

Allegato A: Capitolato Tecnico – Tender Specifications

Alla MANIFESTAZIONE DI INTERESSE – CALL FOR EXPRESSION OF INTEREST per l'affidamento della fornitura di un servizio per **Human heart characterization and nitinol stent fabrication** a favore della fondazione Ri.MED **nell'ambito del progetto** 'Engineering the mitral valve: bioinspired control of structure and function for enhanced in vivo performance' — '**BIOMITRAL**' – Grant Agreement No.101002561 a valere **su fondi dello European Research Council (ERC)** – Consolidator Grant

Task: Human heart characterization and nitinol stent fabrication

ITALIANO

Il servizio dovrà essere espletato entro 12 mesi dalla data di affidamento.

Task 1.1: Caratterizzazione del cuore umano

La task 1.1 prevede quattro esperimenti per caratterizzare la struttura e la funzione delle valvole cardiache umane (valvola mitrale, aortica, tricuspide e polmonare) alla scala del tessuto e degli organi: 1) valutazione quantitativa istologica e immunoistochimica; 2) microscopia e analisi delle immagini; 3) prova meccanica biassiale; 4) prova di flessione a tre punti.

La task 1.1 richiede un numero di cuori pari a $n=7$ /esperimento (totale=28 cuori).

Tutti gli esperimenti verranno condotti su tessuti freschi entro 8 ore dal decesso del donatore. Solo casi di morte non collegati a patologie valvolari verranno considerati in questo studio.

Valutazione quantitativa istologica e immunoistochimica:

Le colorazioni che saranno utilizzate per la caratterizzazione istologica dei tessuti sono:

- Ematossilina eosina (H&E) per quantificare cellularità e morfologia generale delle cuspidi;
- Picrosirius Red (PR) e colorazione tricromica di Masson per quantificare il contenuto di collagene;
- VonKossa per quantificare la formazione di calcio;
- Van Gieson per quantificare il contenuto di elastina;
- Alcian blu per quantificare glicosamminoglicani.

L'analisi immunoistochimica sarà finalizzata ad individuare il fenotipo delle cellule (es. endoteliali, fibroblasti e cellule interstiziali valvolari).

Microscopia e analisi delle immagini:

L'analisi del volume e della superficie delle cuspidi sarà condotta tramite microscopia a scansione elettronica (SEM).

L'analisi microscopica a scansione elettronica sarà condotta su cuspidi fissate in 2% di glutaraldeide. I campioni saranno spruzzati con Pd/Au prima dell'acquisizione.

Le immagini ottenute dall'analisi SEM saranno processate tramite un algoritmo quantitativo per analisi di immagini per misurare: (1) numero, posizione e **densità di intersezione di fibre**, definite come la sovrapposizione di due o più fibre; (2) **distribuzione della connettività**, definita come la percentuale di intersezione di fibre vs. il numero di fibre passanti per un'intersezione; (3) distribuzione dell'**angolo di orientamento delle fibre (OI)**; (4) **diametro delle fibre**; (5) **dimensione dei pori e porosità**.

Test meccanico biassiale e uniassiale:

Lo spessore medio delle cuspidi e degli strati di tessuto sarà misurato con un calibro di precisione in quindici punti selezionati tra le diverse aree della valvola.

Il test biassiale verrà condotto con una macchina elettromeccanica custom-made specifica per tessuti biologici. Campioni di 10x10 mm saranno raccolti dalla zona centrale delle cuspidi, quattro marcatori saranno posizionati al centro del campione formando un quadrato e saranno utilizzati per misurare il gradiente di deformazione. Il test biassiale sarà condotto tramite un protocollo lagrangiano equi biassiale a controllo di carico, il carico massimo verrà selezionato per indurre livelli di deformazione fisiologici. I campioni (n=3/gruppo) saranno preconditionati e testati per 10 cicli di 15s immersi in PBS a temperatura ambiente. Il **rapporto di anisotropia (AR)** e la **risposta meccanica biassiale** saranno valutati.

Il test meccanico uniassiale sarà condotto utilizzando una macchina elettromeccanica commerciale. Le corde tendinee saranno estratte dall'apparato sub valvolare, classificate e testate. Prima del test, il diametro delle corde sarà misurato usando un microscopio ottico in tre diversi punti selezionati casualmente. Il test meccanico seguirà un protocollo a controllo di spostamento con una velocità di 25mm/min fino alla rottura del campione. La **tensione a rottura (UTS)**, la **deformazione a rottura (ϵ_f)** e il **modulo elastico (E_c)** saranno misurati.

Test di flessione a tre punti:

Il test di flessione a tre punti sarà condotto utilizzando un dispositivo custom-made. Campioni di (12-25) x 2.5 mm orientati lungo la direzione radiale delle cuspidi saranno ricavati dalla zona centrale delle cuspidi.

Marcatori saranno disposti lungo il bordo di ogni campione ad 1 mm di distanza tra loro, la posizione dei marker sarà acquisita con una telecamera e analizzata in tempo reale. Il campione sarà posizionato nel dispositivo, immerso in PBS a temperatura ambiente, e collegato ad una barra di carico verticale di rigidità nota. Un supporto motorizzato avrà il compito di alzare/abbassare il campione rispetto alla barra di carico, applicando una curvatura massima di $\Delta k_{max}=0.12$ mm.

La **rigidezza a flessione (EI)** e il **modulo di rigidezza a flessione (E)** saranno misurati.

Ruolo	Caratterizzazione	Variabile misurata
Macro-struttura delle cuspidi	Microscopia	Spessore
Macro-struttura delle corde	Microscopia	Diametro
Micro-struttura delle cuspidi e delle corde	Microscopia ed analisi delle immagini	OI, diametro della fibra, dimensione dei pori, porosità
Meccanica planare delle cuspidi	Test meccanico biassiale	AR, risposta costitutiva
Meccanica uniassiale delle corde	Test meccanico uniassiale	UTS, E_c , ϵ_f
Meccanica a flessione delle cuspidi	Test di flessione a tre punti	E, EI

Task 1.2: Fabbricazione stent in nitinolo

La task 1.2 richiede la fabbricazione di n=7 stent in nitinolo da implementare in un dispositivo biomedicale per la sostituzione della valvola mitrale.

Barre di nitinolo di diametro differente saranno collegate tramite micro-saldature laser di precisione.

I parametri di saldatura saranno ottimizzati per ottenere stent con le migliori proprietà meccaniche e materiali.

I parametri di processo della saldatura laser saranno: 1.4 kW di potenza, 0.7 mm dimensione del punto di saldatura, 1.2 ms tempo di saldatura, 3 Hz di frequenza e onda rettangolare.

Un mandrino in alluminio lavorato a macchina avente forma basata sull'anatomia della valvola mitrale sarà utilizzato per creare la struttura in nitinolo con la geometria desiderata. Il diametro esterno del mandrino corrisponderà al diametro del dispositivo al termine della procedura di rilascio e posizionamento.

Il diametro del mandrino sarà sovrastimato del 20% per ottenere uno stent sovradimensionato in modo da generare una forza radiale sufficiente a garantire il corretto funzionamento.

Il mandrino con lo stent sarà scaldato fino a 500°C in una fornace per 30-60 min, dopo, lo stent sarà raffreddato rapidamente in acqua fino a 20°C in 10 s. Trattamenti termici saranno utilizzati per definire la forma finale delle barre in nitinolo con proprietà superelastiche, eliminando ogni potenziale concentrazione di stress causata dalla saldatura.

TABELLA CONTENENTE I CRITERI PER L'ATTRIBUZIONE DEL PUNTEGGIO AGLI ELEMENTI DIVERSI DAL PREZZO E I RELATIVI PUNTEGGI MASSIMI

	Task	Requisito	Condizione per attribuzione punteggio, valori migliorativi	Punteggio massimo
1	1.1	Collaborazioni con organizzazioni che gestiscono organi e tessuti da donatori umani.	Si/No	20
2	1.1	Pubblicazioni su rivista scientifica riguardo la caratterizzazione di tessuti cardiovascolari animali	Si/No	20
3	1.2	Esperienza pregressa nella fabbricazione di stent in nitinolo per protesi valvolari cardiache	Si/No	20

ENGLISH

The task must be completed within 12 months by the assignment date.

Task 1.1: Human heart characterization

Task 1.1 requires four different experiments to characterize structure-function of human heart valves (mitral valve, aortic valve, tricuspid valve, and pulmonary valve) at tissue and organ level scale: 1) quantitative histological and immunohistochemical assessment; 2) microscopy and image analysis; 3) biaxial mechanical test; 4) three point bending test.

Task 1.1 will require n=7/experiment hearts (total=28 hearts).

All the experiments will be conducted on fresh samples delivered within 8 hrs from the decease of the donor. Only cases of death unrelated to valve disease will be included in the study.

Quantitative histological and immunohistochemical assessment:

Samples will be harvested immediately after animal sacrifice, staining to be utilized for the histological characterization of the tissues include:

- Hematoxylin and eosin (H&E) to quantify cellularity and general ECM morphology of the leaflets;
- Picrosirius red (PR) and Masson's trichrome (MT) to quantify the collagen content;
- VonKossa to quantify the calcium formation;
- Van Giesons to quantify elastin content;
- Alcian blue to quantify glycosaminoglycans.

Immunohistochemical assessment will be used to identify cellular phenotype (e.g. endothelial, fibroblast and valvular interstitial cells).

Microscopy and image analysis:

Leaflet surface and volume analysis will be conducted by scanning electron microscopy (SEM).

SEM imaging will be performed on valve leaflets after fixation in 2% glutaraldehyde. Samples will be sputter-coated with Pd/Au and imaged.

SEM images will be processed with a digital image processing algorithm for quantitative image analysis to extract: (1) number, spatial position, and density of the **fiber intersections**, defined as two or more overlaying fibers; (2) **connectivity distribution**, defined as the percentage of fiber intersections vs. number of fibers crossing a fiber intersection; (3) **fiber orientation** angle distribution (**OI**); (4) **fiber diameter**; (5) **pore size and porosity**.

Biaxial and tensile mechanical test:

Average **leaflet and layer thickness** will be measured with a dial indicator gauge on fifteen locations spanning from the valve's free edge to the belly and the commissural regions.

Biaxial test will be performed using a custom-made electromechanical testing system developed for biological tissues. Samples of 10x10 mm will be harvested from the valve's leaflet belly region, four markers will be placed on the corners of a squared area at the center of the sample and used to measure the deformation gradient tensor. Biaxial tests will be performed using a Lagrangian equi-stress control protocol and the maximum load will be selected to induce physiologically relevant strain levels. Samples (n=3/group) will be preconditioned and then tested for 10 cycles of 15 s in PBS at room temperature. **Anisotropy ratio** (AR) and **mechanical response** will be measured.

Uniaxial tensile test will be performed using a commercial electromechanical testing system. Chordae tendineae will be extracted by the subvalvular apparatus, classified, and tested. Before the

uniaxial test, the chordae **diameter** will be measured using brightfield microscopy at three random locations. Tensile tests will be performed using an equi-strain control protocol at a speed of 25 mm/min until failure to determine the **ultimate tensile strength** (UTS), the **ultimate strain** (ϵ_f), and the **elastic modulus** (E_c).

Three point bending test:

Three point bending test will be performed using a custom-made setup. Samples of (12-25) x 2.5 mm oriented along the radial direction of the leaflets will be dissected from the belly region.

Markers will be affixed along the edge of each sample 1 mm apart from each other, marker positions will be acquired with a camera and analyzed in real-time. Samples will be placed in the holder, submerged in a PBS bath at room temperature, and connected to a vertical loading bar of known stiffness. A motorized stage will lower/ raise the sample against the loading bar reaching a maximum sample curvature of $\Delta k_{max} = 0.12$ mm. **Flexural rigidity** (EI) and **bending modulus** (E) will be measured.

Role	Characterization method	Measured variable
leaflet macro-structure	microscopy	thickness, layer thickness
chordae macro-structure	microscopy	diameter
leaflet micro-structure chordae micro-structure	microscopy and image analysis	OI, fiber bundle/fiber diameter, pore size, porosity
leaflet in-plane mechanics	biaxial test	AR, constitutive response
chordae uniaxial mechanics	uniaxial tensile test	UTS, E_c , ϵ_f
leaflet out of plane mechanics	three point bending test	E, EI

Task 1.2: Nitinol stent fabrication

Task 1.2 requires the fabrication of n=7 nitinol stent to be implemented in a biomedical device for mitral replacement.

Nitinol wires with different diameters will be joined by a precision micro laser-welding system. Welding parameters will be optimized to acquire the best material and mechanical properties of the structure for nitinol wires with various thicknesses. The laser process parameters will be 1.4 kW power, 0.7 mm spot size, 1.2 ms time duration, 3 Hz frequency, and rectangular wave.

A machined aluminum mandrel based on the anatomy of the animal model will be used to create the nitinol backbone with the desired geometry, where the external diameter of the mandrel corresponds to the deployed device diameter.

The mandrel diameter will be oversized by 20% to produce the oversized stent backbone for achieving sufficient radial force for the device. The mandrel with frame will be heated up to 500°C by tube furnace for 30-60 min, then, the frame will be rapidly cooled in water to 20°C in 10 seconds (quenching). Thermal treatment will be performed to set the final shape of nitinol wires with required superelastic properties, eliminating any potential local stress concentration caused by welding.

TABLE WITH THE CRITERIA CONSIDERED FOR THE SCORE ASSIGNMENT OF ELEMENTS DIFFERENT THAN THE PRIZE WITH THE RELATIVE MAXIMUM SCORE

	Task	Requirements	Criterion for additional score	Max Score
1	1.1	Collaborations with human organ procurement organizations.	Yes/No	20
2	1.1	Publications on scientific journals about animal cardiovascular tissue characterization	Yes/No	20
3	1.2	Expertise in nitinol stent fabrication for cardiac valve prosthesis	Yes/No	20