

Vplyv prídavku medu na vlastnosti kalcium fosfátových biocementov -výsledky in vitro testovania

APVV 20-0184 Kompozitné biomateriály s komplexnými prírodnými aditívami

Medvecký, L.; Giretova, M.; Stulajterova, R.; Sopcak, T.; Jevinova, P.; Luptakova, L.

Novel Biocement/Honey Composites for Bone Regenerative Medicine. J. Funct. Biomater. 2023, 14, 457.

Kompozitný biocement

Kalcium fosfátový biocement

Kvapalná zložka
s medom



Ako ovplyvňuje tuhnutie kompozitu?

Aký je vplyv na mikroštruktúru?

Menia sa mechanické vlastnosti?

Zlepšujú sa antioxidačné vlastnosti?

Zvyšuje sa osteogénny potenciál?

Ako sa uvoľňujú základné komponenty medu z kompozitu?

Aký je vplyv na cytotoxicitu?

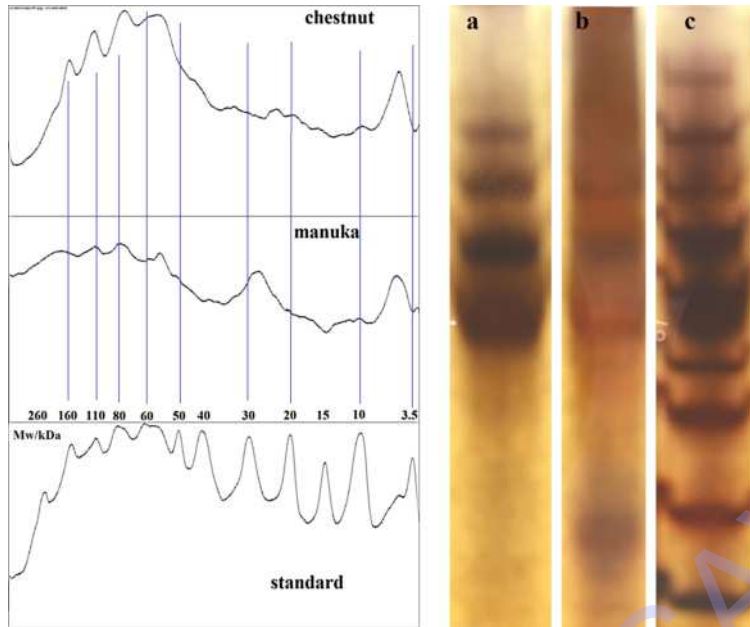
Pozoruje sa vplyv na antibakteriálne vlastnosti extraktov?

Table 2. Contents of the main polyphenols and flavonoids in the honeys (determined via HPLC method).

Polyphenols	Chestnut [µg/g of Honey]	Manuka [µg/g of Honey]
Luteolin	8.2 ± 1	3.9 ± 1
Chrysin	55.6 ± 6	26.1 ± 3
Gallic acid	44.8 ± 7	46.4 ± 6
Kaempferol	18.1 ± 2	6.9 ± 1
3,4,5-trimethoxybenzoic acid	26.3 ± 3	10.4 ± 1
Chlorogenic acid	162.1 ± 11	ND
Rutin	27.5 ± 5	ND
Quercetin	7.5 ± 1	4.3 ± 1
Ferulic acid	26.8 ± 3	12.9 ± 2
Coumaric acid	76.0 ± 6	32.4 ± 2
Syringic acid	37.9 ± 5	16.6 ± 3
Methylsyringate	37.0 ± 4	134.3 ± 12
Caffeic acid	68.2 ± 8	31.8 ± 4
Protocatechuic acid	36.7 ± 3	100.3 ± 11
Sugars	[wt%]	[wt%]
Fructose	50.1 ± 2	40.5 ± 2
Glucose	27.5 ± 1	34.0 ± 2
Saccharose	3.8 ± 0.5	2.3 ± 0.3
Maltose	5.7 ± 0.8	4.8 ± 0.8

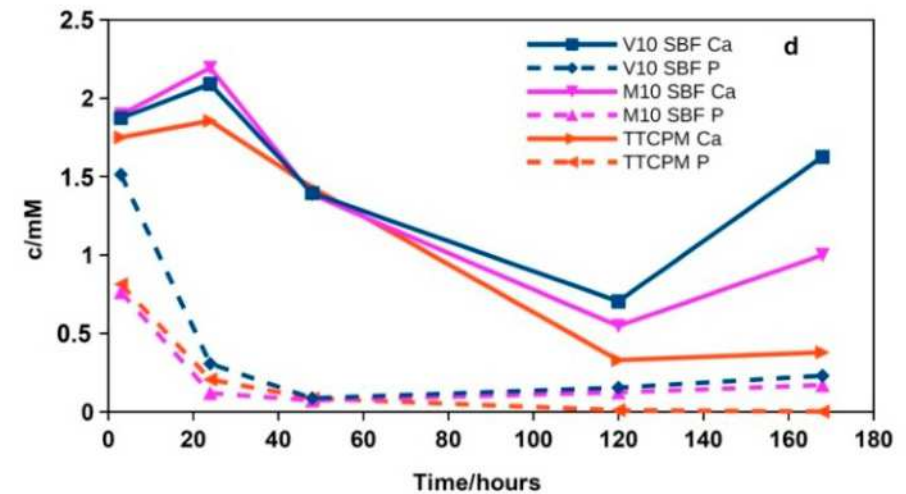
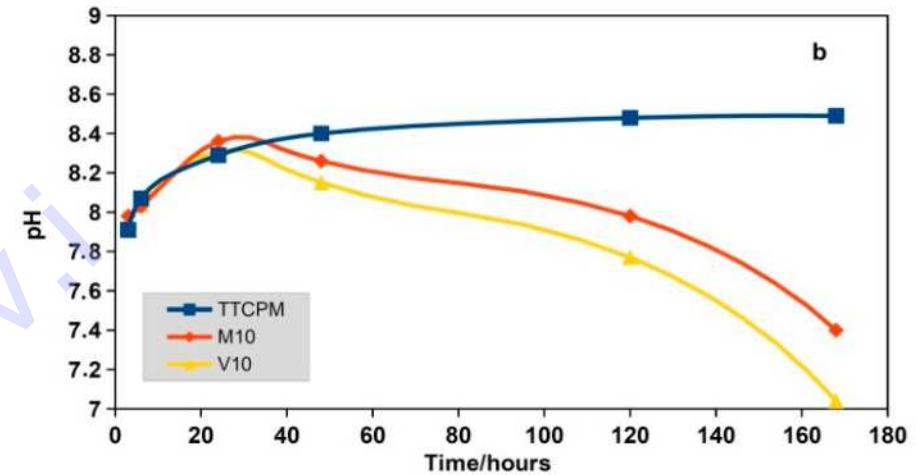
Obsah hlavných polyfenolov, flavonoidov
a obsahy majoritných cukrov
v gaštanovom a manukovom medoch
použitých v experimentoch

Proteínový profil medov stanovený SDS PAGE elektroforézou



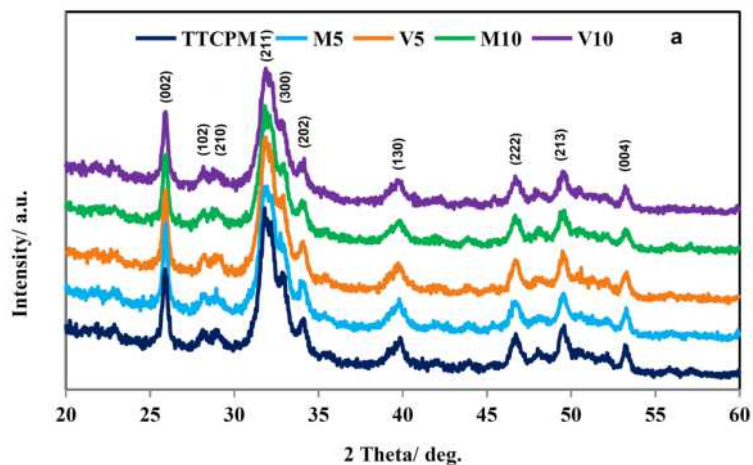
Obsah proteínov v medoch nízky do 0,15 hm%
 - nájdené proteíny materskej kašičky,
 - proteíny rastlinného pôvodu peľ a nektár
 - apisimin and defensin-1

Zmeny pH a uvoľňovanie iónov z biocementu počas namáčania kompozitov v roztoku simulovanej telovej tekutiny M-manukový med, V- gaštanový med



- zaznamenaný pokles hodnoty pH s dobou namáčania
 - súvis s transformáciou cukrov a oxidáciou na kyseliny
 - zvýšenie rozpustnosti cementovej matrice - rast obsahu iónov

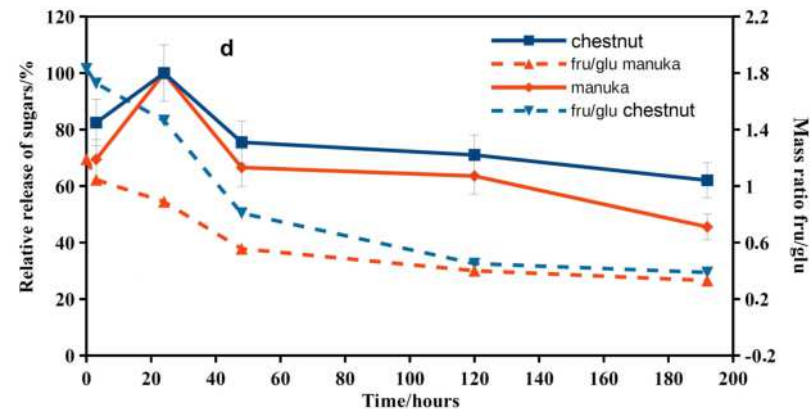
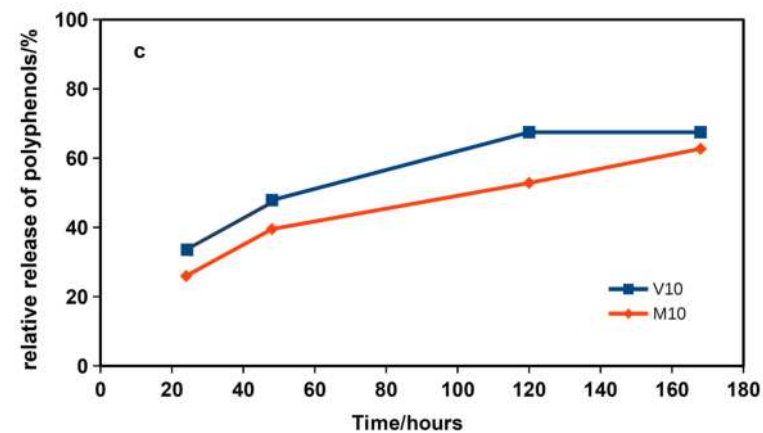
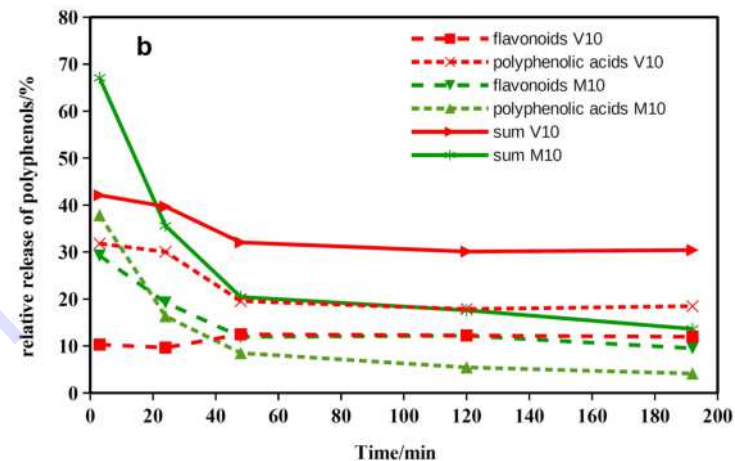
Transformácia kalcium fosfátovej cementovej zmesi po 1 dňovom tuhnutí v simulovanej telovej tekutine

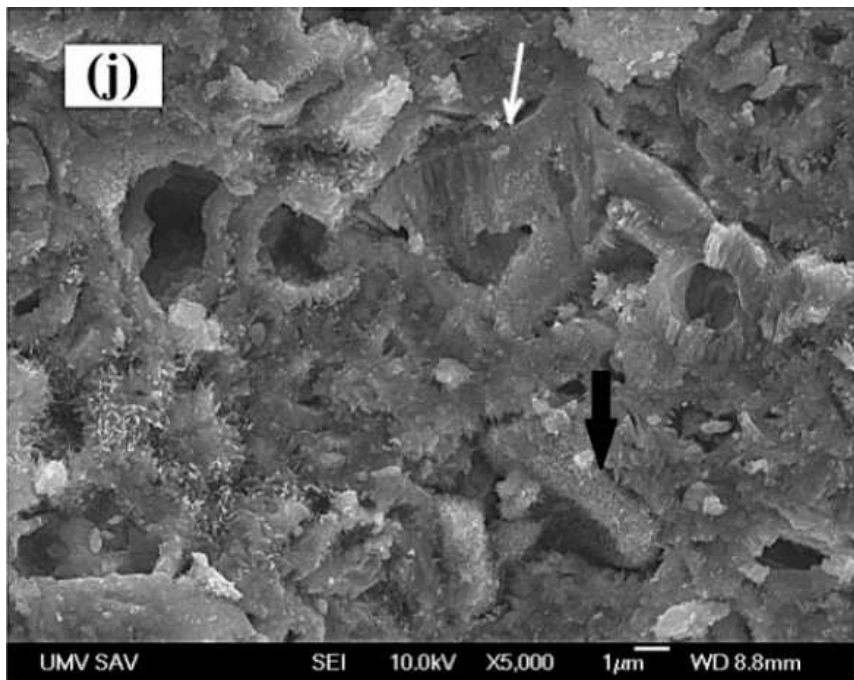


Úplná premena na nanokryštalický kalcium deficitný (HAP)

Procesy spojené s transformáciou cementovej zmesi výrazne ovplyvňujú uvoľňovanie iónov, polyfenolov a cukrov z kompozitu počas namáčania v roztokoch
- vzniknutý hydroxyapatit je aktívny adsorbent

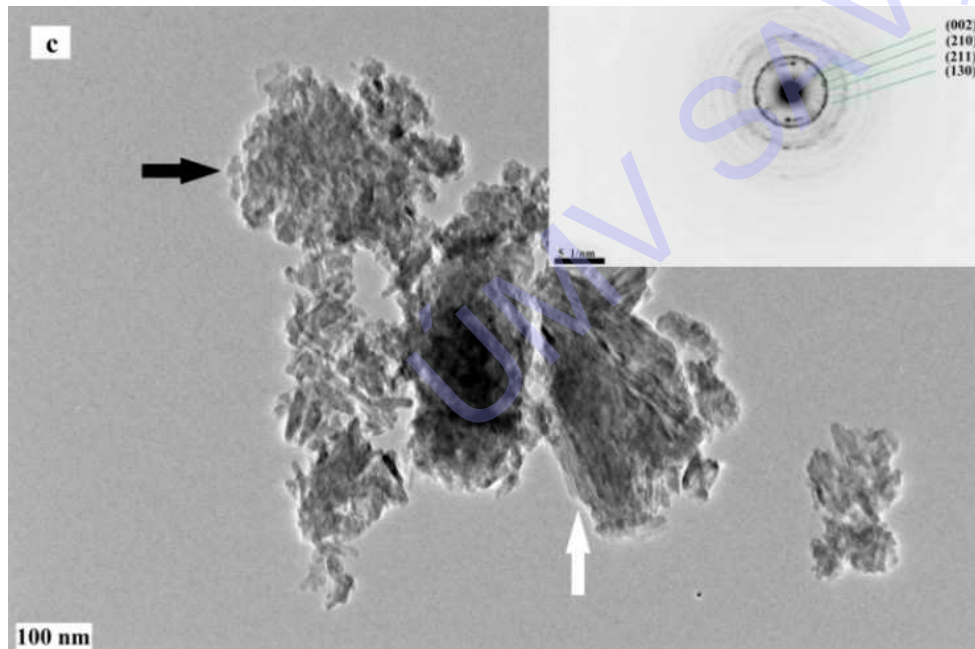
Uvoľňovanie polyfenolov a cukrov do simulovanej telovej tekutiny a fyziologického roztoku





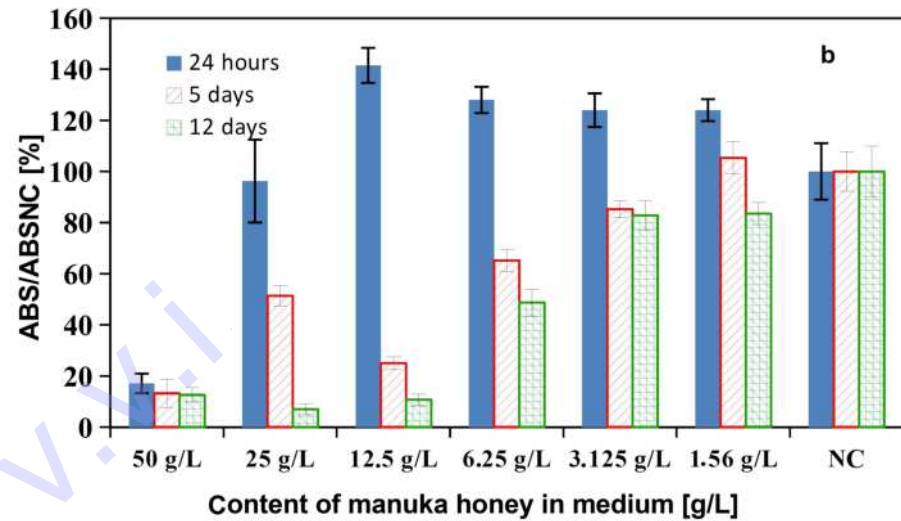
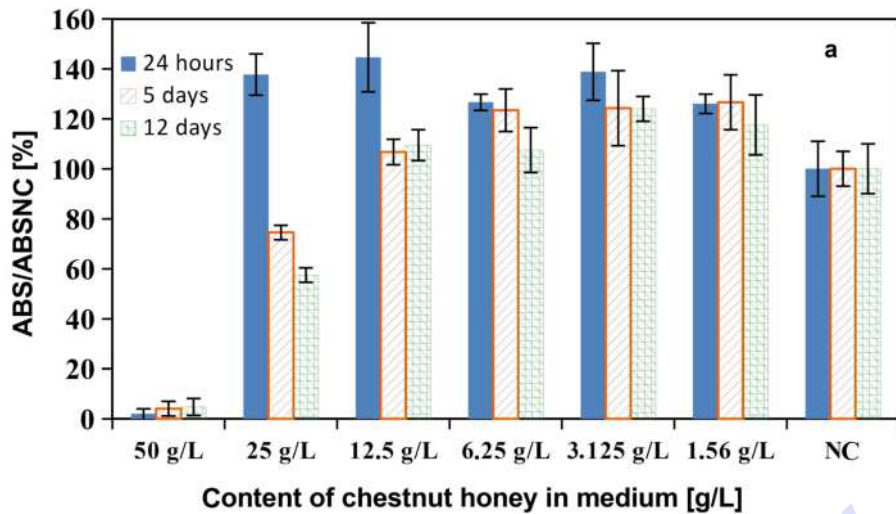
Mikroštruktúra kompozitov a morfológia HAP častíc po 7 dňovom namáčaní v simulovanej telovej tekutine

- Vznik hydroxyapatitových hraničných stien v okolí pôvodných častíc TTCP so stĺpcovitým usporiadaním
- Tvorba materiálovo ochudobnených prázdnych zón v okolí HAP zhlukov po transformácii fáz biocementu- slabá väzba s cementovou maticou- pokles mechanickej pevnosti kompozitu

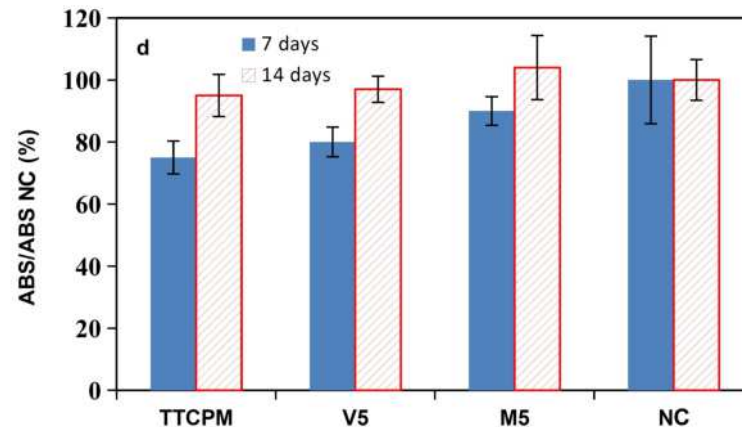
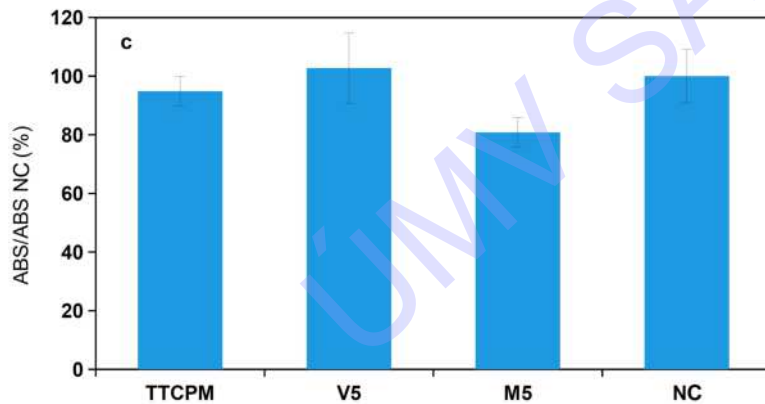


- Vznik nanokryštalických HAP častíc dvoch morfológií – veľmi jemných globulárnych 10-20nm veľkosti a ihlicovitých so stĺpcovitým usporiadaním v aglomerátoch

Cytotoxicita medových roztokov (kritická hranica 70%)

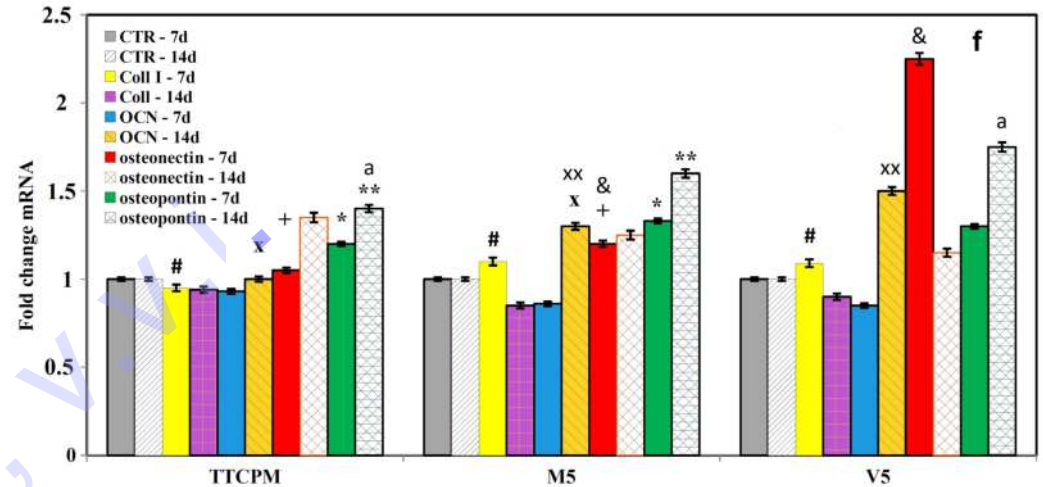
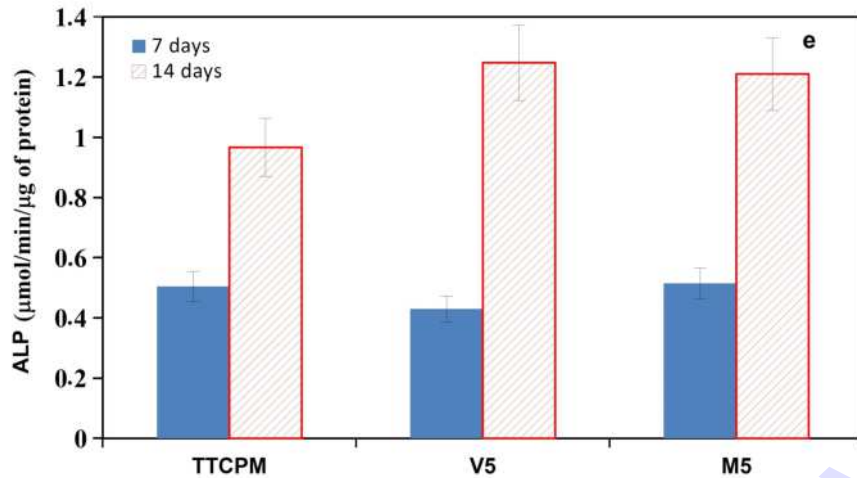


Manukový med má výrazne vyššiu cytotoxicitu v porovnaní s gaštanovým medom
– zloženie kvapalnej zložky biocementu optimalizované vzhľadom na cytotoxicitu



Štandardný MTS test cytotoxicity po 1 dňovej kultivácii buniek v extraktoch kompozitov preukázal ich nízku cytotoxicitu. Pri dlhodobom testovaní (7 a 14 dní) nebol potvrdený cytotoxický charakter extraktov.

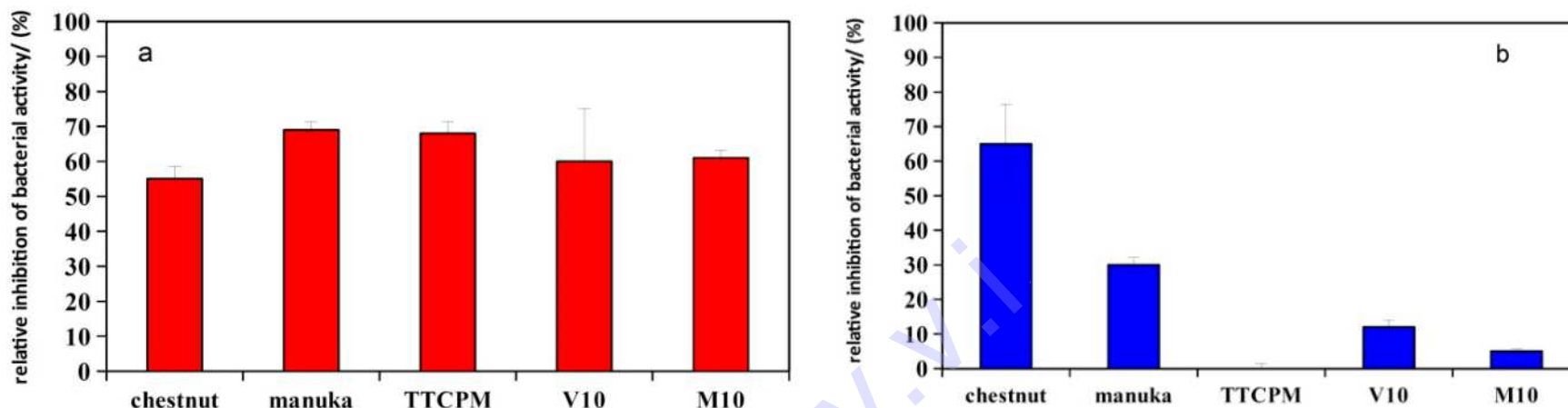
Osteogénna aktivita mezenchýmových kmeňových buniek kultivovaných v extraktoch kompozitných biocementov



Zvýšená ALP aktivita buniek po 14 dňovej kultivácii v extraktoch kompozitných biocementov a výsledky RT PCR analýzy exprese génov osteogénnych markerov v MSC kultivovaných v cementových extraktoch počas 7 a 14 dní (f) Štatisticky významné rozdiely medzi expresiou osteogénnych génov v bunky kultivované v extraktoch medových kompozitných cementov a v čistom biocemente poukazujúce na zvýšenú expresiu génov osteokalcínu (OCN), osteopontínu (OP) (#, *, **, X, XX, a: $p < 0,001$) a osteonektínu (ON) (&, +: $p < 0,0001$)

Výhodou biocementových zmesí pripravených in situ reakciou je výrazne zníženie hodnoty pH v počiatočných fázach tuhnutia pod 8,4 a prídavok včelieho medu, znižuje intenzitu dráždenia, zápalovej reakcie a stresových faktorov okolitých tkanív po aplikácii. Porovnanie in vitro celkovej antioxidačnej kapacity extraktov z kompozitného biocementového systému a cementu bez prídavku medu preukázalo viac ako dvojnásobnú antioxidačnú kapacitu kompozitných systémov. Podobne bola identifikovaná štatisticky významne zvýšená (20-120%) osteogénna génová expresia osteokalcínu, osteonektínu a osteopontínu po in vitro kultivácii osteoblastov v extraktoch kompozitných systémov v porovnaní s extraktami z čistého cementu – systém má potenciál na zlepšenie procesu hojenia kostných defektov

Antibakteriálna aktivita kompozitných biocementov



Antibakteriálna aktivita kompozitov charakterizovaná na Gram-negatívnych baktériách *Escherichia coli* (a) Gram-pozitívnych baktériách *Staphylococcus aureus* (b) dokumentuje antibakteriálnu aktivitu roztokov medov v kvapalnej zložke a kompozitných cementov, pričom je zrejme výrazne vyššia antibakteriálna aktivita voči Gram-negatívnym ako Gram-pozitívnym baktériám. Nebol pozorovaný synergický efekt na antibakteriálnu aktivitu kompozitov v porovnaní s čistým biocementom avšak v prípade Gram-pozitívnych baktérií sa prejavil na malom zvýšení antibakteriálnej aktivity vplyv prídavku medu.



Makroskopická ukážka rezu kostného tkaniva po hojení subchondrálneho defektu v kolene ovce (vyplnenie defektu s medovým kompozitným biocementom, makroskopicky uniformná a spojitá tkanivo chrupky rovnakej hrúbky, novovytvorené tkanivo subchondrálnej kosti prepojené s chrupkou a okolitým kostným tkanivom)