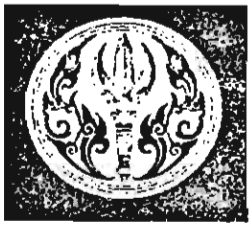
รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ศึกษาผลของ Angiotensin II โดยทำงานผ่าน AT_1 receptors ต่อการเกิด apoptosis ในระบบนำสัญญาณไฟฟ้าของหัวใจของหนูขาว

โดย ดร.อุราพร วงศ์วัชรานนท์ และ คณะ ฯ

วันที่ 31 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2547



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ศึกษาผลของ Angiotensin II โดยทำงานผ่าน AT_1 receptors ต่อการเกิด apoptosis ในระบบนำสัญญาณไฟฟ้าของหัวใจของหนูขาว

โดย ดร.อุราพร วงศ์วัชรานนท์ และ คณะ ฯ

วันที่ 31 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2547

สัญญาเลขที่ MRG4580038

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ศึกษาผลของ Angiotensin II โดยทำงานผ่าน AT_1 receptors ต่อการเกิด apoptosis ในระบบนำสัญญาณไฟฟ้าของหัวใจของหนูขาว

คณะผู้วิจัย

1. ดร.อุราพร วงศ์วัชรานนท์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. นพ.ทพ. สุรพงษ์ วงศ์วัชรานนท์ โรงพยาบาลทันตกรรม ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
3. ศ. ดร. ประเสริฐ โศภณ มหิดล ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย
4. Dr. Terry Parker School of Biomedical science, Nottingham University, UK
5. นาง พรพิมล คีรีรัตน์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
6. ดร. นิชาอูดะห์ ระเด่นอาหมัด ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
7. น.ส. ประนอม อินทสโร ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดยทบวงมหาวิทยาลัย และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ทบวงฯ และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง ศึกษาผลของ Angiotensin II โดยทำงานผ่าน AT_1 receptors ต่อการเกิด apoptosis .นระบบนำสัญญาณไฟฟ้าของหัวใจของหนูขาว ได้รับทุนสนับสนุนจาก ทบวงมหาวิทยาลัย และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ Professor Sheila Gardiner และ Professor Terry Benet มหาวิทยาลัย Nottingham ประเทศอังกฤษ สำหรับหนู transgenic (mRen-2)27 และ หนู Sprague Dawley

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG4580038

ชื่อโครงการ : ศึกษาผลของ Angiotensin II โดยทำงานผ่าน AT_1 receptors ต่อการเกิด apoptosis ในระบบนำสัญญาณไฟฟ้าของหัวใจของหนูขาว

ชื่อนักวิจัย : ดร.อุราพร วงศ์วัชรานนท์ และ คณะ ฯ
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

E-mail Address : vuraporn@ratree.psu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 1 ปี 6 เดือน

วัตถุประสงค์ : ศึกษาผลของ angiotensin II (Ang II) โดยการทำงานของ AT_1 receptors ในการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในระบบนำสัญญาณไฟฟ้าของหัวใจ (SA node และ AV node) โดยการศึกษาจำนวนของ apoptosis และปริมาณของ AT_1 receptors ในหนู m(Ren-2)27 transgenic rat (TG) เปรียบเทียบกับหนูสายพันธุ์ Hanover Sprague Dawley ที่ไม่ได้มีการสอดแทรกยีน (SD)

วิธีทดลอง: นำหัวใจหนูที่มีอายุ 2 วัน 1 สัปดาห์ และ 2 สัปดาห์ กลุ่มอายุละ 6 หัวใจ ทั้งกลุ่ม TG และ SD มาผ่านขบวนการ wax embedding และตัดเป็นแผ่นบาง 5 ไมครอน หลังจากนั้นนำมาย้อมด้วย Masson Trichrome เพื่อชี้แสดง SA และ AV node นำ section ที่มี SA หรือ AV node มาหาปริมาณ apoptotic nuclei และหาปริมาณของ AT_1 receptors โดยการใช้เทคนิค immunocytochemistry

ผลการทดลอง

1. พบ apoptotic nuclei ทั้งใน SA และ AV node โดยมีจำนวนลดลงเมื่อหนูมีอายุมากขึ้นทั้ง 2 บริเวณ และพบว่ากลุ่ม TG มีจำนวน apoptotic nuclei มากกว่า กลุ่ม SD อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละช่วงอายุ
2. สำหรับปริมาณ AT_1 receptors ต่อพื้นที่ ใน SA node มีจำนวนลดลงเมื่อเมื่อหนูมีอายุมากขึ้นขณะที่ใน AV node กลับมีจำนวนมากขึ้น และพบว่ากลุ่ม TG มีปริมาณของ AT_1 receptors ต่อพื้นที่มากกว่ากลุ่ม SD ในทั้ง 2 บริเวณ อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละช่วงอายุ

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลองและข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ในหนูกลุ่ม TG ซึ่งถูกสอดแทรกยีน renin ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของ local renin-angiotensin system จึงพบปริมาณของ AT_1 receptors ต่อพื้นที่ รวมถึงมีจำนวน apoptotic nuclei มากกว่ากลุ่ม SD แต่เนื่องจากพบ apoptosis ลดลงเมื่อหนูอายุมากขึ้น จึงไม่อธิบายการเกิด arrhythmia ในผู้ใหญ่ด้วยแนวคิดของ apoptosis แต่สามารถอธิบายได้จากการทำงานผ่าน AT_1 receptors โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การที่พบ AT_1 receptors ที่ AV node มากกว่าที่ SA node เมื่อหนูมีอายุมากขึ้น ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการอธิบายสาเหตุรวมถึงแนวการรักษาภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะที่สัมพันธ์กับความดันโลหิตสูงได้

คำหลัก : Angiotensin II, apoptosis, conduction system, AT_1 receptor

Abstract

Project Code : MRG4580037

Project Title : Effect of Angiotensin II via AT_1 receptor on mediating apoptosis in the rat cardiac conduction system

Investigator : Dr.Uraporn Vongvatcharanon et al,

Department of Anatomy, Faculty of Science,Prince of Songkla University

E-mail Address : vuraporn@ratree.psu.ac.th

Project Period : 1 year and 6 months

Aim : This research aims to study the effect of angiotensin II (Ang II) via the AT_1 receptors on mediating apoptosis in a cardiac conduction system (SA node และ AV nodes) and is performed by quantitation of the apoptosis and AT_1 receptors in m(Ren-2)27 transgenic rat. The results will be compared with those of the age-matched Sprague Dawley rat which has no Ren-2 gene (SD).

Methodology : Hearts from six male 2-days, 1 week and 2 week TG and SD rats were processed for wax embedding and 5 micron serial sections were cut, after which, the sections were stained with Masson Trichrome to localize SA and AV nodes. The sections containing SA or AV node were processed for quantitation of apoptotic nuclei and AT_1 receptors by using immunocytochemical technique.

Results:

1. The number of apoptotic nuclei/mm^2 in the SA and AV nodes were found to decrease from 2 days to 2 weeks in both the TG and the SD rats, and the number of apoptotic nuclei/mm^2 in the TG was significantly more than that of the SD in all age groups ($p<0.05$).
2. The number of AT_1 receptors/mm^2 in the SA node were found to decreased from 2 days to 2 weeks whereas the number of AT_1 receptors/mm^2 in the AV node was increased from 2 days to 2 weeks in both the TG and the SD rats, and the number of AT_1 receptors/mm^2 in the TG was significantly more than that of the SD in all age groups ($p<0.05$).

Discussion and Conclusion: As a consequence of the additional renin gene in TG rats which results in the alteration of the local renin-angiotensin system, the number of AT_1 receptors/mm^2 and apoptotic nuclei/mm^2 are increased. The number of apoptotic nuclei/mm^2 is decreased in aging rat, therefore,the apoptosis may not be used to explain the cause of the arrhythmia in the aging patient. However, the number of AT_1 receptors in the AV node which is more than the SA node in aging rat, could be used to explain pathology of arrhythmia associated with hypertension.

Key words : Angiotensin II, apoptosis, conduction system, AT_1 receptor.

เนื้อหางานวิจัย

บทนำ

การทำงานของหัวใจต้องอาศัยระบบนำสัญญาณไฟฟ้า (conduction system) เพื่อส่งผ่านสัญญาณไฟฟ้า ทำให้มีการเต้นของหัวใจ ความผิดปกติของระบบนำสัญญาณไฟฟ้า มีผลทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ของหัวใจ เช่น ภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะ (arrhythmia), ภาวะกีดกันเอวี (A-V) block หรือ complete heart block ซึ่งอาจทำให้เกิดการเสียชีวิตอย่างเฉียบพลับ (sudden death) โดยพบทั้งในทารก (James *et al*, 1996[a]) และในผู้ใหญ่ (Jame *et al*, 1996[b]) จากการศึกษาเกี่ยวกับสาเหตุของความผิดปกติของระบบนำสัญญาณไฟฟ้าดังกล่าวพบว่า สาเหตุสำคัญเกิดจากความผิดปกติของพัฒนาการของระบบนำสัญญาณไฟฟ้า อาจจะทั้งก่อนหรือหลังคลอด (James *et al*, 1996[a], James *et al*, 1996[b] ; James *et al*. 1994) ในการพัฒนาการของทุกอวัยวะจะต้องอาศัย ความสมดุลย์ของการเกิด mitosis และ apoptosis ภาวะไม่สมดุลย์ของ mitosis และ apoptosis อาจทำให้เกิดการพัฒนาการที่ผิดปกติของอวัยวะนั้น ดังเช่นการพบการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของ conduction system ที่มีจำนวนมากผิดปกติเกิดขึ้นในทารกที่ไม่มี AV node, sinus node และ internodal pathways ซึ่งมีผลทำให้เกิดภาวะกีดกันเอวีอย่างสมบูรณ์ (complete heart block) และ ภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะ (fatal arrhythmia's) (James *et al*. 1996)

จากการศึกษาเรื่อง apoptosis ในหัวใจ โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจพบว่า hormone angiotensin II (Ang II) มีผลในการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ โดยทำงานผ่าน angiotensin II type I receptors (AT_1) (Kajstura *et al*, 1997 และ Cigola *et al*, 1997) แต่ยังไม่มีการศึกษาว่า Ang II โดยการทำงานของ AT_1 receptor มีบทบาทต่อการเกิด apoptosis ในระบบ conduction system ด้วยหรือไม่ แต่เนื่องจากการแยกเซลล์ของ conduction system แล้วนำมาเพาะเลี้ยงนั้นยังทำได้ยาก ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จะได้ศึกษาถึงผล Ang II โดยการทำงานของ AT_1 receptor ในการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในระบบนำสัญญาไฟฟ้าของหัวใจหลังคลอด โดยศึกษาปริมาณของ การตายของเซลล์แบบ apoptosis และปริมาณของ AT_1 receptors ในระบบนำสัญญาณไฟฟ้าของหัวใจ (SA node และ AV node) ในหนู m(Ren-2)27 transgenic rat (TG) ซึ่งเป็นหนูสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ถูกสอดแทรกยีน renin ผลของการสอดแทรกยีน renin ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ local renin-angiotensin system เพียงอย่างเดียว โดยมีผลทำให้ระดับของ tissue Ang II ในอวัยวะต่าง ๆ เพิ่มขึ้น เช่น ต่อมหมวกไต สมอง และโดยเฉพาะหัวใจ (Mullins *et al*, 1996; Campbell *et al*, 1995) ซึ่งปริมาณของ Ang II ในหัวใจที่เพิ่มขึ้นอาจจะมีผลทำให้ปริมาณการตายของเซลล์แบบ apoptosis ใน conduction system เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับหนูสายพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้มีการสอดแทรกยีน โดยศึกษาภายหลังคลอด เนื่องจากช่วงเวลา 2-3 อาทิตย์ภายหลังคลอดเป็นช่วงเวลาสำคัญของขบวนการ morphogenesis ของ conduction system (James, 1994) คาดว่าข้อมูลจากการวิจัยจะเป็นความรู้พื้นฐาน ในการอธิบายถึงสาเหตุและพยาธิสภาพของการเกิดความผิดปกติ ของระบบการนำสัญญาณไฟฟ้าของหัวใจ และเป็นข้อมูลที่อาจจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกัน หรือรักษาผู้ป่วยด้วยโรคที่เกิดจากความผิดปกติของระบบการนำไฟฟ้าในหัวใจได้

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาว่า ฮอร์โมน Angiotensin II โดยการทำงานผ่าน AT_1 receptors มีส่วนในการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์ของ conduction system หรือไม่ โดย

- ศึกษาประมาณการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของเซลล์ในระบบ นำสัญญาณไฟฟ้า (SA node และ AV node) ในหัวใจของหนู *m(Ren-2)27* transgenic rat ซึ่งเป็นหนูสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ถูกสอดแทรกยีน renin เปรียบเทียบกับหนูสายพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้มีการสอดแทรกยีน ที่มีอายุเท่ากัน
- ศึกษาปริมาณ AT_1 receptor ของเซลล์ในระบบนำสัญญาณไฟฟ้า (SA node และ AV node) ในหัวใจของหนู *m(Ren-2)27* transgenic rat เปรียบเทียบกับหนูสายพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้มีการสอดแทรกยีน ที่มีอายุเท่ากัน

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

นำหนู *m(Ren-2)27* transgenic rat (TG) ซึ่งเป็นหนูสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ถูกสอดแทรกยีน renin ที่มีอายุ 2 วัน, 1 สัปดาห์ และ 2 สัปดาห์ หลังคลอด และหนู Sprague Dawley ที่ไม่ได้รับการสอดแทรกยีน (SD) ที่อายุเท่ากัน กลุ่มละ 6 ตัว (รวมทั้งหมด 36 หัวใจ) มาทำให้สลบโดยการฉีดด้วย pentobarbiton sodium (100 mg/kg) เข้าทางหน้าท้อง จากนั้นเปิดช่องอกเพื่อนำหัวใจออกมา แล้วแช่น้ำยา 10% formalin อย่างน้อย 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำหัวใจหนูมาผ่านขบวนการ Tissue processing for Wax embedding แล้วตัด serial sections หนา 5 μm ทั้งหัวใจ และ mount sections บน TESPA coated glass slide (5 sections ต่อ 1 slide)

หมายเหตุ หนู SD และ TG ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Terry Bennett และ Prof. Sheila Gardiner Nottingham University, Nottingham UK.

2. ชี้แสดงตำแหน่งของ Conduction system (SA node และ AV node) โดยสุ่มเลือก sections (screening sample) มาย้อมด้วย Masson Trichrome เพื่อชี้แสดงว่า section ใดมี SA node หรือ AV node

3. ศึกษาปริมาณของเซลล์ของ conduction system ที่มีการตายแบบ apoptosis

3.1 เลือก section มาจำนวน ½ ของจำนวน section ทั้งหมดของแต่ละหัวใจที่มี SA node หรือ AV node โดยเลือก 1 slide เว้น 1 slide ทำเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ (อีก ½ ของจำนวน section ทั้งหมดใช้สำหรับศึกษาปริมาณของ AT_1 receptors) จากนั้นชี้แสดงเซลล์ของ conduction system ที่เกิดการตายแบบ apoptosis โดยใช้วิธีการที่เรียกว่า TUNEL Technique (TdT-mediated DUTP-biotin nick end labeling) (Sarraste and Pulkki, 2000; Yaoita *et al.*, 1992; James, 1998) โดยใช้ Fluorescein-FragEL TM kit แล้วนับจำนวนของเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis โดยนับเฉพาะ section ที่ 1 ของแต่ละ slide และหาปริมาณพื้นที่ของ AV node หรือ SA node โดยใช้โปรแกรม Microimage analysis (Olympus)

Number of labeled nuclei per unit area = $\frac{\text{Number of apoptotic nuclei}}{\text{Area of sections examined}}$

3.2 เปรียบเทียบปริมาณของเซลล์ของ conduction system ที่เกิดจากการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของ TG และ SD ที่อายุเท่ากัน โดยใช้ทางสถิติ unpaired T test

4. ศึกษาปริมาณของ AT_1 receptors บนเซลล์ของ conduction system โดย

4.1 นำ slide ที่อยู่ถัดจาก slide ที่มี sections ที่ใช้ย้อมปริมาณ apoptosis ทั้งหมดมาย้อมหาปริมาณของ AT_1 receptors (โดยใช้วิธี immunohistochemistry technique และใช้ AT_1 receptors antibody (polyclonal rabbit anti AT_1 receptors) (Timmermans *et al*, 1993, Murphy *et al*, 1991. Marrero *et al*, 1995) ดูด้วยกล้อง confocal laser scanning

4.2 หาปริมาณของ AT_1 receptor บนเซลล์ของ conduction system ใน TG และ SD โดยนับจำนวน AT_1 receptor โดยนับเฉพาะ section ที่ 1 ของแต่ละ slide และหาพื้นที่ของ AV node หรือ SA node โดยใช้โปรแกรม Microimage analysis (Olympus)

Number of AT_1 receptor per unit area = $\frac{\text{Number of } AT_1 \text{ receptor}}{\text{Area of sections examined}}$

4.3 เปรียบเทียบปริมาณของ AT_1 receptor บนเซลล์ของ conduction system ใน TG และ SD ที่มีอายุเท่ากัน โดยใช้วิธีทางสถิติ unpaired T test

ผลการทดลอง

1.การชี้แสดงตำแหน่งของ conduction system (SA node และ AV node)

sections บางส่วนที่ถูกเลือกมาย้อมด้วย Masson Trichrome เพื่อชี้แสดงตำแหน่งของ conduction system (SA node และ AV node) พบว่า

Sinoatrial node (SA) จะพบบริเวณรอยต่อระหว่างหลอดเลือด superior vena cava (SVC) และหัวใจห้องบนขวา (RA) มีลักษณะเป็นก้อนคล้ายกระสวยยาว ประกอบด้วยกล้ามเนื้อที่ดัดแปลงไปจากเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ โดยจะมีขนาดของเซลล์ เล็กกว่า และมีจำนวน myofibril ใน cytoplasm น้อยกว่า จึงทำให้ cytoplasm ของเซลล์มีลักษณะใส (รูปที่ 1A-F) ภายใน SA node มีหลอดเลือดมาเลี้ยง ชื่อ nodal artery

Atrioventricular node (AV node) มีลักษณะเป็นก้อนกลมหรือรี พบที่ส่วนล่างของผนังกั้นระหว่างหัวใจห้องบนทั้ง 2 ห้อง (interatrium septum) และขอบบนของผนังกั้นระหว่างหัวใจห้องล่างทั้ง 2 ห้อง (interventricular septum) เซลล์ของ AV node มีขนาดของเซลล์ ขนาดเล็กกว่าเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโดยทั่วไป และมีจำนวน myofibril ใน cytoplasm น้อยกว่า จึงทำให้ cytoplasm ของเซลล์มีลักษณะใสซึ่งเป็นลักษณะเช่นเดียวกับที่พบภายใน SA node (รูปที่ 2A-F)

2. การชี้แสดงเซลล์ของ conduction system ที่เกิดการตายแบบ apoptosis

ชี้แสดงเซลล์ของ conduction system ที่เกิดการตายแบบ apoptosis ใน TG และ SD โดยใช้วิธีการที่เรียกว่า TUNET Technique (TdT-mediated DUTP – biotin nick end labeling) ถ่ายรูปเซลล์ที่เกิดการตายของเซลล์ แบบ apoptosis โดยใช้กล้อง fluorescence ร่วมกับ digital camera DP50 (Olympus) ซึ่งโดยหลักการทางการย้อมด้วย Fluorescent FragEL™ Kit นี้ Fluorescent FragEL™ TdT Labeling จะจับกับ 3'-OH ของสาย DNA fragment โดยอาศัยการทำงานของ terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme ดังนั้นเมื่อดูด้วยกล้อง fluorescence จะเห็นนิวเคลียสของเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis มีสีเขียวอมเหลืองสว่างจ้า และนิวเคลียสมีขนาดเล็กลง (รูปที่ 3a-f และ 4a-f) อาจจะมองเห็นการขดกันแน่นเป็นก้อนของ (chromatin condensation) พบ apoptotic nuclei กระจายอยู่ภายใน SA node และ AV node ของ SD และ TG ทุกช่วงอายุ (รูปที่ 3A-Fและ4A-F)

3. การศึกษาปริมาณของเซลล์ของ conduction system ที่เกิดการตายแบบ apoptosis

3.1 การศึกษาปริมาณของเซลล์ของ conduction system ที่เกิดการตายแบบ apoptosis ภายใน SA node

พบว่าจำนวนของ apoptotic nuclei/mm^2 ในหนู TG อายุ 2 วัน (1.48$\pm$0.75 cell/mm^2), 1 สัปดาห์ (0.66$\pm$0.33 cell/mm^2) และ 2 สัปดาห์ (0.13$\pm$0.07 cell/mm^2) มากกว่าหนู SD ในช่วงอายุเดียวกัน (2 วัน= 0.77$\pm$0.60 cell/mm^2 , 1 อาทิตย์ = 0.14$\pm$0.22

cell/mm^2, 2 อาทิตย์ = 0.04±0.07 cell/mm^2) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) นอกจากนี้จำนวนของ apoptotic nuclei ของหนู TG และ SD ลดลงเมื่อหนูมีอายุมากขึ้น (รูปที่ 5)

3.2 การศึกษาปริมาณของเซลล์ของ conduction system ที่เกิดการตายแบบ apoptosis ภายใน AV node

พบว่าจำนวนของ apoptotic nuclei/mm^2 ในหนู TG อายุ 2 วัน (5.27±2.60 cell/mm^2), 1 สัปดาห์ (2.23±0.08 cell/mm^2) และ 2 สัปดาห์ (0.43±0.11 cell/mm^2) มากกว่าหนู SD ในช่วงอายุเดียวกัน 2 วัน (2.68±2.96 cell/mm^2), 1 สัปดาห์ (0.26±0.4 cell/mm^2) และ 2 สัปดาห์ (0.16±0.12 cell/mm^2) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (รูปที่ 6) นอกจากนี้จำนวนของ apoptotic/mm^2 ทั้งหนู TG และ SD ลดลงเมื่อหนูมีอายุมากขึ้น

4. การศึกษาปริมาณ AT_1 receptors ภายใน SA node และ AV node

4.1 ผลการย้อมโดยใช้ Immunocytochemistry technique ร่วมการใช้ AT_1 receptor antibody และดูด้วยกล้อง confocal laser scanning

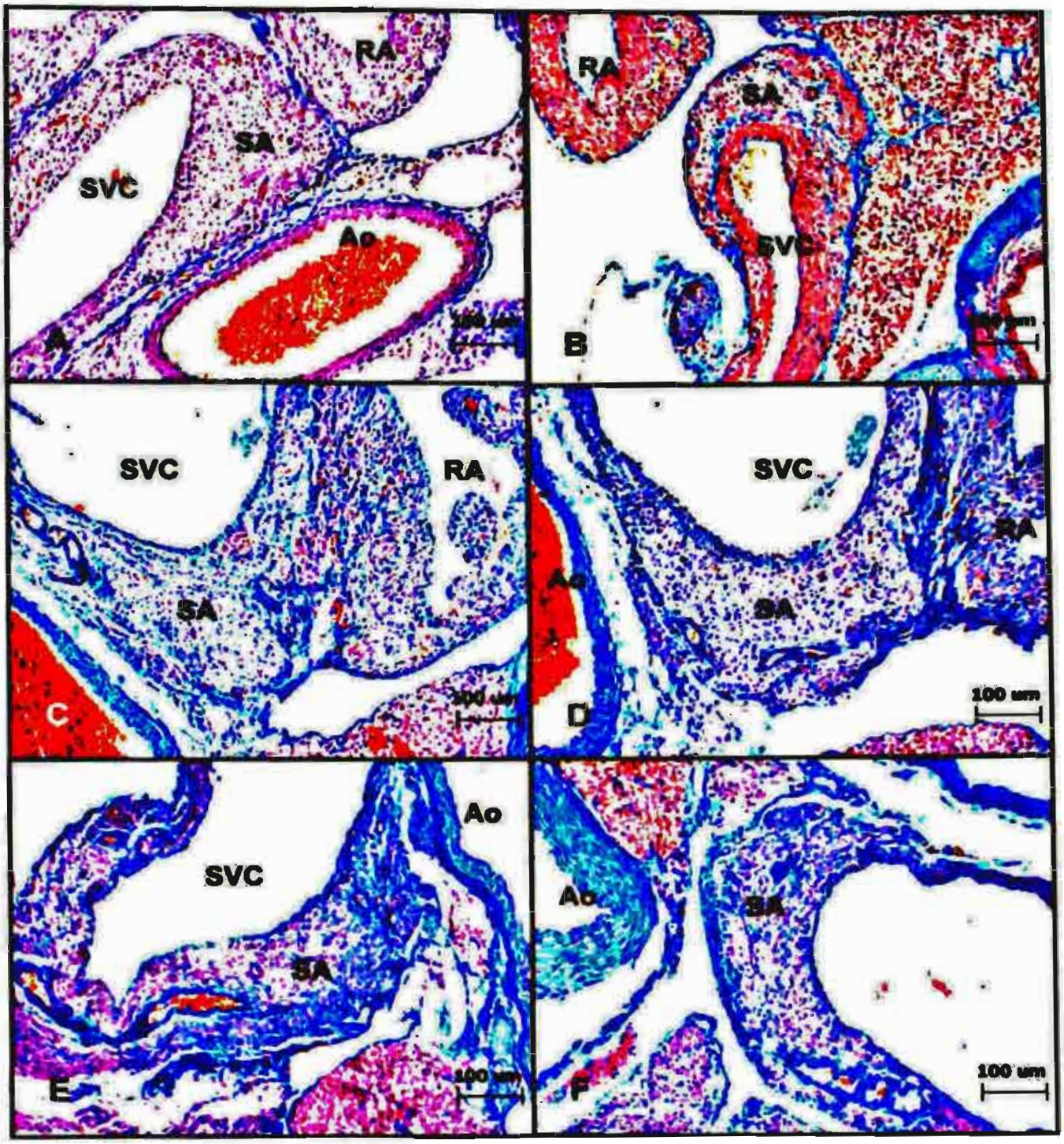
พบว่า AT_1 receptors มีลักษณะเป็นจุดสว่างสีเขียวอ่อนกระจายอยู่ทั่วไปทั้งภายใน SA node และ AV node (รูปที่ 7a-f และ 8 a-f) หนู SD และ TG อายุ 2 วัน AT_1 receptors ภายใน SA node กระจายอยู่อย่างหนาแน่นและมีปริมาณลดลงเมื่อมีอายุมากขึ้น (รูปที่ 7 A-F) ในขณะที่ภายใน AV node หนู SD และ TG อายุ 2 วัน มี AT_1 receptors กระจายอยู่ในปริมาณน้อย และมีจำนวนมากขึ้นเมื่อหนูมีอายุมากขึ้น (รูปที่ 8 A-F)

4.2 ผลการศึกษาปริมาณ AT_1 receptors ต่อพื้นที่ (mm^2) ภายใน SA node

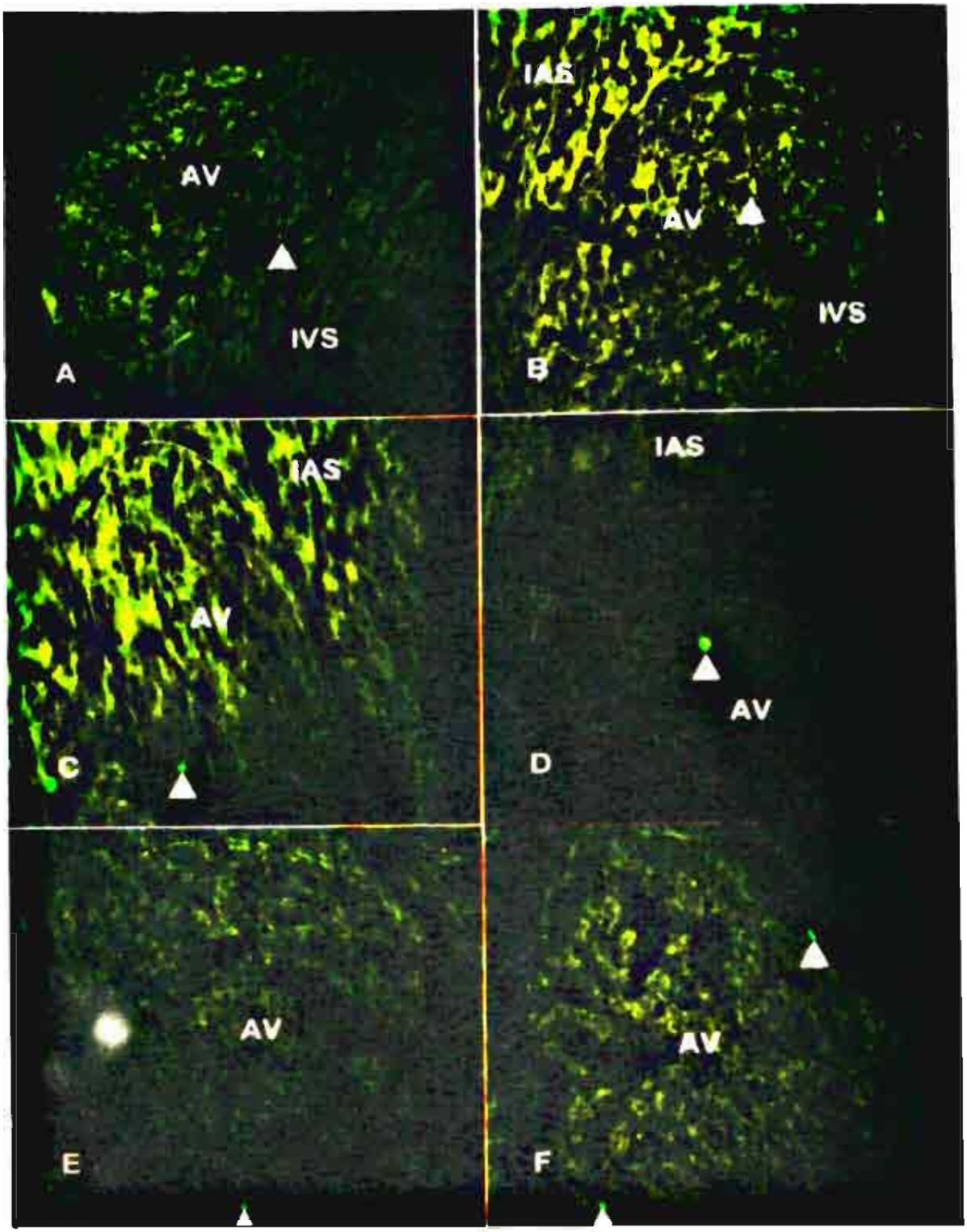
พบว่าจำนวนของ receptors ต่อพื้นที่ (mm^2) ในหนู TG อายุ 2 วัน (14.05±2.05 x10^3 receptors/mm^2) , 1 สัปดาห์ (7.42±1.32x10^3 receptors/mm^2) และ 2 สัปดาห์ (1.67±0.26 x10^3 receptors/mm^2) มากกว่าหนู SD ในช่วงอายุเดียวกัน (2 วัน = 7.05 ± 1.14 x 10^3 receptors/mm^2 , 1 สัปดาห์ = 2.92 ± 0.67 x10^3 receptors /mm^2 และ 2 สัปดาห์ = 1.14 ± 0.17x10^3 receptors/mm^2) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (รูปที่ 9) นอกจากนี้จำนวนของ receptors ต่อพื้นที่ (mm^2) ลดลงเมื่อหนูมีอายุมากขึ้น

4.3 ผลการศึกษาปริมาณ AT_1 receptors ต่อพื้นที่ (mm^2) ภายใน AV node

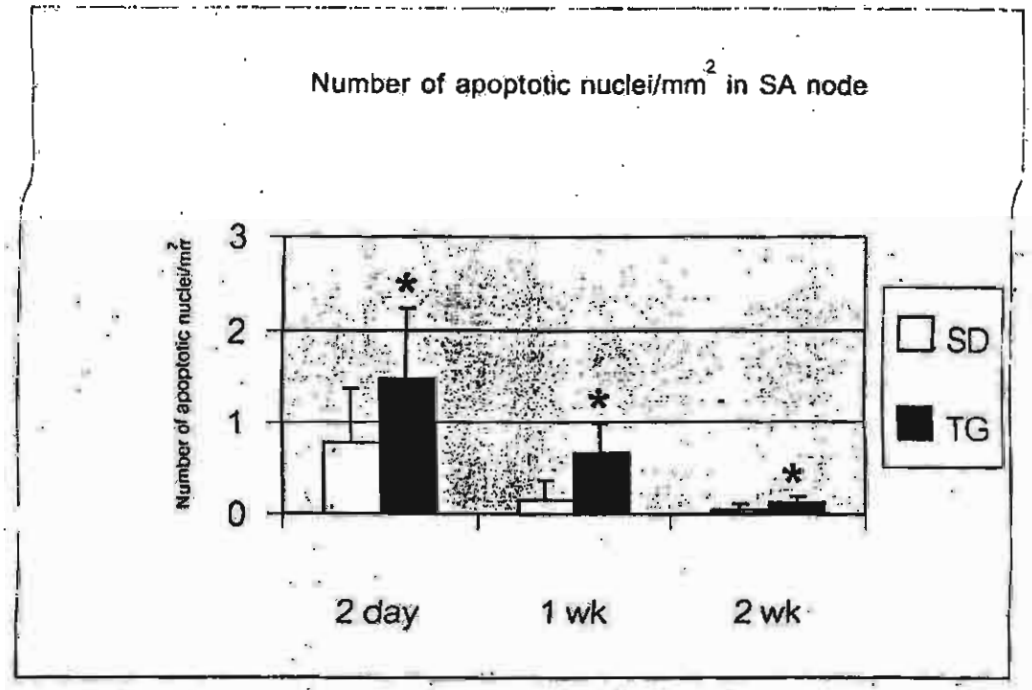
พบว่าจำนวนของ receptors ต่อพื้นที่ (mm^2) ในหนู TG อายุ 2 วัน (5.26±1.60x10^3 receptors/mm^2), 1 สัปดาห์ (12.13±2.03x10^3 receptors/mm^2) และ 2 สัปดาห์ (12.50±3.97x10^3 receptors/mm^2) มากกว่าหนู SD ในช่วงอายุเดียวกัน (2 วัน = 2.61±0.49x10^3 receptor/mm^2), 1 สัปดาห์ = 5.37±1.20x10^3 receptors/mm^2 และ 2 สัปดาห์ 7.63±1.91x10^3 recptor/mm^2) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (รูปที่ 10) นอกจากนี้จำนวนของ receptors ต่อพื้นที่ (mm^2) เพิ่มขึ้นเมื่อหนูมีอายุมากขึ้น



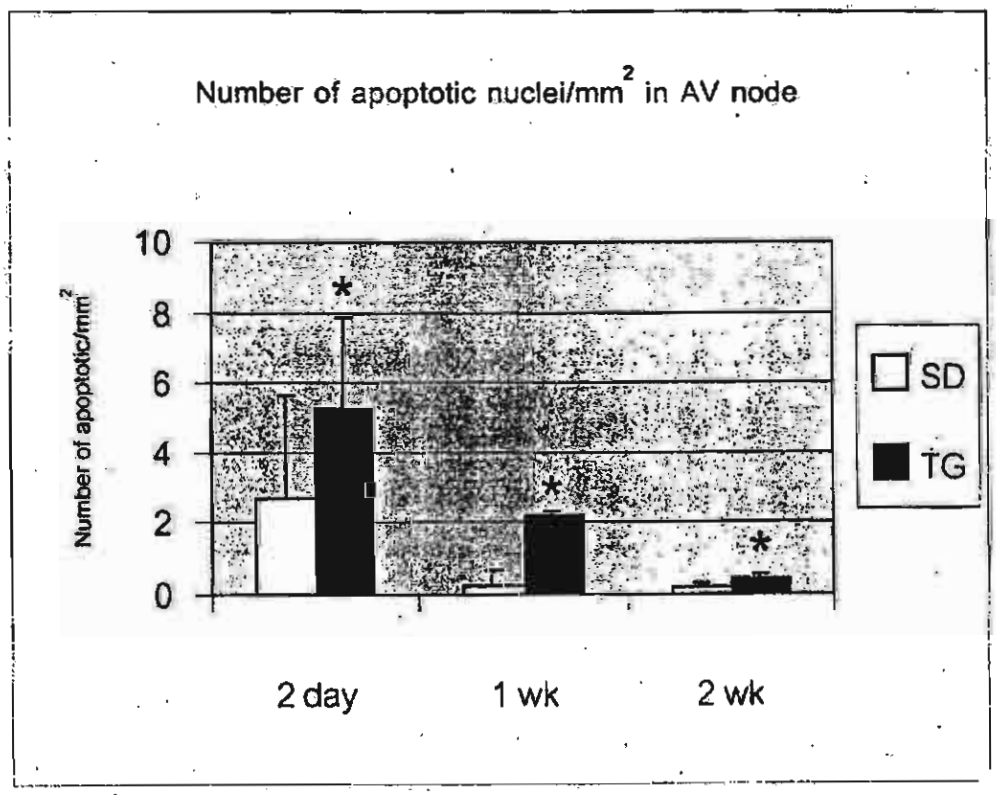
รูปที่ 1 A-F แสดงตำแหน่งของ sinoatrial node (SA) ของหัวใจหนูแต่ละกลุ่ม (A) หนู SD อายุ 2 วัน (B) หนู TG อายุ 2 วัน (C) หนู SD อายุ 1 สัปดาห์ (D) หนู TG อายุ 1 สัปดาห์ (E) หนู SD อายุ 2 สัปดาห์ (F) หนู TG อายุ 2 สัปดาห์ ย้อมโดยใช้ Masson's Trichrome SVC: superior vena cava. RA: right atrium, Ao: Aorta



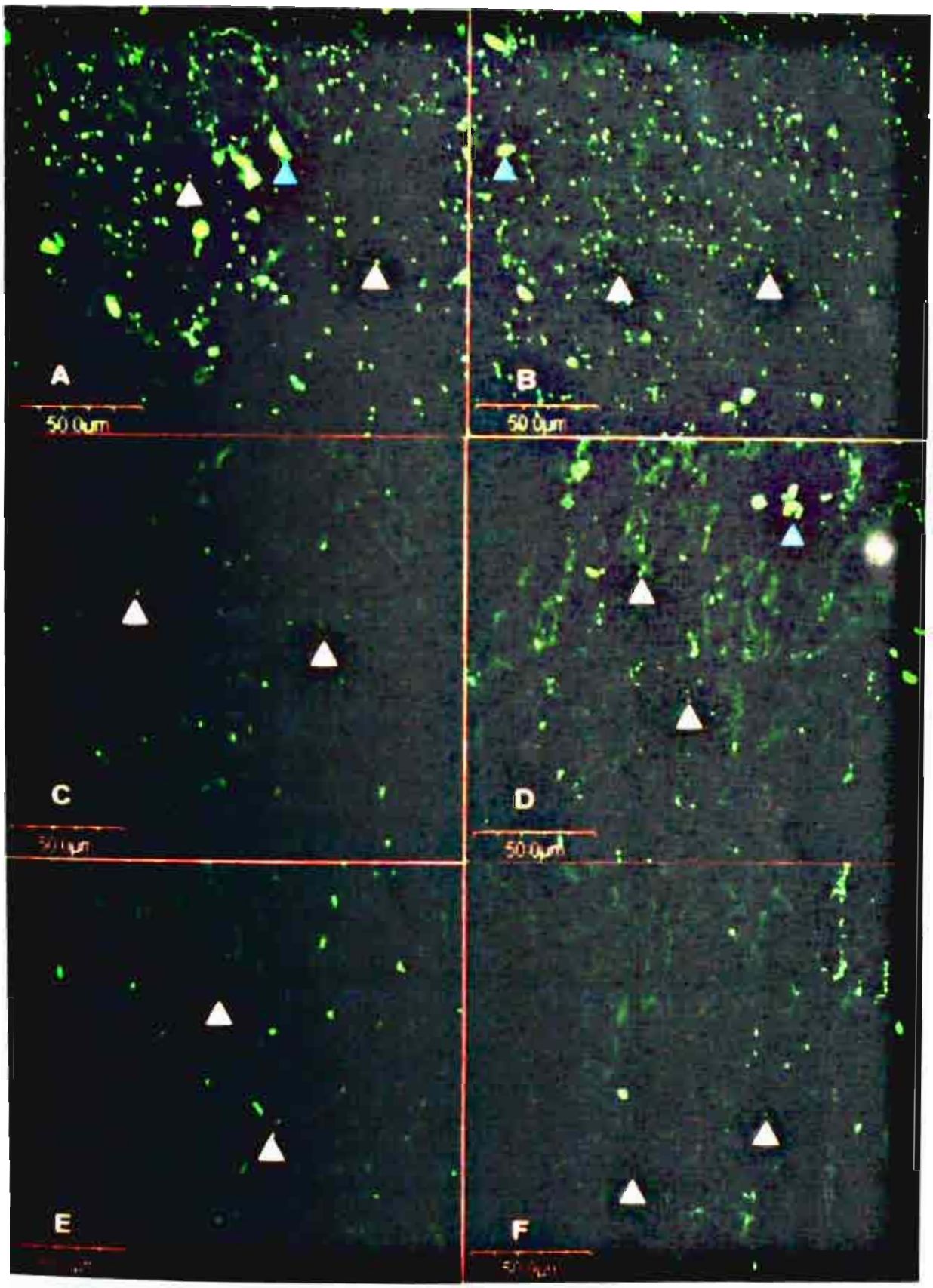
รูปที่ 4A-F **แสดง** apoptotic nuclei (**ลูกศรสีขาว**) **ภายใน** atrioventricular node (AV) **ของหัวใจหนูแต่ละกลุ่ม** (A) **หนู** SD **อายุ** 2 **วัน** (B) **หนู** TG **อายุ** 2 **วัน** (C) **หนู** SD **อายุ** 1 **สัปดาห์** (D) **หนู** TG **อายุ** 1 **สัปดาห์** (E) **หนู** SD **อายุ** 2 **สัปดาห์** (F) **หนู** TG **อายุ** 2 **สัปดาห์** **กำลังขยาย** = 400 IAS: interatrium septum IVS: interventricular septum,



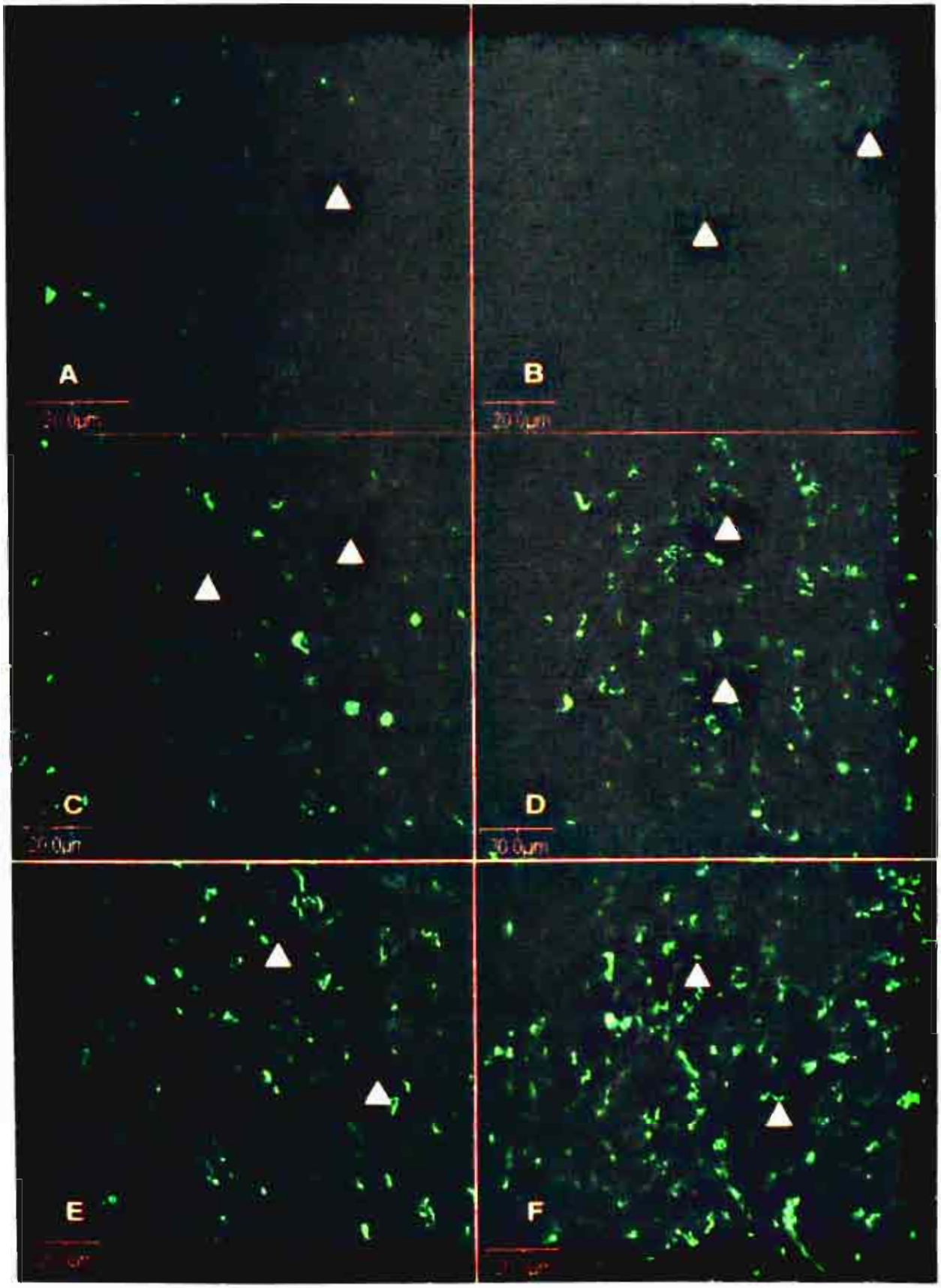
รูปที่ 5 แสดงจำนวนของ apoptotic nuclei ต่อพื้นที่ (mm^2) ภายใน SA node n = 6, unpaired T-test, * = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$)



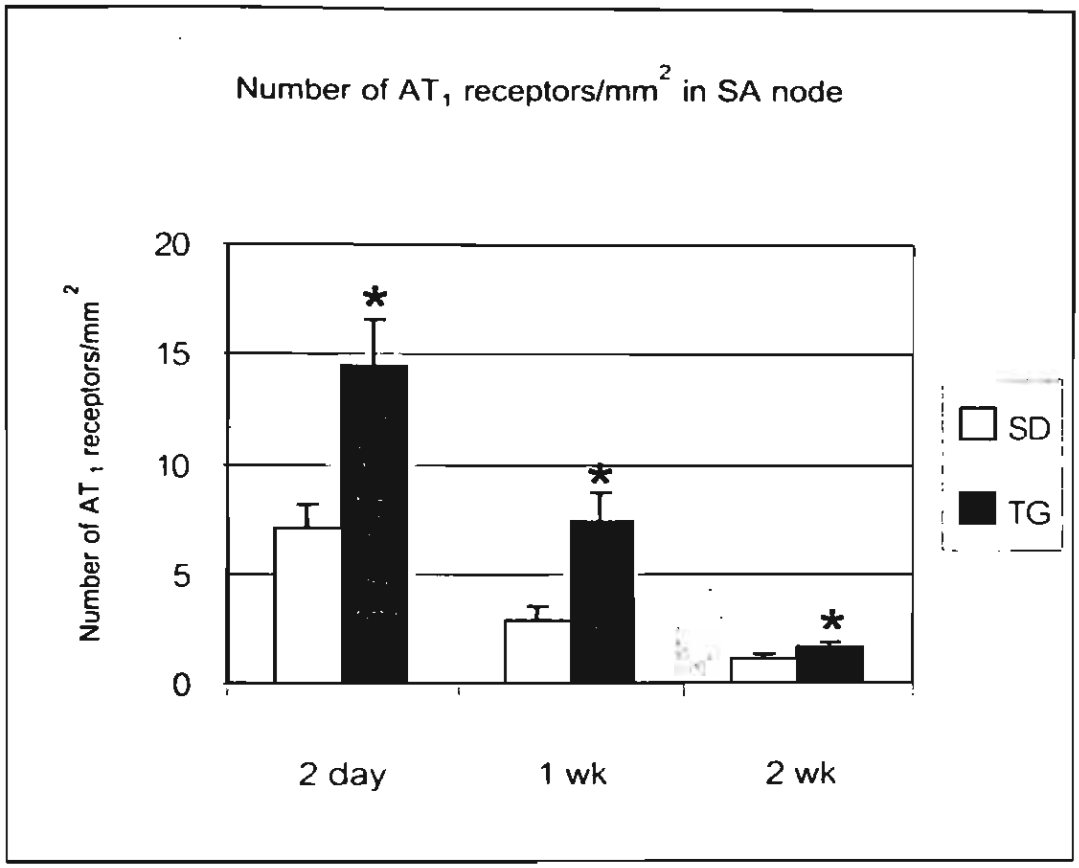
รูปที่ 6 แสดงจำนวนของ apoptotic nuclei ต่อพื้นที่ (mm^2) ภายใน AV node n = 6, unpaired T-test, * = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$)



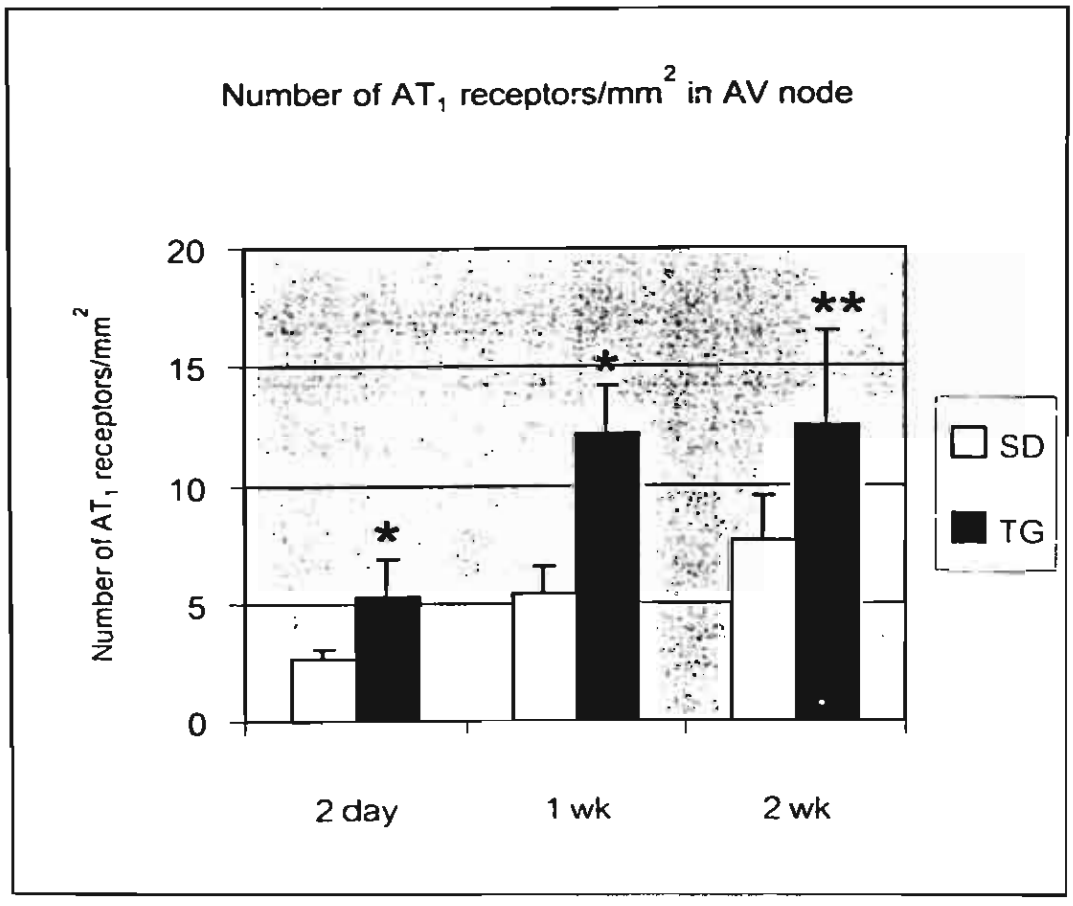
รูปที่ 7A-F **แสดง** AT. receptors (**ลูกศรสีขาว**) **ภายใน** sinoatrial node (SA) **ของหัวใจหนูแต่ละกลุ่ม**
(A) **หนู** SD **อายุ** 2 **วัน** (B) **หนู** TG **อายุ** 2 **วัน** (C) **หนู** SD **อายุ** 1 **สัปดาห์** (D) **หนู** TG **อายุ** 1 **สัปดาห์**
(E) **หนู** SD **อายุ** 2 **สัปดาห์** (F) **หนู** TG **อายุ** 2 **สัปดาห์** **ลูกศรสีฟ้า**= **เม็ดเลือดแดง**



รูปที่ 8A-F **แสดง** AT_1 receptors (**ลูกศรสีขาว**) **ภายใน** atrioventricular node (AV) **ของหัวใจหนูแต่ละกลุ่ม** (A) **หนู** SD **อายุ** 2 **วัน** (B) **หนู** TG **อายุ** 2 **วัน** (C) **หนู** SD **อายุ** 1 **สัปดาห์** (D) **หนู** TG **อายุ** 1 **สัปดาห์** (E) **หนู** SD **อายุ** 2 **สัปดาห์** (F) **หนู** TG **อายุ** 2 **สัปดาห์**



รูปที่ 9 แสดงจำนวนของ AT_1 receptors ต่อพื้นที่ (mm^2) ภายใน SA node n = 6, unpaired T-test, * = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$)



รูปที่ 10 แสดงจำนวนของ AT_1 receptors ต่อพื้นที่ (mm^2) ภายใน AV node n = 6, unpaired T-test, * = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) **แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.01$)

บทวิจารณ์

การสอดแทรกยีน renin ในหนู m(Ren-2)27 (TG) จะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของระบบ local renin-angiotensin ทำให้มี Angiotensin II (Ang II) ในหัวใจเพิ่มขึ้น (Campbell *et al*, 1995) และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ AT_1 receptorsทั้งใน SA และ AV node ในทุกช่วงอายุที่ศึกษาเมื่อเทียบกับกลุ่ม SD การที่หนู TG มีปริมาณ Ang II และ AT_1 receptors เพิ่มขึ้นนั้นอาจเป็นสาเหตุทำให้มีการเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis เพิ่มขึ้น ซึ่งในการวิจัยนี้พบว่าหนูกลุ่ม TG มีจำนวน apoptic nuclei/mm^2 มากกว่าหนูกลุ่ม SD ทั้งใน SA และ AV node ในทุกช่วงอายุ (2 วัน, 1 สัปดาห์ และ 2 สัปดาห์) สอดคล้องกับการศึกษาของ Lie *et al* (2000) ซึ่งพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ apoptosis ในหัวใจของหนู spontaneously hypertensive rat (SHR) Ang II โดยผ่านการทำงานของ AT_1 receptors มีผลในการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Kajstura *et al*, 1997 และ Cigola *et al*, 1997) โดย Ang II จะทำให้มีปริมาณของ Ca^{2+} ภายในเซลล์ (cytosolic free calcium) เพิ่มขึ้นโดยการกระตุ้นให้ Ca^{2+} ผ่านเข้ามาในเซลล์โดยผ่าน voltage – gated L – type calcium chanels ซึ่งจะไปมีผลกระตุ้น calcium-dependent DNase enzymes เนื่องจาก calcium เป็น cofactor ของ Ca^{2+}-dependent DNase I ซึ่งจะไปทำให้เกิดการแตกหักของ DNA (double strand clevage of DNA) (Cigola *et al*, 1997) ดังนั้นอาจจะกล่าวได้ว่า Ang II โดยผ่านการทำงานของ AT_1 receptors มีส่วนชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ใน SA และ AV node เช่นเดียวกับในกล้ามเนื้อหัวใจ

จากการศึกษาพบว่า apoptosis ใน SA และ AV node ทั้งในหนู SD และ TG มีจำนวนลดลงเมื่อหนูมีอายุมากขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kajstura *et al*, (1995) ซึ่งศึกษาปริมาณของ apoptosis ของหัวใจหนูหลังคลอด โดยพบว่า apoptosis เกิดขึ้นทันทีหลังคลอดและจะมีปริมาณลดลงมากเมื่อหนูอายุ 11 วันและหลังจากนั้นไม่พบ apoptosis เกิดขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าช่วงเวลา 1-2 อาทิตย์ ภายหลังคลอดเป็นช่วงเวลาสำคัญของขบวนการ morphogenesis ของ conduction system (James, 1994) และ apoptosis เป็นขบวนการที่มีบทบาทสำคัญของการ morphogenesis ปริมาณของ apoptosis ที่มากเกินไปจะมี ผลทำให้เกิดการพัฒนาการที่ผิดปกติของระบบนำสัญญาณไฟฟ้า พบว่า apoptosis เป็นสาเหตุที่สำคัญในการทำให้เกิดการพัฒนาที่ผิดปกติของ AV node, SA node และ internodal pathway ซึ่งมีผลทำให้เกิดภาวะกีดกัน AV อย่างสมบูรณ์ และภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะ (James *et al*, 1996)ซึ่งแนวคิดของ apoptosis นี้เป็นการอธิบายภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะในเด็กซึ่งเกิดภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะตั้งแต่แรกเกิดและอาจสัมพันธ์กับระบบ renin-angiotensin ที่ผิดปกติ แต่แนวคิดของ apoptosis นี้ไม่สามารถอธิบายการเกิดภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะที่เกิดขึ้นในผู้สูงอายุได้

นอกจากนี้ Ang II โดยผ่านการทำงานของ AT_1 receptors นั้นพบว่ามีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะ โดยการศึกษาของ Kass *et al*, (1981) พบว่าการกระตุ้น AT_1 receptors บน SA node และ AV node นั้น มีผลทำให้เกิดการสร้าง spontaneous electrical activity หรือเปลี่ยนแปลงการตอบสนองต่อ electric stimulation Mello (2001) อธิบายว่าการกระตุ้น ระบบ renin – angiotensin จะไปมีผลทำให้เกิดการกระตุ้นที่ AT_1 receptors ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการกระตุ้นของ protein

kinase C เช่นกัน แต่จะไปมีผลทำให้เกิดขบวนการ phosphorylation ของ junctional proteins ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการลดลงของ junctional conductance ทำให้เกิดการลดลงของความเร็วของการนำกระแสประสาท (conduction velocity) หรือขัดขวางการนำกระแสประสาท (block of conduction) ส่งผลให้เกิด reentrant rhythms นำไปสู่การอธิบายว่า Ang II โดยการทำงานของ AT_1 receptors เป็นเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะ

จากการศึกษานี้พบว่า AT_1 receptors ภายใน SA node ของหนูทั้ง SD และ TG นั้นมีปริมาณลดลง ในขณะที่ใน AV node นั้น AT_1 receptors มีปริมาณหนาแน่นมากเมื่ออายุมากขึ้น แต่ในการศึกษาครั้งนี้ศึกษาไปจนถึงหนูอายุ 2 สัปดาห์ ขณะที่การศึกษาของ Sechi *et al* (1990) ซึ่งศึกษาในหนูอายุ 10 และ 14 สัปดาห์ พบว่ามี AT_1 receptors ใน AV node ในปริมาณสูงในขณะที่ใน SA มีปริมาณน้อยกว่ามาก (Sechi *et al*.,1990) อาจอธิบายว่า AT_1 receptors ในอายุน้อยน่าจะมีผลต่อ SA node มากกว่าขณะที่อายุเพิ่มขึ้น AT_1 receptors จะมีผลต่อ AV node มากกว่า ซึ่งสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ AT_1 receptor ทั้งใน SA และ AV นั้นยังต้องการศึกษาต่อไป

นอกจากนี้ยังพบว่าหนู TG มีปริมาณ AT_1 receptors ทั้งใน SA และ AV node ทุกช่วงอายุมากกว่าหนู SD ซึ่งการมีปริมาณที่มากเกิน (overexpression) ของ AT_1 receptors นั้นพบว่าเป็นสาเหตุทำให้เกิด bradycardia ร่วมกับ heart block ซึ่งทำให้เสียชีวิตภายใน 1 สัปดาห์แรก ในหนู MHC – AT_1 transgenic mice (Hein *el al*., 1997) นอกจากนี้พบว่าการให้ AT_1 receptor antagonist, CV-11974 สามารถป้องกันการเกิดภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะใน wild-type mice (Harade *et al*, 1998) ได้มีการนำ AT_1 receptor antagonist (losartan) มาใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่สูงอายุที่ป่วยด้วยโรคหัวใจล้มเหลว พบว่าสามารถลดอัตราการตายจากการเสียชีวิตอย่างเฉียบพลันได้ถึง 46% ซึ่งเชื่อว่าการสกัดกั้น AT_1 receptors อย่างสมบูรณ์ (complete blockade of AT_1 receptors) จะส่งผลในการป้องกันภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะ (Pitt *et al*., 1997) ซึ่งสนับสนุนบทบาทของ Ang II ที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะ โดยผ่านการทำงานของ AT_1 receptors อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่กล่าวมาในเบื้องต้นว่า Ang II โดยการทำงานผ่าน AT_1 receptors อาจจะมีส่วนทำให้เกิดภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะ หากแต่อธิบายภาวะทำให้เกิดหัวใจเต้นผิดจังหวะ โดยเสนอในแง่มุมของ Ang II อาจจะทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ใน SA และ AV node ปริมาณ apoptosis ที่มากเกินไปจะส่งผลทำให้เกิดการพัฒนาการที่ผิดปกติของ SA และ AV node และจะส่งผลให้เกิดการทำงานที่ผิดปกติ ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะในที่สุด ดังนั้นการศึกษาในอนาคตถึงผลของ AT_1 receptors antagonist ในการลดปริมาณของ apoptosis ใน SA และ AV node ในหนูที่มีความดันโลหิตสูง จึงมีความจำเป็น เพื่อเป็นแนวทางการรักษาผู้ป่วยด้วยโรคความดันโลหิตสูง ร่วมกับภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะ

หนังสืออ้างอิง

Campbell D.J, Rong P, Kladis A, Rees B, Ganten D and Skinner S.L.(1995) Angiotensin and Bradykinin peptides in the TGR (mRen-2)27 rat. *Hypertension*, 25, 1014-1020.

Cigola E, Kajstura, Li B, Meggs L.G. and Anversa P. (1997) Angiotensin II activates programmed myocyte cell death *in vitro*. *Exp. Cell Res*, 231,363-371.

De Mello WC. (2001) Cardiac arrhythmias: the possible role of the renin-angiotensin system. J *Mol Med*, 79, 103-108.

Harada H, Komuro I, Hayashi D, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y. (1998) Angiotensin II Type 1a receptor is involved in the occurrence of reperfusion arrhythmias. 97, 315-317.

Hein L, Steven ME, Barsh GS, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ. (1997) Overexpression of angiotensin AT1 receptor trasgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block. *Pre. Natl. Acad. Sci*, 94, 6391-6396.

James T.N. , Nichols M.M, Sapire D.W, Dipatre D.L and Lopez S.M (1996[a]) Complete heart block and fatal right ventricular failure in an infant. *Circulation*, 93 , 1588-1600.

James T.N., Martin E, Willis III P.W and Lohr T.O. (1996[b]) Apoptosis as a possible cause of gradual development of complete heart block and fetal arrhythmias associated with absence of the AV node, sinus, and internodal pathways. *Circulation*, 93, 1424-1432.

James T.N. (1994) Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart : from postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias *Circulation*, 90 (1),

James T.N.(1998) Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. *Annu Rev Physiol*, 60, 309-325.

Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs L.G and Anversa P. (1997) Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes *in vitro*. *J. Mol cell cardiol*, 29, 859-870.

Kajstura J, Mansukhani M, Cheng W, Reiss K, Kralewski S, Reed JC, Quaini F, Sonnenbleck EH, Anversa P. (1995) Programmed cell death and expression of the protooncogene bcl-2 in myocytes during postnatal maturation of the heart. *Exp. Cel Res*, 219, 110-121.

Kass RS, Blair ML. Effects of angiotensin II on membrane current in cardiac Purkinje fibers. *J Mol Cell Cardiol*, 13, 797-809.

Liu J.J, Peng L, Bradley C.J, Zulli A, Shen J, Buxton B.F. (2000) Increased apoptosis in the heart of genetic hypertension, associated with increased fibroblasts. *Cardiovasc Res*, 45, 729-735.

Marrere M.B, Schieffer B, Paxton W.G, Heerdt L, Berk B.C, Delafontaire P and Bernsterin K.E. (1995) Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT_1 receptor. *Nature*, 375,247-259.

Murphy T.J, Alexander R.W, Griendling K.K, Runge M.S and Bernstein K.E (1991) Isolation of a cDNA encoding the vascular type – 1 angiotensin II receptor. *Nature*, 351, 233-236.

Pitt B, Segal R, Martinez FA, Meurers G, Cowley AJ, Thomas I, Deedwania PC, Ney DE, Snavely DB, Change PI. (1997) Randomised trial of losartan versus captopril in patients over 65 with heart failure (Evaluation of Losartan in the Elderly Study, ELITE). *Lancet*, 349, 747-752.

Sarraste A. and Pulkki K (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Car Res*, 45,528-537

Sechi LA, Griffin CA, Grady EF, Kalinyak JE and Schambelan M. (1992) Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart. *Circ Res*, 71, 1482-1489.

Timmermans P.B.M.W.M, Wong P.C, Chiu A.T, Herblin W.F, Benfield P, Carini D.J, Lee R.J, Wexler P.R, Saye J.A.M, and Smith R.D. (1993) Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists, Pharmacol Rev, 45(2), 206-251.

Yaoita H, Ogawa K, Machara K and Maruyama Y (2000) Apoptosis in relevant clinical situations contribution of apoptosis in myocardial infarction. *Car Res*, 45,630-641

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก ทบวงมหาวิทยาลัยและ สกว.

บทความวิจัยเสนอในที่ประชุมวิชาการ ของ Australian Physiological and Pharmacological Society

Vongvatcharanon U., Vongvatcharanon S., Radenahmad N., Kirirat P., Intasaro P., Sabhon P and Parker T.L. (2003) Angiotensin II via AT_1 receptors may mediate apoptosis in the cardiac conduction system of rat heart. ***Proceeding of the Australian Physiological and Pharmacological Society***, Syney, Australia, 33, 82 P.

ภาคผนวก

Manuscript เรื่อง **Angiotensin II may mediate apoptosis via the AT_1 receptors in the rat cardiac conduction system**

PROCEEDINGS OF THE AUSTRALIAN PHYSIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL SOCIETY

olume 33 August 2003

Correspondence

Correspondence concerning literary and technical aspects of the journal should be addressed to the Editor. Correspondence concerning subscriptions to the journal should be addressed to the Treasurer and that involving all other Society business should be addressed to the National Secretary.

Angiotensin II via AT_1 receptors may mediate apoptosis in the cardiac conduction system of rats

W. Vongvatcharanon[1], S. Vongvatcharanon[2], N. Radenahmad[1], P. Kirirat[1], P. Intasaro[1], P. Sobhom[3] and J. Parker[4]. [1]Department of Anatomy, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai 90112, Thailand. [2]Department of Oral Surgery, Faculty of Dentisty, Prince of Songkla University, Hat-Yai 90112, Thailand. [3]Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand and [4]School of Biomedical Science, Nottingham University, Nottingham NG7 2UH, UK.

Apoptosis has been suggested as a possible cause of gradual development of complete heart block and fatal arrhythmias associated with absence of the AV node, sinus, and internodal pathways (James *et al.* 1996). Studies about apoptosis in the heart by means of cardiomyocyte cell culture have demonstrated that angiotensin II (Ang II) mediates cardiomyocyte apoptosis via angiotensin II type I receptors (AT_1) (Cigola *et al.* 1997). The transgenic *m(Ren-2)27* (TG) rat carries the additional *Ren-2* gene, the expression of which results in an increase of heart Ang II (Campbell *et al.* 1995), thus potentially affecting the cell growth death equilibrium. This study addresses the question of role of Ang II/AT_1 receptors mediated apoptosis in the sinoatrial (SA) and atrioventricular nodes (AV).

Six, male 2 week TG and Hannover Sprague Dawley (SD) rats were anaesthetised by pentobarbitone sodium i.p. injection (100 mg/kg). The hearts were removed and fixed in 10% formaldehyde. Following dehydration and embedding in paraffin, 5 µm serial sections were cut then stained with Masson Trichrome to localize SA and AV nodes. The sections containing SA or AV node were processed for either: (a) calculation of apoptotic nuclei following terminal deoxnucleotidyl transferase nick end labelling of 3'-OH ends using Fluorescein-FragEL™; or (b) immunohistochemical labelling with antibodies to the AT_1 receptors prior to confocal scanning laser microscopical analysis. Quantification of AT_1 receptors was performed by using Microimage analysis software (Olympus).

Group	Apoptotic cells/mm^2		AT_1 receptors ($\times 10^3$)/mm^2	
	SA	AV	SA	AV
SD	0.040±0.07	0.164±0.12	1.14±0.17	7.63±1.91
TG	**0.140±0.37***	**0.433±0.11***	**1.67±0.26***	**12.50±3.97***

Data expressed as mean ± SD (n=6)

* = significant compared with control ($P<0.05$) (Independent-Sample T-test)

The table shows that the number of apoptotic cell in both the SA and AV node is significantly greater in the TG compared with the SD ($p<0.05$). Quantification of AT_1 receptors within SA and AV node shows that there were significantly more AT_1 receptors in the TG compared with the SD ($p<0.05$). These data suggest that an elevated level of apoptosis in the TG rat heart compared with the controls could be accounted for by *Ren-2* derived Ang II active via AT_1 receptors.

Campbell, D.J., Rong, P., Kladis, A., Rees, B., Ganten, D. and Skinner, S.L.(1995) Angiotensin and Bradykinin peptides in the TGR (mRen-2)27 rat. *Hypertension*, 25, 1014-1020.

Cigola, E., Kajstura, L.B., Meggs, L.G. and Anversa, P. (1997) Angiotensin II activates programmed myocyte cell death *in vitro*. *Experimental Cell Research*, 231, 363-371.

James, T.N., Martin, E., Willis, P.W. and Lohr, T.O. (1996) Apoptosis as a possible cause of gradual development of complete heart block and fatal arrhythmias associated with absence of the AV node, sinus, and internodal pathways. *Circulation*, 93, 1424-1432.

Angiotensin II may mediate apoptosis via the AT_1 receptors in the rat cardiac conduction system

Uraporn Vongvatcharanon[1], Surapong Vongvatcharanon [2], Nisauda Radenahmad[1], Pornpimol Kirirat[1], Pranom Intasaro[1], Prasert Sobhon[3], Terry Parker[4]

[1]Department of Anatomy, Faculty of Science, [2]Department of Oral Surgery, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University, Hat-Yai 90112, Thailand, [3]Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand and [4]School of Biomedical Sciences, Nottingham University, Nottingham NG7 2UH, UK.

Abstract

Introduction: Apoptosis and angiotensin II (Ang II) have been suggested as possible causes of arrhythmias. In addition, Ang II via angiotensin II type I receptors (AT_1) has been demonstrated to induce cardiomyocyte apoptosis. The transgenic m(Ren-2)27 (TG) rat carries the additional Ren-2 gene, the expression of which results in an increase of heart Ang II thus potentially affecting the cell growth/death equilibrium. In this research we have studied the effect of angiotensin II (Ang II) via the AT_1 receptors on mediating apoptosis in a cardiac conduction system (SA node and AV nodes). **Materials and methods**: Heart sections from male 2-day, 1-week and 2-week TG and Sprague Dawley (SD) rats were stained with Masson Trichrome to localize SA and AV nodes. The sections containing SA or AV nodes were processed for quantitation of apoptotic nuclei and AT_1 receptors. **Results**: The number of apoptotic nuclei/mm^2 in the SA and AV nodes were found to decrease from 2-day to 2-week in both the TG and the SD rats, and the number of apoptotic nuclei/mm^2 in the TG groups was significantly higher than that of the SD groups for all ages ($p<0.05$). The number of AT_1 receptors/mm^2 in the SA node were found to decrease with increasing age, whereas the number of AT_1 receptors/mm^2 in the AV node was increased in both TG and SD rats and the number of AT_1 receptors/mm^2 in the three TG groups was significantly more than that of the three SD groups ($p<0.05$). **Discussion and Conclusion**: As a consequence of the additional renin gene in the TG rats , which results in the alteration of the local renin-angiotensin system, the numbers of AT_1 receptors/mm^2 and apoptotic nuclei/mm^2 are increased. The number of apoptotic nuclei/mm^2 decrease with maturation, therefore, the apoptosis may not be used to explain the cause of the arrhythmia in the aging patient. However, the number of AT_1 receptors in the AV node, of which there are more than in the SA node at 2-week rats, could be used to explain the pathology of arrhythmia associated with angiotensin in hypertension patients.

Key words : Angiotensin II, apoptosis, conduction system, AT_1 receptor.

Introduction

Cardiac arrhythmias are a major health problem in cardiomyopathies. They cause severe symptoms and even sudden death (Myerburg et al, 1993) In addition, there is no treatment available to prevent sudden death in patients with arrhythmia (De Mello, 2001). Cardiac arrhythmias are caused by multiple mechanisms such as abnormal automaticity after depolarization and reentry (De Mello, 2001). It has been suggested that angiotensin II (Ang II) possesses arrhythmogenic activity such as decrease in cell coupling and reduction in conduction velocity, facilitating the generation of reentrant rhythms. (De Mello and Altien, 1992; De Mello, 1996:, De Mello and Danser, 2000, ; De Mello, 1998 and De Mello, 1994). In addition, apoptosis has been suggested as a cause of gradual development of complete heart block and fatal arrhythmia, associated with absence of the AV node, sinus and internodal pathways (Jame et al, 1996). Studies about apoptosis in the heart by means of cardiomyocyte cell culture (in vitro) have demonstrated that Ang II mediates cardiomyocyte apoptosis via angiotensin II type I receptors (AT_1) (Cigola et al, 1997; Kajstura et al, 1997). However, in the in vivo condition, it is not known whether Ang II is involved in inducing apoptosis in the heart, and in particular in the conduction system.

The m(Ren-2)27 transgenic rats (TG) are rats carrying the additional mouse Ren-2 renin gene. The rats develop fulminant hypertension despite low circulating renin. Therefore, it is hypothesized that hypertension results from enhanced local Ang II generation in extrarenal tissue (Lee et al, 1995). The renin gene is strongly expressed in extrarenal tissue especially in the heart, where the increase of heart Ang II is found (Campbell et al, 1995). Due to the increased Ang II in the heart, the cell growth/death equilibrium may potentially be affected. This study focusses on the role of Ang II via AT_1 receptors in mediating apoptosis in the cardiac conduction system (sinoartial node, SA, and atrioventricular node, AV) in the in situ condition by comparing the apoptosis level and number of AT_1 receptors between transgenic rats and normal Sprague Dawley rats. The study is performed in postnatal rats (2 days, 1 week and 2 weeks) as these stages have been suggested to be important for morphogenesis of the conduction system (Jame, 1994). Results from this study may explain the pathology of arrhythmia and may lead to new approaches to prevent disaster or to improve arrhythmia therapies.

Materials and Methods

1. Animals

The m(Ren-2)27 transgenic rat (TG) and Sprague Dawley (SD) rats were obtained from the Biomedical Service Units, School of Biomedical Sciences, Nottingham University, UK (provided by Dr T. Bennett and Dr S.M Gardiner). The rats were kept on a standard laboratory diet with free access to food and water on a 12:12 h light/dark cycle at 22°C.

All 2-day, 1-week and 2-week male TG and SD rats (six rats per group, total 36 rats) were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbitone sodium (100mg/kg). The hearts were removed and fixed with 10% formalin. Following dehydration and paraffin wax embedding, 5 μm serial sections were cut and mounted on TESPA coated slides. Random sections were stained with Masson Trichrome to localize the SA and AV nodes.

2. Quantitative analysis of apoptotic nuclei in the SA and AV nodes

2.1 *In situ* end labeling procedure

Every tenth section containing the SA node or the AV node of each heart were systematically sampled (Mayhew, 1991) for in situ terminal deoxytransferase nick end labeling using the Fluorescent FragEL™ DNA Fragmentation Detection kit (Oncogene Research Products). The sections were deparaffinized and dehydrated before permeabilization with 20 μg/ml proteinase K in 10 mM Tris for 20 minutes. A positive control was generated by incubating with 1 μg/μl DNase I in 100 mM Tris, 700 mM NaCl pH 7.6 for 20 minutes. After incubating with Equilibration Buffer (1 M sodium cacodylate, 0.15 M Tris, 1.5 mg/ml BSA, 3.75 mM $CoCl_2$ pH 6.6) for 10-30 minutes, the sections were incubated with Labeling Reaction Mixture Comprising FITC–conjugated deoxynucleotide and terminal deoxynucleotide transferase (TdT), except one slide, a negative control which was incubated with the labeling mixture without TdT, at 37°C for 1 hour. The sections were washed, then mounted using Fluorescein-FragEL™ Mounting Media.

2.2 Quantitative analysis of apoptotic nuclei

Quantitative analysis of apoptotic nuclei stained with Fluorescein–FragEL™ was performed by using a fluorescent microscope with an excitation wavelength of 494 mm. Apoptotic nuclei identified by morphological criteria and intensity of staining were counted. The number of apoptotic nuclei was calculated by dividing the total number of apoptotic nuclei by the area of sections examined. Microimage analysis software (Olympus) was applied to estimate the

area of sections examined in the SA node and in the AV node. The results were expressed as number of apoptotic nuclei per mm^2.

3. Quantitative analysis of AT_1 receptors in the SA and AV nodes

3.1 Immunofluorescence

Every tenth section adjacent to the sections stained for apoptosis was systematically sampled (Mayhew, 1991). Immunofluorescence was performed to localize the number of AT_1 receptors in the SA and AV nodes. After deparaffinizing and rehydration, the sections were pre-incubated in 0.3%, Triton X-100, in 0.01 M potassium phosphate buffer saline (KPBS) for 30 minutes and a blocking solution (1.5% goat serum in KPBS) for 20 minutes prior to incubation in the primary antibody, rabbit polyclonal IgG raised against AT_1 receptors (Autogen Bioclear), at 1:50 dilution $4^{\circ}C$ overnight, followed by the secondary antibody, 1:200 FITC-labeled goat anti-rabbit IgG (Vector laboratories) for 2 hours. Finally the sections were mounted using Vactashield mounting medium (Vector laboratories). Negative controls were obtained by replacing the primary antibody with diluting buffer.

3.2 Quantitative analysis of AT_1 receptors

The sections were enlarged under confocal laser scanning microcopy for visualizing AT_1 receptors and photographing. The AT_1 receptors in each photograph were counted by Microimage analysis software (Olympus). The results were expressed as number of fluorescent AT_1 spots per mm^2

4. Statistical Analysis

Data are reported as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed by Student's T-test to compare the number of apoptotic nuclei/mm^2 and AT_1 receptors/mm^2 between SD and age-matched TG. Statistical significance was set at $P<0.05$.

Results

1. Localization the SA and AV nodes

Masson Trichrome staining showed the sinoatrial node (SA) at the wall of the proximal superior vena cava adjacent to the right atrium. SA nodal cells consisting of thin modified muscle cells are stained more lightly than those of cardiomyocytes (Fig 1A-B). The coronal sections of the heart stained with Masson Trichrome showed the atrioventricular node (AV) at the lower part of the interatrial septum astrides the interventricular septum. The AV node cells are smaller in diameter and stained more lightly than those of ventricular cardiomyocytes (Fig 1C-D).

2. Quantitative analysis of apoptotic nuclei in the SA and AV node

2.1 Morphology of apoptotic nuclei

The nuclei labeled for internucleosomal strand breaks using Fluorescein-FragEL™ Kit were viewed under fluorescent microscopy and appeared as small, brightly-stained nuclei exhibiting morphological features of chromatin condensation, characteristic of apoptotic nuclei (Fig 2A-D).

2.2 Quantitative analysis of apoptotic nuclei in the SA node

Quantitative analysis of Fluorescein-FragEL™ labeled nuclei showed that in all three age-groups, the number of apoptotic nuclei was significantly higher in the TG rats (2-day 1.48 ± 0.75 cell/mm^2; 1-week 0.66 ± 0.33 cell/mm^2 and 2-week 0.13 ± 0.07 cell/mm^2) compared with the SD rats (2-day 0.77 ± 0.60 cell/mm^2; 1-week 0.14 ± 0.22 cell/mm^2 and 2-week 0.04 ± 0.07 cell/mm^2) ($P = 0.002$, 0.04 and 0.035 for 2-day, 1-week and 2-week, respectively). The number of apoptotic nuclei was reduced with maturation in both the TG and SD rats (Fig 3).

2.3 Quantitative analysis of apoptotic nuclei in the AV node

Quantitative analysis of Fluorescent – FragEL™ labeled nuclei showed that in all age-groups, the number of apoptotic nuclei was significanty higher in the TG rats (2-day 5.27 ± 2.60 cell/mm^2; 1-week 2.23 ± 0.08 cell/mm^2 and 2-week 0.43 ± 0.11 cell/mm^2) than those of the SD rats (2-day 2.68 ± 2.96 cell/mm^2; 1-week 0.26 ± 0.4 cell/mm^2 and 2-week 0.16 ± 0.12 cell/mm^2) ($P = 0.01$, 0.04 and 0.032 for 2-day, 1-week and 2-week respectively). The number of apoptotic nuclei was reduced with maturation in both the TG and SD rats (Fig 4).

3. Quantitative analysis of AT_1 receptors in the SA and AV node

3.1 Immunofluorescence

Immunofluorescent labeled sections with anti–AT_1 receptors viewed under the confocal laser scanning microscope showed the distribution of the AT_1 immunoreactivity (the bright-green fluorescent dots) in the SA and AV nodes (Fig. 5A-F and 6A-F).

3.2 Quantitative analysis of AT_1 receptors in the SA node

In the SA nods, the number of AT_1 receptors at all three age-groups of the TG rats were $14.05\pm2.05x10^3/mm^2$, $7.42\pm1.32x10^3/mm^2$, $1.67\pm0.26x10^3/mm^2$, respectively, which were significantly higher than those of the SD rats (2-day $7.05\pm1.14x10^3/mm^2$; 1-week $2.92\pm0.67x26x10^3/mm^2$ and 2-week $1.14 \pm 0.17x10^3/mm^2$) (P=0.032, 0.02, 0.011 for 2-day, 1-week and 2- week, respectively). The number of AT_1 receptors was down–regulated from 2-day to 2-week in both the TG and the SD rats (Fig 7).

3.3 Quantitative analysis of AT_1 receptors in the AV node

In the AV node, the numbers of AT_1 receptors at all three age-groups of the TG rats were $5.26\pm1.60x10^3/mm^2$, $12.13\pm2.03x10^3/mm^2$, $12.50\pm3.97x10^3/mm^2$ respectively, which were significantly higher than those of the SD rats (2-day $2.61\pm0.49x10^3/mm^2$; 1-week $5.37\pm1.20x10^3/mm^2$, and 2-week $7.63\pm1.91x10^3/mm^2$) (P = 0.031, 0.04 and 0.006 for 2-day, 1-week and 2-week, respectively). The number of AT receptors was up–regulated from 2-day to 2-week in both the TG and the SD rats (Fig 8).

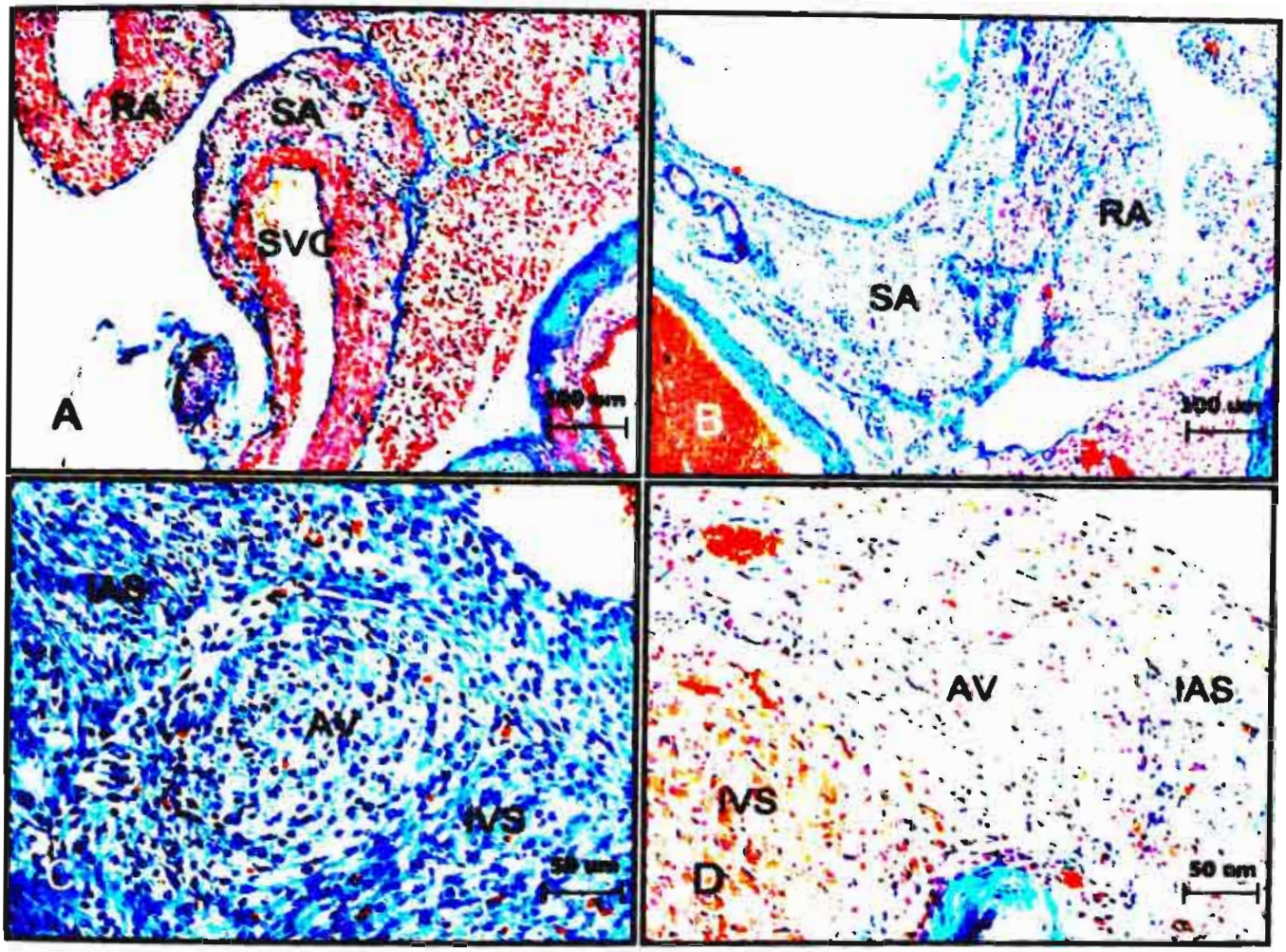


Fig.1 A-D Micrographs of Masson Trichrome stained sections showing sinoatrial node (SA) in (A) 2-day SD (B) 2-week SD, and atrioventricular node (AV) in (C) 2-day SD (D) 2-week SD rat hearts. SVC: superior vena cava, RA: right atrium, IVS: interventricular septum, IAS: interatrial septum

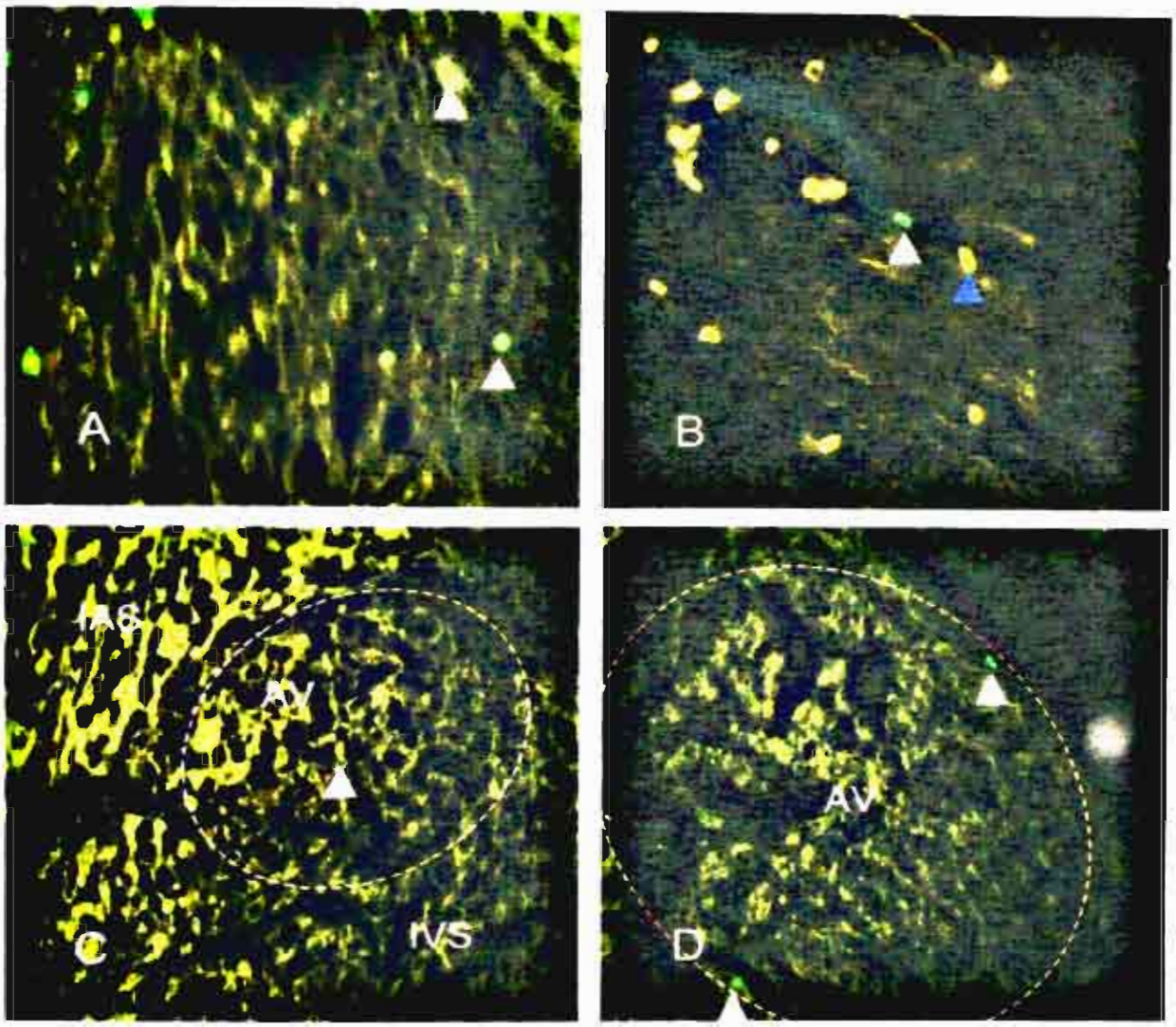


Fig. 2A-D Micrographs showing Fluorescein-FragEL™ labeled nuclei (white arrows) in the sinoatrial node (SA) AV node of (A) 2-dayTG (B) 1-week SD and the AV node of (C) 2-day TG (D) 2-week TG rat hearts. X 400, blue arrows: red blood cells IVS: interventricular septum, IAS: interatrial septum

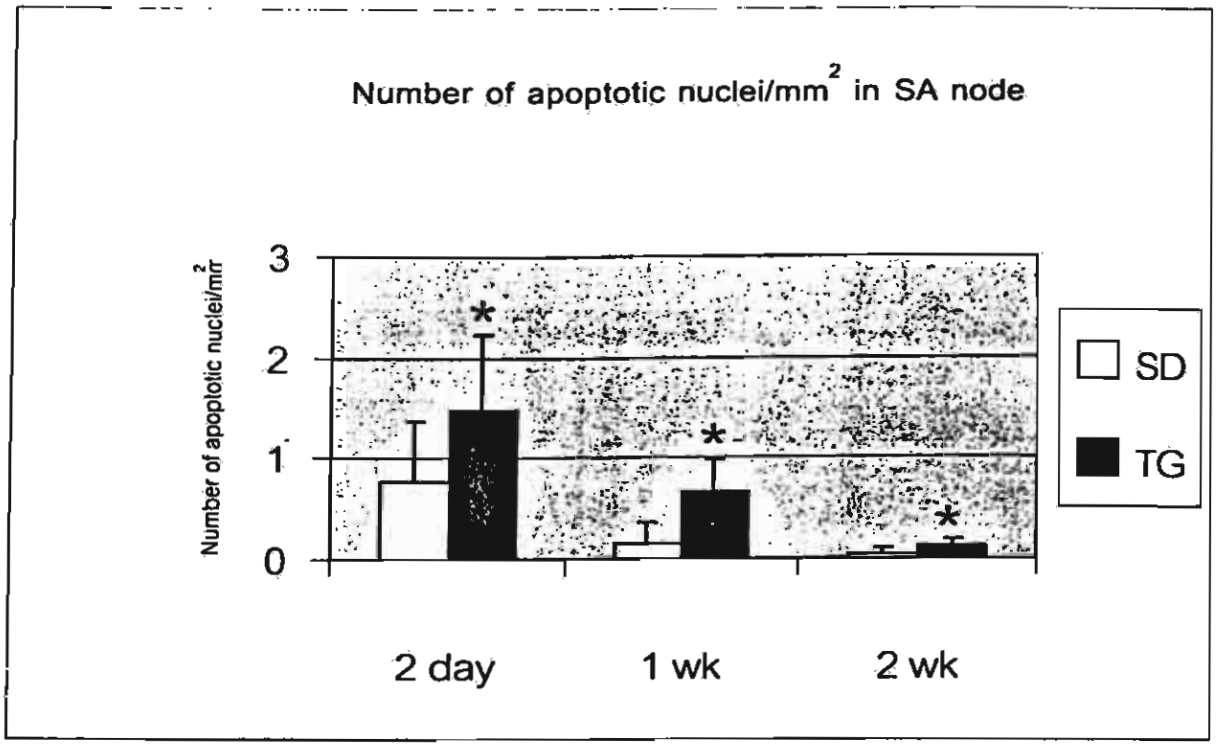


Fig. 3 Bar chart showing number of apoptotic nuclei/mm^2 in the SA node of 2-day, 1-week and 2-week SD and TG rats; data are expressed as mean± SEM, Student's T-test, *P<0.05, N=6

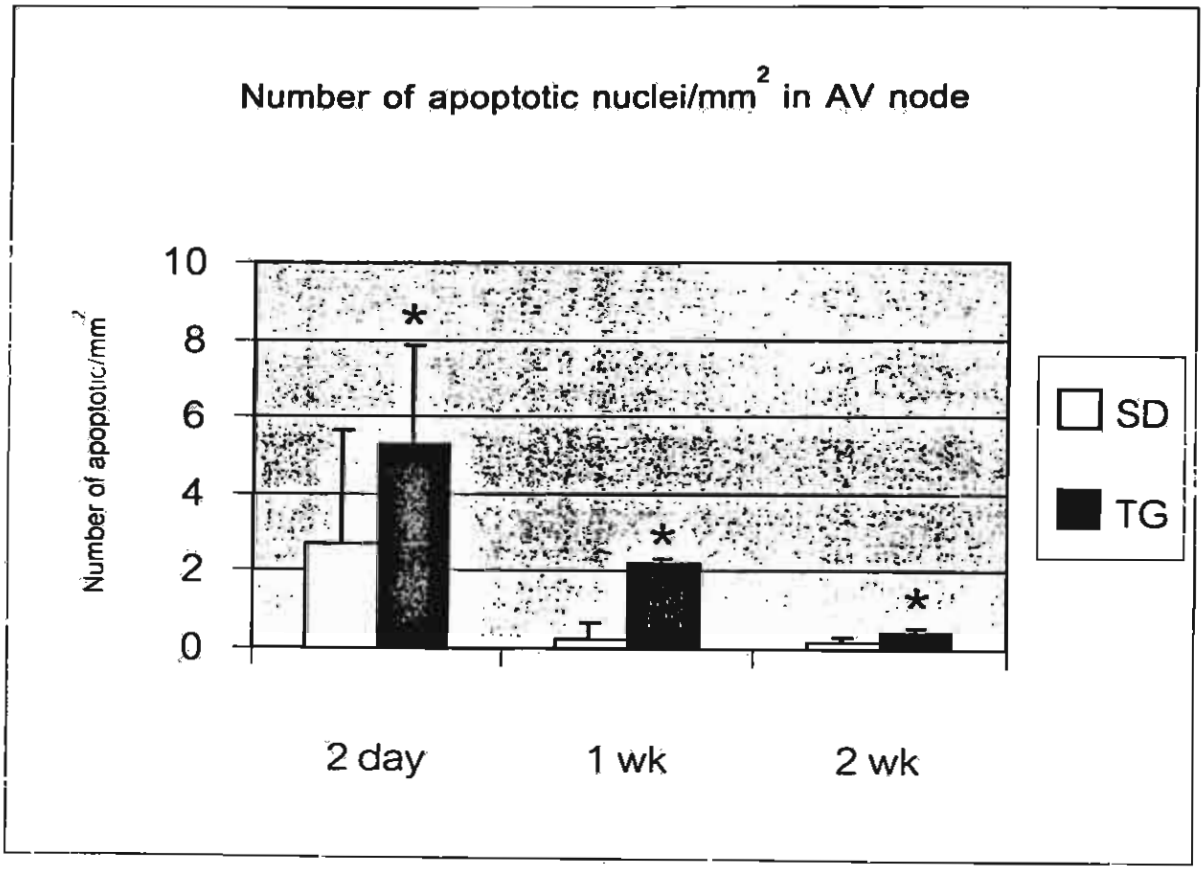


Fig. 4 Bar chart showing number of apoptotic nuclei /mm^2 in the AV node of 2-day, 1-week and 2-week SD and TG rats; data are expressed as mean± SEM, Student's T-test *P<0.05, N=6

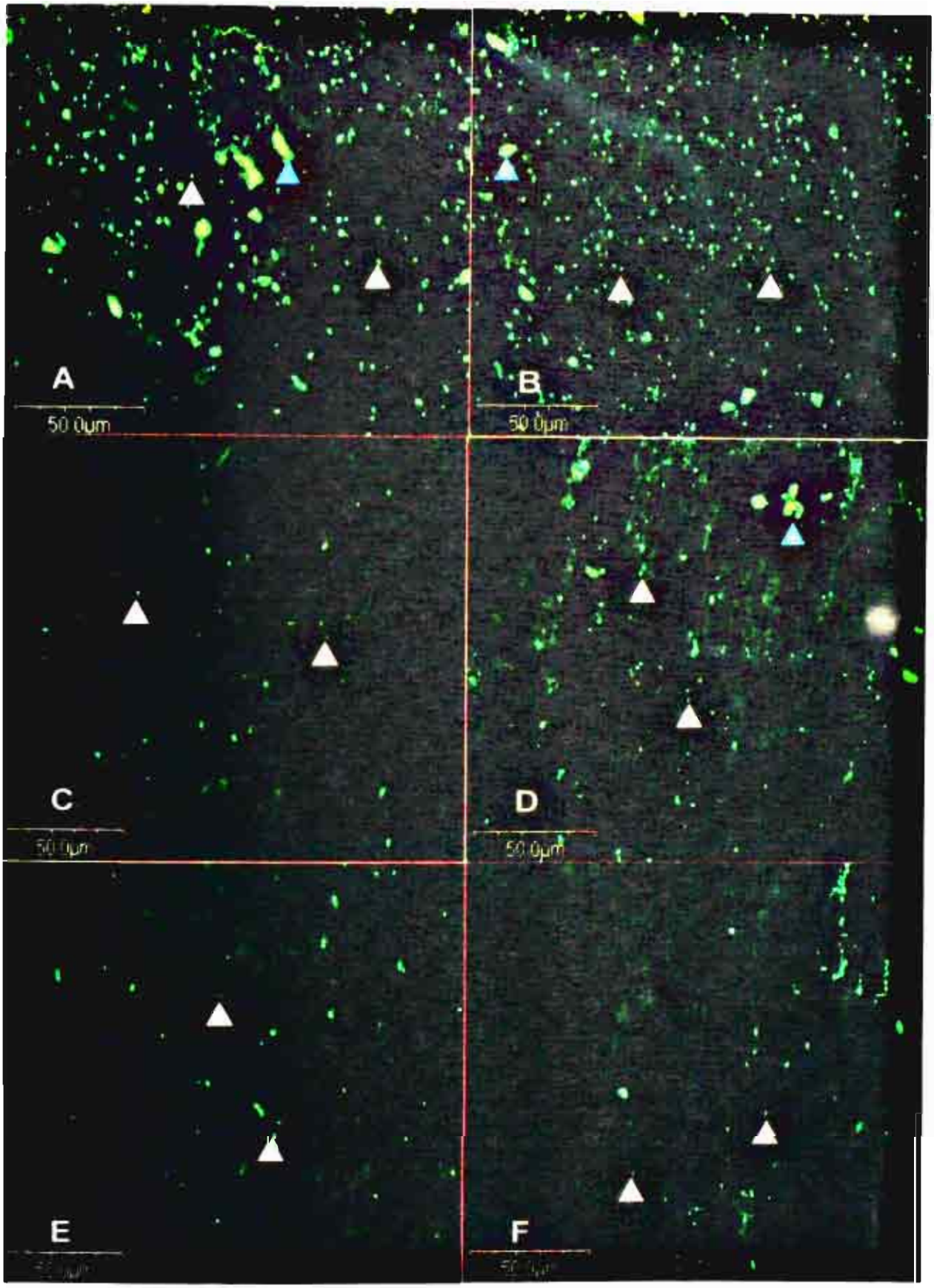


Fig. 5A-F Confocal micrographs showing the distribution of AT_1 receptors (white arrows) in sinoatrial node (SA) of (A) 2-day SD (B) 2-day TG (C) 1-week SD (D) 1-week TG (E) 2-week SD (F) 2-week TG rat hearts. blue arrows: red blood cells

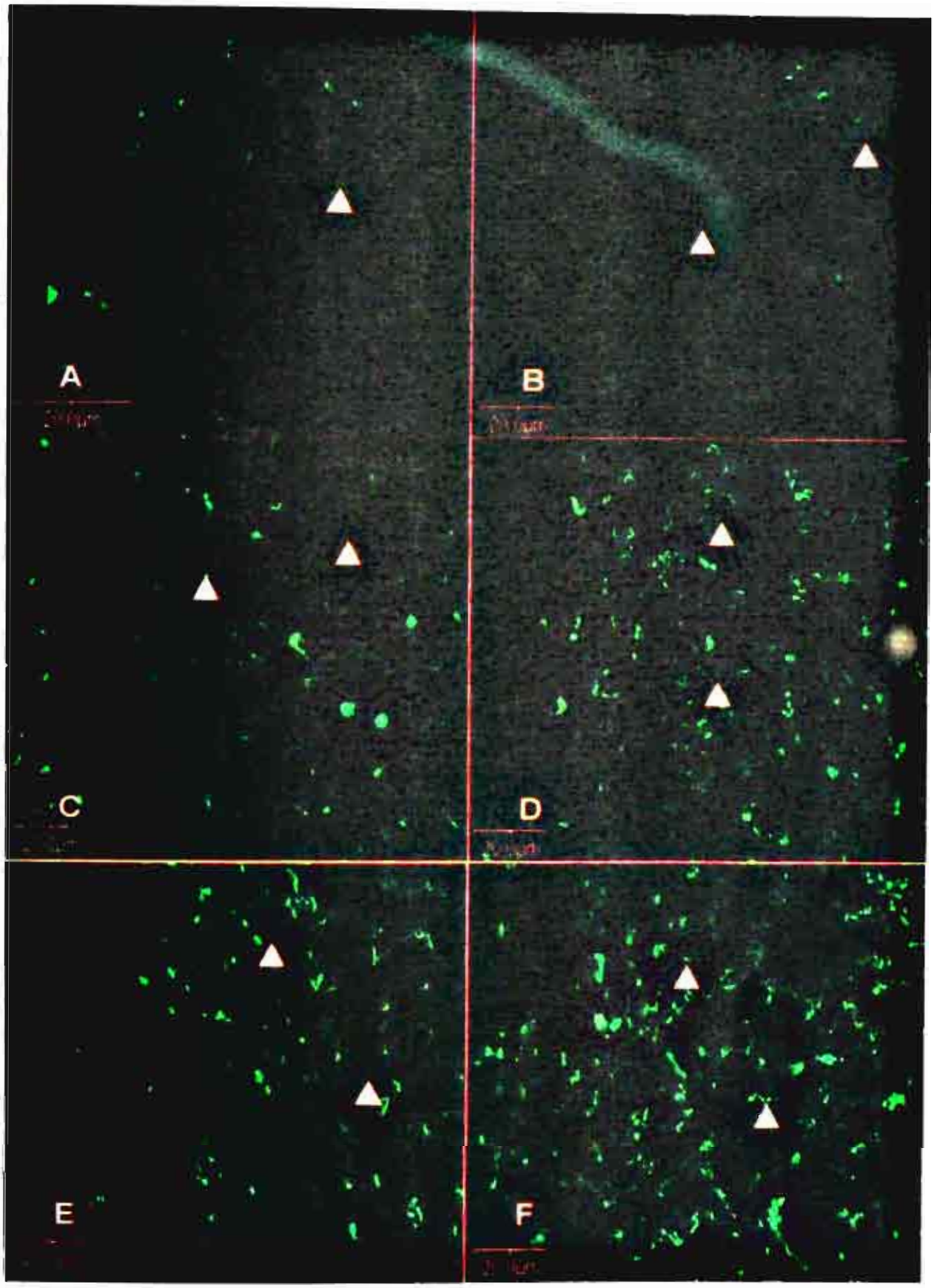


Fig. 6A-F Confocal micrographs showing the distribution of AT_1 receptors (white arrows) in atrioventricular node (AV) of (A) 2-day SD (B) 2-day TG (C) 1-week SD (D) 1-week TG (E) 2-week SD (F) 2-week TG rat hearts.

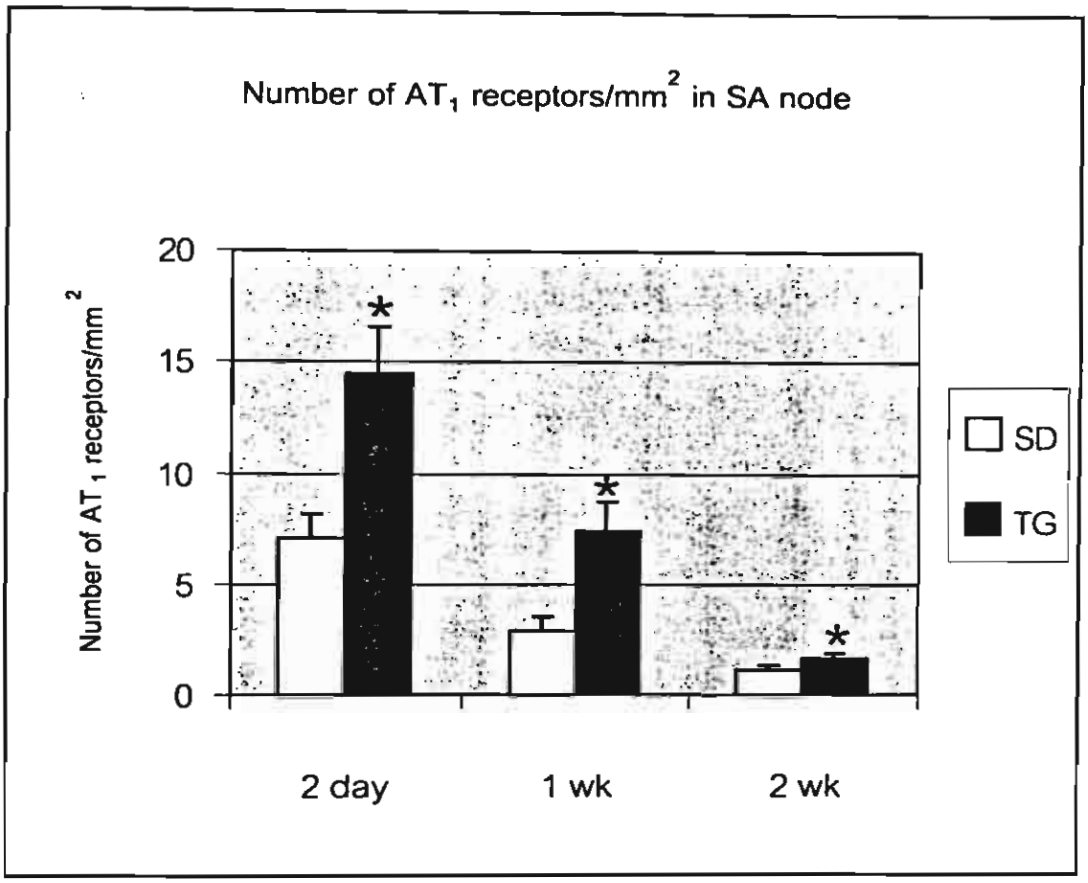


Fig. 7 Bar chart showing number of AT_1 receptors/mm^2 in the SA node of 2-day, 1-week and 2-week SD and TG rats; data are expressed as mean± SEM, Student's T-test *P<0.05, N=6

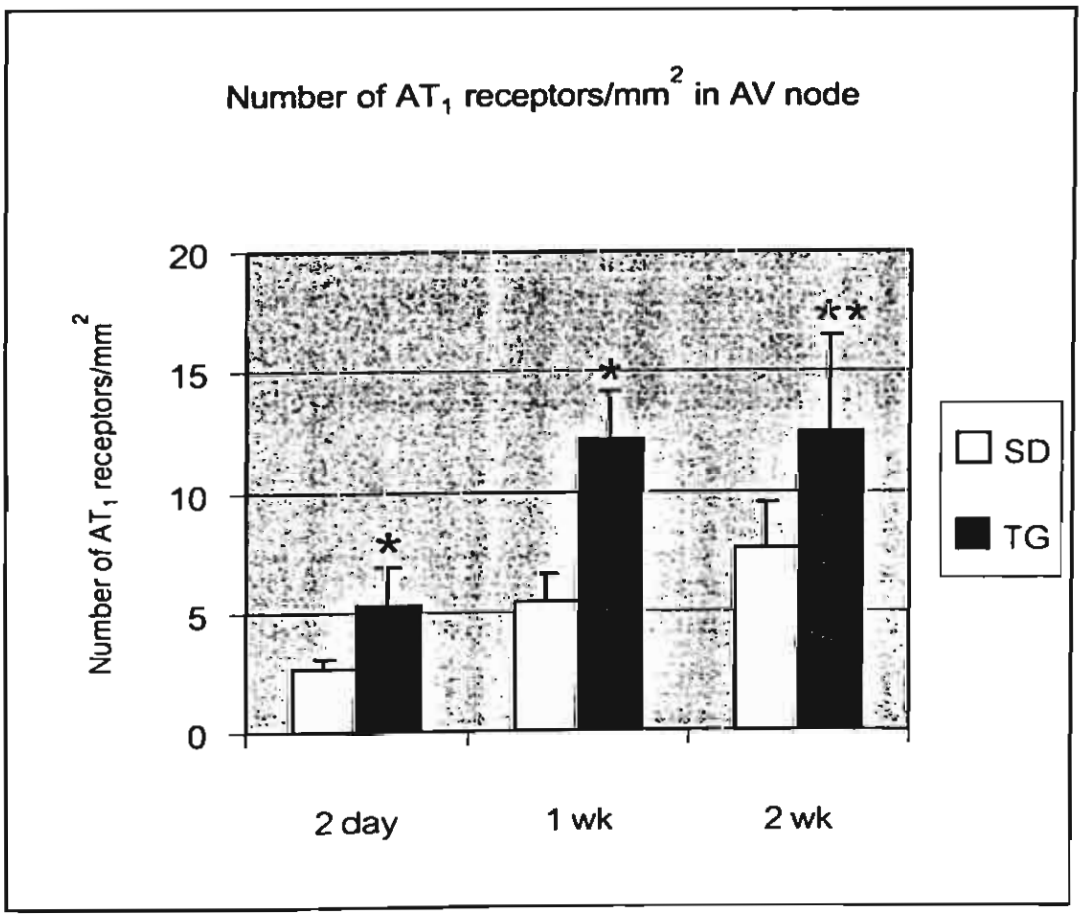


Fig. 8 Bar chart showing number of AT_1 receptors/mm^2 in the AV node of 2-day, 1-week and 2-week SD and TG rats; data are expressed as mean± SEM, Student's T-test *P<0.05, **P<0.01,N=6

Discussion

Additional renin gene in the TG results in alteration of the local renin-angiotensin system, i.e. increased angiotensin II (Ang II) in the heart (Campbell et al, 1995). Our data showed an increase of AT_1 receptors in the SA and AV nodes of TG at 2 days, 1 week and 2 weeks (when compared to that of SD) suggesting that an increase in Ang II in heart and AT_1 receptors may lead to the higher apoptosis. In the present study, we found the number of apoptotic nuclei/mm^2 in the TG to be more than that of the SD in both the SA and the AV nodes in all age–groups (2 days, 1 week and 2 weeks). The results correspond to the work of Lie et al., (2000) who demonstrated that there is an increased apoptosis in the heart of spontaneously hypertensive rat (SHR).

It has been shown that Ang II via AT_1 receptors mediates apoptosis (Cigolar et. al, 1997; Kajstura et al, 1997). Ang II binds to AT_1 receptors, what leads to an elevated influx of calcium from the extracellular space through the L-type calcium channel (Dosemea et al., 1988). Calcium is a cofactor of Ca^{2+} dependent DNase I. Therefore, an activation of DNase enzyme has occurred which induces cleavage of double-strand DNA (Peitsch et al., 1993). Thus, Ang II via AT_1 receptors may mediate apoptosis in the SA and the AV nodes similar to cardiomyocyte.

We found that the apoptosis in the SA and the AV nodes was reduced with maturation. This finding is in the line with the work of Kajstura et al, (1995) who demonstrated that apoptosis occurs immediately after birth and was reduced at day 11, after which the apoptosis could not be detected. In addition, the few weeks after birth is the major period when morphogenesis of the conduction system take place (James, 1994), and apoptosis plays an important role. This might explain the reduction of apoptosis after 2 weeks. Excess apoptosis has been demonstrated to be a possible cause of abnormal development of the AV node, SA node and internodal pathway, leading to complete heart block and arrhythmia (Jame et al, 1996). Therefore, apoptosis is possibly the principal mechanism for the pathogenesis of arrhythmia in human infants associated with an abnormal renin-angiotensin system. However, apoptosis may not explain arrhythmia in the elderly.

On its own, Ang II via AT_1 receptors has been shown to be directly involved in arrhythmia. Kass et al (1981) have demonstrated that stimulation of AT_1 receptors on the SA and AV nodes can generate spontaneous electrical activity, or alter responses to electrical stimulation. Mello (2001) has shown that activation of renin–angiotensin system results in stimulation of AT_1 receptors leading to an activation of protein kinase C. Phosphorylation of junctional protein then occurs, which causes a reduction of the junctional conductance. As a

consequence, the conduction velocity is decreased or conduction is blocked, leading to reentrant rhythms.

We have shown that the number of AT_1 receptors in the SA node in both the SD and TG is reduced from 2 days to 2 weeks whereas in the AV node, the number of AT_1 receptors is increased. According to the work of Sechi et al (1990), who demonstrated that at 10 and 14 weeks, the density of the binding sites of AT_1 receptors in AV node is high, whereas it is low in the SA node. This data confirm that AT_1 receptors in the AV node increase with maturation, but in the SA node it decreases with maturation, suggesting that at a very young age AT_1 receptors may be involved in SA node function rather than AV node, whereas in aging animals they may act on the AV node rather than on the SA node. The cause of AT_1 receptors alteration in the SA and AV node associated with age requires further investigation.

Our data has demonstrated that there are more AT_1 receptors in both the SA and the AV nodes in the TG rats in all age-groups than in the SD rats. The overexpression of AT_1 receptors has been shown to be a major cause in mediating bradycardia associated with heart block, producing a lethal phenotype within the first week after birth in MHC–AT_1 transgenic mice (Hein et al., 1997). Treatment with a selective AT_1 antagonist like CV-11974 has been shown to prevent arrhythmias in wild-type mice (Harade et al, 1998). Recently, AT_1 receptors antagonist Losartan appeared to reduce mortality in older patients with chronic congestive heart failure by 40%. This was due to fewer sudden cardiac deaths, suggesting that complete blockade of AT_1 receptor may results in preventing arrhythmia (Pitt et al., 1997). This supports the role of Ang II in associated with inducing arrhythmia.

Conclusion

From the present study, we suggest that Ang II via AT_1 receptors may induce arrhythmia. However, this may not be due to its mediating role in apoptosis, instead the reduction of the junctional conduction or reentrant rhythms may be a possible cause. Arrhythmia associated with the alteration of angiotensin when animals getting older occurs more often at the AV node than at the SA node.

Acknowledgment

With thanks to Professor Sheila Gardiner and Professor Terry Bennett for providing transgenic and Sprague Dawley rats. This work was supported by the Thailand Research Fund (TFR) under MRG4580038.

References

Campbell DJ, Rong P, Kladis A, Rees B, Ganten D, Skinner SL. Angiotensin and Bradykinin peptides in the TGR (mRen-2)27 rat. Hypertension 1995; 25: 1014-20.

Cigola E, Kajstura LB, Meggs LG, Anversa P. Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro. Exp. Cell Res 1997; 231: 363-71.

De Mello WC. Cardiac arrhythmias: the possible role of the renin-angiotensin system. J Mol Med 2001; 79: 103-8.

De Mello WC, Jan Danser AH. Angiotensin II and the heart. On the intracrine renin angiotensin system. Hypertension 2000; 35: 1183-8.

De Mello WC. Intracellular angiotensin II regulates the inward calcium current in cardiac myocytes. Hypertension 1998;32: 976-82.

De Mello WC. Is an intracellular renin-angiotensin system involved in the control of cell communication in heart?. J Cardiovasc Pharmacol 1994; 23: 640-6.

De Mello WC. Renin-angiotensin system and cell communication in the failing heart. Hypertension 1996 ;27: 1267-72.

De Mello WC, Altieri P. The role of the renin-angiotensin system in the control of cell communication in the heart; effects of angiotesin II and enalapril. J Cardiovasc Pharmacol 1992; 20: 643-51.

Harada H, Komuro I, Hayashi D, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y. Angiotensin II Type 1a receptor is involved in the occurrence of reperfusion arrhythmias. Circulation 1998; 97: 315-7.

Hein L, Steven ME, Barsh GS, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ. Overexpression of angiotensin AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block. Pro Natl Acad Sci 1997; 94: 6391-6.

James TN, Nichols MM, Sapire DW, Dipatre DL, Lopez SM. Complete heart block and fatal right ventricular failure in an infant. Circulation 1996; 93 :1588-600.

James TN, Martin E, Willis III PW, Lohr TO. Apoptosis as a possible cause of gradual development of complete heart block and fatal arrhythmias associated with absence of the AV node, sinus, and internodal pathways. Circulation 1996 ; 93: 1424-32.

James TN. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart: from postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. Circulation 1994; 90(1): 556-73.

James TN. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. Annu Rev Physiol 1998; 60: 309-25.

Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs LG et al. Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. J Mol cell cardiol 1997; 29: 859-70.

Kajstura J, Mansukhani M, Cheng W, Reiss K, Kralewski S, Reed JC, et al. Programmed cell death and expression of the protooncogene bcl-2 in myocytes during postnatal maturation of the heart. Exp Cel Res 1995; 219: 110-21.

Kass RS, Blair ML. Effects of angiotensin II on membrane current in cardiac Purkinje fibers. J Mol Cell Cardiol 1981; 13: 797-809.

Lee M, Bohm M, Kim S, Bachmann S, Bachmann J, Badder M, et al. Differential gene expression of renin and angiotensin in the TGR (mREN-2)27 transgenic rat. Hypertension 1995; 25: 570-80.

Liu JJ, Peng L, Bradley CJ, Zulli A, Shen J, Buxton BF. Increased apoptosis in the heart of genetic hypertension, associated with increased fibroblasts. Cardiovasc Res 2000; 45: 729-35.

Marrere MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaire P, et al. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT_1 receptor. Nature 1995; 375: 247-59.

Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type – 1 angiotensin II receptor. Nature 1991; 351: 233-6.

Myerburg RJ, Kessler KM, Castellanos A. Sudden cardiac death: epidemiology, transient risk, and intervention assessment. Ann Intern Med 1993; 119: 1137-97.

Pitt B, Segal R, Martinez FA, Meurers G, Cowley AJ, Thomas I, et al. Randomised trial of losartan versus captopril in patients over 65 with heart failure (Evaluation of Losartan in the Elderly Study, ELITE). Lancet 1997; 349: 747-52.

Sarraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. Cardiovasc Res 2000; 45: 528-37.

Sechi LA, Griffin CA, Grady EF, Kalinyak JE, Schambelan M. Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart. Circ Res 1992; 71: 1482-9.

Timmermans PBMWM, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists, Pharmacol Rev 1993; 45(2): 206-51.

Yaoita H, Ogawa K, Machara K, Maruyama Y. Apoptosis in relevant clinical situations contribution of apoptosis in myocardial infarction. Cardiovasc Res 2000; 45: 630-41.