

МОДУЛЯЦИЯ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ИОННЫХ ТОКОВ ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕЙРОНОВ ОРЕКСИНОМ А

УДК 615.216.2:577.3:612.822.3

© П. Д. Шабанов, А. И. Вислобоков

ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург

Ключевые слова:

орексин А; *Planorbarius corneus*; нейроны; потенциал покоя; потенциал действия; импульсная активность; ионные токи.

Резюме

Изучены изменения внутриклеточных потенциалов покоя (ПП) и действия (ПД) идентифицированных нейронов педальных и висцерального ганглиев ЦНС моллюска *Planorbarius corneus*, зарегистрированные с помощью внутриклеточных микроэлектродов, и ионных токов изолированных нейронов при фиксации потенциала под влиянием орексина А в концентрациях 1, 10, 100 и 1000 мкг/мл. Показано, что этот нейропептид модулирует электрическую активность нейронов: незначительно изменяет ПП, параметры ПД и частоту импульсной активности (ИА), что в целом можно оценивать как активизирующее действие. В концентрации 1000 мкг/мл на фоне деполяризации наблюдали увеличение частоты ИА вплоть до подавления генерации ПД. В концентрации 1 мкг/мл орексин А увеличивал амплитуду медленного выходящего калиевого тока на 3–5%, а в концентрациях 100 и более мкг/мл дозозависимо подавлял входящие ионные токи вплоть до 40% при концентрации 1000 мкг/мл. При этом подавление натриевых токов было более сильным, чем кальциевых. Эффекты орексина А в высоких концентрациях можно считать неспецифическими и даже токсичными.

Орексины (orexinin) — новые и интенсивно изучаемые нейропептиды [10, 15, 19, 22, 30, 31, 32]. Орексин А содержит 33 аминокислоты, имеет две дисульфидные связи (cys6-cys12, cys7-cys14), необходимые для его функционирования. Орексин В — прямая цепочка из 28 аминокислот. Известны два орексиновых рецептора — OX1 и OX2, которые являются частью большого семейства рецепторов, сопряженных с G белком (*G protein-coupled receptors, GPCRs*) [30]. У этих рецепторов наблюдается 64-процентная идентичность в последовательности аминокислот [10]. Орексин А имеет примерно одинаковую аффинность к обоим рецепторам, а орексин В реагирует в основном с OX2 и в 5 раз слабее орексина А. GPCRs рецепторы являются мишенью до 40% выпускаемых лекарств, поэтому с открытием орексинов появилась надежда, что будут разработаны новые лекарства против различных расстройств сна, эффективные и обладающие

меньшими побочными эффектами. Уже разрабатываются как орексиновые агонисты (для лечения нарколепсии), так и антагонисты (для лечения бессонницы) [11, 22]. Орексины обнаружены у различных животных [8, 24, 38].

Орексиновые рецепторы имеются в гипоталамических нейронах головного мозга млекопитающих, эти нейроны участвуют в регуляции различных физиологических процессов: поддержании энергетического баланса, регуляции сна и бодрствования, пищевого поведения, ответных реакций на стресс и восприятие боли; они могут принимать участие в патогенезе многих заболеваний — сердечно-сосудистых, наркологических (регулируя переносимость наркотиков и их отмену), нарколепсии, нарушениях аппетита/чувства вкуса, эпилептиформных состояниях и других заболеваниях, связанных с общим нарушением функций орексиновой системы [4, 13, 19, 27, 29, 36, 37].

Известные из литературы данные указывают на то, что орексины могут непосредственно увеличивать возбуждение нейронов в гиппокампе, воздействуя на постсинаптические OX1 и OX2 рецепторы. Орексины могут увеличивать выделение ацетилхолина, ГАМК и глутамата в гиппокампе в результате потенциации возбуждения нейронов медиальной перегородки, на которых имеются OX1 и OX2 рецепторы [6, 12, 14, 17, 23, 33, 39]. Вследствие этого может изменяться выраженность и частота гиппокампального тета-ритма. Они могут влиять на функционирование систем подкрепления, включая нейроны гиппокампа, префронтальной коры, миндалина, вентрального стриатума и вентральной области покрышки, непосредственно модулируя их активность через специфические рецепторы [6, 10, 13]. За счет увеличения активности дофаминергических клеток и повышения выделения дофамина орексины могут изменять характер функционирования базальных ганглиев, улучшать функционирование систем подкрепления и облегчать пространственное обучение [31].

Биоэлектрическая активность нейронов является важнейшим средством межклеточных взаимодействий и отражает собою уровень их функционального состояния. Клеточно-молекулярные механизмы нейропротекторного действия пептидов являются предметом пристального изучения биологов, медиков и фармакологов [4, 14, 16, 18, 20, 34, 35]. Известно, что довольно часто мишенью действия фармакологических средств являются не только рецепторы,

но и ионные каналы мембран клеток [1–3, 5, 7, 9, 26, 28, 40, 41, 42]. Изучение изменений биопотенциалов и ионных токов нейронов под влиянием орексина А может способствовать пониманию механизмов его многообразной активности. Поскольку в литературе подобных данных мало [6, 14, 16, 18, 20, 21, 23, 25, 34, 40–42], целью исследования было изучение изменений внутриклеточных потенциалов покоя, действия, характера импульсной активности и трансмембранных ионных токов нейронов ЦНС моллюска катушки роговой (*Planorbarius corneus*) под влиянием орексина А в широком диапазоне концентраций.

МЕТОДИКА

Микроэлектродные исследования проводены на интактных идентифицируемых нейронах (100–200 мкм) дорзальной стороны pedalных и висцерального ганглиев изолированной ЦНС моллюска *Planorbarius corneus*. Использованы нейроны, обладающие спонтанной импульсной активностью (ИА) — нейроны кардиореспираторной системы и управляющие движениями ноги моллюска. Из тела вырезали кольцо ганглиев (ЦНС) и помещали в камеру объемом около 0,5 см³ с физиологическим раствором (в мМ/л): NaCl — 50; KCl — 2; CaCl₂ — 4; MgCl₂ — 1,5; трис-ОН — 10; pH — 7,5. Для регистрации внутриклеточных биопотенциалов нейронов использовали стеклянные микроэлектроды, заполненные 2,5 М KCl, с сопротивлением 10–20 МОм [1, 2, 5].

Субстанцию орексина А (C₁₅₂H₂₄₃N₄₇O₄₄S₄, молекулярная масса 3561,12, Sigma, США) вводили в физиологический раствор до концентраций 1, 10, 100 и 1000 мкг/мл и использовали сразу после растворения. При внеклеточном приложении регистрировали изменения потенциала покоя (ПП), импульсной активности (ИА), параметров потенциалов действия (ПД). Биопотенциалы вводили в компьютер с помощью аналого-цифрового преобразователя фирмы «L-Card» L-791 (Россия).

Измерения трансмембранных ионных токов при фиксации потенциала проведены на изолированных неидентифицированных нейронах с диаметром около 100 мкм [1, 2]. Из тела моллюсков вырезали окологлоточное кольцо нервных ганглиев, которое обрабатывали 0,25%-м раствором смеси трипсина и проназы-Е в равном количестве в течение 40–50 мин и затем подвергали механическому разделению. Использовали свежeweделенные нейроны (через 60–120 мин после их выделения), а также на следующий день после хранения в холодильнике при 4 °С. Для измерения трансмембранных ионных токов применяли метод внутриклеточной перфузии изолированных нейронов и фиксации мембранного потенциала с использованием электрофизиологической установки [1, 2, 5]. Орексин А добавляли в наружный (перфузирующий) раствор. Эффекты орексина А на разных

нейронах или повторно на одних и тех же нейронах качественно воспроизводились неоднократно. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента и непараметрического U-критерия Вилкоксона–Манна–Уитни, поскольку нейроны были довольно разнородны, с различным исходным функциональным состоянием. В каждом опыте использовали по 3–4 воздействия на нейроны при каждой его концентрации.

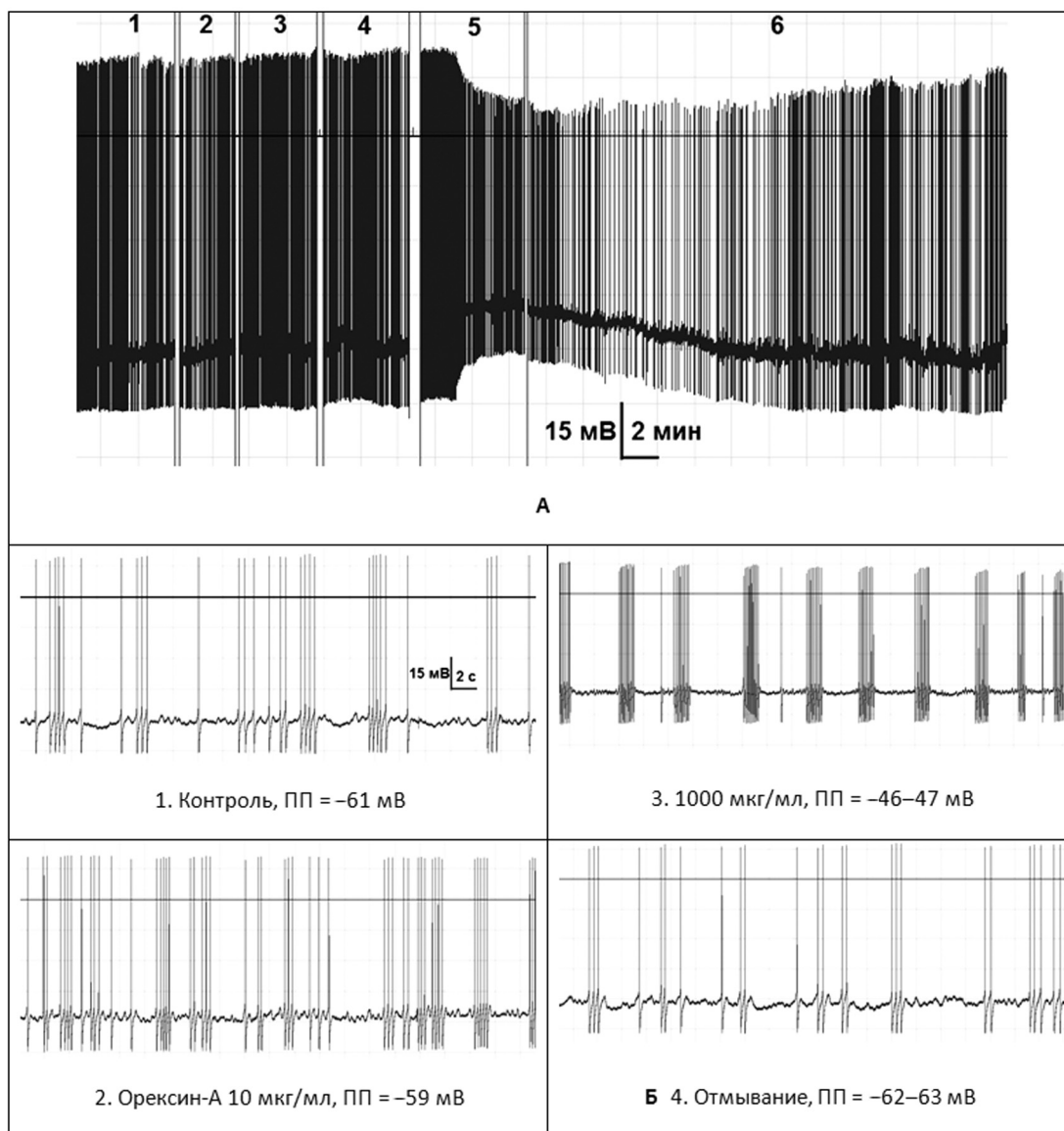
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Орексин А вызывал зависимые от концентрации незначительные гипер- и деполяризационные сдвиги ПП с соответствующими изменениями ИА и параметров ПД. Эффекты стабилизировались через 2–3 мин от начала действия, были обратимы и довольно часто с небольшим гиперполяризующим последствием в течение 5–15 мин. Перестройка ИА нейронов была разнообразной, что зависело от исходной величины их ПП (уровня функционального состояния), характера фоновой ИА и концентраций орексина А. На рисунках приведены наиболее характерные реакции нейронов.

На рис. 1 (А, 1–6 и Б) представлены реакции нейрона правого pedalного ганглия (ППед1) с регулярной ИА на орексин А в концентрациях от 1 до 1000 мкг/мл. Небольшая гиперполяризация (примерно на 1 мВ) и урежение ИА с увеличением амплитуд ПД при действии орексина А в концентрации 1 и 10 мкг/мл (рис. 1 А, 2 и 4) сменялись на столь же небольшую деполяризацию (около 1 мВ) при действии препарата в концентрации 100 мкг/мл с урежением ИА (рис. 1 А, 6). После действия препарата в концентрации 1000 мкг/мл вместо деполяризации и учащения ИА очень замедленно возникала гиперполяризация нейрона на 2–4 мВ с восстановлением ИА и параметров ПД (рис. 1 А, 6).

На рисунке 2 показана динамика изменений электрической активности висцерального нейрона (В1) под влиянием орексина А в концентрациях 100 и 1000 мкг/мл (фрагменты записей 2 и 3) и повторное действие в концентрации 100 мкг/мл (фрагмент 5). Видно, что орексин А вызывает урежение ИА (рис. 2, запись 2, 3 и 5 в сравнении с контролем 1), а при повторном действии на этот же нейрон в концентрации 100 и 1000 мкг/мл на фоне деполяризации происходило снижение частоты и уменьшение (подавление) амплитуд ПД (рис. 2 Б, 3–4 по сравнению с 1). Эффект подавления ПД устранялся замедленно (Б, запись 5).

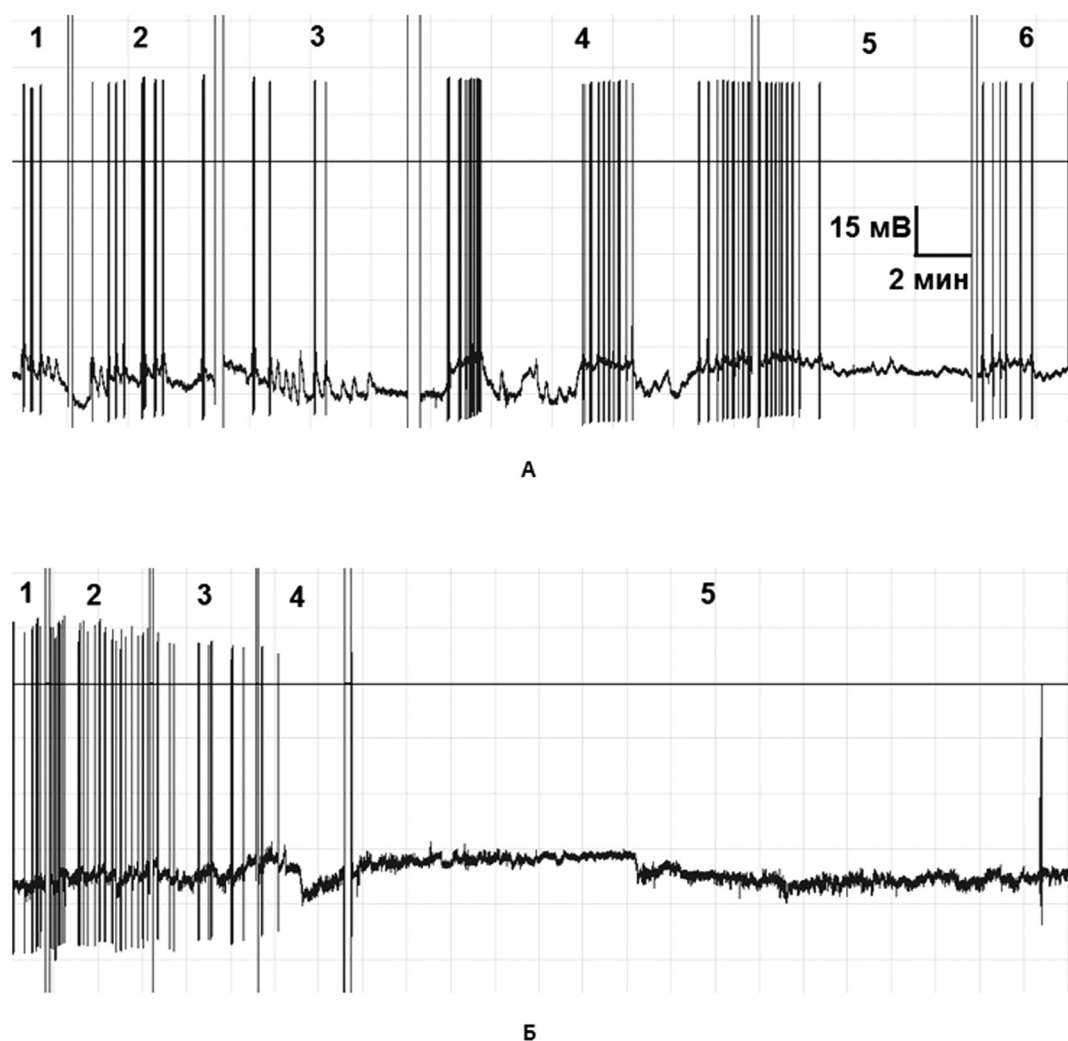
На рисунке 3 на нейроне ППед1 показаны активирующий эффект орексина А при концентрации 10 мкг/мл (А, запись 2), снижение амплитуды ПД при концентрации 100 мкг/мл (запись 3) и подавление ПД при концентрации 1000 мкг/мл (запись 4) с последующим медленным восстановлением ИА (А, запись 5 и Б, запись 5 и 6).



■ **Рисунок 1.** Изменения внутриклеточных биопотенциалов нейронов катушки под влиянием орексина А в различных концентрациях. А — динамика изменений ИА ППед1 нейрона: 1 — контроль, 2 — орексин А 1 мкг/мл, 3 — орексин А 10 мкг/мл, 4 — орексин А 100 мкг/мл, 5 — орексин А 1000 мкг/мл, 6 — отмывание; Б — развертка во времени записей А того же нейрона. Калибровка на Б, 1 — для всех ее фрагментов. Вертикальные линии на записях А — смена растворов (для всех рисунков)

При регистрации трансмембранных ионных токов на изолированных нейронах обнаружено, что под влиянием орексина А в концентрации 1 мкг/мл амплитуда медленного калиевого тока незначительно (на 3–5%) возрастала (рис. 4 А, 2), а с увеличением действующей концентрации она столь же незначительно снижалась (запись 3). Подавление амплитуды кальциевых токов под влиянием орексина А было в меньшей степени, чем калиевых (рис. 4 Б, кривая 3), а натриевых — существенно сильнее — при концентрации 1000 мкг/мл их амплитуда уменьшалась до 40% от контроля (рис. 4 Б, левая часть кривой 3 по сравнению с кривой 1), что можно считать специфическим для орексина А избирательным действием на натриевые каналы, но как для лекарственного средства — неспецифическим.

Таким образом, полученные данные об изменениях ПП (зависимая от концентрации гипер- и деполяризация) и о соответствующих изменениях параметров ПД, ИА и ионных токов нейронов ЦНС моллюска при действии орексина А в концентрациях 1 и 10 мкг/мл или после его действия во всех концентрациях убедительно свидетельствуют о его модулирующем (активирующем) действии на функциональное состояние клеток. Вместе с тем более высокие концентрации орексина А — 1000 мкг/мл, а иногда даже 100 мкг/мл — начинали оказывать неблагоприятное, но обратимое воздействие на нейроны, состоящее в развивающейся деполяризации, сопровождающейся подавлением их ИА и ионных токов.



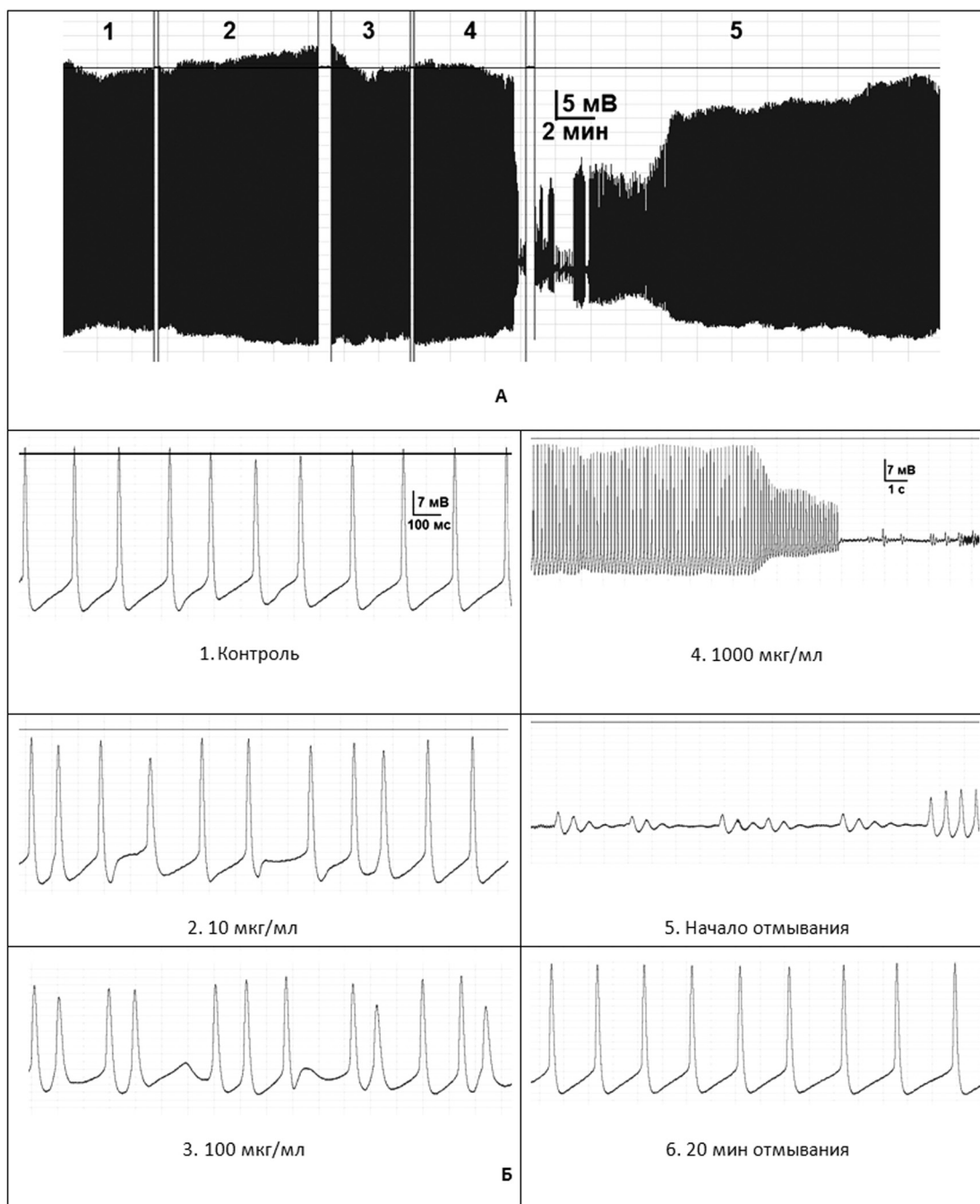
■ Рисунок 2. Динамика изменений ИА висцерального нейрона V1 под влиянием орексина А. А: 1 — контроль, 2 — орексин А 100 мкг/мл, 3 — орексин А 1000 мкг/мл, 4 — отмывание, 5 — повторно орексин А 100 мкг/мл, 6 — отмывание; Б: повторное влияние орексина А на том же нейроне при ухудшении его функционального состояния: 1 — контроль, 2 — орексин А 10 мкг/мл, 3 — орексин А 100 мкг/мл, 4 — орексин А 1000 мкг/мл, 5 — медленное отмывание. Калибровка на А и для Б

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты об изменениях электрической активности нейронов под влиянием орексина А свидетельствуют о его выраженной мембранотропной активности, которая может вносить существенный вклад в механизмы его терапевтических эффектов. Вероятно, что такое влияние орексина А на мембрану нейронов в нашем случае может быть реализовано и помимо его специфических рецепторов. Для подтверждения этого предположения необходимы эксперименты с изучением влияния на ИА нейронов агонистов и/или антагонистов орексиновых рецепторов. При изменениях уровня ПП нейронов орексин А оказывает модулирующее влияние

на параметры ПД и ИА, на выброс медиаторов в синапсах, на межклеточные взаимоотношения, то есть в целом на функциональное состояние и функциональную активность клеток и, следовательно, на деятельность органов и систем организма [1–3, 5, 6, 9, 16, 18, 21, 24, 26, 28, 30, 33, 36, 37, 40–42].

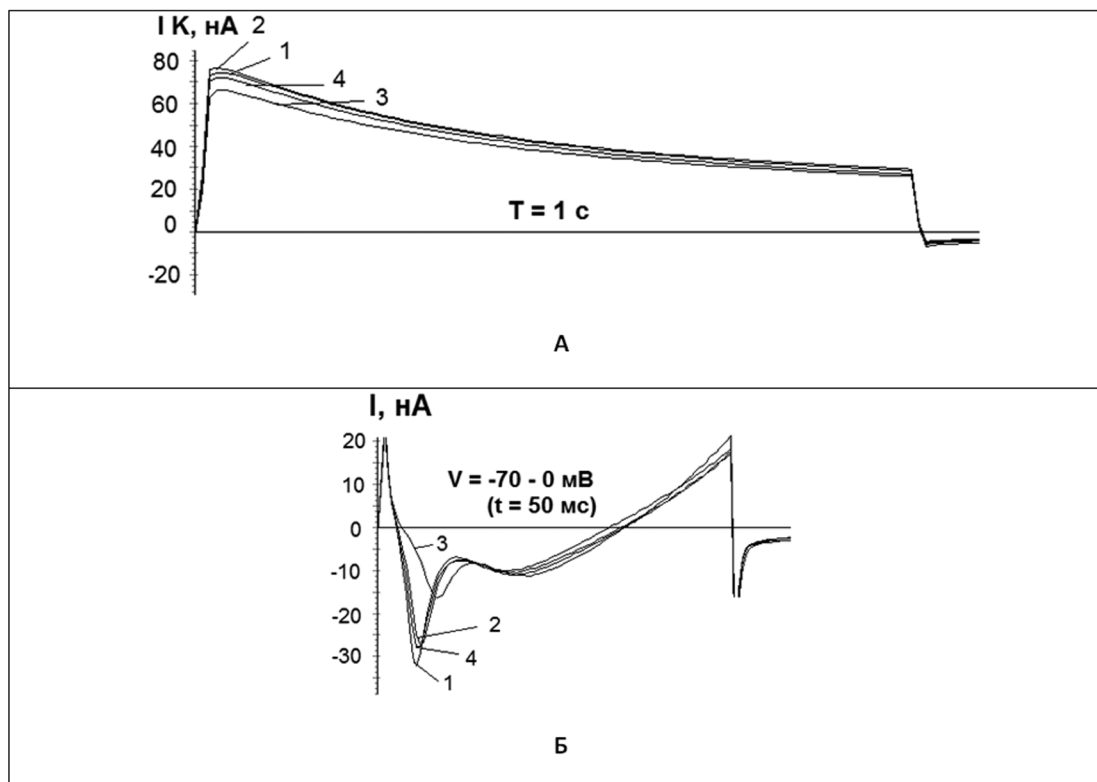
В своем действии на нейроны орексин А напоминает недавно полученные нами данные о влиянии на подобные нейроны моллюска полипептида кортексина и тетрапептида кортагена. Изменения ПП нейронов могут быть связаны с изменениями пассивной проницаемости клеточных мембран к ионам натрия и калия, а гиперполяризация после действия пептидов — как с восстановлением пассивной проницаемости, так и с активацией работы электроген-



■ Рисунок 3. Изменения ИА нейрона ППед1 под влиянием орексина А. А — динамика изменений ИА при последовательном действии в различных концентрациях: 1 — контроль, 2 — орексин А 10 мкг/мл, 3 — орексин А 100 мкг/мл, 4 — орексин А 1000 мкг/мл, 5 — отмывание; Б — развернутые по времени соответствующие записи фрагментов А. Калибровка на Б,1 и для Б,2, 3, 5 и 6

ного натрий-калиевого насоса вследствие увеличения внутриклеточной концентрации ионов натрия при действии пептидов. Изменения ионных токов, параметров ПД и ИА нейронов под влиянием пептидов, скорее всего, обусловлены соответствующими изменениями ПП и частично их можно связать с прямым влиянием на потенциалоправляемые ионные каналы или хемоправляемые каналы синаптических и пейсмекерных структур [5, 6, 14, 17, 18, 21, 25, 30, 33, 34, 41, 42]. В литературе показано увеличение натриевых и кальциевых синаптических токов

под влиянием орексина в концентрациях 0,3–10 нМ [20, 34], но в то же время токи NMDA-рецепторов орексин в концентрации 1 мкМ подавлял [23]. Однако поскольку в методике фиксации потенциала нами показано заметное подавление натриевых ионных токов под влиянием орексина А в концентрации 100 и 1000 мкг/мл, увеличение калиевого тока в концентрации 1 мкг/мл, а также учитывая данные литературы о влиянии орексина на ионные каналы, нельзя исключать и вклад незначительных изменений токов ионных каналов при его действии.



■ Рисунок 4. Изменения ионных токов нейронов моллюска под влиянием орексина А в различных концентрациях. А — калиевые медленные токи: 1 — контроль, 2 — орексин А 10 мкг/мл, 3 — орексин А 1000 мкг/мл, 4 — отмывание; Б — суммарные входящие натрий-кальциевые и выходящие калиевые токи: 1 — контроль, 2 — орексин А 100 мкг/мл, 3 — орексин А 1000 мкг/мл, 4 — отмывание. Поддерживаемый потенциал = -90 мВ, тестирующий — 30 мВ (А) и пилообразное смещение потенциала от -70 до 0 мВ за 50 мс (Б). По оси абсцисс — время (А) и потенциал (Б): по оси ординат — ионные токи

ЛИТЕРАТУРА

1. Вислобоков А. И., Игнатов Ю. Д., Галенко-Ярошевский П. А., Шабанов П. Д. Мембранотропное действие фармакологических средств. — СПб.; Краснодар: Просвещение-Юг, 2010. — 528 с.
2. Вислобоков А. И., Игнатов Ю. Д., Середенин С. Б. Изменения электрической активности нейронов под влиянием афобазола // Эксперим. и клин. фармакол. — 2012. — Т. 75, № 6. — С. 3–7.
3. Камкин А. Г., Киселева И. С. Физиология и молекулярная биология мембран клеток: уч. пособие. — М.: ИЦ Академия, 2008. — 592 с.
4. Лысенко А. В., Арутюнян А. В., Козина Л. С. Пептидная регуляция адаптации организма к стрессорным воздействиям. — СПб.: ВМедА, 2005. — 207 с.
5. Фармакология ионных каналов / Вислобоков А. И., Борисова В. А., Прошева В. И., Шабанов П. Д. — Серия: Цитофармакология. Т. 1 — СПб.: Информ-Навигатор, 2012. — 528 с.
6. Arrigoni E., Mochizuki T., Scammell T. E. Activation of the basal forebrain by the orexin/hypocretin neurons // Acta Physiol. (Oxf). — 2010. — Vol. 198, N 3. — P. 223–235.
7. Ashcroft F. M. Ion channels and disease. — San Diego: Acad. Press, 2000. — 481 p.
8. Brisbare-Roch C. et al. Promotion of sleep by targeting the orexin system in rats, dogs and humans // Nat. Med. — 2007. — Vol. 13, N 2. — P. 150–155.
9. Camerino D. C., Tricarico D., Desaphy J. F. Ion channel pharmacology // Neurotherapeutics. — 2007. — Vol. 4, N 2. — P. 184–198.
10. Dhuria S. V., Hanson L. R., Frey W. H. Intranasal drug targeting of hypocretin-1 (orexin-A) to the central nervous system // J. Pharm. Sci. — 2009. — Vol. 98, N 7. — P. 2501–2515.
11. Dugovic C. et al. Blockade of orexin-1 receptors attenuates orexin-2 receptor antagonism-induced sleep promotion in the rat // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 2009. — Vol. 330. — P. 142–151.
12. Fadel J., Frederick-Duus D. Orexin/hypocretin modulation of the basal forebrain cholinergic system: insights from in vivo microdialysis studies // Pharmacol. Biochem. Behav. — 2008. — Vol. 90, N 2. — P. 156–162.
13. Heinonen M. V. et al. Functions of orexins in peripheral tissues // Acta Physiol. — 2008. — Vol. 192, N 4. — P. 471–485.
14. Hoang Q. V., Bajic D., Yanagisawa M. et al. Effects of orexin (hypocretin) on GIRK channels // J. Neurophysiol. — 2003. — Vol. 90, N 2. — P. 693–702.
15. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXVI. Orexin Receptor Function, Nomenclature and Pharmacology // Pharmacol. Rev. — 2012. — Vol. 64, N 3. — P. 389–420.
16. Ivanov A., Aston-Jones G. Hypocretin/orexin depolarizes and decreases potassium conductance in locus coeruleus neurons // Neuroreport. — 2000. — Vol. 11. — P. 1755–1758.
17. Karnani M. M., Venner A., Jensen L. T., Fugger L., Burdakov D. Direct and indirect control of orexin/hypocretin neurons by glycine receptors // J. Physiol. — 2011. — Vol. 589, Pt. 3. — P. 639–651.
18. Kohlmeier K. A., Watanabe S., Tyler C. J., Burlet S., Leonard C. S. Dual orexin actions on dorsal raphe and laterodorsal tegmentum neurons: noisy cation current activation and selective enhancement of Ca²⁺ transients mediated by L-type calcium channels // J. Neurophysiol. — 2008. — Vol. 100, N 4. — P. 2265–2281.
19. Kukkonen J. P. Physiology of the orexinergic/hypocretinergic system: a revisit in 2012 // Amer. J. Physiol. Cell. Physiol. — 2013. — Vol. 304, N 1. — P. 2–32.

20. Larsson K. P., Peltonen H. M., Bart G. et al. Orexin-A-induced Ca²⁺ entry: evidence for involvement of trpc channels and protein kinase C regulation // *J. Biol. Chem.* — 2005. — Vol. 280, N 3. — P. 1771–1781.
21. Lund P. E., Shariatmadari R., Uustare A. et al. The orexin OX1 receptor activates a novel Ca²⁺ influx pathway necessary for coupling to phospholipase C // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275, N 40. — P. 30 806–30 812.
22. Malherbe P., Borroni E., Pinard E., Wettstein J. G., Knoflach F. Biochemical and electrophysiological characterization of almorexant, a dual orexin 1 receptor (OX1) / orexin 2 receptor (OX2) antagonist: comparison with selective OX1 and OX2 antagonists // *Mol. Pharmacol.* — 2009. — Vol. 76. — P. 618–631.
23. Martin G., Fabre V., Siggins G. R., de Lecea L. Interaction of the hypocretins with neurotransmitters in the nucleus accumbens // *Regul. Pept.* — 2002. — Vol. 104, N 1–3. — P. 111–117.
24. Mieda M., Sakurai T. Integrative physiology of orexins and orexin receptors // *CNS Neurol Disord Drug Targets.* — 2009. — Vol. 8, N 4. — P. 281–295.
25. Murai Y., Akaike T. Orexins cause depolarization via non-selective cationic and K⁺ channels in isolated locus coeruleus neurons // *Neurosci. Res.* — 2005. — Vol. 51, N 1. — P. 55–65.
26. Narahashi T. Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 2000. — Vol. 294, N 1. — P. 1–26.
27. Ohno K., Sakurai T. Orexin neuronal circuitry: Role in the regulation of sleep and wakefulness // *Front. Neuroendocrinol.* — 2008. — Vol. 29, N 1. — P. 70–87.
28. Ragsdale D. S., McPhee J. C., Scheuer T., Catterall W. A. Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na⁺ channels // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1996. — Vol. 93. — P. 9270–9275.
29. Rodgers R. J. et al. Orexins and appetite regulation // *Neuropeptides.* — 2002. — Vol. 36, N 5. — P. 303–325.
30. Sakurai T. Reverse pharmacology of orexin: from an orphan GPCR to integrative physiology // *Regulatory peptides.* — 2005. — Vol. 126. — P. 3–10.
31. Sakurai T., Amemiya A., Ishii M. et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior // *Cell.* — 1998. — Vol. 92, N 4. — P. 573–585.
32. Scammell T. E., Winrow C. J. Orexin receptors: pharmacology and therapeutic opportunities // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 2011. — Vol. 51. — P. 243–266.
33. Selbach O., Doreulee N., Bohla C. et al. Orexins/hypocretins cause sharp wave- and theta-related synaptic plasticity in the hippocampus via glutamatergic, gabaergic, noradrenergic, and cholinergic signaling // *Neuroscience.* — 2004. — Vol. 127. — P. 519–528.
34. Squecco R., Garella R., Luciani G., Francini F., Vaccari M. C. Muscular effects of orexin A on the mouse duodenum: mechanical and electrophysiological studies — *J. Physiol.* — 2011. — Vol. 589, Pt. 21. — P. 5231–5246.
35. Takahashi K., Lin J. S., Sakai K. Neuronal activity of orexin and non-orexin waking-active neurons during wake-sleep states in the mouse // *Neuroscience.* — 2008. — Vol. 153. — P. 860–870.
36. Takatoshi M., Elda A. et al. Orexin receptor 2 expression in the posterior hypothalamus rescues sleepiness in narcoleptic mice // *PNAS.* — 2011. — Vol. 108, N 11. — P. 4471–4476.
37. Tsujino N., Sakurai T. Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system // *Pharm. Rev.* — 2009. — Vol. 61, N 2. — P. 162–176.
38. Volkoff H. Sleep and orexins in nonmammalian vertebrates // *Vitam. Horm.* — 2012. — Vol. 89. — P. 315–339.
39. Wu M., Zaborszky L., Hajsan T., van den Pol A. N., Alreja M. Hypocretin/orexin innervation and excitation of identified septohippocampal cholinergic neurons // *J. Neurosci.* — 2004. — Vol. 24, N 14. — P. 3527–3536.
40. Yang B., Ferguson A. V. Orexin-A depolarizes dissociated rat area postrema neurons through activation of a nonselective cationic conductance // *J. of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience.* — 2002. — Vol. 22, N 15. — P. 6303–6308.
41. Yang B., Ferguson A. V. Orexin-A depolarizes nucleus tractus solitarius neurons through effects on nonselective cationic and K⁺ conductances // *J. Neurophysiol.* — 2003. — Vol. 89, N 4. — P. 2167–2175.
42. Zhang L., Kolaj M., Renaud L. P. Ca²⁺-dependent and Na⁺-dependent K⁺ conductances contribute to a slow AHP in thalamic paraventricular nucleus neurons: a novel target for orexin receptors // *J. Neurophysiol.* — 2010. — Vol. 104, N 4. — P. 2052–2062.

MODULATION OF ELECTRICAL ACTIVITY AND IONIC CURRENTS OF ISOLATED NEURONS BY OREXIN A

Shabanov P. D., Vislobokov A. I.

◆ **Summary:** The changes in intracellular potential of resting (PR) and potential of action (PA) of the identified neurons of pedal and visceral ganglia of the CNS mollusk *Planorbarius corneus* registered by means of intracellular electrodes, and ionic currents of isolated neurons under fixed potential after administration of orexin A in concentrations 1, 10, 100 and 1000 µg/ml were studied by the method of fixation of membrane potential in isolated neurons of the *Lymnaea stagnalis* mollusk. Dibazol in concentrations of 1 and 10 µM effected slightly on the ionic currents. High concentrations of dibazol (100 and 1000 µM) inhibited all currents in dose dependent manner with maximal effect on potassium currents amplitude. EC₅₀ were 7.4 mM for I_{Na}, 4.0 mM for I_{Ca}, 83.9 µM for I_{Ks,1} (one group of neurons) and 2.9 mM for I_{Ks,2} (the another group of neurons). The voltage-ampere membrane characteristics shift was not registered, but the kinetics of currents development was changed. Dibazol was more effective in inhibition of ionic currents compared to its structural analogs.

◆ **Key words:** dibazol; calcium; sodium and potassium ionic currents; mollusk neurons; *Lymnaea stagnalis*.

◆ Информация об авторах

Шабанов Петр Дмитриевич — д. м. н., профессор, заведующий отделом нейрофармакологии им. С. В. Аничкова. ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН. 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12. E-mail: pdshabanov@mail.ru.

Вислобок Анатолій Іванович — д. б. н., старший научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С. В. Аничкова. ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН. 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12. E-mail: vislobokov@yandex.ru.

Shabanov Petr Dmitriyevich — Dr. Med. Sci. (Pharmacology), Professor and Head, Anichkov Dept. of Neuropharmacology. Institute of Experimental Medicine, NWB RAMS. 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlov St., 12, Russia. E-mail: pdshabanov@mail.ru.

Vislobokov Anatoliy Ivanovich — Dr. Med. Sci. (Physiology), Senior Researcher, Anichkov Dept. of Neuropharmacology. Institute of Experimental Medicine, NWB RAMS. 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlov St., 12, Russia. E-mail: vislobokov@yandex.ru.