

# Магнитно-резонансная спектроскопия нейрометаболитов гиппокампа и стриатума при синдроме посттравматических стрессорных расстройств

В.Э. Цейликман<sup>1</sup>✉, О.Б. Шевелев<sup>2</sup>, Н.В. Хоцкий<sup>2</sup>, А.С. Доценко<sup>2</sup>, Г.В. Концевая<sup>2</sup>, М.С. Лапшин<sup>1</sup>, М.П. Мошкин<sup>2</sup>, М.В. Комелькова<sup>1</sup>, И.В. Фекличева<sup>1</sup>, О.Б. Цейликман<sup>1</sup>, И.В. Дременков<sup>3</sup>, Е.Л. Завьялов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Институт молекулярной физиологии и генетики, Академия наук Словакии, Братислава, Словацкая Республика

Методом <sup>1</sup>H магнитно-резонансной спектроскопии исследовали спектр метаболитов в дорзальной области гиппокампа и стриатума у крыс линии Wistar при экспериментальном моделировании синдрома посттравматического стрессорного расстройства (ПТСР). Через 12 дней после завершения экспериментальной серии стрессорных воздействий, осуществляемых путем экспозиции запаха хищника (кота), у животных был определен уровень тревожности на основе индивидуальных особенностей поведения в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». У крыс с высоким индексом тревожности (> 0.8) отмечены умеренное сниженное по сравнению с контролем содержание кортикостерона в плазме крови; со средними значениями индекса тревожности (0.7–0.8) – повышенный уровень кортикостерона; а с низким индексом тревожности (< 0.7) содержание кортикостерона резко снижено по сравнению с контролем. Крысы со средними значениями индекса тревожности (0.7–0.8) характеризуются повышенным уровнем гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) в гиппокампе и N-ацетиласпартата в стриатуме. В остальных группах уровни всех исследуемых нейрометаболитов как в гиппокампе, так и в стриатуме не отличаются достоверно от контроля. Полученные результаты свидетельствуют о том, что множественные экспозиции психологического стресса, связанного с ощущением близости естественного хищника, у части животных вызывают анксиолитическую реакцию. Для этой группы отмечено резкое снижение концентрации кортикостерона в сочетании с увеличенным содержанием N-ацетиласпартата в стриатуме. У крыс с наиболее высоким индексом тревожности наблюдалось умеренное снижение содержание кортикостерона. При этом количество нейрометаболитов в гиппокампе и стриатуме находилось в пределах контрольных значений. У крыс с промежуточным уровнем тревожности отмечена синхронизация между приростом содержания кортикостерона в плазме крови и содержания ГАМК в гиппокампе. Полученные результаты хорошо согласуются с представлениями о протекторном действии глюкокортикоидов в условиях ПТСР, проявляющемся в сдерживании нарушений психофизиологического статуса. Материалы исследования позволяют детализировать нейробиологические механизмы протекторного действия глюкокортикоидов.

Ключевые слова: ПТСР; нейрометаболиты; кортикостерон; индекс тревожности.

## Magnetic resonance spectroscopy of hippocampal and striatal neurometabolites in experimental PTSD rat modeling

V.E. Tseilikman<sup>1</sup>✉, O.B. Shevelev<sup>2</sup>, N.V. Khotskin<sup>2</sup>, A.S. Dotsenko<sup>2</sup>, G.V. Kontsevaya<sup>2</sup>, M.S. Lapshin<sup>1</sup>, M.P. Moshkin<sup>2</sup>, M.V. Komelkova<sup>1</sup>, I.V. Feklicheva<sup>1</sup>, O.B. Tseilikman<sup>1</sup>, E. Dremencov<sup>3</sup>, E.L. Zavjalov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russia

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Institute of Molecular Physiology and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic

The spectrum of the metabolites in the dorsal region of the hippocampus and striatum was studied using the method of <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy at experimental modeling of the posttraumatic stress disorder syndrome (PTSD) in rats. PTSD was reproduced by exposure of the cat cue to rats daily along 10 day by 10 minutes at once. The anxiety level of animals was estimated 12 days later after the end of the experimental series of stress. Based on the anxiety index, the rats were divided into 3 phenotypes. The animals with an anxiety index > 0.8 (group 1) had lower plasma corticosterone compared with rats from the control group. In animals with an anxiety index in the range 0.7–0.8 (group 2), an elevated corticosterone level was noted. The rats with an anxiety index < 0.7 (group 3) had a lower plasma corticosterone level compared with animals from the control group. Rats of group 2 were characterized by an increased level of GABA in the hippocampus compared with controls. In the remaining groups, the percentages of GABA in the hippocampus and striatum did not differ significantly from the control. The distribution of NAA differed from that of GABA. The highest level of NAA was found in the striatum for rats from group 1, whereas NAA in animals from groups 1 or 3 did not differ from the control. The NAA level in the hippocampus was similar between all groups, including the control. The results obtained indicate that multiple exposures to psychological stress associated with the sense of proximity of a natural enemy in some animals cause an anxiolytic

reaction. These animals are characterized by a stable corticosterone level and a stable level of neurometabolites in the studied structures of the brain. For rats with the highest level of anxiety, a lowered level of corticosterone with a constant level of neurometabolites in the hippocampus and striatum is characteristic. And only in rats with an intermediate level of anxiety, synchronization was observed between the increase in plasma corticosterone and the increase in hippocampal GABA content. The results obtained are in good agreement with the ideas of the protective action of glucocorticoids under PTSD manifested in restraining violations of the psycho-physiological status. The materials allow the neurobiological mechanisms of the protective action of glucocorticoids to be detailed.

**Key words:** PTSD; neurometabolites; corticosterone; anxiety index.

**КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:**

Цейликман В.Э., Шевелев О.Б., Хоцкин Н.В., Доценко А.С., Концевая Г.В., Лапшин М.С., Мошкин М.П., Комелькова М.В., Фекличева И.В., Цейликман О.Б., Дременков И.В., Завьялов Е.Л. Магнитно-резонансная спектроскопия нейрометаболитов гиппокампа и стриатума при синдроме посттравматических стрессорных расстройств. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):783-787. DOI 10.18699/VJ17.293

**HOW TO CITE THIS ARTICLE:**

Tseilikman V.E., Shevelev O.B., Khotskin N.V., Dotsenko A.S., Kontsevaya G.V., Lapshin M.S., Moshkin M.P., Komelkova M.V., Feklicheva I.V., Tseilikman O.B., Dremencov E., Zavjalov E.L. Magnetic resonance spectroscopy of hippocampal and striatal neurometabolites in experimental PTSD rat modeling. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):783-787. DOI 10.18699/VJ17.293 (in Russian)

Состояние посттравматического стрессорного расстройства (ПТСР) возникает как отсроченная реакция на опасные для жизни психологические травмы, такие как боевой стресс во время военной службы, дорожно-транспортные происшествия, стихийные бедствия или террористические нападения (Pitman et al., 2012). ПТСР связано с хроническим психологическим расстройством, которое часто способствует развитию как психических, так и соматических заболеваний. Однако не у всех переживших психологическую травму в дальнейшем развивается ПТСР. В общей когорте лиц, переживших чрезмерные для психического здоровья воздействия, выделяют устойчивых и предрасположенных к развитию симптомов ПТСР (Cohen, Zohar, 2004). Несмотря на многочисленные клинико-экспериментальные исследования, проводимые в различных исследовательских центрах на протяжении последних 30 лет, природа устойчивости к ПТСР остается неизвестной. Тем не менее имеются определенные клинические и экспериментальные наблюдения, которые представляются полезными для выбора главного направления в изучении механизмов развития устойчивости и восприимчивости к ПТСР. Весьма впечатляют данные о том, что введение кортизола лицам, попавшим в автомобильные катастрофы, предупреждает развитие ПТСР (Zohar et al., 2011). Между тем имеются клинические данные о том, что для больных ПТСР характерно наличие низкого уровня кортизола (Yehuda, Seckl, 2011). Следовательно, представляется уместной постановка вопроса о наличии нейропротекторного действия глюкокортикоидов, которое целесообразно рассматривать в качестве механизма устойчивости к развитию симптомов ПТСР в отдаленный период после развития психологической травмы. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе этого феномена, до сих пор не изучены.

Гиппокамп, будучи ведущим когнитивным центром, играет важную роль в развитии устойчивости к стрессорным ситуациям (McEwen, 2017). Более того, комплекс гиппокамп–стриатум включен в формирование активной поведенческой стратегии антистрессорного характера (De Kloet, 2014). При этом гиппокамп вместе с миндалиной и префронтальной корой относятся к глюкокортикоид-зависимым регионам головного мозга (McEwen, 2017). В последнее время появляются данные об участии гиппокампа в торможении тревоги и агрессии. Причем в нейробиологические механизмы, обеспечивающие это полезное свойство гиппокампа, вовлечены такие нейрометаболиты, как гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) и N-ацетиласпартат (Szulc et al., 2011), которые могут быть задействованы и в стриатуме при функционировании комплекса гиппокамп–стриатум. Однако не понятно, как изменение уровня глюкокортикоидов соотносится с изменениями уровня нейрометаболитов в гиппокампе и в стриатуме при экспериментальном моделировании ПТСР у животных, предрасположенных и устойчивых к развитию ПТСР. В настоящее время разделение на восприимчивых и устойчивых к экспериментальному ПТСР проводится на основе предложенного индекса тревожности (Cohen, Zohar, 2004). Целью настоящего исследования было изучение сопряженности изменений индекса тревожности, уровня кортикостерона и содержания нейрометаболитов в гиппокампе и стриатуме у крыс линии Wistar при экспериментальном моделировании ПТСР.

**Материалы и методы**

**Экспериментальные животные.** Исследование проведено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) на 24 половозрелых самцах крыс ли-

нии Wistar, которых содержали однопольными семейными группами по две особи в индивидуально вентилируемых клетках системы Tecniplast при световом режиме свет/темнота 14/10 ч. Корм Sniff (Германия) и воду животным предоставляли *ad libitum*.

**Общий протокол.** Крысы были разделены на две группы: контрольные ( $n = 7$ ) и стрессированные ( $n = 17$ ). Моделирование развития ПТСР проводили экспозицией кошачьей мочи. В течение 10 дней ежедневно в клетки с экспериментальными животными на 10 мин помещали древесные опилки, пропитанные мочой домашнего кота. На протяжении последующих 10 дней дополнительные воздействия не проводились. На 21-й день крыс рассадил в индивидуальные клетки и затем на 23-й день исследовали их поведенческую активность. На 25-й день производили забор крови из хвостовой вены и на 26-й день проводили магнитно-резонансную спектроскопию (МРС) нейрометаболитов в гиппокампе и стриатуме.

**Определение поведенческой активности.** Оценку эмоциональной реакции тревоги у крыс проводили в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» в течение 600 с (10 мин). В качестве интегрального показателя, характеризующего наличие тревожных расстройств, использовали индекс тревожности (ИТ), вычисляемый по следующей формуле (Cohen et al., 2008):

$$\text{ИТ} = 1 - \left( \frac{\text{Время в открытых рукавах}}{\sum \text{Время в лабиринте}} + \frac{\text{Количество заходов в открытые рукава}}{\sum \text{Общее количество заходов}} \right) / 2.$$

На основании значений ИТ животные, подвергнутые ПТСР, были разделены на три фенотипа: фенотип 1 – животные с  $\text{ИТ} < 0.7$  ( $n = 4$ ); фенотип 2 – с  $0.7 \leq \text{ИТ} \leq 0.8$  ( $n = 5$ ); фенотип 3 – с  $\text{ИТ} > 0.8$  ( $n = 8$ ).

**Магнитно-резонансная спектроскопия гиппокампа и стриатума.** Измерения проводили на горизонтальном томографе с напряженностью магнитного поля 11.7 Тесла (Bruker, BioSpec 117/16 USR, Германия). За 5 мин до исследования крыс обездвигивали газовым наркозом (Isofluran, Baxter Healthcare Corp., США) при помощи наркозного аппарата (The Univentor 400 Anaesthesia Unit, Univentor, Мальта). Температуру животных поддерживали благодаря использованию водного контура в томографическом столике-кроватке ( $t = 30$  °C). Под нижнюю часть туловища помещали пневматический датчик дыхания (SA Instruments, Stony Brook, N. Y., США), что позволяло контролировать глубину наркоза.

Все протонные спектры гиппокампа и стриатума крысы получены с использованием передающей объемной (500.3 МГц, диаметр 72/89 мм) и приемной поверхностной (500.3 МГц, размер  $123 \times 64 \times 31$  мм)  $^1\text{H}$  радиочастотных катушек. Для правильного позиционирования спектроскопических вокселей были сняты T2-взвешенные изображения головного мозга крысы высокого разрешения методом RARE (rapid with relaxation enhancement) с параметрами импульсной последовательности TE = 11 мс, TR = 2.5 с (толщина среза 0.5 мм, поле обзора  $2.5 \times 2.5$  см, размер матрицы  $256 \times 256$  точек). Все протонные спектры получены с помощью пространственно-локализованной одновоксельной спектроскопии методом STEAM (stimulated echo

acquisition mode spectroscopy) с параметрами импульсной последовательности TE = 3 мс, TR = 5 с и количеством накоплений 100. Перед каждым спектроскопическим измерением проводили настройку однородности магнитного поля в пределах выбранного вокселя при использовании методики FastMap. Подавление сигнала воды в спектрах осуществляли с помощью импульса переменной мощности и оптимизированной задержки релаксационной последовательности (VAPOR).

Для обработки экспериментальных спектров  $^1\text{H}$  МРС и определения количественного состава метаболитов применяли оригинальную специализированную компьютерную программу, основанную, как и программный пакет LCModel (Provencher, 1993), на предположении о том, что спектр смеси известных соединений представляет собой линейную комбинацию спектров анализируемых компонентов. Подробное описание работы программы представлено в статье (Moshkin et al., 2014).

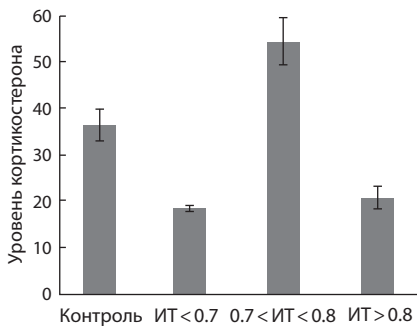
**Содержание кортикостерона.** Содержание кортикостерона определяли в плазме крови после предварительной экстракции иммуноферментным методом (Cusabio ELISA Kit) в соответствии с протоколом производителя. Чувствительность определения составила 0.25 нг/мл, вариативность < 5 %.

**Статистическая обработка.** Для обработки полученных результатов применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Достоверность различий между фенотипами исследуемых животных оценивали с помощью *post hoc* теста (Fisher). Значения исследованных параметров представлены в виде средних и ошибки средней (Mean ± SE).

## Результаты

В суммарной выборке животных, подвергнутых повторным стрессорным воздействиям, не наблюдалось статистически значимых изменений ИТ, а также содержания кортикостерона и нейрометаболитов в гиппокампе и стриатуме. Однако разделение стрессированных крыс на три фенотипа (рисунок) позволило выявить статистически значимые различия по уровню кортикостерона ( $F_{3,21} = 4.53$ ;  $p < 0.05$ ).

Установлено, что у крыс, условно отнесенных к первому (ИТ < 0.7) и третьему (ИТ > 0.8) фенотипам, содержание кортикостерона снижено по сравнению с контролем ( $p < 0.01$  и  $p < 0.05$  соответственно). Крысы с ИТ от 0.7 до 0.8 имели более высокие значения кортикостерона в плазме крови, чем животные из контрольной группы ( $p < 0.05$ ). После завершения повторных стрессорных воздействий также наблюдались статистически значимые различия по содержанию ГАМК в гиппокампе ( $F_{3,21} = 5.13$ ;  $p < 0.05$ ). При этом у крыс второго фенотипа содержание ГАМК в гиппокампе было выше, чем у контрольных крыс и животных первого и третьего фенотипов (таблица). Между тем у крыс этих подгрупп отсутствовали статистически значимые различия с контролем. По содержанию других нейрометаболитов в гиппокампе не обнаружено статистически значимых различий как по сравнению с контролем, так и между отдельными подгруппами. В стриатуме из всех исследованных нейрометаболитов только по отношению к N-ацетиласпартату обнаружены статистически значи-



Содержание кортикостерона у животных с разными значениями индекса тревожности (ИТ).

мые различия ( $F_{3,21} = 4.47; p < 0.05$ ). При этом наиболее высокий уровень N-ацетиласпартата наблюдали у животных, относящихся к первому фенотипу. У крыс этой подгруппы содержание N-ацетиласпартата было выше, чем у контрольных и животных второго или третьего фенотипов.

## Обсуждение

В ходе исследования установлено соотношение между изменениями индекса тревожности, уровня кортикостерона и содержания ГАМК в гиппокампе спустя 14 дней после завершения повторных стрессорных воздействий. Следует отметить, что в группе стрессированных животных выявлялся фенотип крыс, у которых индекс тревожности снижался по сравнению с контролем. Именно эту подгруппу животных можно рассматривать как фенотип, устойчивый к развитию тревожной симптоматики ПТСР. У этих крыс содержание кортикостерона было резко снижено по сравнению с контролем при повышенном уровне N-ацетиласпартата в стриатуме. В то же время содержание нейрометаболитов в гиппокампе не отличалось статистически значимо от контроля.

Таким образом, животные, устойчивые к развитию тревожной симптоматики ПТСР, характеризуются наиболее низким уровнем кортикостерона. Согласно данным, полученным на животных, содержащихся в условиях конвенционного вивария, при воспроизведении этой экспериментальной модели ПТСР у крыс с резко пониженным уровнем кортикостерона отмечен низкий индекс тревожно-

Доля нейрометаболитов ГАМК и N-ацетиласпартата в гиппокампе и стриатуме у крыс с разными значениями ИТ при экспериментальном моделировании ПТСР

	Контроль	Первый фенотип, ИТ < 0.7	Второй фенотип, 0.7 ≤ ИТ ≤ 0.8	Третий фенотип, ИТ > 0.8
ГАМК; гиппокамп, %	7.65 ± 0.45	8.28 ± 0.61	13.07 ± 0.9*	7.79 ± 0.89
N-ацетиласпартат; гиппокамп, %	16.31 ± 4.67	16.58 ± 5.24	15.29 ± 4.78	16.71 ± 5.46
ГАМК; стриатум, %	6.37 ± 0.94	6.21 ± 1.45	5.50 ± 0.96	5.23 ± 0.67
N-ацетиласпартат; стриатум, %	14.75 ± 1.26	18.61 ± 1.29*	14.32 ± 0.98	15.57 ± 0.87

\* Значения, достоверно отличающиеся от значений контрольной группы ( $p < 0.05$ ).

сти. У крыс с умеренным понижением уровня кортикостерона установлено повышение уровня тревожности при одновременном снижении уровня замирания (Кондашевская и др., 2017). Поэтому неуместно говорить о фенотипе устойчивости к ПТСР в целом. Нам представляется более корректным рассматривать устойчивость к определенным симптомам ПТСР. Причем между устойчивостью к тревожной симптоматике и устойчивостью к депрессивной симптоматике можно проследить обратную зависимость.

Механизмы сниженного уровня глюкокортикоидов при ПТСР могут быть связаны с развитием надпочечниковой недостаточности. Ранее нами было показано, что данный режим повторных стрессорных воздействий характеризуется дистрофией пучковой зоны коры надпочечников (Kondashevskaya et al., 2017). Более того, отмечены корреляции между уровнем тревожности и гистологическими показателями пучковой зоны коры надпочечников.

В ходе исследований на основе показателей индекса тревожности удалось выявить подгруппу животных с умеренной ПТСР-симптоматикой. Именно у них отмечается наиболее резкий прирост уровня кортикостерона, которому соответствовали наиболее высокие значения ГАМК и N-ацетиласпартата в гиппокампе. Вполне возможно, что прирост этих показателей зависит от уровня глюкокортикоидов. Не исключено, что подобное изменение уровня нейрометаболитов в этих структурах мозга отражает напряжение нейробиологических механизмов регуляции поведенческой активности, препятствующих дальнейшему усугублению ПТСР-симптоматики.

## Благодарности

Исследование выполнено в рамках базовой части государственного задания Минобрнауки России (№ 17.7255.2017/8.9) с использованием оборудования ЦКП, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015).

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

- Кондашевская М.В., Цейликман В.Э., Манухина Е.Б., Дауни Г.Ф., Комелькова М.В., Лапшин М.С., Самойлов Е.А., Алилуев А.В., Курганов А.С., Мальцева Н.В., Цейликман О.Б. Корреляция между поведенческими проявлениями и морфофункциональными изменениями в надпочечниках при моделировании синдрома посттравматических стрессорных расстройств у крыс Вистар. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2017;103(7):808-818.
- Cohen H., Matar M.A., Buskila D., Kaplan Z., Zohar J. Early poststressor intervention with high-dose corticosterone attenuates posttraumatic stress response in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Biol. Psychiatry*. 2008;64:708-717. DOI 10.1016/j.biopsych.2008.05.025.
- Cohen H., Zohar J. An animal model of posttraumatic stress disorder: the use of cut-off behavioral criteria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004;1032:167-178.



- De Kloet E.R. From receptor balance to rational glucocorticoid therapy. *Endocrinology*. 2014; 155(8):2754-2769. DOI 10.1210/en.2014-1048.
- Kondashevskaya M.V., Tseilikman V.E., Manukhina E.B., Downey H.F., Komelkova M.V., Lapshin M.S., Samoylov E.A., Aliluev A.V., Kurganov A.S., Kozochkin D.A., Maltseva N.B., Tseilikman O.B. Disorder in the morphology and functions of adrenal glands in experimental posttraumatic stress disorder in rats: correlation with behavioural markers. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2017.
- McEwen B.S. Allostasis and the epigenetics of brain and body health over the life course: The brain on stress. *JAMA Psychiatry*. 2017; 74(6):551-552. DOI 10.1001/jamapsychiatry.2017.0270.
- Moshkin M.P., Akulov A.E., Petrovski D.V., Saik O.V., Petrovsky E.D., Savelov A.A., Kpotug I.V. Proton magnetic resonance spectroscopy of brain metabolic shifts induced by acute administration of 2-deoxy-D-glucose and lipopolisaccharides. *NMR Biomed.* 2014;27(4):399-405. DOI 10.102/nbm.3074.
- Pitman R., Rasmusson A., Koenen K., Shin L., Orr S., Gilbertson M., Milad M., Liberzon I. Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* 2012;13(11):769-787. DOI 10.1038/nrn3339.
- Provencher S.W. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn. Reson. Med.* 1993;30(6):672-679.
- Szulc A., Galinska B., Tarasow E., Waszkiewicz N., Konarzewska B., Poplawska R., Bibulowicz D., Simonienko K., Walecki J. Proton magnetic resonance spectroscopy study of brain metabolite changes after antipsychotic treatment. *Pharmacopsychiatry*. 2011;44(4):148-157. DOI 10.1055/s-0031-1279739.
- Yehuda R., Seckl J.J. Minireview: Stress-related psychiatric disorders with low cortisol levels: a metabolic hypothesis. *Endocrinology*. 2011; 152(12):4496-4503. DOI 10.1210/en.2011-1218.
- Zohar J., Yahalom H., Kozlovsky N., Cwikel-Hamzany S., Matar M.A., Kaplan Z., Yehuda R., Cohen H. High dose hydrocortisone immediately after trauma may alter the trajectory of PTSD: interplay between clinical and animal studies. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2011;21(11):796-809. DOI 10.1016/j.euroneuro.2011.06.001.