

which the difference of 16% is statistically significant ($p < 0.05$).

Conclusions. Hemoperitoneum is shown to be harmless compared to white laparotomy confirmed by low significant levels of SMMM and low insignificant levels of SN, indicating inflammatory syndrome and tissue degradative processes lower in the group of animals with haemoperitoneum and conservative approach.

Key words: hemoperitoneum, nonoperator, biochemical

SUPPORT CELULAR PENTRU INGINERIA TISULARĂ



COBZAC V, JIAN M, CROITOR G, NACU V

Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare, USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova

Scop. Obținerea unui suport tridimensional hibrid din collagen tip I și chitosan pentru fixarea celulelor cultivate *in vitro*, favorizarea adeziunii celulare și proliferării acestora.

Material și metode. Materiale utilizate pentru obținerea spongiei hibride collagen/chitosan au fost tendoane de bovină care după mărunțire au fost prelucrate cu soluție de 0,05M de Na_2HPO_4 timp de 4 zile, după care s-a supus procesului de digestie enzimatică cu pepsină în cantitate de 100 mg/gram tendon cu acid acetic EDTA timp de 24 de ore la 4°C. Apoi collagenul obținut se purifică prin precipitarea cu 1,8M NaCl, după care se dizolvă cu acid acetic și se dializează în săculețe cu dimensiunile porilor de 12000 Da (Sigma) într-un volum mare de soluție de 0,02M Na_2HPO_4 până pH-ul soluției de collagen devine neutru sau slab bazic, apoi acesta se îngheață la -60°C și se lasă la dezghețat la temperatura camerei. Collagenul se separă de restul lichidului prin centrifugare la 1000 g timp de 10 min. Collagenul obținut se dizolvă cu acid acetic până la concentrația de 1%, apoi se liofilizează (EVD-12; Unicryo MCL-60). Spongia obținută se tratează timp de 24 de ore cu soluție chitosan de 0,25%. Apoi se spală cu apă distilată pe vibrator (Leleux, Laborwelt, V7032) cu schimbarea apei. După care spongia cu chitosan se usucă prin liofilizare și ulterior reticulează la temperatura camerei în aburi de glutaraldehidă de 12,5% (SERVA) timp de 24 ore.

Rezultate. Dimensiunile porilor în cazul spongiei collagenice variază între 50 și 200 μ , iar în cazul spongiilor hibride dimensiunile porilor variază între 30 și 100 μ .

Concluzii. Tehnică de obținere a matricei hibride din collagen este una efectivă. Structura microscopică și dimensiunile spongiei permit de a fi utilizată pentru suplinirea unor defecte de țesuturi, cât și utilizarea pentru ingineria tisulară.

Cuvinte cheie: collagen, chitosan, hibrid, spongie

CELL SCAFFOLD FOR TISSUE ENGINEERING

COBZAC V, JIAN M, CROITOR G, NACU V

Laboratory of tissue engineering and cells cultures, SMPPhU “Nicolae Testemitsanu”, Chisinau, Republica of Moldova

Purpose. To obtain a three-dimensional collagen type I/chitosan scaffold for seeding the cells cultured *in vitro*, and promotion of cell adhesion and proliferation.

Materials and methods. Materials used to obtain a collagen I/chitosan hybrid scaffold were bovine tendons that after mincing have been processed with 0,05M Na_2HPO_4 solution for 4 days, followed by enzymatic digestion with pepsin 100 mg per 1gr. of tendon, EDTA and acetic acid for 24 hours at 4°C. Then collagen was purified by precipitation with 1.8 M NaCl, followed by acetic acid dissolution and dialysis in bags with 12000 Da pore size by a large volume of 0.02 M Na_2HPO_4 solution, until pH of collagen solution become neutral or weak base, then it was frozen at -60 °C and allowed to thaw at room temperature. Collagen is separated from the remaining liquid by centrifugation at 1000 g for 10 min. The obtained collagen is dissolved with acetic acid to a concentration of 1%, then freeze-dried (EVD-12; Unicryo MCL-60). Obtained sponge was treated with 0.25% chitosan solution for 24 hours, then washed with distilled water on a vibrator, frequently changing the water. After that the collagen/chitosan sponge is freeze-dried and cross-linked at room temperature in a vapor chamber with 12.5% glutaraldehyde (SERVA) for 24 hours.

Results. Pore size in native collagen sponge varies between 50 and 200 μ , but in the case of hybrid collagen/

chitosan sponge, pore size varies between 30 and 100 μ .

Conclusion. The obtaining method of a hybrid collagen/chitosan scaffold for cell seeding is effective. The sponge size and microscopic structure allow its utilisation in filling tissue defects and tissue engineering.

Keywords: collagen, chitosan, hybrid, sponge.

CULTIVAREA DE CONDROCITE AUTOLOGE PENTRU TERAPIA CELULARĂ



COBZAC V, JIAN M, CROITOR G, NACU V

Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare, USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova

Scop. Izolarea condrocitelor din cartilaj hialin și expansionarea acestora în culturi celulare pentru transplantarea ulterioară în defectul de cartilaj.

Material și metode. Studiul s-a efectuat pe 9 iepuri de rasa neozeelandeză de 6 luni. În condiții sterile s-a prelevat cartilajul hialin de la nivelul regiunii neportante a articulației genunchiului, după care s-a tratat cu tripsină-EDTA de 0,25% timp de 30 min, apoi cu colagenază de 0,6% timp de 6 ore. Celulele au fost cultivate în flacoane de cultură celulară a câte 10000 \pm 500 cel/cm² în mediu de nutriție DMEM cu 10% FBS în incubator cu 5% CO₂ la temperatura de 37°C. Celulele s-au expansionat în culturi până la o confluență de 80%, timp de 21 de zile. Numărarea celulelor s-a efectuat cu hemocitometru. Condrocitele s-au colorat cu Safranin O și albastru de tuloidină/fast green.

Rezultate. Din aproximativ 50 \pm 10 mg de cartilaj prelevat s-au izolat 4x10⁵ \pm 5x10⁴ celule. La colorarea condrocitelor cu Safranin O, nucleii celulelor erau de culoare întunecată, citoplasma sur-verzuie, iar mucina și cartilajul oranj spre roșu. La colorarea cu albastru de tuloidină/fast green nucleii au apărut de culoare albastru închis, cartilajul albastru-violet intens iar fundalul verde.

Concluzii. Metoda de izolare a condrocitelor din cartilaj hialin este una eficientă și a fost confirmată prin intermediul colorării celulelor *in vitro* cu Safranin O și albastru de tuloidină/fast green. În continuare este necesară implantarea *in vitro* a condrocitelor pe suport tridimensional și transplantarea lor în defectul osteocondral.

Cuvinte cheie: condrocite, cartilaj, obținere

AUTOLOGOUS CHONDROCYTE CULTURE FOR CELL THERAPY

COBZAC V, JIAN M, CROITOR G, NACU V

Laboratory of tissue engineering and cells cultures, SMPPhU “Nicolae Testemitsanu”, Chisinau, Republic of Moldova

Purpose. Isolation of chondrocytes from articular hyaline cartilage and their expansion in cell cultures for further transplantation in a cartilage defect.

Materials and methods. The study was performed on 9 New Zealand White rabbit 6 months old. Under sterile conditions, slices of hyaline cartilage were harvested from unbearing area of knee joint, followed by 0,25% tripsină-EDTA treatment for 30 min and 0,6% collagenase for 6 hours. The cells were cultivated in cell culture flasks by 10000 \pm 500 cell/cm² and incubated at 37 ° C with 5% CO₂ in DMEM with 10% FBS. The cells were expanded in culture up to 21 days to a confluence of 80%. The cells were counted by a hemocytometer. The chondrocytes were stained with Safranin O and toluidine blue/fast green.

Results. From approximately 50 \pm 10 mg of cartilage were isolated 4x10⁵ \pm 5x10⁴ cells. At staining chondrocytes with Safranin O, the nuclei were black, the cytoplasm gray-green and and cartilage, mucin were orange to red. At staining chondrocytes with toluidine blue/fast green, the nuclei appeared dark blue, the cartilage blue, deep purple and background green.

Conclusion. The method of chondrocytes isolation from hyaline cartilage is efficient and it was confirmed by *in vitro* cell staining with Safranin O and toluidine blue/fast green. Our further purpose is implantation *in vitro* of expanded chondrocytes on tridimensional scaffold and their transplantation in an osteochondral defect.

Keywords: chondrocyte, isolation, hyaline, cartilage