

اثر تزریق مرفین در ماده خاکستری دور قناتی بر روی نورون‌های هسته مشبک پاراژینگانتوسلولاریس پاسخ دهنده به فرمالین

نعمت الله غیبی* دکتر سعید سمنانیان** دکتر یعقوب فتح الهی***

The effect of morphine injection in the periaqueductal gray matter on the neuronal responsiveness of nucleus reticularis paragigantocellularis to formalin

N. Gheibi

S. Semnanian

Y. Fathollahi

Abstract

Background : Nucleus reticularis paragigantocellularis (PGi) has a very effective role in the supraspinal pain modulation. PGi as a rostroventromedial medulla (RVM) structure receives a major input from periaqueductal gray matter (PAG). Formalin as a peripheral noxious stimulus has biphasic nociception and behavioural manifestations.

Objective : To assess morphine injection in the periaqueductal gray matter (PAG) on the neuronal responsiveness of nucleus reticularis paragigantocellularis (PGi) to formalin.

Methods : The experimental subjects were male NMRI rats. Diluted formalin (2.5%) as a chemical noxious stimulus and morphine as an analgesic drug were used. Using single unit recording (an extracellular recording electrophysiologic method) the research was done.

Findings: Findings indicate that the responses of the PGi inhibitory neurons evoked by formalin were disinhibited by morphine microinjection in the PAG. In the excitatory neurons, morphine decreased the firing rate to the baseline activity.

Conclusion : PGi inhibitory neurons are affected by the PAG's GABAergic interneurons. Morphine blocks GABA released from these interneurons and results to off-cell disinhibition. On-cells suppressions are probably related to morphine effects directly.

Keywords: Single Unit Recording, PGi, PAG, Formalin, Morphine, Rat

چکیده

زمینه : هسته PGI در بصل النخاع شکمی - میانی (RVM) قرار گرفته است. یکی از ورودی‌های عمده به هسته مشبک پاراژینگانتوسلولاریس (PGi) از ماده خاکستری دور قناتی (PAG) منشأ می‌گیرد و فرمالین به عنوان یک محرک شیمیایی تولید درد را در دو فاز حاد و مزمن به دنبال دارد.

هدف: مطالعه به منظور ارزیابی اثر تزریق مرفین در ماده خاکستری دور قناتی بر روی نورون‌های هسته مشبک پاراژینگانتوسلولاریس پاسخ دهنده به فرمالین انجام شد.

مواد و روش‌ها: در آزمایش‌ها از موش‌های سفید صحرایی نر نژاد NMRI استفاده شد. فرمالین ۲/۵ درصد به عنوان محرک شیمیایی دردزا و مرفین سولفات به عنوان ماده القاء کننده بی‌دردی به کار رفت. این تحقیق به روش ثبت تک واحدی انجام شد.

یافته‌ها: با تزریق میکرونی مرفین در PAG مشاهده شد که نورون‌های مهار از مهار خارج شده و به حالت اولیه شلیک خود به خودی برگشتند. تزریق مرفین در نورون‌های تحریکی باعث کاهش شلیک تا رسیدن به حدود فعالیت پایه شد. اما تزریق مرفین در پاسخ نورون‌های خنثی هیچ تغییری را القاء نکرد.

نتیجه‌گیری: مرفین باعث رفع مهار از نورون‌های مهار می‌شود و این تأثیر احتمالاً به اینترنورون‌های گابانرژیک مهار با منشأ PAG مربوط می‌شود. اما اثر مرفین در کاهش شلیک نورون‌های تحریکی تا حد پایه به طور مستقیم صورت می‌گیرد.

کلید واژه‌ها: ثبت تک واحدی، پاراژینگانتوسلولاریس، ماده خاکستری دور قناتی، فرمالین، مرفین، موش سفید صحرایی

* دانشجوی دکتری بیوفیزیک و عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

** استاد فیزیولوژی دانشگاه تربیت مدرس

*** استادیار فیزیولوژی دانشگاه تربیت مدرس

□ مقدمه:

NRM در مکانیسم مهار نزولی مربوط به بی دردی که با اپیوئیدها فعال می شود یک مکانیسم همگرا را تشکیل می دهند. (۲۰)

دسته‌ای از نورون‌ها که اثر شبکه‌ای مهاری بر حس درد دارند *off-cell* ها هستند. بلافاصله قبل از رخ دادن بازتاب‌های مؤثر درد مانند مکانیسم *Tail Flick (TF)* ناشی از گرما، ترمز ناگهانی در شلیک این نورون‌ها اتفاق می افتد که بعد از کاربرد سیستمیک مرفین به طور پیوسته فعال می شوند. دومین دسته سلولی که در تشدید درد دخالت دارند، *on - cell* ها هستند. این نورون‌ها در هنگام *TF* افزایش ناگهانی فعالیت دارند ولی فعالیت آنها در پاسخ به مرفین کاهش می یابد و بی دردی را به دنبال دارد. (۱۱)

بیشترین احتمال و بهترین کاندید برای مهار یا تحریک نورون‌های هسته *PGi*، *PAG* است. احتمال می رود که اینترنورون‌های گاباثرژیک با منشأ *PAG* با تحریک ناشی از فرمالین و رهایش گابا پدیده مهار را به دنبال داشته باشند. لذا این مطالعه به منظور ارزیابی اثر تزریق مرفین در ماده خاکستری دور قناتی بر روی نورون‌های هسته مشبک پاراژینگانتوسلولاریس پاسخ دهنده به فرمالین انجام شد.

□ مواد و روش‌ها:

در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر نژاد *NMRI* استفاده شد. موش‌ها در دسته‌های پنج تایی تحت شرایط مناسب، درجه حرارت ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی - تاریکی ۱۲:۱۲

هسته مشبک پاراژینگانتوسلولاریس (*PGi*) به عنوان منطقه وسیعی از تشکیلات بصل النخاع شکمی - میانی (*RVM*) ابتدا در مغز انسان و سپس در موش به کمک رنگ آمیزی نیسل گزارش شده است. (۱۶و۱۵و۱۶) تجمع سلولی هسته رافه مگنوس (*NRM*) و *PGi* در کنترل فوق نخاعی حس درد نقش مهمی به عهده دارند. (۸) تحریک الکتریکی موضعی در *PAG* و *NRM* به طور وسیعی اثرات ضد درد را به دنبال دارد و این تحریک، نورون‌های حس درد را در شاخ خلفی نخاع مهار می نماید. (۲۱) *PAG* از طریق دسته‌های پشتی - طرفی (*DLF*) انشعاب مستقیمی به نخاع ندارد، بلکه به طور غیر مستقیم از طریق انشعاب به بخش جلویی - شکمی بصل النخاع (*RVM*) بر روی نورون‌های نخاعی تأثیر می‌گذارد. این بخش *NRM* و هسته‌های مشبک کناری آن یعنی *PGi* و هسته مشبک ژینگانتوسلولاریس (*Gi*) را شامل می‌شود و انشعاب‌های نزولی آن از طریق *DLF* به شاخ خلفی نخاع می‌رسند. (۶)

آزمون فرمالین به عنوان یک مدل معتبر درد کلینیکی توسط دایسون و دنیس (۱۹۷۱) طراحی شد و به دنبال آنها سایر دانشمندان به طور متفاوتی این مدل ارزیابی درد را به کار بردند. (۲۲و۲۵) دستگاه عصبی مرکزی در پستانداران قادر به واکنش به تحریک‌های درازا در سطوح متفاوت انتقال، تعدیل و احساس درد است. پپتیدهای اپیوئیدی درون زاد و گیرنده‌های آنها در نقاط کلیدی مسیرهای درد واقع شده‌اند و پاسخ به درد را می‌توان با کاربرد موضعی اپیوئیدها در برخی نواحی سیستم عصبی تعدیل نمود. (۱۲) *PGi*، *PAG* و

نگهداری شدند و آب و غذا به مقدار مناسب دریافت نمودند.

سپس حیوان‌ها را با تزریق درون صفاقی ۱/۳ گرم در کیلوگرم اورتان بی‌هوش نموده و پس از قرار دادن لوله پلی اتیلن در نای جهت تفکیک تنفس از دهان، در دستگاه استریوتاکیک تثبیت شدند. پوست پشت سر حیوان را شکافته و به کمک مته مجموعه در مختصات PGi (۹/۸- تا ۱۲/۷- میلی متر نسبت به برگما، ۱ تا ۲/۵ میلی متر جانبی نسبت به خط میانی) و PAG (۴/۸- تا ۶/۳- نسبت به برگما، صفر تا ۱ جانبی نسبت به خط میانی) مطابق اطلس پاکسینوس و واتسون برداشته شد.^(۱۸) برای تسهیل ورود الکتروود به مغز، بافت سخت شامه کنار زده شد. کانول راهنمایی به قطر ۰/۷ میلی متر تا حدود ۱/۵ میلی متر در قسمت برداشته شده در مختصات PAG بالاتر از موضع تزریق (۳/۵ میلی متر شکمی نسبت به سطح مجموعه) فرو برده شد و به کمک پیچ‌های ریز و سیمان دندان پزشکی بر روی مجموعه ثابت گردید.

ثابت خارج سلولی تک واحدی از نورون‌های PGi به کمک مجموعه‌ی مجهزی از دستگاه‌های الکترونیکی به روش زیر انجام گرفت. میکروالکترودهای شیشه‌ای (قطر ۲ تا ۴ میکرومتر، امپدانس ۲ تا ۱۲ مگا اهم) با محلول پونتامین اسکای بلو ۲ درصد و سدیم استات ۰/۵ مولار پر شدند و توسط دستگاه پیش برنده میکروالکتروود و به کمک میکروسکوپ تشریح به میزان ۹/۸ تا ۱۱/۱ میلی متر نسبت به سطح مجموعه در مغز حیوان فروبرده شدند. امواج گرفته شده توسط میکروالکتروود شیشه‌ای به کمک آمپلی فایر

تقویت و توسط اسیلوسکوپ نمایش داده شدند و صدای آنها توسط دستگاه تقویت و تصفیه صوت (*Audio monitor*) شنیده شد. با ایجاد پنجره مناسب توسط موج بیز (*Window discriminator*) امواج حاصل از یک نوع نورون از زمینه تفکیک و به برد مبدل آنالوگ به دیجیتال (*A/D*) وارد شدند. شمارش امواج توسط برنامه نرم افزاری *PSTH* با تبدیل داده‌های قیاسی به رقمی توسط برد مذکور انجام گرفت. دمای بدن حیوان توسط پتوی حرارتی در ۳۶/۵ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد کنترل شد. به طور کلی ۳۰ واحد نورونی در ۳۰ حیوان مورد مطالعه قرار گرفتند. تمام واحدهای نورونی مشاهده شده در این مطالعه دارای فعالیت خودبه خودی بودند که بعد از تفکیک هر نورون، فعالیت آن تا رسیدن به حالت پایه به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه بدون انجام ثبت ادامه یافت. ثبت فعالیت پایه نورون‌ها به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد، با تزریق ۵۰ میکرولیتر فرمالین رقیق شده به کف پنجه حیوان ثبت از همان نورون به مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت. از طریق کانول راهنما مرفین با غلظت ۰/۰۳۵ مولار و به میزان ۱۲۰ تا ۲۰۰ نانولیتتر به کمک سرنگ هامیلتون و لوله‌های پلی اتیلینی بسیار ظریف در PAG تزریق و بلافاصله ثبت عصبی از نورون مذکور به مدت ۳۰ دقیقه ادامه یافت.

موضع‌های ثبت شده در PGi با رسوب‌گذاری رنگ پونتامین اسکای بلو و بررسی آناتومیکی برش‌های مغز مشخص شدند.

دریافت و شمارش امواج، تغییر بازه‌های زمانی و محاسبه داده‌ها در برنامه نرم افزاری *PSTH* انجام شد.

فرمالین و فعالیت مرفین سطح معنی داری $P < 0/05$ و بین فعالیت پایه و فعالیت مرفین اختلاف معنی دار وجود نداشت.

نورون‌های تحریکی دارای میانگین فعالیت پایه $1/3 \pm 10/6$ بودند. تعداد آنها از کل نمونه‌ها ۶ واحد و پاسخ آنها به فرمالین یک پاسخ افزایشی بود که این پاسخ با تزریق مرفین کاهش می‌یافت. مقایسه بین میانگین فعالیت پایه، فعالیت در حین فرمالین و فعالیت در حین مرفین توسط روش آنالیز واریانس یک طرفه اختلاف آماری کلی را معنی دار نشان داد ($F(2, 15) = 6/058, P = 0/012$). در تکمیل تجزیه و تحلیل و کاربرد آزمون توکی بین فعالیت پایه و فعالیت در حین فرمالین سطح معنی داری $P < 0/05$ ، فعالیت فرمالین و فعالیت مرفین $P < 0/05$ و بین فعالیت مرفین و فعالیت پایه تفاوت آماری معنی داری مشاهده نشد.

در نورون‌های خنثی میانگین فعالیت پایه در حدود $2/25 \pm 13/67$ بود. تعداد آنها از کل نمونه‌ها ۹ واحد بود که هیچ‌گونه پاسخ تحریکی یا مهارتی از خود نشان ندادند. مقایسه بین میانگین فعالیت پایه، فعالیت در حین فرمالین و فعالیت در حین مرفین در این دسته اختلاف آماری معنی داری نشان‌نداد.

الگوی شلیک یک واحد نورونی از هرکدام از این سه دسته نورون و میانگین شلیک آنها به مدت ۷۵ دقیقه ترسیم شده است (مهارتی، شکل ۱-الف و ۱-ب؛ تحریکی، شکل ۲-الف و ۲-ب؛ خنثی، شکل ۳-الف و ۳-ب). مقایسه فعالیت مجموع نورون‌های هرکدام از این سه دسته نشان داده شده است (شکل ۴).

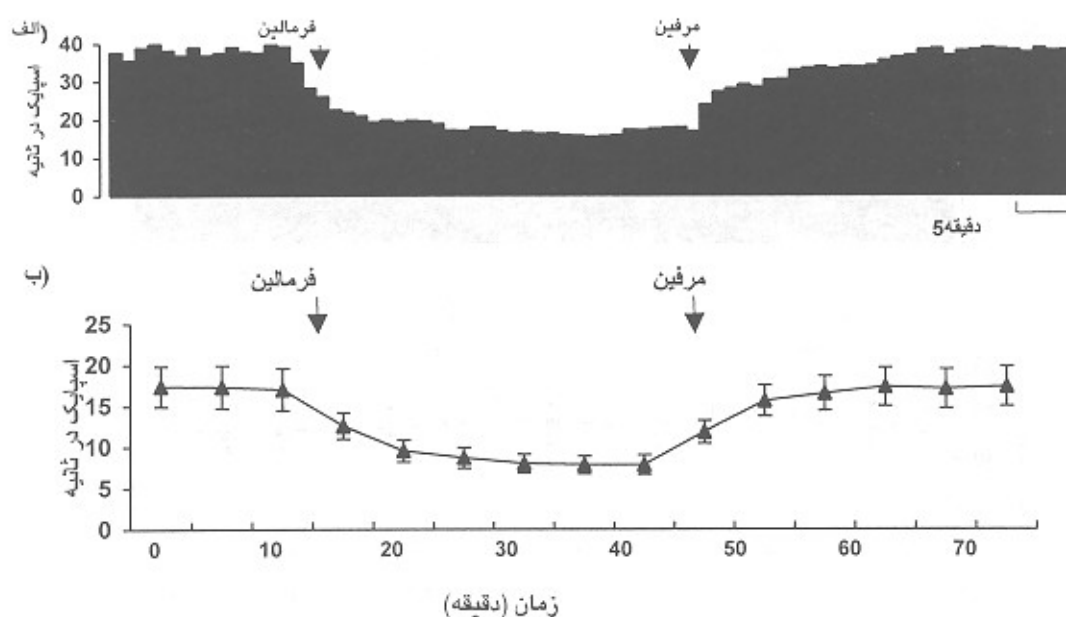
افزایش یا کاهش پاسخ دهی (تحریک و مهار) این‌گونه بیان شد که چنانچه میانگین شلیک بعد از تزریق محرک، پایین تر از میانگین شلیک قبل از تزریق منهای دو برابر خطای استاندارد بود ($Pre - 2SD$) نوع پاسخ مهارتی؛ چنانچه بیشتر از میانگین شلیک قبل از تزریق به اضافه دو برابر خطای استاندارد بود ($Pre + 2SD$) نوع پاسخ تحریکی و بین این دو محدوده پاسخ بدون تغییر در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و مقایسه چندگانه بین فعالیت پایه، فعالیت در حین فرمالین و فعالیت در حین مرفین توسط آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه و توکی انجام شد.

□ یافته‌ها :

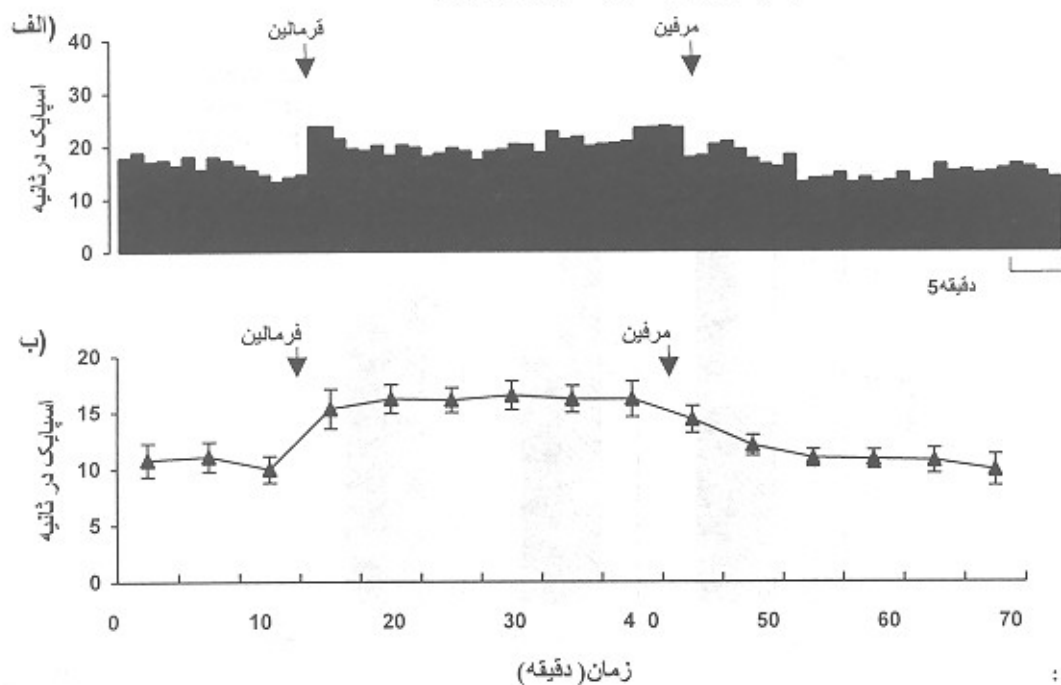
در پاسخ به فرمالین سه دسته مجزای نورونی تفکیک شدند. واحد فعالیت نورونی اسپایک در ثانیه در نظر گرفته شد. نورون‌های مهارتی اکثراً دارای میانگین فعالیت پایه بالا در حد $2/25 \pm 17/25$ بودند. تعداد آنها از کل نمونه‌ها ۱۵ واحد و نوع پاسخ آنها به فرمالین کاهش بود که با تزریق مرفین در حین فرمالین پاسخ آنها افزایش یافت. مقایسه بین میانگین فعالیت پایه و فعالیت در حین فرمالین و سپس در حین مرفین توسط آزمون آنالیز واریانس یک طرفه اختلاف آماری کلی را معنی دار نشان داد ($F(2, 42) = 4/630, P = 0/015$).

در تکمیل تجزیه و تحلیل و استفاده از آزمون توکی برای مقایسه چندگانه بین فعالیت پایه و فعالیت فرمالین سطح معنی داری $P < 0/05$ بین فعالیت



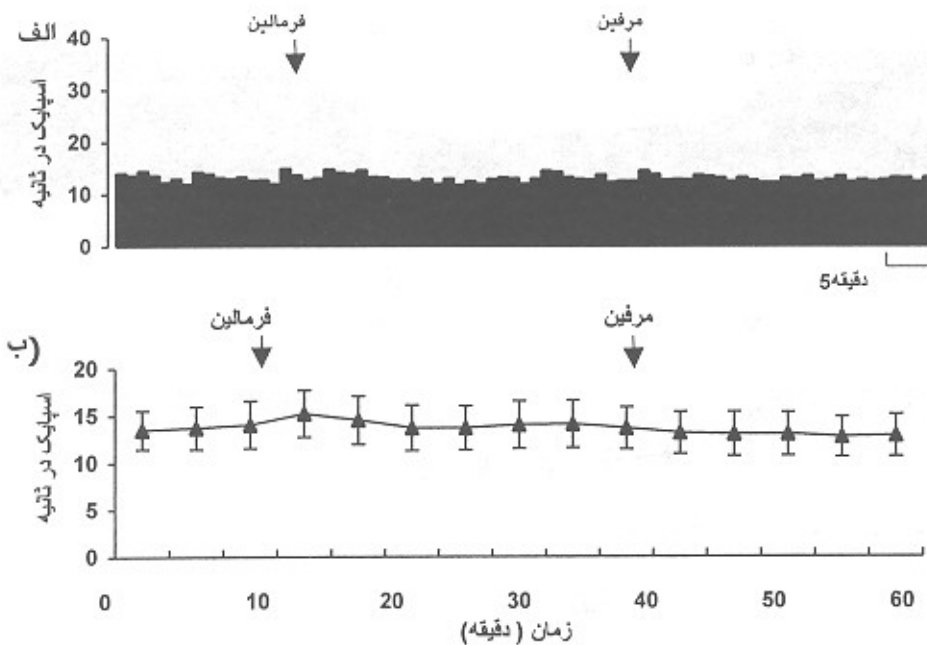
شکل ۱:

الگوی شلیک در نورون‌های مهارتی: الف - شلیک یک نمونه از این نورون‌ها در ۱۵ دقیقه فعالیت پایه، ۳۰ دقیقه بعد از تزریق فرمالین و ۳۰ دقیقه بعد از تزریق مرفین نشان داده شده است. ب - میانگین شلیک این دسته نورون در شرایط فوق در مجموع برای ۱۵ واحد نورونی ترسیم شده است.



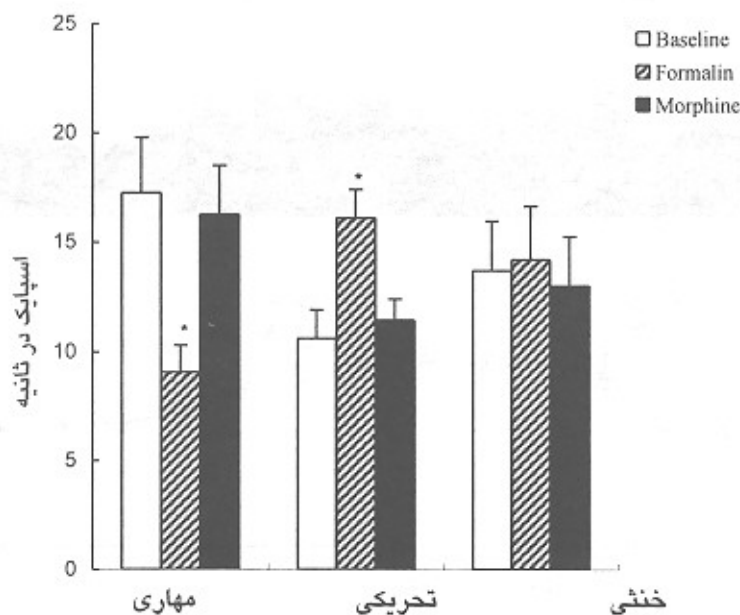
شکل ۲:

الگوی شلیک در نورون‌های تحریکی: الف - شلیک یک نمونه در شرایط فعالیت پایه، بعد از تزریق فرمالین و بعد از تزریق مرفین؛ ب - میانگین شلیک این دسته نورون در شرایط فوق در مجموع برای ۶ واحد نورونی ترسیم شده است.



شکل ۳:

الگوی شلیک در نوروں‌های خنثی: الف - شلیک یک نمونه از این نوروں‌ها در شرایط فعالیت پایه، بعد از تزریق فرمالین و بعد از تزریق مرفین؛ ب - میانگین شلیک این دسته نوروں در شرایط فوق در مجموع برای ۹ واحد نوروںی ترسیم شده است.



شکل ۴:

مقایسه میانگین کلی شلیک در سه دسته نوروں مهاری، تحریکی و خنثی. میزان شلیک در شرایط فعالیت پایه، بعد از تزریق فرمالین و بعد از تزریق مرفین بر حسب اسپایک در ثانیه نشان داده شده است. $P < 0.05$ *

۹ بحث و نتیجه‌گیری :

در این پژوهش با تزریق میکرونی مرفین در PAG در حین تأثیر فرمالین و ثبت تک واحدی از PGI سه دسته نورون مهاری، تحریکی و خنثی تشخیص داده شد.

استفاده از فرمالین رقیق شده به عنوان یک محرک دردزا مطالعات رفتاری و الکتروفیزیولوژیک وسیعی را به خود اختصاص داده است. این محرک اثر دردزایی خود را در دو فاز نشان می‌دهد: فاز اول یا فاز حاد بلافاصله بعد از تزریق فرمالین شروع می‌شود و به مدت ۵ دقیقه ادامه می‌یابد؛ دومین فاز ۱۰ تا ۱۵ دقیقه بعد از تزریق آغاز می‌شود و تا حدود یک ساعت تداوم پیدا می‌کند. فاز اول ممکن است نتیجه تحریک مستقیم گیرنده‌های حس درد در پا باشد، اما دومین فاز تا حدی به حساس شدن نورون‌های سیستم مرکزی حس درد مربوط می‌شود و یک فاز مزمن را نشان می‌دهد. از آنجا که این ماده فرآیندهای التهابی و تشدید درد را به همراه دارد، به عنوان مدل معتبری از درد کلینیکی شناخته شده است. (۴)

مرفین اولین اپیوئید طبیعی است که خصوصیاتش شناسایی شد. رسپتورهای μ تمایل فراوانی برای پیوند با مرفین و آلکالوئیدهای مربوطه دارند، چنین پیوندی در نواحی مختلف مغزی از جمله PAG گزارش شده است. (۹)

شواهد آناتومیکی نشان می‌دهند که PGI ورودی‌های عمده‌ای از بخش‌های پشتی و شکمی - جانبی PAG دریافت می‌نماید. (۲۳) این ورودی‌ها در مهار درد دخالت دارند و سیستم مهار درد درون زاد نزولی با منشأ PAG به طور مداوم فعال است که بلوکه نمودن آن باعث رفع مهار و تشدید درد می‌شود. (۲۰)

دو نوع سلول به تحریک آسیب رسان اعمال شده در هرکجای سطح بدن پاسخ می‌دهند، *off-cell* ها مهار شده و *on-cell* ها تحریک می‌شوند. (۱۳) مطالعات قبلی ما نیز وجود سه دسته نورون تحریکی، مهاری و خنثی در PGI در پاسخ به تزریق محیطی فرمالین را نشان داد. (۱) این نورون‌ها به ترتیب مشابه *on-cell* ها، *off-cell* ها و نورون‌های خنثی هستند که توسط سایر محققین در RVM گزارش شده‌اند. (۷)

بسیار و فیلدز با مطالعات الکتروفیزیولوژیک خود ارتباط PAG و PGI با NRM و جمعیت‌های سلولی آن را به خوبی مشخص نمودند. طبق بیان آنها *off-cell* ها و *on-cell* های تشکیل دهنده هسته NRM در اثرات بی‌دردی اپیوئیدها مؤثر هستند. (۳) این نوع نورون‌های *off* و *on* در PAG نیز گزارش شده‌اند. (۱۹) به علاوه، تزریق میکرونی مرفین به PAG فعالیت نورونی ۵۰ درصد از واحدهای نورونی تشکیلات مشبک بصل النخاع (MRF; شامل Gi و PGI) را افزایش و فعالیت ۱۷ درصد را کاهش می‌دهد. (۱۴) با توجه به این که مهار *off-cell* ها توسط گابا صورت می‌گیرد، و آنستاگونیست‌های گابا آنها را فعال می‌نمایند، (۱۰) به نظر می‌رسد نورون‌های حد واسطی که از خارج PGI یعنی PAG منشأ می‌گیرند، تحت تأثیر فرمالین رهایش گابا و مهار *off-cell* ها را در PGI به دنبال دارند، اما تزریق میکرونی مرفین در PAG رهایش گابا را بلوکه می‌نماید و منجر به رفع مهار و افزایش فعالیت *off-cell* ها می‌شود.

هینریچر و همکاران نشان دادند که کاربرد سیستمیک مرفین حداقل با دو جزء سلولی در RVM درگیر است، یکی مهار مستقیم *on-cell* ها و دیگری

5. Dubuisson D, Dennis SG. *The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brainstem stimulation in rats and cats. Pain 1977; 4: 161-74*
6. Fields HL, Heinricher MM. *Brainstem modulation of nociceptor- driven withdrawal reflexes. Annuals of the New York Academy of Science, 1989, 34-44*
7. Fields HL, Vanagas H, Hental ID, Zorman G. *Evidence that disinhibition of brainstem neurons contributes to morphine analgesia Nature 1983;306: 684-6*
8. Gebhart GF. *Opiate and opioid peptide effects on brainstem neurons: relevance to nociceptor and antinociceptor mechanisms. Pain 1982; 12: 93-140*
9. Gouarderes C, Cros J, Quirion R. *Autoradiographic localization of mu, delta and kappa opioid receptor binding sites in rat and guinea pig spinal cord. Neuropeptides 1985; 6(4): 331-42*
10. Heinricher MM, Haws CM, Fields HL. *Evidence for GABA-mediated control of putative nociceptive modulating neurons in the rostral ventromedial medulla: iontophoresis of bicuculline eliminates the off-cell pause. Somatosens Mot Res, 1991; 8: 215-25*
11. Heinricher MM, Morgan MM, Fields HL. *Direct and indirect actions of morphine on medullary neurons that modulate nociception.*

فعال سازی غیر مستقیم off-cell ها^(۱۱) از طرفی کاربرد بیکوکولین در PAG نیز شلیک off-cell ها را در RVM افزایش می دهد.^(۱۷)

خلاصه این که با توجه به یافته‌ها مهار ناشی از تزریق محیطی فرمالین در نورون‌های مشابه off-cell در PGI احتمالاً با بلوکه شدن رهایش گابا از نورون‌های حدواسط گاباثرژیک با منشأ PAG توسط مرفین برداشته می شود، اما کاهش فعالیت نورون‌های مشابه on-cell احتمالاً به تحریک مستقیم آنها توسط مرفین مربوط می شود.

▣ مراجع:

- ۱- غیبی نعمت الله، سمنانیان سعید، فتح الهی یعقوب. بررسی اثرات فرمالین بر روی نورون‌های هسته مشبک پارازیگانتوسولولاریس در موش های هایپرترمیک به روش ثبت تک واحدی. مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی، بهار و تابستان ۱۳۸۰، جلد ۵، شماره ۱، ۶۷-۷۴
2. Andrezic J A, Chan play V, Palay SL. *The nucleus paragigantocellularis lateralis in the rat: conformation and cytology. Anat Embryo 1981; 161: 355-72*
3. Basbaum AI, Fields HL. *Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. Ann Rev Neuroscience 1984; 7: 309-38*
4. Coderre TJ, Melzack R. *The contribution of excitatory amino-acids to central sensitization and persistent nociception after formalin induced tissue injury. J Neuroscience 1992; 121:3665-70*

- Neuroscience* 1992; 48(3): 533-43
12. Kanjhan R. Opioids and pain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; 22(6-7): 397-403
13. Mason P, Skinner K, Cho HJ, Basbaum AI, Fields HL. Anatomical evidence for GABAergic control of physiologically identified off - cells in the rostral ventromedial medulla. In: MR Bond, JE Charton, CJ Woolf, Eds. *Proceedings of the 5th world congress on pain, 1991*
14. Mohrland JS, Gebhart GF. Effects of focal electrical stimulation and morphine microinjection in the periaqueductal gray of the rat mesencephalon on neuronal activity in the medullary reticular formation. *Brain Res* 1980; 201(1): 23-27
15. Newman DB. Distinguishing rat brainstem reticulospinal nuclei by their neuronal morphology I Medullary nuclei. *J Hirnforsch* 1985; 187-226
16. Olzewski J, Baxter D. *Cytoarchitecture of the Human Brain stem*. Baset, Karger, 1954
17. Pan ZZ, Fields HL. Endogenous opioid - mediated inhibition of putative pain - modulating neurons in rat rostral ventromedial medulla. *Neuroscience* 1996; 74(3): 855-62
18. Paxinos G, Watson C. *The rat brain stereotaxic coordinates*. New York, Academic press, 1985
19. Rosenfeld JP, Xia LY. Lack of effect of tetracaine in rat nucleus paragigantocellularis (PGi) met- enkephalin (ME) injection in raphe magnus- blocking doses and on baseline tail - flick latency. *J Neuroscience* 1993; 1-15
20. Rosenfeld JP. Interacting brainstem components of opiate-activated, descending, pain-inhibitory systems. *Neurosci Biobehav Rev* 1984; 18(4): 83-9
21. Sandkuler JS, Gebhart GF. Characterization of inhibition of a Spinal nociceptive reflex by stimulation medially and Laterally in the midbrain and medulla in the pentobarbital - anesthetized rat. *Brain Res* 1984; 305: 67-76
22. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51: 5-17
23. Van Bockstaele EJ, Akoka H, Aston- Jones G. Brainstem afferents to the rostral (juxtafacial) nucleus paragigantocellularis: integration of exteroceptive and interoceptive sensory inputs in the ventral tegmentum. *Brain Res* 1993; 603: 1-18