

허혈후 칼슘 결핍 용액의 재관류가 적출 관류 기니피크 심근 세포에 미치는 영향에 관한 전자현미경적 관찰

오승환 · 김호덕 · 라봉진

An Electron Microscopic Study on the Effect of Calcium-free Reperfusion in Isolated Perfused Guinea Pig Heart after Global Ischemia

Oh, Seung Hwan, Ho Dirk Kim and Bong Jin Rah

(Received February 3, 1990)

Abstract

The effect of calcium-free reperfusion for 5, 10, and 15 minutes, respectively, followed by continuous reperfusion with normal Tyrode solution containing 1.0mM calcium chloride, after global ischemia in the isolated perfused guinea pig heart by Langendorff techniques was examined with transmission electron microscope.

Compared to the nomal Tyrode solution-perfused control hearts, the 5 minute calcium-free-reperfused hearts showed loss or thickening of Z lines, focal sarcolemmal disruption, mitochondrial swelling, clumping of chroma-tin, intracellular fluid accumulation, and some separation of cell junctions, especially the fasciae adherentes. These changes became more severe in the hearts of 10 minute calcium-free reperfusion. Subsarcolemmal larger bleb and near complete separation of cell junctions were noticed. In the 15 minute calcium-free-reperfused hearts, irreversible ultrastructural changes including contraction bands, bizarre mitochondria, and sarcolemmal destruction were widely distributed. The severity of myocardial changes were in accordance with the duration of calcium-free reperfusion.

These changes indicate that calcium-free reperfusion regardless of its duration could not salvage the post-ischemic myocardium probably due to development of calcium paradox.

서 론

포유 동물의 심장의 수축, 이완은 세포간

질로부터 유입되는 심근 세포내 자유칼슘(intracytoplasmic free calcium)의 증가, 감소에 의한 수축 기전에 따라 일정하게 유지되

고 있음은 잘 알려져 있다(Rüegg, 1988). 칼슘 paradox라는 용어는 칼슘이 고갈된 용액으로 관류하고 칼슘을 재투여했을 때 심장에서 막대한 심근세포 손상이 발생된다는 실험 결과를 서술하기 위하여 처음 소개되었다(Zimmerman과 Hülsmann, 1966). 이러한 paradox 현상은 칼슘이 고갈된 용액으로 장시간 관류하고 다시 칼슘을 재투여했을 때 발생한다고 하며(Tomlinson들, 1974), 개심술(open-heart surgery) 후 재순환의 실시를 비롯하여 혀혈 또는 혀혈후 나타나는 부행로(collateral)의 발생 등의 경우에서와 같이 칼슘이 고갈 상태에 노출될 수 있는 경우 칼슘 paradox 현상이 발생할 가능성이 있기 때문에 심장 연구자들에게는 많은 관심의 대상이 되어오고 있다 (Sharman들 1975 ; Hearse, 1977 ; Singal들 1979 ; Øksendal들 1985 ; Daly들 1987). 칼슘 paradox로 인한 심근세포의 손상은 재관류에 의하여 심근 세포내로 유입되는 칼슘의 빠른 증가에 의한 과부하 때문인 것으로 알려져 있으며(Nayler들, 1984), 뿐만 아니라 이러한 칼슘 과부하는 혀혈이나(Shen과 Jennings, 1972 ; Jennings들, 1975) catecholamine의 투여로(Bloom과 Cancilla, 1969 ; Bloom과 Davis, 1972 ; Fleckenstein들, 1973) 인한 심근 괴사의 발생에 있어서 중심 역할을 할 것이라는 점에 대하여는 이론이 없다.

한편, 최근에는 칼슘 길항제를 투여하거나 (Watts들, 1980 ; Bourdillon과 Polle-Wilson, 1982 ; Fleckenstein, 1983 ; Kim과 Rah, 1988) 매우 낮은 농도의 칼슘을 포함한 용액으로 재관류하여 줌으로써(Shine들, 1978 ; Nayler과 Grinwald, 1981 ; Chappell들, 1983 ; Diggerness들, 1983) 혀혈 손상을 개선시킬 수 있다는 결과가 많다.

이상으로 저자는 일과성 혀혈후 초기 재관류시 칼슘이 결핍된 용액으로 재관류할 경우 칼슘 paradox현상 유발의 가능성과 이들이 혀혈 심근의 미세구조 변화에 미치는

영향을 관찰하고자 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

일정한 환경 하에서 12시간-12시간의 명암 주기에 따라 순응시켜 복합사료와 물을 제한없이 주어 사육한 건강한 기니픽(guinea pig)을 암수 구별없이 실험 동물로 사용하였다.

2. 관류액

본 실험에서는 NaCl 140.0 mM, KCl 4.4mM, CaCl₂ 1.0mM, MgCl₂ 1.0mM, HEPES buffer 3.0mM로 조제된 Tyrode용액을 표준 관류액으로 사용하였고, 표준 관류액의 조성 성분 중에서 CaCl₂만을 제외하고 EDTA 0.2mM을 첨가하여 만든 용액을 칼슘 결핍 관류액으로 사용하였다. 모든 관류액을 사용 직전에 glucose(10.0mM)를 첨가하고 pH를 7.4로 조정하여 액온 37°C, 관류량 10ml/min, 관류압 80 ± 5 cmH₂O로 유지하면서 관류하였다.

3. 실험 protocol

3-1. 실험 동물의 처치

실험 동물의 후두부를 강타하여 실신시킨 후 흉벽을 절개하여 심장을 노출시킨 다음 대동맥궁(aortic arch)의 기시 적진 부위를 절개하여 15G의 stainless-steel 카뉼라를 삽관하고 결찰한 후 곧 심장을 적출하여 non-recirculating Langendorff 방법(Döhring과 Dehnert, 1985)에 따라 관류하였다.

3-2. 실험방법

정상 대조군 (n=5) : 3-1의 방법에 따라 20-25분 동안 표준 Tyrode용액으로 관류하여 일정 상태를 유지하게 한 심장을 정상 대조군으로 하였다.

허혈후 재관류군 (n=11) : 3-1의 방법에 따라 20-25분 동안 표준 Tyrode용액으로 관류한 후 10분 동안 관류를 차단하여 허혈 상태(global ischemia)를 만든 다음 일부(n=4)는 칼슘 결핍 관류액으로 5분, 다른 일부(n=3)는 10분, 그리고 나머지 일부(n=4)는

15분 동안 초기 재관류한 후 표준 Tyrode 용액으로 재관류하여 서로 정상 대조군과 비교하였다. 재관류의 전 기간은 20분을 초과하지 않았다.

3-3. 전자현미경 관찰

각 실험의 종료 직후 심장을 심정지 용액에 침적시켜 박동을 멈추게한 후 4°C에서 2.5% glutaraldehyde(in 0.1M phosphate buffer, pH 7.2)로 관류 고정하였다(Kim과 Rah, 1987). 고정 후 같은 용액내에 10시간 이상 침적하고 1% osmium tetroxide로 후 고정한 후 ethanol에 탈수 및 propylene oxide 침투 과정을 거쳐 통상적으로 처리하여 Epon 812에 포매하였다. 2 μ m 두께의 박절편을 만들어 toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰한 후 대표적이라고 생각되는 block 을 선택하여 30–50nm의 초박절편을 만들어 uranyl acetate 및 lead citrate로 이종 염색하여 Jeol 200CX 투과전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. 정상 대조군

대부분의 심근세포에서 미세구조는 잘 보존되어 있었다(Fig. 1). 심근세포는 내측으로는 단층의 세포막(sarcolemma)과 외측으로는 중등도의 전자 밀도를 가진 외판당피(glycocalyx 또는 cell coat)로 둘러싸여 있었다. 핵은 정방형으로 심근 세포의 중앙에 위치하고 있었으며 핵 또한 단층의 막으로 둘러싸여 있었고 핵질내에는 염색질들이 비교적 균질하게 산재해 있었다. 횡소관(transverse tubule)의 크기는 여러 가지로 나타났으며 외측으로는 단층의 막과 외판당피양의 층으로 구성되어 있었다. 근절(sarcomere)은 대부분이 이완 상태로 나타났으며 A대, I 대, M대, Z선, N선 등이 뚜렷하였으며 이를 일정한 간격을 두고 규칙적으로 배열되어 있었다. 심근원섬유(myofibril) 사이 사이에는 많은 수의 여러 가지 모양의 사립체

들이 위치하고 있었으며 사립체능이 매우 치밀하였고 사립체 기질은 강한 전자 밀도를 나타내었다. 사립체 사이에서 자주 지방소적들이 관찰되었으며 많은 수의 당원과립을 관찰할 수 있었다. 그러나 근형질세망(sarcoplasmic reticulum)은 자주 관찰되지 않았다. 세포 결합부는 전형적인 Z자 모양으로 부착반(desmosome), 부착대(fascia adhens), 열극연결(nexus) 등의 세포간 특수연접을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

2. 허혈후 재관류군

허혈후 칼슘 결핍 관류액으로 재관류하여 준 대부분의 심근세포에서는 근절이 이완되어 있거나 혹은 수축되어 있는 상태로 관찰되었다.

칼슘 결핍 관류액으로 5분동안 재관류하여준 심근세포의 일부의 근절에서는 I 대가 과이완(overstretch)되어 Z선은 거의 소실되어 있었으며(Fig. 3) 수축을 보인 근절에서는 Z선이 비후되어 있었다(Fig. 4). 심근세포막은 국소적으로 파괴를 보이는 곳이 자주 관찰되었으며 세포내에 수분 축적을 보이는 곳도 빈도는 적으나 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 손상을 입지 않은 사립체도 있었으나 많은 사립체는 종창을 나타내었으며 사립체능이 가늘어 지거나 혹은 종창되어 있는 것도 자주 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 염색질은 응집하여 핵막 주위로 이동한 것이 자주 관찰되었으나 당원과립이나 지방소적은 비교적 상당수 존재하였다. 세포 결합부는 정도의 차이는 있으나 분리를 보이는 곳이 많았으며 특히 부착대의 분리는 매우 뚜렷하였다(Fig. 7).

칼슘 결핍 관류액으로 10분 동안 재관류하여준 심근세포에서는 외판당피와 심근 세포막이 분리되어 그 사이에 비교적 큰 수포가 형성되어 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 8). 이와 더불어 세포 결합부는 심하게 분리되어 있었으며 특히 부착대는 거의 완전히 분리되어 나타났다(Fig. 9). 세포내 수분 축

적을 보이는 곳도 비교적 자주 관찰할 수 있었다.

칼슘 결핍 관류액으로 15분 동안 재관류하여 심근세포에서는 미세구조의 비가역적인 변화를 관찰할 수 있었다. 세포내 수분 축적 및 심근 세포막하의 수포 형성 등은 흔히 관찰되었고 근절의 과수축(hypercontraction)에 의하여 생긴 수축대(contraction band)를 자주 관찰할 수 있었다(Fig. 10). 뿐만 아니라 세포 결합부는 완전히 분리되어 있거나 거의 분리되어 정상의 구조를 보이는 곳은 매우 드물었으나(Fig. 11) 열극연결은 비교적 잘 보존된 곳이 종종 관찰되었다. 사립체는 그 모양이 변형되어 사립체능은 매우 bizarre한 형태를 나타내었으며 사립체내에서는 전자 밀도가 다소 높은 비교적 큰 과립들을 자주 관찰할 수 있었다.

고 칠

저자들은 적출 관류 기니픽 심장(isolated perfused guinea pig heart)을 이용하여 10분 동안의 전체적 허혈(global ischemia) 후 20분 동안의 재관류 중 5분, 10분, 15분 동안의 재관류 초기에 칼슘이 포함되지 않은(Ca^{2+} -free) 관류액으로 각각 관류하고 이어서 정상농도(1.0mM)의 칼슘이 포함된 관류액으로 관류하였을 때 허혈심근에서 나타나는 미세구조의 변화를 기술하였다.

종(species)에 따라 정도의 차이는 있으나 비교적 단기간 동안의 허혈(transient ischemia)에 의하여 심근세포에서는 심근 세포막의 국소적 파괴, 사립체의 종창, 염색질의 응집 및 이들의 핵막 주위로의 이동, 근절의 단축, 심근원섬유의 파괴, 당원과립 및 지방 소적의 고갈, 세포결합부의 분리 등 미세구조의 변화가 유발됨은 흰쥐(McCallister들, 1979; Edoute들, 1981; Ganote와 Heide, 1987), 기니픽(Chase들, 1978; Kim들, 1989a), 토끼(Hoelscher들, 1961), 혹은 잡종견(Shen과 Jennings, 1972); Schaper들, 1979)을 대

상으로 한 실험을 통하여 비교적 자세히 밝혀져 있으며 이와 같은 미세구조의 변화는 심근세포내의 칼슘 농도와 매우 밀접한 관계가 있음을 잘 알려진 사실이다(Nayler과 Grinwald, 1981; Murphy들, 1985; Kim과 Rah, 1988).

실험적으로 포유동물의 심근세포에서 가역적인 미세구조의 변화를 나타낼 수 있는 허혈의 지속 기간(가역역, reversible period)은 연구자에 따라 다소간의 차이는 있으나 대개 15~20분 정도로 알려져 있다(Jennings, 1969; DeBoer들, 1980; Jenning들, 1985). 그러나 심근세포의 손상 정도는 반드시 허혈의 지속 기간과 비례하는 것은 아니며 (Schaper들, 1985), 허혈의 지속 기간이 가역역에 있다 하더라도 심근세포는 재관류를 해줌에도 불구하고 기능이상이 장시간 지속되거나 (Heyndrickx들, 1975; Weiner들, 1976; Ellis들, 1983) 허혈후보다 더욱 심한 미세구조의 변화를 나타낼 수 있다(Kim들, 1989b)는 실험 결과들이 많으며 이러한 재관류 손상을 유발함에 있어서 칼슘이 중심적인 역할을 하리라는 견해에 여러 연구자들 사이에 일치를 보이고 있다(Nayler, 1981; Ferrari들, 1982; Nayler들, 1988). 그러나 관상동맥을 통하여 적절히 재관류를 시행하는 방법 이외에는 허혈 손상에 빠진 심근세포의 기능을 재건하고 미세구조의 변화를 억제하기 위한 방법은 아직까지는 없다 (Hearse, 1977). 따라서 이상과 같은 재관류 손상을 줄이기 위하여 칼슘 길항제(calcium antagonist)로 알려진 여러 가지의 약물들이 재관류전이나 재관류중에 자주 사용되고 있으나 그 효과에 대하여는 논란이 많다.

칼슘 길항제는 종류에 따라 작용기전에는 서로 차이가 있지만 심근세포막에서 세포내로 유입되는 칼슘을 차단하거나(Kim과 Rah, 1988) 사립체에서 칼슘 흡수가 증가되도록 하며(Vaghy들, 1982) 혹은 세포내 칼슘 저장고로 부터 세포질내로의 방출을 억제하여

(Sutton과 Morad, 1987) 심근세포에 대하여 칼슘 과부하를 막아줌으로서 심근 보호 작용이 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 점으로 보면 재관류시 칼슘이 포함되지 않은 관류액을 사용할 경우 심근세포에 대하여 적어도 칼슘 과부하는 주지 않기 때문에 칼슘 길항제를 사용한 경우와 유사한 결과를 기대할 수 있다. 그러나 이와는 대조적으로 본 실험에서는 상당한 미세구조의 변화를 관찰할 수 있었다. 즉 칼슘 결핍 관류액으로 5분동안 재관류하여 준 심근세포에서는 허혈에 의하여 유발되는 것으로 알려진 여러 가지의 미세구조의 변화와 함께 근절의 I대가 과이완 또는 과수축으로 Z선이 소실되거나 비후되어 있었으며 특히 세포결합부는 뚜렷이 분리되어 있었다. 이와 같은 변화는 칼슘 결핍 관류액으로 관류하여 준 시간이 길어질수록 더욱 심화되었다. 10분 동안의 재관류로 심근세포에서는 세포막에서 큰 수포형성을 비롯하여 보다 심하게 세포결합부 특히 부착대의 분리가 나타났으며, 15분 동안의 재관류에 의하여는 수축대(contraction band)의 출현, bizarre한 형태의 사립체등 비가역적인 변화와 함께 세포결합부의 완전 분리를 볼 수 있었다. 다시 말하면 심근세포 손상의 정도는 칼슘 결핍 관류액으로 관류하여준 기간과 거의 비례하고 있고 특히 세포결합부의 분리나 사립체의 변형 등은 칼슘 paradox(Øksendal들, 1985 ; Daly들, 1987)시 관찰되는 소견과 매우 유사함을 알 수 있다.

본 실험에서와 같이 적출 심장에서 관류를 차단하여 허혈을 일으킨 경우 재관류를 하지 않는 한 세포막을 통한 칼슘의 유동은 거의 일어날 수 없거나 억제될 것이며 근형 질세망 등에 저장 혹은 수축기중에 유리될 수 있는 칼슘도 매우 적기 때문에 심근세포는 칼슘 고갈 상태에 놓이게 된다. 이에 더하여 칼슘 결핍 관류액으로 재관류할 경우 심근세포는 더욱 더 칼슘 고갈에 빠지게 되

며 이와 같은 상태에서 칼슘을 재투여하였을 경우 이로 인하여 발생한 상대적으로 강한 장력때문에 칼슘 고갈로 이미 약화되어 있던 세포결합부가 분리를 일으키며 Z선이 소실 혹은 비후되고 동시에 심근 세포막까지도 파괴되는 것으로 추측된다(Nayler들, 1984 ; Daly들, 1987). 이렇게 심근세포에 치명적인 결과를 가져온 것으로 미루어 칼슘 결핍 관류액으로 재관류한다는 것은 칼슘 paradox유발 가능성이 매우 높기 때문에 기간에 관계없이 재관류중 특히 초기에는 사용해서는 않을 것으로 생각된다.

결 론

적출 관류 기니피 심장에서 허혈후 5, 10, 및 15분 동안 칼슘 결핍 용액으로 각각 재관류하고 계속해서 정상 농도의 칼슘을 포함한 용액으로 재관류하였을 때 심근세포의 변화를 투과전자현미경으로 관찰하였다.

정상 Tyrode용액으로 관류하여준 대조군에 비하여 5분 동안 칼슘 결핍 용액으로 재관류하여 준 심근세포에서는 Z선의 소실 혹은 비후, 국소적 심근 세포막의 파괴, 사립체의 종창, 염색질의 응집, 심근세포내 수분 축적, 세포결합부 특히 부착대의 분리 등이 관찰되었으며 이들의 변화는 칼슘 결핍 용액으로 재관류하여준 시간이 길어질수록 심해졌다. 10분 동안 칼슘 결핍 용액으로 재관류하여준 심근세포에서는 심근 세포막하에 큰 수포의 형성과 세포결합부의 분리가 더욱 뚜렷하여졌으며 15분 동안 칼슘 결핍 용액으로 재관류하여준 심근세포에서는 수축대의 형성, bizarre한 형태의 사립체, 심근 세포막의 파괴등 비가역적인 변화가 관찰되었다.

이상의 결과로 미루어 칼슘 결핍 용액으로 재관류함은 재관류 기간과 관계없이 칼슘 paradox 현상을 유발할 가능성이 매우 크기 때문에 허혈 심근세포는 소생할 수 없을 것으로 생각된다.

References

- Bloom, S. and P.A. Cancilla. 1969. Myocytolysis and mitochondrial calcification in rat myocardium after low doses of isoproterenol. *Am. J. Pathol.* 54, 373-391.
- Bloom, S. and D.L. Davis. 1972. Calcium as mediator of isoproterenol-induced myocardial necrosis. *Am. J. Pathol.* 69, 459-470.
- Bourdillon, P.D. and P.A. Poole-Wilson. 1982. The effect of verapamil, quiescence, and cardioplegia on calcium exchange and mechanical function ischemic rabbit myocardium. *Circ. Res.* 50, 360-368.
- Chappell, S. P., M. J. Lewis and A. H. Henderson. 1983. Myocardial reoxygenation damage can be circumvented(abstact). *J. Mol. Cell. Cardiol.* 15(Suppl), 392.
- Chase, D., K. Dasse, A.H. Goldberg and W.C. Ullrick. 1978. Influence of acute hypoxia on Z-line width of cardiac muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 10, 1077-1080.
- Daly, M.J., J.S. Elz and W.G. Nayler. 1987. Contracture and the calcium paradox in the rat heart. *Circ. Res.* 61, 560-569.
- DeBoer, L.W.V., J.S. Ingwall, R.A. Kloner and E. Braunwald. 1980. Prolonged derangements of canine myocardial purine metabolism after a brief coronary artery occlusion not associated with anatomic evidence of necrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 5471-5475.
- Diggerness, S.B., W.G. Tracy, N.F. Andrews, B. Bowdoin and J.W. Kirklin. 1983. Reversal of myocardial ischemic contracture and the relationship to functional recovery and tissue calcium. *Circulation.* 68(Suppl 2), 34-40.
- Döhring, H.J. and H. Dehnert. 1985. Das isolierte Warmblüter-Herz nach Langendorff. 1st ed. Biomesstechnik. Mach. pp. 10-27.
- Edoute, Y., D. Sanan, A. Lochner, D. Graney and J.G.N. Kotze 1981. Effects of propranolol on myocardial ultrastructure, mitochondrial function and high energy phosphates of isolated working rat hearts with coronary artery ligation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 13, 619-639.
- Ellis, S.G., C.I. Henschke, T. Sandor, J. Wynne, E. Braunwald and R.A. Kloner. 1983. Time course of functional and biochemical recovery of myocardium salvaged by reperfusion. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1, 1047-1055.
- Ferrari, R., F. Di Lisa, R. Raddina and O. Vissioli. 1982. The effects of ruthenium red on mitochondrial function during post-ischaemic reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 14, 737-740.
- Fleckenstein, A. 1983. Reduction by calcium antagonists of the myocardial oxygen requirement. In : Calcium Antagonism in Heart and Smooth Muscle. Wiley & Sons. London. pp. 101-108.
- Fleckenstein, A., J. Janke, H.J. Dohring and O. Pachinger. 1973. Ca overload as the determinant factor in the production of catecholamine-induced myocardial lesions. In : Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism. E. Bajusz, et al(eds). vol 2. University Park Press. Baltimore. pp. 455-466.
- Ganote, C.E. and R.S.V. Heide. 1987. Cytoskeletal lesions in anoxic myocardial injury. A conventional and high-voltage electron microscopic and immunofluorescence study. *Am. J. Pathol.* 129, 327-344.

- Hearse, D.J. 1977. Reperfusion of the ischemic myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 9, 605-616.
- Heyndrickx, G.R., R.W. Millard, R.J. McRitchie, P.R. Maroko and S.F. Vatner. 1975. Regional myocardial, functional, and electrophysiological alterations after brief coronary occlusion in conscious dog. *J. Clin. Invest.* 56, 978-985.
- Hoelscher, B., O.H. Just and H.J. Merker. 1961. Studies by electron microscope on various forms of induced cardiac arrest in dog and rabbit. *Surgery*. 49, 492-499.
- Jennings, R.B. 1969. Early phase of myocardial ischemic injury and infarction. *Am. J. Cardiol.* 24, 753-765.
- Jennings, R.B., J. Schaper, M.L. Hill, C. Jr. Steenbergen and K.A. Reimer. 1985. Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure. *Circ. Res.* 56, 262-278.
- Jennings, R.B., C.E. Ganote, R.A. Kloner, D.A. Jr. Whalen and D.G. Hamilton. 1975. Explosive swelling of myocardial cells irreversibly injured by transient ischemia. In : Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism. A. Fleckenstein and G. Rona(eds). vol 6. University Park Press. Baltimore. pp. 405-413.
- Kim, H.D. and B.J. Rah. 1987. Fixation of heart by modified vascular perfusion. *Chung-ang J. Med.* 12, 603-610.
- Kim, H.D. and B.J. Rah. 1988. Effects of diltiazem on isoproterenol- or Ca-induced ventricular myocardial cell injuries in isolated perfused rabbit heart: an electron microscopic study. *Anat. Rec.* 222, 260-271.
- Kim, H.D., H.S. Kim and B.J. Rah. 1989a. Effect of exogenous Ca^{2+} concentration on the ischemic reperfused guinea pig heart: an electron microscopic study. *Korean J. Anat.* 22, 21-37.
- Kim, Y.M., H.D. Kim and B.J. Rah. 1989b. Changes of the ultrastructure and Ca^{2+} distribution after ischemia and after reperfusion in the myocardial cells of isolated perfused guinea pig heart. *Korean J. Electr. Microsc.* 19, 1-18.
- McCallister, L.P., S. Trapukdi and J.R. Neely. 1979. Morphometric observations on the effects of ischemia in the isolated perfused rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 11, 619-630.
- Murphy, E., R. Jacob and M. Lieberman. 1985. Cytosolic free calcium in chick heart cells. Its role in cell injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 17, 221-231.
- Nayler, W.G. 1981. The role of calcium in the ischemic myocardium. *Am. J. Pathol.* 102, 262-270.
- Nayler, W.G. and P. Grinwald. 1981. Calcium entry blockers and myocardial function. *Fed. Proc.* 40, 2855-2861.
- Nayler, W.G., S. Panagiotopoulos, J.S. Elz and M.J. Daly. 1988. Calcium-mediated damage during post-ischemic reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 20(Suppl 2), 41-54.
- Nayler, W.G., S.E. Perry, J.S. Elz and M. J. Daly. 1984. Calcium, sodium and the calcium paradox. *Circ. Res.* 55, 227-237.
- Øksendal, A.N., P. Jynge, O.F.M. Sellevold, S. Rovetvath and T. Saetersdal. 1985. The calcium paradox phenomenon: a flow rate and volume response study of calcium-free reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 17, 959-972.
- Rüegg, J.C. 1988. The vertebrate heart :

- modulation of calcium control. In : Calcium in Muscle Activation. Springer. Berlin. pp. 165-200.
- Schaper, J., J. Mulch, B. Winkler and W. Schaper. 1979. Ultrastructural, functional, and biochemical criteria for estimation of reversibility of ischemic injury : a study on the effects of global ischemia on the isolated dog heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 11, 521-541.
- Schape, J., R.V. Essen, B. Messmer, S. Effert and F. Hehrlein. 1985. Effect of ischemia and reperfusion on myocardium from patients with coronary heart disease. *Bilbthca. cardiol.* 39, 3-13.
- Sharman, G.P., K.G. Varley, S.W. Kim, J. Barwinsky, M. Cohen and N.S. Dhalla. 1975. Alterations in energy metabolism and ultrastructure upon reperfusion of the ischemic myocardium after coronary occlusion. *Am. J. Cardiol.* 36, 235-243.
- Shen, A.C. and R.B. Jennings. 1972. Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. *Am. J. Pathol.* 67, 417-440.
- Shine, K. I., A. M. Douglas and N. V. Ricchiuti. 1978. Calcium, strontium and barium movements during ischaemia and reperfusion in rabbit ventricle. Implications for myocardial preservation. *Circ. Res.* 43, 712-720.
- Singal, P.K., M.P. Matsukubo, and N.S. Dhalls. 1979. Calcium-related changes in the ultrastructure of mammalian myo-
cardium. *Br. J. Exp. Path.* 60, 96-106.
- Sutton, M. St. J. and M. Morad. 1987. Mechanisms of action of diltiazem in isolated human atrial and ventricular myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 19, 497-508.
- Tomlinson, C.W., J.C. Yates and N.S. Dhalla. 1974. Relationship among changes in intracellular calcium stores, ultrastructure, and contractility of myocardium. In : Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism. N.S.Dhalla and G. Rona(eds). vol 4. University Park Press. Baltimore. pp. 331-345.
- Vaghy, P.L., D. Johnson, M. Matlieb, T. Wang and A. Schwartz. 1982. Selective inhibitor of Na^+ -induced Ca^{2+} release from heart mitochondria by diltiazem and certain other Ca antagonist drug. *J. Biol. Chem.* 257, 6000-6002.
- Watts, J.A., C.D. Koch and K.F. LaNoue. 1980. Effects of Ca^{2+} antagonism on energy metabolism : Ca^{2+} and heart function after ischemia. *Am. J. Physiol.* 238, H909-H916.
- Weiner, J.M., G.S. Apstein, J.H. Arthur, F.A. Pirzada and W.B. Jr. Hood. 1976. Persistence of myocardial injury following brief periods of coronary occlusion. *Cardiovasc. Rec.* 10, 678-686.
- Zimmerman, A.N. and W.C. Hülsmann. 1966. Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. *Nature* 211, 646-647.

Figure Legends

Fig. 1. Tyrode solution-perfused control group. Ultrastructure are relatively well preserved. Arrow indicates nucleolus. M, mitochondria ; N, nucleus ; g, glycogen granules. Bar = 1.17 μm .

- Fig. 2.** Tyrode solution-perfused control group. Cell junction comprises desmosomes(D), fasciae adherentes(FA), and nexuses(arrowheads). Bar=0.60 μ m.
- Fig. 3.** 5 minute calcium-free reperfused group. A Z-line(arrow) is near completely disappeared by hypercontraction of neighbouring sarcomeres. Z, Z-line. Bar=1.17 μ m.
- Fig. 4.** 5 minute calcium-free reperfused group. Z-lines(Z) are thickened and the cell junction(arrowheads) is widened. Sarcolemma (SL) contains subsarcolemmal blebs(asterisks). M, mitochondria. Bar=1.17 μ m.
- Fig. 5.** 5 minute calcium-free reperfused group. Sarcolemma(SL) is partially destructed. Nuclear matrix is cleared and chromatins are clumped and marginated(arrow). Fluid accumulation is seen in the bipolar regions of the nucleus(N). M, mitochondria. Bar=1.17 μ m.
- Fig. 6.** 5 minute calcium-free reperfused group. Swollen mitochondria(M) contain thinned lamellated or vesicular(arrowheads) cristae. Bar=0.60 μ m.
- Fig. 7.** 5 minute calcium-free reperfused group. Cell junction is widely separated in the regions of fascia adherens(arrow) but the desmosomes(arrowheads) are relatively intact. g, glycogen granules. Bar=0.60 μ m.
- Fig. 8.** 10 minute calcium-free reperfused group. Large subsarcolemmal blebs(asterisks) formed by separation of glycocalyx(arrows) from the sarcolemma are seen. Bar=0.53 μ m.
- Fig. 9.** 10 minute calcium-free reperfused group. Cell junction is completely separated (arrowheads). M, mitochondria. Bar=1.15 μ m.
- Fig. 10.** 15 minute calcium-free reperfused group. Contraction band(asterisks) resulted from hypercontraction of sarcomeres and intracellular fluid accumulation are obvious. Arrowheads indicate loosened myofibrils. Bar=1.48 μ m.
- Fig. 11.** 15 minute calcium-free reperfused group. Cell junction is severly separated (arrows) and mitochondria(M) show bizarre morphology. Bar=1.17 μ m.





