

بررسی الگوی تحمل ایسکمی در سنین مختلف قبل از بلوغ در قلب مجزا شده خرگوش

علی اشرف گودینی^۱، دکتر داریوش شکیبایی^۲

۱- کارشناس ارشد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه (مؤلف مسؤول) تلفن: ۰۸۳۱-۴۲۷۹۹۲۳ agodini@kums.ac.ir

۲- استادیار فیزیولوژی و عضو مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات متعددی نشان داده‌اند که مقاومت قلب نسبت به ایسکمی در دوره قبل از بلوغ بیشتر از دوره پس از آن می‌باشد و به تدریج در طول زندگی کاهش می‌یابد. بیشتر مطالعات انجام شده در دوره قبل از بلوغ حاکی از آن است که مقاومت به ایسکمی در طول دوره قبل از بلوغ نیز به تدریج کاهش می‌یابد. مطالعات اندک دیگری این الگوی کاهش را تایید نکرده‌اند. با توجه به اهمیت بالینی موضوع، مطالعه حاضر به منظور تعیین سیر تغییرات مقاومت قلب نسبت به ایسکمی در قلب مجزا شده خرگوش در سنین مختلف قبل از بلوغ انجام گردید.

روش بررسی: در این مطالعه از خرگوش سفید آزمایشگاهی با سن دو هفته ($n=9$) سه هفته ($n=7$) شش هفته ($n=7$) و هشت هفته ($n=9$) استفاده گردید. قلب حیوانات مطابق روش لانگندورف تحت فشار ثابت، با محلول کربس تغذیه شده و میزان جریان کرونری و پارامترهای عملکردی قلب شامل ضربان قلب و نوسانات فشار بطن چپ اندازه‌گیری شد. همچنین حاصل ضرب افزایش فشار بطن چپ در ضربان قلب (RPP) محاسبه گردید. مراحل آزمایش شامل ۲۰ دقیقه ثبت مقادیر پایه، ۳۵ دقیقه ایسکمی کلی با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۴۵ دقیقه تغذیه مجدد (Reperfusion) بود. میزان درصد تغییرات پارامترهای قلبی از جمله RPP بعد از ۴۵ دقیقه تغذیه مجدد نسبت به مرحله پایه در بین گروهها با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج حاکی از آن است که بازگشت عملکرد قلبی نسبت به قبل از ایسکمی در سن ۳ هفتهگی ($85/81 \pm 4/36$) (میانگین $\pm$ خطای استاندارد) به صورت معنی‌داری بیشتر از ۲ هفتهگی ($67/57 \pm 3/27$)، ۶ هفتهگی ($61/19 \pm 2/83$) و ۸ هفتهگی ($52/03 \pm 5/09$) می‌باشد.

نتیجه‌گیری: بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مقاومت قلب نسبت به ایسکمی الگوی کاهشی نداشته، بلکه میزان مقاومت در قلب خرگوش در زمانی بین تولد و بلوغ به حد اکثر می‌رسد.

کلیدواژه‌ها: قلب جدا شده، تحمل نسبت به ایسکمی، نوزاد خرگوش

وصول مقاله: ۸۶/۹/۱۳ اصلاح نهایی: ۸۷/۳/۲۲ پذیرش مقاله: ۸۷/۵/۳

مقدمه

ایسکمی در قلب مجزا شده خرگوش در سنین بین ۷ تا ۹۰ روزگی می‌باشد (۳). مشخص گردیده که مقاومت قلب مجزا شده خرگوش نسبت به ایسکمی گلوبال هیپوترمیک در دوره نوزادی (یک هفتهگی) بیشتر از دوره قبل از بلوغ (یک ماهگی) و پس از بلوغ (چهار ماهگی) می‌باشد (۴). همچنین مشخص شده که مقاومت

مطالعات تجربی متعددی نشان داده‌اند که مقاومت قلب نسبت به ایسکمی در دوره قبل از بلوغ بیشتر از دوره پس از بلوغ می‌باشد (۱). در مطالعه‌ای نشان داده شده که مقاومت قلب موش نسبت به ایسکمی از ۲ تا ۱۸ ماهگی به تدریج کاهش می‌یابد (۲). برخی مطالعات نشان دهنده کاهش تدریجی مقاومت قلبی نسبت به

قلب مجزا شده خرگوش ده روزه نسبت به هیپوکسی بشکل معنی داری بیشتر از قلبهای مجزا شده در سن ۳۰ روزگی می باشد (۵). از طرف دیگر برخی مطالعات دیگر نشان داده اند که مقاومت افزایش یافته این قلبها هماهنگ با تغییرات آنزیمی و ساختمانی نبوده (۶) و در حضور ایسکمی دراز مدت نیز ماندگار نمی باشد (۷). علاوه بر آن برخی مطالعات مشخص ساخته اند که در شرایط ایسکمی طولانی همراه با بکارگیری مکرر و مداوم کاردیوپلژیا، آسیب پذیری قلب جوان بیشتر از قلب بالغین می باشد (۸-۱۰) گزارش یک تحقیق دیگر حاکی از این است که مقاومت قلب مجزا شده خرگوش در سن ۳ تا ۴ هفتهگی بشکل معنی داری بیش از قلبهای مجزا شده در سنین دو هفتهگی و پنج ماهگی می باشد (۱۱) هر چند که افزایش مقاومت قلب نسبت به ایسکمی در سنین قبل از بلوغ نسبت به دوران پس از آن امری شناخته شده است، اما با توجه به نتایج مطالعات صورت گرفته، درخصوص روند تغییرات مقاومت در دوران قبل از بلوغ توافق نظر وجود ندارد. به عبارت دیگر مشخص نیست که حداکثر میزان مقاومت قلبی نسبت به ایسکمی در بدو تولد می باشد و یا در مقطع زمانی بین تولد و بلوغ. با توجه به اهمیت و ارزش بالینی این نکته و همچنین اختلاف نظرهای موجود و فقدان اطلاعات کافی در این زمینه، مطالعه حاضر به منظور بررسی آسیب پذیری قلب نسبت به ایسکمی در سنین ۲، ۳، ۶ و ۸ هفتهگی در قلب مجزا شده خرگوش صورت گرفته است.

روش بررسی

این مطالعه به روش تجربی و بر روی خرگوش سفید آزمایشگاهی (تهیه شده از موسسه رازی) در

گروههای سنی دو هفتهگی ($n=9$)، سه هفتهگی ($n=7$) شش هفتهگی ($n=7$) و هشت هفتهگی ($n=9$) صورت گرفت. حیوانات در شرایط استاندارد نگهداری می شدند. ابتدا حیوانات با استفاده از تجویز داخل صفاقی پنتوباریتال سدیم با دوز ۶۰ میلی گرم به کیلو گرم بیهوش شده، سپس مورد عمل جراحی برش قفسه سینه و جداسازی قلب قرار گرفتند. بلافاصله پس از جداسازی قلبها در محلول کربس سرد (۴-۰ درجه سانتی گراد) قرار داده شده و به سرعت آئورت به کانول دستگاه متصل گردید. قلبها مطابق روش لانگندورف و به شکل Retrograde با محلول کربس حاوی $\text{NaCl}=118$, $\text{NaHCO}_3=25$, $\text{KCl}=4.8$, $\text{CaCl}_2=1.2$, $\text{MgSO}_4=1.2$, $\text{KH}_2\text{PO}_4=1.2$, $\text{Glucose}=11$ مول در لیتر تغذیه (Perfusion) شدند. محلول فوق از کاغذ صافی واتمن شماره ۲ (Cat No 1002 125) عبور داده شده، پس از مخلوط شدن با گاز اکسیژن (۹۵ درصد) و دی اکسید کربن (۵ درصد)، با $\text{PH}=7.4$ ، حرارت ۳۷ درجه و فشار ثابت (۵۰ میلی متر جیوه در گروههای اول و دوم و ۶۰ میلی متر جیوه در گروههای سوم و چهارم) (۱۲) برای تغذیه قلبی مورد استفاده قرار گرفت. سپس یک بالون لاتکس کوچک محتوی آب از طریق دهلیز چپ و دریچه میترال به بطن چپ قلب وارد گردید. این بالون از طریق یک کاتتر به transducer pressure مدل MLD844 و از طریق Bridge Amp آن به Power lab مدل ML825 و سپس به رایانه متصل بود. حجم بالون به گونه ای تنظیم شد که فشار پایان دیاستولی ۱۰-۵ میلی متر جیوه تأمین گردد. بدین ترتیب امکان سنجش معیارهای مختلف عملکردی قلب از جمله فشار بطن چپ Left ventricular developed pressure (LVDP) که برابر است با فشار سیتولیک بطنی منهای

بشکل میانگین $\pm$ خطای استاندارد گزارش شده و $p < 0/05$ بعنوان تفاوت معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در جدول ۱ مقادیر پایه پارامترهای قلبی در گروه‌های مختلف آورده شده است. میزان وزن قلبها و RPP آنها مناسب با سن هر گروه و هماهنگ با سایر مطالعات می‌باشد (۱۲). میزان درصد تغییرات RPP در دوره پس از ایسکمی نسبت به مرحله پایه در نمودار ۱ آورده شده است. بازگشت عملکرد قلبی بدنبال ایسکمی در قلبهای گروه با سن دو هفته $67/57 \pm 3/27$ درصد، میزان پایه، در گروه سه هفته $85/81 \pm 4/36$ درصد، گروه ۶ هفته $61/19 \pm 2/83$ درصد و در گروه ۸ هفته $52/03 \pm 5/09$ درصد مقدار پایه بودند. حداکثر بازگشت عملکرد قلبی نسبت به مرحله قبل از ایسکمی در گروه با سن سه هفته بوده است. با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه مشخص گردید که اختلاف بین این گروه با گروه‌های دو هفته ($p < 0.05$)، ۶ هفته ($p < 0.01$) و هشت هفته ($p < 0.001$) معنی دار می‌باشد. همچنین مشخص شد که اختلاف بین میزان درصد بازگشت عملکرد قلبی در قلب‌های گروه با سن دو و هشت هفته نیز معنی دار ($p < 0.05$) می‌باشد. در خصوص میزان بازگشت جریان کرونری بدنبال ایسکمی (نمودار ۲) نیز مشخص شد که این مقدار در گروه‌های با سن ۲ هفته $87/24 \pm 2/55$ ، سه هفته $92/88 \pm 1/64$ ، ۶ هفته $72/66 \pm 3/8$ و ۸ هفته $74/13 \pm 3/52$ درصد میزان پایه در هر گروه بودند. در رابطه با این پارامتر نیز حداکثر میزان بازگشت مربوط به گروه با سن سه هفته بوده که تفاوت آن با گروه‌های ۶ هفته و ۸ هفته اختلاف معنی داری ($p < 0.001$) داشت. همچنین تفاوت بین میزان بازگشت CF در گروه با سن

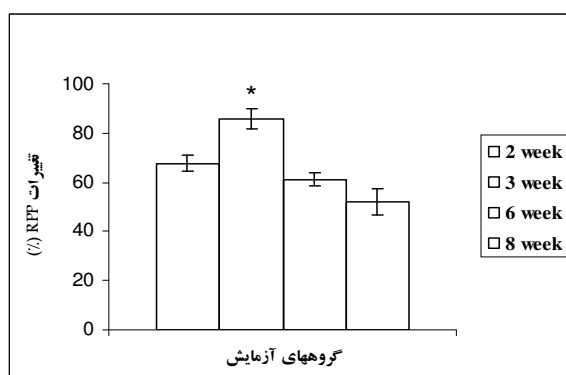
فشار دیاستولیک آن برحسب میلی‌متر جیوه و نیز تعداد ضربان قلب در دقیقه (Beat Per Minute (BPM) فراهم گردید. همچنین معیار عملکردی قلبی موسوم به Rate (pressure product-RPP) که برابر حاصل ضرب نوسانات فشاری بطن چپ در تعداد ضربان قلب در دقیقه است نیز محاسبه گردید (۱۳) برای سنجش میزان جریان مایع کرونری (coronary flow-CF) از روش اندازه‌گیری مستقیم با بکارگیری سیلندر مدرج استفاده شد.

مراحل آزمایش بدین ترتیب بود که قلبها ابتدا دوره تثبیت اولیه و ثبت اطلاعات پایه را به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه گذرانده، سپس وارد مرحله دوم یعنی دوره ایسکمی شدند و به مدت ۳۵ دقیقه در این مرحله باقی می‌ماندند. در این مرحله تغذیه قلبی متوقف و قلب در یک محفظه محتوی کربس با حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد غوطه ور می‌شد. بدین ترتیب قلب در این دوره تحت ایسکمی کلی با درجه حرارت طبیعی (Global and Normothermic) قرار می‌گرفت (۱۳). در مرحله سوم، تغذیه قلبی دوباره با مشخصات دوره قبل از ایسکمی صورت گرفت و این دوره موسوم به تغذیه مجدد (Reperfusion) به مدت ۴۵ دقیقه ادامه یافت. سپس با مقایسه معیارهای مختلف قلبی پس از طی دوره ایسکمی نسبت به مرحله اول، میزان آسیب حاصل از ایسکمی تعیین شد. به این منظور درصد تغییرات پارامترهای مختلف قلبی در مرحله پس از ایسکمی (متعاقب ۴۵ دقیقه تغذیه مجدد) نسبت به مرحله قبل از ایسکمی، برای هر گروه محاسبه شده و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و tukey post test بین گروه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر

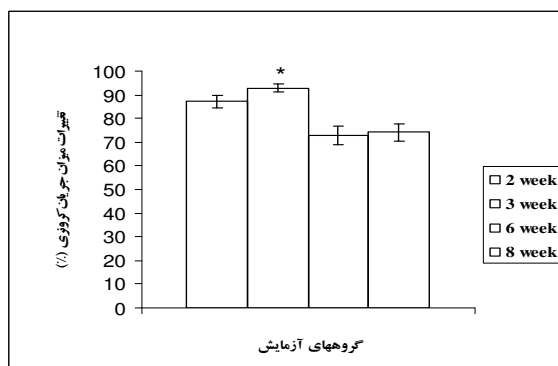
دو هفته نسبت به گروههای ۶ و ۸ هفته نیز معنی دار ($p < 0.05$) بود.

جدول ۱: مقادیر وزن حیوانات (خرگوش) و قلب آنها و نیز مقادیر پایه پارامترهای عملکردی قلب و میزان جریان کرونری در گروههای آزمایش

گروهها	وزن حیوانات (گرم)	وزن قلب (گرم)	ضربان قلب (BPM)	افزایش فشار بطن چپ (mmHg)	میزان جریان عروق کرونری (ml)	حاصل ضرب ضربان قلب درافزایش فشار بطن چپ
۲ هفته	۱۹۲±۲۲	۰/۹۶±۰/۱۳	۲۱۱±۸	۷۱/۳۷±۲/۵۸	۱۰/۶۵±۱/۱۷	۱۴۹۶۴±۵۱۱
۳ هفته	۲۵۹±۱۷	۰/۹۷±۰/۰۴	۱۹۹±۵	۷۳/۲۸±۳/۵۷	۱۰/۸±۰/۹۴	۱۴۵۲۰±۸۱۳
۶ هفته	۸۱۹±۲۳	۲/۴±۰/۰۹	۱۹۲±۹	۹۴/۶۳±۴/۱۹	۳۰/۴۳±۰/۹۵	۱۷۸۸۷±۱۰۰۲
۸ هفته	۹۴۷±۴۰	۲/۸۶±۰/۱۴	۱۹۶±۱۰	۹۳/۲۷±۲/۶	۲۷/۵۶±۱/۶۹	۱۸۲۰۵±۹۱۲



نمودار ۱: درصد تغییرات حاصل ضرب میزان افزایش فشار بطن چپ در ضربان قلب ($\text{mmHg} \times \text{Beat}$) (Rate Pressure Product) (Per Min) پس از ۴۵ دقیقه تغذیه مجدد (Reperfusion) نسبت به قبل از ۳۵ دقیقه ایسکمی کلی با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد در گروههای آزمایش. مقادیر (میانگین $\pm$ خطای استاندارد) توسط آنالیز واریانس مورد مقایسه واقع شده و $p < 0.05$ معنی دار تلقی شده است. * اختلاف معنی دار با سایر گروهها.



نمودار ۲: درصد تغییرات میزان جریان کرونری پس از ۴۵ دقیقه تغذیه مجدد (Reperfusion) نسبت به قبل از ۳۵ دقیقه ایسکمی کلی با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد در گروههای آزمایش. مقادیر (میانگین $\pm$ خطای استاندارد) توسط آنالیز واریانس مورد مقایسه واقع شده و $p < 0.05$ معنی دار تلقی شده است. اختلاف با گروه ۶ و ۸ هفته.

بحث

مهمترین یافته مطالعه حاضر عبارت از بازگشت مناسب‌تر عملکرد قلبی پس از ایسکمی در سن سه هفتگی که بشکل معنی‌داری با سنین کمتر و بیشتر از این مقطع متفاوت بود. این یافته جدیدی است که در سایر گزارشها کمتر مورد توجه واقع شده است. نتایج مطالعه حاضر حاکی از اینست که میزان درصد بازگشت عملکرد قلبی متعاقب ایسکمی در خرگوشهای با سن کمتر از یک ماه بشکل معنی‌داری بیش از قلبهای با سن بیشتر از یک ماه می‌باشند. این یافته هماهنگ با سایر مطالعات می‌باشد (۵-۳). از طرف دیگر این نکته که بازگشت عملکرد قلبی متعاقب ایسکمی در قلبهای با سن سه هفته بشکل معنی‌داری بیش از قلبهای با سن دو هفته می‌باشند، حائز اهمیت بوده و نشان‌دهنده الگوی متفاوتی از میزان مقاومت قلبی نسبت به ایسکمی در دوران پس از تولد می‌باشد. در مطالعه مشابهی مشخص شده که متعاقب کاردیوپلژیا و ایسکمی هیپوترمیک، میزان بازگشت عملکرد قلب مجزا شده خرگوش در سن ۳ تا ۴ هفتگی بیش از سنین دو هفتگی و پنج ماهگی می‌باشد (۱۱). نتایج مطالعه حاضر نیز تاکید به این الگوی متفاوت تحت شرایط ایسکمی گلوبال نورموترمیک دارد. با وجود تحقیقات متعدد در این زمینه، هنوز علت آسیب‌پذیری کمتر قلب نسبت به ایسکمی و هیپوکسی در دوره قبل از بلوغ بدرستی مشخص نیست (۸). اینکه قلبهای جوان نسبت به قلبهای بالغ تحمل بیشتری نسبت به ایسکمی دارند احتمالاً ناشی از فشار پایین اکسیژن محیطی در دوره جنینی می‌باشد. در واقع دسترسی محدود میوکارد به اکسیژن در این دوره منجر به فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی متابولیکی بر علیه هیپوکسی می‌گردد. ازجمله فعال شدن بعضی از ژنها که در این

شرایط آنزیمهای مورد نیاز را کد می‌کنند. پس از تولد نوزاد و شروع زندگی در محیط غنی از اکسیژن، روندهای متابولیک حفاظتی به تدریج فروکش می‌کنند، اما این روند نیاز به زمان داشته و در واقع به دلیل فعال بودن این مکانیسم در دوره پس از تولد نیز مقاومت قلبی در این هنگام بیش از بالغین می‌باشد (۱). تفاوت‌های ساختمانی و متابولیک متعدد دیگری بین میوکارد نابالغ و بالغ وجود دارد، که می‌توانند منجر به تحمل مناسب‌تر شرایط ایسکمیک در قلبهای نابالغ گردد. از جمله این مکانیسم‌ها می‌توان به ذخیره گلیکوژن بالاتر و حفظ مناسب‌تر ATP در این قلبها (مصرف آهسته‌تر ATP و کاهش کاتابولیسم آن بوسیله ۵- نوکلئوتیداز) و نیاز به اکسیژن کمتر برای تأمین و نقل و انتقال کلسیم مورد نیاز در روند انقباض اشاره نمود (۱۴، ۱۵). با توجه به اختلافات متابولیک قلبهای جوان و بالغ، این نکته مشخص شده که پاسخ آنها نیز به کاردیوپلژیا، متفاوت و وابسته به سن می‌باشد (۱۶). از طرف دیگر معتقدند که ظرفیت بالای گلیکولیتیک قلبهای نابالغ منجر به تولید بیشتر لاکتات می‌گردد که به نوبه خود موجب افت بیشتر PH بافتی می‌گردد (۸). همچنین آسیب‌پذیری بالاتر قلبهای جوان نسبت به تأثیرات توکسیک رادیکالهای اکسیژن نیز مشخص گردیده است (۱۷). این نکات منفی می‌تواند سبب آسیب‌پذیری بیشتر این قلبها نسبت به ایسکمی در مقاطعی از دوره قبل از بلوغ گردد. بنابراین بنظر می‌رسد که در دوران پس از تولد عوامل متعدد مثبت و منفی تأثیرگذار بر روند مقاومت قلبی نسبت به ایسکمی وجود داشته و با توجه به نتایج مطالعه حاضر و با تاکید بر الگوی متفاوت مقاومت قلبی در سنین مختلف، باید معلوم کرد کدامیک از مکانیسمهای نامبرده شده در هر سنی از تولد فعالتر می‌باشد. بنابراین

می‌توان نتیجه گرفت که مقاومت قلب نسبت به ایسکمی الگوی کاهشی نداشته بلکه میزان مقاومت در قلب خرگوش در زمانی بین تولد و بلوغ به حداکثر می‌رسد.

بررسی تکمیلی جهت مشخص شدن مکانیسم این مقاومت افزایش یافته در مقاطع زمانی خاص، پیشنهاد می‌گردد.

تقدیر و تشکر

با سپاس و تشکر از مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه به خاطر فراهم آوردن امکانات این تحقیق.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج می‌توان گفت بازگشت عملکرد قلبی پس از ایسکمی در سن سه هفتگی بشکل معنی‌داری بیشتر از دیگر گروهها بوده است. بنابراین

References

1. Rosenkranz E R, Feng J, Li H L. Myocardial preconditioning in the experimental model: a new strategy to improve myocardial protection. In: Salerno T A, Ricci M, Editors. Myocardial Protection. First edition, New York: Blackwell Publishing 2004. p. 252-259.
2. Willems L, Zatta A, Holmgren K, Ashton KJ, Headrick JP. Age-related changes in ischemic tolerance in male and female mouse hearts. J Mol Cell Cardiol 2005; 38: 245-256.
3. Murashita T, Kempford R D, Hearse D J. Age-dependent changes in the tolerance of the rabbit heart to ischemia. Eur J Cardiothorac Surg 1990; 4: 492-7.
4. Bove EL, Stammers AH. Recovery of left ventricular function after hypothermic global ischemia. Age-related differences in the isolated working rabbit heart. J Thorac Cardiovasc Surg 1986; 91: 115-22.
5. Fitzpatrick CM, Shi Y, Hutchins WC, Su J, Gross GJ, Ostadal B, and et al. Cardioprotection in chronically hypoxic rabbits persists on exposure to normoxia: role of NOS and KATP channels. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005; 288: H62-8.
6. Murashita T, Borgers M, Hearse DJ. Developmental changes in tolerance to ischaemia in the rabbit heart: disparity between interpretations of structural, enzymatic and functional indices of injury. J Mol Cell Cardiol 1992; 24: 1143-54.
7. Nakamura H, del Nido PJ, Jimenez E, Sarin M, Feinberg H, Levitsky S. Age-related differences in cardiac susceptibility to ischemia/reperfusion injury. Response to deferoxamine. J Thorac Cardiovasc Surg. 1992; 104: 165-72.
8. Bittira B, shum -tim D, Tchervakov C I. New concepts in myocardial protection in pediatric cardiac surgery. In: Salerno T A, Ricci M, Editors. Myocardial Protection. First edition, New York: Blackwell Publishing 2004. p. 264-265.
9. Magovern JA, Pae WE Jr, Waldhausen JA. Age-related changes in the efficacy of crystalloid cardioplegia. J Surg Res 1991; 51: 229-32.
10. Baker JE, Boerboom LE, Olinger GN. Age-related changes in the ability of hypothermia and cardioplegia to protect ischemic rabbit myocardium. J Thorac Cardiovasc Surg 1988; 96: 717-24.
11. Podesser B, Hausleithner V, Seitelberger R, Wollenek G, Wolner E, Steiert H. New developments in the isolated working heart: a comparison of neonatal, immature, and adult rabbits after sixty minutes of ischemia in respect to hemodynamic and biochemical parameters. J Pharmacol Toxicol Methods 1993; 30: 189-96.
12. Carr LJ, VanderWerf QM, Anderson SE, Kost GJ. Age-related response of rabbit heart to normothermic ischemia: a ³¹P-MRS study. Am J Physiol. 1992; 262: H391-8.
13. Shackebaei D, King N, Shukla B, Suleiman MS. Mechanisms underlying the cardioprotective effect of L-cysteine. Mol Cell Biochem 2005; 277: 27-31.

14. Nishioka K, Jarmakani JM. Effect of ischemia on mechanical function and high-energy phosphates in rabbit myocardium. *Am J Physiol* 1982; 242: H1077-83.
15. Pridjian AK, Bove EL, Bolling SF, Childs KF, Brosamer KM, Lupinetti FM. Developmental differences in myocardial protection in response to 5'-nucleotidase inhibition. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 107: 520-6.
16. McCully JD, Rousou AJ, Parker RA, Levitsky S. Age and gender-related differences in mitochondrial oxygen consumption and calcium with cardioplegia and diazoxide. *Ann Thorac Surg* 2007; 83: 1102-9.
17. Parrish MD. Oxygen radical injury in the immature isolated rabbit heart. *J Dev Physiol* 1991; 16: 243-9.