

¹Katedra i Zakład Farmakologii i Terapii Collegium Medicum, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy

²Katedra i Klinika Kardiologii i Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy

³Katedra i Klinika Transplantologii Collegium Medicum, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy

⁴Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Collegium Medicum, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy

Modyfikacja reaktywności mięśniówki gładkiej tętnic po ekspozycji na cyklosporynę-A

Modification of arterial smooth muscle reactivity in cyclosporine A pretreated arteries

Summary

Background In the present study the interactions between phenylephrine — selective α_1 -adrenoceptor agonist, arg-vasopressine — selective agonist of vasopressine receptor type 1 (V_1) and modulator — cyclosporine A were investigated.

Material and methods Experiments were performed on perfused rat tail arteries. Using classical pharmacometric methods the relationship between concentration-response curves (CRCs) for agonists performed in the absence and presence of cyclosporine A were analyzed.

Results In the presence of cyclosporine A the reduction in ED_{50} values for agonists was observed. Dissociation constants for agonists calculated in the presence of cyclosporine A did not differ significantly from controls.

Conclusions Changes in plots of agonists responses against receptor occupancy for agonists and changes in K_d/ED_{50} value suggest increase in receptor reserve. This increase was not significantly reduced in the presence of losartan. Our results suggest that changes in receptor reserve are result of changes in signal transduction.

key words: cyclosporine-A, α_1 -adrenoceptors, vasopressine receptors, receptor reserve

Arterial Hypertension 2007, vol. 11, no 1, pages 21–26.

Wstęp

Cyklosporyna A (CsA) jest najczęściej stosowanym lekiem immunosupresyjnym u pacjentów po przeszczepieniu narządów. Ma szerokie spektrum działania tkankowego.

Jej podstawowy mechanizm działania wiąże się z hamowaniem aktywności kalcyneuryny będącej aktywatorem czynnika transkrypcyjnego NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*, czynnik jądrowy aktywowanych komórek T). W obecności CsA hamowana jest migracja NF-AT z cytoplazmy do jądra komórkowego. Czynnikiem transkrypcyjnym NF-AT, oprócz czynników transkrypcyjnych AP-1, AP-3, NF- κ B, Oct-1, wiąże się z promotorem, pod którego kontrolą pozostaje ekspresja genu dla interleukiny 2 (IL-2). Ponadto CsA hamuje szlaki kinaz JNK i MAP p38. Głównym efektem jego działania jest więc hamowanie aktywacji limfocytów T przez hamowanie produkcji IL-2. W mniejszym stopniu hamowana jest także synteza IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, GM-CSF, IFN- γ i TNF. Dodatkowym efektem jest hamowanie uwalniania cytokin przez limfocyty T oraz zmniejszenie rezerwy receptorowej receptorów dla IL-2 [1–3].

Jednym z dość powszechnych objawów niepożądanych stosowania CsA jest nadciśnienie tętnicze, obserwowane u około 30% osób leczonych CsA. Działania niepożądane CsA są związane zarówno z toksycznym działaniem na nerki, upośledzeniem filtracji kłębkowej, jak i zwiększeniem stężenia cytoplazmatycznego wapnia. Efekty te można łączyć ze stałym zwiększaniem oporu naczyniowego [1–4].

Adres do korespondencji: dr med. Grzegorz Grześk
Katedra i Zakład Farmakologii i Terapii Collegium Medicum,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9, 85–094 Bydgoszcz
tel.: (052) 585–35–86, faks: (052) 585–40–23
e-mail: ggrzesk@cm.umk.pl

 Copyright © 2007 Via Medica, ISSN 1428–5851

Zdolność do wywołania odpowiedzi tkanki — mięśniówki gładkiej naczyń — na stymulację chemiczną jest uzależniona od kilku grup czynników. Warunkiem niezbędnym jest obecność na powierzchni błony komórkowej odpowiedniego receptora. Ponadto receptor taki musi być metabolicznie aktywny i wyzwać łańcuch reakcji chemicznych, prowadzących w efekcie do powstania odpowiedzi tkanki na stymulację. Zdolność do powstania odpowiedzi jest wobec tego uwarunkowana odpowiednią aktywnością poszczególnych enzymów. Łańcuch zdarzeń biochemicznych występujących między pobudzeniem receptora i powstaniem efektu fizjologicznego jest często określany mianem łańcucha zdarzeń pozareceptorowych. Obydwa badane receptory należą do receptorów metabotropowych — efekt ich działania jest uzależniony od aktywacji białka G oraz enzymów fosfolipazy C i kinezy białkowej typu C [5, 6].

Za proces zmiany wrażliwości tkanki na stymulację badanych receptorów, znajdujących się na powierzchni mięśniówki gładkiej naczyń, może odpowiadać kilka procesów regulacyjnych. Może dochodzić do zmiany stymulacji przez zmianę aktywności nerwów układu wegetatywnego (regulacja centralna) lub też zmianie może ulegać sama wrażliwość tkanki na stymulację. Ostatni proces może być następstwem zwiększenia gęstości receptorów lub stężenia białek G odpowiedzialnych za przewodzenie informacji w układzie zdarzeń pozareceptorowych, wynikać ze zmiany struktury miejsca receptora odpowiedzialnego za wiązanie agonisty lub też być następstwem zaburzenia przewodzenia informacji w łańcuchu zdarzeń pozareceptorowych [4, 7]. Podstawowa różnica między warunkami *in vitro* i *in vivo* jest związana z częstością podawania leku. W warunkach *in vivo*, w trakcie leczenia CsA, lek jest podawany przewlekle, natomiast w doświadczeniu *in vitro* można oceniać zarówno efekty długotrwałego stosowania leku, jak i efekty pojawiające się po zastosowaniu go na izolowany narząd czy tkankę. Oznacza to, że czynnik modulujący — CsA — wpływający na tkankę przez długi czas, zmienia szereg procesów metabolicznych. Prawdopodobne są więc tutaj przeobrażenia związane nie tylko ze zmianą aktywności, ale także stężeń aktywnych białek błonowych. Efektem może być zarówno dysfunkcja układów enzymatycznych, układu przewodzenia zdarzeń pozareceptorowych, jak i zmiana stężenia receptorów czy elementów składowych układu zdarzeń pozareceptorowych lub samych kanałów jonowych. Dalszym efektem może być przewlekła dysfunkcja tkanek, objawiająca się na przykład jako dysfunkcja śródbłonna naczyńowego [4].

Celem niniejszej pracy było przeanalizowanie *in vitro* procesu zmiany wrażliwości tkanki na pobudzenie receptorów adrenergicznych i wazopresynowych, zachodzącego podczas krótkotrwałej inkubacji w środowisku zawierającym CsA, ze szczególnym określeniem roli śródbłonna naczyńowego.

Materiał i metody

Badania prowadzono na izolowanych tętnicach ogonowych szczurów szczepu Wistar (m.c. 220–270 g). Narządy pobierano w głębokiej narkozie uretanowej (120 mg/kg m.c. i.p.). Po usunięciu tkanek otaczających proksymalny odcinek tętnicy o długości 2–3 cm kaniulowano i instalowano w naczyniu do narządów izolowanych o pojemności 20 ml. Obciążenie spoczynkowe — 0,5 g — ustalono doświadczalnie. W doświadczeniach wykonywanych na tętnicach pozbawionych śródbłonna naczyńowego śródbłonek usuwano mechanicznie. Brak śródbłonna potwierdzano wywołaniem skurczu mięśniówki po podaniu karbacholu.

W pierwszej fazie doświadczeń naczynia stabilizowano w roztworze Krebsa, zwiększając stopniowo przepływ płynu infuzyjnego od 0,25–1,0 ml/min, aż do osiągnięcia ciśnienia perfuzatu 2–4 kPa. Wykładnikiem skurczu naczynia w badanym schemacie doświadczalnym był wzrost ciśnienia perfuzatu w układzie doświadczalnym. Skurcz wyzwalano, stosując selektywnego agonistę receptorów α_1 -adrenergicznych — fenylefrynę (PHE, *phenylephrine*) i nieselektywnego agonistę receptorów wazopresynowych — wazopresynę argininową (AVP, *arginine vasopressin*). Krzywe zależności efektu od stężenia agonisty wyznaczano, stosując klasyczną metodę farmakometryczną — metodę wzrastających stężeń van Rossuma. Zależności wyznaczano dla warunków kontrolnych, w obecności CsA (1 nM i 10 nM), a także w obecności antagonisty receptora typu 1 dla angiotensyny II — losartanu (10^{-5} M). Stosowane stężenia molowe CsA 1 i 10 nM odpowiadają stężeniu odpowiednio 121,6 i 1216 ng/ml. Badane związki podawano do przestrzeni zewnątrznaczyniowej [8].

Analiza farmakometryczna

Wartości stężenia powodującego powstanie odpowiedzi równej połowie odpowiedzi maksymalnej (ED_{50}) wyznaczono, stosując metodę regresji liniowej dla zakresu efektu między 20 i 80%. Wartość pD_2 stanowi ujemny logarytm wartości ED_{50} . Wartości stałych dysocjacji kompleksu agonista–receptor (K_A) obliczano, stosując metodę Furchotta i Bursztyna. Wartości K_A posłużyły do wyznaczenia frakcji receptorów związanych z agonistą [8].

Roztwory i odczynniki

Odczynniki wykorzystywane w doświadczeniach zakupiono w Sigma Chemical Company Poland. Stosowano płyn Kresa o składzie NaCl 118, KCl 5,9, CaCl₂ 1,5, MgSO₄ 0,72, NaHCO₃ 25, glukoza 11,7 mM (95% O₂, 5% CO₂, pH 7,4, temp. 37°C).

Analiza statystyczna

Prezentowane wyniki są wartościami średnimi \pm SE. W celu szacowania znamienności statystycznej wykorzystano test Newmana-Keulsa. Za istotne statystycznie przyjmowano wartości $p < 0,05$. Wartości $0,05 \leq p < 0,1$ podano jako wyraz trendu ku istotności statystycznej, natomiast dla $p \geq 0,1$ użyto skrótu „ns” (nieistotne statystycznie).

Akceptacja Lokalnej Komisji Etycznej

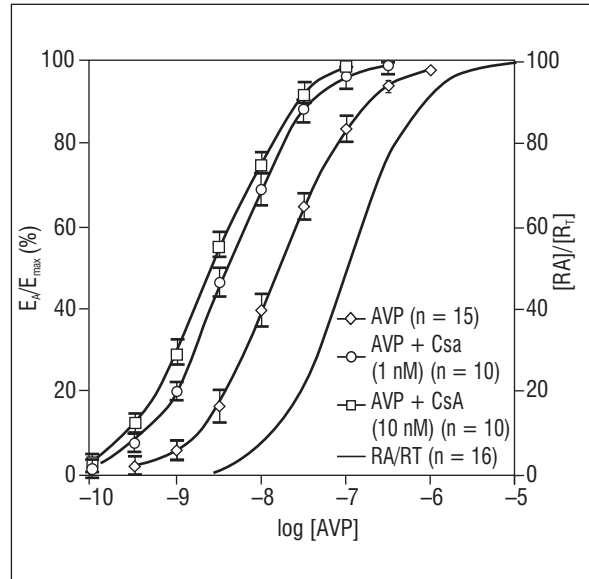
Badania przeprowadzono po uzyskaniu wcześniejszej zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń w Bydgoszczy (wniosek nr 15/2002, nr opinii 15/2002 z 9. lipca 2002).

Wyniki

W obecności CsA (1 nM i 10 nM, 120 min) uzyskano zależne od stężenia przemieszczenie krzywych zależności efektu od stężenia agonisty (CRCs, *concentration-response curves*) w stronę lewą, czyli w kierunku niższych stężeń. Efekt ten występował w przypadku obydwu badanych receptorów metabotropowych. Krzywe zależności efektu od stężenia agonisty, odpowiednio PHE lub AVP, przedstawiono na rycinach 1 i 2.

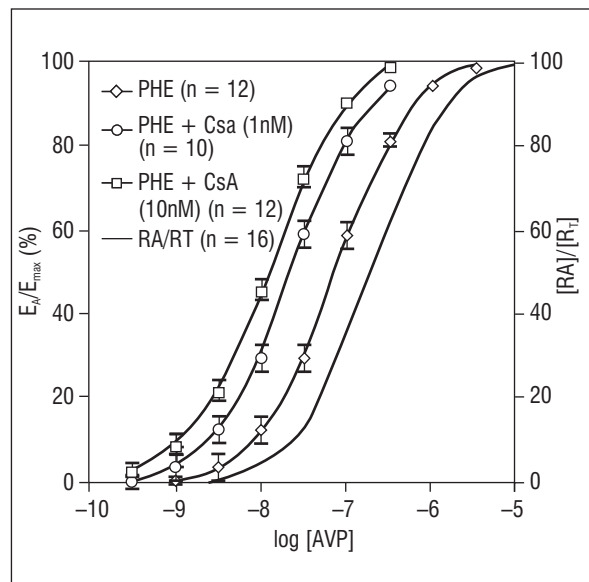
Określone doświadczalnie wartości ED₅₀ w obecności CsA dla obydwu stężeń były znamienne statystycznie niższe ($p < 0,0001$). Uzyskane dla PHE wartości EC₅₀ w obecności CsA w stężeniu 1 nM były istotnie wyższe ($p = 0,03$) niż wartości uzyskane dla stężenia 10 nM, natomiast w przypadku odpowiednich wartości EC₅₀ dla AVP stwierdzono jedynie trend ku istotności statystycznej ($p = 0,07$). Usunięcie śródbłonka naczyniowego z tętnicy spowodowało przesunięcie krzywych zależności efektu od stężenia agonisty dla PHE i AVP w stronę niższych stężeń. W obecności CsA zarejestrowano dalsze, istotne statystycznie, zwiększenie kurczliwości tętnicy, manifestujące kolejnym przemieszczeniem krzywych w lewą stronę (tab. I).

Wyznaczone wartości K_A w obecności CsA nie różniły się znamienne statystycznie od wartości uzyskanych w warunkach kontrolnych (tab. I). Obecność losartanu (10⁻⁵ M) nie wpływała istotnie na przesunięcie wyznaczonych krzywych. Krzywe zależności efektu od frakcji zajętych receptorów, w warunkach kontrolnych dla PHE i AVP, mają charak-



Rycina 1. Krzywe zależności efektu od stężenia agonisty — wazopresyny argininowej (AVP) w warunkach kontrolnych oraz w obecności CsA. Punkty odpowiadają wartościom średnim (\pm SE)

Figure 1. Effect of CsA on concentration-response curves for arg vasopressine (AVP). Each point represents the mean and vertical lines show SE



Rycina 2. Krzywe zależności efektu od stężenia agonisty — fenylefryny (PHE) w warunkach kontrolnych oraz w obecności CsA. Punkty odpowiadają wartościom średnim (\pm SE)

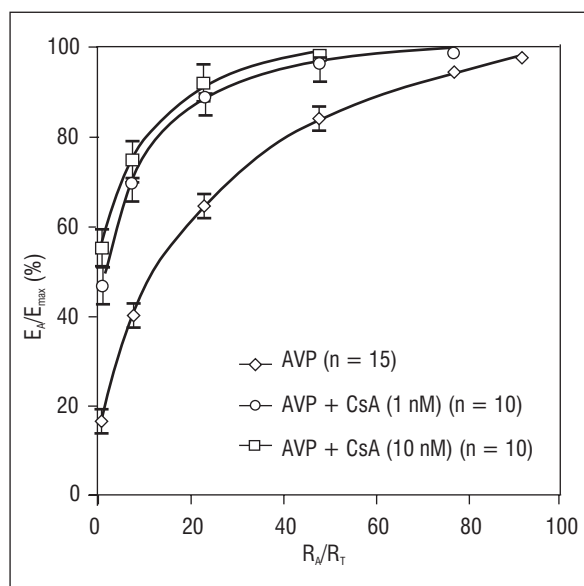
Figura 2. Effect of CsA on concentration-response curves for phenylephrine (PHE). Each point represents the mean and vertical lines show SE

ter hiperboli (ryc. 3, 4). W obecności CsA kształt hiperboli ulega zmianie — zaczyna się ona coraz bardziej różnić od prostej. Jednocześnie wyznaczone wartości współczynnika K_A/ED₅₀, będącego wykład-

Tabela I. Wartości ED_{50} , K_A oraz stosunek K_A/ED_{50} wyznaczone w warunkach kontrolnych oraz w obecności cyklosporyny A
Table I. ED_{50} , K_A and K_A/ED_{50} values obtained for control arteries and in the presence of cyclosporine-A

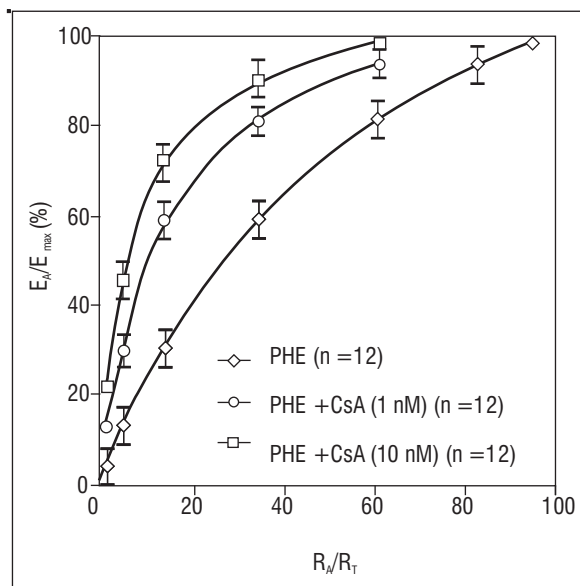
	n	ED_{50}	K_A	K_A/ED_{50}
AVP	15	$1,37 (\pm 0,36) \times 10^{-8}$	$1,21 (\pm 0,44) \times 10^{-7}$	8,83
AVP+CsA (1 nM)	10	$7,24 (\pm 0,85) \times 10^{-9*}$	$1,95 (\pm 0,51) \times 10^{-7**}$	26,93
AVP+CsA (10 nM)	10	$6,15 (\pm 0,95) \times 10^{-9*}$	$2,83 (\pm 0,84) \times 10^{-7**}$	46,02
AVP (BE)	12	$4,10 (\pm 1,30) \times 10^{-9*}$	$1,64 (\pm 0,75) \times 10^{-7**}$	40,00
AVP (BE) +CsA (10 nM)	12	$8,60 (\pm 0,95) \times 10^{-9*†}$	$3,66 (\pm 0,62) \times 10^{-7**}$	42,57
PHE	12	$6,90 (\pm 0,86) \times 10^{-8}$	$1,85 (\pm 0,62) \times 10^{-7}$	2,68
PHE+CsA (1 nM)	12	$2,84 (\pm 0,71) \times 10^{-8*}$	$1,52 (\pm 0,73) \times 10^{-7**}$	5,35
PHE+CsA (10 nM)	12	$1,22 (\pm 1,22) \times 10^{-8*}$	$2,15 (\pm 0,93) \times 10^{-7**}$	17,62
PHE (BE)	14	$3,62 (\pm 1,25) \times 10^{-8*}$	$2,38 (\pm 1,05) \times 10^{-7**}$	6,57
PHE (BE) +CsA (10 nM)	14	$1,12 (\pm 0,82) \times 10^{-9*†}$	$1,88 (\pm 0,88) \times 10^{-7**}$	167,00

* $p < 0,001$ vs. kontrola; † $p < 0,05$ vs. kontrola BE; **różnice nieistotne statystycznie vs. kontrola
 AVP (arginine vasopressin) — wazopresyna argininowa; CsA — cyklosporyna A; PHE (phenylephrine) — fenylefryna; BE (bare endothelium) — tętnice pozbawione śródbłonka naczyniowego



Rycina 3. Wpływ CsA na krzywe zależności efektu od frakcji zajętych receptorów dla wazopresyny argininowej (AVP). Punkty odpowiadają wartościom średnim (\pm SE)

Figure 3. Effect of CsA on agonist evoked responses vs. receptor occupancy plots for arg-vasopressine (AVP). Each point represents the mean and vertical lines show SE



Rycina 4. Wpływ CsA na krzywe zależności efektu od frakcji zajętych receptorów dla fenylefryny (PHE). Punkty odpowiadają wartościom średnim (\pm SE)

Figure 4. Effect of CsA on agonist evoked responses vs. receptor occupancy plots for phenylephrine (PHE). Each point represents the mean and vertical lines show SE

nikiem wielkości rezerwy receptorowej, ulegają zwiększeniu w obecności CsA. Przy wartości ilorazu równej jedności można mówić o braku rezerwy receptorowej, natomiast wartości większe od jedności świadczą o wzroście, a mniejsze o dalszym zmniejszaniu rezerwy receptorowej. Zmiany kształtu krzywych zależności efektu od frakcji zajętych receptorów, a także wartości K_A/ED_{50} świadczą jednoznacznie o zwiększeniu wielkości rezerwy receptorowej.

Dyskusja

Procesy regulacyjne zachodzące na poziomie receptora ogrywają ogromną rolę w procesie odpowiedzi komórki na bodźce chemiczne, dochodzące zarówno ze środowiska zewnętrznego, jak i wewnętrznego. Odpowiedź prawidłową i we właściwym natężeniu warunkują receptory oraz aktywność procesów regulacyjnych, dostosowujących odpowiedź ze stro-

ny komórki na czynniki środowiskowe. Procesy te zachodzą w różnych stanach, zarówno fizjologii, jak i patologii. Są szczególnie wyraźne na przykład we wstrząsie septycznym i nadczynności tarczycy [9–11]. Poza czynnikami chemicznymi także stymulacja z zastosowaniem czynników fizycznych może prowadzić do zmiany wrażliwości tkanki na stymulację adrenergiczną przez zmianę wielkości rezerwy receptorowej. Redukcję rezerwy receptorowej obserwuje się na przykład w czasie stosowania biostymulacji laserem o małej i średniej mocy [12]. Istnieje kilka możliwości zmiany wrażliwości tkanki na stymulację. Za proces zmniejszenia wrażliwości tkanki na stymulację może odpowiadać zmiana centrum aktywnego receptora przez modulator. Inną możliwością jest zmiana wielkości rezerwy receptorowej. Występuje prosta zależność między wielkością rezerwy receptorowej a wrażliwością tkanki na stymulację — im większa rezerwa receptorowa, tym większa wrażliwość tkanki na stymulację [7, 13]. Istotną rolę w zmianie wrażliwości tkanki na stymulację odgrywają także kanały wapniowe, zlokalizowane zarówno na powierzchni błony komórkowej, jak i błon cytoplazmatycznych retikulum endoplazmatycznego. Kanały te stanowią ostatnie ogniwo układu przewodzącego informację z metabotropowych receptorów α -adrenergicznego i wazopresynowego. Aktywność kanału może ulegać zmianie w wyniku modulowania przewodzenia informacji w łańcuchu zdarzeń pozareceptorowych lub bezpośrednio — przez blokowanie ich aktywności antagonistami wapnia. Czynniki zwiększającymi opór naczyniowy mogłyby być wykazywana przy długotrwałym stosowaniu CsA dysfunkcja śródbłonna naczyniowego, a także wpływ angiotensyny II [14–17]. Stosowane w doświadczeniach stężenie CsA 1 nM odpowiada stężeniu 121,6 ng/ml, czyli znajduje się w zakresie stężeń terapeutycznych (100–300 ng/ml). Stężenie 10 nM odpowiada stężeniu 1216 ng/ml, czyli przekracza znacznie zakres stężeń terapeutycznych. Obserwowane zjawiska występowały nie tylko w zakresie stężeń toksycznych, lecz także w zakresie stężeń terapeutycznych.

W prowadzonych doświadczeniach wykazano, że nie dochodzi do zmian w obrębie miejsca wiążącego agonistę, dochodzi natomiast do zmiany wielkości rezerwy receptorowej. Wielkość rezerwy receptorowej jest czynnikiem, który bezpośrednio wpływa na wrażliwość tkanki na stymulację. Podobne rezultaty uzyskał Seasholtz [18], przy czym w swoich doświadczeniach obserwował wpływ długotrwałej stymulacji adrenergicznej (24-godzinnej) na stężenie podfrakcji białka G. Zmiany te są czynnikiem wpływającym bezpośrednio na aktywność układu receptorowego, przy czym zmiany stężenia białek pojawiają się wyłącz-

nie przy długotrwałej stymulacji. Kolejnym czynnikiem może być proces endocytozy receptorów [13]. Wymaga on czasu, a więc nie pozwala na szybkie zmiany reaktywności układu receptorowego. Wyniki badań autorów artykułu nie wykluczają obecności procesów regulacyjnych innych niż zmiana przewodzenia informacji w układzie zdarzeń pozareceptorowych. Krótki czas, po którym pojawia się zmiana wrażliwości tkanki na stymulację, a także możliwość odwrócenia zachodzących procesów w równie szybkim czasie, sugerują występowanie zmian jakościowych, dotyczących zarówno receptora, jak i układu zdarzeń pozareceptorowych. Zmiany mogą być następstwem zmniejszenia stopnia wiązania receptora z układem białka G, a także stopnia wiązania między białkiem G a układem enzymów.

Wnioski

W obecności CsA w trakcie 2-godzinnej inkubacji obserwuje się zwiększenie wrażliwości tkanki na stymulację receptorów adrenergicznych i wazopresynowych, zarówno w stężeniach odpowiadających stężeniom terapeutycznym, jak i w znacznie ten zakres przekraczających.

Za efekt zwiększenia wrażliwości przez CsA odpowiada bezpośrednio zwiększenie wielkości rezerwy receptorowej, które nie jest efektem jedynie dysfunkcji śródbłonna naczyniowego. W procesie tym, w izolowanym naczyniu, nie współuczestniczy receptor typu I dla angiotensyny II.

Przy inkubacji krótkotrwałej w środowisku zawierającym CsA na pierwszy plan wysuwa się możliwość zmiany stopnia wiązania między białkiem G a receptorem lub układem enzymatycznym, ewentualnie bezpośrednia zmiana aktywności enzymów lub kanału wapniowego.

Streszczenie

Wstęp W niniejszej pracy przeanalizowano interakcje zachodzące między agonistami receptorów: α_1 -adrenergicznych — fenylefryną i receptorów wazopresynowych typu I (V_1) — wazopresyną argininową a cyklosporyną A.

Materiał i metody Badania prowadzono na perfundowanych tętnicach ogonowych szczurów, samców szczepu Wistar. Stosując klasyczne metody farmakometryczne, określono zależności efektu od stężenia agonisty dla fenylefryny i wazopresyny argininowej w warunkach kontrolnych oraz w obecności cyklosporyny A.

Wyniki W obecności cyklosporyny A dla obydwu agonistów zaobserwowano zmniejszenie wartości ED_{50} . Wyznaczone wartości stałych dysocjacji kompleksu agonisty receptora (K_A) w warunkach kontrolnych oraz w obecności cyklosporyny A nie różniły się znamienne. **Wnioski** Zarówno przebieg krzywych ilustrujących zależność efektu od frakcji zajętych receptorów, jak i zmiany wartości ilorazu K_A/ED_{50} sugerują zwiększenie w obecności cyklosporyny frakcji receptorów rezerwowych. Wzrost rezerwy nie ulegał znaczącej redukcji w obecności losartanu. Uzyskane wyniki sugerują także, że proces zmiany wielkości rezerwy receptorowej zachodzi w następstwie zwiększenia przewodnictwa w łańcuchu zdarzeń pozareceptorowych.

słowa kluczowe: cyklosporyna-A, receptory α_1 -adrenergiczne, receptory wazopresynowe, rezerwa receptorowa

Naciśnienie Tętnicze 2007, tom 11, nr 1, strony 21–26.

Piśmiennictwo

- Nickel T., Schlichting C.L., Weis M. Drugs modulating endothelial function after transplantation. *Transplantation* 2006; 82 (supl. 1): S41–46.
- Meyer-Lehnert H., Schrier R.W. Potential mechanism of cyclosporine A-induced vascular smooth muscle contraction. *Hypertension* 1989; 13: 352–360.
- Seeman T., Simkova E., Kreisinger J., Vondrak K., Dusek J., Gilik J., Feber J., Dvorak P., Janda J. Control of hypertension in children after renal transplantation. *Pediatr Transplant* 2006; 10: 316–322.
- Cantarovich M. Renal dysfunction in liver transplantation: The problem and preventive strategies. *Can. J. Gastroenterol.* 2004; 18 (supl. C): 27C–40C.
- Docherty J.R. The pharmacology of α_1 and α_2 -adrenoceptors: evidence for and against a further subdivision. *Pharmacol. Ther.* 1989; 44: 241–284.
- Abe K., Saito H., Matsuki N. Changes in intracellular free Ca concentration by activation of α -adrenoceptors in rat tail artery. *Jpn. J. Pharmacol.* 1990; 51: 337–344.
- Prudy R.E., Weber M.A. Angiotensin II amplification of α -adrenergic vasoconstriction: role of receptor reserve. *Circ. Res.* 1988; 63: 748–757.
- Kenakin T. *Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction.* Wyd. 3, Raven Press, New York 1997.
- Touyz R.M., Schiffrin E.L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol. Rev.* 2000; 52: 639–672.
- Grzešek G., Szadujkis-Szadurski L. Pharmacometric analysis of α_1 -adrenoceptor function in pretreated with lipopolysaccharides rat tail artery. *Pol. J. Pharmacol.* 2001; 53: 605–613.
- Baker C.H., Sutton E.T., Price J.M. i wsp. Attenuation of arteriolar α_2 -adrenoceptor sensitivity during endotoxemia. *Am. J. Physiol.* 1994; 267: H2171–H2178.
- Mackiewicz-Milewska M., Talar J., Grzešek G., Szadujkis-Szadurski L., Bułatowicz I., Śliwiński Z. Rola tlenu azotu w modulacji skurczu mięśniówki gładkiej tętnic wyzwalanego pobudzeniem receptorów adrenergicznych podczas biostymulacji laserowej. *Fizjoterapia Pol.* 2002; 2 (2): 89–98.
- Ferguson S.S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* 2001; 53: 1–24.
- Gao L., Zhu C., Jackson E.K. α_2 -adrenoceptors potentiate angiotensin II- and vasopressin-induced renal vasoconstriction in spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003; 305: 581–586.
- Min S.A., Stapleton M.P., Tabrizchi R. Influence of chloride ions on α_1 -adrenoceptor mediated contraction and Ca^{+2} influx in rat caudal artery. *Life Sci.* 1999; 64: 1631–1641.
- Toyoshima H., Nasa Y., Hashizume Y. i wsp. Modulation of CAMP-mediated vasorelaxation by endothelial nitric oxide and basal cGMP in vascular smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1998; 32: 543–551.
- Gardiner S.M., March J.E., Kemp P.A. i wsp. Regional haemodynamic effects of cyclosporine A, tacrolimus and sirolimus in conscious rats. *Br. J. Pharmacol.* 2004; 141: 634–643.
- Seasholtz T.M., Gurdal H., Wang H.Y. i wsp. Heterologous desensitization of the rat tail artery contraction and inositol phosphate accumulation after *in vitro* exposure to phenylephrine in mediated by decreased levels of G_{aq} and G_{ai} . *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997; 283: 925–931.