



УДК 612.826 + 612.884

EDN JAKGNU

<https://doi.org/10.33910/2687-1270-2024-5-3-307-317>

Эффекты колита на вовлечение серотонинергических и несеротониновых нейронов в ноцицептивную активацию ядер шва

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. (2024) Эффекты колита на вовлечение серотонинергических и несеротониновых нейронов в ноцицептивную активацию ядер шва. *Интегративная физиология*, т. 5, № 3, с. 307–317. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2024-5-3-307-317> EDN JAKGNU

Получена 27 ноября 2024; прошла рецензирование 2 декабря 2024; принята 3 декабря 2024.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00151, <https://rscf.ru/project/23-25-00151/>.

Права: © Б. М. Сушкевич, А. А. Михалкин, О. А. Любашина (2024). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

Аннотация. Серотонин-синтезирующие большое (БЯШ) и дорсальное (ДЯШ) ядра шва являются ключевыми центрами обработки болевых сигналов. Эти ядра, помимо серотонинергических ноцицептивных нейронов, содержат множество боль-реактивных несеротониновых клеток. Ранее нами было показано, что БЯШ и ДЯШ содержат различающиеся по морфо-функциональным характеристикам популяции нейронов, которые специализированы в отношении висцеральной или соматической ноцицепции и специфически изменяют активность при кишечном воспалении. Однако остается неясным, как при этом изменяется общий уровень активации этих структур висцеральными и соматическими болевыми входами, а также относительный вклад в этот процесс серотонинергических и несеротониновых механизмов. Целью нашего исследования, выполненного на анестезированных самцах крыс Вистар с использованием иммуногистохимических методов, являлось определение индуцируемых колитом изменений в количестве с-Fos-синтезирующих нейронов БЯШ и ДЯШ, активируемых висцеральным (колоректальное растяжение) и соматическим (сдавливание хвоста) болевыми раздражениями, и в соотношении среди них серотонинергических и несеротониновых клеток. Установлено, что в отсутствие патологии реципиентами висцеральных болевых сигналов в БЯШ и ДЯШ преимущественно являются несеротониновые нейроны, тогда как соматическая ноцицепция, наряду с несеротониновыми, активирует серотониновые. Экспериментальный колит сопровождается общим усилением возбудимости с-Fos-синтезирующих нейронов БЯШ при их ослабленной активации соматическими болевыми сигналами, а также снижением реактивности с-Fos-позитивных нейронов ДЯШ к висцеральному и соматическому ноцицептивным входам. Эти изменения в БЯШ ассоциированы со смещением соматической ноцицептивной трансмиссии в сторону большей активации несеротониновых нейронов, а в ДЯШ — с сохранением серотонин-зависимых процессов обработки болевых сигналов при сокращении доли в них несеротониновых. Продемонстрированные при колите нейрохимические перестройки могут ослаблять серотонин-зависимый вклад БЯШ в нисходящий антиноцицептивный контроль и усиливать ноцицептивный поток от ДЯШ к структурам переднего мозга, способствуя развитию висцеральной и соматической гипералгезий.

Ключевые слова: ядра шва, висцеральная боль, соматическая боль, экспрессия с-Fos белков, серотонинергические нейроны, колит

Effect of colitis on the involvement of serotonergic and non-serotonin neurons in the raphe nuclei nociceptive activation

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. (2024) Effect of colitis on the involvement of serotonergic and non-serotonin neurons in the raphe nuclei nociceptive activation. *Integrative Physiology*, vol. 5, no. 3, pp. 307–317. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2024-5-3-307-317> EDN JAKGNU

Received 27 November 2024; reviewed 2 December 2024; accepted 3 December 2024.

Funding: The study was supported by the Russian Science Foundation, project no. 23-25-00151, <https://rscf.ru/project/23-25-00151/>.

Copyright: © B. M. Sushkevich, A. A. Mikhalkin, O. A. Lyubashina (2024). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under [CC BY-NC License 4.0](#).

Abstract. The serotonin (5-HT)-synthesizing raphe magnus (RMg) and dorsal raphe (DR) nuclei are key pain processing centers. In addition to serotonergic nociceptive neurons, these regions house various non-serotonin cells that respond to pain stimuli. Our previous studies indicated that the RMg and DR contain distinct neuronal populations that specialize in either visceral or somatic nociception, with their activity being influenced by intestinal inflammation. However, the effects of inflammation on the general activation of the RMg and DR by visceral or somatic nociception and relative contribution of serotonergic and non-serotonergic mechanisms to this process remain unclear. In this immunohistochemical study performed on anesthetized male Wistar rats, we assessed colitis-induced changes in the neuronal activation of RMg and DR neurons by visceral (colorectal distension) and somatic (tail squeezing) pain stimuli, focusing on the local c-Fos-synthesizing activity and the balance between 5-HT-ergic and non-serotonin cells. Under normal conditions, non-serotonin neurons predominantly responded to visceral pain in both RMg and DR, whereas somatic nociception activated both 5HT-ergic and non-serotonin cells. Colitis led to a general increase in c-Fos production in RMg neurons, with their reduced response to somatic pain, and a decrease in c-Fos-positive DR neuron reactivity to both types of pain. These colitis-induced changes in the RMg were linked to a shift in somatic nociceptive processing toward greater involvement of non-serotonin neurons, while the DR maintained 5-HT-dependent pain signaling but exhibited reduced non-serotonin one. These neurochemical alterations associated with colitis may attenuate the RMg's role in descending antinociceptive control and enhance nociceptive signaling from the DR to the forebrain, contributing to both visceral and somatic hyperalgesia.

Keywords: raphe nuclei, visceral pain, somatic pain, c-Fos expression, serotonergic neurons, colitis

Введение

Будучи ключевыми компонентами церебральной серотонинергической системы большое ядро шва (БЯШ) и дорсальное ядро шва (ДЯШ) являются важнейшими центрами обработки болевых сигналов, получаемых от разных областей тела непосредственно по восходящим спинальным трактам или через парабрахиальный комплекс моста (Chen, Heinricher 2022; Martins, Tavares 2017; Zhang et al. 2024).

Установлено, что эти ядра являются сложными нейрхимическими системами, содержащими, помимо серотонин-синтезирующих нейронов, также значительные количества несеротониновых клеток (глутамат-, ГАМК-,

дофамин-, норадрен-, опиоид-, нитро-, холин-, гистаминергических, а также экспрессирующих SP и NPY), регулирующих различным образом возбудимость первых и высвобождение ими серотонина внутри ядра или в других областях мозга (Hernández-Vázquez et al. 2019; Inyushkin et al. 2010; Martins, Tavares 2017; Wang, Nakai 1994; Zhang et al. 2024).

В нашем предыдущем исследовании было обнаружено, что БЯШ и ДЯШ содержат избирательно реагирующие на висцеральное и соматическое болевые раздражения нейроны, различающиеся по импульсной и c-Fos-синтезирующей активности (Sushkevich et al. 2023a). Эти данные указывают на существование в БЯШ и ДЯШ специализированных по отношению к болевым

ходам нейрональных популяций, которые могут обладать различным нейрохимическим фенотипом и, в частности, различаться по содержанию серотонин-синтезирующих и несеротониновых клеток, способствуя формированию присущей каждому виду боли функциональной активности ядер шва. Однако до настоящего времени мало известно о сравнительных нейрохимических характеристиках ноцицептивных нейронов БЯШ и ДЯШ, активирующихся в ответ на висцеральные и соматические болевые воздействия.

Между тем, изучение нейрохимических процессов, обеспечивающих избирательную обработку висцеральных и соматических болевых сигналов в ядрах шва в норме и при патологии, является актуальным, поскольку нарушения в них считают одной из причин развития хронических болевых синдромов (Chen, Heinricher 2022; Cleary, Heinricher 2013; Zhang et al. 2024). Так в экспериментах на грызунах продемонстрированы изменения в серотонинергической и несеротониновой (ГАМК-, глутамат-, дофамин- и нитроергической) нейротрансмиссиях в БЯШ и ДЯШ при усилении соматической (Cai et al. 2014; Costa-Pereira et al. 2020; Ganley et al. 2023; Liu et al. 2023; Xie et al. 2022) и висцеральной болевых чувствительностей (Ren et al. 2007; Sanoja et al. 2010). При этом отдельные факты свидетельствуют о различиях в локальных нейрохимических перестройках, сопровождающих развитие соматической и висцеральной гипералгезий (Vilela et al. 2021; Zhang et al. 2018). Между тем, специфика таких перестроек при разных видах патологии и их значение для ноцицептивной активности исследуемых ядер шва изучены мало.

Ранее было установлено, что кишечное воспаление вызывает изменения фоновой экспрессии c-Fos-белков в нейронах БЯШ и ДЯШ (Goehler et al. 2005; Lu, Westlund 2001; Wan et al. 2017), а также импульсных реакций функционально различных групп их нейронов на висцеральные и соматические болевые стимулы (Sanoja et al. 2010; Sushkevich et al. 2023b). Однако остается неясным, как при этом изменяются общий уровень нейрональной активации этих структур при поступлении висцеральных и соматических болевых сигналов, а также относительный вклад серотонинергических и несеротониновых механизмов в этот процесс.

Поэтому целью нашего исследования являлось определение индуцируемых кишечным воспалением изменений в количестве c-Fos-синтезирующих нейронов БЯШ и ДЯШ, активируемых висцеральными и соматическими болевыми сигналами, и в соотношении среди них серотонин-синтезирующих и несеротониновых клеток.

Материалы и методы

Исследование выполнено на взрослых самцах крыс стока линии Вистар (масса тела 280–320 г) из ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем», разделенных на две равные группы ($n = 9$): 1) с интактной толстой кишкой и 2) подвергнутые экспериментальному колиту (Morris et al. 1989). Спустя шесть-восемь дней животные из обеих групп после 16-часовой пищевой депривации со свободным доступом к воде были анестезированы (в/б; уретан (0,8 г/кг; Sigma-Aldrich, США) и альфа-хлоралозы (60 мг/кг; Sigma-Aldrich, США)). Внутри каждой из групп были случайным образом сформированы три равные ($n = 3$) подгруппы: 1) контрольная (без стимуляционных воздействий); 2) с висцеральной и 3) с соматической болевыми стимуляциями.

Висцеральное болевое раздражение вызывали колоректальным растяжением посредством раздувания резинового баллона шприцевым насосом ДШ-09 (Висма-Планар, Беларусь) до достижения уровня внутрикишечного давления в 80 мм рт. ст. Соматическое — механическим сдавливанием основания хвоста пинцетом алгезиметра (БИО-RP-R, Bioseb SAS, Франция) с нагрузкой от 650 до 900 г. Оба вида стимуляции осуществляли периодами по 60 с и четырёхминутным интервалом в течение часа. Животные контрольной подгруппы такое же количество времени находились в покое.

По окончании описанных выше процедур производили транскардиальную перфузию опытных животных с последующим извлечением головного мозга. Каждый мозг подвергали криопротекции перед изготовлением серийных (один-из-пяти) фронтальных срезов толщиной 40 мкм через области исследуемых серотонинергических структур (Sushkevich et al. 2023a).

Срезы первой серии монтировали на стекла, высушивали, окрашивали крезоловым фиолетовым (Merck, Germany) по методу Ниссля и заключали в энтеллан (Merck, Germany) для идентификации границ исследуемых структур по стереотаксическому атласу мозга крысы (Paxinos, Watson 1998).

Вторая серия срезов была подвергнута иммуногистохимической обработке для визуализации клеток с c-Fos-позитивными ядрами по авидин-биотин-пероксидазному методу с применением первичных поликлональных антител к белку c-Fos (ABE457; Sigma-Aldrich, США; host: rabbit; 1:10000), вторичных биотинилированных антител (goat anti-rabbit IgG; PK-4001 kit, Vector Laboratories,

США; 1:600) и хромогенсодержащего раствора диаминобензидаина с Ni и H₂O₂. Готовые срезы обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в среду 05-ВМНМ508 (Bio-Оптика, Италия).

Срезы из третьей серии подвергали двойному флуоресцентному иммуногистохимическому процессингу для выявления серотонин-синтезирующих нейронов с с-Fos-позитивными ядрами с использованием антител anti-c-Fos (ABE457; 1:1000) и anti-Serotonin (ab66047; Abcam, Великобритания; host: goat; 1:500), а также вторичных флуоресцентных антител Alexa Fluor 568 Goat anti-Rabbit IgG (A-11036; Thermo Fisher, США; 1:500) и Alexa Fluor 405 Donkey Anti-Goat IgG (ab175664; Abcam, Великобритания; 1:250). Высушенные стекла со срезами заключали в защитную среду ab104135 (Abcam, Великобритания).

Во всех видах иммуногистохимического процессинга для приготовления инкубационных растворов использовали 0,01 М фосфатный буфер (рН = 7,4; БиолоТ, Россия).

Изображения препаратов, окрашенных хромогенами, получали в светлом поле микроскопа Olympus CX41 (Япония) с помощью цифровой видеокамеры Nikon (Япония). Локализацию и количество с-Fos-позитивных клеток определяли при помощи программного пакета CAS (Nurzynska et al. 2017). Изображения флуоресцентных препаратов получали с помощью кон-

фокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 710 на базе инвертированного микроскопа Axio Observer (Carl Zeiss AG, Германия) в ЦКП «Конфокальная микроскопия» ИФ им. И. П. Павлова РАН. Количество с-Fos и с-Fos/серотонин-позитивных (с-Fos/5-НТ) нейронов определяли с помощью программного пакета «ImageJ Fiji» (НИН, США).

Статистическую обработку, сравнение и графическое оформление данных осуществляли в среде программных пакетов «Origin 8» (США) и «GraphPad InStat 3.02» (США) с использованием непараметрических тестов для независимых измерений (тесты Крускала — Уоллиса и Манна — Уитни — Вилкоксона). Данные представлены как медиана (25-й перцентиль; 75-й перцентиль). Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Анализ препаратов мозга, иммуногистохимически обработанных по avidин-биотин-пероксидазному методу, показал, что у здоровых животных болевые раздражения вызывают значительное увеличение количества с-Fos-позитивных нейронов как в БЯШ, так и в ДЯШ (рис. 1).

В БЯШ увеличение в числе клеток с иммунопозитивными ядрами после обеих стимуляций

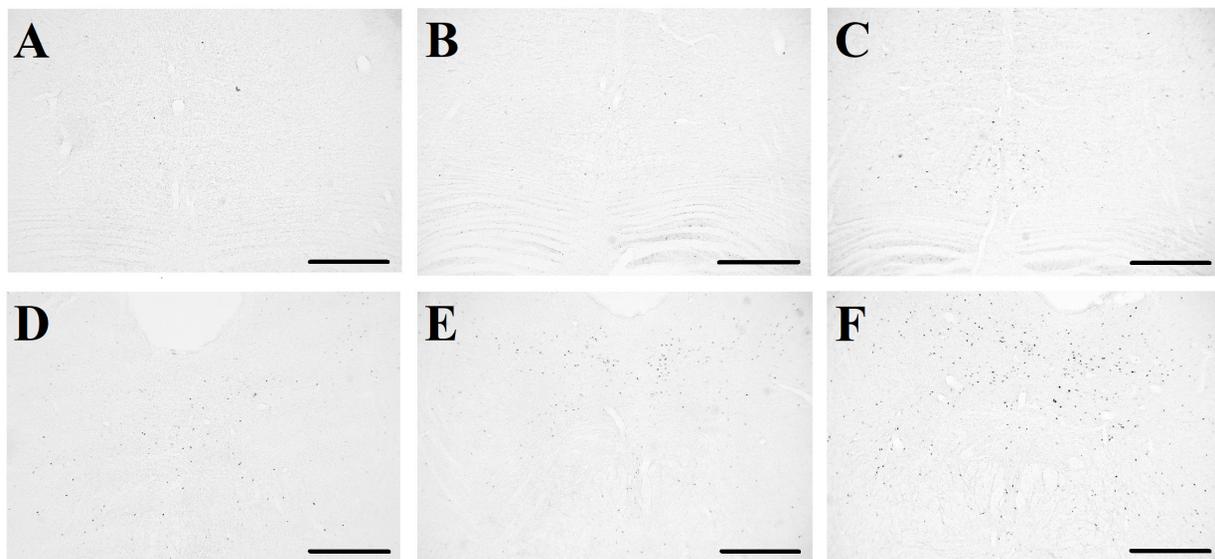


Рис. 1. Микрофотографии иммунохимически обработанных срезов мозга через область БЯШ на уровне 10,2 мм каудальнее брегмы (А — С) и ДЯШ на уровне 7,6 мм каудальнее брегмы (D — F) у здоровых крыс, демонстрирующие с-Fos-позитивные ядра нейронов в контрольной группе (А, D), после висцерального (В, E) и соматического (С, F) болевых раздражений. Масштабная линия — 300 мкм

Fig. 1. Micrographs of immunohistochemically processed brain sections through the RMg at 10.2 mm caudal to bregma (A–C) and DR at 7.6 mm caudal to bregma (D–F) in healthy rats, demonstrating c-Fos-positive neuronal nuclei in the control group (A, D), after visceral (B, E) and somatic (C, F) noxious stimulation. Scale bar = 300 μ m

было в равной мере существенным по сравнению с контролем (для висцеральной — $p = 0,0001$, $U = 75$, тест Манна — Уитни — Вилкоксона; для соматической — $p < 0,0001$, $U = 70$) (рис. 2 А). Однако реактивность структуры к растяжению кишки была менее выражена, чем к сдавливанию хвоста ($p = 0,04$, $U = 135$).

В свою очередь, ДЯШ демонстрировало сопоставимое усиление *c-Fos*-синтезирующей активности после активации висцерального ($p = 0,03$, $U = 69$) и соматического ($p = 0,0015$, $U = 88$) ноцицептивных входов (рис. 2 В). В обоих ядрах различий в локализации нейронов, активируемых разными стимулами, не наблюдалось.

Состояние кишечной патологии по сравнению со здоровым контролем характеризовалось увеличением базального количества *c-Fos*-позитивных нейронов в БЯШ ($p = 0,04$, $U = 235,5$, тест Манна — Уитни — Вилкоксона) и существенным сокращением числа клеток этого ядра, реагирующих на соматическую ноцицепцию ($p = 0,03$, $U = 212,5$) (рис. 2 А). Количество последних при колите было сопоставимым с чис-

лом нейронов, активируемых висцеральным болевым раздражением ($p = 0,4$, $U = 327$). В свою очередь, ДЯШ в условиях кишечного воспаления уже не демонстрировало каких-либо выраженных изменений в количестве *c-Fos*-синтезирующих клеток при разного рода болевых воздействиях ($p = 0,6$, $KW = 1,13$, тест Крускала — Уоллиса), так же как и не проявляло сдвигов в базальном уровне этого показателя по сравнению с нормой ($p = 0,5$, $U = 204$, тест Манна — Уитни — Вилкоксона) (рис. 2 В).

Как показали результаты двойного флуоресцентного иммуногистохимического процессинга, большинство нейронов БЯШ с *c-Fos*-позитивными ядрами, как в контроле, так и после болевых воздействий, были негативны к мечению на серотонин. Лишь в среднем $38,6 \pm 2,3\%$ из них относились к серотонин-позитивным. Существенное увеличение количества *c-Fos*/5-НТ клеток в ядре (т. е. функциональная активация серотонинергических нейронов) было отмечено только после соматического болевого раздражения ($p = 0,016$, $U = 15$, тест Манна — Уитни —

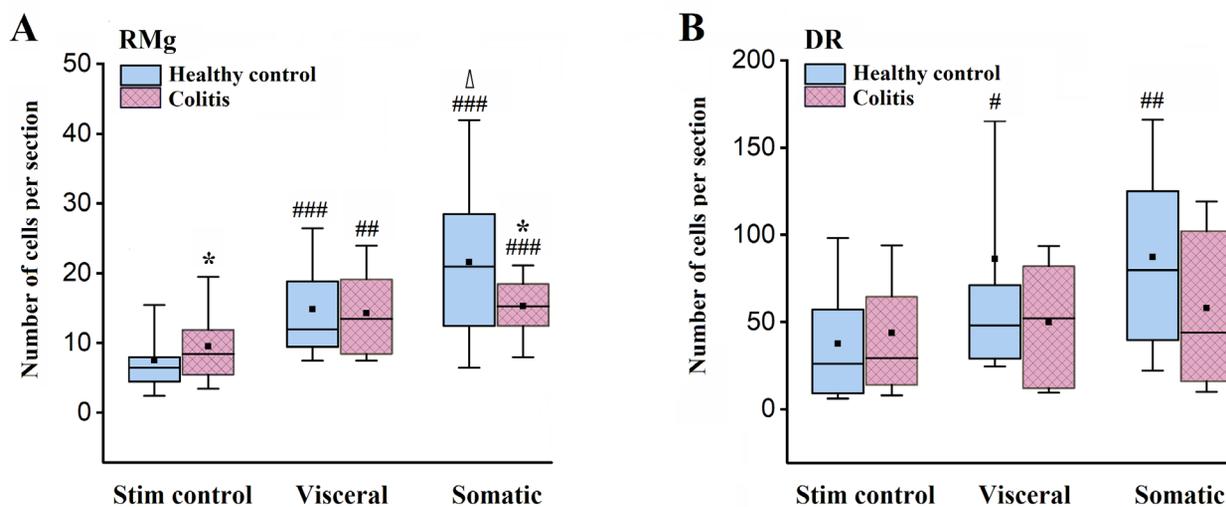


Рис. 2. Количество *c-Fos*-позитивных нейронов в БЯШ (RMg, А) и ДЯШ (DR, В) у крыс без стимуляции (Stim control), после висцерального (Visceral) или соматического (Somatic) болевых раздражений в группе здорового контроля (Healthy control) и группы с колитом (Colitis). На (А, В) верхняя и нижняя границы каждого прямоугольника — первый и третий квартили (25-й и 75-й процентиля соответственно), горизонтальная линия внутри — медиана (50-й процентиль), квадрат — среднее арифметическое, концы отрезков — 10-й и 90-й процентиля. Значимые различия (тест Манна-Уитни-Вилкоксона): # — $p < 0,05$, ## — $p < 0,01$ и ### — $p < 0,001$ — по сравнению со стимуляционным контролем; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ — по сравнению со здоровым контролем; △ — $p < 0,05$; △△ — $p < 0,01$ — по сравнению с висцеральной болевой стимуляцией

Fig. 2. Numbers of *c-Fos*-positive neurons in the RMg (A) and DR (B) in rats with no stimulation (Stim control), after visceral (Visceral) and somatic (Somatic) noxious stimulations in the healthy control (Healthy control) and colitis (Colitis) groups. In panels (A) and (B), the upper and lower edges of the box represent the first and third quartiles (25th and 75th percentiles, respectively), the horizontal line inside the box indicates the median (50th percentile), the square represents the mean, and the ends of the segments show the 10th and 90th percentiles. Significant differences (Mann-Whitney-Wilcoxon test): # — $p < 0.05$, ## — $p < 0.01$ and ### — $p < 0.001$ — vs. stimulation control; * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$ — vs. healthy control; △ — $p < 0.05$; △△ — $p < 0.01$ — vs. visceral noxious stimulation

Вилкоксона (рис. 3 А). При этом доля таких клеток в общем числе *c-Fos*-позитивных нейронов оставалась на уровне $36,5 \pm 3,1\%$ (рис. 3 С).

В ДЯШ здоровых животных контрольной и стимулируемых групп лишь в среднем $27,7 \pm 1,0\%$ нейронов с *c-Fos*-позитивными ядрами были серотонинергическими. Как и в БЯШ, значимое по сравнению с контролем увеличение количества *c-Fos/5-HT* клеток наблюдалось только после соматического болевого раздражения ($p = 0,0099$, $U = 10,5$, тест Манна — Уитни — Вилкоксона) (рис. 3 В). При этом доля таких клеток в общем числе *c-Fos*-позитивных нейронов повышалась до $30,2 \pm 1,8\%$. Это было

существенно выше, чем при висцеральной болевой стимуляции ($p = 0,008$, $U = 4$, тест Манна — Уитни — Вилкоксона), при которой процент *c-Fos/5-HT* нейронов среди всех ею активируемых был ниже, чем в контроле ($p = 0,04$, $U = 8$) (рис. 3 D).

У крыс с колитом в покое не было выявлено существенных изменений в количестве *c-Fos/5-HT* клеток в БЯШ по сравнению с таковым у здоровых крыс ($p = 0,7$, $U = 63$), хотя и наблюдалась тенденция к его уменьшению в относительном к общему числу *c-Fos*-позитивных нейронов значениях (c $45,6 \pm 7,7\%$ в норме до $36,9 \pm 6,1\%$ при колите) (рис. 3 С). При этом

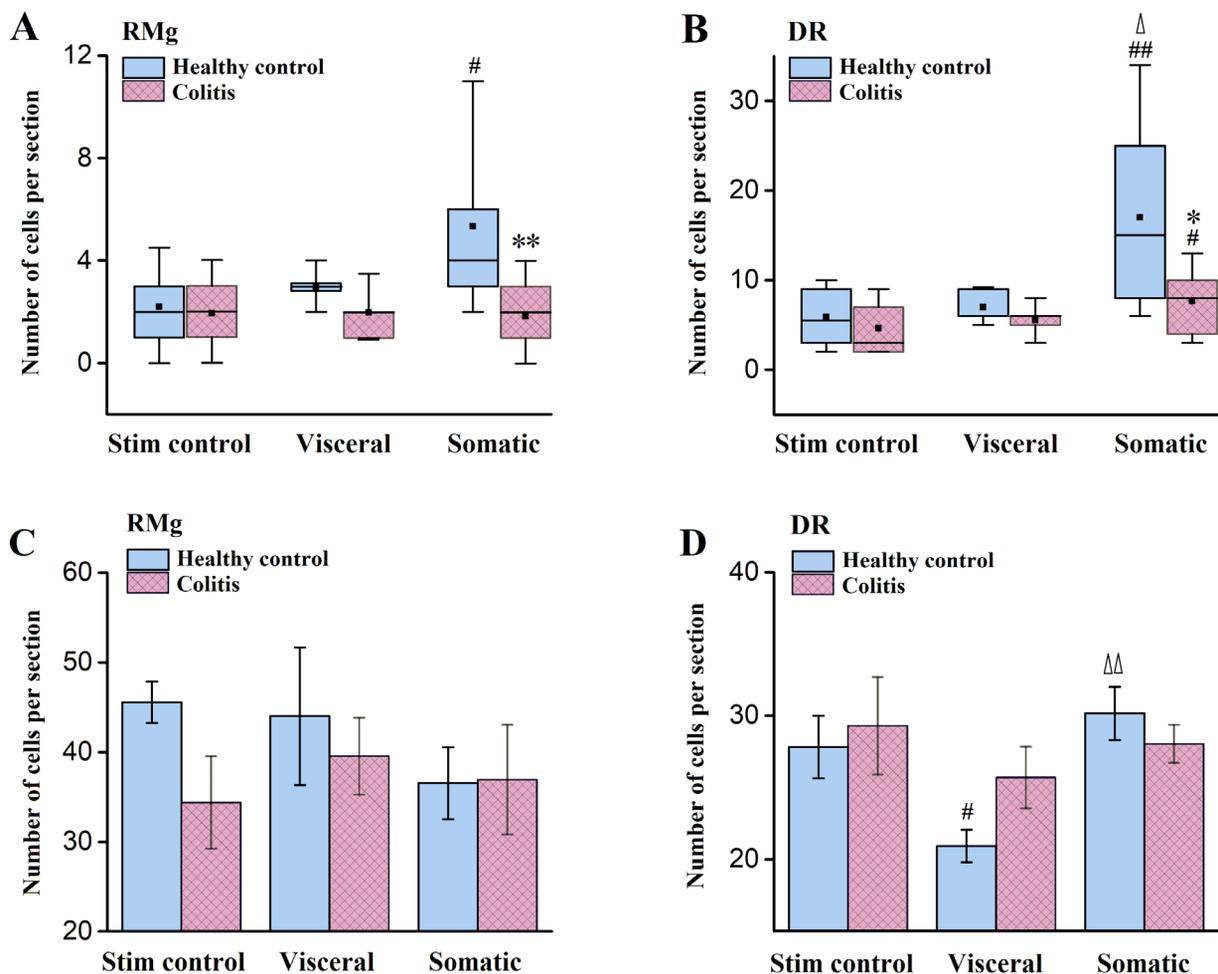


Рис. 3. Абсолютное количество *c-Fos/5-HT*-позитивных клеток (А, В) и их процентная доля в общем числе *c-Fos*-синтезирующих нейронов (С, D) в БЯШ (RMg; А, С) и ДЯШ (DR; В, D) ядрах шва у крыс без стимуляции (Stim control), после висцерального (Visceral) или соматического (Somatic) болевых раздражений в группе здорового контроля (Healthy control) и группы с колитом (Colitis). На (А, В) обозначения как для рис. 2. На (С, D) высота каждого столбца — среднее арифметическое, отрезки — стандартная ошибка среднего. Расшифровка значимых различий как для рис. 2

Fig. 3. Absolute number of *c-Fos/5-HT*-positive cells (A, B) and their percentage in the total number of *c-Fos*-synthesizing neurons (C, D) in the RMg (A, C) and DR (B, D) in rats without stimulation (Stim control), after visceral (Visceral) or somatic (Somatic) pain stimuli in the healthy control (Healthy control) and colitis (Colitis) groups. Notations in (A, B) and significant differences are as shown in Fig. 2. In (C, D), the column height represents the mean, and the segments represent the standard error of the mean

висцеральная ноцицепция не вызвала статистически значимых изменений обоих показателей ($p = 0,9$, $U = 68$ и $p = 0,68$, $U = 62,5$, соответственно). Число c-Fos/5-НТ клеток БЯШ при соматическом раздражении в условиях колита было значительно меньше, чем в норме ($p = 0,002$, $U = 14,5$), не отличаясь от соответствующего контрольного уровня в абсолютном ($p = 0,9$, $U = 95,5$) (рис. 3 А) и процентном значениях ($p = 0,79$, $U = 92$) (рис. 3 С).

В ДЯШ крыс с кишечной патологией не было выявлено существенных изменений в базальном количестве c-Fos/5-НТ клеток ($p = 0,7$, $U = 63$, тест Манна — Уитни — Вилкоксона) (рис. 3 В) и их процентной доле в общем числе c-Fos-позитивных нейронов ($29,3 \pm 3,4\%$) по сравнению с таковым у здоровых крыс (рис. 3 D). Висцеральная болевая стимуляция не вызвала статистически значимых сдвигов этих показателей ($p = 0,57$, $U = 57,5$), хотя вовлекала несколько больший процент серотониновых нейронов среди c-Fos-позитивных (рис. 3 В, D). При этом соматическое раздражение по-прежнему повышало абсолютное число c-Fos/5-НТ нейронов по отношению к контролю ($p = 0,02$, $U = 57,5$), но в меньшей степени, чем в норме ($p = 0,02$, $U = 24$) (рис. 3 В) и уже в сопоставимых с висцеральной ноцицепцией процентных долях (рис. 3 D).

Обсуждение

Как демонстрируют результаты нашего исследования, в отсутствие патологии реципиентами висцеральных болевых сигналов в БЯШ и ДЯШ преимущественно являются несеротониновые нейроны, тогда как соматическая ноцицепция активирует как несеротониновые, так и серотонинергические. Кишечное воспаление сопровождается общим усилением возбудимости c-Fos-синтезирующих нейронов БЯШ при их ослабленной активации соматическими болевыми сигналами и параллельном снижении уровня реактивности c-Fos-позитивных нейронов ДЯШ к обоим видам болевого воздействия. Эти изменения ассоциированы с дефицитом серотонинергической ноцицептивной трансмиссии в БЯШ при сохранении серотонин-зависимых процессов обработки болевых сигналов в ДЯШ.

Полученные нами данные о небольшой доле серотонин-синтезирующих нейронов среди боль-реактивных в БЯШ и ДЯШ согласуются с результатами предыдущих исследований (Brink, Mason 2003; Gau et al. 2013; Winkler et al. 2006). Однако, в отличие от указанных

авторов, мы впервые провели сравнительное исследование нейрональных популяций БЯШ и ДЯШ, активируемых висцеральным и соматическим болевыми входами, и установили, что обе данные структуры главным образом вовлечены в процессы соматической ноцицепции. Что касается реактивных к болевым сигналам несеротониновых клеток в исследуемых ядрах, то их нейрохимический фенотип в настоящее время изучен плохо. Известно только, что соматическое болевое воздействие может активировать глутамат-, ГАМК- и энкефалинергические нейроны в БЯШ, а также глутамат- и ГАМКергические в ДЯШ, а висцеральное — нитроергическую нейротрансмиссию в ДЯШ (Liu et al. 2024; Radhakrishnan, Sluka 2009; Ren et al. 2024; Winkler et al. 2006; Yang et al. 2009). Очевидно, что нейрохимические характеристики реактивных к висцеральной ноцицепции нейронов БЯШ и ДЯШ нуждаются в специальном исследовании.

Как впервые показали наши эксперименты, при кишечном воспалении серотонин-синтезирующие нейроны БЯШ утрачивали реактивность к соматическим болевым сигналам. Известно, что БЯШ является основным источником нисходящих серотонинергических проекций, регулирующих передачу болевых сигналов в дорсальных рогах спинного мозга. Поэтому нарушенная активация при соматической ноцицепции тех серотонин-синтезирующих нейронов БЯШ, которые обеспечивают его нисходящие тормозные влияния (Ganley et al. 2023; Martins, Tavares 2017), может способствовать соматической гипералгезии, которую, помимо висцеральной, отмечают при воспалении кишки (Jain et al. 2015; Sanoja et al. 2010; Zhang et al. 2014; Zhou et al. 2008).

Логично предположить, что именно несеротониновые клетки вносят основной вклад в усиление базальной c-Fos-синтезирующей активности БЯШ и ее подъем после висцерального и, в меньшей степени, соматического болевых воздействий, которые мы наблюдали у крыс с колитом. В частности, при патологии может усиливаться ноцицептивная активация локальных ГАМКергических нейронов, которые, как установлено, способны оказывать тормозные влияния на серотонинергические нейроны БЯШ (Inyushkin et al. 2010; Li et al. 2015). Косвенным подтверждением чего может служить продемонстрированное нами ранее нарастание в нем тормозных ноцицептивных процессов после колита (Sushkevich et al. 2023b). Также подавляющие влияния ГАМКергических нейронов, активированных болевыми воздействиями, могут

испытывать соседние с ними ГАМК/энкефалиновые, опосредующие нисходящий тормозный контроль проведения болевых сигналов на уровне спинального дорсального рога (Nguyen et al. 2022; Zhang et al. 2015). В совокупности, все указанные выше процессы могут приводить к общему ослаблению функции БЯШ в системе эндогенной анальгезии, способствуя характерному для кишечной патологии усилению как висцеральной, так и соматической болевых чувствительностей.

В свою очередь, серотонинергические нейроны ДЯШ при колите сохраняли реактивность к соматическим болевым стимулам в меньшей степени и вместе с этим сильнее вовлекались в висцеральную ноцицептивную трансмиссию. Отсутствие при этом существенных сдвигов в общей c-Fos-синтезирующей активности клеток ДЯШ после болевых воздействий может говорить об уменьшении вклада в эти процессы значительной группы локальных несеротониновых нейронов, в том числе ГАМКергических (Liu et al. 2024; Ren et al. 2024), способных подавлять активность серотониновых (Wang, Nakai 1994; Xie et al. 2022; Zhang et al. 2024). Следствием их меньшей реактивности к болевым воздействиям при колите может быть ослабление ноцицептивного тормозного контроля в пределах ДЯШ и, как результат, постколитное усиление импульсных реакций нейронов на висцеральные и соматические болевые стимулы, которое было отмечено в нашем предыдущем исследовании (Sushkevich et al. 2023b).

Известно, что восходящие серотонинергические проекции ДЯШ к ядрам таламуса, амигдалы, первичной соматосенсорной и медиальной префронтальной коры обеспечивают формирование перцептуальных, эмоционально-аффективных и когнитивных реакций организма на боль (Hao et al. 2023; Huang et al. 2019; Wang, Nakai 1994; Zhang et al. 2024). При колите, в условиях ослабленного локального ГАМКергического тормозного контроля, ноцицептивная активация нейронов ДЯШ, являющихся источниками этих проекций, может быть более интенсивной, приводя к усилению указанных выше реакций. Результатом может быть проявление висцеральной и соматической гипералгезий на поведенческом уровне. Косвенными подтверждениями этому предположению могут служить результаты поведенческих исследований других авторов (Akbar et al. 2023; Xie et al. 2022; Zhang et al. 2018). Помимо этого, мы не можем исключать, что определенный вклад в развитие таких состояний при колите также может вносить возможное снижение

реактивности к болевым стимулам других несеротониновых нейронов ДЯШ — дофаминергических, ноцицептивная активация которых важна для механизмов антиноцицепции (Taylor et al. 2019; Zhang et al. 2024). Для проверки предложенных нами гипотез необходимы дальнейшие исследования.

Таким образом, проведенные нами исследования впервые продемонстрировали, что колит инициирует разнонаправленные изменения в относительном вкладе серотонинергических и несеротониновых нейронов в активацию БЯШ и ДЯШ висцеральными и соматическими болевыми стимулами — ослабление серотонинергических ноцицептивных процессов при сохранении несеротониновых в БЯШ и противоположные перестройки в ДЯШ. Продемонстрированные нейробиохимические изменения могут ослаблять вклад БЯШ в нисходящий антиноцицептивный контроль и усиливать ноцицептивный поток от ДЯШ к структурам переднего мозга, способствуя тем самым развитию присущих кишечному воспалению висцеральной и соматической гипералгезий.

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, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и были одобрены Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И. П. Павлова РАН (протокол №10/23 от 23.01.2023).

Ethics Approval

All experimental procedures were conducted in accordance with the ethical standards set forth by the Russian legislation, the principles outlined in the Basel Declaration, and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Pavlov Institute of Physiology (Protocol No. 10/23, dated 23.01.2023).

Вклад авторов

а. Сушкевич Борис Михайлович — сбор данных, обработка данных, написание и редактирование манускрипта;

б. Михалкин Александр Александрович — сбор данных, обработка данных, написание и редактирование манускрипта;

в. Любашина Ольга Анатольевна — идея работы и планирование эксперимента, сбор данных, обработка данных, написание и редактирование манускрипта.

Author Contributions

a. Boris M. Sushkevich — data collection, data processing, manuscript writing and editing;

b. Aleksandr A. Mikhalkin — data collection, data processing, manuscript writing and editing;

c. Olga A. Lyubashina — conceptualization and experimental design, data collection, data processing, manuscript writing and editing.

References

- Akbar, L., Castillo, V. C. G., Olorocisimo, J. P. et al. (2023) Multi-region microdialysis imaging platform revealed dorsal raphe nucleus calcium signaling and serotonin dynamics during nociceptive pain. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, no. 7, article 6654. <https://doi.org/10.3390/ijms24076654> (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)
- Cai, Y.-Q., Wang, W., Hou, Y.-Y., Pan, Z. Z. (2014) Optogenetic activation of brainstem serotonergic neurons induces persistent pain sensitization. *Molecular Pain*, vol. 19, no. 10, article 70. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-10-70> (In English)
- Cleary, D. R., Heinricher, M. M. (2013) Adaptations in responsiveness of brainstem pain-modulating neurons in acute compared with chronic inflammation. *Pain*, vol. 154, no. 6, pp. 845–855. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.02.019> (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)
- Costa-Pereira, J. T., Serrão, P., Martins, I., Tavares, I. (2020) Serotonergic pain modulation from the rostral ventromedial medulla (RVM) in chemotherapy-induced neuropathy: The role of spinal 5-HT₃ receptors. *European Journal of Neuroscience*, vol. 51, no. 8, pp. 1756–1769. <https://doi.org/10.1111/ejn.14614> (In English)
- Ganley, R. P., de Sousa, M. M., Werder, K. et al. (2023) Targeted anatomical and functional identification of antinociceptive and pronociceptive serotonergic neurons that project to the spinal dorsal horn. *Elife*, vol. 8, no. 12, article 78689. <https://doi.org/10.7554/eLife.78689> (In English)
- Gau, R., Sévoz-Couche, C., Hamon, V., 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)
- Goehler, L. E., Gaykema, R. P., Opitz, N. et al. (2005) Activation in vagal afferents and central autonomic pathways: Early responses to intestinal infection with *Campylobacter jejuni*. *Brain, Behavior and Immunity*, vol. 19, no. 4, pp. 334–344. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2004.09.002> (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)
- Hernández-Vázquez, F., Garduño, J., Hernández-López, S. (2019) GABAergic modulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Reviews in the Neurosciences*, vol. 30, no. 3, pp. 289–303. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2018-0014> (In English)
- Huang, K. W., Ochandarena, N. E., Philson, A. C. et al. (2019) Molecular and anatomical organization of the dorsal raphe nucleus. *Elife*, vol. 8, article 46464. <https://doi.org/10.7554/eLife.46464> (In English)
- Inyushkin, A. N., Merkulova, N. A., Orlova, A. O., Ilyuskina, E. M. (2010) Local GABAergic modulation of the activity of serotonergic neurons in the nucleus raphe magnus. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, vol. 40, no. 8, pp. 885–893. <https://doi.org/10.1007/s11055-010-9337-x> (In English)
- Jain, P., Hassan, A. M., Koyani, C. N. et al. (2015) Behavioral and molecular processing of visceral pain in the brain of mice: Impact of colitis and psychological stress. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, vol. 9, article 177. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00177> (In English)
- Li, M. H., Suchland, K. L., Ingram, S. L. (2015) GABAergic transmission and enhanced modulation by opioids and endocannabinoids in adult rat rostral ventromedial medulla. *Journal of Physiology*, vol. 593, no. 1, pp. 217–230. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.275701> (In English)

- Liu, D., Hu, S. W., Wang, D. et al. (2024) An ascending excitatory circuit from the dorsal raphe for sensory modulation of pain. *Journal of Neuroscience*, vol. 44, no. 4, article e0869232023. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0869-23.2023> (In English)
- Liu, X., He, J., Jiang, W. et al. (2023) The roles of periaqueductal gray and dorsal raphe nucleus dopaminergic systems in the mechanisms of thermal hypersensitivity and depression in mice. *Pain*, vol. 24, no. 7, pp. 1213–1228. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2023.02.004> (In English)
- Lu, Y., Westlund, K. N. (2001) Effects of baclofen on colon inflammation-induced Fos, CGRP and SP expression in spinal cord and brainstem. *Brain Research*, vol. 889, no. 1–2, pp. 118–130. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)03124-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)03124-3) (In English)
- Martins, I., Tavares, I. (2017) Reticular formation and pain: The past and the future. *Frontiers in Neuroanatomy*, vol. 5, article 11:51. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00051> (In English)
- Morris, G. P., Beck, P. L., Herridge, M. S. et al. (1989) Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, vol. 96, no. 3, pp. 795–803. PMID: 2914642 (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. San Diego: Academic Press, 237 p. (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, S., Zhang, C., Yue, F. et al. (2024) A midbrain GABAergic circuit constrains wakefulness in a mouse model of stress. *Nature Communications*, vol. 15, no. 1, article 2722. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46707-9> (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)
- Sanoja, R., Tortorici, V., Fernandez, C. et al. (2010) Role of RVM neurons in capsaicin-evoked visceral nociception and referred hyperalgesia. *European Journal of Pain*, vol. 14, no. 2, article 120.e1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2009.04.006> (In English)
- Sushkevich, B. M., Mikhalkin, A. A., Lyubashina, O. A. (2023a) Differentsirovannye reaktsii neyronov bol'shogo i dorsal'nogo yader shva krysy na vistseral'nye i somaticheskie bolevye signaly [Differential reactions of neurons in the rat raphe magnus and dorsal raphe nuclei to visceral and somatic pain signals]. *Integrativnaya fiziologiya — Integrative Physiology*, vol. 4, no. 3, pp. 312–323. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-3-312-323> (In Russian)
- Sushkevich, B. M., Sivachenko, I. B., Lyubashina, O. A. (2023b) Postcolitis alterations in nociceptive properties of neurons in the rat nucleus raphe magnus and dorsal raphe nucleus. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 59, no. 4, pp. 1057–1076. <https://doi.org/10.1134/S0022093023040051> (In English)
- Taylor, N. E., Pei, J., Zhang, J. et al. (2019) The role of glutamatergic and dopaminergic neurons in the periaqueductal gray/dorsal raphe: Separating analgesia and anxiety. *eNeuro*, vol. 6, no. 1, article 0018-18.2019. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0018-18.2019> (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)
- Wan, J., Ding, Y., Tahir, A. H. et al. (2017) Electroacupuncture attenuates visceral hypersensitivity by inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway in the descending pain modulation system. *Frontiers in Neuroscience*, vol. 11, article 644. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00644> (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)
- 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)
- Xie, L., Wu, H., Chen, Q. et al. (2022) Divergent modulation of pain and anxiety by GABAergic neurons in the ventrolateral periaqueductal gray and dorsal raphe. *Neuropsychopharmacology*, vol. 48, pp. 1509–1519. <https://doi.org/10.1038/s41386-022-01520-0> (In English)

- Yang, J., Yuan, H., Chu, J. et al. (2009) Arginine vasopressin antinociception in the rat nucleus raphe magnus is involved in the endogenous opiate peptide and serotonin system. *Peptides*, vol. 30, no. 7, pp. 1355–1361. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.03.014> (In English)
- Zhang, H. A., Sang, N., Ge, X. et al. (2018) Nesfatin-1 in the dorsal raphe nucleus influences visceral sensitivity via 5-HT neurons in male maternally separated rats. *Scientific Reports*, vol. 8, article 9334. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27592-x> (In English)
- Zhang, H., Li, L., Zhang, X. et al. (2024) Role of the dorsal raphe nucleus in pain processing. *Brain Sciences*, vol. 14, no. 10, article 982. <https://doi.org/10.3390/brainsci14100982> (In English)
- Zhang, M. M., Liu, S. B., Chen, T. et al. (2014) Effects of NB001 and gabapentin on irritable bowel syndrome-induced behavioral anxiety and spontaneous pain. *Molecular Brain*, vol. 7, article 47. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-7-47> (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)
- Zhou, Q., Price, D. D., Caudle, R. M., Verne, N. G. (2008) Visceral and somatic hypersensitivity in a subset of rats following TNBS-induced colitis. *Pain*, vol. 134, no. 1–2, pp. 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.03.029> (In English)