



Univesità degli Studi di Padova
Dottorato di Ricerca in Scienze dello Sviluppo
e della Programmazione Sanitaria
XXIX Ciclo

Tesi di Dottorato

Sviluppo del miocardio fetale: impatto dell'orientamento
delle fibre sulla funzione diastolica del ventricolo sinistro

The development of the fetal myocardium: the impact of
fiber orientation on the left ventricular diastolic compliance

Relatore: Prof.ssa Ornella Milanese

Candidato: Dott. Biagio Castaldi

Revisori: Prof.ssa Maria Giovanna Russo;

Prof. Giovanni Di Salvo

Anno Accademico: 2016/2017

Co-Autori dello Studio

Valutazione clinico-ecocardiografica:

Prof. Ornella Milanese

Dott.ssa Irene Cattapan

Dipartimento della Salute della Donna e del Bambino – Università di
Padova

Valutazione anatomopatologica:

Prof.ssa Annalisa Angelini

Dott.ssa Marny Fedrigo

Dott.ssa Irene Cattapan

Dipartimento di Scienze Cardio-Toraciche e Respiratorie – Università di
Padova

Studio *in silico*:

Prof.ssa Francesca Susin

Prof.ssa Daniela Boso

Dott. Paolo Peruzzo

Dott.ssa Elena De Filippi

Dipartimento di Ingegneria Ambientale, Strutturale e Civile – Università
di Padova

INDICE

Riassunto.....	9
Abstract.....	13
Capitolo 1 - Anatomia, embriologia e clinica del ventricolo sinistro	17
1.1 Sviluppo embriologico del cuore.....	17
1.2 Sviluppo del muscolo cardiaco.....	23
1.3 Sviluppo dell'anisotropia cardiaca.....	25
1.4 Architettura cardiaca.....	29
1.5 Transizione da feto a Neonato.....	32
1.5.1 <i>La circolazione fetale</i>	32
1.5.2 <i>Modificazioni emodinamiche alla nascita</i>	33
1.5.3 <i>Rimodellamento cardiaco post-natale</i>	34
1.6 Ecocardiografia con metodica speckle tracking	36
1.7 Principi generali dello speckle tracking deformation imaging.....	36
1.8 Lo strain.....	38
1.9 Lo strain rate.....	40
1.10 Twisting, untwisting e torsion.....	41
1.11 Acquisizione delle immagini e post-processing.....	44
1.11.1 <i>Acquisizione delle immagini</i>	44
1.11.2 <i>Il post-processing</i>	46
1.12 Validazione della tecnica.....	47

1.13 Limitazioni.....	48
1.14 Valori normali in età pediatrica.....	49
1.15 Applicazioni cliniche in pediatria.....	54
1.15.1 Origine anomala della coronaria sinistra dall'arteria polmonare.....	54
1.15.2 Coartazione aortica.....	54
1.15.3 Difetti del setto interatriale.....	55
1.15.4 Ventricolo destro sistemico.....	55
1.15.5 Cuore uni ventricolare.....	56
1.15.6 Tetralogia di Fallot.....	57
1.16 Ecocardiografia fetale.....	58
1.17 Valori di riferimento in epoca fetale.....	61
1.18 Applicazioni cliniche in epoca fetale.....	63
Capitolo 2 - Le basi meccaniche della funzione ventricolare sinistra	67
2.1 La legge costitutiva per il miocardio.....	73
Capitolo 3 - Scopo dello studio.....	77
Capitolo 4 - Materiali e metodi.....	79
4.1 Studio ecocardiografico.....	79
4.1.1 Popolazione dello studio.....	79
4.1.2 Acquisizione delle immagini.....	80
4.1.3 Analisi off-line con 2D-STE.....	81
4.1.4 Analisi statistica.....	82
4.2 Studio anatomopatologico.....	83
4.2.1 Popolazione dello studio.....	83
4.2.2 Materiale di studio.....	83

4.2.3 <i>Acquisizione ed elaborazione delle immagini</i>	84
4.2.4 <i>Analisi statistica</i>	87
4.3 Il modello numerico.....	88
4.3.1 <i>Carichi</i>	91
4.3.2 <i>Analisi di sensitività</i>	95
Capitolo 5 - Risultati	99
5.1 Valori medi di strain longitudinale subendocardico, subepicardico e rapporto endocardico/epicardico.....	99
5.1.1 <i>Variabilità inter- ed intra- osservatore</i>	100
5.1.2 <i>Relazione tra deformazione subendocardica ed età gestazionale</i> .	100
5.1.3 <i>Relazione tra deformazione subepicardica ed età gestazionale...</i>	101
5.1.4 <i>Relazione tra rapporto epi/endo ed età gestazionale</i>	101
5.2 Studio istologico.....	103
5.2.1 <i>Valori percentuali di spessore dei diversi layers</i>	105
5.2.2 <i>Angolazione media delle fibre miocardiche</i>	106
5.3 Il modello in silico.....	108
Capitolo 6 - Discussione	119
Capitolo 7 - Limitazioni	125
Capitolo 8 . Conclusioni	127
8.1 Prospettive future.....	128
Bibliografia	129

RIASSUNTO

Obiettivi: Scopo dello studio è di migliorare la comprensione dei meccanismi evolutivi che promuovono lo sviluppo dell'architettura miocardica del ventricolo sinistro, confrontando i dati anatomici ottenuti con l'esame istologico del miocardio fetale alle differenti settimane di gestazione con i dati funzionali calcolati all'ecocardiografia fetale mediante metodica *speckle tracking*.

Materiali e metodi: in questo studio trasversale sono stati al momento arruolati 72 feti di età gestazionale compresa tra le 17 e le 36 settimane gestazionali e 39 neonati in prima giornata di vita nati dopo 23-36 settimane di gestazione. Di questi pazienti è stata ottenuta una proiezione apicale 4 camere da cui è stato possibile studiare il valore di *strain* longitudinale regionale sia a livello dell'endocardio sia a livello dell'epicardio.

Sono stati inoltre analizzati i cuori di 20 feti sottoposti ad indagine autoptica per aborto spontaneo o interruzione volontaria di gravidanza senza patologia cardiaca. Di questi sono state ottenute delle fette di miocardio ventricolare sinistro da tagli longitudinali e sagittali a livello della parete laterale del ventricolo sinistro.

Sulla base dei risultati funzionali ed istologici sono stati progettati, in collaborazione con il Dipartimento di Ingegneria Civile, Ambientale e Strutturale, ricostruzioni al computer di curve pressione-volume durante la fase diastolica in funzione della diversa prevalenza di espressione delle fibre miocardiche.

Sviluppo del progetto: Il progetto ha coinvolto l'UOC di Cardiologia Pediatrica, l'UOC di Patologia Neonatale, l'UOC di Anatomia Patologica e il Dipartimento di Ingegneria Civile, Ambientale e Strutturale dell'Università di Padova. Lo sviluppo di questo progetto si è avvalso della collaborazione della Prof. Annalisa Angelini e della Dott.ssa Marny Fedrigo afferenti alla UOC di Anatomia Patologica; della Prof.ssa

Francesca Susin, della Prof.ssa Daniela Boso, del Dott. Paolo Peruzzo e della Dott.ssa Elena De Filippi, afferenti al Dipartimento di Ingegneria, per l'implementazione del modello matematico per la customizzazione della curva di Frank-Starling nei diversi pattern di distribuzione delle fibre miocardiche; della Dott.ssa Valentina Favero (acquisizione dati dei neonati afferenti alla UOC di Patologia Neonatale) e delle studentesse Alessia Basso (acquisizione dati ecografici del feto) e Irene Cattapan (acquisizione ed analisi dei dati ecografici del feto e dei dati di Anatomia Patologica)

Risultati: Lo studio ha dimostrato che i fasci longitudinali endocardici si differenziano precocemente rispetto ai fasci longitudinali epicardici. Infatti i primi rappresentano il 50% dello spessore miocardico già alla 14° settimana, e tale valore risulta stabile lungo il resto della gestazione. I fasci epicardici, invece, si differenziano alle spese dei quelli mesocardici trasversi solo tardivamente, passando dal 5% della 14° settimana al 22% al termine della gestazione. Dal punto di vista funzionale tale ripartizione è confermata dal rapporto tra lo *strain* longitudinale epicardico rispetto a quello endocardico, che passa dal 55% alla 18° settimana al 70% al termine della gestazione.

Il lavoro *in silico* ha permesso di evidenziare il comportamento delle curve pressione-volume a seconda della diversa disposizione delle fibre. È stato dimostrato che se le fibre si dispongono in senso radiale aumenta la *compliance* diastolica del ventricolo, mentre man mano che le fibre assumono un assetto longitudinale il sistema diventa più rigido. In condizioni fisiologiche le fibre hanno una disposizione +/- 60°. Tale livello di rigidità assicura contenute variazioni di volume a differenti condizioni di carico. Durante la vita fetale, invece, il sistema parte da una disposizione prevalentemente orizzontale, probabilmente perché le pressioni da generare sono più basse e perché la camera ventricolare ha rapidi incrementi di volume legati alla crescita. È stato inoltre verificato che il sistema risulta più rigido se lo strato longitudinale è posto all'endocardio, questo è ciò che si verifica nel feto a partire dalla 12° settimana di gestazione.

Conclusioni: questo studio dimostra i meccanismi meccanici e idraulici che sostengono allo sviluppo del miocardio fetale e pone le basi per lo studio dei meccanismi di compenso che si sviluppano nei pazienti con scompenso cardiaco.

In futuro sarebbe utile sviluppare la curva pressione-volume anche in fase sistolica per determinare la performance delle fibre in fase contrattile.

ABSTRACT

Background: Left ventricular myocardium is arranged in a complex three-dimensional network of fibers, which form a counterclockwise helix in the endocardial layer and a clockwise helix in the epicardial layer. This architecture may change in congenital and acquired heart disease. However, few studies evaluated the fetal myocardial development as well as the mechanism promoting these changes.

Purpose of the study: Speckle tracking Echocardiography allows to study endocardial and epicardial functionality in vivo separately. Combining these data with morphometric observations on histological sections of fetal human heart, we compared the development of the different myocardial layers with advancing gestational age. In addition, we verified in-silico the influence of different myocardial fibers arrangements on diastolic performance.

Methods: To study fetal myocardial function, we enrolled 72 fetuses and 39 premature babies without cardiac pathologies. We studied longitudinal endocardial and epicardial strain in these patients. For the histological section, we studied 20 fetal hearts without cardiac pathologies from autopsy investigation. We determined every layer's thickness and cardiac fibers orientation in comparison with gestational age. Concerning the in-silico study, three finite element models of the left ventricular myocardium were developed, corresponding to 20, 30 and 40 weeks' fetuses. An idealized thick walled ellipsoidal shape was considered, based on the values obtained from fetuses and babies measurements. Different combinations for the fiber orientations were investigated.

Results: Endocardial values of deformation are higher than epicardial ones. Epi/endocardial values ratio increased with gestational age ($R=0.51$, $p<0.0001$). Histo-

logical data confirm these observations (Epi/Endocardial thickness ratio over the gestational age: $R=0.76$; $P<0.0001$). All layers increase their thickness during but, while epicardium increases fourfold, trabecular and endocardial layers maintain almost the same value throughout pregnancy. Computational models showed that a radial arrangement of the myocardial fibers gives the highest diastolic compliance, while a longitudinal arrangement gives the poorest diastolic compliance. The endocardial longitudinal layer is the main contributor to the left ventricular diastolic rigidity.

Conclusions: Left ventricular myocardium maturation is a process that begins early during fetal life. It starts from the differentiation of a subendocardial layer. The development of the epicardium is slower than the endocardium and it is completed late in the fetal life. The radial arrangement of the myocardium fibers gives the highest compliance to the left ventricle, with poor changes in end-diastolic pressure even getting twice the end-diastolic volume. The endocardial longitudinal fibers are the main contributors to the preservation of the shape of the left ventricle.

CAPITOLO 1 – ANATOMIA, EMBRIOLOGIA E CLINICA DEL VENTRICOLO SINISTRO

1.1 LO SVILUPPO EMBRIOLOGICO DEL CUORE

L'abbozzo del cuore si forma nella regione cardiogenica, situata cranialmente e lateralmente all'encefalo, ad opera di elementi vascolari chiamati tubi endocardici. Queste strutture si formano a partire dalle cellule del mesoderma splancno-pleurico mediante un processo detto vasculogenesi.

Verso la fine della terza settimana il ripiegamento cefalico e laterale dell'embrione porta i due tubi endocardici a fondersi assieme nella regione mediana fino a formare una struttura impari: il tubo cardiaco primitivo.

Sempre nello stesso periodo compaiono nel tubo cardiaco una serie di solchi e costrizioni che nelle cinque settimane successive parteciperanno alla formazione delle diverse camere cardiache. All'estremo inferiore del tubo così formato viene a trovarsi il seno venoso, costituito dai corni sinusali sinistro e destro; spostandoci più cranialmente troveremo invece l'atrio primitivo e il ventricolo, che darà origine alla maggior parte del ventricolo sinistro definitivo, divisi tra loro dal solco atrio-ventricolare. Il solco bulbo-ventricolare separa invece il ventricolo dalla successiva dilatazione, il bulbo appunto, che formerà la maggior parte del ventricolo destro con la sua parte inferiore e la regione di deflusso dei ventricoli destro e sinistro con la sua parte superiore, detta cono-tronco.

Al 23° giorno il tubo cardiaco inizia il processo di "looping": si piega e allunga contemporaneamente formando delle anse. Il bulbo sarà così dislocato in basso, ventralmente e a destra; il ventricolo invece si sposterà a sinistra; mentre l'atrio primitivo si porterà in alto e indietro. Il ripiegamento si completa per il 28° giorno.

Al 24° giorno il sangue inizia a circolare in tutto l'embrione. Il ritorno venoso inizialmente raggiunge i corni destro e sinistro del seno venoso tramite le vene cardinali comuni, ma nel giro delle prime settimane si rimodella in modo tale che tutto il sangue venoso fluisca nel corno destro del seno venoso tramite una vena cava superiore e una vena cava inferiore. In questo momento, il corno sinistro smette di crescere e si riduce ad un piccolo sacco sulla parete posteriore del cuore: il seno coronarico.

Nel momento in cui il corno destro e le vene cave si allargano per seguire la rapida crescita del cuore, il lato destro venoso è gradualmente incorporato nella porzione destra e posteriore della parete dell'atrio in via di sviluppo, andando così a formare il seno venoso. L'originario lato destro delle vene primitive invece darà luogo ad un piccolo lembo ventrale di tessuto, l'auricola destra. Nella parte posteriore dell'atrio destro così formato, troveremo quindi gli osti delle vene cave e del seno coronarico, che saranno attornati, sia a destra che a sinistra, dalle rispettive valvole venose. Al di sopra dell'orifizio seno-atriale superiore, le valvole si incontrano a formare un septum primum. In seguito, la valvola venosa di sinistra parteciperà alla costituzione del septum secundum, mentre la valvola venosa destra darà luogo alla valvola del seno coronarico e a quella della vena cava inferiore. Al di sopra di quest'ultima valvola, un rilievo di tessuto detto "cresta terminale" delimita la parete dell'auricola, a parete trabecolata, dal seno delle vene cave, a parete liscia.

All'inizio della quinta settimana, dall'atrio primitivo di sinistra si diparte una vena polmonare, che successivamente si biforcherà in un branca destra e una sinistra, che si divideranno poi in due vene polmonari ciascuna. Queste vene vengono progressivamente incorporate nella parete posteriore del lato sinistro dell'atrio primitivo, dove andranno a formare la parte liscia dell'atrio sinistro definitivo.

La settazione atriale comincia parallelamente al rimodellamento degli atri. Verso il 26° giorno si forma una depressione sul tetto dell'atrio, per la spinta esercitata dal conotruncato sovrastante. Al 28° giorno, questa depressione dà luogo ad un cercine di tessuto a forma di semiluna detto "ostium primum". Il setto cresce in senso postero-anteriore e cranio-caudale, fino a separare gradualmente i due atri. Il pertugio rimanente tra i due atri e che via via si stringe, viene chiamato ostium primum.

Nel contempo, a livello del contorno del canale atrioventricolare, si sviluppano quattro cuscinetti endocardici (sinistro, destro, superiore e inferiore). Questa proliferazione endocardica è innescata da segnali derivanti dal miocardio adiacente. Alla fine della sesta settimana, il cuscinetto superiore e il cuscinetto inferiore si fondono a formare il septum intermedium che divide il canale atrioventricolare comune in canale destro e sinistro. Contemporaneamente, il septum primum prolifera fino a raggiungere il septum intermedium, con conseguente oblitterazione dell'ostium primum. Un processo di morte cellulare programmata nel margine superiore del septum primum garantisce il continuo passaggio di sangue da destra a sinistra: compare così l'ostium secundum.

Parallelamente al septum primum si forma anche un septum secundum, più spesso e di struttura muscolare, a differenza del septum primum che era sottile e di consistenza membranosa.

Il septum secundum si sviluppa con andamento cranio-caudale e antero-posteriore, ma si arresta prima di raggiungere il piano atrioventricolare per lasciare un'apertura detta "forame ovale" sul pavimento dell'atrio destro. Fino alla nascita saranno quindi presenti due comunicazioni: il forame ovale sul pavimento dell'atrio destro e l'ostium secundum sul tetto di quello sinistro.

Il successivo sviluppo sarà costituito dal processo di balloning, ovvero rimodellamento della camera ventricolare e adeguato sviluppo di setti e valvole. A questo punto

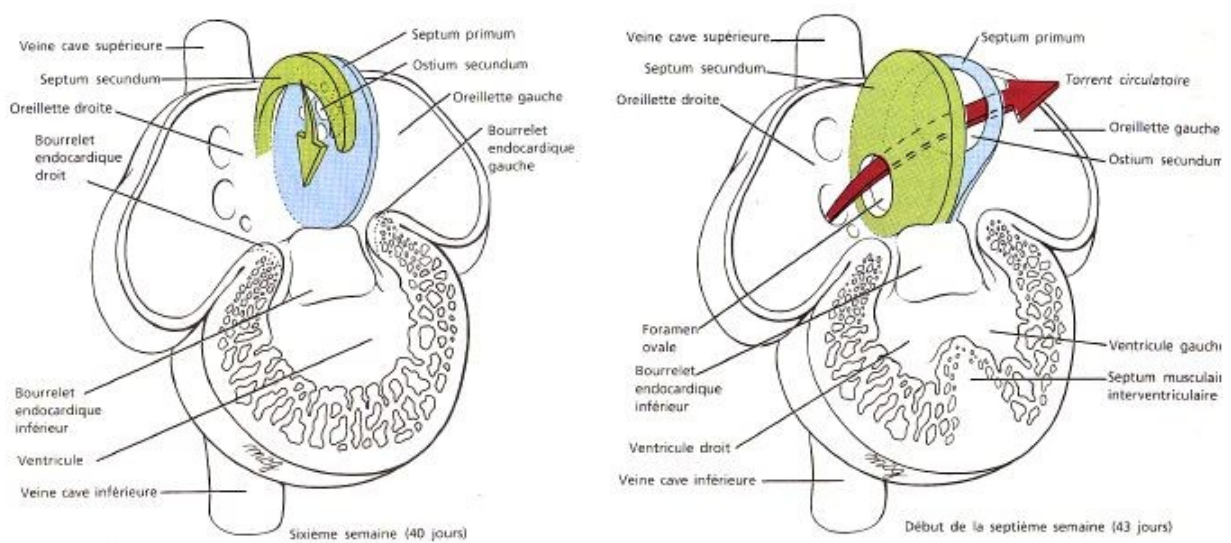


Figura 1.1. Formazione del setto interatriale.

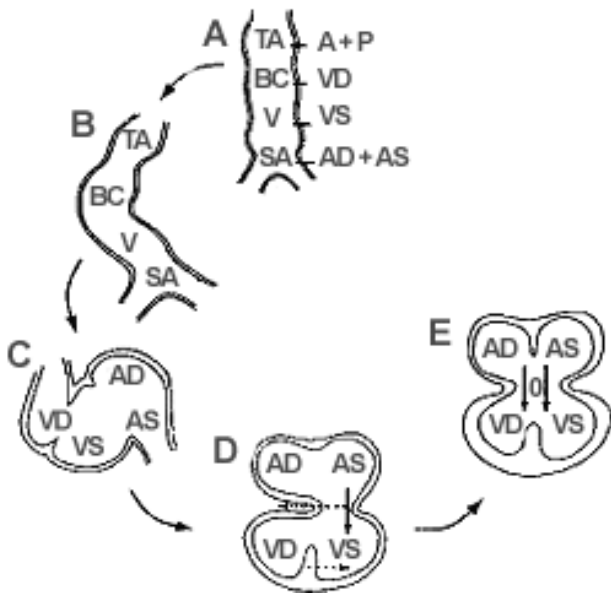


Figura 1.2. Ripiegamento del tubo cardiaco primitivo e balloning ventricolare.

del processo infatti, il canale atrioventricolare consente il passaggio di sangue solo tra futuro atrio destro e ventricolo sinistro. Per di più, solo il ventricolo destro è connesso al conotruncus e quindi al suo efflusso. Si verifica a questo punto un apparente movimento della struttura verso destra, dato dalla scomparsa del solco bulbo-ventricolare e dall'allargamento del conotruncus. In questo modo, verso il 42° giorno si verifica l'allineamento delle due porzioni del canale atrio-ventricolare con i rispettivi atri e ventricoli.

Le valvole atrioventricolari raggiungeranno il loro completo sviluppo verso il terzo mese di gravidanza.

Gli apici dei ventricoli vengono formati appunto attraverso il processo di balloning. L'apice sinistro deriverà dalla porzione inlet del tubo ripiegato, mentre l'apice destro dalla porzione outlet. In questo modo prenderà forma anche il setto muscolare definitivo tra i due apici.¹

Alla fine della quarta settimana, dalla parte inferiore del solco bulbo ventricolare, comincia a formarsi una sporgenza; la crescita di questo setto si arresterà a metà della settima settimana, prima che quest'ultimo arrivi a contattare il setto intermedio. Ciò è fondamentale: se non avvenisse il ventricolo sinistro sarebbe tagliato fuori dal tratto di deflusso.

Tra la quinta e l'ottava settimana si svilupperà anche il setto membranoso che arriverà a contattare quello muscolare in corrispondenza con la separazione delle vie di deflusso ventricolari. Un corretto incuneamento della radice aortica a livello del piano atrio ventricolare è cruciale per una corretta settazione. Nel frattempo, il miocardio inizia ad ispessirsi fino a formare delle creste muscolari dette trabecole. La trabecolatura coinvolge anche il setto in via di formazione.

A livello conotruncale si formano due rigonfiamenti, che crescono dalle opposte pareti del tronco di eiezione e si incontrano poi nel mezzo. Inizialmente questi rigonfiamenti sono spessi e occupano gran parte della regione di efflusso, ma alla fine si assottigliano fino a dividere le vie di deflusso dei rispettivi ventricoli. La crescita a spirale di questo setto implica che tronco polmonare e aorta ascendente si attorciglieranno l'uno intorno all'altra.

A metà della quinta settimana compare un piccolo tubercolo sulla punta di ciascun rigonfiamento del tronco arterioso. Quando i rigonfiamenti si fonderanno assieme per separare tra loro i tratti di efflusso, questi tubercoli, inizialmente in posizione laterale, si suddivideranno in due, così che la metà di ognuno vada a far parte di ciascuno dei tratti d'efflusso in via di formazione. Nel mentre, un secondo paio di tubercoli si svilupperanno a partire rispettivamente dalla parete anteriore e posteriore del tronco arterioso. Una volta completata la sepimentazione, ciascun tratto di efflusso conterrà quindi tre tubercoli disposti a triangolo: due formati dai tubercoli laterali suddivisi ed un terzo cresciuto sulla parete anteriore o posteriore del tronco. Il tubercolo cresciuto dalla parete anteriore andrà a comporre la valvola polmonare, mentre quello cresciuto dalla parete posteriore la valvola aortica. Lo sviluppo delle valvole semilunari si ritiene completo attorno alla nona settimana.²

Il cuore inizia a battere al 22° giorno di vita, essendo un organo che deve funzionare da subito. Le prime onde ritmiche di depolarizzazione elettrica sono miogeniche, ovvero insorgono spontaneamente nel muscolo cardiaco. La sequenza di attivazione cambia con il variare della morfologia, troveremo lenti movimenti peristaltici in senso base-apice nel ventricolo trabecolato in fase di looping, fino ad arrivare all'andamento apice-base del miocardio maturo.³

Precocemente l'attività di pacemaker viene assunta da un gruppo di cellule della regione senoatriale derivate dalla porzione destra del seno venoso. Queste cellule formano una struttura ovalare ben distinta chiamata nodo senoatriale.

Il tessuto di conduzione atrioventricolare invece è costituito da un anello interventricolare e da un esteso anello atrioventricolare. Il nodo atrioventricolare finale prenderà luogo al bordo postero-inferiore della confluenza dei due anelli, sul piano atrioventricolare. A livello antero-superiore si forma un "nodo retroaortico" la

cui connessione con il tessuto di conduzione ventricolare viene poi distrutta, in concomitanza con lo stabilirsi di una continuità fibrosa mitro-aortica.⁴

Lo sviluppo del nodo atrioventricolare è accompagnato dalla comparsa di un fascio di cellule specializzate all'interno del setto ventricolare. Si tratta del fascio di His, che decorre fino all'apice dividendosi successivamente in una branca destra e una sinistra.

L'esatta origine embriologica di queste strutture è attualmente dibattuta. Si ritiene che il sistema di conduzione tragga origine dal mesoderma cardiogenico, ma che il nodo senoatriale, invece, possa originare dalla cresta neurale.

Riassumendo, i processi di base a cui il tubo cardiaco primitivo va incontro sono: looping, ballooning, formazione della trabecolatura, settazione ed, in ultimo, compattazione.

Alla luce della complessità dell'intero processo, non devono stupire la grande varietà e la relativa frequenza delle malformazioni cardiache esistenti.

Finora, lo sviluppo del muscolo cardiaco è stato studiato soprattutto su modelli animali come pulcini, maiali e, soprattutto, topi. Sedmera et al⁵ hanno tuttavia dimostrato che questi modelli non sono distanti da ciò che accade nell'uomo.

Per standardizzare le tappe dello sviluppo, svincolandole dalla precisa età gestazionale (che può non riflettere uno stesso grado di sviluppo per una lunga serie di motivi), si sono creati degli stadi e scale di riferimento, come quella di Hamburger-Hamilton, in uso soprattutto nei polli, o quella di Carnegie, usata nei topi.

Quanto al confronto tra sviluppo miocardico umano e murino, va notato come le due specie correlino strettamente nelle prime fasi, mentre a partire dallo stadio 18 secondo Carnegie, lo sviluppo del cuore umano resti indietro, se comparato con quello murino, considerando lo sviluppo totale dell'embrione.¹

Nel topo, inoltre, è ormai validata la presenza di un secondo "heart forming field" dal quale derivano cellule che vanno a localizzarsi ai poli del tubo cardiaco primitivo. Avremmo quindi due linee cellulari: la prima, che dà vita alla maggior parte del ventricolo sinistro, e una seconda, contraddistinta dal marker *Islet1*, che andrebbe a formare miocardio ed endocardio del ventricolo destro, l'ouflow del tubo cardiaco e il seno venoso.⁶ Se ciò possa essere vero anche nell'uomo, è tuttora da verificare.

1.2 SVILUPPO DELLA PARETE CARDIACA

Il tubo cardiaco primitivo è formato inizialmente da endotelio. Al 22° giorno, uno spesso strato di mesoderma splancno-pleurico va a rivestire il tubo cardiaco e si differenzia in due nuovi strati: il miocardio e la gelatina cardiaca. Quest'ultima è formata da uno spesso strato di matrice acellulare secreta dal miocardio in via di sviluppo.

Il tubo cardiaco, poi, affronta il processo di looping: ovvero ruota leggermente a destra e si piega sia ventralmente che a destra a seguito di forze meccaniche extracardiache. Questo processo, infatti, pare determinato in primis dalla trazione esercitata verso destra dalle vene onfalomesenteriche, più che dalle intrinseche capacità rotazionali del miocardio primitivo, che appaiono scarse.⁷

Allo stadio 13 di Carnegie, corrispondente più o meno al 37° di gestazione umana, quando inizia il processo di ballooning, le pareti dei ventricoli in via di sviluppo sono sottili. La maggior parte della cavità è infatti occupata da una rete spongiosa di fini trabecole, uguali sia nel primitivo ventricolo di destra che in quello di sinistra.

Allo stadio 18 di Carnegie, le pareti di entrambi i ventricoli si inspessiscono in risposta a segnali proliferativi derivanti dall'epicardio sovrastante. Essi sono: FGF (Fibroblast Growth Factor), Wnts, acido retinoico ed eritropoietina.¹ Questo aumento dello spessore parietale implica la necessità di formazione di una vascolatura coronarica che vada a supplire le esigenze del muscolo nel momento in cui il processo di semplice diffusione non sia più sufficiente. A questo punto dello sviluppo cardiaco, la zona trabecolata è due volte più spessa della porzione di parete compatta, una situazione fortemente analoga al patologico miocardio spongioso.

In corrispondenza dello stadio 21, alcune trabecole di entrambi i ventricoli cominciano a compattarsi per formare i muscoli papillari, anche se permangono zone estesamente trabecolate.

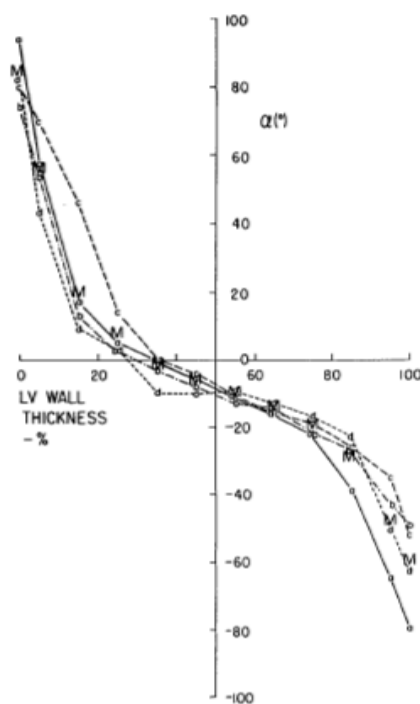
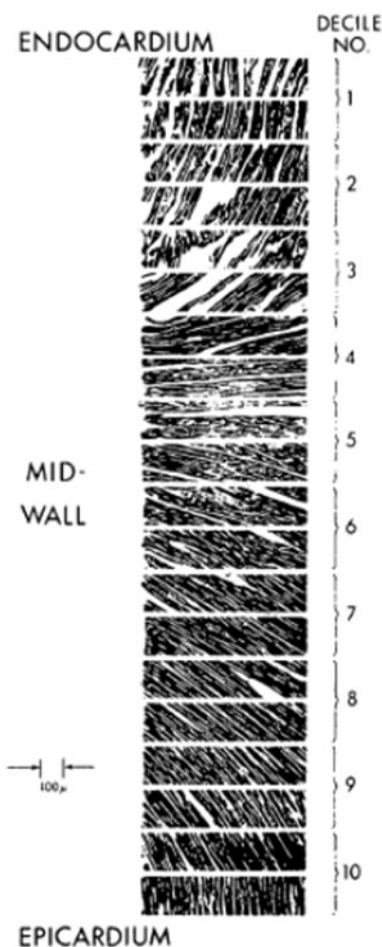
Le trabecole iniziano a scomparire verso lo stadio 23 di Carnegie. Solo a questo punto cominciano a rendersi evidenti le differenze in grossolanità delle trabecole residue dei due ventricoli: la trabecolatura del ventricolo destro sarà appunto più grossolana e circonda l'intera cavità, mentre quella del sinistro sarà invece più fine e localizzata prevalentemente all'apice.

Figura 1.3. Rappresentazione grafica dell'andamento delle fibre in sezioni progressive dall'epicardio verso l'endocardio.

Nel contesto della parete ventricolare del cuore maturo si possono riconoscere tre diversi layers in base all'angolatura delle miofibre: endocardio, mesocardio ed epicardio, rispettivamente dall'interno verso l'esterno.⁸ Il primo e l'ultimo sono composti da fibre ad andamento principalmente longitudinale, mentre il mesocardio è caratterizzato da fibre perpendicolari al piano di sezione. Streeter et al⁹ hanno studiato il cambiamento di angolazione delle fibre dallo strato più esterno a quello più interno su cuori canini fermati in sistole o in diastole utilizzando sezioni progressive che da un piano tangente all'epicardio si portavano via via verso la parte più interna del cuore. Ne è emerso che agli estremi le fibre raggiungono angolature di 90° nell'endocardio e -90° a livello epicardico, mentre le fibre mesocardiche, orientate in senso circonferenziale, sono maggiormente rappresentate a livello della base cardiaca. Il rapporto tra fibre circonferenziali e fibre longitudinali è comunque alto, si attesta infatti su valori di 10:1.

Al passaggio dalla diastole alla sistole, l'angolatura incrementa di circa 7° a livello basale

Figura 1.4. Rappresentazione grafica dell'angolatura delle fibre (asse y) in base alla percentuale di spessore parietale (asse x).



e di circa 19° a livello medio-apicale, dato che può dipendere dai meccanismi di torsion ventricolari.⁹ In più, l'andamento della curva che descrive il cambiamento dell'angolazione plottata sullo spessore di parete espresso in percentuale è più ripido a livello medio-apicale che basale. Ciò indica una maggior presenza di fibre orientate longitudinalmente a livello medio-apicale.

1.3 SVILUPPO DELL'ANISOTROPIA CARDIACA

L'anisotropia è la proprietà per la quale un dato materiale ha caratteristiche che dipendono dalla direzione lungo la quale sono considerate. Un materiale è anisotropo se le sue caratteristiche fisiche (conducibilità elettrica e termica, proprietà ottiche) o il suo comportamento meccanico (rigidezza, resistenza, tenacità) sono differenti in direzione longitudinale e trasversale. In un certo senso, l'anisotropia rappresenta per la direzione quello che la disomogeneità rappresenta per lo spazio.

Il tessuto cardiaco maturo è anisotropo, anche se nasce, al contrario, come un tessuto isotropo che evolve questa sua peculiarità nel corso dello sviluppo fetale e dopo la nascita.¹⁰

Inizialmente, infatti, i cardiomiociti sono cellule di forma sferica e con giunzioni cellulari e molecole di adesione distribuite omogeneamente sulla sua superficie.

Durante le ultime fasi dello sviluppo endouterino e nel primo periodo post-nascita, i cardiomiociti si allungano progressivamente fino ad acquistare una forma a barra con un gradiente endo-epicardico.¹⁰ Shiraishi et al hanno infatti dimostrato come, agli stadi 7 e 13 di Hamburger-Hamilton, gli embrioni di pollo presentino uno strato epicardico formato da cellule rotondeggianti e uno endocardico con cellule allungate e orientate in direzione circonferenziale.¹¹

I cardiomiociti diventano quindi cellule fortemente polarizzate: le molecole di adesione si concentrano via via in zone specifiche della cellula, ovvero i dischi intercalari.

Alcuni dei segnali molecolari che indirizzano la polarizzazione sono stati scoperti. I cardiomiociti di topi knock out per alcune proteine PCP (Planar Cell Polarity), come Scrib e Vangl2, rimangono tondi e sviluppano anomalie che ricordano il miocardio non compatto.¹²

È utile a questo punto chiarire il concetto di “fibra”, che verrà spesso utilizzato di seguito. Questo termine sarà usato in senso macroscopico, con riferimento ad un insieme di cellule miocardiche che seguono una stessa direzione. Sarebbe perciò sbagliato volerle intendere come entità anatomiche tra loro separate da tessuto connettivo; il vantaggio dell’uso di tale termine sta nell’indicare regioni dove l’orientamento generale cambia solo di pochi gradi, in contrasto con le zone dove invece quest’ultimo cambia più rapidamente.¹³

Anche l’andamento delle fibre riflette l’anisotropia cardiaca prima menzionata. Durante lo sviluppo si passa infatti da un’orientazione uniforme e circolare delle fibre ad un pattern più complesso che vede la formazione di un arrangiamento a spirale antioraria a livello endocardico e a spirale oraria a livello epicardico.¹⁴ Anche questo è un processo che avviene secondo un gradiente endo-epicardico.

Alford e Taber¹⁵ studiarono, mediante sono-micrometria, il tasso di deformazione regionale della parete cardiaca di cuori di embrioni di pollo che avevano già sostenuto la fase di looping e notarono che lo strain della curvatura esterna era “isotropo”, in linea quindi con una mancanza di arrangiamento delle miofibre, mentre lo strain delle regioni centrali e della curvatura interna era invece “ortotropico”, suggerendo la quindi la presenza di un allineamento delle fibre.

La distribuzione transmurale delle fibre nel miocardio compatto si dimostra infatti uniforme dallo stadio 21 fino allo stadio 27, quando le fibre centrali si orientano seguendo la tangente all’epicardio nel piano trasversale, mentre quelle nel piano sagittale si orientano in senso circonferenziale.¹⁴ Ciò va di pari passo con un cambiamento del pattern di contrazione: da uniforme allo stadio 21 fino a diventare non-uniforme e longitudinalmente dominante allo stadio 27.¹⁶

Allo stadio 36, si passa da trabecolatura “secondaria”, con le trabecole orientate in senso dorso-ventrale, alla trabecolatura terziaria, con trabecole orientate secondo una spirale antioraria se viste dalla base cardiaca. In questa fase le trabecole diventano più larghe e interconnesse fino a formare una struttura simile ad un cesto di vimini che si allunga dall’apice del ventricolo all’orifizio mitralico.¹⁴

A livello funzionale ciò implica che il ventricolo acquisirà quel twist sistolico che caratterizza la contrazione adulta.¹⁷ Il cambiamento nell’orientamento trans-murale

delle fibre procede inoltre di pari passo con un più breve ciclo cardiaco e un aumento di funzione.¹⁸

Quindi è facile capire come in una situazione di cardiopatia, congenita o acquisita, in cui questa struttura di base viene alterata anche la funzionalità cardiaca possa essere significativamente compromessa.¹⁹

Ne sono la prova gli esperimenti di Tobita et al che hanno riprodotto su embrioni di pollo dei cambiamenti di pre-carico e post-carico cardiaci tramite rispettivamente legatura dell'atrio sinistro e legatura del tronco-conale.

Nel primo caso, il cambiamento delle dimensioni e del volume ventricolare divennero evidenti in corrispondenza degli stadi 29 e 31 di Hamburger Hamilton, in corrispondenza dello shift tra trabecolatura secondaria e terziaria.^{20,21} Questi cambiamenti sono associati anche con una riduzione della velocità di proliferazione cellulare.²² In particolare, i cambiamenti nella pressione sviluppata dal ventricolo, nel flusso sanguigno e nell'espressione di proteine del citoscheletro e nei pattern di contrazione regionali, si rendevano evidenti prima dell'effettivo rimodellamento cardiaco.^{23,24} Per quanto riguarda gli angoli di distribuzione delle fibre, questi rimanevano normali fino allo stadio 27, ma lo sviluppo diventava significativamente ritardato verso lo stadio 31.¹⁴

Per quanto riguarda invece l'aumento di post-carico, si è visto che la legatura del cono-tronco induceva una dilatazione del ventricolo sinistro a cui seguiva un ispessimento della parete di miocardio compatto e un'accelerazione dello sviluppo della trabecolatura terziaria.²¹ Al contrario di quanto visto a seguito della legatura dell'atrio sinistro, in questo caso l'indice di proliferazione cellulare del miocardio era aumentato. L'angolazione delle fibre rimaneva normale fino allo stadio 27, come nel caso precedente, ma presentava un'accelerazione verso lo stadio 36. In particolare, allo stadio 36. Le miofibre inoltre presentavano un angolo più negativo sul piano trasversale, implicando un twisting maggiore che negli altri embrioni.¹⁴

Per finire, all'alterata emodinamica correlano anche rispettivamente un ritardo o un'accelerazione nella maturazione del sistema di conduzione e nella formazione della vascolatura coronarica, sempre in relazione all'alterata formazione delle trabecole terziarie.

L'anisotropia cardiaca si presta ad essere studiata, oltre che con approccio istologico, anche con la Risonanza Magnetica di diffusione, metodica DTI.²⁵ In particolare si sfrutta la capacità della risonanza di ricostruire un quadro trattografico e di calcolare l'indice di anisotropia (FA) del tessuto.

Mekkaoui et al hanno studiato cuori umani di feti tra le 10 e le 19 settimane di gestazione, ricavandone che tra le 10 e le 14 settimane il tessuto era altamente isotropico, mentre verso le 19 settimane era possibile discernere con chiarezza l'andamento elicoidale delle fibre, anche se il tessuto di per sé era ancora debolmente anisotropo, nonostante in generale il trend si dimostrasse concorde all'età gestazionale.²⁶ In questo contesto, la misura di organizzazione delle fibre utilizzata è stata l'angolo di elica (HA), valutato su sezioni trasversali. L'angolo HA, da definizione, è l'angolo formato tra il piano radiale e la proiezione del vettore principale nel piano tangente a quello radiale.²⁷ Nell'adulto, dallo studio di questo valore si comprende come le fibre del ventricolo sinistro sottendano un angolo HA di circa 120° prodotto dal sistema di eliche intersecantesi.²⁷ Dalla letteratura presente in materia, si comprende che lo studio dello sviluppo cardiaco fetale sia un campo

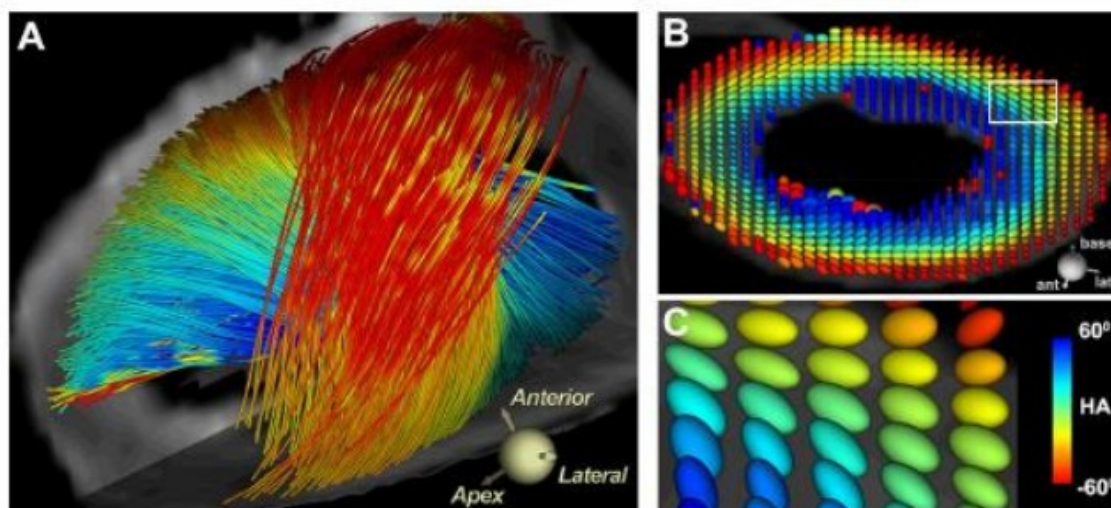


Figura 1.5. Rappresentazione trattografica dell'andamento delle fibre nel miocardio adulto, ottenuta tramite risonanza magnetica cardiaca di diffusione. In figura A si nota come le fibre endocardiche abbiano un angolo di elica positivo (elica destrorsa), mentre le fibre epicardi che siano disposte secondo un angolo negativo (elica sinistro-rotaria). Nelle figure B e C è invece possibile notare l'indice di anisotropia delle fibre in sezione trasversale.

ancora aperto e che siano necessari ulteriori studi per riuscire a trasporne i risultati a livello clinico.

1.4 ARCHITETTURA CARDIACA

Sono stati proposti molti modelli di architettura cardiaca. Nel contesto degli studi presenti in materia, si possono rintracciare due linee di pensiero prevalenti: il muscolo cardiaco interpretato in analogia al muscolo scheletrico e il muscolo cardiaco come specializzazione dell'apparato vascolare.

Nel primo modello, i fasci ad andamento "omogeneo" delle fibre vengono interpretati come entità individuali a sé in cui ogni fibra prende comunque rapporto diretto con lo scheletro fibroso del cuore.

L'ipotesi più estrema è quella di Robb and Robb (1942) che identificava quattro fasci muscolari separati con origine dal trigono fibroso e dalle radici polmonare e aortica (Fig. 1.6). Torrent-Guasp (1975) invece individuava un unico fascio muscolare proteso tra valvola aortica e valvola polmonare (Fig. 1.7). Nell'ambito dell'interpretazione del muscolo cardiaco alla stregua di quello scheletrico, sicuramente questa rappresentazione è stata quella che ha avuto più fortuna. Il gruppo di Jouk et al, studiando il miocardio fetale tramite microscopia a luce polarizzata, ha escluso la sua validità nel periodo fetale, ma per quanto riguarda la vita post-natale le evidenze raccolte non hanno portato né ad accettare né a rigettare questa tesi.²⁸

Il limite principale di questi tipi di rappresentazione, comunque, sta nell'approccio

tramite dissezione, tecnica molto poco riproducibile e fortemente operatore dipendente.¹³

Nel secondo modello invece il muscolo cardiaco è considerato una sorta di specializzazione del muscolo vascolare, con fibre che si dipartono l'una dall'altra. Questa teoria è stata nel corso

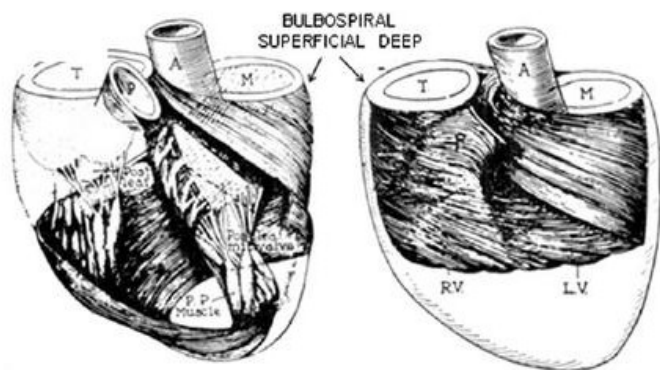


Figura 1.6. Ipotesi di Robb & Robb.

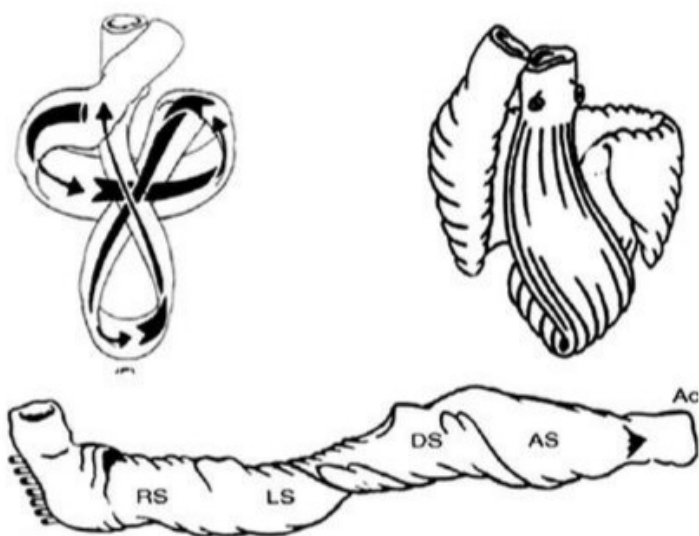


Figura 1.7. Modello di architettura proposto da Torrent-Guasp.

del tempo suffragata anche dalle tecnologie a disposizione, come microscopia elettronica ed imaging, che hanno mostrato come le fibre miocardiche costituiscano una rete di cellule con un orientamento preferenziale e giunzioni cellulari end-to-end.²⁹

Krehl (1891) si concentrò sul ventricolo sinistro descrivendo una continuità tra fibre subendocardiche e subepicardiche a livello dell'orifizio mitralico e dell'apice. Streeter (1979) molti anni dopo validò questa descrizione elaborando un modello in cui le fibre del ventricolo sinistro si comportano come "linee geodesiche che corrono su una serie di solidi di rotazione di forma toroidale contenuti l'uno all'interno dell'altro" (Fig. 1.8).³⁰ Il discorso può essere semplificato come segue: le fibre seguono le traiettorie più brevi possibili su superfici di forma a ciambella di dimensioni via via decrescenti che sono innestate tra loro come delle matrioske.

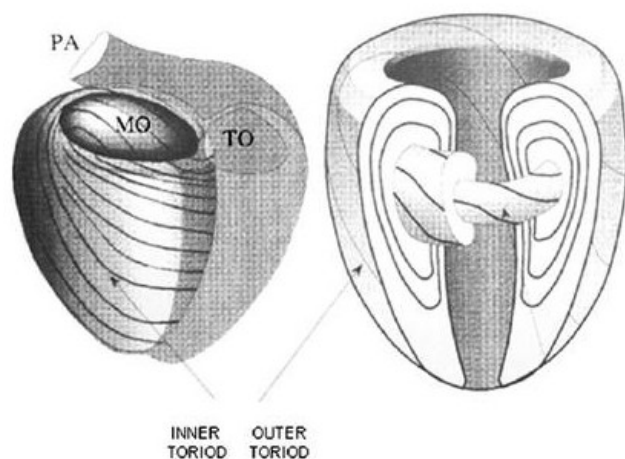


Figura 1.8. Modello di architettura cardiaca proposto da Streeter.

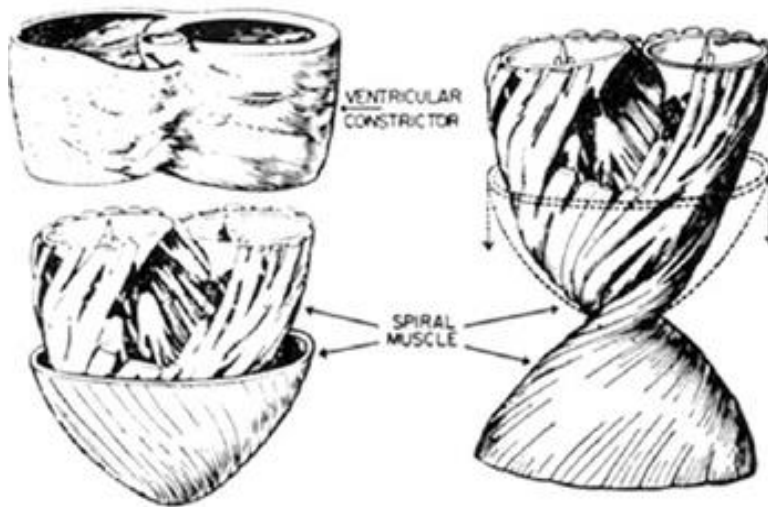


Figura 1.9. Modello di architettura cardiaca proposto da Rushmere.

Successivamente Rushmer et al hanno esteso questo modello all'intera massa ventricolare, individuando tre diverse lamine di cardiomiociti all'interno della massa cardiaca: la superficiale, la lamina media e la profonda. Le fibre dello strato superficiale prendono origine dallo scheletro fibroso del cuore e corrono obliquamente sulla superficie ventricolare per poi invaginarsi in modo spirale a livello apicale, dove poi si continuano nello strato profondo della parete. Le fibre dello strato profondo si portano longitudinalmente dall'apice alla base dando corpo ai muscoli papillari e alle trabecole. Le fibre dello strato medio invece non prendono inserzione nello scheletro fibroso del cuore e hanno un andamento circonferenziale. Diversi studi hanno corroborato questa ipotesi.^{13,31,32}

Sanchez-Quintana et al³³ hanno ritrovato la struttura trilaminare in ventricoli sinistri di cuori fetali. In particolare, hanno notato come sia soprattutto lo strato epicardico a subire modificazioni legate all'età.

Questa teoria presenta, tuttavia, dei difetti intrinseci dal momento che suppone che le fibre cardiache corrano solamente all'interno del loro strato di appartenenza, quando invece diverse osservazioni hanno smentito questa concezione compartimentale dell'architettura cardiaca arrivando persino a calcolare l'angolo di penetrazione delle fibre all'interno del muscolo cardiaco.³⁰ I punti di criticità maggiori riguardanti questo modello emergono in particolare a livello del setto interventricolare e della parete del ventricolo destro, che sembra non presentare uno strato di fibre circonferenziali.

Per superare l'approccio tramite dissezione e tutte le limitazioni che ne conseguono, Jouk et al. hanno studiato la struttura di cuori fetali al secondo trimestre di gestazione al microscopio a luce polarizzata, sfruttando le proprietà di birifrangenza del miocardio incluso in resine acriliche. Ne è emerso che l'analogia con il modello "a nastro piatto" di Torrent-Guasp è inadeguato per descrivere l'architettura cardiaca in questo periodo di sviluppo, dal momento che le direzioni "preferenziali" delle fibre stirate tra i due efflussi non sono rispettate. La descrizione tramite modello trilaminare è meno inadeguata, ma tuttavia presenta delle ulteriori perplessità rispetto a quelle sopra esposte. In particolare, il modello non spiega in maniera plausibile dal punto di vista bio-meccanico le relazioni tra i diversi strati muscolari del ventricolo destro e il setto interventricolare.

Il modello che questi ricercatori hanno quindi proposto è una rivisitazione della teoria di Steeter: le fibre dell'intero cuore decorrono come linee geodesiche su una serie di "pretzels" deformati contenuti l'uno all'interno dell'altro. Dobbiamo quindi immaginare una figura simile a due ciambelle unite lungo la loro parete mediale, che formerà quindi il setto. La ciambella di destra sarà formata da fibre stirate tra l'orifizio tricuspidalico e l'efflusso polmonare, assumendo dunque la piega di un tubo a "U". La curvatura interna della ciambella corrisponderà alla cresta sopraventricolare, mentre la curvatura esterna rappresenta la parete libera del ventricolo.

Non è ancora chiaro, tuttavia, se questo modello continui a rimanere valido dopo la nascita e nella vita adulta.³⁴

1.5 TRANSIZIONE DA FETO A NEONATO

1.5.1 La circolazione fetale

Prima della nascita, l'ossigenazione del sangue e il rilascio di anidride carbonica avvengono a livello placentare. Durante la vita fetale, il polmone offre altissime resistenze vascolari, per cui solo una minima quantità di sangue (<5% della gittata cardiaca) va al polmone e ritorna in atrio sinistro attraverso le vene polmonari. Il sangue venoso ritorna dalla placenta al feto attraverso la vena ombelicale. Da qui la maggior parte torna al cuore fluendo attraverso il dotto venoso di Aranzio, mentre una minoranza passa per il fegato. Dal dotto venoso il sangue ossigenato passa

nella cava inferiore, dove si mescola con il sangue deossigenato proveniente dagli arti e dal tronco. Giunto nell'atrio destro, un terzo di questo sangue passa direttamente nel settore sinistro attraverso il forame ovale. In questo modo, in atrio sinistro arriva il sangue più saturato, attorno a valori circa del 65%. Quest'ultimo si mescola con il pochissimo sangue refluo dalle vene polmonari per poi passare nel ventricolo sinistro. Di qui il sangue viene pompato in aorta di modo che coronarie e il distretto cranio-encefalico possano beneficiare di maggiori livelli di ossigeno.

A livello dell'atrio destro, il sangue proveniente dalla cava superiore e quello proveniente dalla cava inferiore formano correnti distinte che si mescolano molto poco. Il sangue che non è dirottato alle sezioni sinistre passa nel ventricolo destro, da cui viene indirizzato all'arteria polmonare. A causa delle resistenze vascolari però, la maggior parte di questo sangue viene deviato al dotto di Botallo, un ampio condotto dal quale viene reimmesso nella circolazione sistemica in corrispondenza dell'istmo aortico. L'addome e gli arti inferiori riceveranno quindi sangue a bassa tensione di ossigeno. Il sangue che non va a perfondere i distretti sopra menzionati va alla placenta per essere nuovamente ossigenato e depurato dai cataboliti fetali.

1.5.2 Modificazioni emodinamiche alla nascita

Al momento della nascita avviene il distacco della placenta. Il parenchima polmonare si distende e il rapido aumento della tensione di ossigeno esplica una potente azione vasodilatatrice che porta alla caduta delle resistenze polmonari e all'entrata di sangue nei polmoni. Questo processo di caduta delle resistenze polmonari non è istantaneo, ma continua per alcuni anni con il rimodellamento della tonaca media delle arteriole polmonari.

Ad ogni modo, in fase precoce questi cambiamenti portano all'inversione dello shunt nel dotto arterioso di Botallo, che da destro-sinistro diviene sinistro-destro. Il cambiamento di direzione del flusso unitamente all'aumento della tensione d'ossigeno e al drastico calo delle prostaglandine, che venivano prodotte dalla placenta, comportano la chiusura del dotto arterioso nelle prime 24-48 ore di vita.

A livello di atrio sinistro aumenta rapidamente la pressione: il calo delle resistenze polmonari produce un maggior afflusso al polmone e di conseguenza un maggior

ritorno venoso. Ciò comporta un'inversione delle pressioni atriali con successiva chiusura del forame ovale.

Il pre-carico, dopo la nascita, aumenta come risultato del calo della pressione pericardica. Quest'ultima infatti in utero è più alta a causa della situazione polmonare: i polmoni sono collassati e imbevuti di liquido. Questo è particolarmente vero per il ventricolo sinistro, mentre per il destro ci sono dati meno chiari. Sembra infatti che al momento del clampaggio del cordone ombelicale il pre-carico cada, ma che nel giro di qualche ora aumenti fino a livelli sopra-sistemici.

Anche il post-carico aumenta al passaggio da una circolazione a basse resistenze, come quella placentare, a quella definitiva.

Da questo momento in poi, la crescita del cuore avverrà prevalentemente per ipertrofia dei cardiomiociti. Ciò è evidenziato dal calo del rapporto DNA/proteine dopo la nascita.³⁵

1.5.3 Rimodellamento cardiaco post-natale

Zhang et al³⁶ hanno studiato le modificazioni cardiache post-natali su cuori suini, tramite risonanza magnetica e tecniche istologiche. Ciò che ne è emerso è che le prime due settimane dopo la nascita sono un periodo critico per il completamento dello sviluppo cardiaco.

Questi cambiamenti riguardano soprattutto il ventricolo destro e il setto interventricolare. Nelle prime due settimane infatti, la struttura elicoidale stabilitasi nel corso del secondo trimestre di gestazione, vede un cambiamento nell'angolo di elica endocardico della parete libera del ventricolo destro, che diminuisce di circa 20°. Dato il ruolo dell'angolo di elica nell'ottimizzare lo stress parietale, questa alterazione dell'architettura cardiaca potrebbe consentire il rapido decremento del carico di lavoro per il ventricolo destro.

Anche la distribuzione dei cardiomiociti nel contesto del setto interventricolare non rimane uguale a sé stessa. In epoca fetale lo strato di cardiomiociti che formano un angolo pari a zero con il piano di taglio, ovvero le fibre ad andamento circonferenziale viste in sezione sagittale, si trovano circa al 25% dello spessore settale, mentre a livello di parete libera le troviamo circa al 45%. Dopo la nascita

tuttavia, queste fibre “slittano” verso il subendocardio del ventricolo destro, fino a raggiungere, due settimane dopo la nascita, quella localizzazione al 45% dello spessore più simile ai cuori adulti. Di pari passo, come prevedibile aumenta anche il rapporto di cardiomiociti settali riferibili al ventricolo sinistro su quelli riferiti al ventricolo destro. Viceversa rispetto a quanto affermato per il ventricolo destro, si suppone che questo ispessimento della porzione sinistra del setto sia funzionale a consentire l'aumento del carico di lavoro del ventricolo sinistro.

Contrariamente a quanto accade per il ventricolo destro e per il setto, la parete libera del ventricolo sinistro non va incontro a significativi cambiamenti nell'ambito delle prime due settimane di vita extra-uterina.

Solo successivamente, nel passaggio all'età adulta, l'angolo di elica del subendocardio di questo ventricolo va incontro ad un aumento di circa 10°.

È interessante notare come anche l'angolo di elica del ventricolo destro tenda nel tempo ad incrementare, nonostante la sua iniziale diminuzione.

Questi cambiamenti possono essere raggiunti tramite proliferazione cardiomiocitaria, che può arrivare ad aumentare la popolazione cardiaca originaria anche del 28% nelle prime due settimane.³⁷

Zhang et al misurarono infatti l'espressione cellulare di Ki67, marker di proliferazione, uno, cinque e quattordici giorni dopo la nascita. Trovarono che questo aumentava tra il primo e il quinto giorno di vita per poi diminuire dal quinto al quattordicesimo. Non furono riscontrate differenze statisticamente significative tra ventricolo destro e sinistro. Anche il contenuto di collagene aumenta dalla nascita fino all'età adulta. Il collagene conferisce infatti forza tensile al muscolo cardiaco sottoposto ad incrementato carico di lavoro.

Anche l'indice di anisotropia (FA) subisce delle modificazioni dopo la nascita. Nei neonati, infatti, risulta più elevato sia rispetto ai feti che agli adulti. Il primo punto si può spiegare con il maggior contenuto d'acqua dei tessuti fetali.³⁸ I minori valori di FA mostrati invece dal miocardio adulto possono derivare dalla fisiologica ipertrofia cardiomiocitaria. In più, l'aumentare del contenuto di collagene nei cuori adulti può portare ad un'espansione degli spazi extracellulari, andando così ad abbassare ulteriormente l'indice di anisotropia.

1.6 ECOCARDIOGRAFIA CON METODICA *SPECKLE TRACKING*

L'ecocardiografia, soprattutto bidimensionale, ha un ruolo primario nella diagnosi e nella gestione del paziente con cardiopatia congenita. Tuttavia l'ecocardiografia convenzionale offre un approccio solamente limitato alla quantificazione della funzionalità ventricolare. La valutazione clinica e routinaria della funzionalità ventricolare è infatti rimasta saldamente ancorata alla valutazione visiva del movimento e dell'ispessimento parietale. Si tratta di una valutazione soggettiva, poco riproducibile, e soggetta a delle limitazioni intrinseche. L'occhio normale infatti non riesce né a visualizzare né a distinguere deformazioni regionali della parete cardiache se queste avvengono in un intervallo di tempo inferiore ai 90 millisecondi. Per queste ragioni, lo sviluppo di nuove tecniche ecocardiografiche è un punto cruciale per una per una più precisa e oggettiva quantificazione e valutazione qualitativa della funzionalità miocardica.³⁹

1.7 PRINCIPI GENERALI DELLO *SPECKLE TRACKING DEFORMATION IMAGING*

Lo *Speckle-Tracking* è una nuova metodica ecocardiografica semplice e non invasiva, che permette un'analisi obiettiva e quantitativa della contrattilità miocardica globale e regionale, indipendentemente dall'angolo di incidenza del fascio ultrasonoro e dai movimenti di traslazione cardiaca.⁴⁰

Questa nuova metodica si avvale della classica ecocardiografia bidimensionale *real time*. Tramite una scala di grigi, vengono infatti identificati dei markers acustici, gli "*speckles*", generati dall'interazione tra il fascio ultrasonoro e le fibre miocardiche.⁴¹ Ognuno di questi elementi misura tra i 20 e i 40 pixel e può essere seguito per un numero di frame consecutivi. Gli *speckle* si comportano quindi come i "*tag*" della risonanza magnetica dato che permettono di tracciare direttamente il movimento cardiaco.

Lo *speckle tracking* utilizza un *software* in grado di identificare *pattern* di *speckle* simili tra un frame e l'altro, in modo da seguire nel tempo lo spostamento di una data regione miocardica. I singoli *speckle* vengono poi valutati come parte di unità funzionali dette "*kernel*", che costituiscono delle impronte ultrasonografiche che

possono essere monitorate durante l'intero ciclo cardiaco. Il *kernel* con il pattern più simile a quello selezionato originariamente dall'operatore viene quindi ricercato e identificato dal software nei frame successivi. Il vettore che unisce due *kernel*, identifica lo spostamento, da un frame a quello successivo, della regione miocardica di interesse.⁴² Normalmente il programma si avvale di un sistema semi-automatico per tracciare i bordi della parete cardiaca.

Nonostante il pattern degli *speckle* sia relativamente stabile, nei diversi frame possono comunque esserci delle differenze, determinate dai movimenti di traslazione cardiaca e da piccoli cambiamenti nel pattern di riflessione degli ultrasuoni. Il peso di questi fattori dipende soprattutto dal numero di *frame* per secondo considerati. Il *frame rate* deve quindi essere adeguato (in genere tra i 60 e i 110 frame/sec) per ridurre la probabilità di errore durante il riconoscimento.^{43,44}

In ogni caso, questa metodica presenta un'alta risoluzione temporale e spaziale e una buona riproducibilità inter- e intra-operatore.⁴⁵

In accordo con le indicazioni provenienti dalla letteratura, è necessario campionare almeno 3 cicli cardiaci consecutivi e farne la media.³⁹

Attraverso l'analisi del moto di ogni *kernel*, il sistema, riesce a calcolare la deformazione (*strain*), il tasso di deformazione (*strain rate*) dei segmenti miocardici selezionati e la *torsion* del ventricolo sinistro.

In questo modo si può avere una buona valutazione della deformazione ventricolare attraverso i principali assi di movimento.

Durante la contrazione e il rilasciamento del muscolo cardiaco i segmenti miocardici si deformano infatti in tre direzioni preferenziali:

- Longitudinale: accorciamento-allungamento del ventricolo, per l'avvicinarsi e il distanziarsi del piano atrio-ventricolare all'apice cardiaco, rispettivamente in sistole e in diastole;
- Radiale: inspessimento-assottigliamento delle pareti ventricolari, rispettivamente in sistole e in diastole;
- Circonferenziale: movimento di avvicinamento e allontanamento di due punti su una circonferenza (che a sua volta si riduce e aumenta)

- Rotazione: spostamento in gradi di un punto lungo la circonferenza. La rotazione avviene con polarità diversa tra base e apice, di conseguenza il ventricolo sinistro durante la sistole subisce un fenomeno di strizzatura, dato dal fatto che l'anulus mitralico compie una contrazione antioraria mentre l'apice ne compie una oraria. Questo particolare movimento cardiaco è detto "twist".

Altre tecniche, come la valutazione del "*Mitral Anulus Peak Systolic Escursion*" (MAPSE) o del valore di picco sistolico calcolato con *Tissue Doppler Imaging* (TDI), possono stimare la funzione longitudinale sistolica di un'unica parete cardiaca. D'altro canto però queste metodiche non distinguono tra movimenti passivi e attivi, quindi rappresentano un'indice di displacement regionale o multi-segmentale e non una misura dell'attività della parete in termini di contrazione. Lo strain e lo strain rate, invece, sono in grado di discernere tra movimento passivo e contrazione attiva a livello regionale.⁴⁶

1.8 LO STRAIN

In ecocardiografia il termine strain è usato per descrivere un accorciamento, ispessimento o allungamento localizzato del miocardio come misura della funzione regionale del ventricolo sinistro.

Nel campo dell'ecocardiografia si utilizza un sistema di coordinate interno allineato con i tre assi cardiaci (longitudinale, circonferenziale e radiale) e si misura l'accorciamento a l'allungamento del miocardio nelle tre direzioni sopracitate durante il ciclo cardiaco, con l'inizio della sistole intesa come inizio del complesso QRS all'elettrocardiogramma come riferimento.

Se indichiamo con L_t la lunghezza di un segmento lungo una di queste direzioni ad un tempo t del ciclo cardiaco e con L_0 la sua lunghezza iniziale, lo strain monodimensionale ("Langangrian strain" o "strain convenzionale") è definito come:

$$\epsilon_t = (L_t - L_0)/L_0$$

Uno strain di segno positivo significa allungamento, mentre uno strain di segno negativo indica accorciamento. Il valore ricavato è da intendersi come percentuale.

Quindi potremmo calcolare:

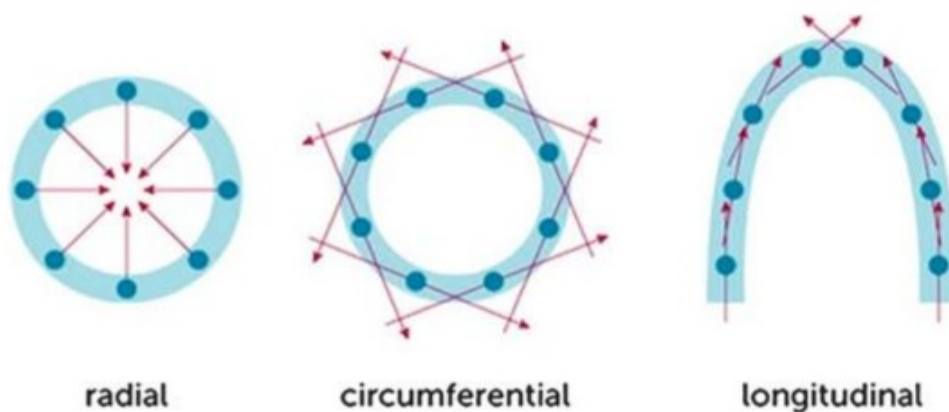


Figura 1.10.
Rappresentazione delle tre tipologie di strain

- Strain Longitudinale: rappresenta il movimento dalla base verso l'apice. La curva che lo rappresenta sarà negativa in sistole perché i kernels si spostano l'uno verso l'altro. Può essere calcolato a partire da diverse proiezioni quali 4-camere, 2-camere e asse lungo.
- Strain radiale: rappresenta l'ispessimento e l'assottigliamento miocardico. Questi valori daranno origine a curve positive in sistole. Viene calcolato a partire dagli assi corti basali e apicali.
- Strain circonferenziale: è definito come la variazione del raggio in asse corto, perpendicolare agli assi radiale e lungo. Durante la sistole darà luogo ad una curva negativa per la riduzione della distanza tra gli *speckle*.⁴⁷ Si calcola anch'esso a partire dagli assi corti basali e apicali.

La descrizione di questi tre tipi di deformazione permette una buona approssimazione del movimento cardiaco.

In un grafico riportante i valori di strain longitudinale potremmo identificare le varie fasi del ciclo cardiaco: in sistole vedremo la curva diventare sempre più negativa (curva S), fino a raggiungere un picco in corrispondenza della chiusura della valvola aortica. In diastole, invece la curva tornerà ai valori originali di inizio ciclo cardiaco, cioè circa a zero, in tre fasi: la fase di riempimento rapido (onda E), una fase di plateau (riempimento lento) e infine la sistole atriale (onda A).

È stato dimostrato che sia in soggetti sani che in pazienti con un'avanzata cardiomiopatia dilatativa, la funzione longitudinale contribuisce fino al 60% alla determinazione dello *stroke volume*.⁴⁸ La determinazione dello strain longitudinale è quindi diventata un parametro importantissimo nella definizione della funzionalità cardiaca,

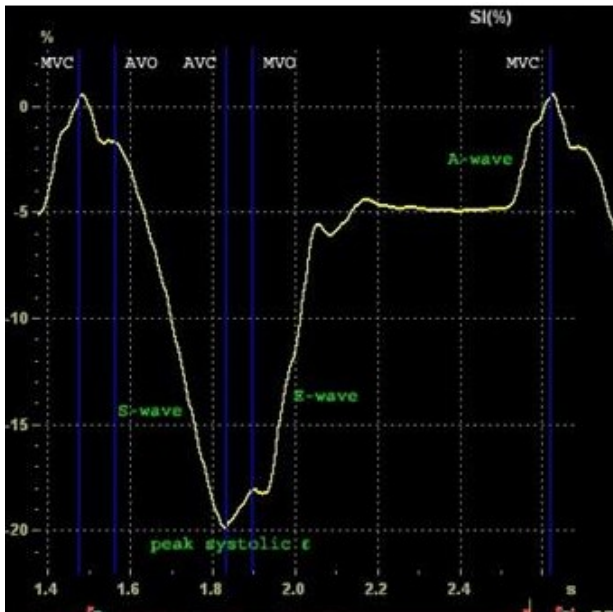


Figura 1.11. Grafico rap-presentante l'andamento dello strain longitudinale per una data ROI durante il ciclo cardiaco.

sia a livello diagnostico che prognostico.⁴⁹ Le applicazioni cliniche di questa metodica sono quindi vastissime: dalla diagnosi di infarto, amiloidosi e miocardite, alla valutazione delle cardiomiopatie, sino ad un'affidabile definizione prognostica per soggetti con scompenso cardiaco.⁵⁰

1.9 STRAIN RATE

Lo strain rate (SR) rappresenta la differenza tra la velocità di due punti posti ad una determinata distanza in un periodo di tempo, secondo la formula:

$$SR = \frac{V1 - V2}{d} = \frac{\Delta V}{d}$$

Sostituendo la velocità con la sua definizione di spazio su tempo (S/t) otteniamo:

$$SR = \frac{L1 - L0}{L0 * t} = \frac{\Delta L}{L0 * t}$$

dove V1 e V2 sono le velocità dei due punti e L0 e L1 sono le distanze che separano i due punti al tempo zero e al tempo t.

L'unità di misura dello strain rate è 1/s.

Lo stesso concetto può essere espresso identificando la posizione del punto analizzato in un piano cartesiano:

$$\frac{\Delta L}{L0} = \frac{(y - y0) - (x - x0)}{(y0 - x0)}$$

dove y_0 , x_0 , y ed x sono rispettivamente le posizioni dei due punti rispetto all'asse analizzato, prima e dopo la deformazione.

Dividendo entrambi i lati dell'equazione per Δt , l'intervallo di tempo fra le due acquisizioni, si ottiene:

$$SR = \frac{\frac{(y - y_0)}{\Delta t} - \frac{(x - x_0)}{\Delta t}}{y_0 - x_0} = \frac{V1 - V2}{D(x, y)}$$

dove $V1$ e $V2$ sono le velocità misurate in due punti preselezionati (x , y) lungo un asse dell'immagine, mentre $D(x,y)$ è la distanza tra questi due punti. In altre parole lo SR può essere espresso come la differenza di velocità alle estremità di un oggetto di lunghezza iniziale L_0 , ciò altro non è che il gradiente spaziale di velocità. Possiamo notare infine come lo SR (1/s) sia la derivata spaziale della velocità tissutale (mm/s), mentre lo strain (%) sia l'integrale temporale dello SR e quindi come tutti questi tre parametri siano matematicamente collegati tra loro.

In un singolo ciclo cardiaco la curva le strain rate mostra quindi tre picchi: il primo nel primo terzo della sistole (S'), il secondo nel primo terzo della diastole (E') e l'ultimo nell'ultimo terzo della diastole (A'). Considerando lo strain longitudinale e circonferenziale avremmo quindi S' avrà un valore negativo (poiché durante la sistole il miocardio si accorcia attivamente), mentre E' e A' avranno valori positivi (dal momento che rappresentano lo stretch diastolico). Di conseguenza, valutando la funzione radiale si ritrova invece che S' è positivo, mentre E' e A' sono negativi.

1.10 TWISTING, UNTWISTING E TORSION

La contrazione e il rilasciamento del ventricolo sinistro causano un movimento rispettivamente di twisting e untwisting dovuto all'arrangiamento elicoidale delle fibre subendocardiche e subepicardiche. Durante la sistole apice e base ruotano in direzioni opposte attorno all'asse lungo del ventricolo causando una sorta di "strizzamento" (*wringing effect*).⁵¹ In particolare, considerando le direzioni di movimento dall'apice, possiamo dire che nella fase di contrazione isovolumetrica sia la base che l'apice ruotano in senso antiorario, mentre durante la fase di eiezione la base ruota in senso orario nonostante l'apice continui a ruotare in senso antiorario.⁵² Si definisce *twisting* la differenza tra la rotazione di apice e base del ventricolo sini-

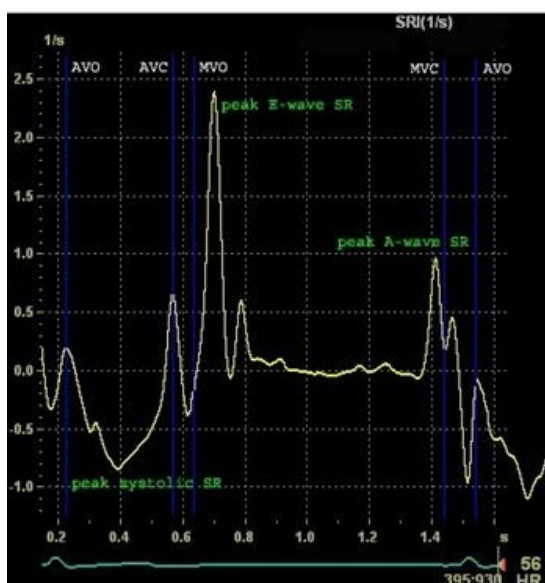


Figura 1.12. Grafico rappresentante l'andamento dello strain rate di parete durante il ciclo cardiaco.

stro durante l'eiezione. Entrambi questi parametri si misurano in gradi. L'importanza a livello biomeccanico del *twisting* ventricolare consiste nell'equilibrare l'accorciamento dei sarcomeri, che avviene in tutte le direzioni durante l'eiezione, in questo infatti modo dovrebbe ridursi lo stress tra le fibre miocardiche.⁵³ Con un accorciamento delle fibre cardiache di un semplice 15% si ottiene infatti una diminuzione del 60% del volume ventricolare.

La *torsion* del ventricolo sinistro è invece il valore di *twisting* sistolico normalizzato per la lunghezza del ventricolo in l'asse lungo. Le fibre epicardiche hanno un braccio

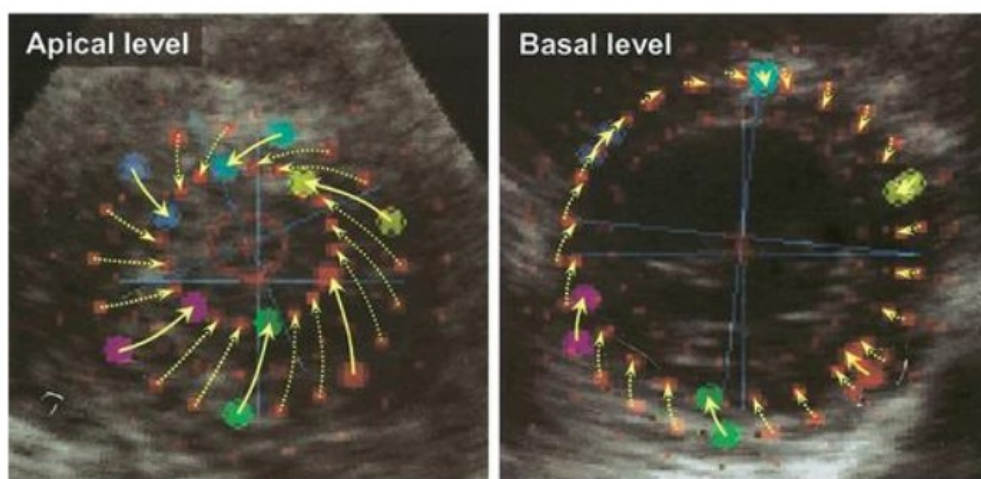


Figura 1.13. Rotazione del ventricolo sinistro durante la sistole, visto con speckle tracking imaging. Si può notare come a livello apicale la rotazione avvenga in senso antiorario, mentre alla base in senso orario; questo gradiente crea una sorta di strizzatura del ventricolo sinistro.

di leva più lungo e quindi determinano un maggior movimento rotazionale.⁵⁴ Questa è la ragione del perché durante l'eiezione la *torsion* abbia un andamento netto antiorario. La *torsion* dell'apice, infatti è maggiore di quella dei segmenti medi, mentre quella base è minima. L'ampiezza del *twist* dipende dall'architettura delle fibre, dato che l'angolazione di queste varia linearmente dall'endocardio all'epicardio, dalla geometria ventricolare, e dalla compressibilità e contrattilità del miocardio. Il modello di cilindro compressibile, impiegato per studiare la *torsion*, prevede un aumento del *twisting* per ogni aumento di compressibilità e spessore di parete, e una sua diminuzione per ogni aumento di volume della cavità ventricolare. Il *peak twist*, infatti, raddoppia (da circa 0.02 rad/cm a 0.04 rad/cm) al raddoppiare della compressibilità ventricolare o al variare dell'angolo totale sotteso dalle fibre endocardiche-epicardiche da $-90^{\circ}/90^{\circ}$ a $-60^{\circ}/60^{\circ}$.¹⁷

Il riavvolgimento, ovvero *untwisting*, si verifica per la maggior parte durante la fase di rilasciamento isovolumetrico, prima dell'apertura della valvola mitrale. In questa fase le fibre subepicardiche rilasciandosi si riavvolgono su se stesse tornando alla posizione originaria. Ciò fa sì che venga esercitata una forza di trazione a livello endocardico. Si verifica pertanto un meccanismo a molla che determina una pressione trasmurale negativa; questa a sua volta determina un gradiente atrioventricolare che porta all'apertura della valvola mitralica e al riempimento ventricolare precoce.

Varie tecniche sono state utilizzate per studiare questi parametri: impianto di marker radiopachi, angiografia, sonomicrometria e soprattutto la risonanza magnetica cardiaca, che è attualmente il *gold standard*. Il recente sviluppo dello *speckle tracking* imaging bidimensionale ha permesso di studiare il movimento cardiaco *frame by frame* attraverso il *tracking* degli *speckle* miocardici con un buona riproducibilità. Esso viene quindi a configurarsi come una valida alternativa alla RMN, avendo come vantaggi i costi relativamente bassi, la grande disponibilità, la semplicità dell'acquisizione delle immagini e il minor tempo per l'elaborazione.⁵⁵

L'importanza di questa nuova tecnica nella quantificazione della *torsion* ventricolare risiede nel suo possibile impatto clinico. La misurazione del picco di *twist*, del tempo per raggiungere il picco di *twist* (*time to peak twist*) la velocità di *twisting* e di *untwisting* e il tempo di picco per l'*untwisting*, possono dare delle informazioni che vanno

al di là della tradizionale valutazione della funzionalità del ventricolo sinistro.⁵⁰

Il *twisting* ventricolare può infatti essere alterato dal rimodellamento cardiaco che segue ad un generico danno, dato che il ri-arrangiamento delle fibre e la sintesi di matrice extracellulare possono variare la capacità miocardica di sviluppare energia potenziale durante la sistole. Anche le alterazioni della perfusione coronarica e le aritmie possono quindi andare ad alterare la torsion ventricolare.

1.11 ACQUISIZIONE DELLE IMMAGINI E POST-PROCESSING

1.11.1 Acquisizione delle immagini

L'analisi della funzionalità miocardica operata con la tecnica dello *speckle tracking* si avvale di immagini ecocardiografiche 2D in scala di grigi. Al momento dell'acquisizione, bisogna curarsi di ottenere immagini apicali e in asse corto con tagli appropriati, in modo da permettere un tracking più affidabile del bordo endocardico. Le immagini si ottengono facendo trattenere il respiro al paziente per ridurre al minimo l'influenza dei movimenti respiratori. È inoltre necessaria una stabile registrazione elettrocardiografica.

A differenza dello strain calcolato tramite utilizzo del Doppler, lo *speckle tracking* non è influenzato dall'angolo di incidenza del fascio ultrasonoro; mantenendo la validità dell'analisi segmentaria e globale anche quando la geometria del ventricolo sinistro è alterata o quando anomalie o deformità impediscono un allineamento ideale della parete rispetto al trasduttore.

Un'importante elemento da considerare è il frame rate (fotogrammi per secondo <FPS>). Tale valore dipende dalle caratteristiche della macchina, della sonda e del setting della stessa. In generale, per ecografi di buona qualità il numero di FPS è compreso tra 40 e 100.⁴⁴ Tale numero si riduce all'aumentare della profondità e della larghezza dell'immagine. Sui principali ecografi è inoltre possibile modificare il setting dell'immagine (opzione Ris-Vel o Frame Rate). In questi casi l'aumento del frame rate coincide con la riduzione della risoluzione laterale e viceversa. Per tali motivi è bene ricordare che è fondamentale per combinare un'adeguata risoluzione temporale con un'accettabile risoluzione laterale e per permettere un adeguato tracking frame-by-frame della regione di interesse. Un frame rate si può considerare

adeguato se permette di incorporare almeno 20-25 fotogrammi per ciclo cardiaco. Frame rate troppo elevati possono infatti portare ad una riduzione della risoluzione spaziale ed esitare di conseguenza in un tracking delle ROI meno ottimale. I bassi frame rate, viceversa, aumentano la risoluzione spaziale, ma possono esitare in un tracking insufficiente per il tempo troppo elevato che intercorre tra i due frame (un po' come accade quando si scatta una fotografia in modalità "notte")⁵⁶. Pertanto, nei bambini tale valore deve essere necessariamente più alto rispetto agli adulti. Fortunatamente, la frequenza cardiaca è inversamente proporzionale alle dimensioni del cuore, pertanto, a parità di sonda, una riduzione di profondità e di larghezza generalmente permette un proporzionale aumento del frame rate.

A tal proposito, tuttavia, non va trascurato il ruolo che ha la scelta della sonda al fine di avere immagini con caratteristiche ideali per l'analisi dei dati mediante *speckle tracking*: la sonda pediatrica lavora su frequenze maggiori (5-9 MHz) e permette una buona qualità di immagine delle strutture più superficiali per la superficializzazione del punto focale, tuttavia nell'acquisizione di una proiezione apicale completa di atri il frame rate risulta essere inferiore rispetto alla stessa immagine acquisita con una sonda da 2-5 MHz. D'altra parte, quest'ultima soffre di "sotto fuoco" per i segmenti apicali con un alto rischio di artefatti durante il tracking. Per tali motivi la scelta della sonda va vincolata al tipo di struttura che si vuole analizzare, la profondità a cui essa si trova e i valori minimi di risoluzione spaziale e temporali necessari.

La qualità delle immagini è poi un requisito fondamentale per l'analisi *speckle tracking*: la visualizzazione della parete miocardica deve essere ottimale e il tessuto miocardico deve essere chiaramente distinguibile dai tessuti circostanti.

Le proiezioni necessarie a calcolare lo strain longitudinale sono i tagli 3 camere 4-camere e la 2-camere apicali; per lo strain radiale, circonferenziale e per lo studio di twist e torsion sono invece necessari un asse corto parasternale a tre diverse altezze: base, impianto dei muscoli papillari e apice. Per convenzione il piano basale è identificato dalla presenza delle estremità dei foglietti mitralici, mentre quello apicale è il piano prossimale al punto in cui la cavità del ventricolo sinistro sparisce a fine sistole.⁴⁵

1.11.2 Il Post-processing

L'analisi delle immagini così ottenute viene generalmente fatta off-line, grazie all'utilizzo di software disponibili su workstation dedicate. Recentemente l'analisi dello strain longitudinale è disponibile in modalità semi-automatica per un utilizzo real-time sull'ecografo. Attraverso un approccio "point and click" si traccia manualmente il bordo interno del ventricolo, ovvero la superficie endocardica del segmento che si vuole analizzare. Il sistema genera allora automaticamente una traccia della superficie epicardica, creando quindi una region of interest (ROI). A questo punto può essere necessario aggiustare manualmente la ROI in termini di forma e ampiezza. Una volta ben definita la regione di interesse, il software la divide automaticamente in 6 segmenti e dà un giudizio sulla qualità dell'immagine, indicata come accettabile o meno, di modo che sia possibile procedere ad un eventuale aggiustamento di uno o più punti di ancoraggio. I segmenti valutati come inadeguati, se non correggibili mediante re-tracing, possono essere esclusi dalla valutazione. Il software fornisce poi una curva di strain per ogni segmento preso in esame e da queste curve l'operatore può ottenere lo strain globale (ovvero la media dei valori ricavati dalla deformazione dei sei segmenti) o regionale, il peak systolic strain e il time to peak systolic strain. Se vengono ottenute immagini da tutte e tre le proiezioni apicali (4-camere, 2 camere, 3-camere) il software fornisce una rappresentazione del ventricolo sinistro a 17 segmenti, il cosiddetto bull's eye. A partire dalle proiezioni asse corto basale e apicali possono invece essere calcolate rotation e rotation rate del ventricolo sinistro, parametri necessari per determinare la torsion.

Per quanto riguarda il ventricolo destro, a causa dello spessore assai ridotto del ventricolo stesso possono essere valutati solo i parametri derivanti da proiezioni longitudinali.

1.12 VALIDAZIONE DELLA TECNICA

Prima dell'introduzione di questa nuova metodica, solo la risonanza magnetica cardiaca era in grado di offrire un'analisi accurata delle deformazioni parietali che caratterizzano la dinamica cardiaca. La risonanza rappresenta infatti il gold standard in questo campo di studio, ma si tratta comunque di un approccio poco utilizzabile

nella routine clinica. Questa tecnica infatti è generalmente poco disponibile, presenta alti costi e l'acquisizione delle immagini è complessa, come anche la loro analisi.

Lo *Speckle tracking* (STE) si propone quindi come una modalità molto più immediata: si tratta infatti di un approccio poco costoso, veloce e non invasivo. È però facile comprendere come questa metodica debba necessariamente rapportarsi sia alla risonanza che alle tecniche pre-esistenti per essere considerata attendibile.

Amundsen et al hanno comparato lo STE con la RMN in uno studio clinico su soggetti sani e con pregresso infarto miocardico. In entrambi i casi lo STE si è dimostrato una tecnica accurata rispetto alla RMN ($p < 0,001$).⁵⁷

Korinek et al hanno invece testato *in silico* il metodo STE su blocchi di gelatina ciclicamente compressi a diverse frequenze, comparando poi i risultati con la sonomicrometria. Il risultati ottenuti con metodica STE correlavano in maniera eccellente con i dati forniti dalla sonomicrometria ($r = 0,99$ e $p < 0,001$) e la riproducibilità inter e intra-individuale si è dimostrata buona.⁵⁸ Lo stesso gruppo di ricerca ha prodotto anche uno studio in vivo, impiantando dei cristalli rilevabili alla sonomicrometria nella parete anteroseptale e posteriore di sedici cuori suini sottoposti sperimentalmente ad ischemia. L'indagine di regressione mostrò ancora una volta una buona correlazione tra le due metodiche, con una tendenza dello STE a fornire dati assoluti di valore minore. Ne conclusero che i dati relativi a bassi strain e strain rate andassero interpretati con cautela.⁵⁹

Fondamentale è stato poi lo studio condotto da Perk et al.⁴⁰ In questo caso si è dimostrato che i valori di strain ottenuti tramite indagine non Doppler con tracking automatico rappresentano un modo semplice e rapido per la stima della frazione d'eiezione. Sono stati infatti studiati 46 pazienti per ognuno dei quali la frazione di eiezione è stata determinata in 3 modi: visivamente da parte di un ecocardiografista esperto, con metodo Simpson e con calcolo dello strain tramite *Speckle tracking* con traccia automatica. Il risultato è stato una forte correlazione tra i tre metodi.⁴⁰

Altri studi più recenti hanno confermato una buona correlazione tra strain globale longitudinale e frazione d'eiezione calcolata con metodo Simpson ($p < 0,001$). In particolare, la tecnica STE si è dimostrata molto utile in presenza di pazienti con una scarsa finestra acustica che rendeva il metodo Simpson poco applicabile.⁶⁰

Per quanto riguarda lo strain radiale e circonferenziale, Becker et al hanno comparato valori di volontari senza patologia cardiaca e pazienti infartuati con metodica STE con i risultati dati dalla risonanza magnetica. Trovarono un'eccellente correlazione tra le due tecniche e attestarono una buona riproducibilità inter e intra-operatore⁶¹. Anche lo studio della torsion ventricolare ha dimostrato di essere adeguatamente riprodotto dallo *Speckle tracking*, quando confrontato con la risonanza magnetica cardiaca⁵⁵.

Oltre ai sopracitati, diversi gruppi di lavoro hanno riprodotto i medesimi risultati. Lo *Speckle tracking* è una tecnica riproducibile e sensibile⁶². Ulteriori approfondimenti sui possibili impieghi clinici sono comunque necessari.

1.13 LIMITAZIONI

Come qualsiasi strumento di indagine, anche lo *Speckle tracking* presenta alcune limitazioni.

La prima tra tutte è la qualità dell'immagine, che deve essere buona. Un altro elemento cruciale sono i frame rate di acquisizione: frame rates troppo bassi (<40) risultano in un tracking di scarsa qualità, mentre frame rates troppo alti (>100) danno un livello troppo alto di rumore sottostante.

Anche le differenze negli algoritmi utilizzati dai software possono costituire un limite. Non è, infatti, tuttora chiaro come comparare e confrontare valori che derivano da diversi scanner o diverse versioni del software.⁶³ Se a livello di strain longitudinale le differenze tra venditori presentano un'accettabile variabilità inter-macchina, questo discorso non può essere ignorato per gli strain circonferenziali e radiali.^{64,65} Una metanalisi di recente pubblicazione in ambito pediatrico ha evidenziato come diversi fornitori comportavano differenze significative nella valutazione dello strain radiale.⁶⁶ Yingchoncharoen et al, tuttavia, in una metanalisi sui valori dello strain del ventricolo sinistro tra gli adulti, hanno rifiutato il ruolo del venditore come un fattore indipendente che influenzasse le differenze in strain riportate dai vari studi. In ogni caso, l'ampia variabilità tra i valori di strain circonferenziale e radiale potrebbe dipendere da differenze nella risoluzione, sia spaziale che temporale. In asse corto infatti è presente un minor numero di speckle e il bordo epicardico è più difficile da

tracciare per via di artefatti causati dalla respirazione. Dato che comunque lo stesso grado di variabilità si applica a tutti gli speckle, saranno affetti da una più ampia variabilità soprattutto i valori più alti di deformazione, come accade infatti per lo strain radiale.⁶⁴

Recentemente, la Società Americana di Ecocardiografia (ASE) ha promosso uno studio volto ad uniformare i valori di strain longitudinale, individuando ed applicando un apposito fattore di correzione degli algoritmi che sottendono al calcolo dello strain longitudinale per i singoli software, al fine di rendere tale parametro indipendente dall'ecografo con il quale è stato ottenuto. Pertanto, per le versioni di software installate dopo il 2016, i valori di strain longitudinale sono considerati normali quando <-19% indipendentemente dal software utilizzato.

Alcuni vendors di recente hanno applicato l'analisi *speckle tracking* anche alle immagini 3D^{47,67}. Tale metodica non è soltanto utile per la scomposizione della deformazione nei tre piani dello spazio studiabili in 2D (longitudinale, radiale e circonferenziale), ma introduce un concetto nuovo che tuttavia è alla base della meccanica dei solidi: l'incomprimibilità del miocardio. In altre parole, la deformazione può di certo essere scomposta nei tre piani dello spazio, ma la risultante deve rispettare il principio di conservazione della massa miocardica e pertanto del suo volume. Ciò che lega deformazione e massa miocardica è l'area strain, che analizza non più lo spostamento di pixel ma le modifiche della geometria dei voxel.

Al momento, tale tecnologia è limitata dal basso frame rate, dalla necessità di acquisizione multi-beat, e dalla qualità dell'immagine altamente dipendente dalla qualità della finestra acustica.

1.14 VALORI NORMALI IN ETA' PEDIATRICA

In cardiologia pediatrica la quantificazione della funzione miocardica è solitamente basata sull'interpretazione visiva dell'escursione endocardica radiale ricavata dalle immagini ultrasonografiche in 2D o su indici ecocardiografici convenzionali in M-mode di ispessimento/assottigliamento radiale o di spostamento dell'anello atrioventricolare in asse lungo. Non si tratta però di una stima quantitativa e i suoi risultati sono operatore dipendenti⁶⁸. Inoltre, i parametri utilizzati nella routine

giornaliera del cardiologo pediatra sono basati su assunzioni geometriche che non possono ritenersi validi in caso di cardiopatie complesse e sono quindi da intendersi come indicatori inaffidabili. La valutazione della funzionalità del ventricolo destro è poi ancora più complicata per via della geometria più complessa, della posizione retrosternale e dell'eterogeneità morfologica e funzionale.

Per tutti questi motivi, l'utilizzo di nuove tecniche ecocardiografiche risulta fondamentale. La valutazione di strain e strain rate si è infatti dimostrata molto utile nel management clinico e nella pianificazione dell'intervento chirurgico nei pazienti con cardiopatia congenita. Questa tecnica, infatti, è in grado di individuare disfunzioni subcliniche molto precocemente rispetto alla maggior parte dei parametri ecocardiografici convenzionali.

L'impiego di questa tecnica in ambito clinico richiede però una definizione chiara dei valori di riferimento. Jashari et al hanno recentemente condotto la prima metanalisi tra gli studi indicanti i range di normalità per strain e strain rate in età pediatrica.⁶⁶ In figura 1.14 sono riportati i valori ritenuti nella norma dedotti da studi che hanno utilizzato un ecografo GE. In questo studio si è utilizzata la classificazione per età già proposta da Marcus et al. e Klitsie et al.^{69,70} Le età pediatriche sono state distinte in 6 classi: neonati, lattanti, 1-4 anni, 5-9 anni, 10-14 e 15-19. Dai risultati della metanalisi si è notato come tra i neonati non ci sia una differenza tra i valori di strain longitudinale a livello di segmento basale, medio e apicale della parete libera e del setto atrioventricolare. Con la crescita però, e in particolare a partire dal range di età 5-9 anni, emergono differenze tali da configurare un vero e proprio gradiente di deformazione dalla base all'apice. Tuttavia, uno degli studi presi in esame ha anche riscontrato una diminuzione di questo gradiente nei neonati.³⁵

	LS (95 % CI)	LSRs (95 % CI)	CS (95 % CI)	CSRs (95 % CI)	RS (95 % CI)
Neonates	-21.0 (-17.3 to -24.7)	-2.1 (-1.5 to -2.6)	-19.7 (-18.1 to -21.3)		29.4 (24.9 to 33.9)
0-1 y	-19.3 (-17.3 to -21.2)		-20.1 (-17.1 to -23.1)		46.3 (35.0 to 57.5)
1-4 y	-21.7 (-19.7 to -23.8)		-19.8 (-16.2 to -23.3)	-1.73 (-1.62 to -1.83)	53.3 (50.0 to 56.7)
5-9 y	-22.7 (-21.5 to -23.9)	-1.6 (-1.5 to -1.8)	-22.9 (-22.5 to -23.4)	-1.66 (-1.55 to -1.77)	48.6 (39.4 to 57.8)
10-14 y	-20.0 (-19.2 to -20.9)	-1.2 (-1.0 to -1.4)	-21.3 (-19.6 to -23.1)	-1.51 (-1.39 to -1.62)	52.4 (47.4 to 57.3)
15-19 y	-19.8 (-18.5 to -21.0)	-1.2 (-1.0 to -1.4)	-19.9 (-16.8 to -23.0)	-1.06 (-0.97 to -1.14)	47.6 (37.0 to 58.1)
Overall	-20.6 (-20.1 to -21.2)	-1.4 (-1.3 to -1.5)	-22.5 (-22.0 to -22.9)	-1.42 (-1.37 to -1.47)	46.8 (44.6 to 48.9)

Figura 1.14. Valori di riferimento per la popolazione pediatrica di strain e strain rate.

L'età si è configurata come un fattore che influenza fortemente lo strain rate longitudinale. Ciò nonostante, gli strain longitudinali, circonferenziali e radiali, non si sono dimostrati età-dipendenti ad un livello statisticamente significativo, cosa che può anche dipendere dai diversi intervalli d'età utilizzati dai vari gruppi di lavoro. Gli studi esaminati tuttavia non si sono dimostrati del tutto concordi.

I dati raccolti da Lorch et al su 284 pazienti sani compresi tra 0-18 anni hanno mostrato una correlazione significativa tra strain rate longitudinale ed età. Lo strain rate infatti assume valori più elevati nella prima infanzia e diminuisce poi in modo significativo fino all'età di 10 anni.⁷¹ In questo senso, questo parametro sembra riflettere la maturazione della contrattilità ventricolare⁷², che è più elevata nei neonati ma diminuisce all'aumentare dello stress parietale che si verifica con l'età.^{73,74}

Anche i valori di SR diastolico precoce hanno lo stesso andamento. Sono infatti più alti durante l'infanzia, ma tendono poi a diminuire fino a 10 anni d'età per rimanere poi sostanzialmente invariati. Quest'ultima osservazione si spiega a partire dai progressivi cambiamenti nel riempimento ventricolare diastolico che iniziano già nella vita fetale. Nel cuore primitivo embrionale il riempimento ventricolare si verifica principalmente in telediastole, grazie alla contrazione atriale, e tende a spostarsi via via verso la protodiastole man mano che lo spessore del miocardio compatto aumenta.⁷⁵ Pare che il medesimo meccanismo non si esaurisca con la vita fetale ma continui anche dopo la nascita fino ad esaurirsi quando il miocardio compatto non è più in grado di aumentare le sue dimensioni tramite iperplasia.⁷⁶

Risultati in accordo con i suddetti sono stati ottenuti anche da Zhang et al che ha studiato con il 3D-STE 256 soggetti sani di età compresa tra 0-18 anni.⁷⁷ In questo studio, tuttavia, si è anche evidenziata una correlazione solo modesta tra strain longitudinale ed età.

Diversi sono invece i risultati dello studio condotto da Marcus et al, condotto sia su pazienti sani in età pediatrica che adulti. Per ogni soggetto è stato determinato lo strain longitudinale, radiale, circonferenziale. L'analisi dei dati mostra una relazione statisticamente significativa tra i valori di strain sistolico in tutte le direzioni. In particolare, le estremità dello spettro di età mostrano valori di deformazione bassi, mentre gli adolescenti raggiungono valori di strain superiori.⁷⁸

La funzionalità del cuore umano è stata rapportata alla crescita in diversi studi ecocardiografici e di ergometria, arrivando a definire un aumento della contrattilità durante la pubertà.^{79,80} Durante lo sviluppo puberale infatti lo spessore di parete in sistole aumenta in maniera sproporzionata se confrontata all'aumento di post-carico. Ciò fa pensare che si stia costituendo una sorta di "riserva cardiaca" per far fronte all'aumento di capacità di lavoro funzionale. Il rapporto tra età e massa cardiaca è stato riportato in soggetti normotesi e in buona salute.⁸¹ La massa ventricolare infatti cresce molto durante l'adolescenza, ma successivamente decresce attestandosi ad un 80% di quella puberale nonostante l'aumento della pressione cardiaca e l'esercizio fisico. I fattori biologici che influenzano questo aumento improvviso della contrattilità e della massa cardiaca non sono ancora stati individuati nello specifico; si ritiene comunque che la genetica, i fattori ormonali e la maggior richiesta di ossigeno da parte dell'aumentata massa corporea possano avere un ruolo.

La revisione dei lavori scientifici sullo *Speckle tracking* nei cuori sani ha poi individuato un'ampia variabilità nei valori di strain di neonati e lattanti, cosa che può essere spiegata dalla maggiore sensibilità del miocardio ai cambiamenti di postcarico che avvengono dopo la nascita. Valori più bassi e appunto ampiamente variabili si spiegano anche in base alle caratteristiche istologiche e fisiologiche del miocardio neonatale: si tratta di un tessuto ancora immaturo, con meno mitocondri, meno proteine contrattili e un più alto rapporto tra collagene 1 e collagene 3 rispetto all'adulto.⁸² Valori adulti di tutti questi parametri non saranno raggiunti che durante l'adolescenza. In più, l'età neonatale è caratterizzata da cambiamenti dinamici in multipli sistemi ormonali e gradualmente il metabolismo dei cardiomiociti passa dai carboidrati fetali all'ossidazione degli acidi grassi.

Un'altra osservazione piuttosto interessante permessa dalla metanalisi condotta da Jashari et al riguarda la correlazione di strain longitudinale con le dimensioni del ventricolo sinistro in diastole. Queste sembrano infatti correlare inversamente con lo strain longitudinale, suggerendo la possibilità di correggere le misurazioni con i cambiamenti del volume ventricolare. In ogni caso, è emersa una relazione positiva tra volume di fine sistole del ventricolo sinistro e strain circonferenziale globale⁷⁷ e tra gli z-score di volume e lo strain longitudinale.⁷¹

	Gruppi di età		
	1-3 anni	4-9 anni	10-19 anni
Rotation (°)			
Basale	-5.35 ± 2.57	-5.01 ± 2.96	-3.34 ± 2.73
Apicale	5.05 ± 3.82	4.40 ± 3.40	6.12 ± 4.56
Twist (°)	8.49 ± 5.34	7.05 ± 4.35	7.74 ± 4.01
Torsion (°/cm)	1.78 ± 1.10	1.20 ± 0.80	1.06 ± 0.56

Figura 1.15. Valori riassuntivi di normalità nella popolazione pediatrica di Rotation, Twisting e Torsion.

Nella tabella 1.15 sono riportati i valori di torsion ricavati dallo studio di Kaku et al con metodica 3D-STE. Anche la torsion del ventricolo sinistro dipende dall'età.⁵¹ Come precedentemente accennato, nella popolazione adulta è ormai chiara la presenza di movimenti di rotazione in direzioni opposte tra base e apice (la prima in senso orario e il secondo in senso antiorario, se visto dall'apice). Nei bambini invece entrambi i segmenti ruotano nella stessa direzione (senso antiorario se visto dall'apice) ma con intensità diverse, creando quindi un ritardo di deformazione maggiore che nell'adulto che contribuisce in modo significativo alla produzione del twist pediatrico.

Notomi et al. hanno studiato la torsion a partire dagli strain circolari di base e apice concludendo che il twisting apicale rimane costante nel corso dell'infanzia, mentre il twisting basale passa da antiorario alla nascita, a neutro nella prima infanzia, fino a raggiungere la rotazione oraria durante l'adolescenza.⁸³ Il senso di questi cambiamenti età correlati potrebbe ritrovarsi in cambiamenti strutturali del miocardio in corso di maturazione oppure nella lunghezza sempre maggiore delle fibre epicardiche. Secondo Wulfsohn et al durante la crescita le fibre cardiache connettono punti basali e apicali sempre più distanti tra loro sul piano circolare.⁸⁴ In questo modo la rotazione della base diventa via via più prominente, lasciando pensare che in qualche modo la maturità apicale venga invece raggiunta prima.

In ogni caso, anche la rotazione apicale aumenta con l'età, per passare da 4° durante l'infanzia a 12° durante l'età avanzata, nello studio condotto con 3D-STE da Kaku et al.⁸⁵ Questo dato ha trovato una spiegazione nello studio condotto da Lumen et al.⁸⁶ Questo gruppo di lavoro ha riscontrato una diminuzione

dell'accorciamento circonferenziale delle fibre nelle persone anziane.⁸⁶ Sembra che l'endocardio sia maggiormente suscettibile a fenomeni di ischemia subclinica e di fibrosi; in questo modo, l'epicardio troverebbe una minor opposizione da parte del layer interno incrementando il suo twisting. Addirittura, pare che nei primi secondi di ischemia la rotazione apicale aumenti perché primariamente sono coinvolte soltanto le fibre epicardiche.⁸⁷

1.15 APPLICAZIONI CLINICHE IN PEDIATRIA

Nel paziente pediatrico strain e strain rate sono meno utilizzate che nell'adulto, probabilmente a causa della maggior interesse verso l'anatomia del cardiologo pediatrico. Questi strumenti tuttavia si sono rivelati molto utili sia nella gestione clinica che nel planning chirurgico del paziente con cardiopatia congenita. Di seguito saranno riportati esempi di utilizzo dello *Speckle tracking* nelle cardiopatie congenite più comuni.

1.15.1 Origine anomala della coronaria sinistra dall'arteria polmonare

L'utilità di strain e strain rate sono state dimostrate da uno studio di Mertens et al che ha riportato un graduale miglioramento della funzionalità radiale e longitudinale durante un follow-up di 10 mesi dopo reimpianto della coronaria anomala.⁸⁸ Di salvo et al hanno invece mostrato che, nonostante la normalizzazione della funzione radiale, la disfunzione longitudinale persisteva anche dopo un lungo periodo di follow-up, come se la fibroelastosi subendocardica associata a questa condizione avesse provocato un danno irreversibile ai cardiomiociti.⁸⁹

1.15.2 Coartazione aortica

A seguito dell'intervento chirurgico di decoartazione il ventricolo sinistro migliora la sua funzione sistolica sino a raggiungere valori di frazione di eiezione superiori al normale. In questi pazienti però non si tratta di una frazione d'eiezione realmente aumentata. Come precedentemente dimostrato, la frazione di eiezione non è un parametro adatto per stimare la contrattilità ventricolare, sono quindi necessari nuovi indici. Nei pazienti con intervento andato a buon esito e che non hanno sviluppato

ipertensione, lo strain longitudinale risulta significativamente ridotto se comparato con valori normali in correlazione con l'età a cui si è stati sottoposti ad intervento e il grado di restringimento residuo.⁹⁰ Sembra quindi che nonostante un intervento precoce andato a buon fine, l'innata anomalia della struttura non possa essere cambiata.

1.15.3 Difetti del setto interatriale

I difetti del setto interatriale sono una cardiopatia comune e benigna. Nei pazienti giovani con un difetto di medie dimensioni e senza ipertensione polmonare, la funzionalità sistolica segmentale e globale sembra essere normale. Tuttavia, qualora si valuti la sola funzione atriale, si può scoprire una diminuzione precoce della fase di reservoir di entrambi gli atri con un ridotto picco sistolico di strain nell'atrio sinistro.⁹¹

Alla lunga, questo tipo di difetto comporta rimodellamento elettrico atriale, dilatazione del ventricolo destro e ipertensione polmonare. Il trattamento ideale quindi non dovrebbe soltanto rimuovere lo shunt, ma anche revertire le anomalie elettriche e geometriche createsi.⁹²

Dopo l'intervento chirurgico, tuttavia, la funzionalità atriale rimane compromessa a seguito della cardioplegia e della pericardiotomia. Negli ultimi anni quindi la chiusura percutanea del difetto è diventata sempre più diffusa, al punto che è stata dimostrata la sua superiorità sulla chirurgia in termini di deformazione del setto interventricolare misurata tramite strain imaging.⁹³ In ogni caso, nemmeno con l'approccio percutaneo il quadro torna perfettamente normale: pare infatti che si stabilisca un lieve deficit di funzionalità a livello del segmento basale del setto, come se l'apposizione di un elemento non deformabile a livello atriale fosse in grado di condizionare l'accorciamento del setto basale.⁹³ Vari studi hanno confermato la superiorità dell'approccio percutaneo anche se il picco di strain sistolico sia dell'atrio destro che del sinistro restavano sotto la norma.⁹⁴

1.15.4 Ventricolo destro sistemico

Un ventricolo destro sistemico si può ritrovare sia in cardiopatie a due ventricoli,

come nel caso della TGA corretta o dopo gli interventi di Senning e Mustard, o in cardiopatie a ventricolo singolo, come nel HLHS o nel canale atrioventricolare sbilanciato con cuore sinistro ipoplasico. Lo studio della funzionalità di questi ventricoli può risultare molto difficile per via della loro geometria e posizione.

Come dimostrato da studi di anatomia patologica, un sovraccarico di pressione a livello di ventricolo destro causa un riarrangiamento delle fibre che lo compongono al fine di incrementare la componente orizzontale per amplificare la deformazione radiale e il suo contributo alla contrazione. In questi pazienti è possibile studiare la funzione radiale tramite metodica *Speckle tracking* a partire da una quattro camere apicale. Essendo un ventricolo sistemico, i valori di strain saranno minori di quelli di un normale ventricolo destro.⁹⁵ Da uno studio condotto da Di Salvo et al su pazienti con TGA sottoposti a correzione tramite intervento di Mustard o Senning, risulta che la funzionalità di questi ventricoli vede come predominante il contributo radiale rispetto all'accorciamento longitudinale.⁹⁶ In più, c'è una correlazione positiva tra ε radiale sistolico e la capacità d'esercizio di questi pazienti.

1.15.5 Cuore univentricolare

Strain e strain rate non dipendono da assunti geometrici e questo li rende estremamente adatti allo studio del cuore univentricolare. La letteratura in materia, però, è ancora piuttosto scarsa. Due studi hanno tentato di comparare i diversi approcci di palliazione al primo stadio del HLHS: ovvero il classico intervento di Norwood e l'intervento di Sano. Hughes et al hanno trovato più vantaggioso lo shunt sistemico-polmonare, il primo dei due tipi di intervento, in termini di funzionalità del ventricolo destro.⁹⁷ Al contrario, Frommelt et al, studiando le velocità miocardiche con tecnica Doppler, non hanno trovato differenze tra i due gruppi.⁹⁸ Ad ogni modo, in entrambi i gruppi era possibile ravvisare una diminuzione delle velocità E' del setto basale destinata a mantenersi tale anche dopo il secondo stadio di palliazione chirurgica (procedura di Glenn).

È interessante notare come vi sia un sottogruppo di pazienti con cuore sinistro ipoplasico a più alto rischio di insufficienza ventricolare destra, e quindi anche di morbilità e mortalità. In questi pazienti, quindi, è necessario porre una particolare

attenzione alla funzione miocardica peri-operatoria nei primi mesi di vita. Strain e strain rate potrebbero essere il modo migliore per farlo.³⁹

1.15.6 Tetralogia di Fallot

La tetralogia di Fallot è una cardiopatia congenita relativamente comune e trattamento chirurgico assicura un buon tasso di sopravvivenza a lungo termine. Sono disponibili per la correzione diverse tecniche tra le quali il chirurgo si orienta in base all'anatomia di base del paziente. Dopo l'intervento possono tuttavia persistere una residua insufficienza polmonare o un qualche grado di ostruzione all'efflusso. Alcuni pazienti hanno infatti bisogno di un re-intervento, ma il timing più adatto è ancora lontano dall'essere ben definito, in particolare nei pazienti con residua insufficienza valvolare. Weidemann et al, utilizzando lo strain Doppler, trovarono nei pazienti operati e asintomatici un danneggiamento della funzionalità longitudinale del ventricolo destro.⁹⁹ Queste alterazioni sono risultate più marcate nei pazienti con patch trans-anulare rispetto a quelli con patch infundibolare. Questi dati possono essere spiegati in base all'effetto combinato di ipertrofia e ipossia preoperatoria, possibili danni intra-operatori,¹⁰⁰ possibili lesioni post-operatorie residue¹⁰¹ e tipo di ricostruzione.

In particolare si è visto che l'alterazione di strain e strain rate correla con la presenza di anomalie elettrocardiografiche come QRS larghi e altri difetti nella depolarizzazione.¹⁰² In questi pazienti l'alterazione della meccanica segmentale associata alla fibrosi concomitante può essere causa sia delle tempeste aritmiche che della disfunzione ventricolare destra a riposo e sotto sforzo.¹⁰³ Di conseguenza, l'analisi della deformazione miocardica tramite strain può essere uno strumento efficace per stratificare i pazienti ad alto rischio, dal punto di vista meccanico come elettrico. Come dimostrato da Eyskens et al, infatti, strain e strain rate non solo correlano con la severità del rigurgito polmonare e con la frazione di eiezione del ventricolo destro stimate mediante RMN, ma anche con la resistenza allo sforzo di questi pazienti.¹⁰⁴ In più, in caso di iniziale disfunzione del ventricolo destro, i valori di ε e SR si modificano prima rispetto ai parametri calcolati con risonanza magnetica.

Infine, uno studio con 2D-STE ha dimostrato che a seguito dell'impianto chirurgico o percutaneo di valvola polmonare per la correzione di anomalie residue all'efflusso destro, vi è un progressivo recupero della funzione ventricolare sistolica destra.¹⁰⁵

Non bisogna dimenticare che, nonostante l'attenzione sia stata fino ad ora rivolta soprattutto al ventricolo destro, la disfunzione del ventricolo sinistro nei pazienti post-correzione di TOF si è rivelata uno dei principali determinanti rispetto agli esiti clinici avversi tardivi. Due diversi studi entrambi utilizzando strain imaging (il primo a partire dalla tecnica Doppler, mentre il secondo con *Speckle tracking*) hanno messo in evidenza la presenza di una compromissione della funzione ventricolare sinistra globale in tutte le direzioni: longitudinale, radiale e circonferenziale.^{102,103}

1.16 ECOCARDIOGRAFIA FETALE

L'ecocardiografia fetale è un esame super-specialistico e effettuato solamente nei centri di terzo livello.

Data l'innocuità, il basso costo e la facile ripetibilità della diagnostica con ultrasuoni, l'ecografia si viene a configurare come il punto cardine della diagnostica cardiologica del feto. Ovviamente, tuttavia, le particolarità dell'ambiente fetale la rendono diversa dall'ecocardiografia classica.

Il battito fetale fu registrato per la prima volta nel 1964 da Callagan e collaboratori tramite Doppler continuo. Da allora, si è dovuto attendere fino a metà anni ottanta perché la diffusione dell'ecocardiografia bidimensionale e l'utilizzo di sonde a più alta risoluzione aprissero la strada allo studio della morfologia del cuore fetale.

Data l'incidenza delle cardiopatie congenite, 8-10:1000 nati vivi, lo studio del cuore fetale e l'eventuale diagnosi in utero di cardiopatia hanno assunto un grande interesse, vista anche la possibilità di gestione medica del problema e di adeguato planning chirurgico.

Con le possibilità messe a disposizione dallo sviluppo tecnologico e scientifico, infatti, è oggi possibile gestire le cardiopatie congenite con buoni risultati. Diagnosticare in anticipo un'eventuale alterazione permette di gestire al meglio il momento del parto e sapere in anticipo di cosa avrà bisogno il bambino alla nascita (incubatrice, trasporto neonatale, infusione di farmaci per via endovenosa ecc.) e nei

giorni seguenti evitando di giungere a eventuali stati di compromissione emodinamica. Non bisogna poi dimenticare che sono possibili anche interventi terapeutici in utero, o tramite farmaci somministrati alla madre per controllare le aritmie o tramite procedure di cardiologia interventistica.¹⁰⁶

L'ecocardiografia fetale è inoltre spesso la prima occasione in cui ai genitori viene spiegata la cardiopatia diagnosticata. Si tratta quindi di un momento molto delicato per comunicare prognosi della patologia, aspettativa di vita del bambino e possibile outcome chirurgico.

Il ginecologo esamina sempre l'anatomia cardiaca, ma qualora sia presente un dubbio o un'indicazione precisa, riferisce la paziente ad un centro di terzo livello in cui un cardiologo pediatra esperto possa valutare la situazione.

Le indicazioni all'ecocardiografia fetale possono riguardare sia la madre che il feto.

Le prime sono:

- Presenza di familiarità per cardiopatia congenita;
- Esposizione ad agenti potenzialmente teratogeni, quali farmaci o sostanze d'abuso;
- Presenza di malattie metaboliche;
- Infezioni virali durante la gravidanza;
- Malattie autoimmuni con positività per anticorpi anti-SSA;
- Sindromi genetiche familiari (ad esempio Marfan e Noonan).

Le indicazioni fetali invece sono le seguenti:

- Sospetto di cardiopatia all'ecografia ginecologica;
- Presenza di anomalie extracardiache;
- Anomalie cromosomiche;
- Idrope;
- Aritmie;
- Aumento della traslucenza nucale nel primo trimestre;
- Sospetto di twin-to-twin transfusion syndrome in gravidanza gemellare.

Generalmente, questo tipo di ecografia viene effettuata tra la diciottesima e la ventiduesima settimana di gestazione, tendenzialmente dopo l'esecuzione dell'ecografia

morfologica. L'esame si esegue per via transaddominale con la paziente in decubito supino e/o laterale.

Il cuore fetale viene esaminato con tecnica 2D, Doppler pulsato e Color-Doppler. Il Doppler pulsato è utile sia per analizzare frequenza e ritmo cardiaco, dato che per ovvi motivi non abbiamo a disposizione una traccia elettrocardiografica, che per calcolare flussi e gradienti trans-valvolari similmente a quanto si fa nell'ecocardiografia post-natale, qualora la posizione fetale e la finestra acustica permettano un adeguato allineamento del cursore.¹⁰⁷ Raffrontando infatti la gittata sistolica a livello dell'efflusso destro con quella a livello di efflusso sinistro, è possibile avere un'idea della portata relativa dei due ventricoli. Il rapporto VD/VS è da intendersi normale quando è circa 1,3-1,5, anche se verso la fine della gravidanza tende ad avvicinarsi all'unità.¹⁰⁸ La tecnica M-mode può eventualmente essere usata per valutare gli spessori parietali, la dimensione delle valvole e la frazione di accorciamento (FA), che risulta normale quando superiore a 0,28.¹⁰⁶ In epoca fetale gli spessori teoricamente si equivalgono dal momento che il post-carico dei due ventricoli è di entità sovrapponibile. Il ventricolo destro invece si dimostra lievemente più ampio del sinistro nel terzo trimestre di gravidanza dato che accoglie il 60-70% del sangue.¹⁰⁹

Le proiezioni utilizzate non sono sempre quelle classiche, l'esame infatti dipende fortemente dalla posizione del bambino e dai suoi movimenti. In genere si procede in primis all'identificazione dei segmenti cardiaci mostrati e poi al loro collegamento sequenziale. Non è quindi possibile in questo tipo di ecografia organizzare le immagini secondo un ragionamento schematico fisso, ma è necessario invece adattarsi alle proiezioni che si riescono ad ottenere. La situazione più fortunata è quella in cui il torace del feto è appoggiato sulla parete addominale materna. In questo modo l'apice cardiaco viene a trovarsi proprio sotto alla sonda. In questo caso le proiezioni utilizzate saranno allora: 4-camere apicale e trasversa, asse lungo sinistro e destro, 3 vasi+trachea, asse corto ventricolare e delle grandi arterie, arco aortico, arco duttale, piano delle vene cave.

Le strutture da ricercare sono i ritorni venosi sistemici e polmonari, il forame ovale, la connessione atrio-ventricolare e ventricolo arteriosa, la relazione tra le grandi arterie, l'arco aortico e quello duttale. Dalle informazioni raccolte si definiscono situs, looping

e posizione dei grandi vasi, secondo l'approccio descrittivo sequenziale di Van Praagh.

Il Doppler, come color o come pulsato, viene utilizzato per studiare le valvole, le vene polmonari, il setto ventricolare e atriale, avendo cura di abbassare il Nyquist, e gli archi aortico e duttale.

Vi sono comunque delle importanti limitazioni. L'ecogenicità dei tessuti materni e la possibilità di trovare una buona finestra acustica sono fattori cruciali per avere una buona visualizzazione del cuore fetale. Come già precedentemente accennato, anche la posizione del bambino e i suoi eventuali movimenti possono influenzare grandemente la qualità dell'esame.

1.17 VALORI DI RIFERIMENTO IN EPOCA FETALE

Generalmente, la valutazione della funzionalità cardiaca del feto è legata a indici quali spessori parietali, volumetria cardiaca, frazione di accorciamento. Tutti questi parametri però sono indici soltanto indiretti della funzionalità miocardica.¹¹⁰ Alcuni studi hanno inoltre dimostrato che le velocità miocardiche ottenute mediante metodica TDI non sono sufficientemente sensibili per la valutazione della funzionalità miocardica regionale.¹¹¹ Lo strain ha una sensibilità maggiore,¹¹² ma la tecnica Doppler soffre di diverse limitazioni date dall'angolo dipendenza, dalla scarsa riproducibilità, dal lungo tempo richiesto per il post-processing e dalla sensibilità ai movimenti extra cardiaci.¹¹³ Le nuove possibilità offerte dalla tecnica STE l'hanno quindi resa un interessante nuova metodica di studio.

Tuttavia, i valori di normalità nei feti non sono ancora stati chiaramente definiti.¹⁰⁶

Di Salvo et al hanno condotto il primo studio sulla misurazione dello strain nei feti con metodica STE.¹¹⁴ Sono stati arruolati 100 feti di età gestazionale compresa tra 20-32 settimane. I dati sono stati acquisiti ad un frame rate da 40 a 90 frame/s e i valori sono stati ottenuti da tre consecutivi cicli cardiaci. La Tab. riporta i valori riscontrati.

A differenza dell'indagine con tecnica Doppler, precedentemente effettuata dal medesimo gruppo di lavoro, tutti i cuori fetali esaminati si sono dimostrati valutabili. I valori riscontrati sono più alti di quelli ricavati con tecnica Doppler. Secondo gli autori

questa variabilità è da attribuirsi all'angolo-dipendenza della tecnica Doppler. A 45° tra miocardio e fascio ultrasonoro infatti lo strain calcolato con tecnica Doppler risulta essere 0, nonostante la normale contrattilità. In ogni caso, in accordo con risultati precedentemente forniti dalla tecnica Doppler, il peak systolic strain sembra aumentare con le settimane di gestazione, come rilevato anche in altri studi.^{115,116}

Ishii et al hanno studiato strain longitudinale e circonferenziale in 81 feti di età compresa tra 17 e 42 settimane di gestazione.¹¹⁷

Il tracking dell'asse corto ha dato minori risultati rispetto a quello della quattro camere apicale. La ragione di questa maggiore difficoltà potrebbe risiedere nella presenza di movimenti ventricolari in più direzioni rispetto alla circonferenziale e radiale, come suggerito da Bussadori et al.¹¹⁸ Un altro motivo plausibile è le proiezioni in asse corto sono le più affette dallo shadowing costale, perché la sonda è orientata perpendicolarmente rispetto alle coste. In più, con l'aumento dell'età gestazionale si è riscontrato un aumento delle difficoltà di tracking anche per le proiezioni apicali. Con l'aumentare dell'età del feto infatti aumenta l'ossificazione costale che rischia di inficiare la qualità dell'immagine generando coni d'ombra.¹¹⁷

Nella figura sottostante sono riportati i risultati dello studio.

I valori di strain longitudinale trovati differiscono di circa una decina di unità da quelli ricavati da Di Salvo et al. In più, non è stata trovata correlazione tra i valori di strain ed età gestazionale. Gli autori ritengono che questo dato possa dipendere da i bassi frame rate utilizzati (30 Hz).

L'equipe composta da Schubert et al ha invece ricavato valori più simili a quelli reperiti da Di Salvo et al studiando strain e strain rate longitudinale su 30 feti a 28 settimane di gestazione. Valori di strain longitudinale più elevati sono stati rinvenuti a livello di parete libera del ventricolo destro e segmento basale della parete libera del

	Parete laterale	Setto	Parete libera VD
Segmento basale	-25 ± 4	-25 ± 3	-24 ± 4
Segmento medio	-25 ± 4	-25 ± 5	-25 ± 5
Segmento apicale	-26 ± 5	-26 ± 5	-25 ± 4
Media	-25 ± 4	-25 ± 5	-24 ± 4

Figura 1.16. Valori di strain longitudinale (%) in 100 feti.

ventricolo sinistro. Per quanto concerne lo strain rate, sono stati trovati valori più elevati in corrispondenza delle sezioni basali del cuori rispetto alle più apicali. Anche in questo caso sono stati trovati valori più elevati in corrispondenza della parete libera del ventricolo destro.³⁵

Kapusta et al hanno studiato strain e strain rate longitudinale e time to peak systolic strain in entrambi i ventricoli con particolare attenzione all'influenza di parametri quali sesso e frequenza cardiaca.¹¹⁹ Non è stata trovata correlazione tra i valori di strain e strain rate e il sesso o la frequenza cardiaca. Una correlazione negativa statisticamente significativa è stata individuata invece tra frequenza cardiaca e time to peak systolic strain del ventricolo sinistro indicando che per frequenze cardiache minori, lo strain sistolico di picco viene raggiunto in un maggior tempo.

Per quanto concerne i valori di strain e strain rate, non sono state trovate differenze statisticamente significative tra i due ventricoli.¹¹⁹

Altri studi, improntati sulla stessa linea di quelli citati, hanno ottenuto risultati comparabili.¹²⁰ Uno studio, in particolare, ha riscontrato una diminuzione dello strain statisticamente significativa con il progredire della gestazione.¹²¹

1.18 APPLICAZIONI CLINICHE IN EPOCA FETALE

La definizione dei valori fisiologici di strain e strain rate permette di passare ad applicare la metodica in ambito clinico.

Il cuore fetale infatti risponde ai danni tramite proliferazione e ipertrofia dei cardiomiociti. Per questo motivo, registrare un'alterazione della funzionalità cardiaca può rappresentare il primo segno di una patologia fetale.⁴¹ In questi casi, gli strumenti attualmente nelle mani del clinico risultano spesso insufficienti ad identificarne il grado di compromissione e scegliere il trattamento più adeguato.

Un esempio è costituito dallo scompenso cardiaco fetale. Questa condizione può avere diverse eziologie: le aritmie, le infezioni virali, le sindromi da trasfusione gemellare, le anemie emolitiche, le cardiopatie congenite (soprattutto la presenza di rigurgiti mitralici o tricuspidalici severi o stenosi aortica critica) e le malformazioni extracardiache.¹²² In queste circostanze, lo *Speckle tracking* può diventare uno strumento assai utile a discriminare funzionalità seriamente compromesse da

situazioni meno critiche evitando ritardi, inapproprietezze terapeutiche e difficoltosi trasferimenti in prima giornata di vita. Riconoscere la gravità di una cardiopatia congenita e saper predire accuratamente l'iter diagnostico e terapeutico del piccolo paziente dopo la nascita, significa saper consigliare ai genitori il luogo, la tempistica e le modalità più sicure di nascita per il piccolo. In questo senso il raffronto di dati morfologici e funzionali con il range di normalità e il calcolo di un profilo di rischio nei pazienti con scompenso cardiaco possono essere utili nella gestione del feto con cardiopatia, aiutando l'equipe medica a prendere la decisione più opportuna per la gestione di un paziente critico.¹⁰⁶

Lo strain bidimensionale può inoltre dirimere dubbi diagnostici qualora si sospettino patologie per cui non esistono parametri diagnostici di sicuro valore predittivo, come nel caso della coartazione aortica e di quelle cardiomiopatie ad eziologia genetico-metabolica (cardiomiopatie ipertrofiche, dilatative, restrittive, da diabete materno, glicogenosi, ecc.) in cui la funzione sistolica non risulta ancora compromessa in epoca prenatale.¹⁰⁶ In questi pazienti lo *Speckle tracking* potrebbe individuare una riduzione del picco sistolico di strain e strain rate che, come già dimostrato nell'adulto, distingue zone con aumento di fibrosi, perdita di miociti e riorganizzazione delle fibre miocardiche.¹²³

Se per alcuni casi, come ad esempio le aritmie, il trattamento farmacologico può essere estremamente efficace nella risoluzione dello scompenso cardiaco, nei casi in cui sia presente una stenosi aortica o polmonare critica può rendersi necessario un parto anticipato o un trattamento di valvuloplastica in utero. Questa tecnica è oggi riservata ai casi in cui il rischio di morte endouterina è molto alto, ma il miglioramento della tecnica potrebbe consentirne l'estensione anche a casi meno gravi in cui però l'interventistica in utero andrebbe a migliorare significativamente l'outcome neonatale.¹⁰⁶

La valvuloplastica viene eseguita infatti allo scopo di alterare la storia clinica della patologia che porta a ipoplasia ventricolare, condizione estremamente complessa per la quale al giorno d'oggi dopo la nascita sono disponibili solamente trattamenti palliativi. La definizione ecografica di ventricoli borderline è tuttavia di difficile valutazione ed esistono ancora pochi dati anatomici e funzionali che ci permettano di

comprendere i fattori associati con la progressione da stenosi aortica a ventricolo sinistro ipoplasico.¹²⁴

L'utilizzo di metodica *Speckle tracking* fornisce indicazioni circa i meccanismi di compensazione nei feti con cuore sinistro ipoplasico borderline e questo potrebbe aiutare a distinguere i pazienti da sottoporre a valvuloplastica fetale.

CAPITOLO 2 - LE BASI MECCANICHE DELLA FUNZIONE VENTRICOLARE SINISTRA

Nei tessuti biologici molli, come in qualsiasi solido in cui è presente una microstruttura, c'è una correlazione tra la struttura interna e le proprietà meccaniche macroscopiche. Le leggi costitutive dei materiali descrivono il comportamento globale che deriva dalla configurazione interna, e il loro sviluppo nell'ambito dei tessuti biologici molli è stato un campo di ricerca molto attivo per diversi decenni. Le leggi costitutive sono di fondamentale importanza per la soluzione di problemi di meccanica del continuo, poichè senza di esse, da un punto di vista matematico, il sistema di equazioni che regge il problema sarebbe irrisolvibile.

La conoscenza delle leggi costitutive è essenziale anche per ottenere una visione più approfondita dei meccanismi resistenti dei tessuti biologici in condizioni fisiologiche e patologiche. In particolare, l'implementazione di un modello costitutivo strutturale, basato sulla microstruttura fisica del tessuto, è il modo più adatto per studiare le modificazioni funzionali che avvengono in seguito a un cambiamento nelle sollecitazioni meccaniche. Lo scopo di questo tipo di modelli è quello di integrare le informazioni sulla composizione dei tessuti alla geometria della struttura e, in questo modo, tenere in considerazione più informazioni sul materiale. Questo permette anche di aumentare il potere predittivo del modello stesso, peculiarità molto utile in ambito clinico, poichè permette di sperimentare diverse terapie *in silico* prima che *in vivo*¹²⁵. La formulazione di un modello matematico che descriva adeguatamente la meccanica cardiaca è molto complicata, perchè le sollecitazioni sul sistema considerato variano durante tutto il ciclo cardiaco. Tuttavia, i benefici che si potrebbero trarre da un modello di questo tipo sono molteplici, perchè si potrebbero studiare in modo più ap-

profondito i cambiamenti che avvengono in alcune regioni del miocardio in seguito ad alcune patologie, come le coronaropatie, in particolare dal punto di vista delle proprietà locali dei tessuti¹²⁶.

Come accennato sopra, la costituzione di un appropriato modello *in silico* è essenziale conoscere le caratteristiche costitutive del tessuto/organo da studiare. Dal punto di vista istologico bisogna considerare non solo la disposizione delle fibre muscolari del ventricolo sinistro in tre strati muscolari (endocardio, mesocardio ed epicardio), ma anche la composizione cellulare e della matrice extracellulare di tale tessuto. Le fibre muscolari, infatti, rappresentano circa il 70% del tessuto, mentre il restante 30% è occupato da tessuto connettivo, matrice extracellulare e vasi sanguigni.

Capire come varia la struttura di questo tessuto sullo spessore è molto importante, perché è proprio grazie a questa particolare architettura che il cuore ha una considerevole resistenza a flessione e torsione durante il ciclo cardiaco. Infatti, le fibre miocardiche hanno un orientamento variabile gradualmente sullo spessore della parete come viene mostrato in figura 2.1b. Questa variazione può essere apprezzata ancora meglio grazie a delle sezioni sul piano longitudinale-circonfrenziale, prese a di-

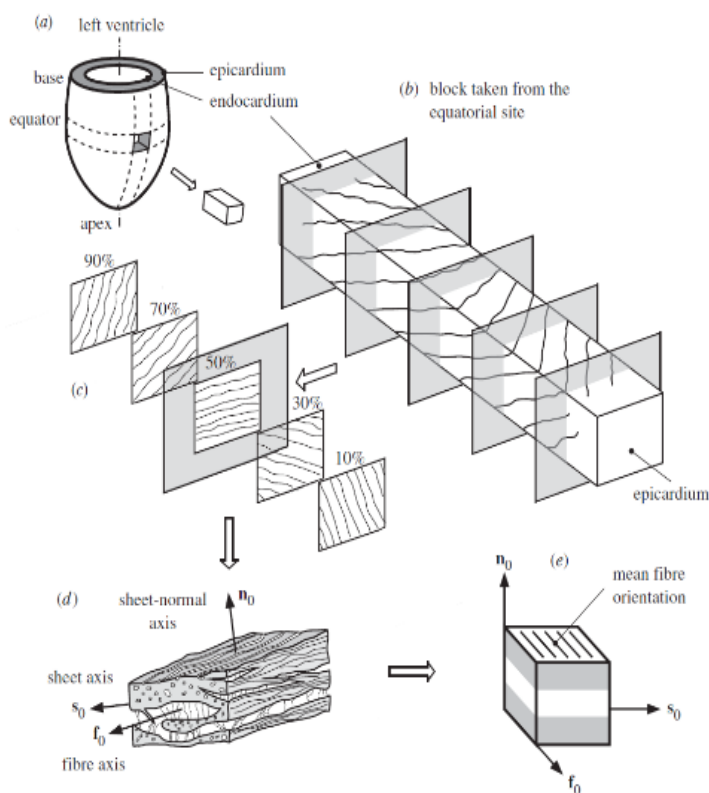


Figura 2.1. (a) Rappresentazione schematica del ventricolo sinistro; (b) struttura interna attraverso lo spessore dall'epicardio all'endocardio; (c) sezioni sul piano longitudinale-circonfrenziale dal 10 al 90% dello spessore della parete dall'epicardio, che mostrano la variazione trans murale nell'orientamento delle fibre; (d) organizzazione a lamine dei miociti collegati tramite fibre di collagene riferite a una terna destrogira di versori ortonormali f_0, s_0, n_0 ; (e) concio di tessuto stratificato con un sistema di riferimento locale (X_1, X_2, X_3) ¹²⁷.

stanze regolari lungo lo spessore, riportate in figura 2.1c. Come si può vedere, l'orientamento delle fibre cambia a seconda della loro posizione all'interno della parete: nella regione equatoriale, la direzione predominante delle fibre varia da $+50^\circ$ / $+70^\circ$ nella regione sub-endocardica, a circa 0° a metà dello spessore, fino a -50° / -70° nella regione sub-epicardica (gli angoli sono definiti positivi se antiorari a partire dalla direzione circonferenziale che ha angolazione 0°). Questa disposizione crea un'andamento delle fibre elicoidale in senso antiorario all'endocardio e in senso orario all'epicardio¹²⁸⁻¹³⁰. Tra i primi studi in questo ambito si citano quelli di Streeter et al.^{131,132}, nei quali è stato osservato il cambiamento di angolazione delle fibre dallo strato più esterno a quello più interno su cuori canini arrestati in sistole o in diastole, utilizzando sezioni progressive che da un piano tangente all'epicardio si portavano via via verso la parte più interna del cuore. I risultati di questi studi anatomici sono riportati in nelle Figg. 1.3 e 1.4.

Oltre all'inclinazione delle fibre muscolari, è importante notare che anche le lamine sono inclinate in direzione trasversale e non si sviluppano tangenzialmente alla direzione circonferenziale¹²⁶. In questo lavoro, però non si terrà conto di questo aspetto e si considererà il ventricolo come composto da dei gusci concentrici, all'interno dei quali si trovano le fibre di orientamento variabile, come rappresentato in figura 2.2. La struttura stratificata del tessuto è caratterizzata da una terna destrogira di versori ortonormali a cui è associato un sistema di riferimento ortogonale. La terna destrogira locale è formata dall'asse delle fibre f_0 , che coincide con l'orientazione

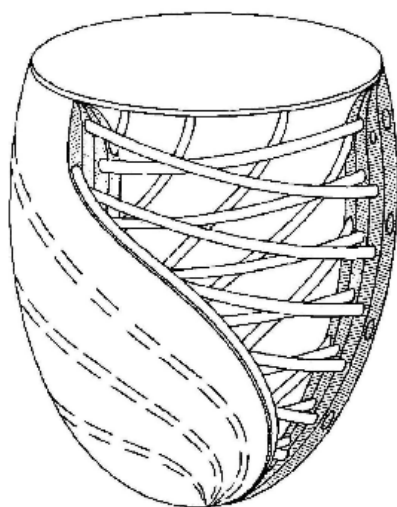


Figura 2.2. Rappresentazione dei gusci concentrici che compongono il ventricolo. All'interno di ciascun guscio si trovano le fibre muscolari, approssimativamente parallele a quelle adiacenti appartenenti allo stesso guscio¹³¹.

delle fibre muscolari, dall'asse della lamina s_0 , che si trova nel piano delle fibre ed è diretto ortogonalmente alla direzione delle stesse, e dalla normale alla lamina n_0 , che è la direzione normale alle precedenti.

In figura 2.1e è presente un cubo di materiale stratificato in cui sono riportate le coordinate (X_1, X_2, X_3) appena descritte. Per semplicità, in seguito, si farà riferimento a queste direzioni indicandole con le lettere f, s, n che corrispondono, rispettivamente, a fibra, lamina e normale. Inoltre, ci si riferirà anche ai piani fs, fn, sn per indicare rispettivamente i piani che contengono le direzioni corrispondenti.

Il tessuto passivo miocardico è costituito da un materiale ortotropo in cui si distinguono tre direzioni distinte, ortogonali tra loro, lungo le quali la risposta del materiale è differente. Delle semplici prove monoassiali¹³³ e biassiali^{134,135} provano solamente un comportamento trasversalmente isotropo; l'ortotropia del materiale, invece, è stata

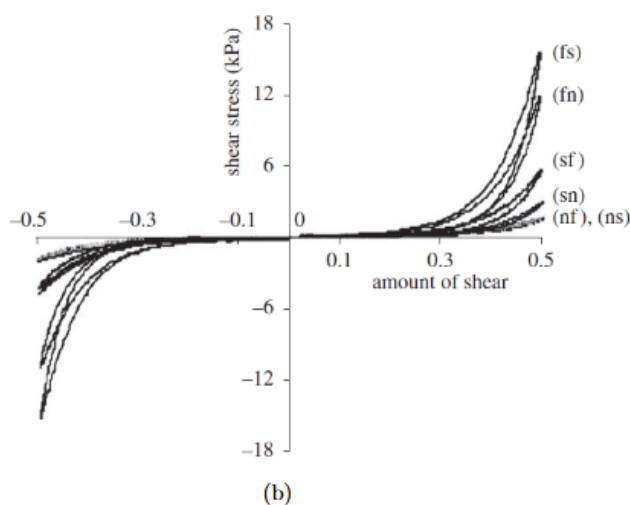
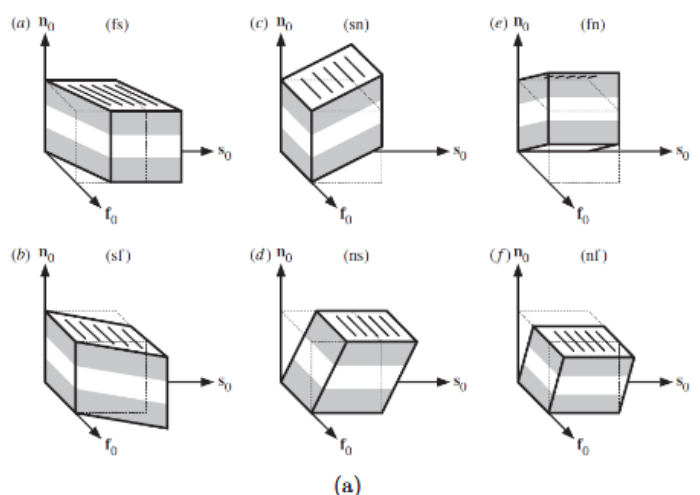


Figura 2.3. (a) Rappresentazione delle sei prove di taglio semplice effettuate su campioni di tessuto cardiaco porcino. Le prove sono identificate da una sigla del tipo (ij) , dove $i, j \in \{f, s, n\}$ e corrispondono ad avere taglio nel piano ij in direzione j ¹²⁷. (b) Il grafico rappresenta la tensione di taglio in ordinata e la deformazione tagliante in ascissa per le diverse prove di taglio in (a). Si evidenzia il comportamento altamente non lineare del materiale e le sue proprietà visco-elastiche, caratterizzate da cicli di isteresi molto snelli. Adattato da Dokos¹³⁶.

dimostrata in uno studio condotto da Dokos et al¹³⁶, nel quale dei provini di tessuto cardiaco porcino sono stati sottoposti a prove di taglio in diverse direzioni, come riportato in figura 2.3a. Dalla figura 2.3b si può notare come il comportamento del materiale sia altamente non lineare e come questo vari notevolmente a seconda dell'orientamento del provino: la rigidità del tessuto è minima quando la prova è condotta nei piani fn e sn in direzione f e s rispettivamente; la rigidità è massima, invece, quando la prova è condotta nei piani fs e fn in direzione s e n rispettivamente, poichè in questi casi le deformazioni taglianti producono un allungamento dei miociti.

È da notare che, nei piani che contengono le fibre, la risposta alla prova è differente in direzione laminare e normale; allo stesso modo, nei piani che contengono le lamine, la risposta è diversa nella direzione delle fibre e normale; al contrario, nei piani che contengono la direzione normale, non vi è differenza tra la risposta ottenuta lungo le fibre e lungo la lamina.

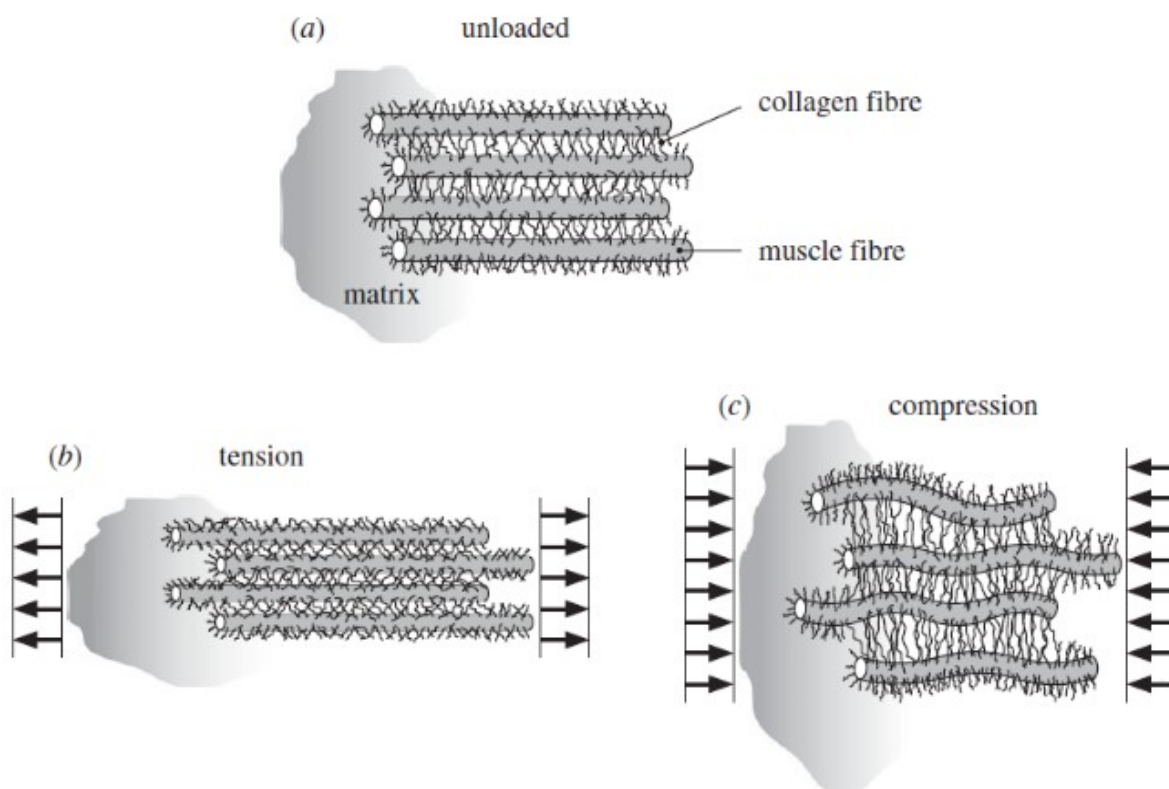


Figura 2.4. Schematizzazione dell'architettura del muscolo, in cui si distinguono le fibre muscolari collegate trasversalmente da filamenti di collagene. (a) Configurazione scarica. (b) e (c) trazione e compressione, rispettivamente, in direzione delle fibre¹²⁷.

Per comprendere meglio come la microstruttura del tessuto influenzi la risposta globale a diverse sollecitazioni, consideriamo la figura 2.4 in cui è rappresentata schematicamente la struttura delle fibre muscolari circondate dai filamenti di collagene, sia in condizioni scariche, sia in condizioni di carico a trazione e compressione nella direzione delle fibre. In particolare, in figura 2.4b è rappresentata la trazione del tessuto nella direzione delle fibre: i miociti sono estesi e diminuiscono le distanze interstiziali comprimendo il collagene.

L'aumento esponenziale di tensione che si registra è dovuto esclusivamente al contributo delle fibre, in quanto i filamenti di collagene non oppongono resistenza alla compressione subita. Nel caso di trazione ortogonale alle fibre si registra sempre un aumento esponenziale della tensione: in questo caso ciò può essere imputato al fatto che il collagene viene sollecitato a trazione in questa configurazione.

In figura 2.4c, invece, dove è rappresentata la compressione parallela alla direzione delle fibre, si nota la tendenza delle fibre a instabilizzarsi e la conseguente trazione dei filamenti extracellulari che collegano tra loro i miociti. Si ipotizza che sia proprio la trazione laterale del collagene a contribuire alla bassa comprimibilità del tessuto osservata^{127,136}. Altri studi condotti da Omens e Fung¹³⁷, hanno evidenziato il fatto che esiste uno stato di pretensione nel miocardio scarico: infatti, recidendo in senso radiale una sezione circonferenziale di ventricolo (proveniente da un cuore murino arrestato con una soluzione di potassio), questa si apre immediatamente formando un arco di cerchio. Le deformazioni residue misurate in questo modo erano compatibili con le deformazioni flettenti necessarie per ripristinare la circonferenza iniziale.

Una distribuzione tridimensionale di tali tensioni iniziali è molto difficile da ottenere e per questo il problema va trattato con cautela; tuttavia, esse influenzano la distribuzione degli stress nelle varie zone del miocardio in condizioni fisiologiche ed è quindi importante tenerne conto qualora si volesse ottenere una stima accurata della distribuzione delle tensioni nel cuore. Ad esempio, in uno studio condotto da Guccione et al.¹³⁸, si è tenuto conto dello stato di pretensione iniziale e questo ha permesso di ottenere dei risultati in termini di tensioni diversi dal caso non pre-sollecitato; si è visto, comunque, che considerare o meno la pretensione non ha influito significativa-

mente nel processo di calibrazione dei parametri della legge costitutiva proposta nell'articolo.

Un altro aspetto da evidenziare è la viscoelasticità del tessuto miocardico, ma questa caratteristica del materiale può non essere considerata nel nostro campo di applicazione, perché la scala temporale del ciclo cardiaco è troppo breve per poter considerare effetti di viscosità. Alla luce di tutte queste considerazioni, nella seguente trattazione considereremo il tessuto passivo miocardico come un materiale non lineare elastico ortotropo non omogeneo e incomprimibile. Per quanto riguarda le tensioni residue, queste non verranno prese in considerazione nel modello costitutivo per le difficoltà descritte precedentemente nella loro determinazione.

2.1 LA LEGGE COSTITUTIVA PER IL MIOCARDIO

Come già evidenziato, un modello costitutivo realistico del tessuto biologico è fondamentale per lo studio della meccanica cardiaca. Questo tipo di materiali, se sottoposto a grandi deformazioni, dimostra un comportamento altamente anisotropo e non lineare, dovuto al riorientamento che subiscono le fibre all'interno. Per simulare adeguatamente questi effetti ci si deve collocare nell'ambito dell'iperelasticità anisotropa.

In letteratura si trovano innumerevoli leggi costitutive di variabile complessità che descrivono il miocardio. Julins¹³⁹ e Gerhard¹²⁷ offrono tra tutti una panoramica esaustiva dei modelli costitutivi più rilevanti. Nella presente sezione si discuterà dei diversi tipi di leggi costitutive e di quella adottata nel resto della trattazione.

In figura 2.5 è rappresentato il tipico legame tensione-deformazione per un tessuto biologico sottoposto a una prova di trazione monoassiale.

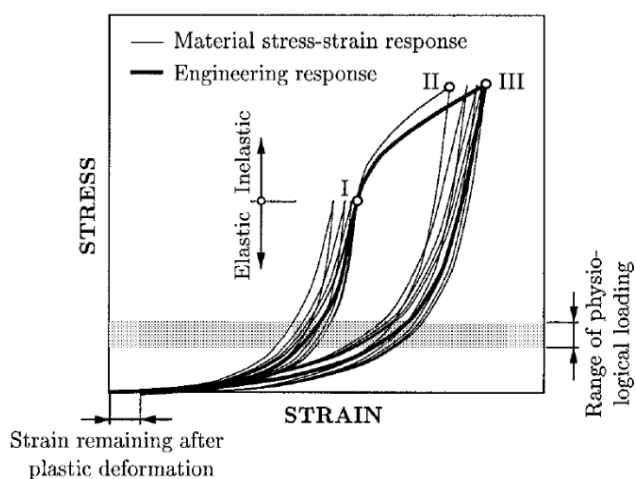


Figura 2.5. Legame tensione-deformazione per un tessuto biologico sottoposto a una prova di trazione monoassiale. È interessante notare il diverso comportamento del materiale in condizioni di carico fisiologico e non.

In generale, esistono due tipologie di leggi costitutive formulate per i tessuti biologici: leggi fenomenologiche e leggi strutturali. L'approccio fenomenologico è stato utilizzato quando il problema della meccanica cardiaca è stato affrontato inizialmente. Seguendo questo modello, la legge costitutiva viene formulata interpolando i dati sperimentali ottenuti da vari tipi di prove su campioni di tessuto¹²⁵. La formulazione della legge, quindi, viene fatta solamente sulla base del comportamento globale del materiale, non tenendo conto della microstruttura che lo compone. Per questo, la legge che ne deriva, è basata esclusivamente su delle misure di deformazione. Un esempio di applicazione di questo approccio al tessuto miocardico è la legge costitutiva di Guccione et al.¹⁴⁰ dove l'energia di deformazione per unità di volume ha la seguente forma

$$W = \frac{C}{2}(e^Q - 1)$$

con

$$Q = b_f E_{11}^2 + b_t(E_{22}^2 + E_{33}^2 + E_{23}^2 + E_{32}^2) + b_{fs}(E_{12}^2 + E_{21}^2 + E_{13}^2 + E_{31}^2)$$

:

dove i termini E_{ij} sono le componenti del tensore delle deformazioni di Green-Lagrange, in un sistema di riferimento ortonormale in cui le fibre sono disposte in direzione e_1 , e i termini C , b_f , b_t , b_{fs} sono i parametri del materiale.

Il materiale così descritto è incomprimibile e può essere trasversalmente isotropo o ortotropo, a seconda dei valori dei parametri. Per quanto riguarda l'approccio strutturale, questo permette di formulare una legge costitutiva composta da più parti, ciascuna delle quali interpreta il comportamento dei singoli costituenti il materiale. La legge che ne deriva è basata sugli invarianti I_i del tensore delle deformazioni e richiede solamente la conoscenza delle direzioni preferenziali locali del materiale. Un esempio di applicazione è la legge costitutiva per il miocardio proposta da Holzapfel et al¹²⁷, la cui energia di deformazione per unità di volume è descritta dalla seguente funzione:

$$\Psi = \frac{a}{2b} \exp[b(I_1 - 3)] + \sum_{i=f,s} \frac{a_i}{2b_i} \{\exp[b_i(I_{4i} - 1)^2] - 1\} + \frac{a_{fs}}{2b_{fs}} [\exp(b_{fs} I_{8fs}^2) - 1] \quad (2.1)$$

dove a, b, af, bf, afs,bfs sono i parametri del materiale (i termini di tipo a hanno l'unità di misura di una tensione e i termini di tipo b sono adimensionali).

Ricordando la struttura istologica del tessuto miocardico, si possono distinguere i contributi dei quattro addendi che compongono la funzione $\bar{\Psi}$: essi rappresentano, rispettivamente, il comportamento della matrice extracellulare (isotropo), delle fibre muscolari (trasversalmente isotropo), delle lamine di fibre (trasversalmente isotropo) e del piano che contiene lamine e fibre (ortotropo). Il primo termine, inoltre, può essere sostituito con una forma neo-Hookiana della legge costitutiva (del tipo $\bar{\Psi}_{iso} = C(I_1 - 3)$), poichè anche questa interpreta bene i risultati sperimentali.

Un altro esempio di legge strutturale è quella formulata sempre da Holzapfel et al.¹²⁵ per la parete arteriosa, molto simile strutturalmente a quella ventricolare; l'energia di deformazione per unità di volume è la seguente:

$$\bar{\Psi} = \frac{c}{2}(\bar{I}_1 - 3) + \frac{k_1}{2k_2} \sum_{i=4,6} \{ \exp[k_2(\bar{I}_i - 1)^2] - 1 \}$$

Dove c, k_1 e k_2 sono parametri del materiale (c e k_1 hanno l'unità di misura di una tensione e k_2 è adimensionale). Anche qui si può distinguere il primo contributo (isotropo) dovuto alla matrice di collagene e gli altri due contributi (trasversalmente isotropi) dovuti alle due famiglie di fibre che si trovano all'interno del tessuto arterioso, al contrario di quello miocardico dove è presente un'unica famiglia di fibre.

Entrambe queste leggi costitutive di Holzapfel et al. descrivono un materiale incomprimibile, a comportamento ortotropo nel primo caso e trasversalmente isotropo nel secondo.

Nella scelta della legge costitutiva più adatta ad essere utilizzata nel modello, si è tenuto conto di diversi fattori. Innanzitutto, le leggi fenomenologiche sono formulate sulla base di dati sperimentali, perciò interpretano ottimamente il comportamento del materiale solo in condizioni fisiologiche; al contrario, quelle strutturali riescono a prevedere con una maggiore accuratezza l'andamento delle tensioni anche al di fuori di questo ambito¹²⁵.

Inoltre, poichè le leggi strutturali sono basate sull'uso degli invarianti, esse hanno delle desiderabili caratteristiche di convessità e stabilità del materiale adatte

all'implementazione numerica, in particolare nell'ambito degli Elementi Finiti. Queste peculiarità, infatti, garantiscono l'unicità della soluzione trovata e la sua coerenza con il comportamento meccanico e fisico osservato sperimentalmente^{125,127}. Poiché ci si trova nell'ambito della biomeccanica è importante tenere conto anche degli obiettivi finali di questa disciplina, tra i quali la possibilità di analizzare dei modelli cosiddetti "patient specific", cioè specifici per ogni determinato paziente. Per ottenere dei modelli attendibili, quindi, è importante che la scelta dei parametri del materiale sia affidabile e stabile per piccole variazioni dei dati clinici, poiché questi sono in quantità e qualità limitate. In questo campo, infatti, si parla di identificabilità pratica (practical identifiability), per indicare la possibilità di determinare un'unica stima dei parametri a partire dai dati disponibili, e di fedeltà del modello (model fidelity), per indicare la capacità del modello di descrivere accuratamente la funzionalità cardiaca con il requisito di parametri affidabili. Un modello adeguato all'utilizzo in ambito clinico come strumento predittivo di possibili patologie, deve possedere entrambe queste caratteristiche. Nello studio di Hadjicharalambous et al.¹⁴¹ sono state confrontate quattro diverse leggi costitutive (tra cui quella di Guccione¹⁴⁰ e di Holzapfel¹²⁷) rispetto alla possibilità di ottenere stime accurate e affidabili dei loro parametri. Ne è emerso che la legge proposta da Holzapfel coniuga una relativa complessità nella formulazione a un'ottima identificabilità pratica, considerato anche il fatto che i parametri del materiale sono facilmente correlabili ai diversi costituenti il tessuto; i parametri della legge proposta da Guccione, invece, non hanno un preciso significato fisico e sono di difficile determinazione^{125,142}.

Alla luce di queste considerazioni, si è scelto di utilizzare una legge costitutiva di tipo strutturale. Si è optato per quella formulata da Holzapfel et al.^{125,143} per la parete arteriosa, poiché già implementata nel codice utilizzato per le analisi (SIMULIA Abaqus v. 6.14), anche se non specifica per il miocardio.

CAPITOLO 3 – SCOPO DELLO STUDIO

Le conoscenze riguardo tempistiche e modalità dello sviluppo miocardico fetale sono ancora limitate; in letteratura, infatti, sono riportati studi sperimentali su modelli animali che si concentrano principalmente sullo sviluppo embrionale. Quali modificazioni intervengano fisiologicamente a livello anatomo-funzionale da allora, ci è tuttora per lo più sconosciuto.

Questo studio si propone quindi di analizzare sia clinicamente che istologicamente le peculiarità di questo processo fisiologico in termini di confronto tra endocardio ed epicardio, sia dal punto di vista funzionale che morfologico.

Sulla base dei risultati ottenuti, poi, si procederà a sviluppare un modello *in silico* che individui le caratteristiche meccaniche dei singoli quadri anatomo-funzionali al fine di identificare (o ipotizzare) la legge costitutiva che porti le fibre miocardiche ad assumere la geometria conosciuta nell'adulto, identificando poi i limiti di confidenza che potrebbero giustificare le alterazioni strutturali ed ultrastrutturali proprie delle cardiopatie congenite e acquisite.

CAPITOLO 4 – MATERIALI E METODI

Lo studio si compone di una parte clinica e di una parte anatomo-patologica. Per la prima sono stati studiati cuori fetali sottoposti a esame ecocardiografico di terzo livello tramite metodica *Speckle tracking*, mentre per la seconda sono stati studiati tramite approccio morfometrico cuori fetali provenienti da esame autoptico. Tutti i cuori esaminati, per entrambe le categorie, erano normali dal punto di vista anatomico e funzionale.

4.1 STUDIO ECOCARDIOGRAFICO

4.1.1 Popolazione dello studio

Sono stati arruolati 72 feti privi di patologia cardiaca di età gestazionale compresa tra le 17 e le 34 settimane di gestazione.

Le gravide afferite all'ambulatorio di ecocardiografia fetale dell'Azienda Ospedaliera di Padova tra il dicembre 2014 e il luglio 2016 sono state informate dello studio e invitate a partecipare. Tutte le madri dei feti arruolati hanno dato il loro consenso allo studio.

Le indicazioni allo svolgimento dell'esame sono state sia materne che fetali: familiarità per cardiopatia congenita, esposizione a teratogeni, sindromi genetiche familiari, anomalie cromosomiche del feto, aritmie, aumento della traslucenza nucale e presenza di arteria ombelicale singola. Nessuno dei feti arruolati presentava anomalie cardiache, aritmie o scompenso cardiaco.

I cuori fetali sono stati dapprima studiati tramite ecocardiografia 2D e successivamente sottoposti ad indagine *Speckle tracking*.

L'età gestazionale è stata calcolata a partire dall'ultima mestruazione. In caso di in-

congruenze tra la presunta età gestazionale e le dimensioni del feto, si è utilizzata la data corretta dal ginecologo in base alle misure antropometriche fetali.

Sono inoltre stati arruolati anche 39 neonati prematuri ricoverati nella Patologia Neonatale dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Nessuno di loro era affetto da patologia cardiaca. Prima di effettuare l'esame ecocardiografico, i genitori sono stati informati dello studio e hanno dato il loro consenso.

4.1.2 Acquisizione delle immagini

Le ecografie sono state condotte da tre dottoresse esperte (R.B., A.C., E.R.) dell'unità di Cardiologia Pediatrica dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

L'esame è stato effettuato per via trans-addominale con la gestante in decubito supino o semidecubito laterale.

In primis, si sono identificate tutte le strutture cardiache e si è proceduti ad analizzare sequenzialmente situs, ritorni venosi sistemici e polmonari, forame ovale, looping ventricolare, concordanze atrio-ventricolari e ventricolo-arteriose. Si è inoltre accertato che la frequenza fosse ottimale.

Tutte le registrazioni raccolte sono state effettuate tramite un ecografo Vivid E9 (GE Vingmed Ultrasound AS, Horten, Norvegia) equipaggiato con trasduttori lineari da 5-MHz e 6-MHz.

Per ogni feto si è cercato di ottenere una buona 4-camera apicale.

Essendo impossibile ottenere un tracciato in maniera non invasiva, l'elettrocardiogramma fetale non è stato registrato.

I neonati prematuri sono stati sottoposti a ecocardiografia nel corso delle prime 24h di vita, per evitare che nel tempo trascorso tra la nascita e l'esame ecocardiografico intervenissero modificazioni anatomiche tali da rendere i valori di strain non confrontabili con quelli fetali. In primis, è stato eseguito un esame fisico completo. In seguito, tutti i soggetti sono stati sottoposti ad esame ecocardiografico transtoracico dettagliato da parte di un esperto cardiologo pediatra (B.C.), secondo le indicazioni dell'American Society of Echocardiography. Ogni ecocardiografia è stata eseguita a riposo, senza ricorrere l'utilizzo di sedativi.

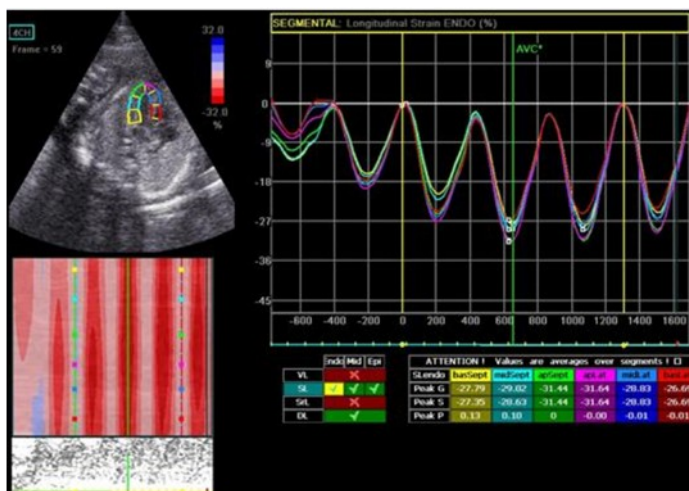


Figura 4.1. Grafico rappresentante lo strain longitudinale endocardico fetale. È possibile notare come sia stato identificato il periodo della curva in cui tracciati erano più stabili e, in assenza di drift compensation, la metodica sia stata applicata al singolo battito. Per ogni segmento è stata poi considerata la media data dai tre cicli cardiaci contigui esaminati.

Le immagini sono state ottenute con sonda da 3,0-MHz (S3) o da 5,0 MHz (S5) utilizzando l'ecocardiografo Vivid E9 (GE Vingmed Ultrasuoni AS, Horten, Norvegia). La scelta della sonda S3 o S5 è dipesa dalla postura del bambino.

Sono state ottenute immagini bidimensionale B-mode in scala di grigi, in particolare in proiezione apicale 4-camere, in asse corto apicale parasternale (a livello dei muscoli papillari) e in asse corto basale parasternale (a livello della valvola mitrale).

4.1.3 Analisi off-line con 2D-STE

L'analisi offline delle immagini è stata eseguita da un cardiologo pediatra (B.C.) che non ha partecipato alla raccolta delle immagini fetali.

L'analisi è stata effettuata tramite software EchoPAC (GE Vingmed Ultrasound AS). Sono state utilizzate ai fini dello studio solo le immagini dotate di sufficiente qualità. Le 4-ch trasverse sono state escluse. Il ciclo cardiaco è stato quindi ricostruito seguendo nel tempo i movimenti della valvola mitrale. Il cursore tempo si pone poco prima della chiusura della valvola. In questo modo si identifica il primo battito. Allineando poi il secondo cursore sul momento antecedente la chiusura della valvola si individua un secondo battito. Analizzando il tempo intercorso tra i due battiti indicati il software è in grado di calcolare una frequenza cardiaca e di utilizzarla per ulteriori analisi. Per ogni feto si è quindi proceduto con l'analisi *Speckle tracking* di setto e parete libera del ventricolo sinistro.

Inizialmente è stato tracciato il bordo endocardico. Il software ha generato poi sei segmenti: setto apicale, medio e basale e parete libera apicale, media e basale.

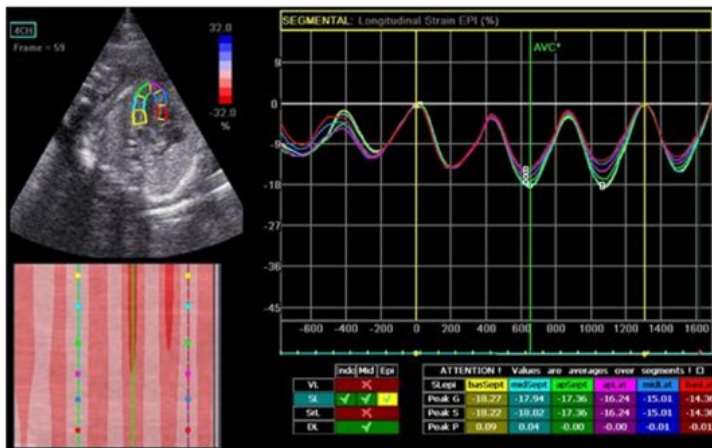


Figura 4.2. Grafico rappresentante lo strain longitudinale epicardico fetale. Anche in questo caso si può notare come sia stato identificato il periodo della curva in cui i tracciati erano più stabili e, in assenza di drift compensation, la metodica sia stata applicata al singolo battito. Per ogni segmento è stata poi considerata la media data dai tre cicli cardiaci contigui esaminati.

Qualora il profilo di queste ROI eccedesse le effettive dimensioni ventricolari si è quindi proceduto a ricollocare o ridimensionare i segmenti dati. A questo punto il software ha fornito un giudizio di qualità sul tracking effettuato. Solo i segmenti percepiti positivamente dal software e dal controllo visivo dell'operatore sono stati utilizzati per l'indagine.

Successivamente, per ogni segmento miocardico sono stati calcolati strain subendocardico e strain subepicardico.

4.1.4 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando SPSS. Versione 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La presenza di relazione tra i parametri di deformazione quantificati (strain subendocardico, strain subepicardico e rapporto Epi/Endo) e l'età gestazionale è stata indagata tramite analisi di regressione lineare.

Per facilitare i calcoli statistici, l'età gestazionale è stata espressa in numeri decimali anziché settimane+giorni.

Il coefficiente p è stato determinato attraverso il test t di Student. L'ipotesi nulla è stata respinta per valori di $p < 0,05$.

La riproducibilità dei dati è stata determinata selezionando 30 esami (20 valutazioni in epoca fetale e 10 in epoca post-natale) in maniera randomizzata. La variabilità inter- e intra-osservatore è stata esaminata utilizzando sia il test di Pearson a due code sia l'analisi di Bland-Altman.

4.2 STUDIO ANATOMO PATOLOGICO

4.2.1 Popolazione dello studio

Sono stati studiati 20 cuori di feti di età gestazionale compresa tra 13 e 39 settimane di gestazione riferiti alla Patologia Cardiovascolare di Padova per l'esame autoptico durante il periodo compreso tra ottobre 2015 e marzo 2016. Nessuno dei cuori studiati presentava cardiopatia congenita o alterazioni anatomico-strutturali cardiache.

Le indicazioni all'esame autoptico sono state le seguenti: aborto spontaneo (4), interruzione volontaria di gravidanza (4), morte endouterina fetale (11) e morte perinatale a pochi minuti dalla nascita (1).

Le interruzioni volontarie di gravidanza sono state eseguite per: trisomia 21 (1), mosaicismo per trisomia 12 (1), artrogriposi (1) e cromosomopatia non definita (1). Le morti endouterine fetali (MEF) sono state refertate come "sine materia" a parte in due casi: in un feto con malrotazione intestinale si è verificata una peritonite che ha portato alla sepsi, mentre in un altro caso è stato repertato un giro di cordone ombelicale attorno al collo. In 3 casi di MEF era presente l'associazione di una restrizione di crescita. In uno di questi casi era presente anche l'inversione pericentrica del cromosoma 4. Per ogni feto studiato erano noti peso e misure antropometriche.

4.2.2 Materiale di studio

Per ogni cuore fetale sono stati effettuati un prelievo longitudinale in corrispondenza del margine ottuso del cuore e uno trasversale a livello medio-apicale. Al momento del prelievo, sono state scrupolosamente revisionate l'anatomia cardiaca e la regione dell'istmo aortico per escludere la presenza di un'eventuale coartazione. Anche l'anatomia extracardiaca è stata riesaminata. I prelievi sono stati effettuati con l'aiuto di un microscopio virtuale e di attrezzatura preposta. Al termine della procedura i campioni sono stati inclusi in paraffina per una notte, tagliati in fette dello spessore di 5 μ m e successivamente colorati con Ematossilina-Eosina (EE) e Azan-Mallory (Azan). Di alcune sezioni trasversali è stata fatta anche l'immunoistochimica con laminina-7 diluita 1:100.

Le sezioni longitudinali della parete laterale del ventricolo sinistro sono state studiate al fine di quantificare lo spessore dei tre layers formanti la parete, ovvero endocardio, mesocardio ed epicardio.

Delle sezioni trasversali, 4 non sono risultate analizzabili per macerazione del campione o frammentazione della parete laterale del ventricolo sinistro. Le restanti sono state analizzate al fine di studiare l'orientamento delle fibre della parte compatta del ventricolo sinistro.

Tra le sezioni trasversali, abbiamo poi selezionato i casi in cui fossero presenti fibre perpendicolari al piano di sezione, ovvero tagliate trasversalmente con un'angolatura di 0°, sia a livello endocardico che epicardico. Nei casi che presentavano questa caratteristica unita a scarsa macerazione (4), siamo passati ad analizzare tramite immunisto chimica diametro, roundness e densità dei cardiomiociti, rispettivamente endocardici ed epicardici.

4.2.3 Acquisizione ed elaborazione delle immagini

Le immagini delle sezioni istologiche sono state acquisite tramite una videocamera (Zeiss Video) connessa ad un microscopio ottico e ad un computer in cui è stato installato il programma Image Pro Plus, un software morfometrico.

Le sezioni sagittali sono state acquisite ad un ingrandimento 2,5x e il software morfometrico è stato successivamente calibrato su questa entità di ingrandimento. Per ogni sezione sono state fatte 3 misurazioni, rispettivamente di: spessore totale, parte trabecolata, endocardio ed epicardio. È stata utilizzata la colorazione tricromica Azan-Mallory, che ha permesso di distinguere i tre strati di fibre. Questa colorazione è detta tricromica perché è una combinazione di tre sostanze coloranti: l'azocarminio

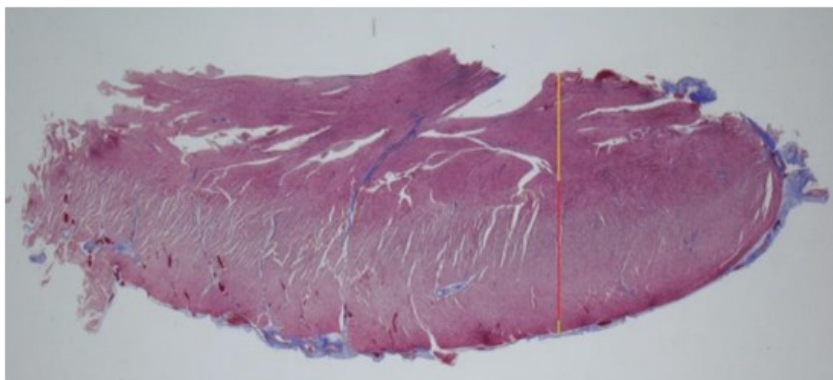


Figura 4.3. Esempio di campionamento degli spessori parietali.

colora di rosso-porpora le strutture acide, come i nuclei, l'orange G colora invece strutture basiche come il citoplasma, che sarà quindi arancione, mentre il collagene reagisce con il blu di anilina assumendo quindi una colorazione azzurrina. Nella sezione è stato quindi possibile distinguere chiaramente le fibre longitudinali di endocardio ed epicardio, colorate di rosso porpora, e le fibre del mesocardio, che presentavano una tonalità più chiara oltre che un diverso andamento. È stato infatti considerato mesocardio il layer di cellule tagliate perpendicolarmente al piano di sezione.

Il morfometro, tramite il comando "measurements" ha permesso di tracciare segmenti di retta direttamente sull'immagine. I valori ricavati dall'analisi dell'immagine sono stati poi salvati direttamente su Microsoft Excel, evitando quindi i passaggi di dati. Le misurazioni sono state condotte a livello medio-basale, evitando quindi la porzione più convessa della parete, ovvero quella che si trova in contiguità con l'anulus mitralico. L'unità di misura utilizzata è stata il micrometro (μm). Delle tre misurazioni contigue è stata poi considerata la media finale.

Le sezioni trasversali sono invece state acquisite tramite campionamenti contigui l'uno all'altro dal versante interno verso l'esterno. In questo caso è stata utilizzata la colorazione EE. Si tratta di una colorazione bicromica in cui in base al pH i componenti cellulari sono diversamente colorati. L'ematossilina infatti è un colorante basico che colora di violetto le strutture acide; l'eosina invece è un colorante acido che viceversa colora le strutture basiche, come i ribosomi contenuti nel citoplasma, la mucina e le proteine basiche. È stato considerato solamente il miocardio compatto, poiché nei cuori fetali le trabecole sono talmente prominenti da occupare tutto il lume e di conseguenza non permettere l'identificazione della parete che dà loro origine. Come precedentemente indicato, è stata studiata la parete laterale del ventricolo sinistro.

L'ingrandimento utilizzato è stato il 20x. Il morfometro è stato quindi successivamente calibrato su questa entità di ingrandimento. Ogni campionamento è stato diviso in 6 ROI della misura (riportare misura) e per ognuna di esse è stato riportato l'angolo prevalente di inclinazione delle fibre. Il software Image Pro-Plus permette infatti di misurare l'angolo compreso tra due segmenti, nel nostro caso quello sotteso tra la fibra e il piano della sezione. L'angolo è stato espresso in gradi. Gli angoli sono

poi stati interpretati in base al loro layer di appartenenza, è stata infatti eseguita una media aritmetica degli angoli registrati per ogni layer. In letteratura, non sono riportati studi che abbiano affrontato il tema dell'angolatura delle fibre miocardiche su sezione trasversa di cuore fetale, abbiamo quindi dovuto mettere a punto un nostro metodo.

Successivamente siamo passati a considerare i singoli cardiomiociti: abbiamo quindi studiato tramite immunostochimica quattro sezioni trasverse. In questo caso è stata utilizzata una colorazione immunostochimica per marcare con anticorpi monoclonali la laminina-7 (proteina componente della matrice extracellulare), permettendo di identificare le membrane cardiomiocitarie e distinguere una cellula dall'altra, cosa non possibile con le altre colorazioni nel miocardio fetale. Quest'ultimo, infatti, presentando un piccolissimo interstizio rispetto al miocardio adulto, rende molto difficoltosa l'identificazione dei cardiomiociti, che sono oltretutto anche di dimensioni molto minori. Abbiamo poi effettuato due campionamenti a livello trabecolare e due cam-

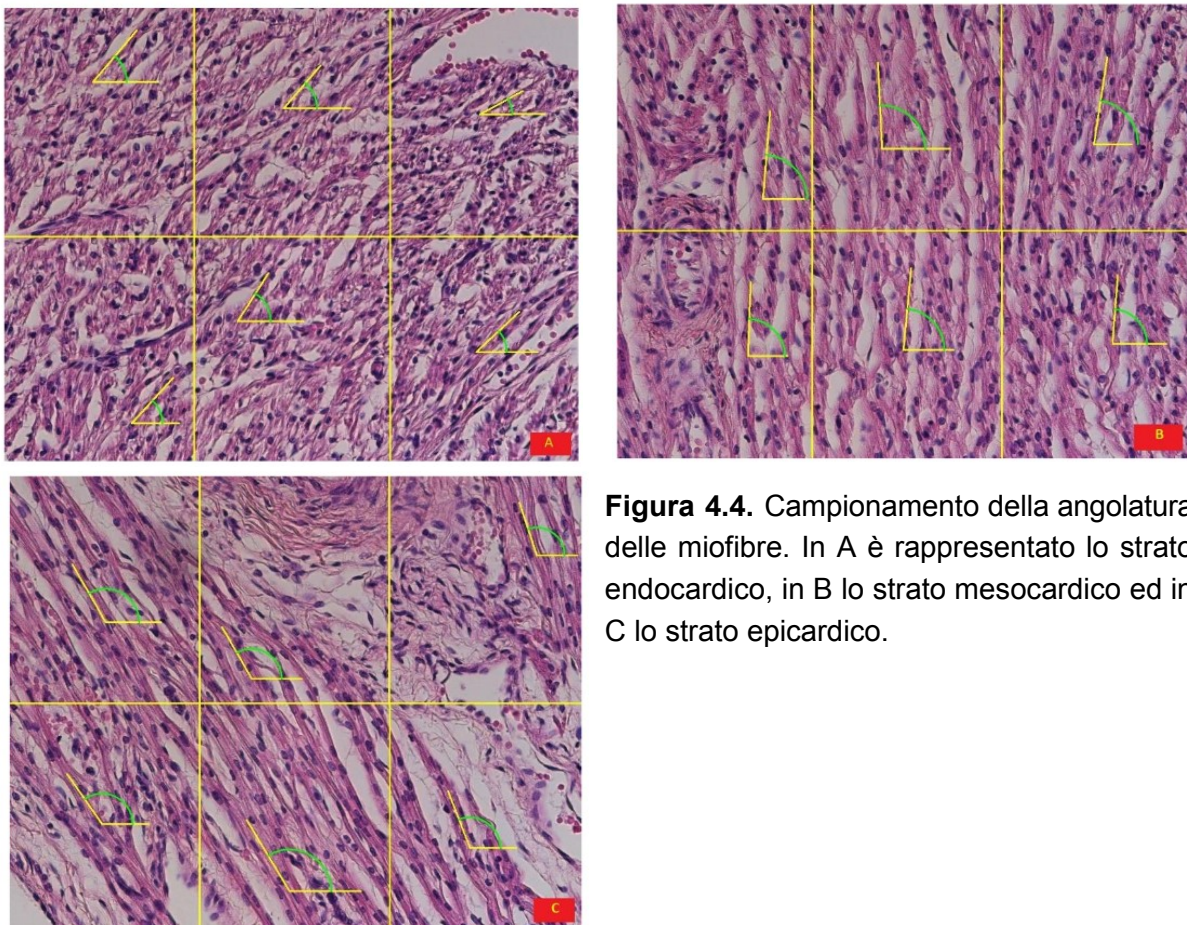


Figura 4.4. Campionamento della angolatura delle miofibre. In A è rappresentato lo strato endocardico, in B lo strato mesocardico ed in C lo strato epicardico.

pionamenti al livello più esterno, in questo modo abbiamo potuto studiare le fibre perpendicolari al piano di sezione, quelle che si presentavano tagliate “trasversalmente”. Abbiamo acquisito le aree di campionamento ad un ingrandimento di 40x e calibrato per fornire misurazioni coerenti con l’ingrandimento scelto. Nelle aree di campionamento si è proceduto, tramite l’opzione “count and size” a disegnare manualmente i contorni cellulari. Il software ha poi fornito la misurazione del diametro medio, maggiore e minimo e della roundness di ogni cellula. I nuclei dei cardiomiociti, tralasciando quelli delle cellule endoteliali, sono poi stati conteggiati tramite la funzione preposta. Le cellule tagliate trasversalmente ma che non presentavano nucleo nella sezione considerata sono state escluse dal conteggio. Il numero risultato è stato successivamente diviso per l’area del campo esaminato riportata in mm^2 . In questo modo si è ricavata la densità di cellule per campo. Per correggere però il dato di densità è stata poi quantificata l’area del campo effettivamente occupata da cardiomiociti. Per fare ciò, si sono studiate le sezioni trasverse corrispondenti agli stessi pazienti ma colorate in Azan-Mallory. Tramite la funzione “segmentation” il software ha riconosciuto il range di gradazione cromatica della colorazione dei cardiomiociti e li ha conseguentemente distinti dal tessuto connettivo e dalle cellule che non presentavano il nucleo nella sezione esaminata. Dall’immagine originaria è stata quindi creata un’immagine virtuale in cui per sottrazione è stato colorato di nero l’interstizio e il citoplasma delle cellule non nucleate, non rientrate nel conto dei cardiomiociti effettuato per la densità. Con la funzione “count and size” è stato quindi possibile quantificare l’area delle parti di campo escluse (nere). Le aree in questione sono poi state sottratte all’area del campo e il risultato è stato espresso come percentuale di campo occupata da cardiomiociti.

4.2.4 Analisi Statistica

I dati sono stati analizzati tramite il software di analisi statistica STATA 13. La presenza di relazione tra i valori raccolti e l’età gestazionale è stata indagata tramite analisi di regressione lineare. Il coefficiente p è stato poi determinato attraverso il test t di student. L’ipotesi nulla è stata respinta per valori di $p < 0,05$.

4.3 IL MODELLO NUMERICO

Il modello numerico è stato implementato tramite il codice agli Elementi Finiti SIMULIA Abaqus (v.6.14). Per trattare un problema così complesso, infatti, con geometria, condizioni al contorno e materiale particolari, sono necessarie delle avanzate tecniche computazionali. Tra queste, il metodo degli Elementi Finiti è uno dei più versatili e utilizzati in ambito meccanico. Questo metodo si basa sulla ricerca di una soluzione approssimata di un sistema di equazioni differenziali riscritto sotto forma di sistema algebrico lineare. Per la trattazione matematica completa del metodo si rimanda a Zienkiewicz¹⁴⁴.

L'analisi che ci si appresta a fare è non lineare, sia per materiale, perché si tratta di materiale iperelastico, sia per geometria, poiché si considerano grandi deformazioni. Inoltre, l'analisi verrà condotta in controllo di forze e non di spostamenti. Per semplicità, si è scelto di modellare solamente il solido (ventricolo) e non il fluido all'interno (sangue): così facendo, non sono stati considerati gli effetti dovuti alla loro interazione. Il modello analizzato è il ventricolo sinistro di un cuore fetale a diverse età gestazionali (20, 30 e 40 settimane).

Per il calcolo dei volumi si è scelto di utilizzare il metodo del cilindro e del semi-ellissoide perché a parità di dimensioni era quello che offriva la migliore stima del volume rispetto agli altri. Inoltre, considerata la difficoltà nella misurazione dello spessore delle trabecole, queste sono state escluse dalla modellazione (Fig. 4.5).

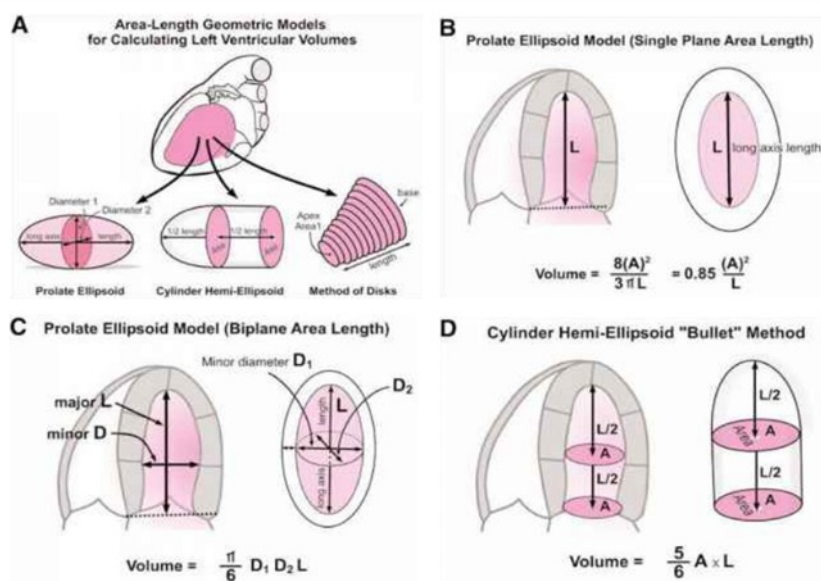


Figura 4.5. Metodi per la stima del volume del ventricolo sinistro a partire da misurazioni 2D ottenute con ecocardiografia. In questa trattazione è stato utilizzato il metodo D .

	20 SG		30 SG		40 SG	
	ED	ES	ED	ES	ED	ES
D_{int} [mm]	8	5	12	8	16	11
D_{est} [mm]	12	11	18	16	23	21
L_{int} [mm]	15	10	22	17	28	22
L_{est} [mm]	17	13	25	21	32	27
t [mm]	2	3	3	4	4	5
V [ml]	0,63	0,16	2,07	0,71	4,69	1,74

Tabella 4.1. Dimensioni adottate per il modello di ventricolo sinistro a diverse settimane gestazionali (SG), per la situazione a fine diastole (ED) e a fine sistole (ES).

Lo spessore parietale, quindi, è costituito solamente dal miocardio compatto. Si riportano in tabella 4.1 le dimensioni adottate per i tre modelli di ventricolo.

Queste misure si riferiscono al momento di fine diastole (ED) e di fine sistole (ES). La geometria così descritta è stata discretizzata con elementi solidi isoparametrici tetraedrici ad interpolazione lineare (8 nodi). Questi elementi sono formulati per includere gli effetti delle deformazioni finite (necessarie quando si tratta con un materiale iperelastico come quello utilizzato). Poiché il materiale è anche incomprimibile, per tenere conto di questa caratteristica ed evitare il fenomeno di blocco volumetrico (volumetric locking), sono implementati in Abaqus degli elementi "ibridi", nei quali le tensioni idrostatiche vengono trattate con un'interpolazione indipendente, accoppiate alla soluzione in spostamenti tramite un moltiplicatore di Lagrange. Per una trattazione più approfondita della formulazione matematica, si rimanda alla Documentazione di Abaqus¹⁴⁵. Dalla libreria di elementi disponibili, quindi, sono stati utilizzati gli elementi C3D8H, con integrazione completa su 8 punti Gauss. La mesh ha un numero variabile di elementi a seconda della geometria considerata per le tre età gestazionali (per le 40 settimane a fine sistole, ad esempio, è composta da 29176 elementi, 31740 nodi e 124396 gradi di libertà). Nonostante la geometria sia simmetrica rispetto all'asse centrale, non è stato possibile fare alcuna semplificazione per simmetria poiché il materiale (nello specifico, la presenza delle fibre) introduce un'asimmetria importante.

La necessità di rappresentare una variazione pressoché lineare dell'orientamento delle fibre muscolari sullo spessore parietale, ha portato a suddividere il solido in 7 gusci concentrici (fig. 4.6).

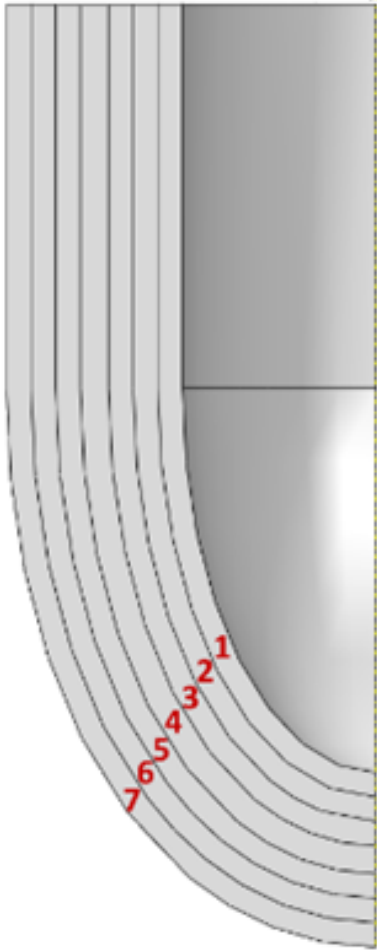


Figura 4.6. Rappresentazione schematica della struttura a gusci del modello di ventricolo. I numeri da 1 a 7 indicano i diversi strati.

Sullo spessore di ciascun guscio sono stati inseriti due elementi finiti, in modo da ottenere una soluzione sufficientemente accurata. Per qualsiasi geometria, quindi, sono presenti un totale di 14 elementi sullo spessore. In figura 4.7 è riportata la mesh per la geometria di 40 settimane a fine sistole. Le altre mesh sono del tutto simili a questa.

In letteratura esistono diversi modelli numerici di ventricolo e ciascuno è vincolato in modo diverso. Infatti, per modellare realisticamente il comportamento del ventricolo e la sua interazione con ciò che lo circonda è importante riprodurre le condizioni fisiologiche in cui si trova: collegato all'atrio sinistro tramite la valvola mitrale e separato dal ventricolo destro dal setto interventricolare; inoltre, è avvolto dall'epicardio e circondato da altri organi e tessuti.

Se non si presta attenzione a questo aspetto della modellazione, si potrebbero introdurre delle forze parassite, inficiando così l'accuratezza dell'analisi¹⁴⁶.

Si riportano di seguito i metodi più utilizzati per vincolare il ventricolo, dal più semplice al più complesso:

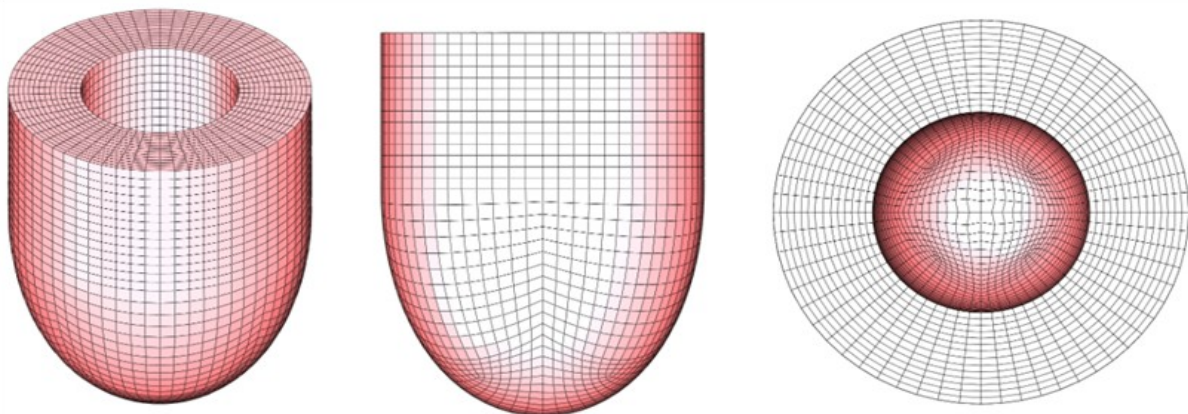


Figura 4.7. Mesh del ventricolo sinistro a fine sistole a 40 settimane gestazionali. Sullo spessore sono presenti 14 elementi, due per ciascun guscio in cui è stato suddiviso il solido.

- condizioni di Dirichlet applicate ai nodi della base (spostamenti impediti $u = 0$);
- condizioni di Dirichlet applicate ai nodi della base (spostamenti imposti $u = u_d$ ottenuti da indagini cliniche);
- condizioni di Dirichlet applicate ai nodi adiacenti alla valvola atrio-ventricolare (spostamenti impediti $u = 0$ o imposti $u = u_d$);
- inserimento di un anello in materiale rigido a livello della base che riproduca gli spostamenti ottenuti da indagini cliniche¹⁴⁷;
- inserimento di molle a livello della base per permettere al ventricolo di spostarsi liberamente in base alle sollecitazioni presenti.

Da questo elenco si evince che generalmente i vincoli vengono imposti solamente alla base del ventricolo, lasciando che il resto del solido si deformi liberamente. In alcuni studi è stato vincolato anche l'epicardio^{148,149}.

Poichè la trattazione qui presentata si basa su una geometria semplificata del ventricolo e non si è interessati a riprodurre fedelmente l'interazione tra il ventricolo e ciò che lo circonda, si è scelto di utilizzare il primo approccio: si sono vincolati gli spostamenti longitudinali di tutti i punti della base e gli spostamenti circonferenziali dei nodi sull'epicardio nel piano della base. Le superfici interna ed esterna sono libere di deformarsi in risposta alle sollecitazioni. Benchè molto semplice, questa configurazione di vincolo ha permesso comunque di ottenere risultati interessanti, che verranno descritti nei prossimi capitoli.

4.3.1 Carichi

Come detto in precedenza, l'analisi verrà fatta a forze imposte e non a spostamenti imposti. Una modellazione più accurata comporterebbe l'interazione fluido-solido, che qui non viene considerata.

È da notare, infatti, che volume del ventricolo e pressione all'interno della cavità sono due grandezze intimamente legate, dove la prima è causa della seconda: escludendo i rami volumetrici dell'equazione di Frank-Starling, è la variazione di volume (sia durante la diastole che durante la sistole) che provoca una variazione di pressione. Nello specifico, la dilatazione diastolica del ventricolo richiama sangue all'interno della cavità e ne aumenta la pressione; allo stesso modo, la contrazione sistolica

	20 SG	30 SG	40 SG
P_{diast} [mmHg]	16.5	23.5	30
P_{sist} [mmHg]	47	65	82

Tabella 4.2. Pressioni intraventricolari a fine diastole (P_{diast}) e a fine sistole (P_{sist}) per il ventricolo sinistro a diverse settimane gestazionali (SG)¹⁵⁰.

	20 SG	30 SG	40 SG
P_{diast} [mmHg]	8	10	12
P_{sist} [mmHg]	47	65	82

Tabella 4.3. Pressioni intraventricolari a fine diastole (P_{diast}) e a fine sistole (P_{sist}) per il ventricolo sinistro a diverse settimane gestazionali (SG).

eietta il sangue nell'aorta portando la pressione al picco sistolico.

Data la mancanza del fluido nel modello, esso viene sostituito da una pressione equivalente, uniforme sulla superficie dell'endocardio e diretta perpendicolarmente ad essa. Il carico è stato applicato in modo incrementale per step progressivi. Si trascurano eventuali differenze di pressione all'interno del ventricolo, che fisiologicamente sono invece presenti. I valori di pressione a fine diastole e a fine sistole alle varie settimane gestazionali sono ottenuti con le seguenti relazioni¹⁵⁰:

$$P_{diast}(tg) = 2.490 + 0.702tg$$

$$P_{sist}(tg) = 12.520 + 1.742tg$$

dove la pressione P è espressa in mmHg e tg sono le settimane di gestazione. In tabella 4.2 sono riportati i valori ottenuti.

Confrontando questi valori con quelli presenti in¹⁵¹, ci si è resi conto che le pressioni di fine diastole sono sovrastimate, perciò sono stati adottati dei valori più plausibili, riportati in tabella 4.3.

In ogni caso, si è scelto di effettuare l'analisi con entrambi questi set di pressioni, ipotizzando che il set della tabella 4.3 si riferisca alla condizione fisiologica e il set di tabella 4.2 si riferisca alla condizione patologica.

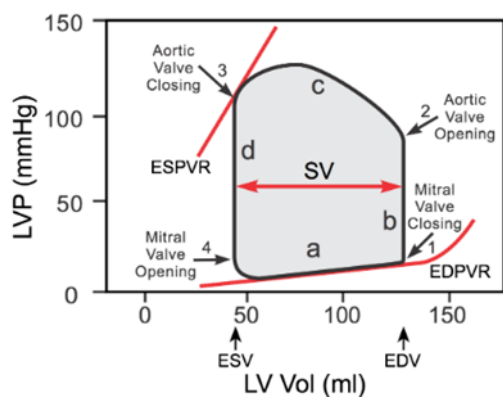


Figura 4.8. Ciclo pressione-volume del ventricolo sinistro. La fase di diastole, durante la quale avviene il rilassamento del muscolo cardiaco, comprende i rami d e a del grafico; la fase di sistole, invece, durante la quale avviene la contrazione, comprende i rami b e c. La differenza tra il volume massimo e minimo di sangue nel ventricolo è la gittata sistolica (SV), un importante indice di funzionalità cardiaca

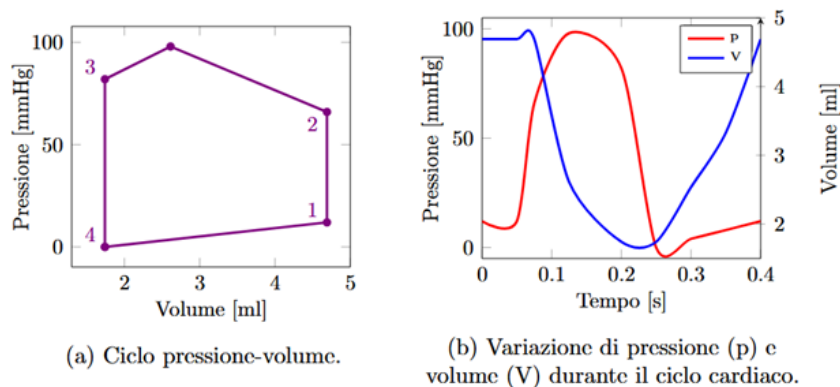


Figura 4.9. Rappresentazione del ciclo cardiaco del ventricolo sinistro a 40 settimane gestazionali su due piani diversi: in (a) nel piano pressione-volume, in (b) nel piano pressione-tempo e volume-tempo.

Dati i valori di volume del ventricolo e le pressioni, vengono determinati due punti del ciclo pressione-volume. Il punto 4 è univocamente determinato dal volume minimo e dalla pressione nulla per definizione. Per determinare gli altri punti e disegnare univocamente il ciclo, in mancanza di altri dati, si è deciso di “scalare” il ciclo cardiaco del ventricolo adulto in modo proporzionale per ottenere quello fetale. In figura 4.9 sono riportati il grafico pressione-volume e la variazione della pressione e del volume rispetto al tempo così ottenuti per il ventricolo sinistro a 40 settimane gestazionali. I grafici che si ottengono con la medesima procedura per le altre età gestazionali sono del tutto simili a questi. Per quanto riguarda la diastole, tutte le analisi svolte per pressioni fisiologiche e patologiche, sono state fatte procedere fino alla pressione di 30 mmHg. Questa scelta è giustificata dal fatto che si è voluto validare il modello confrontandolo con una relazione pressione-volume di fine diastole (End Diastolic Pressure Volume Relationship - EDPVR) che richiedeva di conoscere il volume del ventricolo a 30 mmHg.

La legge costitutiva scelta è stata quella proposta da Holzapfel et al.^{125,143} che era già implementata nel codice utilizzato Abaqus e che descrive un materiale trasversalmente isotropo. Questa legge è stata formulata per il tessuto arterioso, ma può essere adottata anche per quello miocardico. Infatti, ci sono diverse caratteristiche che accomunano questi due tessuti: entrambi sono da considerarsi materiali anisotropi iperelastici incompressibili e fibro-rinforzati, tutte ipotesi che si trovano alla base della formulazione della legge costitutiva.

Dalla guida teorica contenuta nella Documentazione di Abaqus, si riporta la funzione adottata per l'energia di deformazione per unità di volume:

$$U = C_{10}(\bar{I}_1 - 3) + \frac{1}{D} \left(\frac{(J^{el})^2 - 1}{2} - \ln J^{el} \right) + \frac{k_1}{2k_2} \sum_{\alpha=1}^N \{ \exp[k_2 \langle \bar{E}_\alpha \rangle^2] - 1 \} \quad (4.1)$$

con

$$\bar{E}_\alpha = \kappa(\bar{I}_1 - 3) + (1 - 3\kappa)(\bar{I}_{4(\alpha\alpha)} - 1)$$

dove C_{10} , D , k_1 , k_2 e $\hat{\epsilon}$ sono parametri del materiale, I_1 è il primo invariante della componente deviatorica della deformazione, J^{el} è il rapporto tra il rapporto volumetrico totale e il rapporto volumetrico termico, N è il numero di famiglie di fibre presenti nel tessuto ($N=2$ nel caso delle arterie e $N=1$ nel caso del miocardio) e $I_{4(\alpha\alpha)}$ sono degli pseudo invarianti di C e A_α (per le definizioni di questi termini si veda il paragrafo 3.2). Poiché il materiale è da considerarsi incomprimibile, l'implementazione interna della legge in Abaqus impone di porre $D=0$ nell'equazione 4.1.

Il modello assume che le fibre di ciascuna famiglia siano disposte con un certo grado di dispersione rispetto a una direzione media. Il grado di dispersione è dato dal coefficiente $\hat{\epsilon}$ ($0 \leq \hat{\epsilon} \leq 1/3$): se $\hat{\epsilon}=0$ le fibre sono tutte allineate e non c'è alcuna dispersione; se $\hat{\epsilon}=1/3$ le fibre sono orientate in modo casuale e il materiale diventa isotropo. Non avendo informazioni precise sul grado di dispersione da adottare, si è scelto $\hat{\epsilon}=0$. Il termine E_α caratterizza la deformazione della famiglia di fibre con direzione media A_α . Una delle ipotesi alla base del modello è che le fibre siano in grado di resistere a soli sforzi di trazione e non di compressione: difatti il contributo delle fibre è non nullo solo quando le fibre sono in trazione, cioè quando $E_\alpha > 0$. Questa condizione è rafforzata dalla presenza dell'operatore $\langle \cdot \rangle$ che è definito come $\langle x \rangle = 1/2(|x| + x)$.

I restanti parametri C_{10} , k_1 e k_2 sono stati calibrati per ottenere il volume di fine diastole previsto (tab. 4.1) alla pressione di fine diastole prevista, come è stato fatto in^{126,147}. Il processo di calibrazione è stato fatto separatamente per tutte e tre le analisi e per i due set di pressioni.

È da notare che in altri studi^{126,127,152} i parametri del modello sono stati scelti in modo da ottenere una buona interpolazione dei dati da prove sperimentali. In assenza di questi dati questo approccio non è stato qui utilizzato.

Per verificare la corretta implementazione della legge costitutiva nel modello, si è dimostrato che il materiale utilizzato è trasversalmente isotropo e che è possibile as-

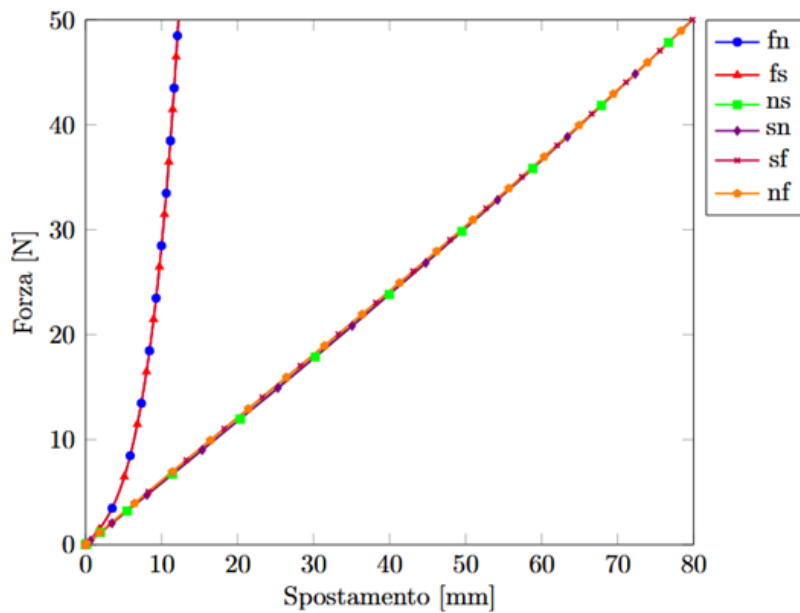


Figura 4.10. Prove di taglio tramite analisi numeriche su cubetti in cui è stata implementata la legge costitutiva di¹²⁵. Le prove di taglio sono quelle riportate in figura 2.3a mantenendo le stesse convenzioni di nomenclatura.

segnare un'angolazione precisa alle fibre miocardiche.

Sono state riprodotte, quindi, le sei prove a taglio descritte in figura 2.3a su un cubetto di materiale. I risultati sono riportati nel grafico 4.10, dove sono state mantenute le stesse abbreviazioni per indicare le diverse prove.

Come era già stato evidenziato al paragrafo 2.2, il materiale ha la massima rigidezza quando la prova è condotta lungo i piani fs e fn, gli unici in cui vengono sollecitate le fibre, e non c'è distinzione tra i due casi proprio perché il materiale è trasversalmente isotropo. Infatti, anche le restanti quattro prove sono del tutto identiche perché sollecitano solamente la matrice extracellulare che è isotropa.

4.3.2 Analisi di sensitività

È stata fatta, quindi, una piccola analisi di sensitività sui coefficienti della legge costitutiva per indagare quali tra questi influenzassero maggiormente la rigidezza del materiale e, di conseguenza, la variazione di volume all'interno del solido. Per semplicità, è stato modellato un cilindro incastrato alle basi, la cui lunghezza è di almeno un ordine di grandezza più grande del diametro. È stata applicata una pressione uniforme sulla superficie interna ed è stato misurato lo spostamento radiale dei punti appartenenti alla circonferenza in mezzeria. Poiché il cilindro è molto lungo, gli effetti della presenza dei vincoli sulle basi sono quasi del tutto inesistenti nella sezione centrale.

Per l'analisi iniziale sono stati utilizzati i valori dei parametri del materiale adottati in¹⁴⁷ (si veda la tabella 4.4), dopodiché ciascun coefficiente singolarmente è stato modificato di un ordine di grandezza in più e in meno ed è stata ripetuta l'analisi.

In figura 4.11 sono riportati i risultati dell'analisi.

Da questi si evince che il parametro C_{10} , che rappresenta la matrice extracellulare, non è particolarmente rilevante; al contrario, i coefficienti k_1 e k_2 , che riguardano il comportamento delle fibre, se modificati determinano un apprezzabile cambio di rigidità del materiale. In accordo con queste considerazioni, si vedrà nel seguito che i coefficienti adottati per le restanti analisi non differiranno notevolmente in termini di C_{10} , bensì in termini di k_1 e k_2 .

L'obiettivo principale di questo studio è quello di valutare l'influenza che ha l'orientamento delle fibre sulla funzionalità ventricolare e viceversa: infatti durante lo sviluppo fetale si osserva un progressivo riorientamento delle fibre¹³⁰ (fenomeno che viene alterato nel caso di cardiopatie¹⁵³) e non è raro riscontrarlo anche in età adulta. Ipotizzando che la Natura tenda sempre ad ottimizzare le risorse per ottenere il massimo risultato, si suppone che questo riorientamento sia necessario per ottenere una maggiore performance cardiaca nel feto e per compensare delle insufficienze dovute a patologie nell'adulto¹⁵⁴.

C_{10} [MPa]	0.0014
D [-]	0
k_1 [MPa]	0.0001
k_2 [-]	0.01

Tabella 4.4. Parametri della legge costitutiva di¹²⁵ adottati in¹⁴⁷.

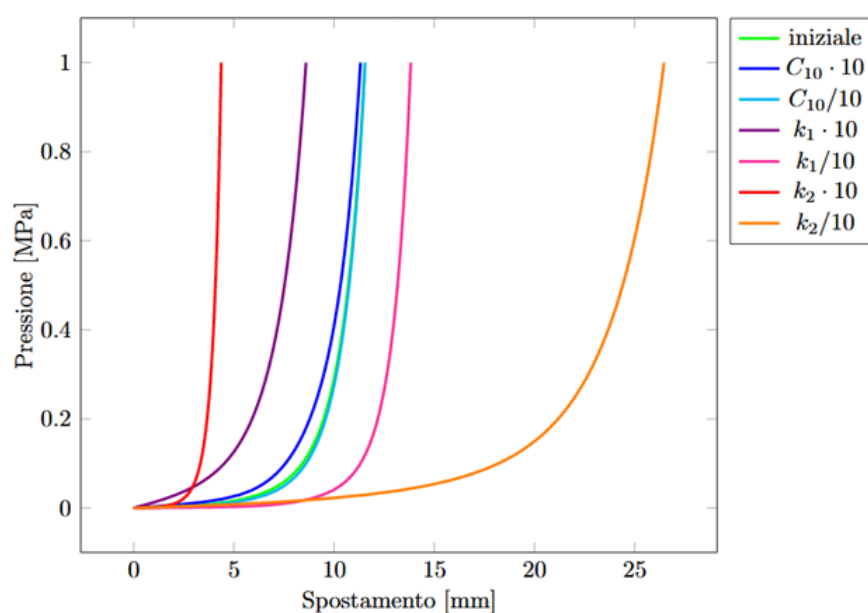


Figura 4.11. Analisi di sensitività dei parametri della legge costitutiva proposta da Holzapfel et al.¹²⁵

Ciascun parametro è stato aumentato e diminuito di un ordine di grandezza a partire dai valori riportati in tab. 4.4.

	20 SG	30 SG	40 SG
Strato 1 (endo)	60°	60°	60°
Strato 2	40°	40°	40°
Strato 3	20°	20°	20°
Strato 4	0°	0°	0°
Strato 5	0°	0°	-20°
Strato 6	-10°	-30°	-40°
Strato 7 (epi)	-60°	-60°	-60°

Tabella 4.5. Angolazione delle fibre muscolari negli strati del ventricolo sinistro (figura 4.6) di un feto a diverse settimane gestazionali (SG). Gli angoli sono considerati positivi per rotazioni antiorarie; la direzione circonferenziale ha angolazione pari a 0°.

Durante l'età fetale, all'interno del ventricolo sinistro, vi è una predominanza dello strato subendocardico, in termini di deformazione muscolare: ciò indica come sia proprio quest'ultimo a determinare la funzionalità longitudinale cardiaca nel periodo intrauterino, con un ruolo minore dello strato subepicardico. Per le tre analisi a diverse età gestazionali sono stati indagati diversi orientamenti delle fibre. In accordo con i dati raccolti in, la variazione di angolatura trasmurale è sostanzialmente lineare, come era già stato dimostrato in¹³² nei cuori canini. Per simulare questa situazione, la geometria semplificata del ventricolo è stata suddivisa in 7 gusci concentrici, a ciascuno dei quali è stato assegnato un orientamento uniforme delle fibre cardiache (si veda la figura 4.6). Ogni strato è contraddistinto da un numero, da 1 a 7, di modo da definire univocamente a quale strato è stata assegnata una determinata angolatura. Il numero di gusci è stato scelto in modo da essere sufficientemente grande per avere una variazione quasi lineare dell'orientamento delle fibre, ma abbastanza piccolo da non richiedere un numero eccessivo di elementi finiti sullo spessore parietale e aumentare esageratamente il costo computazionale dell'analisi.

È importante evidenziare come, nell'assegnare l'angolazione delle fibre ai diversi strati, si è preso in considerazione lo stadio di sviluppo a cui si trova il ventricolo, in particolare la preponderanza o meno dello strato subendocardico su quello subepicardico. Infatti, per l'analisi a 20 settimane gestazionali, lo strato più interno è quello più rilevante meccanicamente, al contrario della situazione a 40 settimane, quando endocardio ed epicardio assumono sostanzialmente la stessa importanza; a 30 settimane la situazione è intermedia tra le due. In tabella 4.5 si riportano gli orientamenti delle fibre adottati per le analisi iniziali che rispecchiano la situazione fisiologica osservata.

5. RISULTATI

L'analisi dei dati mediante *Speckle tracking* è stata possibile in tutti i 72 feti studiati, grazie alla buona qualità delle immagini 2D per la selezione dei volontari in base alla qualità della finestra ecocardiografica. A questi sono stati aggiunti 39 feti prematuri, privi di cardiopatie emodinamicamente rilevanti. Anche in questo caso l'analisi dei dati è stata possibile nel 100% dei casi per la selezione dei casi all'atto dell'arruolamento.

Per quanto riguarda l'anatomia patologica, l'esame morfometrico delle sezioni sagittali è stato possibile in tutti i 20 cuori fetali; l'analisi delle sezioni trasverse è invece stata effettuata solo in 16 casi a causa dell'elevata macerazione del campione e degli artefatti da fissazione e taglio.

L'analisi dei diametri e delle densità cellulari è stata effettuata solamente in 4 preparati istologici a causa delle limitazioni tecniche legate a questo tipo di studio.

5.1 VALORI MEDI DI STRAIN LONGITUDINALE SUBENDOCARDICO, SUBEPI-CARDICO E RAPPORTO DI EPICARDIO/ENDOCARDIO

In Tabella 5.1 sono riportate le medie dello strain longitudinale globale di endocardio ed epicardio del ventricolo sinistro. Le medie risultano dai valori dei sei segmenti in cui il software ha diviso il ventricolo sinistro: setto basale, medio e apicale e parete libera basale, media e apicale.

sg	Endo	Epi	Ratio	SD ratio
17-20,0	-26,5422	-15,5128	0,581667	0,079206
20,1-24,0	-27,1508	-16,8838	0,623243	0,072267
24,1-29,0	-24,93	-16,4213	0,664167	0,088951
29-34,0	-22,5797	-15,8247	0,70125	0,072234

Tabella 5.1. Valori medi e deviazione standard di strain (%) subendocardico e subepicardico e rapporto Epi/Endo in rapporto a 4 gruppi di età gestazionali.

L'età gestazionale è stata espressa come numero decimale anziché come settimane+giorni. In virtù di quest'ultima, i pazienti sono stati ordinati in ordine crescente.

5.1.1 Variabilità inter- ed intra- osservatore

La variabilità intra-operatore ha ottenuto una $R=0,92$; $p<0,001$. L'errore medio intra-operatore è stato del 2,3%. La variabilità inter-operatore ha dimostrato una $R=0,88$, $p<0,001$, la variabilità inter-operatore ha mostrato un errore medio del 3,5%.

5.1.2 Relazione tra deformazione sub endocardica ed età gestazionale

L'analisi di regressione lineare semplice tra i parametri "Media Endo" e "sg" (settimane gestazionali) ha mostrato una relazione negativa tra l'aumento dell'età fetale e la deformazione dello strato più interno del miocardio, con una R pari a 0,41 ($p<0,001$) (Figura 5.1).

È bene specificare che si tratta di una correlazione negativa in quanto la deformazione delle fibre endocardiche si riduce (meno negativa) all'aumentare delle settimane gestazionali.

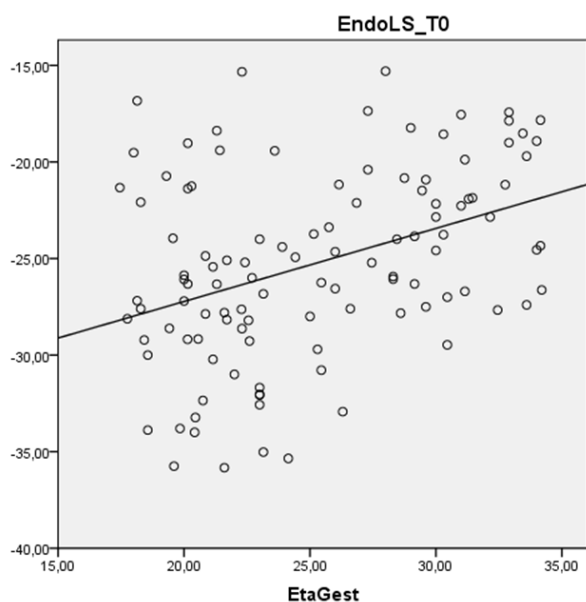


Figura 5.1. Il grafico mostra l'andamento dello strain longitudinale (asse y) endocardico in relazione all'aumento dell'età gestazionale (asse x).

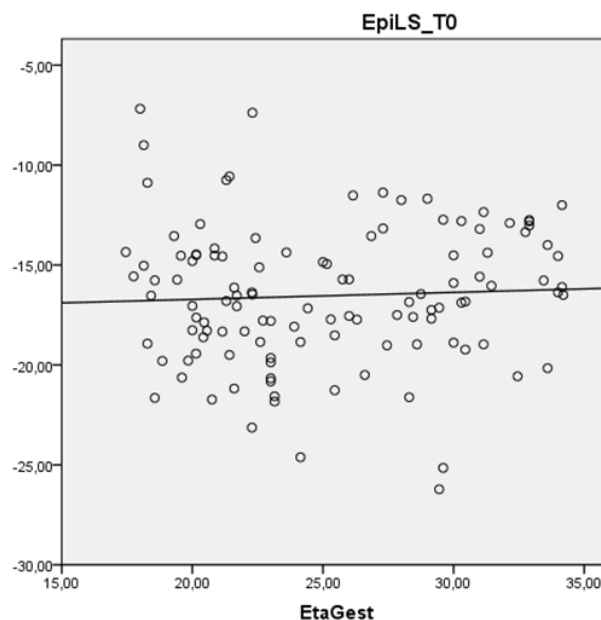


Figura 5.2. Il grafico mostra l'andamento dello strain longitudinale epi-cardico (asse y) in relazione all'aumento dell'età gestazionale (asse x).

5.1.3 Relazione tra deformazione sub epicardica ed età gestazionale

L'analisi di regressione lineare semplice tra i parametri "Media Epi" e "sg" (settimane gestazionali) ha mostrato un'assenza di relazione tra l'aumento dell'età fetale e la deformazione dello strato più esterno del miocardio, con un coefficiente di $(R=0,004; P=0,63)$ (Figura 5.2).

A differenza delle fibre endocardiche, quindi, le fibre epicardi che mantengono inalterata la loro magnitudine di deformazione, sebbene il raggio del ventricolo sinistro e le pressioni sistolica e telediastolica aumentino con l'età gestazionale.

5.1.4 Relazione tra rapporto epi/endo ed età gestazionale

Di conseguenza, il rapporto tra deformazione longitudinale epicardica e deformazione endocardica aumenta col passare delle settimane gestazionali, con una $R=0,51$ ($p<0,0001$), passando da 0,5 a 18 sg a 0,75 al termine della gravidanza.

Per ottenere il modello matematico di funzione ventricolare discusso nei paragrafi seguenti, sono state ottenute le misure di diametri cavitari, spessori parietali e massa del ventricolo sinistro secondo il modello "Bullet" cilindro-semiellissoide.

I diametri parietali, trasversali e longitudinali sono espressi dalle funzioni e dai grafici riportati di seguito.

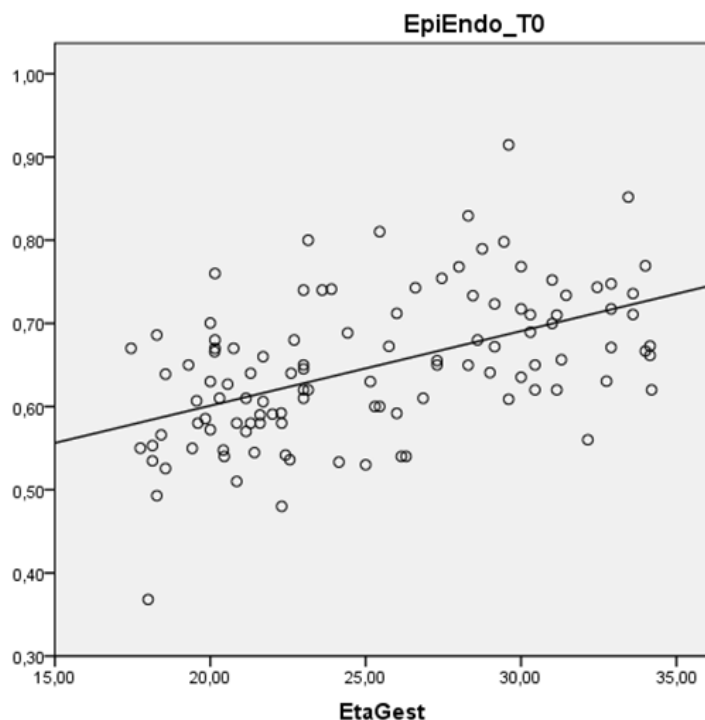


Figura 5.3. Il grafico mostra l'andamento del rapporto Epi/Endo in relazione all'aumentare dell'età gestazionale.

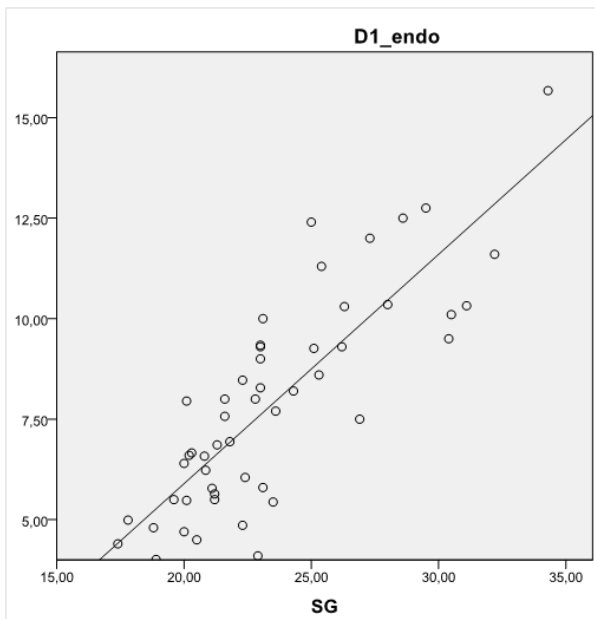


Figura 5.4. Curva di crescita del diametro trasverso basale del ventricolo sinistro all'aumentare dell'età gestazionale. La relazione è lineare con una $R=0,83$; $p<0,0001$,

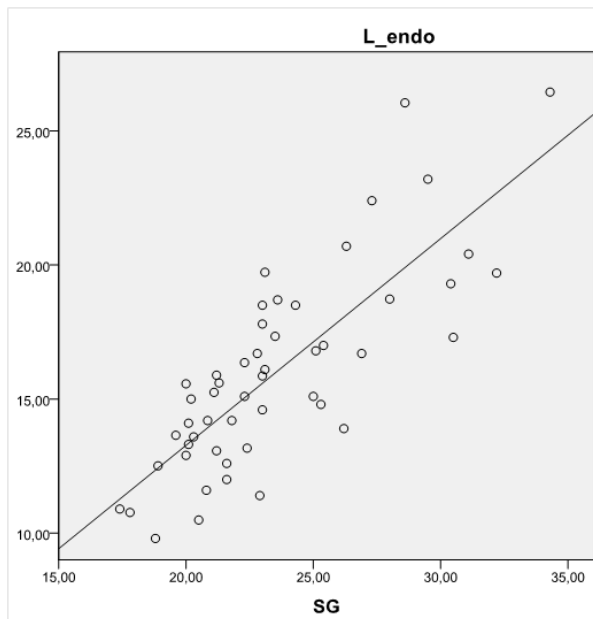


Figura 5.5. Curva di crescita della lunghezza endocavitaria del ventricolo sinistro all'aumentare dell'età gestazionale. La relazione è lineare con una $R=0,80$; $p<0,0001$,

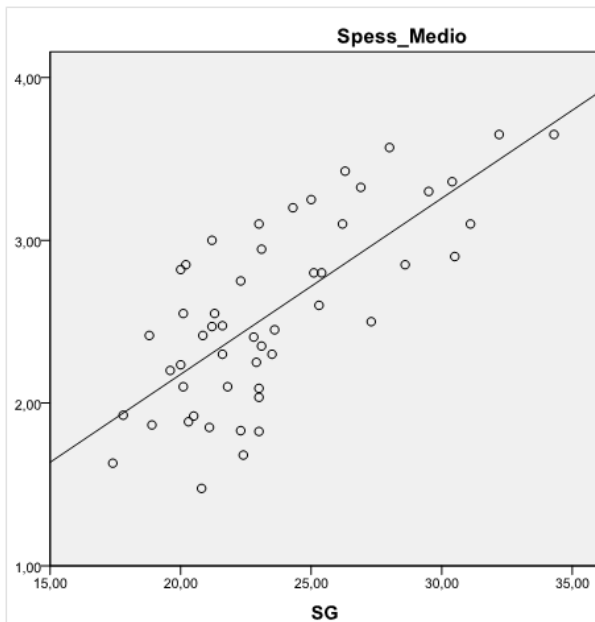


Figura 5.6. Curva di crescita dello spessore medio del ventricolo sinistro all'aumentare dell'età gestazionale. La relazione è lineare con una $R=0,73$; $p<0,0001$.

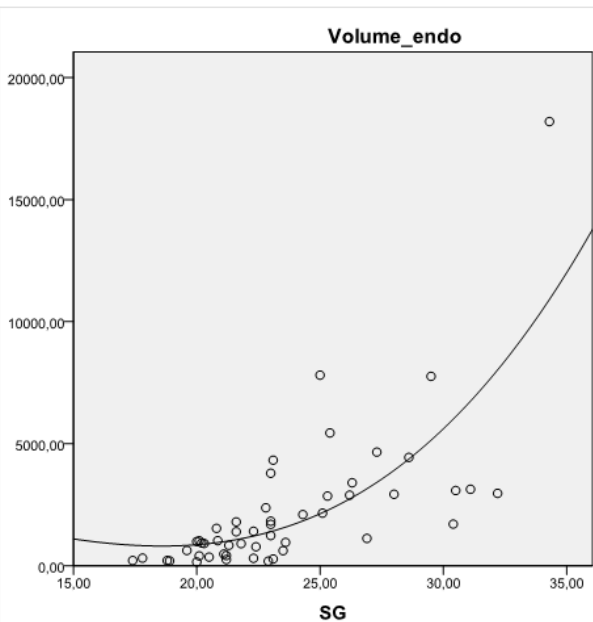


Figura 5.7. Curva di crescita del volume endocavitario del ventricolo sinistro. La relazione è cubica con una $R=0,73$; $P<0,0001$.

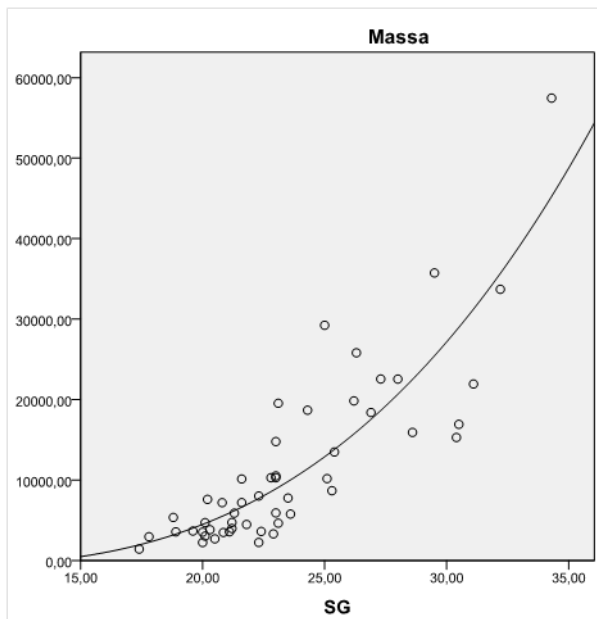


Figura 5.8. Curva di crescita della massa del ventricolo sinistro. La relazione è cubica con una $R=0,86$; $P<0,0001$.

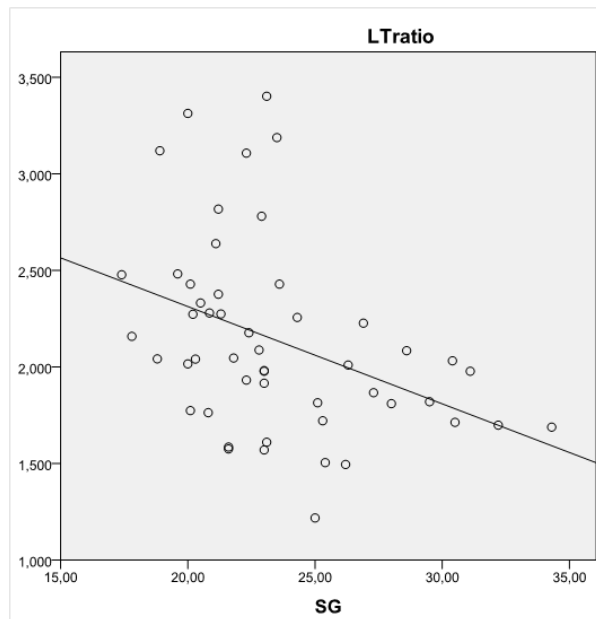


Figura 5.9. rapporti tra diametro longitudinale e trasverso del ventricolo sinistro. La relazione è lineare con una $R=0,39$; $P<0,001$.

Come atteso, i diametri aumentano secondo una funzione lineare mentre volumi e massa miocardica aumentano al progredire delle settimane gestazionali con una funzione cubica.

5.2 STUDIO ISTOLOGICO

In tabella 5.2 sono riportati i valori medi di spessore parietale della parete totale, della parte trabecolata, e di endocardio, mesocardio ed epicardio nei campioni istologici analizzati.

Anche dalle misurazioni istologiche si apprezza come vi sia una relazione lineare di crescita degli spessori parietali all'avanzare dell'età gestazionale ($R=0,90$; $p<0,0001$).

Questo trend di crescita è valido sia per lo studio dello spessore globale della parete sia per l'incremento dei singoli layers: per lo spessore medio delle trabecole ($R=0,80$; $p<0,0001$), per lo spessore endocardico ($R=0,89$; $p<0,0001$), per lo spessore mesocardico ($R=0,64$; $p=0,002$) ed infine per quello epicardico ($R=0,91$; $p<0,0001$).

sg	M Spessore	M Trabecole	M Endo	M Meso	M Epi
13	1305,15	417,00	731,51	501,22	72,42
14	1522,75	531,65	611,15	810,89	100,71
16	1737,61	701,65	941,94	625,76	169,91
18	2339,90	904,45	1201,81	686,76	451,34
19	2320,32	1010,29	1162,13	968,98	189,21
20	2955,75	831,86	1552,22	1113,28	290,27
22	2939,82	1139,83	1162,84	1435,39	341,59
24	3761,43	1454,39	1765,83	1418,47	577,14
25	2338,06	1449,56	1552,22	592,86	192,92
25	2720,68	455,93	1135,95	1161,95	422,78
26	2847,41	823,06	1616,28	562,62	668,52
26	3501,90	1080,73	1668,79	1237,11	596,00
26	1901,97	681,07	789,08	834,97	278,08
27	2779,80	540,74	1274,16	1105,87	399,77
29	2741,59	801,77	1357,52	784,07	600,02
32	4432,73	2004,79	2696,57	734,32	1001,84
34	5065,49	1341,60	2378,77	1647,77	1038,94
38	6022,72	2078,14	2958,06	1927,23	1136,89
40	6267,94	2378,87	2898,26	1974,77	1394,91
40	5067,26	2284,96	2821,24	1192,93	1053,10

Tabella 5.2. Spessori medi (mm) divisi per layer alla valutazione istologica.

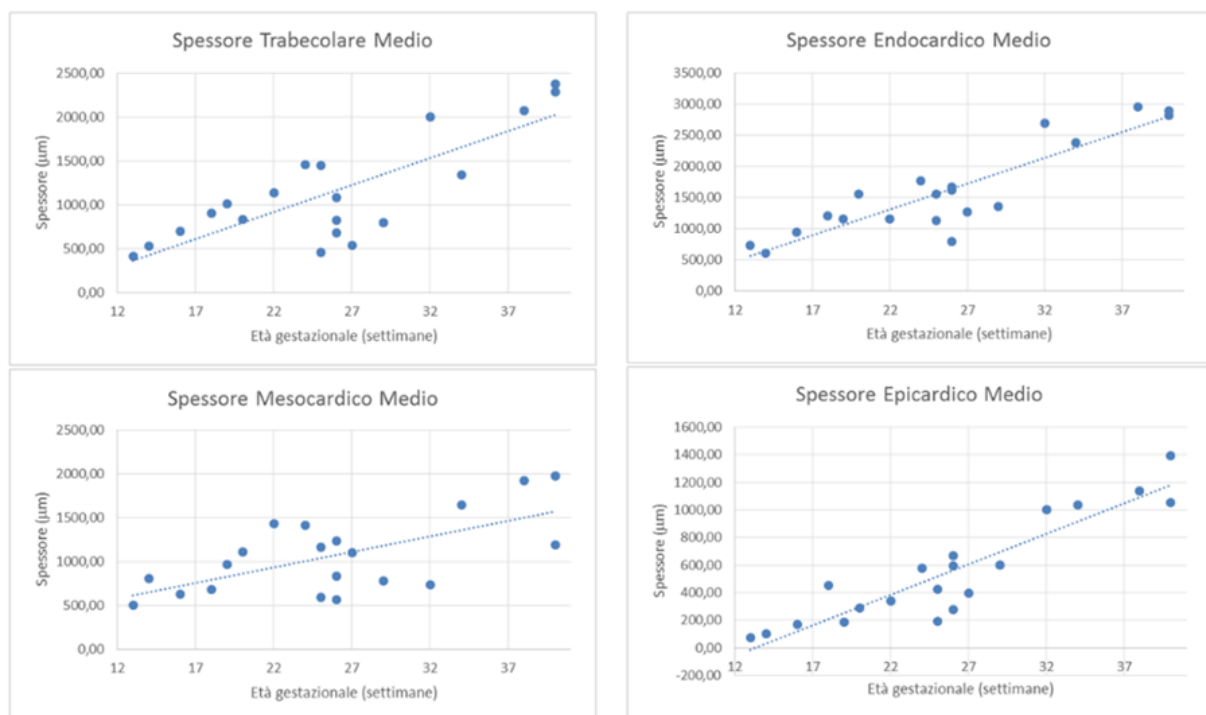


Figura 5.10. Rappresentazioni grafiche dell'andamento dei valori assoluti dei vari layers (asse y) in relazione all'aumento dell'età gestazionale (asse x). In alto a sinistra è possibile vedere il trend dello spessore medio trabecolare, in alto a destra si può invece apprezzare l'andamento dello spessore medio endocardico. In basso a sinistra è riportato lo spessore mesocardico medio, mentre in basso a destra si può vedere il trend dello spessore epicardico medio.

sg	% trabecole	%endo	% Meso	% Epi	Epi/Endo
13	31,95	56,05	38,4	5,55	0,10
14	34,91	40,13	53,26	6,61	0,16
16	40,38	54,21	36,02	9,77	0,18
18	38,65	51,36	28,74	19,29	0,38
19	43,54	50,08	41,77	8,15	0,16
20	28,14	52,51	37,67	9,82	0,19
22	38,77	39,55	49,05	11,62	0,29
24	38,66	46,94	37,72	15,34	0,33
25	61,1	66,39	25,36	8,25	0,12
25	16,75	41,75	42,71	15,54	0,37
26	28,9	56,76	19,76	23,48	0,41
26	51,6	47,65	35,33	17,02	0,36
26	35,8	41,48	43,9	14,62	0,35
27	19,45	45,84	39,78	14,38	0,31
29	29,24	49,51	28,61	21,88	0,44
32	45,23	60,83	16,57	22,6	0,37
34	26,48	46,96	32,53	20,51	0,44
38	34,5	49,11	32,01	18,88	0,38
40	37,95	46,24	31,51	22,25	0,48
40	45,1	55,67	23,55	20,78	0,37

Tabella 5.3. Valori di spessore percentuale per ogni layer.

5.2.1 Valori percentuali di spessore dei diversi layers

In tabella 5.3 sono riportati i valori percentuali di spessore dei diversi layers nei singoli campioni istologici analizzati. Le percentuali sono state ottenute dal rapporto tra lo spessore di un dato layer e lo spessore totale miocardico.

Rispetto agli spessori totali, la rappresentazione tramite percentuale ci consente di apprezzare la crescita dei diversi layers rispetto agli altri. Ogni layer infatti continua a crescere con il progredire dell'età gestazionale, ma non tutti lo fanno con la stessa entità.

Per le trabecole infatti possiamo notare come, nonostante una crescita in spessore statisticamente significativa, il valore percentuale tenda a conservarsi durante la gestazione ($R=0,028$; $p=0,91$). Un analogo trend si è riscontrato per l'endocardio ($R=0,05$; $p=0,80$). Il mesocardio tende a ridurre la propria percentuale di pertinenza ($R=-0,51$; $p=0,02$), mentre, al contrario, l'epicardio tende ad acquistare spessore relativo nel tempo, passando dal 5 al 25% nel corso della gestazione ($R=0,76$;

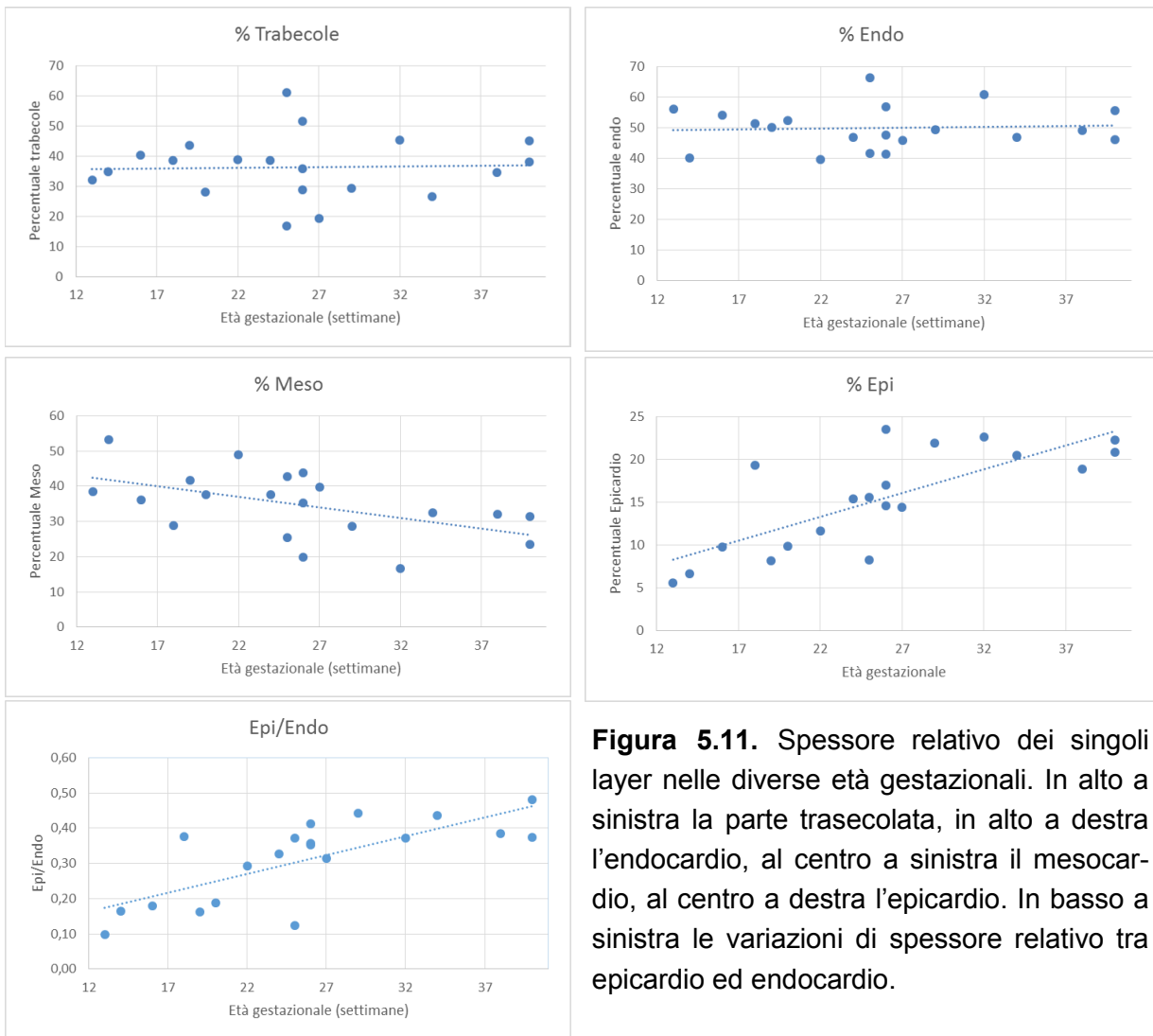


Figura 5.11. Spessore relativo dei singoli layer nelle diverse età gestazionali. In alto a sinistra la parte trasecolata, in alto a destra l'endocardio, al centro a sinistra il mesocardio, al centro a destra l'epicardio. In basso a sinistra le variazioni di spessore relativo tra epicardio ed endocardio.

$p < 0,0001$). Il rapporto Epi/Endo, similmente per quanto visto per lo strain, aumenta con il progredire dell'età gestazionale ($R = 0,74$, $p < 0,0001$).

5.2.2 Angolatura media delle fibre cardiache

Nelle sezioni trasversali dei cuori fetali abbiamo studiato gli angoli rispettivamente delle fibre endocardiche, mesocardiche ed epicardiche. In Tab. 5.4 sono riassunti i valori trovati.

Dai dati elencati si può notare come l'angolo medio endocardico oscilli in un range che spazia dai 40° ai 65° , con una leggera tendenza ad aumentare durante la gestazione. Per definizione, invece, l'angolo mesocardico medio spazia in un range

sg	Angolo Medio Endo	Angolo Medio Meso	Angolo Medio Epi
13	49,50	89,98	110,79
14	48,47	89,01	138,95
16			
18	46,90	91,07	129,05
19	24,69	88,64	130,03
20	56,58	89,51	139,78
22	37,36	89,63	105,37
24	51,14	90,00	114,55
25	65,41	90,00	107,04
25			
26			
26			
26	52,50	89,78	105,01
27	43,91	90,00	121,17
29	44,27	89,50	113,01
32	58,12	91,03	134,79
34	63,72	89,42	117,06
38	50,03	90,24	110,83
40	43,09	89,62	124,92
40	53,51	89,83	125,99

Tabella 5.4. Angolatura media delle fibre endocardiche, mesocar-diche ed epicar-diche

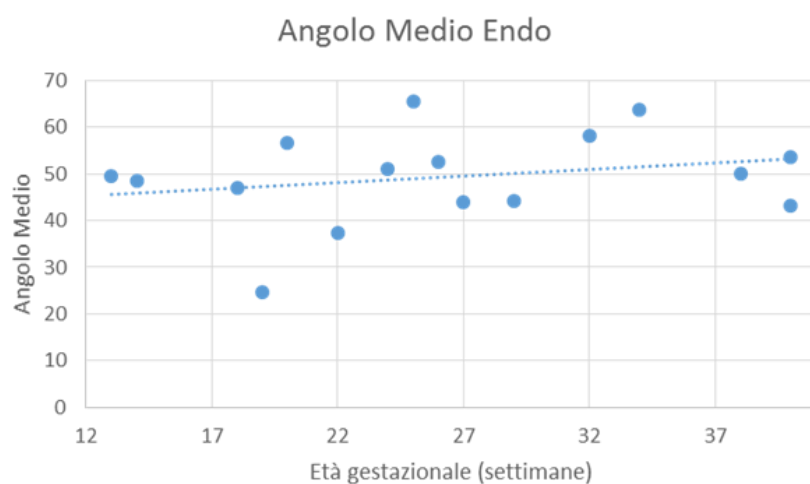


Figura 5.12. Rappresentazione grafica dell'angolo endocardico medio in relazione all'aumentare dell'età gestazionale.

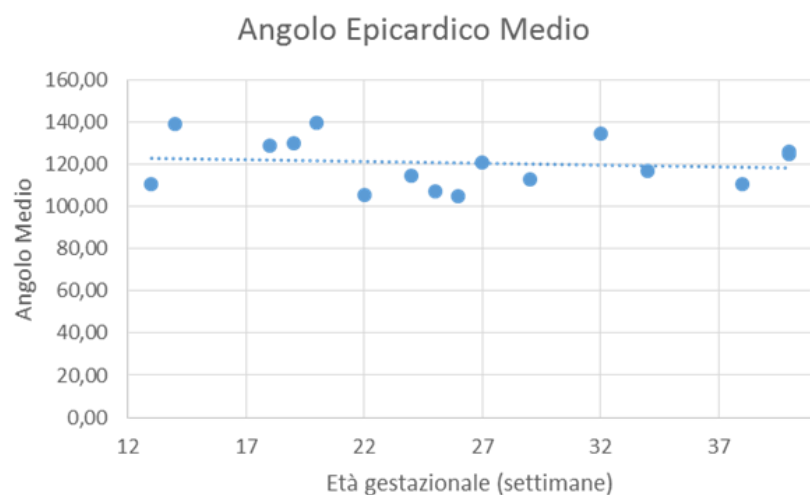


Figura 5.13. Rappresentazione grafica dell'angolo epicardico medio in relazione all'aumentare dell'età gestazionale.

molto più ristretto di valori (89°-90°). L'angolo medio epicardico è invece compreso tra 105°-134° (o -45/-75°).

Il dato ha un trend di progressione con l'età gestazionale sia per l'endocardio (R=0,25), sia per l'epicardio (R=-0,14); tuttavia, in entrambi i casi, il dato non è statisticamente significativo per la elevata dispersione e la ridotta numerosità del campione.

5.3 IL MODELLO *IN SILICO*

Nella costruzione del modello *in silico* si è tenuto conto della sola fase diastolica, escludendo il rilasciamento isovolumetrico. Questa scelta è stata necessaria perché in questa analisi non sono state considerate le tensioni residue, e pertanto si è assunto il momento di apertura della valvola mitrale come tempo 0.

Per quanto riguarda i parametri dimensionali, ci si è basati sulle linee di regressione ottenuti dai dati ecocardiografici, mentre per i parametri pressori ci si è basati sull'algoritmo proposto da Pena¹⁵⁰. Si riportano di seguito nelle tabelle 5.5 e 5.6 i valori determinati per i diversi coefficienti del materiale per i due set di pressioni.

La pressione è stata applicata per step successivi, incrementando progressivamente il valore fino a raggiungere la pressione finale. Ad ogni step di carico è stato misurato il volume all'interno del ventricolo tramite la formula riportata in figura 4.2. La geometria del ventricolo non rimane perfettamente identica a quella iniziale (cioè un cilindro sovrapposto a un semi-ellissoide), ma si ritiene che la stima del volume sia comunque valida in quanto non si

	20 SG	30 SG	40 SG
C_{10} [MPa]	0.0001	0.0004	0.0004
D [-]	0	0	0
k_1 [MPa]	0.004	0.005	0.01
k_2 [-]	3	4	4

Tabella 5.5. Valori dei parametri della legge costitutiva di equazione 4.1 determinati per ottenere il volume di fine diastole atteso date le pressioni in tabella 4.2

	20 SG	30 SG	40 SG
C_{10} [MPa]	0.0001	0.0004	0.0004
D [-]	0	0	0
k_1 [MPa]	0.001	0.001	0.0015
k_2 [-]	4	4.2	4.5

Tabella 5.6. Valori dei parametri della legge costitutiva di equazione 4.1 determinati per ottenere il volume di fine diastole atteso date le pressioni in tabella 4.3

sono osservate delle distorsioni cos'ý accentuate della forma globale del ventricolo da giustificare un approccio diverso nel calcolo del volume interno.

In figura 5.14 si riportano i grafici pressione-volume ottenuti per la diastole del ventricolo sinistro alle diverse età gestazionali e per i due set di pressioni menzionati precedentemente. Come si può notare, le curve hanno lo stesso andamento a prescindere dall'epoca gestazionale.

Si può osservare come la concavità della curva sia inizialmente verso il basso e poi si rivolga verso l'alto. Ricordando le figure 2.5 e 4.7, ci si aspetterebbe che la curva avesse la concavità sempre verso l'alto. Questo avviene in quanto a pressioni molto basse il contributo delle fibre è trascurabile rispetto a quello della matrice extracellulare, che quindi prevale.

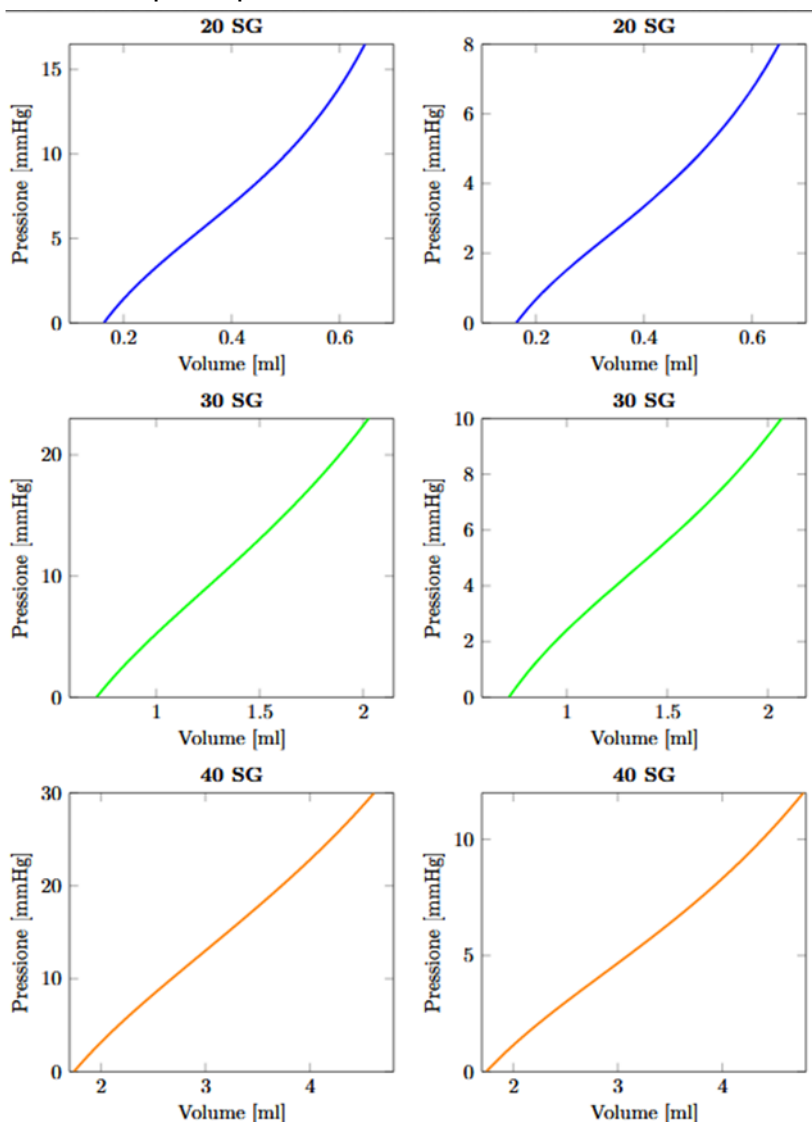


Figura 5.14. Curve pressione-volume per la diastole del ventricolo sinistro per 20 (in alto), 30 (al centro) e 40 settimane gestazionali (in basso). Nella colonna di sinistra il caso di pressioni patologiche (tab. 4.2); in quella di destra il caso di pressioni fisiologiche (tab. 4.3).

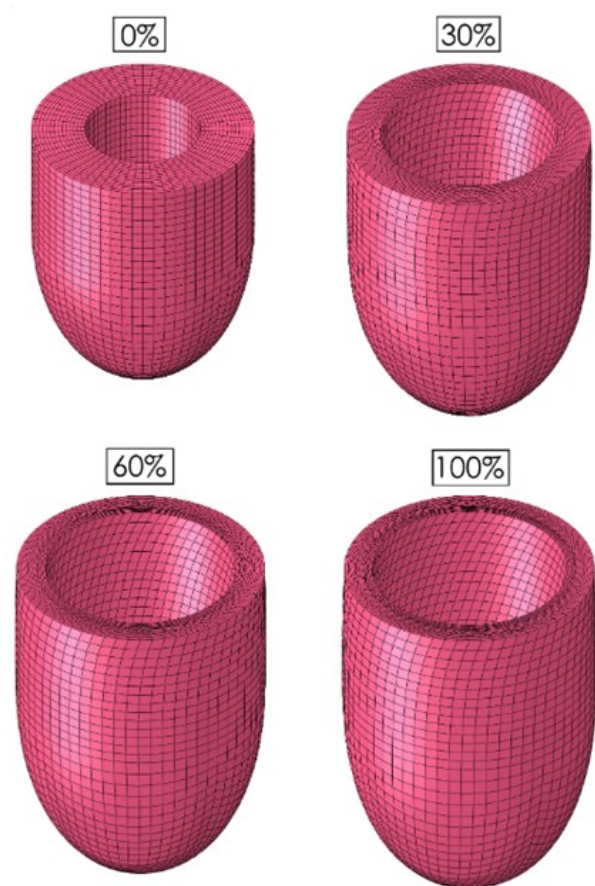


Figura 5.15. Geometria deformata del ventricolo sinistro a 40 settimane gestazionali durante la diastole, per diverse percentuali di carico applicato. È possibile notare come il ventricolo subisca una torsione globalmente oraria.

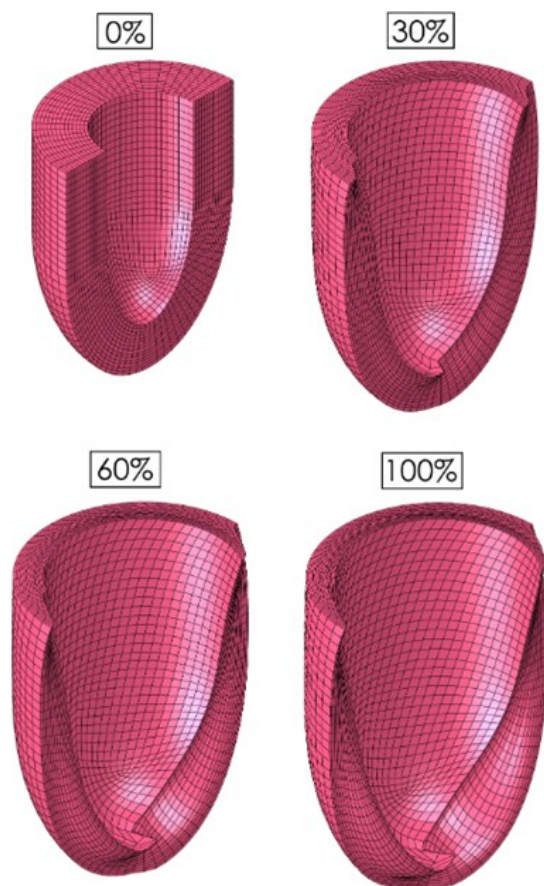


Figura 5.16. Geometria deformata di metà ventricolo sinistro a 40 settimane gestazionali durante la diastole, per diverse percentuali di carico applicato. È possibile apprezzare più chiaramente la torsione che subiscono tutti gli strati.

Il primo termine neo-Hookiano della legge costitutiva (equazione 4.1), relativo proprio alla matrice extracellulare, ha un andamento debolmente crescente con la concavità verso il basso; con l'aumento progressivo della pressione, invece, il contributo della rigidità delle fibre si fa sempre più preponderante, finché prevale sull'altro termine e l'andamento esponenziale della legge costitutiva porta la concavità della curva verso l'alto. Questa inversione di concavità a potrebbe essere evitata se si utilizzasse la legge costitutiva proposta da Holzapfel et al.¹²⁷ riportata al paragrafo 3.1, nella quale anche il termine isotropo della matrice extracellulare è un esponenziale. È già stato fatto notare, però, che anche la formulazione neo-Hookiana è valida per

l'interpretazione dei risultati sperimentali, perciò si è ritenuta accettabile questa piccola discrepanza tra le curve attese e ottenute.

In figura 5.15 è riportata la geometria deformata del ventricolo a 40 settimane gestazionali per diversi step di carico (in figura 5.16 per metà ventricolo). Si può notare come il comportamento del modello sia del tutto simile a ciò che si riscontra in vivo, sia in termini di variazioni volumetriche, sia nella uniforme riduzione degli spessori parietali sia nello sviluppo di torsione (untwisting). Quest'ultima è globalmente oraria, sia all'epicardio che all'endocardio, anche se le eliche di orientamento delle fibre hanno versi opposti¹²⁹: durante il riempimento passivo, le eliche di fibre tendono a svolgersi, perciò si ha una torsione oraria all'endocardio e antioraria all'epicardio; poichè gli strati più esterni hanno un braccio maggiore rispetto a quelli interni, se le tensioni fossero uniformi sullo spessore, si dovrebbe avere la prevalenza della torsione antioraria su quella oraria, cosa che non è supportata dalle evidenze sperimentali. Infatti, un altro fattore geometrico e meccanico interviene e contrasta questo effetto: durante la diastole, le deformazioni circonferenziali del ventricolo sono maggiori all'endocardio che all'epicardio, perciò si registrano tensioni più alte negli strati interni (amplificate anche dalla particolare forma esponenziale della legge costitutiva) che si oppongono al vantaggio meccanico dell'epicardio, determinando complessivamente una rotazione oraria. I risultati ottenuti per le altre età gestazionali sono del tutto simili a questi.

La relazione pressione-volume di fine diastole (End Diastolic Pressure-Volume Relationship - EDPVR) caratterizza le proprietà passive del ventricolo sinistro. Questa relazione tiene conto della geometria del ventricolo, dello spessore della parete e delle proprietà meccaniche del materiale di cui è costituito il miocardio, perciò è un importante strumento di valutazione della performance ventricolare.

Si è deciso di utilizzare la curva EDPVR come validazione della curva pressione-volume ricavata tramite l'analisi numerica, per confermare la corretta implementazione della legge costitutiva e verificare la plausibilità dei risultati ottenuti, come è già stato fatto in altri studi^{126,141,155}. Poichè non si era in possesso di dati sperimentali per cuori fetali in vivo o ex vivo da cui estrapolare una curva EDPVR, si è deciso di adottare il metodo semplificato suggerito da Klotz et al.

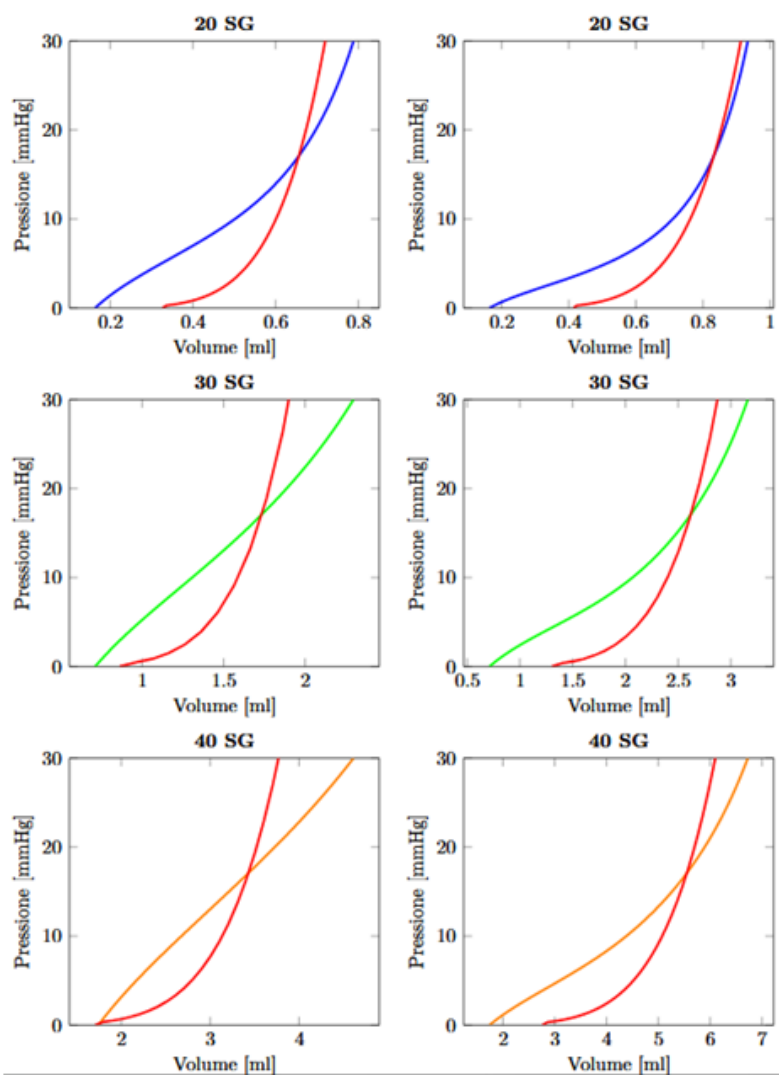


Figura 5.17. Confronto tra le curve pressione-volume ottenute da modello numerico a 20 (azzurro), 30 (verde) e 40 settimane gestazionali (in arancione) e le curve EDPVR ottenute con il metodo descritto¹⁵⁶ (in rosso). A sinistra il caso con pressioni patologiche, a destra con pressioni fisiologiche.

Per ciascuna delle sei analisi svolte, sono stati calcolati tutti i parametri V_0 , V_{30} , α e β ed è stata tracciata la corrispondente curva EDPVR. In figura 5.17 sono riportati i grafici delle curve pressione-volume ottenute dall'analisi numerica e delle curve EDPVR.

Per poter confrontare le curve, tutte le analisi sono state effettuate fino alla pressione di 30 mmHg, indipendentemente da quale fosse la pressione di fine diastole prevista (sempre mantenendo i valori dei parametri del materiale pari a quelli riportati nelle tabelle 5.5 e 5.6).

Come già discusso, si può subito notare come la curva EDPVR abbia la concavità costante verso l'alto, al contrario della curva numerica. Inoltre, eccetto in due casi, le stime di V_0 e V_{30} sono poco accurate rispetto ai valori ottenuti con l'analisi. Si nota

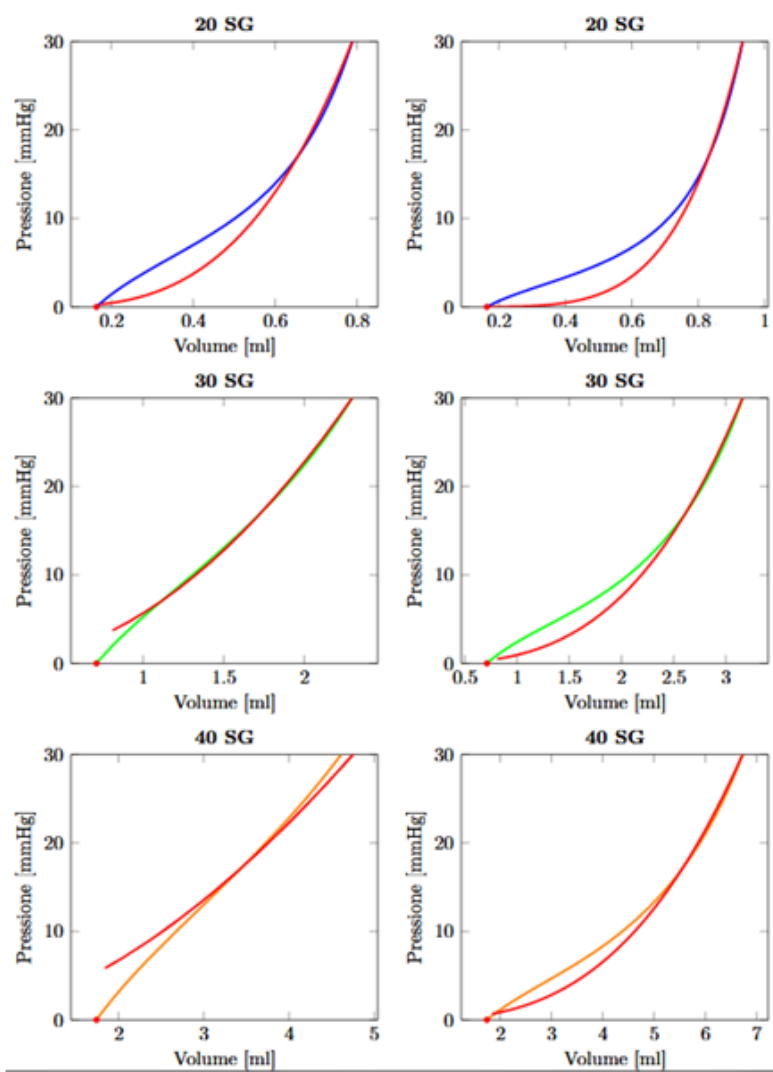


Figura 5.18. Confronto tra le curve pressione-volume ottenute da modello numerico a 20 (azzurro), 30 (verde) e 40 settimane gestazionali (in arancione) e le curve EDPVR ottenute adattando il metodo descritto¹⁵⁶ (in rosso). A sinistra il caso con pressioni patologiche, a destra con pressioni fisiologiche.

anche che la curva EDPVR si discosta di meno da quella numerica nelle analisi che prevedono una pressione fisiologica piuttosto che per quelle relative alle pressioni patologiche. Dalle figure si evince chiaramente che non c'è un buon accordo tra i risultati. Il problema sembra essere proprio la stima dei volumi. Le equazioni utilizzate, come anche i valori di A_n e B_n , sono stati ricavati dai dati sperimentali raccolti per cuori adulti e per questo potrebbero fornire risultati poco accurati quando applicati a cuori fetali. Per questi motivi, si è deciso di modificare il metodo adottato, utilizzando come valori per V_0 e V_{30} quelli ricavati proprio dall'analisi numerica, sostituendo le stime previste dal procedimento. I parametri \acute{a} e \hat{a} sono stati calcolati con le medesime espressioni e sono stati inseriti nell'equazione. I grafici così ottenuti sono riportati in figura 5.18. In tutti i casi, il punto iniziale della nuova curva EDPVR è stato sepa-

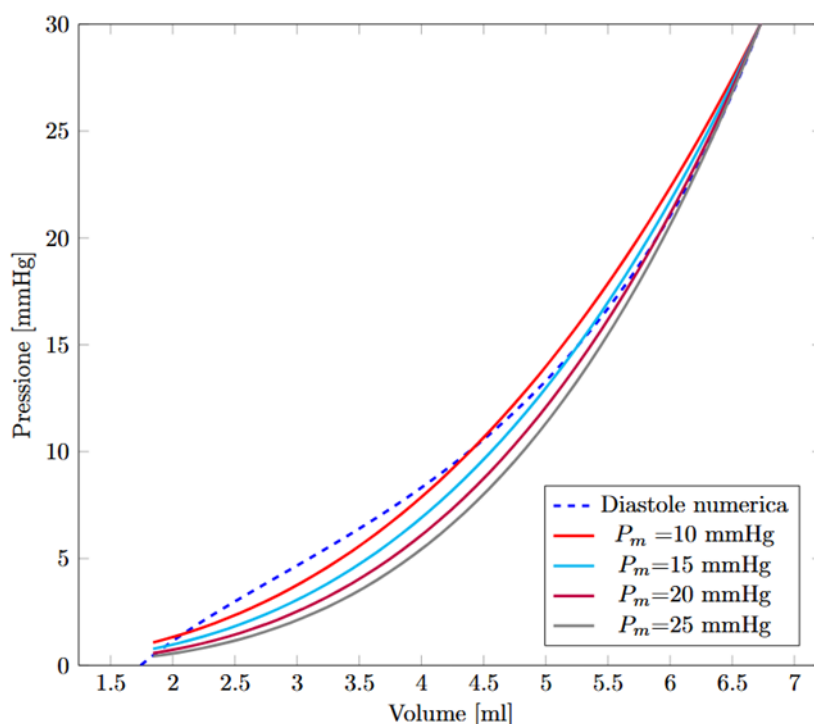


Figura 5.19. Confronto tra la curva pressione-volume ricavata con l'analisi numerica e un fascio di curve EDPVR adattate, ottenute per diversi valori di pressione del punto (V_m , P_m).

rato dal resto della curva. Infatti, il passaggio del grafico per questo punto è stato imposto, invece gli altri punti sono stati calcolati grazie alla formula. Si è scelto, quindi, di non rappresentare questo tratto lineare iniziale, non veritiero dovuto solamente all'artificio matematico utilizzato. Si può notare come in questo caso la concordanza tra valore ottenuto e valore atteso sia molto buona. Si vedrà al paragrafo successivo, nel quale verranno modificati gli orientamenti delle fibre miocardiche, come la curva EDPVR sia ancora valida e sostanzialmente confermi la buona qualità della legge costitutiva.

Si è deciso, quindi, di calcolare la curva EDPVR per vari valori di P_m (10, 15, 20, 25 mmHg) entro i limiti suggeriti in¹⁵⁶, nel caso del feto di 40 settimane gestazionali con pressione fisiologica. Le curve così ottenute sono riportate in figura 5.19. Se si confronta ancora una volta la curva ottenuta numericamente con il fascio di curve EDPVR, si può nuovamente concludere la buona concordanza tra i risultati.

Si è quindi proceduto a valutare l'effetto sulla curva pressione volume del diverso orientamento delle fibre. Le configurazioni sono descritte in tabella 5.7.

Nel seguito, si vedrà che alcune curve pressione-volume si interrompono prima di altre. Questo è dovuto al fatto che durante alcune analisi la mesh è risultata troppo deformata e non è stato possibile raggiungere la convergenza. Analizziamo per primi

	90°	80°	60°	40°	20°	0°	90°/0°	0°/90°
Strato 1 (endo)	90°	80°	60°	40°	20°	0°	90°	0°
Strato 2	90°	50°	40°	27°	13°	0°	60°	0°
Strato 3	90°	30°	20°	13°	7°	0°	30°	0°
Strato 4	90°	0°	0°	0°	0°	0°	0°	0°
Strato 5	90°	-30°	-20°	-13°	-7°	0°	0°	-30°
Strato 6	90°	-50°	-40°	-27°	-13°	0°	0°	-60°
Strato 7 (epi)	90°	-80°	-60°	-40°	-20°	0°	0°	-90°

Tabella 5.7. Diverse angolazioni delle fibre muscolari negli strati del ventricolo sinistro di un feto a 40 settimane gestazionali. Gli angoli sono considerati positivi per rotazioni antiorarie; la direzione circonferenziale ha angolazione pari a 0°.

due casi estremi della tabella 5.7, quelli relativi ai pattern 0°, dove le fibre sono disposte circonferenzialmente in tutti gli strati, e 90°, dove le fibre sono invece disposte longitudinalmente. Le curve pressione-volume ottenute per i due set di pressioni sono riportate in figura 5.20 e le geometrie deformate finali dei ventricoli (qualitativamente identiche per le diverse pressioni) sono in figura 5.21. Si nota subito come queste deformate siano perfettamente coerenti con la disposizione di fibre scelta, ma assolutamente irrealistiche in ambito clinico.

Come prima cosa, si può notare come nel caso di pressione fisiologica il materiale risulti meno rigido del caso patologico, evidenza riscontrata anche in medicina. Inoltre, la presenza di fibre circonferenziali conferisce molta più rigidità delle fibre longitudinali, indipendentemente dai parametri del materiale adottati. Questo suggerisce, quindi, che per ottenere una maggiore compliance (la capacità di una cavità di

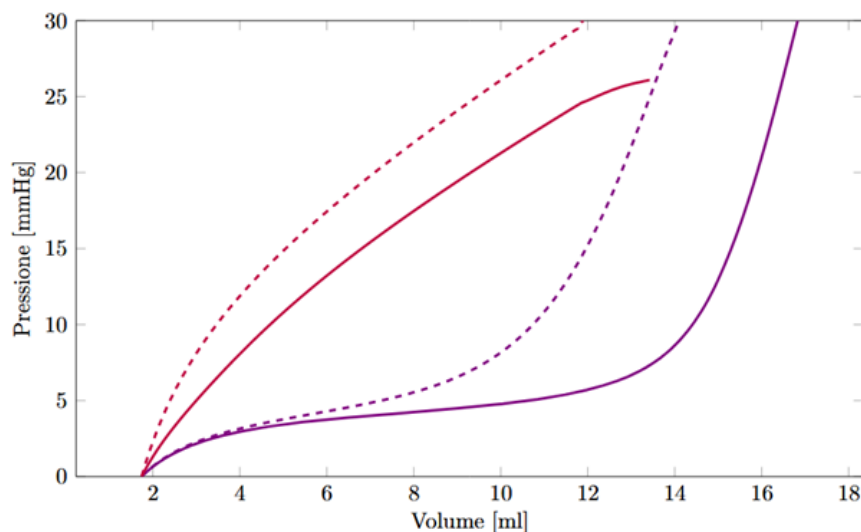


Figura 5.20. Curve pressione-volume in un ventricolo sinistro di 40 settimane gestazionali, ottenute modificando l'orientamento delle fibre, utilizzando i pattern 0° (rosso in continuo per le condizioni fisiologiche e in tratteggio per quelle patologiche) e 90° (in viola).

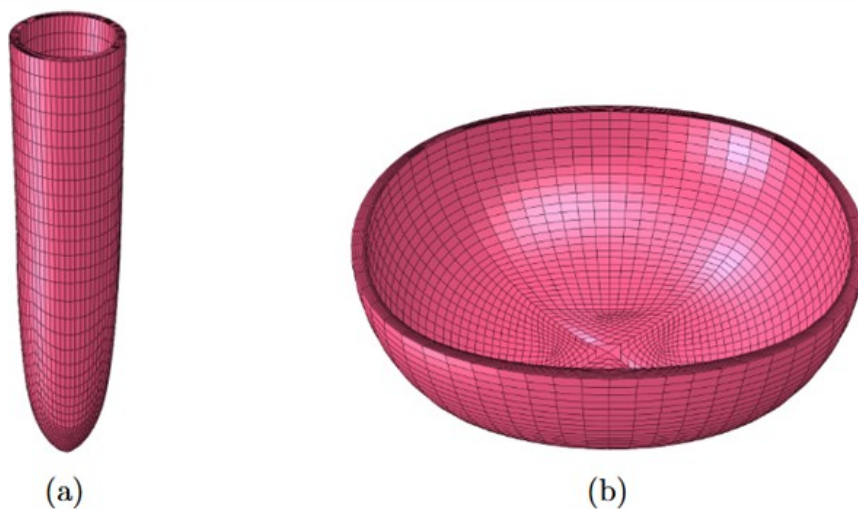


Figura 5.21. Geometrie deformate di un ventricolo sinistro a 40 settimane gestazionali con orientamenti di fibre diversi da quello fisiologico. In (a) il caso con fibre circolari (pattern 0°) e in (b) il caso con fibre longitudinali (pattern 90°).

dilatarsi elasticamente sotto l'effetto di una pressione) le fibre debbano tendere a una disposizione longitudinale. A questo proposito è possibile fare un'interessante osservazione nei riguardi del progressivo riorientamento delle fibre che avviene nel cuore fetale: è già stato detto come, fino alle 14 settimane circa, le fibre siano orientate esclusivamente in direzione circonferenziale e la deformazione ventricolare avvenga principalmente in senso longitudinale, similmente a un cilindro; con il progredire della crescita, le aumentate richieste di volume e pressione spingono ad avere una maggiore compliance e un orientamento delle fibre più longitudinale. Ne consegue quindi un diverso pattern di deformazione, che ora prevede anche una componente radiale, oltre a quella longitudinale.

Analizziamo ora tutti gli altri pattern presenti in tabella 5.7. Anche in questo caso la prima cosa che si nota è che la rigidità del miocardio in condizioni patologiche è maggiore. In generale, poi, all'aumentare dell'angolo di inclinazione delle fibre (da 20° a 80°) si ha un aumento di rigidità (Figura 5.22).

Per quanto riguarda il ruolo individuale di epicardio ed endocardio, si possono fare diverse considerazioni. Innanzitutto, confrontando le curve per 60° e per $90^\circ/0^\circ$ si nota che il ruolo dell'epicardio non è così rilevante: infatti, modificando l'orientamento delle fibre negli strati più esterni in direzione circonferenziale, non si apprezza una particolare modifica nel comportamento. Al contrario, prendendo in considerazione la curva relativa a $0^\circ/90^\circ$, si può notare un marcato aumento di rigidità. Questo suggerisce, quindi, che le fibre circolari (che conferiscono una

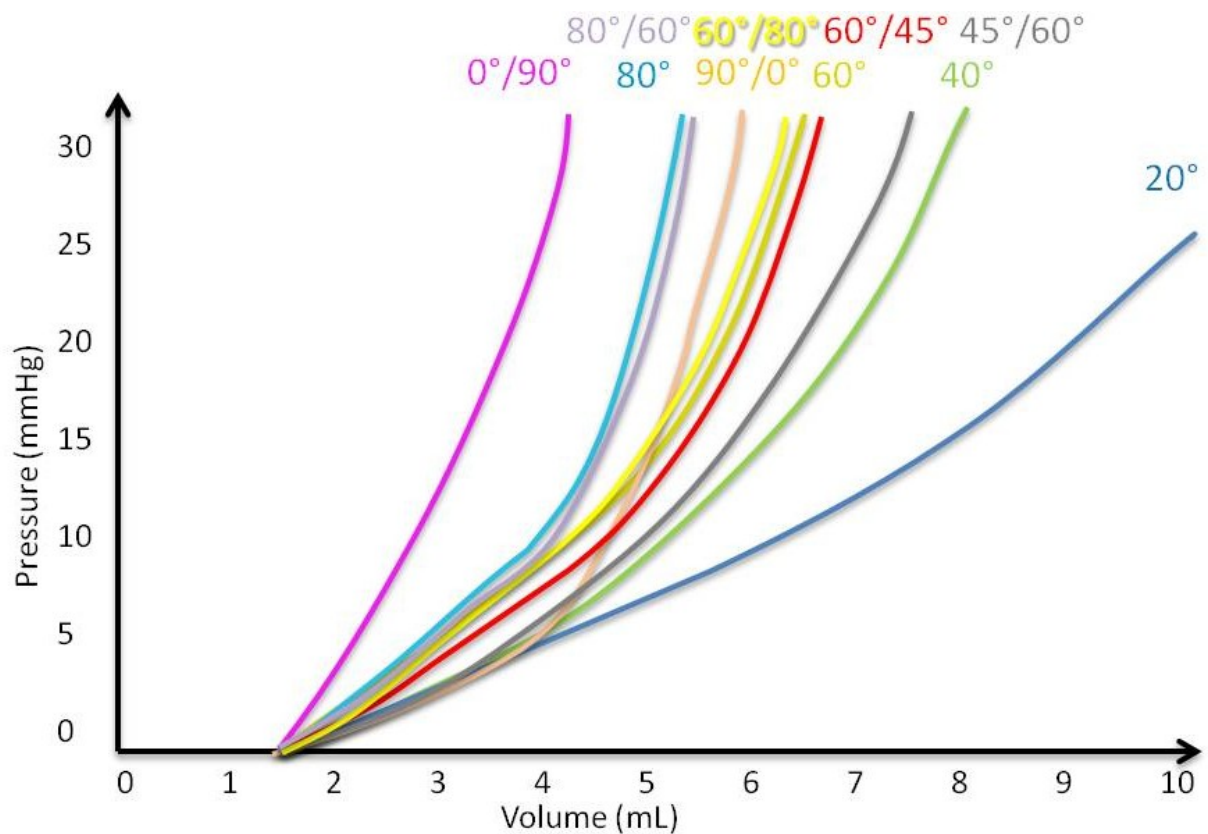


Figura 5.22. Confronto tra curve pressione-volume in condizioni di pressione patologica (curve tratteggiate) e fisiologica (curve continue), ottenute per diverse angolazioni di fibre. Quando è indicata una sola cifra le angolazioni si intendono simmetriche. Quando sono indicati due parametri, la prima cifra si riferisce al layer endocardico, la seconda al layer epicardico.

maggior rigidità al comportamento globale) sono più efficaci quando si trovano all'endocardio piuttosto che all'epicardio. È proprio lo strato più interno del miocardio, infatti, che durante lo sviluppo fetale ha un ruolo preponderante sugli altri.

CAPITOLO 6 – DISCUSSIONE

Il cuore dei vertebrati superiori nasce originariamente come struttura tubulare omogenea per poi evolvere in un organo complesso formato da quattro camere. Nonostante la conformazione macroscopica definitiva del cuore sia raggiunta già al termine dell'embriogenesi, lo sviluppo cardiaco continua a livello microscopico per tutta la vita fetale.

Il tessuto cardiaco maturo è fortemente anisotropo, le fibre sinciziali che lo compongono assumono orientamenti differenti nel contesto della parete. Le trabecole terziarie, infatti, si compattano fino a formare un'elica destrorsa a livello endocardico, mentre l'epicardio si organizza in un'elica sinistrorsa. Il mesocardio, compreso tra i due layers sopracitati, è invece composto da fibre ad andamento circonferenziale.

Uno studio di risonanza su cuori fetali ha evidenziato come a 10 settimane il tessuto cardiaco sia ancora ampiamente omogeneo e indifferenziato, ma che già dalle 14 settimane sia possibile rintracciare sistemi discreti di miofibre endocardiche ed epicardiche organizzate in modo da sottendere un angolo di 120 gradi. Dalle 19 settimane, il pattern delle fibre cardiache è simile a quello dell'adulto, anche se l'indice di anisotropia è ancora molto basso.²⁶

Tutto ciò è estremamente importante dal punto di vista funzionale dal momento che determina la complessa dinamica cardiaca.

Ecco perché studiare lo sviluppo di quest'organo durante la gestazione non può prescindere né dalla definizione della sua microstruttura anatomica né dallo studio della sua funzionalità: correlare il dato anatomico con l'aspetto funzionale consente di studiare in vivo lo sviluppo cardiaco.⁹⁶

Mentre per lo studio dell'aspetto microanatomico si possiedono da anni strumenti e modalità efficaci, per la valutazione della funzione solo recentemente è emersa una tecnica affidabile, non invasiva e assolutamente sicura per il feto, ovvero lo *Speckle tracking*.

Questa tecnica, basata sul movimento bidimensionale di markers acustici, detti speckle, ci ha permesso di indagare lo strain di ciascuno dei due strati longitudinali del miocardio ventricolare sinistro, lo strato subendocardico e quello subepicardico, e di studiarne il rapporto e il cambiamento durante la gestazione. Già dalle 17 settimane è stato possibile individuare due layer con pattern di deformazione longitudinale, che presentano peraltro valori di deformazione diversi. Lo strato muscolare più interno mostra infatti valori di strain longitudinale compresi tra un minimo di -17% ed un massimo di -35%. Questi valori sono ben più elevati di quelli mostrati dal layer epicardico, che vanno invece da un minimo di -9% ad un massimo del -25%. Un gradiente endo-epicardico di strain longitudinale, per la verità, è noto anche nell'adulto, con una differenza tuttavia inferiore al 20%.¹²⁵

Il fatto che, durante l'età fetale, all'interno del ventricolo sinistro vi sia una precoce differenziazione dello strato subendocardico, in termini di deformazione muscolare e quindi di strain, indica come sia proprio questo il maggior determinante della funzione ventricolare sinistra così come la conosciamo nell'adulto, mentre la differenziazione di uno strato epicardico longitudinale avvenga con un certo ritardo. Il rapporto tra deformazione epicardica e deformazione endocardica, infatti, aumenta nel corso del tempo passando da un valore minimo di 0,37 ad un massimo di 0,85.

Siamo perciò passati a verificare i dati funzionali analizzando la microstruttura anatomica della parete libera del ventricolo sinistro. Abbiamo rilevato che lo spessore totale della parete cardiaca e quello di ogni singolo layer crescono in valore assoluto durante la gravidanza: lo spessore totale di parete passa infatti da valori di 1,3 mm a 13 settimane a valori di 6,2 mm a termine; la parte trabecolata partendo da valori di 0,4 mm raggiunge i 2,3 mm; l'endocardio da valori di 0,7 mm arriva ai 2,8 mm totali; il mesocardio da 0,5 mm aumenta fino a 1,9 mm, mentre l'epicardio da valori di 0,07 mm si porta a 1,3 mm. Durante la gravidanza quindi, parte trabecolata, endocardio, mesocardio ed epicardio aumentano tutti in spessore assoluto, anche se non cre-

scono della medesima entità. Valutando infatti la percentuale di crescita di ogni strato rispetto allo spessore totale abbiamo trovato che mentre trabecole ed endocardio si mantengono più o meno sugli stessi valori nel corso di tutta la gestazione, l'epicardio quadruplica il suo spessore portandosi da una percentuale del 5,5% sul totale della parete cardiaca al 22% al termine della gestazione, ottenendo una curva di crescita del tutto simile a quella ricavata dallo studio della deformazione miocardica allo *speckle tracking*. Questo processo sembra accadere a seguito di una "differenziazione" delle fibre mesocardiche in fibre epicardiche; la percentuale di mesocardio infatti decresce significativamente con il progredire dell'età gestazionale. Questo dato confuterebbe, di fatto, l'ipotesi di Torrent-Gausp¹⁵³, in quanto evidenzia come il ventricolo sinistro non sia già costituito da fasci prestabiliti e differenziati e pertanto distintamente disseccabili, ma sia originante da un unico sincizio cellulare che viene spinto alla differenziazione da stimoli funzionali.

L'utilizzo del modello matematico è stato quindi volto a verificare quale fosse il vantaggio differenziativo di una così radicale modificazione dell'orientamento delle fibre nel corso della vita fetale. I primi dati ottenuti da un orientamento a 0° dimostra come di fatto l'assenza di angolazione delle fibre determini una geometria ventricolare assolutamente incompatibile con la funzione, ma non è banale far notare come lo stesso si può dire con una disposizione esclusivamente longitudinale. La forma conica del ventricolo sinistro, quindi, è ottenibile solo quando vi è una disposizione obliqua delle fibre miocardiche.

Il primo riscontro ottenuto dal confronto in-silico/in-vivo è la differenziazione precoce dell'endocardio rispetto all'epicardio. Come accennato nei risultati, le fibre endocardiche sono quelle che maggiormente determinano la rigidità del miocardio. In altre parole la precoce differenziazione di uno strato endocardico longitudinale (90°/0°) permette di offrire una compliance diastolica molto più simile a quella "finale" +60°/-60°. Al contrario una precoce differenziazione dell'epicardio (0°/90°) determinerebbe una eccessiva rigidità, assai simile alla conformazione a 0°.

Più interessanti sono le considerazioni sul confronto tra i plot pressione/volume in condizioni fisiologiche e in condizioni patologiche. Come noto, la riduzione dell'elasticità delle fibre muscolari e le alterazioni a carico della matrice extracellulare

determinano un aumento delle pressioni tele-diastoliche a parità di volumi ventricolari. D'altra parte la pressione tele-diastolica incide anche sull'efficacia della perfusione coronarica, in quanto il miocardio viene irrorato prevalentemente in diastole. Il nostro modello matematico mostra come una riduzione dell'angolo delle fibre miocardiche di fatto abbassi, a parità di volume, le pressioni di riempimento del ventricolo sinistro. Questo fenomeno è ben noto in fisiopatologia dello scompenso cardiaco dell'adulto, ed è inoltre sempre più evidente da quando è disponibile lo *speckle tracking* per lo studio della funzione longitudinale. I nostri risultati spiegherebbero quindi il motivo per cui lo *speckle tracking* rappresenti un marker subclinico di disfunzione ventricolare, cogliendo precocemente un meccanismo di adattamento del ventricolo che per motivi ultrastrutturali ha bisogno di ridurre la funzione longitudinale per lasciare invariata la pressione di riempimento ventricolare e quindi la perfusione coronarica. Con questo studio non è stato possibile identificare la legge per cui il ventricolo sinistro tenda esattamente a quell'angolo di incidenza delle fibre rispetto al piano verticale ($+60^\circ/-60^\circ$). Per ottenere tali risposte sarebbe necessario avere dati funzionali durante la fase sistolica, ma tale studio necessita di una funzione ben più complessa che includa la meccanica dei fluidi oltre che la meccanica di deformazione. D'altra parte, è possibile, a tal proposito, fare alcune considerazioni anche basandosi sulle curve di compliance diastolica. Per motivi grafici le curve stimate con fibre angolate a 20° o 40° sembrano attrattive in termini di efficienza, tuttavia sappiamo che il ventricolo sinistro lavora con differenze di precarico relativamente basse. Al netto delle modifiche legate allo stato inotropo, le differenze tra i volumi di riempimento, così come i valori di frazione di eiezione (espressione del rapporto tra volume iniziale e volume finale) sono relativamente contenute, anche durante sforzo. Sulla base di queste considerazioni, si nota che, per passare da 5 a 15 mmHg, con le fibre disposte ad 80° occorre un aumento del volume pari al 35%, con le fibre disposte a 60° è necessario un incremento del 65%, mentre quando le fibre sono disposte a 20° è necessario un incremento del 170%. Sebbene avere una riserva di pre-carico è molto importante per la funzione ventricolare sinistra per adattarsi alle modifiche dettate dalle diverse condizioni di lavoro, è noto che, per avere una ottimale sovrapposizione dei ponti di actina e miosina (e non compromettere la fase sistolica) il range di

lunghezza della fibra miocardica non può oscillare oltre il 20% della lunghezza di base. Se si trasforma questa lunghezza in variazione di volumi ($1,2^3$) si ottiene un 70% di delta che corrisponde al valore ipotizzato nel nostro studio per l'angolazione 60/-60°.

CAPITOLO 7 – LIMITAZIONI

Il nostro studio ha presentato diverse limitazioni. Una prima limitazione potrebbe dipendere dal fatto che i dati anatomici e funzionali sono stati raccolti su unità statistiche differenti. Abbiamo raccolto informazioni a partire dalle 17 settimane per la parte ecocardiografica e dalle 13 settimane per quella anatomo-patologica. Ciò significa che non possediamo per il momento dati sulle età gestazionali più precoci.

Per quanto riguarda i dati anatomici poi, non possiamo tralasciare che sebbene siano stati raccolti su cuori senza patologia cardiaca, provengono comunque in buona parte da aborti spontanei e morti endouterine di cui non sono note le cause. Benché siano stati selezionati cuori fetali ben conservati, in 4 casi, a causa della macerazione, non è comunque stato possibile valutare l'angolazione delle miofibre.

Anche il modello matematico potrebbe in futuro essere ulteriormente affinato. Per prima cosa si dovrebbe sostituire la legge costitutiva utilizzata con quella proposta da Holzapfel et al.²² specifica per il miocardio: in questo modo, non si presenterebbe più il problema della concavità rovescia nella curva pressione-volume. Per ovvi motivi etici non è stato possibile ottenere misure dirette delle pressioni endocavitari, che sono state estrapolate dallo studio di Pena et al¹⁵⁰. Con questi affinamenti del modello si dovrebbe poter ottenere un ciclo pressione-volume più coerente con quello analitico.

Ulteriori miglioramenti potrebbero riguardare l'utilizzo di una geometria ventricolare paziente-specifica o l'accoppiamento solido-fluido nell'analisi.

CAPITOLO 8 – CONCLUSIONI

Questo studio dimostra che sussiste un gradiente endo-epicardico nello sviluppo cardiaco sia dal punto di vista anatomico che da quello funzionale. Quanto evidenziato dall'analisi della deformazione ventricolare porta a supporre il passaggio da un modello di contrazione essenzialmente longitudinale ad uno più complesso in cui emergono anche componenti radiali e circonferenziali. Questa transizione si spiega con il progressivo sviluppo dell'epicardio, le cui fibre, avendo un raggio maggiore, determinano una deformazione in più direzioni spaziali. Il cambiamento del pattern di contrazione potrebbe essere innescato dalla necessità di aumentare il lavoro cardiaco per far fronte all'aumento di pre-carico e di post-carico connaturato alla crescita corporea del feto. Quindi, mentre durante la vita embrionale la forma segue la funzione, a livello fetale sembra vero il contrario: la funzione è condizionata strettamente dalla forma.

Questo studio ha inoltre confermato la validità della metodica 2D-STE nello studio della fisiologia della cinetica del muscolo cardiaco in epoca fetale. Tramite l'analisi dei parametri di deformazione regionale, è possibile valutare l'anisotropia del muscolo cardiaco in modo non invasivo né pericoloso per il feto.

Questo è stato il primo studio a valutare lo sviluppo miocardico fetale sia dal punto di vista anatomico che da quello funzionale, inoltre è stato possibile verificare *in silico* il guadagno funzionale determinato dalla peculiare disposizione delle fibre miocardiche così come è stata identificato il vantaggio differenziativo dello sviluppo precoce dell'endocardio rispetto all'epicardio.

8.1 PROSPETTIVE FUTURE

La migliore comprensione dello sviluppo del miocardio fetale, e la possibilità di valutare in vivo e in maniera non invasiva l'adeguatezza dei singoli layer potrebbe migliorare lo screening dei pazienti con patologie del cuore sinistro (es. stenosi aortica, complesso del cuore sinistro ipoplasico, etc) che si potrebbero beneficiare delle manovre di interventistica fetale quali la valvuoplastica aortica. Al momento, infatti, l'efficacia a lungo termine di tale procedura è limitata da una considerevole percentuale di pazienti (20-30%) che, nonostante l'efficacia della procedura, progrediscono verso la degenerazione fibroelastica dell'endocardio e l'ipoplasia della cavità ventricolare.

Studi futuri dovranno stabilire se anomalie della funzione endocardica pre-procedura o un alterato rapporto endo/epicardico (es. valori superiori alla norma) siano in grado di predire una minore risposta alle manovre percutanee.

BIBLIOGRAFIA

1. Henderson DJ, Anderson RH. The development and structure of the ventricles in the human heart. *Pediatr Cardiol* 2009;30(5):588–96.
2. Larsen W. *Human Embriology*.
3. Sedmera D. Form follows function: Developmental and physiological view on ventricular myocardial architecture. *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.* 2005;28(4):526–8.
4. Anderson RH, Ho SY, Becker AE. Anatomy of the human atrioventricular junctions revisited. *Anat Rec* 2000;260(1):81–91.
5. Sedmera D, Pexieder T, Vuillemin M, Thompson RP, Anderson RH. Developmental patterning of the myocardium. *Anat. Rec.* 2000;258(4):319–37.
6. Cai CL, Liang X, Shi Y, et al. *Isl1* identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* 2003;5(6):877–89.
7. Voronov DA, Alford PW, Xu G, Taber LA. The role of mechanical forces in dextral rotation during cardiac looping in the chick embryo. *Dev Biol* 2004;272(2):339–50.
8. Rushmer RF, Crystal DK, Wagner C. The functional anatomy of ventricular contraction. *Circ Res* 1953;1(2):162–70.
9. Streeter DD, Spotnitz HM, Patel DP, Ross J, Sonnenblick EH. Fiber orientation in the canine left ventricle during diastole and systole. *Circ Res* 1969;24(3):339–47.
10. Hirschy A, Schatzmann F, Ehler E, Perriard JC. Establishment of cardiac cytoarchitecture in the developing mouse heart. *Dev Biol* 2006;289(2):430–41.
11. Shiraishi I, Takamatsu T, Fujita S. Three dimensional observation with a confocal scanning laser microscope of fibronectin immunolabeling during cardiac looping in the chick embryo. *Anat Embryol (Berl)* 1995;191(3):183–9.
12. Phillips HM, Rhee HJ, Murdoch JN, et al. Disruption of planar cell polarity signaling results in congenital heart defects and cardiomyopathy attributable to early cardiomyocyte disorganization. *Circ Res* 2007;101(2):137–45.
13. Greenbaum RA, Ho SY, Gibson DG, Becker AE, Anderson RH. Left ventricular fibre architecture in man. *Heart* 1981;45(3):248–63.
14. Tobita K, Garrison JB, Liu LJ, Tinney JP, Keller BB. Three-dimensional myofiber architecture of the embryonic left ventricle during normal development and altered mechanical loads. *Anat Rec - Part A Discov Mol Cell Evol Biol* 2005;283(1):193–201.
15. Alford PW, Taber LA. Regional epicardial strain in the embryonic chick heart during the early looping stages. *J Biomech* 2003;36(8):1135–41.
16. Tobita K, Keller BB. Right and left ventricular wall deformation patterns in normal and left heart hypoplasia chick embryos. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* 2000;279(3):H959–69.

17. Taber LA, Yang M, Podszus WW. Mechanics of ventricular torsion. *J Biomech* 1996;29(6):745–52.
18. Akiyama R, Mitsubayashi H, Tazawa H, Burggren WW. Heart rate responses to altered ambient oxygen in early (days 3-9) chick embryos in the intact egg. *J Comp Physiol - B Biochem Syst Environ Physiol* 1999;169(2):85–92.
19. Schmid P, Niederer P, Lunkenheimer PP, Torrent-Guasp F. The anisotropic structure of the human left and right ventricles. *Technol Health Care* 1997;5:29–43.
20. Tobita K, Keller BB. Right and left ventricular wall deformation patterns in normal and left heart hypoplasia chick embryos. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279(3):H959–69.
21. Sedmera D, Pexieder T, Rychterova V, Hu N, Clark EB. Remodeling of chick embryonic ventricular myoarchitecture under experimentally changed loading conditions. *Anat Rec* 1999;254(2):238–52.
22. Sedmera D, Hu N, Weiss KM, Keller BB, Denslow S, Thompson RP. Cellular changes in experimental left heart hypoplasia. *Anat Rec* 2002;267(2):137–45.
23. Tobita K, Schroder E a, Tinney JP, Garrison JB, Keller BB. Regional passive ventricular stress-strain relations during development of altered loads in chick embryo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282(6):H2386–96.
24. Schroder EA, Tobita K, Tinney JP, Foldes JK, Keller BB. Microtubule involvement in the adaptation to altered mechanical load in developing chick myocardium. *Circ Res* 2002;91(4):353–9.
25. Pierpaoli C, Basser PJ. Toward a quantitative assessment of diffusion anisotropy. *Magn. Reson. Med.* 1996;36(6):893–906.
26. Mekkaoui C, Porayette P, Jackowski MP, et al. Diffusion MRI Tractography of the Developing Human Fetal Heart. *PLoS One* 2013;8(8).
27. Mekkaoui C, Reese TG, Jackowski MP, Bhat H, Sosnovik DE. Diffusion MRI in the heart. *NMR Biomed.* 2015;
28. Jouk PS, Mourad A, Milisic V, et al. Analysis of the fiber architecture of the heart by quantitative polarized light microscopy. Accuracy, limitations and contribution to the study of the fiber architecture of the ventricles during fetal and neonatal life. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007;31(5):915–21.
29. Smerup M, Nielsen E, Agger P, et al. The three-dimensional arrangement of the myocytes aggregated together within the mammalian ventricular myocardium. *Anat Rec* 2009;292(1):1–11.
30. Jr SD. Gross morphology and fibre geometry of the heart. In: *Handbook of physiology. The cardiovascular system.* 1979. p. 61–112.
31. Fernandez-Teran MA, Hurle JM. Myocardial fiber architecture of the human heart ventricles. *Anat Rec* 1982;204(2):137–47.
32. Sanchez-Quintana D, Garcia-Martinez V, Hurle JM. Myocardial fiber architecture in the human heart. Anatomical demonstration of modifications in the normal pattern of ventricular fiber architecture in a malformed adult specimen. *Acta Anat* 1990;138(4):352–8.
33. Sanchez-Quintana D, Garcia-Martinez V, Climent V, Hurle JM. Morphological changes in the normal pattern of ventricular myoarchitecture in the developing human

- heart. *Anat Rec* 1995;243(4):483–95.
34. Jouk P, Usson Y, Michalowicz G, Parazza F. Mapping of the orientation of myocardial cells by means of polarized light and confocal scanning laser microscopy. *Microsc Res Tech* 1995;30(6):480–90.
 35. Schubert U, Müller M, Norman M, Abdul-Khaliq H. Transition from fetal to neonatal life: Changes in cardiac function assessed by speckle-tracking echocardiography. *Early Hum Dev* 2013;89(10):803–8.
 36. Zhang L, Allen J, Hu L, Caruthers SD, Wickline S a, Chen J. Cardiomyocyte architectural plasticity in fetal, neonatal, and adult pig hearts delineated with diffusion tensor MRI. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;304(2):H246–52.
 37. Beinlich CJ, Rissinger CJ, Morgan HE. Mechanisms of rapid growth in the neonatal pig heart. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27(1):273–81.
 38. Rudolph a M. Fetal and neonatal pulmonary circulation. *Annu Rev Physiol* 1979;41(0):383–95.
 39. Castaldi B, Baldini L, Salvo G Di, Pacileo G, Russo MG. Chapter 4: New echocardiographic techniques in congenital heart disease. :45–63.
 40. Perk G, Tunick PA, Kronzon I. Non-Doppler Two-dimensional Strain Imaging by Echocardiography-From Technical Considerations to Clinical Applications. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 2007;20(3):234–43.
 41. Godfrey ME, Messing B, Cohen SM, Valsky D V, Yagel S. Functional assessment of the fetal heart: a review. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2012;39(January):131–44.
 42. Mondillo S, Galderisi M, Mele D, et al. Speckle-tracking echocardiography: a new technique for assessing myocardial function. *J Ultrasound Med* 2011;30(1):71–83.
 43. Burns a T, McDonald IG, Thomas JD, MacIsaac A, Prior D. Doin’ the twist: new tools for an old concept of myocardial function. *Heart* 2008;94(8):978–83.
 44. Teske AJ, De Boeck BW, Melman PG, Sieswerda GT, Doevendans PA, Cramer MJ. Echocardiographic quantification of myocardial function using tissue deformation imaging, a guide to image acquisition and analysis using tissue Doppler and speckle tracking. *Cardiovasc Ultrasound* 2007;5:27.
 45. Van Dalen BM, Soliman OII, Vletter WB, et al. Feasibility and reproducibility of left ventricular rotation parameters measured by speckle tracking echocardiography. *Eur J Echocardiogr* 2009;10(5):669–76.
 46. Sutherland GR, Di Salvo G, Claus P, D’hooge J, Bijnens B. Strain and strain rate imaging: A new clinical approach to quantifying regional myocardial function. *J Am Soc Echocardiogr* 2004;17(7):788–802.
 47. Gorcsan J, Tanaka H. Echocardiographic assessment of myocardial strain. *J Am Coll Cardiol* 2011;58(14):1401–13.
 48. Carlsson M, Ugander M, Mosén H, Buhre T, Arheden H. Atrioventricular plane displacement is the major contributor to left ventricular pumping in healthy adults, athletes, and patients with dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292(3):H1452–9.
 49. Mignot A, Donal E, Zaroui A, et al. Global longitudinal strain as a major predictor of cardiac events in patients with depressed left ventricular function: A multicenter study. *J Am Soc Echocardiogr* 2010;23(10):1019–24.

50. Cameli M, Mondillo S, Solari M, et al. Echocardiographic assessment of left ventricular systolic function: from ejection fraction to torsion. *Heart Fail Rev* 2016;21(1):77–94.
51. Kim HJ, Yoon J-H, Lee E-J, et al. Normal left ventricular torsion mechanics in healthy children: age related changes of torsion parameters are closely related to changes in heart rate. *Korean Circ J* 2015;45(2):131–40.
52. Lorenz CH, Pastorek JS, Bundy JM. Delineation of normal human left ventricular twist throughout systole by tagged cine magnetic resonance imaging. *J Cardiovasc Magn Reson* 2000;2(2):97–108.
53. Arts T, Reneman RS. Dynamics of left ventricular wall and mitral valve mechanics-A model study. *J Biomech* 1989;22(3):261–71.
54. Wu MT, Tseng WYI, Su MYM, et al. Diffusion tensor magnetic resonance imaging mapping the fiber architecture remodeling in human myocardium after infarction: Correlation with viability and wall motion. *Circulation* 2006;114(10):1036–45.
55. Notomi Y, Lysyansky P, Setser RM, et al. Measurement of ventricular torsion by two-dimensional ultrasound speckle tracking imaging. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(12):2034–41.
56. Sanchez AA, Levy PT, Sekarski TJ, Hamvas A, Holland MR, Singh GK. Effects of frame rate on two-dimensional speckle tracking-derived measurements of myocardial deformation in premature infants. *Echocardiography* 2015;32(5):839–47.
57. Amundsen BH, Helle-Valle T, Edvardsen T, et al. Noninvasive myocardial strain measurement by speckle tracking echocardiography: Validation against sonomicrometry and tagged magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(4):789–93.
58. Korinek J, Kjaergaard J, Sengupta PP, et al. High Spatial Resolution Speckle tracking Improves Accuracy of 2-Dimensional Strain Measurements: An Update on a New Method in Functional Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2007;20(2):165–70.
59. Korinek J, Wang J, Sengupta PP, et al. Two-dimensional strain-A Doppler-independent ultrasound method for quantitation of regional deformation: Validation in vitro and in vivo. *J Am Soc Echocardiogr* 2005;18(12):1247–53.
60. Benyounes N, Lang S, Soulat-Dufour L, et al. Can global longitudinal strain predict reduced left ventricular ejection fraction in daily echocardiographic practice? *Arch Cardiovasc Dis* 2015;108(1):50–6.
61. Altiok E, Tiemann S, Becker M, et al. Myocardial deformation imaging by two-dimensional speckle-tracking echocardiography for prediction of global and segmental functional changes after acute myocardial infarction: A comparison with late gadolinium enhancement cardiac magnetic resonance. *J Am Soc Echocardiogr* 2014;27(3):249–57.
62. Edvardsen T, Gerber BL, Garot J, Bluemke DA, Lima JAC, Smiseth OA. Quantitative assessment of intrinsic regional myocardial deformation by Doppler strain rate echocardiography in humans: Validation against three-dimensional tagged magnetic resonance imaging. *Circulation* 2002;106(1):50–6.
63. Takigiku K, Takeuchi M, Izumi C, et al. Normal range of left ventricular 2-dimensional strain: Japanese Ultrasound Speckle tracking of the Left Ventricle (JUSTICE) study.

- Circ J Off J Japanese Circ Soc 2012;76(11):2623–32.
64. Koopman LP, Slorach C, Manlihot C, et al. Assessment of myocardial deformation in children using digital imaging and communications in medicine (DICOM) data and vendor independent speckle tracking software. *J Am Soc Echocardiogr* 2011;24(1):37–44.
 65. Manovel A, Dawson D, Smith B, Nihoyannopoulos P. Assessment of left ventricular function by different speckle-tracking software. *Eur J Echocardiogr* 2010;11(5):417–21.
 66. Jashari H, Rydberg A, Ibrahimi P, et al. Normal ranges of left ventricular strain in children: a meta-analysis. *Cardiovasc Ultrasound* 2015;13:37.
 67. Zhang L, Zhang J, Han W, et al. Three-Dimensional Rotation, Twist and Torsion Analyses Using Real-Time 3D Speckle tracking Imaging: Feasibility, Reproducibility, and Normal Ranges in Pediatric Population. *PLoS One* 2016;11(7):e0158679.
 68. Lu X, Xie M, Tomberlin D, et al. How accurately, reproducibly, and efficiently can we measure left ventricular indices using M-mode, 2-dimensional, and 3-dimensional echocardiography in children? *Am Heart J* 2008;155(5):946–53.
 69. Marcus KA, Mavinkurve-Groothuis AMC, Barends M, et al. Reference values for myocardial two-dimensional strain echocardiography in a healthy pediatric and young adult cohort. *J Am Soc Echocardiogr* 2011;24(6):625–36.
 70. Klitsie LM, Roest AAW, Van Der Hulst AE, Stijnen T, Blom NA, Ten Harkel ADJ. Assessment of intraventricular time differences in healthy children using two-dimensional speckle-tracking echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2013;26(6):629–39.
 71. Lorch SM, Ludomirsky A, Singh GK. Maturational and Growth-Related Changes in Left Ventricular Longitudinal Strain and Strain Rate Measured by Two-Dimensional Speckle tracking Echocardiography in Healthy Pediatric Population. *J Am Soc Echocardiogr* 2008;21(11):1207–15.
 72. Greenberg NL, Firstenberg MS, Castro PL, et al. Doppler-derived myocardial systolic strain rate is a strong index of left ventricular contractility. *Circulation* 2002;105(1):99–105.
 73. Colan SD, Parness I a, Spevak PJ, Sanders SP. Developmental modulation of myocardial mechanics: age- and growth-related alterations in afterload and contractility. *J Am Coll Cardiol* 1992;19(3):619–29.
 74. Rowland DG, Gutgesell HP. Noninvasive assessment of myocardial contractility, preload, and afterload in healthy newborn infants. *Am J Cardiol* 1995;75(12):818–21.
 75. Ishiwata T, Nakazawa M, Pu WT, Tevosian SG, Izumo S. Developmental changes in ventricular diastolic function correlate with changes in ventricular myoarchitecture in normal mouse embryos. *Circ Res* 2003;93(9):857–65.
 76. Taber LA. Biomechanics of cardiovascular development. *Annu Rev Biomed Eng* 2001;3:1–25.
 77. Zhang L, Gao J, Xie M, et al. Left ventricular three-dimensional global systolic strain by real-time three-dimensional speckle-tracking in children: Feasibility, reproducibility, maturational changes, and normal ranges. *J Am Soc Echocardiogr* 2013;26(8):853–9.
 78. Marcus KA, Mavinkurve-Groothuis AMC, Barends M, et al. Reference Values for

- Myocardial Two-Dimensional Strain Echocardiography in a Healthy Pediatric and Young Adult Cohort. *J Am Soc Echocardiogr* 2011;24(6):625–36.
79. Burke GL, Arcilla RA, Culpepper WS, Webber LS, Chiang YK, Berenson GS. Blood pressure and echocardiographic measures in children: the Bogalusa Heart Study. *Circulation* 1987;75(1):106–14.
 80. Milicevic G, Narancic NS, Steiner R, Rudan P. Increase in cardiac contractility during puberty. *Coll Antropol* 2003;27(1):335–41.
 81. Cain PA, Ahl R, Hedström E, et al. Age and gender specific normal values of left ventricular mass, volume and function for gradient echo magnetic resonance imaging: a cross sectional study. *BMC Med Imaging* 2009;9:2.
 82. Marijjanowski MMH, van der Loos CM, Mohrschladt MF, Becker AE. The neonatal heart has a relatively high content of total collagen and type I collagen, a condition that may explain the less compliant state. *J Am Coll Cardiol* 1994;23(5):1204–8.
 83. Notomi Y, Srinath G, Shiota T, et al. Maturational and adaptive modulation of left ventricular torsional biomechanics: Doppler tissue imaging observation from infancy to adulthood. *Circulation* 2006;113(21):2534–41.
 84. Wulfsohn D, Nyengaard JR, Tang Y. Postnatal growth of cardiomyocytes in the left ventricle of the rat. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004;277(1):236–47.
 85. Kaku K, Takeuchi M, Tsang W, et al. Age-related normal range of left ventricular strain and torsion using three-dimensional speckle-tracking echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2014;27(1):55–64.
 86. Lumens J, Delhaas T, Arts T, Cowan BR, Young A a. Impaired subendocardial contractile myofiber function in asymptomatic aged humans, as detected using MRI. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291(4):H1573–9.
 87. Kroeker C a, Tyberg J V, Beyar R. Effects of ischemia on left ventricular apex rotation. An experimental study in anesthetized dogs. *Circulation*. 1995;92:3539–48.
 88. Mertens L, Weidemann F, Sutherland GR. Left ventricular function before and after repair of an anomalous left coronary artery arising from the pulmonary trunk. *Cardiol Young* 2001;11(1):79–83.
 89. Di Salvo G, Eyskens B, Claus P, et al. Late post-repair ventricular function in patients with origin of the left main coronary artery from the pulmonary trunk. *Am J Cardiol* 2004;93(4):506–8.
 90. di Salvo G, Pacileo G, Limongelli G, et al. Abnormal regional myocardial deformation properties and increased aortic stiffness in normotensive patients with aortic coarctation despite successful correction: an ABPM, standard echocardiography and strain rate imaging study. *Clin Sci (Lond)* 2007;113(5):259–66.
 91. Di Salvo G, Drago M, Pacileo G, et al. Atrial function after surgical and percutaneous closure of atrial septal defect: a strain rate imaging study. *J Am Soc Echocardiogr* 2005;18(9):930–3.
 92. Santoro G, Pascotto M, Sarubbi B, et al. Early electrical and geometric changes after percutaneous closure of large atrial septal defect. *Am J Cardiol* 2004;93(7):876–80.
 93. Di Salvo G, Drago M, Pacileo G, et al. Comparison of strain rate imaging for quantitative evaluation of regional left and right ventricular function after surgical versus percutaneous closure of atrial septal defect. *Am J Cardiol* 2005;96(2):299–

302.

94. Eyskens B, Ganame J, Claus P, Boshoff D, Gewillig M, Mertens L. Ultrasonic strain rate and strain imaging of the right ventricle in children before and after percutaneous closure of an atrial septal defect. *J Am Soc Echocardiogr* 2006;19(8):994–1000.
95. Chow PC, Liang XC, Cheung EW, Lam WW, Cheung YF. New two-dimensional global longitudinal strain and strain rate imaging for assessment of systemic right ventricular function. *Heart* 2008;94(7):855–9.
96. Di Salvo G, Pacileo G, Rea A, et al. Transverse strain predicts exercise capacity in systemic right ventricle patients. *Int J Cardiol* 2010;145(2):193–6.
97. Hughes ML, Shekerdeman LS, Brizard CP, Penny DJ. Improved early ventricular performance with a right ventricle to pulmonary artery conduit in stage 1 palliation for hypoplastic left heart syndrome: evidence from strain Doppler echocardiography. *Heart* 2004;90(2):191–4.
98. Frommelt PC, Sheridan DC, Mussatto KA, et al. Effect of Shunt Type on Echocardiographic Indices After Initial Palliations for Hypoplastic Left Heart Syndrome: Blalock-Taussig Shunt Versus Right Ventricle-Pulmonary Artery Conduit. *J Am Soc Echocardiogr* 2007;20(12):1364–73.
99. Weidemann F, Eyskens B, Mertens L, et al. Quantification of regional right and left ventricular function by ultrasonic strain rate and strain indexes after surgical repair of tetralogy of Fallot. *Am J Cardiol* 2002;90(2):133–8.
100. Kavey RE, Bove EL, Byrum CJ, Blackman MS, Sondheimer HM. Postoperative functional assessment of a modified surgical approach to repair of tetralogy of Fallot. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;93(4):533–8.
101. Schamberger MS, Hurwitz RA. Course of right and left ventricular function in patients with pulmonary insufficiency after repair of Tetralogy of Fallot. *Pediatr Cardiol* 2000;21(3):244–8.
102. Cheung EWY, Liang X, Lam WWM, Cheung Y. Impact of right ventricular dilation on left ventricular myocardial deformation in patients after surgical repair of tetralogy of fallot. *Am J Cardiol* 2009;104(9):1264–70.
103. Scherptong RWC, Mollema SA, Blom NA, et al. Right ventricular peak systolic longitudinal strain is a sensitive marker for right ventricular deterioration in adult patients with tetralogy of fallot. *Int J Cardiovasc Imaging* 2009;25(7):669–76.
104. Eyskens B, Brown SC, Claus P, et al. The influence of pulmonary regurgitation on regional right ventricular function in children after surgical repair of tetralogy of Fallot. *Eur J Echocardiogr* 2010;11(4):341–5.
105. Moiduddin N, Asoh K, Slorach C, Benson LN, Friedberg MK. Effect of Transcatheter Pulmonary Valve Implantation on Short-Term Right Ventricular Function as Determined by Two-Dimensional Speckle tracking Strain and Strain Rate Imaging. *Am J Cardiol* 2009;104(6):862–7.
106. Di Salvo G, Russo MG, Castaldi B, et al. Valutazione della funzione cardiaca in epoca fetale. *G Ital Cardiol* 2009;10(8):499–508.
107. Shenker L, Reed KL, Marx GR, Donnerstein RL, Allen HD, Anderson CF. Fetal cardiac Doppler flow studies in prenatal diagnosis of heart disease. *Am J Obs Gynecol* 1988;158(6 Pt 1):1267–73.

108. De Smedt MC, Visser GH, Meijboom EJ. Fetal cardiac output estimated by Doppler echocardiography during mid- and late gestation. *Am J Cardiol* 1987;60(4):338–42.
109. Rychik J. Fetal cardiovascular physiology. *Pediatr Cardiol* 2004;25(3):201–9.
110. DeVore GR. Assessing fetal cardiac ventricular function. *Semin Fetal Neonatal Med* 2005;10(6):515–41.
111. Aoki M, Harada K, Ogawa M, Tanaka T. Quantitative assessment of right ventricular function using doppler tissue imaging in fetuses with and without heart failure. *J Am Soc Echocardiogr* 2004;17(1):28–35.
112. Weidemann F, Jamal F, Sutherland GR, et al. Myocardial function defined by strain rate and strain during alterations in inotropic states and heart rate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283(2):H792–9.
113. Di Salvo G, Russo MG, Paladini D, et al. Quantification of regional left and right ventricular longitudinal function in 75 normal fetuses using ultrasound-based strain rate and strain imaging. *Ultrasound Med Biol* 2005;31(9):1159–62.
114. Di Salvo G, Russo MG, Paladini D, et al. Two-dimensional strain to assess regional left and right ventricular longitudinal function in 100 normal foetuses. *Eur J Echocardiogr* 2008;9(6):754–6.
115. Paladini D, Lamberti a, Teodoro a, Arienzo M, Tartaglione a, Martinelli P. Tissue Doppler imaging of the fetal heart. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000;16(6):530–5.
116. Harada K, Tsuda a, Orino T, Tanaka T, Takada G. Tissue Doppler imaging in the normal fetus. *Int J Cardiol* 1999;71(3):227–34.
117. Ishii T, McElhinney DB, Harrild DM, et al. Circumferential and longitudinal ventricular strain in the normal human fetus. *J Am Soc Echocardiogr* 2012;25(1):105–11.
118. Bussadori C, Moreo a, Di Donato M, et al. A new 2D-based method for myocardial velocity strain and strain rate quantification in a normal adult and paediatric population: assessment of reference values. *Cardiovasc Ultrasound* 2009;7:8.
119. Kapusta L, Mainzer G, Weiner Z, et al. Second trimester ultrasound: Reference values for two-dimensional speckle tracking-derived longitudinal strain, strain rate and time to peak deformation of the fetal heart. *J Am Soc Echocardiogr* 2012;25(12):1333–41.
120. Peng QH, Zhou QC, Zeng S, et al. Evaluation of regional left ventricular longitudinal function in 151 normal fetuses using velocity vector imaging. *Prenat Diagn* 2009;29(12):1149–55.
121. Ta-Shma A, Perles Z, Gavri S, et al. Analysis of Segmental and Global Function of the Fetal Heart Using Novel Automatic Functional Imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 2008;21(2):146–50.
122. Huhta JC. Fetal congestive heart failure. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 2005;10(6):542–52.
123. Weidemann F, Niemann M, Herrmann S, et al. A new echocardiographic approach for the detection of non-ischaemic fibrosis in hypertrophic myocardium. *Eur Heart J* 2007;28(24):3020–6.
124. Mäkikallio K, McElhinney DB, Levine JC, et al. Fetal aortic valve stenosis and the evolution of hypoplastic left heart syndrome: Patient selection for fetal intervention. *Circulation.* 2006;113(11):1401–5.

125. Holzapfel GA, Gasser TC, Ogden RW. A new constitutive framework for arterial wall mechanics and a comparative study of material models. *Journal of Elasticity*, 61:1–48, 2000.
126. Wang HM, Gao H, Luo XY, et al. Structure-based finite strain modelling of the human left ventricle in diastole. *International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering*, 26(1):807–827, 2012.
127. Holzapfel GA, Ogden RW. Constitutive modelling of passive myocardium: a structurally based framework for material characterization. *Philosophical transactions of the Royal Society Series A*, 367(1902):3445–75, 2009.
128. Sengupta PP, Tajik AJ, Chandrasekaran K, Khandheria BK. Twist Mechanics of the Left Ventricle. Principles and Application. *JACC: Cardiovascular Imaging*, 1(3):366–376, 2008
129. Taber LA, Yang M, Podszus WW. Mechanics of ventricular torsion. *Journal of Biomechanics*, 29(6):745–752, 1996.
130. Tobita K, Garrison JB, Liu LJ, et al. Three-dimensional myofiber architecture of the embryonic left ventricle during normal development and altered mechanical loads. *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 283(1):193–201, 2005.
131. Streeter DD, Hanna WT. Engineering Mechanics for Successive States in Canine Left Ventricular Myocardium. *Circulation research*, XXX(17):639–655, 1973.
132. Streeter DD, Spotnitz HM, Patel DP, et al. Fiber Orientation in the Canine Left Ventricle during Diastole and Systole. *Circulation research*, 24(8):339–348, 1969
133. MacKenna DA, Omens JH, McCulloch AD, Covell JW. Contribution of collagen matrix to passive left ventricular mechanics in isolated rat hearts. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 266(3):H1007–H1018, 1994.
134. Demer LL, Yin FCP. Passive biaxial mechanical properties of isolated canine myocardium. *Journal of Physiology*, 339:615–630, 1983.
135. Smaill B, Hunter P. Structure and Function of the Diastolic Heart: Material Properties of Passive Myocardium, pages 1–29. Springer New York, New York, NY, 1991.
136. Dokos S, Smaill BH, Young AA, LeGrice JJ. Shear properties of passive ventricular myocardium. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2650–2659, 2002.
137. Omens JH, Fung YC. Residual Strain in Rat Left Ventricle. *Circulation Research*, 1989: 37–46.
138. Guccione JM, McCulloch AD, Waldman LK. Passive Material Properties of Intact Ventricular Myocardium Determined From a Cylindrical Model. *Journal of Biomechanical Engineering*, 113(February 1991):42–55, 1991.
139. Guccione JM, McCulloch AD. Finite Element Modeling of Ventricular Mechanics. In L. Glass Editor, *Theory of Heart*, chapter 6, pages 121–144. Springer-Verlag, New York, 1991.
140. Guccione JM, Costa KD, McCulloch AD. Finite element stress analysis of left ventricular mechanics in the beating dog heart. *Journal of Biomechanics*, 28(10):1167–1177, 1995.

141. Hadjicharalambous M, Chabiniok R, Asner L, et al. Analysis of passive cardiac constitutive laws for parameter estimation using 3D tagged MRI. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, pages 807–828, 2014.
142. Fung YC. *Biomechanics: mechanical properties of living tissue*. Springer, 2nd edition, 1993.
143. Gasser TC, Ogden RW, Holzapfel GA. Hyperelastic modelling of arterial layers with distributed collagen fiber orientations. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 3(6):15–35, 2006.
144. Zienkiewicz OV. *The finite element method*. McGraw-Hill, 1977.
145. Karlsson Hibbitt and Sorensen. *ABAQUS Documentation*. Hibbitt, Karlsson & Sorensen, Incorporated, 2002.
146. Asner L, Hadjicharalambous M, Chabiniok R, et al. Patient-specific modeling for left ventricular mechanics using data-driven boundary energies. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering*, 2016; 314:269–295.
147. Cutri E, Serrani M, Bagnoli P, et al. The cardiac torsion as a sensitive index of heart pathology: A model study. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2015, 55:104–119.
148. Kayvanpour E, Mansi T, Sedaghat-Hamedani F, et al. Towards Personalized Cardiology : Multi-Scale Modeling of the Failing Heart. *PLoS ONE*, 2015; 1–18.
149. Marchesseau S, Delingette H, Sermesant M, Ayache N. Fast parameter calibration of a cardiac electromechanical model from medical images based on the unscented transform. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 2013;12(4):815–831.
150. Pena E, Tracqui P, Azancot A, et al. Unraveling changes in myocardial contractility during human fetal growth: A finite element analysis based on in vivo ultrasound measurements. *Annals of Biomedical Engineering*, 2010;38(8):2702–2715.
151. Johnson P, Maxwell DJ, Tynan MJ, Allan LD. Intracardiac pressures in the human fetus. *Heart*, 2000; 84(1):59–63,.
152. Gao H, Li WG, Cai L, Berry C, Luo XY. Parameter estimation in a Holzapfel–Ogden law for healthy myocardium. *Journal of Engineering Mathematics*, 2015.
153. Schmid P, Niederer P, Lunkenheimer PP, Torrent-Guasp F. The anisotropic structure of the human left and right ventricles. *Technol. Health Care*, 1997; 5(1,2):29–43.
154. Sanchez-Quintana D, Garcia-Martinez V, Hurlé JM. Myocardial fiber architecture in the human heart. anatomical demonstration of modifications in the normal pattern of ventricular fiber architecture in a malformed adult specimen. *Acta Anatomica*, 1990; 138(4):352–358.
155. Asner L, Hadjicharalambous M, Chabiniok R, et al. Estimation of passive and active properties in the human heart using 3D tagged MRI. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 2015; 15(5):1–19.
156. Klotz S, Hay I, Dickstein ML, et al. Single-beat estimation of end-diastolic pressure-volume relationship: a novel method with potential for noninvasive application. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 2006;291(1):403–412.