

Angiotensin II のラット単離心室筋内向き 整流カリウムチャンネルに対する活性化作用

藪下博史 高井博之 赤松幹一郎
唐崎専也 石川欽司

近畿大学医学部第1内科学教室

抄 録

近年、アンジオテンシン変換酵素阻害薬が各種重症不整脈に対し抑制作用を有することが報告されており、こうした抗不整脈作用の機序の一つとしてアンジオテンシン II (Angiotensin II; Ang II) の直接的な心室筋イオンチャンネルに対する作用が考えられている。心室筋内向き整流カリウムチャンネル (inward rectifier potassium channel; IK_1) は活動電位再分極相形成を担うため、上記の作用に重要な役割を果たしていると考えられるが Ang II の心室筋 IK_1 に対する報告は少なく、またその制御経路は明らかでない。我々はラット心室筋を用いて Ang II の IK_1 に対する影響と、その制御経路を patch clamp 法を用いて検討した。ラット単離心室筋細胞を作成し whole cell voltage clamp 法により保持電位 -40 mV から -120 mV まで過分極させて得られた IK_1 電流を観察した。Ang II・CV 11974 (AT_1R 拮抗薬)・CGP 42112A (AT_2R 拮抗薬) は 100 nM に調整し細胞外に灌流した。Ang II 添加によって IK_1 電流は、添加前に比べ $133.1 \pm 4.2\%$ の有意な増強がみられた ($p < 0.01$, $N = 7$)。CGP 42112A で前処理したものは Ang II の IK_1 電流の増強効果は同様であった (添加前に比べ $132.0 \pm 4.5\%$, $p < 0.01$, $N = 5$) が、CV 11974 で前処理したものは Ang II の IK_1 電流の増強効果が抑制された (添加前に比べ $96.7 \pm 1.8\%$, $N = 5$)。本研究において、Ang II はラット心室筋細胞の IK_1 電流を増加させること、さらにその効果が AT_1R 拮抗薬の前処理で消失し AT_2R 拮抗薬の前処理にて影響を受けないことから、その発現経路において AT_1R が関与していることが解明された。

Key words: Angiotensin II, 内向き整流カリウムチャンネル, Angiotensin II type 1 受容体, patch clamp 法, whole cell voltage clamp 法, 心室筋細胞

緒 言

今日、レニン・アンジオテンシン系は生体内において最も主要な血圧体液調節ホルモン系の一つであると同時に、血管、心臓、腎臓などの組織においても存在し、局所での循環・細胞機能調節系としても重要な役割を果たしている¹。そしてその活性を担うアンジオテンシン II (Angiotensin II; Ang II) の機能調節の多くはイオンチャンネルの制御を介してなされることが patch clamp 法を用いて報告されている^{2,3,4,5,6}。心室筋においても Ang II はナトリウムチャンネル、クロライドチャンネル、そしてカリウムチャンネルの中では遅延整流カリウムチャンネル (delayed rectifier potassium channel; IK) を制御

している^{7,8,9}と報告されている。臨床面においては、アンジオテンシン変換酵素阻害薬 (Angiotensin converting enzyme inhibitor; ACE-I) が、冠動脈閉塞後の再灌流時に生じる心室性不整脈を抑制する^{10,11,12}、慢性心不全症例の非持続型心室性頻拍を抑制する^{13,14,15}といった報告がなされ、Ang II 受容体拮抗薬もまた、アンジオテンシン II タイプ 1 受容体 (Ang II type 1 receptor; AT_1R) 拮抗薬が心筋虚血時の不整脈を抑制し¹⁶、梗塞モデルにおける再灌流不整脈を抑制する^{17,18}といった ACE-I と同様の抗不整脈作用を有することが報告されている。以上のことから上記の不整脈発症に Ang II の関与が考えられる。こうした ACE-I や Ang II 受容体拮抗薬の抗不整脈作用の発現理由には一定の見解が得られ

ていないが、交感神経活性抑制作用や、血清カリウム増加作用、虚血心筋保護作用、心室リモデリング抑制作用、迷走神経の改善作用などになり、Ang IIの直接的な電気生理学的作用が挙げられている。興味深い報告として Marakas ら¹⁹の急性心筋梗塞患者、Bashir ら²⁰の左室機能不全患者における ACE-I の一つである captopril による QT 間隔延長作用があり、この QT 間隔に影響を及ぼす主要なチャネルは活動電位再分極相の形成を担う IK と内向き整流カリウムチャネル (inward rectifier potassium channel; IK₁) である。特に IK₁ は活動電位において、第3相後半および静止膜電位の形成に重要な役割を果たしていると考えられ QT 間隔に対する影響も大きい。しかし Ang II の心室筋の IK₁ に対する影響は Morita ら⁸がウサギを用いた実験結果で述べているのみで詳細な報告はない。

また、1989年になりサブタイプの特異的な拮抗薬の開発により、少なくとも AT₁R およびアンジオテンシン II タイプ2受容体 (Ang II type 2 receptor; AT₂R) の2つの存在が明らかにされた^{21,22}が、その発現は種差や臓器において様々であり²³、このことが Ang II の作用の多様性を反映していると考えられている。しかしながら、上述の理由から Ang II 受容体拮抗薬の臨床使用において、Ang II 受容体の一方のみをブロックすることにより血中の Ang II レベルが上昇^{24,25,26}、ブロックされていないもう一方の受容体への刺激が亢進する可能性が指摘されている。このため Ang II の作用が AT₁R、あるいは AT₂R の単独の受容体を介する効果か、もしくは2つの受容体が互いに拮抗する作用を有し、両者を加算した効果であるのかを認識する事が重要となってきた²⁷。

以上のことから、Ang II の IK₁ に対する直接的な電気生理学的作用を把握することが ACE-I や Ang II 受容体拮抗薬の抗不整脈作用の発現において重要な位置を占めると考えられるが、心室筋においては先述の Morita ら⁸がその報告のなかでウサギを用いて IK₁ の活性化を述べているのみであり、またその作用は AT₁R あるいは AT₂R、いずれの受容体を介する効果かまでは言及されていない。

そこで今回我々は、ラット心室筋を用いて IK₁ に対する Ang II の影響と、その経路について patch clamp 法を用いて検討した。

方 法

心室筋細胞単離法

心室筋細胞の単離は Isenberg と Klockner²⁸ および Powell ら²⁹が行った酵素処理法を用いた。体重

200~220 g の雄性ラット (Wistar) を pentobarbital sodium (40 mg/kg) を腹腔内投与して麻酔した。開胸後直ちに心臓を取りだし、ランゲンドルフ型灌流装置に固定した。冠動脈内の血液は大動脈から30 ml の modified Tyrode 液を70 cmH₂O の灌流圧で逆行性灌流を行って取り除いた。次に心臓が自然に停止するまで Ca²⁺-free Tyrode 液 (modified Tyrode 液から CaCl₂ を除いたもの) で灌流し、さらに0.04%のコラゲナーゼ (Sigma, Type I) を含む Ca²⁺-free Tyrode 液60 ml で灌流した後、100 ml の Krebs buffer 液で灌流しコラゲナーゼを洗い流した。すべての灌流液は100%酸素を通気し、恒温槽で37°Cに加熱して使用した。摘出心臓をハサミで細切し、150 μm のメッシュナイロンで単離心室筋細胞のみをビーカーに濾過し、実験開始まで4°Cで1時間保存した。保存後、得られた単離心室筋細胞を modified Tyrode 液で灌流し、Ca²⁺ 耐性が保たれた桿状形態の単離心室筋細胞を実験に使用した。ラット心室筋単離に用いた各液の組成は modified Tyrode 液は NaCl 140 mM, KCl 5.4 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 0.5 mM, HEPES 5 mM, glucose 5.5 mM, NaH₂PO₄ 0.4 mM で NaOH を用いて pH を7.4に調整したもの、Krebs buffer 液は KCl 25 mM, glutamic acid 80 mM, taurine 10 mM, oxalic acid 14 mM, KH₂PO₄ 10 mM, KOH 116 mM, HEPES 10 mM, glucose 11 mM, EGTA 0.5 mM で KOH を用いて pH を7.4に調整したものを用いた。

whole cell voltage clamp 法

単離心室筋細胞の IK₁ 電流は whole cell voltage clamp 法を用いて Axopatch-1D amplifier (Axon Instruments) で測定を行った。patch モデルと各細胞液組成を示す(図1)。カルシウム電流、ナトリウム電流を十分に除去して IK₁ 電流を測定するために modified Tyrode 液に CoCl₂ 1 mM, tetrodotoxin (TTX) 10 μM を加え細胞外液として使用した。吸引電極はガラス製毛細管 (GS150T-10, Clark Electromedical Instruments) を垂直マイクロ電極プーラー (Type PP-83, Narishige) を用いて2段階ステップで引き伸ばして作製した。吸引電極の内径は直径2.5~5.0 μm で、先端をヒートポリッシュで加工した後、標準内液を満たしたときの抵抗が2~5 MΩ のものを使用した。細胞内液の組成は K-aspartate 120 mM, KCl 20 mM, Mg-ATP 2 mM, Na₂-ATP 5 mM, HEPES 5 mM, EGTA 5 mM で KOH を用いて pH 7.2に調整したものを用いた。17~19°Cの modified Tyrode 液を bath に灌流し、

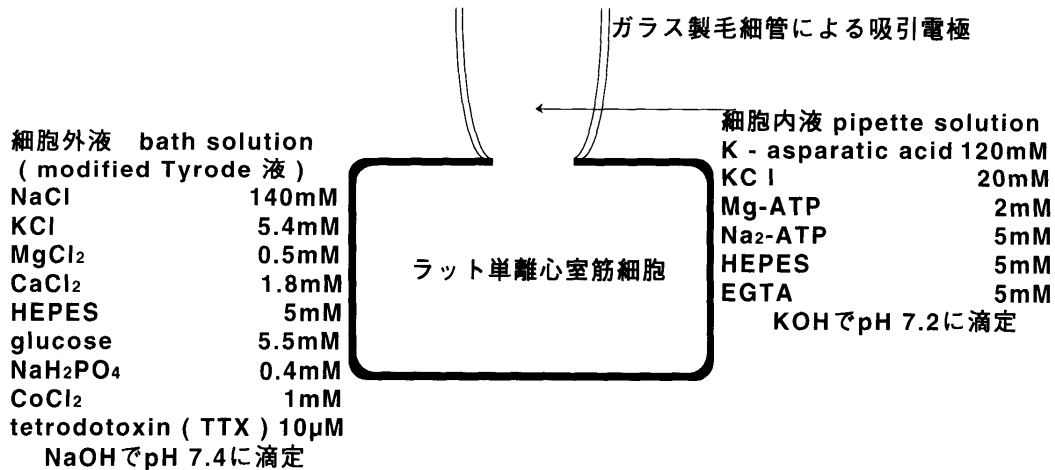


図1 patch モデルと細胞外液細胞内液の組成ラット単離心室筋を用いた patch clamp モデルとその各細胞液組成を示した。

bath 内の単離心室筋細胞の表面に吸引電極の先端をつけ、20~40 cmH₂O で吸引すると G Ω シールができた。G Ω シールが安定したことを確認した後、吸引電極にさらに短時間吸引を加え細胞膜を破った。細胞膜の破れたことは電気容量が増加することで確認できた。吸引電極内液が完全に入れ替わり、シールが安定するまで15分間待った後、bath に各種薬剤の灌流を開始した。一連の抵抗を代償した後は、実験中電気容量を一定にした。吸引電極電流は吸引電極と bath を modified Tyrode 液で満たしたときに電流が 0 ボルトとなるように調節した。一連の抵抗の補正は電気容量の変動が最小になるようにした。

実験で用いる標準の whole cell voltage clamp 法のプロトコールは保持電位を -40 mV とし -150 mV から +10 mV まで各 10 mV 毎に増加させたものを用いた。刺激時間は 500 msec とし、各刺激間隔は 10 sec とした。IK₁ 電流の測定は Steady state にて計測した。データの解析は Axopatch (Version 5.5.1, Axon Instruments) および Microsoft Excel (Ver. 5.0, Microsoft corporation) を用いて行った。

使用薬剤 Ang II, CV 11974 (AT₁R 拮抗薬), CGP 42112A (AT₂R 拮抗薬) は 100 nM の濃度になるよう modified Tyrode 液で実験前に溶解して、それぞれ細胞外に添加した。CV 11974 は 10 mg につき Na₂CO₃ を 50 μ l (0.05 ml) 加えて溶解した。Ang II は Sigma より、CGP 42112A は S. N. P. Japan より購入した。CV 11974 は武田薬品工業株式会社より提供を受けた。

統計

すべての数値は平均 \pm 標準誤差 (S. E.) で示し、統計処理には Student's t test を用い、 $p < 0.05$ を有意と判定した。

成 績

Ang II の IK₁ 電流への効果

細胞膜を破った状態 (Gaining) から各 2.5 分毎に図 2-A の whole cell voltage clamp 法のプロトコールに基づき、Ang II の IK₁ 電流への Steady state における作用を観察した。IK₁ 電流は、細胞外に Ang II を加えずに 30 分以上観察したところ、定常状態になるまで 15 分を要した (N=5)。そのため IK₁ 電流が定常状態になるまで Gaining から 15 分間経過した後、細胞外に modified Tyrode 液で希釈した 100 nM の Ang II を 15 分間添加した (図 2-B)。Ang II 100 nM を添加させる前後での、IK₁ 電流の実電流記録 (図 3) と、各電位に固定させて得られた電流電圧曲線を示した (図 4)。さらに Ang II 100 nM を添加させる前後 (Control 15 分時と Ang II 100 nM 添加後 15 分時) での、-40 mV の保持電位から -120 mV に変化させてえられる Steady state にて計測した IK₁ 電流を示した (図 5)。Ang II 添加後の IK₁ 電流は、添加前に比べ 133.1 \pm 4.2% の有意な増強を示した (-1.54 \pm 0.19 nA vs -2.04 \pm 0.26 nA, $p < 0.01$, N=7)。静止膜電位は Ang II 添加前は -75 \pm 7 mV で、Ang II 100 nM 添加後 -80 \pm 9 mV となり有意差は認めなかったが過分極になる傾向を示した (N=7)。

Ang II による IK₁ 電流増強作用の制御経路

Gaining から各 2.5 分毎に図 6-A の whole cell voltage clamp 法のプロトコールに基づき、Ang II による IK₁ 電流の増強が AT₁R、または AT₂R のいずれを介しての作用であるかを検討した。Gaining から 15 分間経過した後、modified Tyrode 液で 100

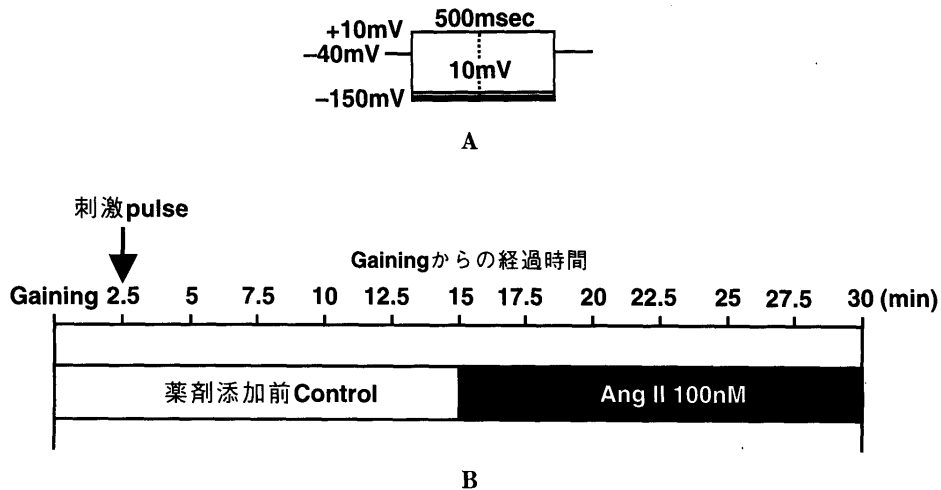


図2 刺激 pulse protocol と Ang II の添加法

図2-A 刺激 pulse protocol

プロトコルは保持電位を -40 mV とし -150 mV から $+10\text{ mV}$ まで各 10 mV 毎に増加させたものを用いた。刺激時間は 500 msec とし、各刺激間隔は 10 sec とした。この刺激は 2.5 分毎に繰り返し加えた。

図2-B Ang II の添加法

Control を 15 分間を記録したのち、細胞外に Ang II 100 nM を 15 分間加え記録した。

Ang II : Angiotensin II

Gaining : 吸引電極にて細胞膜を破った状態

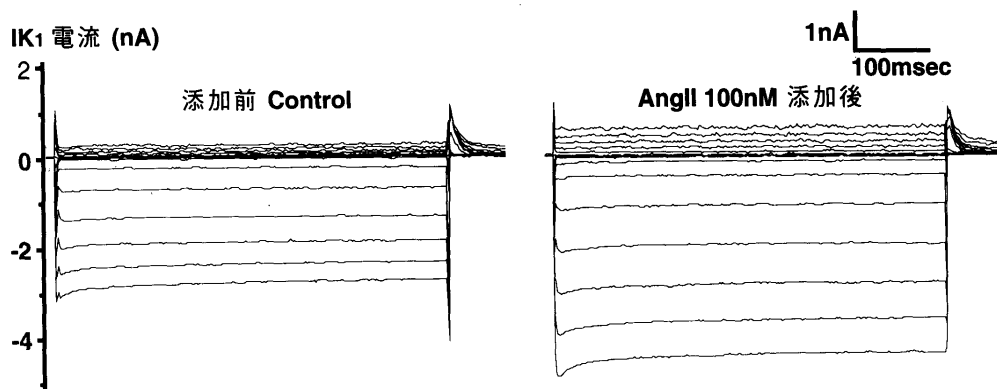


図3 Ang II 100 nM 添加前後の IK_1 実電流波形 whole cell voltage clamp 法で得られた Ang II 100 nM 添加前後での IK_1 実電流波形を示した。Ang II 添加前に対し Ang II 100 nM 添加後に IK_1 電流の増加が見られる。

IK_1 : Inward rectifier potassium channel

nM に希釈した AT_1R 拮抗薬 (CV 11974), または AT_2R 拮抗薬 (CGP 42112A) を細胞外に 15 分間灌流して前処理した。その後、それぞれの Ang II 受容体拮抗薬と同時に Ang II 100 nM を 15 分間灌流した。次に Ang II 受容体拮抗薬の灌流を中止し Ang II のみ 15 分間灌流した (図6-B)。

CV 11974, または CGP 42112A の前処理後の Ang II 添加前後の実電流波形をそれぞれ図7と図8に示す。CV 11974 を前処理した細胞では Ang II

の IK_1 電流増強作用はみられず, Ang II のみを灌流したのち、はじめて IK_1 電流の増強作用がみられた (図7)。一方, CGP 42112A を前処理した場合は, CGP 42112A と Ang II を同時に灌流しても Ang II の IK_1 電流増強作用は観察された。また CGP 42112A の灌流を中止する前後で IK_1 電流増強作用の変化はみられなかった (図8)。薬剤添加前から Ang II 単独, Ang II 添加前後での CV 11974 または CGP 42112A を前処理した際の平均の IK_1 電流の

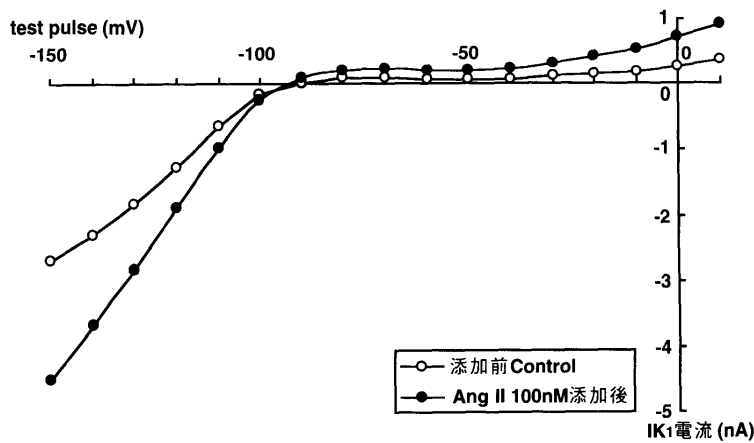


図4 Ang II 100 nM 添加前後での電流電圧曲線
標準のプロトコールで得られた図3で用いた細胞の電流電圧曲線をAng II 100 nM 添加前後で示す。Ang II 添加後、主に平衡電位よりも過分極側でIK₁ 電流の増加が見られる。

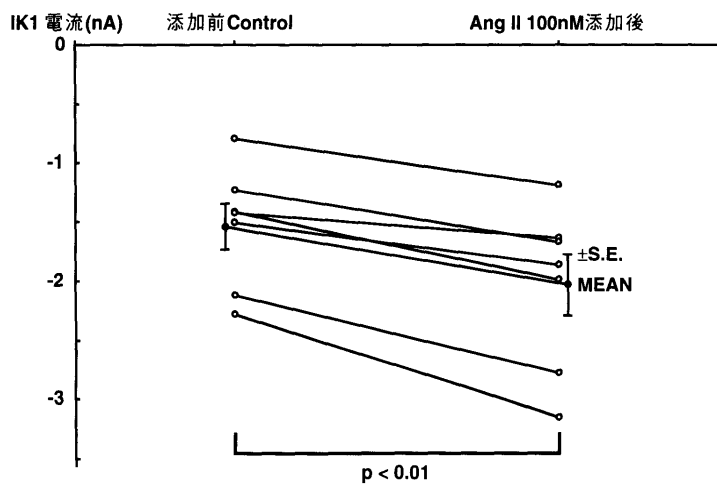


図5 Ang II 100 nM 添加前後でのIK₁ 電流の変化
-40 mV の保持電位から-120 mV に変化させてえられるAng II 100 nM を添加させる前後でのSteady stateにて計測したIK₁ 電流を示した。Ang II 添加後のIK₁ 電流は、添加前に比べ有意な増強を示した(p<0.01, N=7)。

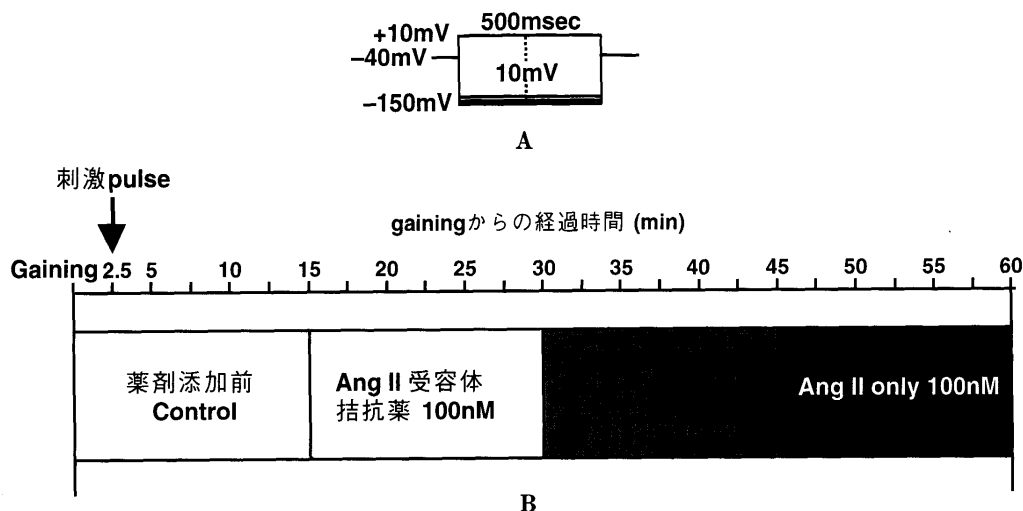


図6 刺激 pulse protocol と Ang II 受容体拮抗薬-Ang II の添加法

図6-A 刺激 pulse protocol

図6-B Ang II 受容体拮抗薬 (type 1: CV 11974, type 2: CGP 42112A)-Ang II の添加法

Controlを15分間記録したのちに、細胞外にAng II 受容体拮抗薬 (type 1もしくはtype 2) 100 nM を灌流し15分間記録した。さらに細胞外にAng II 100 nM も同時に灌流し15分間追加記録した。その後Ang II 受容体拮抗薬の灌流を中止し細胞外にはAng II のみとし15分間記録した。

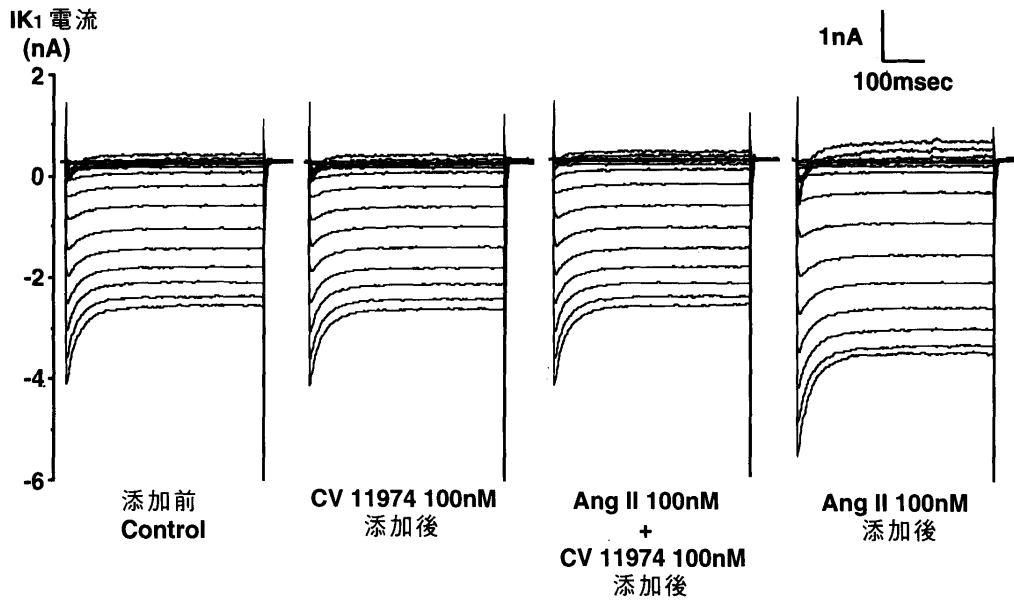


図7 AT₁R拮抗薬 (CV 11974) 前処理後の Ang II 添加前後の実電流波形
whole cell voltage clamp 法で得られた各条件下での IK₁ 実電流波形を示す。CV 11974 を前処理した後に CV 11974 と Ang II を同時に灌流した時は IK₁ 電流増強作用は認めず、その後 Ang II のみを灌流し、はじめて IK₁ 電流の増強作用がみられた。
AT₁R拮抗薬：Ang II type 1 受容体拮抗薬

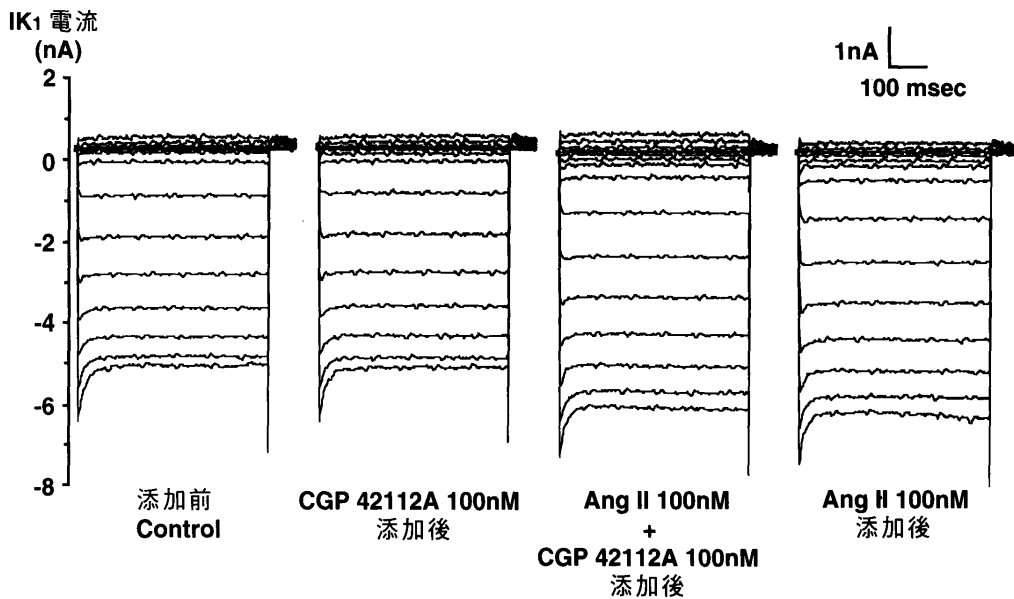


図8 AT₂R拮抗薬 (CGP 42112A) 前処理後の Ang II 添加前後の実電流波形
whole cell voltage clamp 法で得られた各条件下での IK₁ 実電流波形を示す。CGP 42112A を前処理した後に、CGP 42112A と Ang II を同時に灌流した時に IK₁ 電流増強作用が観察された。CGP 42112A の灌流中止後も IK₁ 電流増強作用は継続した。
AT₂R拮抗薬：Ang II type 2 受容体拮抗薬

変化(表1)と、添加前の IK₁ 電流を100%とした際の変化率を示す(図9)。

CV 11974 または CGP 42112A で前処理した際は

いずれも添加前と比べ有意な変化はなかった。薬剤添加前の Control に対して Ang II 100 nM のみを添加した時 (-1.54 ± 0.19 nA vs -2.04 ± 0.26 nA,

表1 薬剤添加前 (Control) と各条件下での平均の IK_1 電流の変化

前処理の種類	N	添加前 Control	Ang II 受容体拮抗薬 100 nM 前処理後	Ang II 受容体拮抗薬 と Ang II 各100 nM 添加後
前処理なし	7	-1.54 ± 0.20	—	$-2.04 \pm 0.26^*$
CV 11974	5	-3.12 ± 0.49	-3.08 ± 0.48	-3.00 ± 0.46
CGP 42112A	5	-2.70 ± 0.50	-2.69 ± 0.48	$-3.55 \pm 0.65^*$

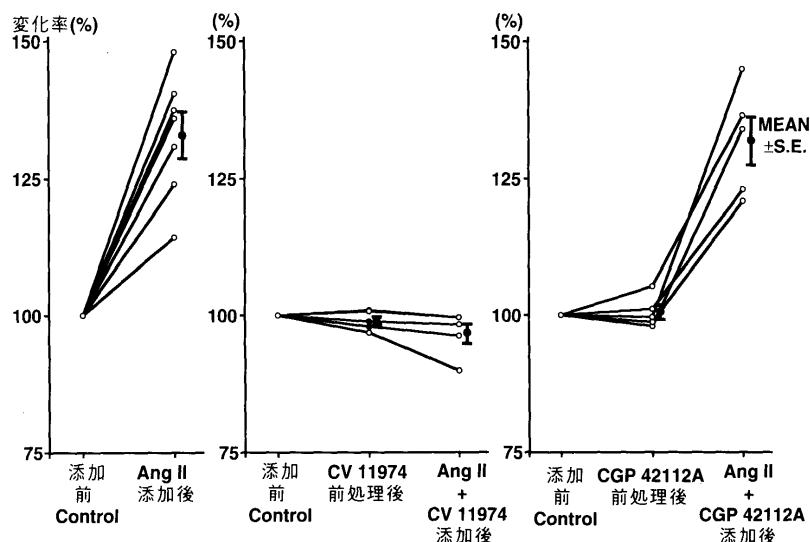
(MEAN \pm S.E., 添加前と比較して * $p < 0.01$)

図9

薬剤添加前 (Control) からの各条件下での IK_1 電流の変化率。薬剤を添加する前の Control 時の IK_1 電流を100%とした際の各条件下での IK_1 電流の変化率を示す。CV 11974・CGP 42112A 前処理のみでは添加前と変化はなかった。Ang II のみを添加した時と同様の IK_1 電流の増強作用は、CGP 42112A と Ang II を同時に添加した際にのみみられた。

N=7, $p < 0.01$)と同様に、CGP 42112A 前処理後の CGP 42112A と Ang II の同時に添加した際 (-2.70 ± 0.50 nA vs -3.55 ± 0.65 nA, N=5, $p < 0.01$)に IK_1 電流の有意な増強が見られた (Control に対して $133.1 \pm 4.2\%$ vs $132.0 \pm 4.5\%$)。しかし CV 11974 前処理後の CV 11974 と Ang II を同時に添加した際 (-3.12 ± 0.49 nA vs -3.00 ± 0.46 nA)は IK_1 電流に有意な変化は認めなかった (Control に対して $96.7 \pm 1.8\%$)。

考 察

本研究において、Ang II はラット心室筋細胞の IK_1 電流を増加させること、さらにその効果が AT_1R 拮抗薬の前処理で消失し AT_2R 拮抗薬の前処理では影響を受けないことから、その発現経路において AT_1R が関与していることが明らかとなった。

今回我々のラット心室筋細胞を用いた実験で、Ang II 100 nM 細胞外添加にて有意に IK_1 電流は増強し ($p < 0.01$)、静止膜電位は過分極になる傾向が認められた。これは Marakas ら¹⁹ や Bashir ら²⁰ の述べた ACE-I で QT 間隔が有意に延長させるとした報告に一致する。さらに Morita ら⁸ のウサギ心

室筋細胞における Ang II による IK_1 電流の変化と同様の結果であったが、ラット心室筋細胞 (Ang II; 100 nM)の方がウサギ (Ang II; 1 μ M)より、より低濃度で IK_1 の増強作用が認められた。これらの差異は種差による心室筋細胞における Ang II 受容体の密度の問題や、 AT_1R と AT_2R の比率の問題が考えられる。Chang と Lotti²³によれば、心室筋における AT_1R と AT_2R の比率は、ラットが AT_1R が90%以上、 AT_2R は10%以下とされている。一方、ウサギでは AT_1R が64%に対して AT_2R は32%とされており、いずれも AT_1R が優位であるがラットの方がより AT_1R の占める割合が高い。このため低濃度の Ang II で IK_1 の増強作用が認められた可能性がある。

さらに Ang II 受容体拮抗薬の臨床使用における大きな課題として、Ang II 受容体の一方のみをブロックすることにより血中の Ang II レベルが上昇し^{24,25,26}、ブロックされていないもう一方の receptor への刺激が亢進する可能性が指摘されている。このため今回の実験でのラット心室筋細胞における Ang II の IK_1 電流増強作用が AT_1R 、あるいは AT_2R の単独の receptor を介する効果か、もしくは

2つの receptor が互いに拮抗する作用を有し、両者を加算した効果であるかを認識するため、AT₁R拮抗薬とAT₂R拮抗薬で前処理したのちAng IIをそれぞれのAng II受容体拮抗薬と同時に灌流した。その結果AT₂R拮抗薬で前処理した細胞ではAng II単独の際と同様の変化を示したが、AT₁R拮抗薬で前処理した細胞ではAng IIの効果は認められなかった。以上より先に確認されたAng IIのラット心室筋IK₁電流増強作用がAT₁Rのみを介する効果であることがはじめて明らかになった。

現在までにAng IIのイオンチャネルに対する制御は、いくつかの系でAT₁RとAT₂Rが互いに拮抗する働きを有することが示されている^{30,31}が、今回の実験ではAT₂RのAT₁Rの効果に拮抗するような作用は認めなかった。この理由として、各細胞におけるAT₁RとAT₂Rの存在比率の差異が考えられる。今回の実験で用いたラット心室筋では存在比率はAT₁Rが90%以上に対して、AT₂Rは10%以下とされておりAT₁R優位である²³。このため本実験においてはAng IIのAT₁Rを介するIK₁電流増強作用は確認されたものの、AT₂Rを介するIK₁への作用は認められなかった可能性は否定できない。

本研究により、ラット心室筋細胞においてAng IIがIK₁を活性化させること、さらにその作用がAT₁Rを介するものであることが解明された。ACE-IやAng II受容体拮抗薬の抗不整脈作用を解析する上で重要な所見を提案したと考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を遂行するにあたり終始ご協力をいただいた佐藤良一先生、伊澤弘先生、片山克彦先生をはじめ教室の諸先生方に心から感謝いたします。

本論文の要旨は、第15回日本心電学会学術集会(1998年10月鹿児島)で発表した。

文 献

- Dzau VJ. (1988) Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 77 (Suppl I): 4-13
- Gelband CH, Hume JR (1995) [Ca²⁺] i inhibition of K⁺ channels in canine renal artery. novel mechanism for agonist-induced membrane depolarization. *Circ Res* 77: 121-130
- Habuchi Y, Lu L-L, Morikawa J, Yoshimura M (1995) Angiotensin II inhibition of L-type Ca²⁺ current in sinoatrial node cells of rabbits. *Am J Physiol* 268: H1053-H1060
- Bescond J, Bois P, Petit-Jacques J, Lenfant J (1994) Characterization of an angiotensin-II-activated chloride current in rabbit sino-atrial cells. *J Membr Biol* 140: 153-161
- Kanazirska MV, Vassilev PM, Quinn SJ, Tillotson DL, Williams GH (1992) Single K⁺ channels in adrenal zona glomerulosa cells. II. inhibition by angiotensin II. *Am J Physiol* 263: E760-E765
- Hoyer J, Popp R, Meyer J, Galla H-J, Gögelein H (1991) Angiotensin II, vasopressin and GTP [γ -S] inhibit inward-rectifying K⁺ channels in porcine cerebral capillary endothelial cells. *J Membr Biol* 123: 55-62.
- Nilius B, Tytgat J, Albitz R (1989) Modulation of cardiac Na channels by angiotensin II. *Biochim Biophys Acta* 1014: 259-262
- Morita H, Kimura J, Endoh M. (1995) Angiotensin II activation of a chloride current in rabbit cardiac myocytes. *J Physiol (Lond)* 483: 119-130
- Daleau P, Turgeon J (1994) Angiotensin II modulates the delayed rectifier potassium current of guinea pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 427: 553-555
- de Langen CDJ, de Graeff PA, van Gilst WH, Bel KJ, Kingma JH, Wesseling H (1989) Effects of angiotensin II and captopril on inducible sustained ventricular tachycardia two weeks after myocardial infarction in the pig. *J Cardiovasc Pharmacol* 13: 186-191
- Westlin W, Mullane K (1988) Does captopril attenuate reperfusion-induced myocardial dysfunction by scavenging free radicals? *Circulation* 77 (suppl I): 30-39
- Linz W, Schölkens BA, Han Y-F (1986) Beneficial effects of the converting enzyme inhibitor, ramipril, in ischemic rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 8 (suppl X): S91-S99
- Cleland JGF, Dargie HJ, Hodsman GP, Ball SG, Robertson JIS, Morton JJ, East BW, Robertson I, Murray GD, Gillen G (1984) Captopril in heart failure. a double blind controlled trial. *Br Heart J* 52: 530-535
- Fletcher RD, Cintron GB, Johnson G, Orndorff J, Carson P, Cohn JN (1993) Enalapril decreases prevalence of ventricular tachycardia in patients with chronic congestive heart failure. *Circulation* 87 (suppl. VI): 49-55
- Cohn JN, Johnson G, Ziesche S, Cobb F, Francis G, Tristani F, Smith R, Dunkman WB, Loeb H, Wong M, Bhat G, Goldman S, Fletcher RD, Doherty J, Hughes CV, Carson P, Cintron G, Shabetai R, Haakenson C (1991) A comparison of enalapril with hydralazine-isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 325: 303-310
- Kohya T, Yokoshiki H, Tohse N, Kanno M, Nakaya H, Saito H, Kitabatake A (1995) Regression of left ventricular hypertrophy prevents ischemia-induced lethal arrhythmias. beneficial effect of angiotensin II blockade. *Circ Res* 76: 892-899
- Matsuo K, Kumagai K, Annoura M, Yamanouchi Y, Handa K, Nakashima Y, Hiroki T, Arakawa K (1997) Effects of an angiotensin II antagonist on reperfusion arrhythmias in dogs. *PACE* 20: 938-945

18. Lee Y-M, Peng Y-Y, Ding Y-A, Yen M-H (1997) Losartan attenuates myocardial ischemia-induced ventricular arrhythmias and reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 10: 852-858
19. Marakas SA, Kyriakidis MK, Vourlioti AN, Petropoulakis PN, Toutouzas PK (1995) Acute effect of captopril administration on baroreflex sensitivity in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 16: 914-921
20. Bashir Y, Sneddon JF, O'Nunain S, Paul VE, Gibson S, Ward DE, Camm AJ (1992) Comparative electrophysiological effects of captopril or hydralazine combined with nitrate in patients with left ventricular dysfunction and inducible ventricular tachycardia. *Br Heart J* 67: 355-360
21. Whitebread S, Mele M, Kamber B, de Gasparo M (1989) Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 163: 284-291
22. Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL, Timmermans PBMWM (1989) Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 165: 196-203
23. Chang RSL, Lotti VJ (1991) Angiotensin receptor subtypes in rat, rabbit, and monkey tissues. relative distribution and species dependency. *Life Sci* 49: 1485-1490
24. Munafo A, Christen Y, Nussberger J, Shum LY, Borland RM, Lee RJ, Waeber B, Biollaz J, Brunner HR (1992) Drug concentration response relationships in normal volunteers after oral administration of losartan, an angiotensin II receptor antagonist. *Clin Pharmacol Ther* 51: 513-521
25. Ohtawa M, Takayama F, Saitoh K, Yoshinaga T, Nakashima M (1993) Pharmacokinetics and biochemical efficacy after single and multiple oral administration of losartan, an orally active nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, in humans. *Br J Clin Pharmacol* 35: 290-297
26. Goldberg MR, Tanaka W, Barchowsky A, Bradstreet TE, McCrea J, Lo M-W, McWilliams Jr EJ, Bjornsson TD (1993) Effects of losartan on blood pressure, plasma renin activity, and angiotensin II in volunteers. *Hypertension* 21: 704-713
27. Burnier M, Waeber B, Brunner HR (1994) Clinical application of treatment with angiotensin receptor antagonists, In: Saavedra JM, Timmermans PBMWM (eds) *Angiotensin Receptors*, Vol 20. New York, Plenum Press, pp 363-376
28. Isenberg G, Klockner U (1982) Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a KB medium. *Pflügers Arch* 395: 6-18
29. Powell T, Terrar DA, Twist VW (1980) Electrical properties of individual cells isolated from adult rat ventricular myocardium. *J Physiol (Lond)* 302: 131-153
30. Kang J, Sumners C, Posner P (1992) Modulation of net outward current in cultured neurons by angiotensin II. involvement of AT₁ and AT₂ receptors. *Brain Res* 580: 317-324
31. Gelband CH, Zhu M, Lu D, Reagan LP, Fluharty SJ, Posner P, Raizada MK, Sumners C (1997) Functional interactions between neuronal AT₁ and AT₂ receptors. *Endocrinology* 138: 2195-2198