

**Dottorato di Ricerca in Medicina Clinica e Sperimentale:
Relazione Annuale**

*Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale
Università del Piemonte Orientale*



2° anno di corso
Anno accademico 2006-07

Dottorando: Dr. Philippe-Primo Caimmi MD, Msc, Dirigente medico cardiocirurgo
Titolo della attività di ricerca: **ricerca clinica e sperimentale in cardiocirurgia.**

Introduzione

In continuità con l'anno precedente, ho portato avanti i progetti iniziati nel primo anno e ho messo "in cantiere" nuovi studi a partire dalle acquisizioni dei lavori dello scorso anno. Quest'anno sono stati inoltre conclusi accordi di collaborazione con aziende biomedicali che porteranno finanziamenti al Dipartimento (vedere nelle note allegate), così come preventivavo nella relazione dello scorso anno. L'attività svolta ha permesso di elaborare tesi di laurea, presentazioni a congressi nazionali e internazionali, articoli originali e review. Le attività svolte sono organizzate nei capitoli di seguito riportati.

A-Attività di Ricerca in Fisiologia e Fisiopatologia Cardiovascolare

- 1. Effetti emodinamici del Levosimendan**
- 2. Effetti antischemici del Levosimendan**
- 3. Protezione miocardica nell'arresto cardioplegico**

L'attività sperimentale e clinica atta a comprendere e validare la risposta ventricolare alla somministrazione intracoronarica di Levosimendan è continuata proficuamente nel corso di quest'anno accademico, portando risultati di grande interesse che sono stati presentati a congressi scientifici internazionali (vedere paragrafo attività scientifica) e che sono chiaramente riassunti nella nota 1 tratta da una review in preparazione. Sulla base delle possibili ricadute cliniche di queste osservazioni, sono stati proposti alla regione due progetti di ricerca sanitaria finalizzata, indicati nelle note 2 e 3.

B-Attività di ricerca in Chirurgia Sperimentale Cardiovascolare

- 1. Sviluppo di modelli animali per la CEC (circolazione extracorporea)**

Nel corso di quest'anno sono stati sviluppati le metodiche ed i protocolli necessari alla realizzazione di progetti sperimentali su problematiche correlate alla CEC. Questi progetti hanno suscitato l'interesse di istituzioni esterne a questo Ateneo, che hanno commissionato dei progetti di ricerca finanziata (note 4 e 5).

- 2. Sperimentazione di nuove protesi cardiovascolari: valvole cardiache, anelli valvolari mitralici e tricuspidi**

L'attività svolta lo scorso anno ha portato all'approvazione da parte del comitato etico dell'Ospedale Maggiore della Carità del progetto "Perseval" commissionato dalla Sorin Group per la sperimentazione clinica di una nuova protesi aortica suturless. Inoltre si è realizzato uno studio clinico sul trattamento dell'insufficienza mitralica ischemica (nota 6).

C-Attività di ricerca in Clinica Cardiovascolare

- 1. Nuovi impieghi clinici del Levosimendan**
Vedere nota 2.
- 2. Nuove metodologie per la guarigione ossea della sternotomia**
Vedere nota 4.
- 3. Nuove metodologie nella cura delle infezioni sternali**

Da circa un anno si sta monitorando l'efficacia terapeutica ed assistenziale di una nuova metodica per il trattamento delle infezioni post-sternotomiche: VAC terapia. L'analisi preliminare di questa

Commento [AMDC-N1]:
Levosimendan for treatment of ischemic heart failure: differences and perspectives between intracoronary and intravenous administration
Introduction
Acute decompensated heart failure (ADHF) is a common and growing medical problem associated with major morbidity and ... [1]

Commento [AMDC-N2]: TIT OLO DEL PROGETTO
Effetti cardioprotettivi della somministrazione intracoronarica di levosimendan in pazienti con shock cardiogeno
Il levosimendan è un nuovo agente inotropo positivo utilizzato per il trattar ... [2]

Commento [AMDC-N3]: TIT OLO DEL PROGETTO
Nuove metodiche di protezione miocardica durante arresto cardioplegico: validazione su modello di chirurgia sperimentale
Il miglioramento delle tecniche di cardiocirur ... [3]

Commento [AMDC-N4]: PR OTOCOLLO SPERIMENTALE E ANALISI DEI COSTI DELLO STUDIO DAL TITOLO: "PROPRIETA' OSTEOGENETICHE DELLO SPONGOSTAN"
OGGETTO: ... [4]

Commento [AMDC-N5]: PR OTOCOLLO SPERIMENTALE E ANALISI DEI COSTI DELLO STUDIO DAL TITOLO: "PROPRIETA' CARDIOPROTETTIVE DELLA SUPEROSSIDO DISMUTASI (SOD)"
OGGETTO:
Esperimenti da eseguire su 10 conigli suddivisi in 2 gruppi
GRUPPO 1: gruppo cor ... [5]

Commento [MSOffice6]: CO RONARY ARTERY BYPASS GRAFTING AND RESTRICTIVE ANNULOPLASTY IN PATIENTS WITH ISCHEMIC CARDIOMYOPATHY.
Philippe Primo Caimmi^{1,2} and Giovanni Teodori¹
¹Departments of cardiac surgery and ²clinical and experimental medicine ... [6]

esperienza costituisce il materiale di una tesi di laurea per il Corso di Scienze Infermieristiche di questa Università (nota [7]).

4. Fisiopatologia delle cellule valvolari cardiache

Dai tessuti non utilizzati nell'attività di homograft banking, si sono isolate e coltivate le cellule valvolari cardiache, sulle quali si è iniziato a svolgere indagini di biologia cellulare e molecolare atte a comprendere i meccanismi di modulazione della risposta cellulare nella patologia valvolare. Questa attività, svolta con i fondi ottenuti dal progetto di ricerca sanitaria finalizzata finanziata lo scorso anno dalla Regione, ha portato alla preparazione di un review scritta in associazione con altri quattro Atenei della Comunità Europea (Golway, Aachen, Edimburgh, Leuven) e alla formulazione di un nuovo progetto presentato alla Regione (note [8 e 9])

6. La chirurgia mininvasiva

Quest'anno si è estesa l'attività clinica di chirurgia mini-invasiva effettuando interventi di chirurgia mitralica per minitoracotomia dx e inoltre si è ottenuta l'approvazione del locale Comitato Etico per lo studio "Perseval" (vedere paragrafo B 2)

7. Espressione recettoriale del grasso epicardico

In collaborazione con l'Istituto di Immunologia di questa Università e con l'unità di Cardiologia Riabilitativa dell'Ospedale Maggiore, si sta svolgendo una ricerca biomolecolare riguardante l'espressione recettoriale nel grasso epicardico di Pazienti cardiopatici (nota [10])

8. Studio Indipendente "ISTHMUS"

Follow up clinico multicentrico sulla valvola biologica Mitroflow.

D-Attività Scientifiche varie

-Relatore a congressi:

1. Annual Meeting of World Society of CardioThoracic Surgery, Kyoto 7/2007
2. The 56th Annual Meeting of Scandinavian Association of Thoracic Surgeons, Helsinki, 18/08/2007
3. Annual Meeting of Mediterranean Society of Cardiology and Cardiac Surgery, Opatija 27/09/2007

-Attività Didattiche

1. Affidamento di attività tutoriale nell'ambito della Scuola di Dottorato
2. Didattica integrativa nell'ambito del Corso di Laurea in Igiene Dentale
3. Docente al Corso infermieristico "Heart and Nursing", Ospedale Maggiore della Carità, 16/10/2007

-Partecipazione a congressi come coautore:

1. Congresso della Società Scandinava di Ricerca Cardiovascolare, Geilo 2/2007
2. Congresso della Società Mondiale di Ricerca Cardiovascolare, Bologna 6/2007
3. Annual Meeting of World Society of CardioThoracic Surgery Kyoto 7/2007
4. The 56th Annual Meeting of Scandinavian Association of Thoracic Surgeons, Helsinki, 18/08/2007.
5. Giornata Cardiologica sullo Scompenso Cardiaco, Università di Verona, 4/2007
6. Congresso Società Italiana Ricerca Cardiovascolare, Imola 09/2007

-Attività di Referee

1. Clinical Pharmacokinetics

CONCLUSIONI

Gli obiettivi che mi prefiggevo quest'anno erano: 1. dare continuità al lavoro già intrapreso al fine di valorizzarne al massimo le potenzialità scientifiche, 2. suscitare l'interesse di eventuali finanziatori. L'ammontare approssimativo dei finanziamenti in corso di definizione si potrebbero aggirare attorno ai 30.000 euro per l'anno solare 2007-2008.

Commento [AMDC-N7]: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
"Amedeo Avogadro"
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA
CORSO DI LAUREA IN INFERMIERISTICA
PRESIDENTE: Prof. Giancarlo Avanzi

... [7]

Commento [AMDC-N8]: "To correct or to repair: that is the Question..." State of the art of conservative treatment of mitral valve pathology.

Philippe-Primo Caimmi MD, Msc,
Centre of Cardiac Surgery,
Dept. of Cardiovascular Diseases, Ospedale Maggiore della Carità, Medical School of University A. Avogadro, Novara Italy

... [8]

Commento [AMDC-N9]: TITOLO DEL PROGETTO differenziazione delle cellule valvolari cardiache in condizioni normali/patologiche: studio condotto nell'ambito dell'attività di homograft banking

Gli omonestri valvolari cardiaci (OVC) rappresentano il migliore sostituto oggi disponibile per la chirurgia delle valvole cardiache. L'apertura della Banca

... [9]

Commento [MSOffice10]: Titolo della ricerca: "Espressione dei recettori per gli endocannabinoidi (CB1 - CB2) nel tessuto adiposo epicardico umano".

Obiettivi:
-Lo studio si propone come obiettivo quello di dimostrare la presenza nel tessuto adiposo epicardico di recettori per gli endocannabinoidi che si sono dimostrati importanti nel modulare lo spessore del tessuto adiposo

... [10]

Levosimendan for treatment of ischemic heart failure: differences and perspectives between intracoronary and intravenous administration

Introduction

Acute decompensated heart failure (ADHF) is a common and growing medical problem associated with major morbidity and mortality. It is the leading reason for hospital admission among patients over age 65 and the most costly cardiovascular disorder in Western countries. The 60-day mortality following hospital admission because of an exacerbation of heart failure is 8%–20%, depending on the population studied. The main cause of ADHF is ischemic heart disease in 60–70% of patients, with approximately 30% of patients being in cardiogenic shock at the time of hospital admission (**Grimm W. What Is Evidence-Based, What Is New in Medical Therapy of Acute Heart Failure? Herz 31, Nr. 8, 2006**). Several clinical trials and registries have shown that the majority of patients hospitalized for ADHF have congestive symptoms with systolic blood pressure higher than 100 mmHg and preserved cardiac function. However, a 2–8% of patients with ADHF exhibit a severely impaired cardiac function with reduced systolic pressure and symptoms and signs of peripheral hypo-perfusion and renal dysfunction. These patients have a fourfold greater risk for adverse cardiac events in the next 6 months than those with normal systolic blood pressure and need an emergent enhancement of cardiac mechanical efficiency in order to achieve clinical stabilization (**Parissis JT, Farmakis D, Nieminen M. Classical inotropes and new cardiac enhancers. Heart Fail Rev. 12:149-56, 2007**). Thus, the main goals of treatment in patients with low output syndrome are: the restoration of systolic pressure, the improvement of peripheral tissue oxygenation, the protection of vital organs, the alleviation of symptoms and, finally, the prevention of new exacerbations. Simultaneously, correctable causes of ADHF have to be identified and treated as soon as possible. Furthermore, although there is little doubt that improving symptoms and hemodynamic function is an important goal in the initial management of ADHF, there is also emerging evidence that patients with ADHF may be particularly susceptible to progressive myocardial failure from the accelerated loss of cardiac myocytes, mainly through necrosis and apoptosis. Necrosis is an episodic process by which myocytes undergo loss of membrane integrity and total disruption of cellular function, followed by cell death, inflammation, and fibrosis. Clinically, the most common cause of necrosis is ischemia. In contrast, apoptosis typically involves smaller numbers of cells, follows a more prolonged time course, and may occur chronically, resulting in a substantial cumulative loss of cells. Furthermore, apoptosis is an energy-dependent process mediated by a highly organized biochemical cascade (**Melanie M and Colucci WS. Cardioprotection: A New Paradigm in the Management of Acute Heart Failure Syndromes Am J Cardiol 96:26G–31G, 2005**). Indeed, during an episode of acute heart failure, myocyte loss caused by either necrosis or apoptosis may occur via several potential mechanisms. In patients with coronary artery disease (CAD), decompensation may lead to increased myocardial oxygen demands that provoke flow-limited ischemia and myocyte death. Even in the absence of CAD, the hemodynamic stresses associated with heart failure may lead to subendocardial ischemia and subsequent apoptosis and/or necrosis. In addition, several of the known stimuli for myocyte apoptosis are present in elevated levels in the myocardium during ADHF, including norepinephrine, angiotensin, mechanical strain, and oxidative stress. Thus if acute decompensation is associated with accelerated myocyte loss, optimal treatment should include agents or strategies directed not only at the restoration of systolic blood pressure and tissue perfusion but at slowing myocyte death also. Cardiotoxic agents, such as digitalis, catecholamines and cyclicAMP-phosphodiesterase III (PDEIII) inhibitors, have currently been available for the treatment of patients with contractile dysfunction. These agents induce the positive inotropic effect by elevation of the intracellular Ca²⁺ concentration acting through various subcellular mechanisms (**Farah AE, Alousi AA, Schwarz RP, Jr. Positive inotropic agents. Ann Rev Pharmacol Toxicol 24:275–328, 1984**). Hence the currently available cardiotoxic agents act primarily via the upstream mechanism (**Blinks JR, Endoh M. Modification of myofibrillar responsiveness to Ca⁺⁺ as an inotropic mechanism. Circulation 73:11185–11198, 1986; Endoh M. Changes in intracellular Ca²⁺ mobilization and Ca²⁺ sensitization as mechanisms of action of physiological interventions and inotropic agents in intact myocardial cells. Jpn Heart J 39:1–44, 1998**) and therefore are not free from the potential risk of intracellular Ca²⁺ overload to result in cardiac arrhythmias, cell injury that could ultimately lead to myocardial cell death and result in aggravation of prognosis of patients with long term administration. (**Thackray S, Easthaugh J, Freemantle N, Cleland JG. The effectiveness and relative effectiveness of intravenous inotropic drugs acting through the adrenergic pathway in patients with heart failure – a meta regression analysis. Eur J Heart Fail 4:515–529, 2002; Packer M. The search for the ideal positive inotropic agent. N Engl J Med 329:201–202, 1993**). In addition, they require an increase in activation energy for induction of the positive inotropic effects as they facilitate intracellular Ca²⁺ mobilization. Furthermore, they have serious problems pertinent to the individual agents, such as arrhythmogenicity, narrow safety margin, long plasma half life and wide individual variations in the case of digitalis, arrhythmogenicity and development of tolerance with catecholamines and PDE III inhibitors during long term administration (**Endoh M, Hori M. Basic pharmacology and clinical application of new positive inotropic agents. Drugs Today 29:29–56, 1993**). Considering disadvantages of these currently available cardiotoxic agents, novel drugs may have a high potential to replace these agents. In particular the class of cardiotoxic agents, termed Ca²⁺ sensitizers, has recently raised wider attention.

Levosimendan

Levosimendan, a member of the Ca²⁺ sensitizers drugs, meets most of the goals of treatment in ADHF and also promotes cardioprotection (**Papp Z, Csapo K, Pollessello P, Haikala H, Edes I. Pharmacological mechanisms contributing to the clinical efficacy of levosimendan. Cardiovasc Drug Rev 23:7198, 2005; Mebazaa A, Barraud D, Welschbillig S. Randomized clinical trials with levosimendan. Am J Cardiol 96:74G–79G, 2005**). Levosimendan is a pyridazinone-dinitrile derivative molecule that has positive inotropic properties by increasing the sensitivity of the cardiomyocyte contractile apparatus to intracellular Ca²⁺. Levosimendan seems to augment cardiac contractile performance by increasing myofilament calcium sensitivity by binding to cardiac troponin C in a Ca²⁺-dependent manner. This mechanistic effect leads to the stabilization of calcium-induced conformational changes of troponin C and modification of actin-myosin cross-bridge kinetics, without causing an increase in cycling rate of the cross-bridges or myocardial ATP consumption (**Kivikko M, Lehtonen L Levosimendan: a new inodilatory drug for the treatment of decompensated heart failure. Curr Pharm Des 11:435–455, 2005; Parissis J, Filippatos G,**

Farmakis D, Adamopoulos S, Paraskevaidis I, Kremastinos D. **Levosimendan for the treatment of acute heart failure syndromes. Exp Opin Pharmacother 6:2741–2751, 2005**. Potassium channels sensitive to intracellular ATP levels (K_{ATP}) are involved in the vasodilator response to reactive hyperemia, hypoxia, endothelium-dependent hyperpolarizing drugs and vasodilator prostaglandins. These channels are expressed on the surface cell membranes of vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes and in the inner mitochondrial membranes. (Zoltán P, Kálmán C, Pollesello P, Haikala H, Édes I. **Pharmacological Mechanisms Contributing to the Clinical Efficacy of Levosimendan. Cardiovascular Drug Reviews 23: 71–98, 2005**). Indeed, levosimendan has been found to be a powerful opener of K_{ATP} channels of the smooth muscle cells causing peripheral arterial and venous dilatation. This biologic action is responsible for the drug-induced reduction of peripheral vascular resistance and cardiac after load. Thus, levosimendan can lead to significant increase of cardiac output through its combined positive inotropic and peripheral vasodilatory properties. In addition to the action on K^+ channels, experimental data also demonstrated that the intra-coronary administration of levosimendan in anesthetized pigs induces a dose-dependent coronary vasodilation through the induced endothelial release of nitric oxide. According to these findings, levosimendan-induced coronary nitric oxide release may be an additional biochemical mechanism elucidating the drug effects on vasculature (Grossini E, Caimmi PP, Molinari C, Teodori G, Vacca G. **Hemodynamic effect of intracoronary administration of levosimendan in the anesthetized pig. J Cardiovasc Pharmacol 46:333–342, 2005**).

Interestingly, in addition to the role of levosimendan as a preconditioning agent through an action on the K_{ATP} mitochondrial channels, recent experimental *in vitro* evidences suggest that levosimendan may protect cardiomyocytes from apoptotic cell death through the opening of the above channels as well (Maytin M, Colucci W. **Cardioprotection: a new paradigm in the acute management of acute heart failure syndromes. Am J Cardiol 96(6A):26G–31G, 2005**). These *in vitro* observations are in keeping with some recent *in vivo* findings, according to which levosimendan-induced clinical improvement of patients with ADHF is closely related with the reduction of circulating soluble apoptosis signalling molecules and pro-inflammatory cytokines (Adamopoulos S, Parissis JT, Iliodromitis EK, Paraskevaidis I, Tsiapras D, Farmakis D, Karatzas D, Gheorghide M, Filippatos GS, Kremastinos DT. **Effects of levosimendan versus dobutamine on inflammatory and apoptotic pathways in acutely decompensated chronic heart failure. Am J Cardiol 98:102–106, 2006**). Immunomodulatory and anti-apoptotic properties of levosimendan may be an important biologic mechanism that prevents further cytotoxic and hemodynamic consequences of abnormal immune and oxidative responses in ADHF, leads to cardioprotection and beneficially intervenes in the progression of syndrome. The administration of levosimendan has been shown to induce dose-dependent favourable effects on various hemodynamic parameters in presence of ADHF also of ischemic origin. Regarding this issue however the beneficial effects of levosimendan have been evidenced mainly in presence of global myocardial ischemia or heart failure (Pieske B. **Levosimendan in regional myocardial ischemia Cardiovasc Drugs Ther. 16: 379-81, 2002**). Hardly any information is available as to the effects of levosimendan in models of regional myocardial ischemia. Du Toit reported on the effects of levosimendan in an *in vivo* pig model of severe regional ischemia-reperfusion (Du Toit E, Hofmann D, McCarthy J, Pineda C. **Effect of levosimendan on myocardial contractility, coronary and peripheral blood flow, and arrhythmia during coronary artery ligation and reperfusion in the *in vivo* pig model. Heart 86:81–87, 2001**). In this model, levosimendan, given intravenously, improved hemodynamic parameters of global left ventricular function during ischemia and after reperfusion, but at the expense of an increased rate of ventricular arrhythmias. In their *in vivo* study, Tassani and coworkers extend this observation to a model of local myocardial ischemia as a consequence of reduced coronary blood flow (Tassani P, Schad H, Heimisch W, Bernhard-Abt A, Ettner U, Mendler N, Lange R. **Effect of the calcium sensitizer levosimendan on the performance of ischaemic myocardium in anaesthetised pigs. Cardiovasc Drugs Ther. 16: 435-41, 2002**). In their model of proximal left anterior descending coronary artery constriction in pigs they observed an unfavourable effect of intravenous levosimendan on regional contractility and energy metabolism in the ischemic myocardium, while contractility in non-ischemic areas as well as overall pump function increased. These findings raise some concerns about the use of levosimendan in situations of cardiac contractile dysfunction related to critical coronary artery stenosis. While an inotropic agent may increase global and even regional contractile function in the stunned or hibernating myocardium, the vasodilating effect of an inodilator (such as levosimendan) may be less beneficial in the presence of critical coronary artery stenosis. In fact, in presence of critical coronary stenosis the subendocardial resistance vessels become near fully dilated, autoregulation fails and their perfusion becomes pressure dependent. However the coronary perfusion pressure may be reduced as a result of reduced systemic vascular resistance and hypotension caused by systemic levosimendan. Indeed a decline in coronary perfusion pressure was also observed in coronary bypass patients upon infusion of levosimendan (Lilleberg J, Nieminen MS, Akkila J, Heikkila L, Kuitunen A, Lehtonen L, Verkkala K, Mattila S, Salmenpera M. **Effects of a new calcium sensitizer, levosimendan, on haemodynamics, coronary blood flow and myocardial substrate utilization early after coronary artery bypass grafting. Europ Heart J 19:660–668, 1998**). Finally under this condition redistribution of blood flow away from the subendocardium to the subepicardium develops as one mechanism of "coronary steal" (Brown BG, Bolson EL, Dodge HT. **Dynamic mechanisms in human coronary artery stenosis. Circulation 70:917–922, 1984**). *Thus as we said in the introduction, the main cause of ADHF is ischemic heart disease in 60–70% of patients, with approximately 30% of patients being in cardiogenic shock at the time of hospital admission. This group of patients represents the majority of patients that should take advantage from levosimendan administration if we would be able to avoid the coronary steal phenomena.*

Effects of intra-coronary levosimendan administration

In an attempt to avoid the systemic effects of levosimendan, in the last years we searched for an alternative way of administration of the drug from the traditional "intravenous" one. Through the intracoronary way of administration the beneficial effects of levosimendan on the heart could have been kept avoiding systemic hypotension.

In the first experiments performed in anesthetized pigs, we examined the hemodynamic effects of the intracoronary administration of doses of levosimendan corresponding to the ones commonly used in clinics as bolus administration (12 and 24 $\mu\text{g}/\text{kg}$), but adapted to the measured coronary blood flow. In these animals the intracoronary bolus administration of the above doses of levosimendan performed in 10 minutes exerted, respectively, coronary blood flow increases of 26.3% and 41.3% in the absence of changes in the other hemodynamic variables. The effects of

levosimendan started within 1-1.5 min from the beginning of the infusion and were persistent. No effects were observed on increased risk of arrhythmias. Furthermore the blockade of the autonomic nervous system did not prevent the coronary vasodilation, which was, however, abolished by the NOS inhibition, thus evidencing the role of nitric oxide in the vasodilating effect of levosimendan (Grossini E, Caimmi PP, Molinari C, Teodori G, Vacca G. *J Cardiovasc Pharmacol.* 46: 333-342, 2005; The Scandinavian Society for Research in Cardio-Thoracic Surgery (SSRCTS), Geilo 2006; National Meeting ANMCO Florence 2006; National Congress of Heart Surgery, Rome 2006). *After these experimental observations, we started a clinical experience* in patients suffering from postpericardiotomy heart failure. In these patients the intracoronary administration of a bolus of levosimendan corresponding to the dosage commonly used as systemic administration, elicited beneficial cardiac effects, increasing both systolic and diastolic functions and blood flow in all of the grafts. No changes of heart rate and systemic arterial blood pressure were observed (Caimmi PP, Grossini E, Molinari C, Vacca G, Teodori G. *Ann Thorac Surg.* 82: 33-34, 2006; The 55th Annual of SATS and the 26th Annual Meeting of ScanSECT, Rejkiavik 2006; National Congress of Heart Surgery, Rome 2006; The 56th Annual of SATS and the 26th Annual Meeting of ScanSECT, Helsinki, 2007; WCTC Kyoto 2007; MCCT Opatija 2007). *So in these consecutive series of 22 patients, clinical results confirmed our previous experimental findings.* After evidencing the absence of hypotension as a consequence of the intracoronary way of administration of the drug, we analyzed its potential role as cardioprotective agent locally given, in presence of regional myocardial ischemia in anesthetized pigs. In particular our goal was to examine, in these experimental conditions, the effects of levosimendan on global myocardial function, expressed by dP/dt_{max} and cardiac output, and on regional myocardial function obtained by the positioning pairs of piezoelectric crystals within the left ventricular wall. Through the use of the crystals we obtained the % of segmental shortening (%SS) in the ischemic and peri-ischemic areas. Moreover the effects of levosimendan on cardiac remodelling were examined by comparing the results of biopsies performed after levosimendan administration with the ones obtained at the end of ischemic period, just before levosimendan. In particular we focused on the effects of levosimendan on apoptosis and autophagy. As concerning the last issue, during the search for cardioprotective mechanisms in a porcine model of chronic myocardial ischemia and hibernating myocardium, Yan et al discovered evidence for autophagy, which could be involved in the protection against apoptosis (Yan L, Sadoshima J, Vatner DE, Vatner SF. *Autophagy: a novel protective mechanism in chronic ischemia.* *Cell Cycle* 5: 1175-1177, 2006).

Autophagy is a cellular degradation process responsible for the turnover of unnecessary or dysfunctional organelles and cytoplasmic proteins, which become sequestered in a double-membrane-bound vesicle, termed autophagosome, and subsequently degraded upon fusion with lysosomes. Autophagy, has recently emerged as an important mediator of programmed cell death pathways. Inhibition of autophagy can trigger apoptosis, and upregulation of autophagy protects against apoptotic stimuli. However, under certain conditions anti-apoptotic and pro-apoptotic Bcl-2 family members activate autophagy to trigger a form of programmed cell death. Furthermore, autophagy can function as a second mode of programmed cell death (type II) distinct from apoptosis, termed autophagic cell death (Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA *The interplay between pro-death and pro-survival signaling pathways in myocardial ischemia/reperfusion injury: apoptosis meets autophagy.* *Cardiovasc Drugs Ther.* 20: 445-62, 2006). In our experiments we analysed the role of levosimendan on apoptosis and autophagy through the analysis of cell death by means of the TUNEL technique, the expression of pro-apoptotic (BAX) and anti-apoptotic genes (Bcl-2) and the expression of pro-autophagic Beclin-1 and of LC3, a specific autophagosome marker.

These experiments were performed in anesthetized pigs instrumented for the measurement of heart rate, aortic blood pressure, central venous pressure, left ventricular end-diastolic blood pressure, left ventricular contractility and relaxation (dP/dt_{max}), %SS, cardiac output (CO) and mean coronary blood flow (CBF). Regional myocardial ischemia was induced by the tie of the second branch of the left anterior descending coronary artery. Levosimendan was injected in the left anterior descending coronary artery at the end of ischemia at doses similar to the ones which have shown to increase coronary blood flow in the absence of systemic effects and at higher doses, which were shown to elicit beneficial effects in stunned myocardium (Jamali IN, Kersten JR, Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC. *Intracoronary levosimendan enhances contractile function of stunned myocardium.* *Anesth Analg.* 85: 23-9, 1997). It is noteworthy that the intra-coronary levosimendan given at corresponding dose of 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ markedly reduced the apoptotic cell death and induced autophagy as a cell survival mechanism without eliciting any beneficial measured effects on myocardial function. The intra-coronary administration of doses higher than 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of levosimendan induced a dose-related increase of dP/dt_{max} , CO, and %SS both in the ischemic and peri-ischemic myocardium, in the absence of changes of other hemodynamic variables. A dose-related increase of coronary blood flow was observed. (National Congress of Heart Surgery, Rome 2006; The 56th Annual of SATS and the 27th Annual Meeting of ScanSECT, Helsinki, 2007; WCCTS, Kyoto 2007). *On the ground of these observations, we started a new clinical study in our institutional CATH LAB performed in patients with ischemic cardiogenic shock before rescue PCA. In this clinical study the ischemic dysfunction of left ventricle was treated by intra-coronary administration of levosimendan. After left ventricular improving, rescue PCA was performed. In particular, a 24 mcg/kg intra-coronary bolus of levosimendan was administered in 10 min in not occluded main coronary branches. In these patients left ventricular function improving was obtained without systemic hypotension and PCA was performed in safer hemodynamic condition in all patients of this series (15 pts). Improvement in hemodynamics allowed to perform safer and more accurate PCA reducing the risk to perform emergent CABG for failed PCA. Comparing data collected during the same period before and after starting this clinical study in our CATH LAB, we observed a significant reduction in number of CABG for failed PCA in levosimendan series than in control series. Lower mortality and better ejection fraction were observed at discharge from the hospital. Furthermore markers of myocardial and endothelial damaging were lower in patients treated with levosimendan than in control ones. In both clinical studies performed in our Institution, either in cardiac surgery or in CATH LAB, the intra-coronary bolus administration of levosimendan was followed in all cases by intravenous administration of levosimendan in the postoperative 24 h.* The results obtained in our *experimental and clinical studies seem to* indicate that in presence of regional myocardial ischemia the intra-coronary administration of levosimendan exerts cardioprotection through the reduction of the apoptotic cell death and the induction of autophagy as a cell survival mechanism, at the corresponding doses commonly used in patients, and through positive direct effects on myocardial function and perfusion at higher doses. Other experiments will be

necessary to: 1.clarify the role of levosimendan on apoptosis and autophagy. Are the inhibitory effects of levosimendan on apoptosis also a consequence of the induced autophagy? Is the effect on apoptosis only a direct effect ? Which are the mechanisms of such effects?2.Is there a dose-related effect on apoptosis and autophagy? Are the higher doses of levosimendan able to induce higher effects on apoptosis and autophagy?3.Which is the role of K_{ATP} channels and of nitric oxide in cardioprotection elicited by intra-coronary levosimendan? Experiments will be necessary to understand the role of these channels and of nitric oxide in the effects of levosimendan on myocardial function and on remodelling. 4.Is there a relationship between nitric oxide and K_{ATP} channels? 5.Which is the intracellular pathway leading to nitric oxide synthesis? 6.Are there genomic effects of levosimendan ? Some of these experiments will be performed in pigs whereas others will be performed *in vitro* on endothelial cells isolated from the coronary arteries of the pigs and on myocardial cells obtained from ischemic and normal myocardium of pigs. The results obtained from these experiments will be useful to clarify the action of levosimendan as a cardioprotective drug when given following the intra-coronary way of administration that could represent the main therapeutic choice in patients with **chronic or acute severe ventricular dysfunction or with** hypotension such as during cardiogenic **or postpericardiotomy** shock, **particularly under suspicion of coronary artery disease. evidences on these issues could also open very important perspectives for the addition of levosimendan in the cardioplegic solutions routinely used in the on-pump surgery to protect the heart during the cardiac arrest . As shown by literature, in** the initial dose finding and therapeutic trials in patients with ADHF, a systolic blood pressure below 90 mmHg was one of the exclusion criteria. in fact, in view of its vasodilatory and potential blood pressure lowering effects, levosimendan alone was not a drug of first choice in cardiogenic shock and was shown to be successfully only used in combination with catecholamines. thus levosimendan given as intra-coronary drug could be used during heart surgery and during p.c.a. in these patients a **significant** reduction of the use of other inotropes could be observed **as just shown by our above mentioned preliminary clinical series. as we underlined at the beginning of this report, the intra-coronary administration allows to treat the ischemic ADHF (60-70% of total number of ADHF) that represents the main exclusion criteria limiting the largest use of this drug at the moment. Besides, as it can be argued from our observations, the use of intra-coronary administration of levosimendan for cardiac protection in on-pump surgery seems feasible after experimental validation. In this case we could extend the beneficial effects of levosimendan on a new large group of patients under risk of ventricle dysfunction.**

TITOLO DEL PROGETTO

Effetti cardioprotettivi della somministrazione intracoronarica di levosimendan in pazienti con shock cardiogeno

Il levosimendan è un nuovo agente inotropo positivo utilizzato per il trattamento dello scompenso cardiaco acuto e cronico anche di natura ischemica. Il levosimendan esercita i suoi effetti benefici sulla contrattilità miocardica aumentando l'affinità della troponina C al Ca^{2+} senza determinare alterazioni della concentrazione citoplasmatica del Ca^{2+} stesso (Gheorghide M. et al. Am J Cardiol 96:68G-73G, 2005). L'assenza di variazioni del Ca^{2+} citosolico ha ripercussioni positive sulla funzionalità diastolica del ventricolo, che non viene peggiorata dalla somministrazione del levosimendan, sul consumo di ossigeno del miocardio e sul rischio di comparsa di aritmie. E' importante sottolineare come il levosimendan si distingue da comuni agenti inotropi che, determinando un aumento del cAMP e del Ca^{2+} intracellulare, inducono effetti deleteri sulla funzione elettromeccanica ventricolare e sulla bioenergetica miocardica (Warltier DC. Anesthesiology 104:556-569, 2006; O'Connor CM et al. Am Heart J. 138:78-86, 1999). Il levosimendan, oltre ad esercitare un effetto inotropo positivo, è anche in grado di determinare vasodilatazione, sia attraverso l'apertura dei canali del K_{ATP} dipendenti della cellula muscolare liscia (Kersten JR et al. Anesth Analg 90:5-11, 2000) che mediante l'attivazione della fosfodiesterasi III (Haikala H et al. Cardiovasc Res 34:536-546, 1997). La somministrazione di levosimendan in presenza di infarto miocardico acuto o di miocardio stordito, sia nel modello animale che

nell'uomo, ha genericamente evidenziato effetti benefici (Figgitt DP et al. *Drugs* 61: 613-627, 2001; Jamali IN et al. *Anesth Analg* 85: 23-29, 1997; Slawsky MT et al. *Circulation* 102: 2222-2227, 2000). Ad esempio nello studio di De Luca (De Luca L et al. *Am Heart J.* 150: 563-567, 2005) il levosimendan, somministrato per via endovenosa a pazienti sottoposti ad angioplastica percutanea, 10 minuti dopo l'intervento, ha determinato un miglioramento dell'indice cardiaco e della riserva coronarica ed una riduzione della pressione di incuneamento polmonare. Effetti benefici sulle pressioni ventricolari e l'indice cardiaco sono stati ottenuti in uno studio analogo condotto da Sonntag (Sonntag S et al. *JACC* 43: 2177-2182, 2004). Occorre tuttavia ricordare come in entrambe i casi il levosimendan abbia determinato una riduzione della pressione arteriosa conseguente al decremento delle resistenze vascolari periferiche. La riduzione del postcarico che si osserva con la somministrazione endovenosa del levosimendan, se da un lato può essere utile per migliorare la gittata cardiaca, dall'altro risulta estremamente dannosa in presenza di una stenosi coronarica. In questo caso, la perfusione miocardica a valle della stenosi risulta esclusivamente dipendente dai valori pressori, così che la somministrazione di un farmaco ipotensivante può risultare deleteria alla cinetica miocardica della regione ischemica (Tassani P et al. *Cardiovasc Drugs Ther* 16:435-441, 2002). Nei nostri precedenti progetti di ricerca finanziati dalla Regione Piemonte nell'anno 2003 (N° 203) e 2006 (N° 1237) abbiamo dimostrato come la somministrazione intracoronarica di dosi corrispondenti a 12µg/kg di levosimendan nel maiale anestetizzato aumenti il flusso ematico coronarico attraverso la liberazione di monossido d'azoto ed eserciti effetti cardioprotettivi in presenza di ischemia miocardica regionale, inibendo l'apoptosi ed attivando l'autofagia. In entrambe i casi l'infusione intracoronarica di levosimendan non ha determinato variazioni della pressione arteriosa e degli altri parametri emodinamici (Grossini E et al. *J Cardiovasc Pharmacol* 46:333-342, 2005). I suddetti progetti di ricerca hanno avuto un'importante ricaduta anche nella pratica clinica in pazienti sottoposti a intervento cardiocirurgico con grave insufficienza cardiaca perioperatoria refrattaria alle terapie convenzionali (Caimmi et al. *Ann Thorac Surg.* 82: 33-4, 2006). Effetti benefici sulla funzionalità miocardica della somministrazione per via intracoronarica di boli di levosimendan sono stati del resto ottenuti anche in pazienti affetti da cardiomiopatia dilatativa (Givertz MM, et al. *Circulation* 115:1218-24, 2007). Occorre a questo proposito ricordare come l'effetto protettivo del levosimendan contro i danni da insulto ischemico sia anche causato dalle sue azioni positive sul preconditionamento secondarie all'apertura dei canali del KATP mitocondriali (Lepran I. et al. *J Cardiovasc Pharmacol* 48: 148-152, 2006).

OBIETTIVI. Scopo del presente progetto di ricerca è quello di valutare gli effetti cardioprotettivi del levosimendan somministrato per via intracoronarica in pazienti in shock cardiogeno sottoposti ad angioplastica percutanea e/o a intervento cardiocirurgico per infarto miocardico acuto (IMA).

METODI. Lo studio sarà effettuato in un totale di 15 pazienti ricoverati per IMA anteriore esteso in sindrome da bassa gittata (indice cardiaco < 2 L/m² al minuto). Saranno esclusi dallo studio pazienti con stenosi aortica o ostruzione del tratto di efflusso ventricolare sinistro. In questo gruppo di pazienti il levosimendan sarà somministrato in 10 minuti per via

intracoronarica alle dosi di 3 µg/min immediatamente prima di effettuare la procedura di angioplastica. I parametri ecocardiografici della funzionalità ventricolare sinistra saranno rilevati mediante eco trans-esofageo, mentre i parametri emodinamici (pressioni sistematica e polmonare, portata cardiaca, pressione venosa centrale, pressione di incuneamento polmonare, resistenze periferiche ecc) saranno monitorati in continuo mediante Swan-Ganz a fibre ottiche. Il tracciato elettrocardiografico sarà registrato in continuo su 12 linee. I pazienti non idonei all'angioplastica e quelli nei quali l'angioplastica è fallita e che quindi saranno sottoposti a intervento di bypass coronarico di emergenza, riceveranno la stessa dose di levosimendan iniettato nel bulbo aortico dopo clampaggio aortico. Gli stessi parametri emodinamici, elettrocardiografici ed ecocardiografici di cui sopra saranno nuovamente rilevati in continuo a partire dal declampaggio. In entrambe le tipologie di intervento sarà annotato l'utilizzo di farmaci cardioattivi e le relative dosi. Date le ampie indicazioni in letteratura riguardanti la sicurezza dell'utilizzo del levosimendan in queste situazioni, a dosaggi sistemici molto più elevati di quelli in esame, è da ritenersi a nostro avviso più etico confrontare i dati ottenuti con casistiche retrospettive anziché effettuare uno studio randomizzato. Parimenti, in caso di differenti indicazioni del comitato etico del nostro Ospedale non vi saranno impedimenti tecnici ad eseguire uno studio randomizzato su due appositi gruppi. **RISULTATI ATTESI.** Come preliminarmente evidenziato negli studi da noi condotti in precedenza questo approccio potrebbe rappresentare un valido ausilio nel trattamento dello shock cardiogeno ischemico durante manovre interventistiche e cardiocirurgiche. **RICADUTE PER IL SSN.** L'incidenza dello shock cardiogeno tra i pazienti coronaropatici è circa del 7% annuo e la mortalità ospedaliera si aggira attorno al 70%. L'identificazione di metodiche atte a ridurre la mortalità e, di conseguenza, i costi assistenziali di una così devastante patologia rappresenta una delle sfide della medicina in ambito cardiovascolare.

TITOLO DEL PROGETTO

Nuove metodiche di protezione miocardica durante arresto cardioplegico: validazione su modello di chirurgia sperimentale

Il miglioramento delle tecniche di cardiocirurgia ha consentito negli ultimi anni di realizzare interventi sempre più complessi su pazienti adulti e pediatrici con funzione ventricolare sempre più compromesse. Parimenti è divenuta maggiore l'esigenza di ovviare agli inconvenienti correlati ai lunghi tempi di arresto cardioplegico. Questo ha portato all'introduzione di nuove cardioplegie. Alla cardioprotezione ipotermica si sono affiancate nell'ordine quella cristalloide, l'ematica fredda, l'ematica calda ed infine varianti come le protezioni intermittenti e continue e la riperfusione miocardica. In particolare la cardioplegia ematica calda (CPEC) segna una rivoluzione in quanto trattasi di una cardioprotezione aerobica e quindi più fisiologica. Studi approfonditi in grado di chiarire gli effetti cellulari delle varie metodiche di cardioprotezione sono scarsi, non sistematici e di non univoca interpretazione. Lo sviluppo delle biotecnologie mette a disposizione dei ricercatori nuove metodiche di biologia

molecolare che consentono di indagare intimamente queste problematiche laddove si abbia a disposizione un modello sperimentale adeguato. L'esigenza di eseguire numerose prove sperimentali e l'invasività dei test (biopsie) e in ultimo la necessità di sacrificare l'animale da esperimento, impongono severi limiti sperimentali e di risorse risolvibili solo con determinati modelli animali. Il coniglio rappresenta un valido modello di chirurgia sperimentale, sia per ricerche di base sia per studi di tecnica chirurgica. Le ragioni sono: basso costo sperimentale, facilità di stabulazione, sufficienti affinità dimensionali. La Facoltà di Medicina del Piemonte Orientale dispone di un validissimo stabulario e di elevate competenze di chirurgia sperimentale cardiovascolare. L'annessa sala operatoria si è recentemente dotata di tutte le apparecchiature necessarie per la realizzazione di interventi cardiocirurgici in CEC con standard paragonabili a quelli adottati sull'uomo. Obiettivi L'efficacia delle cardioprotezioni aerobiche è legata alla frequenza e ai volumi di somministrazione della cardioplegia stessa. Queste variabili rappresentano tuttavia anche la criticità procedurale della metodica. Obiettivo dello studio è identificare soluzioni migliorative di queste metodiche come ad esempio:

- 1) cardioplegia con aggiunta di farmaci attivi sui canali del potassio (levosimendan, diazossido; Kim MY et al. Br. J. Pharmacol. 2006;149:1059-70)
- 2) cardioplegia ipermagnesemica;
- 3) cardioplegia con aggiunta di sostanze antiossidanti (bucillamina, superossido dismutasi chimerica) (S.K. Nelson et al. Biomedicine & Pharmacotherapy 59 (2005) 149–157).

Metodi Lo studio verrà condotto su 40 conigli, del peso di circa 4 Kg, anestetizzati con buprenorfina, medetomidina cloridrato, propofol in infusione continua alle dosi accettate in campo scientifico internazionale per ottenere un adeguato livello di anestesia nel coniglio, ventilati con una miscela di aria e ossigeno. Gli esperimenti verranno condotti secondo le linee guida espresse dal D.L.vo 116/92. Verranno registrate le pressioni arteriosa e venosa centrale tramite cateteri inseriti rispettivamente nell'arteria femorale sinistra e nella vena giugulare destra. Dopo avere effettuato la toracotomia nel 4° spazio intercostale sin., si posizioneranno: una sonda flussimetrica a ultrasuoni attorno all'arco aortico, per la misurazione della gittata cardiaca; sonde piezoelettriche sull'epicardio, per valutare la contrattilità miocardica. Saranno monitorizzati l'ECG e la frequenza cardiaca. Dopo l'instaurazione del bypass cardiopolmonare normotermico, mediante cannulazione della carotide comune dx e della vena giugulare sin., in 5 conigli il cuore sarà arrestato con cardioplegia ematica calda (perfusione per 3 minuti di una soluzione ematica contenente 2 mEq per ml di KCl, alla velocità di 150 ml/h con l'aggiunta, finale di 1 g di MgSO₄). La durata prevista dell'arresto cardiaco sarà di 30 min (gruppo 1, di controllo).. Nel corso dell'esperimento tutti i parametri emodinamici saranno misurati seguendo il time-course: C=controllo; t₀=durante la cardioplegia; t₁=inizio riperfusione. Durante gli esperimenti si eseguiranno biopsie del ventricolo sin per misurare la concentrazione di nucleotidi, lattati, aminoacidi e studiare l'espressione dei geni apoptotici ed autofagici. Saranno prelevati a vari intervalli del time course campioni ematici per valutare la cTnI. Analogamente si procederà negli altri gruppi di studio rispettivamente: gruppo 2: 10 conigli, arresto cardioplegico del gruppo di controllo associato alla somministrazione di farmaci attivi sui canali del potassio (5 conigli con levosimendan, 5 conigli con

diazossido); gruppo 3: 5 conigli, arresto cardioplegico del gruppo di controllo ma deprivato di potassio e con una dose maggiorata di MgSO₄); gruppo 4: 10 conigli, arresto cardioplegico come nel gruppo 3 associato alla somministrazione di farmaci attivi sui canali del potassio (5 conigli con levosimendan, 5 conigli con diazossido); gruppo 5: 10 conigli, arresto cardioplegico del gruppo di controllo associato alla somministrazione di sostanze antiossidanti (5 conigli con bucillamina, 5 conigli con superossido dismutasi chimerica). Dopo l'intervento i conigli saranno mantenuti sotto copertura antibiotica (enrofloxacin per 3-5 giorni). Boli di buprenorfina saranno effettuati a scopo analgesico. Agenti procinetici come la metoclopramide associati eventualmente a farmaci antiulcera come la ranitidina saranno utilizzati in caso di necessità. A sei mesi dall' esperimento i conigli potranno essere sacrificati secondo le modalità consentite e sui loro cuori realizzati studi di anatomo-patologici per valutare l'apoptosi e il rimodellamento ventricolare. Risultati Attesi Dal presente progetto ci attendiamo di perfezionare le conoscenze sull'arresto cardioplegico aerobico ovviandone le attuali criticità. In particolare: 1) l'utilizzo di farmaci attivi sui canali del K⁺ o l'aumento delle dosi di MgSO₄ potrebbero consentire di ridurre le quantità di K⁺ necessario per l'arresto cardioplegico, con importanti benefici sulla ripresa dell' attività cardiaca e sulla funzione renale (cosa particolarmente importante nei Pazienti in insufficienza renale); 2) l'associazione con sostanze antiossidanti potrebbe ridurre lo stress ossidativo e quindi ridurre il danno da riperfusione e l' apoptosi. In entrambi i casi si potrebbe ottenere un aumento del tempo di resistenza all' ischemia, consentendo così di ridurre la frequenza e i volumi della somministrazione di cardioplegia con importanti vantaggi sulla conduzione della CEC. Ricadute Sul Sistema Sanitario Regionale I risultati di questo studio potrebbero fornire importanti indicazioni atte a ridurre il fenomeno dello stunning, della sindrome da riperfusione, della sindrome da bassa gittata e tardivamente del rimodellamento ventricolare conseguenti all'arresto cardioplegico prolungato.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE E ANALISI DEI COSTI DELLO STUDIO DAL TITOLO: “*PROPRIETA' OSTEOGENETICHE DELLO SPONGOSTAN*”

OGGETTO:

Esperimenti da eseguire su 12 conigli suddivisi in 3 gruppi

GRUPPO 1: applicazione sternale di Spongostan (GS)

GRUPPO 2: applicazione sternale di cera (GW)

GRUPPO 3: senza applicazione sternale: controllo (GC)

L'identificazione dei gruppi di studio risponde alla necessità di identificare, così come già da noi esposto in precedenti occasioni (simposi scientifici e riunioni di lavoro con gli specialisti aziendali del prodotto), le eventuali proprietà osteogenetiche dello Spongostan applicato sullo sterno al posto dell'usuale cera.

PROTOCOLLO CHIRURGICO

Lo studio verrà condotto su 12 conigli, del peso di circa 4 Kg, anestetizzati con buprenorfina (0.05 mg/kg e.v) seguita da medetomidina cloridrato (Domitor: 0.1 mg/kg i.m) + propofol (Inderal: 7-8 mg/kg e.v. in bolo seguito da infusione continua alle dosi di 0.6 mg/kg/min), dosi accettate in campo scientifico internazionale come ideali per ottenere un adeguato livello di anestesia nel coniglio, e ventilati con una miscela di aria e ossigeno. Gli esperimenti verranno condotti secondo le linee guida espresse dal D.L.vo 116/92 per evitare le sofferenze degli animali e limitare allo stretto necessario il numero degli esperimenti. In ogni animale verrà effettuata la sternotomia seguita da resintesi sternale previa applicazione di Spongostan nei 4 conigli del gruppo GS, cera nei 4 conigli del gruppo GW, mentre nel gruppo di controllo la re-sintesi non viene preceduta da alcuna applicazione di alcuno prodotto per l'emostasi sternale. Dopo ogni intervento i conigli saranno mantenuti sotto copertura antibiotica attraverso la somministrazione di enrofloxacin (Baytril; 5-10 mg/kg s.c BID) per 3-5 giorni. La temperatura corporea sarà mantenuta nei limiti attraverso utilizzo di copertina termica o lampada a infrarossi. Boli di buprenorfina (0.05 mg/kg i.v) saranno effettuati a scopo analgesico. Agenti procinetici come la metoclopramide (0.5 mg/kg SC o per os) associati eventualmente a farmaci antiulcera come la ranitidina (5 mg/kg per os) saranno utilizzati in caso di necessità. In corrispondenza di tempi diversi (T1= dopo 30 giorni dall'intervento; T2= dopo 60 giorni; T3= dopo 90 giorni e T4= dopo 120 giorni) verrà sacrificato un coniglio per ogni gruppo, mediante bolo ev di pentobarbital 120mg/kg, e verranno effettuati appositi prelievi dallo sterno per effettuare le indagini istologiche e di biologia molecolare. I prelievi saranno confrontati all'interno di ogni gruppo e tra i diversi gruppi e con i basali (prelievi in T0).

CONTROLLI IN VITRO

- 1) analisi istologiche di microscopia ottica
- 2) prove di immunoistochimica:

- a- utilizzo del cristal violetto per effettuare la curva di crescita quantitativa
- b- dosaggio della fosfatasi alcalina (marcatore precoce di differenziazione osteoblastica)
- c- dosaggio dell'osteopontina (marcatore tardivo di differenziazione osteoblastica)
- d- misurazione del contenuto di calcio (marcatore tardivo di differenziazione osteoblastica)
- e- ELISA specifico per fattori di crescita (IL-1, IL-6, IL-10, TGF β ecc.)
- f- dosaggio proteico (BCA)
- g- WESTERN BLOT (per evidenziare proteine attivate)
- f- valutazione del grado di apoptosi (caspasi)

SPESE DI ACQUISTO E STABILIZZAZIONE:

Costo di ogni coniglio=	65 euro	(Totale=780 euro)
Mantenimento di ogni coniglio =	40 centesimi/die	(Totale= 360 euro)
Spese di trasporto (1 gabbia + 2 conigli)=	100 euro	(Totale= 600 euro)

TOTALE= 1740 euro

COSTO UNITARIO A INTERVENTO

DOMITOR=	27.4 euro
PROPOFOL=	9 euro
BAYTRIL=	1 euro
BUPRENORFINA=	1 euro
MATERIALE CHIRURGICO DI CONSUMO:	30 euro

TOTALE= 68.4 euro / coniglio = 820.8 euro + IVA 20% (984.96 euro) per 12 conigli

SPESE RELATIVE ALLE PROVE ISTOLOGICHE E DI BIOLOGIA MOLECOLARE

analisi istologiche di microscopia ottica :	500	euro
1 ELISA=	752.5	euro
1 anticorpo anti-caspasi=	310	euro
Kit fosfatasi alcalina=	500	euro
Arsenazo III (per dosaggio del calcio)=	337	euro
Cristavioletto=	87	euro
BCA=	280	euro
PLASTICHERIA=	500	euro
MULTICANALE=	440	euro

TOTALE= 3706.5 euro + IVA 20% (4447.8 euro)

N.B. Costo totale minimo per l'avvio delle metodiche

BUDGET PER PAGAMENTO CONSULENZE

Chirurgo Sperimentale per l' esecuzione degli interventi:	2000	euro
Biotechnologo per l'esecuzione delle analisi di biologia molecolare	500	euro
Tecnico di Stabulario per la stabulazione degli animali:	328	euro
Fisio-patologo per l'esecuzione di analisi istologiche e di crescita cellulare	1000	euro

Totale 3828 euro

COSTO TOTALE DELLO STUDIO (SOMMA DELLE VOCI PRECEDENTI):

11000.76 euro

N.B. Il costo totale derivante dalla somma delle sopraesposte voci di spesa, rappresenta una stima minima dei costi. Bisogna infatti considerare che potrebbero avvenire: 1) aumento dei prezzi di mercato dei materiali 2) imprevisti procedurali che richiedano la ripetizione di uno o più esperimenti 3) identificazione di nuove procedure utili per l'ottimizzazione dello studio avviato. Tutte le eventuali variazioni, saranno naturalmente discusse preventivamente e di volta in volta con il Committente.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE E ANALISI DEI COSTI

DELLO STUDIO DAL TITOLO:

“*PROPRIETA' CARDIOPROTETTIVE DELLA SUPEROSSIDO DISMUTASI (SOD)*”

OGGETTO:

Esperimenti da eseguire su 10 conigli suddivisi in 2 gruppi

GRUPPO 1: gruppo controllo (GC)

GRUPPO 2: gruppo dismutasi (GD)

L'identificazione dei gruppi di studio risponde alla necessità di identificare, così come già da noi esposto in precedenti occasioni (simposi scientifici e riunioni di lavoro con gli specialisti del prodotto), le eventuali proprietà cardioprotettive della SOD.

PROTOCOLLO CHIRURGICO

Lo studio verrà condotto su 10 conigli, del peso di circa 4 Kg, anestetizzati con buprenorfina (0.05 mg/kg e.v) seguita da medetomidina cloridrato (Domitor: 0.1 mg/kg i.m) + propofol (Inderal: 7-8 mg/kg e.v. in bolo seguito da infusione continua alle dosi di 0.6 mg/kg/min), dosi accettate in campo scientifico internazionale come ideali per ottenere un adeguato livello di anestesia nel coniglio, e ventilati con una miscela di aria e ossigeno. Gli esperimenti verranno condotti secondo le linee guida espresse dal D.L.vo 116/92 per evitare le sofferenze degli animali e limitare allo stretto necessario il numero degli esperimenti.

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

Via Solaroli 17

28100 Novara

Tel 0321 660.660/602/645

Fax 0321 620421

Verranno registrate le pressioni arteriosa e venosa centrale tramite cateteri inseriti rispettivamente nell'arteria femorale sinistra e nella vena giugulare destra. Dopo avere effettuato la toracotomia nel 4° spazio intercostal e sin., si posizioneranno: una sonda flussimetrica a ultrasuoni attorno all'arco aortico, per la misurazione della gittata cardiaca e sonde piezoelettriche sull'epicardio, per valutare la contrattilità miocardica. Saranno monitorizzati l'ECG, i parametri ecocardiografici mediante sonda epicardica e la frequenza

cardiaca. Dopo l'instaurazione del bypass cardiopolmonare (CPB) normotermico, mediante cannulazione della carotide comune dx e della vena giugulare sin., in 5 conigli il cuore sarà arrestato con cardioplegia ematica calda secondo le modalità accettate nella pratica clinica (perfusione per 3 minuti di una soluzione ematica contenente 2 mEq per ml di KCl, alla velocità di 150 ml/h con l'aggiunta, finale di 1 g di MgSO₄). La durata prevista dell'arresto cardiaco sarà di 20 min (gruppo 1, di controllo).. Nel corso dell'esperimento tutti i parametri emodinamici saranno misurati seguendo il time-course: C=controllo; t₀=durante la cardioplegia; t₁=inizio riperfusione; t₂= 30 min dalla stabilizzazione emodinamica post CPB. Durante gli esperimenti si eseguiranno, secondo il time-course, biopsie del ventricolo sin per misurare la concentrazione di nucleotidi, lattati, aminoacidi e studiare l'espressione dei geni apoptotici ed autofagici. Saranno prelevati a vari intervalli del time course campioni ematici per valutare la cTnI. Analogamente si procederà nell'altro gruppo di studio (gruppo 2): 5 conigli, arresto cardioplegico del gruppo di controllo associato alla somministrazione di SOD. Dopo l'intervento tutti i 10 conigli saranno mantenuti sotto copertura antibiotica (enrofloxacin per 3-5 giorni). Boli di buprenorfina saranno effettuati a scopo analgesico. Agenti procinetici come la metoclopramide associati eventualmente a farmaci antiulcera come la ranitidina saranno utilizzati in caso di necessità. A sei mesi dall'esperimento i conigli potranno essere sacrificati secondo le modalità consentite e sui loro cuori realizzati studi anatomo-patologici per valutare l'apoptosi e il rimodellamento ventricolare.

CONTROLLI IN VITRO

1) analisi istologiche di microscopia ottica

2) prove di immunoistochimica:

a- utilizzo del cristal violetto per effettuare la curva di crescita quantitativa

b- ELISA specifico per fattori di crescita (IL-1, IL-6, IL-10, TGF β ecc.)

c- dosaggio proteico (BCA)dgd-

WESTERN BLOT (per evidenziare proteine attivate)

e-valutazione del grado di apoptosi (caspasi)

f- autofagia (Beclin 1, citocromi, ecc)

SPESE DI ACQUISTO E STABILIZZAZIONE:

Costo di ogni coniglio= 65 euro (Totale=650 euro)

Mantenimento di ogni coniglio = 40 centesimi/die (Totale= 300 euro)

Spese di trasporto (1 gabbia + 2 conigli)= 100 euro (Totale= 500 euro)

TOTALE= 1450 euro

COSTO UNITARIO A INTERVENTO

DOMITOR= 27.4 euro

PROPOFOL= 9 euro

BAYTRIL= 1 euro

BUPRENORFINA= 1 euro

MATERIALE CHIRURGICO DI CONSUMO: 30 euro

TOTALE= 68.4 euro / coniglio = 684 euro + IVA 20% (820.8 euro) per 10 conigli

SPESE RELATIVE ALLE PROVE ISTOLOGICHE E DI BIOLOGIA MOLECOLARE

analisi istologiche di microscopia ottica : 500 euro

1 ELISA= 752.5 euro

1 anticorpo anti-caspasi= 310 euro

Kit autofagia= 500 euro

Kit LC3= 337 euro

Cristavioletto= 87 euro

BCA= 280 euro

PLASTICHERIA= 500 euro
MULTICANALE= 440 euro

TOTALE= 3706.5 euro + IVA 20% (4447.8 euro)

N.B. Costo totale minimo per l'avvio delle metodiche

BUDGET PER PAGAMENTO CONSULENZE

Chirurgo Sperimentale per l'esecuzione degli interventi:

2000 euro

Biotechnologo per l'esecuzione delle analisi di biologia molecolare

1500 euro

Tecnico di Stabulario per la stabulazione degli animali:

500 euro

Fisio-patologo per l'esecuzione di analisi istologiche e di crescita cellulare

2000 euro

Totale 6000 euro

COSTO TOTALE DELLO STUDIO (SOMMA DELLE VOCI PRECEDENTI):

12718.6 euro

N.B. Il costo totale derivante dalla somma delle sopraesposte voci di spesa, rappresenta una stima minima dei costi. Bisogna infatti considerare che potrebbero avvenire: 1) aumento dei prezzi di mercato dei materiali 2) imprevisti procedurali che richiedano la ripetizione di uno o più esperimenti 3) identificazione di nuove procedure utili per l'ottimizzazione dello studio avviato. Tutte le eventuali variazioni, saranno naturalmente discusse preventivamente e di volta in volta con il Committente.

RISULTATI ATTESI

Dal presente progetto ci attendiamo di perfezionare le conoscenze sull'arresto cardioplegico aerobico ovviandone le attuali criticità. In particolare l'associazione con sostanze antiossidanti potrebbe ridurre lo stress ossidativo e quindi ridurre il danno da ri-perfusione e l'apoptosi. In questi casi si potrebbe ottenere un aumento del tempo di resistenza all'ischemia, consentendo così di ridurre la frequenza e i volumi della somministrazione di cardioplegia con importanti vantaggi sulla conduzione della CPB. Le acquisizioni di questo studio potrebbero fornire importanti indicazioni atte a ridurre il fenomeno dello stunning, della sindrome da ri-perfusione, della sindrome da bassa gittata e tardivamente del rimodellamento ventricolare conseguenti all'arresto cardioplegico prolungato.

CORONARY ARTERY BYPASS GRAFTING AND RESTRICTIVE ANNULOPLASTY IN PATIENTS WITH ISCHEMIC CARDIOMYOPATHY.

Philippe Primo Caimmi^{1,2} and ¹Giovanni Teodori

¹Departments of cardiac surgery and ²clinical and experimental medicine
Ospedale Maggiore della Carità, University of East Piedmont, Novara, Italy

Category: mitral valve repair
Oral Presentation

Objectives: Data on combined coronary artery bypass grafting (CABG) and restrictive annuloplasty in patients with ischemic cardiomyopathy are scarce, and the effect on reverse left ventricular (LV) remodeling is unknown.

Methods: From May 2004 to May 2006, 120 consecutive patients with ischemic LV dysfunction (mean LV ejection fraction 38 ± 11 %) and moderate or severe mitral regurgitation (grade 3 to 4+) underwent CABG

and restrictive annuloplasty with stringent down sizing of the mitral annulus (by 2 sizes, Sovering-ring, size 40 or 50mm). Serial transthoracic echocardiographic studies were performed before surgery and every 3 months in postoperative period to assess mitral regurgitation, transmitral gradient, leaflet coaptation, and left atrial and LV reverse remodeling. Clinical follow-up (New York Heart Association [NYHA] class, survival, events) was assessed at 2-year follow-up.

Results: Early operative mortality was 3,3%; 5% of annuloplasty were converted to mitral replacement at intraoperatively; 2-year follow-up, all patients were alive, free of endocarditis and thromboembolism, and 2,6% needed re-operation for recurrent mitral regurgitation; NYHA class improved from 3.3 ± 0.9 to 1.6 ± 0.5 ($P<0.001$), LV end-systolic and end-diastolic dimensions decreased from 63 ± 15 to 54 ± 13 mm ($P<0.001$) and from 76 ± 9 to 65 ± 10 mm ($P<0.001$) respectively.

Conclusions: Excellent operative results of combined restrictive annuloplasty and CABG were obtained. Residual mitral regurgitation was absent/minimal at 2-year follow-up, associated with a significant LV reverse remodeling. Restrictive annuloplasty with Sovering ring 40 mm or 50mm seems to be a standard and safe procedure and its use in this set of patients should be recommended.

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
"Amedeo Avogadro"**

**FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA
CORSO DI LAUREA IN INFERMIERISTICA
PRESIDENTE: Prof. Giancarlo Avanzi**

**LA V.A.C. TERAPIA IN CARDIOCHIRURGIA:
GESTIONE DELLE FERITE STERNALI COMPLICATE**

RELATORE: Dott.ssa Annamaria Chiericato

CORRELATORE: Dott. Philippe Caimmi

Candidato: Laura

Albertazzi

***"To correct or to repair: that is the Question...."* State of the art of conservative treatment of mitral valve pathology.**

Philippe-Primo Caimmi MD, Msc,

Centre of Cardiac Surgery, Dept. of Cardiovascular Diseases, Ospedale Maggiore della Carità, Medical School of University A. Avogadro, Novara Italy

Introduction

Mitral valve functioning and its influence on the left ventricular mechanics have always been uncompletely understood. As a consequence, although first surgical mitral procedures were necessarily conservative in a closed beating heart, after cardiopulmonary bypass (CPB) coming, surgeon developed prosthesis for valve replacement rather than investigate more deeply the mechanisms of valve failure in order to modify and repair the failing valves. Only in the last two decades, after the most important factors of mortality and morbidity in cardiac surgery were releaved, the weight of prosthesis related events on long term mortality and morbidity has become dramatically evident. In the mean time ecocardiography imaging developed considerably. Because of these two things, the attention of surgeon on valve repair grew up again and many new techniques were developed. Today the valve repair is considered the gold standard for treatment of valve failure in long life expectancy Patients. This chapter shows the state of the art about methods and techniques of mitral valve repair.

Valve Inspection

It is obvious that knowledge of anatomy provides the basis for optimal surgical practise. This is particularly respected in the mitral valve surgery.

Preoperative and intraoperative echocardiography defines the mechanism of mitral valve dysfunction before the heart has been stopped. Echocardiography evaluates:

1. annulus diameters: intercommisural diameter and antero-posterior diameter;
2. origin, direction and position of regurgitation jet: large or little jet origin, central or excentric jet direction, commissural or para-commissural jet position;
3. motion of leaflets: the motion of each leaflet is classified as normal (type I), prolapsed (type II), or restricted (type III) see the fig. 1 ⁽¹⁾ ;
4. morphology and length of leaflets;
5. leaflets prolapses: prolapse of anterior or posterior leaflets and which scallop is prolapsing;
6. rupture of the chordae;

When the heart is stopped and opened, the surgeon performs a systematic direct examination of the valve to evaluate:

- A. annulus dilatation
- B. pliability and morphology of leaflet and of their scallops
- C. length, thickening, fusion or rupture of the chordae
- D. elongation or rupture of the papillary muscles

Repair techniques for Mitral valve disease

A large number of techniques are reported in literature, but only a restricted number of them presents good results that have been confirmed by sufficient follow up. The following paragraphs show the mostly accepted techniques of mitral repair.

Commisurotomy It was the first technique used. Commisurotomy was very popular in pre-CPB era because it is also feasible in closed beating heart operations. Commisurotomy represents a good technique for treatment of not calcified rheumatic stenosis. It is performed through a knife incision in the middle of commissures abolishing their fusion and improving leaflets motion. Often this technique is combined with the splitting of papillar muscles (fig. 2 A, B). This allows an higher improvement of leaflets motion. These techniques are easy and safe, they do not use artificial materials (sutures, prosthetic rings, etc.) but they are prone to recurrent stenosis and regurgitation because of the progression of rheumatic mitral disease ⁽²⁾.

Quadrangular resection This technique is used to treat the posterior leaflet prolapse (fig.3 A). The portion of the posterior leaflet with elongated or ruptured chordae is identified and resected. The annular dilatation reduced by mean of an annular plication and after the leaflet edges are reapproximated

using running 5-0 braided suture. An annuloplasty completes the repair stabilizing the annular plication (fig.3 B). Annuloplasty may be performed with a strip of autologous pericardium or with rigid or flexible, complete or incomplete prosthetic ring.

Sliding leaflet repair The sliding leaflet repair is a variant of posterior leaflet quadrangular resection. It has been proposed to prevent left ventricular outflow tract obstruction caused by systolic anterior motion (SAM) of the anterior mitral leaflet. SAM develops in patients with excess leaflet tissue. After the repair, the line of leaflet coaptation is displaced anteriorly by redundant posterior leaflet tissue, and the anterior leaflet obstructs the left ventricular outflow tract^(3,4). The sliding leaflet repair is mandatory in patients with a posterior leaflet height > 1.5 cm (fig.4 A, B). The primary purpose of the sliding leaflet repair is to reduce the height of the posterior leaflet. It is performed after quadrangular resection: the posterior leaflet is detached from the annulus for a distance of 1.5 to 2 cm on either side of the resection. Annuloplasty sutures are easily placed after the leaflet is detached. Then the leaflet is reapproximated to the annulus using running 4-0 polypropylene suture.

Chordal repair Many techniques have been used for anterior leaflet prolapse. The most used are: chordal transfer, chordal replacement, and chordal shortening. Chordal transfer is considered the best technique for treating anterior leaflet prolapse. Normal primary chordae from the posterior leaflet are transposed to the unsupported region of the anterior leaflet. The advantage to this procedure is that precise measurement of the transferred chordae is unnecessary (fig.5). The detached segment is sewn to the unsupported portion of the anterior leaflet using interrupted 4-0 braided suture. The defect in the posterior leaflet is repaired as for standard quadrangular resection. Chordal replacement is another option for correction of anterior leaflet prolapse^(5,6). PTFE suture (4-0 or 5-0) is the preferred material for chordal replacement. The neochordae are affixed to the fibrous portion of the papillary muscle and then passed through the leaflet one or more times and tied (fig 6). The primary challenges with this technique are judging the length of the chordae and tying the PTFE. Chordal shortening: the pathologic, elongated chord is shortened by tucking it into a papillary muscle trench or affixing a portion of the chord to the side of the papillary muscle. Alternatively, the chord may be shortened at its insertion into the mitral leaflet⁽⁷⁾.

Alfieri edge-to-edge repair Alfieri et al described the edge-to-edge repair^(8,9). When employed to correct anterior leaflet prolapse, a suture affixes the free edge of a segment of normal posterior leaflet to the free edge of a prolapsing portion of the anterior leaflet. The normal posterior leaflet with its chordae serves to anchor the anterior leaflet, restricting its motion (fig. 6, A, B).

Annuloplasty Annuloplasty is a component of the repair in all patients with degenerative or ischemic disease. Annuloplasty is performed to correct annular dilatation, increase leaflet coaptation, reinforce suture lines, and prevent further annular dilatation. It is important to place sutures in the fibrous trigones, which are located near the commissures and may be visible as indentations in the endocardium. A variety of annuloplasty rings is available^(10,11) either flexible or rigid, complete or incomplete^(11,12). Concern exists about rigid rings because they abolish the annular motion. At the same time there are concerns also for flexible rings because they seem to be not able to keep the corrected annular shape. Differently with the generally accepted concept that only the posterior part of the annulus dilates, some recent papers seem to indicate that also the anterior part of the annulus takes a part to the whole annular dilatation. This new finding put under discussion the long term durability of annuloplasty performed with uncomplete prosthetic rings.

Undersizing annuloplasty This technique is used in primary or ischemic cardiomyopathy when the annulus is dilated and mitral valve is structurally normal (functional mitral regurgitation). By mean of the placement of restringent undersizing prosthetic ring, mitral valve is modified from bi-leaflet to mono-leaflet valve. In this new situation the posterior mitral leaflet is functionally abolished and coaptation is warranted by the anterior mitral leaflet only⁽¹³⁾.

Decalcification of the annulus The techniques of annular decalcification are not valve repair procedure "per se" but they are necessary to facilitate annuloplasty placement. When calcium is not extensive, simple debridement is sufficient. In the setting of dense posterior annular calcification, the calcium may be removed piecemeal or en bloc^(14,15). In order to facilitate debridement, the posterior leaflet is detached from the annulus as in a sliding leaflet repair. After debridement, if there is a concern about posterior ventricular rupture, a pericardial patch is used to cover the weakened area. The patch is affixed to ventricular and left atrial muscle. The leaflets are then attached to the patch at the annular level.

Degenerative Mitral Valve Disease

The classic features of degenerative mitral valve disease include leaflet prolapse and annular dilatation. Mitral valve prolapse occurs in 4% to 5% of the general population⁽¹⁶⁾. Approximately 5% of patients with prolapse ultimately develop MR that requires surgery^(16,17). Chordae may be elongated and thinned, ruptured, or thickened. The posterior leaflet and its chordae are affected more commonly than the anterior leaflet is. Posterior chordal rupture is the most common finding, occurring in 50% of patients⁽¹⁸⁾. Such patients most commonly have prolapse or flail of the middle scallop of the posterior leaflet.

Surgical indications Symptomatic patients with degenerative mitral valve disease and 3+ or 4+ mitral regurgitation should be referred for surgery. Asymptomatic patients with 3+ or 4+ mitral regurgitation and a decrease in left ventricular function as demonstrated by resting or stress echocardiography, left ventricular dilatation, or new onset atrial fibrillation should also be referred for surgery ^(19,20).

Repair techniques Posterior leaflet prolapse is treated by quadrangular resection. Annular dilatation is corrected with annuloplasty that is performed with rigid or flexible, complete prosthetic ring. In patients with a redundant posterior leaflet (height > 1.5 cm) the quadrangular resection is not safe because of high risk of SAM. In this particular set of Patients the sliding leaflet repair is required. The prolapse of anterior leaflet is usually treated with chordal transfer, replacement or shortening. A very interesting alternative to the chordal repair is the Alfieri's technique. Both the techniques need annuloplasty with rigid or flexible complete ring. Because the repair of degenerative mitral disease required in most cases annuloplasty, accurate annular decalcification is mandatory.

Rheumatic Mitral Valve Disease

Pathologic features of rheumatic mitral valve disease produce varying degrees of regurgitation, stenosis, or mixed lesions ⁽²¹⁾. Acute rheumatic valvitis produces leaflet prolapse and MR. Most patients presenting for evaluation have some component of restricted leaflet motion, producing mitral stenosis or a mixed lesion ⁽²²⁾. Restricted leaflet motion is caused by thickening of the subvalvular apparatus, thickening of the leaflets, and commissural fusion; there may also be calcification of any component of the valve.

Surgical Indications Symptomatic mitral stenosis or regurgitation is an indication for intervention. New onset atrial fibrillation is also an indication for intervention. In rheumatic mitral stenosis, if the anterior leaflet and chordae are pliable, repair is considered ^(22,23). In contrast, if the valve is severely distorted, the leaflets heavily calcified, or the papillary muscles fused to the leaflet edges, the valve should be replaced. Pure rheumatic mitral regurgitation is uncommon. Durability of repair for this entity is limited ⁽²⁴⁾. In such patients, repair may be offered as a palliative option, particularly if there are compelling reasons to provide a period of time during which the patient will not require anticoagulation (e.g., childbearing). Patients with mixed rheumatic stenosis and regurgitation present a particular technical challenge and are least amenable to repair ⁽²⁵⁾. If valve distortion is not severe and the anterior leaflet and chordae are pliable, repair may be considered.

Repair Techniques In patients with primary mitral stenosis and limited calcification and subvalvular thickening, open mitral commissurotomy is a good option. The commissurotomy should extend to 2 mm from the annulus; more

extensive commissurotomy may cause MR. If there is MR after commissurotomy, an annuloplasty is added. Debridement of calcium and fibrous peel from the leaflets is an adjunctive measure employed in some patients. Rheumatic MR from leaflet prolapse is repaired using techniques such as chordal transfer and creation of artificial chordae ⁽²⁶⁾. An annuloplasty is incorporated in these repairs. Patients with combined mitral stenosis and regurgitation are usually best served by replacement. When repair is attempted, a combination of techniques described above is necessary.

Ischemic Mitral Regurgitation

Ischemic mitral regurgitation is caused by coronary artery disease. In patients with ischemic MR, the valve leaflets and chordae appear normal ^(27,28). The MR is a direct consequence of left ventricular dysfunction. Ischemic MR may be transient, a result of reversible ischemia that causes ventricular dysfunction. Ischemic MR can be caused by three mechanisms: (1) ruptured papillary muscle, (2) infarcted papillary muscle without rupture, and (3) functional regurgitation. Ruptured papillary muscle is most frequently caused by infarction in the circumflex or right coronary artery distribution. Patients with elongated and infarcted but unruptured papillary muscles have leaflet prolapse. Patients with isolated functional MR have normal papillary muscles, chordae, and leaflets; however, the leaflets fail to coapt. Failure of coaptation is caused by annular dilatation, leaflet tethering, or both. Myocardial infarction produces ventricular dilatation and dysfunction, and the resulting geometric changes prevent leaflet coaptation. These changes in annular and ventricular geometry are usually caused by myocardial infarction in the circumflex or right coronary artery distributions ⁽²⁹⁻³¹⁾.

Surgical Indications Surgical indications for patients with functional ischemic MR are controversial. Selected patients with ischemic cardiomyopathy and functional MR should be offered mitral valve repair ^(32,33). These patients should be offered surgery only if they have 3+ or 4+ MR. Such patients should have a preoperative viability study to assess the need for coronary artery bypass grafting.

Repair Techniques Papillary muscle rupture should usually be managed by mitral valve replacement with a bioprosthesis ^(29, 34). Papillary muscle infarction with elongation is managed using the techniques described for patients with degenerative mitral valve disease and prolapse. If a portion of the posterior leaflet is affected, quadrangular resection is indicated. If there is anterior leaflet prolapse, chordal transfer or chordal replacement suffice. Occasionally, papillary muscle shortening is employed ⁽³⁵⁾. Functional ischemic MR is generally managed with annuloplasty alone. The annuloplasty should be undersized in

order to increase maximally leaflet coaptation. The precise type of ring to use (flexible vs. rigid, complete vs. incomplete) is controversial ^(29,13). If leaflet tethering is extensive and annuloplasty fails, mitral valve replacement with a bioprosthesis and preservation of the subvalvular apparatus is indicated ⁽³⁵⁾.

Endocarditis

Pathologic findings include chordal rupture (70%), vegetation (62%), leaflet perforation (53%), and abscess (7%) ⁽³⁶⁾.

Surgical Indications Potential advantages of mitral valve repair in the setting of infection include preservation of the native, living valve apparatus, which is resistant to infection, and corresponding avoidance of prosthetic material ⁽³⁶⁻³⁸⁾.

Repair Techniques Radical debridement is the cornerstone of operative treatment of endocarditis ⁽³⁹⁾. All infected material must be removed. If there are ruptured chordae to the posterior leaflet, quadrangular resection is performed. Anterior chordal rupture is repaired with standard techniques. Anterior leaflet perforations are repaired with autologous pericardial patches; it is not necessary to fix or tan the pericardium. Abscess cavities are debrided and excluded with a pericardial patch ⁽⁴⁰⁾. We favour posterior pericardial annuloplasty in both active and chronic endocarditis ⁽³⁶⁾.

Results

About 90% of degenerative mitral valves can be repaired. For isolated mitral valve repair, hospital mortality is lower than 1%, and repair results in survival curves similar to those of the general population ^(17,41). Degenerative disease is associated with the most durable mitral valve repairs. Overall 10-year freedom from reoperation is 93%; posterior leaflet repair with quadrangular resection and annuloplasty result in 98% 10-year and 97% 20-year freedom from reoperation ^(16, 41, 42, 43). Overall 10-year freedom from reoperation in patients with repaired rheumatic valves is 72% ⁽²²⁾. However, durability is particularly limited in young patients with acute rheumatic carditis and prolapse; nearly half of these patients develop severe recurrent MR within 5 years ⁽²⁴⁾. Surgical treatment of ischemic MR is associated with poor long-term survival. Hospital mortality after valve repair in patients with ischemic MR is 3% to 6%. However, 5-year survival is only 58% ⁽²⁹⁾. The mechanism of MR influences survival ^(27,29,30). Patients with ruptured papillary muscle have the best long-term survival, likely related to better preservation of left ventricular function. Patients with functional ischemic MR have more LV damage and correspondingly reduced longevity. Anyway the majority of patients with ischemic MR benefit from mitral valve repair versus replacement. Only the most critically ill patients should receive bioprostheses; in such patients, there is no survival benefit to repair because of the restricted leaflets motion by

severe cardiomyopathy. Furthermore, because long-term survival is limited, the durability of mitral valve repair in patients with ischemic MR is difficult to establish⁽⁴⁴⁾. Eighty percent of infected mitral valves are amenable to repair⁽³⁶⁾. Hospital mortality is 0% to 7%. Recurrent endocarditis is rare after mitral valve repair⁽³⁹⁾. When compared to replacement, repair of the infected mitral valve results in greater freedom from recurrent infection and higher early and late survival⁽³⁶⁾.

Conclusion and Perspectives

As shown in this chapter, all techniques of mitral repair in use are able to get an efficient coaptation of leaflets valve but they aim through significant modifications of mitral anatomy and physiology. It is possible to say that the repaired mitral valve is a heavily sick valve that has been modified in order to abolish the mitral regurgitation. In fact, the positive effects of valve repair are the consequence of the disappearing of left ventricular surcharge that was substained by mitral regurgitation. The disease that afflicts the valve is only limited but not eliminated by mitral repair. These considerations explain the limit of this approach: it is a correction not a repairing. New insights in cellular and molecular biology, the use of cell, tissue and organ culture allow today to have new instruments to better understand mechanisms regulating mitral valve pathology onset. Interstitial cells (IC) are the most prevalent cell type in the cardiac valve and are found throughout all layers of the valve⁽⁴⁵⁻⁴⁸⁾. IC likely play a primary role in the pathobiology of heart valve disease, especially in the regulation of the regeneration and remodeling of injured and diseased cardiac valves⁽⁴⁹⁾. Probably, these knowledge might generate methods that if combined with nowadays repair techniques, might improve significantly valve repairing result. Besides many innovations might derived from the development of tissue engineering in this field. Traditional training in surgery is mainly focused on technical aspects of the surgical procedure and if this attitude is partially understandable for demolitive surgery (valve replacement), which abolishes the substrate of pathology, this approach is difficulty to understand for conservative surgery (valve repair). The probity of decisions of the surgeon to preserve and repair the pathologic valve has to be based on deep knowledge about mechanisms of pathology. This is particularly important as mitral valve repair is today widely recognised as the gold standard in the treatment of mitral disease. Surgeon absolutely need deeper knowledge about tissue biology of mitral valve to understand deeply the set where they act. The biology of mitral valve represents really a "new world"⁽⁵⁰⁾ of opportunities for cardiac surgeons that are dedicated to mitral valve repair.

TITOLO DEL PROGETTO

differenziazione delle cellule valvolari cardiache in condizioni

normali/patologiche:studio condotto nell'ambito dell'attività di homograft

banking

Gli omoinnesti valvolari cardiaci (OVC) rappresentano il migliore sostituto oggi disponibile per la chirurgia delle valvole cardiache. L'apertura della Banca Regionale di OVC presso l'Ospedale Regina Margherita di Torino ha permesso il prelievo, la preparazione e la criopreservazione di numerosi OVC, che sono stati utilizzati in interventi salva-vita nelle principali cardiocirurgie piemontesi. Gli OVC non validati dalla Banca per l'utilizzo sull'uomo sono stati utilizzati nell'ultimo anno, per effettuare, nell'ambito del progetto di ricerca finanziato dalla Regione Piemonte nell'anno 2006 (n°1191), studi atti ad esaminare i meccanismi alla base della degenerazione valvolare. Le nuove conoscenze sulla biologia molecolare e cellulare permettono di aggiungere nuove informazioni sui meccanismi alla base della patologia valvolare di importanza cruciale nell'ambito della moderna cardiocirurgia, che si può avvalere di tali nozioni per decidere se intervenire in maniera demolitiva o conservativa. Nell'ultimo anno si è proceduto alla raccolta e all'isolamento di cellule interstiziali (VIC) ed endoteliali (VEC) a partire da valvole normali, umane e porcine, e patologiche umane. Le valvole porcine sono state isolate presso il laboratorio di Fisiologia dell'Università del Piemonte Orientale. Le valvole umane sono state prelevate durante interventi di chirurgia mitralica o durante prelievi da donatori multiorgano, eseguiti dai cardiocirurghi dell'Ospedale Maggiore della Carità di Novara. Dei due suddetti tipi cellulari le VIC, elemento cellulare più abbondante all'interno dei lembi valvolari, possono essere considerate un pool dinamico di cellule in grado di esprimere una gamma di fenotipi diversi in risposta a differenti condizioni ambientali. Le VIC, infatti, presentano, in condizioni fisiologiche, il tipico aspetto di fibroblasto, caratterizzato dall'espressione di vimentina e dalla positività per il CD34. Invece nella degenerazione mixomatosa assumono un fenotipo miofibroblastico caratterizzato dall'espressione di alfa actina, proteina contrattile (Rabkin-Aikawa E. et al. *J Heart Valve Dis.* 13:841-7, 2004) e dalla perdita del CD34 (Barth, P.J et al. *Pathol Res Pract* 201:301-4, 2005). Le VIC, inoltre, intervengono nel rimodellamento della matrice extracellulare (ECM), modulando l'espressione delle metalloproteasi e dei loro inibitori (Taylor PM. et al. *Int J Biochem Cell Biol* 35:113-8, 2003; Rabkin E. *Circulation* 104:2525-32, 2001; Dreger S.A. et al. *J Heart Valve Dis* 11:875-80, 2002). Occorre a questo proposito ricordare come la ECM giochi un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'architettura valvolare, intervenendo, sia nella fase embrionale dello sviluppo che in quella postnatale, sulla compartimentalizzazione e sulle capacità proliferative delle VIC (Aikawa E. et al. *Circulation* 113:1344-52, 2006). Risulta quindi evidente come minime alterazioni del delicato equilibrio tra popolazioni cellulari e ECM siano alla base dello sviluppo delle patologie valvolari. I meccanismi fisiopatologici della trasformazione patologica non sono tuttavia ben chiari. **OBBIETTIVI.** Lo scopo del presente progetto di ricerca è quello di approfondire i meccanismi fisiopatologici della differenziazione cellulare delle valvole cardiache ottenute dall'attività della Banca Regionale e dall'attività della chirurgia valvolare svolta dal centro di Cardiocirurgia di Novara. In particolare la ricerca sarà focalizzata sulla valvola mitrale, che sta acquisendo negli ultimi anni una posizione preponderante nella chirurgia valvolare, perché le patologie degenerative a suo

carico sono tra le più frequenti. Lo studio della valvola mitrale, oltre ad offrire concrete possibilità di realizzare una chirurgia riparativa, risulta interessante in quanto la sua fisiopatologia si interseca con quella del ventricolo sinistro.

METODI. Le valvole normali e patologiche fornite dalla Banca Regionale e dall'Istituto di Cardiocirurgia dell'Ospedale Maggiore di Novara saranno sottoposte presso il Dipartimento di Scienze Biomediche ed Oncologia Umana dell'Università degli Studi di Torino e presso il Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università degli Studi di Novara a:

1. Studio istologico. I tessuti pervenuti verranno fissati sia in formalina tamponata al 4% e processati per inclusione in paraffina che inclusi in OCT per future determinazioni immunoistochimiche incompatibili con la fissazione in formalina (FAP-alpha). I blocchetti in paraffina saranno tagliati e sulle sezioni ottenute saranno effettuate le colorazioni morfologiche (ematossilina/eosina, tricromica di Masson) ed immunoistochimiche impiegando un panel di anticorpi mirato alla valutazione della trasformazione fenotipica dei fibroblasti nel corso della progressione della malattia (CD34, SMA, vimentina, desmina, progesteron receptor, estrogen receptor beta, fattore XIIIa, FAP-alpha, S100A4) e alla valutazione del ciclo cellulare (Ki67).
2. Isolamento ed espansione di colture cellulari di VIC e VEC. Dai tessuti pervenuti le VIC verranno isolate mediante due distinte metodiche. La prima tecnica (tissue explant) permette di porre in coltura piccoli frammenti selezionando popolazioni cellulari ad alta capacità migratoria. La seconda metodica (digestione enzimatica) libera dai tessuti valvolari tutte le cellule indiscriminatamente. Le VEC verranno invece isolate per mezzo di rimozione superficiale e successiva espansione su piastre pre-trattate con gelatina 0.1%.
3. Studio della modulazione fenotipica. VIC normali e patologiche verranno sottoposte a trattamenti con vari agenti (serotonina, progesterone, 17 β -estradiolo, fluoxetina, imatinib, isoproterenolo) anche in co-coltura con VEC a mezzo di inserti porosi al fine di valutare le rispettive caratteristiche di proliferazione e/o migrazione in vitro e la loro espressione fenotipica.

RISULTATI ATTESI. Caratterizzazione dei meccanismi di modulazione fenotipica di VIC e VEC in condizioni normali e patologiche. La presenza di tipologie differenziate di OVC, provenienti dalla Banca Regionale e dalla Cardiocirurgia di Novara, permetterà uno studio dettagliato sia dell'anatomia normale degli OVC e dei processi di degenerazione tissutale che sono alla base delle disfunzioni valvolari. E' possibile prevedere risultati di pregio scientifico per lo studio dei meccanismi di attivazione cellulare ed extracellulare, poco caratterizzati, che sono alla base della degenerazione mixomatosa della valvola mitrale.

RICADUTE SUL SSN. La comprensione dei meccanismi alla base della patologia valvolare cardiaca, apre nuovi orizzonti nella cura delle cardiopatie valvolari. Inoltre bisogna tenere in giusto conto che il significativo incremento dell'età media della popolazione ha fatto aumentare notevolmente l'incidenza delle valvulopatie degenerative, tanto da rappresentare la chirurgia valvolare una quota considerevole delle procedure cardiocirurgiche effettuate ogni anno. Queste conoscenze sulla fisiopatologia delle valvole cardiache sono di fondamentale interesse poiché dallo studio di questi meccanismi si potranno eventualmente acquisire e sviluppare strumenti e metodi per la cura dei vizi valvolari cardiaci (tissue engineering, chirurgia valvolare conservativa, terapie mediche).

Titolo della ricerca: "Espressione dei recettori per gli endocannabinoidi (CB1 – CB2) nel tessuto adiposo epicardico umano".

Obbiettivi:

-Lo studio si propone come obiettivo quello di dimostrare la presenza nel tessuto adiposo epicardico di recettori per gli endocannabinoidi che si sono dimostrati importanti nel modulare lo spessore del tessuto adiposo addominale.

- In corso di sperimentazione l'efficacia del rimonabant , antagonista recettoriale di CB-1 sulla riduzione del tessuto adiposo addominale.

Ad oggi sono stati reclutati per tale studio 15 pz a cui è stata eseguita biopsia del tessuto adiposo epicardico e di cui si stanno raccogliendo i campioni.

Lo studio è in fase iniziale di raccolta dati e non è ancora iniziata la sperimentazione.