

الپیک کامپوزیتی پلی کاپرولاکتون و آلجینات کلسیم حاوی نانوافزودنی‌های سرامیکی برای استفاده در طب احیا کننده

ترجمه: مهندس آزاده موحد

چکیده

هدف از انجام این تحقیق تولید مواد کامپوزیتی بر پایه ی دو پلیمر زیست سازگار (آلجینات سدیم و پلی کاپرولاکتون) برای استفاده در ترمیم بافت استخوان می باشد. تحقیقات انجام شده برای تولید کامپوزیت های پلیمری-لیفی با استفاده از دو پلیمر با قابلیت جذب دوباره، امکان تولید کامپوزیت هایی با خواص مکانیکی کاربردی را تایید می کند. مدول یانگ در سیستم های کامپوزیتی مورد بررسی بیشتر از ورق پلی کاپرولاکتون (PCL) اصلاح نشده است. شبکه ی PCL صرف نظر از فاز لیفی آن پایداری خوبی در شرایط آزمایشگاهی دارد. مقدار ثابت PH و تغییرات اندک در میزان هدایت یونی آب نشان می دهد که این مواد دستخوش تغییرات تدریجی و کندی می شوند.

مقدمه

یکی از راه های دسترسی به روش های جدید در علم پزشکی تولید مواد ایمپلنتی جدید با استفاده از پلیمرهای زیست تجزیه پذیر و زیست سازگار نظیر کوپلیمرهای لاکتیک اسید، پلی کاپرولاکتون، سلولز، کیتین و آلجینات است. رشد سریع نانو تکنولوژی در اواخر قرن بیستم دریچه های جدیدی را برای نمایش خواص مواد پیشرفته به ویژه بیواکتیویته آن ها به روی ما گشود. یک ایمپلنت با بیواکتیویته مناسب باعث فعالیت شیمیایی خوب و در نتیجه ایجاد اتصال بین بافت طبیعی و ایمپلنت می شود.

هدف از این تحقیق تولید مواد کامپوزیتی جدید بر اساس پلیمرهای زیست سازگار (آلجینات سدیم و پلی کاپرولاکتون) برای استفاده در درمان عیوب بافت استخوان می باشد. این مواد از روی پراکندگی الیاف در شبکه پلیمری تعریف می شوند. در این مقاله نتایج آزمایشات انجام شده در رابطه با زیست سازگاری کامپوزیت های پلیمری لیفی مورد استفاده ارائه شده است. آزمایشات سلولی نقش بسزایی در پیش بینی اثربخشی کامپوزیت های پلیمری لیفی تشکیل شده از الیاف آلجینات حاوی نانوافزودنی های سرامیکی ایفا می کنند. البته لازم به ذکر است که با به کارگیری مواد ایمپلنتی جدید در شرایط آزمایشگاهی می توان ارزیابی معتبری از موثر بودن فعالیت آن ها

طب احیا کننده از شاخه های علم پزشکی است که امروزه شاهد رشد سریعی می باشد. این شاخه از طب به بازسازی بافت های آسیب دیده در اثر بیماری های مختلف یا عیوب ژنتیکی می پردازد. مهندسی بافت نقش مهمی را در این زمینه ایفا می کند. پیشرفت های اخیر علم مهندسی مواد این امکان را برای دانشمندان فراهم می کند تا بتوانند انواع جدیدی از مواد ایمپلنتی را برای مثال برای استفاده در بازسازی بافت های استخوان ایجاد کنند. استفاده از تیم های علمی در زمینه ی رشته های مختلف، بهره برداری کامل از پتانسیل تکنولوژی های تولید را میسر ساخت. مواد ایمپلنتی جدید مورد استفاده در بازسازی بافت استخوان که منطبق با معیارهای طب احیا کننده هستند باید دارای خصوصیات زیر باشند :

- زمان مشخص برای تخریب تا امکان رشد بیش از حد ایمپلنت همراه با بافت بازیافتی فراهم شود،
- عملکرد حمایتی (بر اساس خواص بیواکتیو و شیمی فیزیکی) بر روی سلول های استخوانی و در نتیجه افزایش نرخ تکثیر آن ها،
- تخلخل و یک ساختار میکروبی مناسب.



الیفاتیک یعنی پلی کاپرولاکتون تولید کمپانی Sigma-Aldrich تشکیل می شد و میانگین شاخص پلی دیسپرسیته که به صورت نسبت Mw/Mn تعریف می شود، ۴/۸ بود.

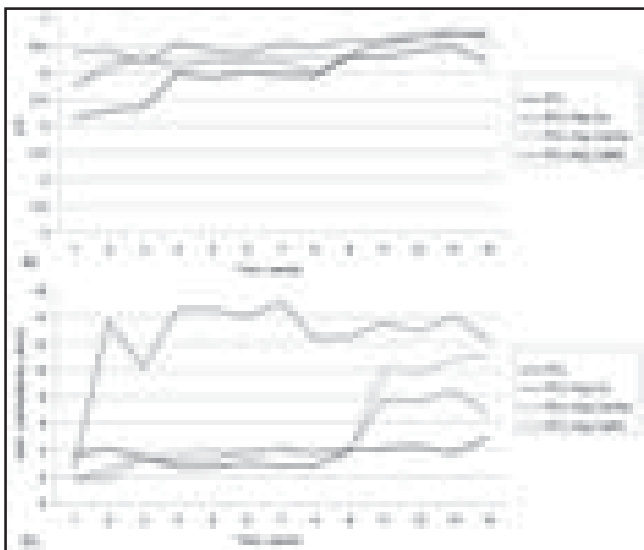
جدول ۱- خواص مکانیکی و توپوگرافی سطحی کامپوزیت های PCL

نمونه	استحکام کششی، MPa	تغییر شکل پذیری، %	مدول یانگ، MPa	زاوی تماس، °	توپوگرافی سطحی، Mμ		
					R _z	R _t	R _a
PCL	۱۸/۸۵	۵۵۵/۰۴	۱۹۸/۳۹	۵۷/۷±۲/۵۴	۱/۷۲	۱۸/۸۶	۱۲/۵۱
PCL+Alg Ca	۱۵/۶۹	۷۲/۲۸	۳۸۹/۴۰	۷۷/۰±۱/۶۶	۱/۲۷	۱۵/۷۸	۹/۳۲
PCL+Alg CaHAp	۱۰/۲۴	۲۰/۴۲	۳۰۶/۹۶	۷۳/۷±۲/۱۴	۲/۵۹	۲۵/۴۰	۱۵/۹۹
PCL+Alg CaBG	۱۱/۱۳	۳۱/۱۳	۲۵۴/۰۳	۷۶/۸±۱/۴۲	۱/۱۷	۱۳/۰۸	۹/۰۲

شکل گیری الیاف و تولید کامپوزیت ها

الیاف آلجینات به روش تریبسی و با استفاده از آب مقطر به عنوان حلال تولید شدند. فرایند انعقاد نیز در حمامی حاوی ۳٪ محلول آبی CaCl₂ و با افزودن مقدار اندکی هیدروکلریک اسید (۳٪ HCl) و در دمای ۴۰°C انجام شد. کشش الیاف در دو مرحله انجام شد: مرحله اول در یک حمام روان سازی با شرایط مشابه حمام انعقاد ولی در دمای ۶۷°C صورت گرفت و مرحله دوم نیز در محیط بخار مافوق گرم و در دمای ۱۴۰-۱۳۵°C انجام شد. الیاف پس از مرحله ی کشش و آبکشی در دمای ۲۵۰°C و در شرایط یکسان خشک شدند.

ورق های کامپوزیت پلیمری-لیفی به روش ریخته گری و در دانشگاه AGH تولید شد. بخش لیفی به صورت الیاف کوتاه با طول تقریبی ۳۰-۲۰ mm تجزیه شد و بخش پلیمری الیاف آلجینات نیز در معرض فرایند هموزنیزاسیون در متیلن کلراید(حلال پلی کاپرولاکتون) قرار گرفت و سپس محلول حاصل بر روی ورقه هایی ریخته شد تا حلال تبخیر شود.



شکل ۱- تغییر در (a) PH و (b) رسانایی یونی محیط غوطه وری (آب) در حین آزمایش تخریب پذیری (دما ۳۷°C و به مدت ۴ ماه) برای کامپوزیت های PCL

به دست آورد که خارج از حیطه این تحقیق می باشد. این کامپوزیت ها برای تسریع درمان بیماری ها طراحی شده اند. علاوه بر آن انتظار می رود عرضه ی این نوع جدید از مواد ایمپلنتی در بازار هزینه های بستری شدن در بیمارستان را کاهش دهد چون استفاده از آن ها نیاز به جراحی مجدد را که در موارد استفاده از ایمپلنت های فلزی ضروری بود، از بین می برد. استفاده از ایمپلنت های زیست تجزیه پذیر و با قابلیت جذب مجدد انجام پیوندهای خودزا را محدود می کند.

در حال حاضر آلجینات یکی از پلیمرهای متداول در علم پزشکی است. این پلیمر یک پلی ساکارید خطی است که از باقیمانده ی D-β مانورونیک اسید و L-α گلوکونیک اسید تشکیل می شود. ویژگی های این پلیمر نظیر غیرسمی و آنتی باکتریال بودن و زمان مشخص تخریب آن را برای استفاده در علم پزشکی ایده آل می سازد. آلجینات در حال حاضر در مهندسی بافت کاربرد داشته و برای درمان و بازسازی پوست، بافت غضروف، بافت استخوان، کبد و بافت میوکارد استفاده می شود. در این تحقیق از آلجینات برای تولید الیاف آلجینات کلسیم که مواد اولیه ی آن حاوی نانوافزودنی های بیواکتیو نظیر هیدروکسی اپتایت و بیوگلس بودند، استفاده شد. این مواد خواص استئوکاندکتیو یا استئوآنیوکتیو در الیاف آلجینات ایجاد می کنند که ناشی از نانوافزودنی های به کار گرفته شده در مواد اولیه ی لیفی می شود.

پلی کاپرولاکتون به خانواده ی پلی استرهای آلیفاتیک زیست تجزیه پذیر تعلق دارد. این ماده آبگریز، خطی و شبه بلوری است. انحلال پذیری خوب، نقطه ذوب پایین (حدود ۶۰°C)، دمای انتقال شیشه ای (-۶۰°C) و توانایی استثنایی پلی کاپرولاکتون برای ترکیب شدن با سایر پلیمرها موجب شده است تا مطالعات زیادی پیرامون به کارگیری این پلیمر در علم پزشکی انجام شود. این پلیمر در نخ های جراحی، سیستم آزادسازی کنترل شده ی دارو، دندانپزشکی و جراحی رگ های خونی استفاده می شود. بنابراین با توجه به امکان طراحی خصوصیات مورد نظر در کامپوزیت های پلیمری لیفی بر پایه ی پلی کاپرولاکتون و الیاف نانوکامپوزیتی آلجینات کلسیم با توجه به نانوافزودنی مورد استفاده، امری بسیار جالب توجه است. زمانی که فاز لیفی حاوی نانوافزودنی های سرامیکی بیواکتیو باشد، می توان انتظار پتانسیل استئوکاندکتیو را داشت.

مواد اولیه مورد استفاده

محلول ریسندهی با استفاده از آلجینات سدیم تولید FMC Biopolymer (نوروز) و تحت نام تجاری Protanal LF و با ویسکوزیته ی ذاتی $\eta = 3/16 \text{ dL/g}$ تولید شد. شاخص پلی دیسپرسیته Mw/Mn که با روش کروماتوگرافی ژل انجام شد، ۶/۸ بود. قسمت بیشتر پلیمر (تا ۶۵٪) از بلوک های متشکل از مانورونیک اسید و باقیمانده ی آن هم از گلوکونیک اسید تشکیل شده بود.

نانو افزودنی های مورد استفاده در محلول ریسندهی عبارت بودند از: - هیدروکسی اپتایت، (HAp) (OH)_۲(PO_۴)_۳Ca که در دانشگاه علوم و تکنولوژی AGH واقع در شهر کراکف لهستان تولید شد، - بیوگلس تولید شده در دانشگاه AGH با ترکیب اکسیدی زیر: ۱۶٪ CaO، ۸۰٪ SiO_۲ مولی، ۴٪ P_۲O_۵ مولی.

شبکه ی بیوکامپوزیتی از یک پلیمر با قابلیت جذب مجدد و از گروه پلی استر



شد. نتایج با میانگین گرفتن از ۱۵ بار اندازه گیری و در سطح معناداری $\alpha=0/05$ به دست آمد.

آزمایش میکروساختار بودن سطح بر اساس مشاهدات حاصل از میکروسکوپ الکترونی پویشی JSM-۵۴۰۰ تولید کمپانی JEOL، زاین انجام شد. پیش از انجام آزمایش نمونه ها با یک لایه کربن رسانا پوشش دهی شدند.

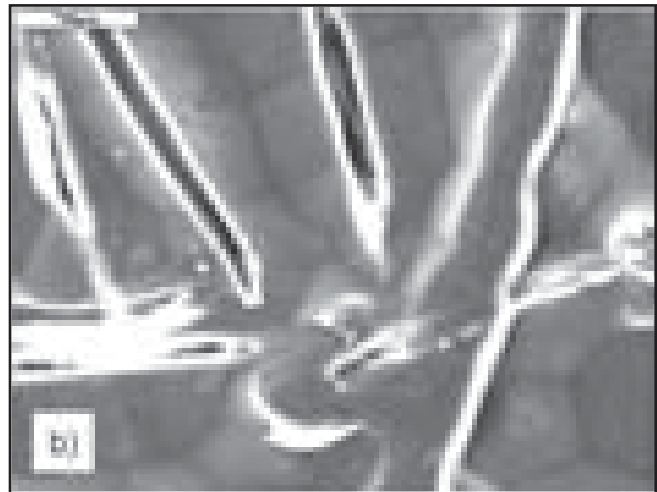
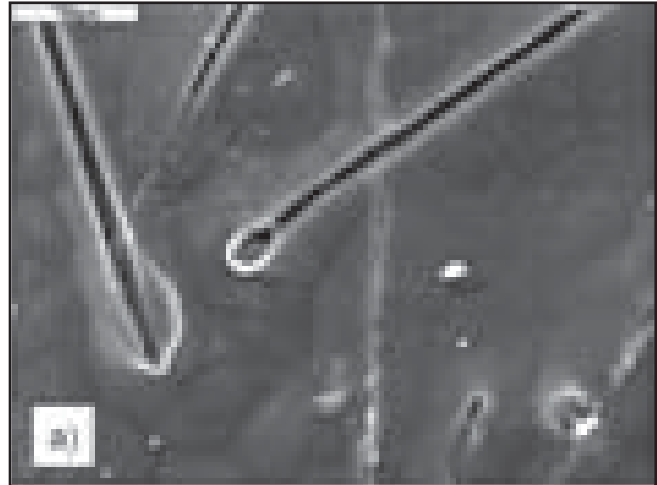
خواص بیولوژیکی ورق های کامپوزیت و همچنین درجه تخریب آن ها در هنگام قرارگیری نمونه ها در آب مقطر اندازه گیری شد. نمونه ها به مدت ۱۶ هفته در محفظه حرارتی در دمای 37°C قرار داده شدند. میزان تخریب آن ها از روی تغییر در رسانایی یونی و PH مایعی که مواد کامپوزیتی در آن غوطه ور هستند (آب) تعیین می شود.

کشت سلول - سلول ها در بطری های پلاستیکی ۷۵ میلی لیتری تولید کمپانی Nunclon دانمارک در یک محیط خنثی و با افزودن $10/10$ فتال بوین سرم (PAA اتریش)، 5% محلول آنتی بیوتیک پنی سیلین (100UI/ml) و استرپتومایسین (10mg/ml) و در محیط CO_2 5% و دمای 37°C رشد داده شدند. با افزودن 5% تریپسین EDTA یک سوسپانسیون سلولی حاصل می شود. سلول ها پس از عملیات آبکشی و سانتریفوژ، به غلظت 3×10^4 cells/ml رسانده می شوند و سپس 1ml از سوسپانسیون سلولی در حفره های ظرف کشت 24 حفره ای حاوی دیسک های استریل حاوی مواد مورد آزمایش ریخته شد. از TCPS^۳ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. انکوباسیون سلول های MG-۶۳ در حضور دیسک های PCL حاوی نانوکامپوزیت الیاف آلجینات به مدت ۳ و ۷ روز در انکوباتور در اتمسفر 5% CO_2 و دمای 37°C انجام شد.

بحث و بررسی نتایج

وجود الیاف کوتاه ($20-30\text{mm}$) در شبکه پلیمری پلی کاپرولاکتون به مقدار 2% وزن پلیمر منجر به کاهش استحکام ازدیاد طول در کامپوزیت های دوگانه می شود. البته هدف از به کارگیری الیاف آلجینات بهبود خواص مکانیکی نبود بلکه هدف صرفاً تولید کامپوزیتی با اجزای بیواکتیو (الیاف آلجینات نانوکامپوزیتی) بود. آزمایشات اولیه ما نشان داد که استفاده از الیاف به میزان 2% وزنی در شبکه پلیمری از حد بحرانی قانون مخلوط ها پایین تر است. با کاهش استحکام ازدیاد طول، قابلیت تغییر شکل پذیری مواد کامپوزیتی نیز کاهش می یابد و مقدار آن از مقدار مادهی مرجع که در این جا ورقه ی پلی کاپرولاکتون می باشد خیلی کمتر می شود. در مورد مدول یانگ درست عکس این قضیه اتفاق افتاد. مقدار مدول یانگ در کامپوزیت های پلیمری-لیفی بیشتر از مقدار آن در ورقه های پلی کاپرولاکتون است. بیشترین میزان این شاخص در کامپوزیت های حاوی الیاف آلجینات کلسیم بدون نانوافزودنی یا حاوی نانوافزودنی HAP مشاهده شد. تجزیه و تحلیل خواص مکانیکی نشان داد که به کارگیری الیاف در شبکه ی پلیمری منجر به کاهش این خصوصیات می شود. البته این کامپوزیت ها همچنان نیازهای اولیه برای مواد مورد استفاده در بازسازی بافت استخوان را تامین می کنند.

آزمایش های شیمی فیزیکی در میان مهم ترین روش ها برای تشخیص اولیه ی واکنش بدن به مواد مورد نظر می باشند. حضور فاز لیفی در شبکه پلیمری منجر به تغییرات اندکی در آبدوستی سطح کامپوزیت ها می شود که با مقادیر زاویه تماس متناظر که در محدوده ی $73-77^{\circ}$ قرار دارد بیان می شود. البته تغییرات در توپوگرافی سطحی کامپوزیت های مورد بررسی (جدول ۱) نشان می دهد که به کارگیری فاز لیفی در شبکه پلیمری بر شاخص سختی سطح مواد اولیه اثر می گذارد. بیشترین مقدار پروفیل سختی Ra و Rz در کامپوزیت های داری الیاف آلجینات



شکل ۲- مورفولوژی سطحی کامپوزیت های (a) PCL+Alg CaBG و (b) PCL+Alg CaHAp پس از گذشت ۷ روز انکوباسیون در SBF

آزمایشات انجام شده بر روی کامپوزیت ها

آزمایشات مکانیکی ورق های کامپوزیتی پلیمری لیفی در دستگاه Zwick ۱۴۳۵ انجام شد. نمونه ها که به شکل نوار درآمده بودند در معرض کشش تحت شرایط زیر قرار گرفتند: سرعت کشش 40mm/min ، طول کاری 40mm و محدوده ی اندازه گیری مدول یانگ 15Mpa .

آزمایشات شیمی فیزیکی سطح ورقه های کامپوزیتی بر اساس تعاریفات زیر انجام شد: پروفیل سختی، قابلیت خیس شدن و ساختار میکروی مواد کامپوزیتی.

سختی سطح ورقه های کامپوزیتی با استفاده از دستگاه T-۵۰۰ تولید کمپانی Hommelwerke آلمان اندازه گیری شد. نتایج این اندازه گیری شامل پارامترهای Ra، Rz و Rt می شود:

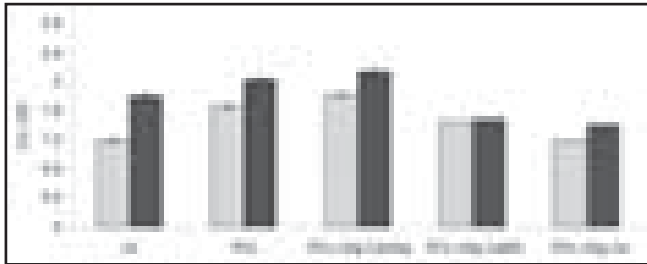
Ir - طول بخش ابتدایی که پارامتر سختی برای آن تعریف می شود؛

R_a (μm) - میانگین حسابی انحراف از پروفیل. Ra به کل بخش ابتدایی یا همان Ir مربوط است.

R_p (μm) - ماکزیمم ارتفاع بین بالاترین و پایین ترین پیک.

R_z (μm) - ارتفاع پروفیل سختی بر حسب ۱۰ نقطه.

زاویه تماس تمام نمونه ها به صورت مستقیم اندازه گیری شد. مایع مورد استفاده آب فوق خالص (UHQ) بود. اندازه گیری ها با استفاده از دستگاه DSA^۲ انجام



شکل ۴-چسبندگی به محیط توسط سلول های استئوبلاست MG-۶۳ در روز سوم و هفتم کشت بر روی TCPS و PCL و سطح دیسک های کامپوزیتی PCL حاوی الیاف آلجینات (OD= دانسیته‌ی نوری اندازه‌گیری شده در طول موج ۵۷۰nm)

آزمایش CV برای بررسی چسبندگی سلول ها امکان نتیجه گیری درباره‌ی تکثیر آن ها را نیز فراهم می کند. تعداد سلول های موجود بر روی سطح بیومواد نیز ممکن است بر نتیجه‌ی آزمایش تاثیر گذار باشد. نتایج به دست آمده از آزمایشات CV نشان داد که بعد از سه روز چسبندگی سلول ها در بیشتر کامپوزیت ها در مقایسه با نمونه‌ی شاهد TCPS بهبود یافت. این شاخص در کامپوزیت هایی که حاوی الیاف آلجینات و بدون نانوافزودنی (۲/AC) و یا دارای بیوگلس (۲/AB) هستند به دلیل تعداد کمتر سلول های در حال رشد بر روی سطح کمتر است (شکل ۳). از سوی دیگر چسبندگی سلول ها بر روی کامپوزیت های متشکل از الیاف با نانوافزودنی های HAP در میان تمام مواد کامپوزیتی مورد تجزیه و تحلیل بالاتر است (شکل ۴). احتمال دارد چسبندگی سلولی پایین تر برای کامپوزیت های حاوی الیاف آلجینات بدون نانوافزودنی و حاوی بیوگلس تحت تاثیر قرار گیری آن جزء بر روی سطح کامپوزیت باشد که امکان چسبیدن سلول ها به سطح کامپوزیت را دشوار می کند.

خلاصه

تحقیقات پیرامون تولید کامپوزیت های پلیمری-لیفی با استفاده از دو پلیمر با قابلیت جذب مجدد نشان داد که می توان کامپوزیت هایی را با خواص مناسب برای کاربردهای مورد نظر تولید کرد. مدول یناگ در سیستم های کامپوزیتی مورد بررسی از ورق های PCL اصلاح نشده بالاتر است. شبکه‌ی PCL صرفنظر از فاز لیفی پایداری خوبی در شرایط آزمایشگاهی از خود نشان می دهد. PH ثابت و تغییرات اندک در رسانایی یونی آب نشان دهنده‌ی تخریب آهسته و تدریجی مواد اولیه است.

کامپوزیت هایی که فاز اصلاحی آن ها الیاف حاوی نانو هیدروکسی اپتایت باشد در میان بهترین کامپوزیت ها قرار دارند. ویژگی های مناسب برای مواد اولیه عبارت است از سختی اولیه، قابلیت خیس شدن و تغییرات اندک در PH محیط غوطه وری. ممکن است این ویژگی ها مستقیماً منجر به چسبندگی و تکثیر سریع تر سلول های استخوان شده و فرایند تثبیت سریع مواد ایمپلنت در بدن زنده را شبیه سازی می کنند. در آزمایشات سلولی سیستم PCL-AIG CaHAP در میان مواد اولیه‌ی کامپوزیتی، مطلوب ترین نتایج را از نظر چسبندگی سلولی ارائه داد.

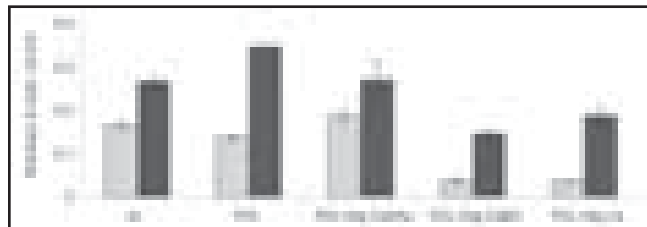
1. Ultra-pure Water
2. Drop Shape Analysis
3. Polystyrene culture discs
4. Crystal Violet

حاوی HAP و کمترین آن در کامپوزیت های دارای الیاف آلجینات حاوی بیوگلس به عنوان نانوافزودنی مشاهده شد. در مورد سختی عمودی نیز ارتباط مشابهی وجود داشت. Rt در کامپوزیت های دارای فاز لیفی آلجینات که حاوی نانوافزودنی HAP بودند بیشتر از ورقه های پلی کاپرولاکتون بود.

پایداری کامپوزیت های پلیمری-لیفی اصلاح شده با نانوافزودنی های سرامیکی نیز بر اساس استاندارد ISO ۱۰۹۹۳-۵ که تخریب پذیری را در شرایط آزمایشگاهی بررسی می کند، مورد آزمایش قرار گرفت. آزمایش تخریب پذیری نیز در دمای ۳۷°C و در مدت زمان ۱۵ هفته انجام شد. کامپوزیت هایی که حاوی ۲٪ فاز لیفی هستند در شرایط مشخص از PH محیط غوطه وری (آب) ثابت بوده و در طول مدت آزمایش در حالت خنثی باقی می ماندند (شکل ۱.a). بررسی مهاجرت یون ها به داخل محلول بر اساس رسانایی آن ها نیز نشان می دهد که کامپوزیت ها تا نه ماه پس از انکوباسیون (بیش از ۲ ماه) پایدار هستند، پس از آن تخریب هیدرولیزی رخ می دهد و منجر به بروز جهشی در رسانایی یونی آب می شود (شکل ۱.b). کامپوزیت های حاوی الیاف آلجینات که فاقد نانوافزودنی بودند بیشترین ناپایداری را از خود نشان دادند (پس از گذشت تنها دو هفته رسانایی یونی افزایش یافت).

در این تحقیق تصاویر SEM حاصل از مشاهده‌ی سطح کامپوزیت های انکوبه شده در پلاسما خون مصنوعی (SBF) در مدت زمان ۷ روز بررسی شده است. مشاهدات میکروسکوپی، شکل گیری ساختار اپتایت را مشخص نکرد که احتمالاً به دلیل طبیعت ماده‌ی اولیه‌ی است که در محل های قرار گیری الیاف سریع تر تخریب می شود (شکل ۲).

تست سلولی کامپوزیت های پلیمری-لیفی با استفاده از رده‌ی سلولی MG-۶۳ شبه استئوبلاست نشان داد که تعداد سلول های کشت شده در محیط آزمایش در میان کامپوزیت ها بسته به نوع جزء لیفی تفاوت چشمگیری داشت (شکل ۳).



شکل ۳-تعداد سلول های استئوبلاست MG-۶۳ در روزهای سوم و هفتم کشت بر روی سطح TCPS و PCL و سطح دیسک های کامپوزیتی PCL با افزودن ۲٪ الیاف آلجینات

در روز سوم کشت تعداد سلول ها تنها در کامپوزیت تشکیل شده از الیاف آلجینات حاوی نانو هیدروکسی اپتایت (۲/AH) بیشتر از TCPS بود. البته در روز هفتم تعداد سلول ها بر روی کامپوزیت های تولید شده کمتر از نمونه‌ی شاهد بود؛ بیشترین تفاوت بین کامپوزیت های حاوی الیاف فاقد نانوافزودنی و دارای بیوگلس به چشم می خورد (۲/AC و ۲/AB).

چسبندگی سلولی به سطح کامپوزیت نیز از نقطه نظر پدیده های زیادی که در آرگانیزم زنده رخ می دهد نظیر پاسخ ایمنولوژیک، فرایند درمان و یکپارچه سازی بافت با استفاده از بیومواد از اهمیت زیادی برخوردار است. تماس، چسبندگی و گسترش سلول ها در فاز اول فعل و انفعالات و هنگام تماس بین سلول ها و بیومواد اتفاق می افتد. موادی که برای بازسازی بافت استخوان طراحی می شوند باید از نظر چسبندگی و تکثیر استئوبلاست ها ایده آل باشند. یک ایمپلنت مربوط به ارتوپدی و یا دندانپزشکی چنانچه یکپارچه‌ی خوبی بین سطح و بافت استخوان ایجاد کند موثر است.