

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ
Departamentul Științe Funcționale

BURIAN S. CAIUS ALEXANDRU ȘTEFAN



TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

**OPTIMIZAREA METODELOR FIZICO-CHIMICE DE
DECELULARIZARE TISULARĂ ÎN VEDEREA OBȚINERII
MATRICILOR BIOLOGICE**

Conducător științific:

Prof. Dr. VIRGIL PĂUNESCU

Timișoara
2017

CUPRINS

INTRODUCERE.....	2
SCOPUL ȘI OBIECTIVELE LUCRĂRII.....	2
STUDIUL 1: PROIECTAREA ȘI REALIZAREA UNOR DISPOZITIVE EXPERIMENTALE TIP LANGENDORFF PENTRU DECELULARIZAREA CORDULUI ÎN CÂMP ELECTRIC ALTERNATIV RECTANGULAR.....	3
STUDIUL 2: PROIECTAREA ȘI REALIZAREA UNUI DISPOZITIV EXPERIMENTAL TIP LANGENDORFF PENTRU DECELULARIZAREA CORDULUI PRIN APLICAREA PRESIUNII DE PERFUZIE OSCILATORII.....	6
STUDIUL 3: ELABORAREA UNUI PROTOCOL EXPERIMENTAL COMPLEX PENTRU EVALUAREA EFECTELOR STĂRII HIPEROSMOLARE INDUSĂ <i>in vivo</i> ASUPRA DECELULARIZĂRII CARDIACE ULTERIOARE.....	8
STUDIUL 4: PROIECTAREA ȘI REALIZAREA UNUI MICROREACTOR ELECTROCHIMIC CU DENSITĂȚI DE CURENT ASIMETRICE PENTRU STERILIZAREA <i>IN SITU</i> A DISPOZITIVELOR DE DECELULARIZARE	9
CONCLUZII FINALE.....	10
CONTRIBUȚII ORIGINALE.....	11
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ.....	12

INTRODUCERE

În ultimele decenii asistăm la o evoluție spectaculoasă a științelor vieții în general și a medicinei în special, cu un impact semnificativ în ceea ce privește creșterea duratei de viață. Medicina specializată în patologia pacientului vârstnic, chiar dacă nu este un concept nou, cunoaște o dezvoltare spectaculoasă în ultimii ani.

Astfel medicina contemporană se confruntă la ora actuală cu o patologie cronică degenerativă din ce în ce mai frecvent exprimată în populație, care reclamă găsirea unei noi posibilități de înlocuire a țesuturilor și organelor afectate impunând astfel nou trend în transplantologie. Mulțumită progreselor majore realizate în științele biomedicale, s-a conturat tehnologia organelor obținute pe suport de biomatrici decelularizate și repopulate cu celule autologe ale primitorului grefei. Tehnologia organelor biologice obținute pe cale artificială este cea mai nouă metodă terapeutică apărută în medicina de transplant. „Ingineria tisulară” cum mai este numită această tehnică, elimină în bună măsură neajunsurile transplantului de organ cu organe prelevate de la donator viu sau de la cadavru, cât și dezavantajele dispozitivelor electronice de supleere a funcției organelor afectate de procesele patologice.

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE LUCRĂRII

Urmărind îndeaproape studiile publicate în literatura de specialitate, necesitățile medicinei de transplant, precum și preocupările colectivului Disciplinei de Fiziologie și Imunologie a Universității de Medicină și Farmacie "Victor Babeș" Timișoara în domeniul biotehnologiilor, biologiei celulare și moleculare precum și medicinei regenerative, lucrarea prezintă și-a propus studiul unor metode și dispozitive experimentale care ulterior să poată fi folosite pentru realizarea altor experimente care să se finalizeze cu elaborarea unor tehnologii capabile să furnizeze organe noi, complet funcționale pentru a putea fi utilizate în medicina de transplant.

Obiectivele cercetării au constat în:

1. Realizarea unei documentații bibliografice cu privire la nivelul actual al cunoașterii în domeniul obținerii biomatricilor prin decelularizarea unor organe.
2. Elaborarea, proiectarea și realizarea unor dispozitive de laborator care să permită decelularizarea în câmp electric și prin vibrație mecanică.

3. Testarea acestor dispozitive și prelucrarea matematică a datelor obținute prin determinări fizico –chimice.
4. Elaborarea unui model experimental de perfuzie *in vivo* cu soluții hipertone în vederea facilitării decelularizării ulterioare.
5. Studiul unor posibilități de sterilizare a circuitelor dispozitivelor de decelularizare și realizarea unui dispozitiv experimental în acest scop.

Rezultatele obținute au fost publicate într-o revistă din fluxul științific principal – International Journal of Artificial Organs – IF 1.005, respectiv în Scientific Papers Veterinary Medicine ISSN: -1221-5295 (reviste BDI și CNCSIS B+), respectiv revista Fiziologia.

Cuvinte cheie: biotehnologii, decelularizare, biomatrici, regenerare tisulară.

1. STUDIUL 1:

PROIECTAREA ȘI REALIZAREA UNOR DISPOZITIVE EXPERIMENTALE TIP LANGENDORFF PENTRU DECELULARIZAREA CORDULUI ÎN CÂMP ELECTRIC ALTERNATIV RECTANGULAR.

1.1. SCOPUL STUDIULUI

Scopul acestui studiu a constat în proiectarea și realizarea a două dispozitive experimentale de laborator pe principiul Langendorff (unul cu control de presiune și celălalt cu coloană de lichid de lungime fixă – hidrostatic) care permit decelularizarea cordului perfuzat cu o soluție tensioactivă de sodiu dodecyl sulfat în prezența unui câmp electric alternativ rectangular.

1.2. DISPOZITIVUL DE DECELULARIZARE CONTROLAT ÎN PRESIUNE PREVĂZUT CU TRADUCTOR DE PRESIUNE HIDROELECTRIC.

Dispozitivul asigură presiunea necesară pentru perfuzia cordului cu ajutorul unei pompe peristaltice, a cărei funcționare este controlată permanent de către un traductor de presiune. Practic putem vorbi de un dispozitiv de reglare a presiunii după legea „tot sau nimic”, adică semnal treaptă.

Dispozitivul este format dintr-o cuvă de decelularizare cu volumul util de 75 cm³ plasată pe un agitator magnetic. Acest sistem de agitare are rolul de a omogeniza permanent soluția de decelularizare.

Aparatul este prevăzut cu o canulă adaptată pentru aorta de șobolan cu diametrul de 1,5 mm (firma AD Instruments).

Presiunea din sistem este monitorizată permanent de către traductorul hidroelectric și se poate citi pe manometrul de uz clinic intercalat în circuitul hidraulic.

În cuva de decelularizare se găsește ansamblul electrozilor plan paraleli prin intermediul cărora se aplică câmpul electric alternativ rectangular. Acești electrozi formează un ansamblu tip condensator plan.

În figura 1.2. se observă schema de principiu a dispozitivului:

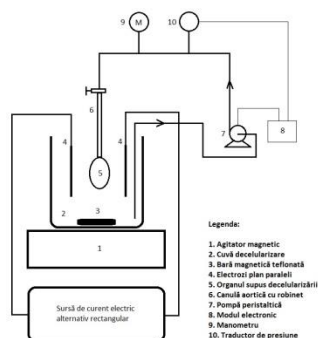


Fig. 1.2. Dispozitivul de decelularizare controlat în presiune prevăzut cu traductor de presiune hidroelectric. Schemă. (Desen original)

1.3. DISPOZITIVUL DE DECELULARIZARE HIDROSTATIC – CU COLOANĂ DE LICHID.

Dispozitivul de perfuzie este de tip „coloană de lichid de lungime constantă” adică un dispozitiv hidrostatic gravitațional cu recircularea soluției de decelularizare, fapt care permite efectuarea unor determinări cinetice biochimice prin prelevarea seriată de probe, volumul de soluție putând fi considerat constant pe durata unui experiment.

Acest tip de dispozitiv este mai simplu de realizat din punct de vedere tehnologic având mai puține componente electronice de reglare. Se apropie cel mai mult de modelul clasic al dispozitivului Langendorff.

În figura 1.3.a. se observă schema de principiu a dispozitivului:

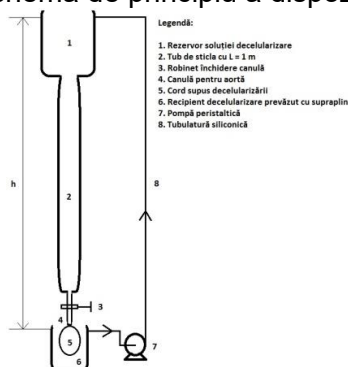


Fig. 1.3.a. Schema de principiu a dispozitivului experimental tip Langendorff propus pentru decelularizarea inimii. (Desen original)

Aplicarea câmpului electric alternativ rectangular se face la nivelul acestui recipient inferior prin intermediul a doi electrozi metalici.

Electrozii sunt dispuși după un model „plan paralel” identic cu cel prezentat la dispozitivul anterior. Organul supus decelularizării este plasat între cei doi electrozi, deci din punct de vedere geometric el se găsește în zona omogenă a acestui câmp electric (Figura 1.3. b.) în cazul ambelor dispozitive experimentale prezentate.

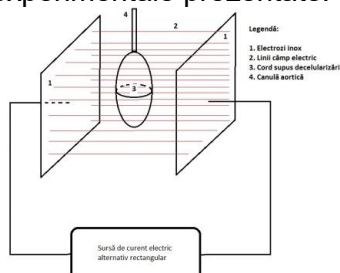


Fig. 1.3.b. Electrozi decelularizare plan paraleli. Dispunerea cordului în zona omogenă a câmpului electric. Schemă. (Desen original)

Pentru evaluarea rezultatelor studiului propunem o metodă de analiză cinetică a eliberării acizilor nucleici și proteinelor din organele care se decelularizează, arătând că în momentul în care aceste concentrații devin constante, practic nu se mai eliberează noi cantități de molecule, deci decelularizarea poate fi considerată finalizată.

A fost testat un set de opt protocoale experimentale pe ambele dispozitive de decelularizare construite. Fiecare experiment a fost efectuat în triplicat. În tabelul 1. sunt prezentați parametrii acestor protocoale.

Tabel 1.

	Concentrația soluției de SDS utilizate (%)	Concentrația soluției de EDTA- Na_2 utilizate (%)	Câmp electric alternativ rectangular 20 KHz
Experiment 1 (E1)	1,5	-	Nu
Experiment 2 (E2)	1,5	0,5	Nu
Experiment 3 (E3)	1,5	-	Da
Experiment 4 (E4)	1,5	0,5	Da
Experiment 5 (E5)	0,5	-	Nu
Experiment 6 (E6)	0,5	0,5	Nu
Experiment 7 (E7)	0,5	-	Da
Experiment 8 (E8)	0,5	0,5	Da

Durata fiecărui experiment a fost de 600 minute cu prelevarea seriată a probelor pentru dozarea acizilor nucleici și proteinelor la 30 minute. În toate situațiile s-a determinat concentrația de acizi nucleici și proteine.

1.4. REZULTATE OBȚINUTE

Se determină eficiența fiecărui protocol de decelularizare prin reprezentarea grafică a momentului în care se consideră încheiată decelularizarea, luând ca referință rezultatele obținute prin aplicarea protocolului experimental E5 unde condițiile de decelularizare au fost cele mai puțin agresive (concentrația soluției de SDS - 0,5%, absența EDTA disodic și absența câmpului electric alternativ). Pentru acest experiment vom considera timpul de decelularizare ca fiind 100%. În cazul experimentelor E3, E4, E5 și E6 s-au observat diferențe între momentul atingerii valorii de platou pentru cei doi analiți urmăriți: acizi nucleici, respectiv proteine. Pentru determinarea eficienței decelularizării se va lua în considerare timpul maxim observat, în toate cazurile cel pentru concentrația proteinelor (Figura 1.4.).

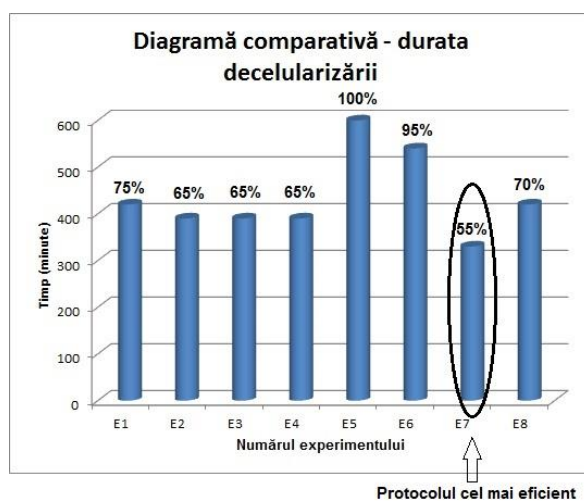


Fig. 1.4. Determinarea eficienței decelularizării.
Analiza datelor pentru experimentele E1 – E8
 (Grafic original)

Dacă decelularizarea se realizează numai cu soluție de sodiu dodecyl sulfat, atunci eficiența mai mare se obține dacă soluția este mai concentrată (1,5% vs 0,5%); adaosul de sare disodică a acidului etilendiaminotetraacetic (0,5%) crește eficacitatea decelularizării cu 10% dacă soluția de SDS este mai concentrată (1,5%) și numai cu 5% dacă acesta este diluată (0,5%), valoare la limita semnificației statistice.

EDTA disodic favorizează decelularizarea prin complexarea ionilor metalici (în special Ca^{2+}) cu destabilizarea membranei celulare și liza mai ușoară a acesteia.

Efectul aplicării câmpului electric pare a fi dependent de concentrația soluției de agent tensioactiv și de prezența agentului chelator. Dacă se folosește soluția mai concentrată de sodiu dodecyl sulfat (1,5%) atât în prezența cât și în absența EDTA disodic, efectul este nesemnificativ. Dacă se folosește însă soluția diluată de SDS (0,5% - protocolul E7), efectul este maxim (reducerea cu 45% a timpului de decelularizare față de referință). Dacă se adaugă și EDTA disodic (0,5%) atunci eficiența se reduce (reducerea cu 30% a duratei de decelularizare față de referință) dar oricum semnificativ îmbunătățită față de protocolul E6 care utilizează atât SDS (0,5%) cât și EDTA disodic (0,5%) unde timpul de decelularizare este redus cu numai 5% față de referință.

Prezența de EDTA disodic, reduce eficiența decelularizării, cel mai probabil prin mecanismul de competiție la transportul sarcinilor electrice: o parte din curent este transportată de EDTA care nu are efect decelularizant direct.

2. STUDIUL 2:

PROIECTAREA ȘI REALIZAREA UNUI DISPOZITIV EXPERIMENTAL TIP LANGENDORFF PENTRU DECELULARIZAREA CORDULUI PRIN APLICAREA PRESIUNII DE PERFUZIE OSCILATORII.

2.1. SCOPUL STUDIULUI

Scopul acestui studiu a constat în proiectarea și realizarea unui dispozitiv tip Langendorff hidrostatic cu coloană de lichid prevăzut cu posibilitatea de a suprapune peste presiunea de perfuzie a unei presiuni oscilatorii de ordinul zecilor de herți. Practic se generează o coloană de lichid care vibrează în plan vertical. Soluția pentru decelularizare este și în acest caz sodiu dodecyl sulfatul.

2.2. PROIECTAREA ȘI REALIZAREA UNUI DISPOZITIV EXPERIMENTAL DE DECELULARIZARE TIP LANGENDORFF ÎN PREZENȚA PRESIUNII DE PERFUZIE OSCILATORII

În cadrul laboratorului de Imunofiziologie și Biotehnologii din cadrul Disciplinei de Fiziologie a UMF „Victor Babeș” Timișoara a fost proiectat și realizat un dispozitiv experimental de laborator pentru studiul decelularizării cordului cu ajutorul unui agent tensioactiv (sodiu dodecyl sulfat) asociat sau nu cu un agent chelator (sarea de sodiu a acidului etilendiaminotetraacetic) în prezența unui factor mecanic: presiunea de perfuzie oscilatorie. În figura 2.2. este prezentată schema de principiu a dispozitivului și detaliile constructive ale ansamblului electromagnetic care generează presiunea oscilatorie.

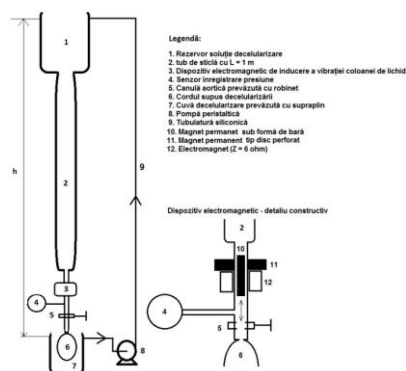


Fig. 2.2. Dispozitiv experimental de decelularizare cu presiune oscilatorie. Schemă. (Desen original)

Dispozitivul experimental este similar celui prezentat în capitolul anterior, având același volum util. Deosebirile constructive constau în: introducerea unui ansamblu electromagnetic la nivelul canulei care realizează mișcarea oscilatorie a coloanei de lichid de decelularizare.

Ansamblul electromagnetic este format dintr-un magnet permanent tip disc perforat fixat de un electromagnet care are deasemenea un orificiu central de același diametru cu al magnetului suprapus peste acesta. Prin acest orificiu trece un tub de sticlă care se continuă cu canula aortică a dispozitivului. În acest tub de sticlă se găsește un alt magnet permanent tip bară cu diametrul inferior diametrului intern al tubului (pentru a permite trecerea lichidului prin spațiul astfel format), care în absența curentului prin electromagnet este menținut în echilibru de către câmpul magnetului disc. În momentul în care electromagnetul este alimentat în curent alternativ, câmpul magnetic generat de acesta se sumează, respectiv se scade ciclic din cel al magnetului permanent tip disc și astfel se induce o mișcare de oscilație magnetului bară din tub, oscilație evident transmisă coloanei de lichid care perfuzează cordul.

Electromagnetul este alimentat prin intermediul unui amplificator audio modificat pentru redarea frecvențelor joase. Generatorul de semnal este cel folosit în cadrul experimentelor din studiul precedent. Se lucrează la frecvența de 15 Hz unde prin determinări preliminare s-a stabilit că variația de presiune este maximă și uniformă (se atinge condiția de rezonanță a dispozitivului).

În cadrul acestui studiu au fost aplicate patru protocoale experimentale. Fiecare experiment a fost efectuat în triplicat. În tabelul 2. sunt prezentate aceste protocoale.

Tabel 2.

	Concentrația soluției de SDS utilizate (%)	Concentrația soluției de EDTA- Na_2 utilizate (%)	Presiune oscilatorie cu frecvența 15 Hz
Experiment 1 (E1)	0,5	-	Nu
Experiment 2 (E2)	0,5	0,5	Nu
Experiment 3 (E3)	0,5	-	Da
Experiment 4 (E4)	0,5	0,5	Da

Durata fiecărui experiment a fost de 600 minute cu prelevarea seriată a probelor pentru dozarea acizilor nucleici și proteinelor la 30 minute.

2.3. REZULTATE OBȚINUTE

Se determină eficiența fiecărui protocol de decelularizare prin reprezentarea grafică a momentului în care se consideră încheiată decelularizarea, luând ca referință rezultatele obținute prin aplicarea protocolului experimental E1 unde condițiile de decelularizare au fost cele mai puțin agresive (concentrația soluției de SDS - 0,5%, absența EDTA disodic și presiune hidrostatică constantă nonoscilatorie). Pentru acest experiment vom considera timpul de decelularizare ca fiind 100%. În cazul experimentelor E2 și E3 s-au observat

diferențe între momentul atingerii valorii de platou pentru cei doi analiți urmăriți: acizi nucleici, respectiv proteine. Pentru determinarea eficienței decelularizării se va lua în considerare timpul maxim observat, în acest caz cel pentru concentrația proteinelor (Figura 2.3.a.).

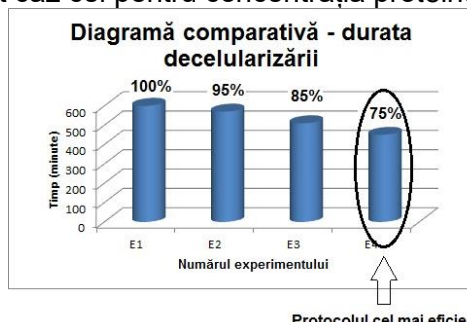


Fig. 2.3.a. Determinarea eficienței decelularizării.
Analiza datelor pentru experimentele E1 – E4
(Grafic original)

Se observă ca expunerea la presiunea hidrostatică oscilatorie are efect cumulativ cu cel al EDTA disodic. Acesta favorizează decelularizarea prin complexarea ionilor metalici (în special Ca^{2+}) cu destabilizarea membranei celulare și liza mai ușoară a acesteia.

Adaosul de EDTA disodic 0,5% reduce timpul de decelularizare cu 5%, la limita semnificației statistice.

Aplicarea presiunii hidrostatice oscilatorii fără EDTA disodic reduce cu 15% durata decelularizării, iar dacă se adaugă și EDTA se ajunge la o reducere a timpului necesar cu 25%.

S-a încercat evaluarea strict macroscopic – calitativă a coronarelor din biomatricea obținută cu ajutorul acestui dispozitiv experimental, fără a avea pretenția unui studiu finalizat, prin injectarea prin canula aortică a unei soluții 1% Albastru Evens și urmărirea pătrunderii colorantului în sistemul coronarian. Pentru rezultate relevante ar fi necesare studii histologice. În figura 2.3.b. se observă progresia colorantului în sistemul coronarian.



Fig. 2.3.b. Vizualizarea sistemului coronarian al biomatricei prin colorare cu Albastru Evans 1%. Fotografii seriate. (Fotografie originală)

3. STUDIUL 3:

ELABORAREA UNUI PROTOCOL EXPERIMENTAL COMPLEX PENTRU EVALUAREA EFECTELOR STĂRII HIPEROSMOLARE INDUSĂ *in vivo* ASUPRA DECELULARIZĂRII CARDIACE ULTERIOARE

3.1. SCOPUL STUDIULUI

Scopul acestui studiu a constat în evaluarea oportunității inducerii unei stări hiperosmolare severe animalului aflat în anestezie generală înaintea prelevării cordului pentru decelularizare. Se administrează lent, cu un debit de 10 ml/h cu ajutorul unei seringi automate, intraarterial, o soluție concentrată (45%) de sucroză heparinizată (100 UI/ml) până la instalarea stopului cardiac. Cordul prelevat se supune decelularizării.

3.2. PROTOCOALE EXPERIMENTALE

În cadrul acestui studiu fost utilizați 6 șobolani împărțiți în două loturi:

- **Lotul A (n=3) „CONTROL”** la care s-a administrat intraarterial soluție salină izotonă heparinizată (100 UI/mL). Volumul de soluție administrată a fost de 20 cm³, pe durata a două ore de administrare.
- **Lotul B (n=3) „HIPERTON”** la care s-a administrat soluție de sucroză hipertonică heparinizată (100 UI/mL) până la instalarea stopului cardiac. Stopul cardiac se instalează după aproximativ 90 -100 minute (corespunzător unui volum de soluție hipertonică de 15 – 17 cm³).

După încheierea perfuziei intraarteriale / instalarea stopului cardiac se detașează cordul conform tehnicilor descrise în capitolele anterioare și se aplică un protocol de decelularizare, identic pentru ambele loturi, cu o soluție de sodiu dodecyl sulfat 0,5% în apă distilată. Se vor folosi următoarele notații:

- E1 pentru experimentele de decelularizare în cazul lotului A „CONTROL” (valori medii)
- E2 pentru experimentele de decelularizare în cazul lotului B „HIPERTON” (valori medii)

S-a utilizat un dispozitiv experimental hidrostatic – cu coloană de lichid de tipul celui folosit în studiul anterior la care s-a demontat modulul electromagnetic. Durata fiecărui experiment a fost de 600 minute.

3.3. REZULTATE OBTINUTE

Se determină eficiența fiecărui protocol de decelularizare prin reprezentarea grafică a momentului în care se consideră încheiată decelularizarea, luând ca referință rezultatele obținute prin aplicarea protocolului experimental E1 corespunzător lotului A. Pentru determinarea eficienței decelularizării se va lua în considerare timpul maxim observat, în acest caz cel pentru concentrația proteinelor (Figura 3.3.).

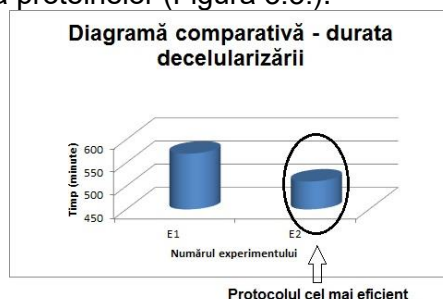


Fig. 3.3. Determinarea eficienței decelularizării.
Analiza datelor pentru experimentele E1 – E2
(Grafic original)

4. STUDIUL 4:

PROIECTAREA ȘI REALIZAREA UNUI MICROREACTOR ELECTROCHIMIC CU DENSITĂȚI DE CURENȚ ASIMETRICE PENTRU STERILIZAREA *IN SITU* A DISPOZITIVELOR DE DECELULARIZARE

4.1. SCOPUL STUDIULUI

În cadrul laboratorului nostru a fost construit un microreactor electrochimic cu densități de curent asimetrice care generează cantități controlate de ioni hipoclorit respectiv clor liber și care se poate cupla direct la ambele tipuri de dispozitive de

decelularizare propuse. Astfel tubulatura acestor dispozitive poate fi sterilizată în vederea efectuării unor cercetări ulterioare de recelularizare a biomatricilor obținute.

4.2. DESCRIEREA DISPOZITIVULUI EXPERIMENTAL

S-a ales reactorul electrochimic cu densități de curent asimetrice deoarece față de reactorul conventional cu electrozi de suprafață egală, acesta favorizează reacțiile electrochimice dorite și evită diafragma care are numeroase dezavantaje (material scump, rezistență mecanică redusă, rezistență ohmică mare).

Din punct de vedere constructiv reactorul electrochimic este format dintr-o cuvă de plaxiglas de forma cilindrică cu volumul util de 100 cm³. La partea inferioară se găsește un ștuț de umplere/golire prin care dispozitivul se poate conecta la pompa peristaltică a dispozitivului de decelularizare. Masa de reacție este omogenizată continuu cu ajutorul unui agitator mecanic antrenat de un micromotor electric prevăzut cu reductor de turație (Fig 4.2.)

Electrozii (anasamblul de opt anodi de grafit și catodul de oțel inoxidabil (inox alimentar)), precum și sistemul de antrenare mecanică sunt montate în capacul reactorului. Gazele rezultate în urma electrolizei sunt evacuate de un mic compresor în afara spațiului de lucru. Tot la nivelul capacului se găsește un port pentru recoltarea de probe în cursul funcționării dispozitivului în vederea analizelor fizico-chimice.

Reactorul este conectat cu un electrod de referință cu calomel (cuplul electrochimic: Hg / calomel / KCl – soluție saturată) care permite măsurarea continuă a potențialului anodic cu ajutorul unui voltmetru cu impedanță de intrare mare.

Electrolitul folosit este soluția de clorură de sodiu 0,9% (serul fiziologic) care suferă o serie de procese de oxidare anodică cu formarea de ioni hipoclorit și mici cantități de clor liber (dizolvat fizic) cu efect puternic sterilizant. Procesele catodice sunt mult limitate prin construcția reactorului.

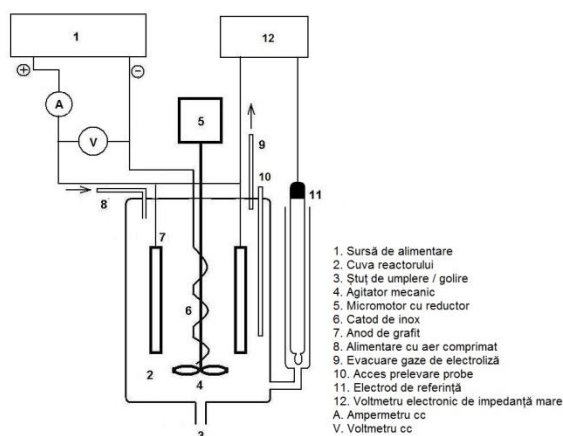


Fig. 4.2. Microreactorul electrochimic cu densități de curent asimetrice. Schema. (După Burian)

4.3. REZULTATE OBȚINUTE

Pentru determinarea eficienței sterilizării s-a utilizat o tulpină de *Staphylococcus aureus* strain (ATCC 25923) și determinarea concentrației de clor liber prin metoda titrimetrică cu methylorange în mediu de acid sulfuric.

În condițiile experimentale prezentate se constată că în primele trei minute de funcționare a instalației experimentale, încărcătura microbiană se reduce de la 9,48 log la 0 pentru o concentrație a speciei active de clor liber sub 3 mg/dl.

CONCLUZII FINALE

Scopul prezentei lucrări a constat în evaluarea unor metode fizico-chimice folosite pentru obținerea de biomatrici cardiace prin decelularizarea cordului de șobolan. Obiectivele

cercetării, expuse în partea introductivă a lucrării au fost atinse în totalitate în cadrul celor patru studii experimentale efectuate și a căror rezultate permit formularea următoarelor concluzii finale:

1. Testarea dispozitivelor experimentale tip Langendorff cu control de presiune, respectiv cu coloană de lichid nu a relevat diferențe semnificative în ceea ce privește durata decelularizării, eficiența celor două dispozitive se poate considera identică.
2. Cinetica procesului de decelularizare este influențată semnificativ de următorii factori:
 - Concentrația soluției de SDS: soluția de SDS 1,5% este mai eficientă decât soluția 0,5% în ceea ce privește timpul de decelularizare, dar soluția mai concentrată are un efect nefavorabil asupra integrității tridimensionale a biomatricii obținute.
 - Adăosul de EDTA disodic la soluția de SDS cu scopul complexării ionilor de Ca^{2+} urmată de destabilizarea membranelor celulare, favorizează decelularizarea în cazul utilizării unor soluții mai concentrate de SDS (1,5%) și într-o măsură mai mică în cazul soluțiilor diluate (0,5%) – la limita semnificației statistice.
 - Aplicarea câmpului electric alternativ (20kHz) crește semnificativ eficiența decelularizării (reducerea cu 45% a timpului de decelularizare față de referință) dar numai pentru soluțiile de SDS diluate (0,5%); pentru soluțiile concentrate (1,5%) acest efect este extrem de redus. Adăosul de EDTA disodic, în prezența câmpului electric, nu favorizează decelularizarea nici pentru soluțiile de SDS diluate și nici pentru cele concentrate, probabil printr-un mecanism de competiție la transportul sarcinilor electrice între ionul dodecyl sulfat și ionul etilendiaminotetraacetat.
3. Dacă se utilizează pentru decelularizare un dispozitiv tip Langendorff prevăzut cu un modul electromagnetic care realizează o presiune hidrostatică oscilatorie cu frecvența de 15 Hz (frecvența de rezonanță a dispozitivului experimental construit) se observă că efectul acestei presiuni vibratorii este cumulativ cu efectul produs de EDTA disodic. Aplicarea presiunii hidrostatice oscilatorii fără EDTA disodic reduce cu 15% durata decelularizării, iar dacă se adaugă și EDTA se ajunge la o reducere a timpului necesar cu 25% pentru o concentrație de SDS egală cu 0,5% față de lotul martor.
4. Aplicarea unui protocol de deshidratare intracelulară *in vivo* prin administrarea unei soluții hipertone de sucroză animalului aflat în anestezie generală, înaintea prelevării cordului aduce un beneficiu relativ modest: se reduce durata decelularizării cu aproximativ 10% comparativ cu lotul martor la care nu s-a administrat sucroză.
5. O modalitate eficientă de sterilizare a tubulaturii dispozitivului tip Langendorff folosit pentru decelularizare constă în generarea unor specii reactive de tipul clorului liber dizolvat fizic, precum și a ionilor hipoclorit pornind de la o soluție de clorură de sodiu 0,9% supusă electrolizei cu anod de grafit într-un microreactor electrochimic cu densități de curent asimetrice cuplat cu dispozitivul Langendorff. Un timp de funcționare de trei minute este suficient pentru a distruge o încărcătură bacteriană de 3×10^8 germeni/ml (safilococ auriu tulpina ATCC 25923) la un volum de soluție de 100 cm³.

CONTRIBUȚII ORIGINALE

1. Proiectarea, realizarea și testarea a trei dispozitive de laborator tip Langendorff folosite pentru decelularizarea cordului de șobolan: un dispozitiv tip Langendorff controlat în presiune, un dispozitiv tip Langendorff cu coloană de lichid și un alt

dispozitiv tot cu coloană de lichid dar prevăzut cu un modul electromagnetic care asigură o presiune hidrostatică oscilatorie cu frecvența de 15 Hz. Pentru toate aceste dispozitive au fost elaborate protocoale experimentale prin care s-a validat funcționarea acestora.

2. Proiectarea, realizarea și testarea unui ventilator anestezic pentru animale mici de laborator utilizat în cadrul experimentelor *in vivo*.
3. Elaborarea unui protocol de inducere a stării de deshidratare intracelulară a cordului *in vivo* prin administrarea unei soluții concentrate de sucroză animalului aflat în anestezie generală. Cordul prelevat după instalarea stopului cardiac a fost supus decelularizării. Această secvență deshidratare intracelulară intravitală urmată de decelularizarea organului respectiv este originală.
4. Proiectarea, realizarea și testarea unui microreactor electrochimic cu densități de curent asimetrice pentru generarea unor specii reactive ale ionului hipoclorit folosit pentru sterilizarea tubulaturii dispozitivelor tip Langendorff.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ (LUCRĂRI PUBLICATE SUB SEMNĂTURĂ PROPRIE)

1. Popoiu CM*, **Burian CA***, Păunescu V, Boia E, Arghirescu S, Muntean DM, Ordodi VL. Development of a High-performance Anesthesia Ventilator for Research in Small Animals. *Int J Artif Organs*. 2014 Jun;37(6):436-41. (* equal contribution) (IF = 1,005)
2. Horea Sarandan, Mihai Decun, Virgil Paunescu, Valentin Ordodi, Florina Bojin, Ioan Hutu, Calin Pop, Simona Zarcu, **Caius Burian**, Gabriela Tanasie and Mihai Sarandan. Deoxynivalenol and Ochratoxin A inactivation in broiler chickens' feed. *Romanian Biotechnological Letters* Vol. 17, No.6, 2012. (IF = 0,404)
3. **C. Burian**, V. Ordodi, R.T. Cristina, A.A. Morvay, M. Decun, Claudia Sala, Adriana Morar, M. Sărăndan. Water Disinfection Using an Electrochemical Reactor with Asymmetric Current Densities. *Lucrări Științifice Medicină Veterinară* vol. xlv(2), 2012, Timișoara
4. M. Sărăndan, V. Ordodi, A.A. Morvay, M. Decun, Claudia Sala, Adriana Morar, **C. Burian**. Electrochemical Bypass of Bacterial Biofilms' Defences. *Lucrări Științifice Medicină Veterinară* vol. xlv(2), 2012, Timișoara
5. Daniela Chiru, Narcis Țepeneu, **Caius Burian**, Adrian Craciun, Ilie Constantin, Mirabela Dima, Valentin Ordodi. Techniques for Endotracheal Intubation in Rats. *Fiziologia - Physiology* 2013.23.2 (78)

UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
"VICTOR BABES"
FACULTY OF MEDICINE
Functional Sciences Department

BURIAN S. CAIUS ALEXANDRU ȘTEFAN



PhD THESIS

SUMMARY

PHYSICO-CHEMICAL METHODS OPTIMIZATION FOR
TISSUE DECELLULARIZATION TO OBTAIN BIOLOGICAL
MATRICES

Scientific advisor:

VIRGIL PĂUNESCU, MD, PhD

Timișoara
2017

SUMMARY

INTRODUCTION.....	2
THE PhD THESIS OBJECTIVES.....	2
STUDY 1: DESIGNED AND DEVELOPED OF TWO EXPERIMENTAL DEVICES TIP LANGENDORFF FOR HEART DECELLULARIZATION IN RECTANGULAR ALTERNATING ELECTRIC FIELD.....	3
STUDY 2: AN EXPERIMENTAL DEVICE TYPE LANGENDORFF FOR THE HEART DECELLULARIZATION WITH OSCILLATION PERFUSION PRESSURE.....	6
STUDY 3: DEVELOPMENT OF A COMPLEX EXPERIMENTAL PROTOCOL FOR ASSESSING EFFECTS ON HYPEROSMOLAR STATUS INDUCED IN VIVO, SUBSEQUENT CARDIAC DECELLULARIZATION.....	8
STUDY 4: MAKING AN ELECTROCHEMICAL MICROREACTOR WITH ASYMMETRIC CURRENT DENSITY FOR IN SITU SANITIZING TUBING SET OF DECELLULARIZATION DEVICES.....	9
FINAL CONCLUSION.....	10
ORIGINAL CONTRIBUTIONS.....	11
SELECTIVE BIBLIOGRAPHY.....	11

INTRODUCTION

In the last decades witnessing a spectacular development of life sciences in general and medicine in particular, with a significant impact in terms of increasing life. Medicine pathology specializes in elderly patients, even if it is not a new concept known a spectacular development in recent years.

Thus contemporary medicine is currently facing a chronic degenerative pathology increasingly frequently expressed in public, which requires finding new ways of replacement tissues and organs affected thereby imposing new trend in transplantology. Thanks to major advances made in biomedical sciences, technology was shaped bodies obtained in hard biomatrix decellularised and repopulated with autologous cells of the graft recipient. Technology biological organs obtained artificially is the newest therapeutic method appeared in transplantation medicine. "Tissue engineering" as it is called this technique, largely eliminates the drawbacks of organ transplant organs taken from live donor or cadaver and alternate electronic devices also disadvantages of organ function affected by pathological processes.

THE PhD THESIS OBJECTIVES

Closely following the studies published in the literature, needs medicine transplantation, and the concerns of staff Department of Physiology and Immunology, University of Medicine and Pharmacy "Victor Babes" in Power stations biotechnology, cell biology and molecular and regenerative medicine, this paper proposed study methods and experimental devices that can later be used to undertake other experiments to complete the development of technologies that provide new organs, fully functional to be used in transplantation medicine.

THE RESEARCH OBJECTIVES WERE:

1. Making a bibliographic documentation on the current level of knowledge in the taking of organs biomatrix by decellularization.
2. Develop, design and implementation of laboratory devices enabling decellularization electric field and mechanical vibration.
3. Testing of these devices and mathematical processing of the experimental data.

4. Develop an experimental model *in vivo* perfusion with hypertonic solutions to facilitate subsequent decellularization.
5. The study opportunities for microbiological decontamination of the devices tubing set and making an experimental device for this purpose.

The research results were published in a leading scientific journal stream - International Journal of Artificial Organs - IF 1.005, respectively Scientifical Papers Veterinary Medicine ISSN: -1221 - 5295 (BDI journals and B +) and Physiology SRSF.

Keywords: biotechnologies, decellularization, biomatrix, tissue regeneration.

1. STUDY 1:

DESIGNED AND DEVELOPED OF TWO EXPERIMENTAL DEVICES TIP LANGENDORFF FOR HEART DECELLULARIZATION IN RECTANGULAR ALTERNATING ELECTRIC FIELD.

1.1. PURPOSE OF STUDY

The aim of this study was to design and construct two experimental devices Laboratory on the principle Langendorff (one with pressure control and the other column of liquid fixed length - hydrostatic) allowing decellularization heart infused with a solution of the surfactant sodium dodecyl sulfate in the presence of an alternating electric field rectangular.

1.2. THE PRESSURE CONTROLLED DECELLULARIZATION DEVICE WITH HYDROELECTRIC PRESSURE TRANSDUCER.

The device provides for the perfusion pressure to the heart by means of a peristaltic pump whose operation is controlled continuously by a pressure transducer. Basically we can speak of a pressure regulating device according to the law "all or nothing", also known as fixed signal level.

The device consists of a vat of decellularization of the useful volume of 75 cm³ placed on a magnetic stirrer. The stirring system is designed to continuously blend of decellularization solution to be homogenous.

The device is provided with a cannula adapted for rat aorta with a diameter of 1.5 mm (AD Instruments Company).

System pressure is continuously monitored and adjusted by hydro-electric transducer and can be read on the clinical use manometer placed in the hydraulic circuit of the device. In decellularization tank we have an assembly of plan parallel electrodes through which rectangular alternating electric field is applied. These electrodes form an assembly type of electric capacitor.

In figure 1.2. observed schematic diagram of the device:

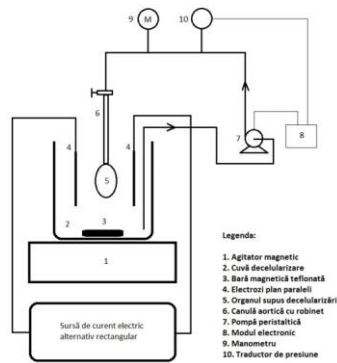


Fig. 1.2. The decellularization device with pressure control transducer. Schematic. (Original)

1.3. HYDROSTATIC DECELLULARIZATION DEVICE - LIQUID COLUMN.

The device perfusion type "column of liquid with constant length" which is a device hydrostatic pressure, recirculating solution decellularization, which allow for determination of kinetic biochemical taking of evidence, the volume of solution can be considered constant during an experiment .

This device is easier to do in terms of having fewer technological control electronics. It is closest to the classical model of Langendorff device.

In figure 1.3.a. observed schematic diagram of the device:

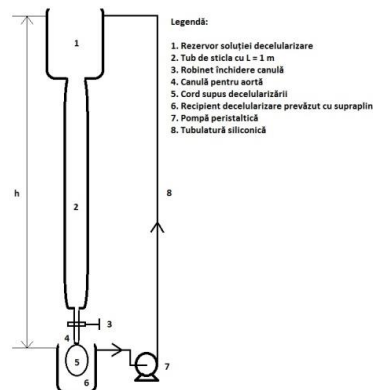


Fig. 1.3.a. Principle schematic of hydrostatic pressure decellularization device. Type Langendorff. (Original)

Application rectangular alternating electric field is at the lower container through two metal electrodes.

The electrodes are arranged in a pattern "plan parallel " exactly the same as the previous device. Organ under decellularization is placed between two electrodes, so the geometrically it is in this area homogeneous electric field (Figure 1.3. b.) If both experimental devices presented.

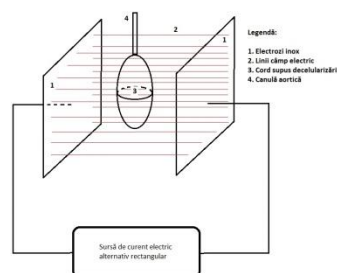


Fig. 1.3.b. Decellularization plan parallel electrodes assembly. Schematics. (Original)

Evaluating the results of the study suggest a method for kinetic analysis of the release of nucleic acids and proteins in organs that are being decellularised, showing that when concentrations become constant, practically no longer release new quantities of molecules, so decellularization may be considered completed.

It was tested a set of eight experimental protocols on both devices built for decellularization purpose. Each experiment was performed in triplicate.

Table 1: The parameters of these protocols.

Table 1.

	SDS Concentration (%)	EDTA-Na ₂ Concentration (%)	Alternating rectangular electric field 20 KHz
Experiment 1 (E1)	1,5	-	No
Experiment 2 (E2)	1,5	0,5	No
Experiment 3 (E3)	1,5	-	Yes
Experiment 4 (E4)	1,5	0,5	Yes
Experiment 5 (E5)	0,5	-	No
Experiment 6 (E6)	0,5	0,5	No
Experiment 7 (E7)	0,5	-	Yes
Experiment 8 (E8)	0,5	0,5	Yes

The duration of each experiment was 600 minutes by taking samples for of nucleic acids and proteins determination for each 30 minutes. In all cases it was determined the concentration of nucleic acids and proteins by UV spectrophotometry.

1.4. RESULTS

Determine the effectiveness of each protocol decellularization by plotting the moment it is considered complete decellularization, taking as reference the results obtained by applying the experimental protocol decellularization E5 where conditions were the less aggressive (SDS solution concentration - 0.5% disodium EDTA absence and the absence of alternating electric field). For this experiment we will consider during the decellularization as 100%. In the experiments E3, E4, E5 and E6 was observed differences when reaching the plateau value for the two analytes follow the nucleic acids or proteins. To determine the effectiveness of decelularization we will consider the maximum observed in all cases for the protein concentration (Figure 1.4.). If decellularization is achieved only with sodium dodecyl sulfate solution, then higher efficiency is obtained if the solution is more concentrated (1.5% vs 0.5%); the addition of ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (0.5%) with 10% increase the effectiveness of decellularization, the solution is more concentrated SDS (1.5%) and only 5% if it is diluted (0.5%), the value borderline significance.

Disodium EDTA complexing metal ions favors by decellularization (especially Ca²⁺) cell membrane destabilization and lysis of it easier.

The effect of the application of electric field appears to be dependent on the concentration of the surfactant and the presence of the chelating agent. When using more concentrated solution of sodium dodecyl sulfate (1.5%) both in the presence and absence of EDTA disodium, the effect is insignificant. But if it is used diluted solution of SDS (0.5% - E7 Protocol) is the maximum effect (45% reduction time reference to decellularization). If we add the disodium EDTA (0.5%) when efficiency is reduced (30% reduction in the duration of decellularization from baseline) but still significantly improved over E6 protocol that uses both SDS (0.5%) and EDTA disodium (0.5%) during the decellularization which is reduced by only 5% over the reference.

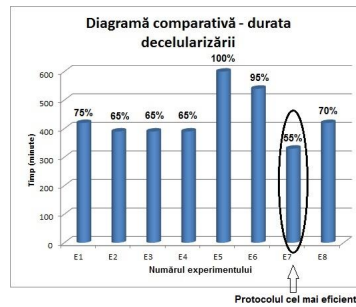


Fig. 1.4. Efficiency of heart decellularization. Experiments E1-E8.
(Original)

The presence of disodium EDTA, decrease the efficiency of decellularization, most likely through the mechanism of competition to transport electrical charges: some of the current is carried by EDTA that has no direct decellularization effect.

2. STUDY 2:

AN EXPERIMENTAL DEVICE TYPE LANGENDORFF FOR THE HEART DECELLULARIZATION WITH OSCILLATION PERFUSION PRESSURE.

2.1. PURPOSE OF STUDY

The aim of this study was to design and construct a device Langendorff type hydrostatic liquid column provided with the opportunity to overlap the pressure perfusion pressure oscillatory tens of hertz. Basically it generates a column of liquid that vibrates vertically. The decellularization solution is sodium dodecyl sulfate in this case.

2.2. AN EXPERIMENTAL DEVICE FOR HEART DECELLULARIZATION TYPE LANGENDORFF IN THE PRESENCE OSCILLATORY PERFUSION PRESSURE

In the laboratory of Imunofiziologie and Biotechnology, Department of Physiology of "Victor Babes" University of Medicine and Pharmacy, was designed and built an experimental laboratory device for the study of heart decellularization using a surfactant (sodium dodecyl sulfate) with or without a chelating agent (sodium salt of ethylenediaminetetraacetic acid) in the presence of a mechanical factor: a perfusion pressure fluctuating (oscillating pressure). Figure 2.2. It is a schematic diagram of the device assembly and construction details that generate electromagnetic oscillations pressure.

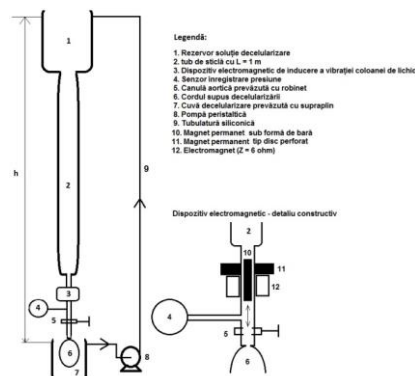


Fig. 2.2. Oscillatory pressure experimental device for heart decellularization.
Schematics. (Original)

The experimental device is similar to that presented in the previous chapter, with the same useful volume. The differences in construction are: the introduction of an electromagnetic setup, the cannula which carried the oscillations of a column of liquid of decellularization.

Electromagnetic assembly consists of a perforated disc-like permanent magnet fixed to an electromagnet, which also has a central hole of the same diameter of the magnet superimposed on it. Through this hole passes a glass tube which is continuous with the aortic cannula of the device. In the glass tube there is another bar-type permanent magnet with a diameter lower than the internal diameter of the tube (to allow the passage of liquid through the space so formed), which in the absence of current in the electromagnet is kept in equilibrium by the magnetic field of the disk. When the solenoid is energized with alternating current magnetic field generated by it are added up or subtracted cyclically one of the permanent magnet type disc and thus induce the oscillation of the magnet rod tube, oscillation obviously passed the column of liquid perfused heart.

The electromagnet is powered by a modified audio amplifier for low frequency playback. The signal generator is used in experiments in the previous study. It works at a frequency of 15 Hz where the preliminary determination was that the pressure variation is set high and uniform (to achieve the resonance condition of the device).

In this study four experimental protocols were applied. Each experiment was performed in triplicate.

Table 2: The parameters of these protocols.

Table 2.

	SDS Concentration (%)	EDTA-Na ₂ Concentration (%)	15 Hz Oscillating pressure
Experiment 1 (E1)	0,5	-	No
Experiment 2 (E2)	0,5	0,5	No
Experiment 3 (E3)	0,5	-	Yes
Experiment 4 (E4)	0,5	0,5	Yes

The duration of each experiment was 600 minutes by taking samples for of nucleic acids and proteins determination for each 30 minutes. In all cases it was determined the concentration of nucleic acids and proteins by UV spectrophotometry.

2.3. RESULTS

It was determine the effectiveness of each protocol decellularization by plotting the moment it is considered complete decellularization, taking as reference the results obtained by applying the experimental protocol E1 decellularization where conditions were the less aggressive (SDS solution concentration - 0.5% absence of disodium EDTA and nonoscillatory constant hydrostatic pressure). For this experiment we will consider during the decellularization as 100%. In the experiments E2 and E3 were observed difference between the time to achieve the set value for the two analytes follow the nucleic acids or proteins. To determine the effectiveness of decellularization will consider the maximum time observed in this case for the protein concentration. (Figure 2.3.a.).

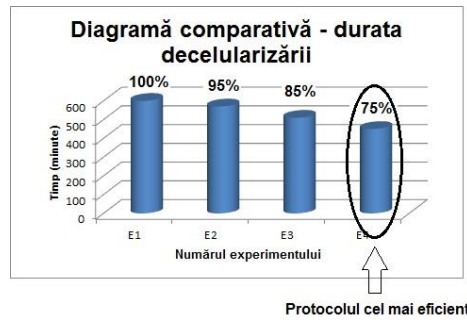


Fig. 2.3.a. Efficiency of heart decellularization. Experiments E1-E4.
(Original)

It is observed that exposure to hydrostatic pressure fluctuating with the cumulative effect of disodium EDTA. It favors decellularization by complexing metal ions (especially Ca^{2+}) cell membrane destabilization and lysis of it easier. The addition of disodium EDTA 0.5% during the decellularization reduced by 5%, of borderline significance.

The application of fluid pressure with disodium EDTA oscillatory reduced by 15% during decellularization, and with the addition of EDTA to achieve a reduction in the time required by 25%.

It tried strictly macroscopic evaluation of coronary system from biomatrix obtained with this experimental device, without claiming a study completed by injecting through the aortic cannula to a 1% blue Evans dye penetration and tracking in the coronary system. For relevant results histological studies would be needed. Figure 2.3.b. observed the progression of dye in the coronary system.



Fig. 2.3.b. Biomatrix coronary system. Blue Evans dye 1%. (Original)

3. STUDY 3:

DEVELOPMENT OF A COMPLEX EXPERIMENTAL PROTOCOL FOR ASSESSING EFFECTS ON HYPEROSMOLAR STATUS INDUCED IN VIVO, SUBSEQUENT CARDIAC DECELLULARIZATION

3.1. PURPOSE OF STUDY

The aim of this study was to assess the appropriateness induce a severe hyperosmolar state animal undergoing general anesthesia before sampling the heart for future decellularization. The administration is slowly, at a rate of 10 ml / h by means of an automatic syringe, intraarterial, a concentrated (45%) of sucrose heparinized (100 IU/ml) until cardiac arrest onset. The heart will remove and is subject for decellularization.

3.2. EXPERIMENTAL PROTOCOLS

In this study were used 6 rats divided into two groups:

- Group A (n = 3) "CONTROL" were administered intraarterially of a isotonic heparinized saline solution (100 IU/mL). The administered volume was 20 cm³ over a period of two hours.

- Group B (n = 3) "HYPERTONIC" which was administered hypertonic sucrose solution The heparinized (100 IU/mL) until installation of the cardiac arrest. Cardiac arrest appear after about 90 to 100 minutes (corresponding to a volume of hypertonic solution of 15 to 17 cm³).

After concluding intra-arterial infusion / installation cardiac arrest cord detaches according to the techniques described in previous chapters and apply a decellularization protocol is identical for both groups, with a solution of sodium dodecyl sulfate 0.5% in distilled water. It will use the following notations:

- E1 decellularization experiments in sample A "CONTROL" (average)
- E2 decellularization experiments in sample B "HYPERTONIC" (average)

It was used, a test device hydrostatic - the column of liquid of the type used in the earlier study, which was removed from the electromagnetic module. The duration of each experiment was 600 minutes. The samples was taking for each 30 minutes. In all cases it was determined the concentration of nucleic acids and proteins by UV spectrophotometry.

3.3. RESULTS

Determine the effectiveness of each protocol decellularization by plotting the moment it is considered complete decellularization, taking as reference the results obtained by applying the experimental protocol corresponding batch A - E1. To determine the effectiveness of decellularization we will consider the maximum observed in this case the for protein concentration (Figure 3.3.).

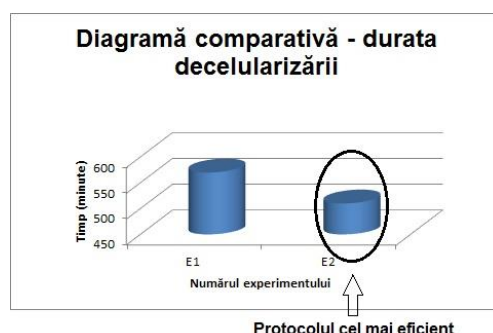


Fig. 3.3. Efficiency of heart decellularization. Experiments E1-E2.
(Original)

4. STUDY 4:

MAKING AN ELECTROCHEMICAL MICROREACTOR WITH ASYMMETRIC CURRENT DENSITY FOR IN SITU SANITIZING TUBING SET OF DECELLULARIZATION DEVICES

4.1. PURPOSE OF STUDY

In our laboratory it was built electrochemical microreactor with asymmetric current densities which generates a controlled amounts of free chlorine and hypochlorite ions respectively which can be connected directly to both devices decellularization suggested. Thus these devices can be sterilized tubing in order to investigate further the biomatrix recellularisation obtained.

4.2. DESCRIPTION OF THE EXPERIMENTAL DEVICE

We chose electrochemical reactor with asymmetrical current densities as compared to conventional reactor equal electrode surface, it favors the desired electrochemical reactions and prevents the diaphragm which has many disadvantages (expensive material, low mechanical strength, high ohmic resistance).

From the constructive point of view of the electrochemical reactor consists of a vat of cylindrical shape plaxiglas the useful volume of 100 cm³. At the bottom is a nozzle filling / emptying the device can connect to the peristaltic pump device decellularization. The reaction mass is continuously stirred by a mechanical stirrer driven by an electric micro-motor provided with a speed reduction unit (Figure 4.2).

Electrodes (anodes eight of the assembly of the graphite and the cathode of stainless steel (stainless steel food), and the motor drive system are mounted in reactor cover. The resulting gases are discharged from the electrolysis of a small compressor outside the workspace. Also on the cover is a port for sampling during operation of the device to physical and chemical analyzes.

The reactor is connected to a reference calomel electrode (electrochemical couple: Hg / calomel / KCl - saturated) which continuously measure been to pick potential anode with a high input impedance voltmeter.

The electrolyte solution used is 0.9% sodium chloride (saline) suffering a series of anodic oxidation processes with the formation of hypochlorite ions and small amounts of chlorine free (physically dissolved) with strong sterilizing effect. Cathodic processes are greatly hampered by the construction of the reactor.

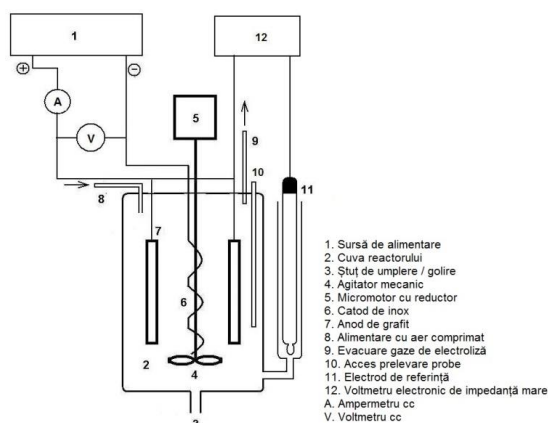


Fig. 4.2. The electrochemical microreactor with assymetric current densities.
Schematic. (Burian)

4.3. REZULTS

To determine the effectiveness of sterilization was used *Staphylococcus aureus* strain to strain (ATCC 25923) and the concentration of free chlorine by titrimetric with methylorange in sulfuric acid medium.

Under the experimental conditions presented it shows that the first three minutes of operation of the pilot plant, microbial load is reduced from 9.48 to 0 for a log of the active species concentration of free chlorine below 3 mg / dL.

FINAL CONCLUSION

The aim of this work was to evaluate some physicochemical methods used to obtain biomatrix rat heart by heart decellularization. Research objectives outlined in the introduction

to this paper have been met entirely within the four experimental studies and whose final results allow the following conclusions:

1. Testing Langendorff type experimental devices with pressure control, versus column of fluid revealed no significant differences in terms of length decelularizării efficiency of the two devices may be considered identical.
2. Kinetics decellularization process is significantly influenced by the following factors:
 - The concentration of SDS solution: 1.5% SDS solution is better than the 0.5% solution with respect to time of decellularization, but more concentrated solution has an adverse effect on the integrity of the three-dimensional biomatrix obtained.
 - The addition of disodium EDTA to the solution of SDS in order complexation of Ca^{2+} , followed by destabilization of cell membranes, the decellularization favor the use of more concentrated solution of SDS (1.5%) and to a lesser extent in the case of diluted solutions (0.5%) - of borderline significance.
 - Applying alternating electric field (20kHz) significantly increases the efficiency decelularizării (45% reduction from baseline decellularization time) but only dilute solutions of SDS (0.5%); for concentrated solutions (1.5%) this effect is greatly reduced. The addition of disodium EDTA in the presence of the electric field does not favor any solutions of SDS decellularization diluted nor for the concentrated, probably through a competition mechanism to transport electrical charges between dodecyl sulfate ions and ion ethylenediaminetetraacetate.
3. An effective way to sterilize the piping used for decellularization Langendorff device type is the generation of reactive species such as free chlorine physically dissolved and the hypochlorite ions to a solution of 0.9% sodium chloride solution subjected to the electrolysis anode graphite in a microreactor asymmetric electrochemical current densities coupled with Langendorff device. A running time of three minutes is sufficient to destroy the bacterial load 3×10^8 bacteria / ml (S. Aureus strain ATCC 25923) at a volume of 100 cm^3 solution.

ORIGINAL CONTRIBUTIONS

5. Design, implementation and testing of three laboratory devices used decellularization type Langendorff rat heart: a controlled pressure Langendorff device type, device type Langendorff liquid column and another device but also with liquid column provided with a mode which provides a hydrostatic pressure electromagnetic oscillations with a frequency of 15 Hz. For all these devices have been developed experimental protocols validated by which their operation.
6. Design, implementation and testing of an anesthetic ventilator for small laboratory animals used in experiments *in vivo*.
7. Development of a Protocol to induce intracellular dehydration condition of the heart in vivo by administration of a concentrated solution of sucrose in the animal undergoing general anesthesia. Taken heart after cardiac arrest has undergone installing decelularizării. This sequence intracellular dehydration followed by intravital organ decellularization is original.
8. Design, implementation and testing of an electrochemical microreactor with asymmetrical current densities to generate reactive species hypochlorite ion type devices used to sterilize tubing Langendorff.

SELECTIVE BIBLIOGRAPHY (PUBLISHED UNDER OWN SIGNATURE)

6. Popoiu CM*, Burian CA*, Păunescu V, Boia E, Arghirescu S, Muntean DM, Ordodi VL. Development of a High-performance Anesthesia Ventilator for Research in Small Animals. Int J Artif Organs. 2014 Jun;37(6):436-41. (* equal contribution) (IF = 1,005)

7. Horea Sarandan, Mihai Decun, Virgil Paunescu, Valentin Ordodi, Florina Bojin, Ioan Hutu, Calin Pop, Simona Zarcu, **Caius Burian**, Gabriela Tanasie and Mihai Sarandan. Deoxynivalenol and Ochratoxin A inactivation in broiler chickens' feed. Romanian Biotechnological Letters Vol. 17, No.6, 2012. (IF = 0,404)
8. **C. Burian**, V. Ordodi, R.T. Cristina, A.A. Morvay, M. Decun, Claudia Sala, Adriana Morar, M. Sărăndan. Water Disinfection Using an Electrochemical Reactor with Asymmetric Current Densities. Lucrări Științifice Medicină Veterinară vol. xlv(2), 2012, Timișoara
9. M. Sărăndan, V. Ordodi, A.A. Morvay, M. Decun, Claudia Sala, Adriana Morar, **C. Burian**. Electrochemical Bypass of Bacterial Biofilms' Defences. Lucrări Științifice Medicină Veterinară vol. xlv(2), 2012, Timișoara
10. Daniela Chiru, Narcis Țepeneu, **Caius Burian**, Adrian Craciun, Ilie Constantin, Mirabela Dima, Valentin Ordodi. Techniques for Endotracheal Intubation in Rats. Fiziologia - Physiology 2013.23.2 (78)