



УДК 571.27

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ГЕПАРИН-КОНЬЮГИРОВАННОГО ФИБРИНОВОГО ГИДРОГЕЛЯ С ИНКАПСУЛИРОВАННЫМИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ И ФАКТОРАМИ РОСТА

Сарсенова М.А.^{1,2}, Исабекова А.С.¹, Каржауов М.Р.¹, Кудайберген Г.К.¹,
Жунусова М.С.¹, Огай В.Б.¹

¹Национальный центр биотехнологии,

Кургальжинское шоссе, 13/5, Нур-Султан, 010000, Казахстан

²Назарбаев Университет, кафедра медицины медицинского факультета

ул. Керей, Жанибек хандар, 5/1, Нур-Султан, 010000, Казахстан

ogay@biocenter.kz

АБСТРАКТ

В настоящее время основным направлением в регенеративной медицине является разработка и внедрение в практику композитных биоматериалов с хондро- и остеоиндуктивными свойствами, в состав которых входят стволовые клетки человека, а также факторы роста. Гепарин-конъюгированный фибриноген был получен с помощью карбодимидного метода, который использовался для создания гепарин-конъюгированных фибриновых гидрогелей (ГКФГ). В результате данной работы были получены два вида ГКФГ: гидрогель с инкапсулированными мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) и гидрогель с факторами роста TGF- β 1 и BMP-4. В работе было обнаружено, что синовиальные МСК сохраняют свою жизнеспособность после инкапсуляции в ГКФГ, что указывает на то, что полученный гидрогель является биосовместимым и не токсичным для клеток. Результаты иммуноферментного анализа по кинетике высвобождения BMP-4 и TGF- β 1 из ГКФГ показали, что полученный гидрогель способен удерживать BMP-4 и TGF- β 1, и значительно медленнее высвобождать их в фосфатный буфер по сравнению с фибриновым гидрогелем.

Ключевые слова: гепарин-конъюгированный фибриновый гидрогель, мезенхимальные стволовые клетки, факторы роста TGF- β 1 и BMP-4.

ВВЕДЕНИЕ

Восстановление обширных и глубоких остеохондральных дефектов коленных и тазобедренных суставов остается одной из сложных и до конца нерешенных проблем в травматологии и ортопедии [1]. В настоящее время большие надежды в регенерации глубоких остеохондральных дефектов обоснованно связывают с применением тканевой инженерии для восстановления структурно-функциональных характеристик поврежденных суставов с использованием стволовых клеток, ростовых факторов и природных биополимеров или скаффолдов. Перспективным клеточным компонентом для тканевой инженерии хряща являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК), которые находятся практически во всех органах и тканях. МСК отличаются относительной простотой выделения и культивирования, способностью пролиферировать в течение длительного времени *in vitro* и дифференцироваться в различные типы специализированных клеток, такие как хондроциты и остеобласты, а также активно участвовать в регенерации поврежденных органов и тканей, в частности хряща. Для того чтобы индуцировать дифференцировку МСК в хондроциты, необходимы соответствующие сигнальные молекулы или ростовые факторы. Одним из таких ростовых факторов является трансформирующий ростовой фактор 1 (TGF- β 1), который играет центральную роль в хондрогенезе [2, 3]. Культивирование МСК с добавлением TGF- β 1 приводит к подавлению экспрессии гена коллагена I, и в то же время, активирует экспрессию коллагена II, который, как правило, синтезируется в процессе формирования гиалинового хряща. Другими немаловажными факторами, играющими очень важную роль в хондрогенезе и остеогенезе, являются костные морфогенетические белки



(BMP). BMP-4 повышает продукцию агрекана и коллагена II типа, индуцирует начальную дифференцировку МСК в хондробласты, и способствует дифференцировке в зрелые хондроциты. Для доставки ростовых факторов и стволовых клеток в область дефекта хряща используют различные природные скаффолды, такие как коллаген, фибрин, альгинат, желатин, агароза, гиалуронан и хитозан. Для восстановления остеохондральных дефектов скаффолды должны соответствовать следующим требованиям: 1) должны обладать способностью инкорпорировать и постепенно высвобождать ростовые факторы; 2) должны иметь достаточную пористость для миграции клеток; 3) должны быть биodeградируемыми и биосовместимыми; 4) скаффолды должны обеспечивать пролиферацию и дифференцировку инкапсулированных клеток; 5) должны быть просты в приготовлении и малоинвазивными в клиническом применении.

В этом отношении инъекционный гелеобразующий фибриновый гидрогель соответствует вышеперечисленным требованиям. Более того, фибриновый гидрогель, а также фибрин содержащие композиты с инкапсулированными хондроцитами и МСК уже успешно применялись для восстановления хрящевых дефектов [4]. В данной работе мы планируем создать новый инъекционный гепарин-конъюгированный фибриновый гидрогель (ГКФГ), содержащий ростовые факторы (TGF- β 1 и BMP-4) и синовиальные МСК для эффективной регенерации остеохондральных дефектов.

В основе создания ГКФГ лежит технология, предложенная ранее Янг и коллегами [5]. Они разработали инъекционную систему для долгосрочной доставки ростового фактора BMP-2 за счет ковалентного конъюгирования гепарина к фибриногену и показали ее эффективность при регенерации костного дефекта. В нашем исследовании с помощью данной технологии планируется создать аналогичный ГКФГ с двумя рекомбинантными белками TGF- β 1 и BMP-4 и оценить кинетику их высвобождения из гидрогеля. Для повышения эффективности регенерации остеохондральных дефектов, в ГКФГ гидрогель будут инкапсулированы синовиальные МСК, поскольку они обладают наиболее выраженным хондрогенным потенциалом по сравнению с МСК костного мозга, жировой ткани и скелетных мышц [6].

Материалы и методы

Приготовление активированного гепарина. Для получения гепарин-конъюгированного фибриногена, 100 мг гепарина (\sim 5000 Да) полностью растворяли в 1 мл буферного раствора 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (0,05M, pH 6.0). 0,0046 г N-гидроксисукцинимид (NHS) и 0,0153 г N-(3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимид гидрохлорида (EDC) добавляли в раствор после 12-часовой реакции при 4 °C, в результате чего получался NHS-раствор гепарина. NHS-раствор гепарина осаждали с помощью ацетона, после чего лиофилизировали в лиофилизаторе при -20 °C в течение 24 часов.

Конъюгирование активированного гепарина с фибриногеном. Для конъюгации активированного гепарина с фибриногеном, лиофилизированный NHS-раствор гепарина (60 мг) растворяли в 20 мл фосфатно-солевой буфер (PBS, pH 7,4), после чего конъюгировали с фибриногеном (100 мг) в течение 3 часов при 4 °C. После завершения реакции конъюгирования, полученный раствор осаждали с помощью ацетона и лиофилизировали в темной комнате, получая данным способом гепарин-конъюгированный фибриноген (ГКФ). Полученный ГКФ диализировали с помощью диализного мешка (MWCO: 12000-14000 Да) в течение 24 часов при 4 °C. Далее, проводили лиофилизацию в течение 48 часов при -20°C. Полученный после лиофилизации ГКФ анализировали на определение сульфатных связей между гепарином и фибриногеном с помощью ИК-Фурье спектрометра (Nicolet iS5, Thermo Scientific, США).

Получение культур мезенхимальных стволовых клеток. МСК были получены из 5 аутбредных кроликов породы «Великан» возрастом 12-14 недель. Выделение синовиальной оболочки из коленных суставов животных производили под общим калипсоловым наркозом



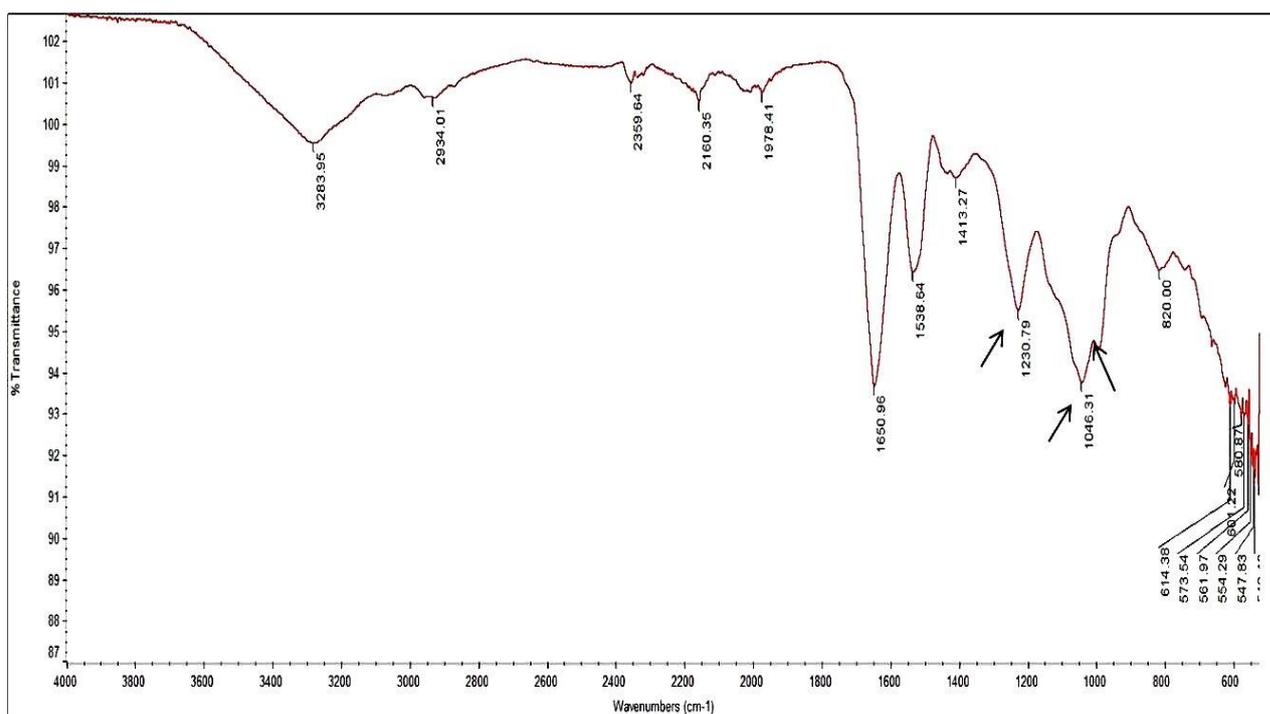
(5 мг/кг внутримышечно). Для выделения клеток, синовиальная оболочка была обработана смесью антибиотиков-антимикотиков (100 Ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В), измельчена на мелкие кусочки (1-2 мм³) и обработана с помощью 0,3% раствора коллагеназы II типа в течение 16 ч при 37 °С. Для удаления оставшихся фрагментов ткани, полученную клеточную суспензию профильтровывали через 70 мкм нейлоновый клеточный фильтр (Becton-Dickenson, USA), ресуспендировали в полной питательной среде DMEM, содержащей 10% FBS, 100 Ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. После подсчета количества клеток в камере Нойбауэра, их культивировали при 37 °С и 5% CO₂. Через 2 дня не прикрепившиеся к пластику клетки удаляли, а фракцию адгезивных клеток культивировали до покрытия клетками 80-90% площади культурального флакона. Пассирование клеток производили с помощью рекомбинантного трипсина TrypLE Express (Life Technologies, UK) с интервалом 5-6 дней. Смена среды в культуре клеток осуществлялась через каждые 2 дня. Для оценки жизнеспособности инкапсулированных МСК в ГКФГ проводили инкубирование с полной питательной средой α -MEM в течение 24, 48 и 72 часов, после чего окрашивали набором красителей определяющие живые и мертвые клетки (Live/Dead assay kit, Life Technologies, USA).

Определение кинетики высвобождения ростовых факторов. Высвобождения ростовых факторов BMP-4 и TGF- β 1 проводили с помощью иммуноферментного анализа. Кинетику высвобождения ростовых факторов BMP-4 и TGF- β 1 из фибриновых гидрогелей проводили с помощью сэндвич ИФА. ГКФГ и фибриновые гидрогели, содержащие по 200 нг/мл BMP-4 и TGF- β 1, были помещены в микроцентрифужные пробирки (2 мл) и инкубировались в 1 мл PBS при 37 °С в термостате при постоянном перемешивании на вортексе. Через каждые 24 часа инкубирования, супернатант собирали и заливали 1 мл свежего PBS. Количество высвобожденных BMP-4 и TGF- β 1 из ГКФГ и фибриновых гидрогелей определяли с помощью коммерческих ИФА наборов (Sigma, USA).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Результаты статистической обработки экспериментальных данных представлены в виде графиков с указанием величины среднего квадратичного отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

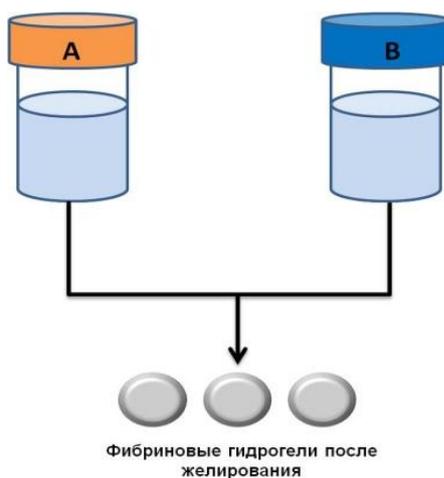
Получение гепарин-конъюгированного фибринового гидрогеля. Для получения гепарин-конъюгированного фибринового гидрогеля (ГКФГ), на первом этапе был проведен синтез гепарин-конъюгированного фибриногена (ГКФ) путем ковалентного связывания низкомолекулярного гепарина (~ 5000 Да) с фибриногеном плазмы человека. Чтобы определить, что конъюгация гепарина с фибриногеном прошла успешно, полученный ГКФ был проанализирован с помощью ИК-Фурье спектрометра для обнаружения присутствия сульфоксидных S=O групп. Согласно литературным данным, ИК-спектры сульфоксидов характеризуются интенсивными полосами поглощения в области 980-1225 см⁻¹, которые соответствуют валентным колебаниям сульфоксидной связи S=O [7]. В ИК-спектре полученного нами образца ГКФ обнаружены полосы поглощения при 1000, 1046,31 и 1230,79 см⁻¹, подтверждающие наличие сульфоксидных групп и образование конъюгата гепарина и фибриногена (рисунок 1).



Черными стрелками отмечены полосы поглощения, соответствующие ассиметричным и симметричным валентным колебаниям S=O сульфатных групп гепарина конъюгированного с фибриногеном.

Рис. 1. ИК-Фурье спектр гепарин-конъюгированного фибриногена

На втором этапе исследования по получению гидрогеля, были подготовлены компоненты А и В. Для получения компонента А, 40 мг/мл ГКФ и 40 мг/мл фибриногена растворили в PBS (рН 7,4) при 37 °С в течение 1 часа. Для получения компонента В, 50 Ед./мл тромбина, 250 Ед./мл апротинина и 50 мМ CaCl₂ растворили в PBS (рН 7,4). Все компоненты были простерилизованы фильтрованием через полиэфирсульфоновый мембранный фильтр с диаметром пор 0,45%. Для гелеобразования свежеподготовленные компоненты А и В были смешаны в равном объеме и залиты в микропробирки по 500 мкл (рисунок 2).



А – Пробирка с фибриногеном и ГКФ; **В** – Пробирка с тромбином и апротинином.

Рис. 2. Схема получения гепарин-конъюгированного фибринового гидрогеля

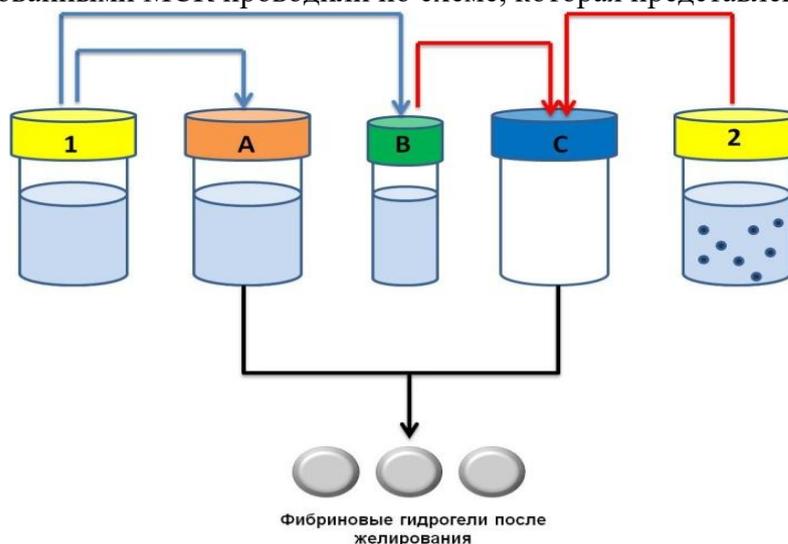
Наблюдения показали, что гелеобразование ГКФГ происходило в течение 2 минут при комнатной температуре. Образцы гепарин-конъюгированных фибриновых гидрогелей показаны на рисунке 3.



Рис. 3. Образцы свежеприготовленных гепарин-конъюгированных фибриновых гидрогелей

Получение фибринового гидрогеля с инкапсулированными синовиальными МСК.

На следующем этапе исследования были проведены эксперименты по получению гепарин-конъюгированного фибринового гидрогеля с синовиальными МСК кроликов. Приготовление ГКФГ с инкапсулированными МСК проводили по схеме, которая представлена на рисунке 4.



1 - Пробирка с питательной средой или фосфатным буфером, содержащая CaCl_2 ;

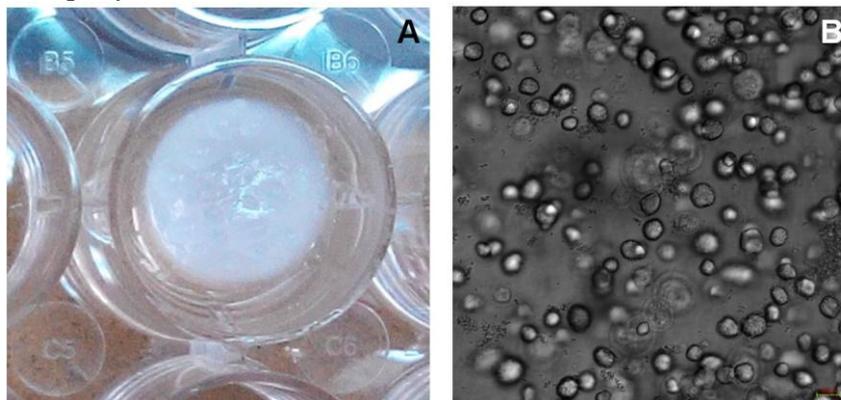
2 - Пробирка с культивируемыми клетками или ростовыми факторами;

А - Пробирка с фибриногеном/ГКФ; В - Пробирка с тромбином и апротинином;

С - пробирка для смешивания раствора тромбина/апротинина с клетками или ростовыми факторами

Рис. 4. Схема получения фибриновых гидрогелей с факторами роста или клетками

Для получения гидрогеля с инкапсулированными клетками, культивируемые синовиальные МСК кроликов в количестве 3×10^5 были смешаны с 50 Ед./мл тромбина и 250 Ед./мл апротинина в объеме 500 мкл. Далее, ГКФ (40 мг/мл) и фибриноген (40 мг/мл) были растворены в питательной среде α -МЕМ (без фенолового красного) и добавлен в равном объеме к раствору, содержащему МСК, тромбин и апротинин. После смешивания всех компонентов, гидрогели с клетками были залиты в лунки 24-луночного культурального планшета. Гелеобразование гидрогелей происходило в течение 2 минут при комнатной температуре (23-24 °С). Результаты получения ГКФГ с инкапсулированными синовиальными МСК представлены на рисунке 5.



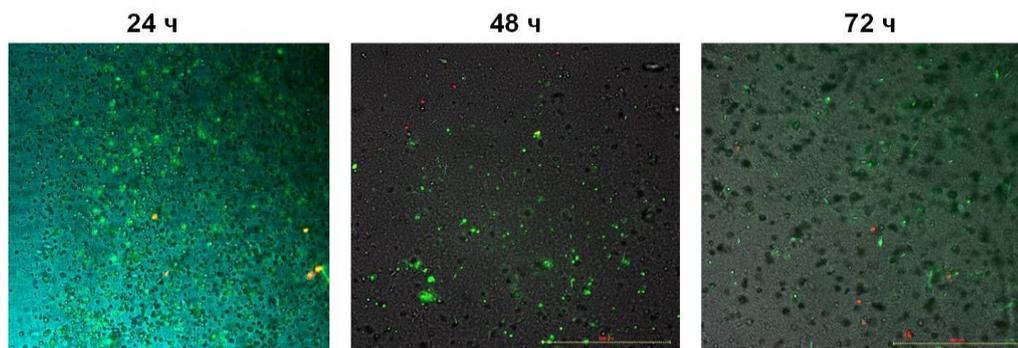
А – Образец гелеобразного ГКФГ с синовиальными МСК кроликов в лунке 24-луночного

культурального планшета; **В** – синовиальные МСК кролика, инкапсулированные в ГКФГ. Снимок получен с помощью конфокального лазерного микроскопа Cell Observer SD (Carl Zeiss, Германия). Увеличение 200×

Рис. 5. Гепарин-конъюгированный фибриновый гидрогель с инкапсулированными МСК кролика

Для того, чтобы оценить жизнеспособность инкапсулированных МСК в ГКФГ проводили инкубирование с полной питательной средой α -МЕМ в течение 24, 48 и 72 часов, после чего окрашивали набором красителей определяющие живые и мертвые клетки (Live/Dead assay kit, Life Technologies, USA). Результаты анализа показали, что большинство инкапсулированных МСК сохраняет жизнеспособность при культивировании в гидрогеле (рисунок 6). Доля мертвых клеток была незначительна. Более того, было обнаружено, что инкапсулированные МСК способны расплываться и пролиферировать в гидрогеле.

Таким образом, данное исследование показало, что полученный ГКФГ является биосовместимым и нетоксичным для инкапсулированных синовиальных МСК.

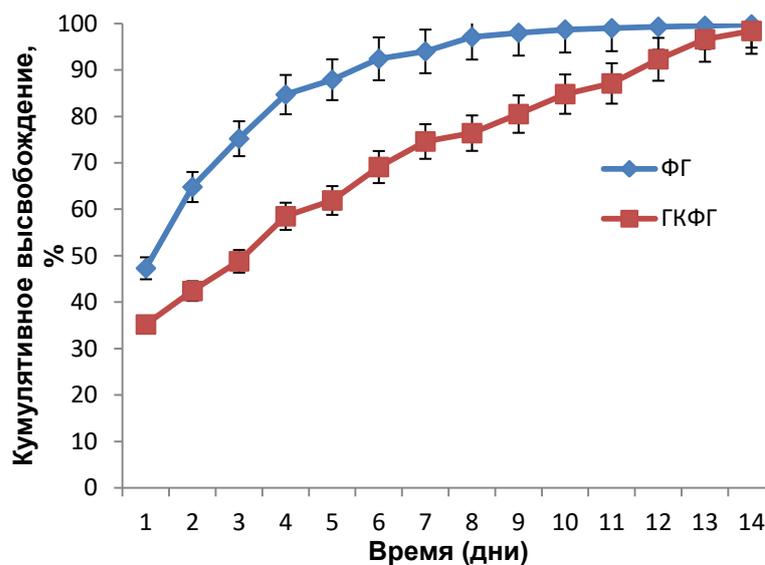


Жизнеспособные клетки (зеленые) окрашены красителем кальцин АМ, мертвые клетки (красные) окрашены бромистым этидиумом. Снимки получены с помощью конфокального лазерного микроскопа (Cell Observer SD, Carl Zeiss, Германия). Увеличение 50×

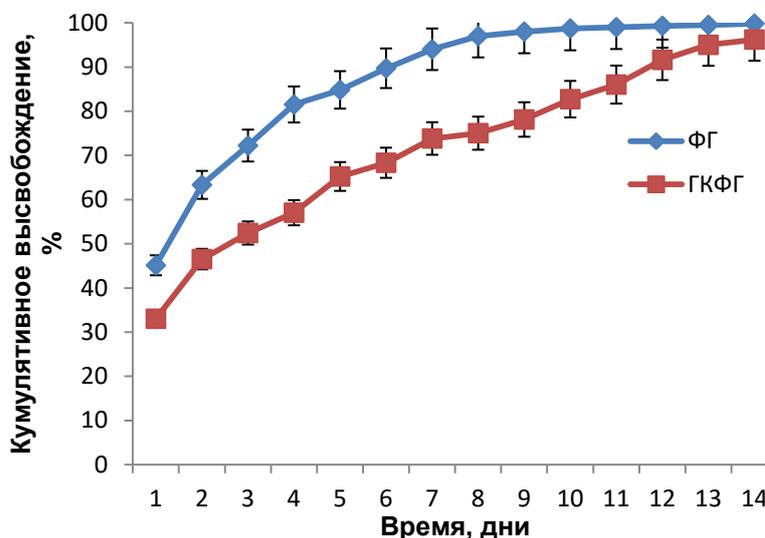
Рис. 6. Жизнеспособность МСК кроликов инкапсулированных в ГКФГ

Получение фибринового гидрогеля, содержащего ростовые факторы, и определение кинетики их высвобождения. На следующем этапе исследования были проведены эксперименты по получению ГКФГ с ростовыми факторами TGF- β 1 и BMP-4. ГКФГ были получены путем смешивания раствора, содержащий ГКФ (40 мг/мл), фибриноген (40 мг/мл) и 200 нг/мл ростовых факторов BMP-4 и TGF- β 1, с раствором, содержащим 50 мМ CaCl₂, 50 Ед./мл тромбина и 250 Ед./мл апротинина. В качестве контроля для сравнения использовали фибриновые гидрогели, для приготовления которых использовался только фибриноген.

Кинетику высвобождения ростовых факторов BMP-4 и TGF- β 1 из фибриновых и гепарин-конъюгированных фибриновых гидрогелей проводили в течение 14 дней с помощью коммерческих наборов ИФА. Результаты ИФА представлены на рисунках 7 и 8.



ФГ - фибриновый гидрогель; ГКФГ - гепарин-конъюгированный фибриновый гидрогель
Рис. 7. Кинетика высвобождения ростового фактора BMP-4 из фибриновых гидрогелей



ФГ - фибриновый гидрогель; ГКФГ - гепарин-конъюгированный фибриновый гидрогель
Рис. 8. Кинетика высвобождения ростового фактора TGF-β1 из фибриновых гидрогелей

Данные результатов ИФА свидетельствуют, что в фибриновом гидрогеле высвобождение факторов роста BMP-4 и TGF-β1 происходило достаточно быстро и уже в первые 24 часа, в среднем, составила 47,3% и 45,1%, соответственно. В тоже время, высвобождение ростовых факторов BMP-4 и TGF-β1 из ГКФГ было – 30,2% и 32,5%, соответственно. В течение 6 дней инкубирования было высвобождено 92,4% BMP-4 и 89,7% TGF-β1 из фибринового гидрогеля. Напротив, из ГКФГ выход факторов происходил значительно медленно, на 6 день было отмечено 69,1% BMP-4 и 68,3% TGF-β1. Практически полное высвобождение ростовых факторов из фибринового гидрогеля наблюдалось на 8 день инкубации, тогда как, из ГКФГ полное высвобождение было отмечено на 13 день.

Таким образом, данные по кинетике высвобождения BMP-4 и TGF-β1 из ГКФГ указывают на то, что полученный гидрогель способен удерживать гепарин-связывающие белки BMP-4 и TGF-β1 и значительно медленнее высвобождать их в фосфатный буфер.



ОБСУЖДЕНИЕ

Для лечения остеохондральных дефектов применяются хирургические методы, направленные на стимуляцию регенерации хрящевой ткани в поврежденном суставе такие как, множественные микроперфорации суставной поверхности, мозаичная хондропластика, абразия и микропереломы. Однако, как показала клиническая практика, они не могут обеспечить полного и устойчивого восстановления суставного гиалинового хряща. Поэтому в последнее время большие надежды в регенерации глубоких остеохондральных дефектов обоснованно связывают с применением тканевой инженерии для восстановления структурно-функциональных характеристик поврежденных суставов с использованием стволовых клеток, ростовых факторов и природных биополимеров или скаффолдов.

Мы решили использовать природный гидрогель – фибрин, который образуется в результате взаимодействия фибриногена и тромбина. Все эти белки относятся к плазме крови человека. Фибриновый гидрогель имеет ряд преимуществ: 1) прост в приготовлении, 2) биосовместим, 3) после нанесения гелеобразуется и закрывает все дефекты раневой области. В настоящее время фибриновый гидрогель, или герметик, широко применяется в зарубежных клиниках для закрытия различных хирургических ран. В нашей работе для того, чтобы можно было использовать фибриновый гидрогель как для доставки стволовых клеток, так и для ростовых факторов, были проведены эксперименты по модификации фибринового гидрогеля. Для этого, с помощью карбодииmidного химического метода был получен гепарин-конъюгированный фибриноген (ГКФ), содержащий большое количество отрицательно заряженных групп $-\text{CH}_2\text{OSO}_3^-$, $-\text{NHSO}_3^-$, $-\text{OSO}_3^-$ в которых присутствуют сульфоксидные связи $\text{S}=\text{O}$. Использование гепарина для конъюгации с фибриногеном было обусловлено тем, что гепарин является сильно сульфатированным, анионным полисахаридом, состоящим из повторяющихся гликозаминовых и уроновых кислотных остатков, что обуславливает его антикоагулянтные свойства. Благодаря наличию значительного количества отрицательно заряженных сульфатных и карбоксильных групп, молекула гепарина представляет собой сильный природный полианион, способный к образованию комплексов со многими белковыми и синтетическими соединениями поликатионной природы, несущими суммарный положительный заряд [8, 9]. В связи с этим сульфатные группы гепарина могут взаимодействовать с рядом ростовых факторов такие как, костные морфогенетические белки (BMP), факторы роста фибробластов (FGF) и трансформирующие ростовые факторы (TGF), образуя сильные полианионные комплексы [10, 11]. Данные комплексы формируют стабильную форму, обеспечивая защиту гепарин-связывающих белков от протеолитической деградации, длительную сохранность их биологической активности и замедленное высвобождение факторов роста из гидрогеля [12, 13, 14].

Таким образом, учитывая литературные данные, мы получили гепарин-конъюгированный фибриновый гидрогель (ГКФГ) путем смешивания ГКФ (40 мг/мл), фибриногена (40 мг/мл), тромбина (50 Ед./мл), апротинина (250 Ед./мл) и 50 мМ CaCl_2 , как было показано на рисунках 7 и 9. Мы обнаружили, что после смешивания всех компонентов гидрогеля его полное гелеобразование наступало в течение 2 минут при комнатной температуре. Мы считаем, что за это время достаточно перенести весь объем ГКФГ в область дефекта без риска его гелеобразования в шприце или пипетке для переноса.

Для получения ГКФГ с ростовыми факторами мы использовали два гепарин-связывающих белка TGF- β 1 и BMP-4 в концентрации 200 нг/мл. Выбор этих двух факторов был обусловлен тем, что TGF- β 1 и BMP-4 являются хондроиндуктивными и остеоиндуктивными белками, которые играют важную роль в образовании новой хрящевой и костной ткани. Чтобы определить, что полученный ГКФГ способен контролировать выход TGF- β 1 и BMP-4 из гидрогеля, был проведен ИФА. Результаты ИФА по кинетике высвобождения BMP-4 и TGF- β 1 из ГКФГ показали, что полученный гидрогель способен удерживать BMP-4 и TGF- β 1 и значительно медленнее высвобождать их в фосфатный буфер



по сравнению фибриновым гидрогелем. Кроме ГКФГ с ростовыми факторами в данной работе мы получили ГКФГ с МСК синовиальной оболочки кролика и показали, что синовиальные МСК сохраняют свою жизнеспособность после инкапсуляции в ГКФГ, что указывает на то, что полученный гидрогель является биосовместимым и нетоксичным для клеток.

Таким образом, в данном исследовании была проделана большая работа по получению ГКФ, который является ключевым компонентом для создания ГКФГ. В результате были получены ГКФГ с инкапсулированными синовиальными МСК и ГКФГ с факторами роста BMP-4 и TGF- β 1, которые планируется испытать в доклинических и клинических исследованиях.

Финансирование

Данное исследование выполнено в рамках научно-технической программы OR11465426 «Внедрение инновационных тканеинженерных технологий в медицинскую практику для восстановления поврежденных суставов» и гранта AP09259357 «Разработка инъекционного гидрогеля для эффективной регенерации массивных костных дефектов», финансируемых Министерством образования и науки Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

1. Newman A.P. Articular cartilage repair // American Journal of Sports Medicine. - 1998. - Vol. 26, № 2. - P. 309-24.
2. Serra R., Johnson M., Filvaroff E.H., LaBorde J., Sheehan D.M., Derynck R., Moses H.L. Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis // Journal of Cell Biology. - 1997. - Vol. 139, № 2. - P. 541-552.
3. Dünker N., Schmitt K., Krieglstein K. TGF-beta is required for programmed cell death in interdigital webs of the developing mouse limb // Mechanism of Development. - 2002. - Vol. 113, № 2. - P. 111-120.
4. Ahmed T.A., Giulivi A., Griffith M., Hincke M. Fibrin glues in combination with mesenchymal stem cells to develop a tissue-engineered cartilage substitute // Tissue Engineering Part A. - 2011. - Vol.17, № 3-4. - P. 323-335.
5. Yang H.S., La W.G., Bhang S.H., Jeon J.Y., Lee J.H. Heparin-conjugated fibrin as an injectable system for sustained delivery of bone morphogenetic protein-2 // Tissue Engineering Part A. - 2010. - Vol. 16, № 4. - P. 1225-33.
6. De Bari C. F., dell'Accio P., Tylzanowski F.P., Luyten. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane // Arthritis Rheum. -2001. - Vol. 44. - P. 1928.
7. Преч Э., Бюльманн Ф., Аффольтер К. Определение строения органических соединений. Таблицы спектральных данных / Пер. с англ. Б. Н. Тарасевича. - Бином. Лаборатория знаний, 2006. - С. 251-318.
8. Samara J.E., Satterfield M.B., Nelson B.C. Quantitative determination of disaccharide content in digested unfragmented heparin and low molecular weight heparin by direct-infusion electrospray mass spectrometry // Pharm Biomed Anal. - 2007. - Vol. 43. - P. 1706-14.
9. Chung Y.I., Tae G., Yuk S.H. A facile method to prepare heparin-functionalized nanoparticles for controlled release of growth factors // Biomaterials. - 2006. - Vol. 27 - P. 2621-2626.
10. Sundaram M., Qi Y., Shriver Z., Liu D., Zhao G., Venkataraman G. et al. Rational design of low-molecular weight heparins with improved in vivo activity // Proc Natl Acad Sci USA - 2003. - Vol. 100 - P. 651-6.



11. Kim T.H., Ihm J.E., Choi Y.J., Nah J.W., Cho C.S. Development of fibrin derivatives for controlled release of heparin-binding growth factors // *J Control Release*. - 2000. - Vol. 65. - P. 389-402.
12. Ricard-Blum S., Feraud O., Lortat-Jacob H., Rencurosi A., Fukai N., Dkhissi F. Characterization of endostatin binding to heparin and heparan sulfate by surface plasmon resonance and molecular modeling: role of divalent cations // *J Biol Chem*. - 2004. - Vol. 279. - P.2927-2936.
13. Sakiyama-Elbert S.E., Hubbell J.A. Development of fibrin derivatives for controlled release of heparin-binding growth factors // *J Control Release*. - 2000. - Vol. 65. - P. 389-402.
14. Saksela O., Moscatelli D., Sommer A., Rifkin D.B. Endothelial cell-derived heparin sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation // *J Cell Biol*. - 1988. - Vol. 107 - P. 743-751.

REFERENCES

1. Newman A. Articular cartilage repair. *American Journal of Sports Medicine*, 1998, vol. 26 no. 2, pp. 309-324. <https://doi.org/10.1177/03635465980260022701>
2. Serra R., Johnson M., Filvaroff E.H., et al. Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *Journal of Cell Biology*, 1997, vol. 139 no. 2, pp. 541-552. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.2.541>
3. Dünker N., Schmitt K., Krieglstein K. TGF-beta is required for programmed cell death in interdigital webs of the developing mouse limb. *Mechanisms of Development*, 2002, vol. 113, no. 2, pp. 111-120. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(02\)00015-1](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(02)00015-1)
4. Ahmed T., Giulivi A., Griffith M., et al. Fibrin glues in combination with mesenchymal stem cells to develop a tissue-engineered cartilage substitute. *Tissue Engineering. Part A*, 2011, vol. 17, no. 3-4, pp. 323-335. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0773>
5. Yang H.S., La W.G., Bhang S.H., et al. Heparin-conjugated fibrin as an injectable system for sustained delivery of bone morphogenetic protein-2. *Tissue Engineering. Part A*, 2010, vol. 16 no. 4, pp. 1225-1233. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0390>
6. De Bari C., Dell'Accio F., Tylzanowski P., et al. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and Rheumatism*, 2001, vol.44, no. 8, pp. 1928-1942. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200108\)44:8<1928::AID-ART331>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200108)44:8<1928::AID-ART331>3.0.CO;2-P)
7. Prech E., Byul'mann F., Affol'ter K. Opredelenie stroeniya organicheskikh soedinenij. Tablicy spektral'nyh dannyh / Per. s angl. B. N. Tarasevicha. - Binom. Laboratoriya znaniy, 2006, S. 251-318.
8. Camara J., Satterfield M., Nelson B. Quantitative determination of disaccharide content in digested unfragmented heparin and low molecular weight heparin by direct-infusion electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, vol. 43, no. 5, pp. 1706-1714. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.01.006>
9. Chung Y.I., Tae G., Hong Y.S. A facile method to prepare heparin-functionalized nanoparticles for controlled release of growth factors. *Biomaterials*, 2006, vol. 27, no. 12, pp. 2621-2626. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.11.043>
10. Sundaram M., Qi Y., Shriver Z., Liu, et al. 2003. Rational design of low-molecular weight heparins with improved in vivo activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, vol. 100, no. 2, pp. 651-656. <https://doi.org/10.1073/pnas.252643299>
11. Sakiyama-Elbert S., Hubbell J. Development of fibrin derivatives for controlled release of heparin-binding growth factors. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 2000, vol. 65, no. 3, pp. 389-402. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(99\)00221-7](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(99)00221-7)
12. Ricard-Blum S., Féraud O., Lortat-Jacob H., et al. Characterization of endostatin binding to heparin and heparan sulfate by surface plasmon resonance and molecular modeling: role



of divalent cations. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, vol. 279 no. 4, pp. 2927-2936.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M309868200>

13. Saksela O., Moscatelli D., Sommer A., et al. Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *Journal of Cell Biology*, 1998, vol. 107, no. 2, pp. 743-751. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.2.743>

ИНКАПСУЛЯЦИЯЛАНҒАН МЕЗЕНХИМАЛЫҚ БАҒАНАЛЫ ЖАСУШАЛЫ ЖӘНЕ ӨСУ ФАКТОРЛЫ ГЕПАРИНМЕН БАЙЛАНЫСҚАН ФИБРИН ГИДРОГЕЛІН АЛУ ЖӘНЕ ОНЫҢ СИПАТТАМАСЫ

Сәрсенова М.А.^{1,2}, Исабекова А.С.¹, Каржауов М.Р.¹, Кудайберген Г.К.¹,
Жунусова М.С.¹, Огай В.Б.¹

Ұлттық биотехнология орталығы,

Қорғалжын тас жолы, 13/5, Нұр-Сұлтан, 010000, Қазақстан

² Назарбаев Университеті, медицина факультетінің медицина кафедрасы

Керей, Жәнібек хандар көш., 5/1, Нұр-Сұлтан, 010000, Қазақстан

ogay@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Қазіргі уақытта регенеративті медицинаның негізгі бағыты хондро- және остеоиндуктивті қасиеттері бар композиттік биоматериалдарды әзірлеу және практикаға енгізу. Олардың құрамына адамның дінгек жасушалары, сондай-ақ өсу факторлары кіреді. Гепаринмен байланысқан фибриноген карбодимид әдісімен алынды, ол гепаринмен байланысқан фибрин гидрогельдерін (ГБФГ) жасау үшін қолданылды. Осы жұмыстың нәтижесінде ГБФГ екі түрі алынды: капсулаланған мезенхималық бағаналы жасушалы (МБЖ) гидрогель және TGF- β 1 мен BMP-4 өсу факторларымен гидрогель. Зерттеу нәтижесінде синовиалды МБЖ-лар ГБФГ-да инкапсуляцияланғаннан кейін өміршеңдігін сақтайтыны анықталды, бұл алынған гидрогель жасушалар үшін биологиялық үйлесімді және улы емес екендігін көрсетеді. ГБФГ-дан BMP-4 және TGF- β 1 шығарылу кинетикасы бойынша иммуно-ферментті талдаудың нәтижелері алынған гидрогель, BMP-4 пен TGF- β 1 фибрин гидрогеліне қарағанда фосфат буферіне әлдеқайда баяу шығаратындығын көрсетті.

Негізгі сөздер: гепаринмен байланысқан фибрин гидрогелі, мезенхималық бағаналы жасушалар, TGF- β 1 және BMP-4 өсу факторлары.

The Development And Characterization Of Heparin-Conjugated Fibrin Hydrogel With Incapsulated Mesenchimal Stem Cells And Growth Factors

Sarsenova M.A.^{1,2}, Issabekova A.S.¹, Karzhauov M.R.¹, Kudaibergen G.K.¹,
Zhunussova M.S.¹, Ogay V.B.¹

¹ National Center for Biotechnology,

Kurgalzhin road, 13/5, Nur-Sultan, 010000, Kazakhstan

² Department of Medicine, School of Medicine, Nazarbayev University

5/1, Kerey, Zhanibek Handar str., Nur-Sultan, 010000, Kazakhstan

ogay@biocenter.kz

ABSTRACT

Currently, one of the major focuses in regenerative medicine is the development and implementation into practice of composite biomaterials with chondro- and osteoinductive properties, which include human stem cells



and growth factors. Heparin-conjugated fibrinogen was obtained using the carbodiimide method, which was further used to create heparin-conjugated fibrin hydrogels (HCFH). As a result of this work, two types of HCFH were obtained: a hydrogel with encapsulated mesenchymal stem cells (MSC) and a hydrogel with TGF- β 1 and BMP-4 growth factors. It has been found that synovial MSCs retain viability after encapsulation in HCFH, which indicates that the developed hydrogel is biocompatible and does not have toxic effect to the cells. The results of enzyme-linked immunosorbent assay on the kinetics of BMP-4 and TGF- β 1 release from HCFH showed that the developed hydrogel is able to retain BMP-4 and TGF- β 1. The kinetics of release from HCFH into phosphate buffer was significantly slower compared to fibrin hydrogel.

Key words: heparin-conjugated fibrin hydrogel, mesenchymal stem cells, growth factors TGF- β 1 and BMP-4.