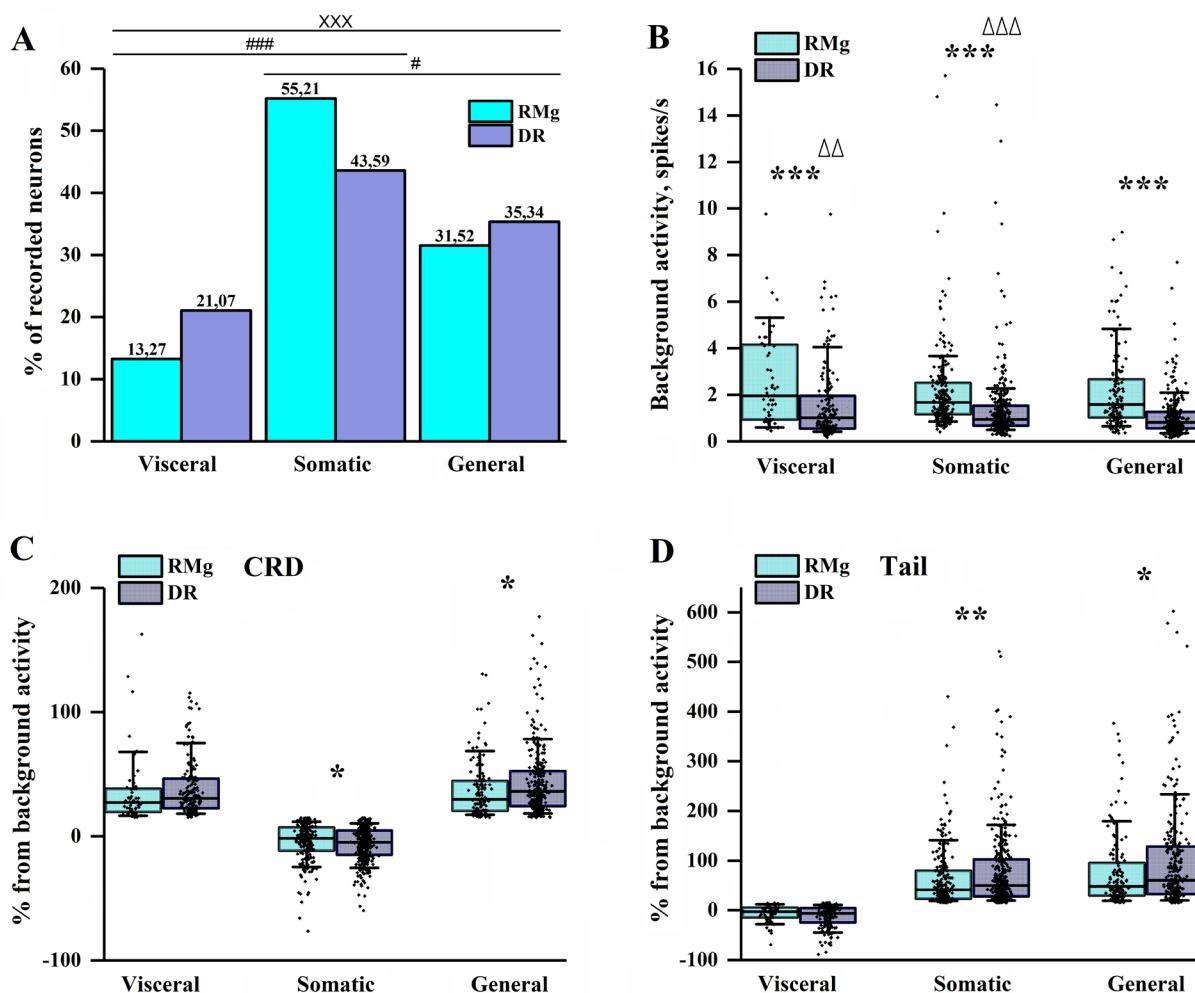


Рис. 3. Процентное представительство (A), фоновая (B) и вызванная разными болевыми стимулами (C, D) активности нейронов большого (RMg) и дорсального (DR) ядер шва, относящихся к висцеральной (Visceral), соматической (Somatic) и общей (General) ноцицептивным группам. На (A) высота колонки — процент (%) от общего количества зарегистрированных нейронов в данном ядре. Значимые различия между RMg и DR: ^{xxx} — $p < 0,001$, тест X^2 ; # — $p < 0,05$, ^{###} — $p < 0,001$, точный тест Фишера. На (B–D) точки — индивидуальные значения в выборке. Background activity — фоновая активность, CRD — KPP, Tail — сдавливание хвоста. Значимые различия (тест Манна — Уитни — Вилкоксона): * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ — между RMg и DR; $\Delta\Delta$ — $p < 0,01$, $\Delta\Delta\Delta$ — $p < 0,001$ — между общими ноцицептивными нейронами DR и его селективными нейрональными группами. Остальные обозначения см. рис. 1 B, D

Fig. 3. Percent representation (A), background (B) and different noxious stimulus-induced (C, D) activities of the raphe magnus (RMg) and dorsal raphe (DR) neurons of visceral, somatic, and general nociceptive groups. In (A), each column — % of all the recorded neurons in a given nucleus. Significant differences between RMg and DR: ^{xxx} — $p < 0.001$, X^2 test; # — $p < 0.05$, ^{###} — $p < 0.001$, Fisher's exact test. In (B–D), data points — individual values in the sample. CRD — noxious colorectal distension, Tail — squeezing of the tail. Significant differences (Mann — Whitney — Wilcoxon test): * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$, *** — $p < 0.001$ — between RMg and DR; $\Delta\Delta$ — $p < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta$ — $p < 0.001$ — between general nociceptive and selective neuronal groups in DR. Other designations as in Fig. 1 B, D

основана только на реакциях на болевую термическую стимуляцию хвоста (Fields et al. 1983). Клетки, которые при таком раздражении демонстрировали усиление импульсации, были отнесены к клеткам «включения» (ON-клеткам), а которые тормозили свою активность — к клеткам «выключения» (OFF-клеткам). Нереагирующие на указанную стимуляцию были обозначены

как нейтральные или NEUTRAL-клетки (Fields et al. 1983, 1991; Martins, Tavares 2017). Однако более подробные исследования ноцицептивных нейронов БЯШ выявили диссоциацию между их ответами на болевую термическую стимуляцию хвоста и болевое механическое раздражение других частей тела (Ellrich et al. 2001). Также было показано, что классификация

нейронов БЯШ на ON-, OFF- и NEUTRAL-клетки по реакциям на стимуляцию хвоста не предопределяет их ответы на висцеральные болевые стимулы. Так ON-клетки для соматической ноцицепции могли являться OFF- или NEUTRAL-клетками для висцеральной и наоборот, свидетельствуя о недостаточности данной классификации (Brink, Mason 2003; Brink et al. 2006; Pinto-Ribeiro et al. 2011; Sikandar, Dickenson 2011). В нашем исследовании были зарегистрированы сходные группы нейронов БЯШ, которые демонстрировали возбуждающие (ON-подобные) реакции на один вид болевой стимуляции и либо не реагировали (были NEUTRAL-клетками), либо тормозили свою активность (как OFF-клетки) при другом болевом раздражении. Однако, в отличие от предыдущих исследований, мы впервые выделили такие нейроны БЯШ в отдельные группы, висцеральную ноцицептивную и соматическую ноцицептивную, и провели анализ их импульсных активностей в сравнении между собой и с импульсной активностью общих ноцицептивных нейронов, т. е. реагирующих возбуждением как на висцеральное, так и соматическое болевые воздействия (т. е. общих ON-клеток).

Аналогичные популяции висцеральных, соматических и общих ноцицептивных нейронов были впервые показаны нами также в ДЯШ, реакции которого на разные виды болевых сигналов малоизучены. В настоящее время имеются лишь доказательства активации его c-fos-синтезирующих клеток при действии соматических и висцеральных стимулов механической, термической или химической природы (Chen et al. 2003; Dong et al. 1997; Ren et al. 2007; Vilela et al. 2021), а также сведения о возбуждающих и тормозных реакциях его нейронов на соматическое болевое раздражение (Montagne-Clavel et al. 1995; Shima et al. 1986). Однако изучение импульсных ответов нейронов ДЯШ на висцеральные болевые стимулы и выявление особенностей его нейрональной активации при разных видах боли ранее никем не проводилось.

Следует отметить, что нейроны, демонстрирующие недифференцированные и селективные реакции на висцеральное и соматическое болевые раздражения ранее были обнаружены в дорсальном роге спинного мозга (Luz et al. 2015; Qin et al. 2008), каудальной вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга (Lyubashina et al. 2019; Ness et al. 1998; Pinto-Ribeiro et al. 2011), а также в переднем гипоталамусе (Snowball et al. 2000), вентральном заднелатеральном и вентромедиальном ядрах таламуса (Monconduit et al. 2003; Zhang et al.

2002; 2003). Это свидетельствует о существовании на разных уровнях ЦНС специфических нейрональных популяций, обеспечивающих селективную обработку висцеральных и соматических болевых сигналов. Мы полагаем, что продемонстрированные нами группы селективных ноцицептивных клеток БЯШ и ДЯШ являются частью таких нейрональных систем.

При этом нами выявлено различие указанных ядер шва по содержанию и свойствам ноцицептивных нейронов разного типа, которое свидетельствует не только о большей реактивности ДЯШ к разного рода болевым сигналам в целом, но и большей чувствительности его селективных ноцицептивных нейронов к висцеральным болевым стимулам по сравнению с таковыми в БЯШ. Учитывая различную роль ДЯШ и БЯШ в супраспинальных механизмах ноцицепции (Bardoni 2019; Martins, Tavares 2017; Mercer Lindsay et al. 2021; Wang, Nakai 1994), последнее обстоятельство может указывать на большее вовлечение серотонинергической системы мозга в модуляцию эмоционально-аффективных и когнитивных реакций организма на висцеральную боль, чем в нисходящую модуляцию ее спинальной трансмиссии.

Как уже было указано выше, выявленное нами отличие в размерах клеточных ядер нейронов БЯШ и ДЯШ, которые избирательно активируются висцеральным или соматическим болевыми входами, предполагает различный нейрохимический фенотип этих клеточных популяций. Однако имеющиеся к настоящему времени данные по этому вопросу отрывочны и не позволяют определить нейрохимические особенности этих групп нейронов в пределах БЯШ или ДЯШ. Согласно результатам ранее проведенных исследований, в обоих ядрах висцеральные и соматические болевые сигналы в равной степени активируют серотонин-синтезирующие клетки (Chen et al. 2003; Dong et al. 1997), и это позволяет нам предположить их принадлежность к общим ноцицептивным нейронам. Однако таковые составляют меньшую часть реагирующих на разные виды ноцицепции клеток БЯШ и ДЯШ, большинство из которых являются несеротонинергическими (Chen et al. 2003; Dong et al. 1997; Gao, Mason 2000; Gau et al. 2013; Nguyen et al. 2022). Показано, что несеротониновыми клетками БЯШ, активирующимися при поступлении соматической болевой информации, являются глутамат- и ГАМК-ергические (Radhakrishnan, Sluka 2009; Winkler et al. 2006), а также ГАМК/энкефалин-синтезирующие нейроны (Zhang et al. 2015). Однако остается неясным, какие из этих клеточных

популяций являются избирательно реактивными к соматической боли, а какие также участвуют в висцеральной болевой трансмиссии. Что касается несеротониновых нейронов ДЯШ, то лишь установлено вовлечение в механизмы висцеральной боли его нитроергических клеток (Yang et al. 2003), тогда как нейрохимические характеристики реагирующих на соматическую боль остаются неясными.

Таким образом, полученные данные впервые свидетельствуют о существовании в БЯШ и ДЯШ специальных нейрональных механизмов для селективной обработки висцеральных и соматических болевых сигналов, которые могут определять специфичный для каждого вида боли уровень активности серотонинергической системы мозга. Результаты исследования указывают на необходимость дифференцированного подхода к лечению висцеральных и соматических болевых синдромов, в частности, с использованием серотонинергических средств.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest, either existing or potential.

Соответствие принципам этики

Все экспериментальные процедуры соответствовали этическим стандартам, утвержден-

ным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И. П. Павлова РАН.

Ethics Approval

All experimental procedures complied with the ethical standards approved by the Russian legislation, the principles of the Basel Declaration, and the recommendations of the Institutional Animal Care and Use Committee of the Pavlov Institute of Physiology.

Вклад авторов

- а. Сушкевич Борис Михайлович — сбор данных, обработка данных, написание и редактирование статьи;
- б. Михалкин Александр Александрович — сбор данных, обработка данных;
- в. Любашина Ольга Анатольевна — идея работы и планирование эксперимента, обработка данных, написание и редактирование статьи.

Author Contributions

- а. Boris M. Sushkevich — data collection, data processing, manuscript writing and editing;
- б. Aleksandr A. Mikhalkin — data collection, data processing;
- с. Olga A. Lyubashina — conceptualization and experimental design, data processing, manuscript writing and editing.

References

- Almeida, A., Leite-Almeida, H., Tavares, I. (2006) Medullary control of nociceptive transmission: Reciprocal dual communication with the spinal cord. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, vol. 3, no. 3, pp. 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2006.09.001> (In English)
- Almeida, T. F., Roizenblatt, S., Tufik, S. (2004) Afferent pain pathways: A neuroanatomical review. *Brain Research*, vol. 1000, no. 1–2, pp. 40–56. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.10.073> (In English)
- Bardoni, R. (2019) Serotonergic modulation of nociceptive circuits in spinal cord dorsal horn. *Current Neuropharmacology*, vol. 17, no. 12, pp. 1133–1145. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666191001123900> (In English)
- Brink, T. S., Hellman, K. M., Lambert, A. M., Mason, P. (2006) Raphe magnus neurons help protect reactions to visceral pain from interruption by cutaneous pain. *Journal of Neurophysiology*, vol. 96, no. 6, pp. 3423–3432. <https://doi.org/10.1152/jn.00793.2006> (In English)
- Brink, T. S., Mason, P. (2003) Raphe magnus neurons respond to noxious colorectal distension. *Journal of Neurophysiology*, vol. 89, no. 5, pp. 2506–2515. <https://doi.org/10.1152/jn.00825.2002> (In English)
- Chen, T., Dong, Y.-X., Li, Y.-Q. (2003) Fos expression in serotonergic neurons in the rat brainstem following noxious stimuli: An immunohistochemical double-labelling study. *Journal of Anatomy*, vol. 203, no. 6, pp. 579–588. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2003.00242.x> (In English)
- Chen, Q., Heinricher, M. M. (2022) Shifting the balance: How top-down and bottom-up input modulate pain via the rostral ventromedial medulla. *Frontiers in Pain Research*, vol. 3, article 932476. <https://doi.org/10.3389/fpain.2022.932476> (In English)

- Dong, Y.-X., Han, Z.-A., Xiong, K.-H., Rao, Z.-R. (1997) Fos expression in serotonergic midbrain neurons projecting to the paraventricular nucleus of hypothalamus after noxious stimulation of the stomach: A triple labeling study in the rat. *Neuroscience Research*, vol. 27, no. 2, pp. 155–160. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(96\)01143-1](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(96)01143-1) (In English)
- Ellrich, J., Ulucan, C., Schnell, C. (2001) Is the response pattern of on- and off-cells in the rostral ventromedial medulla to noxious stimulation independent of stimulation site? *Experimental Brain Research*, vol. 136, no. 3, pp. 394–399. <https://doi.org/10.1007/s002210000594> (In English)
- Fields, H. L., Bry, J., Hentall, I., Zorman, G. (1983) The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. *Journal of Neuroscience*, vol. 3, no. 12, pp. 2545–2552. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.03-12-02545.1983> (In English)
- Fields, H. L., Heinricher, M. M., Mason, P. (1991) Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annual Reviews of Neuroscience*, vol. 14, no. 1, pp. 219–245. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.14.030191.001251> (In English)
- Gao, K., Mason, P. (2000) Serotonergic Raphe magnus cells that respond to noxious tail heat are not ON or OFF cells. *Journal of Neurophysiology*, vol. 84, no. 4, pp. 1719–1725. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.4.1719> (In English)
- Gau, R., Sévoz-Couche, C., Hamon, M., Bernard, J.-F. (2013) Noxious stimulation excites serotonergic neurons: A comparison between the lateral paragigantocellular reticular and the raphe magnus nuclei. *Pain*, vol. 154, no. 5, pp. 647–659. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.09.012> (In English)
- Hao, S., Shi, W., Liu, W. et al. (2023) Multiple modulatory roles of serotonin in chronic pain and injury-related anxiety. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, vol. 15, article 1122381. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2023.1122381> (In English)
- Luz, L. L., Fernandes, E. C., Sivado, M. et al. (2015) Monosynaptic convergence of somatic and visceral C-fiber afferents on projection and local circuit neurons in lamina I: a substrate for referred pain. *Pain*, vol. 156, no. 10, pp. 2042–2051. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000267> (In English)
- Lyubashina, O. A., Sivachenko, I. B., Sokolov, A. Y. (2019) Differential responses of neurons in the rat caudal ventrolateral medulla to visceral and somatic noxious stimuli and their alterations in colitis. *Brain Research Bulletin*, vol. 152, pp. 299–310. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.07.030> (In English)
- Martins, I., Tavares, I. (2017) Reticular formation and pain: The past and the future. *Frontiers in Neuroanatomy*, vol. 11, article 51. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00051> (In English)
- Mercer Lindsay, N., Chen, C., Gilam, G. et al. (2021) Brain circuits for pain and its treatment. *Science Translation Medicine*, vol. 13, no. 619, article eabj7360. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj7360> (In English)
- Monconduit, L., Bourgeois, L., Bernard, J.-F., Villanueva, L. (2003) Convergence of cutaneous, muscular and visceral noxious inputs onto ventromedial thalamic neurons in the rat. *Pain*, vol. 103, no. 1–2, pp. 83–91. [https://doi.org/10.1016/s0304-3959\(02\)00418-9](https://doi.org/10.1016/s0304-3959(02)00418-9) (In English)
- Montagne-Clavel, J., Oliveras, J.-L., Martin, G. (1995) Single-unit recordings at dorsal raphe nucleus in the awake-anesthetized rat: Spontaneous activity and responses to cutaneous innocuous and noxious stimulations. *Pain*, vol. 60, no. 3, pp. 303–310. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(94\)00129-3](https://doi.org/10.1016/0304-3959(94)00129-3) (In English)
- Ness, T. J., Follett, K. A., Piper, J., Dirks, B. A. (1998) Characterization of neurons in the area of the medullary lateral reticular nucleus responsive to noxious visceral and cutaneous stimuli. *Brain Research*, vol. 802, no. 1–2, pp. 163–174. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)00608-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00608-8) (In English)
- Nguyen, E., Smith, K. M., Cramer, N. et al. (2022) Medullary kappa-opioid receptor neurons inhibit pain and itch through a descending circuit. *Brain*, vol. 145, no. 7, pp. 2586–2601. <https://doi.org/10.1093/brain/awac189> (In English)
- Nurzynska, K., Mikhalkin, A., Piorkowski, A. (2017) CAS: Cell annotation software — research on neuronal tissue has never been so transparent. *Neuroinformatics*, vol. 15, no. 4, pp. 365–382. <https://doi.org/10.1007/s12021-017-9340-2> (In English)
- Paxinos, G., Watson, C. (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4th ed. London: Academic Press, 237 p. (In English)
- Pinto-Ribeiro, F., Ansah, O. B., Almeida, A., Pertovaara, A. (2011) Response properties of nociceptive neurons in the caudal ventrolateral medulla (CVLM) in monoarthritic and healthy control rats: Modulation of responses by the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). *Brain Research Bulletin*, vol. 86, no. 1-2, pp. 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.06.014> (In English)
- Qin, C., Farber, J. P., Linderth, B. et al. (2008) Neuromodulation of thoracic intraspinal visceroreceptive transmission by electrical stimulation of spinal dorsal column and somatic afferents in rats. *The Journal of Pain*, vol. 9, no. 1, pp. 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2007.08.007> (In English)
- Radhakrishnan, R., Sluka, K. A. (2009) Increased glutamate and decreased glycine release in the rostral ventromedial medulla during induction of a pre-clinical model of chronic widespread muscle pain. *Neuroscience Letters*, vol. 457, no. 3, pp. 141–145. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.03.086> (In English)
- Ren, T.-H., Wu, J., Yew, D. et al. (2007) Effects of neonatal maternal separation on neurochemical and sensory response to colonic distension in a rat model of irritable bowel syndrome. *American Journal of Physiology*

- Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 292, no. 3, pp. G849–G856. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00400.2006> (In English)
- Shima, K., Nakahama, H., Yamamoto, M. (1986) Firing properties of two types of nucleus raphe dorsalis neurons during the sleep-waking cycle and their responses to sensory stimuli. *Brain Research*, vol. 399, no. 2, pp. 317–326. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)91522-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)91522-2) (In English)
- Sikandar, S., Dickenson, A. H. (2011) Pregabalin modulation of spinal and brainstem visceral nociceptive processing. *Pain*, vol. 152, no. 10, pp. 2312–2322. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.06.020> (In English)
- Snowball, R. K., Semenenko, F. M., Lumb, B. M. (2000) Visceral inputs to neurons in the anterior hypothalamus including those that project to the periaqueductal gray: A functional anatomical and electrophysiological study. *Neuroscience*, vol. 99, no. 2, pp. 351–361. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00203-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00203-7) (In English)
- Vilela, F. C., Vieira, J. S., Vitor-Vieira, F. et al. (2021) Maternal separation increases pain sensitivity by reducing the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus and noradrenergic neurons in locus coeruleus. *Neuroscience Letters*, vol. 748, article 135734. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135734> (In English)
- Wang, Q.-P., Nakai, Y. (1994) The dorsal raphe: An important nucleus in pain modulation. *Brain Research Bulletin*, vol. 34, no. 6, pp. 575–585. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(94\)90143-0](https://doi.org/10.1016/0361-9230(94)90143-0) (In English)
- Wei, F., Gu, M., Chu, Y.-X. (2012) New tricks for an old slug: Descending serotonergic system in pain. *Sheng Li Xue Bao*, vol. 64, no. 5, pp. 520–530. PMID: [23090493](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23090493/) (In English)
- Winkler, C. W., Hermes, S. M., Chavkin, C. I. et al. (2006) Kappa opioid receptor (KOR) and GAD67 immunoreactivity are found in OFF and Neutral cells in the rostral ventromedial medulla. *Journal of Neurophysiology*, vol. 96, no. 6, pp. 3465–3473. <https://doi.org/10.1152/jn.00676.2006> (In English)
- Yang, B., Zhang, L.-C., Zeng, Y.-M. (2003) Zhōng féng bèi hé wēi liáng zhù shè L-N- xiāo jī jīng dàn suān jiǎ lóng yì zhì dà shǔ yǐ zhuàng jié cháng tòng [Microinjection of L-NAME into dorsal raphe nucleus inhibits nociceptive response in sigmoid pain model of rats]. *Sheng Li Xue Bao — Acta Physiologica Sinica*, vol. 55, no. 5, pp. 577–582. PMID: [14566407](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14566407/) (In Chinese)
- Zhang, H.-Q., Al-Chaer, E. D., Willis, W. D. (2002) Effect of tactile inputs on thalamic responses to noxious colorectal distension in rat. *Journal of Neurophysiology*, vol. 88, no. 3, pp. 1185–1196. <https://doi.org/10.1152/jn.2002.88.3.1185> (In English)
- Zhang, H.-Q., Rong, P.-J., Zhang, S.-P. et al. (2003) Noxious visceral inputs enhance cutaneous tactile response in rat thalamus. *Neuroscience Letters*, vol. 336, no. 2, pp. 109–112. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)01243-0](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)01243-0) (In English)
- Zhang, Y., Zhao, S., Rodriguez, E. et al. (2015) Identifying local and descending inputs for primary sensory neurons. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 125, no. 10, pp. 3782–3794. <https://doi.org/10.1172/JCI81156> (In English)