

Receptory β -adrenergiczne w układzie krążenia. Udział niewrażliwych na propranolol receptorów β -adrenergicznych w regulacji układu krążenia

β -adrenergic receptors in the cardiovascular system. The participation of propranolol insensitive β -adrenoceptors in the regulation of the cardiovascular system

Barbara Malinowska, Hanna Kozłowska, Agnieszka Zakrzaska, Grzegorz Kwolek

Zakład Fizjologii Doświadczalnej, Akademia Medyczna, Białystok

Streszczenie

W pracy opisano udział receptorów β -adrenergicznych w regulacji układu krążenia. Szczególną uwagę zwrócono na scharakteryzowanie oraz określenie funkcji, w sercu zdrowym i niewydolnym, receptorów β -adrenergicznych niewrażliwych na propranolol (antagonistę receptorów β_1 -/ β_2 -adrenergicznych). Są to pobudzające pracę serca receptory β_1 -adrenergiczne o niskim stanie powinowactwa i osłabiające kurczliwość serca receptory β_3 -adrenergiczne. Dodatkowo omówiono rozszerzające naczynia krwionośne działanie ligandów tych receptorów.

Abstract

In this paper we described the participation of β -adrenoceptors in the regulation of the cardiovascular system. We characterized mainly the low-affinity state of β_1 -adrenoceptors and β_3 -adrenoceptors, which are insensitive to propranolol (the antagonist of β_1 -/ β_2 -adrenoceptors). We also illustrated their function in the healthy and failing heart. In addition the vasodilatory effects of these receptors ligands were described.

Kardiologia Polska 2005; 63; 4 (Supl. 2): 399-408

Według najnowszej klasyfikacji [1] do receptorów β -adrenergicznych zaliczamy sklonowane już w chwili obecnej receptory β_1 -, β_2 -, β_3 -adrenergiczne (β -AR), przy czym wśród receptorów β_1 -AR wyróżnia się receptory o wysokim i niskim stanie powinowactwa (*high- and low-affinity state of β -adrenoceptors*). Jak zaznaczono w Tabeli I, wszystkie receptory β -AR są utworzonymi z długich łańcuchów białkowych siedmiokrotnie przenikających przez błonę komórkową i sprzężonymi z białkiem Gs receptorami metabotropowymi. Ich pobudzenie aktywuje cyklazę adenylową, co prowadzi do wzrostu cAMP w komórce. Receptory β_2 - i β_3 -AR mogą ponadto działać za pośrednictwem białek Gi (dokładniejsze omówienie w dalszej części pracy). Długotrwała aktywacja receptorów β_1 -AR (zarówno o wysokim, jak i o niskim stanie powinowactwa) oraz β_2 -AR, ale nie

β_3 -AR, prowadzi do zmniejszenia ich wrażliwości (desensytyzacji, czyli odczulania). Wszystkie receptory β -AR są pobudzane przez endogenne katecholaminy – pochodzącą głównie z zakończeń włókien współczulnych noradrenalinę i uwalnianą z rdzenia nadnerczy adrenalinę, które, jak zaznaczono w Tabeli I, mają różne powinowactwo do poszczególnych typów receptorów. Do wzrostu wydzielania noradrenaliny dochodzi między innymi na skutek pobudzenia presynaptycznych receptorów β_2 -AR zlokalizowanych na zakończeniach włókien współczulnych unerwiających poszczególne elementy układu krążenia oraz inne narządy wewnętrzne. Obecnie nie ma jednoznacznych dowodów wskazujących na to, że endogenne katecholaminy pobudzają receptory β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa. Prawdopodobieństwo takiego działania wynika jedynie z ba-

Adres do korespondencji:

Barbara Malinowska, Zakład Fizjologii Doświadczalnej Akademii Medycznej, ul. Mickiewicza 2A, 15-089 Białystok, tel./faks: +48 85 748 56 99, e-mail: bmalin@amb.edu.pl

dań z zastosowaniem znakowanego [^3H]-CGP 12177, w których wykazano, że zarówno noradrenalina, jak i (w mniejszym stopniu) adrenalina posiadają powinowactwo do tych receptorów w zakresie stężeń mikromolarnych [2].

W sercu człowieka zdecydowanie przeważają receptory β_1 -AR. Stosunek receptorów β_1 -AR: β_2 -AR wynosi w komorach 70–80:30–20%, a w przedsionkach 60–70:40–30%. Powyższa sytuacja ulega charakterystycznym zmianom w niewydolności mięśnia sercowego, kiedy pod wpływem zwiększonej aktywności układu współczulnego dochodzi do zmniejszenia liczby (tzw. *down regulation* – regulacja w dół) receptorów β_1 -AR (może dojść aż do 50% spadku mRNA dla tych receptorów). Nie notuje się przy tym istotnych zmian w ilości i aktywności białka Gs. Nie obserwuje się także spadku (lub obserwuje w znacznie mniejszym stopniu) w gęstości receptorów β_2 -AR. Dochodzi natomiast do wzrostu ilości i aktywności białka Gi [3, 4].

Pobudzenie receptorów β_1 -/ β_2 -AR zarówno przez endogenne, jak i egzogenne agonistów powoduje zwiększenie częstości i siły skurczu, a także prędkości rozkurczu (są to odpowiednio tzw. dodatnie efekty

chronotropowe, inotropowe i luzitropowe). Stymulacja receptorów β_1 -/ β_2 -AR prowadzi także do zwiększenia pobudliwości oraz szybszego przewodzenia potencjałów czynnościowych (dodatni efekt batmo- i dromotropowy). W przypadku nasilonego pobudzenia zarówno receptorów β_1 -AR, jak i β_2 -AR dochodzi do arytmii (Tabela I).

W ostatnich latach coraz częściej zwraca się uwagę na kardioprotekcyjne działanie receptorów β_2 -AR. Jak wykazano bowiem na modelach zwierzęcych (i to zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*) ich pobudzenie hamuje apoptozę w kardiomiocytach, co związane jest, jak się sugeruje, z działaniem zachodzącym za pośrednictwem białka G_i . Z kolei stymulacja receptorów β_1 -AR nasila apoptozę i działa toksycznie na miocyty. Co ważne, do nasilenia ochronnej funkcji receptorów β_2 -AR dochodzi w obecności antagonistów receptorów β_1 -AR. Natomiast blokada receptorów β_2 -AR zwiększa niekorzystny wpływ pobudzenia receptorów β_1 -AR [3, 4].

W naczyniach krwionośnych przeważają receptory β_2 -AR, których pobudzenie prowadzi do rozszerzenia naczyń krwionośnych, a tym samym do zmniejszenia całkowitego oporu obwodowego i obniżenia ciśnienia

Tabela I. Charakterystyka receptorów β -adrenergicznych (β -AR) i ich rozmieszczenie w układzie krążenia człowieka. NA – noradrenalina:

¹działanie występujące w stężeniach wyższych w porównaniu do ich wpływu na receptory β_1 -AR o wysokim stanie powinowactwa lub na receptory β_2 -AR;

²zbadane tylko w 1 przypadku [25] – brak danych. W Tabeli I nie wymieniono antagonistów receptorów β_1 -/ β_2 -AR umieszczonych w Tabeli II.

RECEPTORY				
	β_1 -adrenergiczne		β_2 -adrenergiczne	β_3 -adrenergiczne
	o wysokim stanie powinowactwa	o niskim stanie powinowactwa		
białko G	G_s	G_s	G_s G_i	G_s G_i
wtórny przekaźnik	cAMP	cAMP	cAMP	cAMP
endogenne agonisty	NA >adrenalina	NA (?)	Adrenalina >NA	NA \approx Adrenalina
egzogenne agonisty	prenalterol, ksamoterol, izoprenalina	CGP 12177 ¹ , cyjanopindolol ¹ , pindolol ¹	fenoterol, salbutamol, prokaterol, izoprenalina,	CL 316243, BRL 37344, SR 58611, ZD 2079; CGP 12177 ¹ , cyjanopindolol ¹
antagonisty	propranolol , bupranolol CGP 20712A, CGP 12177, cyjanopindolol	CGP 20712A ¹ , bupranolol ¹	propranolol, ICI 118551, CGP 12177 bupranolol	SR 59230A, L 748337, bupranolol ¹
desensytyzacja	+	+	+	–
efekt pobudzenia w sercu:				
chronotropowy	dodatni	dodatni	dodatni	b.d.
inotropowy	dodatni	dodatni	dodatni	ujemny
luzitropowy	dodatni	dodatni	dodatni	ujemny (?) ²
arytmia	arytmogenny	arytmogenny	arytmogenny	b.d.

krwi. Receptory β_1 -AR rozszerzają, obok receptorów β_2 -AR, naczynia wieńcowe i mózgowe.

Niewrażliwe na propranolol receptory β -adrenergiczne

Jak wynika z Tabeli I, receptory β_1 - i β_2 -AR są hamowane między innymi przez ich niespecyficznego antagonistę propranolol. W latach 80. pojawiły się pierwsze prace, w których wykazano, że niektóre efekty agonistów receptorów β_1 - i β_2 -AR są niewrażliwe na propranolol lub innych klasycznych antagonistów receptorów β -AR (zestawienie ligandów receptorów β_1 -/ β_2 -AR – Tabela I). Sugerowało to istnienie nowego typu receptora β -AR. Z czasem okazało się, że istnieją dwa typy niewrażliwych na propranolol receptorów. Pierwszy z nich, receptor β_3 -AR, został sklonowanego w 1989 r. Drugi określany był jako atypowy receptor β -AR [5]; receptor β_4 -AR [2, 6], a obecnie przyjmuje się, że jest to receptor β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa (dokładne omówienie dalej). Do dziś dochodzi jednak często do mylnego określania, czy dana reakcja zachodzi za pośrednictwem receptorów β_3 -AR czy też receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa. Wiąże się to przede wszystkim z dwoma faktami:

1. jak już wspomniano, obydwa typy receptorów są niewrażliwe na niespecyficznego antagonistę receptorów β_1 -/ β_2 -AR: propranolol lub innych, konwencjonalnych antagonistów receptorów β_1 -/ β_2 -AR;
2. brak jest specyficznych ligandów (zarówno agonistów, jak i antagonistów) tych receptorów (w tym przede wszystkim receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa).

Według Kaumanna i Molenaara [2] receptory β_3 -AR:

1. są pobudzane przez selektywnych agonistów receptorów β_3 -AR (spis: Tabela I);
2. są także pobudzane przez tzw. częściowych niekonwencjonalnych agonistów receptorów β -AR, czyli związki, które w niższych stężeniach blokują receptory β_1 - i β_2 -AR, a w wyższych stężeniach stymulują efekty niewrażliwe na propranolol. Zaliczamy do nich takie substancje, jak CGP 12177, cyjanopindolol czy pindolol;
3. pośredniczą w reakcjach, które nie są hamowane przez wysokie stężenia klasycznych antagonistów receptorów β_1 -/ β_2 -AR (w tym propranololu; spis w Tabeli I);
4. stymulują efekty osłabiane przez antagonistów receptorów β_3 -AR (pierwszym i najczęściej stosowanym antagonistą jest SR 59230A; spis w Tabeli I).

Receptory β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa nie spełniają pierwszego warunku, a ponadto – w odróżnieniu od receptorów β_3 -AR – nie są lub są słabiej an-

tagonizowane przez SR 59230A. Są natomiast hamowane przez wysokie stężenie antagonisty receptora β_1 -AR CGP 20712A [2, 5, 7]. Z kolei obecność receptorów β_3 -AR można jednoznacznie potwierdzić, wykazując w danej tkance specyficzne dla nich mRNA. Jak wynika z powyższego zestawienia oraz z danych zawartych w Tabeli I, cechą wspólną łączącą receptory β_3 -AR i receptory β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa jest fakt, że są pobudzane przez częściowych niekonwencjonalnych agonistów receptorów β -AR, a antagonizowane przez wysokie stężenia bupranololu [2, 5-8].

Wszystkie opisane poniżej badania związane z oceną funkcji receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa oraz receptorów β_3 -AR zostały wykonane w obecności propranololu (bądź innego klasycznego antagonisty receptorów β_1 -/ β_2 -AR) lub też w doświadczeniach wstępnych wykazano, że dany efekt nie jest blokowany przez tych antagonistów. W celu uproszczenia tekstu, nie będziemy tego powtarzać w dalszej części pracy. Nie będziemy także wymieniać szczegółowo zastosowanych w danym badaniu ligandów danych receptorów, których spis znajduje się w Tabeli I.

Atypowy receptor β -adrenergiczny receptorem β_1 -adrenergicznym o niskim stanie powinowactwa

Receptor β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa nie został sklonowany. Nie jest on receptorem β_3 -AR, gdyż – jak wykazano w prowadzonych równolegle badaniach – zarówno w warunkach *in vitro* [6] jak i *in vivo* [5, 7] specyficzni agoniści receptorów β_3 -AR stymulowali reakcje charakterystyczne dla receptorów β_3 -AR (odpowiednio relaksację izolowanego jelita i termogenezę w brunatnej tkance tłuszczowej szczura), ale nie pobudzały pracy serca (charakterystyczne dla receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa; dokładne omówienie poniżej). Ponadto pobudzające pracę serca działanie agonistów receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa pozostało niezmienione u myszy transgenicznych pozbawionych receptorów β_3 -AR [9]. Z kolei fakt, że występowanie receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa jest uzależnione od obecności receptorów β_1 -AR został jednoznacznie potwierdzony w badaniach z użyciem myszy transgenicznych, u których niewrażliwe na propranolol, pobudzające działanie CGP 12177 obserwowano we fragmentach serca izolowanych od zwierząt kontrolnych oraz pozbawionych receptorów β_2 -AR. Działanie to było natomiast całkowicie zniesione w grupie myszy pozbawionych zarówno receptorów β_1 -, jak i β_2 -AR [10].

W chwili obecnej przyjmuje się istnienie dwóch stanów aktywności receptorów β_1 -adrenergicznych [1, 10–17]:

- o wysokim stanie powinowactwa (*high-affinity state of β_1 -adrenoceptors*) – pobudzane i antagonizowane odpowiednio przez ich klasycznych agonistów (np. katecholaminy) i antagonistów (np. propranolol, niskie stężenie CGP 20712A);
- o niskim stanie powinowactwa (*low-affinity state of β_1 -adrenoceptors*) – pobudzane przez częściowych, niekonwencjonalnych agonistów receptorów β -adrenergicznych (CGP 12177, cyjanopindolol, pindolol), a blokowane przez wysokie stężenie CGP 20712A oraz bupranolol, ale niewrażliwe na propranolol.

Niewątpliwie czynnikami łączącymi receptory β_1 -AR o wysokim i niskim stanie powinowactwa jest ich funkcja – pobudzenie pracy serca, a także fakt działania za pośrednictwem tego samego II przekąźnika – cAMP. Jak wykazano bowiem w warunkach *in vitro* CGP 12177 aktywuje kinazę białkową A, zwiększa poziom cAMP, a efekty jego pobudzenia we fragmentach serca człowieka i szczura są nasilone w obecności inhibitora fosfodiesterazy, nie ulegając przy tym modyfikacji w obecności toksyny krztuśca [2, 13–15].

Hipoteza o dwóch stanach powinowactwa receptorów β_1 -AR została udowodniona w oparciu o doświadczenia na izolowanych fragmentach serca człowieka, szczura i fretki oraz hodowli komórek linii CHO (pochodzących z jajnika chomika chińskiego) z ludzkimi lub szczurzymi rekombinowanymi receptorami β_1 -AR. Badanymi odpowiedziami, w zależności od modelu doświadczalnego, były stymulowane za pośrednictwem agonistów obydwu stanów receptorów β_1 -adrenergicznych, w warunkach kontrolnych oraz w obecności poszczególnych antagonistów, kurczliwość kardiomiocytów oraz poziom cAMP. Dodatkowych dowodów dostarczyły doświadczenia, w których wykazano, że (-)-[³H]-CGP 12177 ma zdolność do wiązania się z miejscami o wysokim i niskim powinowactwie we fragmentach serca człowieka [15] i szczura [16] oraz hodowli komórek CHO z ludzkimi rekombinowanymi receptorami β_1 -adrenergicznymi [11, 12]. Co ciekawe, okazało się przy tym, że w przedsionkach serca człowieka [15] i lewej komorze serca szczura [16] jest 4 razy większa gęstość receptorów β_1 -AR o niskim niż o wysokim stanie powinowactwa.

Do chwili obecnej nie została wyjaśniona molekularna natura dwóch różnych aktywnych stanów konformacyjnych receptora β_1 -AR. Przypuszcza się, że mogą się one wiązać z modulacją allosteryczną receptora, z wpływem na inne białko modyfikujące jego aktywność, z krótkoterminowymi zmianami na poziomie II przekąźnika bądź długoterminową zmianą związaną z transkrypcją genu [11, 12, 17].

Funkcja receptorów β_1 -adrenergicznych o niskim stanie powinowactwa w sercu

Obecnie udowodniono w sposób jednoznaczny, że receptory β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa są receptorami pobudzającymi pracę serca. Ich obecność wykazano (badania ze znakowanym [³H]-CGP 12177) bądź się ją sugeruje na podstawie wyników badań funkcjonalnych *in vitro* na fragmentach izolowanego serca w węzle zatokowo-przedsionkowym, przedsionkach i komorach serca człowieka [2, 13–15, 17, 18], szczura [2, 6, 16, 17, 19], myszy [9, 10] i fretki [20–22]. Pobudzenie receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa prowadzi do dodatniego efektu chronotropowego, a także do nasilenia zarówno siły skurczu, jak i prędkości skracania przedsionków i komór (dodatni efekt inotropowy). Ponadto zaobserwowano nasilenie prędkości rozkurczu miokardium człowieka w większości [2, 14–17], ale nie wszystkich [13] doświadczeniach. Ten ostatni efekt jest bardzo korzystny, gdyż umożliwia prawidłowe wypełnianie komór przy nasilonej częstotliwości skurczów serca. Pod wpływem agonistów receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa dochodzi także do skrócenia potencjału czynnościowego komórek roboczych komór fretki [21]. Ponadto udowodniono, że związki te nasilają kurczliwość serca szczura poprzez wzrost poziomu wapnia w komórkach miocytów [2, 16]. Działanie pobudzające receptory β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa uzyskiwano, stosując głównie CGP 12177 i rzadziej cyjanopindolol. Cyjanopindolol okazał się przy tym częściowym agonistą tych receptorów, gdyż efekty maksymalne uzyskiwane przy zastosowaniu jego wyższych stężeń wynosiły około 50% w porównaniu z pobudzającym pracę serca działaniem CGP 12177 [2, 6–8]. Jednocześnie udowodniono, że przy kumulacyjnym podawaniu kolejnych dawek CGP 12177 dochodzi do osłabienia dodatniego efektu inotropowego tego związku w izolowanych fragmentach przedsionka człowieka [18]. Związane jest to ze zjawiskiem desensytyzacji receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa, które jest także charakterystyczne dla receptorów β_1 -AR o wysokim stanie powinowactwa i receptorów β_2 -AR (Tabela I).

W przeciwieństwie do badań *in vitro* efekt pobudzenia receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa w warunkach *in vivo* został wykazany jedynie przez naszą grupę w badaniach z zastosowaniem modelu szczura odrdzienionego i poddanego obustronnej wago-tonii [5, 7, 8]. Model ten, dzięki zniszczeniu rdzenia przedłużonego i kręgowego, umożliwia ocenę jedynie obwodowych mechanizmów związanych z regulacją układu krążenia, a przecięcie nerwów błędnych wyklucza reakcje odruchowe. W przeprowadzonych doświadczeniach stwierdzono, że dożylnie podanie CGP 12177

nasila częstość akcji serca [5, 7, 8], a także, jak to wykazano za pomocą specjalnego przetwornika dosercowego, zwiększa ciśnienie w lewej komorze serca i prędkość jej skurczu [8] odpowiednio o ok. 40, 30 i 100% wartości wyjściowych. Jednocześnie zaobserwowano zwiększenie prędkości rozkurczu komór o ok. 70% [8]. Dodatni efekt chronotropowy, inotropowy i lusitropowy zanotowano także po dożylniej iniekcji cyjanopindololu. Również i w warunkach *in vivo* związek ten okazał się częściowym agonistą receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa, gdyż, pomimo że stosowano go w 10 razy wyższych dawkach, wszystkie stymulowane przez niego efekty związane z pobudzeniem pracy serca były mniejsze o około 30–50% w porównaniu do CGP 12177. Udział receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa w omówionych wyżej reakcjach potwierdzono, przeprowadzając analogiczne doświadczenia z zastosowaniem wymienionych w Tabeli I antagonistów tych receptorów. Maksymalny wzrost wszystkich czterech parametrów określających pracę serca zanotowano w 5. min po podaniu CGP 12177 i cyjanopindololu. Działanie obydwu agonistów było długotrwałe, przy czym efekt chronotropowy utrzymywał się dłużej niż inotropowy. W ciągu 30 min od momentu iniekcji agonistów nasilona częstość skurczów praktycznie nie obniżyła się, gdy tymczasem ciśnienie w lewej komorze i prędkość narastania siły skurczów zmalały odpowiednio o ok. 70–80 i 50%. Z kolei dodatni efekt lusitropowy nie uległ zmianie (CGP 12177) lub był zmniejszony o ok. 70% (cyjanopindolol). Dłużej utrzymujące się działanie chronotropowe dodatnie w porównaniu z krótszym efektem inotropowym i lusitropowym uzyskane po pobudzeniu receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa wskazuje, że nasilona prędkość skurczu i rozkurczu nie wynikają z istotnego podwyższenia częstości akcji serca, a związane są z mechanizmem receptorowym.

Jak wygląda porównanie efektów działania pobudzonych receptorów β_1 -AR o wysokim i niskim powinowactwie? Niewątpliwie zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* pobudzenie receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa powodowało słabsze, ale dłużej trwające pobudzenie pracy serca. Jak wykazano, stymulowany za pomocą CGP 12177 maksymalny wzrost częstości skurczów izolowanych fragmentów przedsionków serca szczura [2, 6] wynosił ok. 60% efektu uzyskiwanego po pobudzeniu receptorów β_1 -AR przez izoprenalinę. Z kolei siła skurczu w porównaniu do działania izoprenaliny wahała się w granicach 50–60% w przedsionkach szczura [2, 6] i ok. 15% w przedsionkach izolowanych z serca człowieka [18]. Istotne nasilenie siły skurczu w sercu człowieka, do ponad 40% efektu izoprenaliny, następowało w obecności inhibitora fosfodiesterazy [13, 15]. Z kolei u szczurów odrdzienionych

agonista receptorów β_1 -AR prenalterol nasilał częstość akcji serca, jego kurczliwość oraz prędkość rozkurczu o około 20–30% silniej niż porównywalna dawka CGP 12177 [8]. Jednocześnie było to działanie szybsze (efekt maksymalny we wszystkich przypadkach osiągnięto już w 1 min po iniekcji tego agonisty), ale utrzymujące się zdecydowanie krócej. W 15 ciągu min po jego podaniu nasilona częstość akcji serca była bowiem zmniejszona o ok. 50% i nie obserwowano już dodatniego efektu inotropowego i lusitropowego. Oczywiście, biorąc pod uwagę warunki *in vivo*, nie można wykluczyć, że szybsze, ale i krótsze działanie prenalterolu wynika z innych parametrów farmakokinetycznych tego związku. Istnieje jednak wymagająca potwierdzenia możliwość, że związane jest to z różnymi właściwościami receptorów β_1 -AR o wysokim i niskim powinowactwie.

Znaczenie receptorów β_1 -adrenergicznych o niskim stanie powinowactwa w patofizjologii i farmakologii serca

Wyniki uzyskane do chwili obecnej wskazują, że badanie funkcji występujących także w sercu człowieka receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa ma znaczenie nie tylko czysto teoretyczne, ale może mieć także potencjalne znaczenie kliniczne. Jak dotąd największe zainteresowanie tymi receptorami wiąże się z ich rolą w arytmogenezie. Jak wykazano bowiem na izolowanych fragmentach serca, ich pobudzenie prowadzi do arytmii przedsionków lub komór serca człowieka, myszy, szczura i fretki [10, 17, 20–21]. Stymulujące arytmie działanie CGP 12177 było przy tym ok. 40 razy silniejsze niż działającej za pośrednictwem klasycznych receptorów β_1 -AR izoprenaliny [10, 19]. Silne, niewrażliwe na propranolol działanie arytmogenne CGP 12177 ulegało ponadto nasileniu w hodowli komórek ze zwiększoną liczbą receptorów β_1 -AR, gdy tymczasem częstość arytmii zachodzącej pod wpływem izoprenaliny pozostawała niezmienną [17]. Biorąc pod uwagę fakt, że efekt ten był blokowany przez bupranolol, autorzy pracy wskazują na potencjalne znaczenie tego antagonisty w terapii arytmii [17].

Z kolei w niewydolności mięśnia sercowego wykazano, że nie tylko receptory β_1 -AR o wysokim powinowactwie, ale i o niskim powinowactwie w porównywalnym stopniu podlegają zjawisku *down-regulation* (regulacji receptorów w dół) w niewydolnym sercu człowieka [15] i szczura [19]. Ich ilość w obydwu przypadkach spadała bowiem o około 50–60%. Jednak dokładniejsze wyjaśnienie funkcji niewrażliwych na propranolol receptorów β_1 -AR w niewydolności serca wymaga dalszych badań.

W przeciwieństwie do receptorów β_2 -AR (omówienie w części wstępnej pracy), odpowiedź na pobudzenie

receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa prawdopodobnie nie ulega zmianie podczas długotrwałego stosowania selektywnych antagonistów receptorów β_1 -AR u człowieka [18]. W ostatnich latach wykazano natomiast, że niektórzy antagoniści receptorów β_1 -/ β_2 -AR mogą pobudzać lub hamować receptory β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa. Różne powinowactwo i siła działania tych związków w stosunku do receptorów β_1 -AR o wysokim i niskim powinowactwie w komórkach linii CHO dodatkowo potwierdziło istnienie dwóch różnych miejsc wiążących dla ligandów receptorów β -AR. Okazało się bowiem, że w stosunku do receptorów β_1 -AR o wysokim stanie powinowactwa uzyskano następujące uszeregowanie zbadanych związków pod względem ich siły działania (wg 11): karwedilol (9,4) > CGP 20712A (9,2) > bupranolol (8,5) \approx timolol (8,6) > betaksolol (8,4) > propranolol (8,1) \approx bisoprolol (8,0) > metoprolol (7,5) \approx nadolol (7,5) > ICI 118551 (6,8) \approx atenolol (6,8) > sotalol (5,8). Natomiast w stosunku do receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa uszeregowanie tych samych związków kształtowało się następująco: karwedilol (7,3) \approx bupranolol (7,3) > CGP 20712A (7,1) >> propranolol (6,4) \approx timolol (6,3) >> nadolol (5,9) \approx ICI 118551 (5,8) \approx betaksolol (5,7) > bisoprolol (5,5) > metoprolol (5,3) >>> atenolol (3,8) \approx sotalol (3,7) (w nawiasie podano odpowiednie wartości pKD, określające siłę działania antagonistycznego).

W Tabeli II zestawiono szereg uznanych już antagonistów receptorów β -AR, które zostały przebadane pod kątem ich wpływu na receptory β_1 -AR o wysokim i ni-

skim stanie powinowactwa w doświadczeniach przeprowadzonych na izolowanych fragmentach ludzkich przedsionków [14] i komór [13], na miocytach komór szczura [17] i fretki [22] oraz hodowli komórek linii CHO z ludzkimi rekombinowanymi receptorami β_1 -AR [11, 12]. Dodatkowo włączono do tej tabeli najczęściej stosowane ligandy receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa – ich agonistów CGP 12177 i cyjanopindolol, blokujących w niskich stężeniach receptory β_1 -AR o wysokim stanie powinowactwa i receptory β_2 -AR oraz antagonistów bupranolol i CGP 20712A, będących w niższych stężeniach antagonistami receptorów β_1 -AR o wysokim stanie powinowactwa i β_2 -AR. Wysokie stężenie bupranololu antagonizuje także receptory β_3 -AR. Jak wynika z tej tabeli, związki β -adrenolityczne o wewnętrznej aktywności sympatykomimetycznej (ISA) pindolol, i alprenolol pobudzają nie tylko receptory β_1 -AR o wysokim stanie powinowactwa, ale i o niskim. Z kolei acebutolol i labetalol pobudzają receptory β_1 -AR o wysokim, ale nie o niskim stanie powinowactwa. Działanie karwedilolu nie zostało określone do końca, gdyż wykazano zarówno jego działanie pobudzające [12], jak i hamujące [11, 22] w stosunku do receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa. Zachodzące za pośrednictwem receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa nasilenie kurczliwości izolowanych fragmentów serca człowieka było pobudzane przez bucindolol, który nie stymuluje z kolei receptorów β_1 -AR o wysokim stanie powinowactwa [11–13]. Natomiast żaden z przebadanych antagonistów receptorów β -AR bez ISA nie

Tabela II. Wpływ uznanych antagonistów receptorów β_1 - i β_2 -adrenergicznych na receptory β_1 -adrenergiczne o wysokim i niskim stanie powinowactwa. (?) – uzyskano różne wyniki w pracach 12 oraz 11 i 22 (opis w tekście). ISA – wewnętrzna aktywność sympatykomimetyczna. Na podstawie 11, 12–14, 17, 22.

SUBSTANCJA	Uznane działanie antagonistyczne w stosunku do receptorów adrenergicznych	ISA	Receptory β_1 -adrenergiczne o stanie powinowactwa		
			wysokim	niskim	
			antagonista	agonista	antagonista
CGP 12177, cyjanopindolol	β_1 i β_2	–	+	+	–
CGP 20712A	β_1	–	+	–	+
bupranolol	β_1 , β_2 , β_3	–	+	–	+
pindolol, alprenolol	β_1 i β_2	+	+	+	–
karwedilol	β_1 , β_2 , α_1	–	+	+	+
bucindolol	β_1 , β_2 , α_1	–	+	+	–
acebutolol	β_1	+	+	–	–
labetolol	β_1 , β_2 , α_1	+	+	–	–
propranolol, sotalol, timolol	β_1 i β_2	–	+	–	–
atenolol, bisoprolol, metoprolol, nebiwolol	β_1	–	+	–	–

wykazał powinowactwa do receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa (Tabela II). Należy przy tym podkreślić, że wszystkie związki zarówno pobudzające, jak i hamujące receptory β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa, wykazują zdecydowanie wyższe powinowactwo do receptorów β_1 -AR o wysokim stanie powinowactwa niż o niskim. Powstaje zatem pytanie, czy leki β -adrenolityczne stosowane w dawkach terapeutycznych są w stanie zmodyfikować funkcję receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że jest to możliwe, jak to wyliczono dla pindololu [14] oraz alprenololu i karwedilolu [12, 20], biorąc pod uwagę osiągalne w osoczu stężenia terapeutyczne tych związków.

Aktywacja receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa prowadzi do długotrwałego pobudzenia pracy serca. Jakie to ma znaczenie dla uznanych już leków β -adrenolitycznych? Z jednej strony wskazuje się na korzystne, pobudzające pracę serca działanie pindololu w przypadku hipotensji ortostatycznej bądź omdlenia wazowagalnego [14]. Z drugiej strony zwraca się natomiast uwagę, że osłabiony efekt terapeutyczny bucindololu, pindololu i alprenololu przy leczeniu niewydolności mięśnia sercowego może być związany właśnie z prowadzącą do arytmii stymulacją receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa [13, 14, 22]. Teoretycznie prawdopodobieństwo występowania arytmii jest zwiększone podczas pobudzenia receptorów β_1 -AR o wysokim stanie powinowactwa, gdyż jak wykazano na komórkach linii CHO, dochodzi wówczas do zwiększonej odpowiedzi na CGP 12177 ze strony receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa [11]. Tymczasem w niewydolności serca zwiększona aktywność układu współczulnego powoduje nasilone wydzielanie pobudzającej klasycznej receptory β_1 -AR noradrenaliny. Jednak wyjaśnienie funkcji receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa w fizjologii i patologii serca wymaga dokładniejszego zbadania.

Receptory β_3 -adrenergiczne w sercu

W 1996 r. grupa Gauthier w doświadczeniach wykonanych na fragmentach biopsyjnych endomiokardium serca człowieka przeznaczonego do transplantacji zaobserwowała, że pobudzenie receptorów β_3 -AR prowadzi do ujemnego efektu inotropowego. Obecność receptorów β_3 -AR została potwierdzona poprzez wykazanie mRNA dla tych receptorów w badanych fragmentach serca. Zmniejszenie kurczliwości serca uzyskano pod wpływem: mikromolarnych stężeń niespecyficznych agonistów receptorów β -AR – endogennego noradrenaliny (badanej w obecności antagonistów receptorów β_1 -/ β_2 -AR nadololu i α_1 -AR prazosyny) oraz egzogennej izoprenaliny (badanej w obecności nadololu), a także

specyficznych agonistów receptorów β_3 -AR (Tabela I). Dla najwyższych stężeń badanych związków zaobserwowano spadek kurczliwości o ok. 20% (noradrenalina, izoprenalina) lub 50–60% (agoniści receptorów β_3 -AR). Jak wykazano, pobudzenie receptorów β_3 -AR prowadziło do aktywacji wrażliwego na toksynę krztuśca białka G_i , wzrostu poziomu cGMP, a także poprzez zachodzące pod wpływem śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) zwiększenie powstawania tlenu azotu. Osłabienie kurczliwości związane było ze zmniejszeniem amplitudy i skróceniem okresu repolarizacji potencjału czynnościowego mięśni roboczych komór serca [23].

Powstało pytanie o znaczenie osłabiających kurczliwość serca receptorów β_3 -AR. W zdrowym sercu receptory β_3 -AR nie odgrywają prawdopodobnie żadnej roli, biorąc pod uwagę zdecydowaną przewagę pobudzających pracę serca receptorów β_1 - i β_2 -AR. Tymczasem, jak wykazano, we fragmentach serca człowieka [24] i psa [25] w niewydolności mięśnia sercowego, w przeciwieństwie do podlegających zjawiskom zmniejszenia gęstości (*down-regulation*) i desensytyzacji receptorom β_1 -AR i β_2 -AR, receptory β_3 -AR nie ulegają desensytyzacji, a ich ilość się zwiększa (*up-regulation*, regulacja w górę). Zmiany te powodują zmniejszoną i nieadekwatną do wysokiego poziomu katecholamin kurczliwość mięśnia sercowego, a przez to znacznie bardziej ekonomiczne wykorzystanie tlenu i substancji energetycznych przez serce [24, 25].

Ta atrakcyjna hipoteza o zachodzącym za pośrednictwem receptorów β_3 -AR ujemnym efekcie inotropowym i jego nasileniu w niewydolności mięśnia sercowego nie została jednak potwierdzona, a przez to do końca zaakceptowana przez inne grupy badawcze. Nie stwierdzono bowiem mRNA dla tych receptorów w sercu człowieka i szczura [6, 16, 18]. Ponadto stosując dokładnie te same ligandy i ten sam zakres stężeń co grupa Gauthier, nie zaobserwowano osłabienia kurczliwości fragmentów serca człowieka i to zarówno zdrowego, jak i niewydolnego [15–16], a także serca szczura zarówno w warunkach *in vitro* [6], jak i *in vivo* [5, 7]. Z drugiej strony powstaje pytanie, dlaczego CGP 12177 – najsilniejszy agonista receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa w doświadczeniach grupy Gauthier zamiast nasilać, osłabiał kurczliwość serca [23]. Również nie do końca zrozumiałe pozostają wyniki badań *in vivo* przeprowadzonych na modelu myszy transgenicznych wyposażonych w ludzkie receptory β_3 -AR. Zupełnie nieoczekiwanie dwie grupy badawcze uzyskały całkowicie odmienny wpływ agonistów receptorów β_3 -AR – zależny od białka Gs wzrost kurczliwości serca [26] i związany ze wzrostem cGMP ujemny efekt inotropowy [27]. Potencjalne występowanie oraz określenie funkcji receptorów β_3 -AR

w sercu zdrowym i niewydolnym wymaga więc dokładnego sprawdzenia i potwierdzenia.

Rozszerzające naczynia krwionośne działanie ligandów receptorów β_1 -adrenergicznych o niskim stanie powinowactwa i receptorów β_3 -adrenergicznych

W Tabeli III zestawiono najważniejsze publikacje z ostatnich lat, w których wykazano niewrażliwe na propranolol lub innych klasycznych antagonistów receptorów β_1/β_2 -AR, rozkurczające izolowane naczynia krwionośne działanie agonistów receptorów β -AR. Sugerowano, że efekt ten wiąże się z pobudzeniem receptorów β_3 -AR bądź atypowych receptorów β -AR. Pojęcie: atypowy receptor β -AR nie było przy tym jednoznaczne z określeniem: receptor β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa, gdyż nie wszystkie cechy farmakologiczne odpowiadają receptorom β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa występującym w sercu [28]. W sposób jednoznaczny istnienie receptorów β_3 -AR udowodniono, wykazując mRNA dla tych receptorów w tętnicy wieńcowej i piersiowej wewnętrznej człowieka, komórkach endotelium aorty szczura oraz miocytach żyły wrotnej szczura (Tabela III).

Zdecydowanie bardziej skomplikowany obraz wyłania się z badań funkcjonalnych, gdyż większość z nich była wykonana na izolowanych naczyniach krwiono-

śnych kurczonych uprzednio agonistami receptorów α_1 -adrenergicznych – fenylefryną lub noradrenaliną. Tymczasem w ubiegłym roku pojawiły się prace, wykonane na izolowanej aorticie i tętnicy krezkowej szczura, a także tętnicy płucnej człowieka, w których udowodniono, że zachodzący pod wpływem agonistów j i antagonistów receptorów β_3 -AR oraz receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa rozkurcz wynika z wyraźnych właściwości α -adrenolitycznych tych związków [29–30]. Wyniki badań funkcjonalnych zostały dodatkowo potwierdzone w doświadczeniach *binding study*, w których wykazano, że wspomniane wyżej ligandy receptorów β -AR wypierają znakowaną trytem prazosynę (antagonistę receptorów α_1 -AR) z jej połączeń z receptorami α_1 -AR [29].

Powstaje pytanie, czy w tym układzie możemy w ogóle mówić o niewrażliwych na propranolol receptorach β -AR rozszerzających naczynia krwionośne. Obecności receptorów β_3 -AR nie możemy wykluczyć w naczyniach, w których stwierdzono dla nich mRNA (Tabela III). Do wyjaśnienia pozostaje jednak znaczenie tych receptorów, gdyż badania funkcjonalne zostały wykonane na naczyniach kurczonych uprzednio agonistą receptorów α -AR. W tym układzie na szczególną uwagę zasługują badania wykonane na ludzkiej tętnicy wieńcowej kurczonej uprzednio za pomocą endoteliny 1 lub KCl, w których pod wpływem agonistów receptorów β_3 -AR dochodziło do 50% rozkurczu. Niewrażliwego na propranolol udziału receptorów β -AR nie

Tabela III. Niewrażliwe na propranolol rozszerzające naczynia krwionośne działanie agonistów receptorów β -adrenergicznych. ¹Szczegółowe dane literaturowe w pracach 28, 30. ²Wykazano istnienie mRNA dla receptorów β_3 -adrenergicznych

sugerowany typ receptora	naczynie	gatunek	czynnik kurczący	literatura
β_3 -AR	aorta	szczur	fenylefryna	Rautureau i wsp., 2002 ^{1,2} ; Mallem i wsp., 2004 ^{1,2}
	tętnica szyjna	szczur	tromboksan A ₂	MacDonald i wsp., 1991
	miocyty żyły wrotnej	szczur		Viard i wsp., 2000 ^{1,2}
	tętnica płucna	pies szczur	noradrenalina hipoksja	Tagaya i wsp., 1999 ¹ Dumas i wsp., 1998
	tętnica piersiowa wewnętrzna	człowiek	fenylefryna	Shafiei i wsp., 2000 ¹ ; Rozec i wsp., 2005 ²
	tętnica pępkowa	człowiek	serotonina	Dennedy i wsp., 2002 ¹
	tętnica wieńcowa	człowiek	KCl (60mM), endotelina 1	Dessy i wsp., 2004 ^{1,2}
atypowy receptor	tętnica szyjna	szczur	noradrenalina	Oriowo, 1994, 1995 ¹
	aorta	szczur	fenylefryna	Brawley i wsp., 2000 ¹
β -AR	tętnica krezkowa	szczur	fenylefryna, serotonina	Kozłowska i wsp., 2003 [28]
	tętnica piersiowa wewnętrzna	człowiek	fenylefryna	Shafiei i wsp., 2000 ¹
	tętnica płucna	człowiek	fenylefryna	Kozłowska i wsp., 2005 [30]

można wykluczyć także w doświadczeniach, w których izolowane naczynia krwionośne kurczono za pomocą czynników niemających powinowactwa do receptorów α_1 -AR, takich jak serotonina, hipoksja czy trombosan A_2 (Tabela III).

Czy działanie ligandów receptorów β_3 -AR i β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa związane jest z ich wpływem na śródbłonek czy mięśniówkę gładką naczyń? W szeregu prac badających ten problem uzyskano różnorodne wyniki, skomplikowane teraz dodatkowo właściwościami α_1 -adrenolitycznymi większości użytych związków. Obecnie najbardziej prawdopodobna hipoteza dotyczy działania hiperpolaryzacyjnego badanych związków, które pobudzając receptory β -AR, prowadziłyby do wypływu jonów potasu z komórki przez specyficzne kanały potasowe zależne między innymi od jonów wapnia (K_{Ca}). Takie działanie agonistów receptorów β_3 -AR zostało wykazane między innymi na naczyniach płucnych szczura i wieńcowych człowieka kurczonych odpowiednio pod wpływem hipoksji i za pomocą endoteliny 1 (Tabela III).

Jakie jest znaczenie niewrażliwego na klasycznych antagonistów receptorów β -AR działania rozkurczowego agonistów receptorów β -AR? Biorąc pod uwagę omówione powyżej problemy metodyczne, trudno odpowiedzieć na to pytanie. Uzyskiwano co prawda aż 100% relaksację, ale w zakresie wysokich stężeń mikromolarnych. Ponadto w doświadczeniach wykonanych na szczurach odrdzienionych [8], w których równolegle oceniano wpływ agonistów receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa na parametry sercowe i naczyniowe, stwierdzono, że zarówno CGP 12177, jak i cyjanopindolol stosowane w dawkach, które stymulują maksymalną lub prawie maksymalną odpowiedź inotropową i chronotropową dodatnią, tylko w niewielkim i nieistotnym stopniu zwiększają krótkotrwale ciśnienie krwi (maksymalnie o niecałe 10 mmHg) i jedynie ich najwyższa dawka zwiększa przepływ krwi przez tętnicę krezkową, a wpływ ten nie jest związany z pobudzeniem receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa [8]. Określenie potencjalnego udziału receptorów β -AR niewrażliwych na propranolol w naczyniach krwionośnych w regulacji układu krążenia wymaga dalszego wyjaśnienia. Niewykluczone bowiem, że działanie to jest nasilone w warunkach patologicznych, np. nadciśnieniu czy cukrzycy.

Podsumowanie

Biorąc pod uwagę wyniki najnowszych badań, w chwili obecnej sugeruje się, że w sercu człowieka oprócz wrażliwych na propranolol (i innych klasycznych antagonistów receptorów β -AR) odpowiedzialnych za pobudzenie pracy serca receptorów β_1 -AR i receptorów

β_2 -AR występują niewrażliwe na propranolol receptory – β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa i β_3 -AR. Pobudzenie receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa prowadzi do dodatniego efektu chronotropowego, inotropowego i lusitropowego, a stymulacja receptorów β_3 -AR indukuje ujemny efekt inotropowy. W niewydolności mięśnia sercowego dochodzi do zmniejszenia liczby receptorów β_1 -AR o wysokim i niskim stanie powinowactwa, zwiększenia gęstości receptorów β_3 -AR, przy niezmienionej liczbie receptorów β_2 -AR. Rozszerzenie naczyń krwionośnych zachodzi za pośrednictwem receptorów β_2 -AR. Natomiast sugerowane działanie rozszerzające naczynia receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa oraz receptorów β_3 -AR wciąż wymaga dokładnego sprawdzenia zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologii.

Piśmiennictwo

1. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA, Adrenoceptors, β . In: Guide to Receptors and Channels. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 10.
2. Kaumann AJ, Molenaar P. Modulation of human cardiac function through 4 beta-adrenoceptor populations. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997; 355: 667-81.
3. Brodde OE, Leineweber K. Autonomic receptor systems in the failing and aging human heart: similarities and differences. *Eur J Pharmacol* 2004; 500: 167-76.
4. Xiao RP, Zhu W, Zheng M, et al. Subtype-specific β -adrenoceptor signaling pathways in the heart and their potential clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 358-65.
5. Malinowska B, Schlicker E. Mediation of the positive chronotropic effect of CGP 12177 and cyanopindolol in the pithed rat by atypical β -adrenoceptors, different from β_3 -adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 943-9.
6. Kaumann AJ, Molenaar P. Differences between the third cardiac β -adrenoceptor and the colonic β_3 -adrenoceptor in the rat. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 2085-98.
7. Malinowska B, Schlicker E. Further evidence for differences between cardiac atypical β -adrenoceptors and brown adipose tissue β_3 -adrenoceptors in the pithed rat. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 1307-14.
8. Zakrzaska A, Schlicker E, Kwolek G, et al. Positive inotropic and lusitropic effects mediated via the low-affinity state of β_1 -adrenoceptors in pithed rats. *Br J Pharmacol* 2005 Sep 5; [w druku].
9. Kaumann AJ, Preitner F, Sarsero D, et al. (-)-CGP 12177 causes cardiostimulation and binds to cardiac putative β_4 -adrenoceptors in both wild-type and β_3 -adrenoceptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 1998; 53: 670-5.
10. Kaumann AJ, Engelhardt S, Hein L, et al. Abolition of (-) CGP 12177-evoked cardiostimulation in double β_1/β_2 -adrenoceptor knockout mice. Obligatory role of β_1 -adrenoceptor for putative β_4 -adrenoceptor pharmacology. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2001; 363: 87-93.
11. Baker JG. Site of action of β -ligands at the human β_1 -adrenoceptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 313: 1163-71.
12. Baker JG, Hall IP, Hill SJ. Agonist actions of „ β -blockers” provide evidence for two agonist activation sites or conformations

- of the human beta1-adrenoceptor. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 1312-21.
13. Bundkirchen A, Brixius K, Bolck B, et al. Bucindolol exerts agonistic activity on the propranolol-insensitive state of β_1 -adrenoceptors in human myocardium. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 794-801.
 14. Joseph SS, Lynham JA, Molenaar P, et al. Intrinsic sympathomimetic activity of (-)-pindolol mediated through a (-)-propranolol-resistant site of the β_1 -adrenoceptor in human atrium and recombinant receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2003; 368: 496-503.
 15. Sarsero D, Russell FD, Lynham JA, et al. (-)-CGP 12177 increases contractile force and hastens relaxation of human myocardial preparations through a propranolol-resistant state of the β_1 -adrenoceptor. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2003; 367: 10-21.
 16. Sarsero D, Molenaar P, Kaumann AJ, et al. Putative β_2 -adrenoceptors in rat ventricle mediate increases in contractile force and cell Ca^{2+} : comparison with atrial receptors and relationship to (-)-[3H]-CGP 12177 binding. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1445-60.
 17. Lewis CJ, Gong H, Brown MJ, et al. Overexpression of β_1 -adrenoceptors in adult rat ventricular myocytes enhances CGP 12177A cardiostimulation: implications for 'putative' β_4 -adrenoceptor pharmacology. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 813-24.
 18. Kaumann AJ. (-)-CGP 12177-induced increase of human atrial contraction through a putative third β -adrenoceptor. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 93-8.
 19. Kompa AR, Summers RJ. Desensitization and resensitization of β_1 - and putative β_4 -adrenoceptor mediated responses occur in parallel in a rat model of cardiac failure. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1399-406.
 20. Freestone NS, Heubach JF, Wettwer E, et al. β_4 -adrenoceptors are more effective than β_1 -adrenoceptors in mediating arrhythmic Ca^{2+} transients in mouse ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1999; 360: 445-56.
 21. Lowe MD, Grace AA, Kaumann AJ. Blockade of putative β_4 - and β_1 -adrenoceptors by carvedilol in ferret myocardium. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1999; 359: 400-3.
 22. Lowe MD, Lynham JA, Grace AA, et al. Comparison of the affinity of β -blockers for two states of the β_1 -adrenoceptor in ferret ventricular myocardium. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 451-61.
 23. Gauthier C, Langin D, Balligand JL. β_3 -adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21: 426-31.
 24. Moniotte S, Kobzik L, Feron O, et al. Upregulation of β_3 -adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation* 2001; 103: 1649-55.
 25. Cheng HJ, Zhang ZS, Onishi K, et al. Upregulation of functional β_3 -adrenergic receptor in the failing canine myocardium. *Circulation* 2001; 89: 599-606.
 26. Kohut TA, Takaoka H, McDonald P, et al. Augmentation of cardiac contractility mediated by the human β_3 -adrenergic receptor overexpressed in the heart of transgenic mice. *Circulation* 2001; 104: 2485-91.
 27. Tavernier G, Toumaniantz G, Erfanian M, et al. β_3 -adrenergic stimulation produces a decrease of cardiac contractility ex vivo in mice overexpressing the human β_3 -adrenergic receptor. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 288-96.
 28. Kozłowska H, Szyska U, Schlicker E, et al. Atypical β -adrenoceptors, different from β_3 -adrenoceptors and probably from the low-affinity state of β_1 -adrenoceptors, relax the rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 3-12.
 29. Brahmadevara N, Shaw AM, MacDonald A. α_1 -adrenoceptor antagonist properties of CGP 12177A and other β -adrenoceptor ligands: evidence against β_3 – or atypical β -adrenoceptors in rat aorta. *Br J Pharmacol* 2004; 142: 781-7.
 30. Kozłowska H, Schlicker E, Kozłowski M, et al. Ligands at β_2 , β_3 , and the low-affinity state of β_1 -adrenoceptors block the α_1 -adrenoceptor-mediated constriction in human pulmonary and rat mesenteric arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 46: 76-82.