

POLITECNICO DI MILANO
Facoltà di Ingegneria dei Sistemi
Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



**Analisi morfometrica comparativa della valvola mitrale
in due banchi prova per cuori battenti passivi**

Relatori: **Ing. Riccardo Vismara**
Prof. Ing. Marcel Rutten

Correlatori: **Ing. Marco Piola**
Ing. Alberto M. Leopaldi

Tesi di Laurea di:
Chiara Asselta 782536

Anno Accademico 2014-2015

INDICE

SOMMARIO	p.IX
ABSTRACT	p.XXI
1. INTRODUZIONE	p.1
1.1 Anatomia della valvola mitrale	p.1
1.1.1 I foglietti valvolari e le commissure.....	p.2
1.1.2 L'annulus.....	p.4
1.1.3 I muscoli papillari.....	p.6
1.1.4 Le corde tendinee.....	p.7
1.2 Fluidodinamica della valvola mitrale	p.8
1.3 Meccanica della valvola mitrale	p.9
1.3.1 I foglietti valvolari.....	p.10
1.3.2 L'annulus.....	p.13
1.3.3 I muscoli papillari.....	p.14
1.3.4 Le corde tendinee.....	p.14
1.4 Patologie della valvola mitrale	p.15
1.4.1 L'insufficienza valvolare mitralica.....	p.15
1.4.1.1 L'insufficienza mitralica degenerativa.....	p.18
1.4.1.2 L'insufficienza mitralica reumatica.....	p.19
1.4.1.3 L'insufficienza mitralica funzionale.....	p.19
1.5 Tecniche di riparazione della valvola mitrale	p.22
1.5.1 Tecniche di riparazione mitralica transcateretere.....	p.23
1.5.1.1 Annuloplastica indiretta o sinoplastica.....	p.24
1.5.1.2 Annuloplastica diretta.....	p.25

1.5.1.3 Rimodellamento ventricolare.....	p.26
1.5.1.4 Riparazione dei foglietti.....	p.27
1.6 Valutazione della coaptazione dei foglietti valvolari mitralici.....	p.28
2. STATO DELL'ARTE.....	p.32
2.1 Banchi prova per l'analisi fluidodinamica di protesi valvolari cardiache meccaniche.....	p.33
2.2 Banchi prova per il test di complessi valvolari espantati.....	p.36
2.2.1 Banchi prova per il test di complessi valvolari mitralici.....	p.36
2.3 Banchi prova per intere strutture cardiache.....	p.43
2.3.1 Banchi prova per cuori attivi.....	p.44
2.3.2 Banchi prova per cuori azionati passivamente.....	p.48
2.4 Il lavoro di Spinner.....	p.50
2.4.1 Valutazione degli effetti: Available Coaptation Area (ACA) e Residual Leaflet Length (RLL)	p.51
2.5 Banchi prova utilizzati nel presente lavoro.....	p.53
2.5.1 Il banco prova ForCardioLab.....	p.54
2.5.1.1 Descrizione dei componenti.....	p.55
2.5.1.2 Strumentazione del <i>setup</i> e tecniche di imaging eseguibili.....	p.58
2.5.2 Il banco prova TU/e.....	p.59
2.5.2.1 Descrizione dei componenti.....	p.60
2.5.2.2 Strumentazione del <i>setup</i> e tecniche di imaging eseguibili.....	p.62
2.5.3 Confronto tra i due banchi prova e obiettivi del lavoro.....	p.63

3. MATERIALI E METODI	p.67
3.1 Selezione dei campioni biologici.....	p.68
3.2 Proiezioni ecografiche per la visualizzazione del complesso valvolare mitralico.....	p.68
3.3 Proiezioni ecografiche rilevate.....	p.71
3.4 Prove statiche presso il ForCardioLab.....	p.71
3.4.1 <i>Setup</i> sperimentale per le prove statiche presso il ForCardioLab.....	p.72
3.4.1.1 Componenti utilizzati e layout del <i>setup</i>	p.72
3.4.2 Protocollo sperimentale per le prove statiche presso il ForCardioLab.....	p.74
3.4.2.1 Preparazione del campione biologico.....	p.74
3.4.2.2 Componenti utilizzati e layout del <i>setup</i>	p.75
3.5 Prove dinamiche.....	p.76
3.5.1 <i>Setup</i> sperimentale per le prove dinamiche presso la TU/e.....	p.77
3.5.1.1 Modifiche del <i>setup</i>	p.77
3.5.1.2 Strumentazione del <i>setup</i> e tecniche di imaging eseguibili.....	p.79
3.5.2 <i>Setup</i> sperimentale per le prove dinamiche presso il ForCardioLab.....	p.80
3.5.2.1 Componenti utilizzati e layout del <i>setup</i>	p.80
3.5.3 Protocollo sperimentale.....	p.81
3.5.3.1 Strumentazione per la realizzazione del pattern mitralico.....	p.81
3.5.3.2 Preparazione del campione biologico.....	p.83
3.5.3.3 Esecuzione delle analisi.....	p.84
3.6 Procedure di elaborazione dei dati sperimentali.....	p.86
3.6.1 Calcolo dell'area disponibile per la coaptazione.....	p.86
3.6.1.1 Prove statiche.....	p.86
3.6.1.2 Prove dinamiche.....	p.87
3.6.2 Misura delle distanze tra muscoli papillari e piano valvolare.....	p.92
3.6.2.1 Prove statiche e dinamiche.....	p.92
3.7 Analisi Statistica dei dati.....	p.94

4. RISULTATI	p.96
4.1 Prove statiche.....	p.97
4.1.1 Area disponibile per la coaptazione.....	p.97
4.1.2 Distanze tra muscoli papillari e piano valvolare.....	p.98
4.2 Prove dinamiche.....	p.100
4.2.1 Area disponibile per la coaptazione.....	p.100
4.2.2 Distanze tra muscoli papillari e piano valvolare.....	p.104
5. CONCLUSIONI, LIMITI E SVILUPPI FUTURI	p.109
5.1 Conclusioni.....	p.109
5.2 Criticità e limiti.....	p.113
5.3 Sviluppi futuri.....	p.114
BIBLIOGRAFIA	p. 115

SOMMARIO

INTRODUZIONE

L'introduzione di nuove tecniche cardiocirurgiche riparative e mini-invasive ha permesso lo sviluppo di simulatori *in vitro* per l'addestramento chirurgico e per indagini biomeccaniche, cinematiche e dinamiche delle strutture anatomiche di interesse quali ad esempio la valvola mitrale e aortica. La possibilità di alloggiare cuori interi espianati consente di fornire un ambiente simile a quello clinico, in cui valutare l'efficacia *in vitro* delle procedure chirurgiche simulate.

In questo contesto, il presente lavoro di tesi si pone l'obiettivo di effettuare un'analisi morfometrica comparativa della valvola mitrale in due *setup* per cuori porcini con azionamenti passivi complementari.

Il primo banco prova sviluppato da Leopaldi et al. [1] [Fig. 1] presso il ForCardioLab dell'Ospedale Luigi Sacco di Milano consiste in un sistema pulsatile esterno per l'attuazione della sola parte sinistra di cuori porcini integri. Durante il funzionamento, in fase diastolica, il moto retrogrado del pistone

richiama il fluido di lavoro dall'atrio sinistro all'interno della camera ventricolare, attraverso la valvola mitrale aperta, mentre in sistole, la pressurizzazione del ventricolo, causata dal pistone, permette l'eiezione del fluido in aorta.

[1] [Fig. 1]

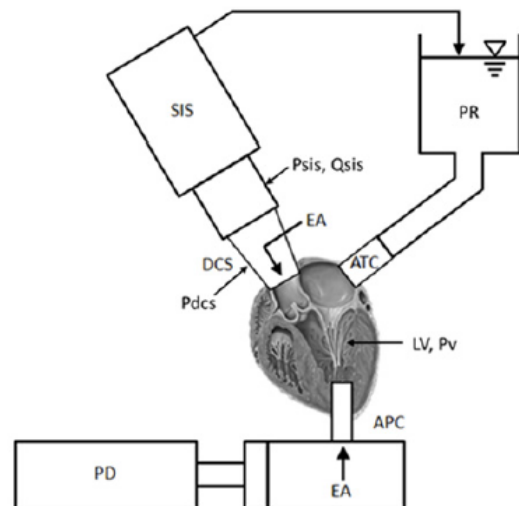


Figura 1 - Schema del setup ForCardioLab [1].

Il secondo sistema progettato da Leopaldi et al. [2] [Fig. 2] presso il Dipartimento di Ingegneria Biomedica della TU/e permette l'alloggiamento di cuori porcini interi garantendo, mediante un'attuazione pulsatile della sola parte sinistra, la pressurizzazione esterna delle pareti

ventricolari, in contrapposizione alla pressurizzazione interna della camera cardiaca, che invece si verifica nel suo predecessore. Durante il funzionamento, in fase sistolica il fluido di lavoro di cui è riempita la camera di alloggiamento del cuore viene pressurizzato dal sistema pompante, agendo sulle sole pareti ventricolari, dal momento che gli atri sono situati all'esterno della camera, mentre, in fase diastolica, l'azione retrograda del pistone, diminuendo la pressione all'interno della camera permette l'espansione delle pareti cardiache.

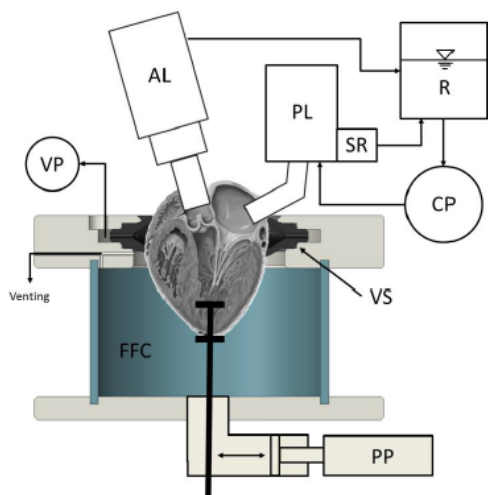


Figura 2 - Schema del setup TU/e.[2]

Il confronto operato in questo lavoro è effettuato per mezzo di indagini endoscopiche e ecografiche, ponendo

così le basi per stabilire quali indagini sia di volta in volta più appropriato effettuare nell'uno o nell'altro *setup*.

MATERIALI E METODI

La differenza più marcata esistente tra i due banchi prova risiede nella modalità di pressurizzazione del ventricolo sinistro: nel banco prova del ForCardioLab la pressurizzazione è realizzata anti-fisiologicamente, mentre in quello TU/e in modo fisiologico.

Si intende quindi concentrarsi sulla valutazione dell'area disponibile per la coaptazione dei singoli foglietti, grazie alle informazioni estratte dai video con il fibro/endoscopio e valutare la distanza tra papillare anteriore/posteriore e piano valvolare, al fine di evidenziare possibili differenze nei due *setup*.

La prima fase del lavoro ha previsto di effettuare una serie di prove statiche eseguite presso il ForCardioLab, per acquisire alcune grandezze di interesse, al fine di costruire un *pool* di dati di riferimento per le successive prove dinamiche. In tabella [Tab.1] sono riportate le grandezze valutate durante le prove statiche preliminari.

Prova Statica			
Grandezze di interesse	1. Perimetro Annulus 2. Diametro Aorto-murale 3. Diametro Commissurale	Area disponibile per la coaptazione	1. Distanza tra papillare anteriore e piano valvolare 2. Distanza tra papillare posteriore e piano valvolare
Metodo per il rilevamento delle grandezze	Ex Vivo tramite fascetta	Marchatura della linea di coaptazione valvolare e Immagine della valvola excisa	Esame ecografico
Pressioni indagate	80 mmHg	60 mmHg 120 mmHg	[60 - 180] mmHg con step pressori di 20 mmHg

Tabella 1 - Grandezze e modalità di ottenimento delle stesse delle prove statiche.

Inoltre grazie ad esse è stato possibile evidenziare le criticità presenti nella modalità di rilevamento delle grandezze e implementare, nelle successive analisi di tipo dinamico, protocolli più precisi e mirati. La condizione più critica per la meccanica della valvola mitrale è quella che si verifica in fase di sistole, ovvero quando è in atto la dilatazione ventricolare indotta dall'eiezione della pompa all'interno del ventricolo sinistro, poiché potrebbe generare l'insorgenza di un'insufficienza mitralica.

Componenti e layout del setup delle prove statiche

Il *setup* [Fig. 3] permette la pressurizzazione della camera ventricolare sinistra per via retrograda, previa rimozione di uno dei foglietti valvolari aortici. In questa configurazione l'atrio sinistro viene completamente rimosso, rendendo così visibile ed accessibile la valvola mitrale, permettendo in questo modo di marcare la linea di coaptazione mitralica.

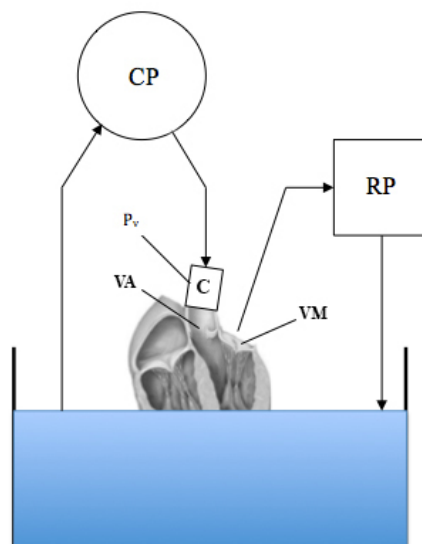


Figura 3 - Schema del setup ForCardioLab in configurazione statica.

Protocollo Sperimentale

Per tali esperimenti sono stati impiegati 8 cuori porcini decongelati. Per quanto

concerne le analisi ecografiche, per ogni cuore sono state applicati differenti valori di pressione (range copreso tra da 60 e 180 mmHg, step di di 20 mmHg) e sono state eseguite le due proiezioni in asse lungo allineate lungo i muscoli papillari [Fig. 4].

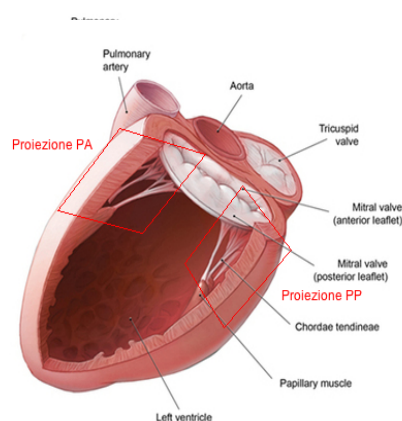


Figura 4 - Proiezioni ecografiche in asse lungo passanti per i due muscoli papillari, rilevate nel presente lavoro.

Infine è stata marcata la linea di coaptazione mitralica, contrassegnando la posizione su entrambi i foglietti per metà dei campioni ad una pressione ventricolare pari a 60 mmHg e per la restante metà a 120 mmHg. A tal fine è stato impiegato un inchiostro di china di colore nero, e uno strumento costruito *ad hoc* utilizzando un comune ago da cucito,

in grado di forare leggermente la parte superficiale dei foglietti e inserire la corretta quantità di inchiostro.

Per quanto riguarda le prove dinamiche si riportano le grandezze rilevate in questa tipologia di prove [Tab. 2].

Prove Dinamiche			
Grandezze di interesse	1. Perimetro Annulus 2. Diametro Aorto-murale 3. Diametro Commissurale	Area disponibile per la coaptazione	1. Distanza tra papillare anteriore e piano valvolare 2. Distanza tra papillare posteriore e piano valvolare
Metodo per il rilevamento delle grandezze	<i>Ex Vivo</i> tramite fascetta	Fibroscopio/Endoscopio + Videocamera ad alta velocità e Immagine della valvola excisa	Esame ecografico
Pressioni indagate	80 mmHg	[80-120] mmHg	[80-120] mmHg

Tabella 2 - Grandezze e modalità di ottenimento delle stesse delle prove dinamiche.

Modifiche del setup TU/e

Le uniche modifiche realizzate al *setup* TU/e riguardano la scelta del precarico (da Resistore di Starling a reservoir statico) e la realizzazione di una guaina da inserire nella camera di alloggiamento del cuore per l'inserimento di una sonda ecografica lineare [Fig. 5].

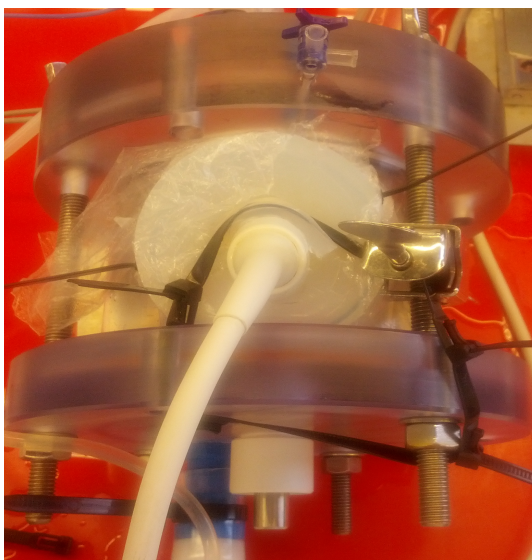


Figura 5 – Foto della camera di alloggiamento con guaina e sonda ecografica inserita.

Protocollo Sperimentale

Per tali esperimenti sono stati impiegati 6 cuori porcini decongelati in entrambi i setup. Su entrambi i foglietti della valvola mitrale è stata creata una griglia di puntini equispaziati 2 mm in entrambe le direzioni. Il pattern è stato realizzato utilizzando uno strumento costruito *ad hoc*. Esso consiste in un dischetto in policarbonato dotato di un foro filettato su cui è stata riprodotta la griglia di interesse, montato su una barra di acciaio inox con estremità filettata. Tale strumento introdotto dal foro apicale, posizionato al di sotto della porzione di foglietto su cui si vuole riprodurre la griglia di markers, solleva quest'ultimo,

permettendo, unitamente all'utilizzo di un inchiostro usato in istologia per marcare aree di tessuto, l'esecuzione del pattern voluto [Fig. 6].

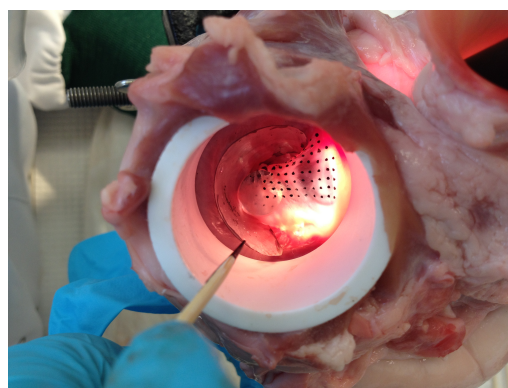


Figura 6 - Modalità di esecuzione del pattern.

In seguito, sono stati impostati 60 bpm e, regolando il postcarico, si sono raggiunti i parametri fluidodinamici desiderati: portata aortica e pressione aortica nel range 3,5 - 5l e 80-120 mmHg.

I video della valvola mitrale con pattern durante i cicli cardiaci sono stati realizzati mediante videocamera ad alta velocità accoppiata ad un endo/fibroscopio ad una frequenza di 200 Hz. Infine si sono acquisite le proiezioni ecografiche di interesse.

Ultimata la prova, il campione è stato aperto posteriormente lungo la commissura postero-mediale per ottenere l'immagine di riferimento per il calcolo, unitamente alle informazioni fornite dai

video ad alta velocità, dell'area disponibile per la coaptazione.

Calcolo dell'area disponibile per la coaptazione

Nelle prove statiche tramite l'utilizzo del software ImageJ è stata misurata, direttamente sulle immagini dei campioni excisi, l'area disponibile per la coaptazione, precedentemente marcata con l'inchiostro a china [Fig. 7].

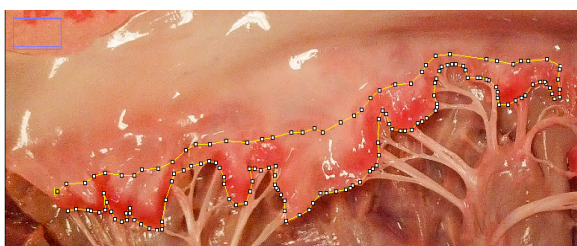


Figura 7 - Area del foglietto posteriore mitralico evidenziata con Image J.

Per quanto concerne le prove dinamiche la procedura utilizzata, riadattata dal lavoro di Spinner et al. [3], è la seguente:

1. per ogni valvola sono state estratte tre immagini definite di inizio sistole, di picco sistolico e di fine sistole, identificate con l'aiuto della curva di pressione aortica registrata;
2. si è realizzata una corrispondenza tra le immagini scattate con la valvola excisa [Fig. 8] e i frame estratti dai video [Fig. 9] al fine di poter

costruire le matrici contenenti le informazioni volute;



Figura 8 - Immagine di riferimento del campione exciso con il numero di colonne evidenziate.

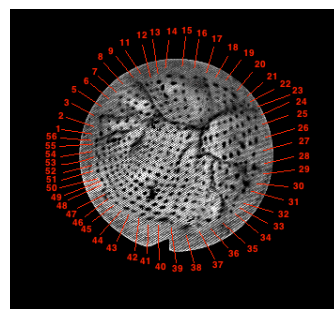


Figura 9 - Frame di inizio sistole (setup FCL) con il numero di colonne evidenziate

3. impiegando appositi programmi Matlab[®] [3] si è proceduto a contare, per ogni foglietto e per ogni condizione sperimentale di interesse, il numero di puntini in ogni riga della griglia.

Per l'immagine di riferimento del campione exciso sono stati contati tutti i puntini presenti su entrambi i foglietti, mentre per le immagini di inizio sistole, picco sistolico e fine

sistole, solamente i markers visibili. Inoltre è stata inserita la posizione del punto di riferimento (x) presente sul foglietto anteriore.

Con tali informazioni è stata creata una matrice di uni e di zeri per ogni foglietto e per ogni condizione sperimentale indagata. Ogni puntino visibile è rappresentato da un 1, ogni porzione di foglietto non visibile da uno 0 e il punto di riferimento è raffigurato da una x.

4. Dalle matrici sono stati prodotti sei grafici [Fig. 10], sovrapponendo le aree visibili dei singoli foglietti nelle tre fasi analizzate, con l'area dei foglietti considerati in configurazione di riferimento.

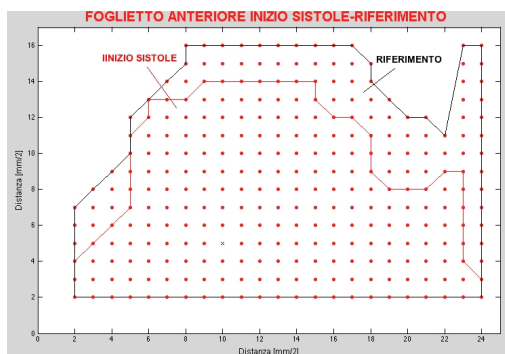


Figura 10 - Grafico della sovrapposizione con aree evidenziate.

5. Infine si è calcolata l'area disponibile per la coaptazione sottraendo le aree

visibili nelle tre condizioni sperimentali indagate a quelle statiche.

Misura delle distanze tra muscoli papillari e piano valvolare

La procedura è analoga sia per le prove statiche che per quelle dinamiche.

Per le prove statiche tali distanze (PP-PV e PA-PV) [Fig. 11] sono state misurate per i valori di pressione: 80mmHg, 100 mmHg e 120 mmHg, mentre per quelle dinamiche si sono rilevate per l'intera durata dell'evento sistolico analizzato, estraendo in particolare tali valori dai frame corrispondenti alle stesse pressioni per cui si sono esaminati i frame del video con fibro/endoscopio

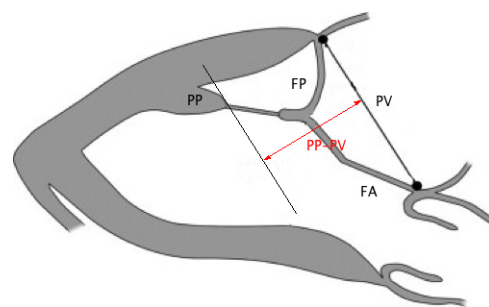


Figura 11 - Rappresentazione del metodo di individuazione della distanza tra la testa dei papillari, anteriore e posteriore, e il piano valvolare.

RISULTATI

Considerando le prove statiche, l'analisi statistica sia delle aree disponibili per la coaptazione relative ai foglietti anteriori e posteriori (alle pressioni ventricolari di 60 mmHg e di 120 mmHg) che delle distanze tra i muscoli papillari e piano valvolare (PA-PV e PP-PV alle pressioni ventricolari 80 mmHg, 100 mmHg e 120 mmHg) non ha rilevato differenze significative.

Tale evidenza indica che in entrambi i foglietti, sia l'area disponibile per la coaptazione che le due distanze non variano significativamente all'interno del range pressorio indagato, mostrando la stabilità valvolare a fronte di variazioni pressorie nel *setup* ForCardioLab nella sua versione statica.

Per quanto concerne le prove dinamiche l'analisi statistica ha evidenziato differenze significative nei confronti a parità di foglietto nelle condizioni di inizio sistole, picco sistolico e fine sistole. Sebbene siano state rilevate differenze significative in quasi tutti i confronti è da sottolineare che nel banco prova TU/e la differenza percentuale tra le varie fasi sistoliche nei due foglietti risulta più marcata rispetto al *setup*

ForCardioLab che garantisce un andamento più costante, in accordo con i valori riscontrati nelle prove statiche [Graf. 1-2].

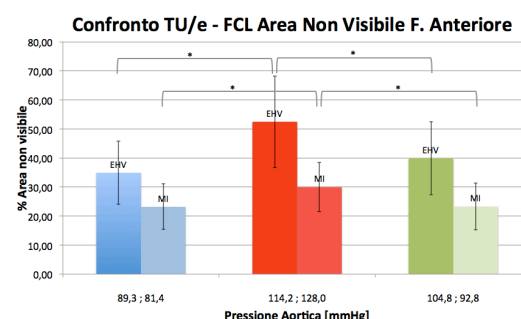


Grafico 1 - Confronto tra i valori medi delle percentuali delle aree non visibili relative al foglietto anteriore nelle tre condizioni sistoliche (inizio sistole, picco sistolico e fine sistole) e in entrambi i setup.

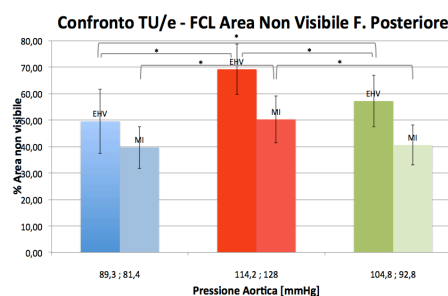


Grafico 2 - Confronto tra i valori medi delle percentuali delle aree non visibili relative al foglietto posteriore nelle tre condizioni sistoliche (inizio sistole, picco sistolico e fine sistole) e in entrambi i setup.

Considerando le distanze tra papillari e piano valvolare è stata evidenziata una sola significativa differenza presente nel *setup* TU/e, ovvero PP-PV rilevata

durante il picco sistolico e in fine sistole [Graf. 3-4].

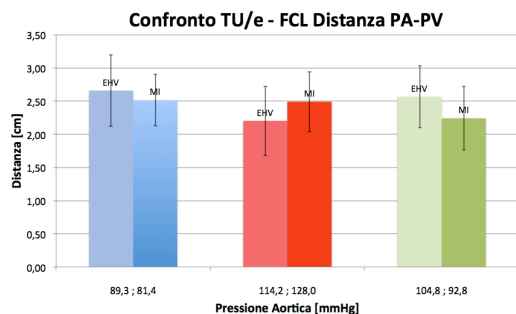


Grafico 3 - Confronto tra i valori medi delle distanze tra papillare anteriore e piano valvolare (PA-PV) nelle tre condizioni sistoliche (inizio sistole, picco sistolico e fine sistole) e in entrambi i setup.

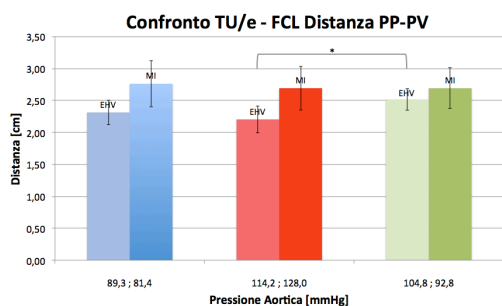


Grafico 4 - Confronto tra i valori medi delle distanze tra papillare posteriore e piano valvolare (PP-PV) nelle tre condizioni sistoliche (inizio sistole, picco sistolico e fine sistole) e in entrambi i setup.

CONCLUSIONI, LIMITI E SVILUPPI FUTURI

In letteratura numerosi lavori [4-6] hanno dimostrato l'esistenza di una stabilità

anulo-papillare, probabilmente dovuta alle corde basali anteriori.

Per contro, ciò che varia considerevolmente è la distanza tra l'annulus mitralico e l'apice, a discapito di quella tra apice e teste dei muscoli papillari. Inoltre, in fase sistolica i muscoli papillari si contraggono unitamente alla porzione posteriore anulare, esibendo un movimento concorde verso l'apice cardiaco, mentre in fase diastolica, con il rilassamento di entrambi, si ha un movimento opposto.

Dal momento che i banchi prova analizzati nel presente lavoro sono per cuori battenti passivi, occorre considerare l'effetto della non contrattilità dei muscoli papillari sul funzionamento del complesso valvolare mitralico.

Nel *setup* TU/e, si è riscontrato un evidente *billowing* di entrambi i lembi valvolari con asimmetria durante la fase di picco sistolico [Fig. 12]. Probabilmente ciò è dovuto alla mancata contrazione dei muscoli papillari, dovuta alla non contrattilità del miocardio, dovuta alla non contrattilità del miocardio, che induce un avvicinamento dei papillari al piano valvolare.

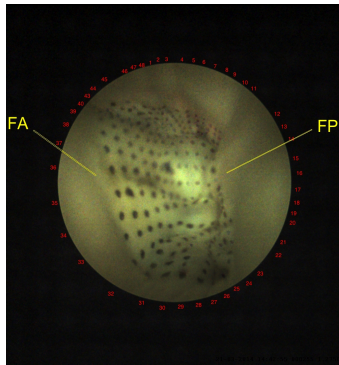


Figura 12 - Billowing asimmetrico della valvola mitrale riscontrato nel setup TU/e.

Nel setup ForCardioLab, nonostante si supponesse che il movimento anti-fisiologico dei muscoli papillari potesse causare l'insufficienza della valvola mitrale, si è dimostrata l'effettiva competenza valvolare, con una fluidodinamica comparabile a quella rilevata *in vivo*. Tale evidenza può essere giustificata considerando che, in fase sistolica, la dilatazione del ventricolo sinistro induce un allontanamento dei muscoli papillari dal piano valvolare, provocando uno stiramento delle corde tendinee, mimando il comportamento fisiologico; tuttavia, si tiene a precisare che ciò non significa che la biomeccanica dell'intero apparato valvolare siano analoghe a quelle fisiologiche [Fig. 13].

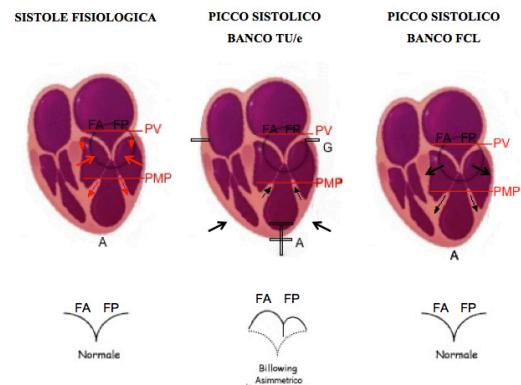


Figura 13 - Schematizzazione del comportamento del complesso valvolare mitralico nei due banchi prova durante l'evento sistolico, a confronto con ciò che si verifica in fisiologia. Le frecce rosse indicano la presenza di contrattilità mentre quelle in nero rappresentano il movimento generato dal sistema di azionamento.

Date queste considerazioni, sembrerebbe ragionevole ipotizzare che il banco prova ForCardioLab sia in grado di riprodurre più fedelmente un modello fisiologico della valvola mitrale, a differenza del banco prova TU/e che invece risulta più riconducibile ad un modello mitralico tendente al prolasso.

Le criticità e i limiti del presente lavoro sono i seguenti:

- l'intervariabilità presente tra i cuori impedisce di effettuare un confronto tra i due banchi prova a parità di campione biologico;
- la numerosità dei campioni testati è esigua;

- il protocollo sperimentale impiegato per la creazione del pattern mitralico presenta un elevato tempo di esecuzione;
- il rilevamento delle distanze tra muscoli papillari e piano valvolare non consente di avere una piena conoscenza di ciò che effettivamente si verifica tra tali strutture anatomiche.

Un naturale proseguimento di tale lavoro, per la validazione del protocollo impiegato, consisterebbe nel valutare le lunghezze disponibili per la coaptazione di ogni singolo foglietto, rilevate centralmente nei due segmenti speculari A2 e P2, durante l'intero evento sistolico. Tali grandezze potrebbero essere confrontate con valori di lunghezze di coaptazione misurate mediante proiezioni ecografiche transtoraciche o transesofagee *in vivo*.

Inoltre, sarebbe auspicabile svolgere ulteriori test al fine di poter individuare il banco prova più appropriato a seconda delle indagini che si desidera effettuare.

Infine, sarebbe opportuno prevedere un'ottimizzazione per il sistema impiegato per rilevare le proiezioni ecografiche nel banco TU/e.

BIBLIOGRAFIA

1. A.M. Leopaldi, et al., "*In vitro hemodynamics and valve imaging in passive beating hearts*", 2012, Journal of biomechanics, Vol. 45, No. 7, 1133:1139.
2. A.M. Leopaldi, "*Multifunctional passive-heart platforms for in vitro hemodynamic studies*", in *Scuola interpolitecnica di dottorato*, 2014, Politecnico di Milano: Milano.
3. E.M. Spinner, "*Tricuspid valve mechanics: understanding the effect of annular dilatation and papillary muscle displacement*", in Department of Biomedical Engineering Theses and Dissertations, 2011, Georgia Institute of Technology: Atlanta.
4. T.M. Joudinaud, et al., "*The papillary muscles as shock absorber of the mitral valve complex. An experimental study*", 2007, European journal of cardiothoracic surgery, Vol. 32, No. 2, 96:101.
5. T. Sakai, et al., "*Distance between mitral annulus and papillary muscles: anatomic study*

- in normal human hearts*”, 1999, The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, Vol. 118, No. 4, 636:641.
6. M. Komeda, et al., *Papillary muscle – left ventricular wall “complex”.*”, 1997, Journal of thoracic and cardiovascular surgery, Vol. 113, No. 2, 292:300.

ABSTRACT

INTRODUCTION

The introduction of new reparative surgical techniques and minimally-invasive surgical approaches lead to the development of *in vitro* simulators. *In vitro* mock loops can be used both for training and for the investigation of the biomechanical, kinematic and dynamic behavior of the anatomical structures involved, such as mitral and aortic valves. A mock apparatus able to house an entire explanted heart can provide reliable and quantitative information about the effectiveness of the investigated solutions, in an environment similar to the operating room.

In this context, the present work of thesis aims to carry out a comparative morphometric analysis on mitral valve in two passive-heart platforms with complementary functioning principles.

The first mock apparatus developed by Leopaldi et al. [1] [Fig. 1] at ForCardioLab in Luigi Sacco Hospital (Milan) is able to host an entire explanted porcine heart.

The functioning principle is the following: during diastole, the retrograde

motion of the piston draws fluid from the left atrium into the left ventricle, through the mitral valve opened, while during systole, the pressurization of the left ventricle, due to the forward piston motion, expels fluid in the aorta.

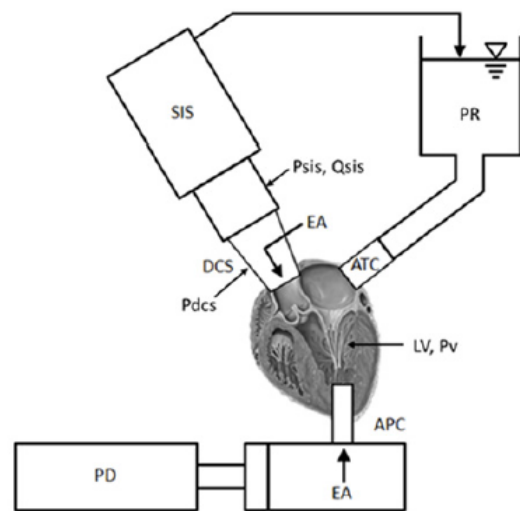


Figure 2 – Scheme of ForCardioLab setup. [1]

The second platform developed by Leopaldi et al. [2] [Fig. 2] at the Department of Bioengineering of the TU/e (Eindhoven) adopts a complementary functioning principle as compared to its predecessor, applying an external pressurization of the ventricle through a piston pump.

During systole, the pressurization of the working fluid inside the chamber, in

which a swine heart is housed, is able to selectively squeeze the ventricular walls, while the atria are outside, excluded from external loads; during diastole, the retrograde motion of the piston, decreasing the pressure of the fluid-filled chamber, allows the dilation of the ventricles.

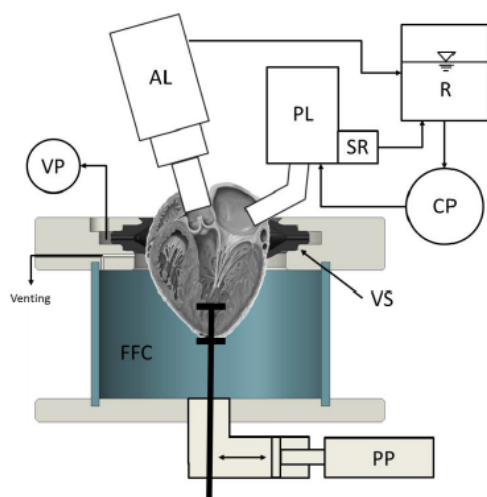


Figure 2 – Scheme of Tu/e setup. [2]

The comparative analysis presented in this work is carried out by means of both endoscopic and echographic imaging thus laying the groundwork to establish from time to time the appropriate investigations for each of the two mock loops.

MATERIALS AND METHODS

The fundamental difference between the two setups resides in the functioning methodology: in the ForCardioLab mock loop the pressurization of the left ventricle is anti-physiological, while the TU/e platform simulates the physiologic dynamic behavior of the ventricular walls.

Therefore, this study intends to focus on the evaluation of the available coaptation area of each mitral leaflet, using the information extracted from endoscopic video and assess the distance between each papillary tip and the valvular plane, in order to highlight possible differences in the two setup.

First of all, the static tests were performed at ForCardioLab to measure quantities of interest, in order to build a pool of reference data for the subsequent dynamic testings.

The table below [Tab. 1] shows the quantities of interest registered during the static testing.

Moreover, it was possible to highlight the critical issues in the adopted protocol so to implement, in the following dynamic

analysis, more precise and targeted approaches.

Prova Statica			
Grandezze di interesse	1. Perimetro Annulus 2. Diametro Aorto-murale 3. Diametro Commissurale	Area disponibile per la coaptazione	1. Distanza tra papillare anteriore e piano valvolare 2. Distanza tra papillare posteriore e piano valvolare
Metodo per il rilevamento delle grandezze	Ex Vivo tramite fascetta	Marcatura della linea di coaptazione valvolare e Immagine della valvola excisa	Esame ecografico
Pressioni indagate	80 mmHg	60 mmHg 120 mmHg	[60 -180] mmHg con step pressori di 20 mmHg

Table 1 – Quantities of interest for the static testing.

The most critical condition for the mechanics of the mitral valve is that which occurs in systole, while the internal pressurization of the ventricular chamber induces the dilation of the left ventricle, because it could result in a mitral regurgitation.

Components and mock loop's layout in static testing

The setup [Fig. 3] allows the retrograde pressurization of the left ventricular chamber thanks to removal of one of the

aortic valve leaflets. In this configuration, the left atrium is completely excised, exposing the mitral valve and allowing to mark the mitral coaptation line.

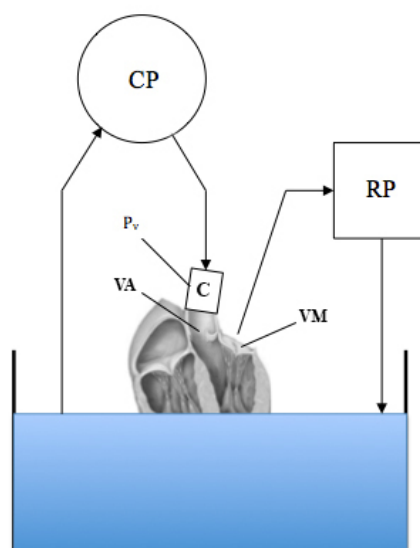


Figure 3 – Scheme of the static version of ForCardioLab setup.

Experimental Protocol

Eight porcine hearts were used to perform the echographic long axis view of the papillary muscles, investigating a pressure range from 60 to 180 mmHg by incremental steps of 20 mmHg for each heart [Fig. 4].

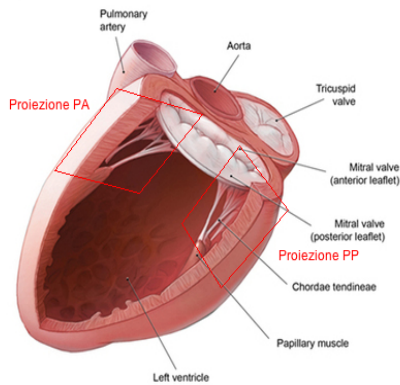


Figure 4 - Echographic long axis view of the papillary muscles performed in the present work.

Finally, it was marked the mitral coaptation line on both leaflets using a black india ink, for half of the samples to a ventricular pressure of 60 mmHg and for the remaining half to 120 mmHg. A tool was built for this purpose, using a common sewing needle, able to slightly pierce the leaflets on their surface and inject the correct amount of ink.

The table below shows the quantities detected in the dynamic tests performed [Tab. 2].

Prove Dinamiche			
Grandezze di interesse	1. Perimetro Annulus 2. Diametro Aorto-murale 3. Diametro Commissurale	Area disponibile per la coaptazione	1. Distanza tra papillare anteriore e piano valvolare 2. Distanza tra papillare posteriore e piano valvolare
Metodo per il rilevamento delle grandezze	<i>Ex Vivo</i> tramite fascetta	Fibroscopio/Endoscopio + Videocamera ad alta velocità e Immagine della valvola excisa	Esame ecografico
Pressioni indagate	80 mmHg	[80-120] mmHg	[80-120] mmHg

Table 2 - Quantities of interest for dynamic testing.

Redesign of the TU/e setup

The only changes made to the setup of Leopaldi et al. [] are: replacing the Starling resistor with a static preload reservoir and the realization of a sheath for a linear ultrasound probe, in order to perform echographic imaging inside the fluid-filled chamber [Fig. 5].

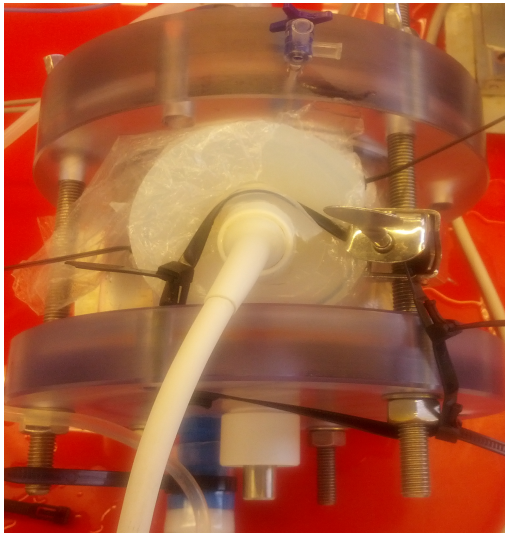


Figure 5 – View of the fluid-fill chamber with the sheath and probe inserted.

Experimental Protocol

Six porcine hearts were used for this type of tests. Markers were placed in a grid of equally (2 mm) spaced dots on the entire surface of each leaflet. A tool was built ad hoc to perform the mitral pattern. It consists in a washer made of polycarbonate with a threaded hole, on which has been reproduced the grid, mounted on a stainless steel bar with threaded end. This instrument positioned below the valve leaflets, together with the use of a tissue-marking dye allowed to perform the pattern [Fig. 6].

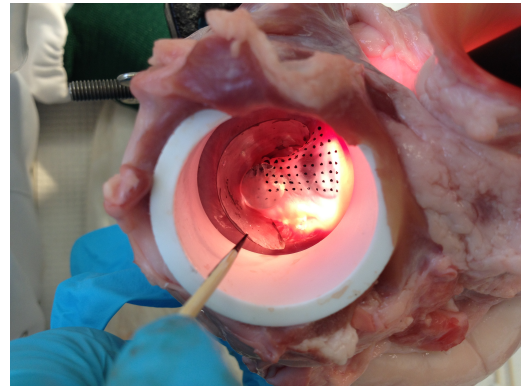


Figure 6 – Pattern on mitral valve.

The heart rate was set at 60 bpm and the systemic impedance simulator was tuned in order to reach the desired hydrodynamic parameters: aortic flow and aortic pressure in the range 3.5l-5l and 80-120mmHg. The videos of the mitral valve with pattern during the cardiac cycles were acquired using an high speed camera coupled with an endoscope, at a sampling frequency of 200 Hz. Finally, the echographic projections were performed. In conclusion, the sample was opened along the postero-medial commissure to obtain the reference image for the calculation, together with the information provided by the endoscopic video, of the area available for coaptation.

Evaluation of the area available for coaptation

In static testing, the area available for coaptation was measured directly on the images of the samples excised by using the software ImageJ [Fig. 7].

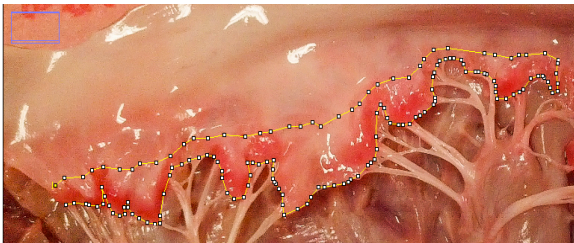


Figura 7 – Posterior leaflet area measured with Image J.

In dynamic testing, the procedure used, adapted from the work of Spinner et al. [3], is the following:

1. for each valve three systolic images were extracted: at the beginning of systole, at peak systole and at end of systole; These frames were identified with the help of the recorded aortic pressure tracings;
2. a match was made between the images extracted from the video and the static pictures of the sample excised, in order to create matrices containing the desired information;

3. Using a Matlab® code [3], the number of dots in each row in the grid were counted, for each leaflet and for each experimental condition. For the reference image all the dots on both leaflets were counted, while for systolic images only visible markers were counted. The row and column in which the reference was located, were identified and displayed within the matrices of the anterior leaflet as an x. A matrix of ones and zeros was created with this information, for each leaflet and for each experimental condition investigated. Each visible dot is displayed as a 1, each non-visible part of the leaflet is displayed as a 0 and the reference point is represented by an x.
4. The reference image was overlaid on each condition and plotted, creating six plots [Fig. 10], considering each leaflet and the three systolic states;
5. Finally, the areas available for coaptation were determined by subtracting the visible areas, in the three experimental conditions and for both leaflets, to the reference ones.

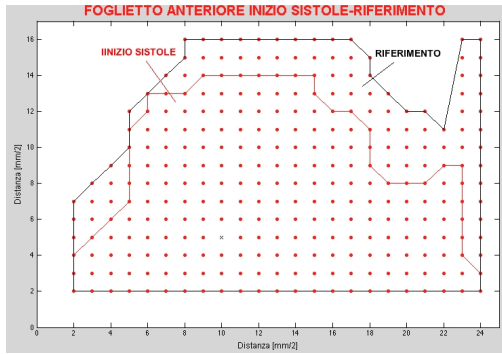


Figura 10 – Reference image overlaid on one of the systolic conditions investigated.

Measure of the distance between papillary muscles and valvular plane

The procedure is similar for both static and dynamic testing. For the static tests the distances between the tips of the papillary muscles and the valvular plane (PA-PV and PP-PV) [Fig. 11] were measured at 80mmHg, 100 mmHg e 120 mmHg mmHg, while for the dynamic tests these quantities were detected for the entire systolic phase, in particular analyzing the images corresponding to the systolic frames of the endoscopic video

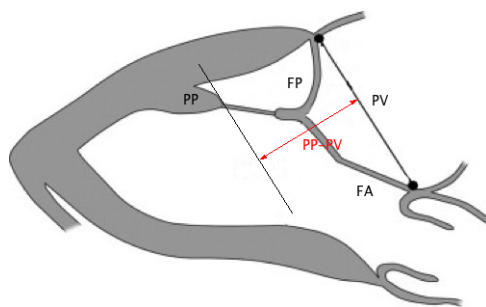


Figura 11 - Representation of the method of detection of the distance between the tip of the papillary muscles and the valvular plane.

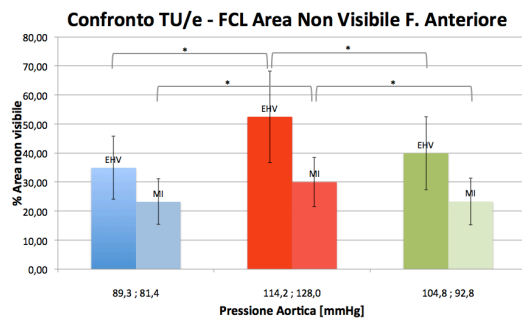
RESULTS

Considering the **static tests**, the statistical analysis of both the areas available for coaptation relative to the anterior and posterior leaflets (at ventricular pressures of 60 mmHg and 120 mmHg) and the distances between the papillary muscles and valvular plane (PA-PV and PP-PV at ventricular pressures to 80 mmHg, 100 mmHg and 120 mmHg) did not detect significant differences.

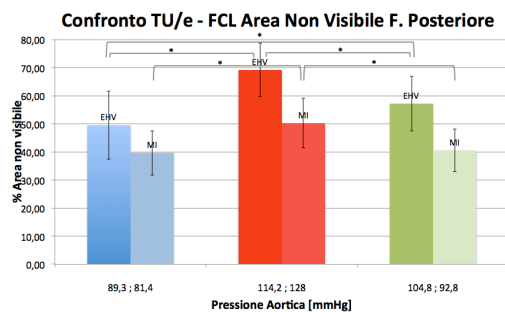
This evidence indicates that, in both leaflets, the area available for coaptation and the two distances do not vary significantly within the pressure range investigated, showing the valvular stability with regard of pressure changes in the static version of ForCardioLab setup.

The statistical analysis of dynamic testing revealed significant differences comparing the three systolic conditions within each leaflet. Although there are significant differences in almost all comparisons, it should be noted that in the TU/e mock loop, the percentage change between the systolic conditions is more pronounced than in the

ForCardioLab setup, that exhibits a more constant trend, likewise the static version of ForCardioLab setup [Graf. 1-2].



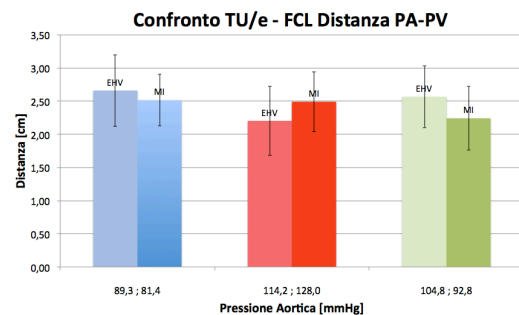
Graphic 1 - Comparison between the mean values of the percentages of the non visible areas of the anterior leaflet in the three systolic conditions (early systole, peak systole and late systole) in both setups.



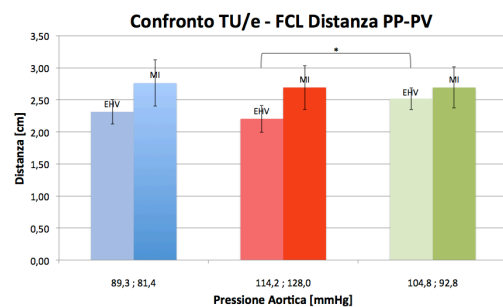
Graphic 2 - Comparison between the mean values of the percentages of the non visible areas of the posterior leaflet in the three systolic conditions (early systole, peak systole and late systole) in both setups.

Only the distances PP-PV measured in the TU/e setup during peak systole and

end systole were significantly different [Graf. 3-4].



Graphic 3 - Comparison between the mean values of the distances between the anterior papillary muscle (PA-PV) in the three systolic conditions (early systole, peak systole and late systole) in both setups.



Graphic 4 - Comparison between the mean values of the distances between the posterior papillary muscle (Pp-PV) in the three systolic conditions (early systole, peak systole and late systole) in both setups.

CONCLUSIONS, LIMITATIONS AND FUTURE DEVELOPMENTS

Several works [4-6] have demonstrated the existence of the anulo-papillary stability, probably due to the basal anterior chords. On the contrary, the distance between the mitral annulus and the apex changes significantly during the cardiac cycle, at the expense of the changes in the apex to papillary muscles tips. Moreover, in the systolic phase papillary muscles contract together with the posterior annular portion, exhibiting concordant motion towards the cardiac apex, while in the diastolic phase, the relaxation cause an opposite movement. In the TU/e setup, a billowing was shown on both valve leaflets with asymmetric behavior during the systolic peak **Fig. 12**].

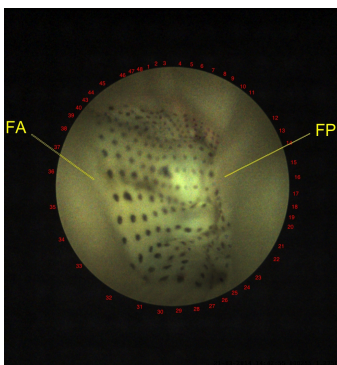


Figura 12 – Asymmetric billowing of the mitral valve leaflets.

The main reason is probably the absence of the papillary muscle function, given by the non-contractility of the myocardium. In the ForCardioLab setup, despite the possibility that the anti-physiological motion of the papillary muscles could lead to mitral valve regurgitation, the endoscopic visualization demonstrated the proper functioning of the mitral valve with a hemodynamic behavior comparable to the *in vivo* conditions.

This result might be explained considering that, during the artificially generated systole, the left ventricle dilation moves the papillary muscles away from the valvular plane, thus stretching the chordae tendineae just as in natural systole; anyway, this does not mean that the biomechanic behavior of the mitral valvular and sub-valvular structures strictly mimics the physiological one [**Fig. 13**].

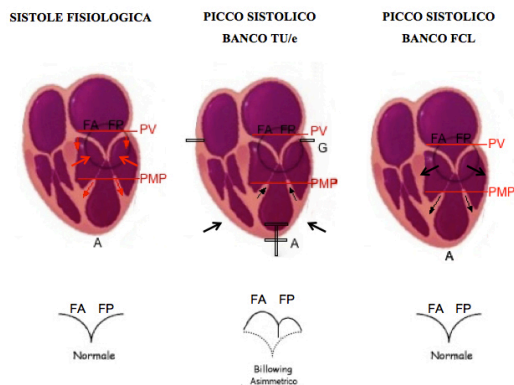


Figure 13 - Schematization of the behavior of the mitral valvular complex in the two analyzed setups, during the systolic phase, in comparison with the physiologic behavior. The red arrows indicate the presence of contractility, while those in black represent the movement generated by the external pumping systems.

Given these considerations, it would seem reasonable to think that the ForCardioLab setup is able to reproduce a physiological model of the mitral valve, the TU / e setup, instead, seems to mimic a model of mitral valve prolapse.

The critical aspects and limitations of the present study are as follows:

- the inter-variability between the samples prevents to perform a comparative analysis between the two setups on equal terms;

- the number of tested samples is small;
- the experimental protocol for the creation of the mitral pattern has a high execution time;
- detection of the distances between the papillary muscles and the valvular plane does not provide a complete understanding of the real behavior between these anatomic structures.

A future development of this work, to validate the protocol used, would be to examine the lengths available for coaptation of each mitral leaflet, identified centrally in the two specular scallops A2 and P2, during the systolic phase. These quantities may be compared with the values of the coaptation lengths measured by transthoracic or transesophageal echocardiography *in vivo*.

In addition, it would be necessary to carry out further tests in order to identify the most appropriate setup according to the desired analysis.

In conclusion, the system used to acquire echographical projections in the TU/e setup should be optimized.

BIBLIOGRAPHY

7. A.M. Leopaldi, et al., "*In vitro hemodynamics and valve imaging in passive beating hearts*", 2012, Journal of biomechanics, Vol. 45, No. 7, 1133:1139.
8. A.M. Leopaldi, "*Multifunctional passive-heart platforms for in vitro hemodynamic studies*", in *Scuola interpolitecnica di dottorato*, 2014, Politecnico di Milano: Milano.
9. E.M. Spinner, "*Tricuspid valve mechanics: understanding the effect of annular dilatation and papillary muscle displacement*", in Department of Biomedical Engineering Theses and Dissertations, 2011, Georgia Institute of Technology: Atlanta.
10. T.M. Joudinaud, et al., "*The papillary muscles as shock absorber of the mitral valve complex. An experimental study*", 2007, European journal of cardiothoracic surgery, Vol. 32, No. 2, 96:101.
11. T. Sakai, et al., "*Distance between mitral annulus and papillary muscles: anatomic study in normal human hearts*", 1999, The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, Vol. 118, No. 4, 636:641.
12. M. Komeda, et al., "*Papillary muscle – left ventricular wall “complex”.*", 1997, Journal of thoracic and cardiovascular surgery, Vol. 113, No. 2, 292:300.

1.

INTRODUZIONE

1.1 Anatomia della valvola mitrale

La valvola mitrale (VM) deve il suo nome ad Andrea Vesalio che nel suo *De Humani Corporis Fabrica* (1543) la chiamò in questo modo a causa della sua forma, molto simile a quella di una mitra, copricapo indossato dai vescovi. La VM separa l'atrio sinistro dal ventricolo sinistro e, a causa della sua complessa architettura composta da diversi elementi, è spesso denominata complesso valvolare mitralico. Tale struttura non è semplicemente un orifizio governato passivamente, ma piuttosto è costituita da una serie di componenti attivi, finemente regolati, e agenti in sincronia.

L'azione coordinata di questi ultimi è in grado di assicurare e facilitare:

1. il passaggio di sangue da atrio a ventricolo, nei tempi appropriati;
2. la completa chiusura dell'orifizio atrio-ventricolare in fase sistolica, impedendo il flusso retrogrado;
3. l'espulsione di sangue attraverso la valvola aortica, dal momento che, al contrario della valvola tricuspide, fa parte della radice aortica (giunzione mitro-aortica) e gioca un ruolo attivo anche durante la fase sistolica.

Di seguito verranno descritte le strutture che compongono la VM: i foglietti, l'annulus, i muscoli papillari e le corde tendinee.

➤ 1.1.1 I foglietti valvolari e le commissure

I foglietti [Fig. 1.1] rappresentano una struttura continua con variegate differenze locali, che da sempre, contribuiscono ad alimentare numerose divergenze nella loro descrizione.

Tradizionalmente, si identificano due foglietti: uno anteriore, denominato anche aortico per la sua vicinanza con l'omonima valvola, e uno posteriore, detto anche murale.

Le estremità della zona di contatto tra i due foglietti in fase di chiusura, non raggiungono l'annulus e sono identificate come: **commissura antero-laterale** e **postero-mediale**.

Il **foglietto anteriore** (FA) si estende per circa un terzo (tra il 35% e il 40%) della lunghezza dell'annulus, è compatto, ha una forma semicircolare e nella maggior parte dei casi non possiede rientranze. La zona di inserzione del FA è costituita da materiale fibroso ed è in continuità con i foglietti sinistro e non-coronarico della valvola aortica.

Il **foglietto posteriore** (PA) presenta una variabilità geometrica più marcata, ha una forma sottile, si estende per i rimanenti due terzi della lunghezza anulare ed è formato generalmente da tre segmenti, denominati P1, P2, P3 partendo dalla commissura antero-laterale a quella postero-mediale. Le porzioni di FA che si affacciano su tali segmenti sono chiamate A1, A2 e A3 rispettivamente, anche se la struttura del FA, nella sua forma più comune, non è frammentata [Fig. 1.2].

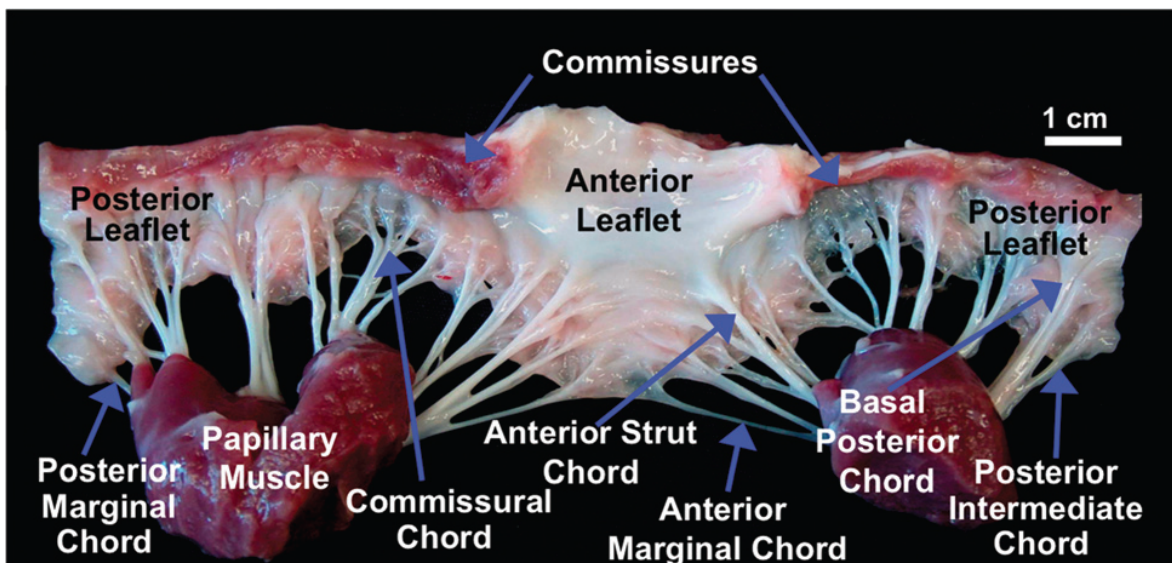


Figura 2.1 - Valvola mitrale porcina excisa.[2]

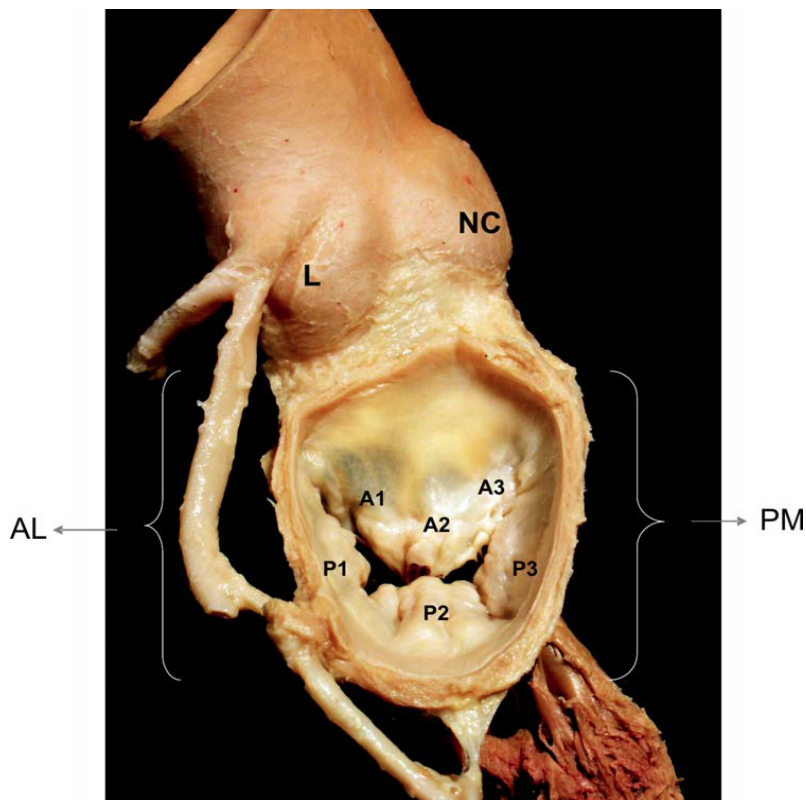


Figura 1.3 - Vista atriale della valvola mitrale con segmenti evidenziati. [1]

Nonostante i foglietti abbiano due forme differenti, presentano aree molto simili; l'area totale di entrambi i foglietti mitralici è di circa 1,5-2 volte maggiore dell'area anulare. Tale discordanza di valori è denominata ridondanza dei foglietti e rappresenta la riserva funzionale della VM, ovvero la capacità di quest'ultima di rendere possibile una corretta coaptazione in presenza di differenti condizioni emodinamiche [1]. Nella

porzione inferiore di ciascun foglietto si evidenziano tre zone: una basale, intesa come la parte di foglietto che si congiunge con l'annulus, una liscia più sottile e centrale e infine una ruvida, dove sono presenti i siti di inserimento delle corde tendinee [Fig. 1.3].

Entrambi i foglietti sono composti da tre strati: uno endoteliale ventricolare, uno intermedio spongioso formato da materiale fibroso e infine lo strato più esterno, rivolto verso il lato atriale, costituito da cellule endoteliali [2]. Inoltre, sono presenti strutture nervose, vasi ematici e cellule muscolari lisce che rendono i foglietti tessuti attivi e adattativi.

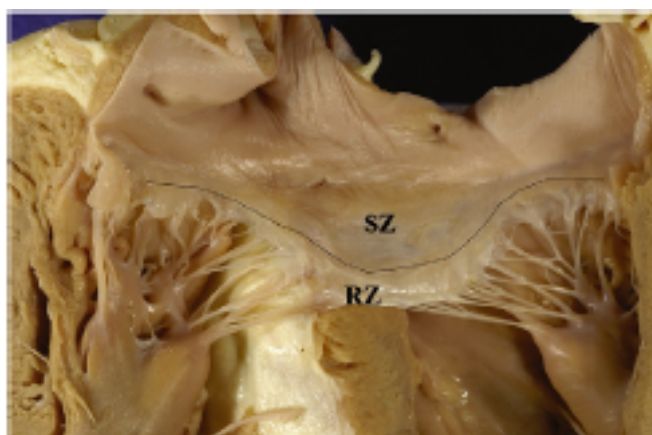


Figura 1.4 - Zona ruvida (RZ) e zona liscia (SZ) di un foglietto mitralico.[3]

➤ 1.1.2 L'annulus

L'annulus mitralico (AM) è descritto come la zona di separazione tra l'atrio e ventricolo, nella quale si inseriscono i foglietti valvolari. Esso possiede una forma somigliante ad una D, che ricorda quella di un rene, con un'eccentricità maggiore in sistole rispetto alla diastole; in particolare, nella configurazione di massima ellitticità, il rapporto tra il diametro aorto-murale (Ao-M) e quello intercommissurale (C-C) [Fig. 1.4] è circa pari a 0,75[3-4].

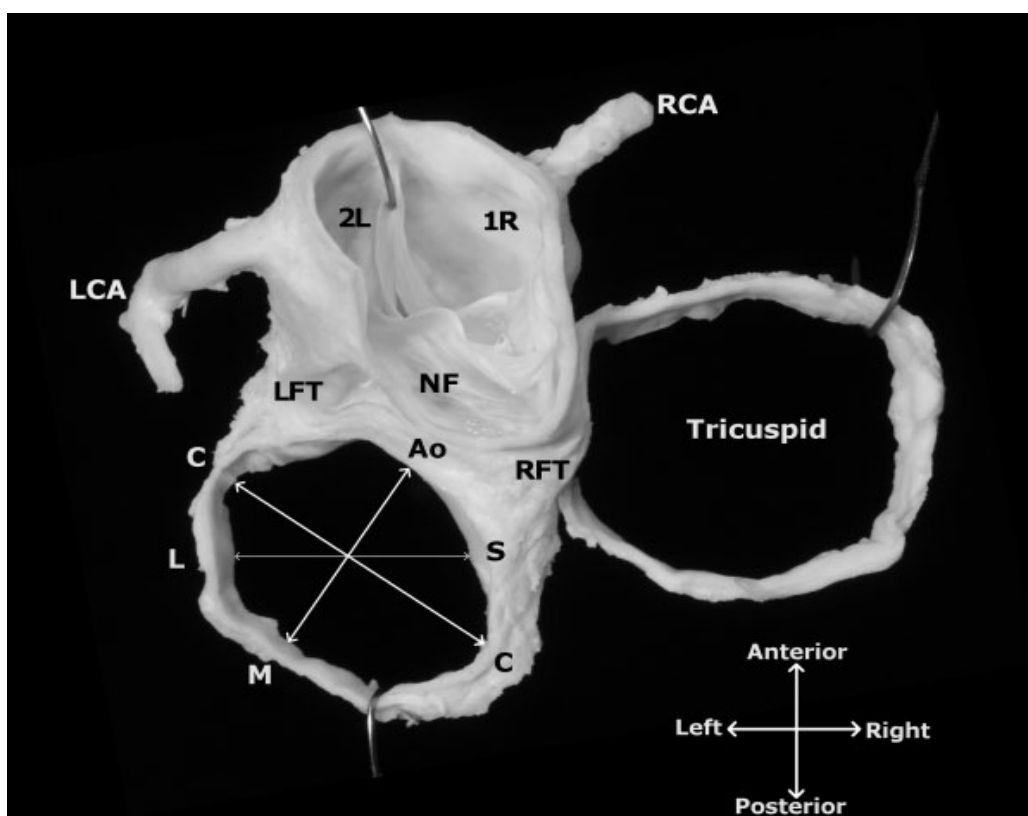


Figura 1.5 - Vista superiore dell'annulus mitralico.[7]

L'AM non è una struttura planare, ma si estende in tre dimensioni assumendo una conformazione a sella (paraboloide iperbolico) [Fig. 1.5], con i punti più bassi a livello delle commissure [3,5]. Da un punto di vista istologico, l'AM è costituito da materiale fibroso e muscolare. Il supporto fibroso si trova tra la valvola aortica e il foglietto anteriore mitralico (continuità mitro-aortica) e si estende fino ai trigoni sinistro e destro anche se, occasionalmente porzioni fibrose possono trovarsi al di fuori di tale zona [3]. La porzione

restante, che rappresenta la zona di inserzione del foglietto posteriore è principalmente muscolare, costituendo così l'elemento dinamico dell'intera struttura anulare. Inoltre Itoh et al. [6] hanno definito l'angolo esistente tra la porzione fibrosa e quella muscolare, più piatta, come angolo cardine (*hinge angle* Φ), riscontrabile sia negli esseri umani che negli ovini [Fig. 1.6].

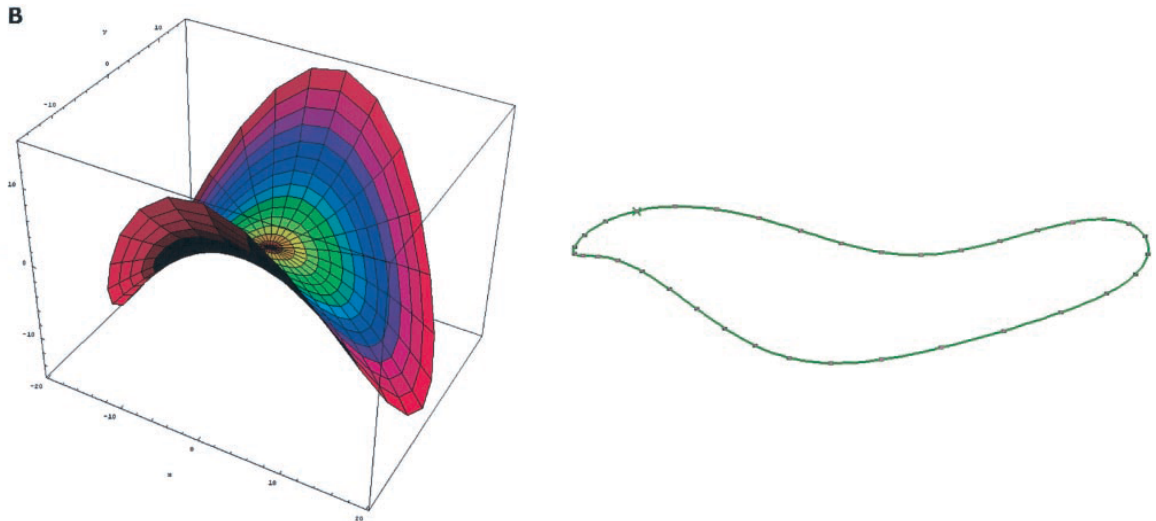


Figura 1.6 - Ricostruzioni del profilo anulare. [5]

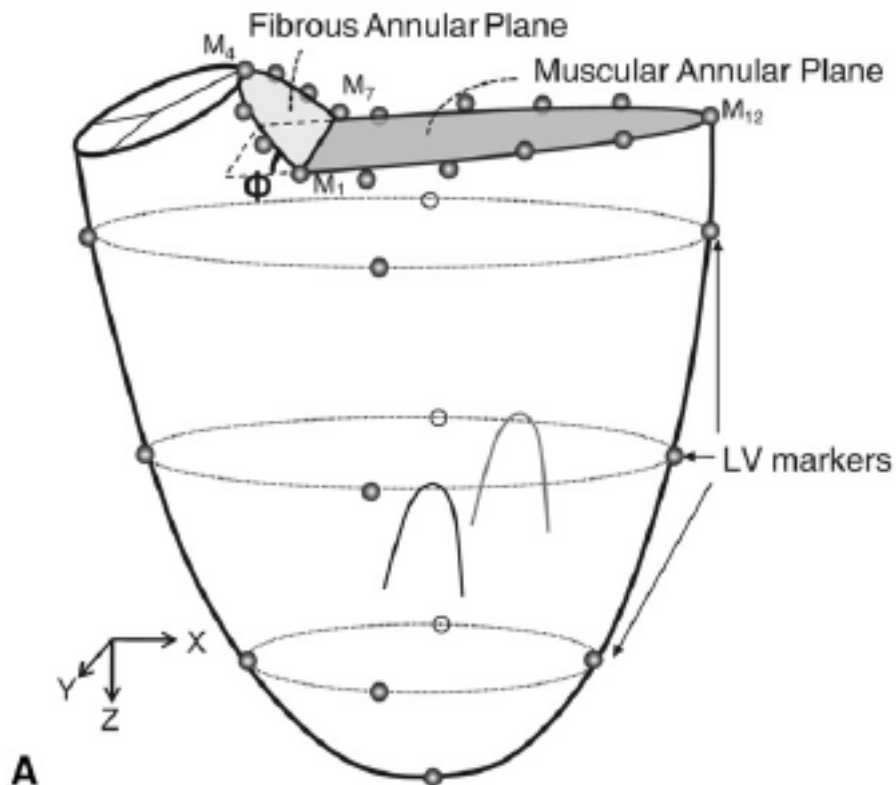


Figura 1.6 - Rappresentazione dei piani anulari e identificazione dell'hinge angle (Φ). [6]

➤ 1.1.3 I muscoli papillari

I muscoli papillari originano normalmente tra il primo terzo e la metà della parete ventricolare partendo dall'apice cardiaco. Comunemente sono due, denominati analogamente alle commissure, come: **papillare antero-laterale (AL)** e **papillare postero-mediale (PM)** [Fig. 1.7]. I due muscoli rappresentano le estremità di una struttura più o meno continua di colonne muscolari che, al di sotto del foglietto anteriore e tra lo spazio presente tra di esse, permette il passaggio del sangue all'interno del ventricolo verso l'aorta [7].

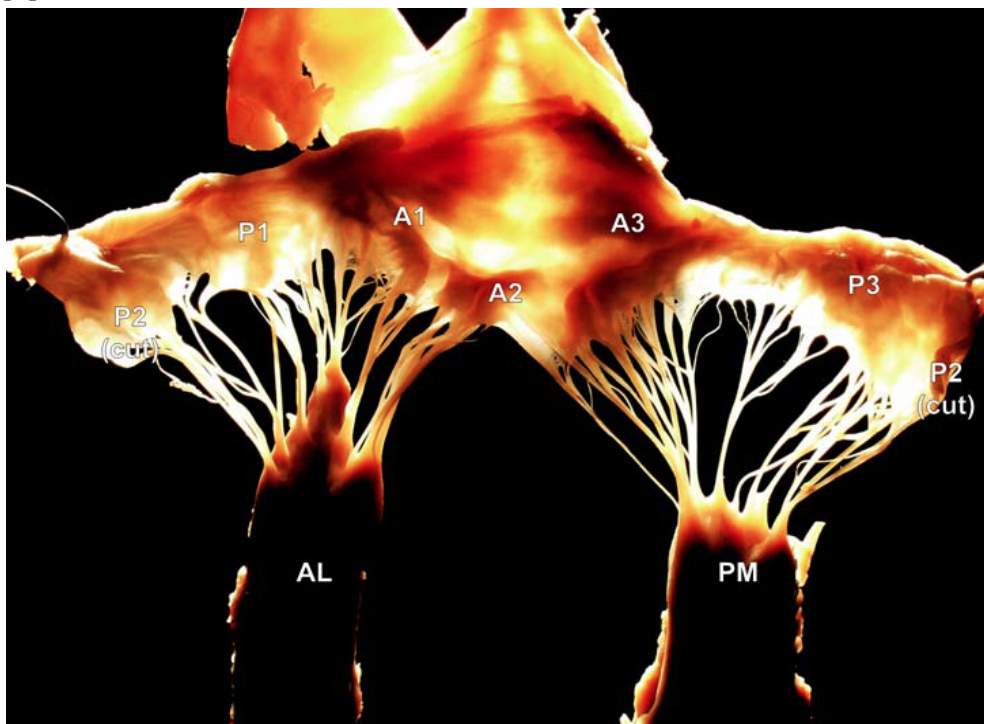


Figura 1.7 - Papillare Antero-Laterale (AL) e Papillare Postero-Mediale (PM). [1]

In generale, i papillari sono gruppi di piccoli fasci muscolari più o meno impaccati insieme e nella maggior parte dei casi presentano una sola testa, ma possono averne anche due, tre o addirittura multiple [Fig. 1.8]. La loro posizione ha un ruolo fondamentale nella distribuzione delle forze agenti e assicura che le corde originanti dalle teste dei papillari siano in grado di consentire un valido supporto per la corretta chiusura dei foglietti mitralici [8-9].

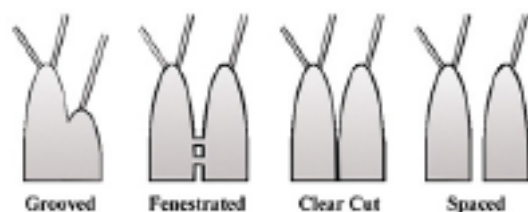


Figura 1.8 - Possibili disposizioni dei muscoli papillari. [3]

➤ 1.1.4 Le corde tendinee

Le corde tendinee originano dalle teste dei muscoli papillari e si diramano in fasci inserendosi in diverse porzioni inferiori di entrambi i foglietti, svolgendo differenti funzioni a seconda della loro posizione di innesto. Sono principalmente costituite da fibre di collagene e di elastina, contengono vasi sanguigni e esternamente sono ricoperte dalle cellule endoteliali dell'endocardio [7]. In letteratura sono state proposte differenti classificazioni. Si riporta quella di Muresian, che riprende e semplifica quella di Lam et al. [10] basata sulla posizione di inserzione delle stesse: **corde del primo ordine** o primarie che si innestano nella porzione distale dei foglietti (corde commissurali, marginali e quelle che si inseriscono nelle fessure dei segmenti del foglietto posteriore); **corde del secondo ordine**, che sono quelle che non si innestano nei margini liberi dei foglietti e infine, quelle di **terzo ordine**, tra cui troviamo: quelle strutturali, spesse che si inseriscono a livello del foglietto anteriore e quelle basali che si congiungono a livello della zona prossimale del foglietto [Fig. 1.9]. In tabella [Fig. 1.10] sono riportate le differenti classificazioni operate da Lam e Ritchie[11] e per ultima quella proposta da Muresian, con relativa spiegazione delle varie funzioni svolte da ciascun tipo di corde.

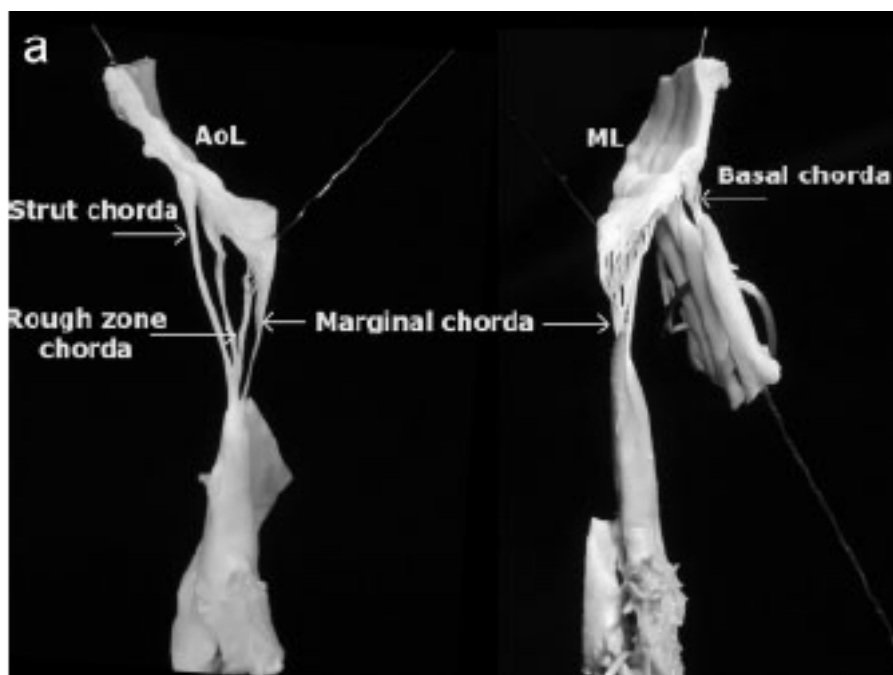


Figura 1.9 - Tipologie di corde tendinee. [7]

Old terminology	Lam et al. (1970)	Ritchie et al. (2005)
First order ^a	Commissural Rough zone cords of AoL and ML that insert into the free margin Branches of the cleft cords of the ML	Commissural Posterior marginal cord Anterior marginal cord
Second order ^b	Rough zone cords of AoL and ML that insert beyond the free margin Strut cords of the AoL Main stem of cleft cords of the ML	Posterior intermediate cord Anterior strut cord
Third order ^c	Basal cords of ML	Basal posterior cord
Type of cord	Major role	Equivalent traditional terms
Proposed simplified classification		
Marginal cords	Essential for coaptation	"First order"
Rough zone cords	Essential for leaflet geometry	"Second order"
Strut (sustain) cords	Essential for ventricular geometry	
Basal cords	Annular reinforcement	"Third order"

Figura 1.10 - Classificazioni delle corde tendinee mitrali. [7]

1.2 Fluidodinamica della valvola mitrale

Durante la diastole, in particolare nella fase di rilassamento isovolumetrico, la differenza di pressione tra atrio e ventricolo sinistro causa l'apertura dei lembi valvolari. La pressione transmitralica si mantiene positiva durante l'intero processo di riempimento ventricolare. Si possono identificare due picchi nell'onda di velocità della curva di flusso mitralico [Fig. 1.11]: il picco E, che si verifica durante la fase iniziale di riempimento ventricolare e il picco A, inferiore al primo, corrispondente alla contrazione atriale in fase tardo-diastolica che provoca un'accelerazione del sangue attraverso la valvola. In seguito si assiste ad una graduale decrescita nella velocità fino alla completa chiusura della mitrale. Valori fisiologici del rapporto di velocità E/A sono compresi tra 1,5-1,7[12].

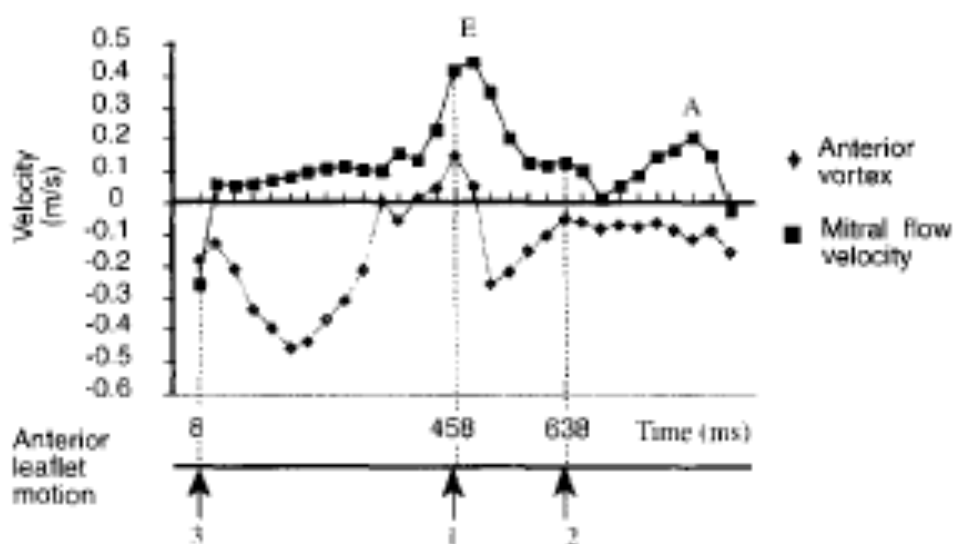


Figura 1.11 - Grafico velocità-tempo del flusso mitralico con evidenziato il movimento del foglietto anteriore mitralico. [16]

Inoltre, grazie a studi condotti mediante MRI [13], è stato possibile confermare la presenza di un vortice in fase di chiusura della valvola, durante l'inizio della contrazione atriale. Tale vortice è creato dal riempimento ventricolare ed è un elemento che concorre, insieme all'inversione della pressione transmitralica (a metà della fase sistolica) e alla tensione esercitata dalle corde tendinee, alla corretta chiusura valvolare [14].

1.3 Meccanica della valvola mitrale

La meccanica della valvola mitrale è un argomento complesso e ad oggi, sotto certi aspetti, ancora inesplorato (ad esempio non si ha ancora consolidata conoscenza sulla distribuzione delle forze agenti *in vivo* sull'annulus mitralico). Gli elementi che la compongono agiscono armonicamente per preservarne la natura dinamica ed è importante comprendere il comportamento di ciascuno di essi nelle diverse condizioni di carico.

La posizione di chiusura fisiologica dei foglietti mitralici in fase sistolica è determinata dall'equilibrio delle forze di allontanamento (*tethering forces* F_T), che agiscono impedendo la chiusura valvolare e di quelle di coaptazione (*coapting forces* F_C) che, invece, ne favoriscono la chiusura, proiettate lungo la direzione delle corde tendinee [Fig. 1.12][15].

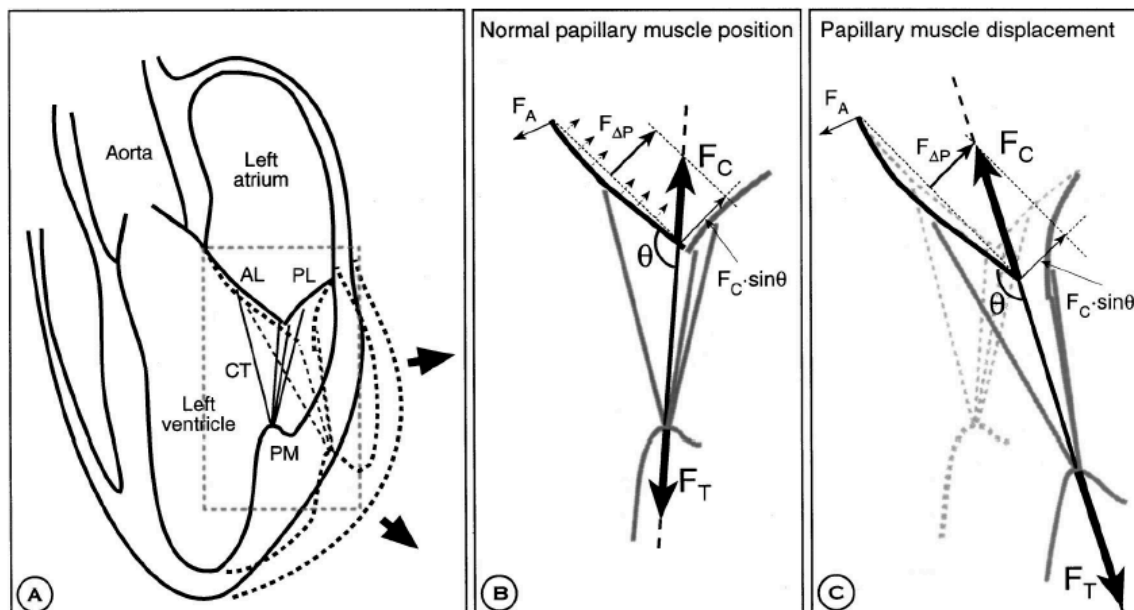


Figura 1.12 - Schematizzazione delle forze agenti in fase di chiusura mitralica. [15]

Tra le forze di allontanamento troviamo le forze anulari (F_A) e quelle dei muscoli papillari; l'ampiezza della loro risultante F_T è determinata dalla relazione spaziale dei muscoli papillari rispetto al piano dell'annulus. In generale, un aumento della distanza tra i due elementi provoca un aumento della risultante. Le forze in favore della coaptazione sono dovute alle forze agenti sulla superficie di entrambi foglietti causate dalla pressione transmitralica ($F_{\Delta P}$). Dal momento che quest'ultima opera in direzione perpendicolare ai foglietti, l'ampiezza della risultante F_C dipende anche dall'angolo di inserzione delle corde tendinee sui foglietti mitralici (θ). Tanto più tale angolo è diverso da 90° quanto più sarà maggiore la forza di coaptazione proiettata lungo la singola corda.

In definitiva, la geometria di coaptazione dei foglietti è influenzata da vari elementi geometrici e da fattori emodinamici, come la pressione transmitralica, che agiscono sulla distribuzione delle forze agenti lungo le corde tendinee e quindi sulla condizione di equilibrio dinamico dell'intero complesso valvolare mitralico [3,12,16].

Di seguito si descrive la meccanica delle strutture che costituiscono la VM.

➤ 1.3.1 I foglietti valvolari

Il foglietto anteriore interviene passivamente nel meccanismo di apertura e chiusura valvolare, offrendo un supporto transitorio per il foglietto posteriore in fase di chiusura. Infatti, inserendosi sulla porzione di annulus fibroso, partecipa in misura minore alle variazioni di area dell'orifizio valvolare, presenti durante l'intero ciclo cardiaco [4, 17,18]; al contrario, il foglietto posteriore, grazie alla contrazione delle fibre muscolari dell'annulus a cui è ancorato, è la struttura chiave per ottenere la completa coaptazione della valvola e la corretta apposizione dei foglietti l'uno contro l'altro (sovrapposizione simmetrica)[2, 5, 16]. Di seguito verrà descritto nel dettaglio il meccanismo di apertura e chiusura valvolare [19, 20].

-Apertura

1. La curvatura dei foglietti (con la concavità rivolta verso il ventricolo in fase sistolica) inizia ad appiattirsi e si inverte in modo da risultare convessa verso la camera ventricolare, mentre i margini liberi di entrambi i foglietti risultano ancora in contatto;

2. i margini liberi al centro della valvola iniziano a separarsi prima delle porzioni in prossimità delle due commissure e l'apertura del foglietto posteriore si verifica approssimativamente da 8 fino a 40ms più tardi;
3. una volta raggiunta la massima apertura valvolare, i bordi liberi evidenziano un movimento rallentato di avvicinamento e allontanamento, simile a quello di una bandiera mossa da una leggera brezza;
4. infine, la contrazione atriale in fase tardo-diastolica (picco A) genera l'ultimo e meno intenso impulso di apertura valvolare.

-Chiusura

1. Quando la porzione prossimale dei foglietti comincia ad ingobbirsi e a protrudere verso l'atrio, ha inizio la chiusura della valvola;
2. la concavità dei foglietti, rivolta verso il ventricolo, si sposta procedendo dalle porzioni prossimali verso quelle distali con un movimento simile ad un rotolamento, man mano che i foglietti si avvicinano all'atrio; i margini liberi sono le ultime zone a raggiungere il piano dell'annulus;
3. il processo di chiusura valvolare diviene completo tra 10 e 40 ms successivi alla fase iniziale di incremento sistolico della pressione ventricolare e con l'inizio dell'eiezione sistolica la curvatura dei lembi diviene maggiormente pronunciata.

La curvatura del profilo valvolare insieme alla conformazione a sella dell'annulus hanno un notevole impatto sulla meccanica dei foglietti, dal momento che concorrono a ridurre gli sforzi presenti sul foglietto anteriore [2, 19-24]. In particolare, il parametro denominato rapporto tra altezza anulare e larghezza commissurale (RAALC) *annular height to commissural width ratio* (AHCWR) [Fig. 1.13], che rappresenta il rapporto tra l'altezza anulare e il diametro commissurale è un importante modulatore degli sforzi agenti sui

foglietti valvolari in fase di sistole. Valori fisiologici dell'altezza dell'annulus sono compresi tra 0,6 cm e 1,4 cm. con un AHCWR all'incirca pari al 20-25%[2]. Studi computazionali hanno evidenziato che gli sforzi maggiori sono presenti nella zona centrale del foglietto anteriore e che la non planarità dell'annulus, quantificata attraverso l'AHCWR, contribuisce alla curvatura dei lembi valvolari e riduce le deformazioni presenti su questi ultimi [25].

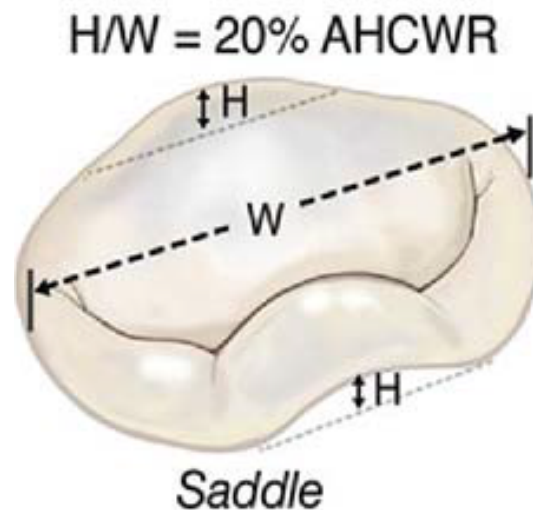


Figura 1.13 - Identificazione dei parametri dell' Annular Height to Commissural Width Ratio.

Studi condotti *in vitro*[4] e *in vivo* [26] per caratterizzare le deformazioni esistenti su entrambi i foglietti durante il funzionamento fisiologico della valvola mitrale hanno evidenziato che entrambi i lembi valvolari sono più rigidi in direzione circonferenziale rispetto a quella radiale e che è presente una eterogeneità intra-foglietto con le porzioni prossimali e centrali meno estensibili rispetto ai margini liberi[3].

Inoltre test biassiali condotti su entrambi i foglietti hanno rilevato una risposta tissutale quasi-elastica e anisotropa, dovuta all'allineamento preferenziale delle fibre di collagene di cui sono costituiti [4,40].

Infine, il foglietto posteriore, che ha una maggiore densità di inserzione delle corde tendinee (da 1,5 a 1,8 volte maggiore rispetto al foglietto anteriore), risulta meno rigido di quello anteriore [4,40].

➤ 1.3.2 L' annulus

L'area della sezione trasversale dell'annulus mitralico fisiologico è compresa tra i $5,0 \text{ cm}^2$ e gli $11,4 \text{ cm}^2$ [27] e, durante il ciclo cardiaco, influenzata dalla contrazione, dalla forma e dalla pressione sia atriale che ventricolare, subisce variazioni in un range dal 20% al 40% rispetto all'area della sezione trasversale anulare fisiologica [4, 19]. L'area anulare è minima in fase tardo-sistolica per facilitare la coaptazione valvolare e, incrementando le dimensioni durante il rilassamento isovolumico e successivamente in diastole, raggiunge la massima apertura in fase tardo-diastolica, favorendo in questo modo il riempimento del ventricolo sinistro. In particolare, il restringimento dell'orifizio valvolare è dovuto principalmente alla contrazione atriale in fase tardo-diastolica, che può causare fino al 90% della diminuzione dell'area anulare, mentre la contrazione ventricolare sistolica è responsabile del rimanente 10% del restringimento dell'annulus [28].

Durante il ciclo cardiaco, le regioni anulari competenti al foglietto posteriore hanno la maggiore escursione di movimento, avvicinandosi all'annulus anteriore, che rimane relativamente immobile, in fase sistolica e allontanandosi in fase diastolica.

Il ruolo svolto dalla giunzione mitro-aortica è fondamentale per assicurare che le valvole mitrale e aortica lavorino in sincronia in ogni sequenza cardiaca.

In fase sistolica, l'annulus posteriore si sposta (dai 3 ai 16 mm) verso l'apice cardiaco, mentre quello anteriore subisce un movimento verso l'atrio di piccola entità, contribuendo all'incremento dell'area dell'orifizio aortico in fine sistole e accompagnando l'aorta nel suo movimento [4]. In diastole invece, la porzione posteriore dell'annulus si sposta (dai 2 ai 4 mm) verso l'atrio sinistro, mentre la porzione anteriore si muove in direzione dell'annulus aortico, incrementando l'area dell'orifizio mitralico per favorire il riempimento ventricolare [12]. Infine in fase tardo-diastolica, a causa della contrazione atriale, si evidenzia un restringimento dell'orifizio che causa un aumento della velocità del flusso transmitralico di circa il 20%.

Uno studio computazionale[4] ha stimato che gli sforzi maggiori (circa pari a 4,3 KPa) si sviluppano in fase tardo-diastolica e in inizio sistole, nelle regioni corrispondenti ai due trigoni. Inoltre Padala et al. [19] hanno dimostrato che la conformazione non planare dell'annulus è in grado di ridurre in modo significativo le deformazioni presenti sul

foglietto posteriore, in fase di chiusura valvolare.

➤ **1.3.3 I muscoli papillari**

Entrambi i muscoli papillari si contraggono contemporaneamente e contribuiscono all'aumento e alla diminuzione del volume della camera ventricolare dal 5% all'8% in fase diastolica e dal 15% fino al 30% in fase sistolica, incrementando così l'eiezione ventricolare[28]. Nonostante in fase sistolica i muscoli papillari si accorcino di circa un quarto della loro lunghezza, la loro contrazione è considerata relativamente poco rilevante rispetto a quella esibita dalle fibre muscolari delle pareti ventricolari[4]. Inoltre, in letteratura non esiste un consenso in merito all'esatta temporizzazione della contrazione e del rilassamento papillare durante il ciclo cardiaco. In generale però, i muscoli papillari seguono la dinamica ventricolare, contraendosi e in parte accorciandosi in fase di eiezione sistolica e rilassandosi con un leggero allungamento durante l'intera fase diastolica, modificando minimamente la loro lunghezza durante i periodi isovolumetrici[12].

Inoltre numerosi studi [29-31] hanno dimostrato l'esistenza di una stabilità anulo-papillare durante l'intero ciclo cardiaco, ovvero la distanza tra le teste di entrambi i muscoli papillari e le corrispondenti porzioni anulari rimane inalterata sia in fase sistolica che in fase diastolica.

➤ **1.3.4 Le corde tendinee**

La tensione delle corde tendinee e lo schema di inserzione delle stesse sui foglietti valvolari hanno un notevole impatto sulla geometria di coaptazione valvolare; inoltre esiste una diretta relazione tra la distribuzione degli sforzi agenti sui foglietti e la ripartizione delle corde tendinee lungo la superficie dei lembi valvolari [32]. In fase di chiusura valvolare, il carico agente sui foglietti viene gradualmente trasmesso alle corde tendinee, dapprima quelle più sottili, ramificate a partire da quelle più spesse, che per ultime sostengono il carico. Questa struttura triangolare nella diramazione delle corde tendinee è stata dimostrata essere fondamentale per la corretta competenza valvolare [32].

Per quanto concerne le forze agenti lungo le corde sono stati registrati valori di picco sistolico medio pari a 0,2 N sulle corde primarie e valori pari a 0,7 N su quelle secondarie, misurati *in vivo* su modello porcino [33]. Successivi studi *in vitro* hanno permesso di rilevare che le corde secondarie possono sopportare carichi significativamente (fino a tre volte) maggiori rispetto a quelle primarie[3]. Tali corde garantiscono un certo grado di stabilità anulo-papillare durante il ciclo cardiaco, inserendosi all'altezza dei trigoni sinistro e destro, rappresentando quindi il veicolo di trasmissione di carico preferenziale durante l'eiezione ventricolare.

La relazione tra sforzi e deformazioni presenta un andamento non lineare e la massima deformazione registrata durante il ciclo cardiaco, pari a $4,29\% \pm 3,43\%$, è quella esistente sulle corde strutturali che si inseriscono sul foglietto anteriore [34].

1.4 Patologie della valvola mitrale

In questa sezione verranno evidenziate le forme patologiche della valvola mitrale rilevanti per il presente lavoro. Le patologie della valvola mitrale possono essere classificate principalmente in due categorie: la stenosi mitralica e l'insufficienza mitralica. Di seguito verrà trattata esclusivamente l'insufficienza valvolare mitralica, con particolare attenzione all'insufficienza mitralica funzionale (IMF).

➤ 1.4.1 L'insufficienza valvolare mitralica

La competenza funzionale della valvola mitrale dipende dalla armoniosa interazione tra gli elementi che la compongono (annulus, foglietti, muscoli papillari, corde tendinee) e le camere cardiache in questione. Una geometria fisiologica del ventricolo sinistro e un corretto allineamento dei muscoli papillari e delle corde tendinee assicura la coaptazione dei lembi valvolari e impedisce il prolasso durante la sistole ventricolare [4]. Disfunzioni di uno o più componenti di questo complesso valvolare-ventricolare può causare l'insufficienza mitralica.

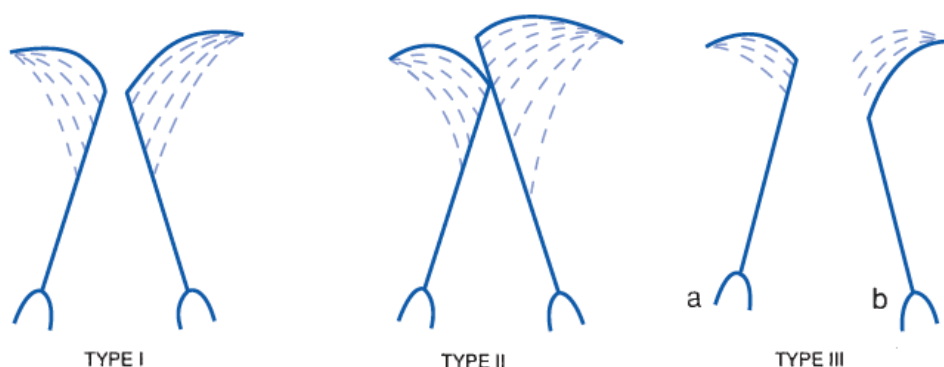
Tralasciando le anomalie congenite che risultano di raro riscontro nella patologia dell'adulto, è possibile distinguere eziologicamente le seguenti forme di insufficienza [4]:

- degenerativa;
- reumatica (post-infiammatoria);
- funzionale o secondaria a miocardiopatia dilatativa;
- ischemica (una sottocategoria dell'insufficienza funzionale);
- infettiva (endocardite batterica), in misura minore rispetto alle quattro cause sopra citate.

In generale, quattro tipi di cambiamenti strutturali dell'apparato valvolare possono produrre insufficienza valvolare: ritiro dei foglietti mitralici dovuto a fibrosi o calcificazione, dilatazione dell'annulus, anomalie delle corde tendinee (si includono rottura, elongazione o accorciamento) e disfuzioni ventricolari con o senza coinvolgimento dei muscoli papillari.

In letteratura la classificazione più nota e utilizzata per l'insufficienza mitralica è quella proposta da Carpentier et al. (1980) [35] [Fig. 1.14], basata sulla mobilità dei lembi e delle corde tendinee:

- normale (tipo I), causata principalmente dalla dilatazione dell'annulus, spesso secondaria alla dilatazione del ventricolo sinistro come accade nella cardiomiopatia dilatativa (insufficienza funzionale) o nei pazienti con cardiomiopatia ischemica, o ancora può essere associata a perforazione del lembo dovuta ad endocardite (insufficienza infettiva);
- eccessiva o prolassante (tipo II), tipicamente dovuta a insufficienza degenerativa, ma può anche verificarsi in seguito a rottura di una o più corde tendinee conseguente ad infarto;
- restrittiva (tipo III), generata dalla patologia reumatica; inoltre quest'ultima categoria è ulteriormente suddivisa in: restrittiva durante la diastole (tipo IIIa) e restrittiva durante la sistole (IIIb), tipicamente riscontrata nell'insufficienza mitralica ischemica o secondaria a cardiomiopatia dilatativa.



Tale classificazione può essere definita chirurgica, al contrario di quella suggerita da Barlow et al. (1985) [36] [Fig. 1.15] sulla base di differenti quadri anatomici:

- *billowing*, semplice rigonfiamento e protusione dei lembi in atrio sinistro;
- prolasso, spostamento sistolico dei lembi valvolari con mancata apposizione e coaptazione dei bordi mitralici con conseguente rigurgito;
- *floppy valve*, estrema protrusione in atrio sinistro di voluminosi foglietti mitralici associata ad allungamento ed assottigliamento delle corde tendinee;
- *flail valve*, valvola mitrale disancorata in un punto qualsiasi dell'apparato di sostegno, per rottura di corde tendinee.

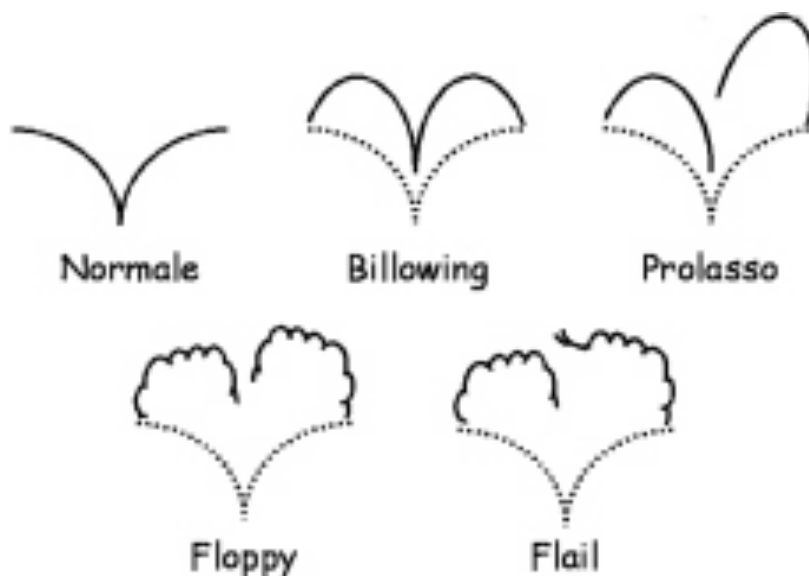


Figura 1.15 - Classificazione dell'insufficienza mitralica operata da Barlow. [38]

Nel 1987 Devereux et al. [37] proposero un'ulteriore classificazione:

- prolasso classico, con spostamento superiore e/o posteriore dei lembi mitralici rispetto all'annulus valvolare durante la sistole e spessore dei lembi aumentato (≥ 5 mm);
- prolasso non classico, con spessore dei lembi < 5 mm.

Quindi secondo Barlow et al. la definizione di prolasso valvolare mitralico è la perdita di coaptazione tra i margini liberi dei lembi mitralici, associata o meno all'anomala

protrusione (*billowing*) dei lembi stessi in atrio sinistro. L'insufficienza mitralica è una condizione necessaria per la definizione, anche se non sufficiente. Al contrario per Devereux et al. il prollasso valvolare mitralico è la protrusione, uno spostamento sistolico superiore o posteriore dei lembi mitralici o di parte di essi, in relazione all'anello, indipendentemente dal fatto che sia mantenuta o meno la coaptazione dei foglietti. Pertanto, l'insufficienza mitralica non è una condizione implicita nella definizione, ma una delle possibili complicanze. Attualmente nel nostro Paese viene impiegata maggiormente la seconda definizione [38].

➤ 1.4.1.1 L'insufficienza mitralica degenerativa

Il termine degenerativo abbraccia un ampio spettro di patologie e include le sindromi di Marfan e di Ehlers Danlos. Le modifiche subite dalla valvola includono l'ispessimento e l'allungamento, dovuto alla rottura delle fibre di collagene, dei lembi valvolari e possono coinvolgere da una singola porzione di un solo foglietto, fino ad entrambi i foglietti nella loro interezza [39]. Carpentier. ha operato una distinzione all'interno della patologia degenerativa mixomatosa tra le due forme di presentazione più frequentemente riscontrate: la Malattia di Barlow e il Deficit della Fibroelastica [Fig. 1.16].

La Malattia di Barlow si caratterizza per un eccesso di tessuto valvolare di aspetto, opaco, con evidente e diffusa ridondanza e rigonfiamento dei lembi, ispessimento delle corde tendinee e frequente dilatazione dell'annulus. L'Insufficienza Fibroelastica invece si caratterizza per la perdita connettivale, che rende la valvola più sottile e trasparente del normale, corde compresse, con

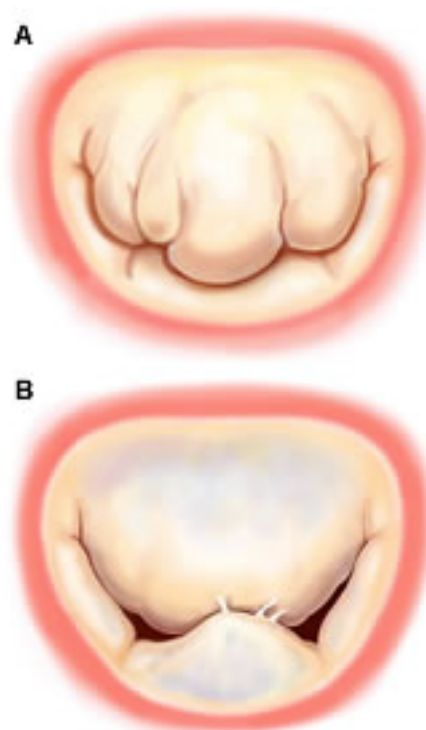


Figura 1.16 - (A) Malattia di Barlow; (B) Deficit della Fibroelastica.

ispessimento tissutale limitato al solo segmento prolapsante. e la dilatazione anulare, quando presente, risulta meno marcata.

➤ **1.4.1.2 L'insufficienza mitralica reumatica**

Nonostante l'incidenza delle febbre reumatica sia ormai in netta diminuzione nei paesi civilizzati, tuttavia essa rimane una delle cause più comuni dell'insufficienza mitralica in tutto il mondo [3, 4, 39]. Tale patologia comunemente può coinvolgere anche un certo grado di stenosi associata o meno all'insufficienza valvolare. Tipicamente i lembi si fondono a livello delle commissure, si ispessiscono diventando rigidi, mentre le corde possono esibire accorciamento ed essere inserite su muscoli papillari fibrotici. In aggiunta, può verificarsi la calcificazione di alcune porzioni dei foglietti, dell'annulus e dell'intero apparato sub-valvolare. Tali modifiche sono causa della ridotta mobilità dei foglietti sia in sistole che in diastole, spiegando così la coesistenza di stenosi e insufficienza [3].

➤ **1.4.1.3 L'insufficienza mitralica funzionale**

L'insufficienza mitrale funzionale (IMF) impedisce la corretta coaptazione dei lembi valvolari causata da disfunzioni (modifiche nella geometria e nel movimento delle pareti ventricolari) e più specificatamente dalla dilazione del ventricolo sinistro, cardiomiopatia dilatativa (con una prevalenza di circa l'80%) o cardiomiopatia ischemica, dovuta ad infarto del miocardio (con una prevalenza del 10%) [40].

L'IMF, ischemica o meno, dovrebbe quindi essere considerata primariamente una patologia del ventricolo sinistro con effetti secondari sul complesso valvolare mitralico.

Sulla base delle differenti alterazioni morfologiche dell'apparato mitralico è possibile operare una differenziazione in due gruppi distinti: modifiche valvolari (annulus e foglietti) e sub-valvolari (muscoli papillari e corde tendinee).

Per quanto concerne le anomalie indotte nella forma e nella cinematica dell'annulus mitralico, si ha una dilazione più marcata in direzione del diametro septo-laterale (+25% ±

12%) rispetto a quello commissurale ($+9\% \pm 5\%$), con una conseguente diminuzione dell'eccentricità anulare, risultante quindi in una forma più circolare [41]. Pertanto, sia il perimetro che l'area dell'orifizio valvolare incrementano le loro dimensioni. La dilatazione anulare risulta asimmetrica in quanto si verifica quasi esclusivamente nella porzione di annulus muscolare, dove si inserisce il foglietto posteriore. Nonostante quest'ultima sia considerata l'alterazione morfologica principale, la sola dilatazione dell'annulus non è sufficiente per causare l'IMF; in aggiunta, si verificano cambiamenti nella forma tridimensionale anulare, come l'appiattimento della conformazione a sella che induce alterazioni nella distribuzione degli sforzi agenti sui lembi valvolari e modifiche nella curva di pressione-volume cardiaca [3].

Accanto ai mutamenti che riguardano forma e dimensioni dell'annulus, anche i foglietti valvolari possono subire cambiamenti nella loro morfologia, ovvero entrambi tendono ad aumentare di circa il 35% la loro area come meccanismo adattativo, nel tentativo di compensare l'incremento dell'area dell'orifizio valvolare dovuta alla dilatazione ventricolare[.]. In conclusione i lembi mitralici diventano eccessivamente ridondanti (dal 28% al 50% più lunghi rispetto a quelli fisiologici) e causa della maggior presenza di tessuto fibrotico e del minor contenuto d'acqua e più spessi (di circa il 34% per il foglietto anteriore e fino al 31% per il foglietto posteriore) [3].

Considerando le modifiche sub-valvolari, le corde tendinee risultano più rigide del 16% e globalmente meno estensibili [15]; in aggiunta, rimangono tese per l'intero ciclo cardiaco, sopportando sforzi ben superiori a quelli fisiologici e nei casi più gravi, possono andare incontro a rottura.

Infine, l'alterazione morfologica ritenuta più importante, al pari di quella subita dall'annulus, è il riposizionamento dei muscoli papillari. Infatti, la dilatazione ventricolare e la conseguente mutata dinamica della parete cardiaca influiscono sulla posizione dei muscoli papillari, dislocandoli lateralmente (o medialmente), posteriormente e apicalmente (o combinazioni di quest'ultime direzioni), producendo uno squilibrio nelle forze agenti sul complesso valvolare mitralico. In particolare, aumentano notevolmente le forze di allontanamento (*tethering forces*), incrementando la tensione delle corde tendinee, a discapito delle forze in favore della coaptazione, come la pressione transmitralica, impedendo la corretta chiusura valvolare [15]. Quindi è possibile affermare che il grado di

IMF è fortemente dipendente dalla distanza dei muscoli papillari dal piano anulare [Fig. 1.17].

Il meccanismo che si instaura è un circolo vizioso: tanto più è il grado di IMF quanto più è dilatato il ventricolo sinistro; tanto più è dilatato il ventricolo quanto più i muscoli papillari sono dislocati e infine, tanto più questi ultimi subiscono spostamenti quanto più è elevato il grado di IMF.

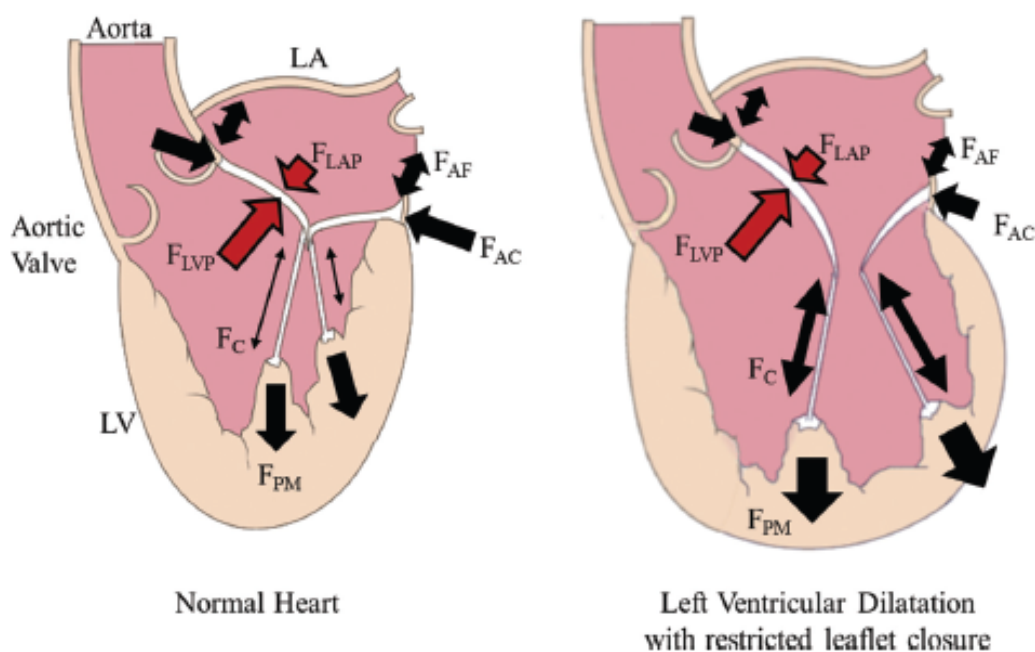


Figura 1.17- Meccanismo dell'insufficienza mitralica funzionale. [42]

Il dislocamento dei muscoli papillari può avvenire simmetricamente o asimmetricamente; Kwan et al. [42] hanno rilevato gli angoli esistenti tra il piano dell'annulus e i differenti segmenti del foglietto anteriore e di quello posteriore [Fig. 1.18]. Nella cardiomiopatia dilatativa (ischemica o non ischemica) tutti gli angoli aumentano in maniera rilevante, perciò lo spostamento papillare è simmetrico. Nel caso dell'insufficienza mitralica ischemica, non accompagnata da dilatazione ventricolare, tutti gli angoli tra i segmenti posteriori e l'annulus risultano maggiori (P3: da 32° a 62°; P2: da 32° a 57°; P1: da 34° a 56°); tra i segmenti anteriori troviamo un aumento in A3 (da 21° a 39°) e in A2 (da 23° a 32°), mentre non viene riscontrata una variazione apprezzabile in A1 (da 23° a 27°); tali modifiche risultano in un dislocamento asimmetrico dei muscoli papillari. Infine, si è riscontrato che è molto più frequente lo spostamento unilaterale (di un solo muscolo papillare) rispetto a quello bilaterale (39% contro il 5%).

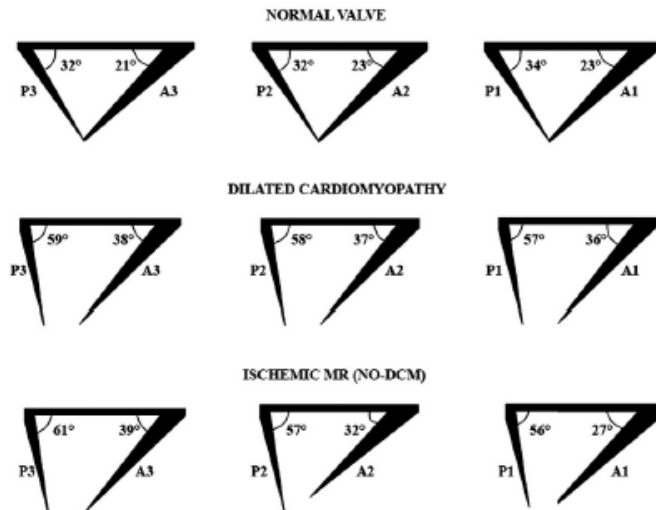


Figura 1.18 - Angoli tra piano anulare e i segmenti di ciascun foglietto in tre differenti condizioni. [42]

Infine, è bene ricordare che *in vivo* non è possibile analizzare individualmente i singoli fattori che concorrono all'IMF, ma studi *in vitro* hanno rilevato che è necessario il 75% di dilatazione anulare per produrre insufficienza valvolare, in assenza di dislocamento dei papillari, invece quando quest'ultima si verifica, l'IM ha luogo con valori significativamente inferiori di dilatazione dell'annulus [43]. In definitiva, si può affermare che lo spostamento dei muscoli papillari causa l'IM mentre la presenza della dilatazione anulare può aumentare il volume rigurgitante in atrio.

1.5 Tecniche di riparazione della valvola mitrale

Attualmente si sta assistendo ad un graduale incremento delle tecniche di riparazione valvolare, preferite sempre più a quelle sostitutive nel trattamento della maggior parte delle patologie legate all'IM [44], a causa dei minori rischi associati (endocarditi infettive, tromboembolismo) e complicazioni legate all'assunzione di anticoagulanti. Nonostante questo trend positivo, solamente il 36% degli interventi mitralici sono riparativi, contro il restante 64% delle sostituzioni valvolari. Tale evidenza riflette la realtà di fondo, ovvero che, per effettuare con successo questi interventi riparativi, è necessario acquisire abilità chirurgiche mirate, per affrontare la maggior complessità tecnica propria di simili

operazioni [12]. Lo sviluppo della chirurgia valvolare ha permesso di introdurre notevoli innovazioni nelle modalità di esecuzione delle tecniche oramai consolidate per il trattamento delle patologie valvolari e in particolare mitraliche, come ad esempio: interventi mini-invasivi, roboticamente assistiti ed infine percutanei transcateretere.

I motori che hanno dato impulso a questa evoluzione sono il desiderio di assicurare cure migliori ai pazienti eseguendo incisioni sempre più piccole e mirate, la possibilità di ottenere ricoveri più brevi e non da ultimo, ridurre i costi ospedalieri [45].

In questa sezione, tratteremo in dettaglio le principali tecniche di riparazione mitralica transcateretere, ad oggi considerate le più innovative e di maggior interesse per il presente lavoro.

➤ **1.5.1 Tecniche di riparazione mitralica transcateretere**

La riparazione percutanea transcateretere della VM sta emergendo come metodo all'avanguardia per trattare l'IM attraverso approccio non chirurgico e a cuore battente.

Rispetto agli interventi mini-invasivi, le tecniche percutanee offrono un trauma complessivo minore, permettendo quindi un immediato recupero da parte del paziente e vantaggi di tipo estetico [4].

In generale, le principali tecniche prevedono un riadattamento di quelle normalmente impiegate nella chirurgia a cuore aperto (riduzione dell'annulus o riparazione edge-to-edge proposta da Alfieri, chiamata anche riparazione a doppio orifizio), ma allo stesso tempo non possono replicare alcuni aspetti propri della chirurgia riparativa (resezione quadrangolare dei foglietti, modifiche cordali o ancora rilocalizzazione dei muscoli papillari).

Le riparazioni percutanee mitraliche possono essere categorizzate in quattro generali approcci:

- annuloplastica indiretta, tramite seno coronarico;
- annuloplastica diretta;
- rimodellamento ventricolare;
- riparazione dei foglietti.

➤ 1.5.1.1 Annuloplastica indiretta o sinoplastica

L'annuloplastica attraverso seno coronarico ha lo scopo essenziale di ridurre la circonferenza dell'annulus mitralico e ripristinarne la conformazione fisiologica, diminuendo il diametro antero-posteriore; in tal modo si favorisce l'avvicinamento del foglietto posteriore a quello anteriore, permettendo così una miglior coaptazione valvolare in pazienti con dilatazione anulare. La maggior parte dei dispositivi impiegati è inserita all'interno del seno coronarico, la principale vena del miocardio, che è esternamente in prossimità e circa sullo stesso piano dell'annulus posteriore [Fig. 1.19]. La quasi totalità degli impianti (ad esempio Cardiac Dimensions Carillon ed Edwards Monarc) [Fig. 1.20] si ancorano sia nella porzione anteriore dell'annulus (nella vena cardiaca magna, vicino all'entrata della vena interventricolare anteriore) che in quella posteriore (in prossimità dell'ostio) del solco coronarico [46]. Al fine di ottenere i risultati terapeutici voluti, questo approccio dovrebbe essere in grado di fornire un adeguato grado di tensione per ridurre l'IM, senza scivolamenti o rotture del dispositivo.

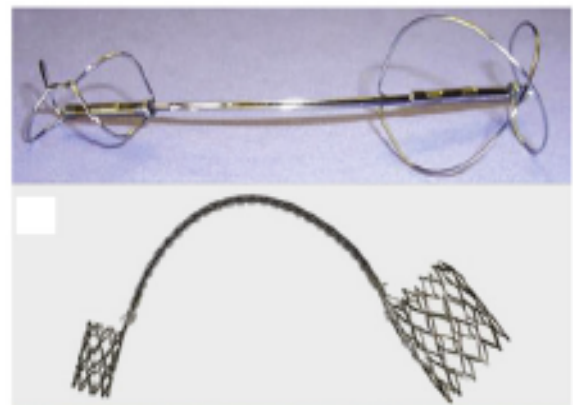
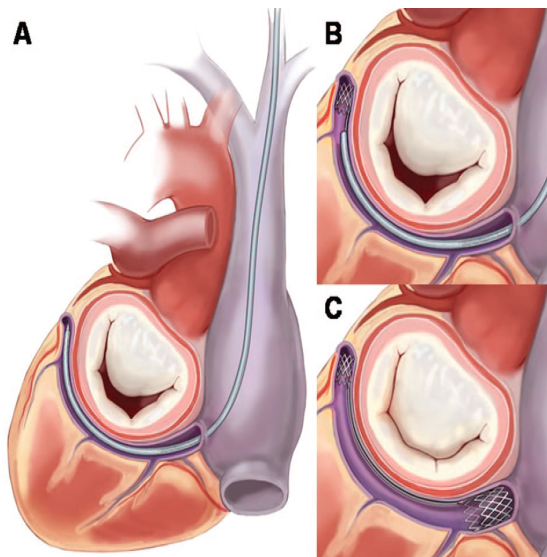


Figura 1.19 - Rappresentazione schematica della procedura di annuloplastica coronarica eseguita con il dispositivo Monarc. [4]

Figura 1.20 - Dispositivi per la sinoplastica. Dall'alto verso il basso: Carillon; Monarc. [4]

Le criticità presenti in questo tipo di metodologia sono diverse[47], ad esempio: la distanza variabile tra il seno coronarico e l'annulus potrebbe inficiare il successo della procedura; infatti in alcuni pazienti, il seno coronarico è situato al di sopra del livello anulare, a contatto con la parete atriale sinistra e l'inserimento del dispositivo stringerebbe quest'ultima, senza ripristinare la corretta conformazione anulare e quindi non riducendo l'IM. Un'ulteriore preoccupazione è legata al rischio di eventi ischemici coronarici, a causa della vicinanza tra il seno coronarico e l'arteria circonflessa.

➤ 1.5.1.2 Annuloplastica diretta

I dispositivi di questa categoria si propongono di rimodellare l'annulus utilizzando un approccio ventricolare diretto[4], come ad esempio quello proposto da Guided Delivery Systems (Accucinch), che prevede l'inserimento di un anello parzialmente flessibile posizionato sul versante ventricolare anulare e assicurato all'annulus posteriore mediante apposite strutture di ancoraggio.

Il sistema chiamato Mitralign [4] [Fig. 1.21] sfrutta l'attrazione magnetica tra un catetere inserito in maniera retrograda nel ventricolo sinistro, posizionato tra il foglietto posteriore e la parete intraventricolare posteriore, e un catetere di riferimento, introdotto nel seno coronarico. Una volta ancorati magneticamente, con una porzione di annulus al loro interno, il primo catetere è impiegato per applicare una serie di punti collegati tra loro nell'annulus posteriore, che successivamente tirati, pinzano l'annulus e ne riducono la circonferenza.

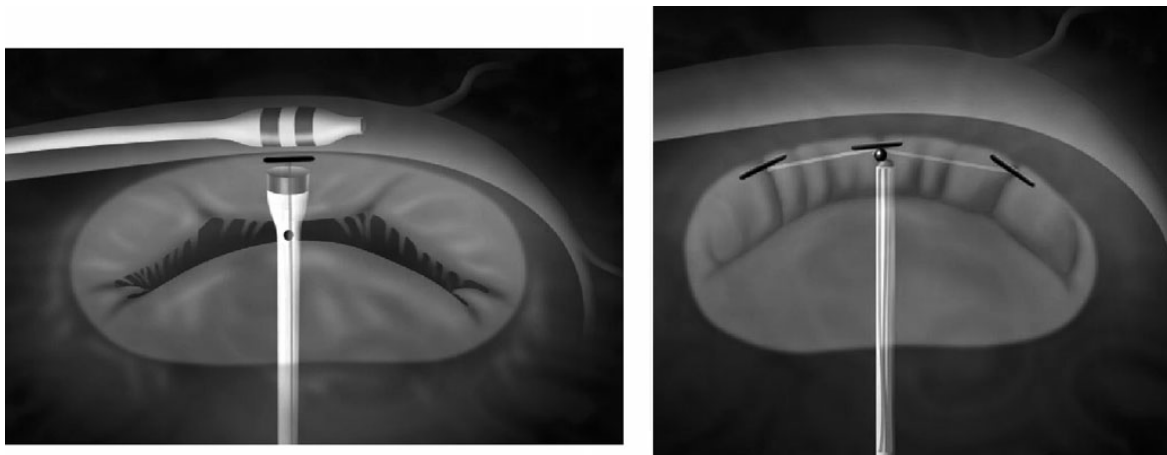


Figura 1.21 - Annuloplastica diretta eseguita con il dispositivo Mitralign. [4]

La Quantum Cor ha sviluppato un dispositivo (Q-care), ancora in fase di sperimentazione animale, che rimodella l'annulus tramite radiofrequenza: riscaldando il tessuto fino a 65°C, può causare la contrazione delle fibre di collagene dell'annulus posteriore.

➤ 1.5.1.3 Rimodellamento ventricolare

I dispositivi progettati per il rimodellamento ventricolare si basano sul concetto che la geometria alterata del ventricolo sinistro, con il conseguente spostamento dei muscoli papillari, è uno degli elementi chiave nella patogenesi della IMF.

Il sistema Mycor Surgical Coapsys[4] sfrutta un paio di cuscinetti posizionati sull'epicardio, connessi attraverso una barra, in grado di ridurre il diametro antero-posteriore sia dell'annulus mitralico che della porzione ventricolare immediatamente sottostante. Una versione non chirurgica di questo dispositivo (iCoapsys) [Fig. 1.22] prevede l'applicazione dei cuscinetti lateralmente alle arterie coronarie discendenti anteriore e posteriore, attraverso approccio pericardico; questi ultimi sono connessi a un deflessore antero-posteriore esterno aggiustabile, posto sopra alla parete laterale ventricolare. Stringendo gli elementi connettivi, la parete ventricolare laterale avanza e provoca così la diminuzione del diametro antero-posteriore dell'annulus.

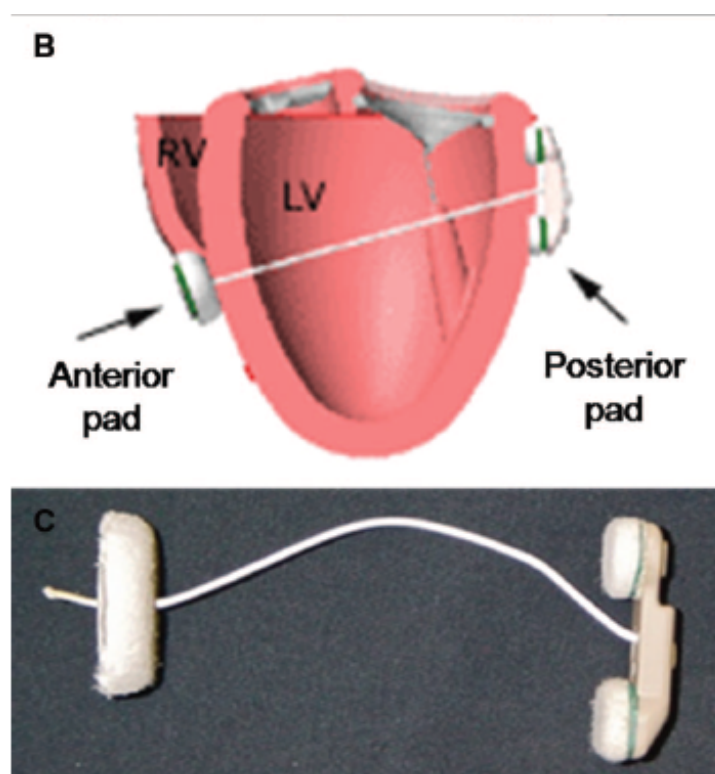


Figura 1.22 - Dispositivo per il rimodellamento ventricolare iCoapsys. [4]

➤ 1.5.1.4 Riparazione dei foglietti

La riparazione percutanea dei lembi mitralici mira a riprodurre l'intervento edge-to-edge, introdotto nella pratica clinica da Alfieri. L'intervento chirurgico consiste nella sutura dei foglietti valvolari a livello dei margini liberi, in corrispondenza dell'origine del rigurgito. Solitamente la sutura è posizionata centralmente, dando origine ad una valvola con doppio orifizio; talvolta quest'ultima è applicata in una delle commissure, avendo come risultato una valvola con un orifizio singolo [48].

Lo strumento maggiormente impiegato per eseguire questa tecnica con l'approccio transcateretere è chiamato MitraClip (Abbott Vascular) [Fig. 1.23] e può essere utilizzato sia in presenza di IM degenerativa che funzionale.

Il sistema è costituito da un impianto in poliestere rivestito in cobalto-cromo con due bracci, che possono essere aperti e chiusi all'occorrenza con un meccanismo controllabile.

L'unione dei margini liberi dei lembi si ottiene applicando una clip sotto guida ecografica, a cuore battente, allineando il dispositivo con le porzioni A2-P2, in modo da risultare perpendicolare alle commissure. Rispetto all'intervento chirurgico, la procedura MitraClip eseguita per via percutanea, offre il vantaggio, oltre che di una minore invasività, di poter sfruttare la guida ecografica durante la realizzazione dell'operazione. Inoltre, nel caso di risultato subottimale, la clip può essere riposizionata, oppure affiancata da una addizionale.

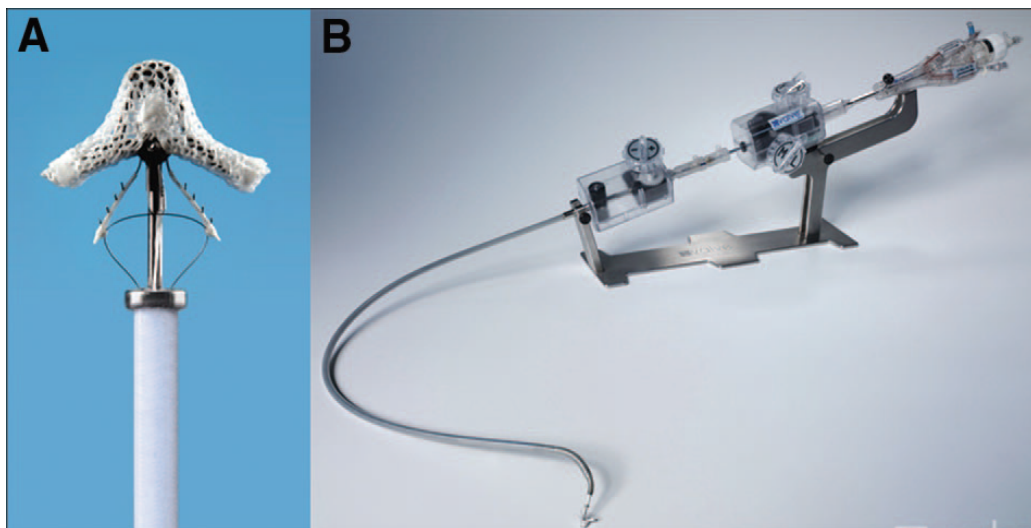


Figura 1.23 - (A) Dispositivo Mitraclip in configurazione aperta; (B) Delivery system per il dispositivo Mitraclip. [49]

Nei pazienti con IMF, tale dispositivo è in grado di migliorare la coaptazione valvolare e creando un “ponte” tra i due lembi, limita la dilatazione dell’annulus e induce un rimodellamento ventricolare inverso, promuovendo in questo modo un circolo virtuoso a scapito dell’insufficienza [49].

1.6 Valutazione della coaptazione dei foglietti valvolari mitralici

La necessità di andare a quantificare l’entità della coaptazione valvolare nasce prevalentemente per fornire un valido strumento per valutare il successo di determinate procedure chirurgiche, specificatamente, nel contesto di questo lavoro, volte a trattare l’insufficienza valvolare mitralica, ad esempio mediante anuloplastica con anello protesico. [71]

La posizione di chiusura dei foglietti della valvola mitrale è determinata dall’equilibrio delle forze agenti lungo le corde tendinee: forze che agiscono in favore della coaptazione e forze che, al contrario, si oppongono a quest’ultima. [15]

Molti studi effettuati *in vitro* si sono quindi avvalsi di trasduttori di forza applicati alle corde tendinee [72-73] per rilevare tutte le forze in gioco agenti sul complesso valvolare, di sonomicrometria per indagare il comportamento dell’annulus valvolare [19, 77, 78] e di metodi di stereofotogrammetria per l’analisi delle deformazioni dei foglietti valvolari [18, 22, 58, 21], in diverse condizioni sperimentali, sia fisiologiche che patologiche. In aggiunta, *in vivo* sono state condotte diverse analisi sia mediante ecografia transtoracica che transesofagea e sempre più frequentemente, con ecografia 3D, per la validazione dei risultati ottenuti *in vitro*.

Diversi autori hanno proposto dettagliate valutazioni geometriche della struttura valvolare, andando ad estrarre angoli, lunghezze e proponendo indici al fine di ottenere una comprensione più approfondita della cinematica valvolare ed in particolare dell’entità della coaptazione dei foglietti ed identificare il ruolo di tali determinanti in condizioni sperimentali di interesse. [15, 42, 56] [Fig. 1.24]

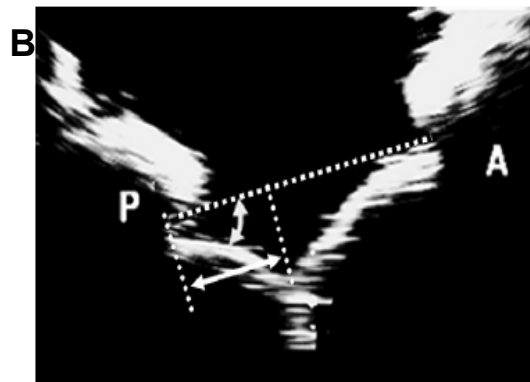
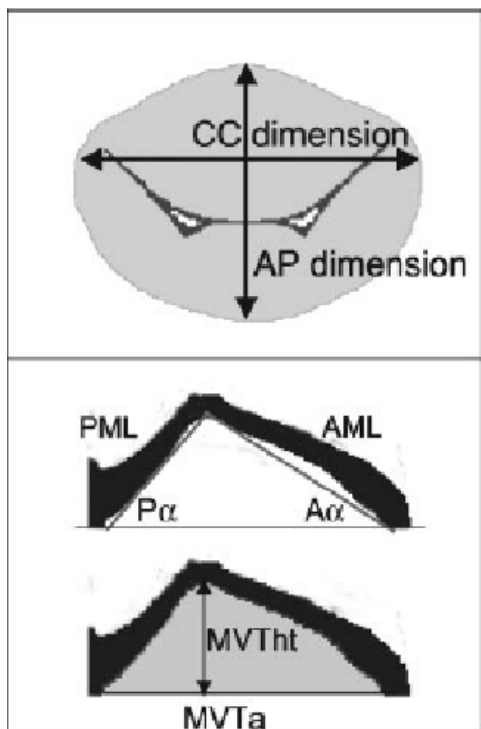
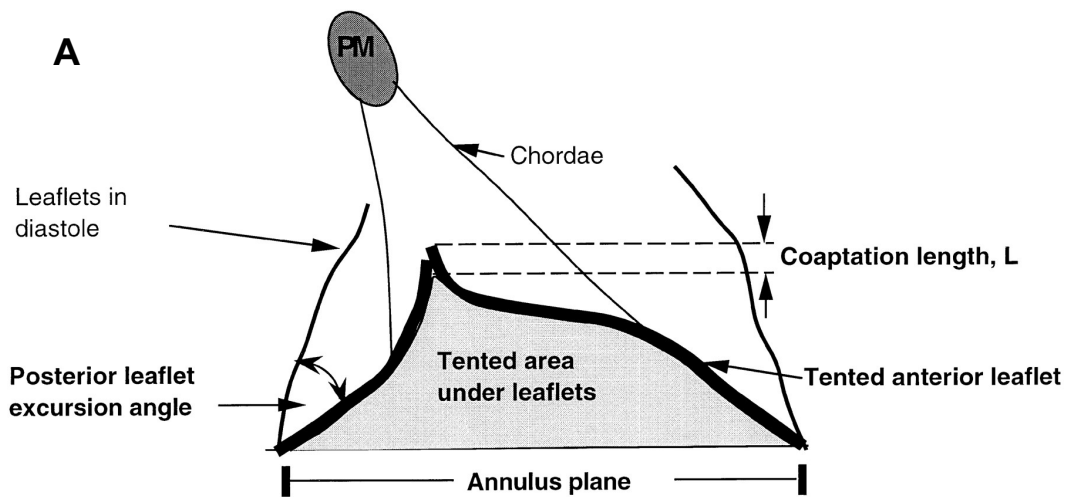


Figura 1.24 - Identificazione dei parametri utilizzati per caratterizzare la mobilità e la coaptazione dei foglietti mitralici: (A) he (1997); (B) Kwan; (C) Padala.

Si riportano di seguito, a titolo esemplificativo, alcune delle grandezze rilevate *in vivo* mediante ecografia transtoracica (TTE) ed ecografia transesofagea (TEE) rispettivamente. Nel lavoro di Lee et al. [79], considerando proiezioni ecografiche parasternali in asse lungo [Fig. 1.25] sono state misurate:

- ❖ l'area racchiusa tra i foglietti mitralici e il piano dell'annulus;
- ❖ la lunghezza di coaptazione (CL) definita come la lunghezza di contatto dei foglietti in fase sistolica;
- ❖ la profondità di coaptazione (CD), ovvero la minima distanza tra la coaptazione e il piano dell'annulus;
- ❖ l'angolo racchiuso tra il piano dell'annulus e la porzione basale del foglietto anteriore (ALA_{base});
- ❖ l'angolo racchiuso tra il piano dell'annulus e la porzione distale del foglietto anteriore (ALA_{tip});
- ❖ l'angolo racchiuso tra il piano dell'annulus e il foglietto posteriore (PLA).

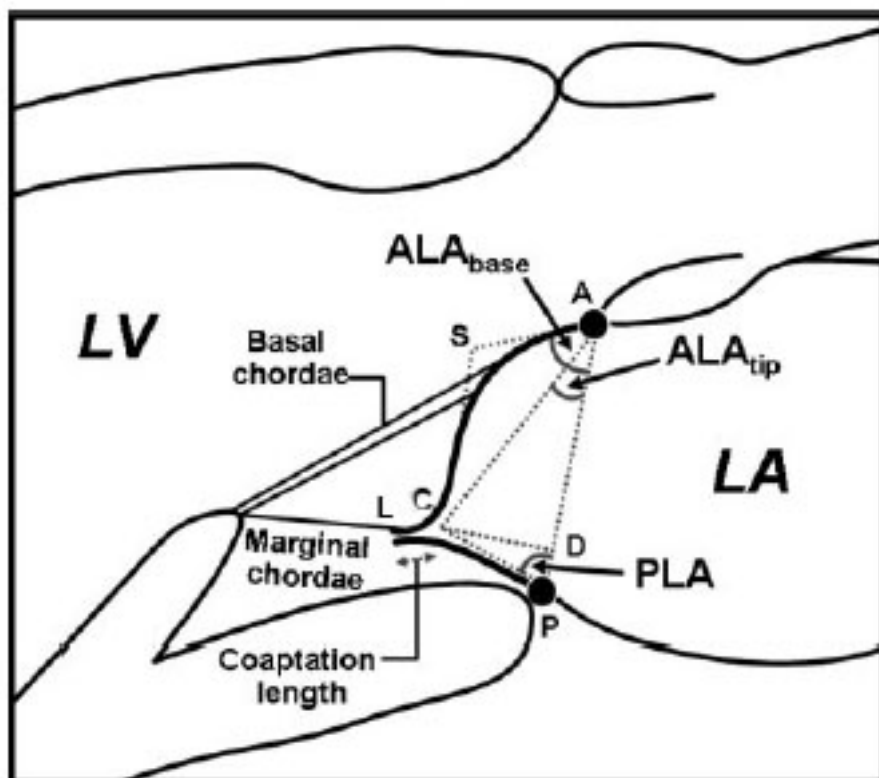


Figura 1.25 - Identificazione dei parametri utilizzati per caratterizzare la coaptazione mitralica in proiezione parasternale in asse lungo effettuata con TTE. [79]

Yamauchi et al. [80] [Fig. 1.26] hanno proposto un indice di lunghezza di coaptazione (CLI) definito come segue:

$$CLI = \frac{(Ad - Ac)}{MVd}$$

dove:

- Ad: lunghezza del foglietto anteriore, misurata in fase diastolica;
- Ac: la lunghezza non coaptante del foglietto anteriore in fase tardo-sistolica;
- MVd: lunghezza dell'annulus valvolare in proiezione in asse corto, dove Vd è definita come la profondità di coaptazione.

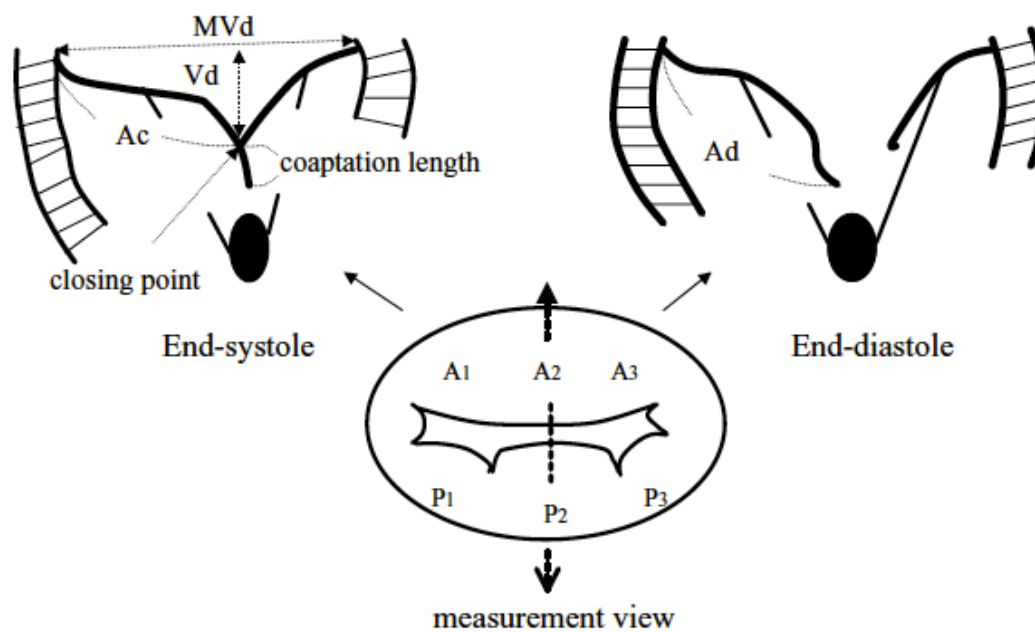


Figura 1.27 - Identificazione dei parametri di interesse utilizzati per caratterizzare la coaptazione mitralica in vista a tre camere e in asse corto (figura centrale) effettuate con TEE. [80]

2.

STATO DELL'ARTE

Il principale scopo del presente capitolo è di fornire al lettore una breve ma significativa panoramica sui banchi prova sviluppati per l'analisi fluidodinamica cardiaca.

La caratteristica essenziale di questi ultimi è quella di poter condurre test *in vitro* in grado di simulare, in un ambiente controllato e ripetibile, condizioni emodinamiche fisiologiche e, all'occorrenza, patologiche.

Le prime tre sezioni del capitolo mirano ad indagare gli esponenti cardine delle diverse tipologie di banchi prova esistenti: per valvole protesiche meccaniche, per complessi valvolari *ex vivo* e per cuori interi umani e porcini. Particolare attenzione sarà attribuita a quelli rilevanti per il presente lavoro, ovvero: banchi prova per **complessi valvolari mitralici e banchi prova per cuori interi porcini**.

Nella quarta sezione verranno esaminati in dettaglio i due banchi prova utilizzati: il *setup* di Leopaldi et al. [50] presso il ForCardioLab dell'Ospedale Luigi Sacco di Milano e il *setup* di Leopaldi et al. [51] presso il Dipartimento di Ingegneria Biomedica dell'Università Tecnica di Eindhoven (TU/e).

Inoltre, si analizzeranno le differenze funzionali presenti tra i due, evidenziando pregi e punti critici che hanno determinato alcune scelte progettuali del protocollo sperimentale impiegato.

Infine, nella sezione conclusiva verranno esposte le tecniche più utilizzate per la valutazione della coaptazione dei foglietti valvolari mitralici.

2.1 Banchi prova per l'analisi fluidodinamica di protesi valvolari cardiache meccaniche

I primi banchi prova ideati furono primariamente utilizzati per la valutazione delle prestazioni fluidodinamiche di valvole cardiache meccaniche e consistevano in simulatori di forme d'onda azionati da motori passo-passo al fine di ricreare artificialmente i battiti cardiaci.

Uno dei primi esempi fu quello di **Cornhill et al. (1977)** [52] per testare protesi valvolari aortiche simulando il complesso ventricolo sinistro-aorta. Tale *setup* fu uno dei primi a prevedere la possibilità di ottenere curve di pressione e portata transvalvolari simili a quelle riscontrate in ambito fisiologico, utilizzando un modello a parametri concentrati (RCR) della circolazione arteriosa.

Il sistema [Fig. 2.1] prevede una sacca collassabile in silicone alloggiata in una camera d'aria chiusa, pressurizzata da un compressore controllato via computer, con frequenza regolabile mediante un'elettrovalvola. Al fine di simulare l'impedenza sistemica cardiovascolare presente a valle della valvola aortica, è stato impiegato un circuito idraulico a 3 elementi RCR: la resistenza caratteristica R_c simula l'impedenza caratteristica del ramo aortico, la resistenza periferica R_p la resistenza del sistema circolatorio periferico e la compliance C la deformabilità dei grandi vasi.

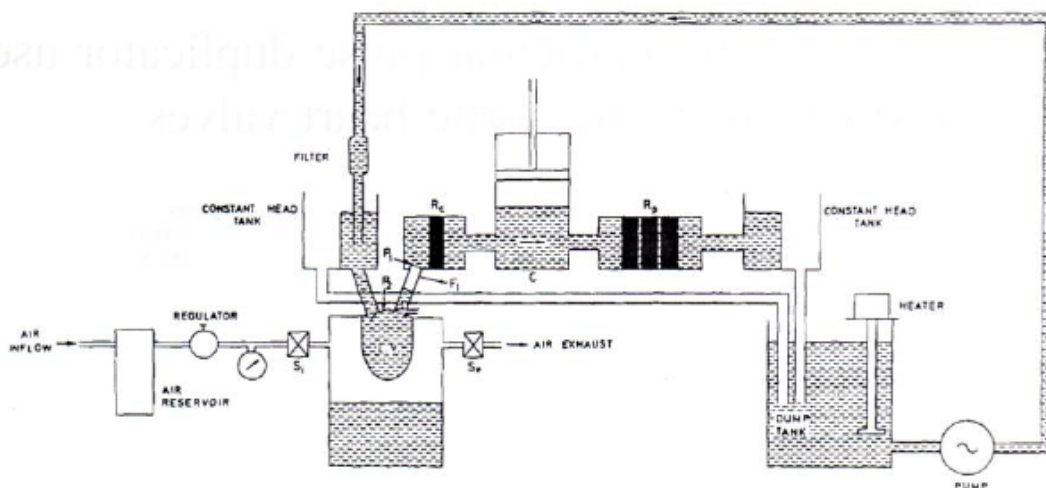


Figura 2.1 - Schema circuitale del setup utilizzato da Cornhill. [52]

Il *setup* di **Scotten** et al. (1979) [53] fu sviluppato per testare protesi valvolari mitraliche. Il sistema [Fig. 2.2] è composto da un motore elettrico che, mediante camma a disco, aziona un pistone che, pressurizzando ciclicamente il fluido di lavoro all'interno di una camera in materiale trasparente, agisce sulle pareti del simulatore di ventricolo sinistro, di forma conica e in materiale poliuretano. Il circuito idraulico di impedenza

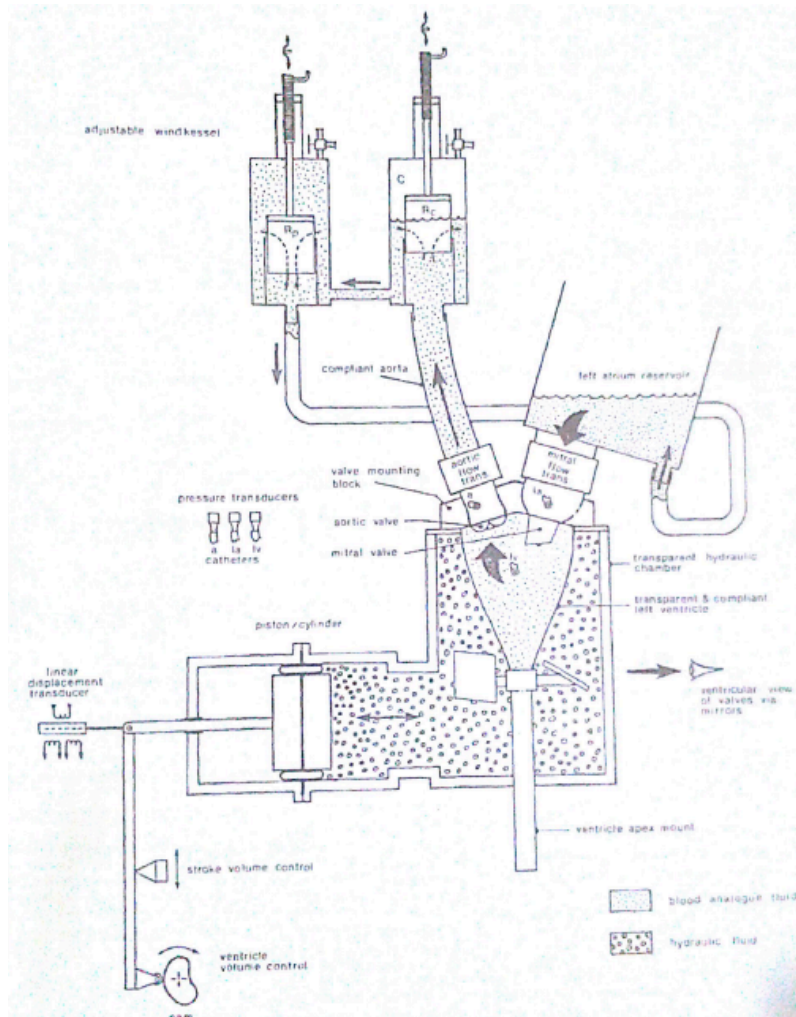


Figura 2.2 - Schema circuitale del setup utilizzato da Scotten.[53]

sistemica è costituito da un tubo aortico compliant in lattice di gomma e da un

circuito RCR. Le resistenze sono state realizzate usando un filtro per l'acqua in fibre di cellulosa, con diametri dei pori di $5\ \mu\text{m}$ e di $50\ \mu\text{m}$, rispettivamente per la resistenza caratteristica e per quella periferica. Modificando l'inserzione di tali filtri in un tubo di plastica è possibile andare a variare le lunghezze di questi ultimi durante il funzionamento del banco e di conseguenza, i valori di resistenza, ottenendo così una resistenza variabile discretamente. La compliance è stata creata con una camera d'aria chiusa situata al di sopra della resistenza caratteristica. Il fluido di lavoro è ricondotto in ingresso al precarico, costituito da un reservoir non regolabile in altezza. Per la realizzazione del sistema sono stati impiegati materiali trasparenti, che, congiuntamente all'uso di un fluido trasparente, hanno permesso di ottenere riprese della valvola in movimento con videocamera ad elevata

velocità e di registrare pressioni transmitraliche e flussi, al variare della frequenza cardiaca imposta, attraverso la valvola mitrale testata.

Il banco prova di **Verdonck** et al. (2002) [54] fu realizzato per l'analisi fluidodinamica di protesi valvolari meccaniche mitraliche e prevedeva la possibilità di acquisire immagini ecoDoppler per la valutazione dei parametri fluidodinamici della valvola protesica testata. Il *setup* [Fig. 2.3] è costituito da una sacca siliconica modellata sull'anatomia del ventricolo sinistro, alloggiata all'interno di una camera riempita d'acqua e connessa ad un reservoir cilindrico, che, mediante aria compressa convogliata al suo interno, permette di simulare la contrazione e il rilassamento della camera cardiaca. Il precarico è un reservoir controllabile da due tubi rigidi uscenti, rappresentanti le vene polmonari. Il circuito di postcarico a due parametri (RC), o modello Windkessel, è costituito dalla serie di un resistore idraulico e di una camera d'aria.

Mediante trasduttori di pressione e un flussimetro, è possibile rilevare le pressioni del ventricolo sinistro, la pressione atriale sinistra e il flusso a monte della valvola mitrale, calcolando in seguito la differenza di pressione transvalvolare e il volume di rigurgito della protesi. L'analisi ecografica, unitamente ai dati fluidodinamici, ha permesso di estrarre gli indici più comunemente usati per la valutazione delle performance valvolari.

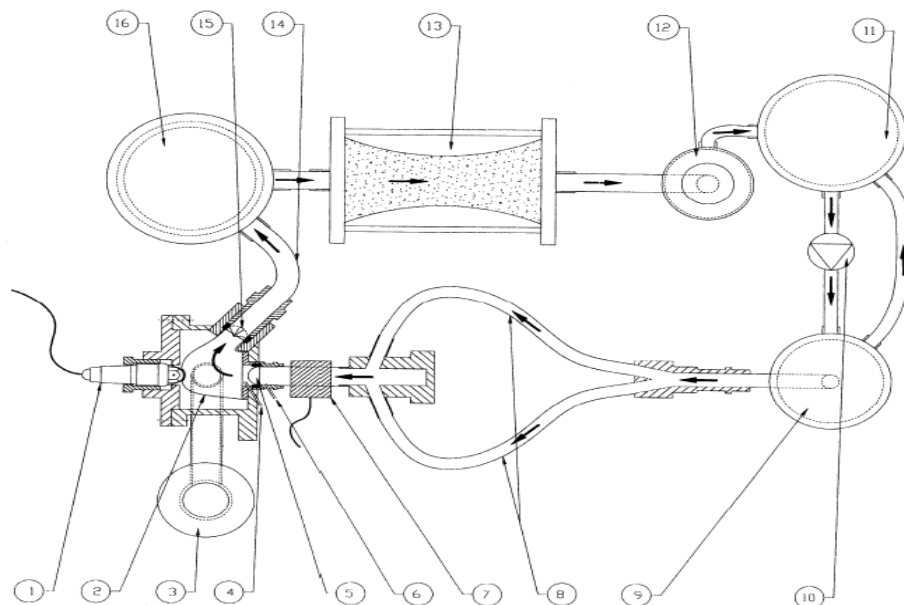


Figura 2.3 - Schema circuitale utilizzato da Verdonck. [54]

2.2 Banchi prova per il test di complessi valvolari espianati

Al fine di ottenere informazioni quantitative e affidabili sull'efficacia di determinate tecniche chirurgiche volte alla riparazione valvolare, ad esempio per meglio identificare quelle che conducono a migliori risultati clinici, si è assistito ad un progressivo inserimento di campioni biologici all'interno dei simulatori *in vitro*.

Di seguito si riportano dapprima un banco prova utilizzato per testare complessi valvolari aortici e successivamente banchi prova per complessi valvolari mitralici, con particolare riguardo verso questi ultimi.

➤ 2.2.1 Banchi prova per il test di complessi valvolari mitralici

Verso la fine degli anni '90 He et al. (1997) [56] idearono un *setup* per indagare, dapprima indipendentemente e successivamente in combinazione, gli effetti causati dallo spostamento laterale, apicale, posterolaterale dei muscoli papillari, dalla dilatazione dell'annulus e da due diverse pressioni di picco del ventricolo sinistro (90 mmHg e 150 mmHg), con lo scopo principale di verificare che l'insufficienza funzionale mitralica fosse il riflesso di un'alterazione nell'equilibrio delle forze agenti sui foglietti valvolari.

Il sistema (*Georgia Tech Left Heart Simulator*) [Fig. 2.4] ha subito notevoli ottimizzazioni negli anni, pur conservando la struttura principale, che consiste in una camera di alloggiamento per la valvola excisa, con all'interno delle asticelle regolabili per lo spostamento dei muscoli papillari nelle direzioni indagate. Un accesso nella zona apicale della camera ventricolare permette il riempimento e lo svuotamento della stessa, per mezzo di un sistema pompante pulsatile. Il precarico è costituito da un semplice reservoir che riempie la camera di alloggiamento, mentre il circuito di postcarico è un modello RCR con elementi regolabili.

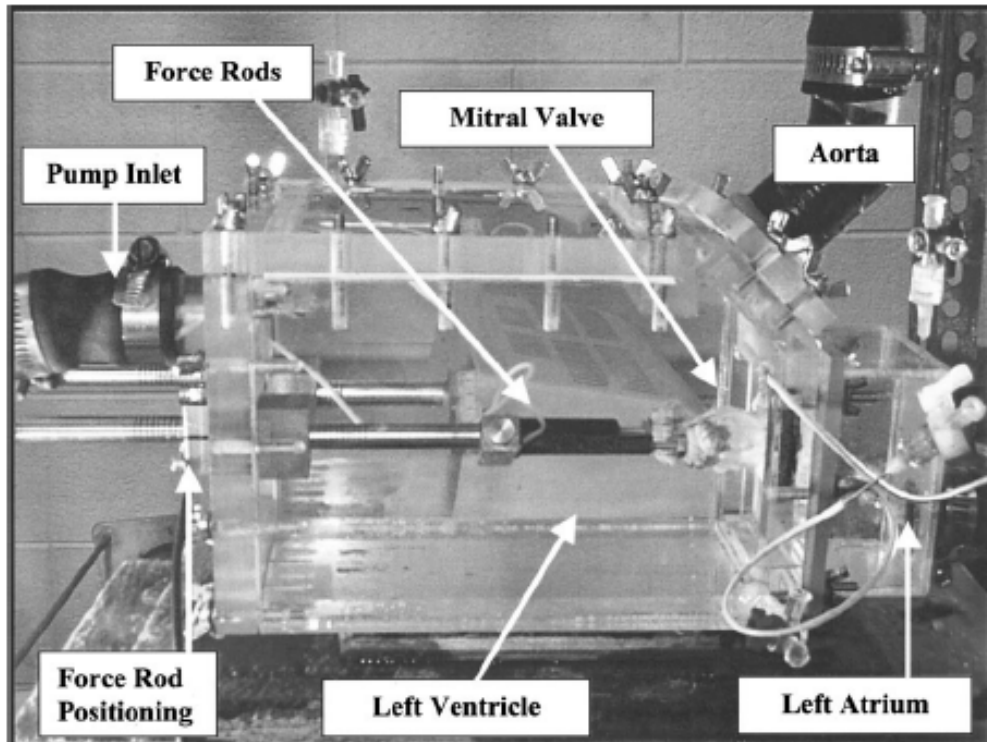


Figura 2.4 - Prima versione del Georgia Tech Left Heart Simulator.

Il sistema di alloggiamento del complesso valvolare permette una fine regolazione della forma e della dimensione dell'annulus, grazie ad un anello flessibile in silicone a cui è suturato [56] e la possibilità di variare tridimensionalmente la posizione dei muscoli papillari rispetto al piano valvolare; ciò è ottenuto grazie a due bracci controllabili ai quali sono ancorati i muscoli papillari, protetti da un patch in Dacron [Fig. 2.5].

La validazione del banco prova ha consentito di rilevare che i parametri fluidodinamici rispecchiano con buona approssimazione quelli fisiologici e, all'occorrenza, patologici.

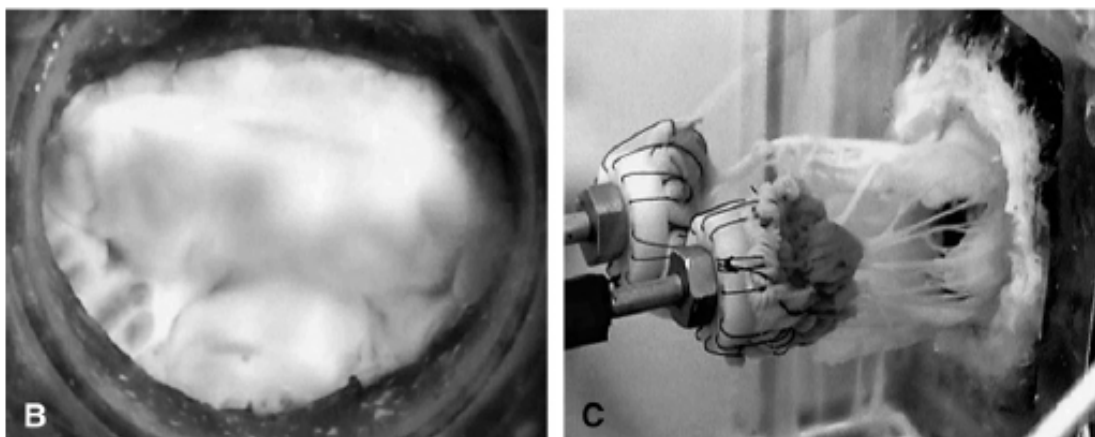


Figura 2.5 - A sinistra: anello flessibile in silicone a cui è suturato l'annulus; a destra: bracci controllabili ai quali sono ancorati i muscoli papillari.

Successivamente con tale *setup* si sono effettuate differenti analisi, oltre a quelle sopra citate, riguardanti la misurazione delle forze presenti sulle corde tendinee mitrali e indagini sulla cinematica valvolare, non solo attraverso tecniche di imaging, ma anche con riprese video [Fig. 2.6]. [20, 57]

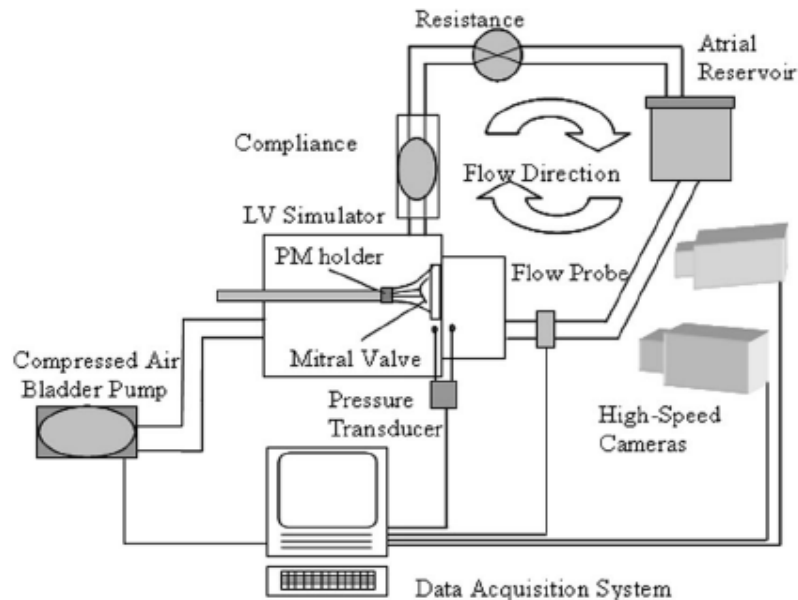


Figura 2.6 - Schema circuitale del Georgia Tech Left Heart Simulator in una successiva implementazione. [57]

Recentemente, sempre He et al. (2005) [22], con qualche variante introdotta al banco prova appena descritto, hanno condotto studi approfondendo il comportamento dinamico delle deformazioni presenti sia sul foglietto anteriore [21, 58] che sul foglietto posteriore della valvola mitrale, in conseguenza a spostamenti imposti ai muscoli papillari in diverse direzioni. Tali deformazioni sono state misurate avvalendosi di un sistema stereofotogrammetrico con due videocamere. In particolare è stata riprodotta una griglia di puntini sul foglietto analizzato, in una regione identificata come centrale, tra l'annulus e la linea di coaptazione dei due foglietti. Registrando, digitalizzando e successivamente analizzando una sequenza di immagini da entrambe le videocamere, durante il ciclo di apertura e chiusura della valvola, è stato possibile determinare gli sforzi principali e le deformazioni, riferiti all'area di interesse [Fig. 2.7].

Infine, si è proceduto al confronto tra i risultati riscontrati nei due foglietti considerando i medesimi spostamenti imposti ai muscoli papillari e in presenza delle stesse condizioni fluidodinamiche [Fig. 2.8].

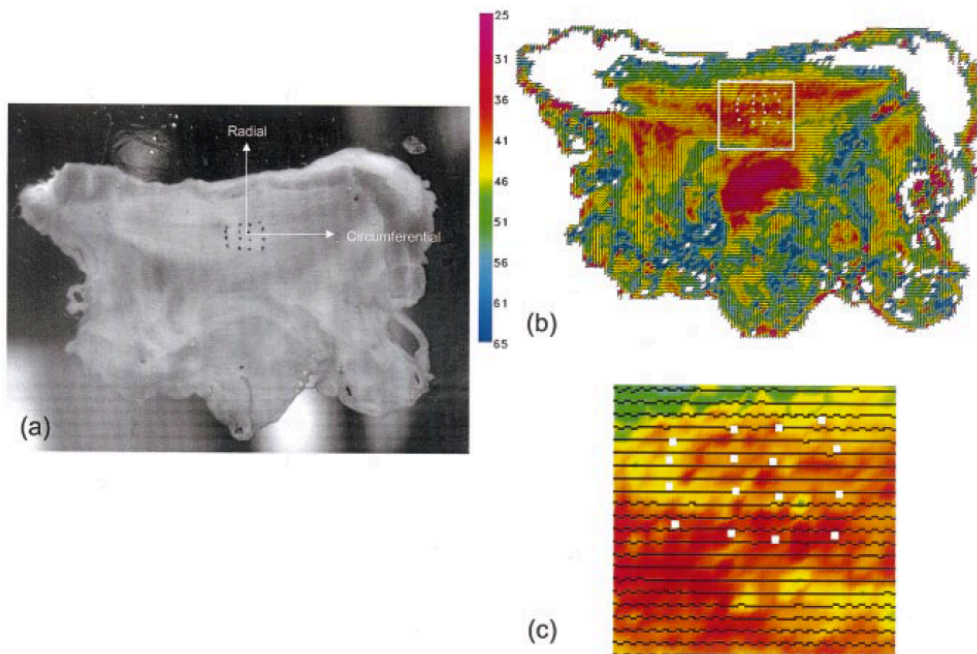


Figura 2.8 – (A) Foglietto anteriore mitralico exciso con evidenziati i 16 markers presenti nella porzione centrale; (B)-(C) risultati ottenuti mediante SALS (Small Angle Light Scattering) indicanti che i markers sono stati posizionati nella zona in cui le fibre di collagene sono altamente allineate. [58]

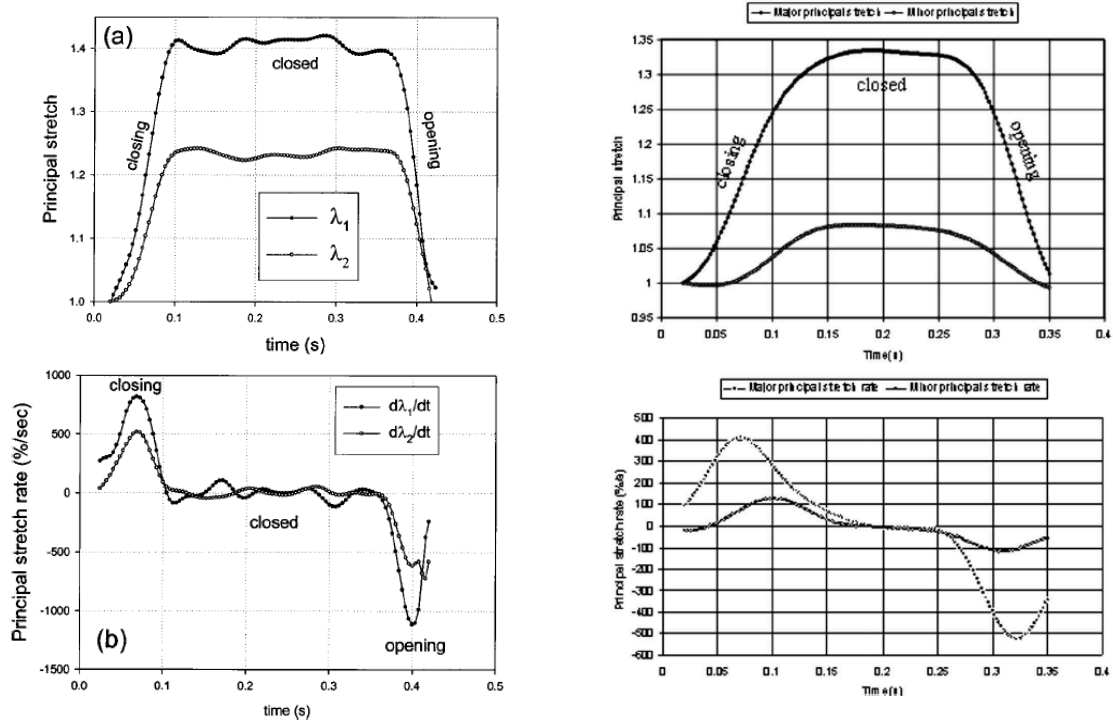


Figura 2.9 - Rapporti di allungamento principali del foglietto anteriore (a sinistra) e del foglietto posteriore (a destra). [21-22]

Inoltre tale banco prova è stato opportunamente modificato in modo da rappresentare un simulatore di cuore destro, al fine di replicare alcuni di questi esperimenti anche sulla valvola tricuspide. [59]

Recentemente Rabbah et al. (2013) [72], al fine di fornire un database di dati sperimentali con elevata affidabilità per la validazione di modelli numerici per valvole mitrali, hanno introdotto nel *setup* la possibilità di eseguire: indagini con micro-CT per ottenere l'anatomia del complesso valvolare mitralico ad elevata risoluzione, ecografia tridimensionale per visualizzare la geometria dei foglietti mitralici in fase sistolica e analisi con tecnica PIV digitale stereoscopica (Particle Image Velocimetry) per la misura delle componenti del campo di velocità del fluido di lavoro attraverso la valvola mitrale nelle tre dimensioni [Fig. 2.9].

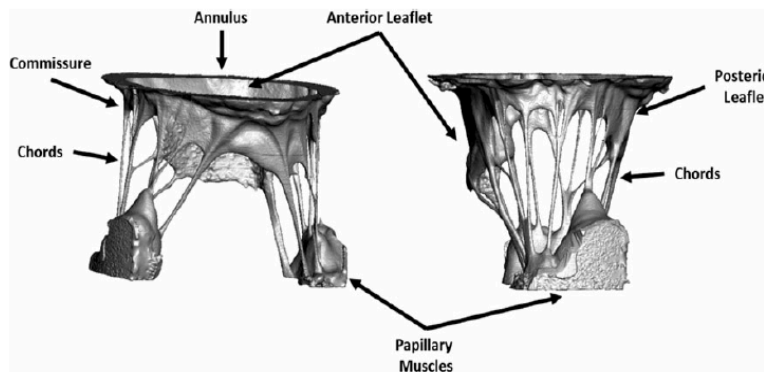
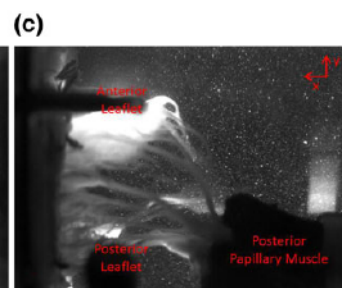
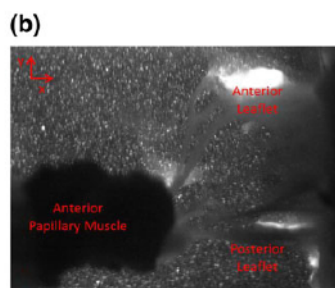
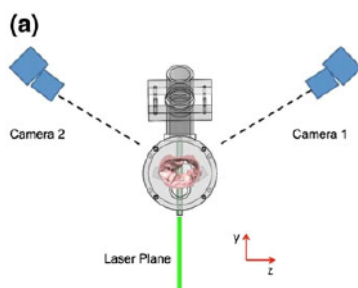
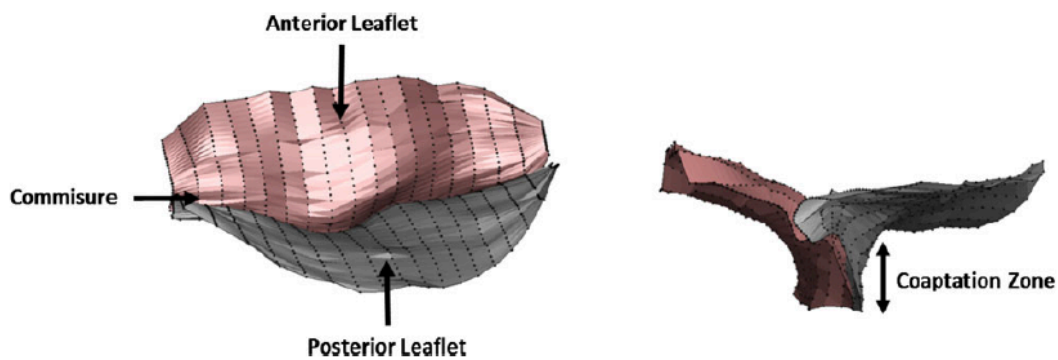


Figura 2.10 - Dall'alto verso il basso: geometria della valvola mitrale ottenuta tramite micro-CT, geometria dei foglietti valvolari coaptanti realizzata con eco-3D e analisi con tecnica PIV digitale stereoscopica. [72]



Il banco prova di **Arita et al. (2004)** [60] è stato progettato per simulare condizioni fisiologiche e patologiche del complesso valvolare mitralico, con la possibilità di riprodurre anche l'insufficienza mitralica ischemica agendo sulla deformazione dell'annulus e lo spostamento dei muscoli papillari rispetto al piano valvolare. La valutazione di tali condizioni è stata condotta sia da un punto di vista fluidodinamico che dal punto di vista annulare mediante un sensore laser di spostamento e una videocamera per osservare il movimento dell'annulus in 3D.

Il sistema [Fig. 2.10] è composto da pompa pulsatile pneumatica e il circuito di postcarico è un modello Windkessel con una resistenza concentrata e una compliance.

L'alloggiamento per il complesso mitralico è stato creato andando a misurare la configurazione dell'annulus valvolare mediante un microscopio digitale, ricreando un piatto in materiale polimerico che permettesse l'inserimento del campione sulla base delle misurazioni precedentemente effettuate. La valvola excisa è stata assicurata a una striscia in Nylon mediante suture e ed è stata utilizzata resina epossidica tra l'annulus mitralico e il suo alloggiamento per evitare perdite paravalvolari [Fig 2.11].

Il *setup* realizzato costituisce quindi un sistema versatile in grado di simulare condizioni fluidodinamiche sia fisiologiche, che patologiche, in particolare è possibile replicare diversi gradi di insufficienza mitralica causata, ad esempio dalla rottura delle corde tendinee o dallo spostamento dei muscoli papillari dovuto ad ischemia o dilatazione ventricolare ed effettuare procedure riparative come l'anuloplastica con anello protesico e valutare il comportamento e gli effetti indotti da tali dispositivi.

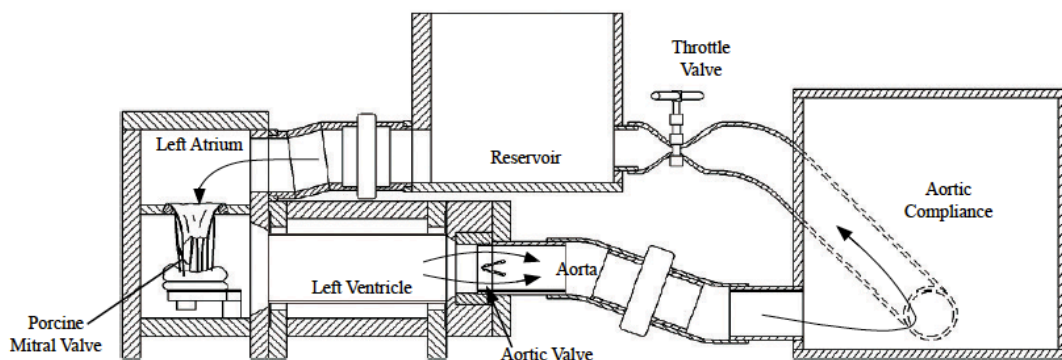


Figura 2.11 - Schema del setup utilizzato da Arita.[60]

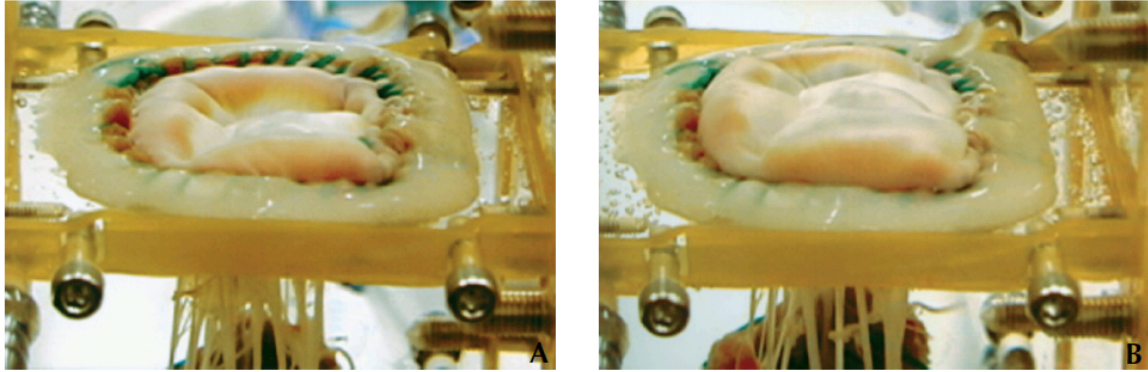


Figura 2.12 - Valvola mitrale alloggiata nel banco prova di Arita in fase sistolica, in condizioni normali (a sinistra) e in condizioni patologiche (a destra). [60]

Studi analoghi sono stati condotti da **Vismara** et al. (2011) [61] utilizzando un alloggiamento per il complesso mitralico [Fig. 2.12] con un'interfaccia sia per la camera atriale che per quella ventricolare, un sistema per assicurare l'annulus, uno per il posizionamento dei muscoli papillari e per la misurazione delle forze su di essi [Fig. 2.13]. Il sistema di azionamento e il postcarico sono analoghi a quelli impiegati nel banco ARFU (unità funzionale radice aortica) di **Vismara** et al. (2010) [55]; il primo consiste in una pompa a pistone che spingendo il fluido di lavoro innesca il movimento di una membrana in PP situata all'interno della camera ventricolare, mentre il secondo è un modello dell'impedenza sistemica a tre parametri.

Si sono misurati: flussi e pressioni transmitralici, le forze esistenti in diverse configurazioni spaziali dei muscoli papillari e sono stati registrati video delle valvole nelle varie modalità di lavoro.

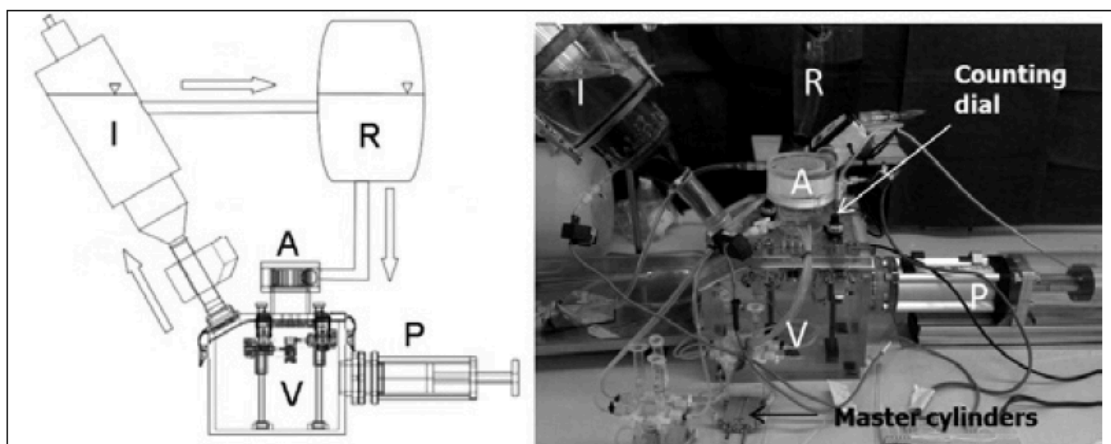


Figura 2.13 - Schema del setup utilizzato da Vismara (a sinistra) e foto del setup (a destra). [61]

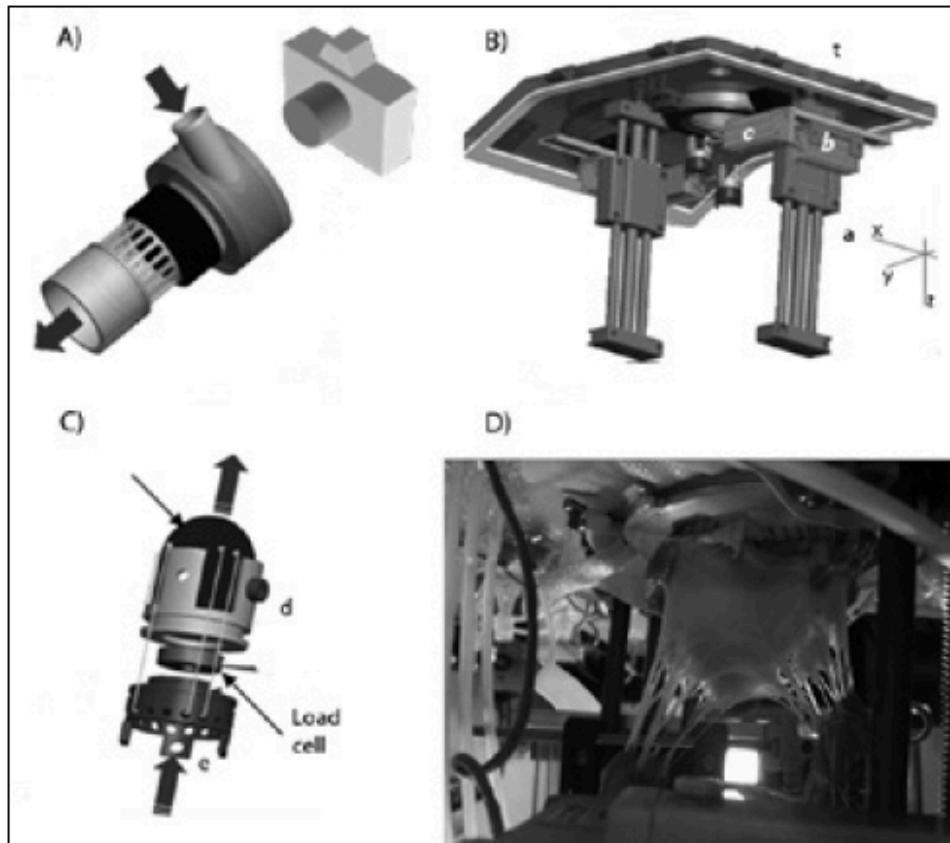


Figura 2.14 - Schema dei sottosistemi costituenti il banco prova: (A) posizione della camera per le riprese atriali della valvola mitrale; (B) rappresentazione 3D del sistema utilizzato per il posizionamento dei muscoli papillari; (C) particolare 3D delle celle di carico; (D) foto della valvola mitrale alloggiata nel setup. [61]

2.3 Banchi prova per intere strutture cardiache

L'evoluzione dei banchi prova è andata sempre più verso una direzione di integrazione delle strutture biologiche indagate. Si è assistito quindi alla progettazione di sistemi, con diversi gradi di complessità nella preparazione del campione, che prevedessero l'alloggiamento di cuori interi sia porcini che umani. Tale progresso ha ampliato lo spettro di analisi eseguibili *in vitro*. Da una parte ha reso attuabile l'approfondimento delle relazioni esistenti tra le diverse strutture cardiache, considerando ad esempio l'interazione tra di esse in condizioni di lavoro fisiologiche, patologiche oppure gli effetti indotti da determinate procedure chirurgiche o dispositivi, dall'altra ha introdotto ulteriori difficoltà riguardo alla riproducibilità dei test effettuati, dal momento che si considera una struttura

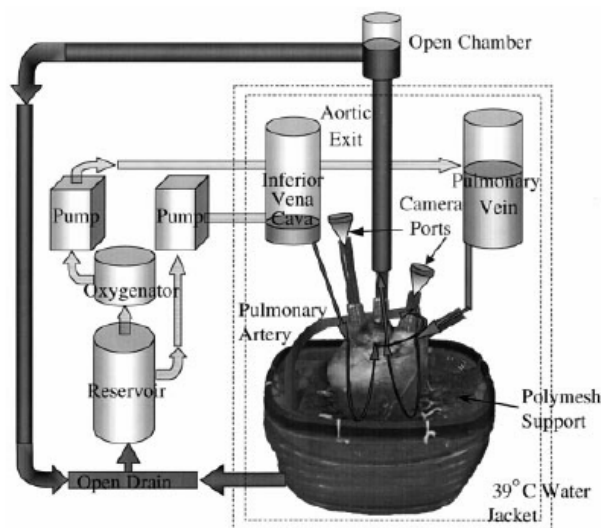
anatomica complessa e controllare le variabili in gioco e saperne distinguere gli effetti separatamente non sempre è possibile.

➤ 2.3.1 Banchi prova per cuori attivi

L'approccio *ex vivo* consiste nel ripristinare il comportamento elettrofisiologico di cuori isolati attraverso un'appropriata perfusione del miocardio. Sin dai primi esperimenti condotti da Langerdoff, molti gruppi di ricerca hanno tentato di creare *setup* per il funzionamento *ex vivo*, la maggior parte impiegando cuori di ridotte dimensioni (maiali della Guinea, ratti e conigli), ma solo pochi riuscendo a sviluppare piattaforme per modelli porcini.[70]

Il principale vantaggio di tali banchi prova risiede non solo nella capacità di riprodurre condizioni molto simili alla fisiologia umana, ma anche nella possibilità di applicare terapie farmacologiche ed eseguire procedure chirurgiche analoghe a quelle effettuate in ambiente clinico. Nonostante l'enorme potenziale offerto, ad oggi questo approccio è scarsamente adottato a causa delle molteplici criticità riscontrabili, come ad esempio la complessità della procedura di preparazione del campione e la tipologia di strumentazione coinvolta per sviluppare modelli cardiaci *ex vivo* rappresentativi.

Il *setup* di **Chinchoy et al.**(2002) [62] [Fig. 2.14] permette l'alloggiamento di un cuore porcino all'interno di un bagno termostato. La perfusione miocardica è assicurata per



mezzo di un precarico con soluzione cristalloide. Sono presenti inoltre un ossigenatore e un postcarico per simulare l'impedenza sistemica. Preservando l'inotropismo intrinseco del cuore, si è in grado di indagare le prestazioni meccaniche e contrattili dello stesso. Il sistema consente l'inserimento di una sonda

Figura 2.15 - Schema circuitale del setup utilizzato da Chinchoy. [62]

endoscopica accoppiata ad videocamera per la visualizzazione delle strutture cardiache desiderate.

Le prestazioni ottenute da Chinchoy *in vitro* sono risultate confrontabili con quelle misurate *in vivo* nonostante i parametri fluidodinamici si siano rivelati compromessi dopo circa 4 ore di attività.

In questo contesto, si inserisce il banco prova di Hill et al. (2005) [63] che parte dal lavoro sviluppato da Chinchoy per adattarlo a cuori umani, non utilizzabili per trapianti.

Il *setup* di Chinchoy è stato opportunamente modificato [Fig. 2.15] per renderlo interfacciabile con cuori umani, al fine di caratterizzare approfonditamente l'anatomia cardiaca, mediante tecniche di imaging, condurre studi farmacologici, simulare episodi ischemici e testare alcuni dispositivi protesici, nello specifico protesi valvolari. Scegliendo una soluzione di perfusione trasparente, è stato possibile utilizzare, attraverso i vasi incannulati, una sonda endoscopica accoppiata con videocamera per indagare la morfologia delle camere cardiache, con particolare attenzione a quella dei complessi valvolari. Inoltre, utilizzando un fibroscopio ottico con diametro ridotto (1,8 cm) si sono riusciti a visualizzare anche gli osti coronarici.

I dati raccolti in merito alle prestazioni fluidodinamiche, meccaniche e contrattili sono risultati confrontabili con quelli presenti in letteratura su cuori porcini. In particolare, si sono rilevati valori di pressione sistolica di 70-90 mmHg e pressione intraventricolare di 21-75 mmHg, per una durata superiore alle 4 ore, ben oltre a ciò che era stato riscontrato nello studio di Chinchoy.

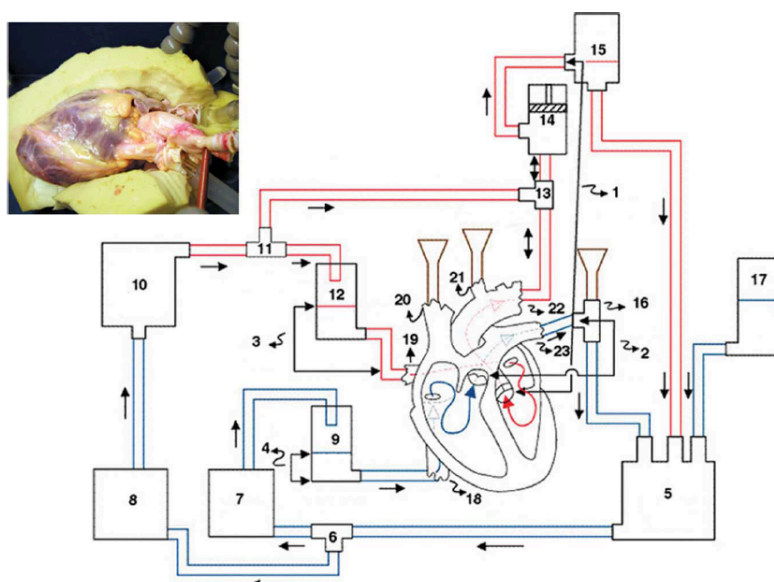


Figura 2.16 - Schema circuitale utilizzato da Hill. [63]

Il banco prova di **Araki et al. (2005) [64]** [**Fig. 2.16**] si concentra unicamente sulla parte sinistra del cuore. Il sistema è costituito da: un reservoir principale che alimenta la colonna di precarico posta a livello atriale e parzialmente, in una diversa modalità di funzionamento, la colonna di postcarico, posta a 80 cm al di sopra della valvola aortica, un reservoir posto al di sotto del cuore che riceve la soluzione di perfusato in uscita dalle coronarie e il flusso aortico in uscita al precarico. Il tutto viene riportato nel reservoir principale, nel quale avviene lo scambio gassoso tra ossigeno e anidride carbonica, da una pompa roller, dopo aver attraversato uno scambiatore di calore.

Lo scopo principale del lavoro è quello di verificare le prestazioni ventricolari confrontando le relazioni pressione-volume rilevate *in situ*, a seguito di sternotomia su maiali con quelle ottenute *in vitro* espiantando e perfondendo gli stessi cuori, in modo da ristabilire una regolare pulsatilità. Le relazioni P-V, nelle due differenti condizioni sperimentali, evidenziano una fondamentale differenza nella morfologia delle curve. Inoltre, per mezzo di un accesso apicale, con tecniche di imaging, si può visualizzare chiaramente e in dettaglio il complesso valvolare mitralico.

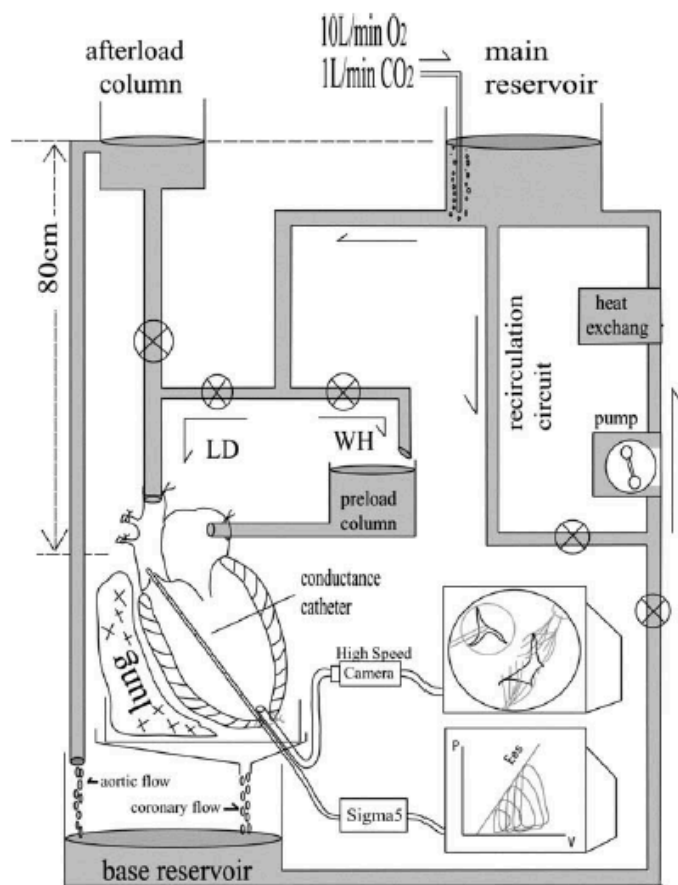
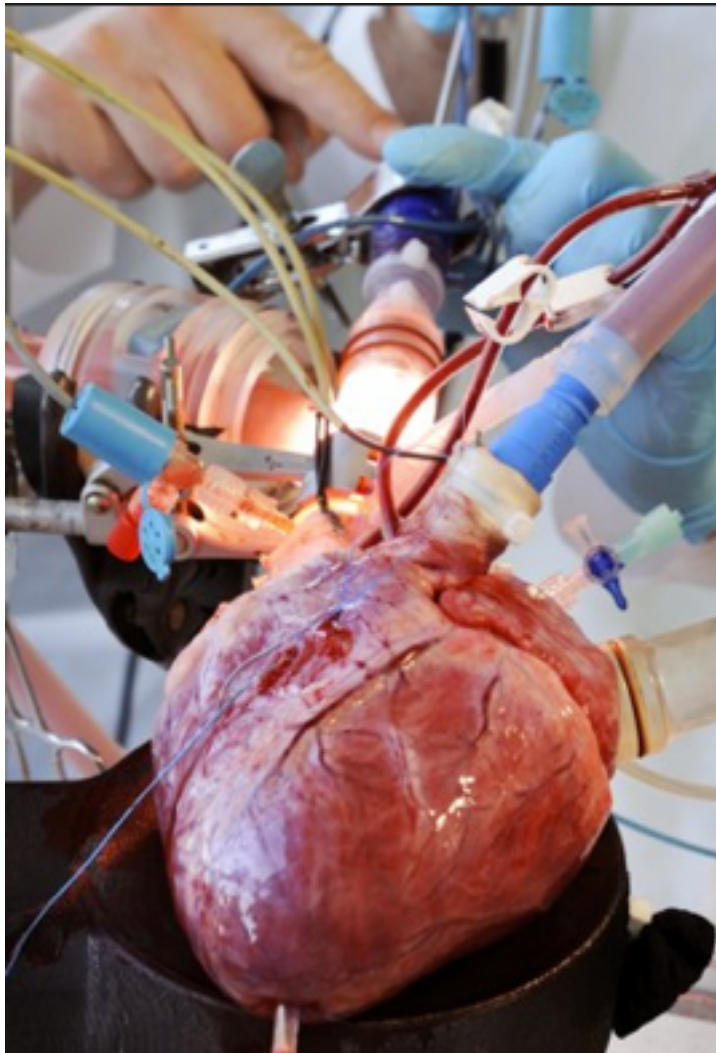


Figura 2.17 - Schema circuitale del setup utilizzato da Araki. [64]

Il *setup* sviluppato da **de Hart** et al. [70] (*PhysioHeart platform*) [Fig. 2.17] rappresenta attualmente il gold standard dei modelli *ex vivo*, essendo l'unico in grado di impiegare cuori porcini accoppiati con un modello modulare di circolazione, progettato per operare in diverse modalità, ad esempio prevedendo il funzionamento delle due camere destre, di quelle sinistre o delle quattro camere contemporaneamente.

La piattaforma utilizza sangue ossigenato come mezzo di perfusione e consente di attuare una perfusione secondo fisiologia



oppure selettiva. Il postcarico è costituito da un tubo compliant *Figura 2.18 - Foto del cuore alloggiato nella PhysioHeart platform. [70]*

in PU e da un modulo RCR regolabile, mentre il precarico, costantemente alimentato da sangue ossigenato attraverso una pompa centrifuga, è ideato per controllare la pressione di riempimento atriale con un resistore di Starling e uno stramazzo.

Infine tale banco prova è in grado di riprodurre l'emodinamica fisiologica e di mantenere rilevanti prestazioni per più di 4 ore.

➤ 2.3.2 Banchi prova per cuori azionati passivamente

Tale categoria di banchi prova prevede l'azionamento del cuore tramite l'impiego di un sistema pompabile pulsatile esterno. Questa tecnica è stata per la prima volta proposta da Richards e colleghi ed ha il pregio di essere una metodologia economica, facilmente ripetibile e di semplice utilizzo per lo studio di intere strutture cardiache. Tuttavia è riscontrabile che il sistema di azionamento esterno possa indurre alterazioni sulla dinamica cardiaca e sulla funzionalità dei complessi valvolari. Infine la difficoltà nell'ottenere valori pressori e, soprattutto di portata, fisiologici rende necessaria una fine ottimizzazione dei componenti del *setup*.

Un differente approccio viene pubblicato da **Richards** et al. (2009) [65], introducendo un elemento innovativo in merito al sistema di attuazione. I cuori, di provenienza porcina, non vengono perfusi con soluzione cristalloide al fine di ripristinare la funzionalità contrattile, ma sono considerati strutture passive azionate mediante un sistema pulsatile esterno.

L'obiettivo del lavoro è quello di dimostrare l'efficacia del sistema nel simulare e quantificare diversi gradi di insufficienza mitralica, concentrandosi in particolare su variazioni di gittata cardiaca in funzione delle pressioni ventricolari, prima e dopo aver indotto la patologia mitralica e anche successivamente all'esecuzione di tecniche di riparazione valvolare.

L'insufficienza mitralica è provocata riproducendo due dei sintomi più comuni della patologia: la dilatazione dell'annulus in direzione antero-posteriore e la rottura delle corde tendinee, fino al raggiungimento del rigurgito valvolare considerato di interesse per il lavoro. Inoltre, è consentito l'imaging, sia mediante tecniche di eco Doppler che attraverso endoscopia.

Il *setup* [Fig. 2.18] è progettato per il funzionamento della sola parte sinistra del cuore e comprende: un reservoir atriale, con altezza regolabile a seconda della pressione da ottenere, che va a riempire passivamente l'atrio sinistro mediante la vena polmonare incannulata, un postcarico aortico con reimmissione nel precarico, anch'esso regolabile in altezza, connesso attraverso una cannula aortica al cuore e infine, una pompa pulsatile a pistone che, mediante l'accesso apicale, in fase sistolica, pressurizza il ventricolo sinistro permettendo un flusso in uscita alla valvola aortica, mentre in fase diastolica, con un

movimento retrogrado del pistone, drena il fluido di lavoro dall'altro sinistro passando per la valvola mitrale, fino al riempimento del ventricolo sinistro.

In aggiunta, il banco prova ammette l'eventualità di effettuare prove in configurazione statica, al fine di valutare l'entità del rigurgito mitralico in funzione di diverse pressioni ventricolari, utilizzando una pompa centrifuga e sfruttando sempre l'accesso apicale.

I valori fluidodinamici ottenuti presentano pressioni, sia nei valori che nella morfologia delle onde, simili a quelli fisiologici, mentre i valori massimi di portata sono ben al di sotto di quelli caratteristici di un cuore adulto.

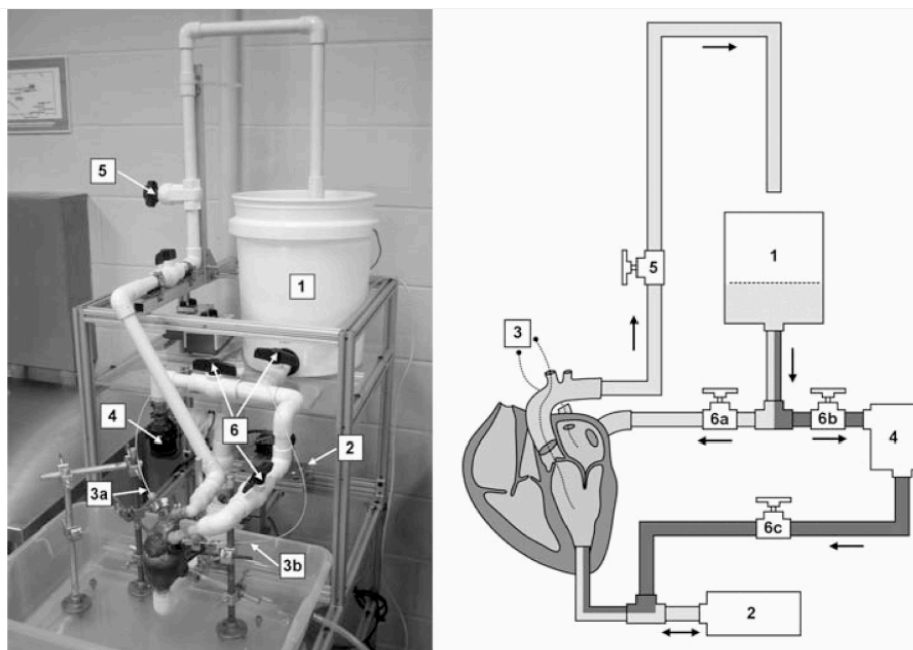


Figura 2.19 - Foto (a sinistra) e schema circuitale (a destra) del setup utilizzato da Richards. [65]

2.4 Il lavoro di Spinner

In questo paragrafo si riporta lo studio di Spinner et al. [59,81] sulla valvola tricuspide, dal quale è stato riadattato e opportunamente modificato parte del protocollo utilizzato nel presente lavoro. Si intende quindi fornire una breve trattazione delle ricerche svolte, soffermandosi maggiormente sugli elementi di interesse.

L'obiettivo principale è quello di sviluppare metodologie sperimentali al fine di investigare dettagliatamente la biomeccanica della valvola tricuspide *in vitro* e nello specifico identificare le relazioni esistenti tra l'insufficienza valvolare e gli effetti, sia disgiunti che in combinazione, della dilatazione dell'annulus e della dislocazione dei muscoli papillari.

Gli esperimenti sono stati condotti su un banco prova per la sola parte destra del cuore, progettato operando opportune modifiche al preesistente simulatore per valvole mitrali del Georgia Institute of Technology, già precedentemente descritto.

Per simulare la dilatazione dell'annulus è stato utilizzato un alloggiamento apposito per la valvola, costituito da un tubo rigido, per la parte di annulus competente al foglietto settale e una molla regolabile per i foglietti anteriore e posteriore [Fig. 2.19]. Di conseguenza la dilatazione è stata effettuata andando ad agire sull'annulus dei soli foglietti anteriore e posteriore, partendo da un'area dell'orifizio valvolare pari a 6 cm^2 fino ad una dilatazione del 100% (12 cm^2) con incrementi del 20%.

Per quanto concerne il dislocamento dei papillari sono state impiegate delle barre per permettere spostamenti traslatori in direzione apicale e antero-posteriore e rotatori in direzione setto-laterale [Fig. 2.20].

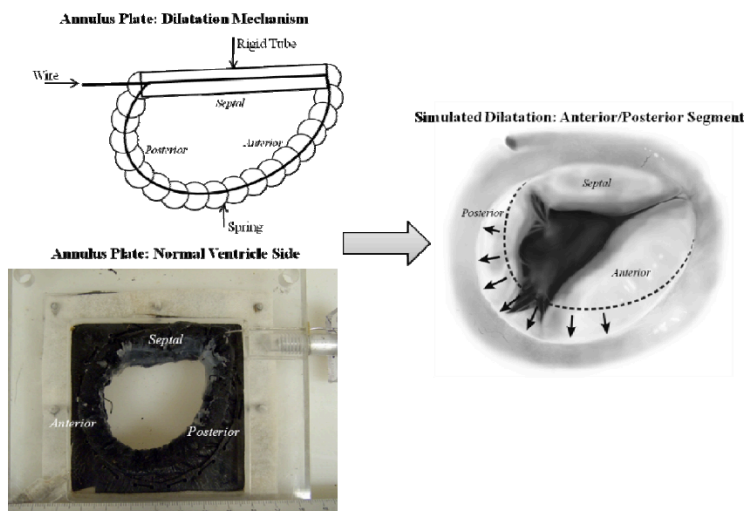


Figura 2.20 - Sistema impiegato da Spinner per simulare la dilatazione anulare della valvola tricuspide. [81]

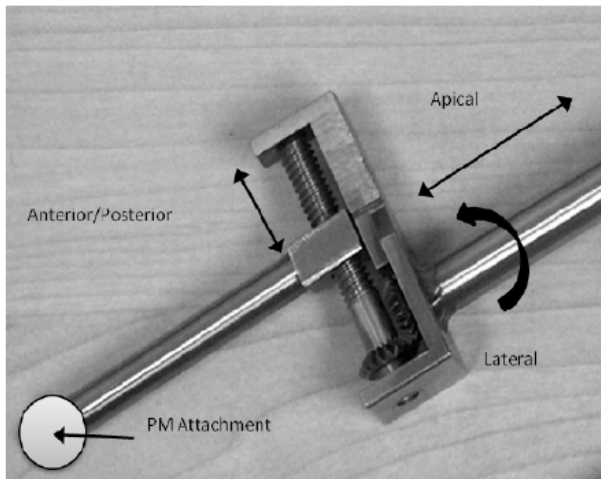


Figura 2.21 - Barre per gli spostamenti dei muscoli papillari nelle direzioni volute. [81]

➤ **2.4.1 Valutazione degli effetti: Available Coaptation Area (ACA) e Residual Leaflet Length (RLL)**

Particolarmente rilevante per questo lavoro è il metodo utilizzato da Spinner [81] per la valutazione degli effetti indotti dalla dilatazione dell'annulus e dal dislocamento dei muscoli papillari, dapprima separatamente e successivamente in combinazione sul funzionamento della valvola mitrale.

Dopo aver exciso l'intero complesso valvolare, si è proceduto alla creazione di una griglia di markers su tutti e tre i foglietti, impiegando un inchiostro utilizzato in istologia per marcare specifiche aree di tessuto o per identificare i margini chirurgici.

Successivamente sono state registrate le tre immagini (una per ogni foglietto) utilizzate come riferimento statico per ulteriori analisi.

Per ogni condizione sperimentale indagata, sono state registrate immagini della valvola tricuspide con la griglia di markers durante l'intero ciclo cardiaco, estraendo quelle di picco sistolico.

Per ciascuna immagine di interesse si è proceduto a contare il numero di puntini visibili in ogni riga della griglia creata, al fine di poter creare con tali informazioni i grafici raffiguranti la sovrapposizione, di volta in volta, del foglietto in configurazione statica e del foglietto in fase sistolica, nelle diverse condizioni sperimentali [Fig. 2.21].

Infine sottraendo le due aree mostrate da tali grafici è stato possibile ricavare l'area del foglietto disponibile per la coaptazione (Available Coaptation Area o ACA).

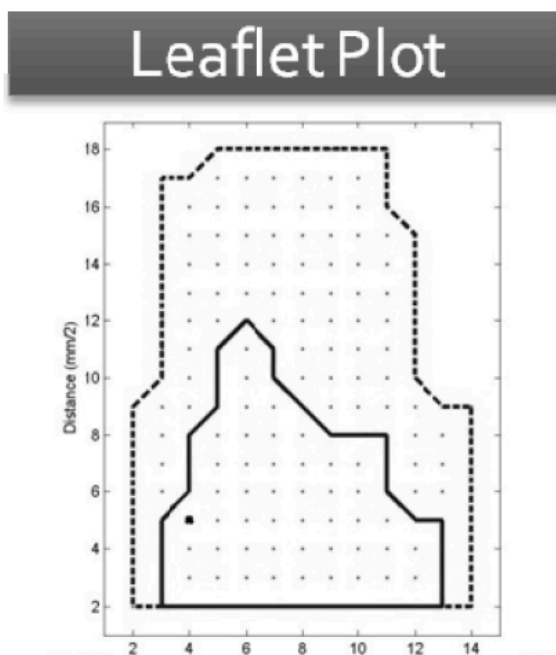


Figura 2.22 - Sovrapposizione delle aree di un foglietto della valvola tricuspide in configurazione statica e in fase sistolica. [81]

Determinazione e misura della Residual Leaflet Length (RLL)

La Lunghezza Residua del Foglietto o *Residual Leaflet Length* (RLL) è considerata la porzione di foglietto disponibile alla coaptazione [Fig. 2.22]. Tipicamente in clinica viene misurata la lunghezza di coaptazione, che non dà alcuna informazione riguardante la coaptazione di ogni singolo foglietto poiché considera i foglietti coaptanti come un'unica entità con una sola lunghezza; con questo nuovo approccio invece è possibile avere una comprensione più fine e dettagliata della meccanica valvolare.

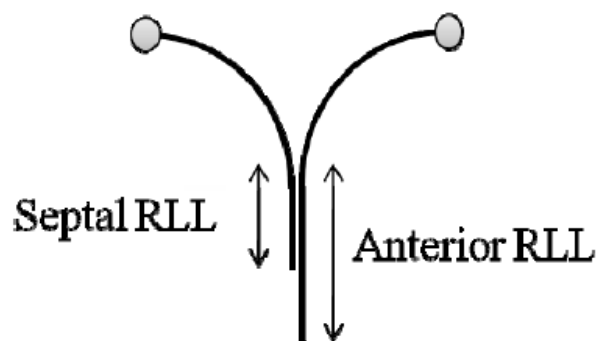


Figura 2.23 - Rappresentazione schematica della RLL del foglietto settale e anteriore della valvola tricuspide. [81]

Nella pratica, la RLL è identificata sui grafici dei foglietti sovrapposti con l'aiuto del marker di riferimento ed è costituita dal numero di markers dell'immagine statica, presenti sulla linea di interesse, meno il numero di markers visibili sulla stessa linea in una determinata condizione sperimentale [Fig. 2.23].

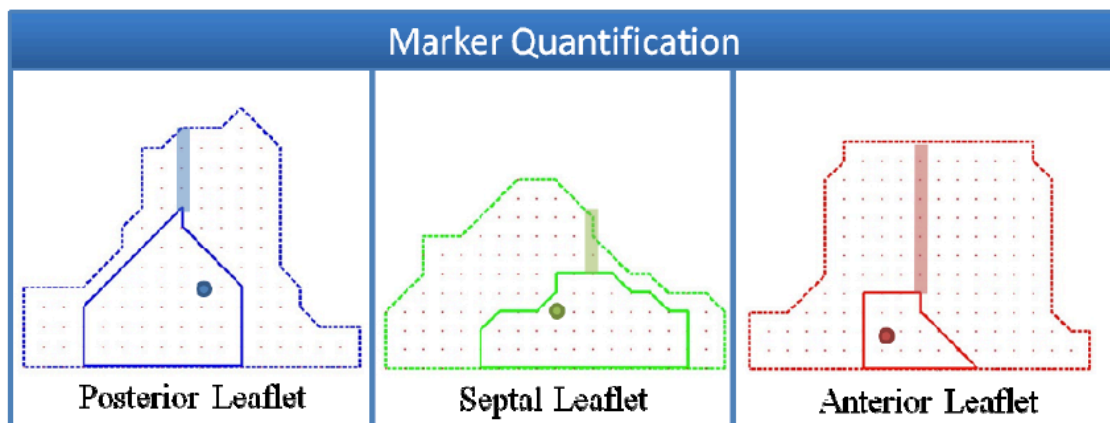


Figura 2.24 - Identificazione della RLL sui grafici dei foglietti sovrapposti.

2.5 Banchi prova utilizzati nel presente lavoro

Nella presente sezione verranno descritti in dettaglio i *setup* usati per la realizzazione di questo lavoro, analizzando i componenti principali, la strumentazione impiegata e le differenze sostanziali tra i due, evidenziandone pregi e criticità esistenti.

Le specifiche progettuali che entrambi i banchi prova hanno dovuto soddisfare, talvolta privilegiandone alcune rispetto ad altre in contrasto, possono essere sintetizzate come segue:

- possibilità di ricreare *in vitro* condizioni fluidodinamiche, in termini di onde di pressione e portata, fisiologiche e all'occorrenza patologiche;
- realizzare l'imaging di strutture cardiache, in particolare ottenere immagini ecografiche ed endoscopiche e, considerando quest'ultime, prevedere la minima invasività;
- ottimizzare il layout del sistema in modo da consentire un accesso alle strutture valvolari comparabile a quello presente in sala operatoria;

- permettere il training chirurgico, prevedendo l'esecuzione di diverse procedure chirurgiche.
- realizzazione con costi contenuti;
- preparazione del campione biologico agevole e rapida;

➤ 2.5.1 Il banco prova ForCardiolab

Il *setup* di **Leopaldi** et al. [50] riprende l'approccio di Richards, concentrandosi quindi sullo sviluppo di un sistema pulsatile esterno per l'attuazione della sola parte sinistra di cuori porcini integri.

Durante il funzionamento, in fase diastolica, il moto retrogrado del pistone richiama il fluido di lavoro dall'atrio sinistro all'interno della camera ventricolare, attraverso la valvola mitrale aperta, mentre in sistole, la pressurizzazione del ventricolo, causata dal pistone, permette l'eiezione del fluido in aorta.

I componenti principali [Fig. 2.24] sono:

1. un sistema volumetrico pulsatile (PD) controllato tramite PC attraverso una centralina;
2. un simulatore di impedenza sistemica (SIS);
3. un reservoir di precarico (PR).

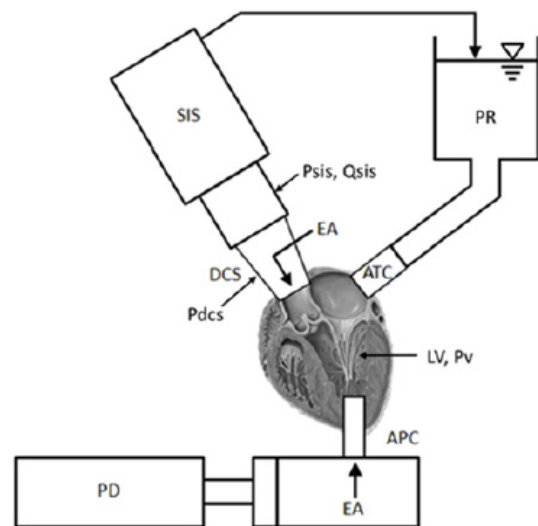
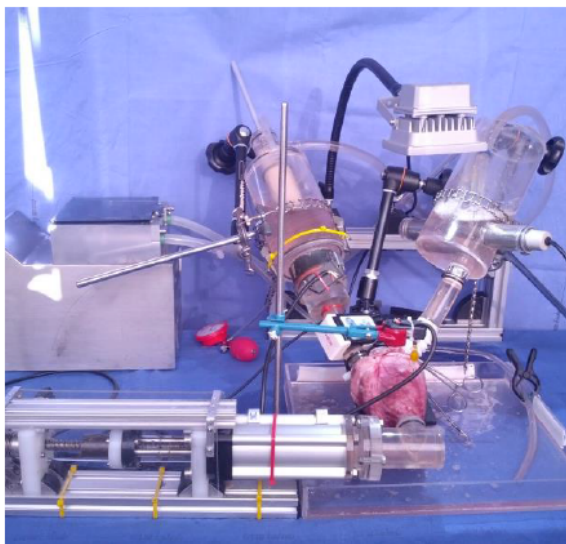


Figura 2.25 - Foto del *setup* ForCardioLab (a sinistra), schema del *setup* (a destra). [50]

➤ 2.5.1.1 Descrizione dei componenti

Il **sistema pulsatile (PD)** [Fig. 2.25] è una pompa volumetrica a pistone in grado di replicare accuratamente le onde di portata cardiaca sistolica coerentemente con l'espressione analitica proposta da Swanson e Clark [66] e quelle di portata cardiaca diastolica secondo l'andamento analitico di Talukder e Reul [67].

Il motore brushless a bassa inerzia (MCS06C41, Lenze, Halmen, Germany), mettendo in rotazione una vite senza fine a ricircolo di sfere (SH12.7.12.7R, SKF, Goteborg, Sweden), permette la traslazione assiale di un pistone (CPA Series Cylinders, Waircom-MBS, Granby, QC, Canada). La centralina (Servo 9322EK, Lenze), controllando elettronicamente il motore, consente, mediante software PC dedicato, di simulare differenti condizioni di lavoro, impostando e variando i parametri di interesse, come ad esempio frequenza e il volume di eiezione.

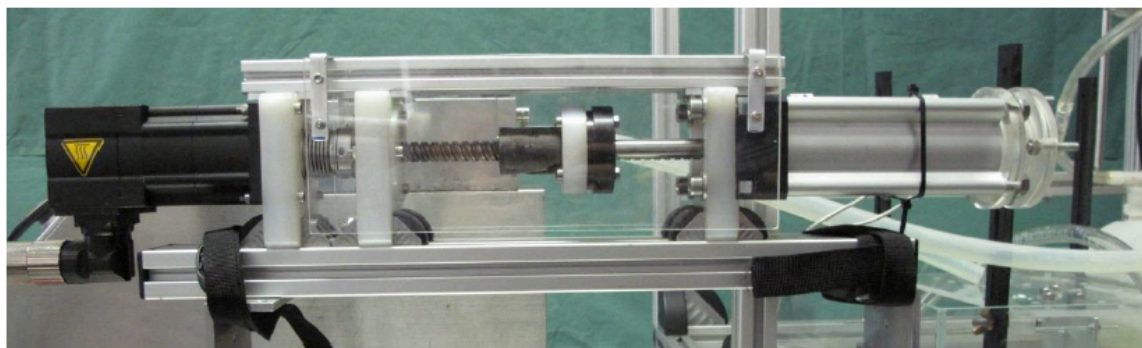


Figura 2.26 - Pompa volumetrica a pistone utilizzata come sistema pulsatile nel setup ForCardioLab. [51]

Analogamente al sistema pulsatile, anche il **simulatore di impedenza sistemica (SIS)** [Fig. 2.26] è stato sviluppato in precedenza e già descritto nel lavoro di Lanzarone et al. [68]. Esso consiste in un circuito idraulico, basato sul modello a tre parametri concentrati (RCR): una resistenza caratteristica R_c in serie ad un circuito parallelo costituito da una capacitance C ed una resistenza periferica R_p .

Nello specifico, la resistenza caratteristica è una rete, a maglie quadrate in materiale polimerico, mentre la resistenza periferica è costituita da un fascio di fibre cilindriche cave in PP; infine la capacitance è ottenuta mediante una camera d'aria di volume all'incirca pari a 5l.

Tale sistema è regolabile e permette di ottenere diverse forme d'onda pressorie sistemiche, simulando sia condizioni fisiologiche che patologiche.

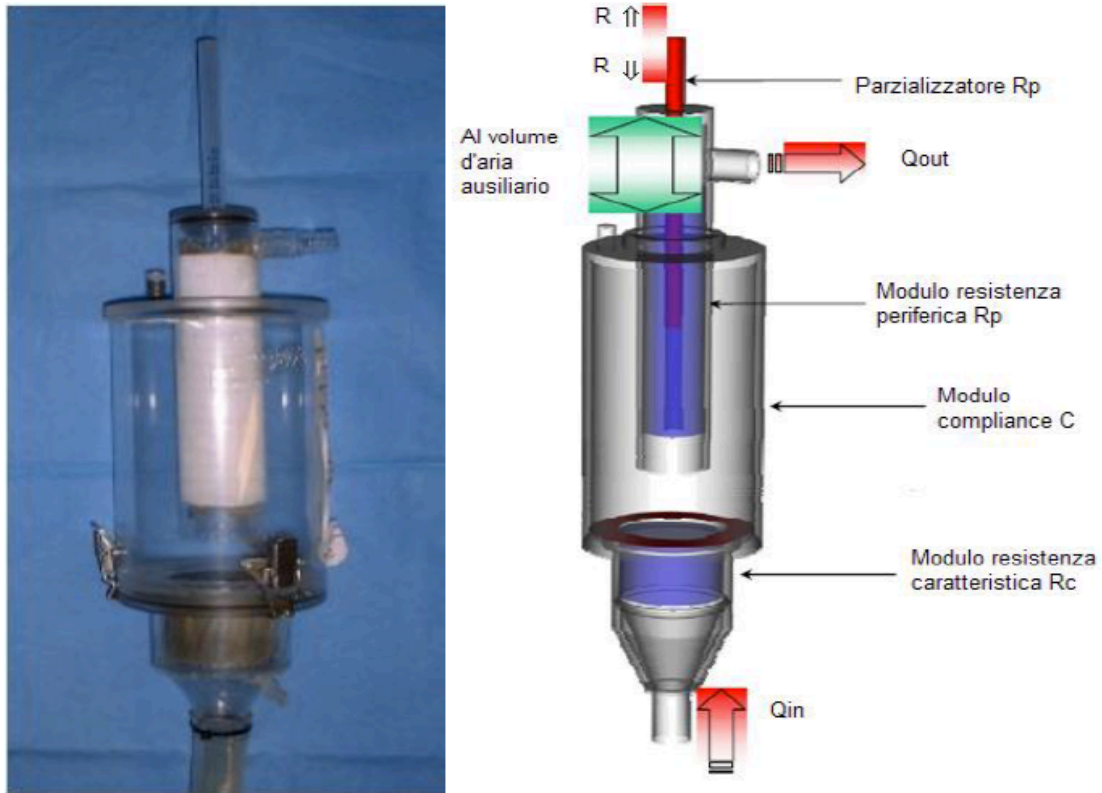


Figura 2.27 - Foto del simulatore di impedenza sistemica (a sinistra) e schema dello stesso (a destra). [51]

Il **reservoir di precarico (PR)** riceve il flusso in uscita al postcarico e riempie passivamente l'atrio sinistro. Il valore di precarico imposto può essere regolato variando l'altezza del fluido di lavoro al suo interno.

Successivamente, è stato creato un alloggiamento trasversale nel reservoir, con lo scopo di inserire uno scambiatore di calore per termostatare il fluido di lavoro.

Il **connettore atriale (ATC)** è stato costituito da un tubo di plastica corrugato ed estensibile assicurato all'atrio sinistro tramite fascetta, mentre il **raccordo tra l'aorta e il postcarico (SIS)** è un cilindro cavo in PMMA con corona circolare esterna forata, che permette l'ancoraggio della parete aortica per mezzo di punti di sutura. Infine il collegamento tra il sistema pulsatile e il ventricolo sinistro è realizzato mediante un **connettore apicale (APC)** composto da un cilindro cavo filettato in PMMA che si inserisce nel ventricolo [Fig. 2.27]. La tenuta sia idraulica che meccanica è assicurata avvitando un dado su quest'ultimo.

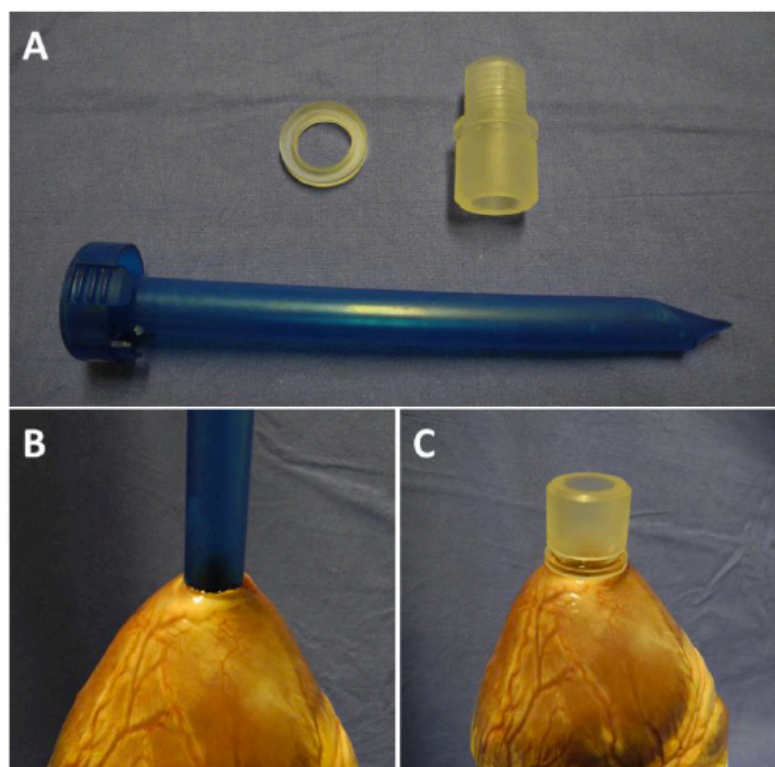


Figura 2.28 - Modalità di inserimento del connettore apicale. [51]

➤ 2.5.1.2 Strumentazione del *setup* e tecniche di imaging eseguibili

Il banco prova è equipaggiato con quattro trasduttori piezoresistivi (PC140 series, Honeywell Inc., Morristown, NJ, USA) per la misura delle pressioni atriale (P_a), ventricolare (P_v), aortica (P_{ao}), all'ingresso del simulatore di impedenza sistemica (P_{sis}) e con un flussimetro a tempo di transito per la misura della portata a valle della valvola aortica (Q_{sis}) o per quella a monte della valvola mitrale (Q_a) (HT110R, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA).

I tracciati di pressione sono comparabili, sia in termini di morfologie d'onda che nei valori numerici, a quelli che si registrano *in vivo* in condizioni fisiologiche, così come la portata aortica, in grado di raggiungere valori medi fino a 5 l/min e di picco fino a 26 l/min.

Per quanto riguarda l'imaging si è già accennata precedentemente la possibilità di acquisire sia immagini endoscopiche che ecografiche. Le prime sono state ottenute mediante un endoscopio a lente rigida con diametro pari a 10 mm (Olympus Europe, Hamburg, Germany) accoppiato con un generatore di luce (Olympus Visera CLV-S40) e una colonna video (Olympus Visera OTV-S7 Digital Processor), mentre le seconde tramite un ecografo HDI 5000 (Philips, Eindhoven, NL) con una sonda L12-3 (Philips) in un range di frequenze 3-12 MHz.

In prossimità del foro apicale è stata inserita una lente endoscopica per l'imaging simultaneo della valvola aortica e mitrale e per indagare il comportamento dinamico delle corde tendinee e dei muscoli papillari, mentre il posizionamento coassiale tra la lente e la radice aortica ha consentito l'imaging della sola valvola aortica in dettaglio.

➤ 2.5.2 Il banco prova TU/e

Il sistema progettato da Leopaldi et al. presso il Dipartimento di Ingegneria Biomedica della TU/e [51] realizza l'approccio complementare a quello seguito per il *setup* appena descritto per quanto concerne l'attuazione passiva del ventricolo. Infatti, esso permette l'alloggiamento di cuori porcini interi garantendo, mediante un'attuazione pulsatile della sola parte sinistra, la pressurizzazione esterna delle pareti ventricolari, in contrapposizione alla pressurizzazione interna della camera cardiaca, che invece si verifica nel suo predecessore.

Durante il funzionamento, in fase sistolica il fluido di lavoro di cui è riempita la camera di alloggiamento del cuore viene pressurizzato dal sistema pompante, agendo sulle sole pareti ventricolari dal momento che gli atri sono situati all'esterno della camera, mentre in fase diastolica, l'azione retrograda del pistone, diminuendo la pressione all'interno della camera permette l'espansione delle pareti cardiache.

I componenti principali [Fig. 2.28] sono:

1. una pompa a pistone (PP);
2. una camera di alloggiamento per il cuore (FFC);
3. un postcarico (AL);
4. un precarico, comprendente un reservoir (R), un modulo di precarico (PL) e un resistore di Starling (SR).

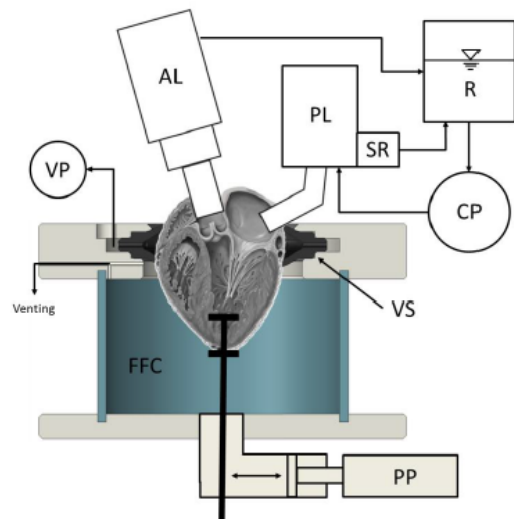


Figura 2.29 - Foto del setup TU/e (a sinistra) e schema del setup (a destra). [51]

➤ 2.5.2.1 Descrizione dei componenti

Il sistema pulsatile è costituito da una **pompa a pistone (PP)** (ETB32, Parker Hannifin, The Netherlands) [Fig. 2.29] connessa al piatto inferiore della camera di alloggiamento del cuore, lateralmente al foro per l'accesso apicale e controllata attraverso una centralina (PCI 6221, National Instruments, Austin, TX, USA) da un software dedicato (LabVIEW 7.1, National Instruments).



Figura 2.30 - Pompa a pistone utilizzata come sistema pulsatile nel setup TU/e.

La **camera di alloggiamento per il cuore (FFC)** [Fig. 2.30], che in fase di funzionamento viene riempita con il fluido di lavoro, è composta da due piatti e un cilindro posto verticalmente tra di essi, realizzati in PMMA.

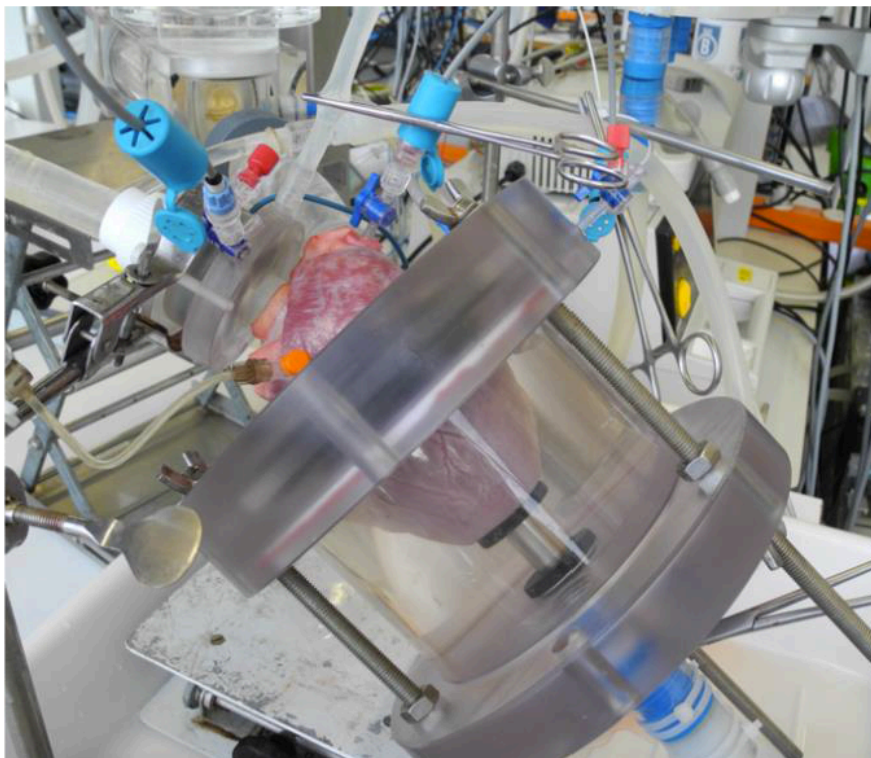


Figura 2.31 - Foto della camera di alloggiamento per il cuore. [51]

Il piatto inferiore, come già precedentemente accennato, prevede due fori di accesso, uno apicale, per il vincolo meccanico dell'apice del cuore, e uno per l'ingresso della pompa. In quello superiore è integrata una guarnizione (VS), collegata ad una pompa a vuoto (VP) (Air Admiral, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA), creata ad hoc mediante stampante 3D a tecnologia PolyJet (Materialise NV, Leuven, Belgium) in gomma-resina flessibile. Tale guarnizione, di forma ellissoidale, è costituita da due labbra deformabili, ed è connessa alla pompa a vuoto mediante un canale, che mette in comunicazione i fori radiali presenti nell'incavo tra i due bordi. In definitiva, grazie all'azione di aspirazione mediata dai fori, questa struttura consente di evitare lo spostamento del cuore durante la pressurizzazione delle pareti cardiache, assicurando l'ancoraggio attorno al solco coronario e separando le camere atriali da quelle ventricolari.

Per quanto concerne il **postcarico (AL)** (HFM-09-1, LifeTec Group, Eindhoven, The Netherlands) [Fig. 2.31], il circuito idraulico consiste in un modello RCR regolabile mediante le due resistenze (caratteristica e periferica) di forma cilindrica con terminale conico, che si inseriscono in fori filettati e situati posteriormente alla camera e da un tubo compliant in silicone. Un tubo in uscita al postcarico drena il fluido di lavoro verso un reservoir (R), dal quale, per mezzo di una pompa centrifuga (CP) (Bio-Pump[®] Plus, Medtronic, Minneapolis, MN, USA) viene mandato al precarico.

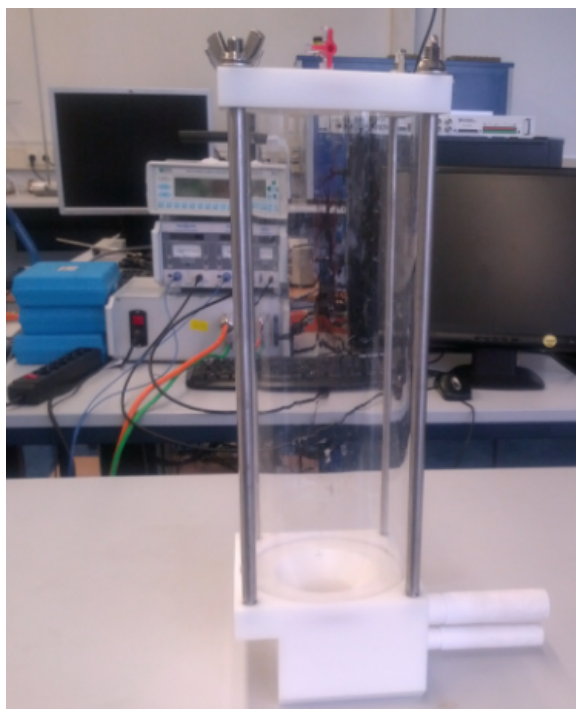


Figura 2.32 - Foto del postcarico con in evidenza le due resistenze (caratteristica e periferica).

Infine, il **modulo di precarico (PR)** è impiegato per impostare e controllare la pressione di riempimento dell'atrio sinistro attraverso un resistore di Starling e uno stramazzo, già utilizzato nel lavoro di de Hart et al. [70]. La connessione atriale è costituita da un tubo compliant in silicone.

I connettori principali sono tre; il **connettore apicale**, una barra rigida filettata ad un'estremità, consente, mediante approccio analogo al sistema presente nel *setup* ForCardioLab, il corretto posizionamento e bloccaggio del cuore all'interno della camera di alloggiamento.

I **connettori atriale e aortico** sono due cilindri cavi, su cui vengono calzati i tubi siliconici, con un foro per permettere l'inserimento di opportuni trasduttori di pressione. La tenuta idraulica tra struttura biologica e connettore e tra connettore e tubo è assicurata mediante fascette.

➤ 2.5.2.2 Strumentazione del *setup* e tecniche di imaging eseguibili

Il sistema è dotato di sensori di pressione a stato solido (P10EZ-1, Becton Dickinson Medical, Franklin Lakes, USA) per il monitoraggio delle pressioni atriali, ventricolari e a valle della valvola aortica e di un flussimetro perivascolare (MA28PAX, Transonic System Inc., Ithaca, NY, USA) per la misura della portata aortica.

I tracciati ottenuti sono in accordo sia morfologicamente che quantitativamente a quelli riscontrabili *in vivo*: pressione atriale media circa pari a 18 mmHg, pressione ventricolare nell'intervallo 125/5 mmHg, pressione aortica tra 125/75 mmHg e portata aortica media fino a 4,5 l/min con picchi di 25-30 l/min.

L'imaging delle strutture cardiache di interesse, in particolare valvola aortica e mitrale, è stato ottenuto mediante un endoscopio a lente rigida di diametro pari a 10 mm (Olympus, Europe, Hamburg, Germany), accoppiato con una videocamera ad alta velocità (MotionScope M5C, IDT Vision, Tallahassee, FL, USA) e con un generatore di luce (Xenon Nova, 300W, Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany).

Per la visualizzazione della valvola aortica l'accesso è stato effettuato attraverso il tubo aortico, mentre per la valvola mitrale, l'endoscopio è stato introdotto attraverso un foro creato in auricola sinistra.

➤ 2.5.3 Confronto tra i due banchi prova e obiettivi del lavoro

Questa sezione è intesa per evidenziare schematicamente [Fig. 2.32], ma in modo esaustivo le differenze esistenti tra i due banchi prova appena descritti, affrontando criticamente vantaggi e svantaggi delle soluzioni di volta in volta adottate e infine accennando brevemente i loro punti in comune.

Iniziamo considerando il sistema di attuazione impiegato:

In entrambi i *setup* la scelta è ricaduta su un sistema di attuazione idraulico volumetrico, che permette di imporre l'andamento della portata fluente dal circuito, di ottenere condizioni di prova indipendenti dalle resistenze incontrate dal fluido in movimento e quindi, in teoria più facilmente regolabili;

Pertanto, il sistema pompante pulsatile utilizzato garantisce: volumetricità, condizioni di prova controllabili, fisiologicità delle curve di portata generate e regolabilità.

Infine, sia nel banco prova milanese che in quello olandese, è possibile usare diversi fluidi di lavoro, come sangue eparinizzato o soluzioni con viscosità simile a quella ematica, in aggiunta a soluzione fisiologica e acqua demineralizzata, normalmente utilizzate.

D'altra parte però, la prima fondamentale differenza riscontrabile nei due banchi prova risiede nella modalità di pressurizzazione del ventricolo sinistro. Nel *setup* ForCardioLab, quest'ultima implica un comportamento anti-fisiologico, provocando un movimento delle pareti cardiache durante l'intero ciclo, che è esattamente il comportamento invertito rispetto a quello che si verifica *in vivo*. Le immediate conseguenze sono la presenza di un campo fluidodinamico alterato all'interno del ventricolo sinistro e la possibilità di alterazioni nella cinematica e nella dinamica dei complessi valvolari e specificatamente della valvola mitrale, data la presenza dei muscoli papillari, strutture connesse alla parete ventricolare.

Nel banco prova TU/e, al contrario, verificandosi una pressurizzazione esterna, si vuole ottenere un modello più realistico della dinamica ventricolare, anche se è da evidenziare che, attuando una simultanea e uniforme pressione sulle pareti ventricolari, non si è in grado di replicare il complesso movimento torsionale, riscontrabile *in vivo*, del ventricolo sinistro. Le indagini preliminari effettuate, riguardanti l'influenza di entrambi i modelli proposti sulla cinematica dei complessi valvolari costituiscono il punto di partenza del presente lavoro e verranno, quindi, affrontate più dettagliatamente in un secondo momento.

Per quanto concerne la *preparazione del campione biologico*, si può affermare che, limitatamente al funzionamento "standard" dei sistemi, in entrambi la durata e la complessità è equiparabile, grazie anche alle successive modifiche introdotte nel design dei connettori del *setup* ForCardioLab.

Inoltre, entrambi i sistemi consentono l'alloggiamento di cuori porcini integri permettendo l'attuazione della sola parte sinistra del cuore.

Per quanto riguarda i *precarichi*, si sottolinea che la scelta di entrambi i sistemi assicura una pressione di riempimento atriale adeguata e regolabile con l'altezza della colonna di fluido al loro interno, mentre in nessuno dei due viene replicato il comportamento fisiologico di contrazione atriale.

Analizzando i *simulatori di impedenza sistemici*, entrambi hanno impiegato un modello a 3 parametri concentrati (RCR), dal momento che quest'ultimo fornisce il miglior compromesso tra accuratezza nel riprodurre le forme d'onda pressorie fisiologiche e complessità di realizzazione, garantendo la possibilità di regolare i valori di resistenza e compliance.

Infine, valutando le *tecniche di imaging effettuabili*, pur assicurando entrambi indagini endoscopiche sia tramite endoscopio che mediante fibroscopio, si denota una significativa differenza, dal momento che nel banco TU/e non è garantita la possibilità di effettuare indagini ecografiche, poiché l'accesso al cuore è limitato dalla presenza della camera di alloggiamento. Tale evidenza è da considerarsi una criticità, in quanto ad oggi l'esigenza di acquisire simultaneamente immagini endoscopiche ed ecografiche allo scopo di ottenere

una più accurata comprensione dei meccanismi cinematici e dinamici delle strutture analizzate è il gold standard per molte indagini diagnostiche e di valutazione funzionale.

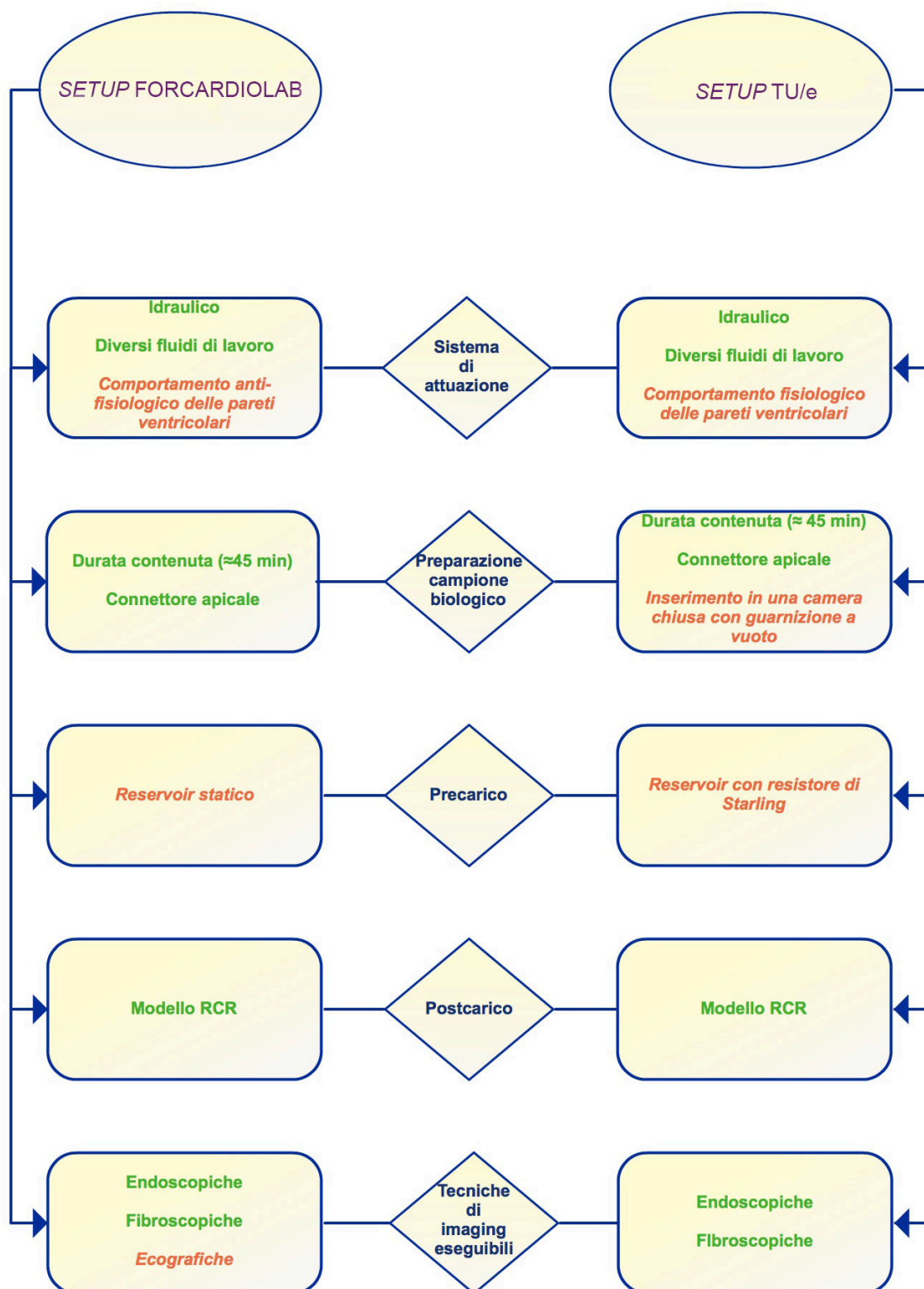


Figura 2.33 - Schema comparativo tra i due setup: in verde sono evidenziati i punti in comune mentre in rosso le differenze.

In conclusione, il presente lavoro si pone l'obiettivo eseguire un'analisi morfometrica della valvola mitrale in entrambi i banchi prova e di fornire un confronto critico sulla base di analisi ecografiche e endoscopiche, ponendo così le basi per stabilire quali indagini sia di volta in volta più appropriato effettuare nell'uno o nell'altro *setup*. Come già precedentemente accennato, la differenza sostanziale esistente tra i due banchi risiede nella modalità di pressurizzazione del ventricolo sinistro, nel banco ForCardioLab realizzata anti-fisiologicamente, mentre in quello TU/e in modo fisiologico.

Si intende quindi concentrarsi sulla valutazione dell'area disponibile per la coaptazione dei singoli foglietti della valvola mitrale, grazie alle informazioni estratte dai video con il fibro/endoscopio e valutare la distanza tra papillare anteriore e posteriore e piano valvolare, al fine di evidenziare possibili differenze nei due *setup*.

A tal fine, per effettuare test ecografici anche nel banco prova TU/e, sono stati modificati opportunamente alcuni componenti del *setup*.

3.

MATERIALI E METODI

Nel presente capitolo verranno descritti i campioni biologici impiegati nel presente lavoro, evidenziandone le caratteristiche principali ed esponendo i criteri impiegati nella loro selezione. Successivamente si porrà l'attenzione sulle modifiche riguardanti nello specifico i componenti dei due banchi prova, attuate per poter misurare ed estrarre i parametri di interesse per il presente lavoro, e verranno presentati i due *setup* usati per l'esecuzione delle prove statiche.

Inoltre verranno illustrati i protocolli sperimentali adottati, descrivendo gli **esperimenti statico** e **dinamici** svolti presso il ForCardioLab (MI) e presso il Dipartimento di Ingegneria Biomedica della TU/e (EHV). In seguito si procederà alla descrizione delle procedure di elaborazione dei dati sperimentali ottenuti, sia nelle prove statiche che in quelle dinamiche, per entrambi i banchi prova.

Il vantaggio di effettuare in primo luogo esperimenti statici risiede nella possibilità, in primis, di analizzare il comportamento della valvola mitrale nelle condizioni ritenute maggiormente critiche per la funzionalità di quest'ultima nei due diversi *setup* e, in secundis, di stabilire quali grandezze misurare e quali parametri estrarre per le successive prove dinamiche, al fine di effettuare un confronto quantitativo e rappresentativo tra i due banchi prova per mezzo di un'analisi morfometrica della VM.

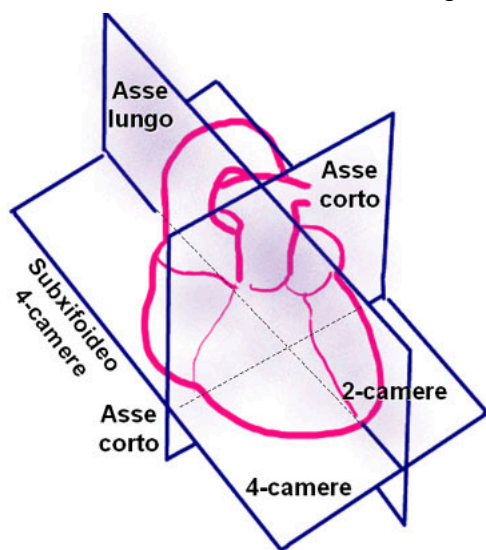
3.1 Selezione dei campioni biologici

I campioni biologici utilizzati per condurre gli esperimenti sono cuori porcini, non adatti all'uso alimentare, prelevati da macelli nelle vicinanze.

I criteri di selezione impiegati sono stati esclusivamente qualitativi; si è controllato che non ci fossero anomalie o danni a carico della parte sinistra del cuore, come lesioni trapassanti il miocardio, oppure a livello dei foglietti valvolari e delle corde tendinee. Inoltre particolare attenzione è stata dedicata all'ispezione dei foglietti valvolari, escludendo campioni con evidenti accumuli di materiale fibroso, che avrebbero potuto inficiare la buona riuscita della realizzazione della griglia di markers. Infine, pressurizzando il ventricolo sinistro fino al raggiungimento di una pressione ventricolare pari a 80 mmHg si è controllato che la valvola fosse perfettamente continente e non presentasse zone malcoaptanti sia tra i due foglietti che tra i segmenti di uno stesso lembo.

3.2 Proiezioni ecografiche per la visualizzazione del complesso valvolare mitralico

L'esame ecografico transtoracico è basato sull'individuazione di piani principali di scansione del cuore. Variando la posizione e l'inclinazione della sonda nelle due



dimensioni è possibile identificare le 20 proiezioni standard attualmente impiegate in clinica. A lato in [Fig. 3.1] si mostrano i piani principali di scansione, identificati come: parasternale asse lungo, parasternale asse corto, due camere, quattro camere e subxifoideo quattro camere.

La VM ha una posizione centrale all'interno del cuore che la caratterizza come una delle strutture cardiache più facilmente visibili.

Figura 3.1 - Rappresentazione schematica dei piani principali di scansione nell'ecografia transtoracica.

Per quanto riguarda i piani di scansione impiegati per la visualizzazione della valvola mitrale si riportano in [Fig. 3.2] alcune delle proiezioni maggiormente utilizzate.

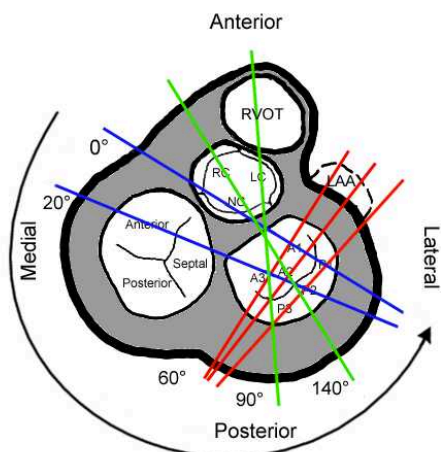


Figura 3.2 - Proiezioni transtoraciche utilizzate per la visualizzazione della valvola mitrale: in blu le proiezioni a quattro camere, in rosso le proiezioni a due camere e in verde le proiezioni in asse lungo.

La sezione ecografica transtoracica **parasternale asse lungo** [Fig. 3.3] attraversa i lembi mitralici centralmente e visualizza i segmenti A2-P2; inclinando la sonda in senso mediale e laterale si ottengono i piani di scansione contigui che visualizzano rispettivamente i segmenti A1-P1 e A3-P3 [Fig. 3.4].

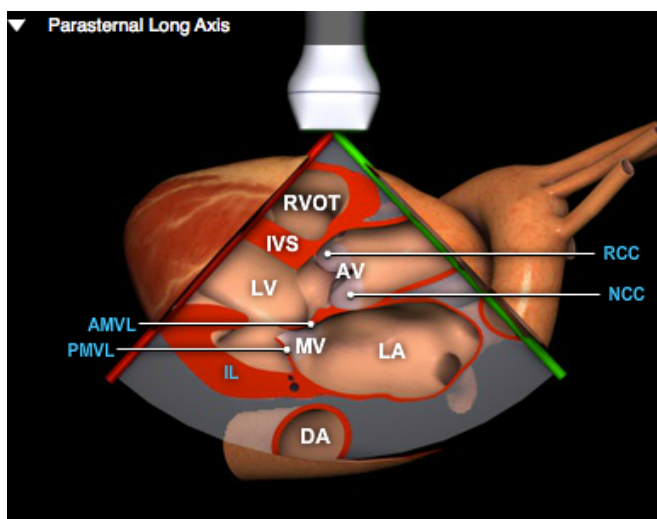
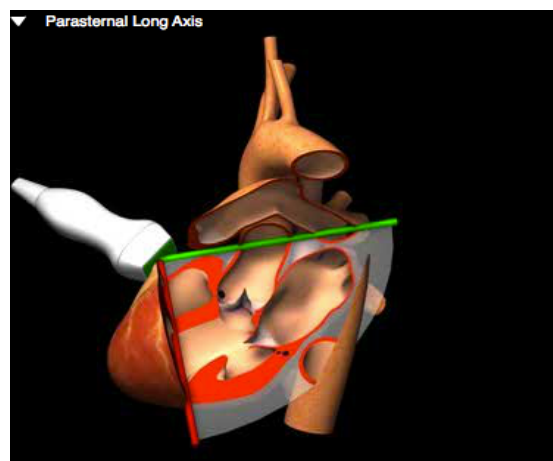
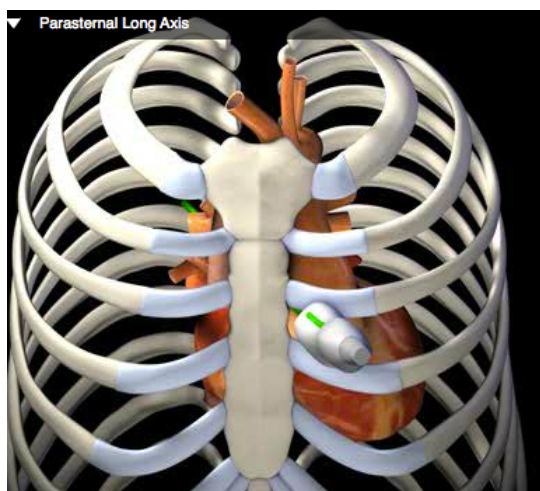


Figura 3.3 - Tre diverse visualizzazioni della sezione ecografica transtoracica parasternale asse lungo [Virtual TTE].

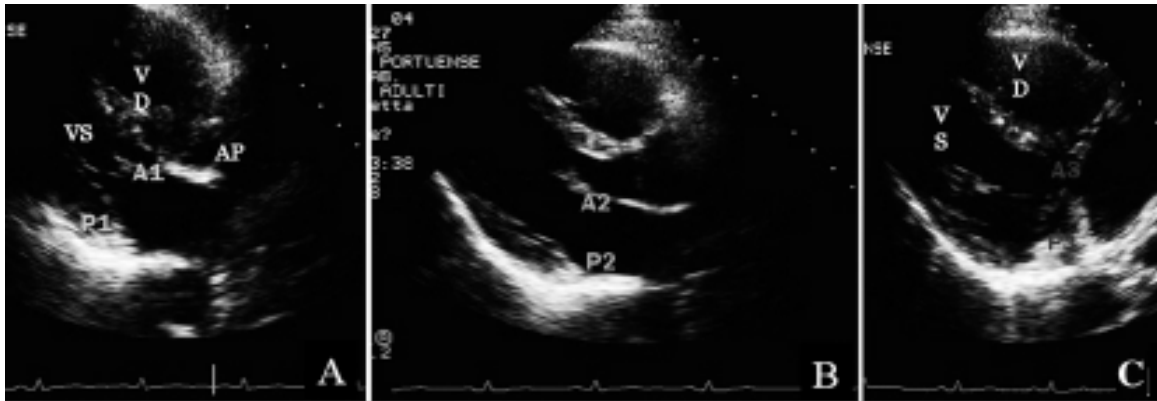


Figura 3.4 - Sezione parasternale asse lungo: (A) visualizzazione di A1-P1; (B) visualizzazione di A2-P2; (C) visualizzazione di A3-P3; [38]

Con la scansione **asse corto** si ottengono sezioni a vari livelli: dell'annulus, utile per misurare le dimensioni dello stesso, del margine libero dei lembi, utile per esaminare le commissure mediale e laterale e infine delle corde e dei muscoli papillari.

Nella sezione **quattro camere** il piano di scansione attraversa il lembo anteriore obliquamente: questa è la sezione ideale per verificare la corretta coaptazione dei lembi valvolari, ma non si dimostra utile per la diagnosi di prolasso valvolare.

Con angolazioni antero-posteriori della sonda è possibile esplorare la valvola nei piani contigui alle sezioni standard e visualizzare in tal modo le strutture di interesse.

La proiezione **due camere** [Fig. 3.5] esamina la valvola secondo un piano parallelo alla linea di chiusura e visualizza il solo lembo anteriore. Da questa posizione, angolando verso il basso e medialmente la sonda, si possono esaminare i muscoli papillari.

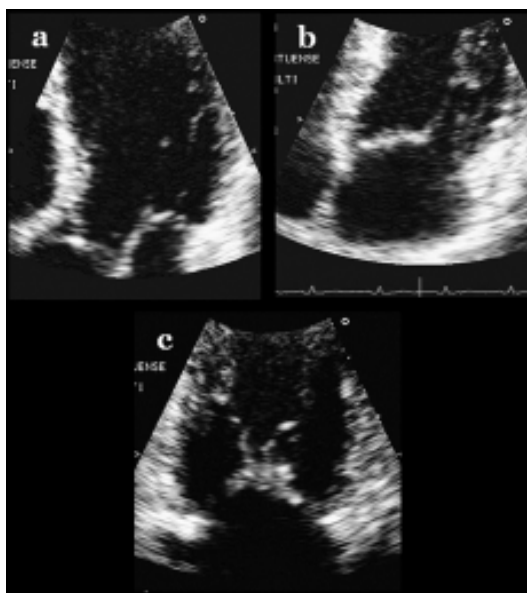


Figura 3.5 - Sezione due camere con piani di scansione che attraversano la valvola mitrale a livelli diversi: Livello (a) interseca i segmenti A1-P1; Livello (b) interseca i segmenti A3-P3; Livello (c) interseca le commissure. [38]

3.3 Proiezioni ecografiche rilevate

Dal momento che l'esame ecocardiografico transtoracico mirato allo studio della VM utilizza piani di scansione standard ed una serie di piani ad essi contigui[], si è deciso di rilevare proiezioni in asse lungo passanti per i due muscoli papillari per entrambe le tipologie di prova [Fig. 3.6].

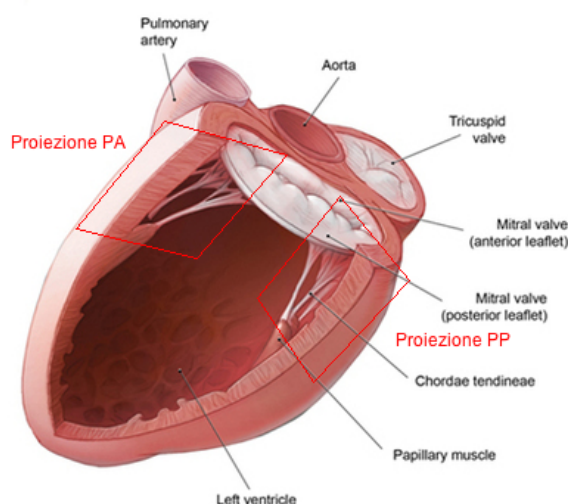


Figura 3.6 - Proiezioni ecografiche in asse lungo passanti per i due muscoli papillari, rilevate nel presente lavoro.

3.4 Prove statiche presso il ForCardioLab

In questa sezione verrà descritto il protocollo sperimentale adottato per la realizzazione delle prove statiche. Quest'ultime prevedono la pressurizzazione della camera ventricolare sinistra per via retrograda. Lo scopo di tali prove è quello di acquisire una serie di grandezze di interesse, al fine di costruire un pool di dati di riferimento per le successive prove dinamiche. Inoltre con esse si vogliono evidenziare le criticità presenti nella modalità di rilevamento delle grandezze e implementare, nelle successive analisi dinamiche, protocolli più precisi e mirati. La condizione più critica per la meccanica mitralica è quella che si verifica in fase di sistole, mentre è in atto la dilatazione ventricolare indotta dall'eiezione della pompa all'interno del ventricolo sinistro. Si è quindi proceduto a replicare in condizioni statiche tale situazione, al fine di ottenere le grandezze desiderate, riportate in [Tab. 3.1].

Prova Statica			
Grandezze di interesse	1. Perimetro Annulus	Area disponibile per la coaptazione	1. Distanza tra papillare anteriore e piano valvolare
	2. Diametro Aorto-murale		2. Distanza tra papillare posteriore e piano valvolare
	3. Diametro Commissurale		
Metodo per il rilevamento delle grandezze	<i>Ex Vivo</i> tramite fascetta	Marcatura della linea di coaptazione valvolare e Immagine della valvola excisa	Esame ecografico
Pressioni indagate	80 mmHg	60 mmHg 120 mmHg	[60 -180] mmHg con step pressori di 20 mmHg

Tabella 3.1 - Grandezze e modalità di ottenimento delle stesse delle prove statiche.

➤ **3.4.1 Setup sperimentale per le prove statiche presso il ForCardioLab**

➤ **3.4.1.1 Componenti utilizzati e layout del setup**

Il *setup* di seguito descritto permette la pressurizzazione della camera ventricolare sinistra per via retrograda, previa rimozione di uno dei foglietti valvolari aortici. In questa configurazione l'atrio sinistro viene completamente rimosso, rendendo così visibile la valvola mitrale e permettendo di marcare la linea di coaptazione mitralica.

I componenti principali [Fig. 3.7] sono:

1. pompa centrifuga (CP);
2. vasca riempita di acqua demineralizzata per l'alloggiamento del cuore;
3. pompa roller (RP);
4. Connettore aortico (C) a cui è collegato il trasduttore di pressione per il rilevamento della pressione ventricolare (P_v).

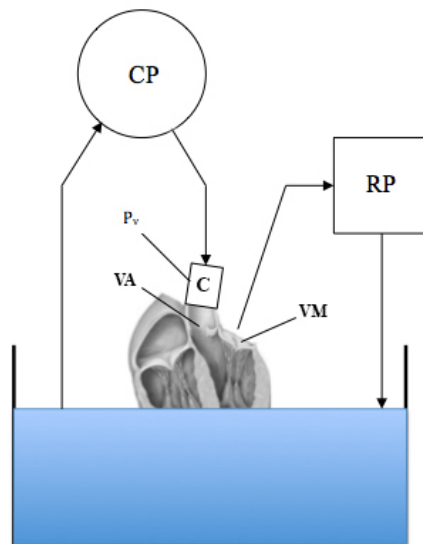
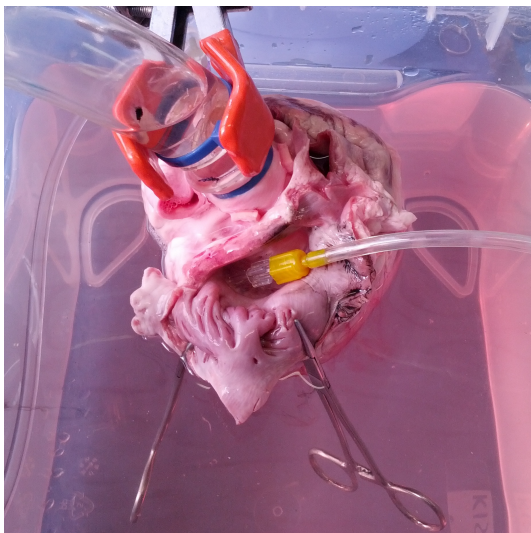


Figura 3.7 - Particolare del setup statico FCL (a sinistra) e schema del setup (a destra).

Il tubo di mandata permette di convogliare il fluido di lavoro in uscita dalla pompa centrifuga all'interno del ventricolo sinistro, per mezzo di un connettore suturato alla parete aortica. Raggiunta una pressione ventricolare pari a circa 60 mmHg la valvola mitrale inizia a chiudersi, creando così un circuito chiuso, dove la portata fluente è nulla e il punto di lavoro della pompa è posizionato nella condizione di ottenimento della massima prevalenza. Si ottiene quindi una pressione costante all'interno della camera ventricolare, modificabile agendo sul numero di giri della pompa.

La pompa roller, con funzione di aspiratore, viene azionata per poter mantenere il più possibile asciutto il sito di lavoro; tale necessità sorge al fine di poter marcare la linea di coaptazione evitando sbavature e la diffusione dell'inchiostro che, senza una adeguata

rimozione dell'acqua presente in prossimità della valvola atriale chiusa, finirebbe per marcare porzioni valvolari indesiderate.

La strumentazione con cui si è equipaggiato il *setup* è costituita da un trasduttore di pressione piezoresistivo, per rilevare la pressione ventricolare e un flussimetro situato in ingresso alla pompa centrifuga, già precedentemente descritti [Cap. 2.4.1.2].

In particolare, tra i sensori di pressione disponibili è stato utilizzato quello con un range pressorio tra 0 e 5 psi.

➤ 3.4.2 Protocollo sperimentale per le prove statiche presso il ForCardioLab

➤ 3.4.2.1 Preparazione del campione biologico

Per tali esperimenti sono stati impiegati 8 cuori porcini decongelati. Dopo aver pesato il campione biologico si è proceduto ad isolare i vasi, in particolare quello aortico, mediante forbici chirurgiche. L'aorta è stata accorciata in modo che ci fossero 2-3 cm di tessuto al di sopra della valvola; è stato rimosso uno dei tre foglietti aortici e le coronarie sono state chiuse utilizzando fili di sutura. Con la parte di vaso precedentemente rimossa si sono ricavati tre *patches*, successivamente suturati sulla parete esterna dell'aorta con punti a U avendo cura di mantenere un'angolazione reciproca di circa 120°; in seguito, i fili di sutura sono stati inseriti negli appositi fori del connettore aortico e si è effettuato l'inserimento dello stesso all'interno del vaso aortico. Le estremità di ciascun punto sono state fissate con nodi chirurgici per garantire la tenuta meccanica tra connettore e vaso [Fig. 3.8]. Infine, per assicurare la tenuta idraulica è stata impiegata una fascetta.



Figura 3.8 - Connettore aortico assicurato alla parete aortica.

Successivamente, l'atrio sinistro è stato completamente rimosso e la valvola mitrale è stata pulita, rimuovendo eventuali depositi di fibrina o coaguli presenti.

➤ 3.4.2.2 Esecuzione delle analisi

Prima dell'esecuzione delle prove sono stati effettuati alcuni cicli di preconditionamento del campione. Partendo da una pressione ventricolare pari a 60 mmHg, eseguendo incrementi di 20 mmHg, si sono raggiunti 180 mmHg; dopodichè è stato effettuato un analogo ciclo di scarico. In seguito, impostando una pressione ventricolare pari a 80 mmHg, sono state rilevate le misure valvolari di interesse [Tab. 3.1]. In particolare, utilizzando una fascetta in cotone di spessore pari a 5 mm, sono stati misurati: il diametro aorto-mitralico (Ao-M), il diametro commissurale (C-C) e il perimetro dell'annulus.

Per quanto concerne le analisi ecografiche (ecografo HDI 5000 e sonda lineare L 12-5 38mm), indagando un range pressorio da 60 a 180 mmHg con incrementi di 20 mmHg, sono state eseguite le due proiezioni allineate lungo i muscoli papillari.

Infine si è marcata linea di coaptazione mitralica, contrassegnando la posizione su entrambi i foglietti, per metà dei campioni ad una pressione ventricolare pari a 60 mmHg e per la restante metà a 120 mmHg. A tal fine è stato impiegato un inchiostro di china di colore nero, e uno strumento costruito ad hoc utilizzando un comune ago da cucito, in grado di forare leggermente la parte superficiale dei foglietti e inserire la corretta quantità di inchiostro [Fig. 3.9]. La scelta di usare l'inchiostro di china è stata fatta a seguito di diverse prove effettuate con alcuni inchiostri di uso comune; si è potuto accertare che quest'ultimo è in grado di marcare i lembi valvolari in modo preciso e puntuale, senza diffondere nella porzione di tessuto immediatamente circostante.

Il campione è poi stato tagliato posteriormente in corrispondenza della commissura postero-mediale, aperto e poi disteso per poter essere fotografato con lo scopo di valutare l'area disponibile per la coaptazione.

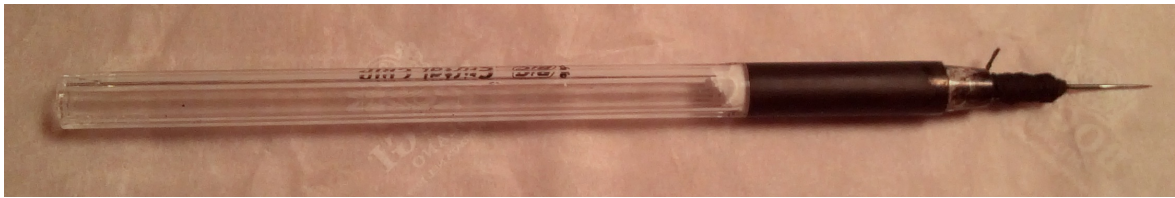


Figura 3.9 - Strumento impiegato per marcare la linea di coaptazione mitralica.

3.5 Prove dinamiche

In questa sezione verrà descritto il protocollo sperimentale adottato per la realizzazione delle prove dinamiche. Verranno dapprima descritte le modifiche introdotte *nel setup* TU/e per poter effettuare le indagini di interesse e in seguito gli strumenti impiegati per la realizzazione della griglia di markers sui foglietti mitralici. In [Tab. 3.2] si riportano le grandezze rilevate in questa tipologia di prove.

Prove Dinamiche			
Grandezze di interesse	1. Perimetro Annulus	Area disponibile per la coaptazione	1. Distanza tra papillare anteriore e piano valvolare
	2. Diametro Aorto-murale		2. Distanza tra papillare posteriore e piano valvolare
	3. Diametro Commissurale		
Metodo per il rilevamento delle grandezze	<i>Ex Vivo</i> tramite fascetta	Fibroscopio/Endoscopio	Esame ecografico
		+	
		Videocamera ad alta velocità e Immagine della valvola excisa	
Pressioni indagate	80 mmHg	[80-120] mmHg	[80-120] mmHg

Tabella 3.2 - Grandezze e modalità di ottenimento delle stesse delle prove dinamiche.

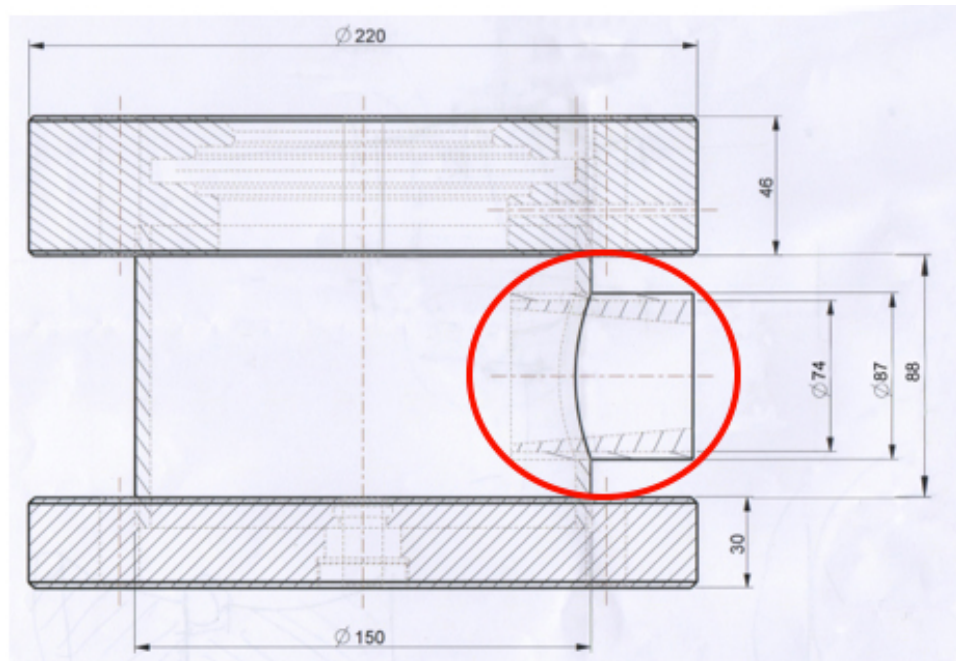
➤ **3.5.1 Setup sperimentale per le prove dinamiche presso la TU/e**

➤ **3.5.1.1 Modifiche del setup**

Per poter effettuare le proiezioni ecografiche di interesse, si è reso necessario effettuare due sostanziali modifiche nella camera di alloggiamento del cuore, volte a permettere la completa visualizzazione sia del piano valvolare che delle teste dei muscoli papillari.

In primo luogo è stato praticato un foro circolare trasversale nel cilindro verticale [Fig. 3.10], per l'inserimento di una guaina cilindrica in silicone, creata ad hoc per la sonda lineare LA523 dell'ecografo MyLab70XVG (Esaote, Firenze, Italia).

La guaina per la sonda è stata realizzata effettuando un calco in negativo della stessa, capovolgendo quest'ultima all'interno di un recipiente cilindrico,



avendo cura di sostenerla in *Figura 3.10 - Disegno quotato della camera di alloggiamento modificata.*

modo da non toccare il fondo del contenitore e centrandola rispetto alle pareti. Una volta raggiunta la posizione desiderata, si è proceduto all'iniezione del silicone all'interno del recipiente, riempiendolo per circa tre quarti della sua altezza. Il silicone utilizzato, Eurosil 8, una volta polimerizzato ha il pregio di essere estremamente deformabile. Sfruttando quest'ultima caratteristica, è stato possibile creare una guaina con diametro superiore al diametro del foro praticato nel cilindro verticale, in modo da poter garantire la tenuta idraulica della stessa. La dimensione interna massima della guaina è pari alla larghezza massima della sonda, ovvero 64 mm, mentre la lunghezza totale, pari a 84mm, è stata

successivamente accorciata per poter aver un più ampio range di movimento della sonda rispetto alla guaina [Fig. 3.11].

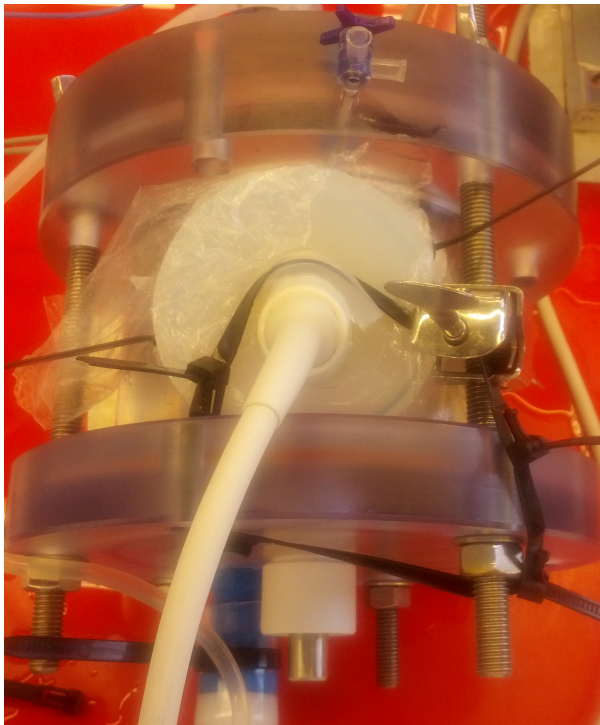
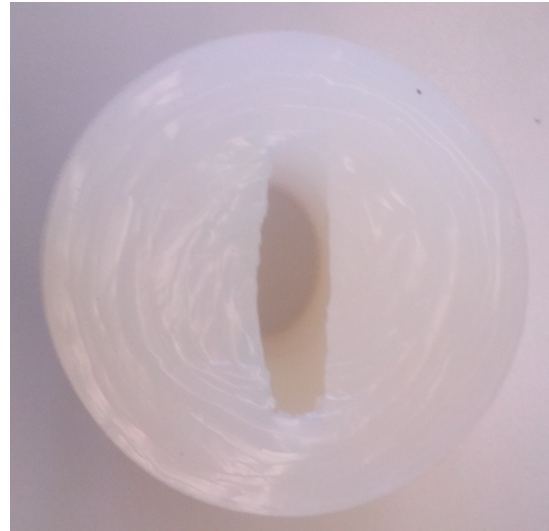
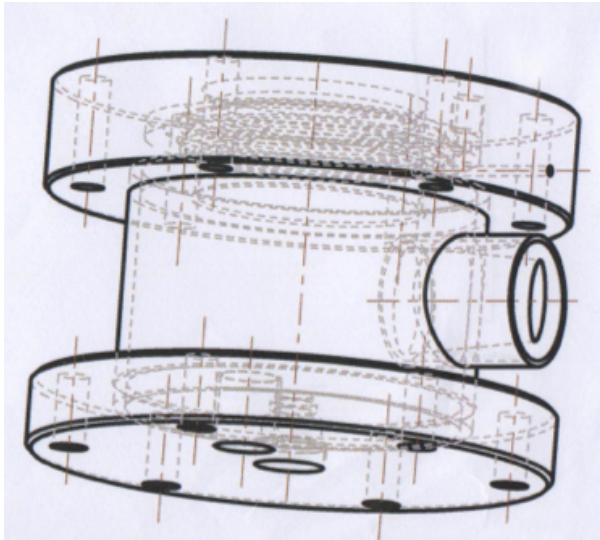


Figura 3.11 – Assemblato della camera di alloggiamento con guaina (in alto a sinistra); foto della guaina (in alto a destra); foto della camera di alloggiamento con guaina e sonda ecografica inserita (in basso a sinistra).

La seconda modifica riguarda il piatto superiore della camera, la cui faccia inferiore ha subito uno svaso a 45° in prossimità dell'alloggiamento della guarnizione per il vuoto, al fine di aumentare la finestra di accessibilità per le proiezioni da ottenere. Prove preliminari hanno evidenziato la necessità di effettuare tale correzione, dal momento che senza di essa

non si sarebbe potuto visualizzare contemporaneamente muscoli papillari e piano valvolare.

Inoltre, per quanto concerne il precarico, il resistore di Starling è stato sostituito da un semplice reservoir statico, costituito da un cilindro aperto, che riceve il fluido di lavoro in uscita al postcarico, con un outlet in prossimità della base, su cui è stato calzato il tubo che connette il precarico all'atrio sinistro. La scelta di usare questo tipo di precarico è stata dettata dal fatto che si è preferito concentrarsi principalmente sulla differente cinematica del complesso mitralico dovuta al diverso sistema di attuazione presente nei due banchi, utilizzando quindi un precarico simile per entrambi i *setup*.

➤ 3.5.1.2 Componenti utilizzati e layout del *setup*

I componenti principali utilizzati per eseguire le prove dinamiche sono i medesimi precedentemente descritti [Cap. 2.5.2.1], ad eccezione del precarico. Di seguito si riporta il layout impiegato per effettuare le indagini di interesse [Fig. 3.12].

Si è determinata la posizione e l'angolazione ottimale del sistema videocamera ad alta velocità-endoscopio rispetto alla valvola mitrale.

Per garantire una corretta visualizzazione del complesso mitralico, l'angolazione dell'asta rigida dell'endoscopio rispetto al piano di lavoro è risultata essere di circa 22°.

Inoltre, è stata definita la collocazione del sito di introduzione per l'asta dell'endoscopio all'interno dell'auricola sinistra [Fig. 3.13].

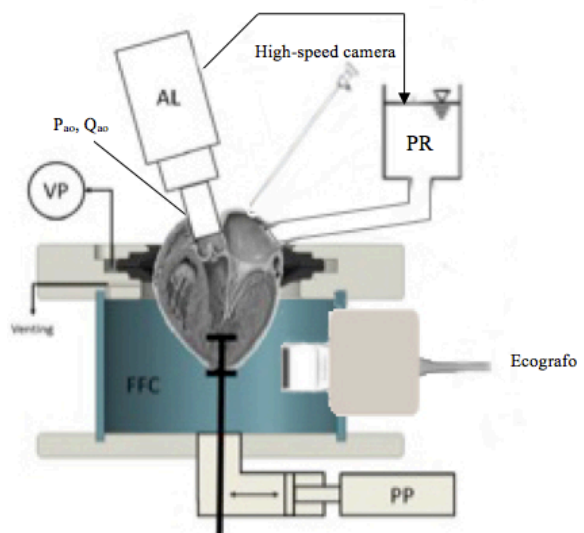
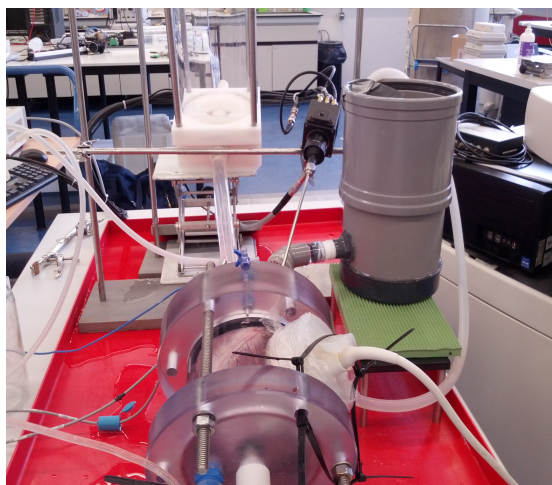


Figura 3.12 - Foto del *setup* TU/e modificato (a sinistra) e schema del *setup* (a destra).



Figura 3.13 - Sito di inserimento dell'asta dell'endoscopio in auricola sinistra.

➤ **3.5.2 Setup sperimentale per le prove dinamiche presso il ForCardioLab.**

➤ **3.5.2.1 Componenti utilizzati e layout del setup**

La trattazione dei componenti utilizzati è stata esposta nel [Cap. 2.5.1.1]. Non sono state apportate sostanziali modifiche né per quanto riguarda gli strumenti adoperati, né per il layout del banco prova. In aggiunta al *setup* di base è stato introdotto il sistema per l'esecuzione delle analisi endoscopiche costituito da videocamera ad alta velocità Phantom Miro eX2 (Vision Research Inc., Wayne, NJ, USA) accoppiata ad un fibroscopio ENF-GP (Olympus) con relativa centralina luce [Fig. 3.14-3.15].

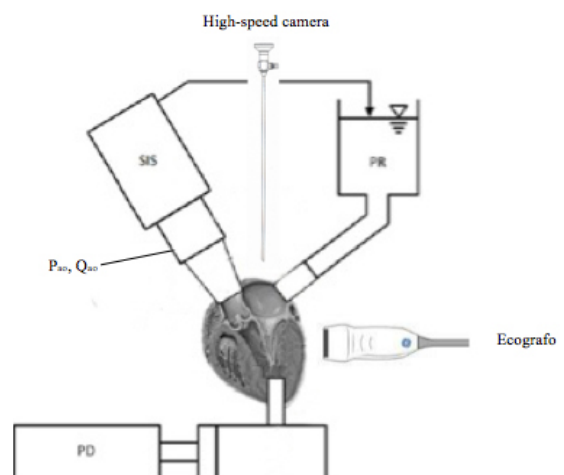
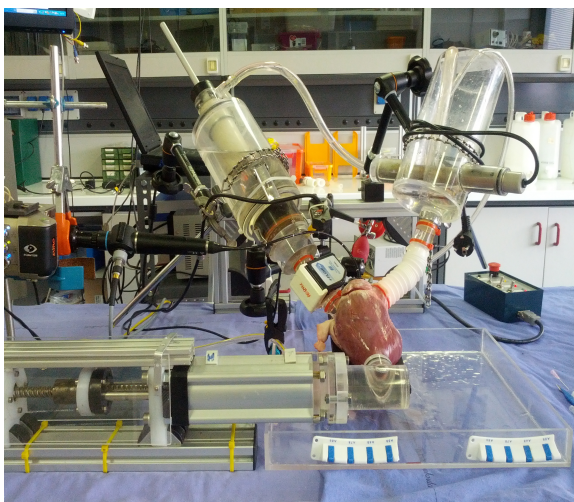


Figura 3.14 - Foto del setup TU/e impiegato per le prove (a sinistra) e schema del setup (a destra).

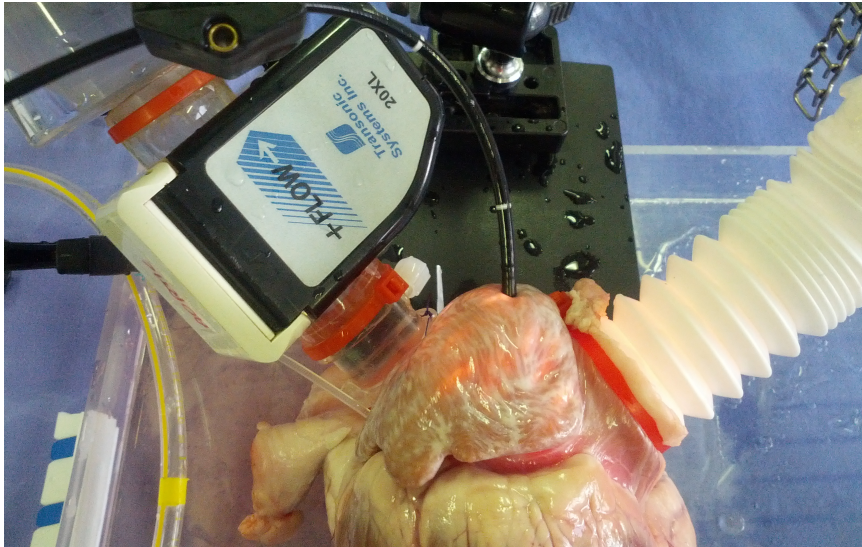


Figura 3.15 - Sito di inserimento dell'asta del fibroscopio in auricola sinistra.

➤ 3.5.3 Protocollo sperimentale

➤ 3.5.3.1 Strumentazione per la realizzazione del pattern mitralico

Dal momento che, diversamente dal lavoro di Spinner [81], la valvola non è excisa, è stato necessario individuare una metodologia per effettuare la griglia di markers sui foglietti valvolari che consentisse minima invasività, per non danneggiare né la struttura valvolare né la cavità ventricolare e allo stesso tempo, che fosse il più precisa possibile.

Il primo requisito da rispettare per poter realizzare il pattern è quello di riuscire ad ottenere una superficie del foglietto tesa e il più possibile orizzontale; si è quindi considerato un approccio che sfruttasse il foro apicale, effettuato in entrambi i *setup* per la connessione al sistema pulsatile.

Si è costruito un dischetto di dimensioni ridotte, rispetto alle dimensioni totali di entrambi i foglietti, con foro filettato, montato su una barra di acciaio inox con estremità filettata. Il dischetto è realizzato in policarbonato, ha un diametro pari a 10 mm e uno spessore pari a 6 mm; la filettatura M6 è realizzata per metà dello spessore (3 mm). La barretta di acciaio inox è lunga 190 mm, con estremità filettata (M6) di lunghezza 23 mm [Fig. 3.16].



Figura 3.16 - Particolare del dischetto in PC (in alto) e sistema barra-dischetto (in basso).



Su tale dischetto è stata creata una griglia di puntini equispaziati 2 mm in entrambe le direzioni; la trasparenza è un requisito fondamentale al fine di rendere visibile il pattern inciso sul dischetto. Infatti, il sistema barra-dischetto introdotto dal foro apicale, posizionato al di sotto della porzione di foglietto su cui si vuole riprodurre la griglia di markers, solleva quest'ultimo, permettendo di intravedere attraverso il lembo il pattern. Per aumentare la visibilità sul sito di lavoro si è illuminato il ventricolo sinistro mediante una sorgente a luce fredda (KL 1500 LCD, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) introdotta in maniera retrograda in aorta.

Per la creazione del pattern si è optato per un inchiostro usato in istologia per marcare aree di tessuto (Marking dye for tissue, Black, n° 24113-2, 2oz, Polysciences, Warrington, PA, USA), applicato sui foglietti per mezzo di uno stecchino di legno con punta arrotondata, per evitare il danneggiamento dei lembi valvolari [Fig. 3.17]. Per aumentare il fissaggio di tale inchiostro si è operata una diluizione del 30% con acqua ed etanolo in parti uguali.

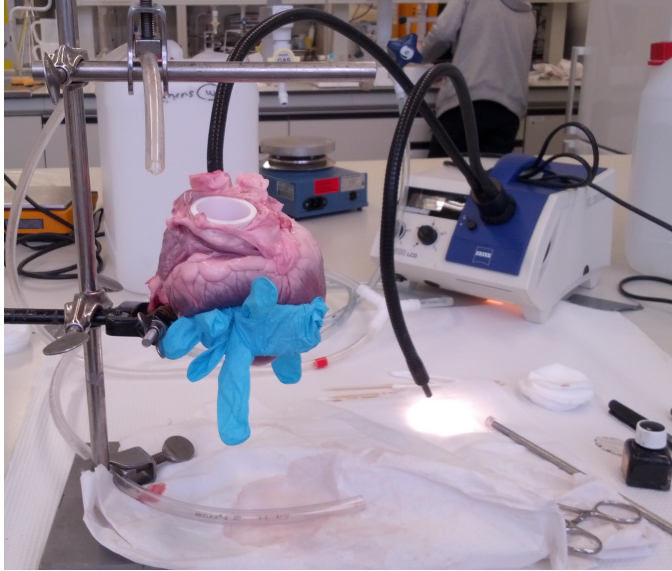
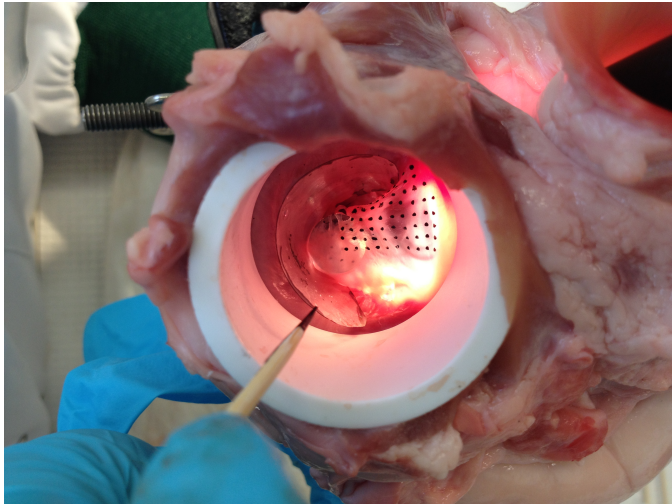


Figura 3.17 - Modalità di esecuzione del pattern (a sinistra) e pattern ultimato (a destra).



➤ 3.5.3.2 Preparazione del campione biologico

Per tali esperimenti sono stati impiegati 6 cuori porcini decongelati in entrambi i *setup*. Il giorno precedente all'esecuzione della prova, il campione, dopo essere stato adeguatamente ispezionato, pulito e pesato, è stato ancorato ad uno stativo mediante un braccio, in modo che risultasse totalmente sospeso. In seguito, dopo aver inciso il sito di immissione delle vene polmonari, si è inserito un cilindro cavo in materiale plastico all'interno dell'atrio sinistro, per allargare il campo di visibilità della valvola mitrale durante l'esecuzione del pattern. Tale cilindro ha un diametro esterno pari a 40 mm, un diametro interno di 36mm e un'altezza pari a 25 mm [Fig. 3.17]. Per assicurare una

riuscita ottimale del pattern, è stata utilizzata dell'aria compressa per asciugare i foglietti valvolari, in modo che l'apposizione di inchiostro risultasse senza sbavature.

Infine è stato preparato il cuore chiudendo le coronarie e inserendo in successione il connettore apicale, aortico e quello atriale, come da procedure illustrate nei due banchi prova [50-51] [Fig. 3.18]

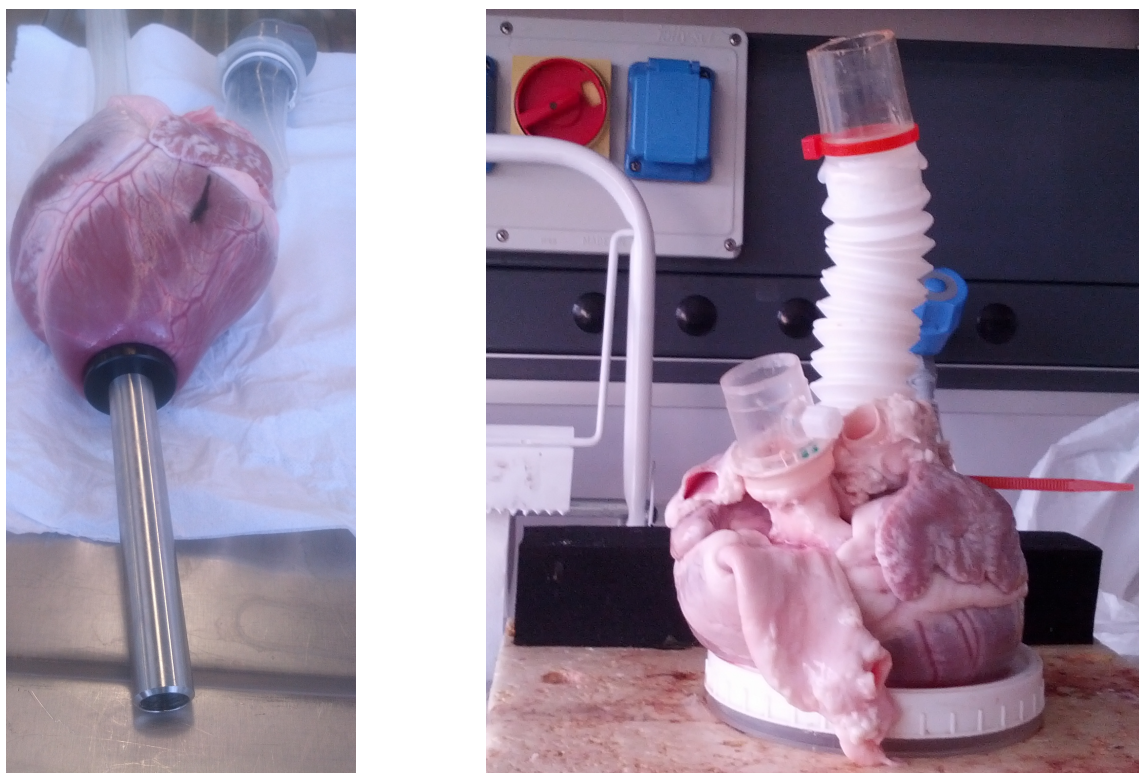


Figura 3.18 - Preparazione del campione ultimata nel setup TU/e (a sinistra) e nel setup FCL (a destra).

Le analisi effettuate durante le prove dinamiche sono di tipo ecografico, le due proiezioni in asse lungo dei muscoli papillari, e di tipo endoscopico, filmando la valvola mitrale con la griglia di markers, per estrarre i parametri di interesse.

➤ 3.5.3.3 Esecuzione delle analisi

Il *setup* è stato equipaggiato con il trasduttore di pressione aortico e il flussimetro per la misura della portata aortica.

Si è quindi azionata la pompa a pistone in modo da raggiungere i 60 bpm e eseguito il tuning del postcarico, agendo dapprima sulla resistenza caratteristica per impostare la forma della curva di pressione aortica e successivamente sulla resistenza periferica per traslare il valore medio della curva secondo necessità. Raggiunti i parametri fluidodinamici desiderati portata e pressioni nel range 3,5l-5l e 80-120mmHg.

Introducendo l'asta rigida dell'endoscopio (fibroscopio ad asta flessibile per le prove dinamiche presso il ForCardioLab) all'interno dell'auricola sinistra e assicurandola mediante borsa di tabacco, è stato registrato il video della valvola mitrale con pattern durante i cicli cardiaci, ad una frequenza di 200 Hz. I video sono stati sincronizzati, mediante un sistema di triggering, con i valori di pressione e portata. Infine si sono acquisite le proiezioni ecografiche di interesse.

Per l'ottenimento delle grandezze geometriche *ex vivo*, il cuore è stato successivamente pressurizzato internamente per via retrograda, attraverso la valvola aortica (con foglietto asportato), fino al raggiungimento di una pressione aortica di 80 mmHg, analogamente a quanto eseguito per le prove statiche [Cap. 3.4.2.2]. Al termine di ogni test, il campione è stato aperto posteriormente lungo la commissura postero-mediale per ottenere l'immagine di riferimento per il calcolo, unitamente alle informazioni fornite dai video ad alta velocità, dell'area disponibile per la coaptazione.

3.6 Procedure di elaborazione dei dati sperimentali

In questa sezione verranno presentate le procedure applicate per l'elaborazione dei dati sperimentali; nello specifico, per le proiezioni ecografiche e per le immagini del campione aperto esclusivamente delle prove statiche è stato impiegato il software per l'elaborazione di immagini Image J, mentre per l'analisi delle immagini endoscopiche delle prove dinamiche è stato utilizzato Matlab.

➤ 3.6.1 Calcolo dell'area disponibile per la coaptazione

➤ 3.6.1.1 Prove statiche

Tramite l'utilizzo del software ImageJ è stata misurata, direttamente sulle immagini dei campioni excisi, l'area disponibile per la coaptazione, precedentemente marcata con l'inchiostro a china alle pressioni ventricolari di 60mmHg e di 120mmHg. Tale software, una volta stabilita la scala di misura sull'immagine da analizzare, permette di approssimare i contorni anatomici di interesse, tracciando una spezzata chiusa lungo i bordi dei foglietti e la linea di coaptazione marcata. Evidenziata l'area di interesse è stata calcolata l'area corrispondente alla selezione [Fig. 3.19]. Tale procedura è stata eseguita per tre volte per ogni campione sia per il foglietto anteriore che per quello posteriore.

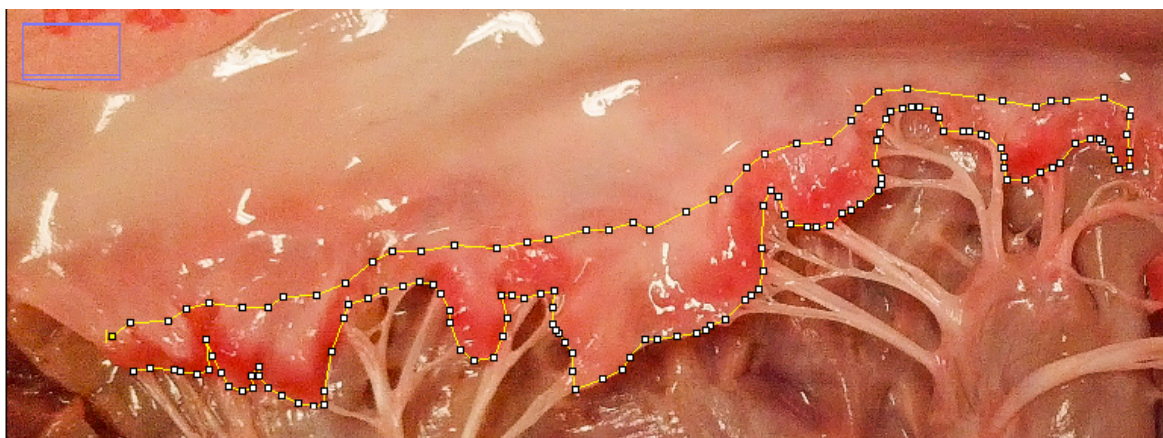


Figura 3.19 - Area del foglietto posteriore mitralico evidenziata con Image J.

➤ 3.6.1.2 Prove dinamiche

Per quanto concerne l'analisi dei video realizzati con il sistema endoscopio-videocamera ad alta velocità, la procedura è la seguente:

1. Estrazione delle immagini di interesse

In primo luogo, per ogni campione testato sono state identificate le fasi diastolica e sistolica nei cicli acquisiti, calcolandone le rispettive durate. La ripartizione media delle due fasi, riferita ad un singolo ciclo è risultata essere pari al 60% per la diastole e 40% per la sistole.

Successivamente per ogni valvola sono state estratte tre immagini definite di inizio sistole, di picco sistolico e di fine sistole. Il criterio impiegato per la scelta di tali immagini prevede che per l'immagine di inizio sistole venga selezionato il primo frame in cui la valvola risulta completamente chiusa, non solo considerando la coaptazione dei foglietti, ma anche verificando che tra i vari segmenti costituenti il lembo non ci sia alcuna apertura; per l'immagine di picco sistolico viene identificato il frame in corrispondenza del picco pressorio della curva di pressione aortica e per quella di fine sistole l'ultimo frame in cui la valvola è totalmente chiusa, appena prima dell'inizio della fase diastolica [Fig. 3.20].

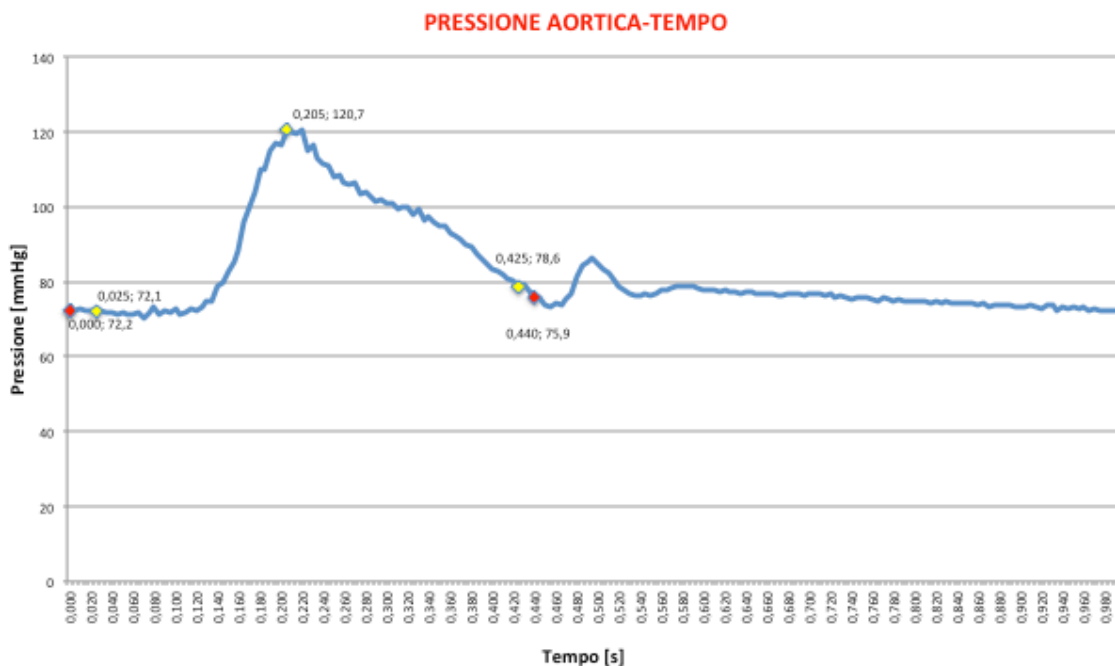


Figura 3.20 - Curva Pressione-Aortica - Tempo con evidenziati (da sinistra a destra): inizio della fase sistolica (rosso), inizio sistole (giallo), picco sistolico (giallo), fine sistole (giallo) e fine della fase sistolica (rosso).

2. Identificazione del numero di colonne

Per poter costruire le matrici contenenti le informazioni relative al pattern realizzato su ogni singolo foglietto, si è reso necessario realizzare una corrispondenza tra le immagini scattate con valvola excisa [Fig. 3.21] e i frame estratti dai video [Fig. 3.22]. Con l'aiuto di un punto di riferimento (X) creato sul foglietto anteriore, è stato possibile numerare ogni colonna visibile nei frame e identificare la stessa sull'immagine a cuore aperto.

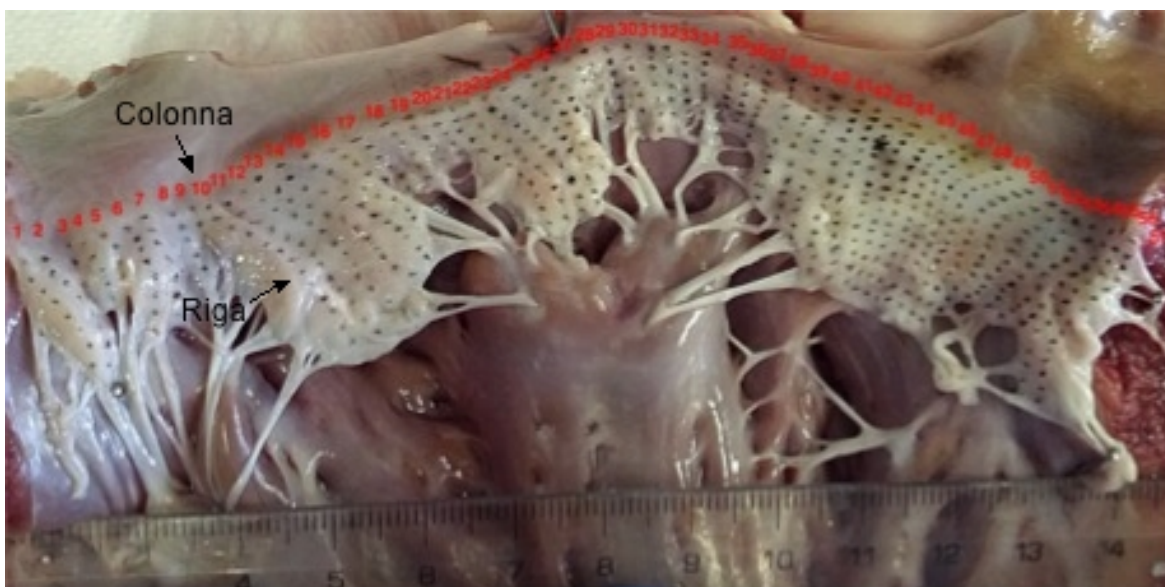


Figura 3.21 - Immagine di riferimento del campione exciso con il numero di colonne evidenziate.

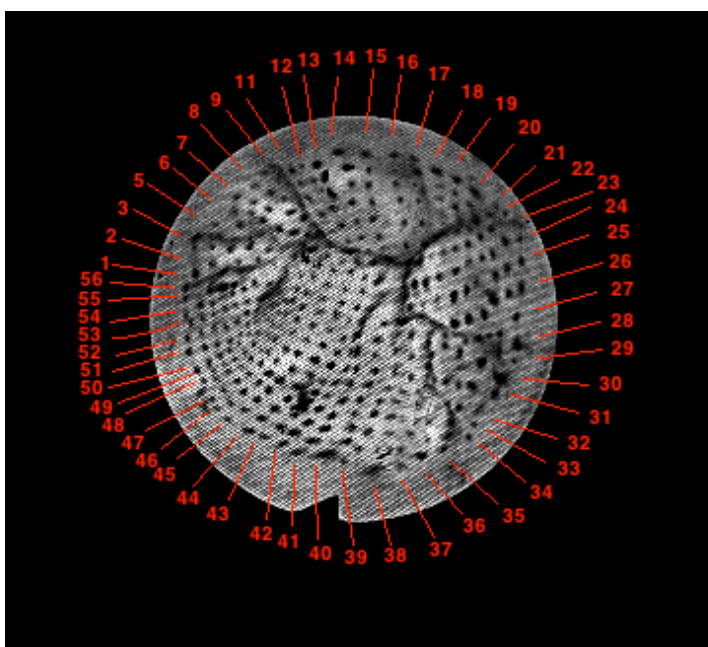


Figura 3.22 - Frame di inizio sistole (setup FCL) con il numero di colonne evidenziate.

3. Creazione delle matrici

Come precedentemente spiegato [Cap. 2.4.1], impiegando appositi programmi Matlab® [81] si è proceduto a contare, per ogni foglietto e per ogni condizione sperimentale di interesse, il numero di puntini in ogni riga della griglia, dal momento che la modalità di creazione della matrice prevede tale informazione.

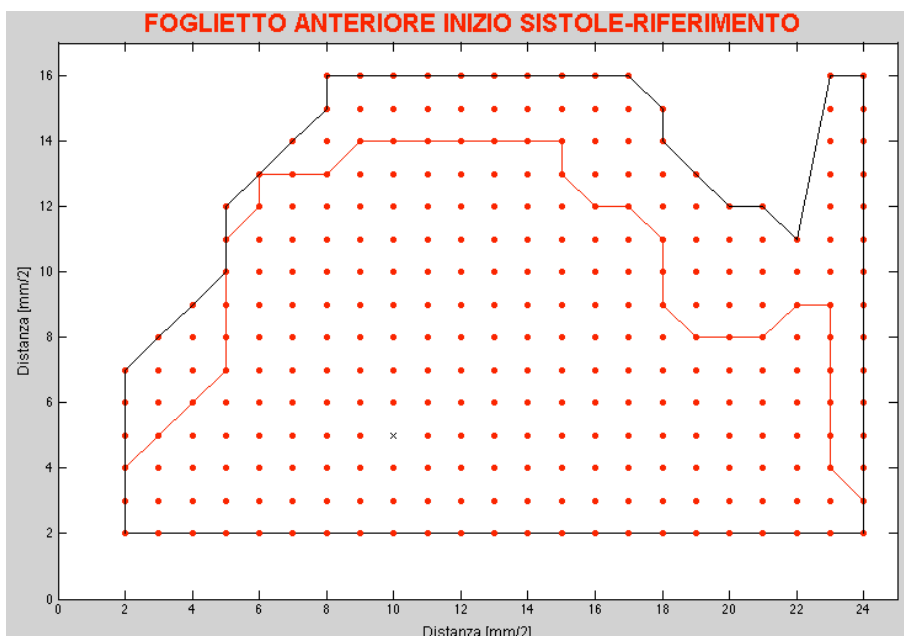
In particolare, per l'immagine statica di riferimento del campione exciso sono stati contati tutti i puntini presenti su entrambi i foglietti, mentre per le immagini di inizio sistole, picco sistolico e fine sistole, solamente i markers visibili, dal momento che parte del foglietto risulta coaptante. Inoltre è stata inserita la posizione del punto di riferimento (x) presente sul foglietto anteriore, per una migliore identificazione dei lembi valvolari durante l'acquisizione video.

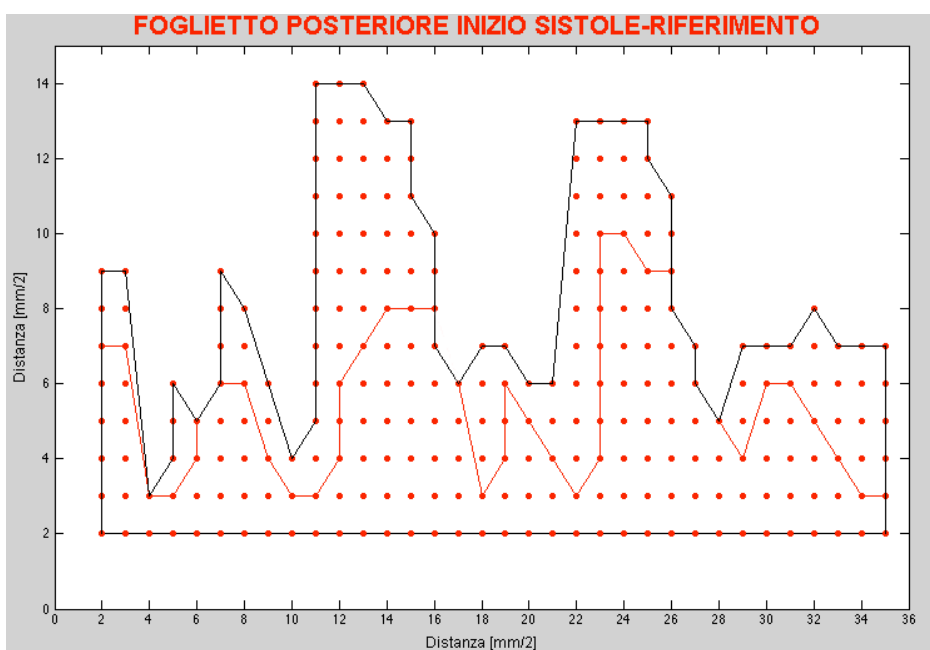
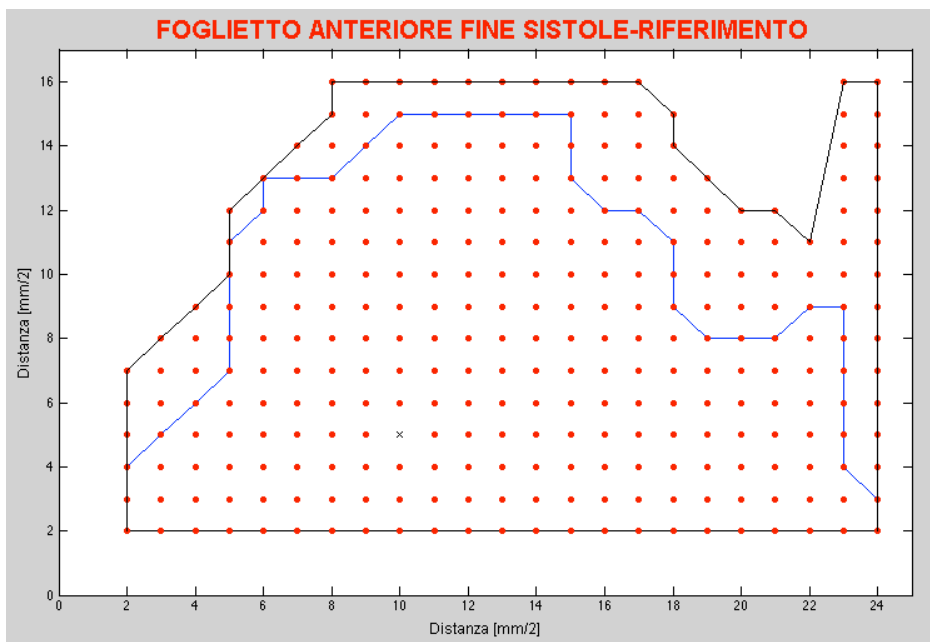
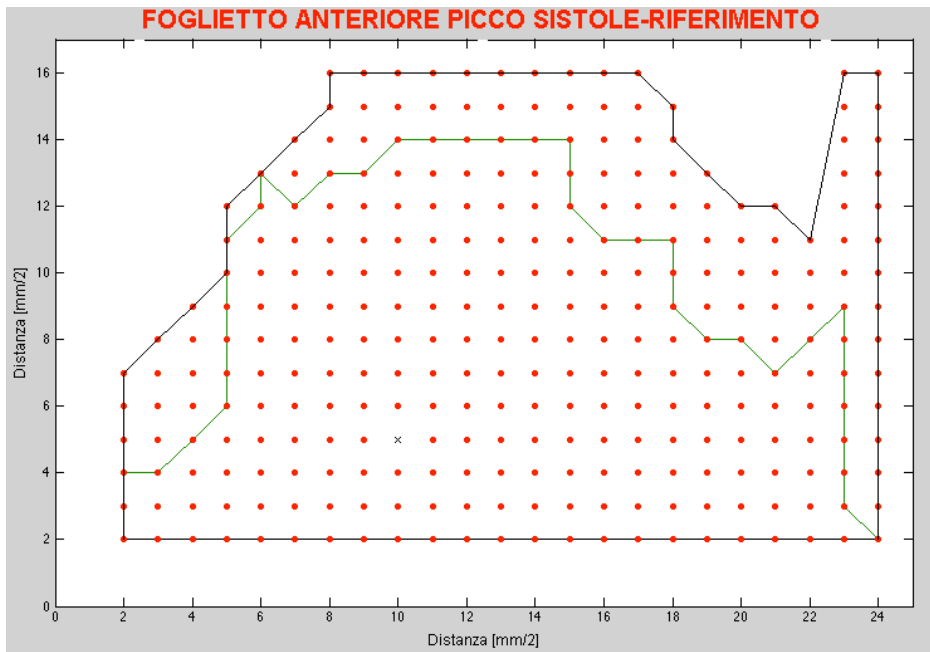
Con tali informazioni è stata creata una matrice di uni e di zeri per ogni foglietto e per ogni condizione sperimentale indagata. Ogni puntino visibile è rappresentato da un 1, ogni porzione di foglietto non visibile da uno 0 e il punto di riferimento è raffigurato da una x.

Per ogni campione sono state quindi create otto matrici, corrispondenti alle condizioni sperimentali indagate per ogni singolo foglietto e alle due immagini di riferimento (da campione exciso) dei rispettivi lembi.

4. Creazione dei grafici dei foglietti

Dalle matrici sono stati prodotti sei grafici [Fig. 3.23-3.28] per ogni campione, sovrapponendo le aree visibili dei singoli foglietti nelle tre fasi analizzate, con l'area dei foglietti ricavata dall'immagine di riferimento.





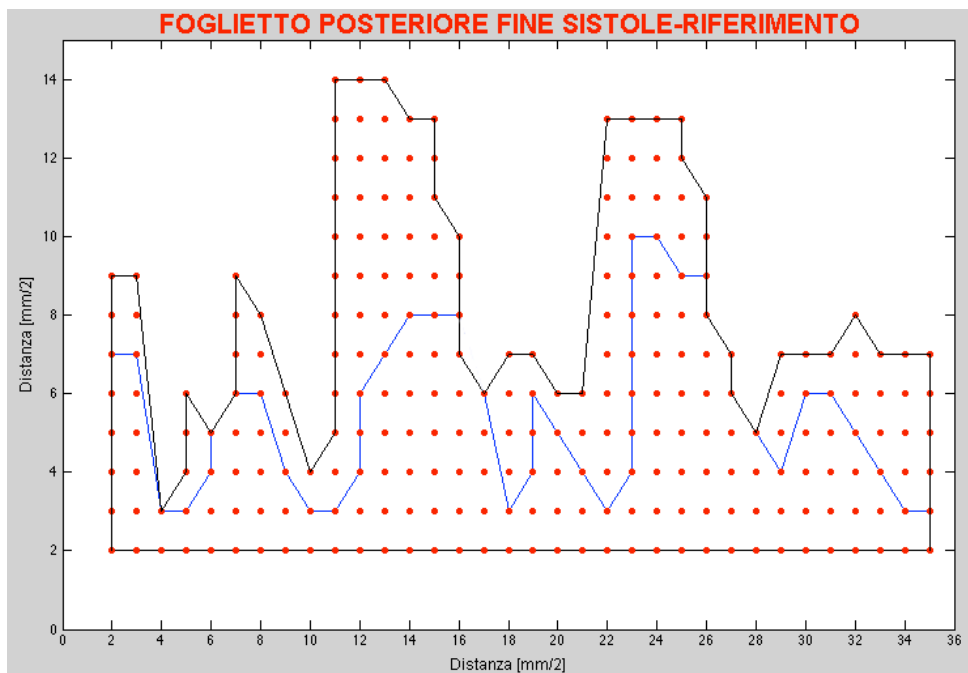
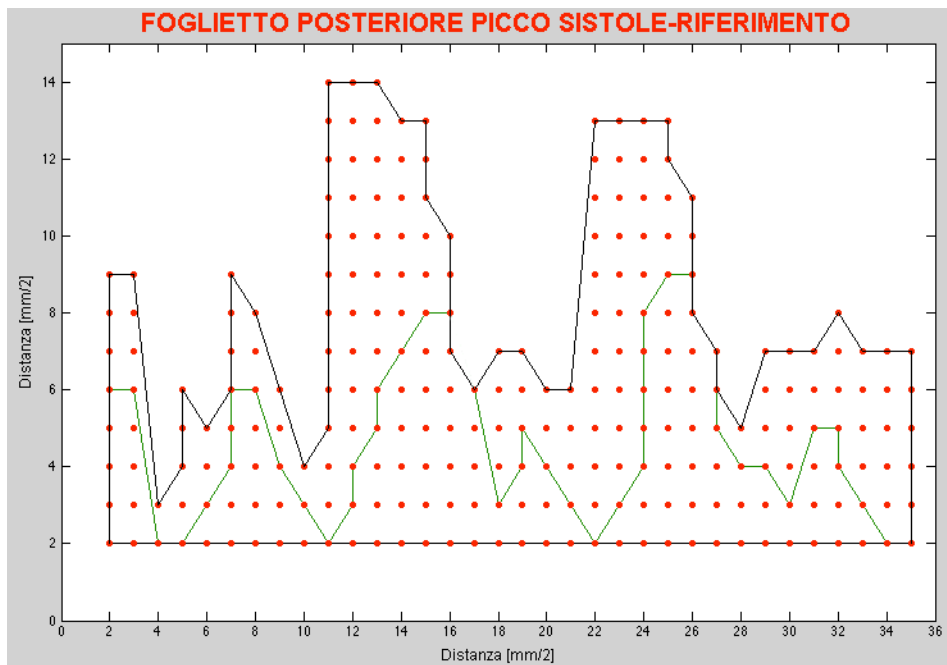


Figura 3.23-3.28 - Grafici della sovrapposizione tra le aree delle figure di riferimento e quelle delle tre condizioni sistoliche, di entrambi i foglietti.

5. Calcolo dell'area disponibile per la coaptazione

Modificando opportunamente il programma Matlab è stato possibile calcolare tutte le otto aree in questione; sottraendo quelle nelle tre condizioni sperimentali indagate a quelle dell'immagine di riferimento è stato possibile ricavare l'area disponibile per la coaptazione [Fig. 3.29].

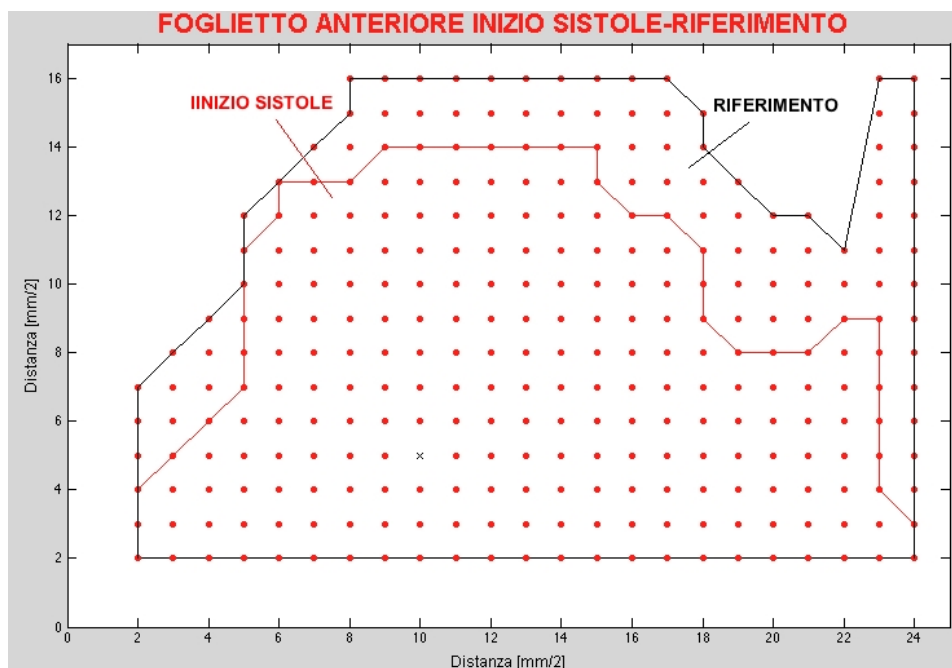


Figura 3.29 - Grafico della sovrapposizione con aree evidenziate.

➤ 3.6.2 Misura delle distanze tra muscoli papillari e piano valvolare

➤ 3.6.2.1 Prove statiche e dinamiche

Per quanto concerne l'estrazione delle grandezze di interesse, eseguita con ImageJ, dalle proiezioni ecografiche acquisite sia nelle prove statiche che in quelle dinamiche, la procedura è analoga.

In [Fig. 3.30] si mostra il metodo di individuazione della distanza tra la testa dei papillari, anteriore e posteriore, e il piano valvolare, identificate come segue: dopo aver tracciato il segmento congiungente le inserzioni di entrambi i foglietti sull'annulus, definito piano valvolare (PV) e il segmento parallelo a quest'ultimo, tangente alla testa del papillare considerato, si è tracciato il segmento ortogonale ad entrambi, che rappresenta la distanza tra la testa del papillare e il piano valvolare (PA-PV per la distanza tra papillare anteriore e piano valvolare e PP-PV per la distanza tra papillare posteriore e piano valvolare) [Fig. 3.31-3.32].

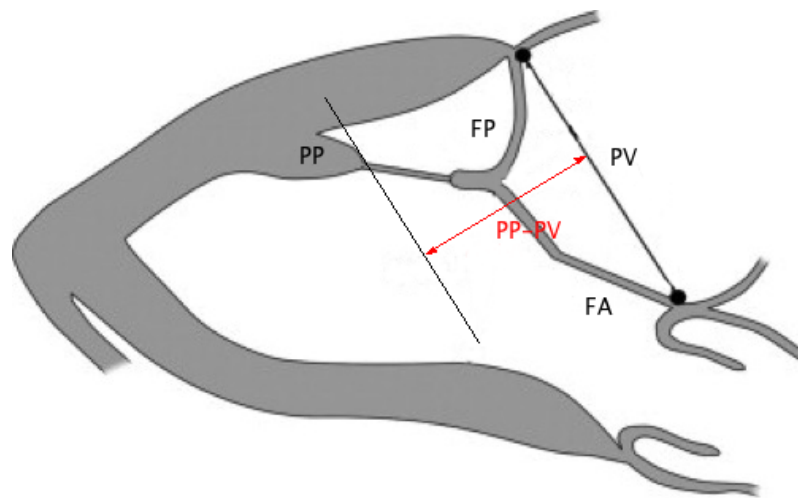


Figura 3.30- Rappresentazione del metodo di individuazione della distanza tra la testa dei papillari, anteriore e posteriore, e il piano valvolare.

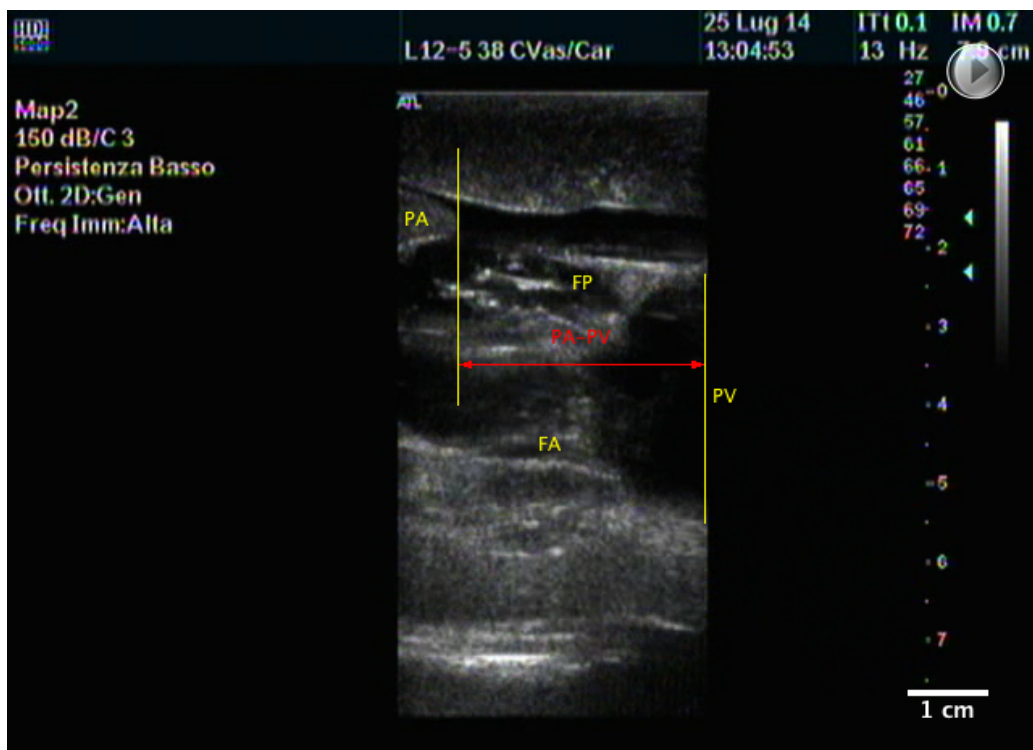


Figura 3.31- Proiezione ecografica rilevata nel setup FCL con le strutture anatomiche di interesse e distanza PA-PV evidenziate.

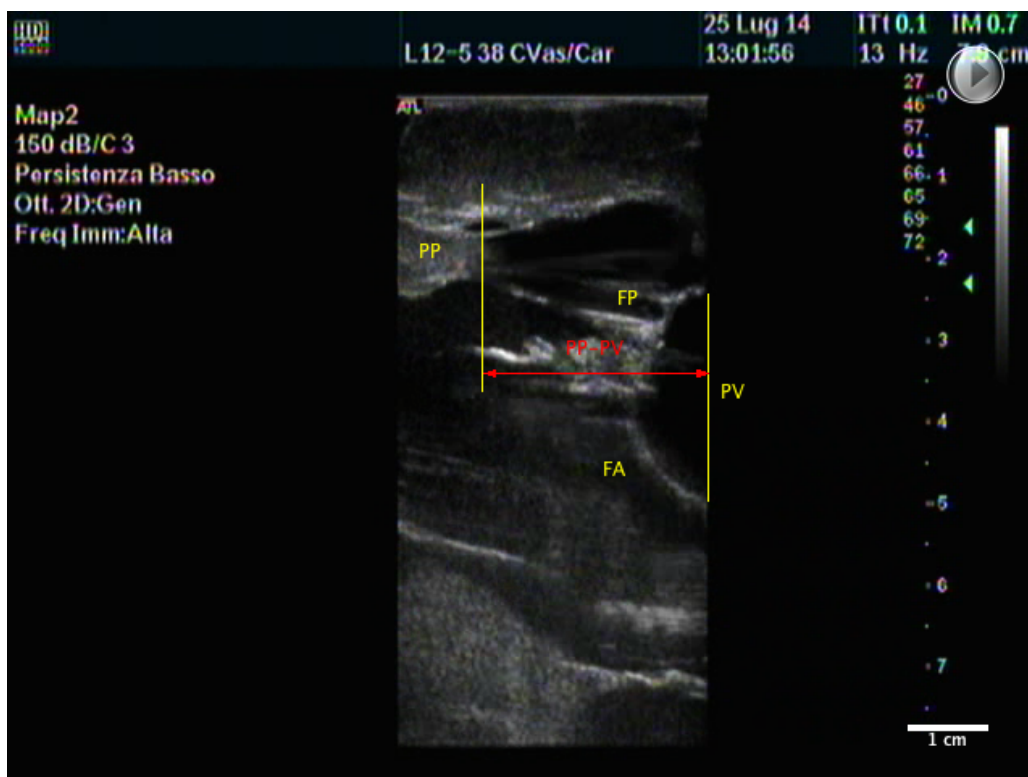


Figura 3.32- Proiezione ecografica rilevata nel setup FCL con le strutture anatomiche di interesse e distanza PP-PV evidenziate.

Per le prove statiche tali distanze (PP-PV e PA-PV) sono state misurate per i valori di pressione: 80mmHg, 100 mmHg e 120 mmHg. La scelta di tali pressioni è dettata dalla necessità di poter comparare le distanze misurate nelle prove statiche e quelle nelle prove dinamiche nelle tre diverse condizioni sistoliche. Per le prove dinamiche si sono rilevate per l'intera durata dell'evento sistolico analizzato, estraendo in particolare tali valori dai frame corrispondenti alle stesse pressioni per cui si sono esaminati i frame del video con endo/fibroscopio, definiti di inizio sistole, picco sistolico e fine sistole.

3.7 Analisi Statistica dei dati

L'analisi statistica dei dati ottenuti per entrambe le tipologie di prova è stata effettuata mediante GraphPad Prism.

Si è proceduto alla verifica di normalità dei dati rilevati con tre test: D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. In caso di esiti positivi è stato usato il test Anova one way parametrico per misure ripetute con post-hoc test di Bonferroni; in caso di

distribuzioni non normali sono stati impiegati: t-test non parametrico non appaiato (test di Mann Whitney), test Anova one way non parametrico per misure non ripetute (test di Kruskal Wallis) con post-hoc test di Dunn e infine test Anova one way non parametrico per misure ripetute (test di Friedman) con post-hoc test di Dunn.

4.

RISULTATI

In questa sezione si intende presentare i risultati ottenuti analizzando le informazioni estratte dalle foto del campione exciso e dai frame video rispettivamente delle prove statiche e di quelle dinamiche.

In aggiunta si esporranno gli esiti delle indagini ecografiche sulle distanze tra muscoli papillari e piano valvolare per entrambe le tipologie di prova effettuate. Infine si porranno in confronto i risultati ricavati nelle prove statiche e in quelle dinamiche eseguite presso il ForCardioLab.

4.1 Prove statiche

➤ 4.1.1 Area disponibile per la coaptazione

Di seguito [Graf. 4.1-4.2] si riportano i grafici delle medie (su 8 cuori testati) delle aree disponibili per la coaptazione relative ai foglietti anteriori e posteriori, in corrispondenza delle pressioni ventricolari indagate (60 mmHg e 120 mmHg).

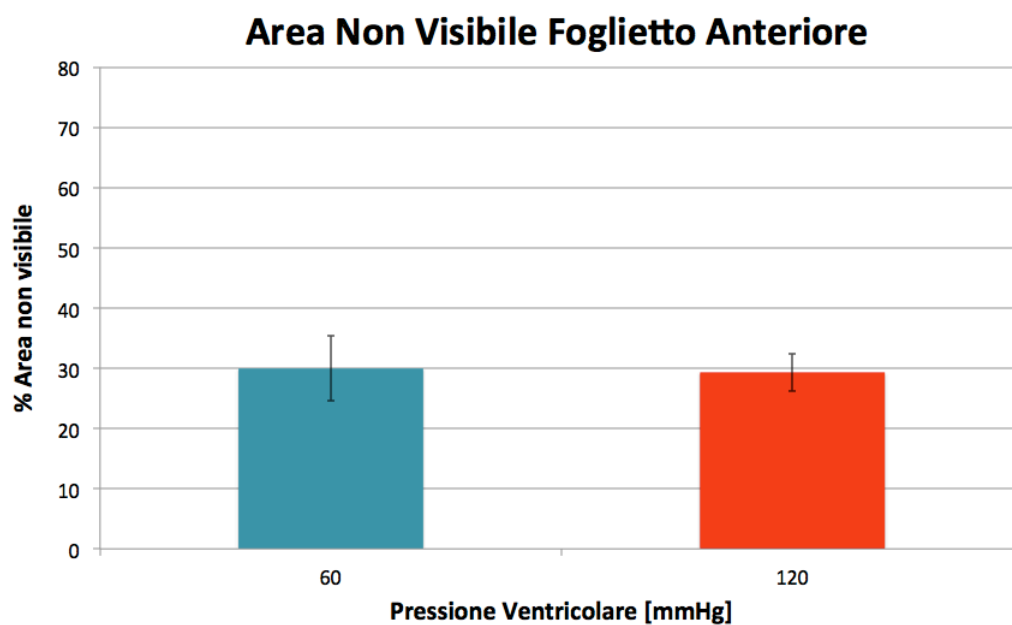


Grafico 4.1- Valori medi delle aree disponibili per la coaptazione relative al foglietto anteriore (a 60 mmHg e a 120 mmHg).

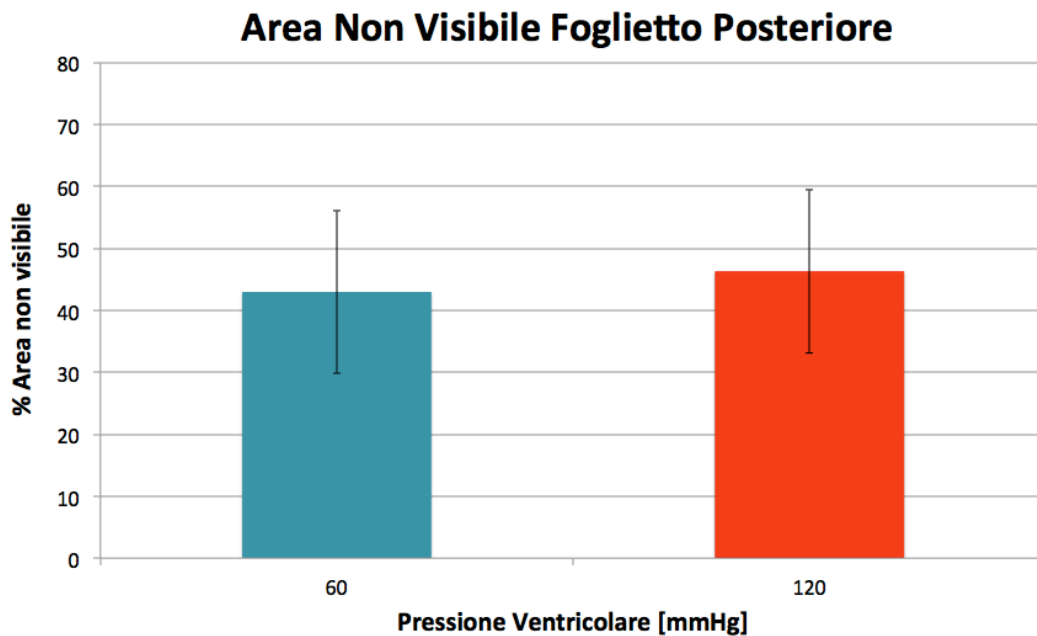


Grafico 4.2- Valori medi delle aree disponibili per la coaptazione relative al foglietto posteriore (a 60 mmHg e a 120 mmHg).

L'analisi statistica non ha rilevato differenze significative né tra i foglietti anteriori né tra quelli posteriori nelle due differenti condizioni pressorie analizzate.

Tale evidenza indica che in entrambi i foglietti, l'area disponibile per la coaptazione non varia significativamente all'interno del range pressorio indagato, mostrando la stabilità valvolare a fronte di variazioni pressorie nel *setup* ForCardioLab nella sua versione statica.

➤ 4.1.2 Distanze tra muscoli papillari e piano valvolare

Per quanto riguarda le distanze tra i muscoli papillari e piano valvolare (PA-PV e PP-PV) di seguito sono riportati i grafici [Graf. 4.3-4.4] relativi agli andamenti nelle tre pressioni di interesse: 80 mmHg, 100 mmHg e 120 mmHg.

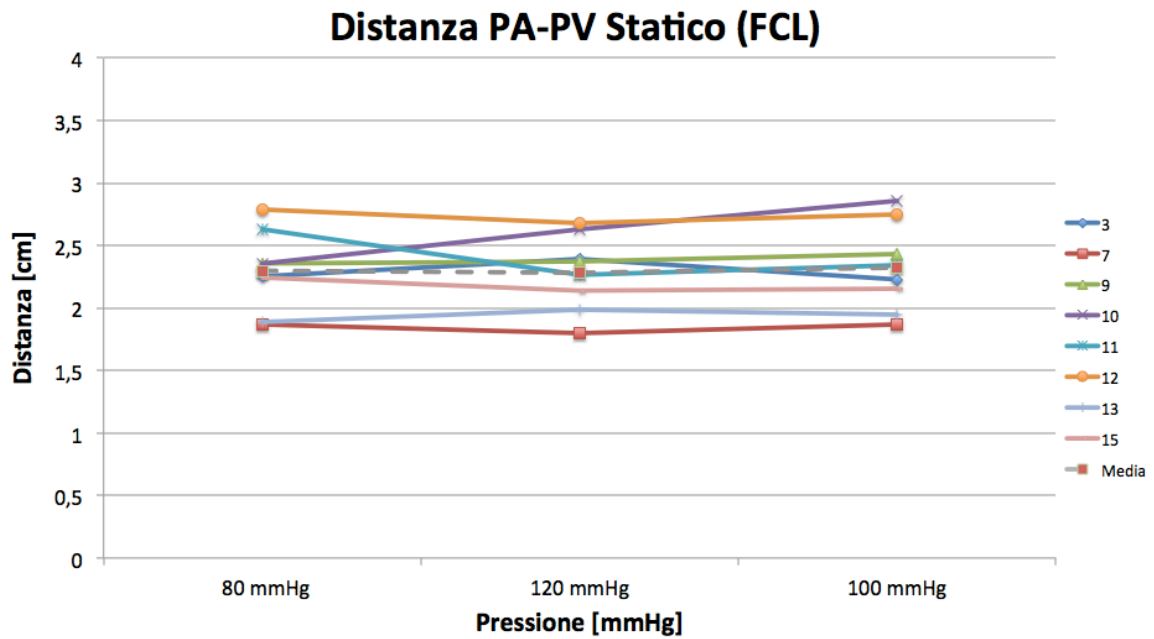


Grafico 4.3- Andamenti delle distanze tra muscolo papillare anteriore e piano valvolare (PA-PV) a 80 mmHg, 120 mmHg e 100 mmHg.

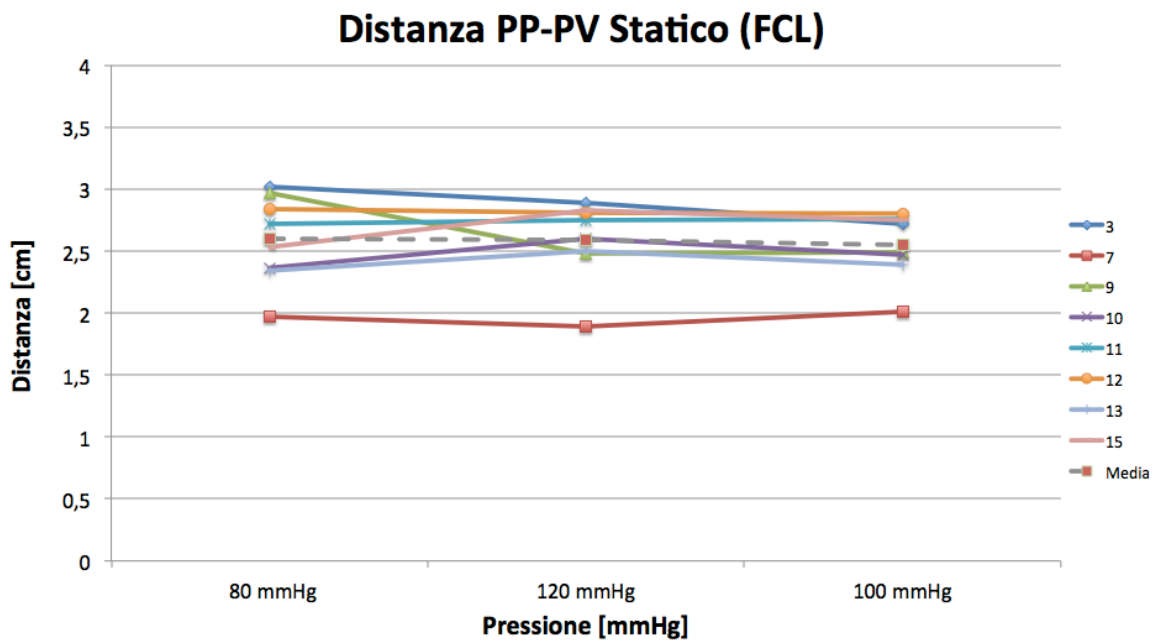


Grafico 4.4- Andamenti delle distanze tra muscolo papillare posteriore e piano valvolare (PP-PV) a 80 mmHg, 120 mmHg e 100 mmHg.

Analogamente alle aree disponibili per la coaptazione, le variazioni delle due distanze in funzione della pressione sono risultate non statisticamente significative, evidenza in accordo con la fisiologia [1].

4.2 Prove dinamiche

➤ 4.2.1 Area disponibile per la coaptazione

In [Graf. 4.5-4.8] sono presenti gli andamenti delle percentuali delle aree non visibili rispetto all'area totale dei rispettivi foglietti nelle tre condizioni sistoliche indagate e nei due banche prova analizzati (6 cuori testati per ogni *setup*).

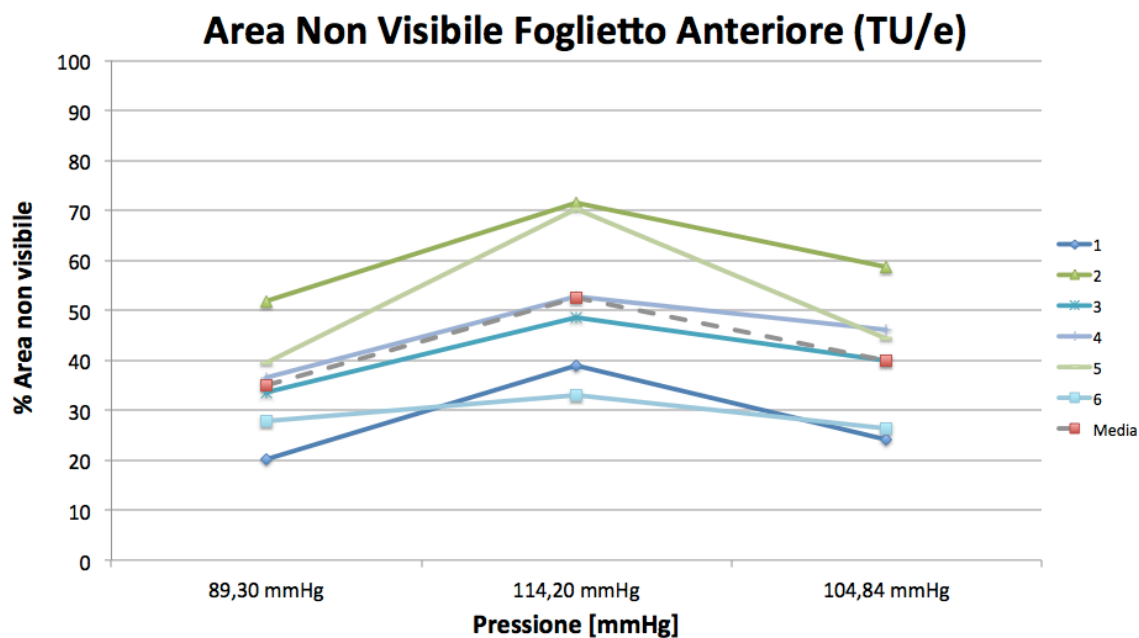


Grafico 4.5- Andamenti delle percentuali delle aree non visibili relative al foglietto anteriore nelle tre condizioni sistoliche (inizio sistole, picco sistolico e fine sistole) nel setup TU/e.

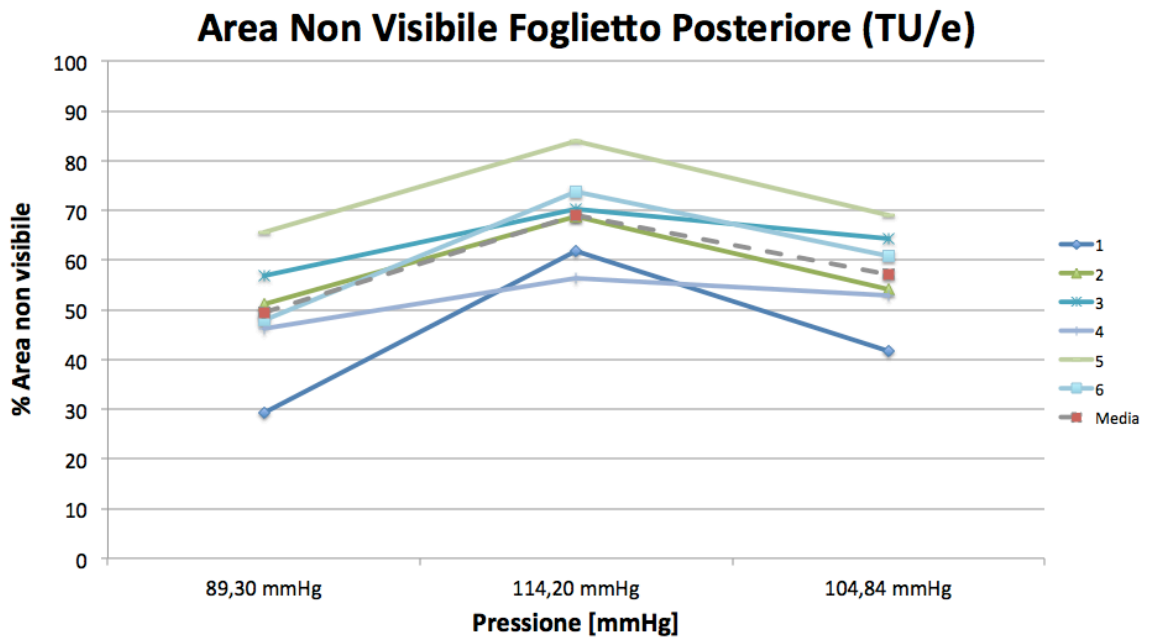


Grafico 4.6- Andamenti delle percentuali delle aree non visibili relative al foglietto posteriore nelle tre condizioni sistoliche (inizio sistole, picco sistolico e fine sistole) nel setup TU/e.

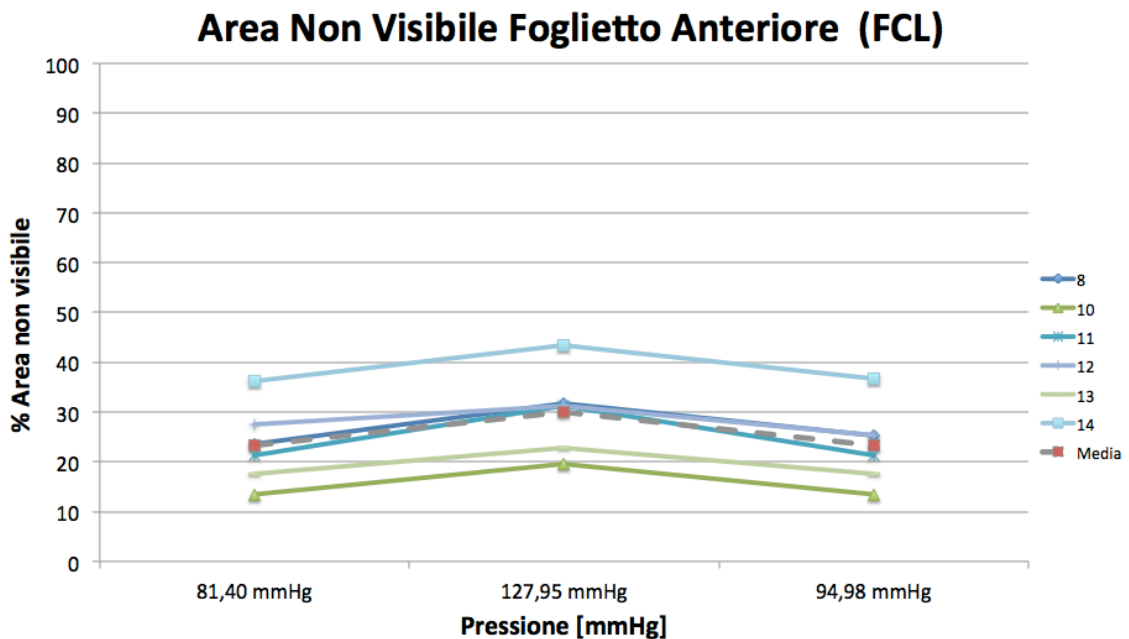


Grafico 4.7- Andamenti delle percentuali delle aree non visibili relative al foglietto anteriore nelle tre condizioni sistoliche (inizio sistole, picco sistolico e fine sistole) nel setup FCL.

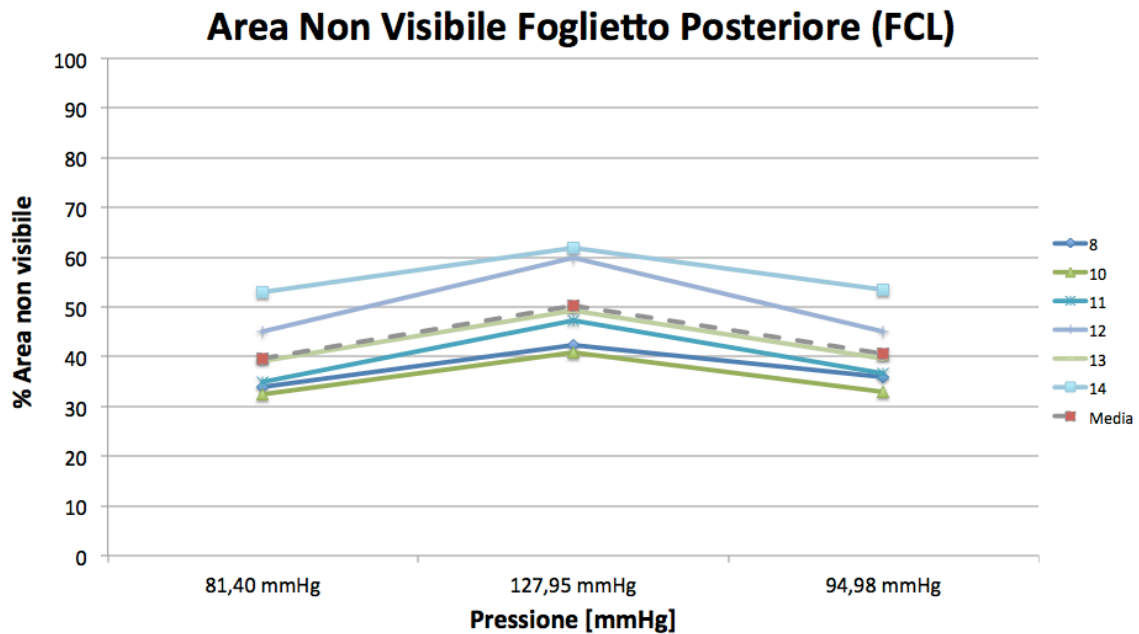


Grafico 4.8- Andamenti delle percentuali delle aree non visibili relative al foglietto posteriore nelle tre condizioni sistoliche (inizio sistole, picco sistolico e fine sistole) nel setup FCL.

Per una migliore visualizzazione di seguito è riportato [Graf. 4.9-4.10] il confronto tra i valori medi delle percentuali di area non visibile effettuato a parità di foglietto e a parità di setup.

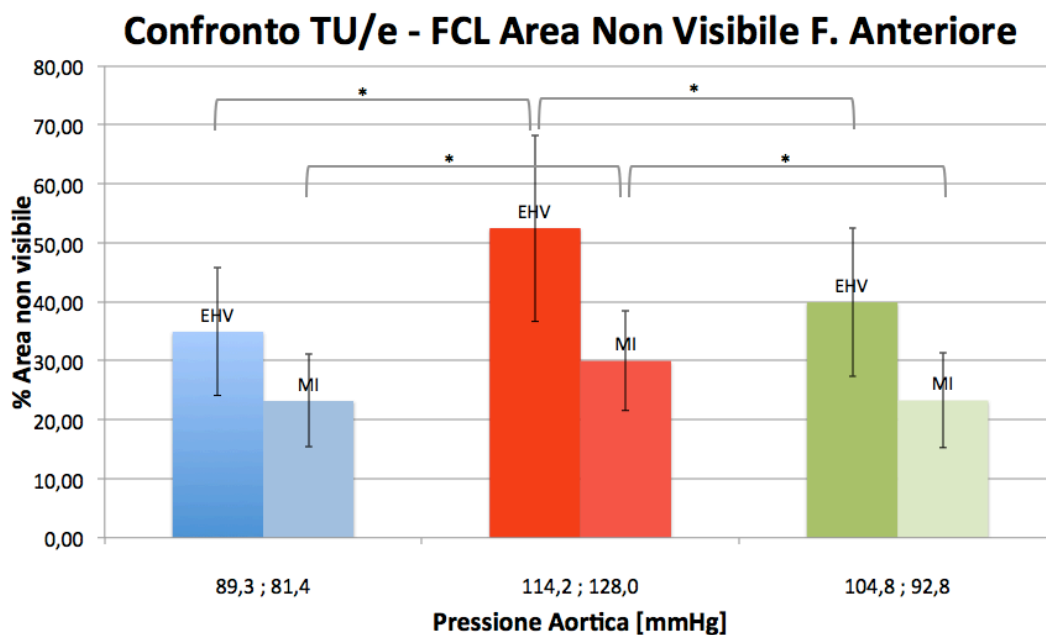


Grafico 4.9- Confronto tra i valori medi delle percentuali delle aree non visibili relative al foglietto anteriore nelle tre condizioni sistoliche (inizio sistole, picco sistolico e fine sistole) e in entrambi i setup.

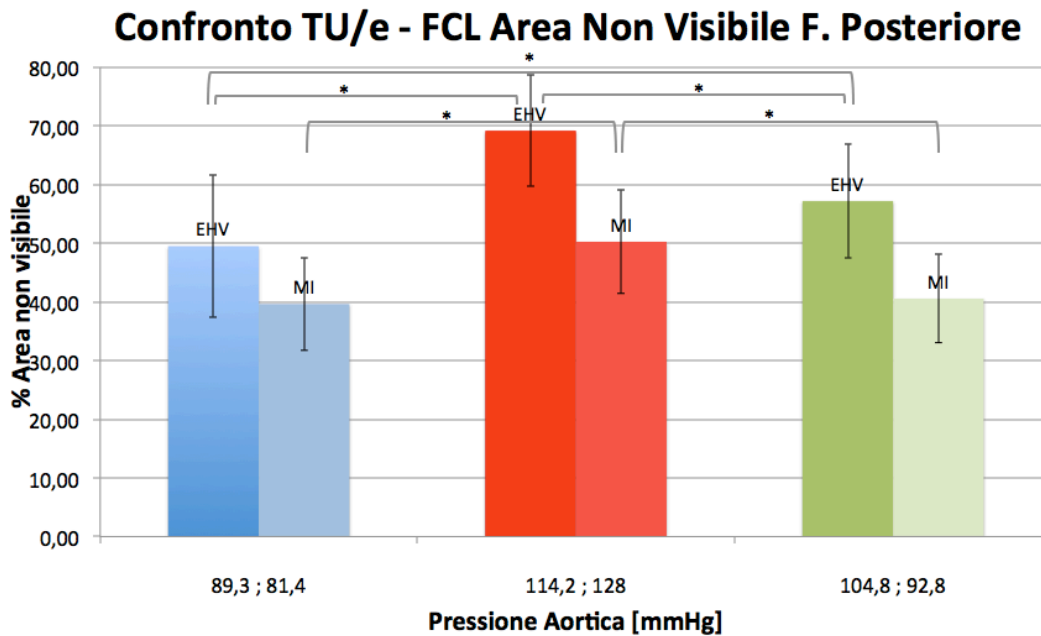


Grafico 4.10- Confronto tra i valori medi delle percentuali delle aree non visibili relative al foglietto posteriore nelle tre condizioni sistoliche (inizio sistole, picco sistolico e fine sistole) e in entrambi i setup.

L'analisi statistica ha evidenziato differenze statisticamente significative nei confronti a parità di foglietto nelle condizioni di inizio sistole, picco sistolico, fine sistole. In particolare il post-test di Bonferroni ha evidenziato che nel *setup* TU/e non è presente una differenza significativa tra l'inizio sistole e il fine sistole nel foglietto anteriore, mentre nel *setup* ForCardioLab non si ha differenza significativa tra l'inizio sistole e il fine sistole sia nel foglietto anteriore che in quello posteriore.

Sebbene siano state rilevate differenze significative in quasi tutti i confronti si sottolinea che nel banco prova TU/e la differenza percentuale tra le varie fasi sistoliche nei due foglietti risulta più marcata rispetto al *setup* ForCardioLab che esibisce un andamento più costante [Tab. 4.1], in accordo a ciò che si è riscontrato per le prove statiche [Graf. 4.1-4.2].

	IS - PS	PS - FS	IS - FS
Foglietto Anteriore <i>setup</i> TU/e	33%	24%	13%
Foglietto Anteriore <i>setup</i> FCL	22%	22%	0,1%
Foglietto Posteriore <i>setup</i> TU/e	28%	17%	13%
Foglietto Posteriore <i>setup</i> FCL	21%	19%	2%

Tabella 4.1 - Confronto tra le differenze percentuali delle aree visibili nelle varie fasi sistoliche nei due foglietti e nei due *setup*, con valore maggiore (in grassetto) e differenze significative (in corsivo).

➤ 4.2.2 Distanze tra muscoli papillari e piano valvolare

Nei grafici sottostanti [Graf. 4.11-4.14] sono mostrati gli andamenti delle due distanze nelle tre fasi considerate e nei due banchi prova, in corrispondenza degli stessi valori pressori per cui sono state analizzati i valori di area non visibile.

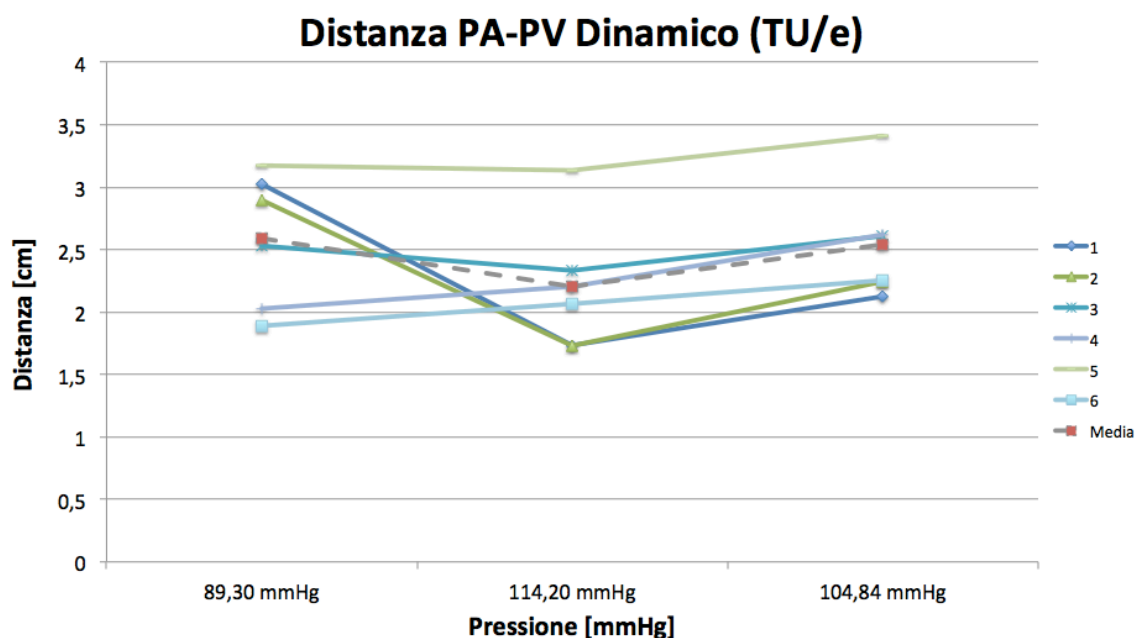


Grafico 4.11- Andamenti delle distanze tra muscolo papillare anteriore e piano valvolare (PA-PV) nelle tre condizioni sistoliche (inizio sistole, picco sistolico e fine sistole nel *setup* TU/e).

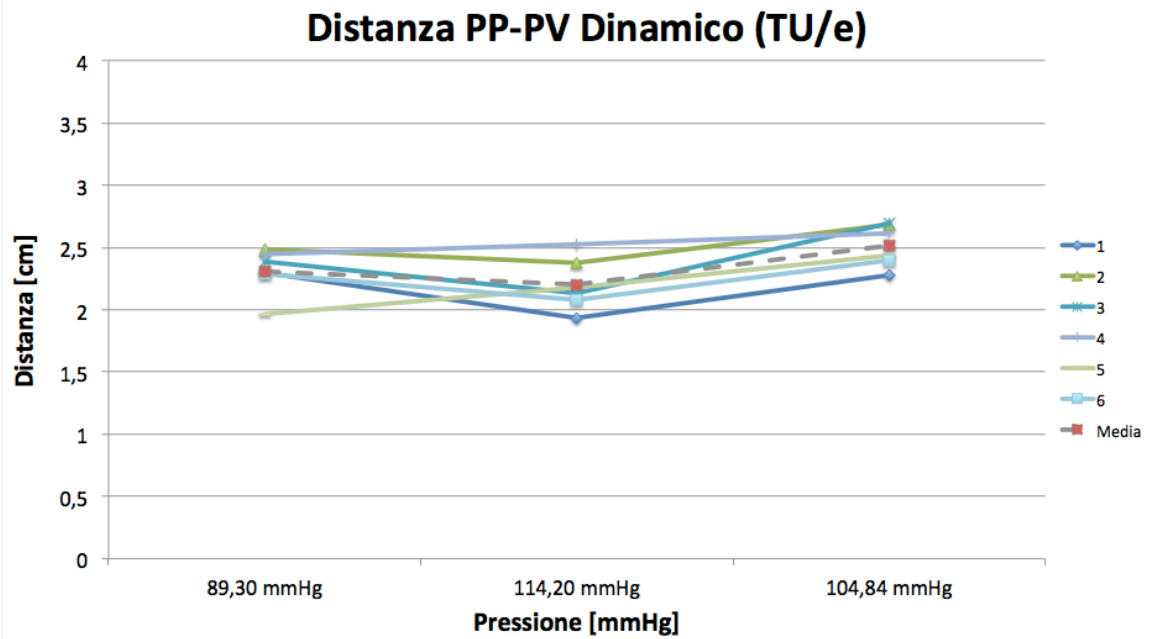


Grafico 4.12- Andamenti delle distanze tra muscolo papillare posteriore e piano valvolare (PP-PV) nelle tre condizioni sistoliche (inizio sistole, picco sistolico e fine sistole nel setup TU/e).

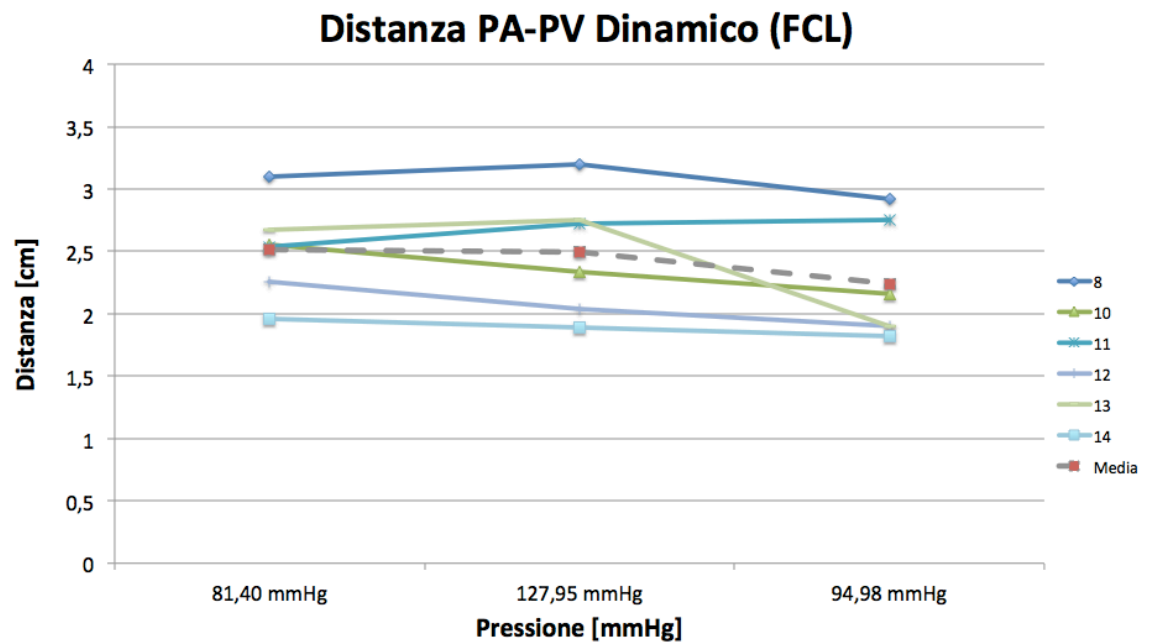


Grafico 4.13- Andamenti delle distanze tra muscolo papillare anteriore e piano valvolare (PA-PV) nelle tre condizioni sistoliche (inizio sistole, picco sistolico e fine sistole nel setup FCL).

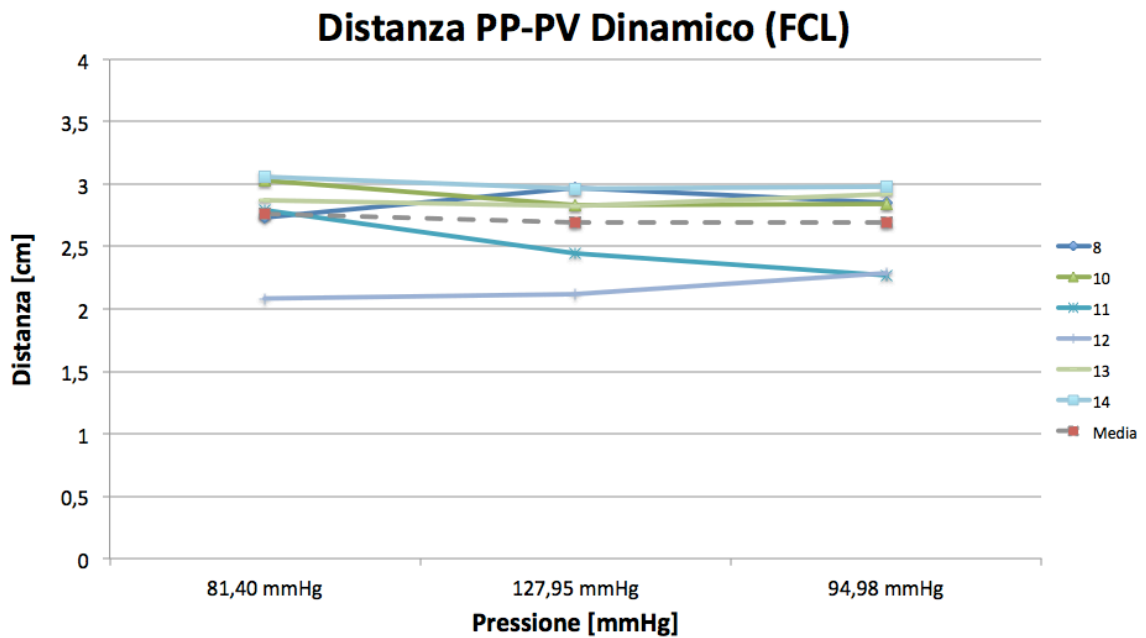


Grafico 4.14- Andamenti delle distanze tra muscolo papillare posteriore e piano valvolare (PP-PV) nelle tre condizioni sistoliche (inizio sistole, picco sistolico e fine sistole nel setup FCL).

Inoltre, per una migliore visualizzazione di seguito è riportato [Graf. 4.15-4.16] il confronto tra i valori medi delle distanze tra papillari e piano valvolare effettuato a parità di papillare e a parità di *setup*:

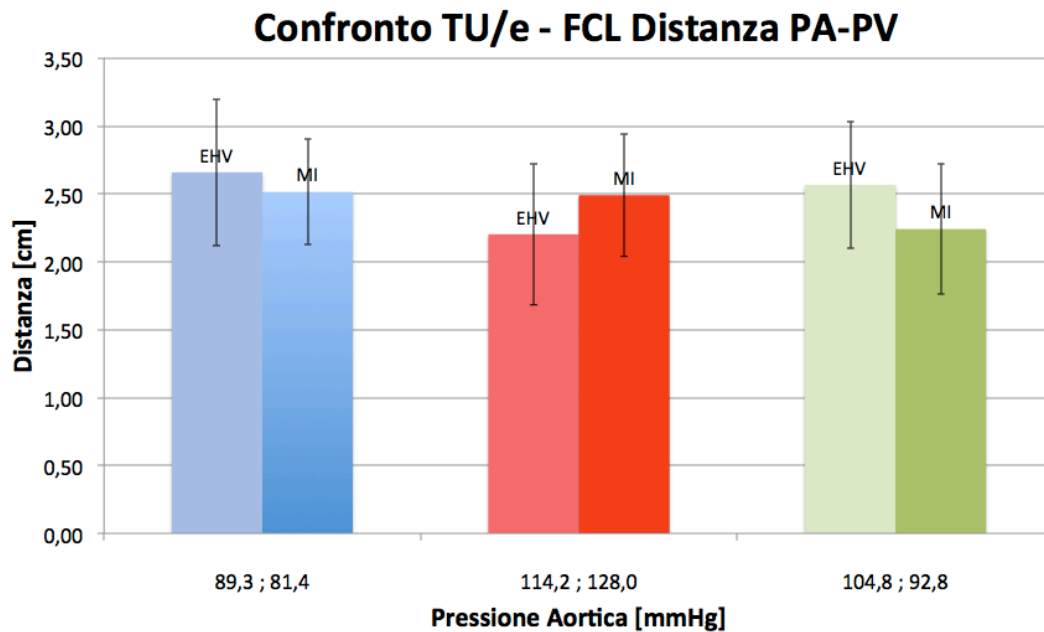


Grafico 4.15- Confronto tra i valori medi delle distanze tra papillare anteriore e piano valvolare (PA-PV) nelle tre condizioni sistoliche (inizio sistole, picco sistolico e fine sistole) e in entrambi i setup.

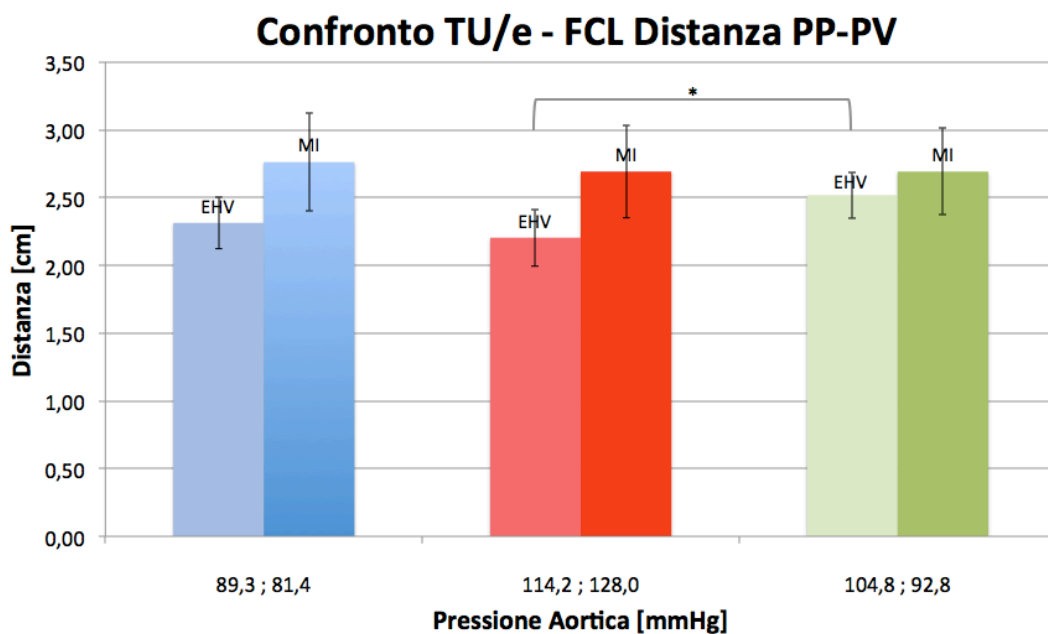


Grafico 4.16- Confronto tra i valori medi delle distanze tra papillare posteriore e piano valvolare (PP-PV) nelle tre condizioni sistoliche (inizio sistole, picco sistolico e fine sistole) e in entrambi i setup.

L'analisi statistica ha evidenziato una sola significativa differenza presente nel *setup* TU/e, ovvero quella esistente tra le distanze tra papillare posteriore e piano valvolare rilevate durante il picco sistolico e in fine sistole.

In tabella [Tab. 4.2] sono mostrate le differenze percentuali delle due distanze tra le tre fasi sperimentali nei due banchi prova, dove si può rilevare che la somma di tali variazioni percentuali è maggiore nel caso dei papillari anteriore e posteriore nel *setup* TU/e rispetto al *setup* ForCardioLab, che esibisce valori simili a quelli riscontrati nelle prove statiche[Graf. 4.3-4.4].

	IS - PS	PS - FS	IS - FS
PA-PV <i>setup</i> TU/e	17%	3%	3%
PA-PV <i>setup</i> FCL	1%	10%	8%
PP-PV <i>setup</i> TU/e	3%	13%	8%
PP-PV <i>setup</i> FCL	3%	0%	3%

Tabella 4.2 - Confronto tra le differenze percentuali delle due distanze (PA-PV e PP-PV) nelle varie fasi sistoliche e nei due setup, con valore maggiore (in grassetto) e differenze significative (in corsivo).

CONCLUSIONI, LIMITI E SVILUPPI FUTURI

5.1 Conclusioni

In letteratura numerosi lavori [29-31] hanno dimostrato l'esistenza di una stabilità anulo-papillare, probabilmente dovuta principalmente alle corde basali anteriori. Nello specifico Sakai et al. [30] hanno rilevato che le distanze tra le teste dei muscoli papillari e i corrispondenti trigoni e tra le stesse e le corrispondenti porzioni di annulus posteriore a livello delle basi dei segmenti P1 e P3 sono costanti durante l'intero ciclo cardiaco. Uno studio condotto su cani [31] ha evidenziato che, al variare della frequenza cardiaca e delle condizioni di precarico, la distanza tra il piano anulare e le teste di entrambi i papillari ha oscillazioni nell'intorno di 1 mm all'interno del ciclo cardiaco. Per contro, ciò che varia considerevolmente è la distanza tra l'annulus mitralico e l'apice, a discapito di quella tra apice e teste dei muscoli papillari.

In particolare, come già precedentemente esposto [Cap. 1.3.2-1.3.3], in fase sistolica i muscoli papillari si contraggono unitamente alla porzione posteriore anulare, esibendo un movimento concorde verso l'apice cardiaco, mentre in fase diastolica, con il rilassamento di entrambi, si ha un movimento opposto.

Dal momento che i banchi prova analizzati nel presente lavoro sono per cuori battenti passivi, occorre valutare l'effetto della non contrattilità dei muscoli papillari sul funzionamento del complesso valvolare mitralico.

Per quanto riguarda il banco prova TU/e si è potuto constatare come la variazione delle percentuali di area non visibili tra le fasi sistoliche indagate sia considerevolmente più marcata in entrambi i foglietti rispetto a quella riscontrata nel *setup* ForCardioLab.

In particolare, confrontando il banco prova TU/e, la variazione presente tra l'inizio sistole e il picco sistolico è più accentuata nel foglietto anteriore, seppur con valori maggiori in entrambi i lembi, rispetto a quelli rilevati nel *setup* FCL.

In aggiunta, dalla misurazione delle distanze tra i due muscoli papillari e il piano valvolare si evidenzia una diminuzione delle stesse durante il picco sistolico.

Una peculiarità di tale *setup* è quella di garantire la stabilità meccanica del cuore all'interno della camera di alloggiamento mediante due vincoli: il primo è quello apicale e il secondo è quello posto dalla guarnizione collegata alla pompa a vuoto. La posizione del cuore all'interno della camera è tale per cui il piano valvolare si trova sullo stesso livello della guaina e, in particolare, il foglietto posteriore è in prossimità di quest'ultima, mentre l'anteriore è collocato più centralmente rispetto al bordo [Fig. 5.1].

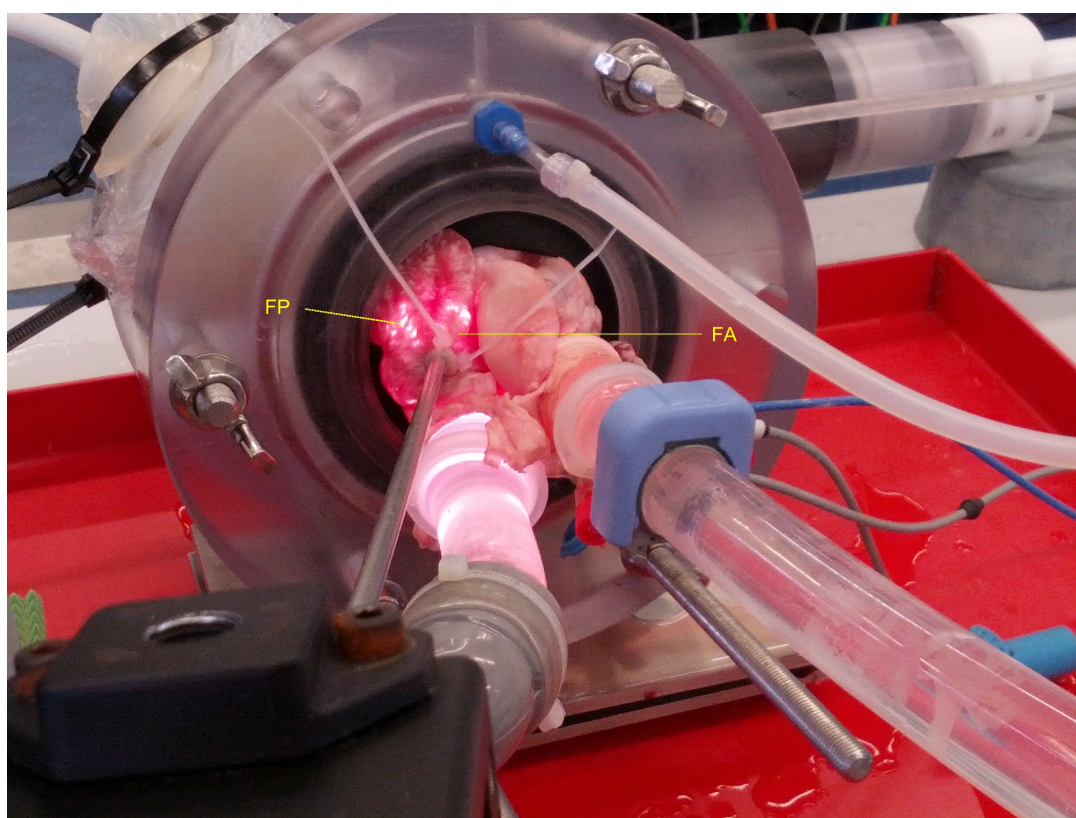


Figura 5.1 – Vista della camera di alloggiamento del setup TU/e che mostra la vicinanza del foglietto posteriore alla guarnizione collegata alla pompa a vuoto.

Tenuto conto di questi aspetti e del funzionamento del sistema, durante la fase sistolica i muscoli papillari, non potendosi opporre tramite contrazione all'azione di spinta meccanica esercitata dall'aumento di pressione all'interno della camera, subiscono uno spostamento verso l'alto. Questo spostamento, unito all'impossibilità del piano valvolare di accompagnare tale movimento, si traduce in una riduzione delle distanze tra quest'ultimo e i muscoli papillari. In particolare si può notare come il foglietto anteriore, meno interessato

dall'azione vincolante della guaina, conservi una possibilità di movimento che lo porta ad assecondare maggiormente il moto di spinta, come evidenziato in [Tab. 4.2].

Quanto sopra è causa, in fase di picco sistolico, di un rigonfiamento asimmetrico (*billowing* asimmetrico) dei foglietti valvolari [Fig. 5.2].

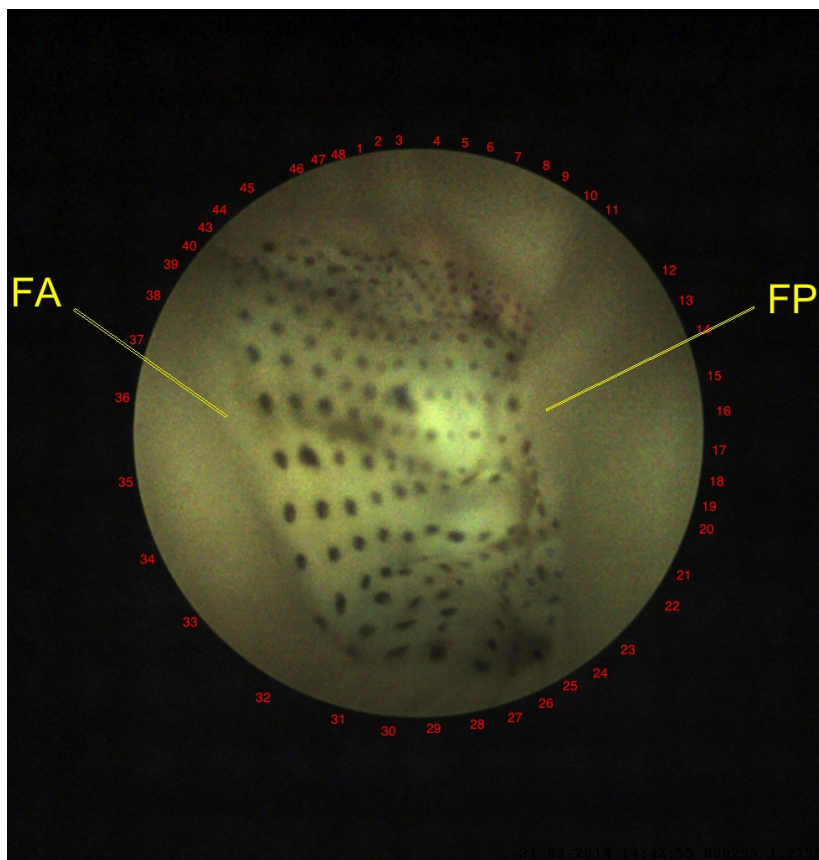


Figura 5.2 - *Billowing* asimmetrico della valvola mitrale riscontrato nel setup TU/e.

Nel banco prova ForCardioLab le percentuali di area non visibile di entrambi i lembi subiscono variazioni percentuali meno marcate durante l'intero evento sistolico, analogamente alle distanze tra muscoli papillari e piano valvolare, che mostrano soltanto leggere oscillazioni in aumento.

Dal momento che il principio di funzionamento del *setup* prevede un'espansione della camera ventricolare in fase sistolica, i muscoli papillari subiscono uno spostamento concorde alla direzione di tale spinta. Il movimento delle pareti ventricolari, sebbene anti-fisiologico, riesce in realtà a garantire con maggior approssimazione, rispetto al *setup* TU/e, un comportamento del complesso valvolare mitralico più simile a quello fisiologico,

poiché l'allontanamento relativo tra la base dei papillari e il piano valvolare riesce a sopperire alla mancanza di contrattilità.

In [Fig. 5.3] si riporta una schematizzazione di quanto appena descritto.

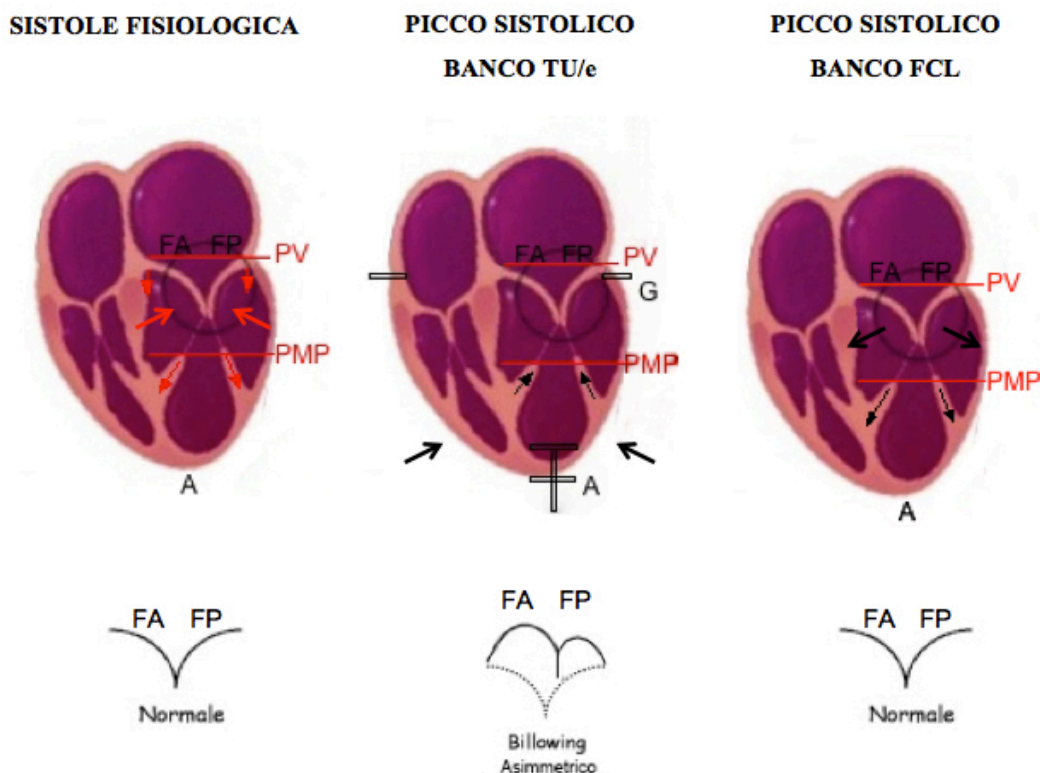


Figura 5.3 - Schematizzazione del comportamento del complesso valvolare mitralico nei due banchi prova durante l'evento sistolico, a confronto con ciò che si verifica in fisiologia. Le frecce rosse indicano la presenza di contrattilità mentre quelle in nero rappresentano il movimento generato dal sistema di azionamento.

Infine, per quanto concerne il confronto tra prove statiche e dinamiche eseguite con il *setup* ForCardioLab, è possibile concludere che la dinamica impulsiva di chiusura valvolare non genera significative variazioni né per quanto riguarda la percentuale di area visibile di entrambi i foglietti, né per le distanze tra papillari e piano anulare.

In conclusione, il presente lavoro di tesi è stato in grado di individuare che:

- ❖ nel *setup* TU/e, si è riscontrato un evidente *billowing* di entrambi i lembi valvolari con asimmetria durante la fase di picco sistolico. Probabilmente ciò è dovuto alla

mancata contrazione dei muscoli papillari, dovuta alla non contrattilità del miocardio, che induce un avvicinamento dei papillari al piano valvolare.

- ❖ nel setup ForCardioLab, nonostante si supponesse che il movimento anti-fisiologico dei muscoli papillari potesse causare l'insufficienza della valvola mitrale, si è dimostrata l'effettiva competenza valvolare, con una fluidodinamica comparabile a quella rilevata *in vivo*. Tale evidenza può essere giustificata considerando che, in fase sistolica, la dilatazione del ventricolo sinistro induce un allontanamento dei muscoli papillari dal piano valvolare, provocando uno stiramento delle corde tendinee, mimando il comportamento fisiologico; tuttavia, si tiene a precisare che ciò non significa che la biomeccanica dell'intero apparato valvolare siano analoghe a quelle fisiologiche.

Date queste considerazioni, sembrerebbe ragionevole ipotizzare che il banco prova FCL sia in grado di riprodurre più fedelmente un modello fisiologico della valvola mitrale, a differenza del banco prova TU/e che invece risulta più riconducibile ad un modello mitralico tendente al prolasso.

5.2 Criticità e limiti

Le criticità e limiti del presente lavoro possono essere schematizzate come segue:

- in tutte le prove effettuate sono stati impiegati cuori diversi, impedendo così di annullare l'intervariabilità esistente tra i campioni ed effettuare un confronto tra i due banchi prova a parità di campione biologico;
- la numerosità dei campioni testati è esigua;
- il protocollo sperimentale impiegato per la creazione del pattern mitralico presenta un elevato tempo di esecuzione;
- il rilevamento delle distanze tra muscoli papillari e piano valvolare non consente di avere una piena conoscenza di ciò che effettivamente si verifica tra tali strutture

anatomiche, dal momento che sarebbe necessario effettuare scansioni ecografiche su più piani per ottenere maggiori informazioni.

5.3 Sviluppi Futuri

Un naturale proseguimento di tale lavoro consisterebbe nel valutare le lunghezze disponibili per la coaptazione di ogni singolo foglietto, rilevate centralmente nei due segmenti speculari A2 e P2, durante l'intero evento sistolico. Tali grandezze potrebbero essere confrontate con valori di lunghezze di coaptazione misurate mediante proiezioni ecografiche transtoraciche o transesofagee *in vivo*, oppure con rilevamenti effettuati per mezzo di ecografi tridimensionali, che quindi potrebbero consentire di validare il protocollo impiegato per le indagini eseguite.

Un fattore da considerare è che il gold standard clinico, che prevede la stima di tale lunghezza di coaptazione tramite ecografia, è in realtà una misura globale rispetto alla singola lunghezza disponibile per la coaptazione riferita ad ogni singolo foglietto mitralico. Sarebbe quindi necessario eseguire indagini endoscopiche all'interno del ventricolo sinistro, al fine di osservare l'effettivo comportamento dei lembi valvolari.

Inoltre, sarebbe auspicabile svolgere ulteriori test al fine di poter individuare il banco prova più appropriato a seconda delle indagini che si desidera effettuare.

Infine, sarebbe opportuno prevedere un'ottimizzazione per il sistema impiegato per rilevare le proiezioni ecografiche nel banco TU/e, per consentire non solo la libertà di movimento della sonda all'interno della camera di alloggiamento, ma anche considerare la possibilità di realizzare esami con diverse tipologie di sonda.

BIBLIOGRAFIA

1. H. Muresian, M. Diena, et al., "*The mitral valve: new insights into the clinical anatomy*", 2006, *Maedica*, Vol. 1, No. 4, 80:87.
2. J.B. Rabbah, et al., "*Mechanics of healthy and functionally diseased mitral valves: a critical review*", 2013, *Journal of biomechanical engineering*, Vol. 135, No. 2, 021007.
3. M. Di Mauro, et al., "*Functional mitral regurgitation: from normal to pathological anatomy of mitral valve*", 2013, *International Journal of Cardiology*, Vol. 163, No. 3, 242:248.
4. Lawrence H. Cohn, "*Cardiac surgery in the adult*", Third edition, Mc Graw Hill Medical, 2011.
5. I.S. Salgo, et al., "*Effect of annular shape on leaflet curvature in reducing mitral leaflet stress*", 2002, *Circulation*, Vol. 106, No. 6, 711:717.
6. A. Itoh, et al., "*Mitral annular hinge motion contribution to changes in mitral septal-lateral dimension and annular area*", 2009, *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, Vol. 138, No. 5, 1090:1099.
7. H. Muresian, "*The clinical anatomy of the mitral valve*", 2009, *Clinical anatomy (New York, N.Y.)*, Vol. 22, No. 1, 85:98.
8. J.H. Jimenez, et al., "*Effects of papillary muscle position on chordal force distribution: an in-vitro study*", 2005, *The Journal of heart valve disease*, Vol. 14, No. 3, 295:302.
9. L. Chen, et al., "*Effect of strut chordae transection on mitral valve leaflet biomechanics*", 2006, *Annals of biomedical engineering*, Vol. 34, No. 6, 917:926.
10. J.H.C. Lam, et al., "*Morphology of the Human Mitral Valve: I. Chordae Tendineae: A New Classification*", 1970, *Circulation*, Vol. 41, No. 3, 449:458.
11. J. Ritchie, et al., "*Structural characterization of the chordae tendineae in native porcine mitral valves*", 2005, *The annals of thoracic surgery*, Vol. 80, No. 1, 189:197.

12. Z. He, S. Battacharya, "*Mitral valve annulus tension and the mechanism of annular dilation: an in-vitro study*", 2010, The Journal of heart valve disease, Vol. 19, No. 6, 701:707.
13. W.Y. Kim, et al., "*Left ventricular blood flow patterns in normal subjects: a quantitative analysis by three-dimensional magnetic resonance velocity mapping*", 1995, Journal of the American College of Cardiology, Vol. 26, No. 1, 224:238.
14. E.L. Yellin, et al., "*Mechanisms of mitral valve motion during diastole*", 1981, The American journal of physiology, Vol. 241, No. 3, 389:400.
15. S.L. Nielsen, et al., "*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*", 2002, Journal of biomechanical engineering, Vol. 124, No. 5, 596:608.
16. T.A. Timek, et al., "*Aorto-mitral annular dynamics*", 2003, The annals of thoracic surgery, Vol. 76, No. 6, 1944:1950.
17. M.O. Karlsson, et al., "*Mitral valve opening in the ovine heart*", 1998, The American journal of physiology, Vol. 74, No. 2, 552:563.
18. J.H. Jimenez, et al., "*Mitral valve function and chordal force distribution using a flexible annulus model: an in vitro study*", 2005, Annals of biomedical engineering, Vol. 33, No. 5, 557:566.
19. M. Padala, et al., "*Saddle shape of the mitral annulus reduces systolic strains on the P2 segment of the posterior mitral leaflet*", 2009, The annals of thoracic surgery, Vol. 88, No. 5, 1499:1504.
20. J.H. Jimenez, et al., "*A saddle-shaped annulus reduces systolic strain on the central region of the mitral valve anterior leaflet*", 2007, The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, Vol. 134, No. 6, 1562:1568.
21. Z. He, et al., "*Effects of papillary muscle position on in-vitro dynamic strain on the porcine mitral valve*", 2003, The Journal of heart valve disease, Vol. 12, No. 4, 488:494.
22. Z. He, et al., "*In vitro dynamic strain behaviour of the mitral valve posterior leaflet*", 2005, Journal of biomechanical engineering, Vol. 127, No. 3, 504:511.
23. M.K. Rausch, "*In vivo dynamic strains of the ovine anterior mitral valve leaflet*", 2011, Journal of biomechanics, Vol. 44, No. 6, 1149:1157.

24. M.S. Sacks, "*In-vivo dynamic deformation of the mitral valve anterior leaflet*", 2006, *The annals of thoracic surgery*, Vol. 82, No. 4, 1369:1377.
25. K. May-Newman, F.C. Yin, "*Biaxial mechanical behavior of excised porcine mitral valve leaflets*", 1995, *The American journal of physiology*, Vol. 269, No. 4, 1319:1327.
26. J.A. Ormiston, et al., "*Size and motion of the mitral valve annulus in man. I. A two-dimensional echocardiographic method and findings in normal subjects*", 1981, *Circulation*, Vol. 64, No. 1, 113:120.
27. D.R. Einstein, et al., "*Non-linear fluid-coupled computational model of the mitral valve*", 2005, *The Journal of heart valve disease*, Vol.14, No. 3, 376:385.
28. M. Marzilli, et al., "*Assessment of papillary muscle function in the intact heart*", 1985, *Circulation*, Vol. 71, No. 5, 1017:1022.
29. T.M. Joudinaud, et al., "*The papillary muscles as shock absorber of the mitral valve complex. An experimental study*", 2007, *European journal of cardio-thoracic surgery*, Vol. 32, No. 2, 96:101.
30. T. Sakai, et al., "*Distance between mitral annulus and papillary muscles: anatomic study in normal human hearts*", 1999, *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, Vol. 118, No. 4, 636:641.
31. M. Komeda, et al., "*Papillary muscle – left ventricular wall “complex”.*", 1997, *Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, Vol. 113, No. 2, 292:300.
32. S. He, et al., "*Geometric distribution of chordae tendineae: an important anatomic feature in mitral valve function*", 2000, *The Journal of heart valve disease*, Vol. 9, No. 4, 495:501.
33. M. Lomholt, et al., "*Differential tension between secondary and primary mitral chordae in an acute in-vivo porcine model*", 2002, *The Journal of heart valve disease*, Vol. 11, No. 3, 337:345.
34. J. Ritchie, et al., "*The material properties of the native porcine mitral valve chordae tendineae: an in vitro investigation*", 2006, *Journal of biomechanics*, Vol. 39, No.6, 1129:1135.
35. A. Carpentier, et al., "*Reconstructive surgery of mitral valve incompetence: ten-year appraisal*", 1980, *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, Vol. 79, No. 3, 338:348.

36. J.B. Barlow, W.A. Pocock, "*Billowing, floppy, prolapsed or flail mitral valves?*", 1985, *The American journal of cardiology*, Vol. 55, No. 4, 501:502.
37. R.B. Devereaux, et al., "*Diagnosis and classification of severity of mitral valve prolapse: methodologic, biologic, and prognostic considerations*", 1987, *American heart journal*, Vol. 113, No. 5, 1265:1280.
38. E. Amici, et al., "*Il prollasso valvolare mitralico*", 2006, *Giornale Italiano di Cardiologia*, Vol. 7, No. 1, 4:22.
39. K.P. McCarthy, et al., "*Anatomy of the mitral valve: understanding the mitral valve complex in mitral regurgitation*", 2010, *European Journal of Echocardiography*, Vol. 11, No. 10, 3:9.
40. S. Kaji, et al., "*Annular geometry in patients with chronic ischemic mitral regurgitation: three-dimensional magnetic resonance imaging study*", 2005, *Circulation*, Vol. 112, No. 9, 409:414.
41. M. Chaput, et al., "*Mitral leaflet adaptation to ventricular remodeling: occurrence and adequacy in patients with functional mitral regurgitation*", 2008, *Circulation*, Vol. 118, No. 8, 845:852.
42. J. Kwan, et al., "*Geometric differences of the mitral apparatus between ischemic and dilated cardiomyopathy with significant mitral regurgitation: real-time three-dimensional echocardiography study*", 2003, *Circulation*, Vol. 107, No. 8, 1135:1140.
43. S. He, et al., "*Mitral valve compensation for annular dilatation: in vitro study into the mechanisms of functional mitral regurgitation with an adjustable annulus model*", 1999, *The Journal of heart valve disease*, Vol. 8, No. 3, 294:302.
44. A.M. Gillinov, et al., "*Repair versus replacement for degenerative mitral valve disease with coexisting ischemic heart disease*", 2003, *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, Vol. 125, No. 6, 1350:1362.
45. R.H. Wong, et al., "*Mitral valve repair: past, present, and future*", 2010, *Asian cardiovascular & thoracic annals*, Vol. 18, No. 6, 586:595.
46. L.F. Tops, et al., "*Noninvasive evaluation of coronary sinus anatomy and its relation to the mitral valve annulus: implications for percutaneous mitral annuloplasty*", 2007, *Circulation*, Vol. 115, No. 1, 1426:1432.

47. P. Sorajja, et al., “*A novel method of percutaneous mitral valve repair for ischemic mitral regurgitation*”, 2008, JACC. Cardiovascular intervention, Vol. 1, No. 6, 663:672.
48. P. Denti, O. Alfieri, “*Chirurgia mitralica per via percutanea. Attualità e prospettive*”, 2013, Cardiology Science, Vol. 11, No. 2, 58:69.
49. J.L. Zamorano, et al., “*EAE/ASE recommendations for the use of echocardiography in new transcatheter interventions for valvular heart disease*”, 2011, Journal of the American Society of Echocardiography, Vol. 24, No. 9, 937:965.
50. A.M. Leopaldi, et al., “*In vitro hemodynamics and valve imaging in passive beating hearts*”, 2012, Journal of biomechanics, Vol. 45, No. 7, 1133:1139.
51. A.M. Leopaldi, “*Multifunctional passive-heart platforms for in vitro hemodynamic studies*”, in *Scuola interpolitecnica di dottorato*, 2014, Politecnico di Milano: Milano.
52. J.F. Cornhill, “*An aortic--left ventricular pulse duplicator used in testing prosthetic aortic heart valves*”, 1977, The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, Vol. 73, No. 4, 550:558.
53. L.N. Scotten, et al., “*Construction and evaluation of a hydromechanical simulation facility for the assessment of mitral valve prostheses*”, 1979, Journal of medical engineering & technology, Vol. 3, No. 1, 11:18.
54. P.R. Verdonck, et al., “*Mock loop testing of On-x prosthetic mitral valve with Doppler echocardiography*”, 2002, Artificial organs, Vol. 26, No. 10, 872:878.
55. R. Vismara, et al., “*A novel approach to the in vitro hydrodynamic study of the aortic valve: mock loop development and test*”, 2010, ASAIO journal, Vol. 56, No. 4, 279:284.
56. S. He, et al., “*Integrated mechanism for functional mitral regurgitation: leaflet restriction versus coapting force: in vitro studies*”, 1997, Circulation, Vol. 96, No. 6, 1826:1834.
57. M.Ø.J. Jensen, et al., “*Improved In Vitro Quantification of the Force Exerted by the Papillary Muscle on the Left Ventricular Wall: Three-Dimensional Force Vector Measurement System*”, 2001, Annals of Biomedical Engineering, Vol. 29, No. 5, 406:413.

58. M.S. Sacks, et al., “*Surface strains in the anterior leaflet of the functioning mitral valve*”, 2002, *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 30, No. 10, 1281:1290.
59. E.M. Spinner, et al., “*In vitro characterization of the mechanisms responsible for functional tricuspid regurgitation*”, 2011, *Circulation*, Vol. 124, No. 8, 920:929.
60. M. Arita, et al., “*Multiple purpose simulator using a natural porcine mitral valve*”, 2004, *Asian cardiovascular & thoracic annals*, Vol. 12, No. 4, 350:356.
61. R. Vismara, et al., “*A pulsatile simulator for the in vitro analysis of the mitral valve with tri-axial papillary muscle displacement*”, 2011, *The International journal of artificial organs*, Vol. 34, No. 4, 383:391.
62. E. Chinchoy, et al., “*Isolated four-chamber working swine heart model*”, 2000, *The annals of thoracic surgery*, Vol. 70, No. 5, 1607:1614.
63. A.J. Hill, et al., “*In vitro studies of human hearts*”, 2005, *The annals of thoracic surgery*, Vol. 79, No. 1, 168:177.
64. Y. Araki, et al., “*Pressure-volume relationship in isolated working heart with crystalloid perfusate in swine and imaging the valve motion*”, 2005, *European Journal of cardio-thoracic surgery*, Vol. 28, No. 3, 435:442.
65. A.L. Richards, et al., “*A dynamic heart system to facilitate the development of mitral valve repair techniques*”, 2009, *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 37, No. 4, 651:660.
66. W.M. Swanson, R.E. Clark, “*A simple cardiovascular system simulator: design and performance*”, 1977, *Journal of bioengineering*, Vol. 1, No. 2, 135:145.
67. N. Talukder, H. Reul, “*Fluid mechanics of natural cardiac valves*”, 1978, In: R. D. Bauer, R. Busse Editions, “*The arterial system – Dynamics, control theory and regulation*”, Springer-Verlag, 269:274.
68. E. Lanzarone, et al., “*A new pulsatile volumetric device with biomorphic valves for the in vitro study of the cardiovascular system*”, 2009, *Artificial organs*, Vol. 33, No. 12, 1048:1062.
69. A.M. Leopaldi, et al., “*Intracardiac Visualization of Transcatheter Aortic Valve and Valve-in-Valve Implantation in an In Vitro Passive Beating Heart*”, 2013, *JACC: Cardiovascular Interventions*, Vol. 6, No. 1, 92:93.

70. J. De Hart, et al., "*An ex vivo platform to simulate cardiac physiology: a new dimension for therapy development and assessment*", 2011, The International journal of artificial organs, Vol. 34, No. 6, 495:505.
71. K.S. Kunzelman, et al., "*Variations in annuloplasty ring and sizer dimensions may alter outcome in mitral valve repair*", 1997, Journal of cardiac surgery, Vol. 12, No. 5, 322:329.
72. J.B. Rabbah, et al., "*A novel left heart simulator for the multi-modality characterization of native mitral valve geometry and fluid mechanics*", 2013, Annals of Biomedical Engineering, Vol. 41, No. 2, 305:315.
73. M. Padala, et al., "*Mitral valve hemodynamics after repair of acute posterior leaflet prolapse: quadrangular resection versus triangular resection versus neochordoplasty*", 2009, The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, Vol. 138, No. 2, 309:315.
74. S. He, et al., "*Mitral leaflet geometry perturbations with papillary muscle displacement and annular dilatation: an in-vitro study of ischemic mitral regurgitation*", 2003, The Journal of heart valve disease, Vol. 12, No. 3, 300:307.
75. M.O. Jensen, et al., "*Saddle-shaped mitral valve annuloplasty rings experience lower forces compared with flat rings*", 2008, Circulation, Vol. 118, No. 14, 250:255.
76. M.Ø. Jensen, et al., "*What forces act on a flat rigid mitral annuloplasty ring?*", 2008, The Journal of heart valve disease, Vol. 17, No. 3, 267:275.
77. E. Lansac, et al., "*Dynamic balance of the aortomitral junction*", 2002, The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, Vol. 123, No. 5, 911:918.
78. A.W. Siefert, et al., "*In vitro mitral valve simulator mimics systolic valvular function of chronic ischemic mitral regurgitation ovine model*", 2013, The annals of thoracic surgery, Vol. 95, No. 3, 825:830.
79. A.P. Lee, et al., "*Mechanisms of recurrent functional mitral regurgitation after mitral valve repair in nonischemic dilated cardiomyopathy: importance of distal anterior leaflet tethering*", 2009, Circulation, Vol. 119, No. 19, 2606:2614.
80. T. Yamauchi, et al., "*Evaluation of the mitral valve leaflet morphology after mitral valve reconstruction with a concept "coaptation length index"*", 2005, Journal of cardiac surgery, Vol. 20, No. 5, 432:435.

81. E.M. Spinner, "*Tricuspid valve mechanics: understanding the effect of annular dilatation and papillary muscle displacement*", in Department of Biomedical Engineering Theses and Dissertations, 2011, Georgia Institute of Technology: Atlanta.