

УДК 612.822.3

ВЛИЯНИЕ МОРФИНА НА СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЛАСТИЧНОСТЬ В ОРГАНОТИПИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЕ ГИППОКАМПА

Береговой Н.А., Панкова Т.М., Сорокина Н.С., Топчий Е.В., Старостина М.В.

*ФГБУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» Сибирского
отделения Российской академии медицинских наук, Новосибирск, e-mail: ber@niimbb.ru*

В работе изучено влияние морфина на органотипическую культуру гиппокампа крыс. Показано, что длительное воздействие морфина не нарушает развития органотипической культуры гиппокампа и не влияет на жизнеспособность клеток. Острое и кратковременное (48 часов) воздействие морфина на культуру не изменяет базовых характеристик суммарных ВПСП мшистых волокон. В то же время достоверно увеличивается амплитуда суммарного ВПСП через 60 мин после тетанизации, то есть регистрируется фасилитация длительной посттетанической потенциации. Длительное (10 и более дней) культивирование в присутствии морфина вызывает достоверное увеличение амплитуды суммарного ВПСП мшистых волокон в ответ на тестовые стимулы и снижает вероятность формирования длительной посттетанической потенциации. В целом временная динамика изменений синаптической пластичности мшистых волокон в культуре гиппокампа аналогична таковой в срезах гиппокампа животных при развитии у них хронической опиатной зависимости. Полученные данные позволяют полагать, что органотипическая культура гиппокампа может быть использована как модель при изучении клеточно-молекулярных механизмов развития наркотической зависимости.

Ключевые слова: морфин, органотипическая культура гиппокампа, синаптическая пластичность

EFFECTS OF MORPHINE ON SYNAPTIC PLASTICITY IN HIPPOCAMPAL SLICE CULTURE

Beregovoy N.A., Pankova T.M., Sorokina N.S., Topchiy E.V., Starostina M.V.

*Institute of Molecular Biology and Biophysics of Siberian Branch RAMS,
Novosibirsk, e-mail: ber@niimbb.ru*

The effects of morphine in hippocampal slice culture were studied. It was shown that prolonged incubation with morphine did not affect the development of slice culture and cell viability. The acute or short-term (48 hours) influence of morphine did not modify the basic characteristics of mossy fiber field EPSPs. At the same time the amplitude of field EPSPs 60 min after tetanization was significantly higher, i.e. facilitation of long-term potentiation was observed. The prolonged (10 days or more) cultivation in presence of morphine resulted in significant increase of field EPSPs amplitude and decreased the probability of LTP development. As a whole a time-course of changes in mossy fiber synaptic plasticity was similar to that in hippocampal slices from animals at different stages of the development of chronic opiate dependence. The data received allowed to suppose that hippocampal slice culture represented a suitable model for the studies on cellular and molecular mechanisms of the development of drug dependence.

Keywords: morphine, hippocampal slice culture, long-term potentiation

Широкое распространение наркомании делает актуальными исследования нейро-биологических основ формирования наркотической зависимости и поиска новых методов и подходов к ее лечению. В настоящее время экспериментальные работы по изучению эффектов вызывающих зависимость препаратов проводятся как *in vivo*, на различных моделях аддикции на животных, так и *in vitro*, на первичных культурах нервных клеток и клеточных линиях.

Культуры, являющиеся относительно однородными клеточными популяциями, предоставляют широкие возможности для изучения молекулярных механизмов действия наркотических веществ и первичного скрининга протекторных соединений, но не позволяют исследовать функционирование нейронных ансамблей и влияние взаимодействий между различными типами клеток нервной системы. Эти ограничения могут быть преодолены использованием органотипических культур нервной ткани.

Особенностью органотипических культур нервной ткани, отличающей их от первичных культур нейронов и клеточных линий, является сохранение характерной для данного отдела мозга citoархитектуры и внутренних межнейронных связей. Это позволяет в условиях *in vitro* исследовать клеточные и молекулярные механизмы патологических состояний, функциональные параметры синаптической пластичности, делает их удобной моделью для скрининга биологически активных соединений.

Наиболее широко используется органотипическая культура гиппокампа (ОКГ). Морфологическое и функциональное становление системы внутренних связей гиппокампа происходит постнатально, срезы гиппокампа, взятые у животных в раннем постнатальном периоде, можно культивировать в течение длительного срока. При этом сохраняется расположение клеточных слоев, а формирование и функциональное созревание специфических синаптических

связей происходит *in vitro*. Таким образом, культура гиппокампа представляет собой удобную модель для изучения морфологических и функциональных характеристик как развивающейся, так и зрелой нервной ткани. ОКГ были использованы для изучения эффектов гипоксии, гипогликемии, комбинации их при моделировании ишемии, окислительного стресса, повреждающего действия возбуждающих аминокислот, нейротоксинов, органических растворителей и этанола [3, 7, 11].

В представленной работе мы анализировали влияние кратковременного и длительного культивирования ОКГ с морфином и вызванных этим изменений синаптической пластичности, сопоставляя эти данные с ранее полученными на животных при формировании у них хронической опиатной зависимости [1].

Материалы и методы исследования

Культивирование: Крысы в возрасте 7–8 дней получали из Лаборатории экспериментальных животных Института цитологии и генетики СО РАН, все экспериментальные процедуры на животных были одобрены комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИИМББ» СО РАН и проводились в соответствии с Принципами надлежащей лабораторной практики (Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53434-2009) и согласно «Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях». Получение и культивирование срезов гиппокампа проводили, как описано ранее [12]. Коротко, поперечные срезы гиппокампа (400 мкм) помещали на покрытые коллагеном стекла, оставляли на 30 мин. во влажной камере (чашки Петри с «пьедесталами») при 36°C в CO₂-инкубаторе для прикрепления, а затем добавляли среду, содержащую 25% раствора Хэнкса, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 65% среды Игла в модификации Дульбекко и добавки инсулина (0,2–0,3 ед./мл), L-глутамин (0,29 г/л), глюкозы (6,5 мг/мл). Культивирование срезов вели в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂, 90% влажности, 36°C. Смену среды проводили раз в два дня. На второй день культивирования в среду на 24 часа добавляли антимитотические препараты (5-Fluoro-2-deoxyuridine, cytosine-b-d-arabinofuranoside, uridine, Sigma, США) в конечной концентрации 10⁻⁶–10⁻⁷ М для подавления размножения макрофагов и фибробластов, нарушающего органотипию среза.

Культивирование контрольных культур вели в стандартной культуральной среде. Для исследования длительного воздействия морфина (конечная концентрация 10 мМ) морфин добавляли к культуральной среде с 4-го дня культивирования, при изучении кратковременного (48 ч) воздействия морфин вносили на 10–11 дни *in vitro*. Состояние органотипических культур регулярно оценивали визуально.

Морфологический анализ и оценка выживания клеток. Для оценки морфологических характеристик использовали общепринятые методы гистологического анализа. На 5, 10, 14, 21 дни культивирования эксплантаты фиксировали 10% нейтральным формалином

и затем окрашивали крезильовым фиолетовым или импрегнировали серебром по методу Бодяна с последующим контрастированием хлорным золотом. Для оценки количества погибших клеток препараты окрашивали иодидом пропидия (3 мкг/мл среды, 1 час в CO₂-инкубаторе), промывали раствором Хэнкса, фиксировали 4% параформом (1 ч) и заключали в глицерин. Анализ полученных препаратов проводили на конфокальном микроскопе LSM 510 (Carl Zeiss).

Электрофизиологические эксперименты. Для выявления функциональных изменений, вызванных острым и хроническим действием морфина, регистрировали суммарный возбуждающий постсинаптический потенциал (ВПСП) мшистых волокон в ответ на тестирующие стимулы и оценивали параметры синаптической пластичности на модели длительной посттетанической потенциации (ДПТП). Ранее было показано [2], что ДПТП может быть вызвана в ОКГ крыс начиная с 7–9 дней культивирования, поэтому для экспериментов использовали ОКГ с 13 по 20 день *in vitro*.

Для проведения электрофизиологических экспериментов стекла с ориентированными эксплантатами помещали в проточную термостатированную камеру в среду следующего состава (в мМ): NaCl – 124; KCl – 4,9; KH₂PO₄ – 1,2; MgSO₄ – 1,3; CaCl₂ – 2,5; NaHCO₃ – 25,6; D-глюкоза – 10; pH 7,5, аэрируемую карбогеном (95% O₂ – 5% CO₂). После 20-минутной инкубации стимулирующий электролитически заточенный биполярный вольфрамовый электрод помещали в область мшистых волокон, регистрирующий стеклянный электрод (сопротивление 2–5 МОм, заполнен 2,5 М NaCl) – в зоне начальных апикальных дендритов пирамидных нейронов области CA3. Тестирование проводили при помощи одиночных прямоугольных стимулов длительностью 200 мкс, наносимых не реже, чем через 5 мин. Вызванные потенциалы регистрировали при помощи 12-разрядного АЦП (Digidata, Molecular Devices) и обрабатывали, используя пакет программ pClamp-6 (Axon Instruments). Для выработки ДПТП амплитуду тестирующего стимула подбирали таким образом, чтобы величина ответа составляла около 50% от максимальной. Тетанизацию проводили тремя последовательными пачками стимулов частотой 200 Гц, длительность каждой пачки импульсов 1 с, интервал между пачками 2 с. Через 10 мин процедуру тетанизации повторяли.

Регистрацию вызванных потенциалов вели не менее 60 мин после тетанизации, что позволяло сделать заключение о формировании или отсутствии ДПТП. Считали, что ДПТП формируется, если после второй тетанизации амплитуда сигнала увеличивалась более чем в 1,5 раза (или на 50%), и оставалась таковой на протяжении всего времени наблюдения. Относительное изменение амплитуды суммарного ВПСП после тетанизации вычисляли по формуле

$$\frac{A_t - A_0}{A_0} \cdot 100\%,$$

где A_0 – амплитуда ответа на тестовый стимул до тетанизации; A_t – соответствующая амплитуда после тетанизации.

Статистический анализ и обработку данных проводили с использованием пакетов программ Statistica 9 (StatSoft) и OriginPro 8.1 (OriginLab Corporation). Для оценки межгрупповых различий использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Оценку достоверности различий средних значений параметров проводили с использованием

t-критерия Стьюдента и критерия Манна – Уитни. Различия между группами считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Данные представлены в виде арифметического среднего и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$).

Результаты исследования и их обсуждение

Через сутки после посадки срезов и в течение всего последующего срока культивирования в контрольной и опытной (культивирование в присутствии $10 \mu\text{M}$ морфина) группах культур наблюдали формирование типичной зоны роста, образующейся по периферии эксплантата за счет мигрирующих астроцитов и фибробластов, а также покидающих эксплантат отростков нейронов. Незначительная их часть покидает эксплантат по всей его границе, в то время как наибольшая часть нейритов выходит из эксплантата в зоне фимбрии и остатка энторинальной коры, то есть в тех областях, где в норме проходят выходящие из гиппокампа аксоны пирамидных нейронов области CA3 и CA1. В этой зоне в ходе культиви-

рования можно наблюдать фасцикуляцию (образование пучков) аксонов. Постепенно фибробласты мигрируют к границам зоны роста, а нейриты, тела и отростки астроцитов, контактируя, образуют плотную сетевидную структуру.

Нарушений прикрепления к субстрату в опытной и контрольных группах срезов отмечено не было. Расположение основных клеточных слоев (слой гранулярных клеток зубчатой фасции и слой пирамидных нейронов Аммонова рога) также соответствовало таковому в срезах гиппокампа целого мозга.

Как можно увидеть на рис. 1, единичные погибшие клетки как в контрольных, так и в опытных ОКГ расположены по всей толще эксплантата и не ассоциированы с каким-либо из определенных полей. В опытных культурах можно было отметить несколько более интенсивное окрашивание мелких ядер в области зубчатой фасции, где расположена герминальная зона, содержащая недифференцированные клетки-предшественники.

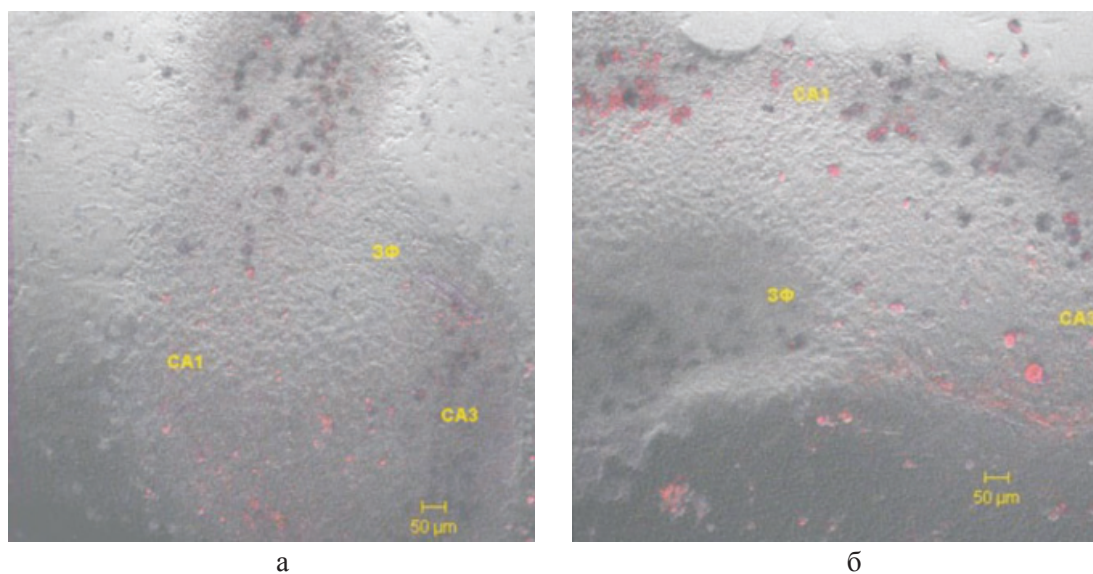


Рис. 1. Оценка жизнеспособности клеток в органотипической культуре гиппокампа с помощью окраски иодидом пропидия. 17 дней *in vitro*: а – культивирование в стандартной среде (контроль); б – культивирование в присутствии морфина ($10 \mu\text{M}$). Длина волны возбуждения 535 нМ , излучения – 560 нМ

В ОКГ присутствуют крупные клетки-макрофаги, представляющие собой активированную микроглию. Активность их наиболее высока на ранних этапах культивирования, когда они участвуют в удалении материала, поврежденного при приготовлении срезов, а затем постепенно снижается. При использовании иодида пропидия клетки макрофагальной глии иногда захватывали окрашенный клеточный материал,

в этом случае свечение было локализовано в цитоплазме, в то время как ядро оставалось темным. Мы не наблюдали достоверного изменения числа таких клеток в опытных ОКГ по сравнению с контрольными. Таким образом, длительное культивирование срезов гиппокампа крыс в среде, содержащей $10 \mu\text{M}$ морфина, не влияло существенным образом на жизнеспособность клеток ОКГ.

Электрофизиология

Непосредственная аппликация морфина (10 μ M) на органотипическую культуру с последующей 20-минутной инкубацией не вызывает достоверных изменений ам-

плитуды и латентности ВПСП мшистых волокон в ответ на тестовый стимул. В то же время под воздействием морфина амплитуда ВПСП через 60 мин после тетанизации достоверно выше, чем в контрольных культурах (рис. 2).

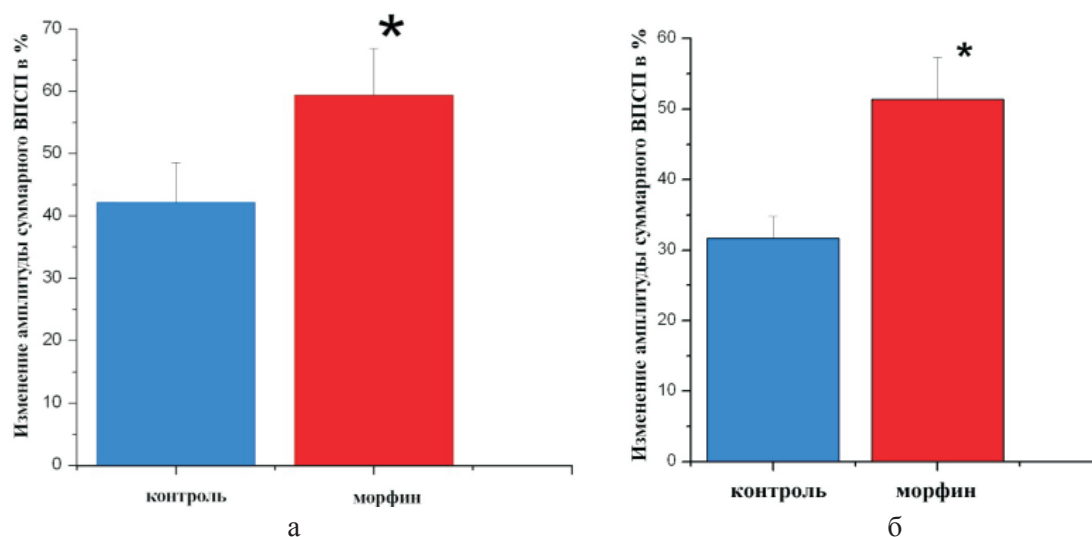


Рис. 2. а – изменение относительной амплитуды суммарного ВПСП мшистых волокон через 60 минут после тетанизации при 20-минутной инкубации после аппликации морфина на ОКГ. * – $p < 0,05$ ($n = 7$); б – изменение относительной амплитуды суммарного ВПСП мшистых волокон через 60 минут после тетанизации при 48-часовом культивировании в присутствии 10 μ M морфина на ОКГ. * – $p < 0,05$ ($n = 8$)

Кратковременное (48 час) культивирование в присутствии морфина также не изменяло базовых характеристик и вызывало фасилитацию ДПТП мшистых волокон.

При длительном культивировании в присутствии морфина (10 и более дней) было зарегистрировано достоверное увеличение амплитуды суммарного ВПСП мшистых волокон в ответ на тестовые стимулы (контроль – $3,4 \pm 0,36$ мВ, $n = 11$; опыт – $4,9 \pm 0,47$ мВ, $n = 9$; $p = 0,019$). При этом вероятность формирования ДПТП при использовании стандартной процедуры тетанизации значительно уменьшалась: если в контрольных культурах формирование ДПТП наблюдали в 85% случаев, то в опытных – менее чем в 40%.

Моделирование различных заболеваний мозга, таких как инсульт [3, 14], болезнь Альцгеймера [8], эпилепсия [6, 9] *in vitro*, на органотипической культуре гиппокампа, не только расширяет возможности исследования клеточно-молекулярных механизмов этих заболеваний, но и позволяет проводить тестирование широкого спектра нейротекторных соединений.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что долговременное культивирование в присутствии морфина не влияет на жизнеспособность ОКГ, но приводит к мо-

дификации функциональных характеристик системы синаптических связей «гранулярные клетки зубчатой фасции – пирамидные нейроны области СА3» (мшистых волокон).

Исследования последних лет показали, что развитие наркотической зависимости обусловлено изменениями нейрональной и синаптической пластичности различных отделов мозга, а молекулярные механизмы этих изменений подобны тем, что происходят при обучении и запоминании [10, 15]. Наибольшее количество работ было выполнено на гиппокампе, структуре, непосредственно связанной с процессами обучения и памяти, с использованием ДПТП как экспериментальной модели синаптической пластичности. Полученные данные о параметрах ДПТП в гиппокампе животных с хронической зависимостью от морфина противоречивы, на различных системах синаптических связей показаны как фасилитация ДПТП, так и нарушения ее формирования [5, 13]. Эти противоречия не могут быть объяснены только использованием разных схем получения морфина животными, но связаны, вероятно, со стадийностью развития хронической зависимости. Ранее мы исследовали динамику изменений ДПТП мшистых волокон в ходе развития, на ранних и поздних стадиях сформированной

хронической опиатной зависимости [1], что дает возможность сопоставления с данными, полученными в представленной работе. Так, аппликация морфина на нативную культуру вызывает фасилитацию ДППП мшистых волокон, что согласуется с результатами, полученными на срезах гиппокампа нативных животных [4]. Кратковременная (48 час) инкубация ОКГ с морфином соответствует периоду развития и ранним стадиям зависимости у животных, а длительная – более поздним стадиям (в наших экспериментах – после 50 дня потребления наркотика), когда выявляется нарушение формирования ДППП [1]. Таким образом, временная динамика изменений синаптической пластичности при инкубации ОКГ с морфином в целом соответствует динамике изменений в гиппокампе животных при развитии хронической зависимости от морфина. Полученные данные позволяют предполагать, что ОКГ может быть использована в качестве модели для изучения клеточно-молекулярных процессов, лежащих в основе развития наркотической зависимости.

Список литературы

1. Береговой Н.А., Сорокина Н.С., Старостина М.В. Динамика изменений синаптической пластичности мшистых волокон в ходе формирования хронической зависимости от морфина // *Бюллетень СО РАМН.* – 2004. – Т. 113. – № 3. – С. 153–156.
2. Береговой Н.А., Панкова Т.М., Сорокина Н.С., Старостина М.В. Влияние моноклональных антител 5F5-B6 на синаптическую пластичность развивающегося и зрелого гиппокампа крыс // *Бюлл. Сиб. отделения РАМН.* – 1999. – № 1. – С. 76–79.
3. Ahlgren, H.; Henjum, K.; Ottersen, O.P.; Runden-Pran, E. Validation of organotypical hippocampal slice cultures as an ex vivo model of brain ischemia: Different roles of NMDA receptors in cell death signalling after exposure to NMDA or oxygen and glucose deprivation. *Cell Tissue Res.* – 2011. – № 345. – P. 329–341.
4. Jin W., Chavkin C. Mu opioids enhance mossy fiber synaptic transmission indirectly by reducing GABA receptor activation. *Brain Research.* 821, 1999. pp. 286–293.
5. Harrison J.M., Allen R.G., Pellegrino M.J., Williams J.T., Manzoni O.J. Chronic Morphine Treatment Alters Endogenous Opioid Control of Hippocampal Mossy Fiber Synaptic Transmission // *J Neurophysiol* 87.– 2002. – P. 2464–2470.
6. He S., Bausch S.B. Synaptic plasticity in glutamatergic and GABAergic neurotransmission following chronic meprobamate treatment in an in vitro model of limbic epileptogenesis // *Neuropharmacology.* – 2014 Feb. – № 77. – P. 379–86.
7. Holopainen I.E. Organotypic hippocampal slice cultures: a model system to study basic cellular and molecular mechanisms of neuronal cell death, neuroprotection, and synaptic plasticity // *Neurochem Res.* – 2005. – № 30(12). – P. 1521–8.
8. Hoppe J.B., Haag M., Whalley B.J., Salbego C.G., Cimarosti H. Curcumin protects organotypic hippocampal slice cultures from Aβ1-42-induced synaptic toxicity // *Toxicol In Vitro.* – 2013 Dec. – № 27(8). – P. 2325–30.
9. Koyama R. The use of organotypic slice cultures for the study of epileptogenesis // *Neuropathology*–2013 Aug. – № 33(4). – P. 475–9.
10. Nestler E.J. Cellular basis of memory for addiction // *Dialogues Clin Neurosci.* – 2013 Dec. – № 15(4). – P. 431–43.
11. Norberg J.I., Poulsen F.R., Blaabjerg M., Kristensen B.W., Bonde C., Montero M., Meyer M., Gramsbergen J.B., Zimmer J. Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair // *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* – 2005 Aug. – № 4(4). – P. 435–52.
12. Palyanova N.V., Pankova T.M., Starostina M.V., Kicha A.A., Ivanchina N.V., Stonik V.A. Neuritogenic and Neuroprotective Effects of Polar Steroids from the Far East Starfishes *Patiria pectinifera* and *Distolasterias nipon* // *Mar. Drugs.* – 2013. – № 11. – P. 1440–1455.

13. Pu L., Guo-Bin Bao G.-B., Xu N.-J., Ma L., Pei G. Hippocampal Long-Term Potentiation Is Reduced by Chronic Opiate Treatment and Can Be Restored by Re-Exposure to Opiates // *The Journal of Neuroscience,* March 1. – 2002. – № 22(5). – P. 1914–1921.
14. Skelding K.A., Arellano J.M., Powis D.A., Rostas J.A. Excitotoxic Stimulation of Brain Microslices as an In vitro Model of Stroke // *J Vis Exp.* – 2014 Feb. – № 4 (84).
15. Von der Goltz C., Kiefer F. Learning and memory in the aetiopathogenesis of addiction: future implications for therapy? // *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* – 2009. – Vol. 259. – Suppl. 2. – P. 183–187.

References

1. Beregovoy N.A., Sorokina N.S., Starostina M.V. *Bull SB RAMS.* 2004, Vol. 113, no. 3, pp. 153–156.
2. Beregovoy N.A., Pankova T.M., Sorokina N.S., Starostina M.V. *Bull SB RAMS.* 1999, no. 1, pp. 76–79.
3. Ahlgren, H.; Henjum, K.; Ottersen, O.P.; Runden-Pran, E. Validation of organotypical hippocampal slice cultures as an ex vivo model of brain ischemia: Different roles of NMDA receptors in cell death signalling after exposure to NMDA or oxygen and glucose deprivation. *Cell Tissue Res.* 2011, 345, 329–341.
4. Jin W., Chavkin C. Mu opioids enhance mossy fiber synaptic transmission indirectly by reducing GABA receptor activation. *Brain Research.* 821, 1999. pp. 286–293.
5. Harrison J.M., Allen R.G., Pellegrino M.J., Williams J.T., Manzoni O.J. Chronic Morphine Treatment Alters Endogenous Opioid Control of Hippocampal Mossy Fiber Synaptic Transmission. *J Neurophysiol* 87: 2464–2470, 2002.
6. He S., Bausch S.B. Synaptic plasticity in glutamatergic and GABAergic neurotransmission following chronic meprobamate treatment in an in vitro model of limbic epileptogenesis. *Neuropharmacology.* 2014 Feb; 77: 379–86.
7. Holopainen I.E. Organotypic hippocampal slice cultures: a model system to study basic cellular and molecular mechanisms of neuronal cell death, neuroprotection, and synaptic plasticity. *Neurochem Res.* 2005 30(12): 1521–8.
8. Hoppe J.B., Haag M., Whalley B.J., Salbego C.G., Cimarosti H. Curcumin protects organotypic hippocampal slice cultures from Aβ1-42-induced synaptic toxicity. *Toxicol In Vitro.* 2013 Dec; 27(8): 2325–30.
9. Koyama R. The use of organotypic slice cultures for the study of epileptogenesis. *Neuropathology.* 2013 Aug; 33(4): 475–9.
10. Nestler E.J. Cellular basis of memory for addiction. *Dialogues Clin Neurosci.* 2013 Dec; 15(4): 431–43.
11. Norberg J.I., Poulsen F.R., Blaabjerg M., Kristensen B.W., Bonde C., Montero M., Meyer M., Gramsbergen J.B., Zimmer J. Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2005 Aug; 4(4): 435–52.
12. Palyanova N.V., Pankova T.M., Starostina M.V., Kicha A.A., Ivanchina N.V., Stonik V.A. Neuritogenic and Neuroprotective Effects of Polar Steroids from the Far East Starfishes *Patiria pectinifera* and *Distolasterias nipon*. *Mar. Drugs.* 2013, 11, 1440–1455.
13. Pu L., Guo-Bin Bao G.-B., Xu N.-J., Ma L., Pei G. Hippocampal Long-Term Potentiation Is Reduced by Chronic Opiate Treatment and Can Be Restored by Re-Exposure to Opiates. *The Journal of Neuroscience,* March 1, 2002, 22(5): 1914–1921.
14. Skelding K.A., Arellano J.M., Powis D.A., Rostas J.A. Excitotoxic Stimulation of Brain Microslices as an In vitro Model of Stroke. *J Vis Exp.* 2014 Feb 4; (84).
15. Von der Goltz C., Kiefer F. Learning and memory in the aetiopathogenesis of addiction: future implications for therapy? *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2009. Vol. 259. Suppl. 2. P. 183–187.

Рецензенты:

Ратушняк А.С., д.б.н., зав. лабораторией «Биомедицинская информатика», ФГБУН «Конструкторско-технологический институт вычислительной техники» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск;

Гилинский М.А., д.б.н., зав. лабораторией регуляции адаптационных процессов, ФГБУН «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 15.05.2014.