

ГАМК_A-РЕЦЕПТОРЫ: УЧАСТИЕ В ФОРМИРОВАНИИ ДЫХАТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ НА ГИПОКСИЧЕСКУЮ СТИМУЛЯЦИЮ ПРИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

Поступила 20.06.15

В опытах на крысах линии Вистар исследовали роль состояния ГАМК_A-рецепторов в формировании респираторного ответа на гипоксическую нагрузку в условиях нормы и экспериментальной митохондриальной дисфункции, вызванной однократным системным введением ротенона – неселективного блокатора комплекса I дыхательной цепи митохондрий (3 мг/кг). Объемно-временные параметры дыхания характеризовали согласно параметрам респираторных ЭМГ-разрядов диафрагмальной мышцы (амплитуде, частоте и интегральной интенсивности). Изменения ЭМГ-активности диафрагмы, вызванные вдыханием гипоксической смеси (12 % O₂ + 88 % N₂), оценивались у контрольных крыс и животных с митохондриальной дисфункцией до и после введения блокатора ГАМК_A-рецепторов бикикуллина (биккуллина метиодида, 1.0 мг/кг). Развитие митохондриальной дисфункции сопровождалось подавлением респираторной реакции на гипоксическую нагрузку, что проявлялось в драматическом уменьшении частоты и интегральной интенсивности ЭМГ-разрядов диафрагмальной мышцы. Подобные результаты могут рассматриваться как указание на существенную вовлеченность ГАМК_A-рецепторов, расположенных на постсинаптических мембранах периферических хеморецепторов, в формирование респираторного ответа на гипоксическую стимуляцию (включая стадию депрессии вентиляции), причем это отмечалось и у контрольных крыс, и у животных с митохондриальной дисфункцией. Участие ГАМК-эргического звена в формировании респираторной активности при гипоксической стимуляции приобретает особую значимость в условиях экспериментальной митохондриальной дисфункции, которая обуславливает окклюзию афферентной импульсации, поступающей от периферических хеморецепторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ГАМК_A-рецепторы, гипоксия, вентиляторный ответ, периферические хеморецепторы, ЭМГ-активность диафрагмы.

ВВЕДЕНИЕ

ГАМК является основным тормозным нейротрансмиттером в ЦНС млекопитающих; она выполняет эту роль в существенной части (порядка 25–40 %) общего количества межнейронных синапсов [1]. В структурах ЦНС, локализованных в продолговатом мозгу и являющихся основным звеном системы нервного контроля дыхательной активности, ГАМК представляет собой один из ключевых нейрорхимических компонентов в системе дыхатель-

ного центра (ДЦ). Содержание ГАМК в различных структурах в пределах ЦНС существенно варьирует. Среди структур, вовлеченных в регуляцию дыхательной функции, высокое содержание ГАМК отмечается в нейронных системах ядер ствола мозга, в частности в парабрахмальном ядре, ядре одиночного пути (*nucl. tractus solitarius* – NTS), голубом пятне, а также в пределах спинного мозга [2–4]. Кроме того, ГАМК и рецепторы ГАМК (и ГАМК_A-, и ГАМК_B-типов) достаточно широко представлены в периферических хеморецепторах – каротидных гломусах (КГ) [5–8]. Активность именно этих рецепторных структур, очевидно, вносит основной вклад в непосредственное определение величины респираторной реакции на гипоксическую стиму-

¹ Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

Эл. почта: dr_kolesnikova@ukr.net (Е. Э. Колесникова).

ляцию. Установлено, что ГАМК не только содержится в КГ, но и высвобождается из хеморецепторных клеток I типа данных гломусов [6–8]. В хеморецепторных клетках I типа КГ ГАМК реализует функцию пресинаптической модуляции, связываясь с ГАМК_B-рецепторами, а также обеспечивает постсинаптические влияния, воздействуя на ГАМК_A-рецепторы постсинаптических мембран афферентных волокон синокаротидного нерва (СКН) [9]. Эти волокна проецируются в NTS ДЦ.

Как известно, снижение содержания кислорода (низкое парциальное давление $O_2 - PO_2$) во вдыхаемом воздухе вызывает увеличение интенсивности вентиляции. Такой респираторный ответ на гипоксическую стимуляцию (hypoxic ventilatory response – HVR) демонстрирует выраженный двухфазный характер в случаях как острой (длящейся несколько минут, acute hypoxia), так и более длительной (10–30 мин, sustained hypoxia) гипоксии [10–13]. Увеличение вентиляции на начальном этапе реакции организма на гипоксическую стимуляцию через некоторое время сменяется падением интенсивности вентиляции (так называемый эффект roll-off, hypoxic ventilatory decline – HVD) [12, 13]. Установлено, что начальное возрастание интенсивности вентиляции при снижении PO_2 во вдыхаемом воздухе опосредуется высвобождением ряда нейротрансмиттеров (катехоламинов, ГАМК, АТФ) из хеморецепторных клеток I типа КГ и последующим усилением активности афферентных волокон СКН, проецирующихся в NTS [13]. Падение интенсивности вентиляции в условиях продолжающейся гипоксической экспозиции связывают, прежде всего, с высвобождением и накоплением в пределах ядер ДЦ ряда тормозных модуляторов и медиаторов – аденозина, катехоламинов, серотонина, опиоидов и, прежде всего, ГАМК [12, 14]. Факт участия ГАМК на уровне ДЦ в депрессии HVR (HVD) вызывает относительно мало сомнений. Сведения же о возможном участии ГАМК-эргических нейронов в формировании начальной (гипервентиляторной) фазы реакции системы дыхания на снижение PO_2 , а также о роли ГАМК в функционировании «периферического датчика» PO_2 (КГ) в пределах поздней фазы HVR (фазы ослабления вентиляции) пока фактически отсутствуют.

Для нейронов гипоксия является одним из факторов, способствующих повышению внутриклеточной концентрации ГАМК, причем этот эффект зависит от «жесткости» и длительности действия упомянутого стимула [15]. Другим не менее значи-

мым фактором, влияющим на рост уровня ГАМК в нейронах, оказалось истощение запасов макроэргов (АТФ). Подобный сдвиг может возникать в результате существенного снижения PO_2 во вдыхаемом воздухе/напряжения кислорода в тканях [16]. Очевидно также, что содержание ГАМК в нервных клетках тесно связано с интенсивностью энергопродукции, обеспечиваемой митохондриями (МХ). Уровень АТФ существенно влияет на активность глутаматдекарбоксилазы (ГАД) – фермента синтеза ГАМК из глутамата [16]. Таким образом, любые состояния организма, которые сопровождаются отклонениями в уровне митохондриальной энергопродукции, могут опосредованно, но существенно сказываться на метаболизме ГАМК как главного тормозного нейротрансмиттера. Данные взаимосвязи могут являться основой определенных перестроек в разных звеньях системы регуляции дыхания.

Учитывая все приведенные выше факты, мы пытались определить роль ГАМК_A-рецепторов в формировании респираторной реакции на гипоксическую стимуляцию в норме и на фоне экспериментальной митохондриальной дисфункции (МХД).

МЕТОДИКА

Эксперименты были проведены на крысах линии Вистар (пять-шесть месяцев, $n = 10$), которые были разделены на контрольную группу ($n = 5$) и группу с экспериментальной МХД ($n = 5$). Весь период исследований крысы находились на стандартном рационе вивария при стандартном световом режиме (12/12 ч освещения/темноты).

Для проведения нейрофизиологических исследований крыс наркотизировали α -хлоразозой и уретаном (35 и 800 мг/кг, внутривенно) и трахеостомировали на уровне верхней трети трахеи. На протяжении всего эксперимента животные сохраняли спонтанное дыхание. Использование двустворчатого клапана позволяло разделять объемы вдоха и выдоха; в интратрахеальную канюлю подавали либо атмосферный воздух, либо гипоксическую газовую смесь (12 % O_2).

Объемно-временные параметры дыхания оценивались не прямо, а соответственно характеристикам ЭМГ-разрядов диафрагмальной мышцы [17]. Для отведения ЭМГ-активности два стальных изолированных, за исключением кончиков, игольчатых электрода (межэлектродное расстояние 12–18 мм) вводили в прилежащую к грудной клетке зону ди-

афрагмы. ЭМГ-сигналы усиливали (полоса пропускания 50–5000 Гц) и подвергали полному выпрямлению и интеграции (низкочастотной фильтрации) с использованием модифицированной программы РЕО (Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины). По трем последовательным полным дыхательным циклам оценивали усредненные текущие значения амплитуды ЭМГ-разрядов (отн. ед.), частоты дыхания (мин^{-1}) и интегральной интенсивности ЭМГ-активности (площади выпрямленных ЭЭГ-разрядов, отн. ед.) в пределах такого сегмента регистрации. Последний индекс, если он определяется в границах более длительных отрезков времени (EMG minute diaphragmatic output – MDO), достаточно строго коррелирует с индексом минутной вентиляции, а амплитуда ЭМГ-разрядов – с дыхательным объемом (V_T). Одновременно упомянутые параметры выпрямленной и интегрированной ЭМГ представляют собой корреляты характеристик центральных моторных команд (ЦМК), поступающих к диафрагмальной мышце по *n. phrenicus*.

При гипоксической стимуляции ЭМГ-активность диафрагмы регистрировали в течение 2.5 мин (150 с) после начала подачи смеси, содержащей в себе 12 % O_2 ; изменения указанных выше параметров производили через каждые 30 с. Наблюдающиеся в данном случае изменения диафрагмальной ЭМГ-активности соответствовали «классическому» вентиляторному ответу на гипоксическую стимуляцию. Вначале происходило усиление респираторной ЭМГ-активности, соответствующее повышению интенсивности вентиляции; затем упомянутая активность ослаблялась, отражая постепенное падение интенсивности внешнего дыхания. Все данные, характеризующие ЭМГ-активность диафрагмы, нормировали, рассчитывая значения относительно исходных величин, принятых за 100 %.

В ходе данных острых опытов также анализировали содержание газов в артериальной крови и измеряли ее рН. В бедренную артерию крысы вводили полихлорвиниловый катетер, который позволял осуществлять забор образцов артериальной крови с последующей экспресс-оценкой газового состава с использованием жидкостного газоанализатора. В течение эксперимента температуру тела животных поддерживали с точностью до 1 °С в интервале 37.0–38.5 °С.

Для блокирования ГАМК_A-рецепторов животным внутривенно вводили препарат бикакуллина (бикакуллина метиодид – БКм; «Sigma», США) в дозе 1.0 мг/кг.

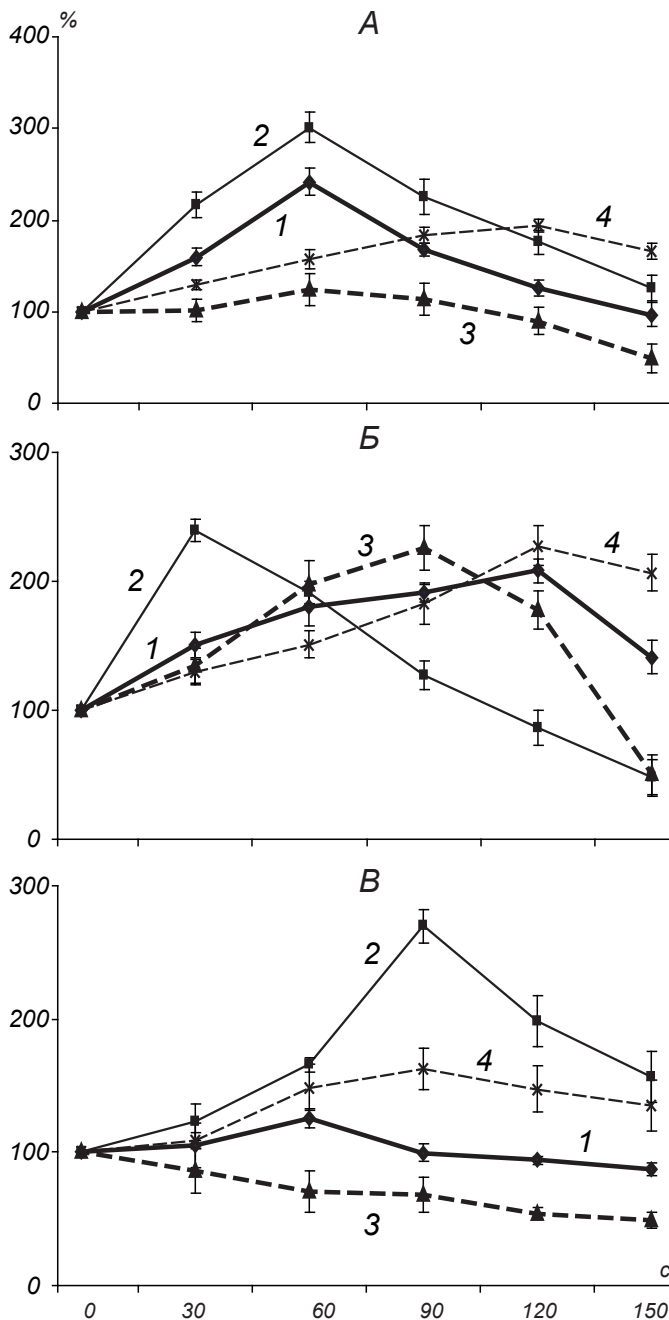
Для частичного блокирования функции МХ в нейронах ствола мозга и КГ животным однократно инъецировали подкожно ротенон, который является селективным ингибитором активности комплекса I дыхательной цепи МХ (3.0 мг/кг) [18, 19]. Ротенон растворяли в минимальном количестве смеси (1:1) двух органических растворителей – диметилсульфоксида (DMSO) и полиэтиленгликоля (PEG) («Sigma», США).

Полученные числовые результаты обрабатывали статистически с использованием стандартных приемов; достоверность межгрупповых различий оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

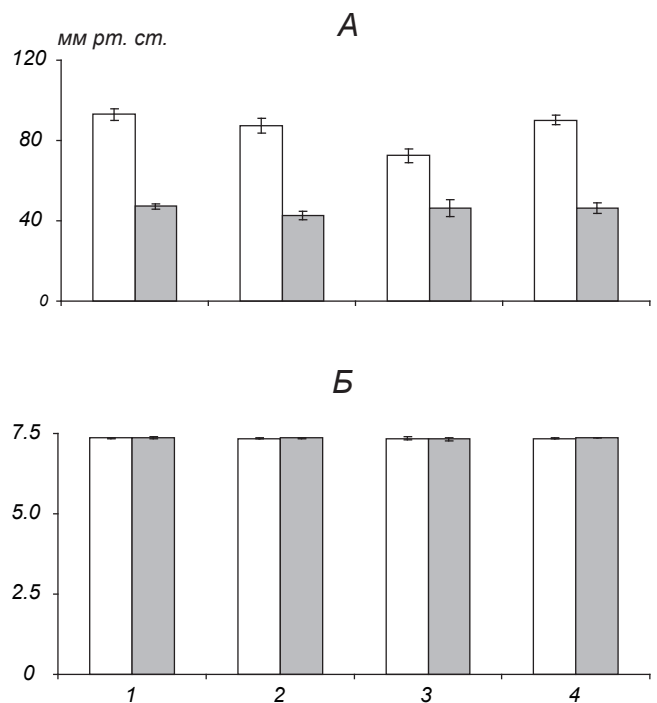
В ходе описываемых исследований были получены результаты, подтверждающие существенное участие ГАМК-эргической системы в механизмах формирования HVR на фоне МХД.

ЭМГ-корреляты HVR контрольных животных. Крысы контрольной группы при дыхании гипоксической смесью (12 % O_2) демонстрировали характерные HVR, представляющие собой двухфазные реакции. Интегральная интенсивность ЭМГ-разрядов диафрагмальной мышцы довольно быстро нарастала, достигая максимума примерно на 60-й с, а затем прогрессивно снижалась вплоть до конца периода наблюдения (150 с; рис. 1, А). Амплитуда HVR согласно показателю MDO на 60-й с гипоксической стимуляции превышала исходный уровень вентиляции в среднем на 141 % ($P < 0.05$). В конечной точке кривой респираторной реакции на вдыхание гипоксической смеси (150 с) интегральная интенсивность ЭМГ-активности снижалась практически до исходного значения (96 %). Следует отметить, что амплитуда ЭМГ-разрядов диафрагмы при гипоксической нагрузке претерпевала более выраженные изменения по сравнению с такими частоты этих разрядов (Б, В). Максимальные значения MDO совпадали именно с аналогичными значениями частоты, в то время как амплитуда ЭМГ-разрядов диафрагмы подвергалась модуляции в основном во второй фазе HVR. Максимальное значение амплитуды достигалось лишь примерно через 120 с дыхания гипоксической смесью и составляло в среднем 208 % исходной величины данного показателя. В конечной точке регистрации HVR амплитуда ЭМГ-активности оставалась повышенной, превышая исходный показатель в среднем



Р и с. 1. Изменения нормированных параметров ЭМГ-активности диафрагмы при действии острой гипоксии (12 % O₂) в контроле и после введения блокатора ГАМК_A-рецепторов бикукулина метиоидида (БКМ). А – динамика интегральной интенсивности, Б – амплитуды, В – частоты ЭМГ-разрядов. За 100 % приняты значения в исходном состоянии (до воздействия гипоксии). 1 – контроль, 2 – контроль после введения БКМ, 3 – животные с индуцированной ротеноном митохондриальной дисфункцией (МХД), 4 – животные с МХД после введения БКМ.

Р и с. 1. Зміни нормованих параметрів ЕМГ-активності діафрагми при дії гострої гіпоксії (12 % O₂) у контролі та після введення блокатора ГАМК_A-рецепторів бікукуліну метіюїду.



Р и с. 2. Парциальное давление кислорода (PaO₂) в артериальной крови (А) и рН крови (Б) контрольных крыс и крыс с индуцированной ротеноном митохондриальной дисфункцией (МХД) до и после введения блокатора ГАМК_A-рецепторов бикукулина метиоидида (БКМ). 1 – контрольные животные, 2 – контрольные животные после введения БКМ, 3 – МХД-животные, 4 – МХД-животные после введения БКМ. Белыми и заштрихованными столбиками обозначены значения параметров в момент начала дыхания гипоксической смесью (0 мин) и спустя 2.5 мин соответственно.

Р и с. 2. Парціальний тиск кисню (PaO₂) в артеріальній крові (А) та рН крові (Б) контрольних щурів і щурів з індукованою ротеноном мітохондріальною дисфункцією до та після введення блокатора ГАМК_A-рецепторів бікукуліну метіюїду (БКМ).

на 40 % ($P < 0.05$). Частота же інтегральної ЕМГ-активності діафрагмальної м'язи претерпівала значительно менші зміни; нормований приріст цього показателя становив всього 25 %.

Парціальне тиск кисню в крові (PaO₂) і рН крові (рис. 2, А, Б) вимірялись в існуючому стані (що на малюнку відповідає 0 хв) і через 150 с після початку вдихання гіпоксическої суміші. Як уже згадувалось, останній часовий інтервал відповідав фазі депресії вентиляції. Зміни згаданих параметрів (PaO₂ і рН) во всіх групах тварин показали, що ці індекси в кінці тест-періоду суттєво не відрізнялись від початкових. Таким чином, относительно кратковременная гипоксическая нагрузка (2.5 мин) не сопровождалась значительными изме-

нениями газового состава и концентрации ионов водорода в крови, причем данные показатели как до, так и после введения блокатора ГАМК_A-рецепторов (БКм) были весьма близки.

ЭМГ-показатели HVR контрольных животных после введения биксукуллина. Блокирование ГАМК_A-рецепторов посредством введения БКм обуславливало ряд определенных изменений практически всех характеристик ЭМГ-активности диафрагмы. Интегральная интенсивность ЭМГ-разрядов диафрагмальной мышцы после введения БКм существенно превышала соответствующие значения, отмечаемые без такого воздействия, на протяжении всего периода наблюдения (рис. 1, А). Пиковое значение MDO, как и у контрольных животных, достигалось примерно через 60 с от начала вдыхания гипоксической смеси, но относительный прирост этого параметра после введения БКм становился заметно большим, чем до такого введения (на 24 %, $P < 0.05$). Повышенные значения MDO сохранялись и во второй фазе развития HVR. Последняя характеризовалась достаточно выраженным эффектом roll-off, но в конце периода наблюдения (через 150 с после начала вдыхания гипоксической смеси) величина MDO все же оставалась увеличенной в среднем на 30 % ($P < 0.05$) по сравнению с контрольным значением. Динамика амплитуды ЭМГ-разрядов, генерируемых диафрагмальной мышцей, после введения БКм также сильно изменялась. В частности, максимальное значение амплитуды ЭМГ-разрядов при гипоксической нагрузке достигалось намного раньше – через 30 с после начала вдыхания гипоксической газовой смеси (а не через 120 с, как в контроле) (А). Вторая фаза HVR после блокирования ГАМК_A-рецепторов характеризовалась более существенным падением амплитуды ЭМГ-активности диафрагмы. В упомянутой конечной точке (на 150-й с регистрации HVR) усредненное значение амплитуды разрядов после введения БКм было на 53 % меньше, чем в начальный момент периода наблюдения ($P < 0.05$). Частота ЭМГ-активности диафрагмы в условиях введения антагониста ГАМК демонстрировала противоположные сдвиги. После инъекции БКм максимальное значение частоты достигалось не через 60, а лишь через 90 с после начала вдыхания гипоксической смеси. При этом частота респираторных ЭМГ-разрядов у животных, подвергнутых действию БКм, более чем в 2.5 раза превышала исходное значение. Напомним, что в контроле в пределах упомянутого временного промежутка (90 с) HVR уже вступал

во вторую фазу, соответствующую депрессии вентиляции (В). Через 150 с действия гипоксической нагрузки среднее значение частоты ЭМГ-разрядов после введения БКм, продолжало значительно (на 79 %) превышать исходное значение этого показателя ($P < 0.05$).

Значения PaO₂ и pH крови контрольных животных, измеренные при вдыхании гипоксической смеси на фоне блокирования ГАМК_A-рецепторов, не отражали каких-либо существенных специфических изменений (рис. 2, А, Б).

ЭМГ-показатели HVR крыс с дисфункцией МХ (МХД). Введение ротенона, которое обуславливало неспецифическое угнетение активности комплекса I дыхательной цепи МХ и последующее снижение продукции АТФ, сопровождалось у животных развитием состояния, носящего признаки МХД. Для HVR при дыхании смесью с низким PO₂, наблюдаемых у животных с МХД, были характерны сравнительно слабые изменения MDO (рис. 1, А). Этот показатель был весьма незначительно увеличен на протяжении 60–90 с наблюдения, а затем снижался. В конце регистрации HVR значения MDO у животных с МХД становились меньше, чем таковые у контрольных крыс, примерно в два раза ($P < 0.05$). Кроме того, для ответов на гипоксическую нагрузку у животных с МХД было характерно превалирование изменений амплитуды диафрагмальной ЭМГ-активности, а не ее частоты (Б). Прирост амплитуды ЭМГ-разрядов в максимальной точке реакции составлял 126 %, причем максимальный инкремент амплитуды отмечался несколько раньше (через 90 с), чем у контрольных крыс (различия средних значений данного параметра в указанных группах не достигали уровня достоверности). В то же время частота ЭМГ-активности диафрагмы в условиях МХД на протяжении всего периода действия гипоксической нагрузки не повышалась, а прогрессивно снижалась (Б). Соответствующий график утрачивал характерную двухфазную форму, и частота ЭМГ-разрядов в конце периода изменений составляла всего 48 % исходного показателя ($P < 0.05$). Более того, в конце HVR частота ЭМГ-разрядов диафрагмы крыс с МХД была более чем вдвое (на 56 %) ниже, чем аналогичное значение у контрольных животных ($P < 0.05$). Таким образом, очевидно, что развитие МХД у крыс обуславливало выраженное подавление электрической активности основной дыхательной мышцы.

Анализ PaO₂ и pH крови животных с МХД после действия гипоксической нагрузки (рис. 2, А, Б) не

выявил их отклонений от аналогичных показателей у контрольных животных.

ЭМГ-показатели HVR у крыс с МХД после введения бикукуллина. Наблюдаемая у животных с МХД и блокадой ГАМК_A-рецепторов динамика изменений MDO выглядела как примерно линейное возрастание данного параметра на протяжении почти всего периода измерения, за исключением короткой фазы относительной депрессии на последнем 30-секундном отрезке респираторного ответа. Таким образом, у крыс с МХД максимальное значение MDO достигалось только через 120 с действия гипоксической нагрузки. Прирост MDO на фоне блокирования ГАМК_A-рецепторов на максимуме HVR был практически двукратным ($P < 0.05$) по сравнению с исходными значениями у животных с МХД и контрольных крыс. Амплитуда ЭМГ-разрядов диафрагмы у крыс с МХД, находящихся под воздействием БКм, демонстрировала динамику, в значительной степени сходную с таковой MDO; она монотонно возрастала в течение 150 с, а затем в течение оставшихся 30 с незначительно уменьшалась (рис. 1, Б). После введения БКм максимальное значение амплитуды ЭМГ-разрядов диафрагмальной мышцы достигалось несколько позже, на 120-й с, а не через 90 с, как у крыс с МХД до введения блокаатора (Б). Разница этого показателя у контрольных крыс и животных с МХД, подвергнутых блокированию ГАМК_A-рецепторов, была несущественной. Гораздо более значительным оказался эффект введения БКм у крыс с МХД в отношении частоты ЭМГ-активности диафрагмы (В). Действие БКм обуславливало значительное увеличение частоты ЭМГ-активности диафрагмы на всех временных отрезках HVR. На отметке 90 с блокирование ГАМК_A-рецепторов способствовало двукратному возрастанию частоты ЭМГ-разрядов ($P < 0.05$) по сравнению с тем, что аналогичный показатель при МХД до блокирования демонстрировал монотонно возраставшее падение. Значительные различия частоты ЭМГ-разрядов у крыс с МХД в условиях наличия и отсутствия блокирования ГАМК_A-рецепторов были весьма четко выражены в конце HVR (на 150-й с). Таким образом, очевидно, что введение БКм животным с МХД обуславливало более существенные изменения динамики частоты, амплитуды и MDO ЭМГ-активности диафрагмы по сравнению с таковой у контрольных крыс; при МХД эффект блокирования ГАМК_A-рецепторов приобретал особую выраженность во второй фазе HVR.

Параметры, отражающие состояние системы эн-

догенных химических стимулов дыхания в крови в условиях действия гипоксической нагрузки, у крыс с МХД и контрольных животных, подвергнутых и не подвергнутых блокированию ГАМК_A-рецепторов, не демонстрировали существенных различий (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Как упоминалось выше, формирование HVR определяется активностью двух основных структур системы управления внешним дыханием – рецепторной (КГ) и центральной (ДЦ) [13]. Динамика HVR характеризуется наличием двух фаз – гипервентиляции и депрессии вентиляции (так называемый эффект roll-off; при острой гипоксии этот эффект проявляется в течение нескольких минут действия гипоксической нагрузки) [10–13]. Есть основания полагать, что именно КГ являются существенным элементом, необходимым для формирования двухфазности HVR [20–22]. Хемоденервация, обеспечиваемая двухсторонней резекцией КГ, не только устраняет начальную фазу респираторного ответа на острую гипоксию (фазу гипервентиляции), но и отменяет сам эффект roll-off; это было обнаружено у многих видов животных и человека [21, 22]. Установлено, что стимуляция КГ при снижении PO₂ вызывает высвобождение возбуждательного медиатора (глутамата) в каудальной части NTS [23, 24]; как хемоденервация КГ, так и блокирование высвобождения глутамата в ДЦ полностью отменяют развитие гипервентиляции в условиях снижения PO₂ [23]. Регистрация активности *n. phrenicus* при гипоксии свидетельствовала о том, что эффект roll-off сопряжен с ростом концентрации тормозных медиаторов (ГАМК и таурина) в области медуллярной вентролатеральной поверхности (ВЛМ) [24]. Аппликация антагониста ГАМК_A-рецепторов бикукуллина на эту поверхность сопровождалась увеличением интенсивности разрядов в волокнах *n. phrenicus* без ее последующего заметного снижения, присущего заключительной фазе респираторной реакции на экспозицию к гипоксии [25, 26]. Таким образом, в настоящее время наиболее широко распространены представления о том, что повышение интенсивности вентиляции со снижением PO₂ во вдыхаемом воздухе тесно связано с активностью КГ и, прежде всего, с проявлениями эффекта основного возбуждательного медиатора (глутамата), высвобождающегося в ДЦ. В то же время

именно ГАМК как ведущему тормозному медиатору на уровне ДЦ отводится основная роль в развитии феномена *roll-off* при экспозиции к гипоксии в условиях сохранения афферентной активности, поступающей от КГ.

Для выявления степени вовлечения ГАМК-эргического звена в механизмы формирования HVR мы использовали способность ротенона блокировать комплекс I дыхательной цепи МХ. Ротенон не обладает селективным действием на митохондриальные процессы каких-либо отдельных структур и способен воздействовать на дыхательную цепь МХ всех клеток [18], включая клеточные компоненты ДЦ, расположенные в продолговатом мозгу [19], и периферические хеморецепторные клетки I типа, находящиеся в КГ [27].

Как описывалось выше, развитие МХД у крыс приводило к снижению значений интегральной интенсивности диафрагмальной ЭМГ-активности, прежде всего, за счет критического падения частоты ЭМГ-разрядов диафрагмальной мышцы при относительной стабильности значений амплитуды этих разрядов, что сопровождалось весьма низкими значениями HVR, т. е., в общем, слабой выраженностью данного ответа. Очевидно, что системное введение ротенона должно оказывать влияние как на уровне структур ДЦ, так и на уровне КГ как основного источника рецепторной респираторной активности в условиях гипоксии [27]. Соответствующие изменения, видимо, можно рассматривать как своего рода окклюзию либо частичную химическую денервацию КГ, что и проявлялось в особенностях формирования HVR у крыс с МХД. Результаты опытов с хирургическим перерыванием путей, идущих от КГ (перерезкой СКН) у кроликов [28] продемонстрировали, что экспозиция таких животных к гипоксии сопровождается существенным снижением частоты дыхания, уменьшением амплитуды дыхательных движений и минутного объема вентиляции. Упомянутые эффекты рассматривались в основном как результат действия сниженного PO_2 на нейроны ДЦ. Вместе с тем, анализ микродиагностов, отобранных в хемочувствительных участках ВЛМ, показал, что у денервированных животных отмечалась повышенная концентрация ГАМК по сравнению с таковой в образцах, взятых в интактной группе [24]. В дальнейшем у денервированных животных уровень ГАМК на поверхности ВЛМ в условиях экспозиции к гипоксии не увеличивался. По-видимому, в изучаемых зонах ВЛМ максимальная концентрация ГАМК достигалась не-

посредственно в результате хемоденервации, и последующее снижение PO_2 не представляло собой эффективного стимула для синтеза/высвобождения ГАМК [24].

По-видимому, при анализе результатов нашего исследования логично предполагать, что результатом нарушения хеморецепторной функции КГ и изменения энергетического/нейротрансмиссивного статуса нейронов продолговатого мозга, обусловленных развитием МХД, являются сдвиги в метаболизме/высвобождении ГАМК в ДЦ. Вероятное наличие относительно высоких концентраций ГАМК в определенных ядрах ДЦ у крыс с МХД обуславливало относительное снижение электрической активности диафрагмальной мышцы и трансформацию паттерна этой активности [29].

Поскольку КГ считают полимодальной сенсорной структурой [9, 30, 31], в которой медиаторную активность реализуют достаточно большое количество агентов (в частности, ацетилхолин, дофамин, серотонин, ГАМК и АТФ), следует учитывать, что в условиях наших экспериментов определенный вклад в наблюдаемые изменения вносит снижение продукции АТФ (являющегося трансмиссивом в хеморецепторных клетках I типа КГ) под воздействием ротенона. Этот фактор, видимо, влияет на процессы хемотрансдукции и модулирует динамику HVR у МХД-крыс. Есть мнение, что АТФ является одним из ключевых трансмиссивом в КГ [31]. В пользу участия АТФ в процессах сенсорной трансдукции уровня PO_2 в КГ свидетельствуют высвобождение АТФ из хеморецепторных клеток I типа под действием гипоксии *in vitro* [32], а также существенное ослабление HVR у мышей с генетическим дефектом субъединицы P2X2 пуринергических рецепторов, локализованных на афферентных терминалах СКН [33]. Интересно, что P2X3-нокаутные животные демонстрируют практически нормальную величину HVR. Это, однако, сочетается со значительным снижением афферентной активности в волокнах СКН в условиях нормоксии [33]. Данный факт еще раз указывает на тесную связь функции пуринергических P2X-рецепторов с обеспечением сенсорной трансдукции в КГ. Кроме того, в опытах, проведенных на совместной культуре нейронов каменистого ганглия (*gangl. petrosum* – GP, нижнего шейного ганглия языкоглоточного нерва) и КГ крыс, удалось выявить взаимодействие P2X- и ГАМК_A-рецепторов, опосредуемое механизмом шунтирования (ГАМК_A-шунтирующее торможение) [9]. Оказалось, что активация ГАМК_A-рецепторов

может обуславливать «короткое замыкание» возбудительных синаптических токов, вызываемых действием АТФ [9]. Все упомянутые факты свидетельствуют в пользу наличия тесного взаимодействия ГАМК и АТФ в периферических механизмах регуляции дыхания.

По-видимому, следует полагать, что у животных с МХД «окклюзия» активности КГ при рецепции PO_2 способна реализоваться в соответствующие изменения хемотрансдукции и передачи афферентных сигналов в ДЦ. Вследствие развития упомянутых изменений в работе периферических хеморецепторов у крыс с МХД характеристики эфферентной команды сформированной в ДЦ и поступающей из него, определяют существенные ограничения активности мышц диафрагмы при гипоксической стимуляции на всех этапах HVR.

Как известно, бичукуллин является селективным конкурентным антагонистом ионотропных ГАМК_A-рецепторов. Последние обладают пентамерными лигандзависимыми ионными хлорными каналами, в структуру которых входит цистеиновая петля. К соответствующему семейству относятся также никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, глициновые рецепторы и серотониновые рецепторы 5-HT₃. В нашем исследовании мы использовали БКм (бичукуллина метиодид). Этот препарат отличается тем, что не проникает через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ). В то же время другой часто используемый препарат бичукуллина – бичукуллина хлорид – проявляет выраженные фармакологические эффекты в отношении ГАМК_A-рецепторов по обе стороны ГЭБ – и в КГ, и в ДЦ [34].

В стволе мозга ГАМК и ее агонисты подавляют активность нейронов дорсальной и вентральной респираторной групп [35], что сопровождается депрессией вентиляции в условиях как нормоксии, так и гипоксии [36, 37]. Аппликация бичукуллина, т. е. блокатора ГАМК_A-рецепторов, на перфузируемые КГ после предшествующего введения агонистов ГАМК восстанавливала хеморецепторную активность этих образований, генерируемую в ответ на гипоксическую стимуляцию [37]. Данный факт весьма убедительно указывает на участие ГАМК_A-рецепторов в передаче афферентного сигнала при снижении PO_2 . Было установлено, что аппликация бичукуллина на поверхность ВЛМ способствует увеличению интенсивности вентиляции и приводит к усилению активности, регистрируемой в *p. phrenicus* [25, 26]. Таким образом, можно заключить, что приведенные выше факты напрямую свя-

зывают ГАМК-эргический аппарат с механизмами формирования спонтанной респираторной активности в условиях как нормоксии, так и гипоксии.

Блокирование периферических ГАМК_A-рецепторов посредством введения БКм в наших экспериментах позволило выявить ряд особенностей формирования диафрагмальной ЭМГ-активности в ответ на дыхание гипоксической смесью. Такое блокирование ГАМК_A-рецепторов у контрольных животных обуславливало увеличение всех нормированных параметров ЭМГ-активности диафрагмальной мышцы, отражающих развитие HVR. При этом эффект БКм был особенно выражен в пределах фазы гипервентиляции, т. е. фазы, которая опосредуется в первую очередь активностью КГ. Данное наблюдение позволяет предполагать, что ГАМК_A-рецепторы принимают непосредственное участие в процессах хемотрансдукции на уровне периферических хеморецепторов. Как упоминалось выше, постсинаптическая тормозная роль ГАМК, реализуемая через ГАМК_A-рецепторы, достаточно хорошо выявляется в условиях кокультуры клеток КГ и GP [9]. Наличие ГАМК_A-рецепторов на нейронах GP и терминалях СКН в срезах КГ крыс было подтверждено иммуногистохимически [9]. В кокультуре КГ и GP, подвергнутой экспозиции к гипоксии, БК оказывал существенное влияние на импульсную активность прежде всего нейронов GP, но не хеморецепторных клеток I типа КГ [9]. Этот факт еще раз подтверждает предположение о тормозной медиаторной функции ГАМК в периферических механизмах регуляции дыхания и вовлеченности ГАМК_A-рецепторов постсинаптических мембран афферентных волокон СКН в формирование респираторной активности, обусловленной влияниями КГ.

Результаты исследований внешнего дыхания у животных и людей, подвергшихся резекции КГ [21, 22], продемонстрировали, что в этих условиях в пределах редуцированного HVR нельзя четко выделить ни фазы гипервентиляции, ни фазы депрессии. Данное обстоятельство является убедительным свидетельством непосредственного участия КГ в формировании обоих этапов респираторной реакции на отклонения PO_2 во вдыхаемом воздухе. Наблюдения за людьми, перенесшими одностороннюю резекцию КГ [22], показали, что характерный двухфазный профиль изменения интенсивности вентиляции в ответ на гипоксическую стимуляцию после частичной денервации у них сохранялся, однако абсолютная величина этого ответа становилась значи-

тельно меньшей, чем у здоровых людей. С другой стороны, у людей с односторонней резекцией КГ фаза подавления HVR была достоверно большей, чем у здоровых субъектов [22]. Таким образом, можно заключить, что при экспозиции к гипоксии приток афферентной импульсации от КГ является необходимым фактором в пределах не только фазы гипервентиляции, но и периода депрессии вентиляции. По-видимому, наши данные о значениях нормированных показателей интегральной ЭМГ-активности диафрагмы при гипоксической нагрузке также указывают на существенное участие ГАМК-эргического аппарата КГ в формировании эффекта roll-off. Введение «периферической» формы антагониста ГАМК_A-рецепторов (БКм) значительно уменьшало декремент кривой именно на завершающем этапе развития HVR.

Основной эффект введения БКм у крыс с МХД представлял собой существенное увеличение интегральной ЭМГ-активности диафрагмы, которое было максимально выражено в фазе депрессии HVR. Несмотря на то что динамика параметров ЭМГ-разрядов в пределах упомянутой фазы у животных исследованных групп была в целом сходной, у крыс с МХД на этапе депрессии HVR интегральная ЭМГ-активность диафрагмальной мышцы в случае воздействия БКм значительно превышала аналогичный показатель у контрольных животных; при этом были увеличены и частота, и амплитуда рассматриваемых разрядов.

Как упоминалось выше, феномен roll-off, видимо, определяется некой суммой событий на уровнях КГ [21, 22] и ядер ДЦ [24]. Более пологий характер восходящей части графиков нормированных показателей ЭМГ-активности после воздействия БКм, отражающих развитие HVR у животных с МХД, указывал на сохранение окклюзии афферентной активности КГ, которую не «нормализовало» даже блокирование ГАМК_A-рецепторов. Если предположить, что крысы с МХД отличаются повышенной концентрацией ГАМК и модифицированным метаболизмом этого трансммитера на поверхности ВЛМ вследствие окклюзии процессов хемотрансдукции в КГ, следует учесть целый ряд факторов, способных влиять на характеристики функционирования ГАМК-эргического аппарата при рецепции PO₂ и формировании соответствующей респираторной активности в упомянутой ситуации. Результаты изучения дыхательных реакций крыс линии Цукер (Zucker), для которых характерны ожирение и усиление синтеза ГАМК в стволе мозга [34], пока-

зали, что у этих животных блокирование ГАМК_A-рецепторов путем введения БКм не вызывало каких-либо изменений вентиляции вследствие снижения PO₂ во вдыхаемом воздухе. Введение же таким животным бикакуллина хлорида (обеспечивающего и «периферический», и «центральный» эффекты) при экспозиции к гипоксии увеличивало глубину дыхания, но практически не воздействовало на интенсивность вентиляции за счет снижения частоты дыхательных движений [34], что указывало на способность центрального пула ГАМК существенно модулировать паттерн HVR. Одновременно в других исследованиях [28] был выявлен парадоксальный эффект ГАМК в случае ее введения в боковые желудочки мозга. При вдыхании гипоксической смеси увеличивались все параметры вентиляции, и парадоксальная гипервентиляция в условиях дыхания гипоксической смесью после внутрижелудочкового введения ГАМК наблюдалась и у контрольных, и у денервированных животных [28]. Данный факт мог объясняться предотвращением конверсии глутамата в ГАМК за счет ингибирования ГАД (основного фермента синтеза ГАМК из глутамата) и последующим повышением концентрации самого глутамата.

Очевидно, влияние избыточной/экзогенной ГАМК может затрагивать разные классы ГАМК-рецепторов в респираторных медуллярных ядрах и воздействовать на функционально различные нейросети ДЦ, а также индуцировать сложные модуляционные взаимодействия с другими трансммитерами [29] (например, с глутаматом). Все это может приводить к достаточно сложным перестройкам объемно-временных показателей HVR. Вместе с тем феноменология динамики гипервентиляции и эффекта roll-off у животных с МХД, подвергнутых воздействию БКм, видимо, обуславливается некой суммой эффекта увеличения интенсивности афферентной импульсации, поступающей от КГ, и парадоксального «центрального» эффекта ГАМК.

Таким образом, с учетом полученных экспериментальных данных можно заключить, что ГАМК-эргический аппарат КГ вовлечен в формирование обеих фаз ответа на действие гипоксической стимуляции (и гипервентиляции, и депрессии дыхания), причем и в контроле и в условиях митохондриальной дисфункции. Специфика динамики нормированных показателей ЭМГ-активности диафрагмальной мышцы при гипоксической нагрузке на фоне МХД, по-видимому, указывает на то, что ГАМК и АТФ в периферических механизмах регуляции ды-

хания тесно взаимодействуют в процессе рецепции PO₂. Упомянутый момент находит отражение в работе центрального звена системы управления внешним дыханием, которое формирует эфферентные команды, направляемые к диафрагмальной мышце.

Исследования выполнялись в соответствии с положениями Международной конвенции по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1985), а также Положениям комитета по биоэтике Института физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины.

Автор настоящей работы – Е. Э. Колесникова – подтверждает отсутствие конфликтов любого рода, касающихся коммерческих или финансовых отношений, отношений с организациями или лицами, которые каким-либо образом могли быть связаны с исследованием.

Є. Є. Колеснікова¹

ГАМК_A-РЕЦЕПТОРИ: УЧАСТЬ У ФОРМУВАННІ ДИХАЛЬНОЇ РЕАКЦІЇ НА ГІПОКСИЧНУ СТИМУЛЯЦІЮ ПРИ МІТОХОНДРІАЛЬНІЙ ДИСФУНКЦІЇ

¹Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

Резюме

У досліджах на щурах лінії Вістар досліджували роль стану ГАМК_A-рецепторів у формуванні респіраторної відповіді на гіпоксичне навантаження в умовах норми та експериментальної мітохондріальної дисфункції, викликаній одноразовим системним введенням ротенону – неселективного блокатора комплексу I дихального ланцюга мітохондрій (3 мг/кг). Об'ємно-часові параметри дихання характеризували відповідно до параметрів респіраторних ЕМГ-розрядів діафрагмального м'яза (амплітуди, частоти та інтегральної інтенсивності). Зміни ЕМГ-активності діафрагми, викликані вдиханням гіпоксичної суміші (12 % O₂ + 88 % N₂), оцінювали у контрольних щурів і тварин із мітохондріальною дисфункцією до та після введення блокатора ГАМК_A-рецепторів бікукуліну (бікукуліну метіодиду, 1.0 мг/кг). Розвиток мітохондріальної дисфункції супроводжувався пригніченням респіраторної реакції на гіпоксичне навантаження, що знаходило прояв у драматичному зменшенні частоти та інтегральної ЕМГ-розрядів діафрагмального м'яза. Подібні результати можуть розглядатись як свідчення істотного залучення ГАМК_A-рецепторів, розташованих на постсинаптичних мембранах периферичних хеморецепторів, у формування респіраторної відповіді на гіпоксичну стимуляцію (включно зі стадією депресії вентиляції), причому це відмічалось і у контрольних щурів, і у тварин із мітохондріальною дисфункцією. Участь ГАМК-ергічної ланки у форму-

ванні респіраторної активності при гіпоксичній стимуляції набуває особливої значущості в умовах експериментальної мітохондріальної дисфункції. Така дисфункція зумовлює оклюзію аферентної імпульсації, що надходить від периферичних хеморецепторів.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. F. E. Bloom and L. L. Iversen, "Localizing ³H-GABA in nerve microscopic autoradiography," *Nature*, **229**, No. 5287, 628-630 (1971).
2. R. A. Mueller, D. B. A. Lundberg, G. R. Breese, et al., "The neuropharmacology of respiratory control," *Pharmacol. Rev.*, **34**, No. 3, 255-285 (1982).
3. C. A. Livingston and A. J. Berger, "Immunohistochemical localization of GABA in neurons projecting to the ventrolateral nucleus of the solitary tract," *Brain Res.*, **494**, No. 1, 143-150 (1989).
4. J. Lipski, H. J. Waldvogel, P. Pilowski, and C. Jiang, "GABA-immunoreactive boutons make synapses with inspiratory neurons of the dorsal respiratory group," *Brain Res.*, **529**, Nos. 1/2, 309-314 (1990).
5. I. R. Moss, M. Denavit-Saubie, F. L. Eldrige, et al., "Neuromodulators and transmitters in respiratory control," *Fed. Proc.*, **45**, No. 7, 2133-2147 (1986).
6. Y. Oomori, K. Nakaya, H. Tanaka, et al., "Immunohistochemical and histochemical evidence for the presence of noradrenalin, serotonin and gamma-aminobutyric acid in chief cells of the mouse carotid body," *Cell Tissue Res.*, **278**, No. 2, 249-254 (1994).
7. M. Pokorski and S. Ohtani, "GABA immunoreactivity in chemoreceptor cells of the cat carotid body," *Acta Histochem. Cytochem.*, **32**, 179-182 (1999).
8. I. M. Fearon, M. Zhang, C. Vollmer, and C. A. Nurse, "GABA mediates autoreceptor feedback inhibition in the rat carotid body via presynaptic GABA_B receptors and TASK-1," *J. Physiol.*, **553**, Part 3, 83-94 (2003).
9. M. Zhang, K. Clarke, H. Zhong, et al., "Postsynaptic action of GABA in modulating sensory transmission in co-culture of rat carotid body via GABA_A receptors," *J. Physiol.*, **587**, No. 2, 329-344 (2009).
10. P. A. Easton, L. J. Slykerman, and N. R. Antoniesen, "Ventilatory response to sustained hypoxia in normal adults," *J. Appl. Physiol.*, **61**, No. 3, 906-911 (1986).
11. G. E. Bisgard and J. A. Neubauer, "Peripheral and central effects of hypoxia," in: *Lung Biology in Health and Disease*, Marcel Dekker, New York (1995), pp. 617-668.
12. J. Neubauer, J. E. Melton, and N. H. Edelman, "Modulation of respiration during brain hypoxia," *J. Appl. Physiol.*, **68**, No. 2, 1462-1470 (1990).
13. L. J. Teppema and A. Dahan, "The ventilatory response to hypoxia in mammals: mechanisms, measurement, and analysis," *Physiol. Rev.*, **90**, No. 2, 675-754 (2010).
14. P. N. McWilliam and S. L. Sheppard, "A GABA-mediated inhibition of neurons of nucleus tractus solitarius of the cat that respond to electrical stimulation of the carotid sinus nerve," *Neurosci. Lett.*, **94**, No. 3, 321-326 (1988).
15. J. D. Wood, W. J. Watson, and A. J. Drucker, "The effect of hypoxia on brain gamma-amino butyric acid levels," *J. Neurochem.*, **15**, No. 7, 603-608 (1968).

16. J. E. Madl and S. M. Royer, "Glutamate dependence of GABA levels in neurons of hypoxic and hypoglycemic rat hippocampal slices," *Neuroscience*, **96**, No. 4, 657-664 (2000).
17. M. Pokorski, E. Kolesnikova, M. Marczak, and K. Budzinska, "Neurotransmitter mechanisms in the enhancement of the hypoxic ventilatory response by antecedent hyperoxia in the anesthetized rat," *J. Physiol. Pharmacol. (Acta Pol.)*, **56**, 433-446 (2005).
18. R. Betarbet, T. B. Sherer, G. MacKenzie, et al., "Chronic systemic pesticide exposure reproduces feature of Parkinson's disease," *Nat. Neurosci.*, **3**, No. 12, 1301-1306 (2000).
19. Е. Э. Колесникова, В. И. Носарь, И. Н. Маньковская, Т. В. Серебровская, "Девиации энергетического метаболизма нейронов ствола мозга при старении и экспериментальной митохондриальной дисфункции, вызванной ротеноном", *Нейрофизиология / Neurophysiology*, **44**, № 1, 18-24 (2012).
20. J. V. Weil, "Ventilatory response to CO₂ and hypoxia after sustained hypoxia in awake cats," *J. Appl. Physiol.*, **76**, No. 6, 2251-2252 (1994).
21. W. Q. Long, G. G. Giesbrecht, and N. R. Anthonisen, "Ventilatory response to moderate hypoxia in awake chemodenervated cats," *J. Appl. Physiol.*, **74**, No. 2, 805-810 (1993).
22. H. Kimura, M. Tanaka, K. Nagao, et al., "A new aspect of the carotid body function controlling hypoxic ventilatory decline in humans," *Appl. Human Sci.*, **17**, No. 4, 131-137 (1998).
23. R. C. Ang, B. Hoop, and H. Kazemi, "Role of glutamate as the central neurotransmitter in the hypoxic ventilatory response," *J. Appl. Physiol.*, **72**, No. 4, 1480-1487 (1992).
24. B. Hoop, J. L. Beagle, T. J. Maher, and H. Kazemi, "Brainstem amino acid neurotransmitters and hypoxic ventilatory response," *Respirat. Physiol.*, **118**, 117-129 (1999).
25. J. I. Melton, J. A. Neubauer, and N. H. Edelman, "GABA antagonism reverses hypoxic ventilatory depression in the cat," *J. Appl. Physiol.*, **69**, No. 4, 1296-1301 (1990).
26. I. Soto-Arape, M. D. Burton, and H. Kazemi, "Central amino acid neurotransmitters and hypoxic ventilatory response," *Am. J. Respirat. Crit. Care Med.*, **151**, 1113-1120 (1995).
27. P. Ortega-Saenz, R. Pardal, M. Garcia-Fernandez, and J. Lopez-Barneo, "Rotenone selectively occludes sensitivity to hypoxia in rat carotid body glomus cells," *J. Physiol.*, **548**, No. 3, 789-800 (2003).
28. N. K. Yelmen, "The role of gamma-aminobutyric acid and glutamate for hypoxic ventilatory response in anesthetized rabbit," *Tohoku J. Exp. Med.*, **203**, 219-232 (2004).
29. Н. Г. Маньшина, О. А. Ведясова, "Сравнительный анализ респираторных реакций на микроинъекции ГАМК и пенициллина в комплекс Бетцингера и комплекс пре-Бетцингера у крыс", *Вест. СамГУ (Естественнонауч. Серия)*, **94**, № 3/1, 210-218 (2012).
30. R. Itturiaga, R. Varas, and J. Alcayaga, "Electrical and pharmacological properties petrosal ganglion neurons that innervate the carotid body," *Respirat. Physiol. Neurobiol.*, **157**, 130-139 (2007).
31. C. A. Nurse, "Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms at peripheral arterial chemoreceptors," *Exp. Physiol.*, **95**, No. 6, 657-667 (2010).
32. J. Buttigieg and C. A. Nurse, "Detection of hypoxia-evoked ATP release from chemoreceptor cells of the rat carotid body," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **322**, No. 1, 82-87 (2004).
33. W. Rong, A. V. Gourine, D. A. Cockaine, et al., "Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory response to hypoxia," *J. Neurosci.*, **23**, No. 36, 11315-11321 (2003).
34. Т.-В. Лин, М.-Д. Ло, С.-Д. Хуанг, et al., "GABAergic modulation of ventilatory response to acute and sustained hypoxia in obese Zucker rats," *Int. J. Obesity*, **29**, 188-195 (2005).
35. J. Champagnat, M. Denavit-Saubie, S. Moyanova, and G. Rondoum, "Involvement of aminoacids in periodic inhibitions of bulbar respiratory neurons," *Brain Res.*, **237**, No. 2, 351-365 (1982).
36. A. M. Taveira-Da Silva, B. Hartley, P. Hamosh, et al., "Respiratory depressant effect of GABA alpha and beta-receptor agonist in the cat," *J. Appl. Physiol.*, **62**, No. 6, 2264-2272 (1987).
37. M. Shirahata, "Neurotransmission in the carotid body and anesthesia," *J. Anesth.*, **16**, No. 4, 298-309 (2002).