

POLITECNICO DI MILANO
SCUOLA DI INGEGNERIA INDUSTRIALE E DELL'INFORMAZIONE

Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria

Laurea Magistrale in:
Ingegneria Biomedica - Biomeccanica e Biomateriali



Sviluppo e caratterizzazione di un modello sperimentale ex-vivo di rigurgito mitralico funzionale

Relatore:

Prof. Riccardo VISMARA

Correlatori:

Dott. Michał Lukasz JAWOREK

Dott. Federico LUCHERINI

Tesi di laurea di:

Cristina MANENTI

Matricola 883349

Anno Accademico 2018 - 2019

Indice

Abstract	3
Introduzione	23
1. Anatomia e patologia	26
1.1. Cenni di anatomia e fisiologia cardiaca	26
1.2. Anatomia della valvola mitrale	29
1.2.1. L'annulus mitralico e le commissure	31
1.2.2. I lembi valvolari	32
1.2.3. I muscoli papillari e le corde tendinee	34
1.3. Patologie della valvola mitrale	35
1.3.1. Stenosi mitralica	36
1.3.2. Insufficienza mitralica	37
1.4. Tecniche riparative	41
1.4.1. Tecniche chirurgiche	41
1.4.2. Tecniche transcateretere	43
1.5. Anatomia del cuore di maiale	45
2. Stato dell'arte	48
2.1. Modelli in vivo di rigurgito mitralico	49
2.2. Modelli ex vivo di rigurgito mitralico	52
2.3. Modelli ex vivo di rigurgito della valvola tricuspide	61
2.4. Obiettivi del lavoro	63
3. Materiali e metodi	66
3.1. Il cuore di cervo come nuovo modello sperimentale	66
3.2. Reperimento dei cuori di cervo	68
3.3. Test preliminari	69

3.3.1. Protocollo di prova 1	69
3.3.2. Protocollo di prova 2	73
3.3.3. Osservazioni ricavate dai test preliminari.....	75
3.4. Caratterizzazione sperimentale del modello patologico	76
3.5. Adeguamento del banco prova.....	79
3.6. Elaborazione dei dati sperimentali	83
4. Risultati e discussione.....	88
4.1. Confronto dei dati anatomici	88
4.2. Confronto dei dati tra l’inizio e la fine del test	92
4.2.1. Imaging della valvola	92
4.2.2. Andamenti delle grandezze ricavate dalle immagini ecocardiografiche	93
4.2.3. Andamenti delle portate e delle pressioni medie	96
4.2.4. Analisi statistica.....	98
4.3. Confronto dei dati con diverse configurazioni della fascia contenitiva.....	102
4.3.1. Imaging della valvola	102
4.3.2. Analisi statistica.....	103
5. Conclusioni e sviluppi futuri.....	112
Bibliografia.....	115

Abstract

Introduzione

Il rigurgito mitralico è una delle patologie valvolari più diffuse nei paesi occidentali [9] e può essere classificato in rigurgito primario o secondario. Il primo ha origini degenerative, mentre il secondo è anche chiamato rigurgito funzionale perché deriva da alterazioni nella geometria ventricolare che causano uno spostamento dei muscoli papillari (nella direzione apicale e postero-laterale) ed una dilatazione dell'annulus mitralico (soprattutto nella direzione antero-posteriore), impedendo così la perfetta coaptazione dei lembi valvolari [11-15]. Negli ultimi decenni sono state sviluppate una serie di tecniche chirurgiche e transcateretere per riparare o sostituire le valvole danneggiate; tali tecniche solitamente sono efficaci per le valvole affette da rigurgito primario [8], mentre non sempre consentono di migliorare l'aspettativa di vita dei pazienti con rigurgito secondario [8]. Per questo motivo negli ultimi decenni diverse ricerche sono state condotte con l'obiettivo di trovare delle tecniche più efficaci per risolvere il rigurgito secondario [27-35], utilizzando una serie di modelli sperimentali per riprodurre le caratteristiche fisiologiche o patologiche della struttura cardiaca. I modelli ex vivo sono un esempio di questi modelli sperimentali che prevedono di posizionare cuori espianati da cadavere o da animali all'interno di circuiti idraulici che riproducono il sistema cardiovascolare umano; il loro scopo è quello di aiutare clinici ed ingegneri a comprendere nel dettaglio quali sono i meccanismi della patologia, a migliorare i trattamenti riparativi o sostitutivi esistenti e a testare il funzionamento di nuove procedure prima di applicarle in clinica.

Generalmente vengono utilizzati i cuori porcini come modello ex vivo perché sono facilmente reperibili e hanno delle caratteristiche anatomiche molto simili a quelle del cuore umano [18,19]. Tuttavia, la maggior parte dei metodi proposti in letteratura per riprodurre le caratteristiche del rigurgito mitralico funzionale sono incompleti perché simulano solamente la dilatazione dell'annulus, tralasciando il contributo della parete ventricolare alla non coaptazione dei lembi valvolari [30, 33, 34]. Solamente lo studio di M. Jaworek et al. [35] ha riprodotto entrambe le lesioni tipiche della patologia, utilizzando un dispositivo artificiale impiantato nel cuore che dilata l'annulus e sposta i muscoli papillari. Questo dispositivo ha

però lo svantaggio di non consentire l'applicazione e la valutazione di alcune tecniche riparative o sostitutive, in particolare quelle che coinvolgono direttamente l'annulus ed i muscoli papillari. Altri lavori hanno invece utilizzato modelli ex vivo per riprodurre il rigurgito funzionale della valvola tricuspide porcina ed hanno dimostrato che l'induzione di tale patologia è più semplice rispetto al rigurgito mitralico funzionale [36, 37]. La parete destra del cuore del maiale ha uno spessore inferiore rispetto alla parte sinistra; per questo motivo la pressione esercitata dalla pompa sul ventricolo destro permette di ottenere sia la dilatazione dell'annulus che della parete ventricolare. A differenza del rigurgito mitralico funzionale, non è quindi necessario modificare la struttura fisiologica della valvola o utilizzare dispositivi artificiali per riprodurre le lesioni tipiche della patologia.

In questo lavoro di tesi, svolto presso il ForCardio Lab, è stato sviluppato un nuovo metodo per indurre il rigurgito mitralico funzionale ex vivo, utilizzando il cuore di cervo come nuovo modello sperimentale. È stato scelto questo animale non solo perché è reperibile sul territorio italiano e ha dimensioni simili al maiale, ma anche perché in letteratura esistono studi che hanno utilizzato alcune parti anatomiche del cervo come modello sperimentale [38-41]; inoltre, dall'osservazione qualitativa dei cuori espianati si è riscontrato che la parete cardiaca del cervo è più cedevole rispetto a quella porcina. Queste osservazioni suggeriscono che il cervo potrebbe essere un buon modello sperimentale per gli scopi di questa ricerca. I risultati ottenuti dalla fase sperimentale dunque sono stati analizzati per verificare l'idoneità del modello proposto alla riproduzione delle caratteristiche del cuore umano in fase di sperimentazione e per determinare se tale modello fosse facilmente ripetibile e controllabile.

Materiali e Metodi

Nella fase sperimentale sono stati utilizzati in totale 20 cuori di cervo con pesi compresi tra 600g e 1200g; 12 sono stati impiegati nei test preliminari. Tali prove avevano l'obiettivo di analizzare più nel dettaglio le caratteristiche del cuore di cervo e capire quale fosse la strategia più efficace per simulare la patologia mitralica. Poiché era difficile prevedere il comportamento dei cuori ex vivo, sono stati elaborati due differenti protocolli di prova: il primo prevedeva di sottoporre la parte sinistra del cuore ad una pressione pulsatile per un'ora e di analizzarne il comportamento ogni 10 minuti (utilizzando flussimetri, trasduttori di pressione, sonda ecocardiografica e fibroscopio). Il secondo invece consisteva nel sottoporre il ventricolo ad una pressione continua per un'ora, utilizzando gli stessi strumenti di misura del primo protocollo per valutare ogni 10 minuti il comportamento della struttura cardiaca.

La pressione esercitata dalla pompa (sia pulsatile che centrifuga) causa un elevato aumento del volume ventricolare, maggiore rispetto a quello che generalmente si ottiene utilizzando cuori porcini. Questo è un aspetto vantaggioso per ottenere il modello patologico, ma, poiché esistono diversi livelli di gravità del rigurgito mitralico funzionale, nasce la necessità di trovare un modo per regolare l'espansione del cuore. È stata quindi realizzata una fascia in polipropilene con un'altezza circa uguale a quella del ventricolo (figura 1) che riduce l'espansione della camera distribuendo uniformemente una compressione sulla parete ventricolare; sono state poi inserite delle fascette regolabili a livello dell'apice ventricolare, dei muscoli papillari e dell'annulus con lo scopo di ottenere un sistema facilmente controllabile.

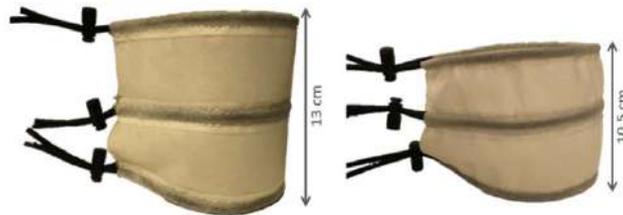


Figura 1. Fasce regolabili in polipropilene che avvolgono il ventricolo del cuore ex vivo. Le fasce sono state realizzate con due altezze differenti (13 e 10,5 cm) per poter essere adattate a cuori di diverse dimensioni.

Dai test preliminari è anche emerso che per ottenere il modello patologico è necessario utilizzare sia la pompa pulsatile che la pompa centrifuga. La pompa centrifuga garantisce il raggiungimento di una dilatazione dell'annulus mitralico e del ventricolo tali da riprodurre sul banco prova il rigurgito valvolare. Per osservare il rigurgito mitralico è indispensabile utilizzare la pompa pulsatile, perché essa permette di analizzare il comportamento dinamico del muscolo cardiaco in condizioni analoghe a quelle presenti durante il ciclo cardiaco fisiologico o patologico. Per questo motivo è stato elaborato un protocollo sperimentale definitivo che comprende l'utilizzo di entrambe le pompe:

1. Scongellare il cuore ad una temperatura tra i 2 e 4°C.
2. Pesare il cuore con una bilancia.
3. Posizionare il cuore sul banco prova pulsatile ed azionare la pompa impostando una frequenza di 60 bpm ed uno stroke volume di 110 ml.
4. Registrare la portata e la pressione a valle della valvola aortica, acquisire delle immagini della valvola mitrale con il fibroscopio e con la sonda ecocardiografica.
5. Se si osserva rigurgito della valvola mitrale procedere con l'applicazione della fascia contenitiva sul cuore esercitando una compressione nei seguenti modi: a livello

dell'annulus; a livello dei muscoli papillari; sia a livello dell'annulus che dei muscoli papillari. Per ognuna delle tre configurazioni registrare portate, pressioni ed immagini ecocardiografiche.

6. Se non si osserva rigurgito mitralico posizionare il campione sul banco prova con la pompa centrifuga e pressurizzare il ventricolo impostando una pressione di 150 mmHg. Dopo 10 minuti abbassare la pressione a 100 mmHg e registrare il valore di portata. Passare nuovamente la pompa pulsatile, registrare i valori delle portate e delle pressioni, acquisire le immagini ecocardiografiche ed endoscopiche. Nel caso in cui il rigurgito non venga osservato, ripetere il test con la pompa centrifuga per un numero di volte tale da consentire l'ottenimento della patologia. Infine, utilizzando la pompa pulsatile, procedere con l'acquisizione dei dati con le tre configurazioni della fascia contenitiva (riportate nel punto 5 del protocollo).
7. Fermare le pompe e prelevare il cuore dal banco prova.
8. Utilizzando delle forbici chirurgiche aprire il cuore del cervo e prelevare la struttura valvolare. Utilizzare la carta millimetrata ed un micrometro per raccogliere i dati anatomici significativi.

Dato che per simulare il rigurgito mitralico funzionale è necessario utilizzare due pompe, in questo lavoro il layout del banco prova pulsatile è stato modificato aggiungendo anche una pompa centrifuga. Tale scelta evita di dover continuamente spostare il cuore su due banchi prova differenti, riducendo così le tempistiche di prova e la probabilità di danneggiamento dei campioni. In figura 2 sono riportati tutti gli elementi che compongono questo circuito, in particolare nella rappresentazione schematica (figura 2b) sono riportati anche alcuni elementi non visibili nella fotografia (figura 2a).

All'apice del ventricolo sono collegate sia la pompa pulsatile (PP) che la pompa centrifuga (PC). A livello dell'aorta è collegato un simulatore di impedenza sistemica (SIS), mentre a livello dell'atrio sinistro del cuore è inserito un reservoir di precarico (PR); SIS e PR sono poi collegati tra loro. Ci sono anche degli elementi secondari che servono per migliorare la gestione del circuito:

- Serbatoio con l'acqua: mantiene in funzionamento il circuito per una durata di tempo tale da consentire l'esecuzione completa della prova sperimentale con la pompa pulsatile. In figura 2b si osserva che il serbatoio è anche collegato ad un tubo di troppopieno (arancione) che evita l'eccessivo riempimento del PR.

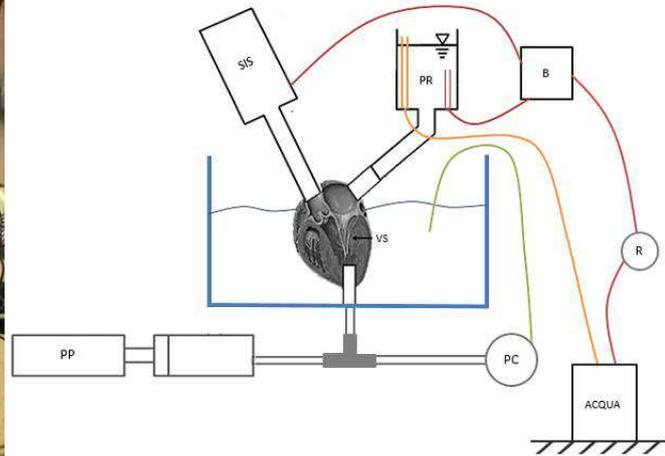
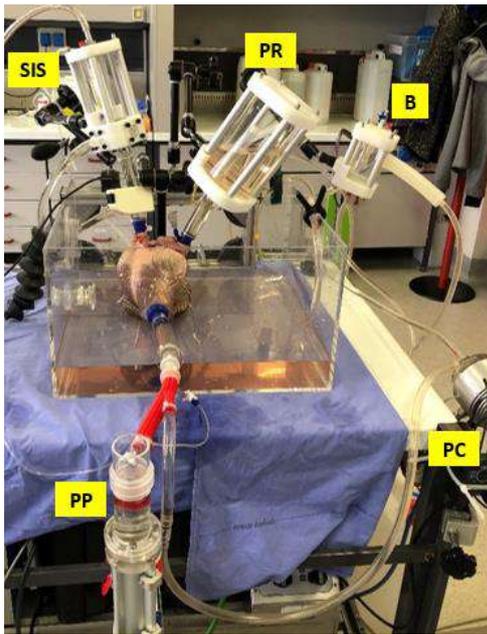


Figura 2. (a) Fotografia del banco prova e dei suoi elementi principali. (b) Rappresentazione schematica degli elementi che compongono il banco prova. PP = pompa pulsatile; PC = pompa centrifuga; R = pompa roller; B = reservoir per eliminare le bolle; PR = reservoir di precarico; SIS = simulatore di impedenza sistemica; VS = ventricolo sinistro.

- Pompa roller (R): garantisce che il liquido proveniente dal serbatoio arrivi al PR.
- Reservoir per eliminare le bolle (B): contenitore il cui scopo è quello di impedire che bolle d'aria entrino all'interno del cuore, peggiorando così la qualità delle immagini acquisite con la sonda ecocardiografica.
- Vasca riempita con acqua distillata in cui viene alloggiato il cuore; all'interno di essa viene posizionato un tubo (verde) che si collega con la pompa centrifuga.

Prima di attivare la pompa centrifuga bisogna posizionare una clamp sul tubo che collega l'aorta al simulatore di impedenza sistemica e scollegare il tubo che unisce l'atrio sinistro ed il reservoir di precarico. Quando la pompa continua viene azionata l'acqua distillata viene prelevata dalla vasca e spinta fino al ventricolo sinistro; una pressione all'interno della camera ventricolare maggiore di 60 mmHg determina la chiusura della valvola mitrale e la pressurizzazione del ventricolo. Invece, tutti gli altri elementi del circuito entrano in gioco durante il funzionamento della pompa pulsatile: l'acqua distillata proveniente dal serbatoio a terra arriva nel PR ed entra passivamente nel ventricolo sinistro; successivamente l'azione del pistone della pompa chiude la valvola mitrale e spinge il fluido fino al SIS, da qui il fluido può tornare nuovamente nel PR. Quindi il movimento della pompa pulsatile garantisce

sia il passaggio ciclico dell'acqua all'interno delle camere cardiache che la simulazione dell'apertura e della chiusura della valvola mitrale.

I dati raccolti durante la fase sperimentale sono stati elaborati con alcuni Software. ImageJ è stato utilizzato per ricavare dalla fotografia della valvola espantata le seguenti grandezze anatomiche: altezza massima dei lembi; lunghezza e area dei due lembi valvolari; lunghezza e numero delle corde tendinee. Il Software LabView è stato utilizzato per analizzare i valori delle portate e delle pressioni medie registrate da flussimetri e trasduttori. 3D Slicer invece è stato utilizzato per scomporre le immagini ecocardiografiche 3D in tre viste prospettiche e per ricavare le seguenti grandezze (figura 3): diametro antero-posteriore (A-P), diametro medio-laterale (M-L), altezza di tenting (h_t), lunghezza di coaptazione (l_c), angolo alfa, angolo beta e area di tenting (ottenuta considerando il triangolo compreso tra il diametro A-P ed i due lembi nella vista in sezione della valvola mitrale).

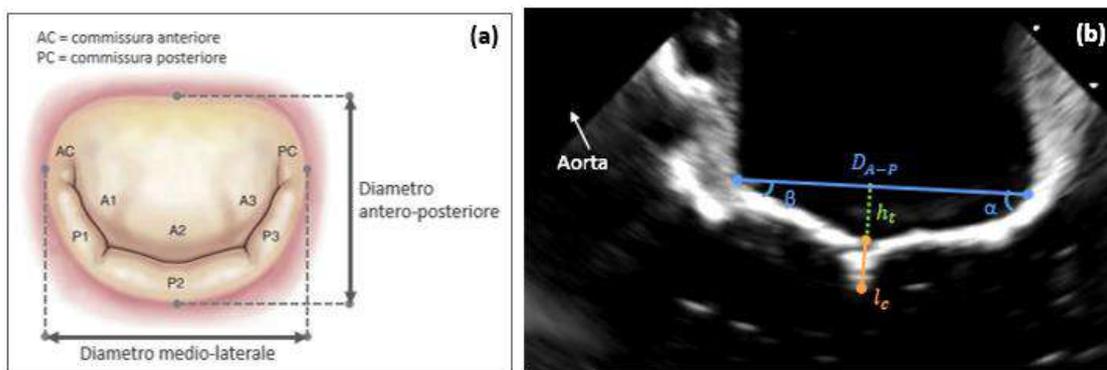


Figura 3. Grandezze ricavate dalle immagini ecocardiografiche. (a) diametro A-P e diametro M-L. (b) altezza di tenting (verde), lunghezza di coaptazione (arancione), diametro A-P ed angoli (blu).

Risultati

Dal confronto tra i dati anatomici è evidente che i cuori di cervo con pesi più bassi hanno delle dimensioni valvolari più vicine a quelle umane e, per questo motivo, possono essere considerati un buon modello sperimentale. Invece, i cuori di cervo più pesanti hanno delle dimensioni valvolari maggiori a livello delle aree dei lembi, delle lunghezze dei lembi e delle lunghezze delle corde tendinee, ma queste grandezze mostrano una relazione lineare con il peso del cuore. Per tale ragione anche i cuori di cervo più grandi possono essere considerati idonei per questa ricerca.

I dati raccolti all'inizio ed alla fine del test su banco prova sono stati confrontati con l'obiettivo di valutare se la parte sinistra del cuore di cervo è efficace per riprodurre le stesse condizioni del rigurgito funzionale mitralico. Dalle immagini ottenute con il fibroscopio si

osserva una differenza tra il comportamento della valvola all'inizio (figura 4a) ed alla fine della prova (figura 4b); in quest'ultimo caso è assente la coaptazione dei lembi in fase sistolica.

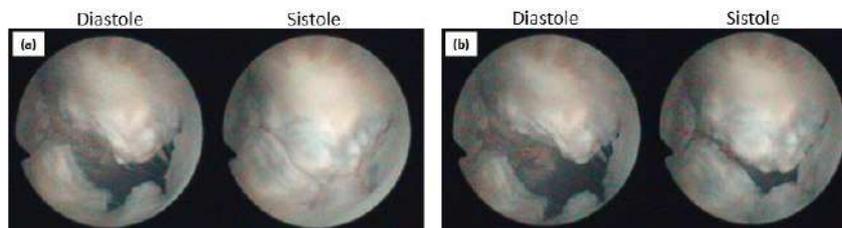


Figura 4. (a) Comportamento della valvola mitrale del cuore 2 all'inizio della prova sperimentale con la pompa pulsatile. (b) Comportamento della valvola mitrale del cuore 2 alla fine della prova sperimentale.

Per valutare se esistono delle differenze significative tra i dati con distribuzione normale è stato utilizzato il t-test parametrico per dati appaiati. In figura 5 sono riportati gli istogrammi che permettono di visualizzare le differenze significative tra l'inizio ed il termine della prova. Per valutare la lunghezza di coaptazione (che è l'unico valore che non segue una distribuzione normale) è stato applicato il test di Wilcoxon, ottenendo un p-value pari a 0,0156. In entrambi i test un p-value < di 0,05 è stato assunto come statisticamente significativo.

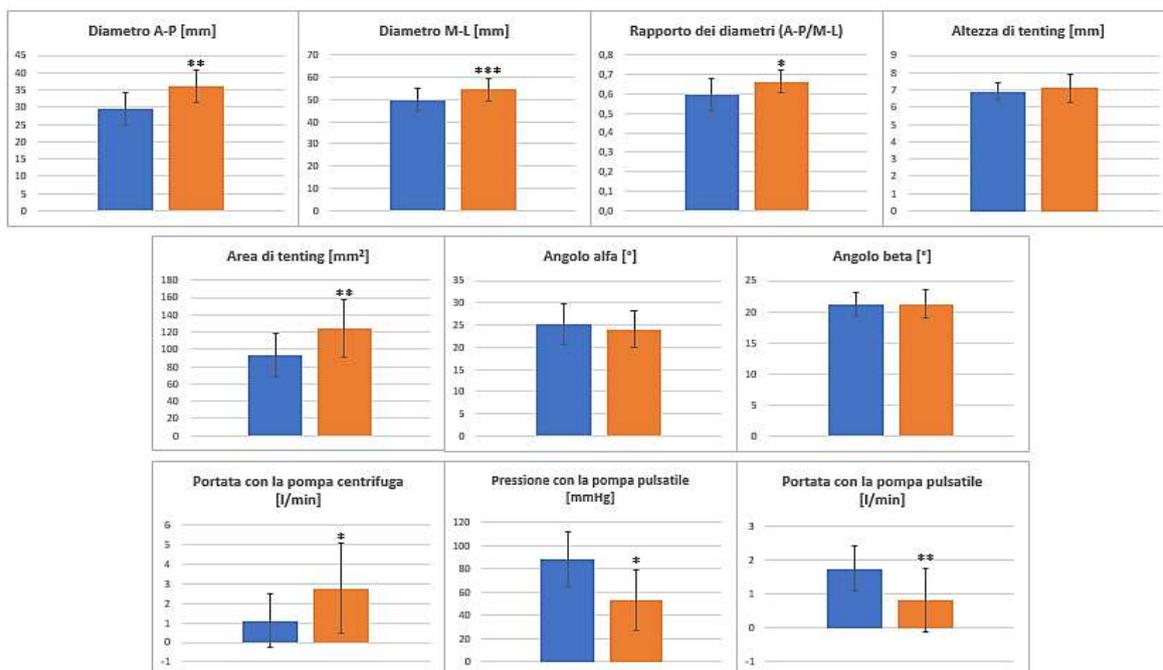


Figura 5. Istogrammi riferiti all'inizio della prova sperimentale (in blu) ed alla fine della prova sperimentale (in arancio). Gli asterischi indicano che esiste una differenza statisticamente significativa tra i valori confrontati all'inizio e alla fine del test (un numero maggiore di asterischi corrisponde ad una differenza significativa più elevata).

Si osserva: un aumento significativo del diametro A-P, del diametro M-L e dell'area di tenting; una diminuzione significativa della lunghezza di coaptazione, delle portate e della pressione; nessuna differenza significativa tra l'altezza di tenting, l'angolo alfa e l'angolo beta misurati all'inizio e alla fine della prova. Tali risultati suggeriscono che la mancanza di coaptazione dei lembi alla fine del test sia causata sia dalla dilatazione dell'annulus, perché i diametri aumentano, che dalla dilatazione del ventricolo, perché sia l'altezza di tenting che gli angoli non variano. Si può quindi concludere che il modello proposto è ripetibile ed efficace per riprodurre il rigurgito mitralico funzionale.

I risultati ottenuti posizionando sul cuore la fascia contenitiva con diverse configurazioni (riportate nel protocollo) sono stati analizzati per determinare se il modello sperimentale è facilmente controllabile. Dalle immagini endoscopiche (figura 6) si osserva una differenza tra il livello di coaptazione dei lembi in funzione della configurazione della fascia utilizzata.

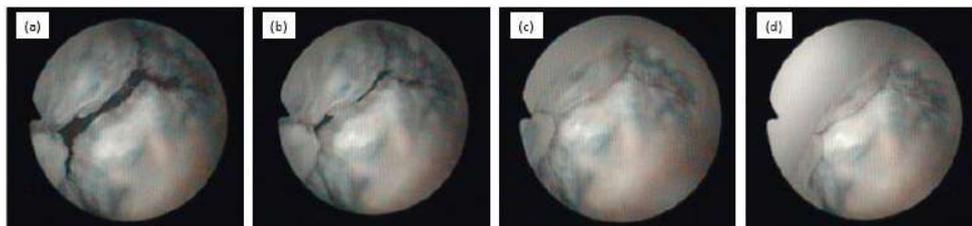


Figura 6. Comportamento del cuore 3 in fase di picco sistolico con diverse configurazioni della fascia: (a) senza fascia; (b) fascia sui papillari; (c) fascia sull'annulus; (d) fascia sia sull'annulus che sui papillari.

Per valutare se esistono delle differenze significative tra le grandezze distribuite normalmente è stato utilizzato il test ANOVA parametrico per misure ripetute. È stato poi applicato il test post-hoc di Dunnett per determinare l'esistenza di differenze significative tra il cuore senza fascia e ciascuna delle configurazioni della fascia, mentre il test post-hoc di Tukey è stato utilizzato per confrontare statisticamente le grandezze misurate con le varie configurazioni della fascia. In figura 7 sono riportati gli istogrammi che permettono di visualizzare le differenze significative esistenti tra le varie configurazioni della fascia.

Invece, per valutare la lunghezza di coaptazione (con distribuzione non normale) è stato applicato il test di Friedman ed il test post-hoc di Dunn per effettuare dei confronti analoghi a quelli effettuati per i dati distribuiti normalmente. È stato riscontrato un aumento significativo della lunghezza di coaptazione considerando la configurazione con la fascia sull'annulus e con la fascia sia sull'annulus che sui papillari rispetto al cuore senza fascia. Un incremento significativo della medesima grandezza è stato osservato anche con la fascia sull'annulus e con la fascia sia sull'annulus che sui papillari rispetto alla configurazione della

fascia solo sui papillari. In tutti i test un p-value < di 0,05 è stato assunto come statisticamente significativo.

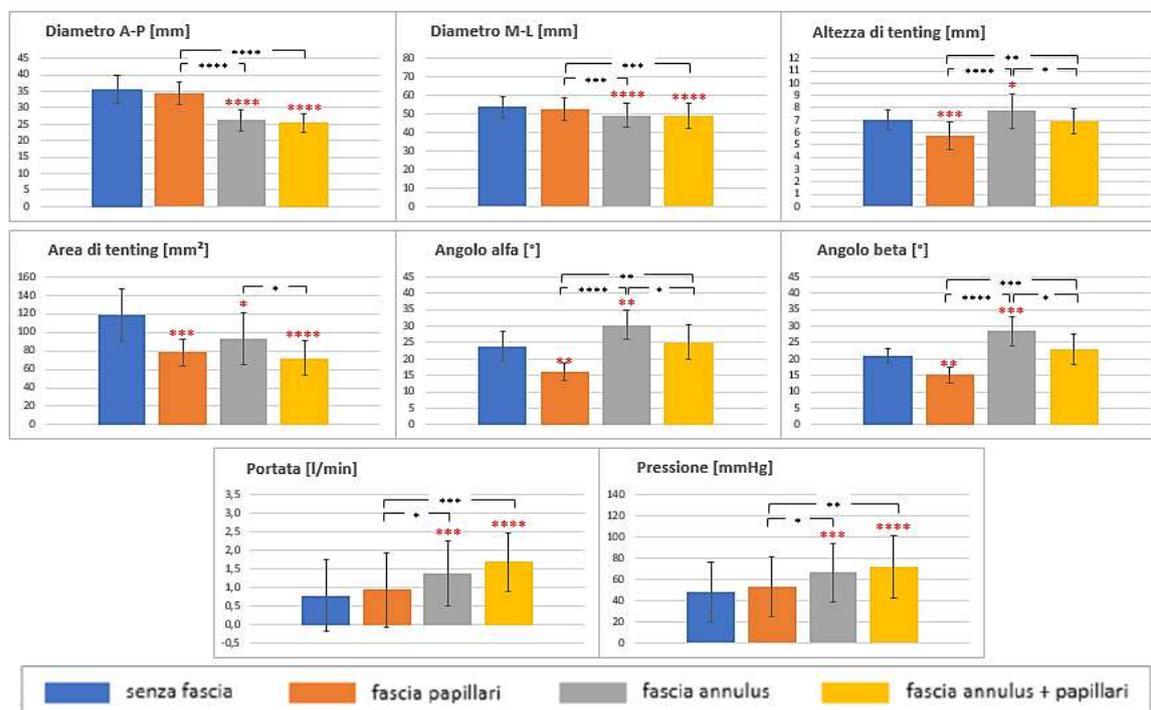


Figura 7. Istogrammi riferiti a diverse configurazioni della fascia contenitiva. Gli asterischi rossi indicano una differenza statisticamente significativa tra la situazione senza fascia ed una determinata configurazione della fascia; gli asterischi neri indicano una differenza significativa tra due diverse configurazioni della fascia (ad un numero maggiore di asterischi corrisponde una differenza significativa più alta).

Dagli istogrammi che fanno riferimento alla configurazione della fascia a livello dei muscoli papillari (in arancio), rispetto agli istogrammi (in blu) relativi al cuore senza fascia, si osserva: una diminuzione statisticamente significativa dell'altezza di tenting, degli angoli alfa e degli angoli beta; nessuna differenza significativa tra i diametri A-P e M-L. Si può concludere che la fascia a livello dei muscoli papillari permette di controllare la dilatazione del ventricolo nel modello patologico. Dalle barre che fanno riferimento alla configurazione della fascia a livello dell'annulus (in grigio), rispetto agli istogrammi (in blu) del cuore senza fascia, si deduce: un aumento statisticamente significativo dell'altezza di tenting, degli angoli alfa e degli angoli beta; una diminuzione significativa del diametro A-P e M-L. Si può quindi affermare che la fascia sull'annulus è utile per regolare la dilatazione dell'anello mitralico nel modello patologico.

Conclusioni

La valvola mitrale del cuore di cervo ha caratteristiche anatomiche analoghe a quelle della valvola umana e porcina; per tale motivo il cervo può essere accettato come modello sperimentale. I risultati ottenuti dall'analisi delle immagini ecocardiografiche hanno evidenziato una dilatazione sia della parete ventricolare che dell'annulus mitralico nel tempo; dal momento che queste sono le lesioni che caratterizzano maggiormente il rigurgito mitralico funzionale, il modello sperimentale utilizzato in questo lavoro può essere considerato efficace per indurre la patologia valvolare ex vivo. Inoltre, è stato dimostrato che il modello è altamente controllabile poiché, posizionando una fascia in polipropilene attorno al cuore su cui è stata indotta la patologia, è possibile regolare il grado di dilatazione del ventricolo e dell'annulus.

Nonostante i risultati della ricerca siano soddisfacenti, sono presenti alcuni limiti. In alcuni casi è stata osservata una dilatazione della struttura cardiaca, ma non è stata ottenuta la non coaptazione dei lembi valvolari entro un'ora dall'inizio della prova sperimentale. La pompa pulsatile connessa all'apice del ventricolo non permette di riprodurre la contrazione naturale del ventricolo e induce un flusso intraventricolare non fisiologico. I cuori di cervo sono meno facilmente reperibili rispetto a quelli porcini.

La tecnica proposta in questa tesi non è efficace per indurre la patologia del rigurgito mitralico funzionale sul cuore di maiale perché esso presenta una parete cardiaca più rigida rispetto a quella del cervo. In letteratura però esistono degli studi che hanno dimostrato che è possibile rimodellare il tessuto cardiaco utilizzando il collagenase, un enzima in grado di degradare il collagene presente nel tessuto muscolare [45-50]; tutte queste tecniche suggeriscono che l'iniezione del collagenase nella struttura valvolare del maiale ex vivo potrebbe modificarne le caratteristiche meccaniche e renderlo più adatto per simulare il rigurgito mitralico funzionale. Pertanto uno sviluppo futuro di questa tesi potrebbe essere l'utilizzo di un protocollo analogo a quello proposto, ma applicato su cuori di maiale modificati con il collagenase.

Il modello sperimentale qui proposto potrebbe essere utilizzato per valutare il funzionamento di nuove tecniche riparative o sostitutive della valvola mitrale e per migliorare quelle già esistenti. La possibilità di simulare il rigurgito mitralico funzionale su banco prova rappresenta inoltre uno strumento utile per effettuare il training chirurgico e per valutare nel dettaglio i meccanismi della patologia.

Abstract

Introduction

Mitral regurgitation is one of the most common valvular disease in the western countries [9] and it can be classified into primary or secondary regurgitation. The first one is caused by degenerative pathologies, while the latter one is also called functional regurgitation because it comes from changes in the ventricular geometry, that cause papillary muscles displacement (in apical and postero-lateral direction) and mitral annulus dilation (mainly in antero-posterior direction), thus preventing the perfect coaptation of the valve leaflets [11-15]. In the last decades some surgical and transcatheter techniques have been developed to repair or replace damage valves; these methods are usually effective to treat primary regurgitation [8], while not always they improve the life quality of patients with secondary regurgitation [8]. For this reason, several researches have been carried out to find more effective techniques to treat the functional regurgitation [27-35], using some experimental models to reproduce physiological or pathological characteristics of the cardiac structure. Among these, the *ex vivo* models allow to reproduce the human cardiovascular system placing explanted hearts (from humans or animals) inside hydraulic circuits; their aim is to help clinicians and engineers to better understand the mechanisms of a pathology, to improve existing reparative or replacement treatments and to test new procedures before applying them in clinical environments.

Porcine hearts are the *ex vivo* models most commonly used because they are easily available and they have anatomical characteristics like those of the human heart [18,19]. However, most of the methods used in literature to obtain functional mitral regurgitation are incomplete, because they reproduce the annular dilation, without consider ventricular wall lesions [30, 33, 34]. Only the work of M. Jaworek et al. [35] has been able to reproduce both the lesions typical of the pathology, implanting in the heart an artificial device to dilate the annulus and to displace the papillary muscles. However, this device has a limitation, because it does not allow the application and the evaluation of some reparative or replacement techniques, especially those that involve the papillary muscles and the annulus. There are also some researches that used *ex vivo* models to induce functional tricuspid regurgitation

in pigs; it has been shown that it is easier to reproduce this pathology than the functional mitral regurgitation [36, 37]. The right side of the pig heart has a lower thickness than the left side; for this reason, both dilation of the annulus and the ventricular wall can be achieved by imposing a pressure on the ventricle. Unlike functional mitral regurgitation, it is therefore not necessary to modify the physiological structure of the valve or to use artificial devices to reproduce the typical lesions of the pathology.

In this work of thesis, performed at ForCardio Lab, a new method to induce *ex vivo* functional mitral regurgitation has been developed, using deer heart as a new experimental model. This animal has been chosen not only because it can be found in Italy and it has similar pig size, but also because in literature there are studies that have used some anatomical parts of the deer as experimental model [38-41]; moreover, from a qualitative observation of the explanted hearts, it was found that the cardiac wall of the deer is softer than the porcine one. All these considerations suggest that the deer could be a good experimental model for this work. The results obtained in the experimental phase have been analysed to verify the suitability of the proposed model in reproducing human heart characteristics and to understand if this model was easily repeatable and controllable.

Materials and Methods

In the experimental phase, 20 deer hearts (with weights between 600g and 1200 g) were used. Twelve samples were utilized for preliminary tests in order to analyse the characteristic of the deer heart and to understand which was the most effective strategy for the simulation of the mitral pathology. Since it was difficult to predict the biomechanical behaviour of the hearts, two different protocols have been developed for preliminary tests. The first one involved a piston pump to apply a pulsatile pressure on the left part of the heart for an hour and the behaviour of the valve was analysed every 10 minutes (with flowmeters, pressure transducers, echocardiographic probe and fiberscope). The latter one applied a continuous pressure on the left ventricle for an hour and the behaviour of the valve was analysed every 10 minutes with the same measurement instruments used in the first protocol.

The pressure generated by the pumping system (both pulsatile and centrifugal) improves the ventricular volume and this increment is greater compared to that observed in pig hearts. This is an advantage to obtain the pathological model, but it is important to find a way to adjust the heart expansion, because there are different levels of severity of the functional mitral regurgitation. Then it has been realized a polypropylene band, with an height

approximately equal to that of the ventricle, that reduces the heart expansion evenly distributing the compression on the ventricle wall; adjustable straps have also been inserted at annular, papillary muscle and apical level, in order to get an easily controllable system.

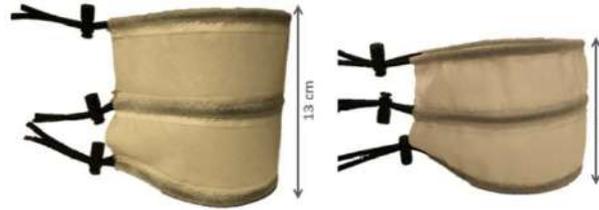


Figure 1. Adjustable bands in polypropylene that wrap the ventricle of the ex vivo heart. The bands have two different heights (13 and 10,5 cm) in order to be put on hearts with different sizes.

Preliminary tests have also shown that to obtain the pathological model it is necessary to use both the pulsatile and the centrifugal pump. The centrifugal pump allows to reach a sufficient level of annular and ventricular dilation to reproduce the disease on the test bench. The pulsatile pump is fundamental to observe the mitral regurgitation, because it reproduces the dynamic behaviour of the heart in conditions similar to those present during the physiological or pathological cardiac cycle. For this reason a definitive experimental protocol has been developed to include both the pumps:

1. Defrost the heart at a temperature between 2 and 4° C.
2. Weigh the heart with a balance.
3. Place the heart on the pulsatile test bench and use the pump by setting a frequency of 60 bpm and a stroke volume of 110 ml.
4. Record the flow rate and the pressure values downstream the aortic valve, acquire images of the mitral valve with the fiberscope and with the echocardiographic probe.
5. If mitral valve regurgitation is observed, apply the adjustable band on the heart, exerting a compression in the following ways: at the level of the annulus; at the level of the papillary muscles; both at the level of the annulus and of the papillary muscles. For each of the three configurations record flow rates, pressure values and echocardiographic images.
6. If mitral regurgitation is not observed, put the sample on the test bench with the centrifugal pump and pressurize the ventricle by setting a pressure of 150 mmHg. After 10 minutes lower the pressure to 100 mmHg and record the flow rate. Use the pulsatile pump again, record flow rates and pressure values, acquire the echocardiographic and endoscopic images. If mitral regurgitation is not observed, repeat the test with the centrifugal pump for such a number of times as to guarantee

the achievement of the pathology. Finally, acquire data with the pulsatile pump using the three configurations of the band (reported at the point 5 of the protocol).

7. Stop the pumps and remove the heart from the test bench.
8. Using surgical scissors, open the heart of the deer and remove the mitral valve. Use graph paper and a micrometer to collect significant anatomical data.

Since that two pumps are necessary to simulate the functional mitral reurgitation, in this work the layout of the pulsatile test bench has been modified adding a centrifugal pump. This choice avoids to move the heart on two different test benches many times, thus reducing the test times and the probability of damaging the samples. All the elements of the circuit are reported in figure 2, in particular in the schematic representation (figure 2b) are showed some elements not present in the picture (figure 2a).

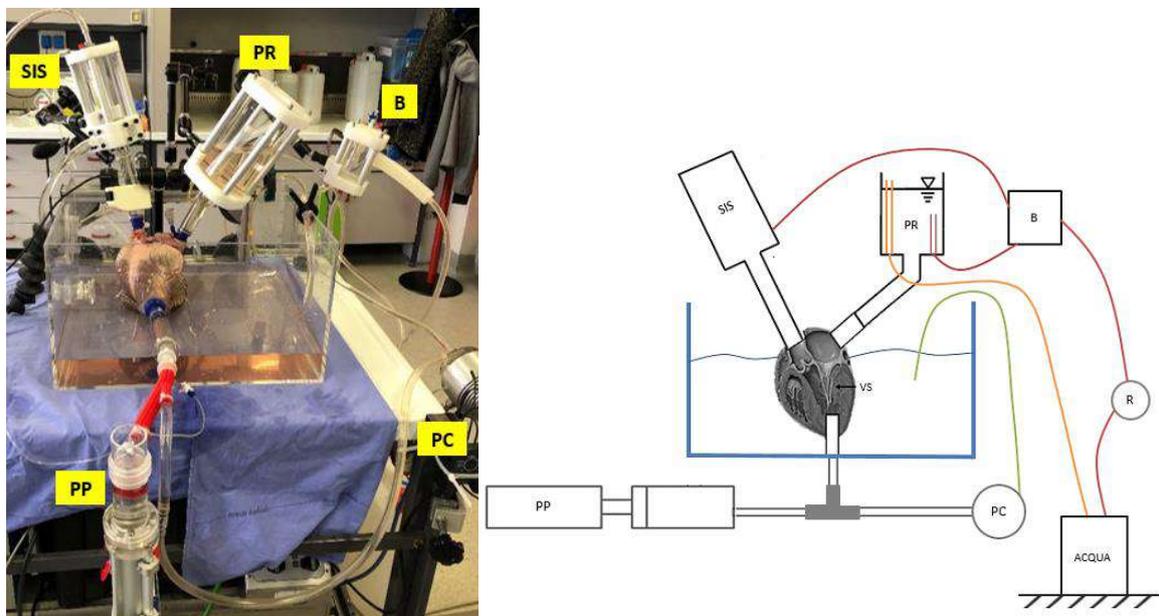


Figure 2. (a) Photograph of the test bench and its main elements. (b) Schematic representation of the elements of the test bench. PP = pulsatile pump; PC = centrifugal pump; R = roller pump; B = bubble-trap; PR = preload reservoir; SIS = systemic impedance simulator; VS = left ventricle.

Both the pulsatile pump (PP) and the centrifugal pump (PC) are connected to the apex of the ventricle. A systemic impedance simulator (SIS) is connected to the aorta, while a preload reservoir (PR) is inserted in the left atrium of the heart; SIS and PR are then linked together. There are also secondary elements to improve the management of the circuit:

- Tank with water: it keeps the circuit in operation for a period such as to allow the complete execution of the test with the pulsatile pump. Figure 2b shows that the tank is also connected to an overflow pipe (orange), which avoids over-filling of the PR.
- Roller pump (R): it ensures that the liquid coming from the tank reaches the PR.

- Bubble-trap (B): a reservoir whose purpose is to prevent that air bubbles entering the heart, thus worsening the quality of the images acquired with the echocardiography.
- Tank filled with distilled water in which the heart is housed; inside there is also a tube (green) connected with the centrifugal pump.

Before turning on the centrifugal pump, it is necessary to place a clamp on the tube that connects the aorta to the systemic impedance simulator and disconnect the tube that joins the left atrium with the preload reservoir. While the pump is running, distilled water is taken from the tank and pushed towards the left ventricle; a pressure within the ventricular chamber greater than 60 mmHg causes the mitral valve closure and the ventricle pressurization. Instead, all the other elements of the circuit act during the activation of the pulsatile pump: the distilled water coming from the tank on the ground arrives into the PR and passively enters the left ventricle; subsequently the action of the pump piston closes the mitral valve and pushes the fluid up to the SIS, from here the fluid can return again to the PR. Therefore, the movement of the pulsatile pump guarantees both the cyclic passage of water inside the heart chambers and the simulation of the opening and closing of the mitral valve.

The data collected during the experimental section have been processed with some software. ImageJ was used to get these anatomical quantities from pictures of the explanted valve: maximum height of the leaflets; length and area of the two leaflets; length and number of the tendinous cords. LabView was used to analyse the average flow rates and pressures values recorded by flowmeters and transducers.

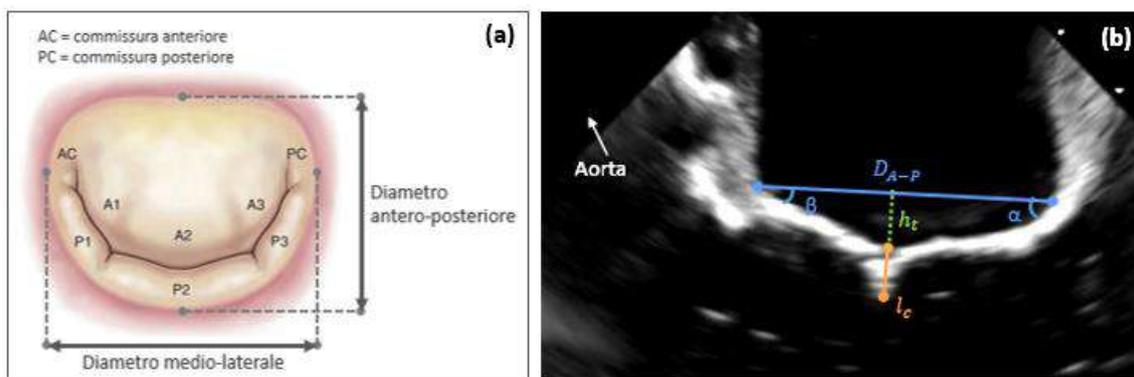


Figure 3. Measurements obtained from echocardiographic images. (a) A-P diameter and M-L diameter. (b) tenting height (green), coaptation length (orange), A-P diameter and angles (blue).

3D Slicer was adopted to study the three perspective views of the 3D echocardiographic images and to obtain the following measurements (figure 3): antero-posterior diameter (A-P), medio-lateral diameter (M-L), tenting height (h_t), coaptation length (l_c), alpha angle, beta

angle and tenting area (obtained by considering the triangle between the A-P diameter and the two leaflets in the sectional view of the mitral valve).

Results

From the comparison between anatomical data it has been shown that deer hearts with lower weights have valve dimensions closer to human ones and, for this reason, they can be considered a good experimental model. Instead, heavier deer hearts have wider leaflets, longer leaflets and longer tendinous cords, but all these quantities show a linear relationship with the heart weight. So, even the big hearts are acceptable for this research.

The data collected at the beginning and at the end of the tests were compared with the aim of assessing whether the left side of the deer heart is effective to reproduce the same lesions of the functional mitral regurgitation. From the endoscopic images a difference is observed between the behaviour of the valve at the beginning (figure 4a) and at the end of the test (figure 4b); in this last case in systolic phase there is not the coaptation of the leaflets.

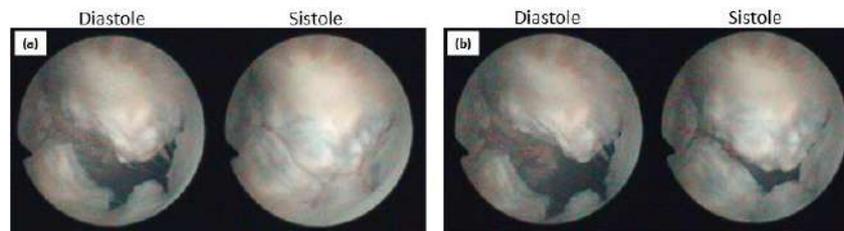


Figure 4. (a) Behaviour of the mitral valve of the heart 2 at the beginning of the test with the pulsatile pump.

(b). Behaviour of the mitral valve of the heart 2 at the end of the test.

To evaluate if there were significant differences between the data with normal distribution, the parametric t-test for paired data was used. In figure 5 are reported the histograms that allow to understand if there are significant differences among the data at the beginning and at the end of the test. To evaluate the coaptation length (which is the only value that does not follow a normal distribution) the Wilcoxon test was applied and a p-value of 0,0156 was obtained. In both tests a p-value lower than 0.05 was assumed as statistically significant.

It can be observed: a significant increase in the A-P diameter, in the M-L diameter and in the tenting area; a significant decrease in coaptation length, flow rates and pressures; no significant difference between the tenting height, the alpha angle and the beta angle measured at the beginning and at the end of the tests. These results suggest that the lack of coaptation of the leaflets at the end of the test is caused both by the dilation of the annulus, (because the diameters increase) and by the dilation of the ventricle (because the tenting

height and the angles do not change). For these reasons it can be stated that the proposed model is repeatable and effective for reproducing functional mitral regurgitation.

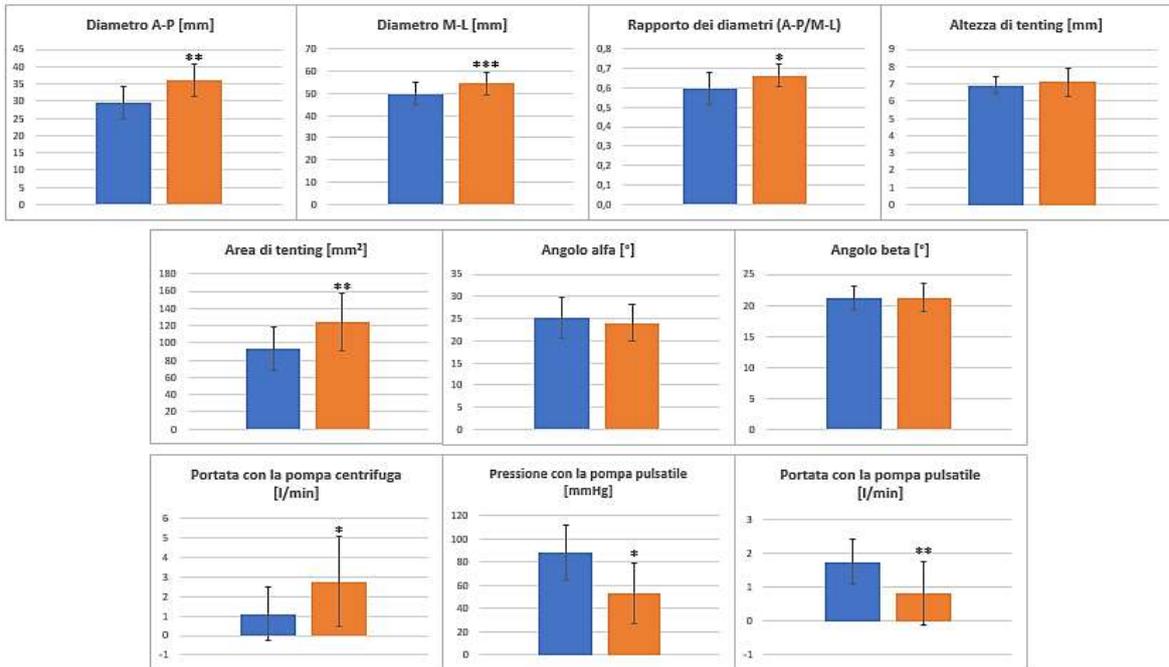


Figure 5. Comparison between the histograms referred to the beginning of the experimental tests (blue) and to the end of the tests (orange). Asterisks indicate that there is a statistically significant difference between the values compared (a greater number of asterisks corresponds to higher significant difference).

Instead, the results obtained by placing on the heart the containing band with different configurations (reported in the protocol) were analysed to determine if the experimental model is easily controllable. Looking at the endoscopic images (figure 6), there is a difference between the coaptation level of the leaflets depending on the configuration of the band used.

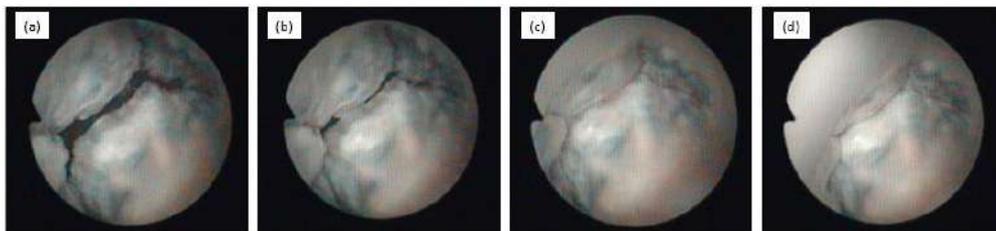


Figure 6. Behaviours of the heart 3 in systole with different band configurations: (a) without band; (b) band on papillary muscles; (c) band on the annulus; (d) band both on the annulus and on the papillary muscles.

To evaluate if there were significant differences between the normal distributed quantities, the parametric ANOVA test for repeated measurements was used. Then the post-hoc Dunnett test was applied to compare statistically the measurements referred to the heart without band and to each band configuration. Subsequently, the post-hoc Tukey test was applied to

compare statistically the quantities measured with the various configurations of the band. The histograms in figure 7 show the significant differences between the data recorded with different band configurations.

Instead, Friedman test was applied to evaluate the coaptation length (with non-normal distribution). Then post-hoc Dunn test was used to make comparisons like those made with the normally distributed data. A significant increase of the coaptation length was observed considering the band on the annulus and the band both on the annulus and on the papillary muscles respect to heart without band. A significant improvement of the same value was also present in these configurations: band on the annulus and band both on the annulus and on the papillary muscles respect to the band only on the papillary muscles. In all tests a p-value lower than 0.05 was assumed as statistically significant.

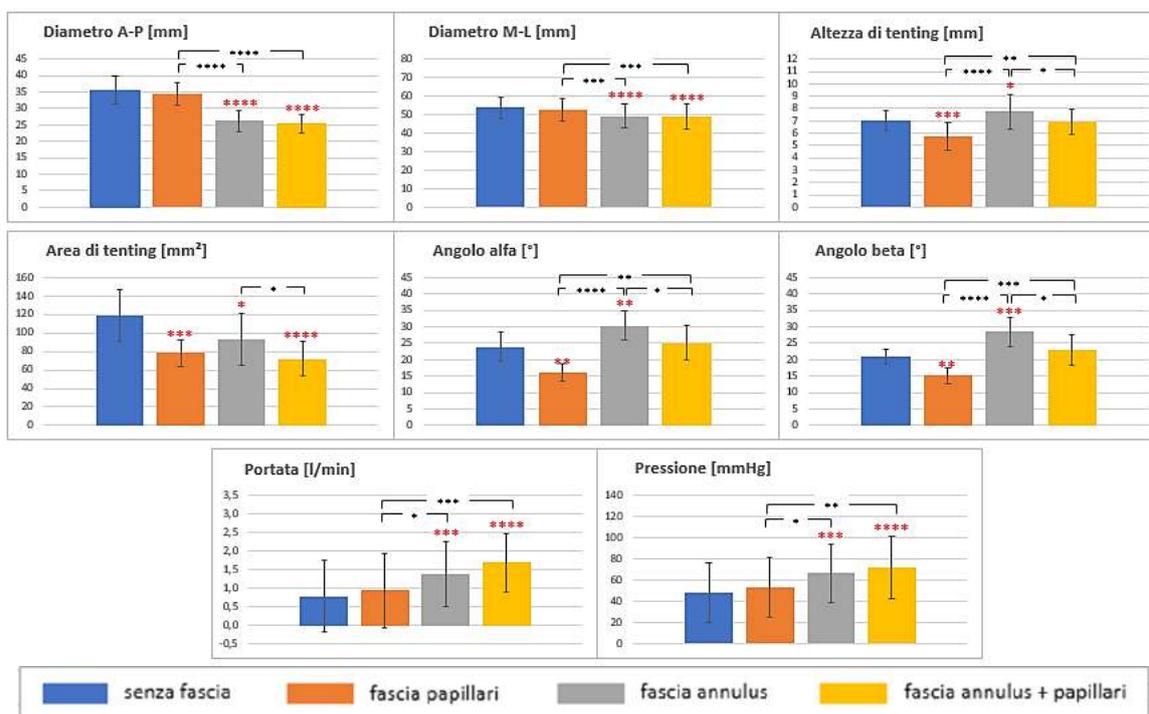


Figure 7. Comparison between the histograms referred to different configurations of the adjustable band. The red asterisks indicate that there is a significant difference between the heart without band and a given band configuration; the black asterisks indicate that there is a significant difference between two different configurations of the band (a higher number of asterisks corresponds to higher significant difference).

From the histograms that refer to the configuration of the band on the papillary muscles (orange), compared to the histograms (blue) related to the heart without band, we can observe: a statistically significant decrease of the tenting height, alpha angles and beta angles; no significant difference between A-P and M-L diameters. It can be stated that the band at the level of the papillary muscles allows to control the dilation of the ventricle in the

pathological model. From the bars that refer to the configuration of the band on the annulus (grey), compared to the histograms (blue) related to heart without band, we can observe: a statistically significant increase of the tenting height, alpha angle and beta angle; a significant decrease in the A-P and M-L diameter. For these reasons it can be said that the band on the annulus is useful for regulating the dilation of the mitral ring in the pathological model.

Conclusions

The mitral valve of the deer heart has anatomical characteristics like those of the human and porcine valve; hence the deer can be accepted as an experimental model. The analysis of echocardiographic images showed a dilation of the ventricular wall and of the mitral annulus over time; since these are the two typical lesions of the functional mitral regurgitation, the experimental model used in this work can be considered effective to induce the valvular disease *ex vivo*. Furthermore, it has been shown that the model is highly controllable because it is possible to adjust the degree of dilation of the ventricle and of the annulus by putting a polypropylene band around the heart on which the pathology has been induced.

Although the results of the research are satisfactory, there are some limits. In some cases, a dilation of the cardiac structure was observed, but the non-coaptation of the valve leaflets was not obtained within an hour from the beginning of the test. The pulsatile pump connected to the apex of the ventricle does not allow to reproduce the natural contraction of the ventricle and it induces a non-physiological intraventricular flow. Deer hearts are less available than porcine ones.

The technique proposed in this thesis is not effective for inducing the functional mitral regurgitation on porcine heart because its cardiac wall is more rigid than the deer one. In literature, however, there are studies that have shown that it is possible to remodel cardiac tissue using collagenase, an enzyme capable of degrading the collagen present inside the muscle tissue [45-50]; all these techniques suggest that the injection of collagenase into the valvular structure of the pig could modify its mechanical characteristics and makes it more suitable to simulate functional mitral regurgitation *ex vivo*. Therefore, a future development of this work could be the use of a protocol like the proposed one but applied on pig hearts modified with collagenase.

The suggested experimental model could be used to evaluate new reparative or replacement techniques for the mitral valve and to improve existing ones. The simulation of functional

mitral regurgitation on a test bench is also a useful tool for performing surgical training and for evaluating pathology mechanisms in detail.

Introduzione

Il rigurgito mitralico è una delle patologie valvolari più diffuse nei paesi occidentali [9]. In base alla causa scatenante della patologia, si possono distinguere due tipologie di rigurgito mitralico: primario e secondario. Il rigurgito primario ha origini degenerative ed è caratterizzato da alterazioni morfologiche di una o più componenti della struttura valvolare (lombi e corde tendinee). Il rigurgito secondario è anche chiamato rigurgito funzionale perché deriva da alterazioni nella geometria ventricolare che causano uno spostamento dei muscoli papillari (nella direzione apicale e postero-laterale) ed una dilatazione dell'annulus mitralico (soprattutto nella direzione antero-posteriore), impedendo così la perfetta coaptazione dei lombi valvolari. È evidente che il rigurgito funzionale è una patologia più complessa rispetto al rigurgito primario perché coinvolge non solamente la valvola mitrale, ma anche la parete cardiaca circostante. Tale complessità è dimostrata anche dal fatto che le tecniche chirurgiche riparative e sostitutive esistenti solitamente sono efficaci per le valvole affette da rigurgito primario [8], mentre non sempre consentono di migliorare l'aspettativa di vita dei pazienti con rigurgito funzionale [8]. In questo contesto nasce la necessità di creare dei modelli sperimentali che aiutino clinici ed ingegneri a comprendere più nel dettaglio i meccanismi del rigurgito secondario e a migliorare i trattamenti riparativi o sostitutivi. Questi modelli riproducono il sistema cardiovascolare umano, permettendo così di analizzare alcuni parametri, sia emodinamici che fisiologici, utili per determinare il comportamento delle diverse strutture cardiache in condizioni fisiologiche, patologiche e post-intervento chirurgico. In letteratura si possono individuare diverse tipologie di modelli che assolvono a tale funzione, tra cui quelli ex vivo: circuiti idraulici che riproducono il comportamento del sistema cardiovascolare tramite una serie di pompe e impedenze idrauliche che vengono collegate ad un cuore (animale o umano) espantato da cadavere [30-35]. Esistono dei modelli ex vivo che hanno dimostrato di essere efficaci per simulare alcune patologie cardiache, come ad esempio il rigurgito mitralico primario [32, 33] o della valvola tricuspidale [36,37], ma altre patologie, come il rigurgito mitralico funzionale, sono difficili da riprodurre correttamente [30, 34, 35]. Infatti, la maggior parte dei metodi proposti sono

incompleti perché riproducono solamente la dilatazione dell'annulus, tralasciando il contributo della parete ventricolare alla non coaptazione dei lembi valvolari [30, 34]. Solamente uno studio [35] ha riprodotto entrambe le lesioni tipiche della patologia, utilizzando un dispositivo artificiale impiantato nel cuore che dilata l'annulus e sposta i muscoli papillari. Questo dispositivo ha però lo svantaggio di non consentire l'applicazione e la valutazione di alcune tecniche riparative o sostitutive, in particolare quelle che coinvolgono direttamente l'annulus ed i muscoli papillari. Questo lavoro di tesi, sviluppato presso il ForCardio Lab, ha quindi l'obiettivo di proporre una nuova metodologia per riprodurre il rigurgito mitralico funzionale ex vivo.

Generalmente le prove sperimentali ex vivo vengono condotte utilizzando cuori di maiale perché sono facilmente reperibili ed hanno delle caratteristiche anatomiche simili al cuore umano [18, 19], ma tali da non facilitare la riproduzione del rigurgito mitralico funzionale su banco prova. In questo lavoro sarà utilizzato il cuore di cervo come nuovo modello animale per replicare le caratteristiche della patologia. È stato scelto non solo perché è un animale reperibile sul territorio italiano e con dimensioni simili al maiale, ma anche perché in letteratura esistono studi che hanno utilizzato alcune parti anatomiche del cervo come modello sperimentale [38-41]; quindi questo suggerisce che anche il cuore del cervo potrebbe essere un buon modello. Inoltre la parete cardiaca del cervo ha una rigidità inferiore rispetto a quella del cuore porcino, caratteristica che potrebbe facilitare la riproduzione del rigurgito funzionale ex vivo. L'unico svantaggio rispetto al cuore porcino è la sua minore reperibilità; per questo motivo è stato necessario raccogliere campioni da diversi comprensori di caccia del Nord Italia: Alta Valle Susa, Valli Pellice, Alpi Comasche, Prealpi Comasche e Prealpi Bergamasche.

Nel primo capitolo sarà introdotta l'anatomia e la fisiologia della valvola mitrale umana; verranno poi spiegate quali sono le patologie che colpiscono questa valvola (prestando particolare attenzione al rigurgito mitralico funzionale) e le tecniche riparative esistenti. Infine verrà riportato un breve confronto tra le caratteristiche anatomiche della valvola porcina (uno dei modelli animali più utilizzati) ed umana.

Nel secondo capitolo sarà presentato lo stato dell'arte relativo ai modelli sperimentali che riproducono il rigurgito mitralico, concentrandosi sui modelli ex vivo. Partendo dai limiti presenti in letteratura saranno definiti gli obiettivi del lavoro.

Il terzo capitolo descriverà i materiali e i metodi utilizzati per ottenere il rigurgito funzionale mitralico su cuori di cervo ex vivo, in termini di: banco prova, strumenti di misurazione, protocollo sperimentale e procedure di elaborazione dei dati.

Nel quarto capitolo verranno presentati e discussi i risultati sperimentali più significativi.

Nell'ultimo capitolo saranno riportate le conclusioni relative al lavoro svolto e le proposte per eventuali sviluppi futuri.

1. Anatomia e patologia

1.1. Cenni di anatomia e fisiologia cardiaca

Il cuore è un organo muscolare cavo che ha il compito di pompare il sangue verso i vari distretti del corpo; il trasporto del sangue è garantito dai vasi sanguigni, che si distinguono in:

- arterie, che trasportano il sangue ossigenato dal cuore verso gli organi;
- vene, che trasportano il sangue deossigenato dagli organi al cuore.

Il cuore (figura 1) è situato nel mediastino, spazio nella cavità toracica compreso tra i due polmoni, ed è avvolto dal pericardio, un sacco fibroso che lo isola dai tessuti circostanti. L'organo è formato da quattro camere, nella parte superiore si trovano gli atri (destro e sinistro), mentre la parte inferiore è composta dai ventricoli (destro e sinistro).

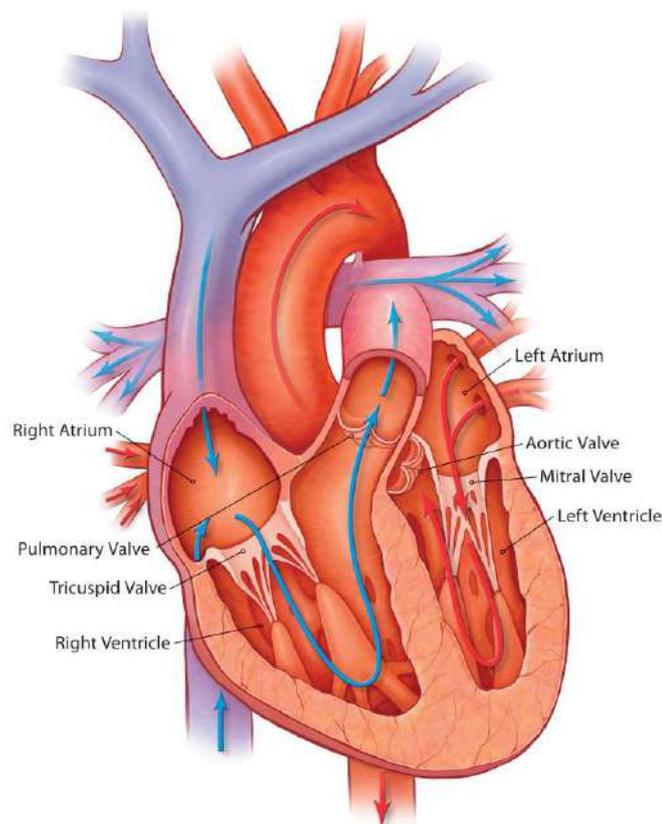


Figura 1. Struttura cardiaca ed elementi che la compongono. Le frecce blu rappresentano il percorso che il sangue compie nella parte destra del cuore (circolazione polmonare); le frecce rosse rappresentano l'andamento del flusso sanguigno nella parte sinistra del cuore (circolazione sistemica).

Anche se anatomicamente il cuore è considerato come un unico organo, esso funziona come due pompe separate che garantiscono il passaggio del sangue in due circolazioni differenti:

- **Circolazione polmonare:** l'atrio destro riceve il sangue non ossigenato proveniente dagli organi tramite le vene cave (superiore e inferiore) e il ventricolo destro spinge il sangue verso i polmoni tramite l'arteria polmonare.
- **Circolazione sistemica:** l'atrio sinistro riceve il sangue ossigenato proveniente dai polmoni tramite le vene polmonari e il ventricolo sinistro spinge il sangue verso i vari organi del corpo tramite l'aorta.

Le due parti del cuore sono separate da una parete muscolare chiamata setto.

Nel cuore sono presenti quattro valvole (figura 2) che garantiscono il passaggio del sangue in una sola direzione:

- la valvola mitrale separa l'atrio sinistro dal ventricolo sinistro;
- la valvola tricuspide separa l'atrio destro dal ventricolo destro;
- la valvola aortica si trova tra il ventricolo sinistro e l'aorta;
- la valvola polmonare si trova tra il ventricolo destro e l'arteria polmonare.

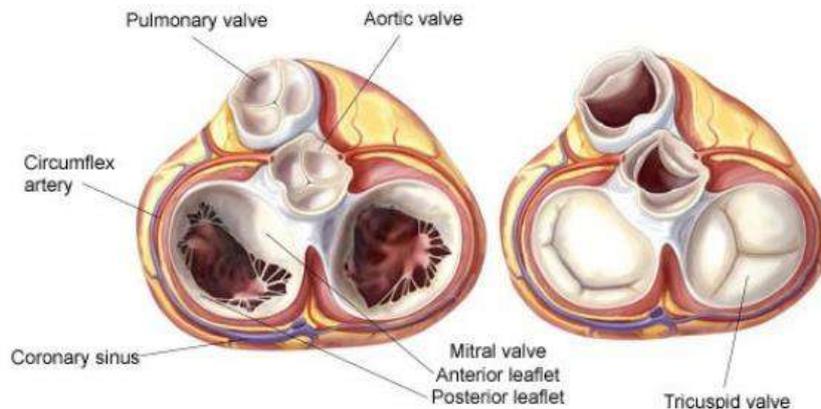


Figura 2. Vista dall'alto delle quattro valvole cardiache. La valvola mitrale e aortica fanno parte del cuore sinistro, mentre la valvola tricuspide e polmonare fanno parte del cuore destro.

L'azione di pompaggio del cuore è garantita da una continua contrazione e rilassamento del tessuto cardiaco (miocardio); la fase di contrazione è chiamata sistole, mentre la fase di rilassamento è chiamata diastole e insieme costituiscono il ciclo cardiaco:

- In **fase diastolica** la pressione atriale è maggiore di quella ventricolare, di conseguenza le valvole atrioventricolari sono aperte e il sangue fluisce passivamente dall'atrio al rispettivo ventricolo.

- In **fase sistolica** la pressione ventricolare aumenta, le valvole atrioventricolari si chiudono, le valvole che collegano i ventricoli alle arterie si aprono, i ventricoli si contraggono e il sangue viene eiettato nelle arterie.

In figura 3 è riportato il diagramma di Wiggers, che rappresenta l'elettrocardiogramma, i toni cardiaci, gli andamenti delle pressioni e la variazione del volume ventricolare durante le varie fasi del ciclo cardiaco. I valori riportati sui grafici fanno riferimento alla parte sinistra del cuore, gli andamenti di pressioni e volume ventricolare sono analoghi anche nella parte destra del cuore, ma con valori ridotti rispetto alla parte sinistra.

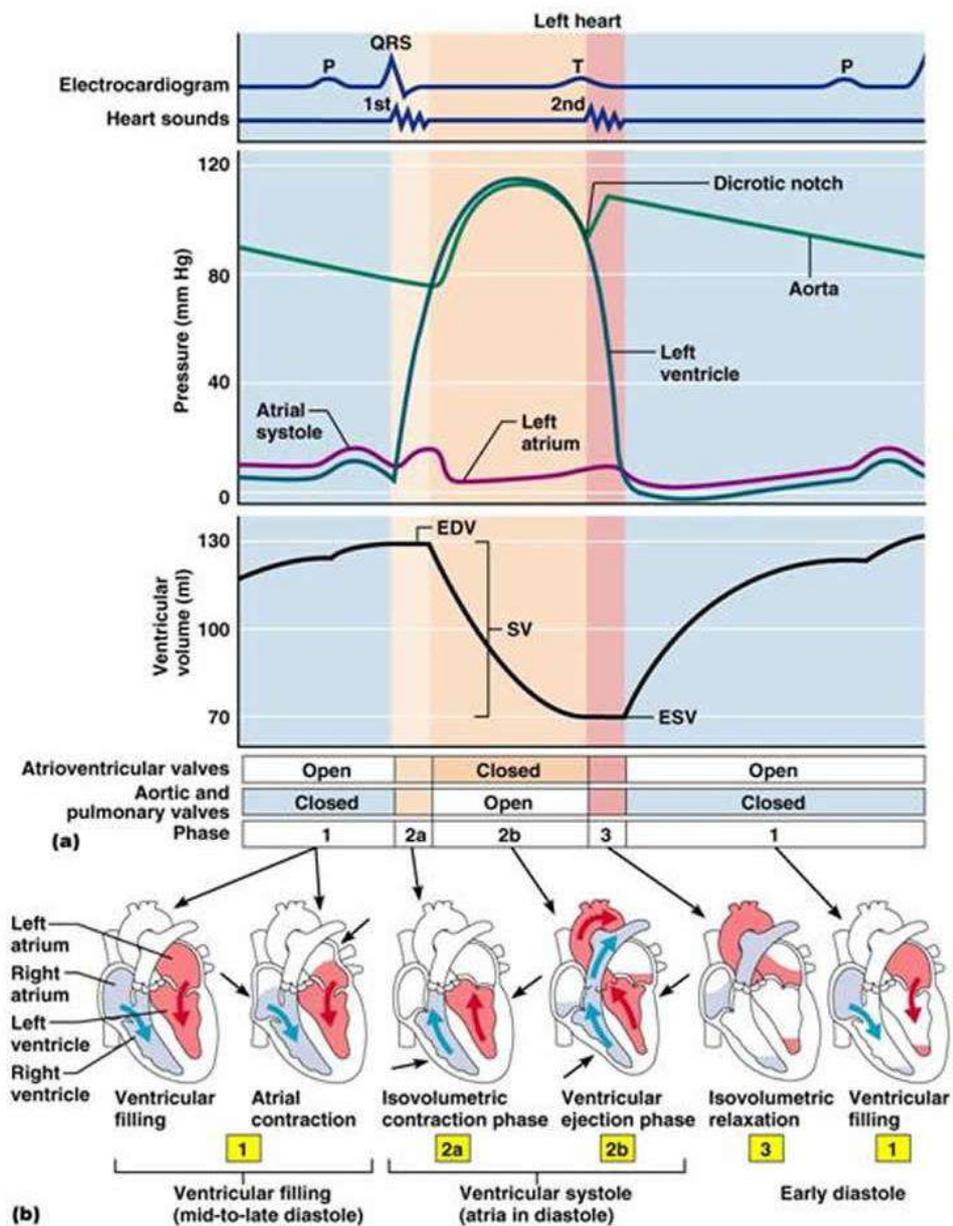


Figura 3. (a) diagramma di Wiggers riferito alla parte sinistra del cuore. (b) le figure evidenziano a quale fase del ciclo cardiaco è riferito il tratto della curva riportato sul diagramma.

Il battito cardiaco è ritmico ed è controllato da un gruppo di cellule situate nella parete superiore dell'atrio destro note con il nome di nodo senoatriale (figura 4). Ogni battito è avviato da un impulso elettrico che parte dal nodo senoatriale e si propaga lungo la parete cardiaca permettendo la contrazione del miocardio; mediamente, in un soggetto a riposo, la contrazione si verifica con una frequenza tipica di circa 70 volte al minuto. Partendo dal nodo senoatriale, l'impulso si diffonde in entrambi gli atri fino al nodo atrioventricolare, da esso si propaga attraverso due fasci di nervi, ognuno dei quali conduce l'onda di depolarizzazione verso uno dei due ventricoli. Questi nervi si collegano poi ad altre cellule specifiche, chiamate fibre del Purkinje, che sono poste lungo la parete ventricolare e che determinano una rapida stimolazione dei ventricoli.

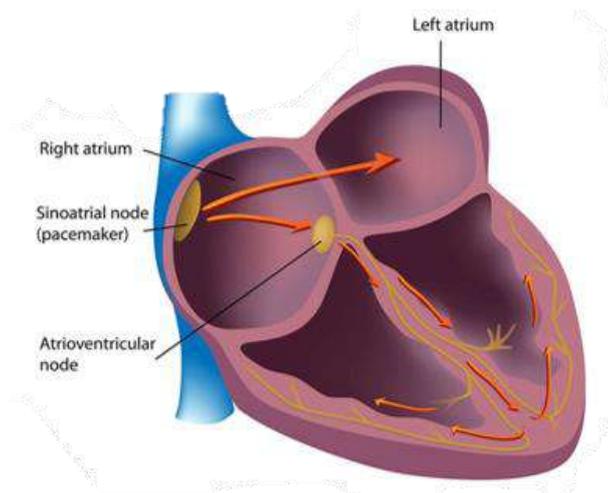


Figura 4. Propagazione dell'impulso elettrico che parte dal nodo senoatriale e causa la contrazione del miocardio.

1.2. Anatomia della valvola mitrale

La valvola mitrale è una valvola che garantisce il flusso unidirezionale del sangue dall'atrio al ventricolo sinistro. La struttura valvolare è formata da due lembi, anteriore e posteriore, che sono collegati ai muscoli papillari tramite delle corde tendinee (figura 5). I lembi valvolari sono ancorati alla parete cardiaca tramite un annulus fibroso, mentre i muscoli papillari sono fissati alla parete ventricolare.

Il complesso valvolare mitralico in fase diastolica garantisce il passaggio del sangue dall'atrio al ventricolo sinistro, mentre in fase sistolica determina la chiusura dell'orifizio atrioventricolare, impedendo così il flusso retrogrado di sangue dal ventricolo all'atrio.

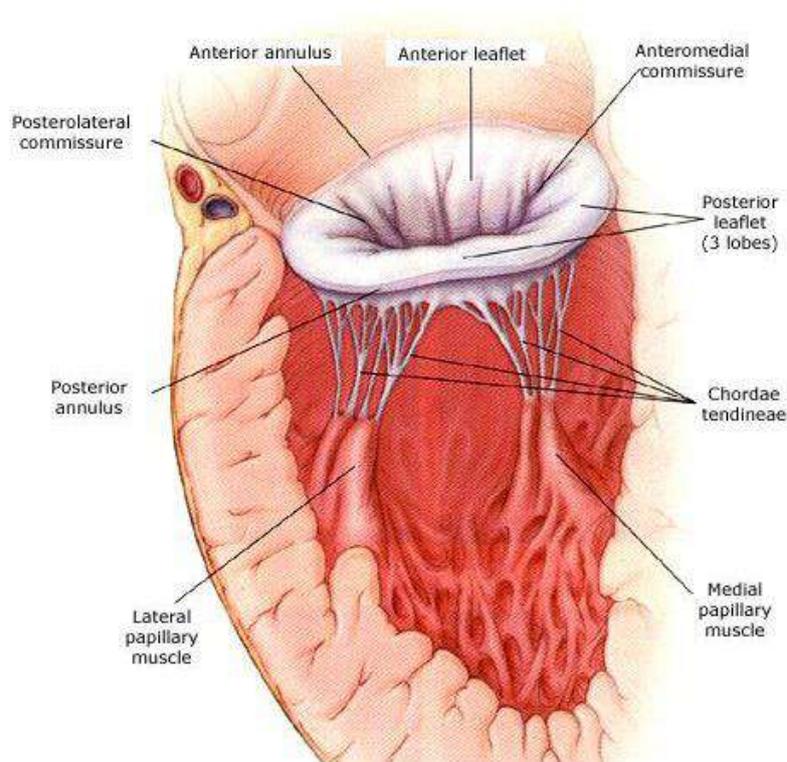


Figura 5. Elementi che compongono la valvola mitrale: i lembi anteriore e posteriore sono collegati, tramite le corde tendinee, ai muscoli papillari che, a loro volta, sono ancorati alla parete ventricolare.

Il movimento della valvola dipende dall'azione coordinata di diversi elementi anatomici: i lembi mitralici, l'anello, le corde, i muscoli papillari e la parete del ventricolo sinistro.

È evidente l'esistenza di una relazione sia anatomica che funzionale tra la valvola mitrale e il ventricolo sinistro; tale legame è visibile sia in condizioni fisiologiche che patologiche, come ad esempio nel caso di malattie ischemiche o dilatative.

La chiusura della valvola avviene per avvicinamento dei due lembi in un piano che si trova sotto al livello dell'annulus mitralico (figura 6). Gli eventi principali che si susseguono in fase di chiusura sono [1]:

- riduzione della circonferenza dell'annulus;
- contrazione del muscolo cardiaco, aumento della pressione ventricolare, generazione di un gradiente pressorio tra atrio e ventricolo che determina la chiusura della valvola;
- contrazione dei muscoli papillari e aumento della tensione delle corde tendinee, con lo scopo di evitare che la pressione ventricolare causi il prolasso dei lembi valvolari nell'atrio.

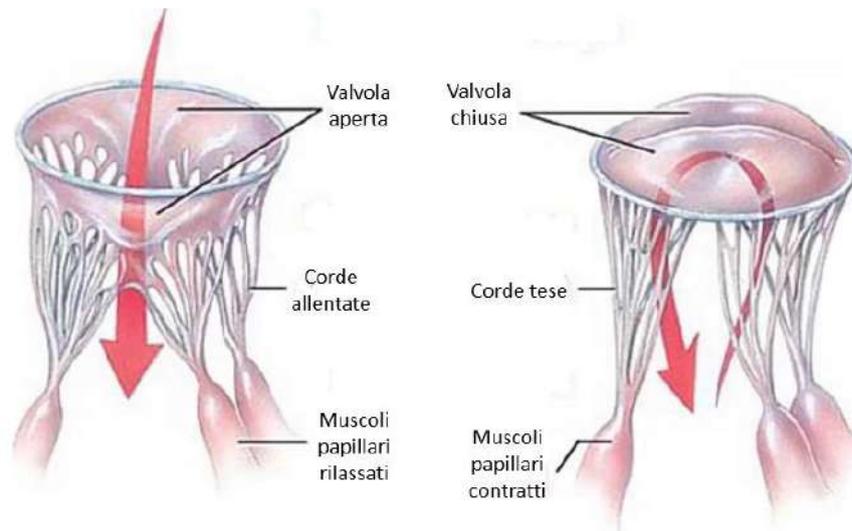


Figura 6. A sinistra è rappresentata la struttura valvolare aperta (fase diastolica), con le corde allentate e i muscoli papillari rilassati; a destra è rappresentata la valvola chiusa (fase sistolica), con le corde tese e i muscoli papillari contratti.

Analizziamo ora più nel dettaglio gli elementi che compongono la struttura della valvola mitrale.

1.2.1. L'annulus mitralico

Questo elemento della valvola mitrale è un anello in tessuto fibroelastico a livello della giunzione atrioventricolare, zona di transizione dal miocardio atriale a quello ventricolare. Ha una forma che assomiglia ad una sella o, più precisamente, ad un paraboloide iperbolico, i cui punti più bassi si trovano a livello delle commissure (figura 7).

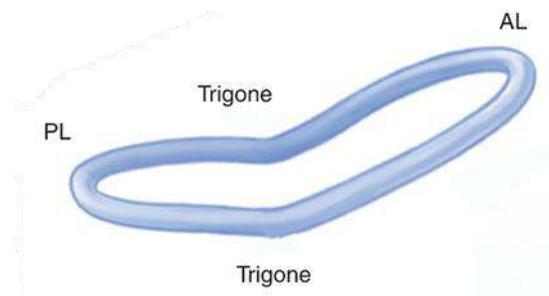


Figura 7. Paraboloide iperbolico, tipica forma dell'annulus mitralico. In corrispondenza delle commissure si trovano i punti più bassi della sella. Il lembo anteriore (AL) e il lembo posteriore (PL) si incontrano a livello dei trigoni fibrosi.

Alcuni studi dettagliati circa l'anatomia dell'annulus mitralico umano [2] riportano che: l'area varia del 26% passando dalla sistole alla diastole; la circonferenza varia del 13% dalla sistole alla diastole; l'altezza dell'anello mitralico è compresa tra 0.6 e 1.4 mm.

L'annulus è suddiviso in due segmenti che corrispondono ai due lembi valvolari. La porzione anteriore dell'anello è ancorata a due aree di giuntura fibrose, chiamati trigoni, ed è solitamente più sviluppata della porzione posteriore. Il segmento posteriore non è collegato a strutture fibrose e il suo scheletro fibroso è discontinuo.

1.2.2. I lembi valvolari e le commissure

Le commissure dividono in due parti i lembi valvolari e vengono classificate in base alla loro posizione in antero-laterale e postero-mediale (figura 8); la loro denominazione corrisponde a quella dei muscoli papillari sottostanti.

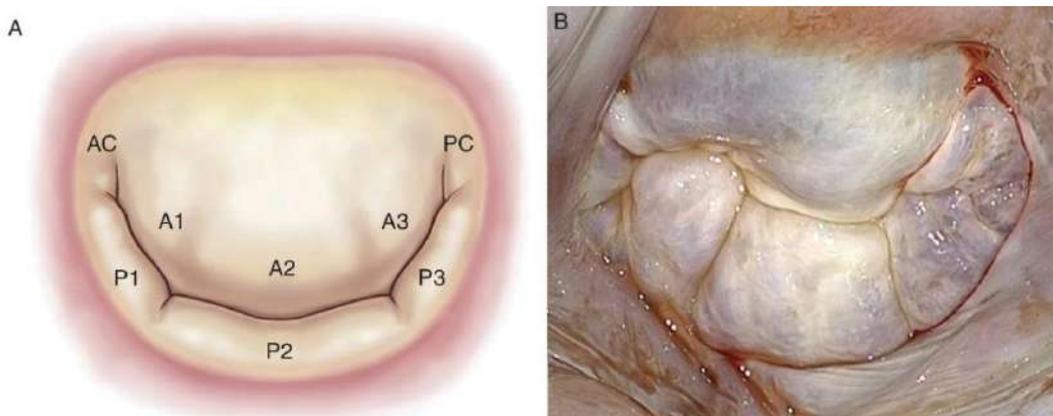


Figura 8. Vista dall'alto della valvola mitrale. (a) P1, P2 e P3 sono le tre zone del lembo posteriore che coaptano rispettivamente con la zona A1, A2 e A3 del lembo anteriore. AC = commissura antero-laterale. PC = commissura postero-mediale. (b) foto di una valvola mitrale umana.

I lembi sono una struttura continua (figura 9), ma vengono tradizionalmente suddivisi in lembo anteriore e posteriore basandosi su alcune differenze anatomiche e funzionali:

- **Il lembo anteriore** occupa circa un terzo della circonferenza dell'anello mitralico, è più largo del lembo posteriore ed ha un profilo trapezoidale o semicircolare.
- **Il lembo posteriore** occupa due terzi della circonferenza mitralica, è a sua volta suddiviso in tre lembi di minori dimensioni ed ha una altezza minore rispetto al lembo anteriore.

Inoltre, in entrambi i lembi si distinguono due zone:

- la zona di coaptazione, che corrisponde alle zone dei lembi che entrano in contatto tra di loro durante la chiusura della valvola;
- la zona atriale, che corrisponde alla regione del lembo che rimane libera ed esposta verso l'atrio durante la chiusura della valvola.

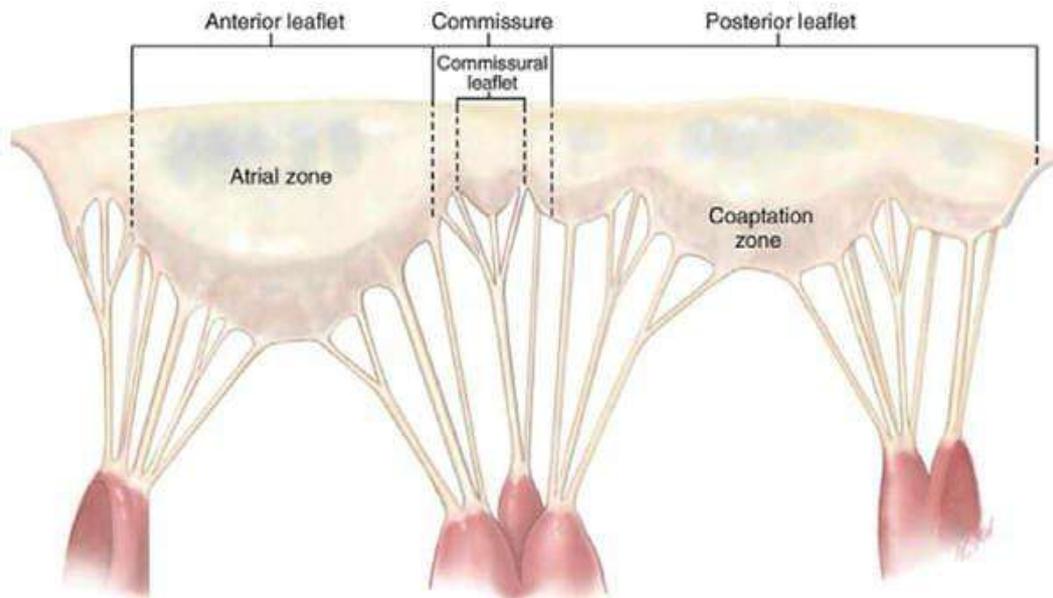


Figura 9. Vista in piano dei lembi mitralici immaginando di tagliare la valvola a livello di una delle due commissure. In particolare, si osserva che il lembo posteriore è più lungo di quello anteriore ed è suddiviso in tre lembi più piccoli; il lembo anteriore invece ha una altezza maggiore.

Lo studio di Horia Muresian et al. [3] ha dimostrato che i lembi hanno un comportamento non lineare anisotropo e sono meno deformabili nella direzione circonferenziale rispetto che nella direzione radiale. Il lembo posteriore si deforma maggiormente rispetto al lembo anteriore.

Dal punto di vista microscopico i lembi sono composti da tre strati [4], [5] (figura 10):

- Atrialis: strato esterno esposto verso l'atrio, è formato principalmente da elastina ed è presente collagene.
- Spongiosa: strato intermedio, è formato da tessuto connettivo lasso che contiene glicosamminoglicani e proteoglicani. Questo strato ha uno spessore che aumenta spostandosi dall'annulus verso il margine libero dei lembi.
- Fibrosa (o ventricularis): strato esterno esposto verso il ventricolo, sopporta maggiormente il carico rispetto agli altri strati adiacenti perché contiene fibre spesse e ordinate di collagene. Lo strato è più spesso vicino all'annulus e diventa più sottile man mano che ci si avvicina al margine libero del lembo valvolare.

Nel complesso i lembi sono formati per il 60% da collagene, per il 20% da glicosamminoglicani e per il 10% da elastina. Cellule endoteliali coprono lo strato più esterno del lembo. Lo strato subendoteliale è popolato da cellule valvolari interstiziali che,

se stimolate meccanicamente o farmacologicamente, possono trasformarsi in cellule simili ai miofibroblasti, ritenuti responsabili del rimodellamento del tessuto.

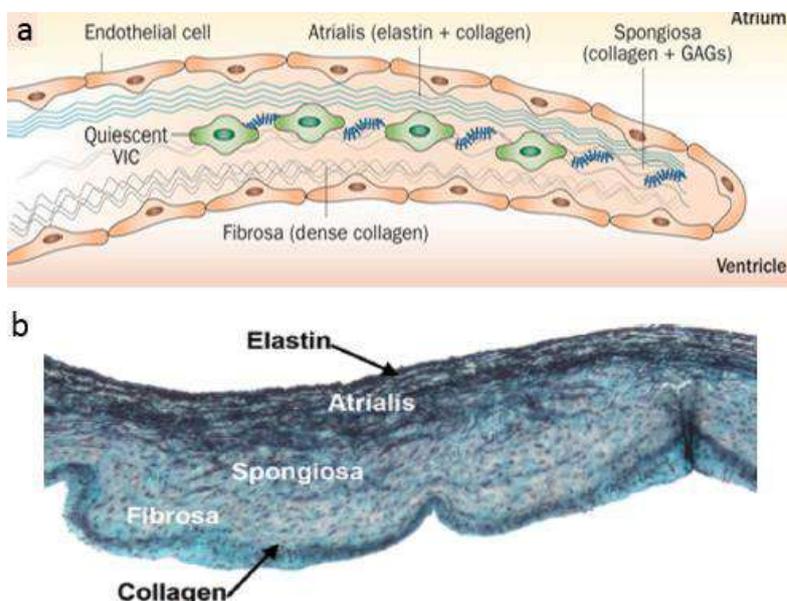


Figura 10. (a) rappresentazione dei tre strati che compongono i lembi mitralici: atrialis, spongiosa e fibrosa. Si osserva che le cellule endoteliali si trovano nello strato più esterno del lembo, mentre le cellule valvolari interstiziali (VIC) sono collocate più internamente. (b) immagine al microscopio del lembo mitralico: sono distinguibili i tre strati che lo compongono.

1.2.3. I muscoli papillari e le corde tendinee

Le corde tendinee generano una connessione tra i lembi valvolari e i muscoli papillari. Esse garantiscono un supporto strutturale alla valvola e favoriscono una distribuzione costante degli sforzi sui lembi mitralici; inoltre queste componenti subvalvolari sono posizionate in modo tale da non interferire con il passaggio del sangue dall'atrio al ventricolo e dal ventricolo all'aorta.

Le corde tendinee (figura 11) sono classificate in [6]:

- **Corde del primo ordine** (o marginali): si inseriscono a livello del margine libero del lembo mitralico e impediscono il prolasso dei lembi.
- **Corde del secondo ordine** (o intermedie): si inseriscono sui versanti dei lembi mitralici esposti verso il ventricolo; servono per mantenere la geometria e la funzione della valvola.
- **Corde del terzo ordine** (o basali): sono corde di sostegno del lembo posteriore che si originano dal muscolo papillare o direttamente dalla parete del ventricolo sinistro e si inseriscono alla base del lembo valvolare o dell'annulus; esse contribuiscono al supporto della zona centrale dei lembi.

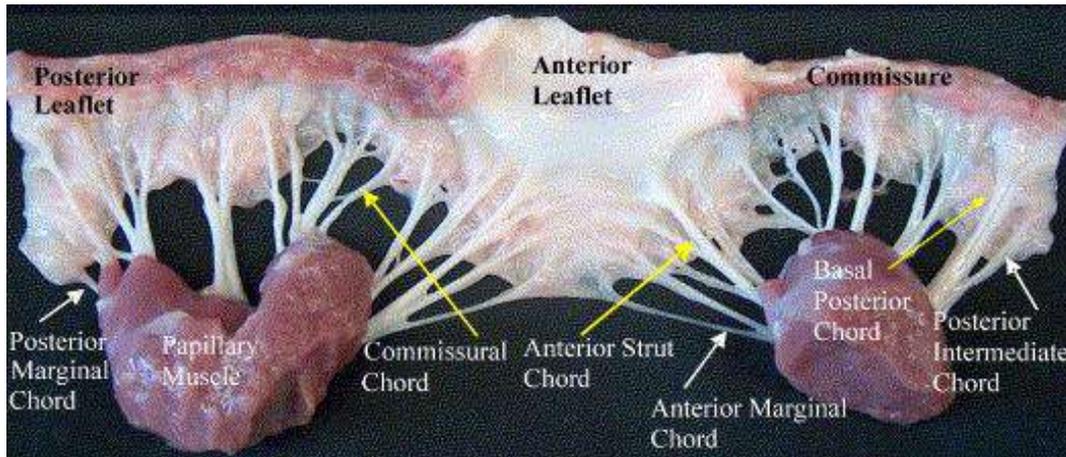


Figura 11. Valvola mitrale espianata in cui sono visibili le tre tipologie principali delle corde: marginali, intermedie e basali. La corda commissurale è così chiamata perché si inserisce in corrispondenza della commissura, mentre la corda strut è una delle due corde più spesse del lembo anteriore.

I papillari invece sono strutture muscolari a forma conica e sezione ellissoidale che originano da una zona compresa tra l'apice ed il terzo medio della parete ventricolare sinistra, si distinguono in:

- **muscolo papillare antero-laterale:** presenta solitamente una sola estremità (o testa).
- **muscolo papillare postero-mediale:** presenta generalmente due estremità (o teste).

La loro vascolarizzazione è garantita da diramazioni delle arterie coronarie e da ciascun muscolo hanno origine corde tendinee dirette ad entrambi i lembi valvolari. I due muscoli si contraggono contemporaneamente ed il loro movimento è sincronizzato con quello del miocardio ventricolare [7]: durante la sistole i papillari si contraggono e le corde vengono messe in tensione, durante la diastole i muscoli si rilassano e recuperano la loro posizione iniziale.

1.3. Patologie della valvola mitrale

Tutte le componenti del complesso valvolare descritte nel paragrafo precedente sono essenziali per garantire il corretto funzionamento della valvola mitrale; anomalie strutturali o alterazioni funzionali di questi elementi possono dare origine a patologie che compromettono il funzionamento fisiologico della valvola e della struttura cardiaca. Le principali patologie della valvola mitrale sono: la stenosi ed il rigurgito (o insufficienza) mitralico che alterano rispettivamente l'apertura e la chiusura dei lembi valvolari.

1.3.1. Stenosi mitralica

La stenosi mitralica consiste in un restringimento della valvola mitrale che ostacola il passaggio del sangue dall'atrio al ventricolo in fase diastolica e, di conseguenza, impedisce il corretto riempimento del ventricolo (figura 12).

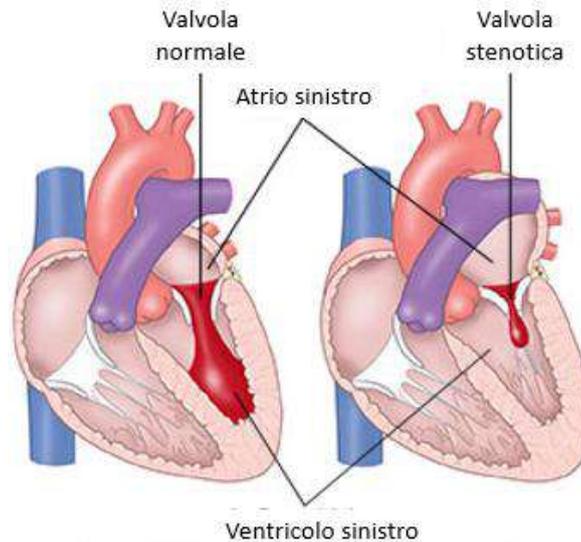


Figura 12. Confronto tra un cuore in condizioni fisiologiche (a sinistra) e uno con stenosi mitralica (a destra) in cui è evidente il restringimento della valvola in fase diastolica.

La valvola stenotica presenta le commissure fuse tra loro e i lembi più spessi rispetto alla condizione fisiologica. In condizioni di patologia avanzata si verifica anche un aumento della rigidità e della calcificazione dei lembi valvolari.

La gravità della stenosi viene stabilita in base alla gravità del restringimento del lume valvolare [8]:

- Stenosi mitralica lieve: la superficie è compresa tra 4 e 2 cm².
- Stenosi mitralica moderata: la superficie è compresa tra 2 e 1 cm².
- Stenosi mitralica severa: la superficie misura meno di 1 cm².

La causa principale della stenosi è legata a malattie reumatiche: solitamente un'infezione batterica a livello delle vie aeree genera un'inflammazione e una conseguente deformazione della valvola mitrale. Altre cause meno frequenti di stenosi mitralica sono: la calcificazione dei lembi della valvola (malattia senile), anomalie congenite ed endocarditi (infezione batterica delle cavità interne del cuore).

Lo strumento che viene maggiormente utilizzato per diagnosticare la stenosi mitralica è l'ecocardiogramma, ma anche l'elettrocardiogramma, la radiografia toracica e la stetoscopia possono aiutare ad individuare anomalie valvolari.

1.3.2. Insufficienza mitralica

L'insufficienza mitralica è la seconda patologia valvolare più diffusa in Europa [8], dopo la stenosi aortica. È caratterizzata da una chiusura non corretta della valvola in fase sistolica che determina un flusso retrogrado dal ventricolo all'atrio sinistro (figura 13).

Il flusso retrogrado del sangue aumenta la pressione nell'atrio sinistro; in presenza di rigurgito avanzato si verifica anche un incremento della pressione nelle vene polmonari che, di conseguenza, causa edema polmonare.

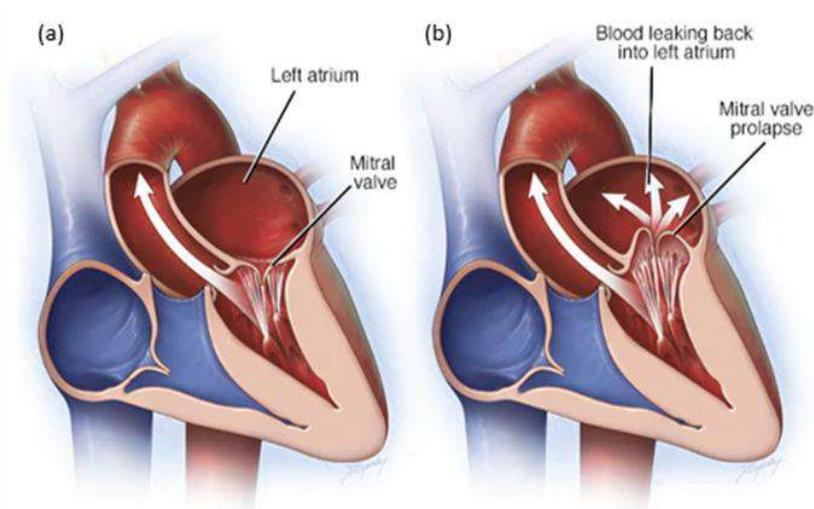


Figura 13. Confronto tra un cuore normale (a sinistra) e un cuore con insufficienza mitralica (a destra) in cui è evidente un flusso retrogrado attraverso la valvola mitrale in fase sistolica.

La patologia può essere suddivisa in due categorie in base all'eziologia:

- **Rigurgito primario:** è caratterizzato da alterazioni morfologiche di una o più componenti della struttura valvolare (lombi e corde tendinee). Nei paesi occidentali le patologie degenerative che colpiscono i lombi mitralici e le corde tendinee sono la causa che più frequentemente determina il fallimento della chiusura valvolare (circa 60% dei casi) [9]. Il rigurgito mitralico compromette la funzione ventricolare, quindi la gravità della patologia viene determinata misurando la dimensione e la frazione di eiezione del ventricolo sinistro. Altri parametri che possono essere valutati sono: il volume dell'atrio sinistro, la pressione sistolica nell'arteria polmonare, la dimensione e la funzionalità del ventricolo destro.
- **Rigurgito secondario:** viene anche chiamato rigurgito funzionale mitralico; la struttura della valvola (con le sue componenti) è fisiologica mentre il rigurgito mitralico deriva da alterazioni nella geometria ventricolare che impediscono la

perfetta coaptazione dei lembi. Questo fenomeno si osserva spesso in pazienti con cardiomiopatie ischemiche o dilatative (circa il 30% dei casi), ma anche in soggetti con fibrillazione atriale cronica e dilatazione dell'atrio (circa il 5-10% dei casi) [9]. Le alterazioni del ventricolo che determinano l'insufficienza possono essere localizzate (solitamente dovute ad un infarto infero-posteriore che crea una trazione asimmetrica sulle porzioni mediali dei due lembi) oppure diffuse a tutta la parete ventricolare (solitamente causate da una cardiomiopatia dilatativa che crea una trazione uniformemente distribuita sui lembi valvolari). L'ecocardiografia è essenziale per diagnosticare l'insufficienza mitralica secondaria.

Il rigurgito mitralico può anche essere classificato sulla base della funzionalità valvolare; ad esempio la classificazione di Carpentier [10] suddivide la patologia in tre categorie in base al movimento dei lembi (figura 14):

- **Tipo I:** sono insufficienze mitraliche con un movimento dei lembi analogo a quello presente in condizioni fisiologiche. È causata dalla perforazione/erosione dei lembi o dalla dilatazione dell'anulus;
- **Tipo II:** è presente un movimento dei lembi eccessivo rispetto alle valvole fisiologiche, le cause principali sono il cedimento o la rottura di corde tendinee;
- **Tipo III:** in questo caso è presente un movimento ridotto dei lembi. È possibile dividere questa categoria in due sottogruppi:
 - tipo IIIa: con un movimenti dei lembi ridotto in diastole e sistole a motivo dell'ispessimento e/o retrazione di lembi o corde, tipico delle patologie reumatiche;
 - tipo IIIb: con un movimento ridotto in sistole, causato da una dilatazione del ventricolo sinistro con conseguente allontanamento reciproco dei muscoli papillari.

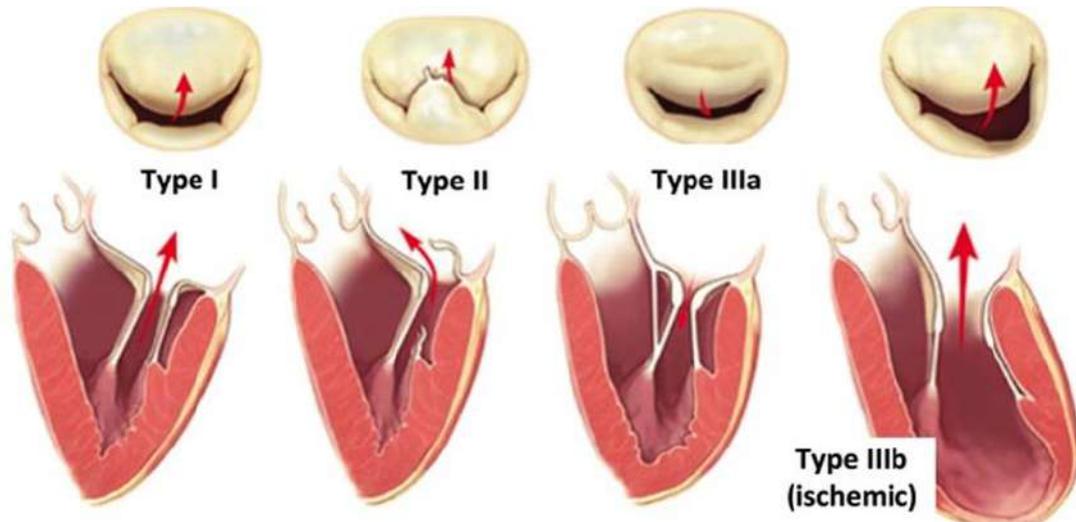


Figura 14. Classificazione di Carpentier: il rigurgito mitralico viene suddiviso in tre categorie in base alla mobilità dei lembi. Le valvole di tipo I si muovono normalmente, quelle di tipo II hanno un movimento eccessivo e quelle di tipo III hanno un movimento ridotto in diastole (IIIa) o in sistole (IIIb).

Dalle considerazioni fatte risulta quindi che il **rigurgito funzionale mitralico** può essere considerato una **patologia ventricolare** (figura 15), con effetti secondari sull'apparato valvolare.

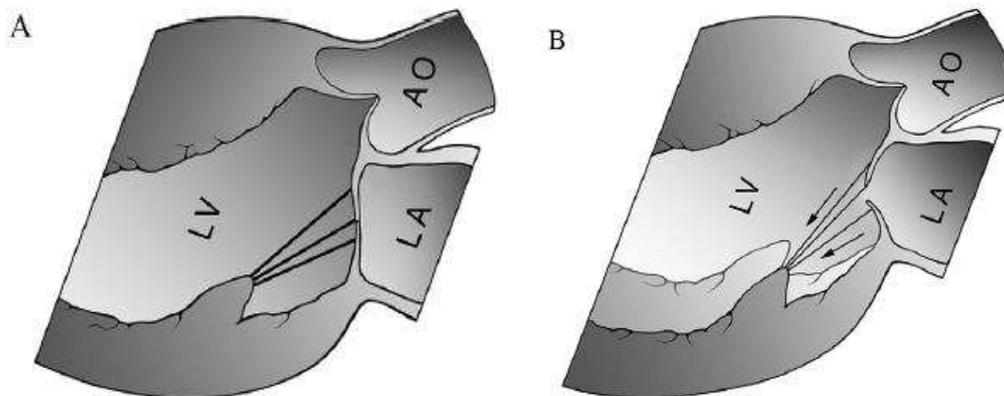


Figura 15. (a) posizione fisiologica del muscolo papillare e delle corde tendinee all'interno del ventricolo sinistro (LV). (b) allargamento della parete ventricolare che causa: spostamento del muscolo papillare, aumento della tensione sulle corde e chiusura non corretta della valvola.

Le conseguenze della dilatazione ventricolare a carico della struttura valvolare patologica sono:

- **Annulus:** la sua capacità di contrazione diminuisce perché si dilata e assume una forma più circolare rispetto a quella fisiologica. La porzione dell'annulus che coincide con l'inserzione del lembo posteriore è quella che si allarga maggiormente. Infatti, alcuni studi [11] hanno dimostrato che il perimetro dell'annulus aumenta di

circa 15 mm ed in particolare la porzione posteriore aumenta di 12.3 mm, mentre quella anteriore aumenta di 2.7 mm. Inoltre, la dilatazione nella direzione antero-posteriore solitamente risulta maggiore rispetto a quella nella direzione medio-laterale [12].

- **Lembi:** alcuni studi recenti basati sull'ecocardiografia 3D [13] hanno dimostrato l'esistenza di un meccanismo adattativo che aumenta l'area dei lembi fino al 35% con lo scopo di coprire tutta la superficie dell'orifizio anche quando il ventricolo si dilata e le forze agenti sui lembi aumentano. Nei pazienti con rigurgito funzionale però, questo meccanismo risulta insufficiente per garantire la chiusura della valvola.
- **Corde tendinee:** hanno un'estensione ridotta e sono più rigide del 16% rispetto alle corde in condizioni fisiologiche [14]; le corde del secondo ordine sono soggette ad una tensione maggiore durante l'intero ciclo cardiaco e in sistole sopportano una tensione tre volte maggiore rispetto alle corde primarie.
- **Muscoli papillari:** è considerato uno dei cambiamenti morfologici più importanti dopo la dilatazione dell'annulus, perchè causa un aumento della tensione sulle corde tendinee ed una diminuzione del movimento dei lembi in sistole (figura 15b). I papillari si spostano lateralmente, posteriormente e verso l'apice causando uno squilibrio tra le forze di chiusura valvolare. Lo studio di Di Mauro et al. [15] si è concentrato sull'analisi di diverse valvole umane patologiche ed ha dimostrato che lo spostamento dei muscoli papillari può essere simmetrico o asimmetrico:
 - spostamento simmetrico: mediamente aumentano sia gli angoli tra il piano dell'anello e il lembo anteriore che quelli tra il piano dell'anello e il lembo posteriore (figura 16). Si verifica in pazienti con cardiomiopatie dilatative (ischemiche e non).
 - spostamento asimmetrico: mediamente tutti gli angoli tra il piano dell'annulus e le tre parti del lembo posteriori (P1=laterale, P2=centrale, P3=mediale) aumentano; aumentano anche gli angoli tra il piano dell'annulus e la porzione mediale (A3) e centrale (A2) del lembo anteriore, mentre quello con la porzione laterale (A1) non cambia (figura 16). Si verifica in caso di rigurgito mitralico ischemico, ma in assenza di cardiomiopatie dilatative.

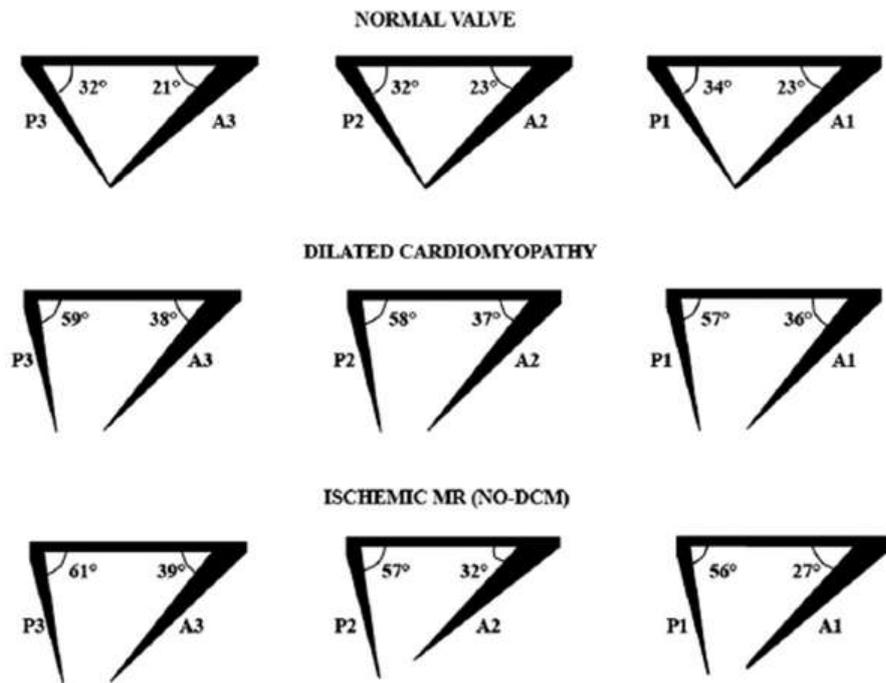


Figura 16. Confronto degli angoli che si creano tra il piano dell'annulus e le tre porzioni del lembo anteriore (A1=laterale, A2=centrale, A3=mediale) e tra il piano dell'annulus e le tre porzioni del lembo posteriore (P1=laterale, P2=centrale, P3=mediale) in condizioni fisiologiche, in presenza di cardiomiopatia dilatativa (ischemica o meno) o rigurgito ischemico (senza cardiomiopatia dilatativa). I valori degli angoli riportati fanno riferimento ai valori medi ottenuti nello studio di M. Di Mauro et al. [15] considerando diverse valvole umane patologiche.

1.4. Tecniche riparative

In questa sezione verranno trattate le principali tecniche che vengono utilizzate per riparare il rigurgito mitralico primario e secondario.

1.4.1. Tecniche chirurgiche

L'intervento chirurgico è lo standard di riferimento per trattare il **rigurgito mitralico primario** [8]. In figura 17 sono riportati tutti gli elementi che vengono valutati dall'equipe medica per scegliere il trattamento più adatto per il rigurgito primario: in base alle caratteristiche specifiche del soggetto si può optare per il trattamento chirurgico, per la terapia farmacologica o per una tecnica percutanea.

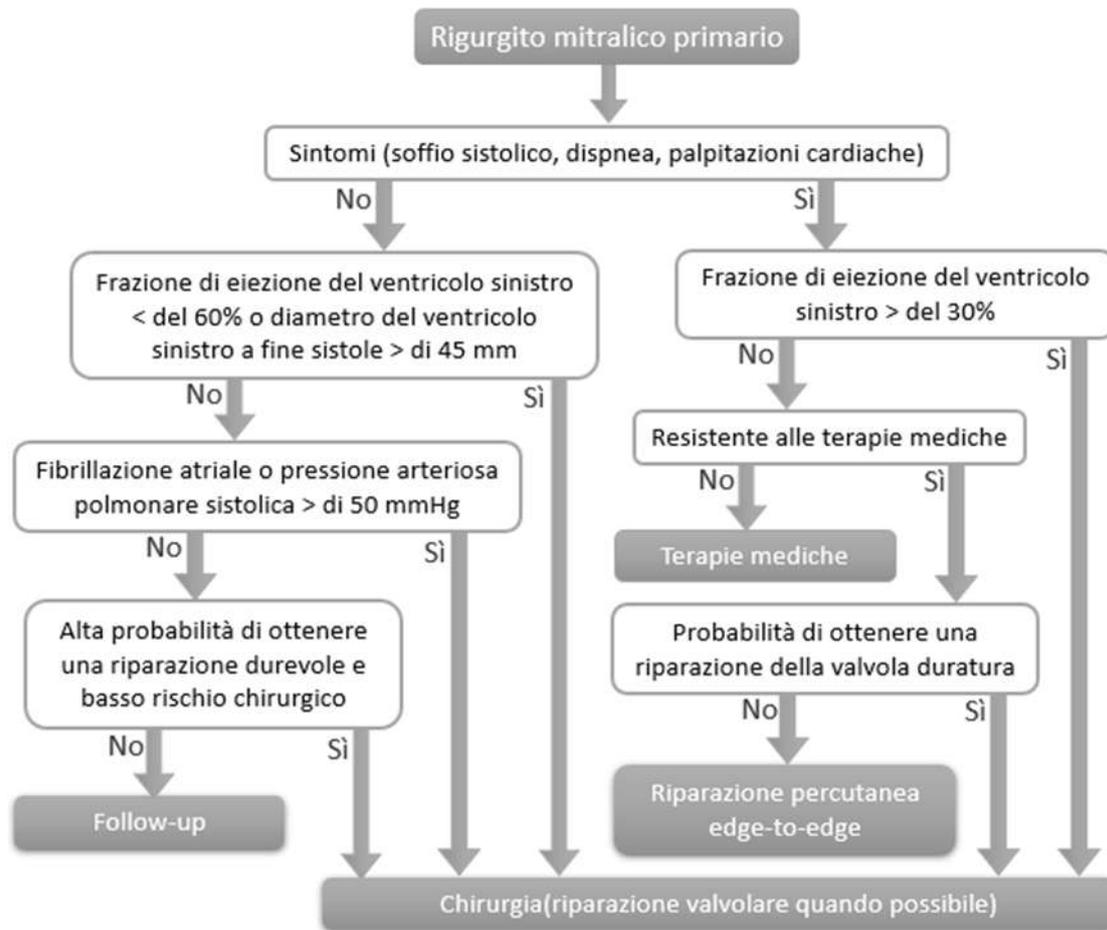


Figura 17. Elementi che vengono valutati per scegliere il trattamento più adatto per un paziente con rigurgito mitralico primario.

Quando si effettua un intervento chirurgico è fondamentale:

- Ripristinare la coaptazione tra il lembo anteriore e posteriore.
- Stabilizzare e rimodellare l'annulus mitralico.
- Ripristinare la cinematica fisiologica.
- Valutare il risultato post-operatorio tramite opportune tecniche diagnostiche (ecodoppler, ecocardiogramma, elettrocardiogramma).

Le tecniche utilizzate per trattare l'insufficienza mitralica si distinguono in base alla zona in cui è collocata la lesione della valvola:

- per consentire una corretta chiusura dei lembi mitralici si utilizza la resezione dei lembi o la tecnica edge-to edge che consiste nella sutura dei margini liberi dei foglietti valvolari nelle zone in cui si origina il rigurgito;
- per riparare le corde tendinee vengono impiantate corde artificiali o vengono spostate quelle esistenti.

La scelta del trattamento è più complessa quando si tratta di pazienti con **rigurgito mitralico secondario**: le correzioni chirurgiche possono ridurre i sintomi, migliorare la qualità della vita e, in alcuni pazienti, ripristinare le corrette dimensioni ventricolari.

Solitamente, in caso di dilatazione dell'annulus mitralico, la riparazione della valvola viene eseguita utilizzando l'annuloplastica per ripristinare la coaptazione dei lembi e la dimensione fisiologica dell'annulus (figura 18). Invece, per ridurre la dilatazione ventricolare, si agisce sulla struttura subvalvolare avvicinando i muscoli papillari.

Bisogna però sottolineare che il rigurgito funzionale mitralico è una patologia del ventricolo e non solamente della valvola: attualmente le procedure chirurgiche esistenti hanno lo scopo di ridurre gli effetti del rigurgito, ma non ne correggono le cause scatenanti. Questo spiega perché le tecniche chirurgiche esistenti non sempre sono efficaci per risolvere il rigurgito secondario.

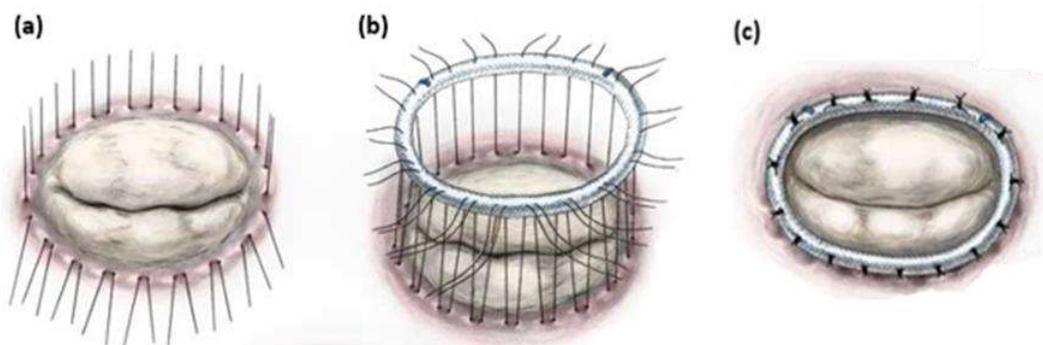


Figura 18. Annuloplastica: (a) inserimento di sei fili di sutura nell'annulus patologico dilatato; (b) inserimento dell'anello artificiale; (c) annuloplastica completata con l'inserimento dell'anello artificiale a livello della valvola mitrale, con lo scopo di ripristinare le corrette dimensioni valvolari.

Sia in presenza di rigurgito primario che secondario, quando non è possibile riparare una valvola particolarmente compromessa, si procede alla sua sostituzione con protesi meccaniche o biologiche.

1.4.2. Tecniche transcaterere

Attualmente esistono diverse tecniche transcaterere (o percutanee) per trattare i pazienti con **rigurgito mitralico primario**, tra queste la tecnica edge-to-edge è quella più ampiamente utilizzata perché è sicura e permette di ripristinare la coaptazione valvolare. Sul mercato esistono una serie di dispositivi che permettono di applicare questa tecnica riparativa; un esempio è il sistema Mitraclip (figura 19): un catetere guida viene introdotto nell'atrio sinistro e, sotto la guida dell'ecocardiografo e del fluoroscopio, una clip a forma di "v" viene

allineata perpendicolarmente al piano valvolare, con le due estremità della clip perpendicolari alla linea di coaptazione. Il dispositivo viene fatto avanzare verso il ventricolo e represso lentamente per unire i lembi valvolari; a questo punto la clip viene chiusa e rilasciata permettendo così di ottenere una riduzione del movimento dei lembi e forzare la coaptazione. Una seconda o una terza clip può essere rilasciata vicino alla prima clip quando è presente un rigurgito residuo significativo.

La riparazione percutanea edge-to-edge viene utilizzata anche in soggetti con **rigurgito secondario** perché è una tecnica a basso rischio.

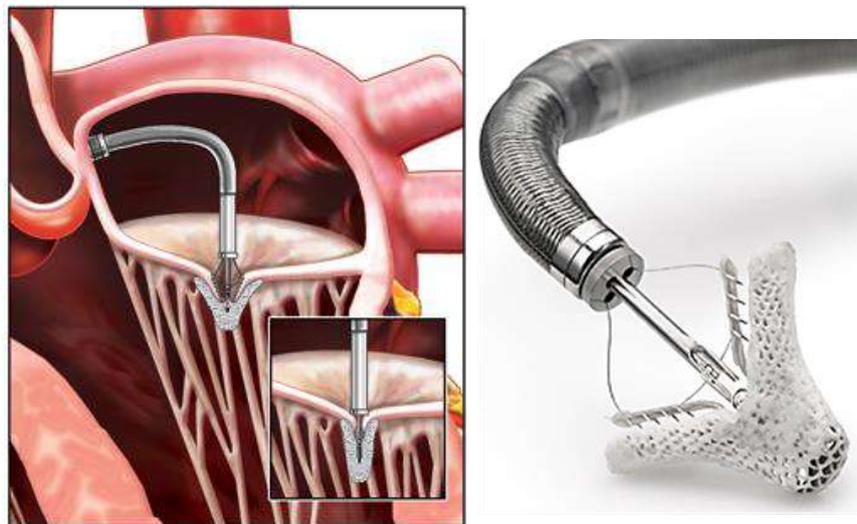


Figura 19. Tecnica edge-to-edge transcaterere effettuata tramite il dispositivo MitraClip per ridurre il movimento dei lembi mitralici e favorirne la coaptazione.

Esistono anche altri dispositivi transcaterere, di seguito sono riportati alcuni esempi [16], [17]:

- 1) NeoChord: è una tecnica che consente di sostituire le corde tendinee danneggiate con corde artificiali in Gore-Tex. Un catetere viene inserito dall'apice del ventricolo fino alla valvola mitrale, qui la corda sostitutiva viene agganciata all'estremità libera del lembo patologico e poi ancorata alla parete cardiaca, permettendo così una stabilizzazione dei segmenti valvolari prolassati (figura 20a).
- 2) Annuloplastica transcaterere: nel corso degli anni sono state sviluppate diverse tecniche percutanee meno invasive rispetto all'annuloplastica chirurgica con lo scopo di ridimensionare l'annulus mitralico patologico. In figura 20b è mostrato un esempio di queste tecniche innovative che consiste nell'inserimento di un catetere attraverso la vena giugulare fino al seno coronarico. L'ancoraggio del dispositivo,

costituito da un filo in nitinol, viene rilasciato nel seno coronarico distale, poi un secondo ancoraggio è posizionato nel seno coronarico prossimale. In questo modo il filo comprime la porzione septo-laterale dell'annulus e riduce il lume di passaggio della valvola.

- 3) iCoapsys: è un dispositivo in fase sperimentale che comprime l'annulus mitralico e rimodella il ventricolo sinistro con lo scopo di ridurre la dilatazione (figura 20c). iCoapsys viene impiantato senza utilizzare il bypass cardiopolmonare ed è formato da due cuscinetti epicardici collegati tra loro da una corda flessibile che attraversa il ventricolo sinistro.

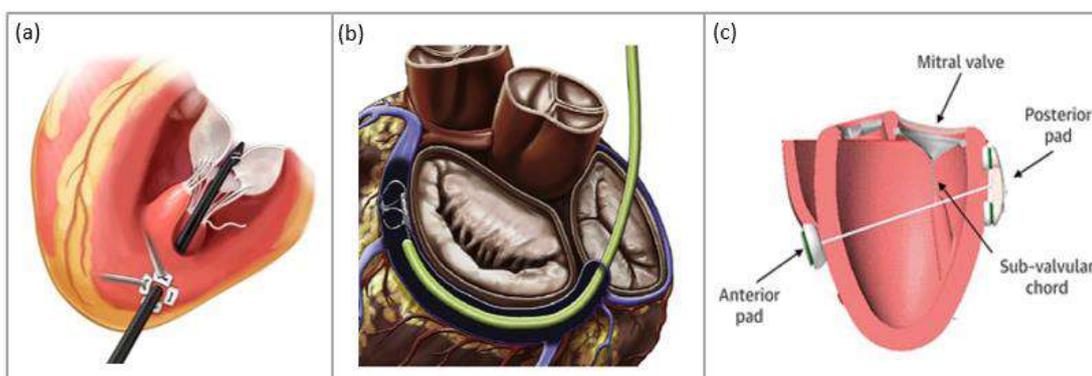


Figura 20. Alcuni esempi di tecniche transcateretere sperimentali. (a) Neochord: tecnica che sostituisce corde tendinee danneggiate. (b) annuloplastica transcateretere: riduce le dimensioni dell'annulus mitralico. (c) iCoapsys: dispositivo per diminuire la dilatazione del ventricolo sinistro e dell'annulus.

È importante sottolineare che le tecniche transcateretere non hanno lo scopo di sostituire le tecniche chirurgiche già esistenti per il trattamento di pazienti a basso rischio e che sono buoni candidati per la chirurgia.

Negli ultimi decenni sono state svolte numerose ricerche per valutare nuove strategie o per migliorare le tecniche chirurgiche e transcateretere esistenti. Poiché la quantità di cuori umani disponibili per la sperimentazione è limitata, spesso si ricorre a modelli animali; tra questi quello maggiormente utilizzato è il cuore di maiale perché è facilmente reperibile ed ha delle caratteristiche analoghe al cuore umano.

1.5. Anatomia del cuore di maiale

Il cuore porcino è largamente studiato perché ha dimensione e forma molto simili al cuore umano. Di seguito sono riportati due esempi di studi che si sono concentrati sull'analisi dell'anatomia del cuore di maiale e che hanno effettuato un confronto con quello umano.

Nello studio di Simon J. Crick et al. [18] è stato osservato che i cuori delle due specie hanno forme molto simili, ma non identiche (figura 21):

- il cuore del maiale ha una forma chiamata “cuore Valentino”;
- il cuore umano ha una forma trapezoidale;
- i due cuori hanno un orientamento diverso all’interno della gabbia toracica.

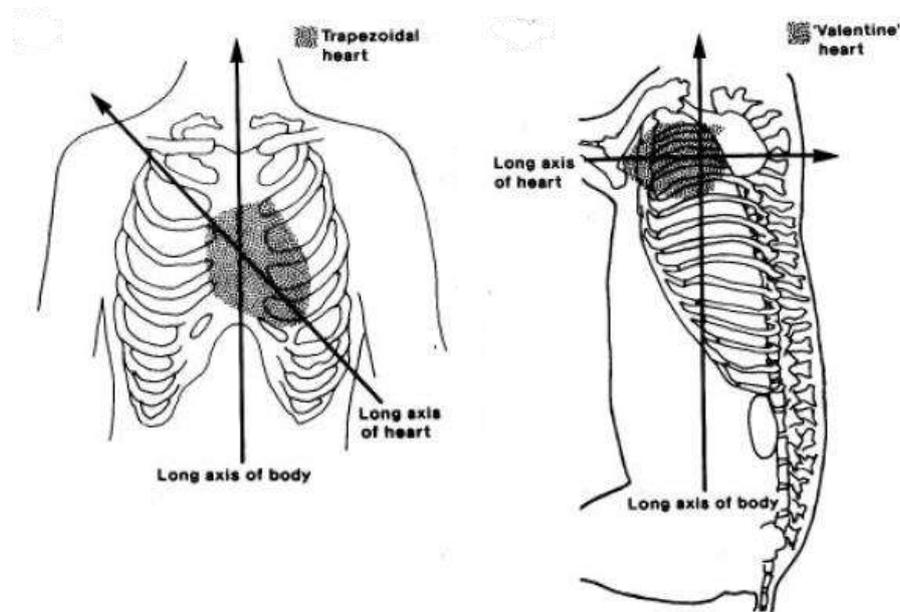


Figura 21. Confronto tra la forma e la posizione all’interno della gabbia toracica del cuore umano (a sinistra) e quello del maiale (a destra).

Inoltre, sezionando i due cuori, è stato osservato che:

- nel maiale l’atrio sinistro è più piccolo rispetto a quello destro, mentre nell’uomo l’atrio destro risulta più piccolo rispetto al sinistro;
- sia nell’uomo che nel maiale il ventricolo sinistro ha dimensioni maggiori rispetto al destro;
- la lunghezza del setto atriale è maggiore nel maiale rispetto che nell’uomo;
- lo spessore della parete ventricolare del maiale è maggiore rispetto a quella umana;
- la struttura della valvola mitrale, della valvola tricuspide e dei muscoli papillari è molto simile nelle due specie.

Anche nel lavoro di Karyn Kunzelman et al. [19] è stato effettuato un confronto tra cuori espantati, ma in questo caso il gruppo di ricerca si è concentrato sullo studio di alcune grandezze anatomiche a livello della valvola mitrale: lunghezza dell’annulus totale, lunghezza della porzione anteriore e posteriore dell’annulus, lunghezza dei lembi, altezza

dei lembi, altezza delle commissure, area dei lembi, lunghezza e distribuzione delle corde tendinee. Sono stati ottenuti i seguenti risultati:

- inter-specie, confrontando il lembo anteriore con quello posteriore, le altezze e le lunghezze dei lembi sono significativamente differenti ($p < 0.01$);
- inter-specie l'area del lembo posteriore è significativamente maggiore dell'area del lembo anteriore ($p < 0.01$);
- inter-specie è presente una differenza significativa tra la lunghezza delle corde basali e marginali ($p < 0.01$).
- la lunghezza del lembo posteriore è leggermente maggiore nelle valvole porcine (con un livello di significatività di $p < 0.01$); mentre i lembi anteriori sono analoghi nelle due specie;
- le altezze delle commissure sono simili per entrambi i gruppi;
- la distribuzione delle corde sui lembi mitralici varia leggermente tra le valvole umane e del maiale, ma non ci sono differenze significative per quanto riguarda la distribuzione delle corde che originano dai muscoli papillari;
- non sono state dimostrate differenze significative per quanto riguarda le lunghezze e gli spessori delle corde delle due specie;

In conclusione, si può affermare che non ci sono differenze statisticamente significative tra le valvole mitraliche umane e porcine.

2. Stato dell'arte

Negli ultimi decenni sono stati sviluppati numerosi dispositivi, tecniche chirurgiche e tecniche transcateretere per trattare le patologie valvolari; attualmente diverse ricerche sono condotte con l'obiettivo di rendere più efficaci le soluzioni già esistenti e crearne di nuove. A questo scopo esistono una serie di modelli sperimentali che vengono utilizzati da clinici ed ingegneri per migliorare i trattamenti esistenti, testare il funzionamento di nuove procedure ed approfondire specifici aspetti di una particolare patologia cardiaca. In letteratura se ne possono distinguere degli esempi che consentono di riprodurre il sistema cardiovascolare umano e di studiarne le caratteristiche in condizioni fisiologiche e/o patologiche:

- **Modelli computazionali:** le simulazioni informatiche sono uno strumento di supporto che viene utilizzato per studiare dettagliatamente la meccanica delle strutture anatomiche, comprendere la risposta fluidodinamica in presenza di una patologia cardiaca e per valutare quali potrebbero essere gli effetti di tecniche riparative o sostitutive sulla struttura valvolare.
- **Modelli in vivo:** animali di piccole dimensioni, come topi o conigli, vengono utilizzati soprattutto quando si vuole testare il funzionamento di un nuovo farmaco o studiare le caratteristiche della struttura cardiaca. Invece per valutare il funzionamento di dispositivi cardiovascolari si preferisce utilizzare animali più grandi, come il maiale. Il vantaggio principale dei modelli in vivo è che il cuore viene mantenuto intatto all'interno del suo ambiente fisiologico. Tuttavia, sono presenti alcuni limiti importanti: alti costi, difficoltà nel controllo delle variabili di interesse e difficoltà nella ripetibilità dei risultati sperimentali.
- **Modelli ex vivo:** sono generalmente costituiti da circuiti idraulici all'interno dei quali viene alloggiata la struttura di origine animale, per simulare il sistema cardiovascolare umano. Anche qui, come per i modelli in vivo, l'animale maggiormente utilizzato è il maiale: a seconda dell'obiettivo della ricerca è possibile alloggiare all'interno del circuito il cuore intero oppure una porzione di esso, ad esempio può essere espantata solamente la struttura della valvola mitrale senza atrio

e ventricolo sinistro. Viene utilizzata una pompa esterna per attivare il ventricolo e simulare la pulsazione cardiaca. Questi modelli sono vantaggiosi quando si vogliono condurre esperimenti in cui è importante mantenere la struttura anatomica e riprodurre le condizioni fluidodinamiche fisiologiche e/o patologiche, senza dover ricorrere all'utilizzo di animali vivi. Lo svantaggio dei modelli ex vivo, rispetto ai modelli in vivo, è che non permettono di riprodurre esattamente il flusso fisiologico del sangue nel ventricolo, i meccanismi di autoregolazione, il rimodellamento cellulare e la secrezione di ormoni. Hanno però costi più contenuti, sono più facilmente controllabili e ripetibili rispetto ai modelli in vivo.

Un importante limite dei modelli sperimentali, sia in vivo che ex vivo, è che non sempre permettono di ottenere un'adeguata simulazione delle patologie valvolari umane poiché è difficile reperire animali che reproducano naturalmente le stesse condizioni patologiche. Per questo motivo nel corso degli anni sono state studiate diverse strategie per indurre un malfunzionamento cardiaco nell'animale prima di testare il funzionamento delle tecniche di riparazione o sostituzione valvolare.

2.1. Modelli in vivo di rigurgito mitralico

Esistono diverse ricerche condotte su animali mirate all'ottenimento del rigurgito mitralico sia di tipo primario che secondario; di seguito sono riportati alcuni esempi.

Lo studio di Bo Li et al. [26] ha ottenuto un modello di **rigurgito mitralico primario tagliando alcune corde** della valvola mitrale porcina; dopo 30 mesi dall'intervento chirurgico è stato effettuato un confronto tra gli animali con le corde tagliate e quelli sani ed è stata osservata una differenza significativa tra i due gruppi in termini di rigurgito valvolare. È quindi possibile affermare che il metodo qui proposto è efficace per riprodurre il rigurgito primario della valvola mitrale su maiali vivi.

Altre ricerche invece si sono concentrate sulla riproduzione del **rigurgito mitralico secondario ischemico** [27], [28]. Per indurre l'infarto miocardico è stato **gonfiato un pallone all'interno dell'arteria coronaria**, allo scopo di isolare i vasi sanguigni a livello del muscolo papillare postero-mediale e della sottostante parete cardiaca dal resto del sistema circolatorio. A questo punto è stato iniettato **etanolo** all'interno dell'arteria per

indurre infarto miocardico e dopo 15 minuti il pallone è stato sgonfiato. In alcuni casi è stato necessario iniettare una seconda dose di 0,5 ml di etanolo per generare occlusione completa delle arterie; mediamente nei diversi campioni sono stati occlusi 2-3 rami delle arterie coronarie per ottenere infarto miocardico e conseguente rigurgito mitralico (figura 25). Infine, a partire da 7 fino a 10 settimane dopo l'operazione per creare rigurgito, sono state applicate diverse tecniche già utilizzate in clinica per la riparazione valvolare (annuloplastica, riposizionamento dei muscoli papillari o entrambe le tecniche combinate) allo scopo di valutare l'efficienza del modello nello studio di tecniche riparative.

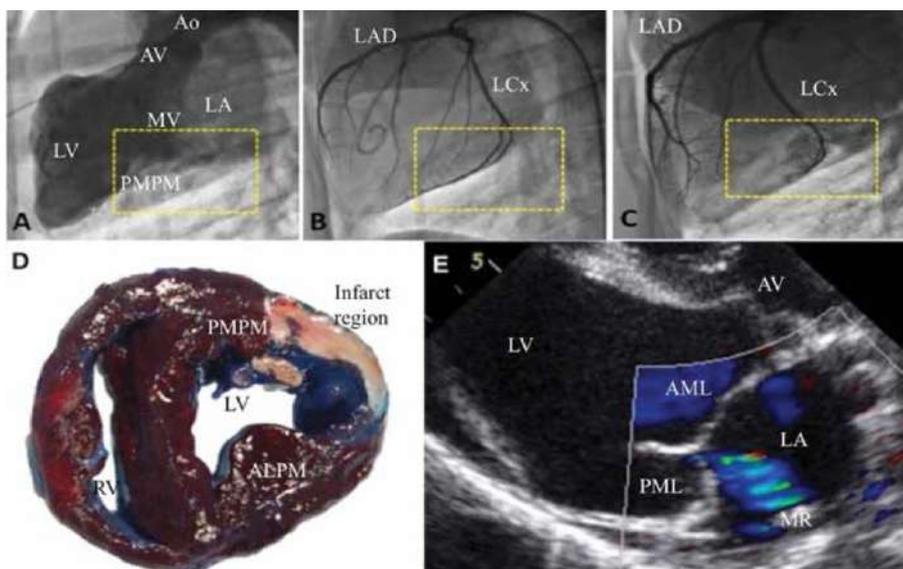


Figura 25. (A–C) immagini del cuore con il fluoroscopio. (A) il riquadro giallo indica la posizione del muscolo papillare postero-mediale; (B) il riquadro giallo indica i rami dell'arteria circonflessa coronaria sinistra che vascolarizzano il muscolo papillare; (C) il riquadro giallo rappresenta l'occlusione completa dei rami coronarici. (D) sezione del cuore porcino espantato alla fine del test in cui è visibile la differenza tra la regione in cui è stato indotto l'infarto miocardico e la porzione sana del tessuto cardiaco. (E) immagine color Doppler del rigurgito mitralico indotto sui cuori di maiale. AML = lembo mitrale anteriore; AMPM = muscolo papillare antero-laterale; LAD = arteria discendente anteriore sinistra; LCx = arteria circonflessa sinistra; PML = lembo mitrale posteriore; PMPM = muscolo papillare postero-mediale.

Esistono anche alcuni lavori, come quello di Yong-Chun Cui et al. [29], per indurre **rigurgito mitralico ischemico** che sfruttano **sia la rottura delle corde tendinee del lembo posteriore che l'occlusione dell'arteria coronaria** circonflessa sinistra.

L'angiografia delle coronarie, l'ECG, l'ecocardiografia e la risonanza magnetica sono state effettuate per valutare la struttura e la funzione del cuore dei maiali una, due, quattro e otto settimane dopo l'operazione chirurgica per indurre il rigurgito. È stata dimostrata la presenza di rigurgito mitralico: le analisi angiografiche hanno mostrato una chiusura delle coronarie

del 10-20% dopo una settimana, del 30-40% dopo due settimane e del 90-100% dopo quattro settimane. Le analisi ECG hanno mostrato un aumento del diametro dell'atrio sinistro dopo due settimane e cambiamenti ischemici sia nel ventricolo che nell'atrio dopo 4 settimane. L'ecocardiografia ha dimostrato un aumento graduale dei volumi atriali e ventricolari nel corso delle 4 settimane, sintomo tipico del rigurgito ischemico (figura 26).

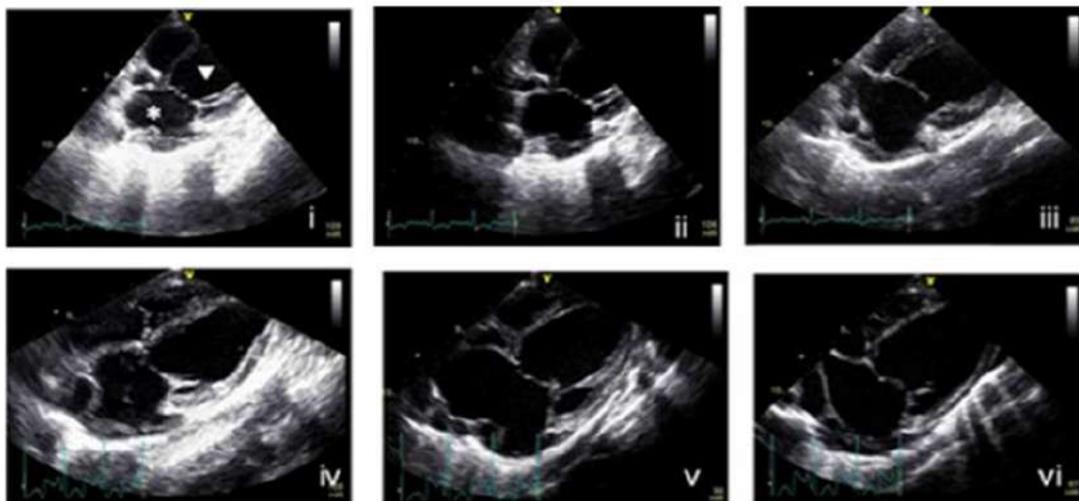


Figura 26. Immagini ecocardiografiche del cuore del maiale nel corso delle otto settimane post -intervento chirurgico in cui è evidente un aumento della dimensione dell'atrio e del ventricolo sinistro. (i) cuore prima della chirurgia; (ii) immediatamente dopo l'operazione chirurgica; (iii) una settimana dopo; (iv) due settimane dopo; (v) quattro settimane dopo; (vi) otto settimane dopo. L'asterisco sull'immagine (i) indica l'atrio sinistro, mentre il triangolo indica il ventricolo sinistro.

In conclusione, in questo studio è stato sviluppato un modello di rigurgito mitralico ischemico utilizzando la rottura delle corde tendinee posteriori e l'impianto di un dispositivo oclusore, a livello delle coronarie, per indurre infarto miocardico. La tecnica utilizzata permette sia di testare il funzionamento di nuove terapie che di esplorare più nel dettaglio i meccanismi della patologia mitralica.

Lo studio di Haruo Yamauchi et al. [30] invece presenta un modello per creare **rigurgito funzionale mitralico** su cuori di maiale effettuando delle piccole **incisioni a livello dell'annulus posteriore**. Sono state effettuate da 14 a 26 incisioni di 2 mm ciascuna sul lato rivolto verso l'atrio dell'annulus mitralico utilizzando come guida un dispositivo che crea una via di accesso per inserire strumenti all'interno del cuore battente e che permette di visualizzare le strutture interne tramite un endoscopio (figura 27). La testa del dispositivo è stata spinta contro l'annulus e sono state effettuate delle incisioni con una lama. Gli animali sono stati sacrificati dopo 4 o 6 settimane dall'inizio della fase sperimentale.

Le incisioni alterano la geometria valvolare, diminuiscono la non planarità dell'annulus e aumentano l'area dell'anello mitralico, soprattutto nella direzione antero-posteriore; non si verificano cambiamenti significativi a livello del volume ventricolare o della distanza dei muscoli papillari, ma si riesce comunque ad ottenere rigurgito mitralico.

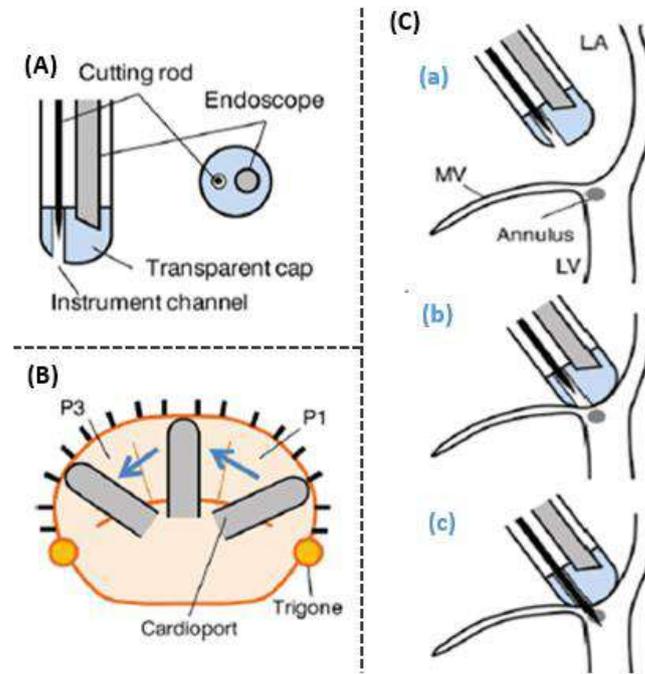


Figura 27. (A) rappresentazione del dispositivo utilizzato per ottenere rigurgito mitralico coperto da un cappuccio trasparente; all'interno del canale si osserva un endoscopio ed una lama per effettuare i tagli a livello dell'annulus. (B) la rotazione del dispositivo consente di incidere l'anello mitralico; P1 e P3 sono rispettivamente la porzione 1 e la porzione 3 del lembo posteriore. (C) rappresentazione dei tre passaggi necessari per ottenere rigurgito: (a) avvicinamento del dispositivo all'annulus; (b) la lama si appoggia all'anello mitralico; (c) la lama effettua delle incisioni sull'annulus.

2.2. Modelli ex vivo di rigurgito mitralico

Esistono diversi metodi per riprodurre l'insufficienza mitralica ex vivo; alcuni sfruttano il **cuore intero**, mentre altri utilizzano solamente la **struttura valvolare espiantata** dal cuore dell'animale.

La riproduzione della patologia con valvole espiantate risulta più semplice rispetto all'utilizzo del cuore intero. Esistono infatti alcuni studi [25], [31], [32] che hanno indotto il rigurgito valvolare posizionando la valvola all'interno di simulatori idrodinamici in grado di riprodurre le condizioni emodinamiche fisiologiche del cuore sinistro ed effettuando delle

modifiche della geometria valvolare. Le modifiche che solitamente vengono apportate alla struttura valvolare sono le seguenti: dilatazione dell'annulus e spostamento dei muscoli papillari nelle direzioni apicale, laterale, posteriore. Tuttavia, questi modelli hanno lo svantaggio di non comprendere la struttura cardiaca che circonda la valvola mitrale e di non poterne analizzare il comportamento in condizioni patologiche.

Per poter mantenere la continuità anatomica tra valvola e strutture adiacenti, con le quali vi è una stretta interazione funzionale, è quindi necessario ricorrere a dei modelli che prevedono l'utilizzo del cuore ex vivo intero. Di seguito verrà mostrato come alcune di queste ricerche hanno riprodotto con successo il rigurgito valvolare su cuori interi, prestando particolare attenzione al rigurgito funzionale e tenendo in considerazione anche i limiti delle diverse tecniche.

Lo studio condotto da Andrew L. Richards et al. [33] ha portato alla realizzazione di un **banco prova pulsatile** per alloggiare cuori espianati da maiali, simulare il rigurgito mitralico e valutare le alternative per riparare la struttura valvolare. Il simulatore sfrutta una pompa pulsatile per riprodurre le condizioni emodinamiche fisiologiche e può essere impostato in modo tale da simulare le condizioni patologiche con diversi gradi di rigurgito mitralico. Gli esperimenti sono stati svolti allo scopo di monitorare i cambiamenti nella portata cardiaca a diversi livelli di pressione sia prima che dopo aver indotto l'insufficienza mitralica e anche dopo aver riparato la valvola; le immagini ecocardiografiche sono state confrontate con quelle ottenute in clinica.

Il banco prova è composto da tre elementi meccanici principali collegati al cuore di maiale espianato: il reservoir atriale sinistro, il contenitore per il deflusso aortico e una pompa a spostamento positivo controllata da un computer (figura 28). La pressione atriale può essere modificata variando l'altezza del fluido nel reservoir atriale, mentre la pressione contro la valvola aortica viene regolata variando l'altezza del tubo di deflusso aortico. Inoltre, una valvola sul percorso di deflusso aortico consente di modificare la resistenza del flusso e può essere utilizzata per aumentare la pressione ventricolare sinistra.

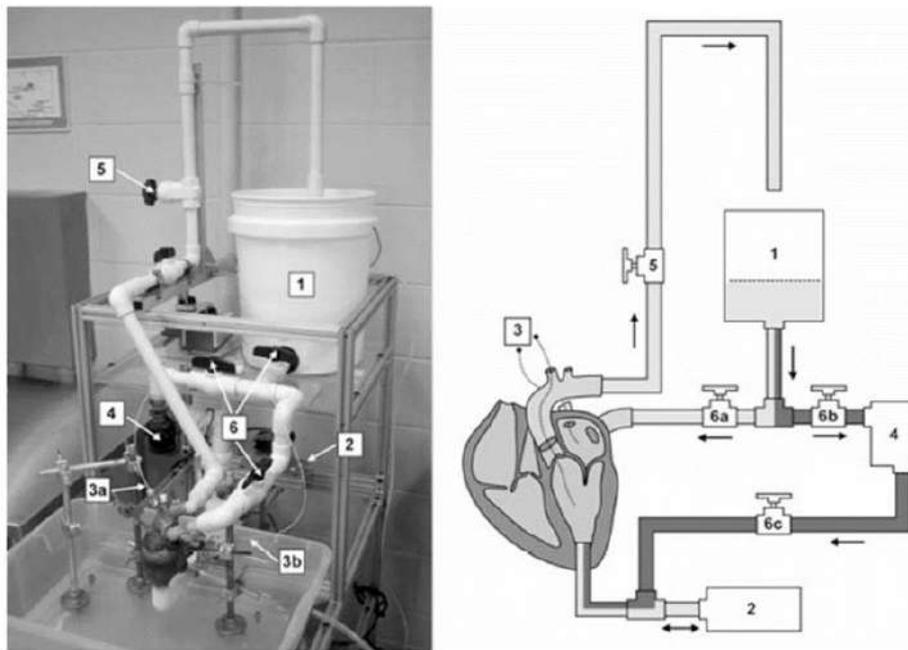


Figura 28. A sinistra: fotografia del banco prova sviluppato da Andrew L. Richards et al. A destra: schema che mostra tutte le componenti del sistema: (1) reservoir atriale, (2) pompa pulsatile, (3) catetere per misurare la pressione, (4) pompa centrifuga, (5) valvola di resistenza al flusso in uscita dall'aorta, (6) valvole a pressione statica. I percorsi del flusso quando il banco prova è impostato per funzionare in modalità statica o dinamica sono mostrati rispettivamente in grigio scuro e grigio chiaro.

La pressurizzazione dinamica del ventricolo sinistro, che permette di simulare la sistole e la diastole sul cuore porcino, viene raggiunta utilizzando una pompa pulsatile controllata da un computer e collegata al cuore attraverso una connessione apicale. Durante la diastole il movimento retrogrado del pistone guida il fluido dall'atrio sinistro al ventricolo sinistro passando attraverso la valvola mitrale. Durante la sistole il movimento in avanti del pistone spinge il fluido dal ventricolo sinistro verso la valvola aortica.

Questo banco prova può anche operare in modalità di pressione statica per svolgere test sulla valvola mitrale che richiedono pressione ventricolare costante. In quest'ultima configurazione le valvole aortica e mitrale sono chiuse, una piccola pompa centrifuga guida il fluido dal reservoir atriale al cuore attraverso una connessione apicale, garantendo così la pressurizzazione del ventricolo; è presente anche un contenitore che raccoglie eventuali flussi di rigurgito dalla valvola mitrale.

Per indurre l'insufficienza mitralica **l'annulus è stato dilatato manualmente** nella direzione antero-posteriore. Poi, per ottenere il prollasso del lembo posteriore, **sono state recise alcune corde tendinee** che collegano il segmento P2 al muscolo papillare. Il numero di corde da tagliare è stato stabilito in base al raggiungimento di un livello adeguato di

rigurgito, considerando la quantità di perdite valvolari che si verificano impostando una pressione ventricolare costante.

Per dimostrare l'efficienza di questo banco prova nel valutare le tecniche riparative, cinque cuori sono stati sottoposti alla riparazione chirurgica della valvola con la tecnica della resezione triangolare, una tecnica già consolidata e largamente utilizzata in clinica.

Durante la sperimentazione è stata misurata la portata cardiaca dei diversi campioni sia prima che dopo aver indotto rigurgito mitralico; successivamente su alcuni di questi cuori patologici è stata applicata la tecnica riparativa, le portate sono state nuovamente misurate e sono state confrontate le immagini ecocardiografiche delle diverse fasi sperimentali. In generale si è osservato che la portata cardiaca diminuisce quando la pressione del ventricolo sinistro aumenta e che dopo l'induzione dell'insufficienza mitralica la portata cardiaca diminuisce. Quindi, il modello cardiaco dinamico qui proposto può riprodurre in maniera affidabile diversi livelli di gravità del rigurgito mitralico e consentire valutazioni chirurgiche; i vantaggi principali sono legati a bassi costi e a tempistiche di sperimentazione contenute.

I limiti di questa ricerca sono dovuti al fatto che non è possibile replicare sul banco prova pulsatile l'esatto movimento che si verifica durante il ciclo cardiaco fisiologico perché sul banco prova il volume ventricolare aumenta in sistole e diminuisce durante la diastole (cioè si verifica l'opposto rispetto a quanto accade fisiologicamente). Inoltre non è possibile riprodurre esattamente sul banco prova i cambiamenti della forma dell'annulus e della parete ventricolare che si verificano naturalmente, quindi non è possibile simulare esattamente le condizioni del cuore umano patologico su cui i chirurghi operano per applicare tecniche riparative.

Lo studio di Haruo Yamauchi, et al. [30], già presentato nel paragrafo precedente, propone anche un modello per creare **rigurgito funzionale mitralico** su cuori di maiale ex vivo, sempre effettuando delle **piccole incisioni a livello dell'annulus** posteriore. In fase sperimentale il cuore è stato inserito in un serbatoio riempito con soluzione salina (figura 29), il ventricolo è stato sottoposto ad una **pressione statica** di 120 mmHg e 16 incisioni da 2 mm ciascuna sono state praticate a livello dell'annulus posteriore.

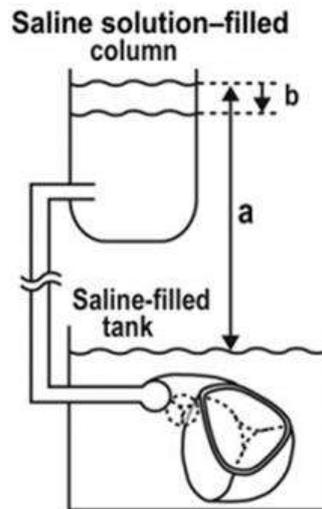


Figura 29. Banco prova costituito da un serbatoio riempito di soluzione salina collegato al cuore posto in un recipiente sottostante. (a) variando questa altezza è possibile sottoporre il ventricolo ad una pressurizzazione di diversa entità; (b) misurando la variazione di questa altezza nel tempo, dopo aver pressurizzato il ventricolo, viene determinata la portata di rigurgito attraverso la valvola mitrale.

È stato osservato un aumento del 15% dell'area dell'annulus e conseguente rigurgito valvolare, quindi, tenendo in considerazione i limiti dell'utilizzo di un banco prova con pressione statica, si può affermare che il metodo proposto è efficace per riprodurre l'insufficienza mitralica.

Anche Shamik Bhattacharya et al. [34] hanno sviluppato un metodo per ottenere **rigurgito mitralico funzionale** ed è stato utilizzato un banco prova (figura 30) per determinare quale dovrebbe essere la forza ottimale da applicare all'annulus durante gli interventi chirurgici per ripristinare la corretta coaptazione della valvola. Questo sistema è costituito da una telecamera digitale ed un trasduttore di forza collegato ad un computer per l'acquisizione dei dati. La dilatazione della valvola mitrale è stata raggiunta iniettando **fenolo** a livello dell'annulus mitralico con una siringa; il fenolo è una sostanza tossica che danneggia la struttura e la funzione del tessuto cardiaco. La **pressurizzazione del ventricolo** viene ottenuta introducendo soluzione salina dall'aorta. La presenza di rigurgito viene determinata misurando la portata a livello dell'atrio sinistro: in caso di perfetta coaptazione dei lembi mitralici tale valore è circa nullo, mentre aumenta all'aumentare della gravità del malfunzionamento valvolare.

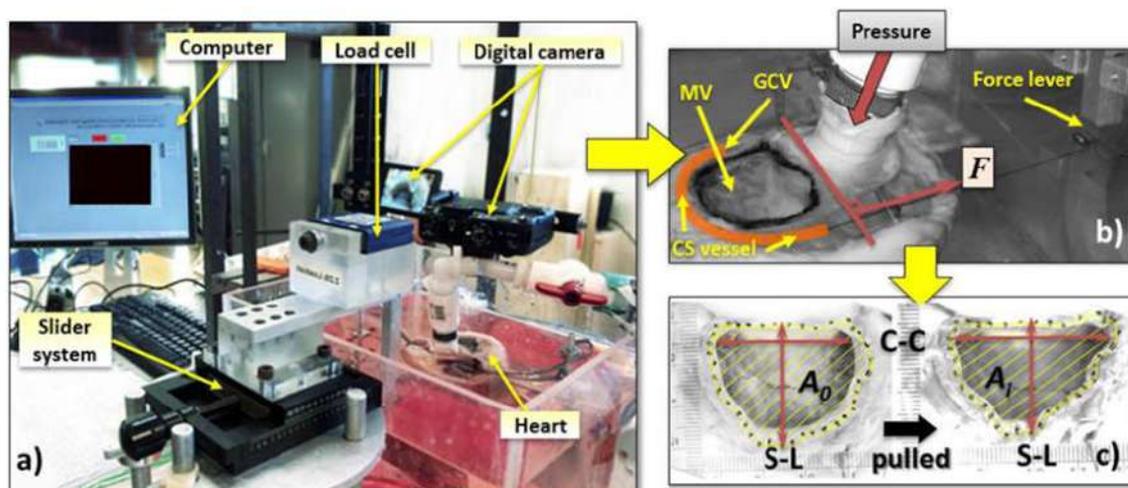


Figura 30. (a) Immagine del banco prova utilizzato per misurare la forza necessaria per correggere la dilatazione patologica dell'annulus. (b) vista dall'alto del cuore con in ventricolo pressurizzato; GCV = grande vena cardiaca; CS = vaso del seno coronario. (c) immagini digitali dell'area valvolare iniziale (A_0) e dell'area dopo aver pressurizzato il ventricolo (A_1).

È stata ottenuta una dilatazione dell'annulus fino al 22,8% e i diametri medio-laterale (M-L) e antero-posteriore (A-P) sono stati aumentati rispettivamente del 26% e dell'11%. Studi su animali vivi hanno dimostrato che in condizioni di rigurgito mitralico l'area dell'annulus mitralico aumenta dal 20 al 28%, mentre il diametro M-L aumenta dal 14 al 19%. Per quanto riguarda studi condotti su cuori umani con rigurgito mitralico, l'area dell'annulus risulta aumentata del 31% circa, i diametri M-L e A-P aumentano rispettivamente del 17% e dell'11%. Quindi si può concludere che gli incrementi nelle dimensioni dell'annulus ottenuti in questo studio sono simili a quelli su animali vivi e a quelli presenti su cuori umani patologici. Ci sono però alcune limitazioni da tenere in considerazione:

- in questa ricerca è stata riprodotta la dilatazione dell'annulus patologica senza tenere in considerazione la dilatazione della parete ventricolare e lo spostamento dei muscoli papillari, quindi il modello proposto non riproduce perfettamente tutte le lesioni che si verificano nel rigurgito funzionale umano;
- è stato utilizzato un banco prova che non rispecchia gli eventi che si susseguono durante il ciclo cardiaco perché applica una pressione idrostatica sul ventricolo, che potrebbe aumentare la tensione necessaria per risolvere la patologia.

Particolarmente interessante è lo studio di Michal Jaworek et al. [35] nel quale il **rigurgito mitralico funzionale** è stato simulato su un **banco prova pulsatile** inserendo nel cuore di

maiale un **dispositivo per allargare l'annulus** nella direzione antero-posteriore e **per spostare i muscoli papillari** apicalmente e lateralmente.

Il dispositivo di dilatazione e spostamento (figura 31) è stato realizzato con una stampante 3D e permette di ottenere alterazioni sia emodinamiche che morfologiche della valvola mitrale.

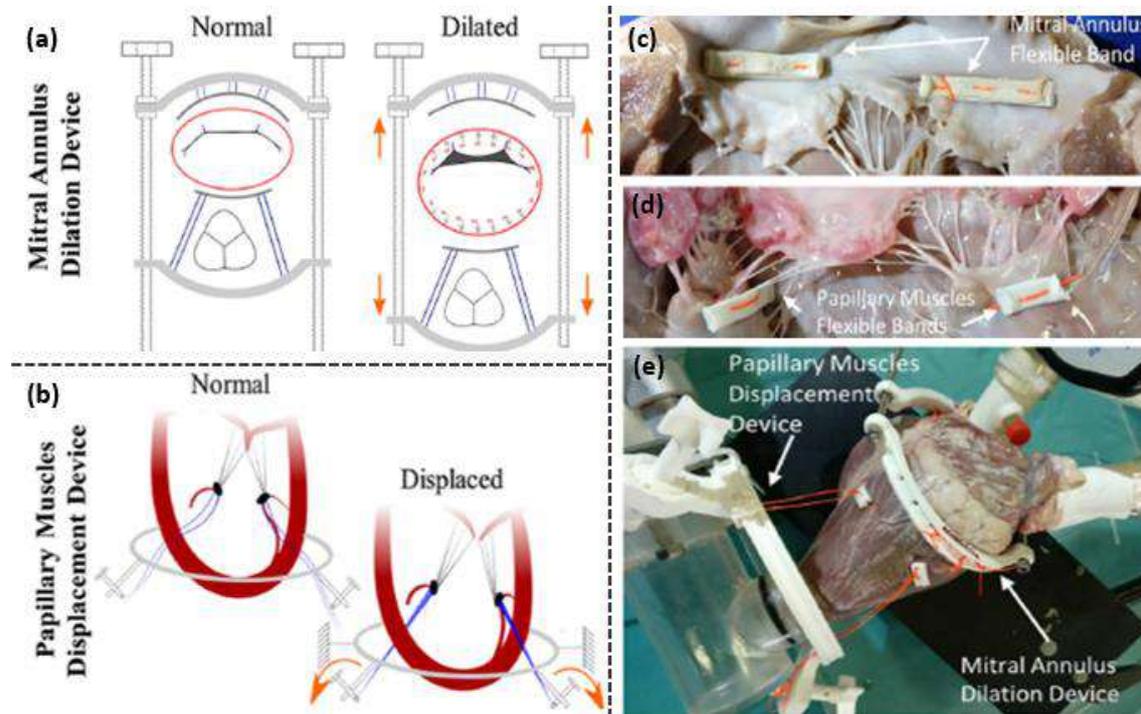


Figura 31. (a) dispositivo per allargare l'anello mitralico; (b) dispositivo per spostare i muscoli papillari; (c) fasce posizionate all'interno del cuore a livello dell'annulus; (d) fasce posizionate nel ventricolo a livello dei muscoli papillari; (e) foto del dispositivo, visto dall'esterno del cuore, per dilatare l'annulus e spostare i muscoli papillari.

Per dilatare l'annulus in direzione antero-posteriore è stato utilizzato il dispositivo rappresentato in figura 31a: la rotazione di due viti provoca l'allontanamento delle due parti del dispositivo che sono posizionate all'esterno della parete atriale sinistra e a livello del piano annulare. All'interno del cuore, a livello dei lembi posteriore ed anteriore, sono impiantate due fasce rettangolari flessibili (40 x 5 x 2 mm) che sono collegate al dispositivo esterno tramite delle suture che passano attraverso la parete atriale. La parte anteriore del dispositivo esterno è mantenuta ad una distanza di 30 mm dalla parete atriale allo scopo di prevenire una compressione dell'aorta, mentre la parte posteriore del dispositivo esterno è collocata a diretto contatto con la parete cardiaca esterna. In questo modo lo spostamento delle due parti esterne del dispositivo induce una dilatazione facilmente controllabile dell'annulus mitralico.

Lo spostamento dei muscoli papillari invece è garantito dal dispositivo mostrato in figura 31b: due fasce flessibili delle dimensioni di 10 x 5 x 2 mm sono posizionate all'interno del cuore a livello delle teste dei muscoli papillari anteriore e posteriore, fissate con una sutura che passa attraverso la parete ventricolare in direzione latero-apicale e collegate ad un anello all'esterno del cuore. Per simulare lo spostamento dei muscoli papillari la parte del dispositivo esterna al cuore viene ruotata in modo tale da sollevare le suture.

Il rigurgito mitralico funzionale è stato ottenuto posizionando il cuore su una piattaforma che simula il battito cardiaco (figura 32), costituita da una pompa a pistone che è collegata all'apice del ventricolo sinistro.

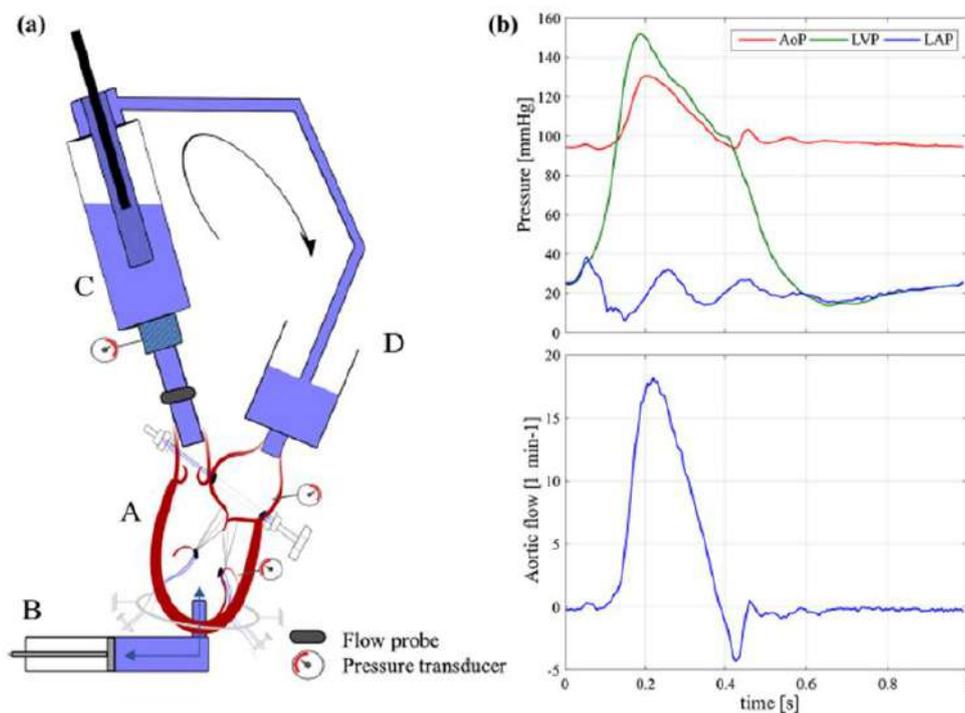


Figura 32. (a) schema degli elementi che compongono il banco prova per simulare il rigurgito mitralico funzionale. (A) dispositivo per dilatare l'annulus e spostare i muscoli papillari; (B) pompa a pistone; (C) simulatore di impedenza sistemica; (D) reservoir di precarico; (b) grafico dell'andamento delle pressioni (sopra) e grafico dell'andamento della portata aortica (sotto) in condizioni fisiologiche.

Durante la sistole la pompa spinge la soluzione salina dal ventricolo al tratto di deflusso aortico che è collegato ad un simulatore di impedenza sistemica. Quest'ultimo elemento è costituito da: una resistenza caratteristica, una camera per la compliance e una resistenza periferica aggiustabile che permette di regolare la pressione sistemica. Un altro elemento del banco prova è il reservoir che fornisce un precarico all'atrio sinistro: durante la diastole il fluido si muove dal reservoir al ventricolo sinistro, passando attraverso la valvola mitrale. Ogni eventuale perdita di fluido viene raccolta e pompata nuovamente all'interno del

reservoir di precarico allo scopo di mantenere costante il volume del fluido in circolazione. La figura 32b mostra le forme d'onda della pressione a livello dell'aorta, del ventricolo e dell'atrio sinistro (grafico superiore) e la portata aortica (grafico inferiore) in condizioni fisiologiche.

I test sono stati svolti imponendo condizioni di flusso pulsatile (frequenza 60 bpm, volume eiettato 70 ml), la resistenza periferica è stata impostata in modo da ottenere una pressione aortica media intorno a 100 mmHg quando la valvola mitralica coapta correttamente ed è poi stata mantenuta costante per tutto l'arco della prova sperimentale. Sono stati applicati diversi gradi di dilatazione dell'annulus e/o spostamento dei muscoli papillari allo scopo di simulare diverse condizioni patologiche osservabili sia con il fibroscopio che con la sonda ecocardiografica. Ognuna delle diverse configurazioni è stata mantenuta sul banco prova per circa 30 minuti, al termine dei quali la coaptazione della valvola veniva ripristinata, con lo scopo di valutare la reversibilità del dispositivo.

Si è osservato che la sola dilatazione dell'annulus causa un aumento della distanza antero-posteriore e una diminuzione dell'altezza di coaptazione, dell'area di tenting e dell'angolazione dei lembi in sistole, determinando così un rigurgito mitralico simile al tipo I (secondo la classificazione di Carpentier) con un movimento normale dei lembi. La dilatazione dell'annulus combinata con lo spostamento dei muscoli papillari causa un aumento della distanza antero-posteriore, dell'area di tenting e dell'altezza di coaptazione, caratteristiche comuni nella lesione di tipo III b, cioè con movimento ridotto dei lembi. In conclusione, in questo studio è stato presentato un nuovo modello ex vivo per indurre il rigurgito funzionale mitralico. È possibile riprodurre alcune caratteristiche della patologia: dilatare l'annulus e spostare i muscoli papillari in maniera ripetibile e controllabile.

I limiti della ricerca sono legati al fatto che la pulsazione cardiaca viene indotta da una pompa meccanica, quindi la contrazione naturale del ventricolo non può essere riprodotta e si genera un flusso intraventricolare non fisiologico. Inoltre, il dispositivo per indurre il rigurgito mitralico limita l'applicazione delle tecniche riparative perché mantiene dilatato l'annulus in maniera forzata, anche dopo l'eventuale utilizzo di un dispositivo o di una tecnica chirurgica per ridurne le dimensioni. In natura a mantenere dilatato l'annulus è la pressione intracavitaria, che può essere contrastata dalla terapia riparativa, ma la presenza di un vincolo meccanico esterno, come quello proposto in questo lavoro, rende impossibile la riparazione dell'anello. Di conseguenza questo modello può essere utilizzato solamente per valutare le

tecniche chirurgiche che agiscono sui lembi valvolari (es: trattamento percutaneo edge-to-edge) e sulle corde tendinee (es: taglio delle corde), escludendo, ad esempio, l'annuloplastica.

2.3. Modelli ex vivo di rigurgito della valvola tricuspide

L'insufficienza della valvola tricuspide è una patologia che colpisce la valvola atrioventricolare della parte destra del cuore. È quindi una patologia analoga al rigurgito mitralico, ma la riproduzione ex vivo del rigurgito della valvola tricuspide risulta più semplice rispetto alla simulazione della patologia che colpisce la parte sinistra del cuore. In questa sezione verranno presentati due esempi di studi che hanno sfruttato banchi prova analoghi a quelli presentati nella sezione precedente, ma tecniche diverse per ottenere il rigurgito funzionale della valvola tricuspide.

Il lavoro di Michal Jaworek et al. [36] è un esempio di queste ricerche che hanno simulato il **rigurgito funzionale** sulla valvola tricuspide di cuori di maiale ex vivo. Il rigurgito funzionale della valvola tricuspide è causato dalla dilatazione dell'annulus valvolare e dallo spostamento dei muscoli papillari che, a loro volta, allontanano i lembi anteriore e posteriore dal lembo settale. È stato utilizzato un banco prova pulsatile che permette di alloggiare l'intero cuore destro espantato dal maiale, di simulare la circolazione polmonare e di riprodurre in maniera controllata il rigurgito funzionale della valvola tricuspide. Lo schema del circuito è rappresentato in figura 33: il cuore destro è collegato apicalmente ad una pompa a pistone, mentre l'arteria polmonare è collegata al simulatore di impedenza polmonare (costituito da un elemento resistivo e da un elemento complianti collegati tra loro in parallelo e a loro volta in serie rispetto ad un altro elemento resistivo), che a sua volta è collegato con un serbatoio a pelo libero che funziona da precarico.

Il rigurgito funzionale della valvola tricuspide è stato ottenuto perché la parete ventricolare destra del cuore del maiale ha uno spessore inferiore rispetto al ventricolo sinistro; per questo motivo sia il miocardio che l'annulus porcino tendono a dilatarsi naturalmente quando sono sottoposti ad una certa pressione sul banco prova.

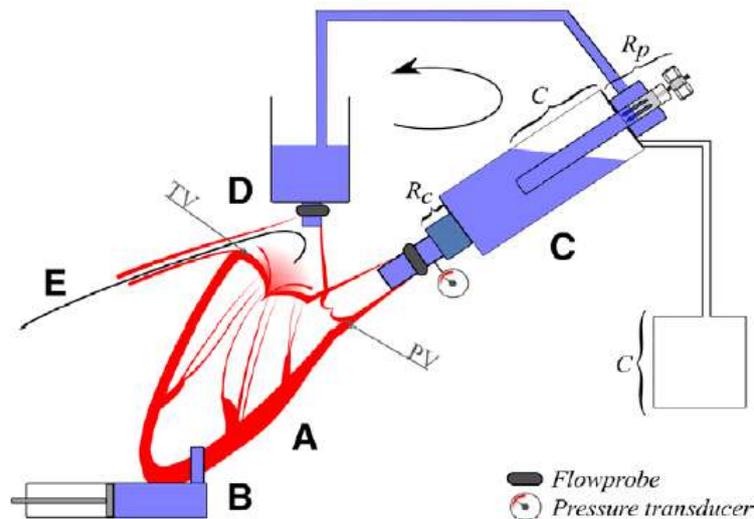


Figura 33. Rappresentazione degli elementi che compongono il banco prova. (A) cuore destro del maiale; (B) pompa a pistone; (C) simulatore di impedenza polmonare; (D) precarico; (E) fibroscopio. La freccia indica la direzione del flusso. C = camera della compliance; RC = resistenza caratteristica; RP = resistenza periferica aggiustabile; PV = valvola polmonare; TV = valvola tricuspide.

Due fasce regolabili (figura 34) possono essere posizionate a livello dei muscoli papillari e dell'annulus per controllare il livello di dilatazione del cuore e regolare il livello di rigurgito della valvola. Durante la fase sperimentale sono state impostate diverse gittate cardiache e frequenze allo scopo di simulare l'emodinamica di pazienti con diversa massa corporea ed in diverse condizioni di esercizio; la resistenza periferica del sistema e le fasce sono state regolate per simulare sia condizioni di ipertensione che di pressioni fisiologiche. Infine, il cuore è stato mantenuto sul banco prova per 60 minuti allo scopo di valutare la stabilità del modello nel tempo (impostando una frequenza di 70 bpm e una gittata sistolica di 70 ml). Su un cuore è stata anche effettuata una riparazione edge-to-edge per valutare se il modello è adatto per testare il funzionamento di tecniche chirurgiche.

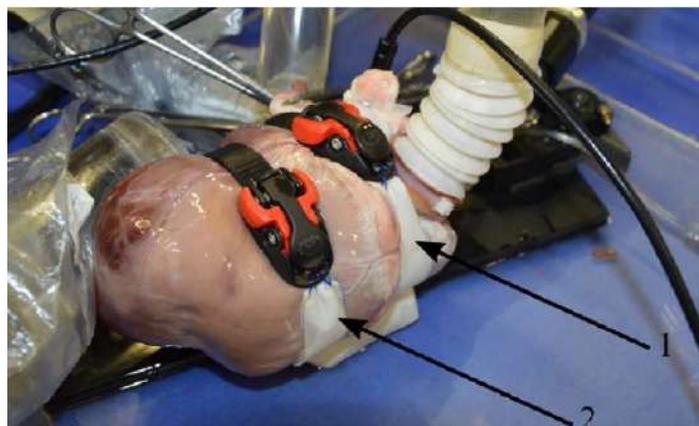


Figura 34. Fasce regolabili posizionate a livello dell'annulus della valvola tricuspide (1) e dei muscoli papillari (2) con lo scopo di contenere l'espansione del ventricolo e controllare la coaptazione della valvola.

Questo modello è facilmente riproducibile, controllabile e mostra una buona stabilità nel tempo. Le immagini ecocardiografiche e quelle ottenute tramite fibroscopio possono essere sfruttate per determinare la dinamica della valvola. I limiti sono dovuti al fatto che il banco prova impedisce di simulare perfettamente la contrazione naturale del cuore perché il volume ventricolare aumenta in sistole e diminuisce in diastole, che è l'opposto di quanto accade fisiologicamente.

Anche nel lavoro di Riccardo Vismara et al. [37] è stato ottenuto **rigurgito funzionale** della valvola tricuspide sfruttando la **dilatazione naturale della parete cardiaca su banco prova pulsatile**. Qui la tecnica transcateretere edge-to-edge è stata applicata su diversi campioni per valutare se il modello potrebbe essere adatto per studiare nuove tecniche riparative. Sono stati utilizzati cuori di maiali ex vivo ed un banco analogo a quello riportato nello studio precedente; quindi il modello sfrutta la tendenza dell'annulus mitralico e del ventricolo destro a dilatarsi se sottoposti a valori di pressione simili a quelli della pressione polmonare fisiologica. La dilatazione si verifica perché queste strutture nella parte destra del cuore del maiale sono estremamente complianti, in particolare si verifica una dilatazione della porzione dell'annulus in corrispondenza dei lembi anteriore e posteriore che determina il loro allontanamento dal lembo settale ed una chiusura non perfetta della valvola. Inoltre, a causa della dilatazione del miocardio, i muscoli papillari ancorati alla parete libera del ventricolo vengono spostati dalla loro posizione originaria e questo aumenta ulteriormente la mancanza di coaptazione della valvola tricuspide. Anche in questo studio sono state utilizzate due fasce regolabili per controllare il livello di dilatazione della parete cardiaca e per poter riprodurre sia condizioni fisiologiche che patologiche sulla valvola. Infine, è stata applicata la tecnica riparativa con diverse combinazioni per valutare quale tra queste fosse la più efficace per risolvere il rigurgito. La portata cardiaca, la pressione polmonare media ed il gradiente pressorio valvolare in diastole sono stati valutati in condizioni fisiologiche, patologiche e dopo aver applicato la tecnica transcateretere; sono anche state registrate immagini ecocardiografiche e video con il fibroscopio.

2.4. Obiettivi del lavoro

Dalla letteratura si osserva che esistono alcuni modelli in vivo che riproducono efficacemente il **rigurgito mitralico funzionale** [27, 28, 29, 30], tuttavia essi presentano

una serie di limitazioni legate a costi elevati, logistica di gestione, tempi, reperibilità degli animali e scarsa ripetibilità dei risultati che li rendono pertanto inappropriati per questa ricerca. Invece, per quanto riguarda i modelli sperimentali ex vivo, si nota che è difficile ottenere tutte le lesioni caratteristiche del rigurgito mitralico funzionale. Infatti, nei paragrafi precedenti sono stati analizzati degli studi che hanno cercato di riprodurre il rigurgito secondario della valvola mitrale porcina, ma la maggior parte di essi sono riusciti ad indurre la patologia in modo parziale [30, 33, 34], favorendo la dilatazione dell'annulus e tralasciando il contributo dei muscoli papillari. Solamente il lavoro di Michal Jaworek et al. [35] ha permesso di ottenere un modello patologico più simile alla situazione reale inserendo nel cuore un dispositivo per dilatare l'anello mitralico e per spostare i muscoli papillari dalla loro sede naturale. Tuttavia, uno dei limiti principali di questo studio è che il dispositivo artificiale impiantato nel cuore per dilatare la struttura valvolare impedisce l'applicazione di tecniche riparative o sostitutive; di conseguenza questo modello non è idoneo per valutare il funzionamento di alcune tecniche chirurgiche o transcateretere e limita la possibilità di utilizzare il modello per effettuare il training chirurgico.

In letteratura esistono anche una serie di studi [36, 37] che hanno dimostrato che la riproduzione del rigurgito funzionale sulla valvola tricuspide è molto più semplice perché in questo caso per indurre la patologia non è necessario modificare la struttura della valvola o impiantare dispositivi artificiali prima di posizionare il cuore sul banco prova.

L'obiettivo di questo lavoro è dunque quello di trovare un metodo più efficace per riprodurre il rigurgito funzionale mitralico ex vivo rispetto ai metodi già esistenti in letteratura.

Verrà quindi proposto un **nuovo protocollo sperimentale** che ha l'obiettivo di indurre la patologia sfruttando la pressurizzazione del ventricolo senza modificare la struttura valvolare fisiologica, in modo analogo a quanto effettuato negli studi relativi al rigurgito della valvola tricuspide.

In questa tesi verrà inoltre presentato un **nuovo modello animale ex vivo** con delle caratteristiche anatomiche e meccaniche diverse rispetto al cuore porcino (che è il modello animale maggiormente utilizzato in letteratura). Questa scelta è stata effettuata perché il cuore del maiale ha delle caratteristiche anatomiche [18, 19] che rendono difficile la dilatazione della struttura valvolare tramite la pressurizzazione del ventricolo, anche impostando dei valori di pressione molto maggiori rispetto ai valori fisiologici. Utilizzando un nuovo modello animale, l'obiettivo è quello di favorire la riproduzione del rigurgito

funzionale mitralico in maniera più semplice ed efficace. I risultati ottenuti dall'applicazione del protocollo sperimentale su cuori ex vivo saranno analizzati al fine di determinare se il nuovo modello sperimentale riproduce le caratteristiche del rigurgito mitralico umano in maniera controllabile e ripetibile.

3. Materiali e metodi

3.1. Il cuore di cervo come nuovo modello sperimentale

Dopo un'accurata valutazione è stato scelto il **cuore di cervo** (figura 35) come nuovo modello sperimentale per riprodurre ex vivo il rigurgito mitralico funzionale.

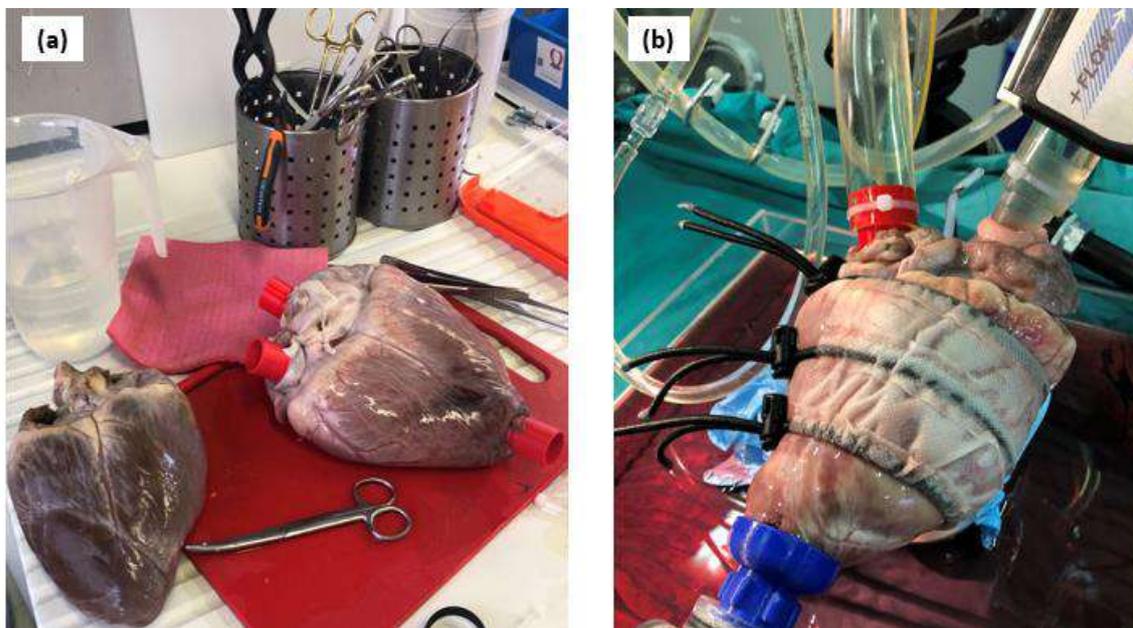


Figura 35. Cuori di cervo utilizzati presso il ForCardio Lab. (a) preparazione dei campioni. (b) cuore durante l'esecuzione della prova sperimentale.

Le ragioni che hanno portato a tale decisione sono:

- Per poter valutare l'efficienza del nuovo modello è necessario scegliere un animale che abbia un cuore con **dimensioni e forma** confrontabili con quello umano.
- Sono stati considerati solamente **animali reperibili** sul territorio italiano ed il cui abbattimento non comporta problemi a livello etico.
- In **letteratura** esistono alcuni studi che sono stati condotti utilizzando diverse parti anatomiche del cervo come modello sperimentale umano. Di seguito sono riportati alcuni esempi delle ricerche più significative:
 - o **Midollo spinale**: alcuni parametri anatomici del midollo spinale del cervo sono stati confrontati con quelli umani [38]. È stato dimostrato che tra i due

modelli esistono delle leggere differenze a livello della regione lombare e della regione toracica bassa; mentre differenze più significative sono presenti a livello della zona cervicale e della zona toracica alta. Di conseguenza sia la regione lombare che quella toracica bassa del midollo spinale del cervo possono essere utilizzate come modello sperimentale del midollo umano.

- **Laringe:** è stato svolto uno studio [39] per capire se la laringe del cervo è un buon modello sperimentale per lo studio della fisiologia delle corde vocali umane; è stato dimostrato che, sebbene esistano alcune differenze, la lunghezza delle corde vocali dell'animale è simile a quella dell'uomo.
- **Ginocchio:** il ginocchio del cervo, ed in particolare il legamento crociato anteriore, ha delle caratteristiche geometriche e meccaniche analoghe a quelle del legamento crociato umano [40]. L'area del legamento, la rigidità e la resistenza alla rottura presentano valori molto simili nei due modelli. Per questi motivi il ginocchio del cervo può essere utilizzato per studiare i meccanismi di rottura dell'articolazione e per valutare le tecniche riparative.
- **Femore:** anche il femore del cervo ha caratteristiche comuni con quello dell'uomo [41]. Confrontando alcuni parametri morfologici, come la lunghezza, il diametro dell'osso, lo spessore corticale, l'area ossea o la densità della struttura ossea e svolgendo alcune prove meccaniche, come quella di flessione o di torsione, è stato osservato che il femore del cervo non è perfettamente identico a quello umano, ma può essere accettato come modello sperimentale.

In tutti questi lavori è stato dimostrato che diverse zone anatomiche del cervo sono un buon modello sperimentale, perciò si può ipotizzare che anche il cuore del cervo potrebbe essere utilizzato per riprodurre il comportamento fisiologico e patologico del cuore umano.

- Infine, dall'**osservazione qualitativa** dei cuori espantati si è riscontrato che il muscolo cardiaco del cervo ha una conformazione ed uno spessore simili al cuore del maiale, ma la parete cardiaca del cervo è più cedevole e malleabile rispetto a quella porcina. Questo suggerisce che il cervo potrebbe essere un buon modello sperimentale per i fini di questo lavoro.

Nei paragrafi successivi verranno approfondite le fasi sperimentali che hanno permesso di elaborare un protocollo idoneo per riprodurre il rigurgito mitralico funzionale sui cuori di cervo ex vivo. Inoltre saranno mostrati nel dettaglio gli elementi che costituiscono i banchi prova, gli strumenti di misura utilizzati durante l'esecuzione dei test e le procedure di elaborazione dei dati sperimentali.

3.2. Reperimento dei cuori di cervo

Nella fase sperimentale sono stati utilizzati in totale 20 cuori di cervo. In Italia sono in vigore delle leggi che limitano l'abbattimento di questa specie, imponendo un numero massimo di capi da poter prelevare dal territorio nell'arco dell'anno solare. Inoltre questi animali vengono abbattuti con i tradizionali metodi di caccia, di conseguenza non è sempre possibile garantire che in questa fase il cuore non venga danneggiato. Per questi motivi, al fine di poter ottenere un numero consistente di cuori da utilizzare nella fase sperimentale, è stato necessario ricorrere a campioni provenienti da molteplici comprensori di caccia del Nord Italia e con pesi variabili, compresi tra 600 e 1200 g circa (tabella 1).

Cuore	Località di provenienza	Peso del cuore [g]
1	Prealpi Bergamasche	938
2	Prealpi Bergamasche	926
3	Prealpi Bergamasche	720
4	Prealpi Comasche	998
5	Prealpi Comasche	967
6	Prealpi Comasche	902
7	Alpi Comasche	644
8	Alpi Comasche	680
9	Prealpi Bergamasche	636
10	Prealpi Comasche	743
11	Alpi Comasche	572
12	Alpi Comasche	558
13	Valli Pellice	850
14	Alta Valle Susa	1301
15	Alta Valle Susa	1110
16	Alta Valle Susa	1275
17	Valli Pellice	865
18	Prealpi Bergamasche	693
19	Valli Pellice	788
20	Valli Pellice	707

Tabella 1. Località di provenienza e peso di ognuno dei cuori utilizzati in fase sperimentale.

3.3. Test preliminari

I test preliminari sono stati svolti presso il ForCardio Lab dell'ospedale Luigi Sacco di Milano; sono stati utilizzati 12 campioni con l'obiettivo di analizzare approfonditamente le caratteristiche del cuore di cervo e capire quale fosse la strategia più efficace per simulare la patologia mitralica. Poiché era difficile prevedere il comportamento biomeccanico dei cuori ex vivo, sono stati elaborati due protocolli di prova. Il primo è basato sull'utilizzo di un banco prova con una pompa a pistone, la quale sottopone il cuore sinistro ad una pressione pulsatile al fine di simulare il battito cardiaco ed il movimento dinamico della valvola mitrale. Il secondo è basato sull'utilizzo di una pompa centrifuga che esercita una pressione continua sul ventricolo sinistro, permettendo così di valutare il livello di chiusura dei lembi mitralici. Nei paragrafi successivi verranno mostrate nel dettaglio le caratteristiche dei due protocolli di prova.

3.3.1. Protocollo di prova 1

Questo protocollo è basato sull'utilizzo di una **pompa volumetrica a pistone**; il sistema pompante di questo tipo disponibile presso il ForCardio Lab è mostrato in figura 36. Esso è costituito da un sistema volumetrico cilindro-pistone che viene azionato da un motore a magneti permanenti a bassa inerzia (MCS06C41, Lenze, Hameln, Germany), comandato elettronicamente da un driver (Servo 9322EK, Lenze). Il collegamento tra motore e pistone è realizzato mediante una vite senza fine a ricircolo di sfere (SH12.7.12.7R, SKF, Göteborg, Sweden), che trasforma il moto di rotazione dell'albero motore nella traslazione del pistone (CPA Series Cylinders, Waircom-MBS, Granby, QC, Canada); il dispositivo è anche dotato di sensori magnetici di fine corsa (FM158, Waircom-MBS). Il driver controlla l'azionamento elettrico del motore, mentre un software PC dedicato permette di modificare alcuni parametri di interesse, come la frequenza di pompaggio e il volume eiettato, la cui variazione determina differenti condizioni di lavoro della pompa.

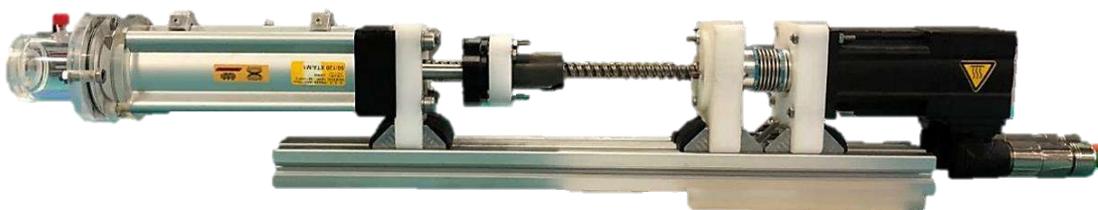


Figura 36. Fotografia della pompa pulsatile utilizzata presso il ForCardio Lab. Il pistone è posizionato nella parte centrale, mentre il punto di connessione tra la pompa e il cuore è situato sull'estremità sinistra.

Tale pompa si inserisce all'interno di un banco prova che fu inizialmente sviluppato da Leopaldi et al. [42]. Il circuito utilizzato in questa tesi è riportato in figura 37; la pompa a pistone è collegata all'apice del ventricolo del campione e consente di simulare il ciclo cardiaco (sistole e diastole).

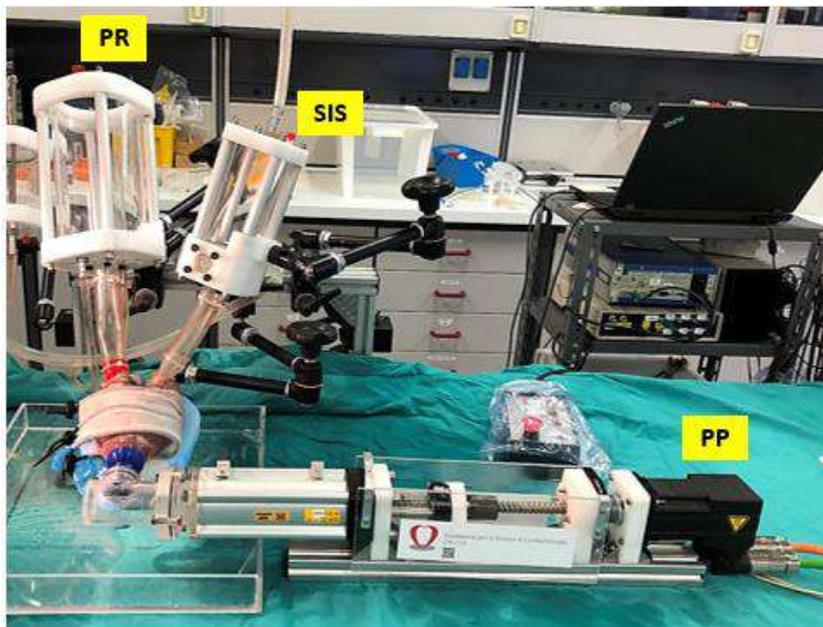


Figura 37. Fotografia del banco prova del ForCardio Lab e degli elementi principali che lo compongono. PP = pompa pulsatile; SIS = simulatore di impedenza sistemica; PR = reservoir di precarico. Attorno al cuore è posizionata la fascia per contenerne l'espansione.

Sono poi presenti altri due elementi del circuito che sono collegati al cuore:

- Un **simulatore di impedenza sistemica (SIS)**: è un circuito idraulico basato sul modello a tre parametri concentrati di tipo RCR:
 - una resistenza caratteristica, costituita da una rete polimerica a maglia quadrata;
 - una compliance, ottenuta con una camera d'aria;
 - una resistenza periferica, formata da un fascio di fibre cave in polipropilene.
 Sia la resistenza periferica che la compliance possono essere regolate allo scopo di ottenere le forme d'onda di pressione desiderate all'interno del circuito. Un tubo connette il simulatore all'aorta, mentre un altro tubo lo collega al reservoir di precarico.
- Un **reservoir di precarico (PR)**: oltre ad essere collegato con il simulatore di impedenza sistemica, questo contenitore è anche connesso con l'atrio sinistro del

cuore. Aumentando o diminuendo il livello di fluido all'interno del reservoir è possibile regolare il precarico atriale.

L'atrio sinistro del cuore e l'aorta vengono collegati rispettivamente al reservoir di precarico ed al simulatore di impedenza sistemica attraverso due connettori. Una volta effettuato il collegamento, il circuito viene riempito con acqua distillata ed il fluido presente all'interno del PR entra passivamente all'interno del ventricolo del cuore, passando attraverso l'atrio e la valvola mitrale aperta. Quando la pompa pulsatile viene azionata, il movimento del pistone spinge l'acqua presente nella camera ventricolare verso il SIS (passando attraverso la valvola aortica aperta). Da qui il fluido viene nuovamente convogliato verso il PR per ripetere il ciclo. Generalmente si sceglie di utilizzare acqua distillata allo scopo di migliorare la qualità delle immagini ecografiche che vengono acquisite per osservare il comportamento della valvola mitrale.

In questo lavoro sono stati utilizzati degli strumenti per misurare pressioni e portate in alcune zone del circuito e per ottenere immagini e video della valvola mitrale:

- **Trasduttore di pressione:** è stato utilizzato un trasduttore di pressione piezoresistivo (PC140 series, Honeywell Inc., Morristown, NJ, USA, figura 38a) ed è stato collegato all'apice del ventricolo per rilevare i valori di pressione che agiscono sulla camera ventricolare.
- **Flussimetro:** è stato impiegato un flussimetro a tempo di transito (HT110R, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA, figura 38b) ed è stato posizionato tra la radice aortica ed il simulatore di impedenza sistemica per registrare la portata cardiaca. Sia i flussimetri che i trasduttori di pressione sono collegati ad un sistema di acquisizione dati controllato dal software LabView (National Instruments, Austin, TX).

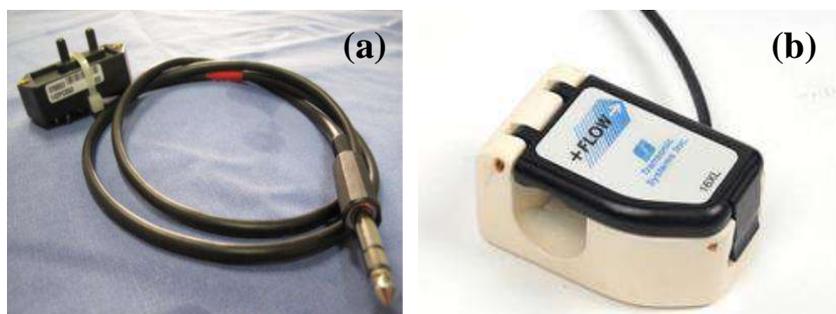


Figura 38. Strumenti di misurazione che, in fase sperimentale, vengono posizionati sul banco prova. (a) trasduttore di pressione piezoresistivo. (b) flussimetro.

- **Fibroscopio:** è costituito da una lente rigida con diametro di 10 mm (Olympus Europe, Hamburg, Germany), una fonte di luce (Olympus Visera CLV-S40) ed una colonna video (Olympus Visera OTV-S7 Digital Processor). È stato inserito attraverso il connettore atriale per visualizzare i lembi mitralici.
- **Ecocardiografia:** È stato utilizzato un ecografo IE33 (Philips, Eindhoven, NL) con una sonda L12-3 (Philips) in un range di frequenze 3-12 MHz. La sonda è stata posizionata sull'atrio sinistro del cuore per visualizzare il comportamento della valvola quando la pompa a pistone è attiva.

La **procedura di esecuzione dei test** prevista dal protocollo di prova 1 è la seguente:

1. Scongellare il cuore ad una temperatura tra i 2 e 4°C, lavare il campione per rimuovere i residui di sangue presenti al suo interno e tagliare le parti dei vasi sanguigni in eccesso.
2. Pesare il cuore con una bilancia e procedere con l'inserimento dei tre connettori a livello dell'atrio sinistro, dell'aorta e dell'apice ventricolare.
3. Posizionare il cuore sul banco prova, collegare i connettori con il tubo corrispondente e posizionare delle fascette da elettricista per stabilizzare la posizione del cuore durante il funzionamento del circuito sperimentale.
4. Azionare la pompa volumetrica a pistone, impostando una frequenza di 60 bpm ed un volume di eiezione 92 ml; sottoporre il cuore alla pressione pulsatile per un'ora.
5. Ogni 10 minuti registrare i valori di portata e di pressione che si generano a valle della radice aortica, acquisire immagini endoscopiche ed ecocardiografiche della valvola mitrale.
6. Prelevare il campione dal banco prova.
7. Utilizzando delle forbici chirurgiche aprire il cuore del cervo e prelevare la struttura valvolare, cercando di mantenere intatti i lembi valvolari, le corde tendinee ed i muscoli papillari. Utilizzare la carta millimetrata ed un micrometro per raccogliere i dati anatomici significativi.

Sistema per contenere l'espansione cardiaca

Dato che il cuore di cervo ha una parete facilmente deformabile, la pressione generata dalla pompa pulsatile causa un elevato aumento del volume ventricolare che impedisce di registrare valori di portata fisiologici con il flussimetro a valle della valvola aortica. Questo è un aspetto vantaggioso per ottenere il modello patologico, ma, poiché esistono diversi

livelli di gravità del rigurgito mitralico funzionale, nasce la necessità di trovare un modo per regolare l'espansione del cuore, ottenendo così un modello patologico controllabile. È stata dunque realizzata una **fascia in polipropilene** con un'altezza circa uguale a quella del ventricolo (figura 39) che riduce l'espansione della camera distribuendo uniformemente una compressione sulla parete ventricolare; sono state poi inserite delle **fascette regolabili** a livello dell'apice ventricolare, dei muscoli papillari e dell'annulus con lo scopo di ottenere un sistema facilmente controllabile. È stato scelto di utilizzare come materiale il polipropilene per i seguenti motivi:

- ha un'elevata resistenza che ne impedisce la rottura anche quando sottoposto ad alte pressioni;
- non assorbe l'acqua presente sulla parete cardiaca;
- è liscio e quindi non lacera il tessuto cardiaco durante la prova sperimentale;
- ha bassi costi.

Sono state realizzate fasce con due altezze differenti, 13 cm e 10.5 cm, che possono essere utilizzate per cuori con diverse dimensioni (figura 39).

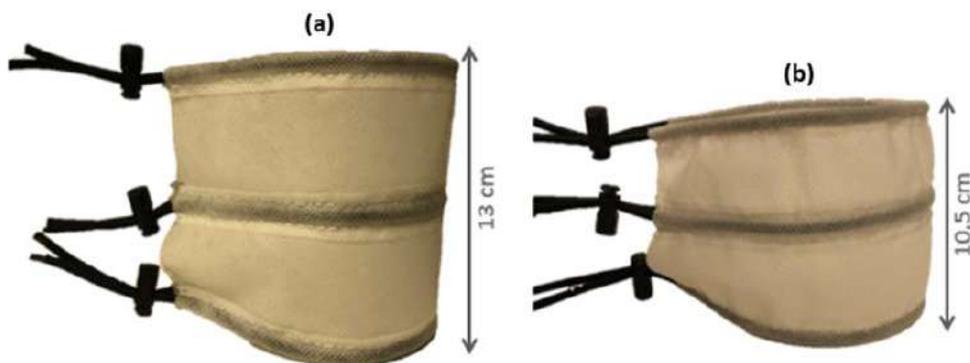


Figura 39. Fasce in polipropilene per contenere l'espansione del cuore. (a) fascia con un'altezza di 13 cm, (b) fascia con un'altezza di 10,5 cm.

3.3.2. Protocollo di prova 2

Questo protocollo è basato sull'utilizzo di una **pompa centrifuga**, che è una pompa continua costituita da una parte fissa centrale collegata al motore e da una parte rotante formata da una serie di coni concentrici. In questo lavoro è stata utilizzata una pompa centrifuga Medtronic Bio Pump BPX-80, collegata a due tubi con un diametro da 3/8" (figura 40).

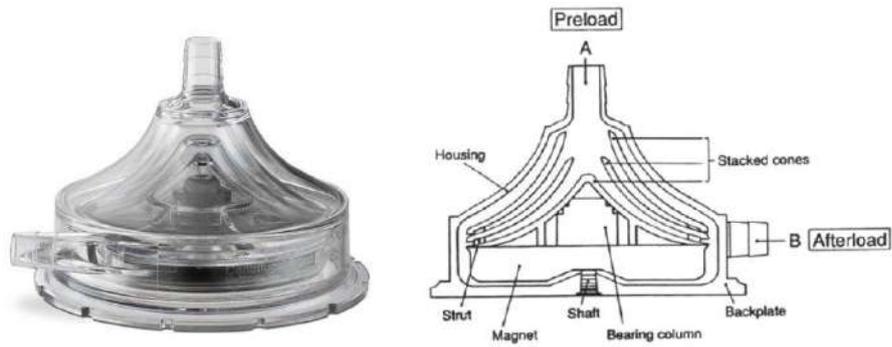


Figura 40. A sinistra: fotografia della pompa centrifuga utilizzata presso il ForCardio Lab. A destra: vista in sezione degli elementi che compongono la pompa centrifuga, in particolare si osserva la parte centrale fissa avvolta da una serie di coni concentrici.

La pompa è stata inserita in un banco prova (figura 41) costituito da una vasca riempita con acqua distillata. All'interno della vasca viene posizionato il cuore ed un tubo che si collega alla pompa centrifuga; quest'ultima viene poi collegata al ventricolo del campione con un tubo che si inserisce attraverso la valvola aortica.



Figura 41. Fotografia del banco del ForCardio Lab utilizzato per pressurizzare il ventricolo.

Quando la pompa viene azionata l'acqua viene prelevata dalla vasca e spinta fino al ventricolo sinistro. Una pressione all'interno della camera ventricolare maggiore di 60 mmHg determina la chiusura della valvola mitrale in condizioni fisiologiche. La pressione costante presente all'interno del ventricolo può essere modificata variando il numero di giri al minuto della pompa centrifuga. Sono stati utilizzati gli stessi **strumenti di misura**

utilizzati per il protocollo di prova 1; è stata anche utilizzata la fascia contenitiva per controllare il livello di espansione della parete ventricolare.

La **procedura di esecuzione dei test** prevista dal protocollo di prova 2 è la seguente:

1. Scongellare il cuore ad una temperatura tra i 2 e 4°C, lavare il campione per rimuovere i residui di sangue presenti al suo interno e tagliare le parti dei vasi sanguigni in eccesso.
2. Pesare il cuore con una bilancia.
3. Posizionare il cuore sul banco prova e inserire nell'aorta il tubo che si collega alla pompa centrifuga.
4. Azionare la pompa, impostando una pressione di 150 mmHg, e sottoporre il cuore ad una pressione continua per un'ora.
5. Ogni 10 minuti abbassare la pressione a 100 mmHg, registrare i valori di portata e di pressione che si generano a valle della radice aortica, acquisire immagini endoscopiche ed ecocardiografiche della valvola mitrale.
6. Prelevare il campione dal banco prova.
7. Utilizzando delle forbici chirurgiche aprire il cuore del cervo e prelevare la struttura valvolare, cercando di mantenere intatti i lembi valvolari, le corde tendinee ed i muscoli papillari. Utilizzare la carta millimetrata ed un micrometro per raccogliere i dati anatomici significativi.

3.3.3. Osservazioni ricavate dai test preliminari

Durante i test preliminari sono stati utilizzati in totale 12 campioni. Quattro cuori sono stati testati solamente con il protocollo di prova 1, mentre altri quattro campioni sono stati sottoposti solo al protocollo di prova 2. Degli altri quattro cuori rimanenti, due sono stati testati prima con la pompa pulsatile e poi con la pompa centrifuga; due sono stati analizzati inizialmente con la pompa centrifuga e successivamente con la pompa pulsatile. Da tali prove sperimentali è emerso che per ottenere un modello patologico sfruttando i cuori di cervo è necessario utilizzare sia la pompa pulsatile che la pompa centrifuga. La **pompa centrifuga** garantisce il raggiungimento di una dilatazione dell'annulus mitralico e del ventricolo tali da riprodurre sul banco prova il rigurgito valvolare; dalle immagini ecocardiografiche infatti si nota un aumento considerevole dei diametri valvolari. Per osservare il rigurgito mitralico è indispensabile utilizzare la **pompa pulsatile**, perché essa permette di analizzare il comportamento dinamico del muscolo cardiaco in condizioni

analoghe a quelle presenti durante il ciclo cardiaco fisiologico o patologico. La pompa pulsatile utilizzata senza l'ausilio della pompa centrifuga non garantisce l'ottenimento del rigurgito mitralico, anche nel caso in cui essa venga utilizzata per un lungo periodo di tempo. La pompa centrifuga invece ha lo svantaggio di essere una pompa continua, quindi non riproduce il comportamento pulsatile del cuore naturale e non permette di raccogliere dati significativi per valutare il rigurgito mitralico.

Dai test con il protocollo di prova 1 è stato osservato che impostando sulla pompa a pistone i valori di frequenza (70 bpm) e del volume eiettato (92 ml), che solitamente vengono utilizzati per svolgere prove sperimentali con i cuori porcini, si registrano valori di portate a valle della valvola aortica più bassi rispetto a quelli misurati in letteratura con il cuore di maiale. Per questo motivo per i test successivi con il cuore di cervo è stato deciso di impostare una frequenza di 60 bpm ed un volume di eiezione di 110 ml.

L'apice del ventricolo del cuore di cervo è piuttosto fragile; per evitare che la parete ventricolare venga danneggiata in fase di inserimento del connettore apicale, è utile avvolgere con una guaina in silicone la parte del connettore che entra in contatto con il tessuto cardiaco.

Per ridurre la dilatazione del cuore sul banco prova si può utilizzare la fascia in polipropilene; durante l'esecuzione dei test è stato osservato che la fascetta apicale è utile per mantenere in posizione la fascia in polipropilene e per distribuire uniformemente la compressione, ma l'aumento della pressione esercitata da questa fascetta non determina variazioni significative in termini di portata. Invece, le fascette posizionate a livello dei muscoli papillari e dell'annulus modificano i valori delle portate registrate dal flussimetro, di conseguenza, per ottenere diversi livelli di rigurgito mitralico, è fondamentale regolare il livello di compressione delle fascette in questi due punti.

3.4. Caratterizzazione sperimentale del modello patologico

Partendo dalle osservazioni riportate nel paragrafo precedente, è stato elaborato un protocollo definitivo che comprendesse l'utilizzo sia della pompa pulsatile che della pompa centrifuga al fine di garantire la riproduzione del rigurgito mitralico funzionale. Tale protocollo è stato applicato su 8 cuori di cervo; di seguito è riportata la procedura di esecuzione dei test (mostrata schematicamente in figura 42):

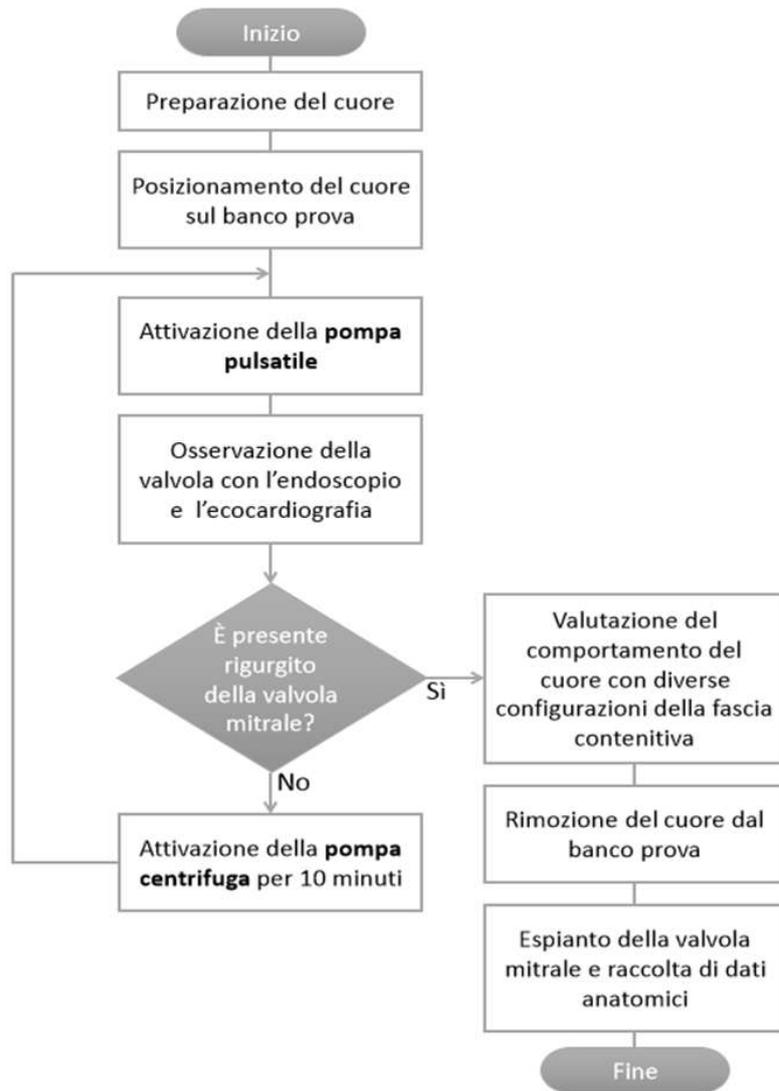


Figura 42. Diagramma di flusso che rappresenta le fasi del protocollo sperimentale.

1. Preparazione del cuore: scongelare il cuore ad una temperatura tra i 2 e 4°C, lavare il campione per rimuovere i residui di sangue presenti al suo interno, tagliare le parti dei vasi sanguigni in eccesso e conservare il campione biologico in acqua a temperatura ambiente.
2. Pesare il cuore con una bilancia e procedere con l'inserimento di tre connettori a livello dell'atrio sinistro, dell'aorta e dell'apice ventricolare.
3. Posizionare il cuore sul banco prova pulsatile, collegare i connettori con il tubo corrispondente e posizionare delle fascette da elettricista per stabilizzare la posizione del cuore durante il funzionamento del circuito sperimentale.
4. Azionare la pompa pulsatile impostando una frequenza di 60 bpm e uno stroke volume di 110 ml.

5. Visualizzare con LabView gli andamenti delle pressioni e delle portate e registrarne i valori per un intervallo di tempo corrispondente a 10 cicli della pompa pulsatile.
6. Inserire il fibroscopio attraverso un apposito foro sul connettore atriale per visualizzare il comportamento dinamico della valvola mitrale.
7. Posizionare la sonda ecocardiografica sulla superficie dell'atrio sinistro per acquisire immagini 3D della valvola mitrale.
8. **Se si osserva rigurgito** della valvola mitrale procedere con l'applicazione della fascia contenitiva sul cuore utilizzando le seguenti tre configurazioni:
 - esercitare una compressione con la fascetta a livello dell'annulus;
 - esercitare una compressione con la fascetta a livello dei muscoli papillari;
 - esercitare una compressione sia a livello dell'annulus che dei muscoli papillari.Per ognuna delle tre configurazioni registrare portate, pressioni ed immagini ecocardiografiche.
9. **Se non si osserva rigurgito** mitralico rimuovere la connessione tra il cuore ed il banco prova pulsatile e passare al posizionamento del campione sul banco prova con la pompa centrifuga. Pressurizzare il ventricolo impostando una pressione continua di 150 mmHg. Dopo 10 minuti abbassare la pressione a 100 mmHg, registrare il valore di portata, fermare la pompa centrifuga ed azionare nuovamente la pompa pulsatile. Controllare con il fibroscopio la presenza del rigurgito mitralico, registrare i valori delle portate, delle pressioni ed acquisire le immagini ecocardiografiche. Nel caso in cui il rigurgito non venga osservato, ripetere il test con la pompa centrifuga per un numero di volte tale da consentire l'ottenimento della patologia. Infine, utilizzando la pompa pulsatile, procedere con l'acquisizione dei dati con le tre configurazioni della fascia contenitiva, riportate nel punto 6 del protocollo.
10. Fermare le pompe, togliere le fascette dai connettori e prelevare il cuore dal banco prova.
11. Utilizzando delle forbici chirurgiche aprire il cuore del cervo e prelevare la struttura valvolare, cercando di mantenere intatti i lembi valvolari, le corde tendinee ed i muscoli papillari. Utilizzare la carta millimetrata ed un micrometro per raccogliere i dati anatomici significativi.

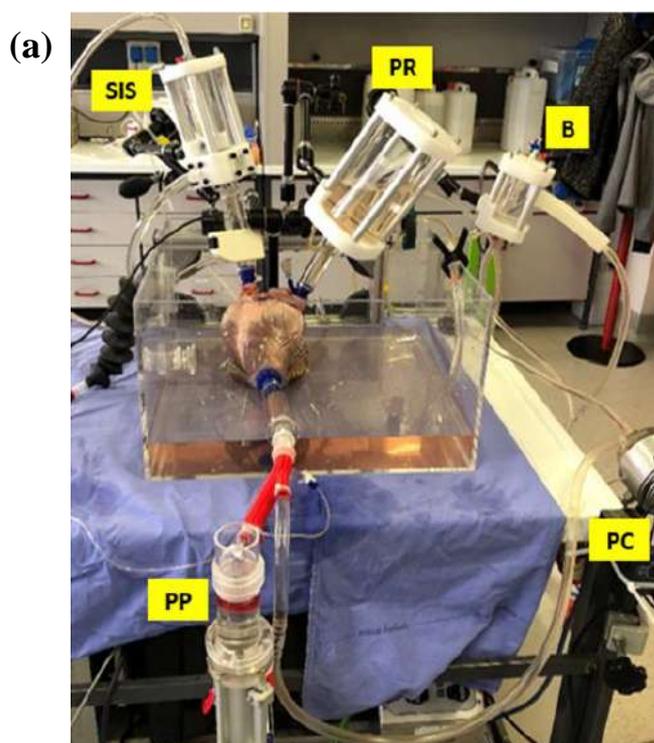
Questo protocollo prevede di utilizzare la pompa centrifuga con intervalli di 10 minuti fino all'ottenimento del rigurgito mitralico, ma, per evitare una durata eccessiva della sessione sperimentale, in questo lavoro di tesi è stato deciso di utilizzare la pompa centrifuga per un

tempo massimo di 60 minuti. Nel caso in cui anche dopo un'ora non venga osservato rigurgito della valvola mitrale, si procede con l'espianto della valvola e con la raccolta delle misure anatomiche.

3.5. Adeguamento del banco prova

Dato che per simulare il rigurgito mitralico funzionale è necessario utilizzare due pompe, il layout del banco prova pulsatile (in figura 37) è stato modificato aggiungendo anche una pompa centrifuga. Tale scelta evita di dover continuamente spostare il cuore su due banchi prova differenti durante l'esecuzione dei test, riducendo così i tempi di attrezzaggio e la probabilità di danneggiamento dei campioni.

In figura 42 sono riportati tutti gli elementi che compongono questo circuito, in particolare nella rappresentazione schematica (figura 43b) sono riportati anche alcuni componenti non visibili nella fotografia (figura 43a). Sono presenti un simulatore di impedenza sistemica (SIS), un reservoir di precarico (PR) ed una pompa pulsatile (PP) analoghi a quelli utilizzati durante l'esecuzione dei test preliminari con il protocollo di prova 1. Oltre alla pompa a pistone, all'apice del ventricolo è collegata anche una pompa centrifuga (PC); in questo modo le due pompe possono essere facilmente attivate in modo alternato (come previsto dal protocollo) senza dover continuamente spostare il cuore su due banchi prova differenti.



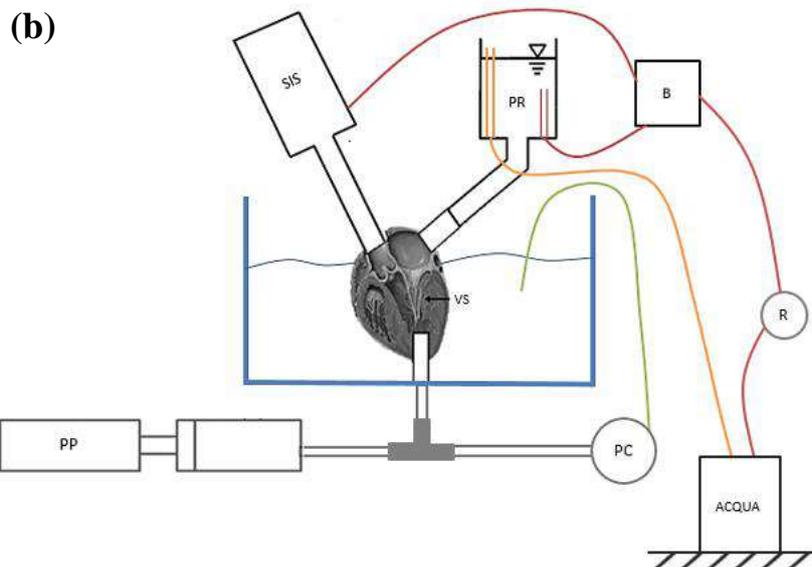


Figura 43. (a) fotografia del banco prova e dei suoi elementi principali. (b) rappresentazione schematica di tutti gli elementi che compongono il banco prova, anche di quelli non visibili dalla fotografia. PP = pompa pulsatile; PC = pompa centrifuga; R = pompa roller; B = reservoir per eliminare le bolle; PR = reservoir di precarico; SIS = simulatore di impedenza sistemica; VS = ventricolo sinistro.

Ci sono anche degli **elementi secondari** che servono per migliorare la gestione del circuito:

- Serbatoio con l'acqua: è posizionato a terra e contiene una riserva d'acqua distillata che mantiene in funzionamento il circuito per una durata di tempo tale da consentire l'esecuzione completa della prova sperimentale con la pompa pulsatile. In figura 43 si osserva che il serbatoio è anche collegato con il reservoir di precarico tramite un tubo di troppopieno all'interno del quale l'acqua scorre passivamente, evitando così un eccessivo riempimento del reservoir.
- Pompa roller (R): pompa necessaria per garantire che il liquido proveniente dal serbatoio a terra possa arrivare fino al reservoir di precarico.
- Reservoir per eliminare le bolle (B): contenitore posizionato tra il reservoir di precarico e la pompa roller, il cui scopo è quello di impedire che bolle d'aria entrino all'interno del cuore, peggiorando così la qualità delle immagini acquisite con l'ecocardiografia. Un altro tubo permette di collegare B con il simulatore di impedenza sistemica.
- Vasca in cui viene alloggiato il cuore: la vasca viene riempita con acqua distillata e all'interno di essa viene posizionato un tubo (verde, in figura 43) che è collegato con

la pompa centrifuga. La vasca permette anche di contenere eventuali perdite di liquidi provenienti dal cuore.

In figura 44 sono mostrati tutti gli elementi del circuito che vengono utilizzati durante l'attivazione di tale pompa centrifuga; prima di attivare la pompa continua bisogna posizionare una clamp sul tubo che collega l'aorta al simulatore di impedenza sistemica e scollegare il tubo che unisce l'atrio sinistro ed il reservoir di precarico. Quando la pompa viene azionata l'acqua distillata viene prelevata dalla vasca e spinta fino al ventricolo sinistro (come mostrato dalle frecce in figura 44). Una pressione all'interno della camera ventricolare maggiore di 60 mmHg determina la chiusura della valvola mitrale e, poiché anche l'aorta è chiusa da una clamp, si ottiene la pressurizzazione del ventricolo.

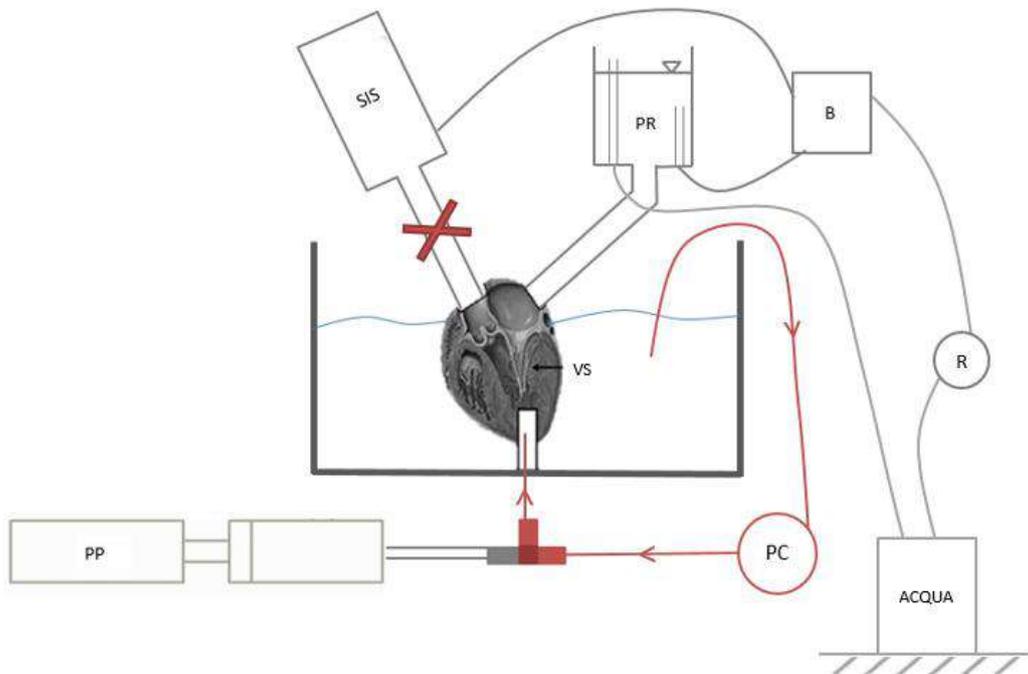


Figura 44. Rappresentazione schematica degli elementi che costituiscono il banco prova. In rosso sono indicati tutti gli elementi del circuito che entrano in gioco quando viene attivata la pompa centrifuga. In grigio sono indicati gli elementi che non sono necessari durante il funzionamento della pompa continua. Le frecce indicano la direzione del flusso.

In figura 45 invece è mostrato il banco prova con tutte le componenti che vengono utilizzate quando viene attivata la pompa a pistone. Durante il funzionamento del dispositivo è fondamentale posizionare una clamp sul tubo che collega l'apice ventricolare alla pompa centrifuga per evitare che una parte del fluido vada verso la pompa continua anziché nel ventricolo sinistro del cuore.

L'acqua distillata proveniente dal serbatoio posizionato a terra arriva nel PR ed entra passivamente all'interno del ventricolo sinistro (seguendo il percorso indicato dalle frecce rosse in figura 45). L'azione del pistone della pompa chiude la valvola mitrale e spinge il fluido fino al SIS, da qui il fluido può tornare nuovamente all'interno del PR (transitando da B). Quindi il movimento della pompa garantisce sia il passaggio ciclico dell'acqua all'interno delle camere cardiache che la simulazione dell'apertura e della chiusura della valvola mitrale. Nel caso in cui dovessero verificarsi delle perdite d'acqua, il livello del fluido all'interno del circuito è mantenuto costante dall'azione della pompa roller che preleva acqua dal serbatoio a terra.

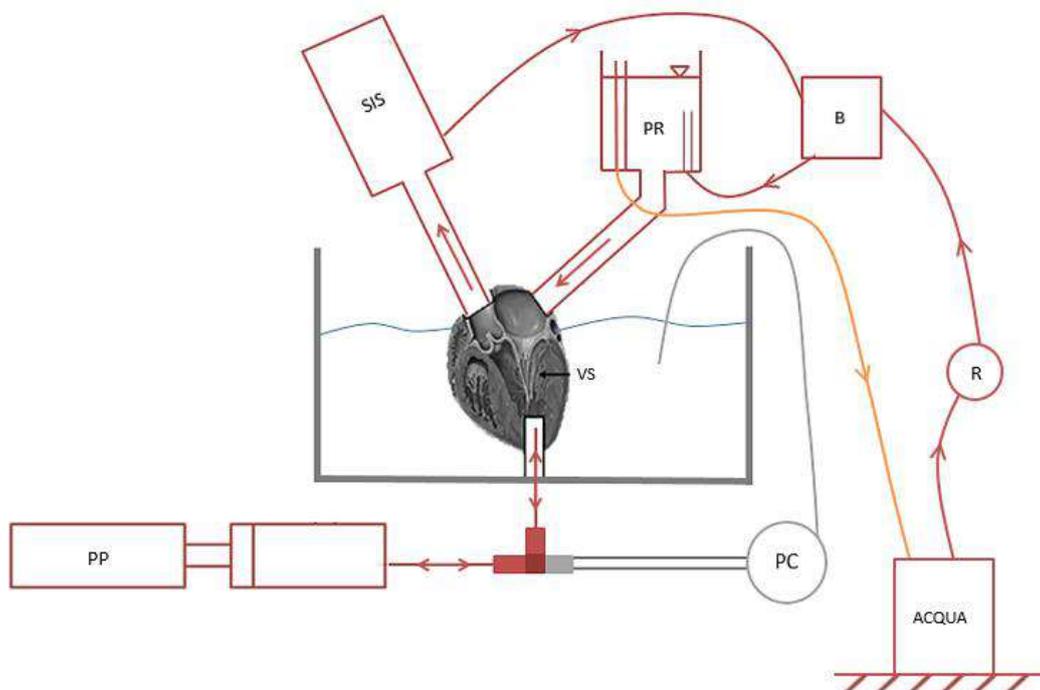


Figura 45. Rappresentazione schematica degli elementi che costituiscono il banco prova. In rosso sono indicati tutti gli elementi del circuito che entrano in gioco quando viene attivata la pompa a pistone. In grigio sono indicati gli elementi che non sono necessari durante il funzionamento della pompa pulsatile. In arancione è indicato il tubo di troppopieno che collega il serbatoio dell'acqua a terra con il reservoir di precarico. Le frecce indicano la direzione del flusso.

Durante l'applicazione del protocollo definitivo sono stati utilizzati gli stessi **strumenti di misura** utilizzati per i test preliminari; l'unica differenza è che il trasduttore di pressione ed il flussimetro per registrare i valori di pressione e portata generati dalla pompa centrifuga sono stati posizionati a livello dell'apice ventricolare (in ingresso al ventricolo) per

evidenziare l'eventuale presenza di perdite quando questa pompa è attiva per pressurizzare il ventricolo.

3.6. Elaborazione dei dati sperimentali

In questa sezione verranno presentate le procedure applicate per elaborare i seguenti dati sperimentali:

- dati anatomici della valvola mitrale espantata;
- portate e pressioni registrate durante l'attivazione della pompa centrifuga o della pompa pulsatile;
- immagini ecocardiografiche del comportamento dinamico della valvola mitrale.

Sono state considerate le seguenti **grandezze anatomiche**:

- altezza massima del lembo anteriore e del lembo posteriore;
- lunghezza dei due lembi valvolari;
- area dei due lembi mitralici;
- spessore del lembo anteriore e del lembo posteriore;
- lunghezza delle corde tendinee che terminano su ognuno dei lembi valvolari;
- numero di corde tendinee che originano dal muscolo papillare laterale e dal muscolo papillare mediale.

Gli spessori dei lembi valvolari sono stati ricavati utilizzando un micrometro (Mitutoyo Italiana srl, Milano, Italy); ogni misurazione è stata ripetuta tre volte considerando punti diversi per ognuno dei due lembi mitralici. Tutte le altre grandezze anatomiche sono state ottenute analizzando le fotografie delle valvole mitrali espantate, aperte e posizionate su carta millimetrata (figura 46) tramite il software ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Tale software, dopo aver stabilito la scala di misura sull'immagine da analizzare, permette di calcolare le grandezze anatomiche di interesse tracciando dei segmenti che corrispondono alle altezze o alle lunghezze delle diverse porzioni della struttura valvolare; l'area dei lembi mitralici invece viene determinata tracciando una linea spezzata chiusa lungo i bordi dei lembi valvolari. Tale procedura è stata ripetuta per tre volte per ogni grandezza anatomica di interesse, allo scopo di ridurre il più possibile eventuali errori di misurazione. Quindi, le grandezze anatomiche valvolari sopra elencate sono state identificate con l'obiettivo di effettuare una caratterizzazione della valvola mitrale,

fondamentale per poter confrontare l'anatomia della valvola del cervo con quella umana e del maiale.

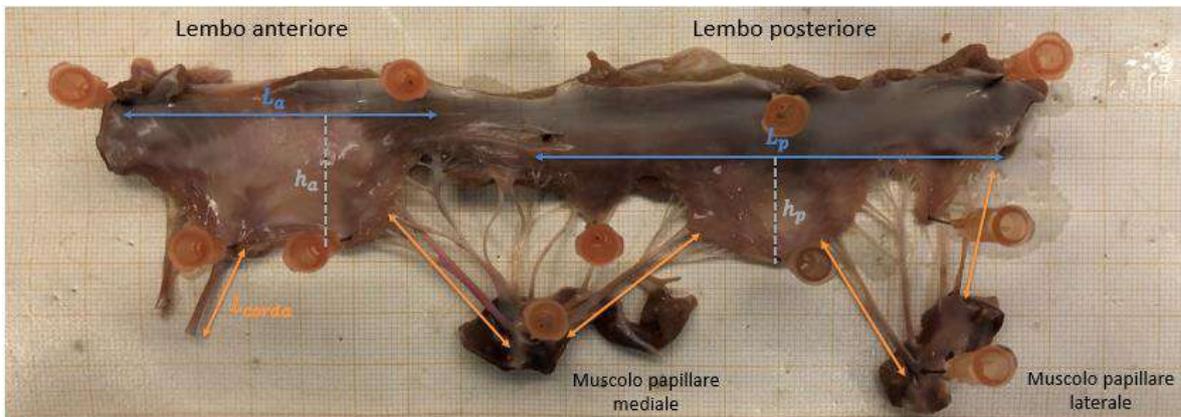


Figura 46. Valvola mitrale espantata, aperta e posizionata sulla carta millimetrata. h_p = altezza lembo posteriore; h_a = altezza lembo anteriore; l_a = lunghezza lembo anteriore; l_p = lunghezza lembo posteriore; l_{corda} = lunghezza delle corde.

I valori delle **portate** e di **pressioni** sono stati registrati per una durata di circa 10 secondi. Utilizzando il software Labview è possibile visualizzare sia l'andamento delle portate e delle pressioni nel tempo che il grafico dei due valori mediati nel tempo (un esempio è mostrato in figura 47). È presente anche una tabella che riporta il valore massimo, minimo e medio della portata e della pressione.

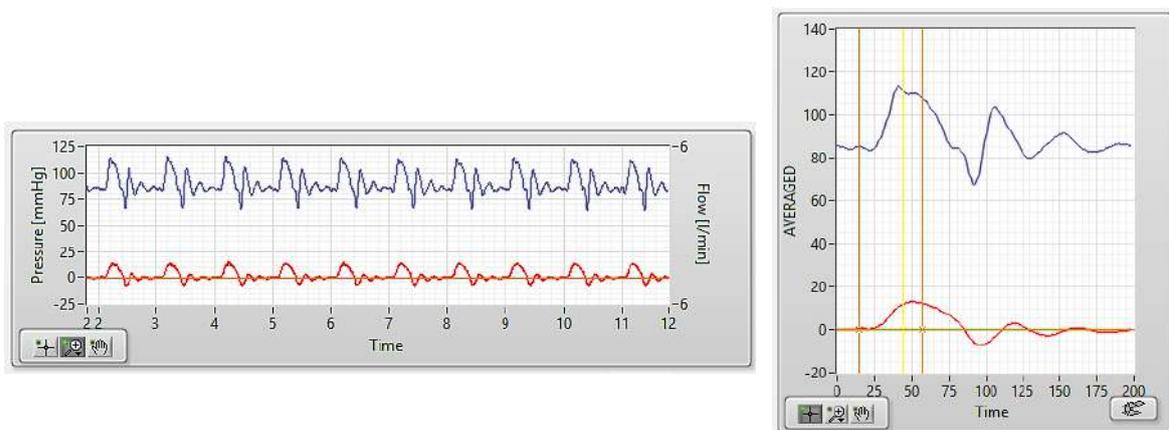


Figura 47. A sinistra è riportato l'andamento della portata cardiaca (in rosso) e della pressione aortica (in blu) in funzione del tempo durante l'attivazione della pompa pulsatile; a destra sono rappresentate le due grandezze mediate nel tempo.

Tra tutti questi dati, al fine di valutare l'efficienza e la ripetibilità del modello patologico sono state confrontate portate medie tra l'inizio e la fine della prova sperimentale. Per valutare la controllabilità del modello patologico, sono state confrontate le portate medie

registrate con le diverse configurazioni della fascia contenitiva in polipropilene previste dal protocollo sperimentale.

Infine, le **immagini ecocardiografiche** sono state analizzate per valutare la dilatazione dell'annulus mitralico e del ventricolo sinistro durante le varie fasi della prova sperimentale. A questo scopo è stato utilizzato il software 3D Slicer per misurare i seguenti parametri:

- il diametro antero-posteriore: diametro riferito all'asse valvolare corto (figura 48a);
- il diametro medio-laterale: diametro riferito all'asse valvolare lungo (figura 48a);
- l'altezza di tenting massima (h_t): distanza massima, in fase di picco sistolico, tra il punto di coaptazione dei due lembi mitralici ed un punto che interseca perpendicolarmente il diametro antero-posteriore o il diametro medio-laterale (figura 48b);
- l'area di tenting: area del triangolo ottenuto dalla vista in sezione della valvola mitrale (figura 48b), considerando come base del triangolo il diametro antero-posteriore (D_{A-P}) e come lati i due lembi valvolari in picco sistolico;
- l'angolo α : angolo misurato in fase di picco sistolico, compreso tra la vista in sezione del diametro antero-posteriore ed il lembo più vicino alla parete ventricolare (figura 48b);
- l'angolo β : angolo misurato in picco sistolico, compreso tra la vista in sezione del diametro antero-posteriore ed il lembo in prossimità della radice aortica (figura 48b);
- la lunghezza di coaptazione massima (l_c): coaptazione massima tra i due lembi mitralici in fase di picco sistolico (figura 48b).

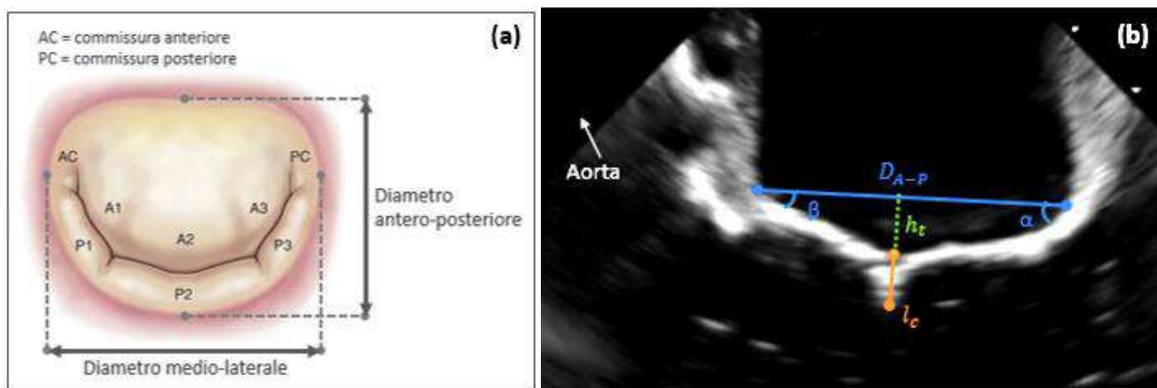


Figura 48. Rappresentazione delle grandezze analizzate dalle immagini ecocardiografiche. (a) diametro antero-posteriore e diametro medio-laterale. (b) altezza di tenting (in verde), lunghezza di coaptazione (in arancione), diametro A-P e angoli (in blu).

3D Slicer è un software di tipo manuale in cui l'operatore, per ricavare dall'immagine ecocardiografica le grandezze sopra elencate, deve prima tracciarne i punti significativi utilizzando tre viste prospettiche delle immagini tridimensionali acquisite durante la prova sperimentale. Quindi, prima di effettuare una misurazione è necessario orientare correttamente l'immagine ecocardiografica tridimensionale, scomponendola in tre viste riportate in tre quadranti distinti (figura 49).

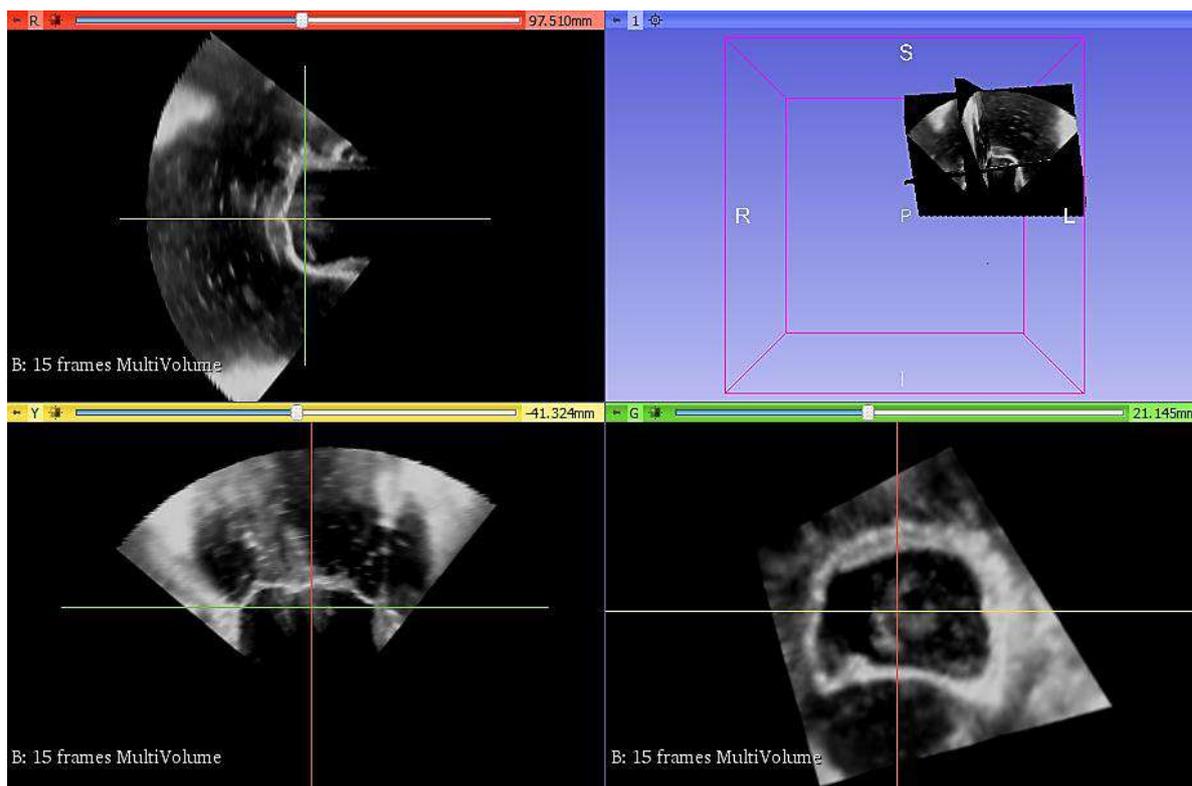


Figura 49. Scomposizione dell'immagine ecocardiografica 3D della valvola mitrale nelle tre viste bidimensionali, effettuata tramite il software 3D Slicer.

Il primo quadrante rappresenta la vista bidimensionale della valvola mitrale tagliata nella direzione dell'asse lungo della valvola mitrale (in basso a sinistra in figura 49); il secondo quadrante raffigura la vista bidimensionale della valvola tagliata ortogonalmente rispetto al taglio del quadrante precedente (in alto a sinistra in figura 49); il terzo quadrante riporta una vista bidimensionale dall'alto dell'annulus valvolare (in basso a destra in figura 49). È inoltre presente un quarto quadrante (in alto a destra in figura 49) che rappresenta l'unione delle tre viste dell'immagine ecocardiografica in esame. Quindi, utilizzando queste quattro viste, l'operatore può ottimizzare la posizione di ciascuno dei tre piani di taglio e ricavare i parametri valvolari significativi. Per poter confrontare le grandezze valvolari in diversi

istanti temporali e con diverse configurazioni della fascia contenitiva, è stato scelto di analizzare solamente l'immagine ecocardiografica che corrisponde al picco sistolico, ossia all'istante in cui si verifica la massima chiusura della valvola mitrale.

4. Risultati e discussione

In questo capitolo saranno mostrati e discussi i risultati ottenuti dalle prove sperimentali.

La prima sezione del capitolo sarà dedicata al confronto tra i dati anatomici della valvola mitrale del cervo con quelli della valvola umana e porcina per individuarne analogie e differenze.

Nel secondo paragrafo verranno confrontati i dati raccolti all'inizio ed alla fine del test su banco prova con l'obiettivo di valutare se la parte sinistra del cuore di cervo è efficace per riprodurre le stesse lesioni del rigurgito funzionale mitralico.

Nella terza parte saranno invece analizzati i risultati ottenuti posizionando sul cuore la fascia contenitiva con diverse configurazioni al fine di determinare se il modello sperimentale è controllabile.

4.1. Confronto dei dati anatomici

Questa sezione è dedicata all'analisi dei dati anatomici ricavati dalle valvole espianate dai cuori di cervo al termine della fase di sperimentazione su banco prova. Per quest'analisi sono stati considerati sia i cuori utilizzati durante i test preliminari (11 cuori) che quelli su cui è stato applicato il protocollo definitivo (8 cuori). Sono state calcolate le medie e le deviazioni standard e sono state confrontate con quelle relative alla valvola mitrale umana e porcina; i dati di questi ultimi due modelli sono stati ricavati dalla letteratura [19, 43, 44].

In figura 50 sono riportati tutti i grafici a barre che confrontano: altezza, lunghezza, area, spessore dei lembi mitralici (distinguendo il lembo anteriore da quello posteriore); numero e lunghezza delle corde tendinee tra cuore umano, del maiale e del cervo.

Si osserva che mediamente i lembi valvolari del cuore di cervo hanno lunghezza, altezza, area e spessore maggiori rispetto al cuore umano, mentre questi scostamenti risultano ridotti confrontando il cervo con il maiale.

Il numero di corde tendinee è analogo in tutti i modelli, mentre la lunghezza delle corde tendinee della valvola mitrale del cervo è maggiore sia rispetto all'uomo che al maiale.

In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati sia cuori con dimensioni analoghe al modello porcino (circa 600 g), ma anche con dimensioni maggiori (fino a 1200 g). Questo spiegherebbe il motivo per cui sia le medie che le deviazioni standard dei dati sperimentali ricavati dalla valvola mitrale del cervo siano maggiori rispetto a quelli estratti dalla letteratura.

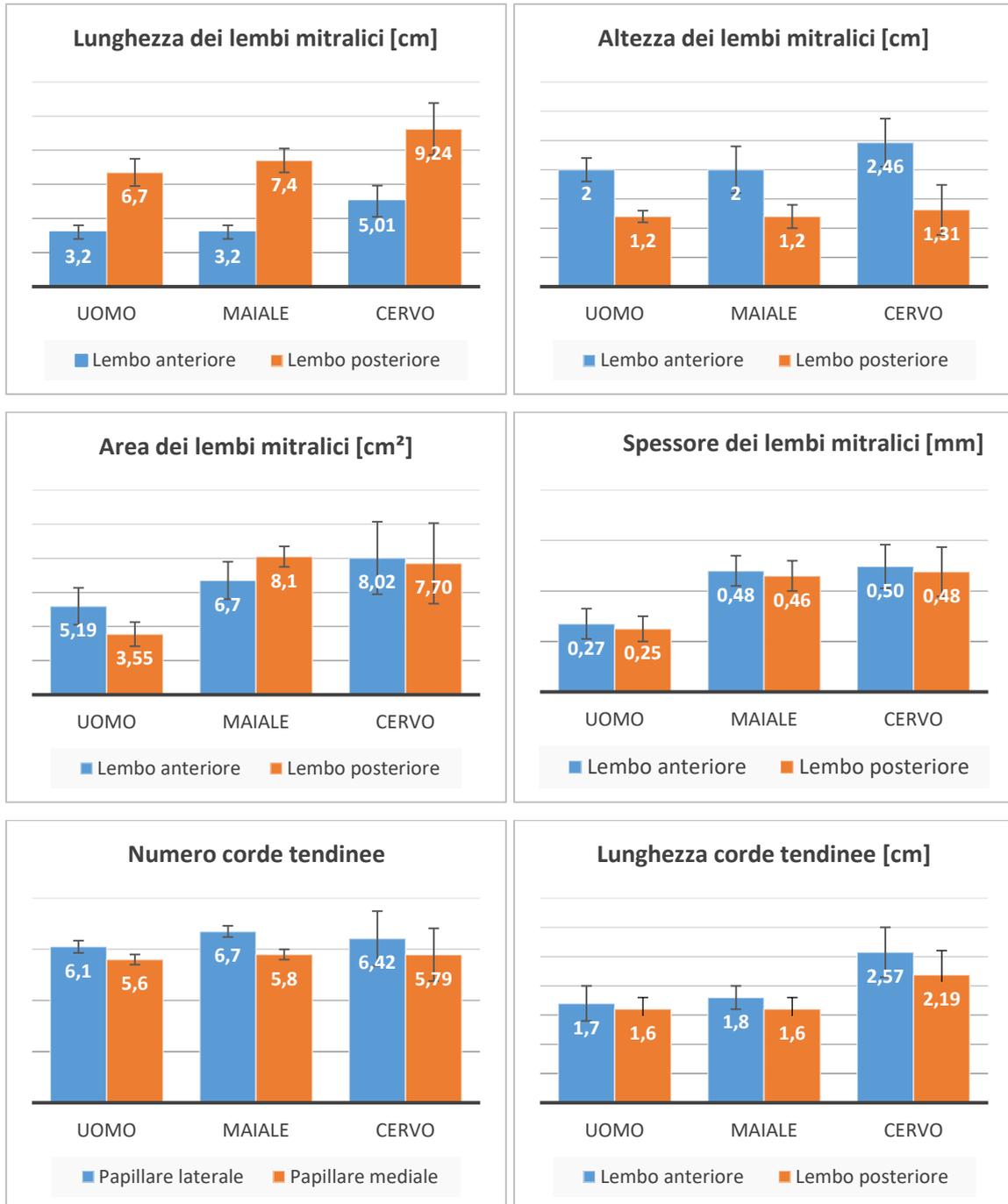
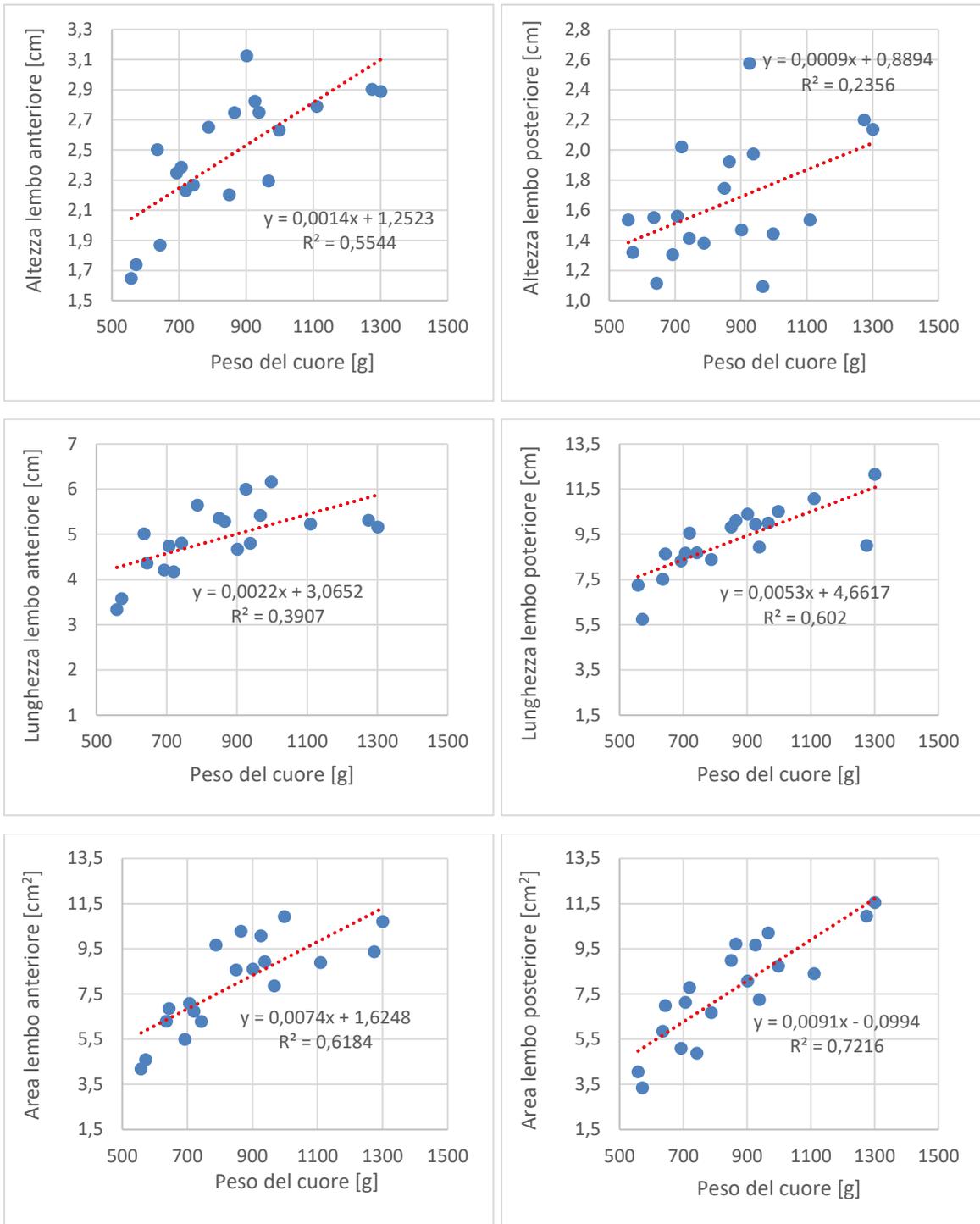


Figura 50. Istogrammi che riportano le medie e le deviazioni standard di alcune grandezze anatomiche della valvola mitrale umana, porcina e del cervo. I valori confrontati sono: la lunghezza, l'altezza, l'area e lo spessore dei lembi valvolari; il numero e la lunghezza delle corde tendinee.

Per visualizzare più dettagliatamente la relazione esistente tra il peso dei cuori di cervo e le misure anatomiche delle valvole mitrali, ognuna delle misure ricavate dai singoli campioni è stata riportata su un grafico in funzione del peso del cuore da cui la valvola è stata prelevata. È stato poi applicato il modello statistico della regressione lineare per determinare se esiste una relazione lineare tra le due variabili (figura 51).



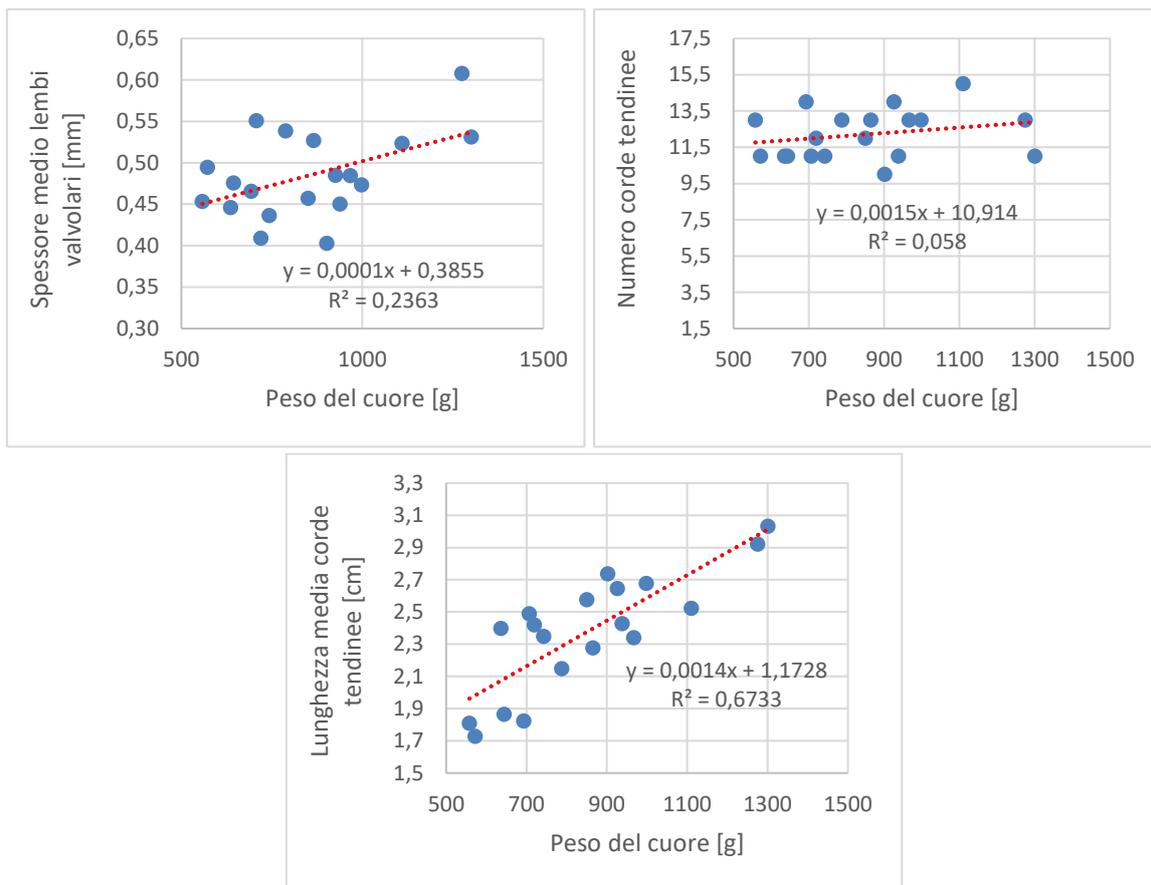


Figura 51. Grafici che rappresentano le grandezze anatomiche delle valvole mitrali dei cuori di cervo in funzione del peso del cuore. Ogni punto è riferito ad un singolo campione e la retta rossa rappresenta la linea di regressione lineare. R^2 vicino a 1 indica che i pesi dei cuori predicano bene la grandezza anatomica specifica, mentre R^2 circa uguale a 0 indica che non esiste relazione tra variabile indipendente e dipendente.

Dalla figura 68 si riscontrano alti valori di R^2 nei grafici che riportano l'area dei lembi valvolari, la lunghezza del lembo posteriore, l'altezza del lembo anteriore e la lunghezza delle corde tendinee. Risulta un valore basso del coefficiente di determinazione dai grafici che rappresentano il numero di corde tendinee, lo spessore dei lembi valvolari e l'altezza del lembo posteriore. Considerando la lunghezza del lembo anteriore si osserva invece un valore di R^2 intermedio (0,39).

Dai grafici è anche evidente che i cuori di cervo con pesi più bassi hanno delle dimensioni valvolari più vicine a quelle umane e, per questo motivo, possono essere considerati un buon modello sperimentale del cuore umano. Invece, i cuori di cervo più pesanti hanno delle dimensioni valvolari maggiori a livello delle aree dei lembi, delle lunghezze dei lembi e delle lunghezze delle corde tendinee, ma queste grandezze mostrano una relazione lineare con il peso del cuore. Per questo motivo si può concludere che anche i cuori di cervo più grandi, poiché presentano lunghezze delle corde tendinee, aree dei lembi e lunghezze dei lembi

proporzionali a quelle dei cuori più piccoli, possono essere considerati un buon modello sperimentale. È stato deciso pertanto di testare su banco prova anche i cuori con dimensioni maggiori, al fine di poterne valutare l' idoneità alla riproduzione del rigurgito mitralico funzionale. Tale scelta è stata anche determinata dal numero limitato di campioni a disposizione per l' esecuzione delle prove sperimentali.

4.2. Confronto dei dati tra l' inizio e la fine del test

In questa sezione verranno mostrate alcune immagini estratte dai video acquisiti con l' endoscopio sia all' inizio che alla fine della prova sperimentale, la cui durata massima è stata 60 minuti. Successivamente saranno riportati gli andamenti nel tempo di alcune grandezze ricavate dalle immagini ecocardiografiche, dal flussimetro e dal trasduttore di pressione. Infine le medie e le varianze di questi valori saranno confrontate statisticamente. Tutti i dati sono stati acquisiti durante il funzionamento della pompa pulsatile ad eccezione della portata, che è stata registrata sia con la pompa centrifuga che con la pompa a pistone. I cuori numerati da 1 a 8 fanno riferimento ai campioni su cui è stato applicato il protocollo sperimentale definitivo.

4.2.1. Imaging della valvola

Dalle immagini della valvola mitrale ottenute con il fibroscopio è possibile osservare se esiste una differenza qualitativa tra il comportamento della valvola pre-test e post-test.

In figura 52 è mostrata la valvola mitrale del cuore 2 all' inizio della prova sperimentale con la pompa pulsatile: è evidente una perfetta apertura della valvola in fase diastolica (prima figura) ed una perfetta chiusura dei lembi in fase sistolica (quarta figura).

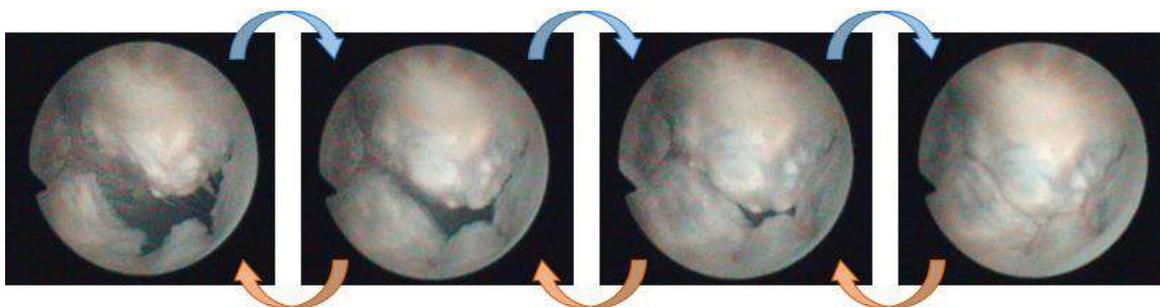


Figura 52. Comportamenti della valvola mitrale del cuore 2 all' inizio della prova sperimentale con la pompa pulsatile, partendo dal picco diastolico (prima figura) fino al picco sistolico (quarta figura). Queste due fasi si ripetono in modo ciclico, come indicato dalle frecce: le frecce blu indicano le fasi per passare dalla diastole alla sistole; le frecce arancio indicano le fasi per passare dalla sistole alla diastole.

In figura 53 è mostrata la valvola mitrale del cuore 2 alla fine della prova sperimentale con la pompa pulsatile: si osserva una perfetta apertura della valvola in fase diastolica (prima figura), mentre in fase sistolica la coaptazione fisiologica dei lembi è assente (quarta figura).

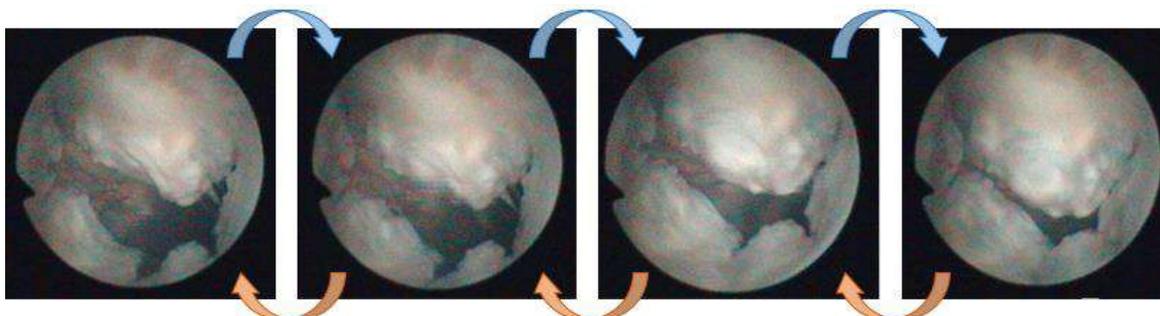


Figura 53. Comportamenti della valvola mitrale del cuore 2 alla fine della prova sperimentale con la pompa pulsatile, partendo dal picco diastolico (prima figura) fino al picco sistolico (quarta figura). Queste due fasi si ripetono in modo ciclico, come indicato dalle frecce: le frecce blu indicano le fasi per passare dalla diastole alla sistole; le frecce arancio indicano le fasi per passare dalla sistole alla diastole.

All'inizio del test è stata riscontrata una perfetta coaptazione dei lembi in fase sistolica in tutti i campioni, con la sola eccezione del cuore 7, che non presentava coaptazione valvolare in fase sistolica.

Alla fine del test è stato osservato rigurgito della valvola mitrale nella maggior parte dei casi, ad esclusione dei campioni 5 e 6, i quali mostravano una coaptazione dei lembi valvolari analoga a quella presente all'inizio della prova.

4.2.2. Andamenti nel tempo delle grandezze ricavate dalle immagini ecocardiografiche

Le immagini ecocardiografiche 3D della valvola mitrale sono state analizzate con il Software 3D Slicer per ricavare le grandezze significative (elencate nel capitolo precedente) per valutare il comportamento della valvola mitrale all'inizio ed al termine del test. Al fine di poter valutare approfonditamente la variazione nel tempo di queste grandezze, per 5 campioni sono stati analizzati anche i dati ricavati con intervalli temporali di 10 minuti (durante il funzionamento della pompa pulsatile, dopo aver terminato la fase sperimentale con la pompa centrifuga). In particolare, nelle figure 54, 55 e 56 sono mostrati gli andamenti temporali del diametro antero-posteriore (A-P), del diametro medio-laterale (M-L) e della lunghezza di coaptazione.

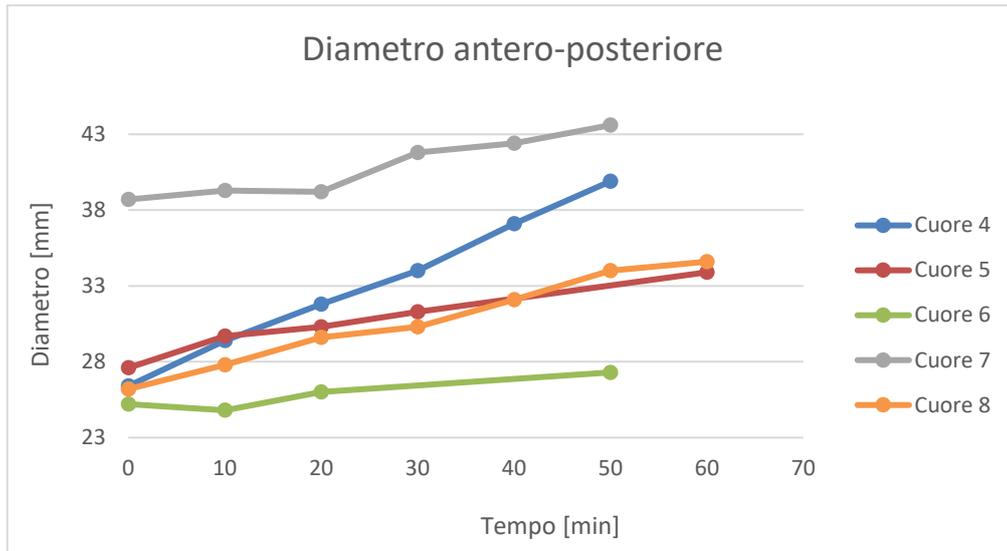


Figura 54. Rappresentazione dei valori dei diametri antero-posteriori di cinque cuori in funzione del tempo.

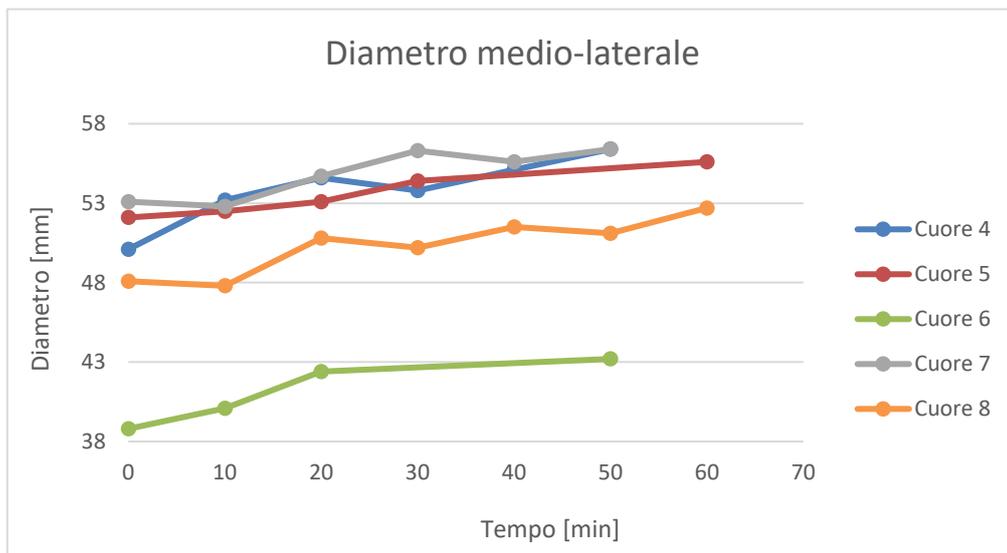


Figura 55. Rappresentazione dei valori dei diametri medio-laterali di cinque campioni in funzione del tempo.

Dai grafici in figura 54 e 55 si osserva che i diametri A-P e M-L dei cuori utilizzati hanno delle dimensioni iniziali variabili: il diametro A-P è compreso in un range tra 25,2 e 38,7 mm, mentre il diametro M-L è compreso tra 27,3 e 43,6 mm. Tuttavia, indipendentemente dalle dimensioni iniziali, in tutti i 5 cuori posizionati sul banco prova si osserva un graduale aumento nel tempo di queste due grandezze.

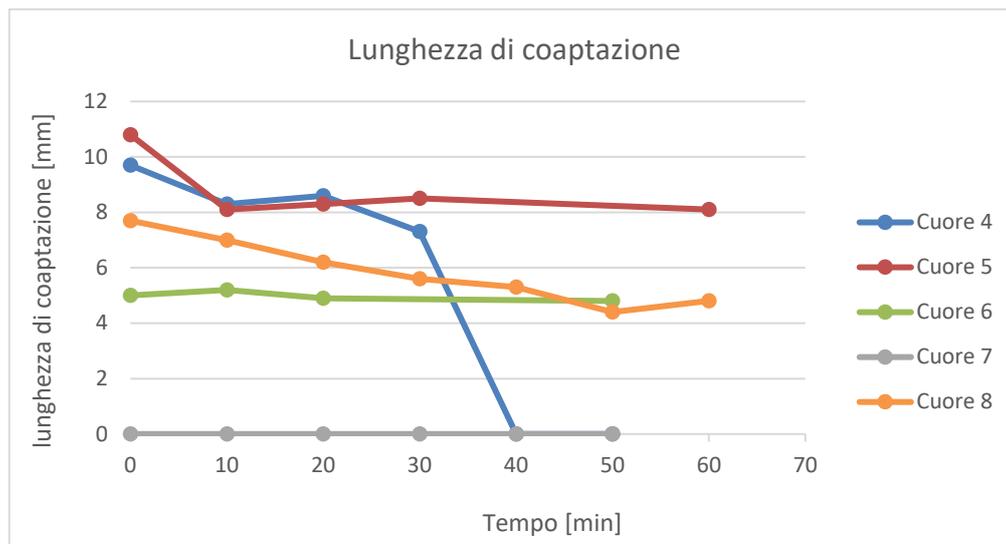


Figura 56. Rappresentazione delle lunghezze di coaptazione di cinque cuori in funzione del tempo.

Anche per quanto riguarda la lunghezza di coaptazione (figura 56) i cuori mostrano dei valori iniziali variabili: il cuore 7 non presenta coaptazione già all'inizio della prova, mentre gli altri campioni hanno una lunghezza di coaptazione compresa tra 4,8 e 10,8 mm. In generale nel tempo si osserva una variazione non costante della lunghezza di coaptazione: nei cuori 4 e 7 la lunghezza finale risulta nulla, mentre nei cuori 5 e 8 diminuisce; il cuore 6 non mostra variazioni tra l'inizio e la fine del test. Si sottolinea inoltre che il cuore 8 alla fine della prova presentava una coaptazione parziale, quindi in fase sistolica i lembi non chiudevano perfettamente l'orifizio atrio-ventricolare.

Sono stati considerati anche gli andamenti temporali dell'altezza di tenting, dell'angolo alfa e dell'angolo beta: le loro misure iniziali si mantengono stabili nel tempo. L'area di tenting diminuisce gradualmente nel tempo a causa della diminuzione del diametro A-P (che costituisce la base del triangolo dalla quale viene calcolato il valore dell'area di tenting).

È importante sottolineare che i cuori 1, 2 e 3 non sono mostrati nei grafici perché in questi casi le immagini ecocardiografiche sono state acquisite solamente nell'istante iniziale e finale della prova sperimentale. Tuttavia, si considera il loro comportamento analogo a quello degli altri campioni perché: sia il diametro A-P che M-L presentano un valore minore alla fine del test rispetto a quello registrato all'inizio del test; la lunghezza di coaptazione finale è minore rispetto a quella iniziale (risulta pari a zero); le altezze di tenting e gli angoli finali sono circa uguali a quelli iniziali.

4.2.3. Andamenti nel tempo delle portate e delle pressioni medie

Per quanto riguarda pressioni e portate, è necessario effettuare una distinzione tra i dati raccolti durante l'attivazione della pompa centrifuga e quelli esaminati durante il funzionamento della pompa pulsatile.

La **pompa centrifuga** è stata utilizzata su ogni campione per 50-60 minuti impostando una pressione costante di 150 mmHg. Le portate all'apice del ventricolo sono state registrate ogni 10 minuti impostando una pressione costante di 100 mmHg. In presenza di valvole mitrali fisiologiche il valore di portata registrato dal flussimetro dovrebbe essere nullo, mentre in presenza di valvole patologiche all'aumentare della non coaptazione dei lembi dovrebbe aumentare anche il valore della portata. È quindi interessante analizzare le portate registrate dal flussimetro per ogni cuore al fine di valutare l'eventuale aumento della portata e per determinare in quale istante temporale esso si verifica.

Il grafico in figura 57 mostra gli andamenti temporali delle portate misurate con la pompa centrifuga. Non è stato riportato il cuore 7 perché mostrava valori molto alti già all'inizio del test (4,4 l/min); questo significa che i lembi della valvola non coaptavano (come confermato anche dalle immagini endoscopiche ed ecocardiografiche) e quindi non è significativo rappresentarlo sul grafico.

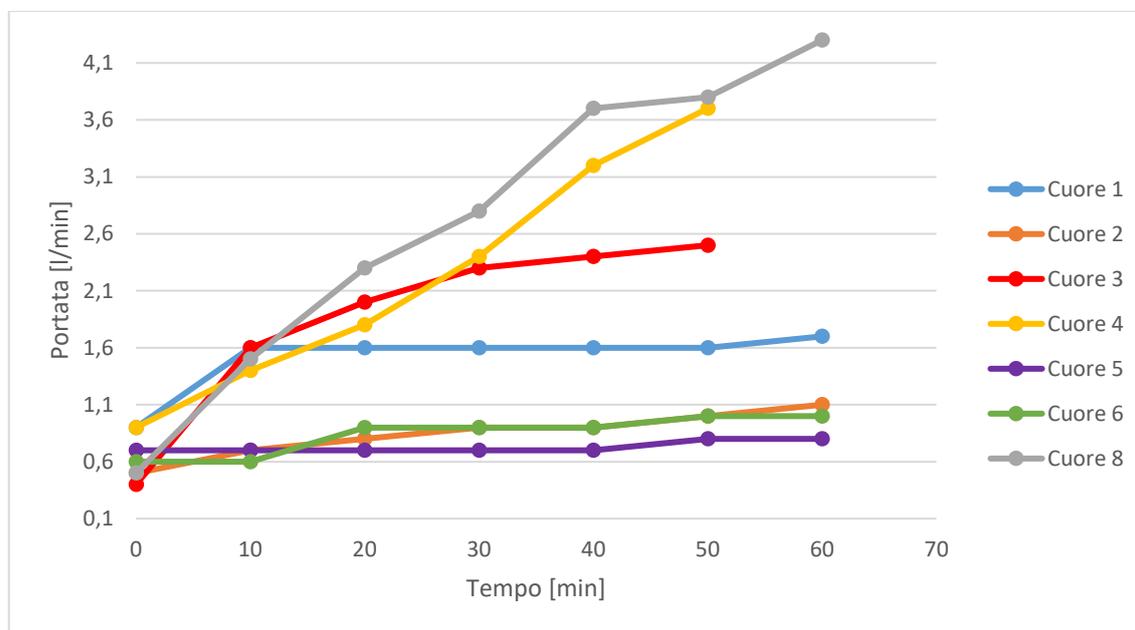


Figura 57. Rappresentazione delle portate di sette campioni in funzione del tempo. Le portate sono state registrate durante l'attivazione della pompa centrifuga.

In tutti i cuori si osserva un graduale aumento della portata nel tempo. Tuttavia l'entità di questa variazione non è uguale in tutti i campioni, come sottolineato dal confronto tra i valori iniziali e finali (tabella 2).

Cuore	ΔQ [l/min]
1	0,8
2	0,6
3	2,1
4	2,8
5	0,1
6	0,4
7	3,3
8	3,8

Tabella 2. Per ogni campione sono riportati i valori delle variazioni di portata tra l'inizio e la fine della prova sperimentale.

Maggiori variazioni della portata suggeriscono una maggiore diminuzione della coaptazione dei lembi mitralici nel tempo. Si osserva inoltre che il valore della portata registrato all'inizio della prova sperimentale risulta maggiore di zero per tutti i cuori (anche se idealmente la portata dovrebbe essere nulla); questo è dovuto a piccole perdite a livello delle coronarie e delle valvole del cuore sinistro.

Analizziamo ora gli andamenti delle pressioni e delle portate durante l'attivazione della **pompa pulsatile**. All'inizio del test è stata impostata la pressione media di lavoro del simulatore di impedenza sistemica, in modo tale da ottenere una pressione a valle della valvola aortica di circa 100 mmHg; la resistenza del simulatore è stata poi mantenuta costante per tutta la durata della prova. Le pressioni e le portate sono state misurate a livello della radice aortica: per entrambe è stata osservata una graduale diminuzione nel tempo. Si osserva infatti che i valori medi di portata ottenuti alla fine della prova sperimentale sono pari a $0,89 \pm 0,96$ l/min, molto inferiori rispetto al valore previsto secondo le impostazioni del sistema pompante. Si ritiene che questo sia dovuto alla presenza di **rigurgito valvolare** e all'**effetto compliant del ventricolo** sinistro, il quale assorbe parte della portata generata dalla pompa. L'alta compliance ventricolare è confermata anche dal fatto che già all'inizio del test i valori di portata registrati sono bassi: $1,94 \pm 0,84$ l/min.

La pressione misurata a livello della radice aortica all'inizio del test risulta pari a $94,8 \pm 26,53$ mmHg, mentre alla fine del test si abbassa a $52,26 \pm 28,75$ mmHg.

4.2.4. Analisi statistica

I dati raccolti nella fase iniziale e finale delle prove sperimentali sono stati utilizzati per svolgere un'analisi statistica per valutare se le differenze riscontrate nei dati pre-test e post-test possano essere considerate statisticamente significative.

Per prima cosa è stato applicato il test statistico di Kolmogorov-Smirnov per determinare se tutti i dati seguissero una distribuzione normale (considerando un p-value < di 0,05 come livello di significatività). I risultati ottenuti dall'applicazione di questo test hanno dimostrato che tutti i valori misurati all'inizio ed alla fine della prova sperimentale, ad eccezione della lunghezza di coaptazione, seguono una distribuzione normale. Sono quindi state calcolate le medie e le deviazioni standard delle grandezze distribuite normalmente (tabella 3). Per la lunghezza di coaptazione invece sono stati calcolati i valori mediani: all'inizio della prova la mediana è pari a 5,9 mm (con dati compresi tra 0 mm e 10,8 mm); alla fine della prova essa è uguale a 0 mm (con dati compresi tra 0 mm e 8,1 mm).

Per valutare se esistono delle differenze significative tra i dati con distribuzione normale è stato utilizzato il t-test parametrico per dati appaiati, mentre per valutare la lunghezza di coaptazione è stato applicato il test di Wilcoxon, che rappresenta il corrispettivo non parametrico del t-test per dati appaiati. In tabella 3 sono riportati i valori dei p-value ottenuti a seguito dell'applicazione del test statistico parametrico; mentre il p-value ottenuto dal test di Wilcoxon è pari a 0,0156. In entrambi i test un p-value < di 0,05 è stato assunto come statisticamente significativo.

	Inizio prova (t ₀)		Fine prova (t _f)		p-value
	Media	Dev. St.	Media	Dev. St.	
Diametro A-P [mm]	29,61	± 4,66	36,01	± 4,72	0,002
Diametro M-L [mm]	49,83	± 5,09	54,35	± 5,19	< 0,0001
A-P/M-L [mm]	0,60	± 0,09	0,66	± 0,06	0,0305
Altezza di tenting [mm]	6,91	± 0,48	7,11	± 0,82	0,4055
Area di tenting [mm²]	93,42	± 25,14	124,09	± 33,17	0,0034
Angolo alfa [°]	25,21	± 4,50	24,07	± 4,04	0,3382
Angolo beta [°]	21,15	± 2,01	21,23	± 2,33	0,8468
Portata pompa centrifuga [l/min]	1,11	± 1,34	2,76	± 2,32	0,0114
Portata pompa pulsatile [l/min]	1,74	± 0,67	0,83	± 0,93	0,0048
Pressione pompa pulsatile [mmHg]	88,56	± 24,06	53,06	± 26,32	0,0148

Tabella 3. Medie e deviazioni standard dei dati relativi alle fasi iniziale e finale della prova sperimentale. I p-value sono stati ottenuti a seguito dell'applicazione del t-test parametrico.

Per quanto riguarda la lunghezza di coaptazione, al termine della prova sperimentale si riscontra una diminuzione statisticamente significativa del suo valore. Di seguito sono riportati gli istogrammi che consentono di visualizzare più chiaramente le differenze statistiche esistenti tra le medie e le deviazioni standard dei valori distribuiti normalmente all'inizio ed alla fine della prova (figure 58, 59 e 60).

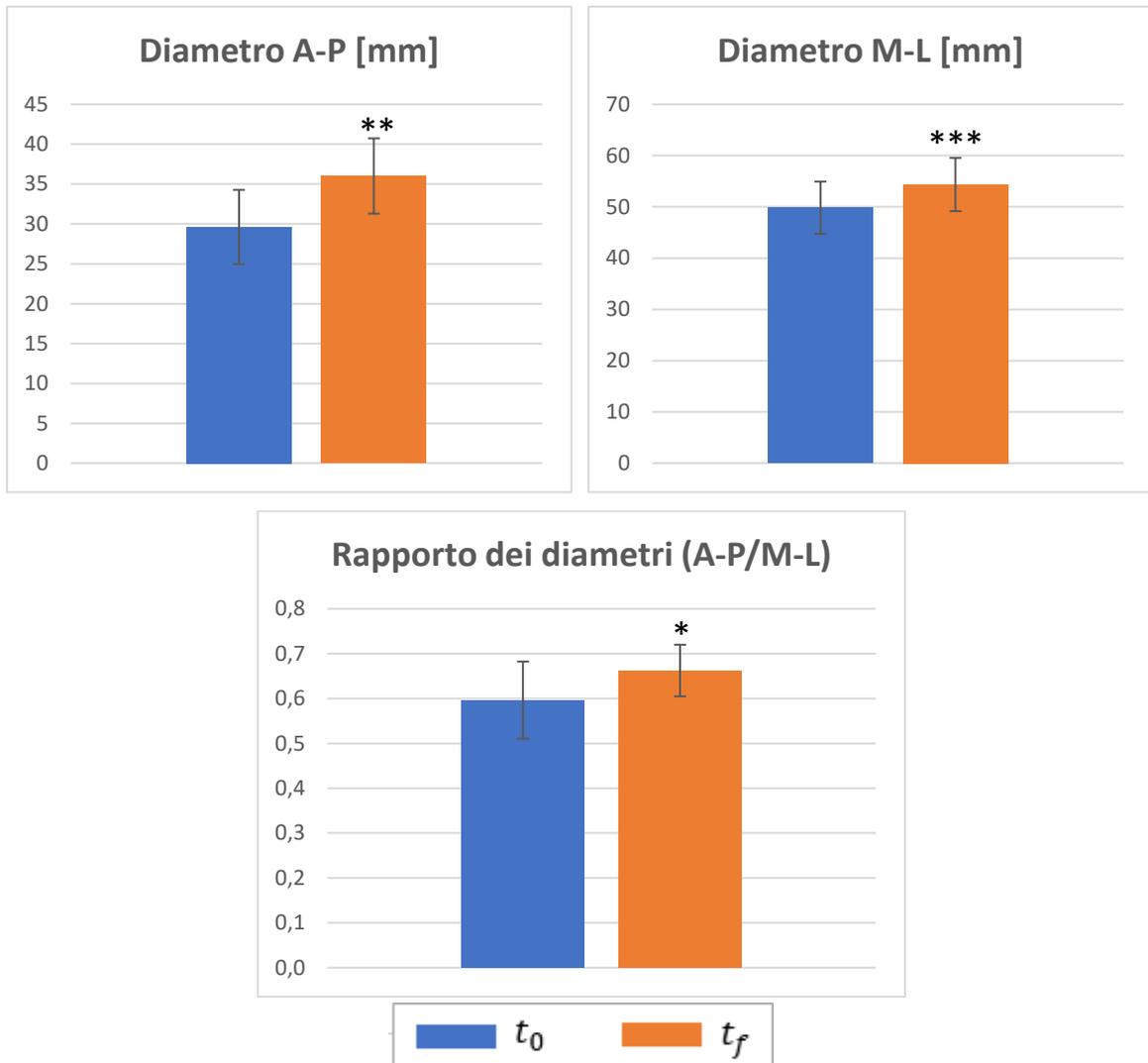


Figura 58. Istogrammi riferiti al diametro A-P (in alto a sinistra), al diametro M-L (in alto a destra) ed al rapporto tra i due diametri (in basso). Gli asterischi indicano che esiste una differenza statisticamente significativa tra i valori all'inizio ed alla fine della prova sperimentale: un numero maggiore di asterischi corrisponde ad una differenza significativa più elevata.

In figura 58, sia per il diametro A-P che per il diametro M-L, si osserva che il valore medio alla fine della prova sperimentale risulta maggiore rispetto a quello iniziale e che tale differenza è statisticamente significativa. Le stesse considerazioni valgono anche per l'istogramma che confronta il rapporto tra i diametri nei due diversi istanti temporali.

Questi risultati evidenziano quindi la presenza di una dilatazione dell'annulus mitralico alla fine del test e sottolineano che la dilatazione è più accentuata nella direzione A-P rispetto che nella direzione M-L (essendo il rapporto tra i diametri A-P ed M-L maggiore alla fine della prova sperimentale rispetto che all'inizio).

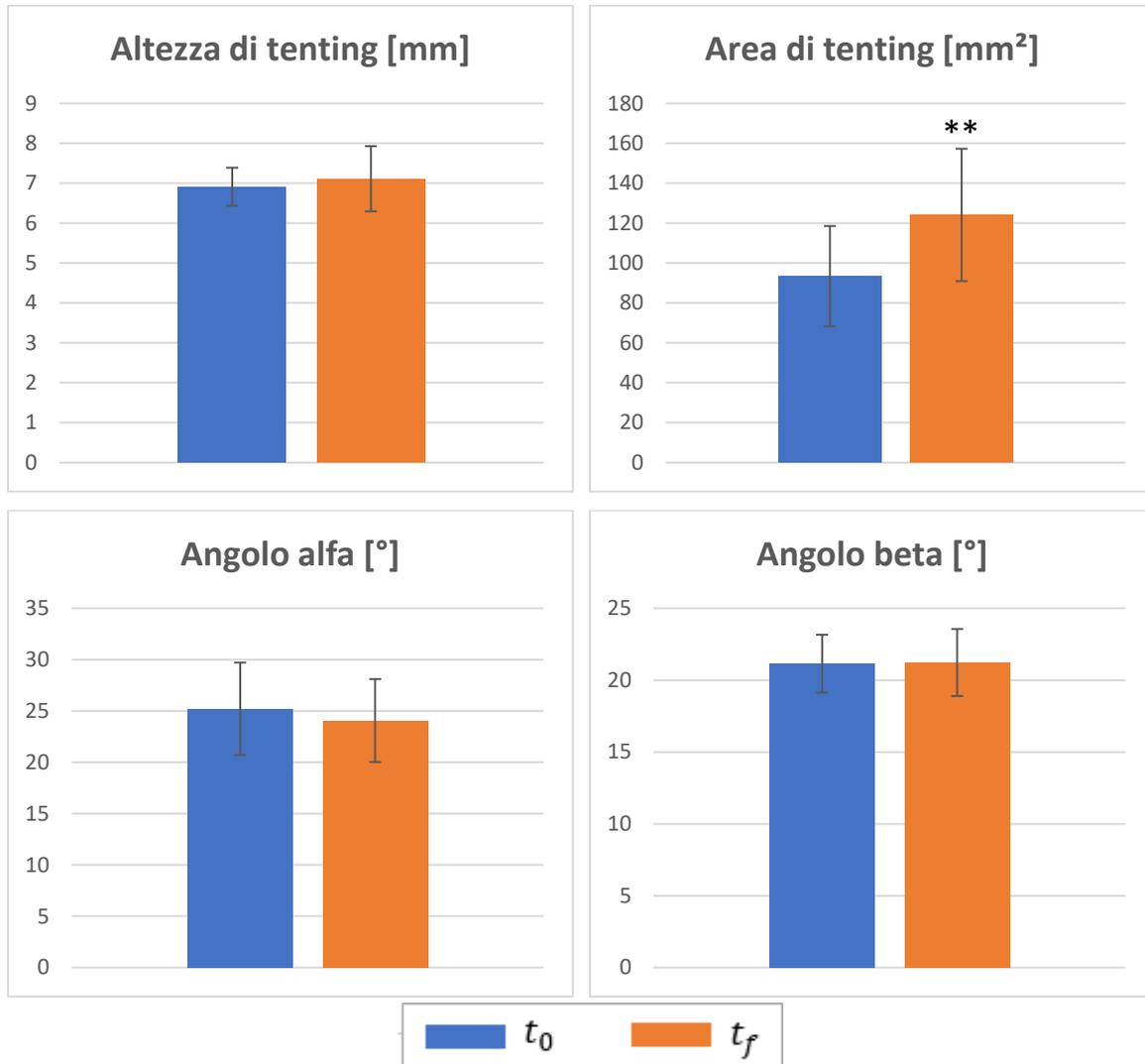


Figura 59. Istogrammi riferiti all'altezza di tenting, all'area di tenting, all'angolo alfa ed all'angolo beta. Gli asterischi indicano che esiste una differenza statisticamente significativa tra i valori all'inizio ed alla fine della prova sperimentale: un numero maggiore di asterischi corrisponde ad una differenza significativa più elevata.

Dagli istogrammi in figura 59 si osserva che non esiste una differenza statisticamente significativa tra altezza di tenting, l'angolo alfa e l'angolo beta misurati all'inizio e la fine dell'esperimento. L'area di tenting invece aumenta significativamente alla fine della prova: questo incremento è causato dalla dilatazione del diametro A-P.

I risultati suggeriscono dunque che la diminuzione della coaptazione dei lembi alla fine della prova sperimentale sia causata non solo dalla dilatazione dell'annulus, ma anche dalla dilatazione del ventricolo. Tale ipotesi è confermata dal fatto che sia l'altezza di tenting che gli angoli non presentano variazioni statisticamente significative. Infatti, se si verificasse la sola dilatazione dell'annulus queste grandezze dovrebbero diminuire, mentre se la dilatazione fosse isolata alla parete ventricolare le grandezze in questione dovrebbero aumentare.

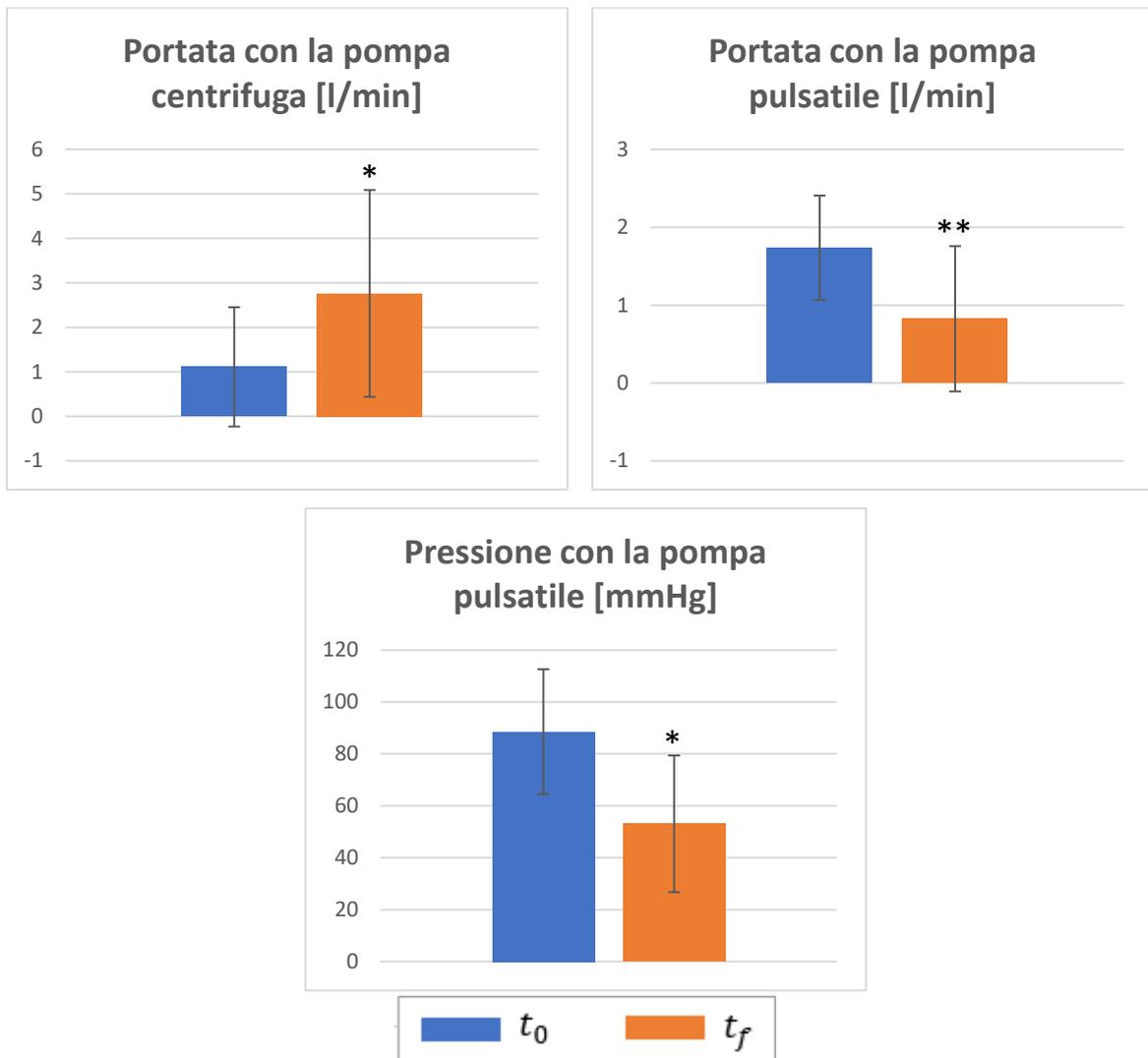


Figura 60. Istogrammi riferiti alla portata generata all'apice del ventricolo dalla pompa centrifuga (in alto a sinistra), alla portata a valle dell'aorta determinata dalla pompa pulsatile (in alto a destra) ed alla pressione generata dalla pompa pulsatile a livello dell'aorta (in basso). Gli asterischi indicano che esiste una differenza statisticamente significativa tra i valori all'inizio ed alla fine della prova sperimentale: un numero maggiore di asterischi corrisponde ad una differenza significativa più elevata.

Infine, gli istogrammi in figura 60 evidenziano un aumento statisticamente significativo della portata generata dalla pompa centrifuga a livello dell'apice ventricolare; una diminuzione statisticamente significativa sia della portata che della pressione misurate a valle della valvola aortica e determinate dalla pompa pulsatile.

Tutti questi risultati dimostrano che sia la valvola mitrale che la struttura cardiaca al termine della prova sperimentale risultano alterate rispetto alle condizioni di partenza e che, nella maggior parte dei casi, la coaptazione dei lembi valvolari è assente. Inoltre tutte le valvole analizzate alla fine del test (anche quelle che non mostrano evidente assenza di coaptazione) presentano le principali caratteristiche della condizione patologica: la dilatazione dell'annulus mitralico e della parete ventricolare. Si può quindi concludere che il modello animale proposto in questo lavoro di tesi è altamente ripetibile e può essere considerato efficace per riprodurre il rigurgito mitralico funzionale umano.

4.3. Confronto dei dati con diverse configurazioni della fascia

In questo paragrafo verranno riportate alcune immagini endoscopiche ed ecocardiografiche che mostrano la valvola mitrale dilatata e/o con rigurgito con l'applicazione della fascia contenitiva con diverse configurazioni. Successivamente, verranno effettuati dei confronti statistici tra le medie e le varianze dei dati sperimentali. Tutti i dati sono stati acquisiti durante il funzionamento della pompa pulsatile.

4.3.1. Imaging della valvola

Dalle immagini della valvola mitrale ottenute sia con il fibroscopio che con la sonda ecocardiografica è possibile osservare se esiste una differenza tra il comportamento della valvola senza fascia, con la fascia a livello dei muscoli papillari, con la fascia a livello dell'annulus e con la fascia sia sull'annulus che sui papillari. Ad esempio, in figura 61 sono presentate le immagini dei lembi mitralici (sopra) acquisite con il fibroscopio ed alcune viste bidimensionali della valvola (sotto) ricavate dalle immagini ecocardiografiche (considerando la vista nella direzione dell'asse della valvola su cui si trova il diametro A-P). Tutte le immagini sono riferite al cuore 3 al termine della prova sperimentale, in fase di picco sistolico e con diverse configurazioni della fascia contenitiva. Si osserva che esiste una differenza tra il livello di coaptazione dei lembi in funzione della configurazione della fascia utilizzata:

- nel caso della configurazione senza fascia è evidente l'assenza di coaptazione dei lembi;
- la fascia posizionata sui muscoli papillari riduce la distanza tra i lembi, ma si osservano comunque alcuni punti con coaptazione assente;
- le altre due configurazioni della fascia permettono di ripristinare la coaptazione valvolare, che è più accentuata quando la fascia viene applicata sia a livello dell'annulus che dei muscoli papillari.

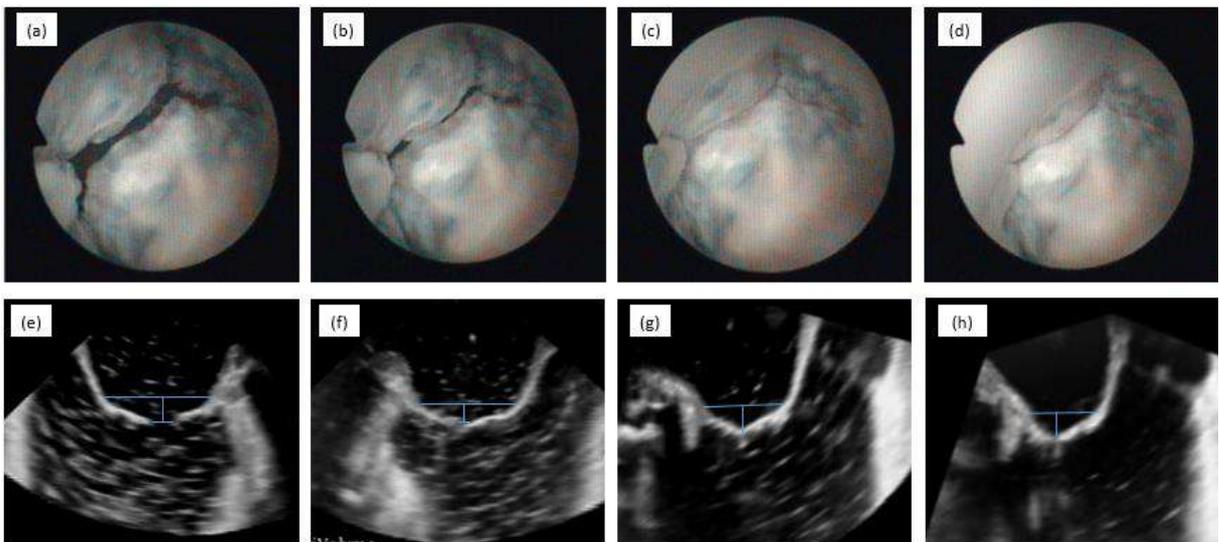


Figura 61. Comportamento del cuore 3 in fase di picco sistolico con diverse configurazioni della fascia contenitiva. Le immagini da (a) a (d) sono state acquisite con la sonda endoscopica e si riferiscono rispettivamente alle seguenti configurazioni: (a) senza fascia); (b) con la fascia sui papillari; (c) con la fascia sull'annulus; (d) con la fascia sia sull'annulus che sui papillari. Le immagini da (e) a (h) sono state acquisite con l'ecocardiogramma e rappresentano la vista in 2D del diametro A-P e dei lembi valvolari facendo riferimento rispettivamente alla stessa configurazione della fascia sovrastante.

In tutti gli altri campioni, analogamente al cuore 3, è stato osservato che la fascia sia a livello dell'annulus che dei muscoli papillari è quella che aumenta maggiormente il livello di coaptazione dei lembi, mentre la fascia sui muscoli papillari è quella che ne determina una variazione minore. La fascia sull'annulus, in termini di coaptazione dei lembi, porta a risultati simili a quelli ottenuti con fascia sia sull'annulus che sui papillari.

4.3.2. Analisi statistica

I dati raccolti sono stati analizzati statisticamente al fine di valutare se le differenze riscontrate tra le varie configurazioni della fascia e la situazione senza fascia possano essere considerate statisticamente significative.

Per prima cosa è stato applicato il test statistico di Kolmogorov-Smirnov per determinare se i dati seguissero una distribuzione normale (considerando un p-value < di 0,05 come livello di significatività). I risultati ottenuti hanno dimostrato che tutti i valori, ad eccezione della lunghezza di coaptazione, seguono una distribuzione normale. Sono quindi state calcolate le medie e le deviazioni standard delle grandezze distribuite normalmente (tabella 4), mentre per la lunghezza di coaptazione sono stati calcolati i valori mediani (tabella 5a).

Per valutare l'esistenza di differenze statisticamente significative tra le grandezze distribuite normalmente è stato utilizzato il test ANOVA parametrico per misure ripetute, mentre per valutare la lunghezza di coaptazione è stato applicato il test di Friedman, che rappresenta il corrispettivo non parametrico del test ANOVA per misure ripetute.

È stato poi applicato il test post-hoc di Dunnett (per i dati con distribuzione normale) ed il test post-hoc di Dunn (per i dati con distribuzione non normale) per determinare l'esistenza di differenze significative tra il cuore senza fascia e ciascuna delle configurazioni della fascia. Mentre il test post-hoc di Tukey (per i dati con distribuzione normale) ed il test post-hoc di Dunn (per i dati con distribuzione non normale) sono stati utilizzati per determinare l'esistenza di differenze significative tra le grandezze misurate con le varie configurazioni della fascia.

In tabella 4 sono riportati tutti i p-value ottenuti a seguito dell'applicazione dei test parametrici confrontando le seguenti configurazioni della fascia:

- cuore senza fascia e fascia solo a livello dei muscoli papillari (p-value 1);
- cuore senza fascia e fascia solo a livello dell'annulus (p-value 2);
- cuore senza fascia e fascia sia sui papillari che sull'annulus (p-value 3);
- fascia sui papillari e fascia sull'annulus (p-value 4);
- fascia sui papillari e fascia sia sui papillari che sull'annulus (p-value 5);
- fascia sull'annulus e fascia sia sull'annulus che sui papillari (p-value 6).

Anche nei test non parametrici sono state confrontate le medesime configurazioni della fascia; i p-value ottenuti sono riportati in tabella 5b.

In tutti i test un p-value < di 0,05 è stato assunto come statisticamente significativo.

	Senza fascia		Fascia papillari		Fascia annulus		Fascia annulus + papillari		p-value 1	p-value 2	p-value 3	p-value 4	p-value 5	p-value 6
	Media	Dev. St.	Media	Dev. St.	Media	Dev. St.	Media	Dev. St.						
Diametro A-P [mm]	35,60	± 4,08	34,41	± 3,50	26,21	± 3,10	25,37	± 2,73	0,5157	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,7237
Diametro M-L [mm]	53,80	± 5,60	52,64	± 5,88	49,37	± 6,22	48,99	± 6,52	0,264	<0,0001	<0,0001	0,0009	0,0003	0,8292
Altezza di tenting [mm]	7,01	± 0,78	5,76	± 1,15	7,74	± 1,38	6,94	± 0,99	0,0009	0,0334	0,8988	<0,0001	0,0032	0,0257
Area di tenting [mm²]	118,59	± 28,06	78,14	± 14,91	93,32	± 27,68	71,85	± 18,57	0,0002	0,0134	<0,0001	0,0878	0,6363	0,0172
Angolo alfa [°]	23,84	± 4,39	16,00	± 2,61	30,29	± 4,40	25,12	± 5,28	0,0015	0,0065	0,8167	<0,0001	0,001	0,0401
Angolo beta [°]	20,92	± 2,17	15,11	± 2,49	28,44	± 4,36	23,03	± 4,68	0,007	0,0005	0,4132	<0,0001	0,0009	0,0135
Portata [l/min]	0,79	± 0,96	0,94	± 1,00	1,39	± 0,88	1,69	± 0,81	0,4407	0,0003	<0,0001	0,0203	0,0005	0,1213
Pressione [l/min]	48,09	± 28,30	53,33	± 28,80	66,54	± 27,92	72,17	± 29,42	0,4122	0,0005	<0,0001	0,0194	0,0017	0,3898

Tabella 4. Medie e deviazioni standard dei dati relativi alle diverse configurazioni della fascia contenitiva applicata sui cuori con assenza di coaptazione della valvola

mitrale e/o con dilatazione della struttura valvolare. P-value ottenuti a seguito dell'applicazione del test ANOVA con post-hoc test di Dunnett; p-value 1 = senza fascia vs fascia sui papillari; p-value 2 = senza fascia vs fascia sull'annulus; p-value 3 = senza fascia vs fascia sia sull'annulus che sui papillari. P-value ottenuti a seguito dell'applicazione del test ANOVA con post-hoc test di Tukey; p-value 4 = fascia sui papillari vs fascia sull'annulus; p-value 5 = fascia sui papillari vs fascia sia sull'annulus che sui papillari; p-value 6 = fascia sull'annulus vs fascia sia sull'annulus che sui papillari.

(a)	C _{min} [mm]	C _{max} [mm]	Mediana [mm]
Senza fascia	0	4,8	0
Fascia papillari	0	5,5	0
Fascia annulus	5,1	9,8	6,8
Fascia annulus + papillari	5,2	10,2	7,9

(b)	p-value
p-value 1	0,315
p-value 2	0,0389
p-value 3	0,013
p-value 4	0,0475
p-value 5	0,0015
p-value 6	0,5443

Tabella 5. (a) Valori della lunghezza di coaptazione minima e massima riferiti alle diverse configurazioni della fascia, con le rispettive mediane. (b) P-value ottenuti a seguito dell'applicazione del test di Friedman con post-hoc test di Dunn: p-value 1 = senza fascia vs fascia sui papillari; p-value 2 = senza fascia vs fascia sull'annulus; p-value 3 = senza fascia vs fascia sia sull'annulus che sui papillari; p-value 4 = fascia sui papillari vs fascia sull'annulus; p-value 5 = fascia sui papillari vs fascia sia sull'annulus che sui papillari; p-value 6 = fascia sull'annulus vs fascia sia sull'annulus che sui papillari.

Quindi, tutte le configurazioni della fascia aumentano il livello di coaptazione della valvola, ma solamente la fascia a livello dell'annulus (p-value 2) e quella applicata sia sull'annulus che sui muscoli papillari (p-value 3) presentano delle differenze statisticamente significative rispetto alla configurazione senza fascia. È inoltre presente un aumento significativo della coaptazione quando la fascia è posizionata sull'annulus (p-value 4) e quando la fascia è sia sull'annulus che sui papillari (p-value 5) rispetto a quando la fascia è solo sui papillari.

Di seguito sono riportati gli istogrammi che consentono di visualizzare più chiaramente le differenze tra le medie e le deviazioni standard dei dati con distribuzione normale relativi alle differenti configurazioni della fascia contenitiva (figure da 62 a 69).

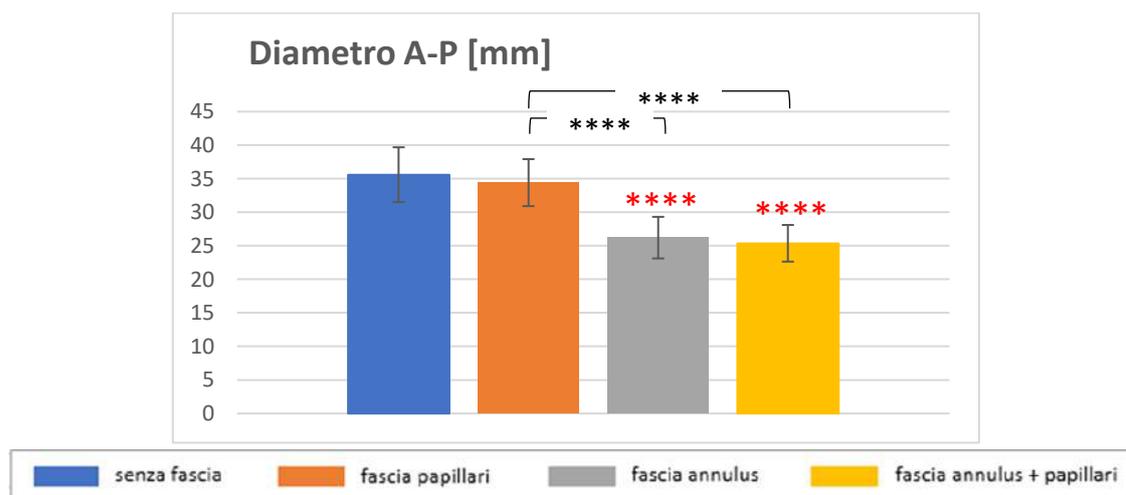


Figura 62. Istogrammi riferiti al diametro A-P con diverse configurazioni della fascia. Gli asterischi rossi indicano che esiste una differenza statisticamente significativa tra il diametro A-P senza fascia e con una determinata configurazione della fascia. Gli asterischi neri indicano che sussiste una differenza significativa tra due diverse configurazioni della fascia. Ad un numero maggiore di asterischi corrisponde una differenza significativa più alta.

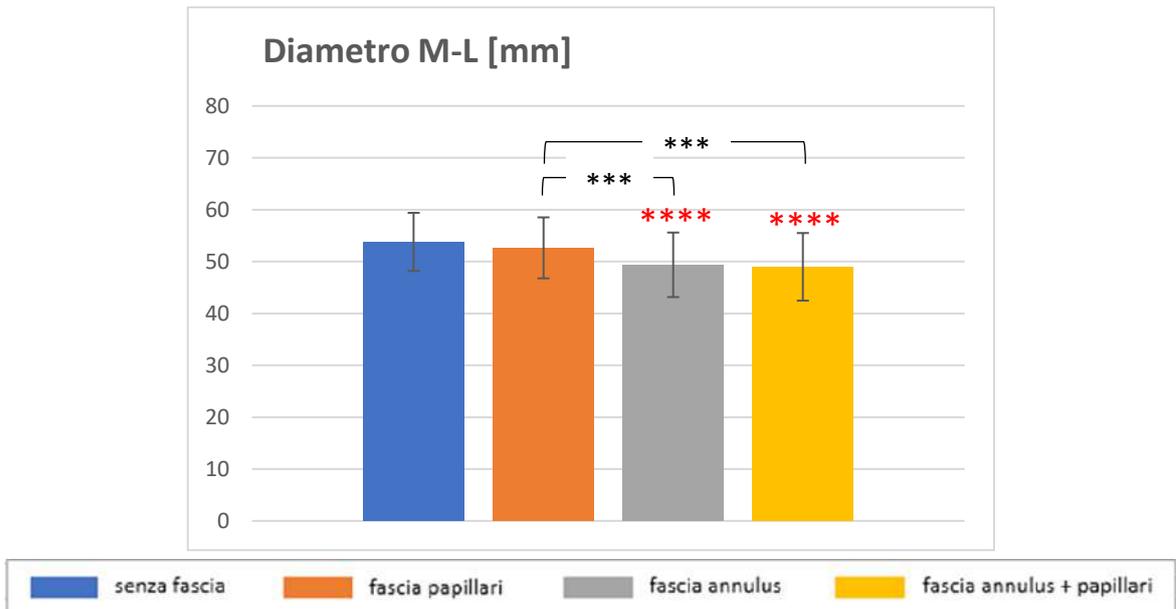


Figura 63. Istogrammi riferiti al diametro M-L con diverse configurazioni della fascia. Gli asterischi rossi indicano che esiste una differenza statisticamente significativa tra il diametro M-L senza fascia e con una determinata configurazione della fascia. Gli asterischi neri indicano che sussiste una differenza significativa tra due diverse configurazioni della fascia. Ad un numero maggiore di asterischi corrisponde una differenza significativa più alta.

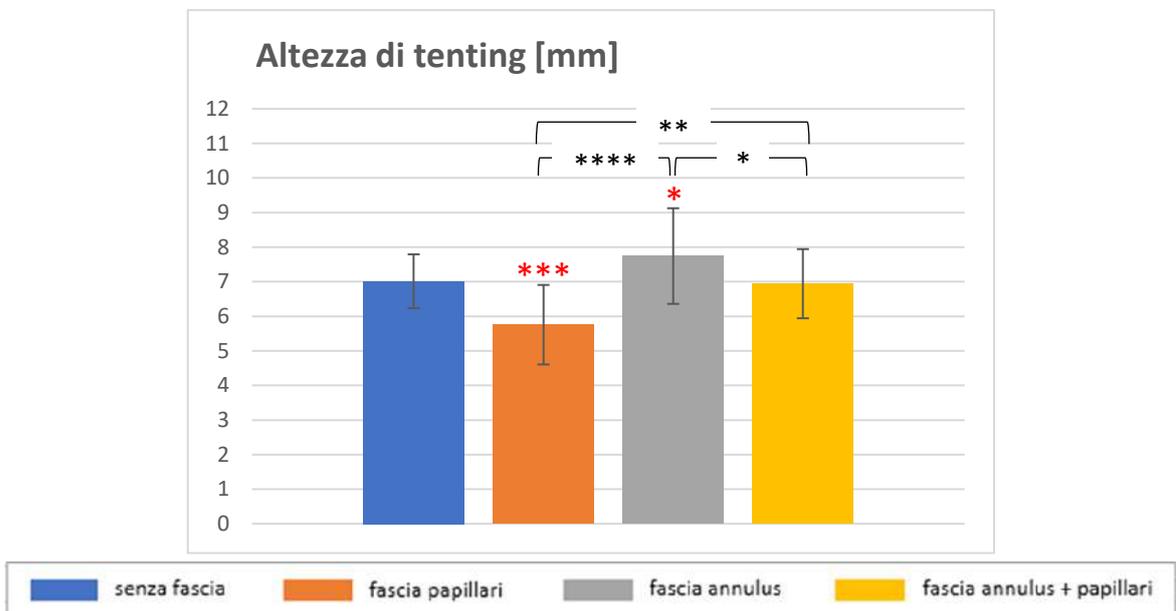


Figura 64. Istogrammi riferiti all'altezza di tenting con diverse configurazioni della fascia. Gli asterischi rossi indicano che esiste una differenza statisticamente significativa tra l'altezza di tenting senza fascia e con una determinata configurazione della fascia. Gli asterischi neri indicano che sussiste una differenza significativa tra due diverse configurazioni della fascia. Ad un numero maggiore di asterischi corrisponde una differenza significativa più alta.

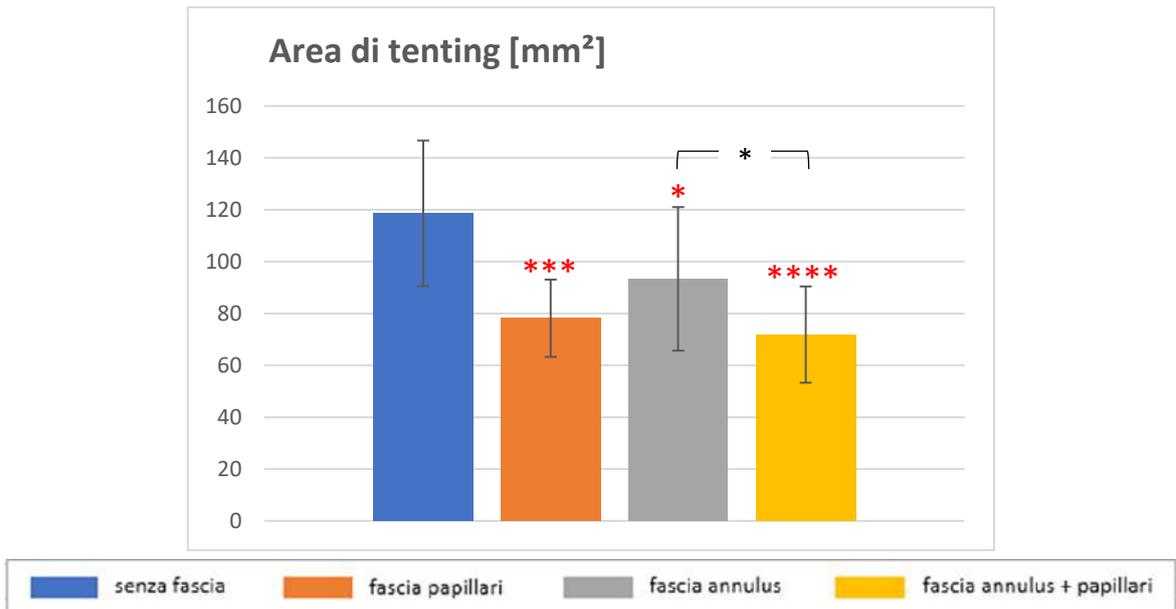


Figura 65. Istogrammi riferiti all'area di tenting con diverse configurazioni della fascia. Gli asterischi rossi indicano che esiste una differenza statisticamente significativa tra l'area di tenting senza fascia e con una determinata configurazione della fascia. Gli asterischi neri indicano che sussiste una differenza significativa tra due diverse configurazioni della fascia. Ad un numero maggiore di asterischi corrisponde una differenza significativa più alta.

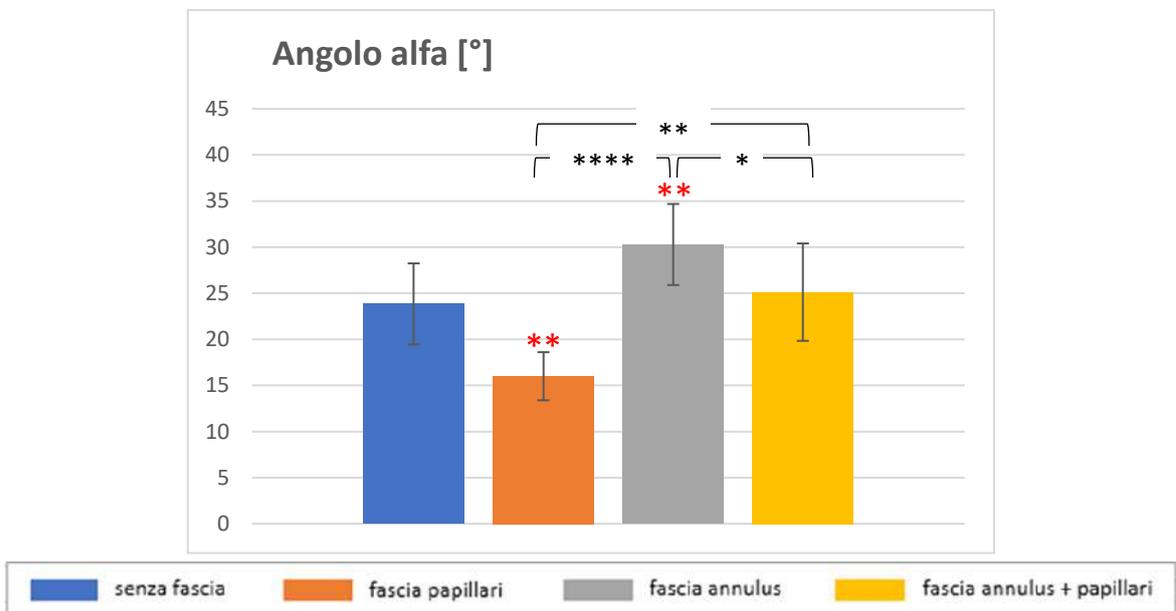


Figura 66. Istogrammi riferiti all'angolo alfa con diverse configurazioni della fascia. Gli asterischi rossi indicano che esiste una differenza statisticamente significativa tra l'angolo alfa senza fascia e con una determinata configurazione della fascia. Gli asterischi neri indicano che sussiste una differenza significativa tra due diverse configurazioni della fascia. Ad un numero maggiore di asterischi corrisponde una differenza significativa più alta.

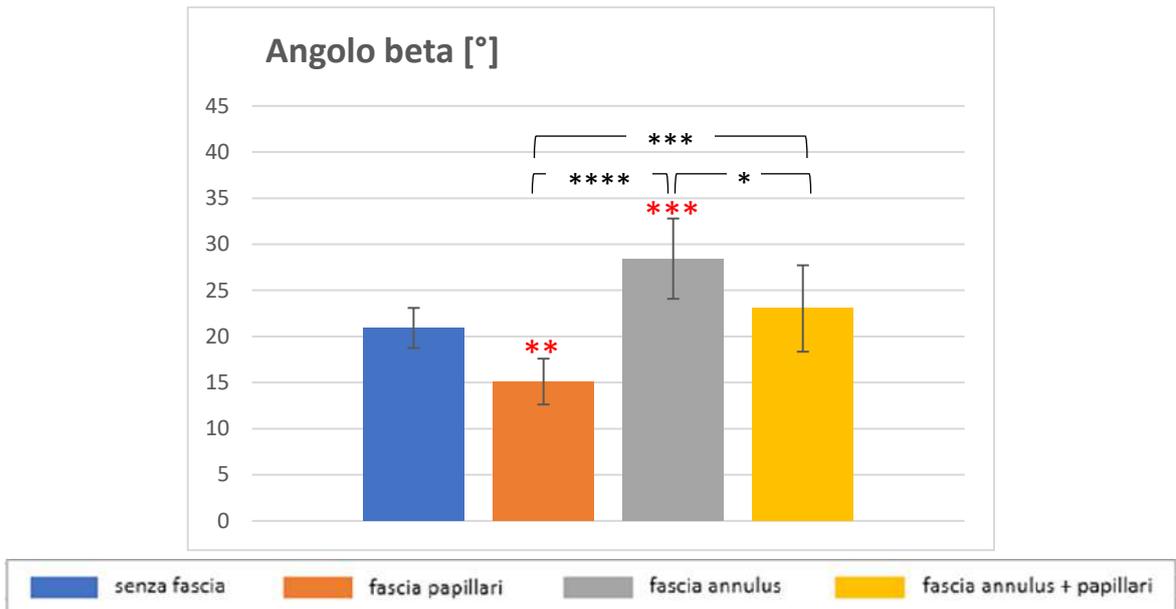


Figura 67. Istogrammi riferiti all'angolo beta con diverse configurazioni della fascia. Gli asterischi rossi indicano che esiste una differenza statisticamente significativa tra l'angolo beta senza fascia e con una determinata configurazione della fascia. Gli asterischi neri indicano che sussiste una differenza significativa tra due diverse configurazioni della fascia. Ad un numero maggiore di asterischi corrisponde una differenza significativa più alta.

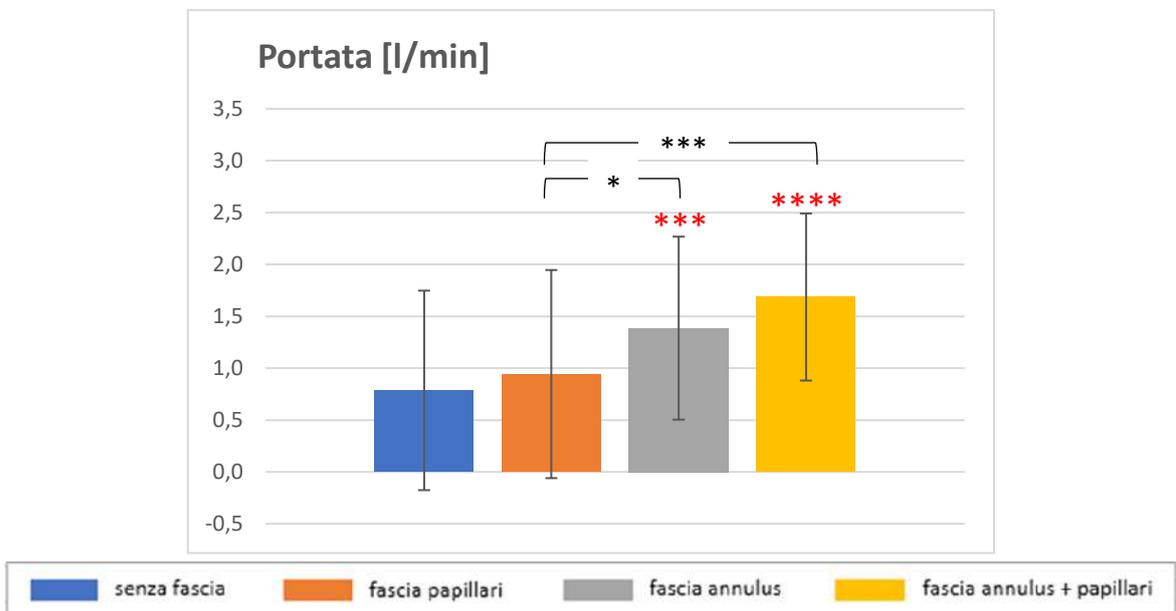


Figura 68. Istogrammi riferiti alla portata registrata a valle della valvola aortica con diverse configurazioni della fascia. Gli asterischi rossi indicano che esiste una differenza statisticamente significativa tra la portata senza fascia e con una determinata configurazione della fascia. Gli asterischi neri indicano che sussiste una differenza significativa tra due diverse configurazioni della fascia. Ad un numero maggiore di asterischi corrisponde una differenza significativa più alta.

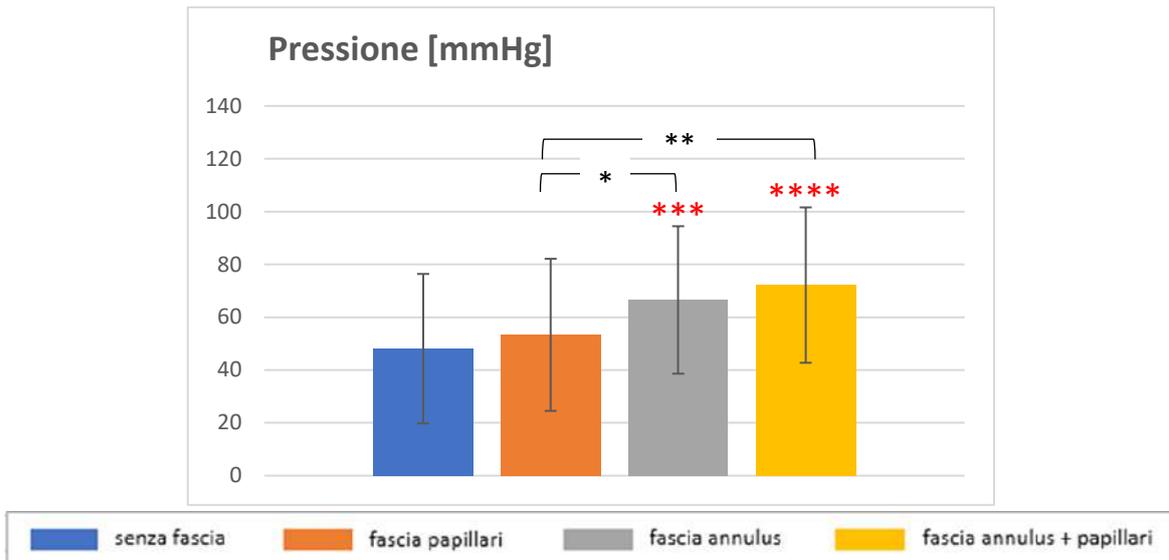


Figura 69. Istogrammi riferiti alla pressione registrata a valle della valvola aortica con diverse configurazioni della fascia. Gli asterischi rossi indicano che esiste una differenza statisticamente significativa tra la pressione senza fascia e con una determinata configurazione della fascia. Gli asterischi neri indicano che sussiste una differenza significativa tra due diverse configurazioni della fascia. Ad un numero maggiore di asterischi corrisponde una differenza significativa più alta.

Dagli istogrammi che fanno riferimento alla configurazione della fascia a livello dei muscoli papillari (in arancio) si osserva una diminuzione statisticamente significativa dell'altezza di tenting, degli angoli alfa e degli angoli beta rispetto agli istogrammi (in blu) relativi al cuore senza fascia. Confrontando ancora queste due classi, non si riscontrano differenze statisticamente significative tra i diametri A-P ed M-L. Si può concludere affermando che la fascia a livello dei muscoli papillari permette di controllare la dilatazione del ventricolo nel modello patologico.

Dalle barre che fanno riferimento alla configurazione della fascia a livello dell'annulus (in grigio) si osserva un aumento statisticamente significativo dell'altezza di tenting, degli angoli alfa e degli angoli beta rispetto agli istogrammi (in blu) relativi al cuore senza fascia. Comparando ancora i medesimi rettangoli, si riscontra una diminuzione statisticamente significativa dei diametri A-P ed M-L quando la fascia viene applicata a livello dell'annulus. È quindi possibile affermare che la fascia sull'annulus permette di controllare la dilatazione dell'anello valvolare nel modello patologico.

I risultati ottenuti posizionando la fascia sia a livello dell'annulus che dei muscoli papillari (in giallo) sono il risultato dell'effetto combinato delle altre due configurazioni della fascia. Si osserva infatti che l'altezza di tenting, l'angolo alfa e l'angolo beta non presentano

differenze statisticamente significative rispetto alla situazione senza fasce, mentre i diametri A-P ed M-L subiscono una diminuzione statisticamente significativa.

Tutte le configurazioni della fascia aumentano la pressione e la portata, ma solamente la fascia a livello dell'annulus e quella applicata sia sull'annulus che sui muscoli papillari presentano delle differenze statisticamente significative rispetto alla configurazione senza fascia. Si osserva inoltre che la fascia posizionata in entrambe le zone della parete cardiaca causa degli incrementi maggiori di questi valori rispetto alla fascia solo sull'annulus.

Si ritiene dunque che le varie configurazioni delle fasce permettono di ottenere un modello patologico altamente controllabile.

5. Conclusioni e sviluppi futuri

In questo lavoro è stato utilizzato per la prima volta in modo sistematico il cuore di cervo come modello sperimentale *ex vivo*: un confronto tra le caratteristiche anatomiche della valvola mitrale del cervo e quelle del cuore umano e porcino (che è il modello patologico maggiormente utilizzato in letteratura) è stato utile per determinare analogie e differenze tra i tre modelli.

Dopo aver accertato che il cervo può essere considerato un buon modello sperimentale, è stato sviluppato un metodo per riprodurre il rigurgito mitralico funzionale *ex vivo*. Lo svolgimento di una serie di test preliminari è stato necessario per elaborare un protocollo per indurre sul cuore, in modo sufficientemente ripetibile e controllabile, i principali cambiamenti biomeccanici che si verificano nella patologia umana [11,12,15]. I risultati ottenuti hanno evidenziato una dilatazione sia della parete ventricolare che dell'annulus mitralico; dal momento che tali lesioni caratterizzano maggiormente il rigurgito funzionale, il protocollo sperimentale utilizzato in questa tesi può essere considerato efficace per indurre la patologia valvolare.

È stato inoltre dimostrato che il modello è altamente controllabile poiché, posizionando attorno al cuore una fascia in polipropilene appositamente sviluppata, è possibile regolare selettivamente il livello delle due lesioni. Stringendo la fascia a livello dei muscoli papillari è possibile controllare il grado di dilatazione del ventricolo, mentre stringendo la fascia a livello dell'annulus si regola la dilatazione dell'anello valvolare.

Nonostante i risultati della ricerca siano soddisfacenti per le motivazioni sopra riportate, sono presenti alcuni limiti.

In alcuni casi non è stata ottenuta la non coaptazione dei lembi valvolari entro un'ora dall'inizio della prova sperimentale. Tuttavia, anche tali campioni possono essere considerati rappresentativi di una fase iniziale della patologia, perché le loro immagini ecocardiografiche confermano la presenza della dilatazione dell'annulus e della parete ventricolare.

Inoltre, esiste un'ulteriore limitazione legata alla piattaforma sperimentale utilizzata in laboratorio: la pompa pulsatile connessa all'apice del cuore non permette di riprodurre la contrazione naturale del ventricolo e induce un flusso intraventricolare non fisiologico. In generale, a differenza di quanto accade in vivo, sul banco prova il ventricolo in sistole si dilata ed i muscoli papillari si allontanano dal piano valvolare senza contrarsi, tuttavia il risultato è che anche nei cuori ex vivo si verifica una coaptazione dei lembi analoga a quella presente in vivo [45]. Quindi il banco prova può essere considerato idoneo per riprodurre il comportamento fisiologico della valvola mitrale umana. A seguito dell'applicazione del protocollo sviluppato in questo lavoro, nella maggior parte delle valvole analizzate con tale piattaforma sperimentale non è stata riscontrata una coaptazione dei lembi valvolari in fase sistolica. Questo è dovuto all'azione della pompa centrifuga che induce una dilatazione ulteriore a livello dell'annulus e del ventricolo e, di conseguenza, il comportamento valvolare sul banco prova pulsatile in fase sistolica risulta analogo a quello della valvola mitrale patologica in vivo. In conclusione, la piattaforma presenta dei limiti nella valutazione delle portate intracardiache, ma può essere considerata affidabile per simulare il rigurgito mitralico funzionale.

Un'ulteriore problematica è la difficoltà nel reperire i cuori di cervo rispetto ai cuori di maiale, dato che in Italia i cervi vengono abbattuti solamente in alcuni periodi dell'anno, generalmente nei mesi tra novembre e febbraio. Esistono inoltre dei piani di abbattimento regionale che limitano il numero dei capi che possono essere prelevati dal singolo territorio. L'utilizzo di cuori porcini risolverebbe tale problema, ma la tecnica proposta in questo lavoro non è efficace per indurre la patologia del rigurgito mitralico funzionale sul cuore di maiale, perché esso presenta una parete cardiaca ipertrofica rispetto a quella del cervo. In letteratura però esistono alcuni studi che hanno dimostrato che è possibile rimodellare il tessuto cardiaco utilizzando il collagenase, un enzima in grado di degradare il collagene presente all'interno del tessuto muscolare. La maggior parte di queste tecniche sono state applicate in vivo [46, 47, 48] oppure su piccoli campioni di lembi valvolari o di miocardio ex vivo [49, 50, 51]. È stato anche dimostrato che l'applicazione di una tensione sui campioni biologici aumenta l'efficacia dell'enzima [49, 50, 51]. Tutte queste tecniche suggeriscono che l'iniezione del collagenase all'interno della parete cardiaca e della struttura valvolare del cuore del maiale ex vivo potrebbe modificarne le caratteristiche meccaniche e renderlo più adatto per simulare il rigurgito mitralico funzionale. Pertanto uno sviluppo futuro per questa

tesi potrebbe essere l'utilizzo di un protocollo analogo a quello proposto, ma applicato su cuori di maiale modificati con il collagenase prima di essere posizionati sul banco prova.

Il modello sperimentale proposto in questa tesi potrebbe essere utilizzato per valutare il funzionamento di nuove tecniche riparative o sostitutive della valvola mitrale e per migliorare quelle già esistenti. La possibilità di simulare in modo realistico il rigurgito mitralico funzionale su banco prova fornisce a chirurghi e cardiologi interventistici un prezioso strumento sia per effettuare training in procedure spesso complesse e ad alto rischio per il paziente, che per valutare nel dettaglio i meccanismi della patologia e gli effetti delle correzioni applicate.

Bibliografia

1. **Sten Lyager Nielsen, Hans Nygaard, Lars Mandrup, Arnold Anthony Fontaine, J. Michael Hasenkam, Shengqui He, Ajit P. Yoganathan** “*Mechanism of incomplete mitral leaflet coaptation - Interaction of chordal restraint and changes in mitral leaflet coaptation geometry: Insight from in vitro validation of the premise of force equilibrium*” *Journal of biomechanical engineering*, Vol. 124, No. 5, 596:608 (2002).
2. **Neelakantan Saikrishnan** “*Mechanics of Healthy and Functionally Diseased Mitral Valves: A Critical Review*” *Journal of Biomechanical Engineering* (2013).
3. **Horia Muresian** “*The Clinical Anatomy of the Mitral Valve*” Wiley InterScience (2008).
4. **Manuel K. Rausch, Nele Famaey, Tyler O’Brien Shultz, Wolfgang Bothe, D. Craig Miller, and Ellen Kuhl** “*Mechanics of the mitral valve: A critical review, an in vivo parameter identification, and the effect of prestrain*” *Biomech Model Mechanobiol* (2013).
5. **Robert A. Levine, Albert A. Hagège, Daniel P. Judge, Muralidhar Padala, Jacob P. Dal-Bianco et al.** “*Mitral valve disease: morphology and mechanisms*” *Nat Rev Cardiol* (2015).
6. **S. A. Gunnal, R. N. Wabale, M. S. Farooqui** “*Morphological Study of Chordae Tendinae in Human Cadaveric Hearts*” *Heart Views*, Jan-Mar 15 Issue 1 / Vol 16 (2015).
7. **M. Marzilli, et al.** “*Assessment of papillary muscle function in the intact heart*” *Circulation*, Vol. 71, No. 5, 1017:1022 (1985).
8. **Helmut Baumgartner, Volkmar Falk, Jeroen J. Bax, Michele De Bonis, Christian Hamm et al.** “*2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease*” *European Heart Journal* (2017).
9. **Dariush Mozaffarian, Emelia J. Benjamin, Alan S. Go, Donna K. Arnett, Michael J. Blaha et al.** “*Heart Disease and Stroke Statistics*” *Circulation* (2017).
10. **Lancellotti P, Tribouilloy C, Hagendorff A, Popescu BA, Edvardsen T, Pierard LA, Badano L, Zamorano JL** “*Recommendations for the echocardiographic assessment of native valvular regurgitation: an executive summary from the European Association of Cardiovascular Imaging*” *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* (2013).

11. **Rashid M. Ahmad, A. Marc Gillinov, Patrick M. McCarthy, Eugene H. Blackstone Carolyn Apperson-Hansen, Jian Xin Qin, Deborah Agler, Takahiro Shiota, and Delos M. Cosgrove** “*Annular Geometry and Motion in Human Ischemic Mitral Regurgitation: Novel Assessment with Three-Dimensional Echocardiography and Computer Reconstruction*” *The Annals of Thoracic Surgery*, Elsevier (2004).
12. **Dal-Bianco, J. P., J. Beaudoin, M. D. Handschumacher, R. A. Levine** “*Basic mechanisms of mitral regurgitation*” *Can. J. Cardiol.* 30:971–981 (2014).
13. **Jun Kwan, Takahiro Shiota, Deborah A. Agler, Zoran B. Popovic’, Jian Xin Qin, Marc A. Gillinov, William J. Stewart, Delos M. Cosgrove, Patrick M. McCarthy, James D. Thomas** “*Geometric Differences of the Mitral Apparatus Between Ischemic and Dilated Cardiomyopathy with Significant Mitral Regurgitation*” *Circulation*, American Heart Association (2003).
14. **Sten Lyager Nielsen, Søren B. Hansen, Katrine O. Nielsen, Hans Nygaard, Peter K. Paulsen, J. Michael Hasenkam** “*Imbalanced chordal force distribution causes acute ischemic mitral regurgitation: Mechanistic insights from chordae tendineae force measurements in pigs*” *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, Volume 129, Number 3 (2005).
15. **Michele Di Mauro a, Sabina Gallina a, Maria Angela D'Amico b, Pascal Izzicupo b, Paola Lanuti b, Adriana Bascelli b, Alessia Di Fonso b, Giovanni Bartoloni c, Antonio Maria Calafiore d, Angela Di Baldassarre** “*Functional mitral regurgitation: From normal to pathological anatomy of mitral valve*” *International Journal of Cardiology*, Elsevier (2013).
16. **Ganesh Athappan, Paul Sorajja, Mario Gossel** “*Percutaneous Treatment of Mitral Regurgitation: Present and Future*” *Journal of the Minneapolis Heart Institute Foundation*, Volume 1 (2017).
17. **Ted Feldman, Amelia Young** “*Percutaneous Approaches to Valve Repair for Mitral Regurgitation*” *Journal of the American College of Cardiology*, Elsevier (2014).
18. **Simon J. Crick, Mary N. Sheppard, Siew Yen Ho, Lior Gebstein, Robert H. Anderson** “*Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure*” *Journal of Anatomy* (1998).
19. **Karyn Kunzelman, Robert C Eberhart, Edward D Verrier** “*Anatomic basis for mitral valve modelling*” *The Journal of heart valve disease* (1994).

20. **Andrés Caballero, Wenbin Mao, Raymond McKay, Charles Primiano, Sabet Hashim, Wei Sun** “*New insights into mitral heart valve prolapse after chordae rupture through fluid–structure interaction computational modelling*” *Scientific Reports* (2018).
21. **Thuy Pham, Fanwei Kong, Caitlin Martin, Qian Wang, Charles Primiano, Raymond McKay, John Elefteradies, Wei Sun** “*Finite Element Analysis of Patient-Specific Mitral Valve with Mitral Regurgitation*” *Cardiovasc Eng Technol* (2017).
22. **Yoo Seok Kim, Ana R. Yuniarti, Kwang-Soup Song, Natalia A. Trayanova, Eun Bo Shim, Ki Moo Lim** “*Computational analysis of the effect of mitral and aortic regurgitation on the function of ventricular assist devices using 3D cardiac electromechanical model*” *Med Biol Eng Comput* (2018).
23. **Marco Stevanella, Francesco Maffessanti, Carlo A. Conti, Emiliano Votta, Alice Arnoldi, Massimo Lombardi, Oberdan Parodi, Enrico G. Caiani, Alberto Redaelli** “*Mitral Valve Patient-Specific Finite Element Modeling from Cardiac MRI: Application to an Annuloplasty Procedure*” *Cardiovascular Engineering and Technology* (2011).
24. **Andrea Avanzini** “*A Computational Procedure for Prediction of Structural Effects of Edge-to-Edge Repair on Mitral Valve*” *Journal of Biomechanical Engineering* (2008).
25. **Andrew William Siefert, Jean-Pierre Michel Rabbah, Neelakantan Saikrishnan, Karyn Susanne Kunzelman, Ajit Prithivaraj Yoganathan** “*Isolated Effect of Geometry on Mitral Valve Function for In-Silico Model Development*” *Comput Methods Biomech Biomed Engin* (2015).
26. **Bo Li, Yongchun Cui, Dong Zhang, Xiaokang Luo, Fuliang Luo, Bin Li1, Yue Tang** “*The characteristics of a porcine mitral regurgitation model*” *Japanese Association for Laboratory Animal Science* (2018).
27. **Eric L Sarin, Weiwei Shi, Rajnish Duara, Todd A Melone, Kanika Kalra, Ashley Strong, Apoorva Girish, Bryant V McIver, Vinod H Thourani, Robert A Guyton, Muralidhar Padala** “*Swine (*Sus scrofa*) as a Model of Postinfarction Mitral Regurgitation and Techniques to Accommodate Its Effects during Surgical Repair*” *Comparative Medicine* (2016).
28. **Alicja Sielicka, Eric L. Sarin, Weiwei Shi, Fatiesa Sulejmani, Daniella Corporan, Kanika Kalra, Vinod H. Thourani, Wei Sun, Robert A. Guyton, Muralidhar Padala** “*Pathological Remodeling of Mitral Valve Leaflets from Unphysiologic Leaflet*

- Mechanics after Undersized Mitral Annuloplasty to Repair Ischemic Mitral Regurgitation*” Journal of the American Heart Association (2018).
29. **Yong-Chun Cui, Kai Li., Yi Tian, Wei-Min Yuan, Peng Peng, Jian-Zhong Yang, Bao-Jie Zhang, Hui-Dong Zhang, Ai-Li Wu, Yue Tang** “*A Pig Model of Ischemic Mitral Regurgitation Induced by Mitral Chordae Tendinae Rupture and Implantation of an Ameroid Constrictor*” Plos One (2014).
 30. **Haruo Yamauchi, Eric N. Feins, Nikolay V. Vasilyev, Shogo Shimada, David Zurakowski, Pedro J. del Nido** “*Creation of Nonischemic Functional Mitral Regurgitation by Annular Dilatation and Nonplanar Modification in a Chronic In Vivo Swine Model*” Circulation (2012).
 31. **Riccardo Vismara, Andrea Pavesi, Emiliano Votta, Maurizio Taramasso, Francesco Maisano, Gianfranco B. Fiore** “*A pulsatile simulator for the in vitro analysis of the mitral valve with tri-axial papillary muscle displacement*” The International Journal of Artificial Organs (2011).
 32. **Patrick S. Connell, Anam F. Azimuddin, Seulgi E. Kim, Fernando Ramirez, Matthew S. Jackson, Stephen H. Little, K. Jane Grande-Allen** “*Regurgitation hemodynamics alone cause mitral valve remodeling characteristic of clinical disease states in vitro*” Annals of Biomedical Engineering (2016).
 33. **Andrew L. Richards, Richard C. Cook, Gil Bolotin, Gregory D. Buckner** “*A Dynamic Heart System to Facilitate the Development of Mitral Valve Repair Techniques*” Annals of Biomedical Engineering (2009).
 34. **Shamik Bhattacharya, Thuy Pham, Zhaoming, Wei Sun** “*Tension to passively cinch the mitral annulus through coronary sinus access: an ex vivo study in ovine model*” J Biomech (2014).
 35. **Michal Jaworek, Federico Lucherini, Claudia Romagnoni, Guido Gelpi, Monica Contino, Paolo Romitelli, Carlo Antona, Gianfranco B. Fiore, Riccardo Vismara** “*Modelling of Lesions Associated with Functional Mitral Regurgitation in an Ex Vivo Platform*” Annals of Biomedical Engineering (2017).
 36. **Michal Jaworek, Marco Piola, Federico Lucherini, Guido Gelpi, Marco Castagna, Giuliana Lentini, Carlo Antona, Gianfranco B. Fiore, Riccardo Vismara** “*Functional Tricuspid Regurgitation Model in a Beating Heart Platform*” ASAIO Journal (2017).

37. **Riccardo Vismara, Guido Gelpi, Santosh Prabhu, Paolo Romitelli, Lauren G. Troxler, Andrea Mangini, Claudia Romagnoni, Monica Contino, Dylan T. Van Hoven, Federico Lucherini, Michal Jaworek, Alberto Redaelli, Gianfranco B. Fiore, Carlo Antona** “*Transcatheter Edge-to-Edge Treatment of Functional Tricuspid Regurgitation in an Ex Vivo Pulsatile Heart Model*” *Journal of the American College of Cardiology* (2016).
38. **Yang Wang, Ting Liu, Liang-Song Song, Zhi-Xin Zhang, You-Qiong Li, Lai-Jin Lu** “*Anatomical Characteristics of Deer and Sheep Lumbar Spines: Comparison to the Human Lumbar Spine*” *International Journal of Morphology* (2015).
39. **Jack J Jiang** “*Comparison of the Phonation-Related Structures among Pig, Dog, White-Tailed Deer, and Human Larynges*” *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* (2002).
40. **Nicole L. Zaino, Mark J. Hedgeland, Mario J. Ciani, Alexander Martin Clark, Laurel Kuxhaus, Arthur J. Michalek** “*White-Tailed Deer as an Ex Vivo Knee Model: Joint Morphometry and ACL Rupture Strength*” *Annals of Biomedical Engineering* (2016).
41. **David C. Kieser, Sumedh Kanade, Neil J. Waddell, Jules A. Kieser, Jean-Claude Theis, Mike V. Swain** “*The deer femur – A morphological and biomechanical animal model of the human femur*” *Bio-Medical Materials and Engineering* (2014).
42. **A. M. Leopaldi, R. Vismara, S. van Tuijl, A. Redaelli, F. N. van de Vosse, G. B. Fiore, M. C. M. Rutten** “*A novel passive left heart platform for device testing and research*” *Medical Engineering and Physics, Elsevier* (2015).
43. **N. Ranganathan, J. H. C. Lam, E. D. Wigle, M. D. Silver** “*Morphology of the Human Mitral Valve*” *Circulation, Volume XLI* (1990).
44. **Alex Pui-Wai Lee, Ming C. Hsiung, Ivan S. Salgo, Fang Fang, Jun-Min Xie, Yan-Chao Zhang, Qing-Shan Lin, Jen-Li Looi et al.** “*Quantitative Analysis of Mitral Valve Morphology in Mitral Valve Prolapse with Real-Time 3-Dimensional Echocardiography*” *Circulation, 112.118083* (2012).
45. **Vismara, R., A. M. Leopaldi, M. Piola, C. Asselta, M. Lemma, C. Antona, A. Redaelli, F. van de Vosse, M. Rutten, and G. B. Fiore** “*In vitro assessment of mitral valve function in cyclically pressurized porcine hearts*” *Med. Eng. Phys. 38:346–353* (2016).

46. **Daigo Yagishita, Olujimi A. Ajijola, Marmar Vaseghi, Ali Nsair, Wei Zhou, Kentaro Yamakawa, Roderick Tung, Aman Mahajan, Kalyanam Shivkumar** “*Electrical Homogenization of Ventricular Scar by Application of Collagenase*” *Circ Arrhythm Electrophysiol* (2013).
47. **Shaina R. Eckhouse, Christina B. Logdon, J. Marshall Oelsen, Risha K. Patel, Allison D. Rice, Robert E. Stroud, W. Benjamin Wince, Rupak Mukherjee, Francis G. Spinale, John S. Ikonmidis, Jeffrey A. Jones** “*Reproducible Porcine Model of Thoracic Aortic Aneurysm*” *Circulation*.112.000363 (2015).
48. **Makoto Fujiki, Kazuhiro Misumi, Hiroshi Sakamoto** “*Evaluation of collagenase-induced mitral valve regurgitation in dogs*” *AJVR*, Vol 61, No. 12 (2000).
49. **Kaitlyn Barbour, Hsiao-Ying, Shadow Huang** “*Strain effects on collagen proteolysis in heart valve tissues*” Springer Nature B.V. (2019).
50. **S. Ghazanfari, A. Driessen, C.V.C. Bouten, F.P.T. Baaijens** “*Modulation of collagen fiber orientation by strain-controlled enzymatic degradation*” *ACTBIO* 4129 (2016).
51. **Siyao Huang, Hsiao-Ying, Shadow Huang** “*Biaxial stress relaxation of semilunar heart valve leaflets during simulated collagen catabolism: Effects of collagenase concentration and equibiaxial strain state*” *Engineering in Medicine*, Vol. 229(10) 721–731 (2015).