

SUCCESSFUL DECELLULARIZATION OF PORCINE AORTA FOR ACELLULAR SCAFFOLD GENERATION WITH THE PURPOSE OF BLOOD VESSELS TISSUE ENGINEERING

Malcova Tatiana¹, Nacu Viorel¹, Rojnovceanu Gheorghe², Birgit Andrée³, Hilfiker Andres³

Scientific adviser: Nacu Viorel¹

¹Laboratory of Tissue Engineering and Cell Cultures,

²Nicolae Anestiadi Department of Surgery no. 1, Nicolae Testemitanu SUMPh;

³LEBAO, Hannover Medical School, Germany

Background. Based on limited availability of autologous vascular grafts, the development of tissue-engineered blood vessels (TEBVs) has reached significant research interest in the last couples of years. Fabrication of TEBVs from decellulized scaffolds seems to be an attractive research strategy. **Objective of the study.** To develop a method for the generation of cell-free vascular scaffolds by combining a detergent-based decellularization (DC) strategy with subsequent nuclease treatment. **Material and Methods.** Cryopreserved porcine aortae were treated with detergents for 48h under rotation (24h exposure to 0.5% SDS and 0.5% SDC, followed by 24h exposure to 1% TritonX-100) with/without following enzymatic digestion (48h exposure to 300 U/ml DNase I solution). The efficacy of DC was evaluated by 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) and hematoxylin and eosin (H&E) stainings. **Results.** H&E staining revealed no persisting cells in all groups, including the samples which were not treated with DNase. The DAPI stain of those specimens, however, uncovered substantial amounts of residual DNA. Additional enzymatic treatment with DNase led to such a reduction of residual DNA that DAPI positive structures could not be detected. **Conclusion.** A direct stain of DNA, e.g. DAPI, is much more sensitive measure for the presence of cell debris than the H&E stain. In addition, detergent-based decellularization technique per se is not sufficient for complete cell and debris removal and has to be combined with a DNase digestion.

Keywords: blood vessel, tissue-engineering, decellularization, detergents, DNase.

DECELULARIZAREA DE SUCCES A AORTEI PORCINE PENTRU GENERAREA SCAFFOLDULUI ACELULAR NECESAR ÎN OBTINEREA GREFELOR VASCULARE INGINEREȘTI

Malcova Tatiana¹, Nacu Viorel¹, Rojnovceanu Gheorghe², Birgit Andrée³, Hilfiker Andres³

Conducător științific: Nacu Viorel¹

¹Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare,

²Catedra de chirurgie nr. 1 „Nicolae Anestiadi”, USMF „Nicolae Testemitanu”;

³LEBAO, Școala Medicală din Hannover, Germania

Introducere. Din cauza deficiențelor funcționale a grefelor vasculare (GV) existente, dezvoltarea substituenților sanguini, prin tehnicile de inginerie tisulară, a avansat semnificativ în ultimii ani. Producerea GV în baza matrixului acelular pare a fi o strategie atractivă. **Scopul studiului:** Dezvoltarea unei metode de generare a scaffoldului decelularizat, prin combinarea unei tehnici bazate pe detergenți, suplimentată cu prelucrarea cu nuclează. **Material și Metode.** Aorta porcină crioprezervată a fost tratată cu detergenți timp de 48h (expunerea la 0.5% SDS și 0.5% SDC pe 24h, urmată de spălarea cu soluție de 1% TX-100) cu/fără următoarea digestie enzimatică (prelucrarea cu soluție 300 U/ml DNază). Eficacitatea decelularizării (DC) a fost evaluată prin colorația 4',6-Diamidino-2-fenilindol(DAPI) și Hematoxilină-Eozină (H&E). **Rezultate.** Colorația H&E nu a evidențiat celule persistente în nici un grup, inclusiv în probele tratate fără nuclează. Cu toate acestea, colorația DAPI a aceluși specimene a descoperit cantități substanțiale de ADN rezidual. Prelucrarea suplimentară cu DNază a dus la o reducere semnificativă a ADN-ului subzistent, încât structuri DAPI pozitive nu au fost detectate. **Concluzii.** Colorațiile cu afinitatea pentru ADN, d.e. DAPI, sunt mai sensibile pentru evaluarea prezenței resturilor celulare, decât H&E. Tehnica DC bazată pe detergenți nu este suficientă pentru îndepărtarea completă a celulelor și a detritului, și trebuie combinată cu prelucrarea enzimatică.

Cuvinte-cheie: vas sanguin, inginerie tisulară, decelularizare, detergenți, DNază.