

بررسی اثرات فرمالین بر روی نوروهای هسته مشبک پارازیگانتوسلولاریس در موش های هایپرترمیک به روش ثبت تک واحدی

نعمت ... غیبی^۱، سعید سمنایان^۱، یعقوب فتح الهی^۲

۱- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی قزوین، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و فیزیکی پزشکی

۲- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

چکیده

هسته مشبک پارازیگانتوسلولاریس (PGi) بخش وسیعی از تشکیلات پل - بصل النخاع شکمی را در بر می گیرد. این هسته ناهمگونی خاصی در عملکرد و سیتولوژی دارد. مطالعه کنونی بر روی موش صحرایی نر در حالت بیهوشی به کمک یکی از روش های الکتروفیزیولوژیک ثبت خارج سلولی یعنی ثبت تک واحدی (Single unit) صورت گرفته است. برای اطلاع کافی از نحوه عمل، میزان شلیک و دامنه فعالیت نورون ها در این هسته، ابتدا در ۳۶ حیوان از ۵۰ نورون بمدت ۶۰ تا ۱۸۰ دقیقه ثبت پایه گرفته شد. میزان شلیک آنها ۱ تا ۳۷ اسپایک در ثانیه مشاهده شد. در ۲۵ حیوان دیگر در هر نورون پس از ۱۵ دقیقه ثبت پایه، دمای بدن حیوان بیهوش از $35/0 \pm 0/1$ به $37/5 \pm 0/1$ درجه سانتیگراد افزایش می یافت و در شرایط هایپرترمی نیز ثبت به مدت ۳۰ دقیقه انجام میکرفت، ۵۰ میکروولتر فرمالین ۵/۲ درصد به کف پنجه حیوان هایپرترمیک تزریق و ثبت از همان نورون به مدت یک ساعت دیگر ادامه می یافت. مطالعه قبلی ما بر روی ۳۱ حیوان با تزریق محرک دردزای فرمالین وجود سه دسته نورون مهارتی ($4/48/4$)، تحریکی ($3/19/3$) و بدون تغییر ($3/32/3$) را در PGi نشان داد. در مطالعه کنونی با تزریق فرمالین در شرایط هایپرترمی دو دسته نورون تحریکی ($4/44$) و بدون تغییر ($5/6$) مشاهده میشوند. احتمال می رود رهائش واسطه هایی که مهار دسته سوم در پاسخ به فرمالین را بدنبال داشته اند با القاء هایپرترمی بنحوی بلوکه شده باشد، از طرفی افزایش فراوانی نوروهای تحریکی در شرایط هایپرترمی نیز در فرآیند تشدید درد واسطه های التهابی قابل تأمل است.

واژه های کلیدی: هسته مشبک پارازیگانتوسلولاریس، هایپرترمی، فرمالین، ثبت تک واحدی.

مقدمه

هسته مشبک پارازیگانتوسلولاریس (PGi) بعنوان منطقه وسیعی از تشکیلات پل - بصل النخاع شکمی - میانی (RVM) ابتدا در مغز انسان [۲۷] و سپس موش [۴] و [۲۶] به کمک رنگ آمیزی نیسل گزارش شده است. نوروهای PGi در عملکردهای متفاوتی از جمله تنظیم قلبی - عروقی [۱۲ و ۳۳]، کنترل تنفسی [۱۷]، درد و

با منشأ درونی عمل می کند [۲۵]. دردهای عضلانی و سایر دردهای ایجاد شده در فرآیند تب این فرضیه را تأیید می نماید که پیروژن های با منشأ درونی یا بیرونی پاسخهای دردناکی را افزایش می دهند [۳۴].

هدف از مطالعه کنونی بررسی پاسخ نوروئیدهای PGI به فرمالین در حین هایپرترمیا و اینکه آیا اثرات التهابی ناشی از این فرآیند در نوع پاسخ نوروئیدها مؤثر است یا خیر؟

مواد و روش ها

حیوانات مورد آزمایش: از موشهای صحرایی نر نژاد NMRI مؤسسه رازی با وزن ۴۰۰-۲۵۰ گرم در آزمایشها استفاده شد. حیوانات بصورت دسته های پنج تایی در قفس تحت شرایط حرارت مناسب ۲۴-۲۲ درجه سانتیگراد و چرخه روشنایی - تاریکی ۱۲:۱۲ نگهداری شده و آب و غذا به مقدار مناسب دریافت نمودند.

آماده نمودن حیوان برای ثبت: حیوانات را با تزریق درون صفاقی اورتان (۱/۳ g/Kg) بیهوش نموده و پس از قراردادن لوله پلی اتیلنی در نای جهت تفکیک تنفس از دهان، در دستگاه استریوتاکسیک تثبیت شدند. با تزریق اورتان بعنوان تقویت، بیهوشی تداوم یافت. پوست پشت سر حیوان را شکافته و به کمک مته جمجمه در مختصات PGI (۱۱/۸- میلی متر نسبت به برگما، ۱/۷-۱/۶ جانبی نسبت به خط میانی، مطابق اطلس پاکسینوس و واتسون [۲۸] سوراخ و برای تسهیل ورود الکتروود به مغز بافت سخت شامه کنار زده شد.

ثبت عصبی: ثبت خارج سلولی تک واحدی از نوروئیدهای PGI به کمک میکروالکترودهای شیشه ای (قطر ۲-۴ میکرومتر، امپدانس ۱۲-۲ مگا اهم) انجام شد. میکروالکترودها با محلول پوتاسیم اسکای بلو ۲/۵ درصد و سدیم استات ۰/۵ مولار پر شده و توسط دستگاه پیش

بیدردی [۶ و ۳۱] و هوشیاری [۵] دخیل می باشند. تجملات سلولی هسته رافه مگنوس (NRM) و PGI در کنترل فوق نخاعی حس درد نقش مهمی بعهده دارند [۱۹]. ماده خاکستری دورآبراهه ای (PAG) بخش دیگری است که در این عملکرد دخیل می باشد و تشکیلات RVM ورودیهای عمده ای از آن دریافت می نمایند [۲ و ۷ و ۸]. استفاده از فرمالین رقیق شده بعنوان یک محرک دردزا مطالعات رفتاری و الکتروفیزیولوژی وسیعی را به خود اختصاص داده است [۱۴، ۱۵، ۲۹ و ۳۰]. این محرک اثر دردزایی خود را در دو فاز نشان میدهد: فاز اول یا فاز حاد بلافاصله بعد از تزریق فرمالین شروع شده و بمدت ۵ دقیقه ادامه می یابد، دومین فاز ۱۵-۱۰ دقیقه بعد از تزریق فرمالین آغاز میشود و تا حدود یک ساعت تداوم پیدا می کند، فاز اول ممکن است نتیجه مستقیم تحریک گیرنده های حس درد در پا باشد، اما دومین فاز تا حدی به حساس شدن نوروئیدهای سیستم مرکزی حس درد مربوط می شود و یک فاز مزمن را نشان می دهد، از آنجا که این ماده فرایندهای التهابی و تشدید درد را به همراه دارد [۳، ۱۰ و ۱۲]، بعنوان مدل معتبری از درد کلینیکی شناخته شده است [۱۱-۱۰]. فرمالین چرخه درد از طناب نخاعی به مغز و بالعکس رافعال می نماید [۳۶]. این محرک شیمیایی با صدمه زدن به بافت و التهاب و حساس شدن سیستم مرکزی، درد مزمنی را بدنبال دارد [۱۳].

برخی مطالعات نشان داده اند که بصل النخاع شکمی -کناری در فرآیندهای تنظیم حرارت [۲۱] و تحریکات حرارتی مغز [۲۴] دخیل می باشد. در موشهای هایپرترمیک با تحریک بخش جلویی زیتون تحتانی (IO) که از PGI کناری تا بخشی از نیمه دمی هسته صورتی گسترش می یابد، درجه حرارت پوست دم و پا تغییر می یابد [۲۰]. هایپرترمیا القاء شده توسط استرس ها با واسطه تب زاهای

Archive of SID

شکافتن سینه و پرفیوژن محلول سالین و سپس فرمالین ده درصد به قلب، مغز تثبیت شد. با خارج نمودن مغز از جمجمه و انتقال به فرمالین ده درصد تثبیت ثانویه صورت گرفت. سپس باتهییه برشهای ۸۰ تا ۱۰۰ میکرونی از مغزهای تثبیت شده بررسی آناتومیکی مکان ثبت انجام شد. جمع آوری داده ها: در برنامه PSTH دریافت و شمارش اسپایک ها، تغییر بازه های زمانی و محاسبه داده ها انجام می شد. میزان تخلیه نورونی بصورت میانگین نسبی شلیک و بر حسب اسپایک در ثانیه گزارش شده است. شاخص تعریف شده بعنوان درصد پاسخ نورونی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شده است:

$$RES(\%) = (\text{Postinjection} - \text{Preinjection} / \text{Preinjection}) \times 100$$

در اینجا افزایش یا کاهش پاسخ دهی (تحریک و مهار) بدین شرح بیان می شود که، چنانچه میانگین شلیک بعد از تزریق محرک، پایین تر از میانگین شلیک قبل از تزریق منهای دو برابر خطای استاندارد باشد (Pre.- 2SD) نوع پاسخ مهاری، چنانچه بیشتر از (Pre.+ 2SD) نوع پاسخ تحریکی و بین این دو محدوده پاسخ بدون تغییر می باشد. تجزیه و تحلیل آماری داده ها و مقایسات چندگانه بین فعالیت پایه، شرایط هایپرترمیا و تزریق فرمالین در حین هایپرترمیا توسط آزمون ANOVA و آزمون Tukey انجام گرفته است.

نتایج

به طور کلی ۷۵ واحد نورونی در ۶۱ حیوان مطالعه شده است.

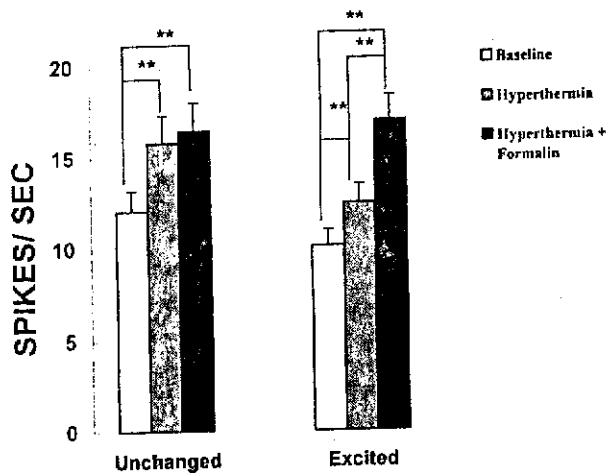
فعالیت پایه نورونهای PGI: فعالیت پایه ۵۰ واحد نورونی در ۳۶ حیوان بمدت یک تا سه ساعت ثبت شده است. تخلیه خود بخودی این نورونها به میزان ۱-۳۷

برنده میکروالکتروود و میکروسکوپ تشریح به میزان ۸/۷ - ۸/۵ میلیمتر نسبت به سخت شامه در مغز حیوان فرو برده شدند. اسپایک های گرفته شده توسط میکروالکتروود شیشه ای بکمک آمپلی فایر تقویت و توسط نوسان نگار کاتدی (CRT) نمایش داده شدند و صدای آنها توسط دستگاه تقویت و تصفیه صوت (Audio monitor) شنیده شد. با ایجاد پنجره مناسب توسط موج نیز (window discriminator) اسپایک های حاصل از یک نوع نورون از زمینه تفکیک و به برد مبدل آنالوگ به دیجیتال (A/D) وارد شدند، با تبدیل داده های قیاسی به رقمی توسط برد مذکور شمارش اسپایک ها توسط برنامه نرم افزاری PSTH صورت گرفت. دمای بدن حیوان توسط پتوی حرارتی در ۳۶ - ۳۵/۵ درجه سانتیگراد کنترل شد. تمام واحدهای نورونی مشاهده شده در این مطالعه دارای فعالیت خودبخودی بود که بعد از تفکیک هر نورون فعالیت آن برای رسیدن به حالت پایه بمدت ۳۰ - ۲۰ دقیقه بدون انجام ثبت ادامه یافت. ثبت از فعالیت پایه نورونها بمدت ۶۰ تا ۱۸۰ دقیقه انجام گرفت. در موشهای هایپرترمیک پس از رسیدن هر نورون به فعالیت پایه ۱۵ دقیقه ثبت انجام داده، سپس بکمک پتوی حرارتی درجه حرارت بدن حیوان تا 38.5 ± 0.1 درجه سانتیگراد افزایش یافت. کنترل درجه حرارت بصورت رکناال صورت گرفت. نورون بمدت ۳۰ دقیقه در شرایط هایپرترمیا به فعالیت خود ادامه داد. بعد از این زمان بلافاصله ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد را به کف پنجه حیوان هایپرترمیک تزریق و تا یک ساعت بعد ثبت از همان نورون ادامه یافت.

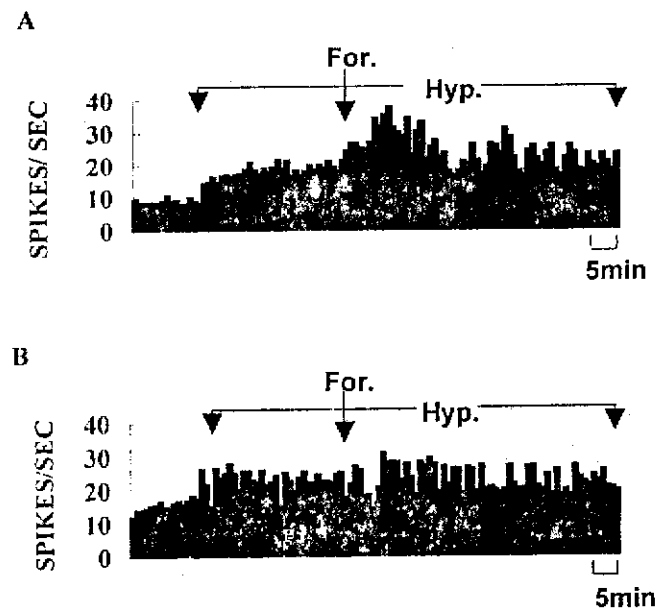
مطالعه بافت شناسی: موضع های ثبت شده در PGI با رسوبگذاری رنگ پونتامین اسکای بلو مشخص شدند. بعد از انجام ثبت، حیوان را بطور عمیق بیهوش نموده و پس از

مرحله در ۲۵ حیوان (۲۵ نورون) انجام گرفته است. برای هر نورون سه مرحله فعالیت با شرایط زیر بررسی شده است: ۱- فعالیت پایه ۲- فعالیت در شرایط هایپرترمیا و ۳- فعالیت نورون بعد از تزریق فرمالین در حین هایپرترمیا. تجزیه و تحلیل آماری وجود دو نوع پاسخ تحریکی (۱۱ نورون) و بدون تغییر (۱۴ نورون) را نشان می‌دهد. در تمام نورون‌های مورد بررسی میزان شلیک در شرایط هایپرترمیا بطور معنی داری افزایش پیدا می‌کند. در نورون‌های تحریکی اختلاف آماری کلی معنی دار بود [F(2,20)=43.223, P<0.0001]. در تکمیل تجزیه و تحلیل و انجام آزمون Tukey اختلافات بین شاخص‌های

اسپایک در ثانیه مشاهده شده است. میانگین کلی شلیک نورون‌های ثبت شده $12 \pm 1/27$ (Mean \pm S.E.M) و این میانگین شلیک به مدت ۱۲۰ دقیقه در (شکل ۱) ترسیم شده است. شکل موج این نورون‌ها ناهمگون می‌باشد که اکثریت (۶۰ درصد) شکل موج منفی با دامنه ۵۰-۱۲۰ میکروولت دارا می‌باشند. سایر اشکال دو فازی بوده که بایک فاز منفی ۴۰-۷۰ میکروولت شروع و با فاز ثانویه مثبت دارای دامنه ۲۵۰-۵۰ میکروولت خاتمه می‌یابند. در بخش خلفی PGI نورون‌های دارای تخلیه ریتمیک مربوط به تنفس مشاهده شدند، این نورون‌ها هنگام دم خاموش و با بازدم فعال می‌شدند.

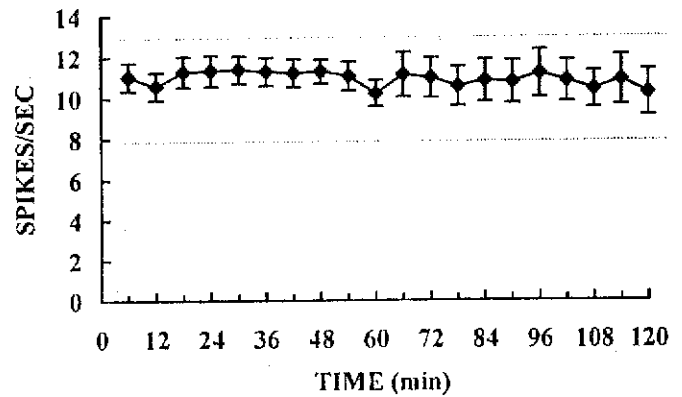
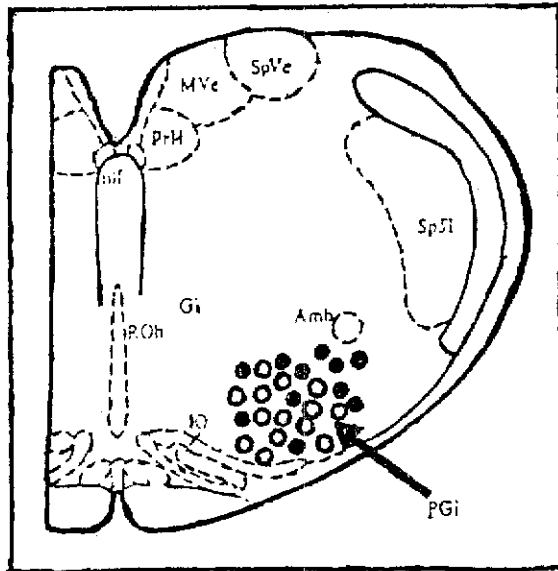


شکل ۲- مقایسه میانگین کلی شلیک در دو دسته نورون بدون تغییر (Unchanged) و تحریکی (Excited) در شرایط پایه (Base.)، هایپرترمیا (Hyp.) و تزریق فرمالین در حین هایپرترمیا (Hyp.+For.) و وجود اختلاف آماری در سطح $P<0.001$ بین این سه شاخص نشان داده شده است. چنانچه مشاهده می‌شود در دسته بدون تغییر بین فعالیت در شرایط هایپرترمیا و تزریق فرمالین در حین هایپرترمیا تفاوت آماری معنی داری وجود ندارد.



شکل ۱- نمودار میانگین شلیک پایه $12 \pm 1/27$ (Mean \pm S.E.M) در ۵۰ نورون PGI به مدت ۱۲۰ دقیقه نشان داده شده است. میانگین شلیک بر حسب اسپایک در ثانیه بیان شده است.

ثبت تک واحدی در گروه هایپرترمیک: آزمایشات این



شکل ۴- تایید بافت شناسی مکان ثبت دو دسته نورون تحریکی (دوایر توپر، $n=11$) و بدون تغییر (دوایر توخالی، $n=14$) در برش مقطعی PGI نشان داده شده است.

شکل ۳- تایید بافت شناسی مکان ثبت دو دسته نورون تحریکی و بدون تغییر به ترتیب در اشکال A-۳ و B-۳ بعنوان نمونه ترسیم شده‌اند. مکان های ثبت به کمک مطالعات بافت شناسی مشخص و در شکل ۴ نشان داده شده‌اند.

بحث

یافته های ما در مورد فعالیت خودبخودی نورونهای PGI با مطالعات Ennis و Aston-Jones (1987) در این هسته موافق و تکمیل کننده می باشد [۱۶]. این نورونها اشکال موجی ناهمگونی دارا بوده که اکثریت دارای شکل موج منفی (۶۰ درصد) و بقیه دو فازی میباشند. تحقیقات قبلی نیز نورونهای PGI را هم از نظر مرفولوژی [۴] و هم از نظر شکل موج و سرعت شلیک [۱۶] متفاوت نشان داده‌است. شواهد فوق الذکر اطلاعات جامعی از نحوه شلیک پایه نورونهای PGI به ما داد.

شکل ۳- دو نمونه از الگوی شلیک نورون های تحریکی و بدون تغییر برای ۱۵ دقیقه فعالیت پایه، ۳۰ دقیقه فعالیت در شرایط هایپرترمیا و ۶۰ دقیقه فعالیت بعد از تزریق فرمالین در حین هایپرترمیا نشان داده شده است. هایپرترمیا فعالیت هر دو دسته نورون را افزایش می دهد، اما فقط نورون های تحریکی به فرمالین پاسخ می‌دهند.

تعریف شده فوق بشرح زیر معنی دار بود. ۱- بین فعالیت پایه و هایپرترمیا ($P < 0.01$) ۲- بین فعالیت پایه و فرمالین در حین هایپرترمیا ($P < 0.01$) و ۳- بین هایپرترمیا و فرمالین در حین هایپرترمیا ($P < 0.01$). در دسته دوم یعنی نورونهای بدون تغییر نیز اختلاف آماری کلی معنی دار بود [F(2,30)=7.616, $P < 0.01$]. اما آزمون تکمیل کننده Tukey اختلاف بین شاخص ها را بشرح زیر نشان داد:

۱- بین فعالیت پایه و هایپرترمیا. ($P < 0.01$) ۲- بین فعالیت پایه و فرمالین در حین هایپرترمیا ($P < 0.01$). در این نورونها بین شرایط هایپرترمیا و تزریق فرمالین در حین هایپرترمیا اختلاف آماری معنی داری مشاهده نشد. مقایسه میانگین شلیک نورونهای مذکور در شرایط متفاوت در شکل ۲ نشان داده شده است. دو الگوی شلیک از

Archive of SID

شده توسط حرارت شلیک شان افزایش می‌یابد، off_cell ها دچار توقف یا کاهش شلیک می‌شوند و نورونهای خنثی که تغییر نمی‌یابند [۱۸]. در مطالعه قبلی ما نیز در پاسخ به محرک دردزای فرمالین سه دسته نورون تحریکی (۱۹/۳٪)، مهارتی (۴/۸۸٪) و بدون تغییر (۳۲/۳٪) از مجموع ۳۱ نورون در PGI تشخیص داده شدند، این نورونها به ترتیب مشابه on_cell ها، off_cell ها و نورونهای خنثی ذکر شده در بالا می‌باشند [۱]. در مطالعه کنونی با تزریق فرمالین در حین هایپرترمیا نورونهای تحریکی ۴۴ درصد و نورونهای بدون تغییر ۵۶ درصد از کل ۲۵ نورون بررسی شده را شامل می‌شوند. عدم مشاهده نورونهای مهارتی ممکن است به واسطه های التهابی مربوط شود، که احتمالاً رهایش آنها در شرایط هایپرترمیا منجر به رفع مهار از off_cell ها می‌شود.

شواهد آناتومیکی نشان می‌دهند که PGI

ورودی‌های عمده‌ای از بخشهای پشتی و شکمی - کناری PAG دریافت می‌نماید [۳۷]. این ورودیها در مهار درد دخیل می‌باشند و سیستم مهار درد درون زای نزولی با منشأ احتمالی PAG بطور مداوم فعال می‌باشد که بلوکه نمودن آن باعث رفع مهار و در نتیجه تشدید درد میشود [۳۲]. پس PAG یکی از بهترین کاندیداهای القاء مهار یا تحریک بر روی نورونهای PGI می‌تواند باشد، این پیشنهاد نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

بطور خلاصه افزایش نورونهای تحریکی پاسخ دهنده به فرمالین در حین هایپرترمیا و عدم مشاهده نورونهای مهارتی، اثر افزایشی تشدید پاسخ به فرمالین را در این فراوانی مورد تأکید قرار می‌دهد. و رفع مهار از نورونهای مشابه off_cell که بعنوان مهار کننده در سیستم مرکزی حس درد عمل می‌کنند، ممکن است به رهایش واسطه های التهابی مربوط شود.

بیشترین حساسیت به فرمالین در محلول های با غلظت ۰/۵ تا ۲/۵ درصد مشاهده شده است [۹]، ما نیز غلظت ۵/۲ درصد فرمالین را بکار برده ایم.

نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان دادند که با القاء هایپرترمیا میانگین فعالیت پایه نورونهای ثبت شده در PGI افزایش می‌یابد، از طرفی فعالیت خود بخودی این نورونها از یک حالت پایدار و تقریباً ثابت دچار فراز و نشیب محسوسی می‌شود. پس هایپرترمیا بعنوان یک سترس بر روی فعالیت این نورونها تأثیر گذاشته است. به زاء هر درجه سانتیگراد افزایش در حرارت بدن فعالیت متابولیکی به میزان ده درصد یا بیشتر افزایش می‌یابد و ازدیاد کمی در درجه حرارت بدن مانند آنچه در فرایند تب مشاهده می‌شود، پاسخهای ایمنی را افزایش می‌دهد [۲۲]. هایپرترمیا بعنوان یک استرس فیزیولوژیک رهایش اینترلوکین های ۱ و ۶ و TNF و سایر سیتوکین های القاءکننده تب را بدنبال دارد، این سیتوکین ها ممکن است منجر به رهایش پروستاگلندین و سایر واسطه های التهابی شوند که درد را تشدید می‌نمایند [۳۴]. هر مقداری از سندرم تب، افزایشی را در پاسخهای دردناکی به دنبال دارد که از یک مکانیسم و مسیر عصبی بخصوصی تبعیت می‌نماید [۲۳]. مطالعات انجام شده توسط Mason (۱۹۹۳) نشان می‌دهد که پروستاگلندین های بوجود آمده در سیستم عصبی مرکزی در حین تب، یک تحریک شبکه ای در نورونهای انتقال دهنده حس درد در شاخ خلفی را باعث می‌شوند، آنها پایانه های محیطی حس درد را حساس می‌نمایند [۲۳].

Fields و همکاران (۱۹۸۳) نشان دادند که در موش های بیهوش، نورونهای RVM براساس فعالیتشان در اثر رفلکس های دردناکی به سه دسته تقسیم می‌شوند: on_cell ها که درست قبل از رفلکس Tail Flick ایجاد

منابع

- [1] غیبی، نعمت الله. پایان نامه کارشناسی ارشد بیوفیزیک، دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی - بیوفیزیک، ۱۳۷۶.
- [2] Abols, I.A. and Basbaum, A.I., Afferent connections of the rostral medulla of the cat: A neural substrate for midbrain medullary interactions in the modulation of pain, *J. Comp. Neurol.*, 201 (1981) 285-297.
- [3] Abbot, F.V., Franklin, K.B., Lodwick, R.J. and Melzack, R., Apparent lack of tolerance in the formalin test suggests different mechanisms for morphine analgesia in different types of pain, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 15 (1981) 637-640.
- [4] Andrezic, J.A., Chan-Play, V. and Palay, S.L., The nucleus paragigantocellularis lateralis in the rat: Conformation and Cytology, *Anat. Embryol.*, 161 (1981) 355-372.
- [5] Aston-Jones, G., Shibly, M.T., Chouvet, G., Ennis, M., Van Bockstaele, E.J., and et al. Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology, *Prog. Brain Res.*, 88 (1991) 44-75.
- [6] Azami, J., Wright, D.M. and Roberts, M.H.T., Effects of morphine and naloxone on the responses to noxious stimulation of neurons in nucleus reticularis paragigantocellularis, *Neuropharmacol.*, 20 (1981) 869-876.
- [7] Bietz, A.J., The organization of afferent projection to midbrain periaqueductal gray of the rat, *Neurosci.*, 7 (1982) 133-152.
- [8] Carlton, S.M., Leichnetz, G.R., Young, E.G. and Mayer, D.J., Supramedullary afferents of the nucleus raphe magnus in the rat: a study using the transcanula HRP gel and autoradiographic technique, *J. Comp. Neurol.*, 214 (1983) 43-58.
- [9] Clavelou, P., Dallel, R., Orliaguet, T., Woda, A. and Raboisson, P., The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin cocentrations, *Pain*, 62 (1995) 295-301.
- [10] Coderre, T.J. and Melzack, R., The contribution of excitatory amino-acids to central sensitization and persistent nociception after formalin induced tissue injury, *J. Neurosci.*, 12 (1992) 3665-3670.
- [11] Dallel, R., Raboisson, P., Clavelou, P., Saade, M. and Woda, A., Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin, *Pain*, 61 (1995) 11-16.
- [12] Dampney, R.A.L. and Moon, E.A., Role of ventrolateral medulla in vasomotor response to cerebral ischemia, *Am. J. Heart Circ. Physiol.*, 239 (1980) 349-358.
- [13] Detwweiler, D.J., Rohde, D.S. and Basbaum, A.I., The development of opioid tolerance in the formalin test in the rat, *Pain*, 63 (1995) 251-254.
- [14] Dickenson, A.H. and Sullivan, A.F., Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin induced activity of rat dorsal horn neurons, *Neurosci. Lett.*, 83 (1987) 207-211.
- [15] Dickenson, A.H. and Sullivan, A.F., Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurons in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre- and post-formalin, *Pain*, 30 (1987) 349-360.
- [16] Ennis, M. and Aston-Jones, G., Two physiologically distinct populations of neurons in the ventrolateral medulla innervate the locus coeruleus, *Brain Res.*, 425 (1987) 275-282.
- [17] Feldman, J.L., Neurophysiology of breathing in mammals. In F.E. Bloom (ED.), *Handbook of Physiology*, Section 1: The nervous system, Vol. 4, Intrinsic regulatory systems of the brain, American Physiological Society, Bethesda, MD, (1986) 463-524.
- [18] Fields, H.L., Bry, J., Hentall, I.D. and Zorman, H., The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal

- from noxious heat, *J. Neurosci.*, 3 (1983) 2545-2552.
- [19] Gebhart, G.F., Opiate and opioid peptide effects on brain stem neurons: Relevance to nociceptor and antinociceptor mechanisms, *Pain*, 12 (1982) 93-140.
- [20] Key, B.J. and Wigfield, C.C., The influence of the ventrolateral medulla on thermoregulatory circulations in the rat, *J. Auton. Nerv. Syst.*, 48 (1994) 79-89.
- [21] Koulchitsky, S.V., Are the capsaicin-sensitive structures of ventral medulla in the temperature response to endotoxin in rats?, *Neurosci. Lett.*, 244 (1998) 112-114.
- [22] Kluger, M.J., Fever: Role of pyrogens and cryogens, *Physiological Reviews*, 71 (1991) 93-127.
- [23] Mason, P., Lipopolysaccharide induces fever and decreases tail flick latency in awake rats, *Neurosci.*, 154 (1993) 134-136.
- [24] McAllen, R.M. and May, C.N., Effects of preoptic warming on subretrofacial and cutaneous vasoconstrictor neurons in anesthetized cats, *J. Physiol., (Lond.)*, 481 (1994) 719-730.
- [25] Morimoto, A., Watanabe, T., Myogin, T. and Murakami, N., Restraint induced stress elicits acute-phase response in rabbits, *Pflugers Arch.*, 410 (1987) 554-556.
- [26] Newman, D.B., Distinguishing rat brainstem reticulospinal nuclei by their neuronal morphology. I. Medullary nuclei., *J. Hirnforsch.*, 2 (1985) 187-226.
- [27] Olzewski, J. and Baxter, D., *Cytoarchitecture of the human brainstem*, Karger, Basel, (1954).
- [28] Paxinos, G. and Watson, C., *The rat brain stereotaxic coordinates*, Academic press, New York, (1985).
- [29] Porro, C.A. and Cavazzuti, M., Spatial and temporal aspects of spinal cord and brainstem activation in the formalin pain model, *Prog. Neurobiol.*, 41 (1993) 565-607.
- [30] Puig, S., Rivot, J.P. and Besson, J.M., Effect of subcutaneous administration of the chemical algogen formalin, on 5-HT metabolism in the nucleus raphe magnus and medullary dorsal horn: a voltametric study in freely moving rats, *Brain Res.*, 365 (1992) 112-124.
- [31] Punnen, S., Willette, R., Krieger, A.J. and Sapru, H.N., Cardiovascular response to injections of the enkephalin in the pressor area of the ventrolateral medulla, *Neuropharmacol.*, 23 (1984) 939-946.
- [32] Rosenfeld, J.P., Interacting brainstem components of opiate-activated, descending, pain-inhibitory systems, *Neuro. Biobehav. Reviews*, 18 (1994).
- [33] Ross, C.A., Ruggiero, D.A., Park, D.H., Joh, T.H., Sun, A.F., Fernandez-Pardal, J., Saavedra, J.M. and Reis, D.J., Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenalin neurons on arterial pressure, heart rate and plasma catecholamines and vasopression, *J. Neurosci.*, 4 (1984) 474-494.
- [34] Schweizer, A., Feilge, U., Fontana, A., Muller, K. and Dinarello, C.A., Interleukin-1 enhances pain reflexes. Mediation through increased prostaglandin E2 levels, *Agents Actions*, 25 (1988) 246-251.
- [35] Smith, J.E., Jansen, A.S., Gilbey, M.P. and Loewy, A.D., CNS cell groups projecting to sympathetic outflow of tail artery: neural circuits involved in heat loss in the rat, *Brain Res.*, 786 (1998) 153-164.
- [36] Vaccarino, A.L. and Melzack, R., Temporal processes of formalin pain: differential role of the cingulum bundle, fornix pathway and medial bulboreticular formation, *Pain*, 49 (1992) 257-271.
- [37] Van Bockstaele, E.J., Akoka, H. and Aston-Jones, G., Brainstem afferents to the rostral (juxtafacial) nucleus paragigantocellularis: integration of exteroceptive and interoceptive sensory inputs in the ventral tegmentum, *Brain Res.*, 603 (1993) 1-18.