

© Коллектив авторов, 2014  
УДК: 616.092

Кожевникова Л.М., Меситов М.В., Павлова О.В., Московцев А.А.

## Агонисты 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов SCH 23390 и МК 212 увеличивают силу сокращения аорты крысы в присутствии вазопрессина или ангиотензина II

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,  
125315, Москва, ул. Балтийская, 8. E-mail: lubovmih@yandex.ru

Исследовано участие 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов в регуляции сократимости кровеносных сосудов. Установлено, что в аорте крысы и в культивируемых гладкомышечных клетках линии A7r5 экспрессируются 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы. Показано, что выраженный вазоконстрикторный эффект агонистов 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов SCH 23390 и МК 212 проявляется при их воздействии на сосуды после предварительной активации ангиотензиновых AT<sub>1A</sub>- и вазопрессиновых V<sub>1A</sub>-рецепторов. При активации 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов в 75% случаев наблюдается двухфазное сокращение — чередование фаз ритмичного сокращения и последующего расслабления колец аорты, а в 25% — тоническое. Вызванные агонистами SCH 23390 и МК 212 выраженные периодические высокоамплитудные сокращения фрагментов аорты сохраняются в течение длительного времени (более 1 ч). Выявлено, что центральную роль в механизмах трансдукции сигнала от 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов на ранних этапах играют кальмодулин и тирозиновая c-Src-киназа. Ингибиторы CaM трифторперазин и тирозиновой c-Src-киназы PP<sub>2</sub> отменяют вазоконстрикторную реакцию изолированных колец аорты крысы в ответ на воздействие агонистов 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов МК212 и SCH 23390, но не влияют на прирост силы сокращения, вызванный активатором G-белков фторалюминатом. Полученные данные позволяют предположить, что в сосудах 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы находятся в латентном состоянии («молчащие» рецепторы) и активация этих рецепторов зависит от функционального состояния рецепторов других эндогенных вазоконстрикторов.

**Ключевые слова:** серотонин, 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы, агонисты SCH 23390 и МК 212, экспрессия мРНК, вазоконстрикция, кальмодулин, тирозиновая c-Src-киназа

Kozhevnikova L.M., Mesitov M.V., Moskovtsev A.A.

## Agonists of 5HT<sub>2C</sub>-receptors SCH 23390 and MK 212 increase the force of rat aorta contraction in the presence of vasopressin and angiotensin II

FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, Baltiiskaya str., 125315, Moscow, Russia. E-mail: lubovmih@yandex.ru

We investigated the role of 5HT<sub>2C</sub> receptors in regulation of blood vessel contractility. We determined expression of 5HT<sub>2C</sub> receptors in smooth muscle cell line A7r5 as well as on isolated rat aorta. It was shown that strong vasoconstriction effect of 5HT<sub>2C</sub> receptor agonists — SCH 23390 and MK 212 appeared on blood vessels after preliminary activation of angiotensin AT<sub>1A</sub>- and vasopressin V<sub>1A</sub>-receptors. Biphasic contraction (a rhythmic alternation of contraction and subsequent relaxation phases of aortic rings) and tonic contraction were observed in 75% and 25% of the cases after 5HT<sub>2C</sub> receptor activation, respectively. Periodic high amplitude constrictions of isolated rat aorta, induced by SCH 23390 and MK 212 agonists, were persisted for a long time (>1 hour). It was revealed that calmodulin and c-Src kinase play a central role in the mechanisms of signal transduction from 5HT<sub>2C</sub> receptors. Trifluoperazine and PP<sub>2</sub>, the inhibitors of calmodulin and c-Src kinase, respectively, abolished vasoconstriction reaction of isolated aortic rings in response to SCH 23390 and MK 212 but did not affect the strength gain of the vasoconstriction caused by fluoroaluminate, a G-protein activator. Taken together, these data suggest that 5HT<sub>2C</sub> receptors are in a latent state in blood vessels («silent» receptors) and activation of these receptors is dependent on the functional state of the receptors of other endogenous vasoconstrictors.

**Key words:** serotonin, 5HT<sub>2C</sub> receptors, SCH 23390 and MK 212 agonists, mRNA expression, vasoconstriction, calmodulin, c-Src kinase

Для корреспонденции: Кожевникова Любовь Михайловна — д.м.н., зав. лаб. патологии клеточной рецепции ФГБНУ «НИИОПП», e-mail: lubovmih@yandex.ru

Дисфункция серотонинергической системы вносит существенный вклад в этиологию и патогенез не только многочисленных психоневрологических, но и сердечно-сосудистых заболеваний, включая мигрень [1], гипертензию легочных артерий [2—5], атероск-

лероз [6]. Все это делает 5HT-рецепторы объектом пристального изучения и мишенью для лекарственных препаратов. По мере накопления данных об участии серотонина в регуляции сердечно-сосудистой системы становится очевидным, насколько сложным, порой противоположно направленным может быть эффект от воздействия серотонина (5HT) на организм. Открытие 5HT в сыворотке крови было связано с поиском гуморальных факторов, вызывающих развитие артериальной гипертензии [7]. В течение многих десятилетий 5HT рассматривали как вазоактивное соединение, которое негативно влияет на сердечно-сосудистую систему путем повышения тонуса артериальных сосудов и активации митогенеза в гладкомышечных клетках сосудов [8—11]. Оба этих процесса — усиление сокращения и рост сосудов, в конечном итоге должны приводить к стойкому повышению АД и развитию гипертонической болезни. Данное представление было подтверждено в многочисленных экспериментальных исследованиях на изолированных сосудах. Было продемонстрировано, что воздействие 5HT на изолированные фрагменты артерий приводит к их выраженному сокращению. Кроме того, у больных гипертонией и у гипертонических животных наблюдается повышенная чувствительность к действию 5HT, которая проявляется в значительном повышении артериального давления [12—14]. Наряду с этим, внутривенное введение 5HT здоровым добровольцам и животным приводит к уменьшению сосудистого сопротивления и снижению артериального давления [15—18]. Предполагают, что этот эффект связан главным образом со стимуляцией 5HT-рецепторов, локализованных в центральной нервной системе [19—21]. Ранее мы показали, что при травматическом шоке, а также при длительном применении глюкокортикоидных гормонов, наблюдается инверсия реакции на воздействие 5HT: увеличение АД в ответ на внутривенное введение амина в дозах, которые в физиологических условиях, напротив, приводили к его снижению [22, 23]. В литературе данный феномен был описан и при других патологических состояниях, в том числе при шоке и кровопотере [18, 24, 25]. Пока нет четкого представления о том, какие 5HT-рецепторы, сигнальные каскады, внутриклеточные белки и процессы, происходящие непосредственно на уровне сосудистой стенки, ответственны за кардинальное изменение реакции на введение 5HT в условиях нормы и патологии.

Убедительные данные о наличии в гладкомышечных клетках сосудов локальной серотонинергической системы, обеспечивающей синтез и межклеточный транспорт биогенного амина, были представлены в работе Ni и соавт. [26]. Необходимые компоненты для синтеза 5HT имеются и в эндотелиальных клет-

ках [27]. Авторами была высказана гипотеза, согласно которой концентрация 5HT в гладкомышечных и эндотелиальных клетках артерий может увеличиваться за счет внутриклеточного синтеза амина, и есть основания полагать, что активация локальной серотонинергической системы вносит существенный вклад в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний, и прежде всего, артериальной гипертензии, атеросклероза и инсульта [26, 27]. Это открытие имеет принципиальное значение, поскольку одним из предметов для многочисленных дискуссий о роли 5HT в развитии гипертонических состояний было отсутствие корреляционной связи между уровнем свободно циркулирующего и связанного с тромбоцитами 5HT, с одной стороны, и развитием гипертонии, с другой [17, 18]. Различные ответы на действие 5HT обусловлены наличием 7 типов и более 15 видов 5HT-рецепторов, локализованных в различных тканях, в том числе в гладкомышечных и эндотелиальных клетках кровеносных сосудов [18, 28]. Традиционно считается, что основными вазоконстрикторными 5HT-рецепторами являются рецепторы 5HT<sub>2A</sub>-типа. Однако убедительных данных о причастности 5HT<sub>2A</sub>-рецепторов к развитию артериальной гипертензии до сих пор нет. Антигипертонический эффект блокатора этих рецепторов кетансерина связывают главным образом со способностью препарата ингибировать  $\alpha$ -адренорецепторы [29, 30]. Ранее мы показали, что в аорте и брыжеечной артерии крысы находятся «тихие» вазоконстрикторные 5HT<sub>1A</sub>-рецепторы, агонист-индуцированная активация которых зависит от функционального состояния рецепторов других эндогенных вазоконстрикторов [31, 32]. Нами была высказана гипотеза, согласно которой, в сосудах помимо 5HT<sub>1A</sub>-рецепторов в неактивном латентном состоянии могут находиться и другие типы 5HT-рецепторов, свойства которых могут значительно меняться в зависимости от условий и факторов, воздействующих на клетку. *Цель исследования* — идентификация 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов в аорте крысы и в гладкомышечных клетках линии A7r5 и изучение их роли в регуляции сократимости сосудов.

### Методика

Работа выполнена на изолированных фрагментах аорты крыс-самцов породы Вистар массой 200—220 г и на культуре гладкомышечных клеток (ГМК) линии A5r7, полученной из АТСС (США). Крыс, наркотизированных 25%-ным раствором уретана (4 мл/кг), декапитировали, извлекали грудной отдел аорты и брыжеечную артерию и помещали в охлажденный физиологический раствор Krebs—Хенселейта. Сосуды очищали от жировой и соединительной ткани. Кольцевые фрагменты сосудов

шириной 1,5—2 мм крепили на держателях, погруженных в термостатируемые камеры с физиологическим раствором (37°C), через который пропускали карбоген (смесь  $O_2/CO_2 = 95/5\%$ ). Измерение силы сокращения изолированных фрагментов сосудов проводили в изометрическом режиме по методу Мульвани согласно ранее описанному протоколу [15]. Для оценки функциональной активности рецепторов в работе применены фармакологические подходы. О функциональном состоянии ГМК и целостности эндотелиального слоя сосудов судили по силе сокращения изолированных колец сосудов в ответ на воздействие агониста  $\alpha_1$ -адренорецепторов ( $\alpha_1$ -АР) норадреналина (NA, Sigma, США) и степени их расслабления на действие агониста мускариновых рецепторов карбахола (Sigma). Были использованы серотонин (5HT), агонисты 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов — SCH 23390 hydrochloride и МК 212 (Tocris, США), а также агонисты 5HT<sub>2A</sub>-рецепторов — DOI hydrochloride (DOI, Sigma, США) и ТВС-2 (Tocris). Применяли агонисты ангиотензиновых (AT<sub>1A</sub>) и вазопрессиновых (V<sub>1A</sub>) рецепторов соответственно ангиотензин II (AT<sub>1II</sub>) и аргинин-вазопрессин (AVP) (Sigma). Оценивали влияние антагонистов 5HT-рецепторов кетансерина (5HT<sub>2A</sub>/5HT<sub>2C</sub>, Alexis, США), SB 221284 (5HT<sub>2C</sub>/5HT<sub>2B</sub>, Tocris) и NAN-190 hydrobromide (5HT<sub>1A</sub>, Sigma), а также антагониста  $\alpha_1$ -АР празозина (Sigma) на агонист-индуцированное сокращение изолированных фрагментов сосудов. Изучали влияние ингибиторов кальмодулина, с-Src- и Rho-киназ соответственно трифторперазина (TFP, Tocris), 3-(4-chlorophenyl) 1-(1,1-dimethylethyl)-1H-pyrazolo [3,4-d]pyrimidin-4-amine (PP<sub>2</sub>, Tocris) и фасудила (Sigma) на 5HT-индуцированное сокращение колец аорты. Время инкубации изолированных фрагментов аорты крысы с ингибиторами и антагонистами 5HT-рецепторов составляло 20 мин, после чего оценивали характер изменения сократительного ответа на воздействие вазоактивных соединений.

ГМК линии A577 выращивали с использованием модифицированной среды Игла DMEM с глюкозой (4,5 г/л) («GIBCO», США), с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), 10 мкг/мл гентамицина и 2 ммоль/л глутамина, при 37°C, в атмосфере с добавлением 5%  $CO_2$ . Жизнеспособность клеток оценивали методом исключения витального красителя трипанового синего на автоматическом счётчике клеток Countess™ («Invitrogen», США).

Выделение суммарной клеточной РНК из клеток линии A7r5 и ткани сосуда проводили с использованием набора RNeasy® Mini Kit («Qiagen GmbH», Хильден, Германия) в соответствии с протоколом про-

изводителя. Лизис клеток адгерентной линии A7r5 проводили непосредственно в культуральной посуде добавлением 350 мкл лизирующего буфера RLT, содержащего 0,1%  $\beta$ -меркаптоэтанола. Для выделения суммарной клеточной РНК из аорты крысы сосуд предварительно растирали пестиком в присутствии жидкого азота. Гомогенизат переносили в 1,5 мл пробирки и лизировали в 350 мкл буфера RLT, содержащего 0,1%  $\beta$ -меркаптоэтанола. Для полной гомогенизации лизат пропускали через шприц с иглой 20g. Дальнейшие этапы выделения суммарной РНК из клеток A7r5 и ткани сосуда были одинаковыми. Концентрацию РНК и примесей в образцах определяли на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). В дальнейшую пробоподготовку брали образцы суммарной РНК с отношением показателей абсорбции при длинах волн 260/280 нм не ниже 2,0 и отношением 260/230 нм — не ниже 2,2. Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили с использованием гексануклеотидных праймеров, последовательности которых представляли собой все возможные комбинации из шести нуклеотидов, и обратной транскриптазы M-MuLV в составе набора RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit («Fermentas», Литва) в соответствии с протоколом производителя.

Для амплификации полученных в ходе реакции ОТ фрагментов комплементарной ДНК исследуемых генов и детектирования в режиме реального времени продуктов ПЦР (ПЦР-РВ) использовали специфические праймеры и универсальный набор реактивов Maxima™ SYBRGreen/ROX qPCR MasterMix («Fermentas», Литва). Конечная концентрация каждого праймера составляла 0,3 мкмоль/л. Реакцию проводили на амплификаторе CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) по следующему трехэтапному температурно-временному протоколу:

- 1) начальная денатурация — 95°C, 10 мин;
- 2) термоциклирование (40 циклов) с шагами денатурация — 95°C, 15 с., отжиг — 56°C, 30 с, элонгация — 72°C, 30 с;
- 3) заключительный синтез — 72°C, 5 мин.

Регистрация интенсивности флуоресценции SybrGreen, связывающегося с двухцепочечной ДНК, и пассивного референсного красителя ROX осуществлялась автоматически программным обеспечением прибора в конце стадии элонгации каждого цикла. Для подтверждения специфичности реакции после этапа заключительного синтеза регистрировали изменение флуоресценции при плавлении продуктов амплификации в пробах в диапазоне температур от 55°C до 95°C с шагом 0,5°C и продолжительностью шага 10 с (кривая плавления). В каждую экспериментальную поста-

новку включали контрольные реакции: отрицательный контроль без матрицы — без кДНК; отрицательный контроль с неспецифической матрицей — суммарной РНК; положительный контроль, содержащий кДНК гена  $\beta$ -Actin. Использовались праймеры со следующими последовательностями:

- для 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов —  
5'-TTCGTTCTCATCGGGTCSCTT-3' (прямой) и  
5'-CACATAGCCAAATCCACASAA-3' (обратный);
- для  $\beta$ -Actin —  
5'-CCTSTATGCCAACACAGTGC-3' (прямой) и  
5'-GCTCAGTAACAGTCCGCCTA-3' (обратный).

Для подтверждения специфичности ПЦР-РВ проводили разделение продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза в 1,7% агарозном геле. Гели фотографировали на станции гель-до-

кументирования Kodak Image Station 440CF («Eastman Kodak Company», США). Статистическая обработка данных проводилась в программе Statistica 6.0. При оценке данных использовали t-критерий Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Ранее нами были получены данные об отсутствии влияния агониста 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов SCH 23390 на тонус «интактных» сосудов крысы, на основе которых было высказано предположение о том, что 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы не участвуют в регуляции тонуса кровеносных сосудов [33]. В настоящем исследовании также были получены данные о том, что в ответ на воздействие на изолированные кольца аорты кры-

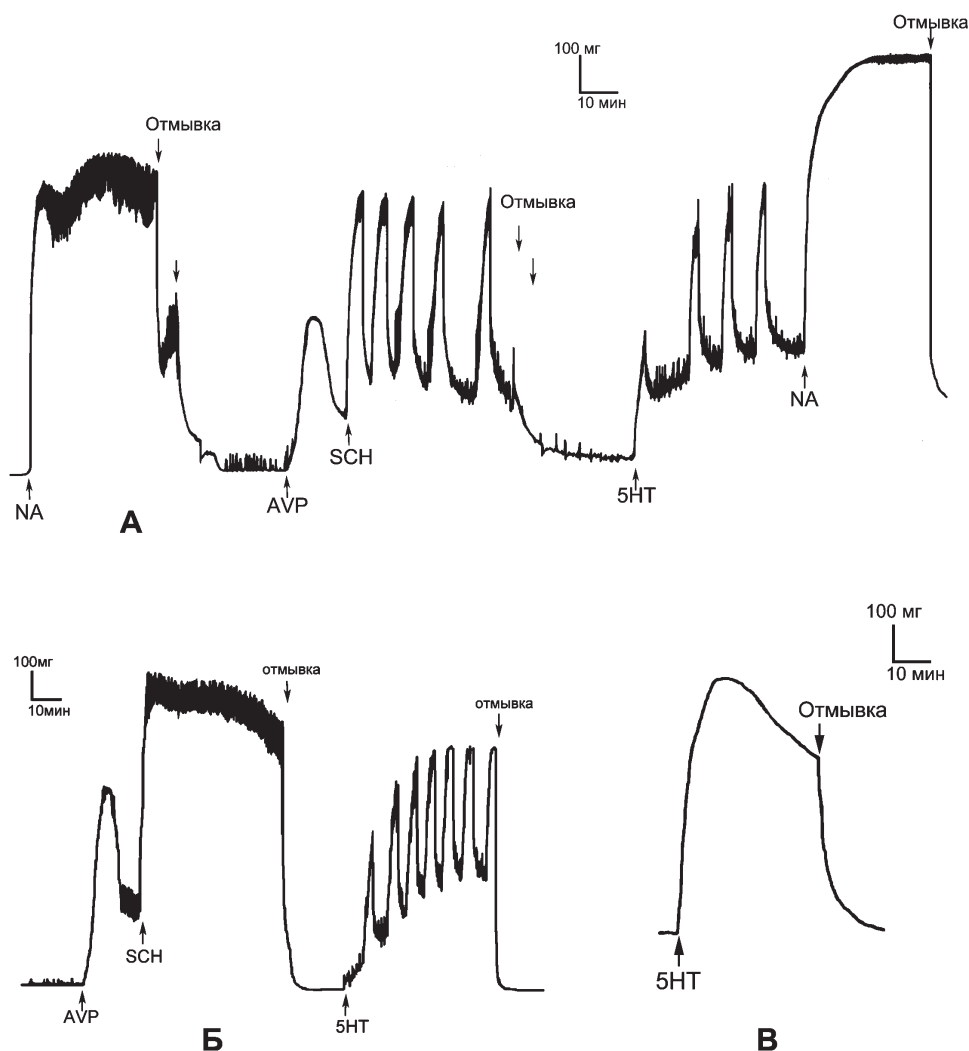


Рис. 1. Периодические высокоамплитудные (А) и тонические (Б) сокращения изолированных колец аорты, вызванные воздействием агониста 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов SCH 23390 на предсокращенные аргинин-вазопрессином (AVP) сосуды. Кинетика 5HT-индуцированного сокращения сосудов до (В) и после (А, Б) активации 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов.

сы агониста 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов SCH 23390 в концентрациях  $10^{-8}$  —  $10^{-5}$  М сила их сокращения не изменяется. Выраженный вазоконстрикторный эффект агониста SCH 23390 проявляется только при его воздействии на предварительно сокращенные АТII ( $10^{-8}$  М) или AVP ( $10^{-8}$  М) кольца аорты. Под воздействием SCH 23390 сила сокращения колец аорты возрастала на  $650 \pm 21$  мг ( $n = 28$ ). Активация 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов в 75% случаев ( $n = 21$ ) индуцировало выраженные периодические высокоамплитудные сокращения фрагментов аорты (рис. 1,А), а в 25% ( $n = 7$ ) — тоническое сокращение (рис. 1,Б). Вызванное агонистом SCH 23390 ритмическое и тоническое сокращение сосудов сохранялось в течение длительного времени (более 1 ч). Описанная кинетика сокращения сосудов в ответ на воздействие SCH 23390 была характерна для сосудов, предсокращенных как AVP, так и АТII.

Неожиданными оказались результаты об изменении кинетики сокращения на 5HT при его воздействии на сосуды, отмытые от агонистов 5HT<sub>2C</sub>- и АТ1А- или V1А-рецепторов (рис. 1). В норме кривая 5HT-индуцированного сокращения колец аорты имеет куполообразную форму — вслед за подъемом следует относительно медленный спуск, который соответствует снижению силы сокращения сосудов (рис. 1,В). Как показано на рис. 1, добавление 5HT через 1 час с момента активации 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов в подавляющем большинстве случаев приводило к не свойственному для данного амина двухфазному сокращению колец аорты.

В отличие от SCH 23390 воздействие на «интактные» сосуды агониста 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов МК 212

( $5 \times 10^{-6}$  М) в 30% случаев ( $n = 9$ ) приводило к увеличению силы сокращения на  $472 \pm 27$  мг. Выраженный вазоконстрикторный эффект агониста в 100% случаев воспроизводился при его воздействии на предварительно сокращенные АТII или AVP фрагменты аорты ( $n = 16$ ). Кинетика МК 212-индуцированного сокращения колец аорты характеризовалась чередованием фаз ритмичного сокращения и последующего расслабления (рис. 2А). Добавление к сокращающимся сосудам агониста 5HT<sub>2A</sub>-рецепторов ТВС-2 ( $5 \times 10^{-7}$  М) или DOI ( $10^{-6}$  М) увеличивало частоту и продолжительность высокоамплитудных сокращений (рис. 2,Б). 5HT<sub>2</sub>-рецепторы структурно высокоомологичны, что обуславливает значительное сходство в их фармакологии. Известно, что агонист МК 212 обладает высокой селективностью по отношению к рецепторам 5HT<sub>2C</sub>-типа и незначительной — к 5-HT<sub>2A</sub>-типа. Возможно, редко воспроизводимые случаи индуцированного МК 212 сокращения «интактных» сосудов обусловлены возможностью данного агониста связываться с 5HT<sub>2A</sub>-рецепторами.

Агонист 5HT<sub>2</sub>-рецепторов DOI обладает высокой селективностью по отношению к рецепторам 5HT<sub>2A</sub>-типа, однако его часто используют в экспериментах на культуре клеток, экспрессирующих 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы человека, для изучения механизмов клеточной сигнализации от данного типа рецепторов [34]. Поэтому не исключено, что эффект, полученный от воздействия ТВС-2 или DOI на фоне активации 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов, мог быть обусловлен их способностью взаимодействовать с данными рецепторами.

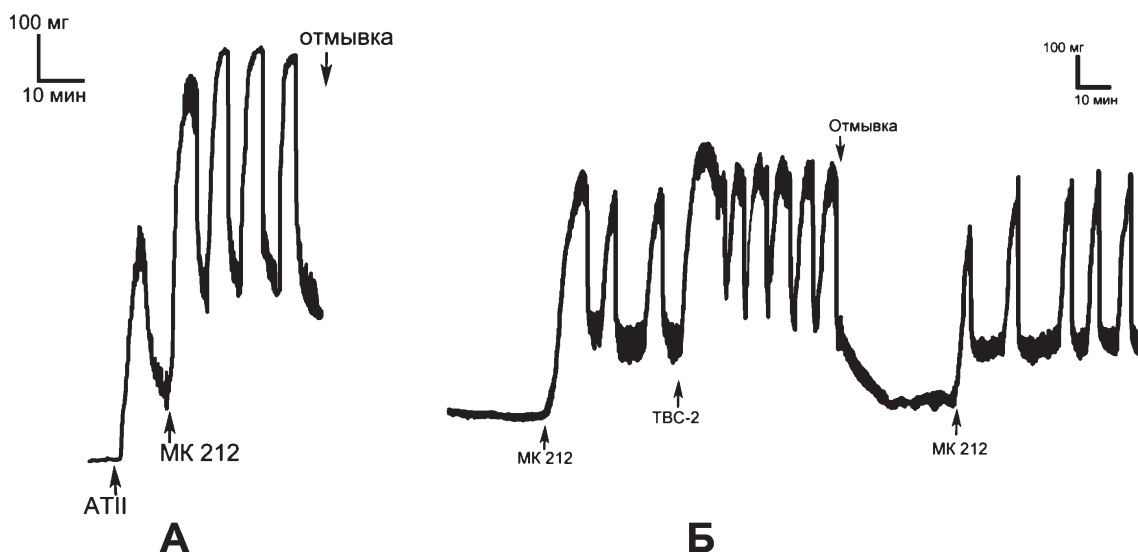


Рис. 2. Двухфазное сокращение изолированных колец аорты (А) в ответ на воздействие агониста 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов МК 212 на предсокращенные ангиотензином II (АТII) сосуды. Б — кинетика сокращения колец аорты, вызванная последовательным воздействием на сосуды агонистов 5HT<sub>2C</sub>- и 5HT<sub>2A</sub>-рецепторов соответственно МК 212 и ТВС-2.

Методом ингибиторного анализа мы попытались получить дополнительное подтверждение тому, что полученный вазоконстрикторный эффект от воздействия на сосуды агонистов SCH 23390 и МК 212 вызван передачей сигнала от 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов. Известно, что на внутриклеточных фрагментах 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов, как и на 5HT<sub>2A</sub>- и 5HT<sub>1A</sub>-рецепторах, имеются участки прямого взаимодействия с кальмодулином (CaM) [35—38]. Ранее было установлено, что ингибиторы CaM избирательно подавляли вазоконстрикторную реакцию в ответ на воздействие 5HT и агонистов 5HT<sub>2A</sub>- и 5HT<sub>1A</sub>-рецепторов [39]. Исследования показали, что в присутствии ингибитора CaM TFP ( $2 \times 10^{-5}$  М) полностью подавляется вазоконстрикторная реакция изолированных колец аорты крысы на воздействие SCH 23390 и МК 212 при их добавлении к предсокращенным AVR или АПВ сосудам (таблица). В то же время ингибитор CaM не оказывал негативного влияния на вазоконстрикцию, вызванную активатором G-белков фторалюминатом (10 мМ NaF в присутствии 20 мкМ AlCl<sub>3</sub>). Как в отсутствие, так и в присутствии TFP в ответ на воздействие фторалюмината сила сокращения колец аорты увеличивалась соответственно на  $743 \pm 31$  мг и  $781 \pm 37$  мг.

Изучение влияния ингибитора тирозиновой c-Src-киназы PP<sub>2</sub> ( $10^{-5}$  М) на сократительные свойства сосудов показало, что препарат полностью подавляет вазоконстрикторную реакцию, вызванную действием 5HT и агонистов 5HT<sub>2</sub>- и 5HT<sub>1A</sub>-рецепторов (таблица). В контрольных экспериментах применяли неактивный аналог PP<sub>3</sub> ( $10^{-5}$  М). В присутствии ингибитора PP<sub>2</sub> не изменялась реакция колец аорты на воздействие NA ( $10^{-7}$  М) и активатора G-белков фторалюмината.

Установлено, что как в присутствии, так и в отсутствие ингибитора Rho-киназы фасудила (ФАС,  $2 \times 10^{-5}$  М) индуцированный агонистами 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов SCH 23390 и МК 212 прирост силы сокращения колец аорты оставался неизменным. Отмечено, что в присутствии ФАС в ряде случаев уменьшалась продолжительность фазы тонического сокращения в ответ на действие агонистов 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов. ФАС не оказывал негативного влияния на 5HT-индуцированную вазоконстрикцию аорты крысы (таблица). В отличие от этого, инкубация сосудов с ингибитором Rho-киназы подавляла сократительную реакцию колец аорты на воздействие агонистов 5HT<sub>2A</sub>- и 5HT<sub>1A</sub>-рецепторов соответственно на 70—85% и 90% (таблица). Полученные данные позволяют предположить, что в присутствии ФАС сокращение сосудов, вызванное воздействием 5HT, реализуется посредством 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов по механизму независимо от активности Rho-киназы.

Как следует из представленных в таблице данных, антагонист 5HT<sub>2C</sub>/5HT<sub>2B</sub>-рецепторов SB 221284 ( $10^{-5}$  М) подавляет вазоконстрикцию, вызванную воздействием на сосуды 5HT и агонистов 5HT<sub>2A</sub>/2C-рецепторов. О специфичности действия SB 221284 по отношению к вазоконстрикторному эффекту 5HT свидетельствуют данные об отсутствии ингибирования NA-индуцированного сокращения. Антагонисты 5HT<sub>1A</sub>- и  $\alpha_1$ -АР соответственно NAN-190 ( $10^{-6}$  М) и празозин ( $10^{-7}$  М) не ингибируют вазоконстрикторное действие агонистов 5HT<sub>2A</sub>/2C-рецепторов и 5HT. Результаты, полученные на аорте крысы, были воспроизведены в экспериментах на изолированных фрагментах брыжеечной артерии (данные не приводятся). Таким образом,

Таблица

Влияние ингибиторов CaM, Rho- и c-Src-киназ и антагонистов 5HT- и  $\alpha$ -адренорецепторов на агонист-индуцированное сокращение изолированных колец аорты крысы

Ингибиторы и антагонисты	Агонисты						
	5HT	DOI 5HT <sub>2A/2C</sub>	TBC-2 5HT <sub>2A</sub>	SCH 5HT <sub>2C/1A</sub>	МК 212 5HT <sub>2C/2A</sub>	8-OHDPAT 5HT <sub>1A</sub>	NA $\alpha$ -AR
TFP ингибитор CaM	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
PP <sub>2</sub> ингибитор cSrc-киназы	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0
ФАС ингибитор Rho-киназы	0	Подавляет на 85%	подавляет на 70 %	0	0	Подавляет на 90%	Уменьшает на 40%
SB 221284 (5HT <sub>2C/2B</sub> )	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	0
NAN-190 5HT <sub>1A</sub>	0	0	0	0	0	(-)	(-)
Празозин $\alpha$ -AR	0	0	0	0	0	Уменьшает на 30%	(-)

Примечание. 0 — достоверно не изменяет; (-) — 100%-ое подавление агонист-индуцированного вазоконстрикторного ответа

методом фармакологического анализа были получены данные, которые позволили предположить, что в аорте и брыжеечной артерии крыс локализованы 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы, посредством которых реализуется вазоконстрикторный эффект 5HT.

Методом ОТ-ПЦР-РВ установлено, что в аорте крысы и в культуре ГМК линии А7г5 экспрессируется мРНК 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов. Однако уровень мРНК 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов как в аорте, так и в клетках линии А7г5 был низким. Для контроля возможности образования ПЦР-продукта за счет контаминации геномной ДНК мы использовали дополнительно образцы кДНК, синтезированной на основе тотальной РНК, выделенной из аорты крыс с травматическим шоком, который моделировали по ранее описанному методу [15]. Как показано на рис. 3,А, уровень мРНК 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов в аорте контрольных крыс в 5 раз выше по сравнению с уровнем мРНК в аорте, выделенной через 24 часа после нанесения животным механической травмы на мягкие ткани бедра. Полученные данные являются косвенным подтверждением того, что определяемый уровень мРНК специфичен по отношению к 5HT<sub>2C</sub>-рецепторам. О специфичности ПЦР-РВ свидетельствовали и данные разделение продуктов амплификации методом электрофореза в 1,7% агарозном геле (рис. 3,Б).

### Заключение

В настоящее время идентифицированы три подтипа 5HT<sub>2</sub>-рецепторов — 5HT<sub>2A</sub>, 5HT<sub>2B</sub> и 5HT<sub>2C</sub>. Фармакологические профили 5HT<sub>2</sub>-рецепторов очень похожи, что представляет определенные сложности в определении их функциональной роли [27, 40, 41]. 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы широко представлены в различных структурах мозга и являются потенциальной мишенью различных фармакологических препаратов, применяемых для лечения депрессии, шизофрении, тревожности и других заболеваний центральной нервной системы [42—45]. Исключительно высок уровень экспрессии этих рецепторов в сосудисто-эпителиальных сплетениях мозга. Вопрос о наличии 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов в сосудах и их участии в регуляции сократимости до сих пор остается открытым. Уникальной особенностью 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов, которая отличает эти рецепторы не только от многочисленных типов 5HT-рецепторов, но и других видов сопряженных с G-белками рецепторов, является посттранскрипционное РНК-редактирование [37]. Редактирование мРНК 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов приводит к изменению аминокислотной последовательности во второй внутриклеточной петле рецепторной молекулы и образованию более 20 изоформ рецептора. Полагают, что редактирование РНК представляет собой но-

вый механизм регуляции 5HT<sub>2C</sub>-опосредованной внутриклеточной сигнализации. В результате РНК-редактирования может в 10—15 раз снижаться эффективность взаимодействия рецепторной молекулы с G-белками [46—48], изменяться не только лиганд-зависимая, но и лиганд-независимая сигнализация [49]. Геномная (неотредактированная) форма 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов IN1 обладает постоянной базальной активностью по отношению к G<sub>q</sub>-зависимой сигнализации [49—51]. Опосредовано через G $\alpha$ q-субъединицу 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы активируют фосфолипазу C (PLC) [52]. В результате 5HT<sub>2C</sub>-индуциро-

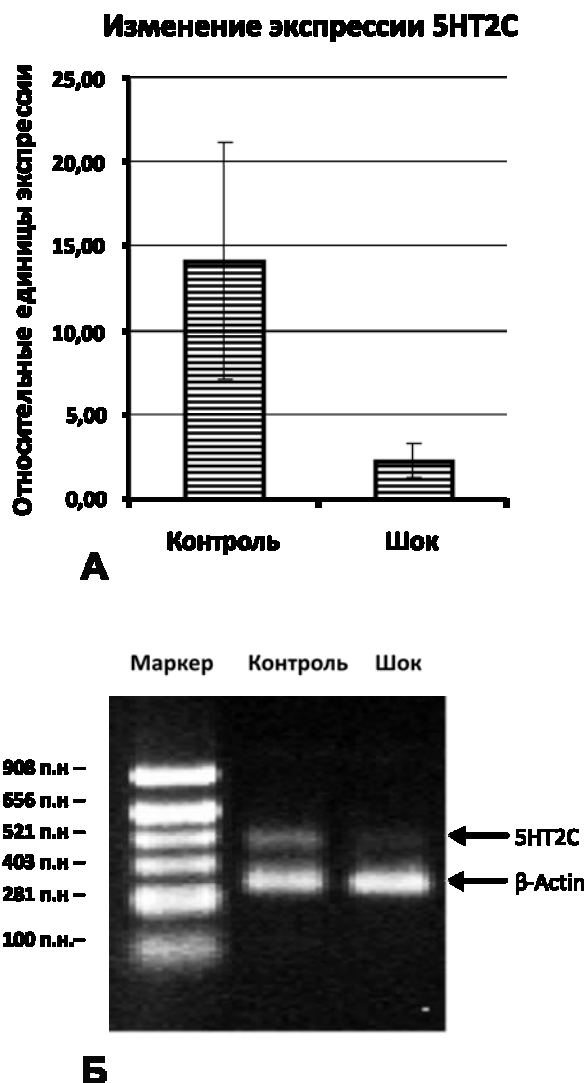


Рис. 3. Экспрессия мРНК 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов в аорте контрольных крыс и крыс с травматическим шоком:

А — уровень экспрессии мРНК 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов (5HT<sub>2C</sub>) в аорте контрольных крыс значительно выше, чем в аорте крыс, выделенных через 24 часа после нанесения травмы (P < 0,05); Б — ПЦР-амплифицированные продукты 5HT<sub>2C</sub> и β-actin, разделенные в 1,7% агарозном геле.

ванного гидролиза фосфоинозитола образуется инозитолтрифосфат ( $IP_3$ ), активируются  $IP_3$ -рецепторы эндоплазматического ретикулаума, что приводит к увеличению концентрации ионов  $Ca$  в цитоплазме клеток (рис. 4А). В экспериментах на культуре клеток линии СРЕ (choroid plexus epithelial) было показано, что 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы (INI) активируют малый G-белок RhoA, и этот процесс опосредован  $G_{\alpha_{13}}$  субъединицей гетеротримерного комплекса G-белков (рис. 4Б) [53]. Аналогичные результаты были получены и на линии клеток NIH-3T3, экспрессирующих INI изоформу 5HT<sub>2C</sub>-рецептора человека [34].

Первые данные об экспрессии 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов в аорте и легочной артерии крыс с легочной гипертензией были представлены в работе Zhang и соавт. [5]. В результате проведенных исследований нами также было установлено, что в аорте крысы и в ГМК линии A7r5 экспрессируются 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы. Однако уровень мРНК рецепторов 5HT<sub>2C</sub>-типа в аорте крысы значительно ниже по сравнению с мРНК рецепторов 5HT<sub>2A</sub>-типа [54].

В настоящем исследовании было установлено, что 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы в физиологических условиях находятся в латентном состоянии, и их активность может проявляться на фоне активации рецепторов других вазоактивных соединений. Отличительной особенностью кинетики 5HT<sub>2C</sub>-индуцированного сокращения является фазовый характер — ритмическое чередование сокращения и релаксации (рис. 1). Характерно, что после лиганд-индуцированной активации 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов изменяется кинетика сократительного ответа и на воздействие 5HT и агонистов 5HT<sub>2A</sub>-рецепторов TBC-2 и DOI — как и в случае с применением антагонистов 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов эти соединения вызывали ритмические сокращения изо-

лированных колец аорты (рис. 1). Этот эффект был специфичен по отношению к вазоконстрикторным 5HT-рецепторам, поскольку добавление к ритмично сокращающимся сосудам приводило к увеличению силы сокращения сосудов и в большинстве случаев отменяло двухфазный характер сокращения. Ранее нами была описана аналогичная кинетика двухфазного сокращения изолированных колец аорты и брыжеечной артерии в ответ на воздействие агониста 5HT<sub>1A</sub>-рецепторов 8-ОН-ДРАТ [32]. По-видимому, высокоамплитудные колебания силы сосудистого сокращения вызваны периодическими изменениями электрического потенциала плазматической мембраны ГМК сосудов. Показано, что воздействие агонистов на экспрессированные в ооцитах Xenopus 5HT<sub>1A</sub>-рецепторы человека вызывало активацию плавного входящего тока,  $Ca$ -чувствительных хлорных каналов и калиевых G-белок-зависимых каналов обратного выпрямления [55].

Исследования на кольцах коронарных артерий человека, выделенных от пациентов с идиопатической дилатационной кардиомиопатией, показали, что ответ на воздействие 5HT в 60% случаев наблюдается двухфазное сокращение артерий и только в 40% — тоническое [56]. Авторы приводят убедительные данные о том, что за фазу релаксации в цикле ритмичных сокращений коронарной артерии ответственны MaxiK каналы (voltage-dependent and  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel). Так, блокатор MaxiK каналов ибериотоксин нивелировал ритмичность сокращений [56]. Можно предположить, что в ГМК сосудов посредством 5HT<sub>1A</sub>- и 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов реализуются перечисленные механизмы активации ионных каналов. В этом случае происходит деполяризация плазматической мембраны этих клеток, что в итоге приводит к открыванию потенциалуправляемых каль-

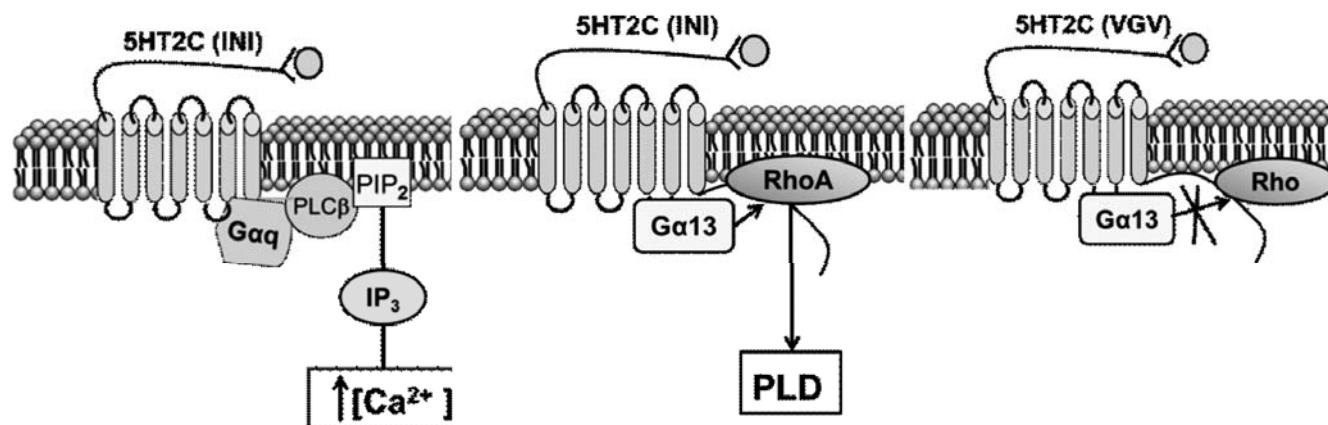


Рис. 4. Влияние редактирования мРНК 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов на трансдукцию сигнала:

А, Б — генотипная форма 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов (INI) активирует  $G_{\alpha_q}$ - и  $G_{\alpha_{13}}$ -опосредованный сигнальный каскад; В — отредактированная изоформа 5HT<sub>2C</sub>-рецептора (VGV) утрачивает  $G_{\alpha_{13}}$ -опосредованный механизм активации Rho-белка и зависимый от него сигнальный каскад.



циевых каналов и сокращению сосудов. Потенциалуправляемые кальциевые каналы быстро инактивируются, в результате чего сосуд расслабляется. Повторная деполаризация мембраны вновь их активизирует и наступает следующее сокращение и таким образом, возможно, происходит ритмичное сокращение сосуда под действием агонистов 5HT<sub>1A</sub>- и 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов. Сложнее ответить на вопрос о природе 5HT<sub>2C</sub>-индуцированных изменений кинетики сокращения сосудов в ответ на воздействие 5HT и агонистов 5HT<sub>2A</sub>-рецепторов. Исследования в этом направлении будут продолжены.

На i2 домене и С-терминальном конце 5HT-рецепторов имеются участки прямого взаимодействия с CaM [37]. Ранее было показано, что ингибиторы CaM подавляют 5HT-индуцированный кальциевый сигнал в ГМК аорты крысы и клетках линии A7r5 и вазоконстрикторную реакцию в ответ на воздействие агонистов 5HT<sub>2A</sub>- и 5HT<sub>1A</sub>-рецепторов [57]. В настоящем исследовании мы получили аналогичные данные, свидетельствующие о важной роли CaM в передаче сигнала от 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов. Поскольку ингибитор CaM трифторперазин не оказывал негативного влияния на силу сокращения изолированных колец аорты крысы при воздействии на них активатора G-белков фторалюмината, мы полагаем, что CaM оказывает непосредственное влияние на конформацию рецепторной молекулы и связь с гетеротримерным комплексом G-белков. Хотя нельзя исключить участие CaM в G-белок-независимых механизмах внутриклеточной сигнализации. Имеются доказательства того, что i2 домен регулирует взаимодействие рецепторной молекулы не только с комплексом G-белков, но и с другими сигнальными молекулами, в том числе с  $\beta$ -аррестином [58-60]. Показано, что связывание CaM с С-терминальным доменом 5-HT<sub>2C</sub>-рецептора стабилизирует взаимодействие рецептора с  $\beta$ -аррестином и стимулирует активацию  $\beta$ -аррестин-зависимой сигнализации по ERK1/2 пути [61, 62].

Мы показали, что ингибитор тирозиновой с-Src-киназы PP<sub>2</sub>, как и ингибитор CaM, полностью подавляет вазоконстрикторную реакцию в ответ на воздействие SCH 23390 и МК 212, что свидетельствует о важной роли тирозиновой с-Src-киназы в передаче внутриклеточного сигнала от 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов. Полученные результаты согласуются с данными литературы. В экспериментах на культивируемых нейронах было продемонстрировано, что 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы индуцируют активацию тирозиновой с-Src [63]. По мнению авторов, 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы модулируют NMDA-опосредованную деполаризацию мотонейронов по с-Src-киназ-зависимому механизму. Кроме того, известно, что с-Src является

важным фактором в  $\beta$ -аррестин-зависимой активации MAP-киназного сигнального каскада [62].

В настоящем исследовании было установлено, что в отличие от 5HT<sub>2A</sub>- и 5HT<sub>1A</sub>-рецепторов реализация вазоконстрикторного эффекта от 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов не зависит от активности Rho-киназы. В экспериментах на клетках линии NIH-3T3, экспрессирующие отредактированную изоформу 5HT<sub>2C</sub>-рецептора (VGV), показано, что воздействие агониста этих рецепторов не приводит к активации Rho-белка и PLD [34] (рис. 4С). С учетом данных литературы, можно предположить, что в ГМК кровеносных сосудов локализованы частично или полностью отредактированные изоформы 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов, не обладающие способностью G $\alpha_{13}$ -опосредованно активировать Rho-белок и зависимый от него сигнальный каскад.

Таким образом, в аорте и брыжеечной артерии крысы локализованы 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы, которые в условиях нормы находятся в функционально неактивном состоянии. Уровень экспрессии 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов в аорте крысы невысок, а механизм их активации напрямую зависит от функционального состояния рецепторов других эндогенных вазоконстрикторов. Вышеизложенные результаты, с учетом ранее полученных данных, позволяют предположить, что активация локализованных в кровеносных сосудах «молчащих» 5HT-рецепторов (5HT<sub>2C</sub>- и 5HT<sub>1A</sub>-типа) является одним из механизмов синергизма действия 5HT с другими вазоактивными соединениями. Этот феномен, по-видимому, имеет общебиологическое значение и вносит существенный вклад в сложные механизмы межрецепторного взаимодействия и развитие как защитных, так и патологических процессов.

### Список литературы

1. Buzzi M.G., Moskowitz M.A. The pathophysiology of migraine: year 2005. *J. Headache Pain.* 2005; 6: 105-11.
2. Eddahibi S., Adnot S. The serotonin pathway in pulmonary hypertension. *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.* 2006; 99(6): 621-5.
3. MacLean M.R., Herve P., Eddahibi S., Adnot S. 5-Hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 2000; Vol. 131:161-8.
4. MacLean M.R., Dempsey Y. Serotonin and pulmonary hypertension from bench to bedside? // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2009; 9(3): 281-6.
5. Zhang B., Liu Yi., Luo Y., Niu W., Li Z.C. Alteration of Serotonin 2C Receptor Expression in the Aorta and the Pulmonary Artery in Rats Exposed to Hypoxia. *Chinese J. Physiol.* 2008; 51(6): 338-47.
6. Hara K., Hirowatari Y., Yoshika M., Komiyama Y., Tsuka Y., Takahashi H. The ratio of plasma to whole-blood

serotonin may be a novel marker of atherosclerotic cardiovascular disease. *J. Lab. Clin. Med.* 2004. Vol. 144: 31-7.

7. Rapport M.M., Green A.A., Page I.H. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* — 1948. — Vol. 176(3). — P. 1243-1251.

8. Nemecek G.M., Coughlin S.R., Handley D.A., Moskowitz M.A. Stimulation of aortic smooth muscle cell mitogenesis by serotonin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83(3): 674-8.

9. Watts S.W., Fink G.D. 5-HT<sub>2B</sub>-receptor antagonist LY-272015 is antihypertensive in DOCA-salt-hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 1999; Vol. 276. — H944 -H952.

10. Russell A., Baner A., Berlin H., Fink G.D., Watts S.W. 5-Hydroxytryptamine(2B) receptor function is enhanced in the N(omega)-nitro-Larginine hypertensive rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; Vol. 303: 179 -87.

11. Watts S.W. 5-HT in systemic hypertension: foe, friend or fantasy? *Clin. Sci.* 2005; Vol. 108: 399-412.

12. Lebrech D. Portal hypertension: serotonin and pathogenesis. *Cardiovasc. Drugs. Ther.* 1990; Vol. 4(1): 33-5.

13. Zwieten, van P.A., Bruning T.A. Comparison of the hemodynamic effects of urapidil and flusinolan in healthy volunteers. *Blood Press. Suppl.* 1994; Vol. 4: 19-24.

14. Davis R.P., Pattison J., Thompson J.M. et al. 5-hydroxytryptamine (5-HT) reduces total peripheral resistance during chronic infusion: direct arterial mesenteric relaxation is not involved. *BMC Pharmacology.* 2012; 12: 4.

15. Кожевникова Л.М., Авдонин П.В. Нарушение гормональной регуляции сосудистого тонуса при травматическом шоке. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2006; 141(5): 511-4.

16. Zwieten, van P.A., Blauw G.J., van Brummelen P. Serotonergic receptors and drugs in hypertension. *Pharmacol. Toxicol.* 1992; 70(6): 17-22.

17. Diaz J., Ni W., Thompson J., King A., Fink G.D., Watts S.W. 5-Hydroxytryptamine lowers blood pressure in normotensive and hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008; Vol. 325: 1031-8.

18. Watts S.W., Morrison S.F., Davis R.P., Barman S.M. Serotonin and blood pressure regulation. 2012; 64(2): 359-88.

19. Huguet F., Brisac A.M. Central 5HT<sub>1A</sub>-receptor binding in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1991; 5(3): 259 -62.

20. Villalobos-Molina R., Lopez-Guerrero J.J., Ibarra M. The hypotensive effect of VMY 7378 is antagonized by a silent 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist: comparison with 8-hydroxy-dipropylamino tetralin. *Arch. Med. Res.* 2001; Vol. 32(5): 389-93.

21. Villalobos-Molina R., Orozco-Mendez M., Lopez-Guerrero J.J. et al. WAY 405, a new silent 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist with low affinity for vascular alpha<sub>1</sub>-adrenoceptors. *Auton. Autacoid. Pharmacol.* 2005; 25(4): 185-9.

22. Кожевникова Л.М., Авдонин П.П., Суханова И.Ф., Авдонин П.В. Роль десенситизации глюкокортикоидных рецепторов в развитии резистентности сосудов к эндогенным вазоконстрикторам при травматическом шоке. *Вестник РАМН.* 2007; (6): 3-8.

23. Кожевникова Л.М., Авдонин П.П., Суханова И.Ф., Авдонин П.В. Инверсия ответа на серотонин при травматическом шоке. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2008; 145(3): 266-9.

24. Scrogin K.E. 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT acts in the hindbrain to reverse the sympatholytic response to

severe hemorrhage. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003; Vol. 284. — R782-R791.

25. Tiniakov R., Osei-Owusu P., Scrogin K.E. The 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor agonist, (+)-8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin, increases cardiac output and renal perfusion in rats subjected to hypovolemic shock. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007; Vol. 320: 811—8.

26. Ni W., Geddes T.J., Priestley J.R., Szasz T., Kuhn D.M., Watts S.W. The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries. *Br. J. Pharmacol.* 2008; 154(3): 663-74.

27. Dempsie Y., MacLean M.R. Pulmonary hypertension: therapeutic targets within the serotonin system. *Br. J. Pharmacol.* 2008; 155(4): 455-62.

28. Villalon C.M., Centurion D. Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2007; 376(1-2): 45-63.

29. Smits J., van Dorsten F., Struyker Boudier H. Interference of ketanserin with baroreflex control of the circulation in the conscious spontaneously hypertensive rat. *Drugs.* 1988; 36(1): 55-60.

30. Chau N.P., Pithoiss Merli I., Levenson J. et al. Comparative haemodynamic effects of ketanserin and ritanserin in the proximal and distal upper limb circulations of hypertensive patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1989; 37(3): 215-20.

31. Кожевникова Л.М., Авдонин П.В. Агонист 5HT<sub>1A</sub>-рецепторов серотонина 8-OH-DPAT увеличивает силу сокращения аорты и брыжеечной артерии крысы в присутствии эндотелина-1 или вазопрессина, но вызывает ослабление сосудов, предсокращенных норадреналином. *Изв. РАН. Сер. Биол.* 2010; 1: 44-53.

32. Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф., Авдонин П.В. Активация «молчащих» 5HT<sub>1A</sub>-рецепторов как возможный механизм синергизма действия ангиотензина II и серотонина на тонус сосудов. *Изв. РАН. Сер. Биол.* 2011; 1: 68-76.

33. Кожевникова Л.М., Давыдова А.Г., Авдонин П.В. Дезполяризация плазматической мембраны и активация рецепторов эндогенных вазоконстрикторов как возможные механизмы усиления вазоконстрикторного ответа на действие серотонина при травматическом шоке у крыс. *Изв. РАН. Сер. Биол.* 2009; 3: 343-57.

34. McGrew L., Price R.D., Hackler E., Chang M.S.S., Sanders-Bush E. RNA Editing of the Human Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> Receptor Disrupts Transactivation of the Small G-Protein RhoA. *Mol. Pharmacol.* 2004; Vol. 65: 252-6.

35. Turner J.H., Gelasco A.K., Raymond J.R. Calmodulin interacts with the third intracellular loop of the serotonin 5hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor at two distinct sites: putative role in receptor phosphorylation by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(17): 17027-37.

36. Turner J.H., Raymond J.R. Interaction of calmodulin with the serotonin 5hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor. A putative regulator of G protein coupling and receptor phosphorylation by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(35):30741-50.

37. Raymond J.R., Turner J.H., Gelasco A.K. et al. 5HT<sub>1</sub> Receptor signal transduction pathways. *The receptors: The serotonin receptors: from molecular pharmacology to human therapeutics.* Ed. Roth B.L. Totowa, New Jersey: Humana Press. Inc., 2006: 143-207.

38. Labasque M., Reiter E., Becamel C. et al. Physical interaction of calmodulin with the 5hydroxytryptamine<sub>2C</sub>

receptor C-terminus is essential for G protein-independent, arrestin-dependent receptor signaling. *Mol. Biol. Cell.* 2008; 9(11): 4640-50.

39. Кожевникова Л.М., Авдонин П.В. Участие кальмодулина в реализации вазоконстрикторных эффектов серотонина и норадреналина. *Изв. РАН. Сер. Биол.* 2012; 4: 430-7.

40. Hoyer D., Clarke D.E., Fozard J.R. et al. International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol. Rev.* 1994; Vol. 46: 157-203.

41. Smith B.M., Thomsen W.J., Grottick A.J. The potential use of selective 5HT<sub>2C</sub> adonists in treating obesity. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 2006; Vol. 15: 257-66.

42. Herrick-Davis K., Grinde E., Teitler M. Inverse agonist activity of atypical antipsychotic drugs at human 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000; Vol. 295: 226-32.

43. Hoyer D., Hannon J.P., Martin G. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002; Vol. 71: 533-54.

44. Jones B.J., Blackburn T.P. The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002; Vol. 71: 555-68.

45. Miller K.J. Serotonin 5-h<sub>2c</sub> receptor agonists: potential for the treatment of obesity. *Mol. Interv.* 2005; Vol. 5: 282-91.

46. Fitzgerald L.W., Iyer G., Conklin D.S., et al. Messenger RNA editing of the human serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor. *Neuropsychopharmacology.* 1999; Vol. 21: 82S-90S.

47. Niswender C.M., Copeland S.C., Herrick-Davis K., Emeson R.B., Sanders-Bush E. RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor silences constitutive activity. *J. Biol. Chem.* 1999; Vol. 274: 9472-8.

48. Price R.D., Weiner D.M., Chang M.S., Sanders-Bush E. RNA editing of the human serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor alters receptor-mediated activation of G<sub>13</sub> protein. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(48): 44663-8.

49. Berg K.A., Dunlop J., Sanchez T., Silva M., Clarke W.P. A conservative, single-amino acid substitution in the second cytoplasmic domain of the human Serotonin<sub>2C</sub> receptor alters both ligand-dependent and -independent receptor signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008; 324(3):1084-92.

50. Berg K.A., Cropper J.D., Niswender C.M., Sanders-Bush E., Emeson R.B., Clarke W.P. RNA-editing of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor alters agonist-receptor-effector coupling specificity. *Br. J. Pharmacol.* 2001; Vol. 134: 386-92.

51. Herrick-Davis K., Grinde E., Weaver B.A. Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor homodimerization is not regulated by agonist or inverse agonist treatment. *Eur. J. Pharmacol.* 2007; 568(1-3): 45-53.

52. Chang M., Zhang L., Tam J.P., Sanders-Bush E. Dissecting G protein-coupled receptor signaling pathways with membrane-permeable blocking peptides. Endogenous 5-HT<sub>2C</sub> receptors in choroid plexus epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 2000; Vol. 275: 7021-9.

53. McGrew L., Chang M.S., Sanders-Bush E. Phospholipase D activation by endogenous 5-hydroxytryptamine 2C receptors is mediated by Galpha13 and pertussis toxin-insensitive Gbetagamma subunits. *Mol. Pharmacol.* 2002; Vol. 62: 1339-43.

54. Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф., Авдонин П.В. Изменение сократительных свойств и экспрессии АТ1А-рецепторов ангиотензина II в аорте крысы

в зависимости от функциональной активности глюкокортикоидных рецепторов. *Патогенез.* 2008; 6 (4): 47-51.

55. Heusler P., Pauwels P.J., Wurch T., Newman-Tancredi A., Tytgat J., Colpaert F.C., Cussac D. Differential ion current activation by human 5-HT<sub>1A</sub> receptors in *Xenopus oocytes*: evidence for agonist-directed trafficking of receptor signaling. *Neuropharmacology.* 2005; 49(7): 963-76.

56. Alioua A., Mahajan A., Nishimaru K., Zarei M.M., Stefani E., Toro L. Coupling of c-Src to large conductance voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels as a new mechanism of agonist-induced vasoconstriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99(22): 14560-5.

57. Кожевникова Л.М., Терехина И.Л., Авдонин П.В. Ингибиторы кальмодулина подавляют кальциевый сигнал от рецепторов серотонина в гладкомышечных клетках и устраняют вазоконстрикторный ответ на внутривенное введение серотонина. *Изв. РАН. Сер. Биол.* 2013; 3: 437-46.

58. Сукоян Г.В. Сигнасомы, строение, функция и дисфункция. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2012; 4: 15-29.

59. Sugimoto Y., Nakato T., Kita A., Takahashi Y., Hatae N., Tabata H., Tanaka S., Ichikawa A. A cluster of aromatic amino acids in the i2 loop plays a key role for G<sub>s</sub> coupling in prostaglandin EP<sub>2</sub> and EP<sub>3</sub> receptors. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(12): 11016-26.

60. Flanagan C.A. A GPCR that is not «DRY». *Mol. Pharmacol.* 2005; 68(1): 1-3.

61. Labasque M., Meffre J., Carrat G., Becamel C., Bockaert J., Marin P. Constitutive activity of serotonin 2C receptors at G protein-independent signaling: modulation by RNA editing and antidepressants. *Mol. Pharmacol.* 2010; 78(5): 818-26.

62. Magalhaes A.C., Dunn H., Ferguson S.S. Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *Br. J. Pharmacol.* 2012; 165(6): 1717-36.

63. Bigford G.E., Chaudhry N.S., Keane R.W., Holohean A.M. 5-Hydroxytryptamine 5HT<sub>2C</sub> receptors form a protein complex with N-methyl-D-aspartate GluN2A subunits and activate phosphorylation of Src protein to modulate monotoneuronal depolarization. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(14): 11049-59.

## References

1. Buzzi M.G., Moskowitz M.A. The pathophysiology of migraine: year 2005. *J. Headache Pain.* 2005; 6: 105-11.

2. Eddahibi S., Adnot S. The serotonin pathway in pulmonary hypertension. *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.* 2006; 99(6): 621- 5.

3. MacLean M.R., Herve P., Eddahibi S., Adnot S. 5-Hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 2000; 131: 161-8.

4. MacLean M.R., Dempsey Y. Serotonin and pulmonary hypertension from bench to bedside? *Curr. Opin. Pharmacol.* 2009; 9(3): 281-6.

5. Zhang B., Liu Yi., Luo Y., Niu W., Li Z.C. Alteration of Serotonin 2C Receptor Expression in the Aorta and the Pulmonary Artery in Rats Exposed to Hypoxia. *Chinese J. Physiol.* 2008; 51(6): 338-47.

6. Hara K., Hirowatari Y., Yoshika M., Komiyama Y., Tsuka Y., Takahashi H. The ratio of plasma to whole-blood serotonin may be a novel marker of atherosclerotic cardiovascular disease. *J. Lab. Clin. Med.* 2004; 144: 31-7.

7. Rapport M.M., Green A.A., Page I.H. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 1948; 176(3): 1243-51.
8. Nemecek G.M., Coughlin S.R., Handley D.A., Moskowitz M.A. Stimulation of aortic smooth muscle cell mitogenesis by serotonin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83(3): 674-8.
9. Watts S.W., Fink G.D. 5-HT<sub>2B</sub>-receptor antagonist LY-272015 is antihypertensive in DOCA-salt-hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 1999; 276: H944 -H952.
10. Russell A., Banas A., Berlin H., Fink G.D., Watts S.W. 5-Hydroxytryptamine(2B) receptor function is enhanced in the N(omega)-nitro-Larginine hypertensive rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; 303: 179-87.
11. Watts S.W. 5-HT in systemic hypertension: foe, friend or fantasy? *Clin. Sci. (London)*. 2005; 108: 399-412.
12. Lebrech D. Portal hypertension: serotonin and pathogenesis. *Cardiovasc. Drugs. Ther.* 1990; 4(1): 33-5.
13. Zwieten, van P.A., Bruning T.A. Comparison of the hemodynamic effects of urapidil and fleroxan in healthy volunteers. *Blood Press. Suppl.* 1994; 4: 19-24.
14. Davis R.P., Pattison J., Thompson J.M. et al. 5-hydroxytryptamine (5-HT) reduces total peripheral resistance during chronic infusion: direct arterial mesenteric relaxation is not involved. *BMC Pharmacology*. 2012; 12: 4.
15. Kozhevnikova L.M., Avdonin P.V. Disturbances in hormonal regulation of vascular tone during traumatic shock. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2006; 141(5): 511-4. (in Russian)
16. Zwieten, van P.A., Blauw G.J., van Brummelen P. Serotonergic receptors and drugs in hypertension. *Pharmacol. Toxicol.* 1992; 70(6): 17-22.
17. Diaz J., Ni W., Thompson J., King A., Fink G.D., Watts S.W. 5-Hydroxytryptamine lowers blood pressure in normotensive and hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008; 325: 1031-8.
18. Watts S.W., Morrison S.F., Davis R.P., Barman S.M. Serotonin and blood pressure regulation. *Pharmacol. Rev.* 2012; 64(2): 359- 88.
19. Huguet F., Brisac A.M. Central 5HT<sub>1A</sub>-receptor binding in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1991; 5(3): 259 -62.
20. Villalobos-Molina R., Lopez-Guerrero J.J., Ibarra M. The hypotensive effect of BMY 7378 is antagonized by a silent 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist: comparison with 8-hydroxy-dipropylamino tetralin. *Arch. Med. Res.* 2001; 32(5): 389-93.
21. Villalobos-Molina R., Orozco-Mendez M., Lopez-Guerrero J.J. et al. WAY 405, a new silent 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist with low affinity for vascular alpha<sub>1</sub>-adrenoceptors. *Auton. Autacoid. Pharmacol.* 2005; 25(4): 185-9.
22. Kozhevnikova L.M., Avdonin P.P., Sukhanova I.F., Avdonin P.V. The role of desensitization of glucocorticoid receptors in the development of vascular resistance to endogenous vasoconstrictors in traumatic shock. 2007; (6); 3-8. (in Russian)
23. Kozhevnikova L.M., Avdonin P.P., Sukhanova I.F., Avdonin P.V. Inversion of the response to serotonin in rats with traumatic shock. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2008; 145(3): 266-9. (in Russian)
24. Scrogin K.E. 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT acts in the hindbrain to reverse the sympatholytic response to severe hemorrhage. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003; 284: R782-R791.
25. Tiniakov R., Osei-Owusu P., Scrogin K.E. The 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor agonist, (+)-8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin, increases cardiac output and renal perfusion in rats subjected to hypovolemic shock. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007; 320: 811-8.
26. Ni W., Geddes T.J., Priestley J.R., Szasz T., Kuhn D.M., Watts S.W. The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries. *Br. J. Pharmacol.* 2008; 154(3): 663-74.
27. Dempsie Y., MacLean M.R. Pulmonary hypertension: therapeutic targets within the serotonin system. *Br. J. Pharmacol.* 2008; 155(4): 455-62.
28. Villalon C.M., Centurion D. Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2007; 376(1-2): 45-63.
29. Smits J., van Dorsten F., Struyker Boudier H. Interference of ketanserin with baroreflex control of the circulation in the conscious spontaneously hypertensive rat. *Drugs*. 1988; 36(1): 55-60.
30. Chau N.P., Pithoiss Merli I., Levenson J. et al. Comparative haemodynamic effects of ketanserin and ritanserin in the proximal and distal upper limb circulations of hypertensive patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1989; 37(3): 215-20.
31. Kozhevnikova L.M., Avdonin P.V. Agonist of serotonin 5HT<sub>1A</sub>-receptors 8-OH-DPAT increases the force of contraction of rat aorta and mesenteric artery in the presence of endothelin-1 or vasopressin and causes relaxation of the vessels precontracted with noradrenaline. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* 2010; (1): 44-53. (in Russian)
32. Kozhevnikova L.M., Avdonin P.V., Sukhanova I.F. Activation of «silent» vasoconstrictive 5-HT<sub>1A</sub> receptors as a possible mechanism of synergism in angiotensin ii and serotonin effect on vascular tone. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* 2011; (1): 68-76. (in Russian)
33. Kozhevnikova L.M., Davydova A.G., Avdonin P.V. Plasma membrane depolarization and activation of receptors for endogenous vasoconstrictors as possible mechanisms of potentiation of vasoconstrictive response to serotonin in traumatic shock in rats. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* 2009; (3): 343-57. (in Russian)
34. McGrew L., Price R.D., Hackler E., Chang M.S.S., Sanders-Bush E. RNA Editing of the Human Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> Receptor Disrupts Transactivation of the Small G-Protein RhoA. *Mol. Pharmacol.* 2004; 65: 252-6.
35. Turner J.H., Gelasco A.K., Raymond J.R. Calmodulin interacts with the third intracellular loop of the serotonin 5hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor at two distinct sites: putative role in receptor phosphorylation by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(17): 17027-37.
36. Turner J.H., Raymond J.R. Interaction of calmodulin with the serotonin 5hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor. A putative regulator of G protein coupling and receptor phosphorylation by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(35): 30741-50.
37. Raymond J.R., Turner J.H., Gelasco A.K. et al. 5HT Receptor signal transduction pathways. The receptors: The serotonin receptors: from molecular pharmacology to human therapeutics / Ed. Roth B.L. Totowa, New Jersey: Humana Press. Inc. 2006; 143-207.
38. Labasque M., Reiter E., Becamel C. et al. Physical interaction of calmodulin with the 5hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptor C-terminus is essential for G protein-independent, arrestin-dependent receptor signaling. *Mol. Biol. Cell.* 2008; 9(11): 4640-4650.

39. Kozhevnikova L.M., Avdonin P.V. Involvement of calmodulin in realization of vasoconstrictive effects of serotonin and norepinephrine. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* 2012; (4): 430-437. (in Russian)
40. Hoyer D., Clarke D.E., Fozard J.R. et al. International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol. Rev.* 1994; 46: 157-203.
41. Smith B.M., Thomsen W.J., Grottick A.J. The potential use of selective 5-HT<sub>2C</sub> agonists in treating obesity. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 2006; 15: 257-66.
42. Herrick-Davis K., Grinde E., Teitler M. Inverse agonist activity of atypical antipsychotic drugs at human 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000; 295: 226-32.
43. Hoyer D., Hannon J.P., Martin G. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002; 71: 533-54.
44. Jones B.J., Blackburn T.P. The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002; 71: 555-68.
45. Miller K.J. Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonists: potential for the treatment of obesity. *Mol. Interv.* 2005; 5: 282-91.
46. Fitzgerald L.W., Iyer G., Conklin D.S., et al. Messenger RNA editing of the human serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor. *Neuropsychopharmacology.* 1999; 21: 825-90S.
47. Niswender C.M., Copeland S.C., Herrick-Davis K., Emeson R.B., Sanders-Bush E. RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor silences constitutive activity. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 9472-8.
48. Price R.D., Weiner D.M., Chang M.S., Sanders-Bush E. RNA editing of the human serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor alters receptor-mediated activation of G<sub>13</sub> protein. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(48): 44663-8.
49. Berg K.A., Dunlop J., Sanchez T., Silva M., Clarke W.P. A conservative, single-amino acid substitution in the second cytoplasmic domain of the human Serotonin<sub>2C</sub> receptor alters both ligand-dependent and -independent receptor signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008; 324(3): 1084-92.
50. Berg K.A., Cropper J.D., Niswender C.M., Sanders-Bush E., Emeson R.B., Clarke W.P. RNA-editing of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor alters agonist-receptor-effector coupling specificity. *Br. J. Pharmacol.* 2001; 134: 386-92.
51. Herrick-Davis K., Grinde E., Weaver B.A. Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor homodimerization is not regulated by agonist or inverse agonist treatment. *Eur. J. Pharmacol.* 2007; 568(1-3): 45-53.
52. Chang M., Zhang L., Tam J.P., Sanders-Bush E. Dissecting G protein-coupled receptor signaling pathways with membrane-permeable blocking peptides. Endogenous 5-HT<sub>2C</sub> receptors in choroid plexus epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 7021-9.
53. McGrew L., Chang M.S., Sanders-Bush E. Phospholipase D activation by endogenous 5-hydroxytryptamine 2C receptors is mediated by G<sub>13</sub> and pertussis toxin-insensitive Gbetagamma subunits. *Mol. Pharmacol.* 2002; 62: 1339-43.
54. Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F., Avdonin P.V. Changes in the contractile properties and expression AT<sub>1A</sub>-receptors of angiotensin II in the rat aorta depending to the functional activity of the glucocorticoid receptors. *Pathogenesis.* 2008; 6(4): 47 — 51. Russian.
55. Heusler P., Pauwels P.J., Wurch T., Newman-Tancredi A., Tytgat J., Colpaert F.C., Cussac D. Differential ion current activation by human 5-HT<sub>1A</sub> receptors in *Xenopus* oocytes: evidence for agonist-directed trafficking of receptor signaling. *Neuropharmacology.* 2005; 49(7): 963-76.
56. Alioua A., Mahajan A., Nishimaru K., Zarei M.M., Stefani E., Toro L. Coupling of c-Src to large conductance voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels as a new mechanism of agonist-induced vasoconstriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99(22): 14560-5.
57. Kozhevnikova L.M., Zharkikh I.L., Avdonin P.V. Calmodulin inhibitors suppress calcium signaling from serotonin receptors in smooth muscle cells and abolish vasoconstrictive response on intravenous introduction of serotonin. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* 2013; (3): 437-46. (in Russian)
58. Sukoyan G.V. Signalosome as therapeutic targets. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* 2012; 4: 15-29. (in Russian)
59. Sugimoto Y., Nakato T., Kita A., Takahashi Y., Hatae N., Tabata H., Tanaka S., Ichikawa A. A cluster of aromatic amino acids in the i2 loop plays a key role for Gs coupling in prostaglandin EP<sub>2</sub> and EP<sub>3</sub> receptors. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(12); P. 11016-26.
60. Flanagan C.A. A GPCR that is not «DRY». *Mol. Pharmacol.* 2005; 68(1): 1-3.
61. Labasque M., Meffre J., Carrat G., Becamel C., Bockert J., Marin P. Constitutive activity of serotonin 2C receptors at G protein-independent signaling: modulation by RNA editing and antidepressants. *Mol. Pharmacol.* 2010; 78(5): 818-26.
62. Magalhaes A.C., Dunn H., Ferguson S.S. Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *Br. J. Pharmacol.* 2012; 165(6): 1717-36.
63. Bigford G.E., Chaudhry N.S., Keane R.W., Holohean A.M. 5-Hydroxytryptamine 5HT<sub>2C</sub> receptors form a protein complex with N-methyl-D-aspartate GluN2A subunits and activate phosphorylation of Src protein to modulate motoneuronal depolarization. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(14): 11049-59.

Поступила 11.11.14

Received 11.11.14

**Сведения об авторах:**

Меситов Михаил Валентинович — к.б.н., с.н.с. лаб. регуляции агрегатного состояния крови ФГБНУ «НИИОПП», e-mail: michael.v.mesitov@gmail.com

Московцев Алексей Александрович — к.м.н., в.н.с. лаб. регуляции агрегатного состояния крови ФГБНУ «НИИОПП», e-mail: bioinf@mail.ru