

Criopreservación cardíaca a temperatura subcero: estudio de la función sistólica y diastólica

Encarnación Gutiérrez Carretero, Rafael Bello Puentes, José Miguel Borrego Domínguez, Ana Hernández Fernández, Joaquín Muñoz García, M.^a Felicidad Prieto González y Antonio Ordóñez Fernández

Unidad de Trasplante Cardíaco. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla.

Introducción. Estudiamos las alteraciones producidas en la función sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo tras aplicar un protocolo de criopreservación a temperatura subcero sobre corazón de conejo aislado, utilizando como agente crioprotector el polietilenglicol de PM 4.000 al 5%.

Material y método. Usamos el CP-16 como solución crioprotectora en el corazón explantado en tres fases: inducción, almacenamiento y recalentamiento. Tras 60 min a $-1,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ y recalentado a $2,7\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, el corazón se conecta al sistema Langendorff y se perfunde por vía anterógrada con solución de Krebs-Henseleit. Analizamos los parámetros sistólicos y diastólicos antes y después de la criopreservación, estableciendo un estudio estadístico comparativo.

Resultados. Tras la criopreservación encontramos un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de los valores de la presión pico y desarrollada de ventrículo izquierdo con desplazamiento de la curva de función ventricular hacia arriba y la izquierda, lo que indica una mejora de la función sistólica. Sin embargo, en la función diastólica se observó un empeoramiento, con un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de la rigidez media, descenso de la rigidez diferencial con $p < 0,05$ y desplazamiento hacia arriba y la izquierda de la curva diastólica de presión-volumen.

Conclusiones. Según nuestros resultados concluimos que: a) el polietilenglicol de PM 4000 al 5% mantiene la viabilidad biológica del corazón durante el protocolo de criopreservación a temperatura subcero, y b) tras la criopreservación se produce un empeoramiento de la función diastólica de ventrículo izquierdo con mejoría de la función sistólica.

Palabras clave: Criopreservación. Polietilenglicol. Sístole. Diástole.

(Rev Esp Cardiol 2000; 53: 1189-1194)

Cardiac Cryopreservation at Subzero Temperatures: Study of Systolic and Diastolic Function

Background. We studied the alterations produced in left ventricular systolic and diastolic function after applying a protocol of cryopreservation at subzero temperatures. Isolated rabbit hearts were used for the study with 5% polyethylene glycol (PM 4000) being the cryoprotective agent.

Material and method. The cryoprotectant solution CP-16 was used on the explanted heart in three phases: induction, storage and thawing. After 60 minutes at $-1.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ and thawing at $2.7\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, the heart was connected to a Langendorff system and perfused anterogradely with Krebs-Henseleit buffer. We analyzed the systolic and diastolic parameters before and after cryopreservation, thereby establishing a comparative statistical study.

Results. Following cryopreservation we found a statistically significant increase ($p < 0.05$) in the peak and developed pressure of the left ventricle with an upward, left displacement of the ventricular function curve. This is indicative of improvement in systolic function. However, the diastolic function showed worsening, with a statistically significant increase ($p < 0.05$) in mean stiffness, decrease in differential stiffness ($p < 0.05$) and upward, left displacement of the diastolic pressure-volume curve.

Conclusions. On the basis of our results we concluded that: a) PM 4000 polyethylene glycol maintains the heart biological viability during cryopreservation at subzero temperatures, and b) after an cryopreservation left ventricular diastolic function worsens with an increase in systolic function.

Key words: Cryopreservation. Polyethyleneglycol. Systolic-diastolic function.

(Rev Esp Cardiol 2000; 53: 1189-1194)

INTRODUCCIÓN

La preservación cardíaca ha sido y es uno de los temas de mayor interés de la investigación de laboratorio y clínica cardiovascular. Esto es debido a la gran relevancia clínica que tiene el mantenimiento de la viabilidad de los miocitos, así como su recuperación

Correspondencia: Dra. E. Gutiérrez Carretero
Milano Perlado, 30. 41020 Sevilla.
Correo electrónico: egc@interbook.net

Recibido el 12 de abril de 1999.
Aceptado para su publicación el 28 de marzo del 2000.

ABREVIATURAS

- PEG: polietilenglicol.
- KHB: solución de Krebs-Henseleit.
- PPVI: presión pico de ventrículo izquierdo.
- PdesVI: presión desarrollada de ventrículo izquierdo.
- Rgm: rigidez media.
- Rgd: rigidez diferencial.
- Pd: presión diastólica.
- VVI: volumen de ventrículo izquierdo.

bioquímica y energética tras largos períodos de isquemia.

Los métodos actuales (solución cardiopléjica a 8 °C) permiten mantener viable al corazón durante cuatro horas de isquemia. Este tiempo resulta insuficiente para realizar un trasplante cardíaco cuando el donante se encuentra geográficamente distante. Si se consigue aumentar el tiempo de preservación cardíaca, puede incrementarse el *pool* de corazones donantes^{1,2}, e incluso formar bancos de órganos si ésta es indefinida.

En teoría, la congelación, al inhibir la actividad metabólica, permite prolongar la preservación de forma indefinida. Sin embargo, el mantenimiento de un corazón a temperatura subcero conlleva la lesión del mismo por dos mecanismos. Por un lado, se encuentran las lesiones asociadas al descenso de temperatura (lesiones crioaducidas) y, por otro lado, las lesiones secundarias a la formación de cristales de hielo³⁻⁵.

Los agentes crioprotectores son sustancias muy hidrosolubles en agua que modifican considerablemente las propiedades fisicoquímicas de las soluciones acuosas presentes en la materia viva, ya que disminuyen el punto de congelación celular, permitiendo el almacenamiento a temperatura subcero sin la formación de cristales de hielo⁶⁻⁸.

El polietilenglicol (PEG) es un agente crioprotector no penetrante que a concentraciones molares reducidas confiere un efecto crioprotector usando velocidades lentas de congelación. Ejerce su acción disminuyendo no sólo la formación de hielo tisular, sino también favoreciendo la deshidratación celular, factor muy im-

portante para la tolerancia a la congelación⁹⁻¹¹. Los malos resultados iniciales hicieron abandonar su uso, pero con modificaciones en su concentración, velocidad de enfriamiento y temperatura de almacenamiento se obtienen buenos resultados a nivel experimental, lo que supone una esperanza para su uso en humanos.

El objetivo de este estudio es realizar un protocolo de criopreservación sobre corazón aislado de conejo utilizando como agente crioprotector el PEG de PM 4.000 al 5% y analizar las alteraciones producidas sobre la función sistólica y diastólica de ventrículo izquierdo.

MATERIAL Y MÉTODO

Criopreservación

Usamos 20 conejos de la raza New Zeland de peso medio 2.440 ± 799 g, a los que previa anestesia con tiopental sódico a 50 mg/kg y anticoagulación con heparina sódica al 5% a la dosis de 3 mg/kg, se les practicó una cardiectomía. El corazón explantado fue conectado al sistema Langendorff a través de una cánula aórtica. Se perfundió por vía anterograda con solución de Krebs-Henseleit (KHB) modificada y oxigenada con carbógeno (95% CO₂ y 5% O₂) a flujo constante de 25 ml/min y a 37 °C. La composición del KHB es (en mmol/l): 118 NaCl, 25 NaHCO₃, 4,7 KCl, 1,2 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄, 11 glucosa y 2,5 CaCl₂.

Tras 15 min de estabilización se tomaron los parámetros basales y se inició el protocolo de criopreservación, que dividimos en tres fases: inducción, almacenamiento y recalentamiento (tabla 1). Usamos como solución crioprotectora el CP-16, cuya composición es (en mml/l): 110 NaCl, 14 KCl, 15 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄, 7 glucosa, 0,15 CaCl₂, 10 manitol y 0,0125 de PEG de PM 4.000.

La inducción se realizó mediante la perfusión anterógrada a 25 ml/min de CP-16 durante 8 min. Se comenzó por 35 °C y fue disminuyendo 10 °C cada 2 min, consiguiéndose una velocidad de enfriamiento de 4,6 °C/min (velocidades intermedias). El almacenamiento del corazón se realizó en un contenedor isotérmico opaco con CP-16 a -1,6 °C en estado líquido durante 60 min. Y, finalmente, el recalentamiento se consiguió mediante la inmersión del corazón en un contenedor con CP-16 a temperatura creciente durante

TABLA 1. Protocolos de criopreservación

Solución (25 ml/min)	KHB				CP-16				KHB
Temperatura (°C)	37	35	25	15	5 + 0	-1,6	4,5	25	37
Tiempo (min)	30	2	2	2	2	60	5	5	30
Fase	Basal		Inducción		Almacenamiento		Recalentamiento		Reperfusión

KHB: solución de Krebs-Henseleit; CP-16: solución crioprotectora.

TABLA 2. Función sistólica durante criopreservación de corazón de conejo aislado

Estadio	Presión diastólica (mmHg)	Presión pico VI (mmHg)			Presión desarrollada VI (mmHg)		
		Pre	Post	p	Pre	Post	p
1	0	29,00	44,50	0,002711*	28,15	43,15	0,002591*
2	10	40,50	47,50	0,083445	30,20	37,30	0,070924
3	20	47,05	56,15	0,023811*	27,40	36,60	0,025161*
4	30	56,95	68,60	0,011172*	26,30	39,20	0,005900*
5	40	67,55	82,85	0,000379*	27,65	42,60	0,000430*
6	50	82,20	92,45	0,008037*	32,05	42,20	0,007951*
7	60	92,10	103,50	0,000554*	32,55	43,20	0,001318*
8	70	97,15	105,40	0,043799*	26,55	34,85	0,042337*

Valores medios de la presión pico y presión desarrollada de ventrículo izquierdo en mmHg para los distintos estadios de medición antes (Pre) y después (Post) de la criopreservación. *Valores de p con significación estadística ($p < 0,05$).

10 min. Los primeros 5 min la solución estaba a 4,5 °C y los últimos 5 min a 25 °C. Se consiguió una velocidad de recalentamiento de 2,7 °C/min.

Análisis de la función ventricular

Tanto en situación basal como tras la criopreservación, el corazón aislado se conectó al sistema Langendorff, donde se perfundió por vía anterógrada con solución KHB oxigenada con carbógeno a 25 ml/min y a 37 °C. Tras 15 min de estabilización, y fijada la frecuencia cardíaca a 150 lat/min, se procedió a la toma de parámetros eléctricos, mecánicos, bioquímicos y morfológicos.

Los parámetros mecánicos se recogieron durante 8 estadios. Cada estadio se correspondía con el valor objetivo de presión diastólica, que comenzó por 0 mmHg en el estadio 1 y terminó por 70 mmHg en el estadio 8. Los incrementos en la presión diastólica objetivo se consiguieron por aumentos en el volumen de un balón de látex del número 12 introducido en el interior del ventrículo izquierdo (VI) a través de la aurícula izquierda. Los aumentos en el volumen del balón determinaron un aumento de la precarga, que se correspondía con aumento de la presión diastólica.

En cada estadio conocimos, por medición directa, los valores de la presión sistólica, diastólica, media, presión de perfusión y volumen del ventrículo izquierdo. A partir de estos datos analizamos la función sistólica y diastólica del corazón explantado.

Para el estudio de la función sistólica calculamos los valores de la presión pico de VI (PPVI), la presión desarrollada de VI (PdesVI) y realizamos la curva de función ventricular. La PPVI correspondía a la máxima presión generada en el VI en las diferentes precargas, mientras que la PdesVI era la diferencia entre la presión sistólica y diastólica frente a diferentes volúmenes de balón.

El análisis de la función diastólica de VI se realizó mediante el estudio de la rigidez media, la rigidez diferencial y la curva diastólica de presión-volumen. La ri-

gidez media (Rgm) se correspondía con los incrementos de presión en relación con los cambios de volumen acumulado ($Rgm = Pd/VVI$), mientras que la rigidez diferencial (RGd) hacía referencia a los incrementos de presión en relación con cada incremento de presión ($RGd = \Delta Pd/\Delta VVI$), donde Pd es presión diastólica y VVI volumen de ventrículo izquierdo). Ambos se expresan en mmHg/ml.

Análisis estadístico

Realizamos un estudio estadístico comparativo entre los datos recogidos antes y después de la criopreservación. Aplicamos una estadística descriptiva de los datos recogidos y calculados, y una inferencia estadística con: a) comprobación de la proximidad a la normalidad de las distribuciones de frecuencia de las variables a comparar mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y b) comprobación de medias mediante la prueba de la t de Student para datos apareados. Para todas las pruebas estadísticas se considera significativa una $p < 0,05$.

RESULTADOS

Tras la criopreservación del corazón con PEG PM 4.000 al 5% encontramos un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de los valores de la presión pico y desarrollada de VI, en todos los estadios excepto en el 2, correspondiente a una presión diastólica objetivo de 10 mmHg. Sus valores, expresados en mmHg, quedan reflejados en la tabla 2. Construimos una curva de función ventricular en la que relacionamos la PPVI con el volumen del VI, encontrando un desplazamiento hacia arriba y la izquierda (fig. 1).

La función diastólica sufre un empeoramiento tras la criopreservación debido a una pérdida de elasticidad por aumento de la rigidez (tabla 3). La rigidez media sufre un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de sus valores tras la criopreservación en todos los estadios excepto en el 1 y el 8, correspondientes a

TABLA 3. Función diastólica durante criopreservación de corazón de conejo aislado

Estadio	Presión diastólica (mmHg)	Rigidez media (mmHg/ml)			Rigidez diferencial (mmHg/ml)		
		Pre	Post	p	Pre	Post	p
1	0	1,26	3,12	0,051454	-	-	-
2	10	12,32	23,01	0,003973*	1,26	3,12	0,051454
3	20	21,84	36,73	0,006434*	12,32	23,01	0,003973*
4	30	32,48	42,61	0,023019*	21,84	36,73	0,006434*
5	40	40,72	46,77	0,002890*	32,48	42,61	0,023019*
6	50	48,71	50,42	0,043643*	40,72	46,77	0,002890*
7	60	54,88	57,80	0,003542*	48,71	50,42	0,043643*
8	70	62,46	63,97	0,161334	54,88	57,80	0,003542*

Valores medios de la rigidez media y diferencial de ventrículo izquierdo antes (Pre) y después (Post) de la criopreservación. *Valores de p que presentan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

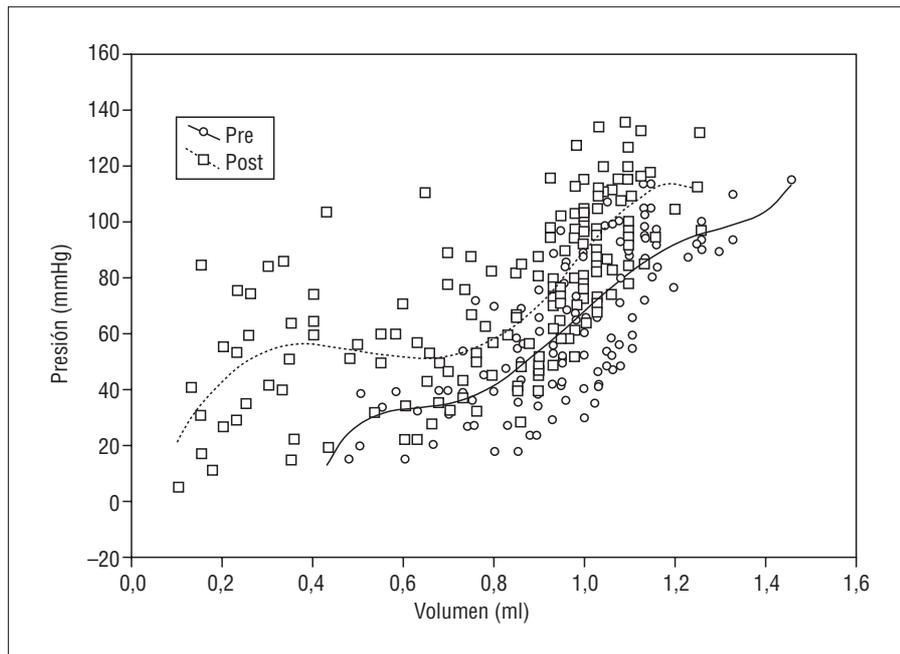


Fig. 1. Curva de función ventricular, con desplazamiento de la misma hacia arriba y la izquierda tras la criopreservación. Las magnitudes relacionadas son la presión sistólica con el volumen de ventrículo izquierdo.

una presión diastólica objetivo de 0 y 70 mmHg, respectivamente. Sin embargo, la rigidez diferencial sufre un descenso estadísticamente significativo de sus valores ($p < 0,05$) tras el almacenamiento a temperatura subcero, en los estadios 4, 5 y 8. Finalmente, en la curva diastólica de presión-volumen observamos un desplazamiento de la curva hacia arriba y a la izquierda, con un comportamiento más homogéneo tras la criopreservación, congruente con los datos obtenidos de los parámetros anteriores (fig. 2).

DISCUSIÓN

La función sistólica o capacidad de contracción muscular del corazón depende de la integridad de las fibras musculares, de un correcto acoplamiento entre la excitación-contracción y una adecuada disponibilidad de energía. Las fibras musculares están formadas

por sarcómeros, constituidos por filamentos proteicos de actina y miosina. La recurrencia cíclica de unión-separación entre los puentes miosínicos y los puntos reactivos de los filamentos de actina es lo que determina el proceso de contracción-relajación miocárdica¹².

La relación entre la longitud telediastólica de las fibras musculares y el volumen se conoce con el nombre de Ley del corazón de Starling. Dentro de ciertos límites, el aumento de longitud de las fibras musculares determina un incremento de fuerza de contracción que se acompaña de un aumento de volumen sistólico, existiendo por tanto una relación entre la longitud de la fibra muscular y la fuerza de contracción.

En nuestro estudio realizamos una curva de función ventricular relacionando la presión pico de ventrículo izquierdo y el volumen del mismo. Encontramos un desplazamiento de la curva hacia arriba y la izquierda, junto con un aumento de la presión sistólica y de

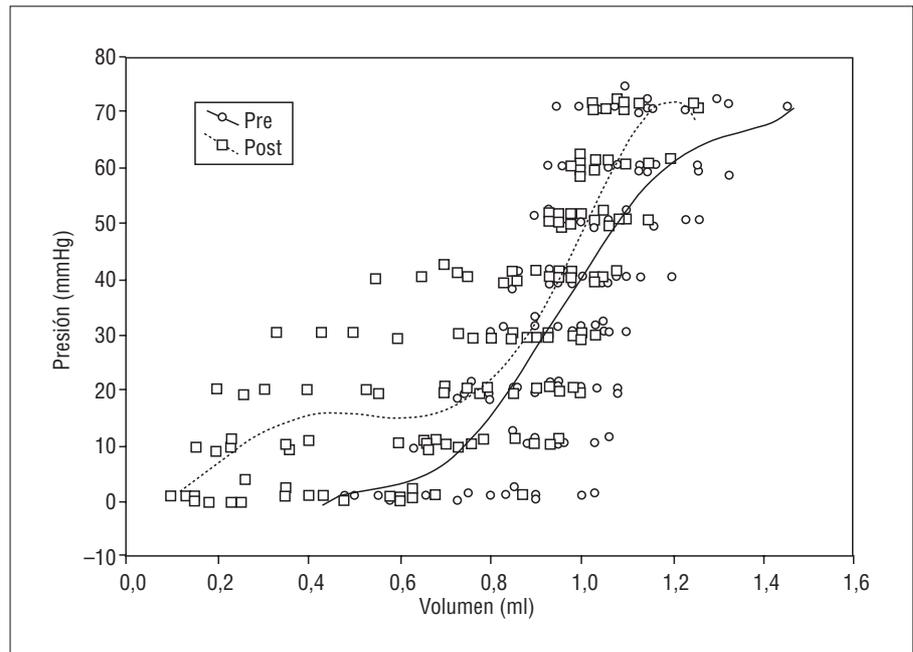


Fig. 2. Curva diastólica de presión-volumen con desplazamiento de la misma hacia arriba tras la criopreservación.

la presión desarrollada del ventrículo izquierdo tras la criopreservación, lo cual nos hace llegar a la conclusión de que no sólo no hay un empeoramiento de la función ventricular sistólica, sino que se produce una mejoría de la misma tras la criopreservación.

Esto quizá sea debido a que, como tras la criopreservación hay un aumento de rigidez, precargas similares ponen al sarcómero en una posición más idónea para que desarrolle más fuerza de contracción. Por otro lado, el aumento de rendimiento mecánico encontrado es congruente con el aumento de consumo de O_2 generado.

Para que se produzca un empeoramiento de la función sistólica ventricular es necesario que haya: *a)* una lesión del aparato generador de la contracción, es decir, de la fibras musculares; *b)* que exista una alteración en el mecanismo de acoplamiento entre la excitación y contracción, fundamentalmente por lesiones de membrana que impiden que los flujos iónicos, sobre todo el del calcio, sean los adecuados para una correcta contracción, o bien *c)* que exista alteración en la producción de energía.

Por tanto, el que no haya una depresión de la función sistólica habla en favor de una buena preservación estructural y funcional de la fibra miocárdica, de las membranas celulares y del aparato energético celular.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio de la función sistólica son concordantes con los obtenidos por Banker y Wang^{10,11} de la Universidad de Rochester respecto a los valores de la presión pico de ventrículo izquierdo, pero no hemos encontrado en la búsqueda bibliográfica realizada trabajos de otros autores que analicen la presión desarrollada ni la curva de función ventricular tras criopreservación cardíaca.

La diástole o relajación ventricular empieza a terminarse la contracción ventricular y se verifica durante la relajación isovolumétrica y el llenado rápido ventricular. Es un proceso dinámico que se corresponde con la recaptación de calcio por el retículo sarcoplásmico¹³.

El estudio de la curva presión-volumen diastólica, que refleja los cambios de presión diastólica/telediastólica intraventricular en relación con los cambios de volumen intracavitario, nos permite conocer la rigidez y compliancia ventricular.

La rigidez ventricular se define por el incremento de presión producido por el incremento de volumen acumulado (P/V) y la magnitud inversa, es decir, el cociente entre los cambios de volumen y los incrementos de presión se conoce con el nombre de distensibilidad o compliancia (V/P)¹⁴.

Los resultados obtenidos en nuestra experiencia sobre la rigidez media y diferencial son congruentes con la morfología de la curva diastólica presión-volumen encontrada tras la criopreservación. Estos hallazgos nos hacen pensar que, tras la criopreservación, el ventrículo izquierdo es más rígido, pero con un comportamiento más uniforme.

Creemos que los dos componentes fundamentales de la rigidez del ventrículo izquierdo (matriz colágena y aparato contráctil) se expresan predominantemente en distintas partes de la curva diastólica presión-volumen. En la porción inicial de la curva predominan las propiedades dinámicas de relajación muscular y en la porción final la resistencia al estiramiento del tejido conectivo ventricular¹⁴. En nuestra opinión, hay un patrón de afectación de la relajación muscular más que de alteraciones en las características elásticas pasivas

del ventrículo izquierdo, ya que se afecta fundamentalmente la porción inicial de la curva.

Cualquier trastorno de la distensibilidad de las cámaras cardíacas puede ser debido a disminución de la elasticidad del colágeno cardíaco, o bien a alteraciones en el proceso de relajación activa de la miofibrilla. La relajación activa de la miofibrilla puede afectarse por: *a)* interferencia de los mecanismos de producción energética de la célula; *b)* alteraciones en el manejo del calcio iónico de la membrana celular, o bien *c)* por lesión directa del aparato contráctil¹⁵.

Basándonos en los resultados obtenidos en nuestro modelo experimental creemos que no hay trastornos en la capacidad de producción de moléculas de alta energía suficientemente importantes como para interferir con la relajación miocárdica, puesto que no hemos observado merma en el rendimiento contráctil del miocardio y, lógicamente, una disminución de la disponibilidad energética celular habría afectado ambas funciones. Por un razonamiento similar, si las proteínas contráctiles estuviesen suficientemente dañadas como para no poderse relajar también se vería muy afectada su función sistólica, cosa que no ocurre.

Las hipótesis plausibles a partir de los resultados obtenidos son que, o bien existe alteración de las propiedades mecánicas de la matriz colágena del órgano, o bien se produce una disfunción de membranas que impide el adecuado flujo de calcio a su través, por trastornos funcionales o estructurales en el transportador.

En la revisión bibliográfica realizada no hemos encontrado estudios de la función diastólica en modelos equiparables al nuestro. Sin embargo, la valoración que hacemos de nuestros resultados es concordante con la conclusión de Kevelaitis et al¹⁶ en su estudio sobre corazones de rata, en las que se atribuye las anomalías diastólicas postrasplante a la contracción miocárdica como factor principal.

Schaefer et al¹⁷ encuentran, tras la preservación de corazón para trasplante, una disfunción diastólica que atribuyen a un inadecuado rendimiento del sistema generador de energía mediante fosforilación oxidativa. En nuestro modelo no parece haber sido ésta la causa fundamental de la disfunción diastólica, puesto que no existe afectación de otras funciones ventriculares altamente dependientes de energía, como la contracción miocárdica, ni tampoco se ha mermado la capacidad del miocardio para consumir oxígeno.

CONCLUSIONES

Según nuestros resultados concluimos que: *a)* el PEG de PM 4.000 al 5% mantiene la viabilidad biológica del corazón durante el protocolo de criopreserva-

ción a temperatura subcero, y *b)* tras la criopreservación encontramos un empeoramiento de la función diastólica de ventrículo izquierdo con mejoría de la función sistólica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wang T, Cliff PC, Batty PR, Hicks G, Layne J. Freezing preservation of adult mammalian heart at high subzero temperatures. *Cryobiology* 1991; 28: 171-176.
2. Wang T, Batty PR, Hicks GL, De Weese JA. Long-term hypothermic storage of the cardiac explant. Comparison of four solutions. *J Cardiovasc Surg* 1991; 32: 21-25.
3. García J, Miralles A. La criobiología: una nueva ciencia. *Med Clin (Barc)* 1990; 94: 65-68.
4. Pegg DE. Mechanisms of freezing damage. *Soc Experimental Biol* 1987; 363-378.
5. Zhu Q, Layne JR, Claydon M, Hicks JR, Wang T. Freezing preservation of the mammalian cardiac explant VI. Effect of thawing rate on functional recovery. *Cryobiology* 1992; 29: 478-484.
6. Vila L, García J. Revisión de los aspectos termodinámicos y cinéticos implicados en un proceso de criopreservación biológica. *Biol Clin Hematol* 1983; 5: 135-142.
7. García J, Vila L. Criopreservadores: concepto y manejo. *Biol Clin Hematol* 1984; 6: 219-224.
8. Yang X, Zhu Q, Layne JR, Claydon M, Hicks G, Wang T. Subzero nonfreezing storage of the mammalian cardiac explant I. Methanol, ethanol, ethylene glycol and propylene glycol as colligative cryoprotectants. *Cryobiology* 1993; 30: 366-375.
9. Fahy G, Lilley TH, Lindsell H, Douglas M, Meryman HT. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms. *Cryobiology* 1990; 27: 247-268.
10. Banker MC, Layne JR, Hicks GL, Wang T. Freezing preservation of the mammalian cardiac explant. II. Comparing the protective effect of glycerol and polyethyleneglycol. *Cryobiology* 1992; 29: 87-94.
11. Banker MC, Layne JR, Hicks GL, Wang T. Freezing preservation of the mammalian heart explant. III. Tissue of the dehydration and cryoprotection by polyethyleneglycol. *J Heart Lung Transpl* 1992; 11: 619-623.
12. Rhoades RA, Tannaer GA. El corazón como bomba. En: Rhoades RA, Tannaer GA, editores. *Fisiología médica*. Nueva York: Ed. McGraw-Hill, 1997; 300-319.
13. Braunwald E. Pathophysiology of heart failure. En: Braunwald E, editor. *Heart disease*. Filadelfia: WB Saunders Co., 1992; 393-418.
14. Casthely PA, Shah C, Mekjijan H, Swistal D, Yoganathan T, Komer C. Left ventricular diastolic function after coronary artery bypass grafting: A correlative study with three different myocardial protection techniques. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 114: 254-260.
15. Ohnuki M, Sunamori M, Amano J, Suzuki A. Mechanism of changes of the collagen matrix of reperfused myocardium in donor heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 106: 172-179.
16. Kevelaitis E, Mouas C, Menasche P. Poststorage diastolic abnormalities of heart transplants: is vascular dysfunction or myocardial contracture the culprit? *J Heart Lung Transplant* 1996; 15: 461-469.
17. Schaefer S, Prussel E, Carr LJ. Requirement of glycolytic substrate for metabolic recovery during moderate low flow ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 2167-2176.