

TOPOGRAFSKO ISPITIVANJE PONTOMEDULARNIH RESPIRATORNO-SENZITIVNIH JEDARA MOZGA PACOVA MIKROSTIMULACIJAMA GLUTAMATOM

Milan Stoiljković^{1,2}, Srdjan Pešić¹ i Nenad Stojiljković³

Autonomna kontrola disanja zavisi od integriteta pontomedularne mreže recipročno povezanih neurona koji su lokalizovani u nekoliko funkcionalno i neurohemijski različitih kompartmana. Glutamat se smatra ključnim neurotransmiterom koji posreduje u transmisiji signala u respiratornim područjima moždanog stabla. Identifikacija respiratorno-senzitivnih neurona mikrostimulacijama ovim neurotransmiterom daje uvid u topografsku organizaciju pontomedularnih jedara uključenih u modulaciju i kontrolu disanja.

Mikroinjekcijama glutamata dobijena su tri tipa respiratornih odgovora: hiperpneja, apneusis (inspiratorni grč) i hipopneja ili apneja. Hiperpneja je dobijena nakon mikrostimulacija u regionu lateralnog parabrahijuma i kaudalnog Kölliker-Fuse nukleusa. Apneustički odgovor je dobijen u regionu koji je ventralno od gornjeg cerebelarnog pedunkula, dok se respiratorni odgovori tipa hipopneje ili apneje dobijaju nakon mikroinjekcija glutamata u području ventralnog Kölliker-Fuse nukleusa i uskom pojasu između motornog i principalnog senzitivnog jedra nervus trigeminusa koje se definiše kao intertrigeminalni region.

Distribucija dobijenih respiratornih odgovora zavisi od anatomske lokalizacije mikroinjekcija i od ascendentnih i descendentnih projekcija koje polaze iz samih područja stimulacija. *Acta Medica Medianae* 2008;47(1):41-46.

Ključne reči: glutamat, pontomedularni region mozga pacova, mikrostimulacija, disanje

Institut za farmakologiju sa toksikologijom Medicinskog fakulteta u Nišu¹

Institut za farmakologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta Illinois u Čikagu, SAD²

Institut za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Nišu³

Kontakt: Milan Stoiljković

Institut za farmakologiju sa toksikologijom Medicinskog fakulteta

Dr Zorana Đinđića 81

18 000 Niš, Srbija

Tel.: 018/226644 lok 121

E-mail: mstoiljkovic@yahoo.com

Uvod

Disanje predstavlja visoko integrisani proces koji uključuje kompleksne signalne mehanizme u mozgu, moždanom stablu, kičmenoj moždini, kranijalnim i spinalnim živcima, uz koordinisano funkcionisanje dijafragme, interkostalnih mišića, larinksa, farinksa, pluća i kardiovaskularnog sistema. Ovaj proces podrazumeva i učešće više različitih neurotransmitera, neuromodulatora, receptora, sekundarnih glasnika i transkripcionih faktora, od kojih se većina još uvek ispituje (1,2).

Ključni neurotransmiter koji posreduje u sprovođenju sinaptičkih ekscitatornih signala u gotovo svim respiratornim neuronima moždanog stabla je glutamat. On je neophodan za tran-

smisiju inspiratornih signala u respiratornim premotorima i respiratornim motornim neuronima (3). Glutamat svoje efekte ostvaruje uglavnom delovanjem preko N-methyl-d-aspartat (NMDA) receptora, ali i preko non-NMDA receptora, tj. AMPA (alfa-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid) i kainatskih receptora, kao i metabotropnih receptora (mGluRs) uključenih u pontomedularne signalne puteve (4,5,6).

Poslednjih godina, brojna eksperimentalna i klinička istraživanja ukazuju na značaj funkcionalnog integriteta pontomedularne signalne mreže koja povezuje dorzolateralni tegmentum ponsa, nc. tractus solitarius i ventrolateralno područje produžene moždine i njihove uloge u autonomnoj kontroli disanja (7,8).

S obzirom na značaj pontomedularnog regiona u kontroli i modulaciji disanja, cilj našeg rada bio je da se mikroinjekcijama glutamata topografski ispituju respiratorno-senzitivne zone i efekti glutamatske stimulacije pojedinih struktura ovog područja.

Materijal i metode

U eksperimentu je korišćeno dvadeset adultnih Sprague-Dawley pacova muškog pola, telesne mase 270-300 g. Pre izvođenja eksperimenta

životinje su uzgajane i čuvane u kontrolisanim uslovima uz dvanaestčasovni ritam svetlost/tama i uvek dostupnu hranu i pijaću vodu. Sve hirurške i eksperimentalne procedure u ovom eksperimentu bile su u skladu sa etičkim principima o radu sa eksperimentalnim životinjama sadržanim u protokolu Nacionalnog saveta za istraživanje SAD (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy of Science Press, Washington, DC, 1996).

Za izvodjenje eksperimenta životinje su anestetizirane kombinacijom ketamina (80 mg/kg) i xylazina (5 mg/kg), datom intraperitonealno. Ovakva kombinacija obezbeđuje relativno brzu anesteziju uz optimalan nivo sedacije i analgezije. Tokom eksperimenta, dubina anestezije je kontinualno praćena stabilnošću respiratornog ritma i odsustvom kornealnog refleksa. Za izvodjenje farmakoloških hemostimulacija pacovi su postavljeni u stereotaksički aparat (Stoelting Co., Wood Dale, IL). Nakon odredjivanja stereotaksičkog "nultog položaja", u cilju pristupa dorzalnom ponto-medularnom regionu mozga vršena je unilaterala parietookcipitalna kraniotomija. Hemostimulacije su vršene pomoću mikropipeta napravljenih od 3 kapilarne cevčice korišćenjem vertikalnog pulera (Harvard Apparatus Ltd, Kent, England) i sa prosečnom širinom vrha od 10-20 μm . Mikropipete su postavljane na stereotaksički micromanipulator a svaka od cevčica je povezivana tankim polietilenskim crevom sa pulsним injektorom (Picospritzer II, General Valve Co., Fairfield, NJ), čime je omogućeno mikroinjektovanje supstance pod pritiskom. Za izvodjenje hemostimulacija mikropipete su punjene 10 mM glutamatom (rastvor u 0.2 M fosfatnom puferu), fiziološkim rastvorom i bojom oil red O-dye. Fiziološki rastvor je služio kao kontrolna injekcija, dok je boja ubrizgavana posle svake efektivne stimulacije glutamatom kako bi se obeležilo i kasnije histološki verifikovalo tačno mesto injekcije. Volumen svake pojedinačne injekcije je kontrolisan praćenjem pomeranja meniskusa rastvora u pipeti pomoću kalibrisanog okulara stereomikroskopa i kretao se između 10 i 30 nl.

Za registraciju efekata nakon ubrizgavanja supstance korišćen je Brain Wave softver prilagodjen za Windows. Dvokanalno registrovanje signala svakog pojedinačnog eksperimenta uključivalo je: 1) artefakt pulsno injektovanja supstance i 2) respiratorne pokrete merene pomoću piezo-električnog pojasa koji sadrži tečni kristal kao senzor (Sleepmate Technologies, Midlothian, VA), a postavljan je oko grudnog koša pacova. Oba kanala su kontinualno pretvarana u digitalni signal sa frekvencom semplovanja od 100/s i snimana na hard disk za dalju analizu koja je vršena pomoću Experimenter's Workbench softvera (Datawave Systems Longmont, CO) za identifikaciju ritma, amplitude i dužine svake pojedinačne respiracije.

Eksperimenti ove studije uradjeni su na Institutu za farmakologiju Univerziteta Illinois u Čikagu u okviru projekta NIH broj 70870. Analiza i ekspertiza dobijenih rezultata obavljena je na Medicinskom fakultetu u Nišu.

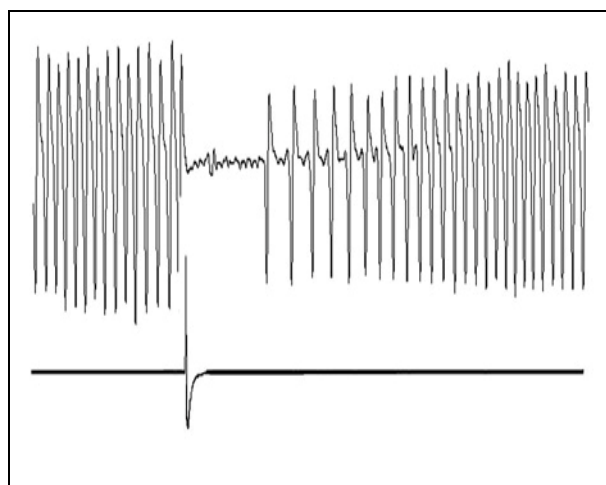
Eksperimentalni protokol

Za topografsko ispitivanje, mikropipeta je uvedena dorzoventralno u mozak pacova kako bi se omogućile injekcije glutamata u različite regione ponsa i medule. Za identifikaciju respiratorno-senzitivnih ponto-medularnih struktura pipeta je pomerana ventralno u inkrementima od 100 μm . Ukoliko nije bilo respiratornih odgovora na injekcije glutamata u datom položaju pipete, vršena su pomeranja po medio-lateralnoj ili antero-posteriornoj osovini. Efektivnim mestom injekcije smatrano je svako gde je stimulacija glutamatom dovela do promene ritma ili privremenog prekida disanja. Ovakvo mesto obeležavano je injekcijom boje, a koordinatne položaja pipete su beležene za dalju identifikaciju pomoću stereotaksičkog atlasa (9).

Po završetku svakog eksperimenta, pacovi su duboko anestetizirani i pripremani za transkardijalnu perfuziju u cilju in situ fiksacije moždanog tkiva. Perfuzija je vršena fiziološkim rastvorom (300 ml, pH=7.4), zatim 4% formaldehidom (200 ml u 0,1 M fosfatnom puferu) i 10% rastvorom saharoze (200ml u 0.1 M fosfatnom puferu) korišćenjem perfuzione pumpe. Nakon toga, mozak pacova je vadjen iz lobanje u bloku i čuvan u 4% formaldehidu tokom noći, a zatim se fiksacija tkiva nastavljala u 30% rastvoru saharoze tokom nekoliko dana, kako bi se potpuno izvršila krioprotekcija tkiva. Tkivo mozga je sećeno koronalnim serijskim preseccima debljine 40 μm korišćenjem kriostat-mikrotoma. Isečci mozga bojeni su klasičnom Nissl-ovom metodom (cresyl violet).

Rezultati

Rezultati ove farmakološke studije pokazuju da ekscitacija mikroinjekcijama glutamatom u različitim delovima pontomedularnog regiona mozga pacova izaziva tri različita tipa respiratornih odgovora: hiperpneju, apneusis (inspiratorni grč) i hipopneju ili apneju (Slika 1).

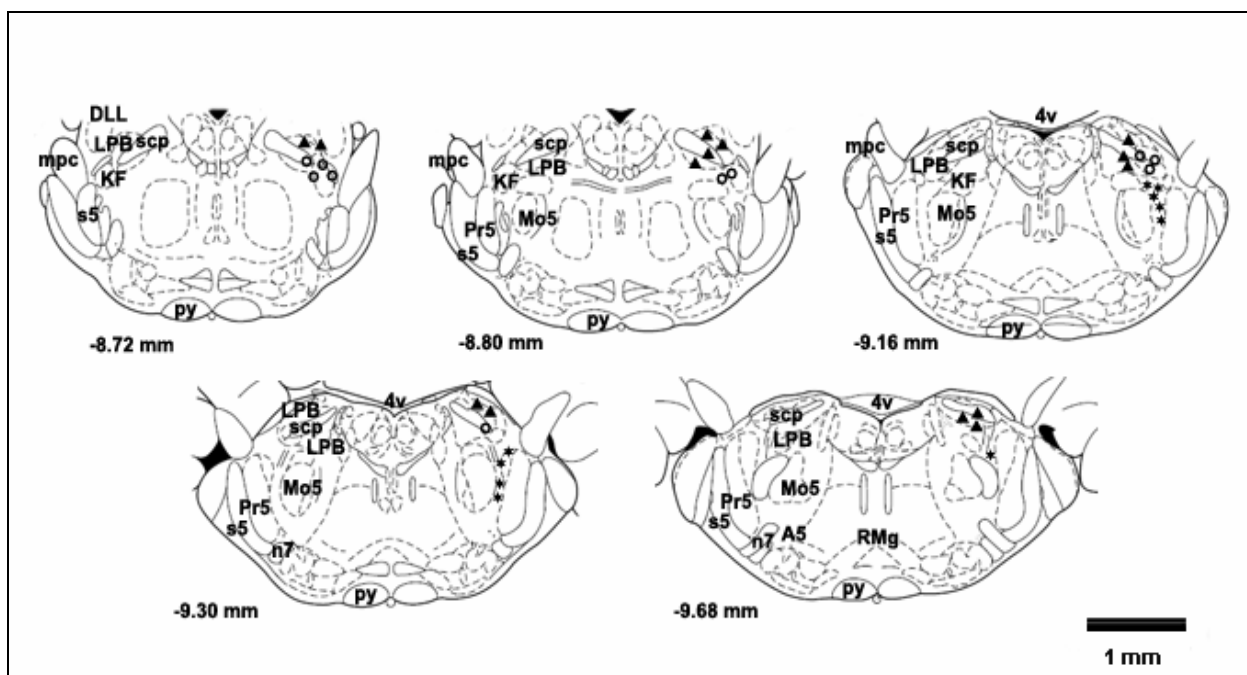


Slika 1. Tranzitorni prekid disanja izazvan mikroinjekcijom glutamata (10mM) u području dorzolateralnog ponsa između motornog i principalnog senzitivnog jedra trigeminalnog živca

Mikroinjekcije glutamata, u području koje se rostro-kaudalno proteže u pojasu od 8.75-9.68 mm udaljenom od bregme, sa dorzoventralnim rasponom od 6,4-7,2 mm i koje je u odnosu na sagitalnu suturu lokalizovano lateralno između 1.6-3.0 mm, izazivaju hiperpneju. Ovo područje po svojoj anatomske lokalizaciji odgovara kompleksu jedara lateralnog parabrahijuma. Posebno senzitivno područje, gde se odmah nakon glutamatske stimulacije javlja tahipneja u trajanju od nekoliko minuta je region koji je lokalizovan 9,16 mm kaudalno od bregme i sa koordinatama 7,4-7,8 mm dorzoventralno i 2.6-3,0 mm mediolateralno. Ovo područje, lokalizovano ventralnije od parabrahijalnog hiperpneičkog regiona, odgovara kaudalnom Kölliker-Fuse nukleusu. Respiratorni odgovori koji se karakterišu produženim trajanjem ili prematurnim inspirijumima (apneusis) dobijeni su u području rostralnog dorzolateralnog ponsa nakon mikroinjekcija glutamata u region koji je 8,8-9,3 mm udaljen od bregme sa dorzoventralnim 7,2-8,2

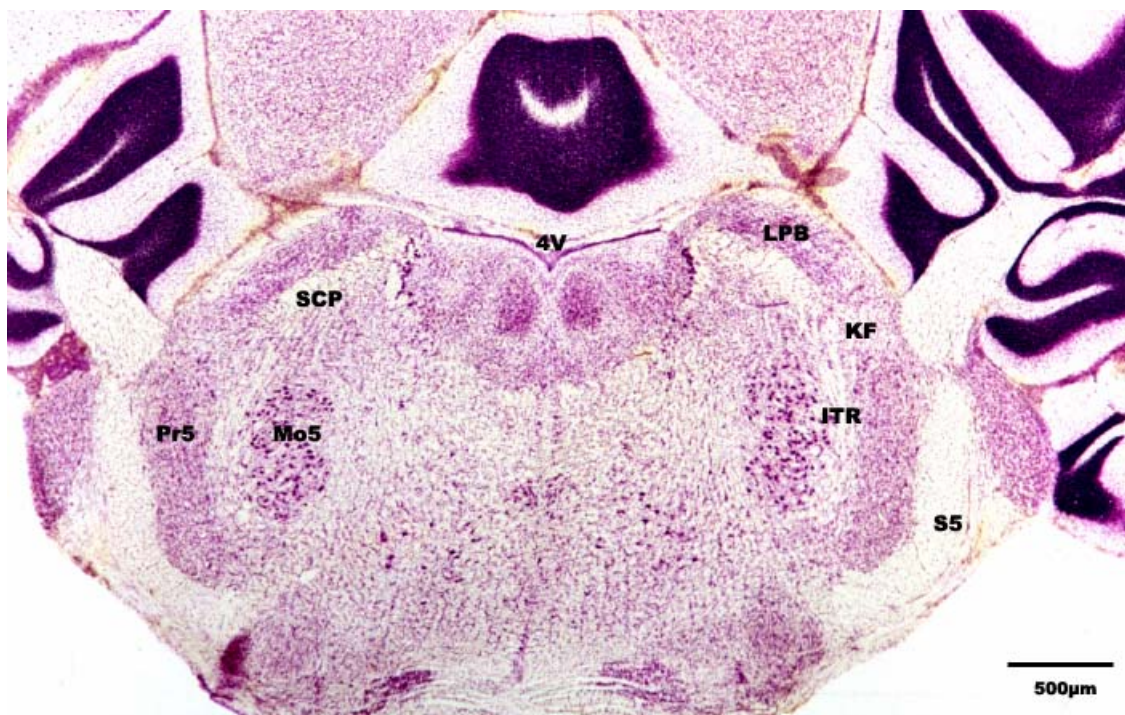
mm i mediolateralnim koordinatama između 1,6-3,0 mm. Prema stereotaksičkom atlasu, ovo područje odgovara regionu koji je ventrolateralno od gornjeg cerebelarnog pedunkula i rostralno od Kölliker-Fuse nukleusa. Tranzitorni prekid disanja (apneja) dobijen je u području koje je na istim anteroposteriornim i mediolateralnim koordinatama kao i područja gde su dobijena prethodna dva respiratorna odgovora, ali se nalazi znatno ventralnije (7,8-9,0 mm) od njih. Momentalni prekid disanja nakon mikroinjekcije glutamata dobijen je u uskom području koje se pruža u pojasu 2,4-2,8 mm lateralno od sagitalne suture. Medijalnije od tog područja, kao i nešto ventralnije dobijani su motorni odgovori kao što su tonički grčevi vilice i facijalne muskulature. Lokalizacija ovih injekcija bila je u području motornog jedra trigeminusa ili u parafacijalnoj regiji.

Sva respiratorno-senzitivna mesta su obeležavana injekcijama boje i kasnije histološki analizirana i identifikovana pomoću stereotaksičkog atlasa (Slike 2 i 3).



Slika 2. Šematski prikaz topografske distribucije respiratorno-senzitivnih jedara pontomedularnog dela mozga pacova. Crteži predstavljaju koronalne preseke mozga pacova koji su u rostralkaudalnom rasponu od 8.72 mm do 9.68 mm udaljeni od bregme. Tri tipa respiratornih odgovora dobijena mikroinjekcijama glutamata su predstavljena posebnim simbolima: hiperpneja (▲); apneusis (○) i hipopneja ili apneja (*).

scp- superior cerebellar peduncle; mpc- middle cerebellar peduncle; LPB- lateral parabrachial region; DLL- nc. dorsalis of lateral lemniscus; KF- Kölliker-Fuse nucleus; Mo5- motor trigeminal nucleus; Pr5- principal sensory trigeminal nucleus; s5- sensory trigeminal root; n7- facial nerve; py- pyramidal tract; RMg- nc. raphe magnus; A5- noradrenaline cells region; 4v- 4th ventricle (Paxinos and Watson, 1986).



Slika 3. Anatomna distribucija respiratornih jedara u pontomedularnom delu mozga pacova. Na slici je prikazan koronalni presek mozga pacova bojen klasičnom Nissl-ovom metodom bojenja, a koji odgovara nivou koji je 9.30 mm kaudalno od bregme.

Diskusija

U eksperimentu se fokalnim mikrostimulacijama glutamatom ispituju respiratorno senzitivna područja pontomedularnog regiona. Ekscitacije glutamatom izazivaju tri vrste respiratornih odgovora koje zavise od anatomske lokalizacije mikroinjekcija. To su: hiperpneja, apneusis (inspiratorni grč) i hipopneja ili apneja. Hiperpneja se karakteriše kratkotrajnim povećanjem respiratorne frekvence (tahipneja) i tidal volumena što je posledica skraćivanja intervala između disajnih ciklusa uz istovremeno povećanje amplitude disanja neposredno nakon stimulacije glutamatom (10). Apneusis ili inspiratorni grč karakteriše se inspirijumom koji se po dostizanju svog maksimuma održava u fazi platoa nekoliko desetina sekundi. Ponekad nekoliko prematurnih inspirijuma može da prethodi normalnom ekspirijumu. Ovakvo disanje može biti posledica neprekidnog produženog nadražaja frenikusa, povećanja frekvence disanja do nivoa koji onemogućava potpuni izdisaj između dva disajna ciklusa tj. vraćanja tidal volumena na bazalne vrednosti ili je posledica istovremenog produženja vremena trajanja inspirijuma i skraćivanja vremena trajanja ekspirijuma (11). Treći tip respiratornog odgovora na stimulaciju glutamatom je hipopneja koja se karakteriše smanjenjem respiratorne frekvence (bradipneja) i tidal volumena ili potpunom tranzitornom inhibicijom inspiracije (apneja) (7). Apnejom se smatra svaka pauza u disanju koja traje duže od 3 sekunde (12). Najznačajnija karakteristika hipopneje je produženje vremena trajanja ekspirijuma koje se ogleda u odloženom početku prvog disajnog

ciklusa nakon egzogene aplikacije glutamata. Nakon pauze koja je dozno-zavisna, disanje se ponovo uspostavlja uz snižen tidal volumen ali se već posle nekoliko ciklusa normalizuje i vraća na početne kontrolne vrednosti (11).

Naša studija je pokazala da se hiperpneja kao odgovor na stimulaciju glutamatom dobija nakon mikroinjekcija u području koje po anatomskoj lokalizaciji odgovara kompleksu jedara lateralnog parabrachijuma (superiorno, lateralno- krescentno, lateralno-dorzalno i centralno jedro) ili regionu kaudalnog Kölliker-Fuse nukleusa. Ovaj nalaz je u korelaciji sa ranijim hemostimulacionim ispitivanjima (11, 13) pontomedularnog područja mačke ili pacova. Studija Herberta i saradnika (14) pokazala je da neuroni ovog hiperpneičkog regiona šalju direktne descendente projekcije do ventrolateralne medule, područje koje se smatra generatorom respiratornog ritma (15). Kvalitativno drugačiji respiratorni odgovor dobijen je u regionu koji po stereotaksičkim koordinatama odgovara području ventralno od gornjeg cerebelarnog pedunkula i rostralno od Kölliker-Fuse nukleusa. Studije (11,14) u kojima su korišćeni anterogradni i retrogradni trejseri pokazale su da iz ovog područja polaze projekcije ka nc. tractus solitariusu (ventrolateralni i komisuralni subnukleus) i ka motornom jedru nervus frenikusa. Apneustički odgovori dobijeni u našoj studiji mogu biti posledica produžene, neprekidne stimulacije ovog živca. Sa druge strane, poznato je da nc. tractus solitarius predstavlja prvu centralnu sinapsu za visceralne senzorne informacije koje dolaze iz hemo-receptora i pulmonalnih streč receptora. Tranzitorni prekid disanja, tj. apneja koja se

javlja neposredno nakon injekcija glutamata u području ventralnog Kölliker-Fuse nukleusa ili uskom pojasu između motornog i principalnog senzitivnog jedra nervus trigeminus također je u korelaciji sa prethodnim studijama (16,17). Smatra se da je ovo područje deo neuronskog kruga koji povezuje nc. tractus solitarius i respiratorne neurone ventrolateralne medule i kao takvo ima ključnu ulogu u integraciji i modulaciji senzornih informacija koje dolaze iz pluća i gornjih disajnih puteva (7,18). Apneja izazvana glutamatom u ovom području u skladu je sa hipotezom o fiziološkoj ulozi neurona

rostralnog ponsa u isključivanju inspiratornog stepeničastog signala.

Zaključak

Topografska distribucija respiratornih odgovora dobijenih nakon mikrostimulacija glutamatom u pontomedularnom području mozga pacova, u našem eksperimentu potvrđuje nalaze ranijih studija sličnog eksperimentalnog dizajna (7,11,19,20,21,22) kao i nalaze starijih, klasičnih elektrostimulacionih studija u ponsu i produženoj moždini (23,24,25).

Literatura

- Bianchi AL, Denavit-Saubie M, Champagnat J. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev.* 1995;75:1-45.
- Wong-Riley MMT, Liu Q. Neurochemical development of brain stem nuclei involved in the control of respiration. *Respir Physiol Neurobiol.* 2005;149:83-98.
- Bonham AC. Neurotransmitters in the CNS control of breathing. *Respir Physiol* 1995; 101: 219-230.
- Liu G, Feldman JL, Smith JC. Excitatory amino acid mediated transmission of inspiratory drive to phrenic motoneurons. *J Neurophysiol.* 1990;64: 423-36.
- Pierrefiche O, Foutz AS, Champagnat J, Denavit-Saubie M. NMDA and non-NMDA receptors may play distinct roles in timing mechanisms and transmission in the feline respiratory network. *J Physiol.* 1994;474:509-23.
- Dogas Z, Stuth EA, Hopp FA, McCrimmon DR, Zuperku EJ. NMDA receptor-mediated transmission of carotid body chemoreceptor input to expiratory bulbospinal neurones in dogs. *J Physiol.* 1995;487 (Pt 3):639-51.
- Chamberlin NL, Saper CB. A brainstem network mediating apneic reflexes in the rat. *J Neurosci.* 1998;18(15):6048-56.
- Alheid GF, Milsom WK, McCrimmon DR. Pontine influences on breathing: an overview. *Respir Physiol Neurobiol.* 2004;143:105-14.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, San Diego. 1986.
- McCrimmon DR, Feldman JL, Speck DF, Ellenberger HH, Smith JC. Functional heterogeneity of dorsal, ventral, and pontine respiratory groups revealed by micropharmacological techniques. In: *Neurobiology of the control of breathing* (von Euler C, Lagercrantz H, eds). New York: Raven; 1986. p.201-8.
- Chamberlin NL, Saper CB. Topographic organization of respiratory responses to glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat. *J Neurosci.* 1994;14(11):6500-10.
- Radulovacki M, Pavlovic S, Saponjic J, Carley DW. Intertrigeminal region attenuates reflex apnea and stabilizes respiratory pattern in rats. *Brain Res.* 2003;975:66-72.
- Takayama K, Miura M. Respiratory responses to microinjection of excitatory amino acid agonists in ventrolateral regions of the lateral parabrachial nucleus in the cat. *Brain Res.* 1993;604:217-23.
- Herbert H, Moga MM, Saper CB. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J Comp Neurol.* 1990;293:540-80.
- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL. Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science.* 1991;254:726-9.
- Dutschmann M, Herbert H. The Kölliker-Fuse nucleus mediates the trigeminally induced apnoea in the rat. *NeuroReport.* 1996;7:1432-6.
- Radulovacki M, Stoiljkovic M, Saponjic J, Carley DW. Effects of intertrigeminal region NMDA and non-NMDA receptors on respiratory responses in rats. *Respir Physiol Neurobiol.* 2007;156:40-6.
- Radulovacki M, Pavlovic S, Saponjic J, Carley DW. Modulation of reflex and sleep related apnea by pedunculopontine tegmental and intertrigeminal neurons. *Respir Physiol Neurobiol.* 2004;143:293-306.
- Bertrand F, Hugelin A, Vibert JF. Quantitative study of anatomical distribution of respiration related neurons in the pons. *Exp Brain Res.* 1973;16:383-99.
- Dawid-Milner MS, Lara JP, Lopez de Miguel JP, Lopez-Gonzalez MV, Spyer KM, Gonzalez-Baron S. A5 region modulation of the cardiorespiratory responses evoked from parabrachial cell bodies in the anaesthetised rat. *Brain Res.* 2003;982:108-18.
- Chamberlin, NL. Functional organization of the parabrachial complex and intertrigeminal region in the control of breathing. *Respir Physiol Neurobiol.* 2004;143:115-25.
- Dutschmann M, Morschel M, Kron M, Herbert H. The Kölliker-Fuse nucleus: command neurons for sensory processing in the respiratory network. *Respir Physiol Neurobiol.* 2004;143:126-31.
- Cohen MI. Switching of the respiratory phases and evoked phrenic responses produced by rostral pontine electrical stimulation. *J Physiol (Lond).* 1971;217:133-58.
- Wang W, Fung ML, St. John WM. Pontile regulation of ventilatory activity in the adult rat. *J Appl Physiol.* 1993;74:2801-11.
- Fung ML, St. John WM. Electrical stimulation of pneumotaxic center: activation of fibres and neurons. *Respir Physiol.* 1994;96:71-82.

TOPOGRAPHIC IDENTIFICATION OF THE PONTOMEDULLARY RESPIRATORY-SENSITIVE NUCLEI OF THE RAT BRAIN BY GLUTAMATE MICROSTIMULATIONS

Milan Stojilkovic, Srdjan Pesic and Nenad Stojilkovic

Automatic control of breathing is highly dependent on the integrity of the pontomedullary network of reciprocally connected neurons localized in a number of functionally and neurochemically different compartments. Glutamate is considered the key neurotransmitter mediating signal transmission in the respiratory regions of the brainstem. Identification of the respiratory-sensitive neurons using this neurotransmitter for microstimulations provides an insight into the topographic organization of the pontomedullary nuclei involved in the modulation and control of breathing.

Three types of respiratory responses were observed following glutamate microinjections: hyperpnea, *apneusis* (inspiratory cramp) and hypopnea or apnea. Hyperpnea was obtained as a result of microstimulations in the region of lateral parabrachium and caudal Kölliker-Fuse nuclei. Apneustic response was observed in the region localized ventrally from superior cerebellar peduncle, while hypopneic or apneic responses followed glutamate microinjections in the region of ventral Kölliker-Fuse nucleus and a narrow area between motor and principal sensory trigeminal nucleus, which is referred to as intertrigeminal region.

Anatomical distribution of the obtained respiratory responses depends on the localization of microinjections and ascendant and descendent projections stemming from the sites of stimulation. *Acta Medica Medianae* 2008;47(1):41-46.

Key words: *glutamate, pontomedullary region of the rat brain, microstimulation, breathing*