**Technical paper**

**Preparation of TGF-beta1/affinity-bound alginate macroporous scaffolds**

**Abstract**

Spatio-temporal presentation of growth factors is one of the key attributes of the cell's microenvironment. The design of macroporous alginate scaffolds, wherein TGF-1 or BMP-4 is electrostatically bound to affinity binding sites of alginate sulfate, mimicking their presentation by the extracellular matrix (ECM), was previously shown to enable sustained presentation and release of eachfactor, thus increasing their biological activity. Specifically, TGF-1/affinity-bound scaffolds induced the chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs) seeded within thesescaffolds. The prolonged activity of the affinity-bound TGF-1 enabled efficient induction of signaling pathways leading to chondrogenesis, up to the appearance of committed chondrocytes. Similarly, BMP-4 affinity-bound to the macroporous alginate scaffold enabled efficient induction of osteogenic differentiation in hMSC constructs. Subsequent construction of a multicompartment inductive system, spatially-presenting TGF-1 and BMP-4 in two distinct layers, enabled complete differentiation of hMSC to chondrocytes and osteoblasts, depending on the type of factor in use in the respective layer.

This paper describes in detail the preparation method of the TGF-1 or BMP4/ affinity-bound alginate scaffolds, and the set of analyses performed to characterize the resultant scaffolds, including release profile study, released factor bioactivity, and functionality of the scaffolds as hMSC-inductive scaffolds.

**Keywords:** alginate, alginate-sulfate, macroporousscaffold, TGF-1, affinity binding, protocol.

**Procedura za dobijanje alginatnih makroporoznih nosača sa afinitetno vezanim faktorom rasta TGF-beta1**

Izvod

Prostorno-vremenska raspodela faktora rasta je jedna od ključnih karakteristika ćelijskog mikro-okruženja. U ranijim istraživanjima su dobijeni makroporozni alginatni nosači sa elektrostatički vezanim faktorima rasta TGF-1 ili BMP-4 za afinitetna vezivna mesta alginat-sulfata, imitirajući na taj način, njihovu raspodelu u ekstracelularnom matriksu. Pokazano je da su ovi nosači omogućili neprekidno prisustvo i otpuštanje svakog od faktora rasta povećavajući tako i njihovu biološku aktivnost. Posebno, nosači sa vezanim faktorom rasta TGF-1 su podstakli hondrogenu diferencijaciju humanih mezenhimskih matičnih ćelija (engl. human mesenchymal stem cells, hMSC) gajenih unutar nosača. Produženo dejstvo vezanog faktora rasta je omogućilo efikasnu aktivaciju signalnih puteva koji dovode do hondrogeneze, sve do pojave zrelih diferentovanih hondrocita. Na sličan način su makroporozni alginatni nosači sa vezanim faktorom rasta BMP-4 omogućili diferentovanje istih matičnih ćelija hMSC u pravcu osteogeneze. Najzad, u višefaznom sistemu koji je sadržao TGF-1 i BMP-4 u dva odvojena sloja omogućeno je potpuno diferentovanje ispitivanih matičnih ćelija hMSC u hondrocite odnosno osteoblaste u zavisnosti of prisustva faktora rasta u datom sloju. U ovom radu, detaljno je opisan metod pripreme alginatnih nosača sa vezanim faktorima rasta TGF-1 odnosno BMP-4, kao i serija analiza za karakterizaciju dobijenih nosača uključujući ispitivanja kinetike otpuštanja, bioaktivnosti otpuštenih faktora rasta i funkcionalnosti nosača za podsticanje diferentovanja humanih mezenhimskih matičnih ćelija.

Ključne reči: alginat, alginat-sulfat, makroporozni nosač, TGF-1, afinitetno vezivanje, procedura.