



بررسی رفتار زیست فعالی و زیست تخریب پذیری نانوذرات ویتلایکیت (Ca₁₈Mg₂(HPO₄)₂(PO₄)₁₂) برای کاربرد ترمیم بافت های سخت بدن

فصلنامه
سرامیک ایران

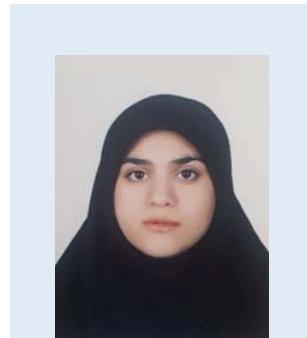
ساناز چائی کازران^{۱*}، محمد رضوانی^۲

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی مواد، سرامیک، گروه مهندسی مواد، دانشگاه تبریز

^۲ استاد تمام، گروه مهندسی مواد، دانشگاه تبریز

چکیده: از گذشته های دور ترمیم و بازسازی تقایص و شکستگی های بافت های سخت بدن، یک چالش بزرگ برای دانشمندان فعال در حوزه ترمیم استخوان بوده است. یکی از مهم ترین روش های درمان تقایص استخوانی، پیوند آلوتروپ استخوان با استفاده از سرامیک های زیستی نظیر ویتلایکیت می باشد. ویتلایکیت با فرمول شیمیایی $(Ca_{18}Mg_2(HPO_4)_2(PO_4)_{12})$ به عنوان دومین جزء معلق فراوان موجود در بافت های سخت بدن، خواص شیمیایی، ساختاری و زیستی بسیار نزدیکی به استخوان طبیعی بدن دارد. به طوری که حدود ۲۶ تا ۵۸ درصد وزنی از بافت استخوان های بدن را به خود اختصاص می دهد. هدف از این تحقیق، بررسی ویژگی های زیستی نانوپور بلوری سنتز شده ویتلایکیت خام و عملیات حرارتی شده در دمای ۹۱۷°C و مقایسه خواص زیستی آن ها می باشد. بدین منظور نانوپورهای ویتلایکیت به مدت ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز در داخل محلول شیشه سازی شدن بدن (SBF) قرار گرفته و تغییرات وزنی و pH نمونه ها در هین غوطه وری در داخل محلول (SBF) مورد بررسی قرار گرفت. برای مشخصه یابی نمونه های قرار داده شده در داخل محلول شیشه سازی شده بدن (SBF) از آنالیزهای XRD و ICP-FT-IR استفاده شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد، با انجام عملیات حرارتی بر روی نانوپور سنتز شده ویتلایکیت، اندازه دانه ها تا ۲۵ nm ریزتر شده و واکنش پذیری آن در محلول شیشه سازی شده بدن افزایش یافت. پس از گذشت ۲۱ روز از غوطه وری نانوپورهای ویتلایکیت در داخل محلول شیشه سازی شده بدن، بر روی سطح ویتلایکیت، فازهای بلوری کلسیم منیزیوم فسفات و ویتلایکیت تشکیل شد. که این امر نشان دهنده زیست فعالی و زیست سازگاری مناسب نانوپورهای ویتلایکیت است. همچنین تغییرات pH هر دو نمونه نیز در محدوده pH زیستی طبیعی بدن انسان بود، که نشانگر زیست سازگاری مناسب نمونه ها است. با این وجود، میزان پایداری ویتلایکیت در محیط های اسیدی $pH < 4$ در بالاترین میزان است. علاوه بر آن می توان گفت، به دلیل رهاش پیوسته یون های (Mg^{2+}) و (Ca^{2+}) از نمونه های ویتلایکیت در داخل محلول شیشه سازی شده بدن (SBF)، استفاده از آن در ترمیم (HPO_4^{2-}) از نمونه های ویتلایکیت خام نشان داد، حدود ۱۵۰ ppm یون منیزیوم از ویتلایکیت در داخل محلول شیشه سازی شده نمونه ویتلایکیت خام نشان داد. همچنین نتایج حاصل از آنالیز ICP عیوب استخوانی باعث افزایش سرعت روند استخوان سازی می شود. همچنین نتایج حاصل از آنالیز (Mg^{2+}) و (Ca^{2+}) از نمونه های ویتلایکیت خام نشان داد، حدود ۱۵۰ ppm یون منیزیوم از ویتلایکیت در داخل محلول شیشه سازی شده بدن در طی ۲۱ روز غوطه وری آزاد می شود، که می تواند بخشی از نیاز روزانه بدن را به منیزیوم تأمین کند. همچنین با بررسی تغییرات وزنی نمونه ها در داخل محلول شیشه سازی شده بدن مشاهده می شود، میزان کاهش وزن نمونه ویتلایکیت خام حدود ۳۲/۱۱ درصد وزنی بیشتر از نمونه ویتلایکیت عملیات حرارتی شده است که نشانگر زیست تخریب پذیری بالاتر این نمونه است.

کلمات کلیدی: ویتلایکیت، زیست فعال، زیست تخریب پذیر، ترمیم استخوان، هیدروکسی آپاتیت، پیوند استخوان.



- نویسنده مسئول و نویسنده اول:
مهندس ساناز چائی کازران
دانشگاه تبریز
نوع مقاله: پژوهشی
صفحه های: ۱۴ تا ۲۵
شایپا چاپی: ۱۷۳۵-۳۳۵۱
* شایپا الکترونیکی: ۲۷۸۳-۳۰۹۷
زبان نشریه: فارسی
دسترسی پذیر در نشانی:
www.JICERS.ir

DOR: 20.1001.1.17353351.1401.18.0.1.7

تاریخ دریافت:
۱۴۰۱/۰۵/۱۵
تاریخ پذیرش:
۱۴۰۱/۰۷/۰۴



۱- مقدمه

استخوان های بدن انسان، کامپوزیت های متخلخلی مشکل از الیاف غیرمعدنی کلاژنی همراه با رگ های خونی و اعصاب هستند؛ که توسط فازهای معدنی مختلف مانند فازهای کلسیم فسفاتی تقویت شده اند [۱]. استخوان ها برای حرکت، پشتیبانی و محافظت از بدن، تولید گلوبول های قرمز و سفیدخون و ذخیره مواد معدنی در بدن همچون کلسیم، منیزیوم و فسفر فعالیت می کنند [۱-۳]. با وجود توانایی ذاتی بافت های سخت بدن در ترمیم خود به خودی آسیب های وارد، در بعضی از موارد شدت آسیب وارد شده به استخوان بالا بوده و امکان ترمیم آن بدون مداخلات پزشکی وجود ندارد [۴]. حدود ۳۰ درصد از افراد جهان در طول زندگی خود دچار شکستگی های استخوان می شوند، که در ۱۰ درصد موارد این شکستگی ها هرگز بهبود نمی بایند [۵]. در چنین مواردی برای ترمیم آسیب های استخوانی از پیوندهای استخوانی استفاده می شود [۶]. یکی از مهم ترین سرامیک های زیستی که برای پیوند و بازسازی بافت های سخت بدن مورد استفاده قرار می گیرند، ویتلакیت با فرمول شیمیایی $(\text{Ca}_{18}\text{Mg}_2(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_2)$ با ساختار بلوری رومبوهرال می باشد [۶-۲۳، ۸]. ویتلکیت یک سرامیک کلسیم منیزیوم ارتو فسفاتی زیست فعال^۱ و زیست تخریب پذیر^۲ است، که حدود ۲۶ تا ۵۸ درصد وزنی از بافت های سخت بدن را به خود اختصاص می دهد [۹-۱۳].

زیست فعالی ویتلکیت بر روی خواص گوناگونی همچون میزان چسبندگی سلولی^۳، رشد و تکثیر سلول های استئوبلاست^۴ بدن تاثیرگذار است [۱۱]. همچنین برای تشکیل آپاتیت شبیه استخوان^۵ در محل اتصال کاشتنی و بافت های بدن، تخریب ویتلکیت یک امر ضروری است. بنابراین سرعت تخریب و انحلال سرامیک های ویتلکیتی در داخل بدن بایستی به گونه ای باشد، که بافت های سخت جدید در بدن امکان رشد و بازسازی داشته باشند [۱۴]. از سایر عوامل تاثیرگذار بر روی زیست تخریب پذیری ویتلکیت می توان به خواص فیزیکی و شیمیایی، میزان جذب فعال بدن، سایش یا خوردگی سطح کاشتنی، فعالیت های سلولی و آنزیمی بدن در اطراف کاشتنی و میزان pH مایع بدن در اطراف کاشتنی اشاره کرد [۱۳-۱۵]. یون های کلسیم (Ca^{2+}) به همراه یون های فسفر و منیزیوم (Mg^{2+}) از یون های اصلی فاز معدنی استخوان های بدن (هیدروکسی آپاتیت و ویتلکیت) به شمار می روند [۱۶].

یون های فسفر در داخل مواد معدنی استخوانی بدن به صورت (HPO_4^{2-}) و (PO_4^{3-}) یافت می شوند [۱۶]. یون های منیزیوم (Mg^{2+}) چهارمین یون فراوان موجود در در داخل بافت های سخت بدن هستند؛ به طوری که استخوان های مینای دندان، عاج دندان و ستون فقرات انسان ها حاوی به ترتیب 0.072 و 0.044 و 0.023 میلی متر منیزیوم می باشند [۱۱، ۱۷]. نتایج تحقیقات نشان داده است برای حفظ سلامت استخوان ها بایستی روزانه حدود 180 تا 230 گرم بر لیتر منیزیوم وارد بدن شود. آزاد شدن یون های منیزیوم حاصل از انحلال ویتلکیت در داخل بدن، می تواند باعث جلوگیری از تردی و پوکی استخوان [۱۸-۲۰] و افزایش فعالیت سلول های استخوان ساز شوند [۲۰-۲۱].

در طی فرایند کانی سازی استخوان های بدن، یون های منیزیوم می توانند انتقال یون های کلسیم را به مناطق فعال استخوان سازی تسهیل کرده و فرایند ترمیم استخوان را سرعت بخشند [۱۱].

در سیستم اسکلتی بدن انسان، بیماری هایی نظیر التهاب مفاصل و یا وجود عفونت، باعث ایجاد و تجمع بیش از اندازه اسید اوریک در غشای سلول های استخوان ساز شده و میزان pH مایع بدن در محل عیب استخوان کاهش می باید. در چنین شرایطی، بدن برای ایجاد تعادل در سطح pH خود از منابع ذخیره شده معدنی مانند استخوان ها استفاده می کند. این امر موجب بروز بیماری هایی نظیر پوکی استخوان می شود. در چنین شرایطی استفاده از ویتلکیت با پایداری بالاتر در شرایط اسیدی ($\text{pH} < 4.2$) می تواند فرایند ترمیم استخوان ها را سرعت بخشد [۲۲، ۲۳].

¹ Bioactive ceramic

² Biodegradable ceramic

³ Cell adhesion

⁴ Growth and Proliferation of Osteoblast cells

⁵ Bone like Apatite

از لحاظ الکترواستاتیکی ویتللاکیت دارای بار سطحی منفی است، که می‌تواند پروتئین‌های استخوانی مختلف از جمله پروتئین‌های مورفوژنیک استخوان^۱ را که دارای بار مثبت می‌باشند، در سطح خود جذب کند [۵].

تمام موارد ذکر شده، باعث تبدیل ویتللاکیت به یک سرامیک زیستی با اهمیت می‌شود که کاربردهای گوناگونی به عنوان عامل بازدارنده خونریزی^۲ [۲۴]، استفاده در رهایش دارو در محیط‌های حساس به pH [۲۵، ۲۶]، سیمان‌های تزریق‌پذیر استخوانی و کاشتنی‌های ترمیم‌کننده استخوان دارد [۲۷]. در این پژوهش ویژگی‌های زیست سازگاری، زیست فعالی و زیست تخریب‌پذیری نمونه‌های سنتز شده و عملیات حرارتی شده ویتللاکیت به کمک روش هم‌رسوبی شیمیایی در شرایط pH مختلف و در تماس با مایع شبیه‌سازی شده بدن^۳ مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۲- مواد و روش تحقیق

در ابتدا نانوپودر بلوری ویتللاکیت با استفاده از mol /۰ .۳۷ کلسیم هیدروکسید^(۲) (Ca(OH)₂)، mol /۰ .۱۳ منیزیوم هیدروکسید (Mg(OH)₂) و M /۰ .۵ اسید فسفریک (H₃PO₄) به روش هم‌رسوبی شیمیایی سنتز می‌شوند. سپس برای دستیابی به اندازه دانه‌های بلوری ریزتر و سطح ویژه بالاتر به مدت ۴ ساعت در دمای ۹۱۷°C تحت عملیات حرارتی قرار می‌گیرد. جدول (۱) شرایط سنتز نانو پودر بلوری ویتللاکیت و عملیات حرارتی انجام شده را نشان می‌دهد.

جدول ۱: شرایط سنتز نمونه ویتللاکیت خام WH₆ و عملیات حرارتی انجام شده بر روی آن (نمونه WH_{6/2})، (دماهی واکنش سنتز ویتللاکیت ۷۰°C، زمان واکنش سنتز ویتللاکیت ۱۰ ساعت و زمان پیرسازی محلول به دست آمده ۱۸ ساعت به صورت ثابت در نظر گرفته شده است)

نمونه	مقدار کلسیم هیدروکسید (mol)	مقدار کلسیم هیدروکسید (ml)	pH	دمای عملیات حرارتی (°C)	زمان عملیات حرارتی (h)	اندازه دانه‌های بلوری (nm)
WH ₆	۰/۳۷	۰/۱۳	۲۰۰	۹۱۷	•	۶۱
WH _{6/2}	۰/۳۷	۰/۱۳	۲۰۰	۹۱۷	۴	۲۵

برای ارزیابی زیست‌فعالی و زیست‌تخریب‌پذیری نانوپودر بلوری ویتللاکیت به دست آمده قبل و پس از عملیات حرارتی، مقدار ۲ گرم از نانوپودر ویتللاکیت را در داخل ۴۰ میلی‌لیتر محلول شبیه‌سازی شده بدن (pH=۷/۴) با نسبت پودر به محلول ۰/۵ گرم بر میلی‌لیتر قرار داده و به مدت ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز در داخل دستگاه انکوباتور در دمای (۳۷ ± ۰/۵°C) نگهداری می‌کنیم. در طی این مدت تعییرات pH محلول و تغییرات وزنی پودرها را به طور منظم ثبت می‌کنیم. پس از پایان زمان مقرر، پودرهای باقی‌مانده را به وسیله کاغذ صافی از محلول جدا کرده، با آب مقطر شستشو داده و خشک می‌کنیم.

همچنین برای بررسی میزان پایداری ویتللاکیت در محدوده‌های pH مخصوصاً مختلف، مقدار ۱ گرم از پودر ویتللاکیت سنتز شده را در ۱۰۰ میلی‌لیتر از آب مقطر با pH≈۷، ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر سدیم هیدروژن فسفات/ سدیم هیدروکسید با ۱۲ pH≈۱۲ و ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول فسفریک اسید با ۳-۶ pH≈۳ به مدت ۲۴ ساعت پیرسازی می‌کنیم و تغییرات وزنی نمونه‌ها را برای تخمین میزان اتحالان پذیری آن‌ها، مورد بررسی قرار می‌دهیم. تغییرات وزنی نمونه‌های ویتللاکیت نیز با استفاده از رابطه (۱) تعیین می‌شود.

$$(رابطه ۱) \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100$$

که در رابطه (۱) W₁ وزن نمونه ویتللاکیت قبل از قرارگیری در محلول و W₂ وزن نمونه بعد از قرارگیری در محلول می‌باشد.

۲- ارزیابی و مشخصه‌یابی مواد سنتز شده

برای مطالعات فازی پودرهای به دست آمده، میزان بلورینگی و اندازه بلورک‌ها از آنالیز پراش اشعه ایکس (XRD) مدل

¹ Bone morphogenic proteins

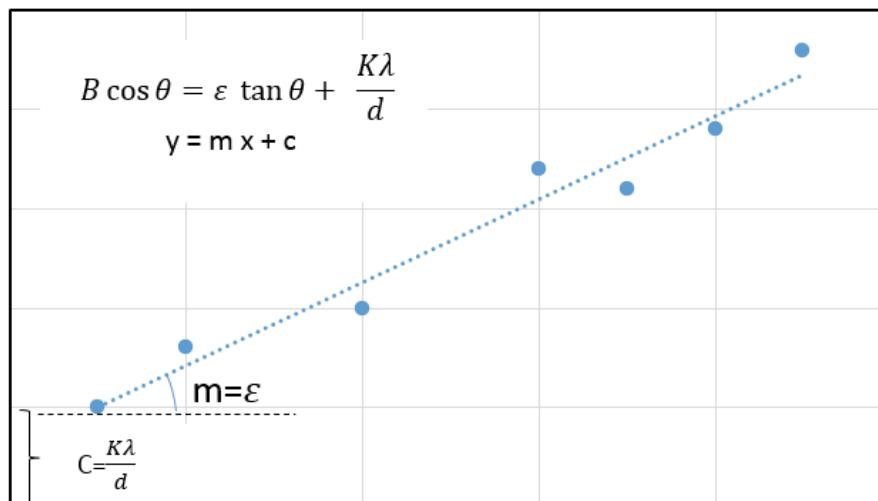
² Hemostatic agent

³ Simulated Body Fluid



Siemens Diffractometer D-500 ساخت استفاده شد. آنالیز پراش اشعه ایکس با تابش Cu(Kα) با طول موج $1/54\text{ \AA}^{\circ}$ در محدوده $5-80^{\circ} = 2\theta$ انجام گرفت. برای تعیین اندازه بلورک‌ها از رابطه ویلسون-هال استفاده شد. بر اساس این رابطه عرض پیک در نیمه شدت بیشینه (FWHM) تابعی از اندازه دانه و همچنین کرنش‌های درون شبکه است. در این روش با استفاده از داده‌های استخراج شده از الگوی پراش، یک خط رسم می‌شود که شب خط معادل کرنش شبکه و عرض از مبدأ خط معادل با اندازه بلورک‌ها است. به همین دلیل در این پژوهش برای تعیین ابعاد بلورک‌ها به جای رابطه شر از رابطه ویلسون-هال استفاده شد.

آنالیزهای انتقال فوریه فروسرخ (FT-IR) در محدوده موج $4000-400\text{ cm}^{-1}$ به منظور بررسی ساختار شیمیایی و پیوندهای پودرهای حاصل و تکمیل تایید نتایج به دست آمده از آنالیز XRD با استفاده از دستگاه مدل Tensor ساخته شرکت Bruker کشور آلمان انجام شد. همچنین برای بررسی یون‌های کلسیم، منیزیوم و فسفر آزاد شده از پودر ویتلاتکیت و محلول شبیه‌سازی شده بدن انجام شد. هنگام قرارگیری ویتلاتکیت در داخل محلول مذکور، از دستگاه آنالیز اسپکترومتری نشری پلاسمای جفت شده القایی (SBF)، به هنگام قرارگیری ویتلاتکیت در داخل محلول مذکور، از دستگاه آنالیز اسپکترومتری نشری پلاسمای جفت شده القایی (ICP-OES) ساخت کشور آمریکا استفاده شد.



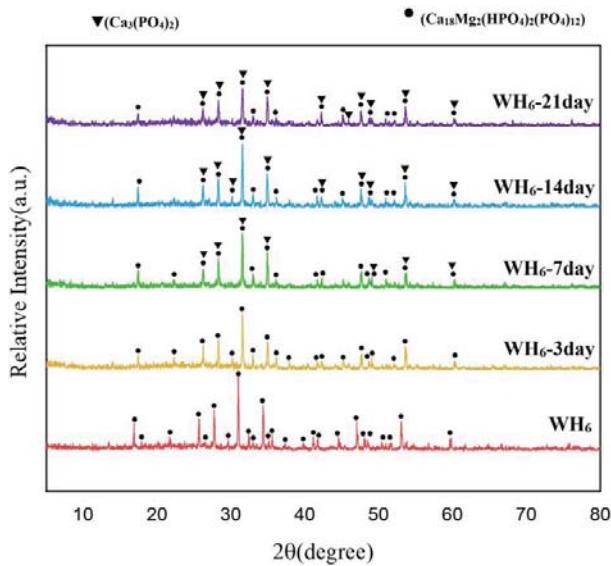
شکل ۱: نمودار رابطه ویلسون-هال

۳- نتایج و بحث

شکل ۲ و ۳ نتایج آنالیز پراش اشعه ایکس^۱ دو نمونه ویتلاتکیت سنتز شده به صورت خام و عملیات حرارتی شده را نشان می‌دهد. همانطور که مشخص است، هر دو نمونه WH₆ و WH_{6/2} در طی ۲۱ روز غوطه‌وری در داخل محلول شبیه‌سازی شده بدن، پایدار نسبی خود را حفظ کردند. این پایداری نشان داد، به هنگام قرارگیری ویتلاتکیت در داخل بدن، این ماده کارایی خود را حفظ کرده و زیست‌سازگاری خوبی را از خود نشان می‌دهد.

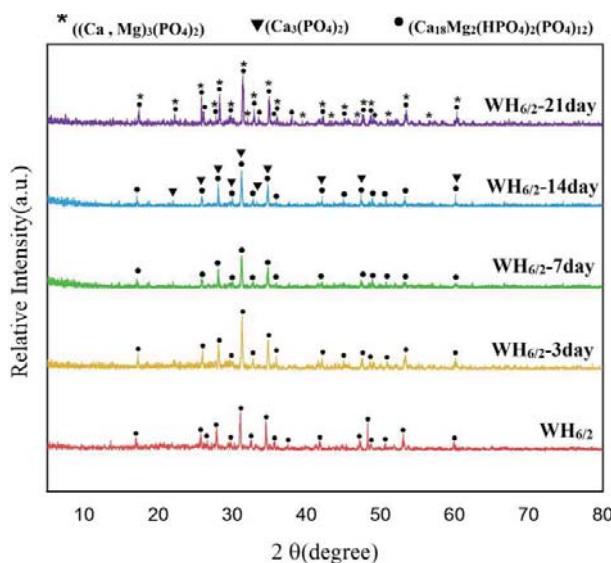
در نمونه WH₆ (شکل ۲) با افزایش زمان غوطه‌وری نمونه در داخل محلول شبیه‌سازی شده بدن تا ۷ روز، روند انحلال آن آغاز شده و شدت پیک‌ها و اندازه دانه‌ها از حدود ۶۵ nm به ۳۵ nm کاهش یافت. از روز ۷ تا روز ۱۴ با افزایش میزان رهایش یون‌های کلسیم و فسفر از نمونه ویتلاتکیت، فاز تری‌کلسیم فسفات (Ca₃(PO₄)₂) بر روی سطح نمونه‌ها شروع به شکل‌گیری کرد. شدت پیک‌ها با ایجاد فاز بلوری جدید افزایش یافت. پس از ۱۴ روز، فاز بلوری تری‌کلسیم فسفات ایجاد شده بر روی سطح ویتلاتکیت، شروع به رشد کرده و به دلیل افزایش اندازه بلورهای تشکیل شده تا ۵۰ nm، شدت پیک‌ها کاهش یافتد. با تشکیل فاز زیست‌فعالتری کلسیم فسفات بر روی سطح نمونه می‌توان گفت، ویتلاتکت در طی ۲۱ روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن، زیست‌سازگاری و زیست‌فعالی نسبتاً خوبی را از خود نشان می‌دهد.

^۱ X-ray diffraction Analysis



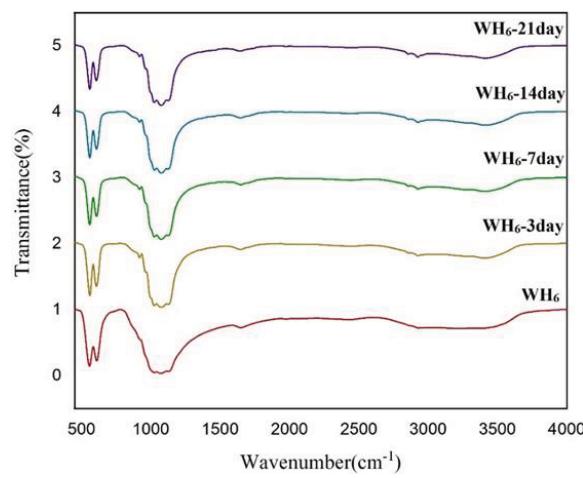
شکل ۲: الگوی پراش اشعه ایکس نمونه ویتلاکیت WH_6 قبل و بعد از قرارگیری در محلول شبیه‌سازی شده بدن

در نمونه $WH_{6/2}$ (شکل ۳)، با شروع قرارگیری نمونه در داخل محلول شبیه‌سازی بدن به دلیل سطح ویژه بالا، اندازه بلورهای کمتر (۲۵ nm) و واکنش‌پذیری مناسب، روند انحلال آن سریع‌تر از نمونه خام آغاز شد. با شروع انحلال نمونه تا روز ۱۴ام، یون‌های کلسیم، منیزیوم و فسفر رهایش یافته از ویتلاکیت و موجود در محلول شبیه‌سازی شده بدن، با یکدیگر واکنش داده و باعث شکل‌گیری فاز تری‌کلسیم فسفات $(Ca_3(PO_4)_2)$ بر روی سطح نمونه شدند. با گذشت ۲۱ روز، میزان یون‌های منیزیوم رهایش یافته از نمونه ویتلاکیت $WH_{6/2}$ به حدی رسیدند که توانایی واکنش با فاز تری‌کلسیم فسفات تشکیل شده بر روی سطح نمونه را یافتند. در نتیجه فاز ویتلاکیت و تری‌کلسیم منیزیوم فسفات بر روی سطح نمونه‌ها شروع به شکل‌گیری کرده و اندازه بلورها تا حدود ۴۳ nm افزایش یافت. با تشکیل مجدد فاز ویتلاکیت و تری‌کلسیم منیزیوم فسفات بر روی سطح نمونه‌ها و افزایش اندازه دانه‌ها می‌توان گفت نمونه ویتلاکیت عملیات حرارتی شده زیست‌فعالی بهتری را در مقایسه با نمونه خام از خود نشان می‌دهد.

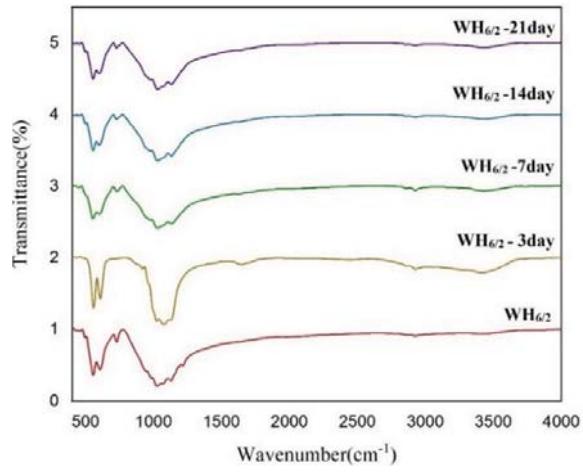


شکل ۳: الگوی پراش اشعه ایکس نمونه ویتلاکیت $WH_{6/2}$ قبل و بعد از قرارگیری در محلول شبیه‌سازی شده بدن

نتایج طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ¹ نمونه‌های ویتللاکیت در شکل‌های ۴ و ۵ آمده است. همانطور که مشخص است، وجود پیک شاخص در عدد موج 872 cm^{-1} در تمامی نمونه‌ها مربوط به گروه‌های فسفاتی HPO_4^{2-} است، که مشخصه‌ی وجود ویتللاکیت زیستی استخوانی در این نمونه می‌باشد. همچنین طیف‌های موجود در عدد موج 1630 cm^{-1} و 3400 cm^{-1} در نمونه‌ها می‌تواند مربوط به گروه هیدروکسیل (OH^-) آب جذب شده توسط ویتللاکیت باشند. این پیک‌ها با گذشت زمان تا ۲۱ روز، تیزتر شده‌اند. در نمونه WH_6 (شکل ۴) با گذشت زمان غوطه‌وری از روز ۳ تا ۲۱ ام، پیکی در محدوده 918 cm^{-1} به وجود آمده است، که می‌تواند مربوط به باندهای ارتعاشات کششی و خمشی اتصالات O-P-O گروه‌های فسفاتی فاز کلسیم فسفاتی ایجاد شده باشد. پیک‌های موجود در 560 cm^{-1} ، 609 cm^{-1} و 1020 cm^{-1} همگی مربوط به گروه‌های فسفاتی (PO_4^{3-}) موجود در ویتللاکیت یا فاز تری‌کلسیم فسفاتی هستند. در طیف نمونه‌های $\text{WH}_{6/2}$ (شکل ۵) نیز از روز اول تا روز ۲۱ ام وجود پیک مربوط به گروه‌های گواه حضور ویتللاکیت و بتاتری‌کلسیم فسفات در این نمونه است.



شکل ۴: نمودار طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ نانوذرات پودری ویتللاکیت WH_6 قبل و بعد از قرارگیری در محلول (SBF)

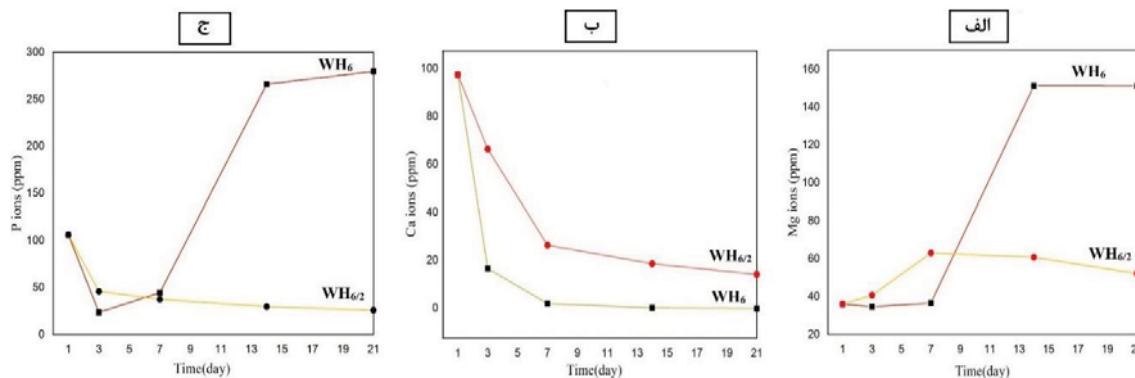


شکل ۵: نمودار طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ نانوذرات پودری ویتللاکیت $\text{WH}_{6/2}$ قبل و بعد از قرارگیری در محلول شبیه‌سازی شده بدن

پیک موجود در نمونه $\text{WH}_{6/2}$ در 1200 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی ((P)- OH^-) گروه‌های فسفاتی (PO_4^{3-}) هستند، که با افزایش زمان قرارگیری نمونه در محلول شبیه‌سازی شده بدن، رفتارهای از بین می‌روند. همچنین وجود باندهای جذبی در نمونه‌ها از روز ۷

¹ Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

تا روز ۲۱ ام، در حدود 720 cm^{-1} می‌تواند به دلیل باندهای گروههای فسفاتی ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) تری‌کلسیم فسفات ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) باشد. شکل ۶ میزان رهایش یون‌های مختلف کلسیم، منیزیوم و فسفر را از نمونه‌ها در داخل محلول شبیه‌سازی شده بدن نشان می‌دهد. با توجه به نتایج، ویتللاکیت در pH‌های زیستی بدن در مقایسه با سایر فازهای کلسیم فسفاتی انحلال‌پذیری بالاتری را دارد. در طی ۳ روز اول غوطه‌وری نمونه WH_6 غلظت هر ۳ یون منیزیوم، کلسیم و فسفر در محلول شروع به کاهش کردند. پس از گذشت ۳ روز در نمونه WH_6 میزان یون‌های کلسیم روند کاهشی خود را حفظ کرده و یون‌های منیزیوم و فسفر افزایش یافته‌ند و این روند تا روز ۲۱ ام ادامه یافت. با توجه بر این نکته که یون‌های منیزیوم و (HPO_4^{2-}) به عنوان مشخصه اصلی ویتللاکیت محسوب می‌شوند، بنابراین میزان رهایش آن‌ها در محیط شبیه‌سازی شده بدن حائز اهمیت است.

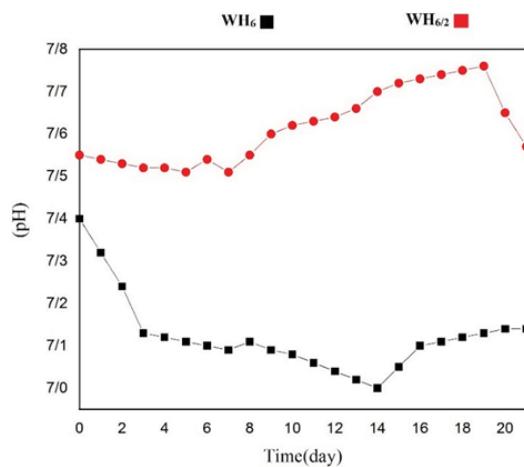


شکل ۶: تغییرات غلظت یون‌های مختلف (الف)، (ب) یون کلسیم، (ج) یون منیزیوم پس از ۲۱ روز قرارگیری در محلول شبیه‌سازی شده بدن

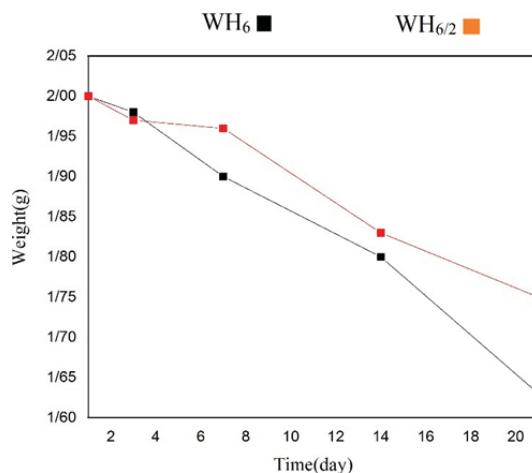
همانطور که در قسمت مقدمه اشاره شد [۲۰-۲۷]، افزایش میزان یون‌های منیزیوم رهایش یافته از ویتللاکیت در مجاورت محلول زیستی بدن، می‌تواند باعث افزایش فعالیت سلول‌های استخوان‌ساز و آنزیم‌های محرك استخوانی شود. که در نتیجه سرعت ترمیم استخوان نیز افزایش می‌یابد. در طی ۲۱ روز غوطه‌وری نمونه ویتللاکیت خام در محلول شبیه‌سازی شده بدن حدود 150 ppm یون منیزیوم رهایش یافته است. آزاد شدن این مقدار از یون‌های منیزیوم از ویتللاکیت می‌تواند نیمی از نیاز استخوان را به منیزیوم برای ترمیم آسیب‌دیدگی را تامین کند. منشا یون‌های فسفر رهایش یافته از ویتللاکیت در داخل محلول شبیه‌سازی شده بدن، می‌تواند حاصل از دو یون (HPO_4^{2-}) و (PO_4^{3-}) باشند. یون‌های (HPO_4^{2-}) نیز می‌توانند از محلول مذکور یا تخریب ویتللاکیت حاصل شوند. بنابراین به طور کلی با انحلال ویتللاکیت در محلول شبیه‌سازی شده بدن، میزان یون‌های فسفر افزایش پیدا می‌کند. با افزایش میزان یون‌های فسفر، سطح نمونه‌ها دارای بار منفی خواهد بود. این عامل می‌تواند سرعت بهبود استخوان را به هنگام قرارگیری ویتللاکیت در بدن افزایش دهد. زیرا بار منفی الکترواستاتیکی سطح ویتللاکیت، باعث افزایش جذب پروتئین‌های استخوان‌ساز می‌شود. یون‌های کلسیم نیز از روز ۷ ام تا روز ۲۱ ام با یون‌های (PO_4^{3-}) شروع به واکنش کرده و فاز تری‌کلسیم فسفاتی جدیدی ایجاد کردند. نمونه $\text{WH}_{6/2}$ به دلیل عملیات حرارتی انجام شده بر روی آن، سطح ویژه و واکنش‌پذیری بالاتری را دارد. سرعت انحلال این نمونه در داخل محلول شبیه‌سازی شده بدن در طی ۳ روز اول نسبت به سایر روزها بالاتر است. در این نمونه، از ابتدا تا روز ۲۱ ام، یون‌های کلسیم و فسفر کاهش یافته‌ند. که این کاهش به دلیل تشکیل فاز تری‌کلسیم فسفات بر روی سطح نمونه اتفاق افتاده است. میزان یون‌های منیزیوم رها شده از ویتللاکیت در طی ۷ روز اول افزایش یافته و سپس با شیب کمتری کاهش یافته است. افزایش میزان یون‌های منیزیوم در محیط محلول شبیه‌سازی شده بدن به هنگام غوطه‌وری نمونه، می‌تواند باعث جلوگیری از تشکیل فاز هیدروکسی آپاتیت شود. از روز ۷ تا روز ۲۱ ام، یون‌های منیزیوم رهایش یافته با فاز تری‌کلسیم فسفاتی ایجاد شده، مجدد و اکنش داده و باعث تشکیل فاز بلوری زیست‌فعال ویتللاکیت و تری‌کلسیم منیزیوم فسفات بر روی سطح نمونه شدند. در نتیجه می‌توان گفت، نمونه ویتللاکیت $\text{WH}_{6/2}$ در طی ۷ روز اول غوطه‌وری در داخل محلول شبیه‌سازی شده بدن دارای زیست تخریب‌پذیری بالاتر و از روز ۷ تا روز ۲۱ ام دارای زیست‌فعالی بیشتر است. این موضوع می‌تواند در ترمیم بافت‌های سخت



آسیب‌دیده عامل مهمی به شمار رود. تخریب اولیه ویتللاکت در محل آسیب‌دیدگی استخوان باعث رهایش یون‌های مختلف کلسیم، منیزیوم و فسفر شده و روند هدایت استخوانی را سرعت می‌بخشد. در ادامه با گذشت زمان، زیست‌فعالی این ماده باعث ایجاد فاز کلسیم منیزیوم فسفاتی شبیه استخوان در محل آسیب‌دیدگی می‌شود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، عملیات حرارتی ویتللاکت می‌تواند باعث بهبد کارایی این ماده در هنگام ترمیم استخوان شود. شکل ۷ و ۸ تغییرات pH و وزن نمونه‌های WH₆ و WH_{6/2} به هنگام قرارگیری نمونه‌ها به مدت ۲۱ روز در محلول شبیه‌سازی شده بدن را نشان می‌دهد. ویتللاکت در محیط زیستی بدن دارای انحلال پذیری بالاتر و پایداری کمتری است. زمانی که فاز خالص ویتللاکت (WH₆) در محلول مذکور وارد شود، مقدار قابل توجهی از یون‌های منیزیوم و (HPO₄²⁻) رهایش می‌یابند. به همین دلیل مقدار pH نمونه WH₆ پس از ۱۴ روز، رفتارهای کاهش یافته و از ۷/۴ به حدود ۷ رسید. همچنین مقدار وزن نمونه WH₆ نیز در طی ۲۱ روز در حدود ۱۸/۵ درصد وزنی (شکل ۸) کاهش یافت. همانطور که از شکل ۸ مشخص است، نمونه WH_{6/2} به دلیل تشکیل چندین فاز بلوری ثانویه زیست‌فعال بر روی سطح آن، تغییرات وزن کمتری را داراست، به طوری که میزان تغییرات وزن این نمونه در طی ۲۱ روز در حدود ۱۲/۵ درصد وزنی است. به طور کلی می‌توان گفت، میزان تغییرات pH نمونه‌ها همواره در محدوده خشی باقی می‌ماند. با توجه به شکل‌های ۷ و ۸- قسمت الف میزان رهایش یون‌های منیزیوم با تغییرات pH تغییری نکرده و با یک روال ثابت افزایش یافته است. بنابراین می‌توان گفت، ویتللاکت به هنگام پیشرفت عفونت یا التهاب در بدن و تغییرات pH، کارایی خود را حفظ می‌کند.



شکل ۷: نمودار تغییرات pH نمونه‌های ویتللاکت قرارداده شده در محلول شبیه‌سازی شده بدن

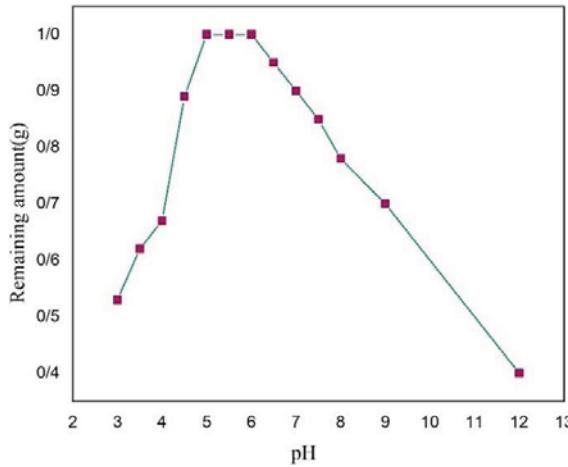


شکل ۸: نمودار تغییرات وزن نمونه‌های ویتللاکت قرارداده شده در محلول شبیه‌سازی شده بدن به مدت ۲۱ روز

۴- نتیجه‌گیری

طبق نتایج به دست آمده، با قرار دادن نمونه ویتللاکیت خام در محلول شبیه‌سازی شده بدن به مدت ۲۱ روز، یون‌های (Ca^{2+}), (Mg^{2+}) و (PO_4^{3-}) به طور پیوسته رهایش یافتند. این یون‌های رهایش یافته با یکدیگر شروع به واکنش کرده و موجب ایجاد فاز تری کلسیم فسفات بر روی سطح نمونه ویتللاکیت شدند. ایجاد این فاز بلوری زیست‌فعال نشان‌دهنده این است که ویتللاکیت به هنگام قرارگیری در داخل بدن، می‌تواند باعث ایجاد فاز کلسیم فسفات شبه استخوانی در محل آسیب‌دیدگی استخوانی شده و فرایند کانی‌سازی استخوان را سرعت بخشد. همچنین غوطه‌وری نمونه ویتللاکیت خام به مدت ۲۱ روز در محلول شبیه‌سازی بدن، می‌تواند موجب رهایش ۱۵۰ ppm یون منیزیوم شده و بخشی از نیاز روزانه بدن را به منیزیوم تأمین کند.

نمونه ویتللاکیت عملیات حرارتی شده، به علت ریزدانه بودن و سطح ویژه بالا، واکنش پذیری بیشتری را در محلول شبیه‌سازی شده بدن (SBF) از خود نشان داد. یون‌های رهایش یافته از این نمونه، با واکنش با یکدیگر موجب تشکیل فاز کلسیم منیزیوم فسفات در طی ۱۴ روز و تشکیل فاز بلوری ویتللاکیت از روز ۱۴ تا ۲۱ ام شدند. این عوامل نشان‌دهنده زیست‌سازگاری و زیست‌فعالی مناسب نانوپودرهای بلوری ویتللاکیت عملیات حرارتی شده بود. ایجاد دوباره ویتللاکیت بر روی سطح نشان داد افزایش



شکل ۹: نمودار تغییرات وزن نمونه ویتللاکیت (WH_6) در pHهای متفاوت



میزان رهایش یون‌های منیزیوم از ویتلایکیت به هنگام غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن می‌تواند از تشکیل فازهایی مانند هیدروکسی آپاتیت جلوگیری کرده و فاز ویتلایکیت بر روی سطح ایجاد کند. همچنین با توجه به سرعت رهایش یون‌ها در نمونه عملیات حرارتی شده می‌توان گفت، این نمونه در طی ۷ روز اول غوطه‌وری زیست‌تخربی‌پذیری بالاتر و از روز ۷ تا روز ۲۱ زیست‌فعالی بالاتری را دارد است. این امر می‌تواند علاوه بر ایجاد فاز بلوری مشابه استخوان طبیعی بدن در محل آسیب‌دیدگی، فرایند هدایت استخوانی را نیز بهبود بخشد.

با بررسی میزان تغییرات pH و وزن نمونه‌ها در طی ۲۱ روز غوطه‌وری نتیجه گرفته شد، ویتلایکیت می‌تواند در شرایط زیستی خنثی بدن نیز پایداری نسبی خود را حفظ کند، با این وجود بهترین pH برای پایداری ویتلایکیت در محدوده pH اسیدی است. همچنین بررسی میزان تغییرات وزن نمونه‌ها نشان داد، تغییرات وزن نمونه ویتلایکیت خام در حدود ۳۲/۴۳ درصد وزنی بیشتر از نمونه بعد از عملیات حرارتی بود که نشانگر زیست‌تخربی‌پذیری بیشتر نمونه خام می‌باشد.

با مقایسه نتایج حاصل از غوطه‌وری نمونه ویتلایکیت خام و عملیات حرارتی شده در محلول شبیه‌سازی شده بدن می‌توان گفت، انجام عملیات حرارتی موجب بهبود خواص زیست‌فعالی ویتلایکیت شده است.

مراجع

- [1]. Sheikh, Zeeshan, Shariq Najeeb, Zohaib Khurshid, Vivek Verma, Haroon Rashid, and Michael Glogauer. "Biodegradable materials for bone repair and tissue engineering applications." *Materials* 8, no. 9 (2015): 5744-5794.
- [2]. Cama, G. "Calcium phosphate cements for bone regeneration." In *Biomaterials for Bone Regeneration*, pp. 3-25. Woodhead Publishing, 2014.
- [3]. Kim, Hwan D., Hae Lin Jang, Hyo-Yong Ahn, Hye Kyoung Lee, Jungha Park, Eun-seo Lee, Eunjee A. Lee et al. "Biomimetic whitlockite inorganic nanoparticles-mediated in situ remodeling and rapid bone regeneration." *Biomaterials* 112 (2017): 31-43.
- [4]. آذریدخت جلالی چهرمی، مجتبیه میرحسینی، حسین ملاحی‌حسینی، حبیب نیکوکار، "موربری بر داریست‌های رایج در مهندسی بافت به منظور بازسازی بافت استخوان"، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوqi بیزد، دوره بیست و هشتم، شماره یک، فروردین ۱۳۹۹.
- [5]. Cheng, Hao, Rosa Chabok, Xiaofei Guan, Aditya Chawla, Yuxiao Li, Ali Khademhosseini, and Hae Lin Jang. "Synergistic interplay between the two major bone minerals, hydroxyapatite and whitlockite nanoparticles, for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells." *Acta biomaterialia* 69 (2018): 342-351.
- [6]. Jin, Yuan-Zhe, Guang-Bin Zheng, Hae Lin Jang, Kyung Mee Lee, and Jae Hyup Lee. "Whitlockite promotes bone healing in rabbit ilium defect model." *Journal of Medical and Biological Engineering* 39, no. 6 (2019): 944-951.
- [7]. Jang, Hae Lin, Hye Kyoung Lee, Kyoungsuk Jin, Hyo-Yong Ahn, Hye-Eun Lee, and Ki Tae Nam. "Phase transformation from hydroxyapatite to the secondary bone mineral, whitlockite." *Journal of Materials Chemistry B* 3, no. 7 (2015): 1342-1349.
- [8]. Batool, Sadaf, Usman Liaqat, Zakir Hussain, and Manzar Sohail. "Synthesis, characterization and process optimization of bone whitlockite." *Nanomaterials* 10, no. 9 (2020): 1856.
- [9]. Jang, Hae Lin, Kyoungsuk Jin, Jaehun Lee, Younghye Kim, Seung Hoon Nahm, Kug Sun Hong, and Ki Tae Nam. "Revisiting whitlockite, the second most abundant biomineral in bone: nanocrystal synthesis in physiologically relevant conditions and biocompatibility evaluation." *ACS nano* 8, no. 1 (2014): 634-641.
- [10]. Jang, Hae Lin, Guang Bin Zheng, Jungha Park, Hwan D. Kim, Hae-Ri Baek, Hye Kyoung Lee, Keunho Lee et al. "In Vitro and In Vivo Evaluation of Whitlockite Biocompatibility: Comparative Study with Hydroxyapatite and β -Tricalcium Phosphate." *Advanced healthcare materials* 5, no. 1 (2016): 128-136.
- [11]. Cacciotti, Ilaria, Alessandra Bianco, Mariangela Lombardi, and Laura Montanaro. "Mg-substituted hydroxyapatite nanopowders: synthesis, thermal stability and sintering behaviour." *Journal of the European Ceramic Society* 29, no. 14 (2009): 2969-2978.
- [12]. Jeong, Jiwoon, Jung Hun Kim, Jung Hee Shim, Nathaniel S. Hwang, and Chan Yeong Heo. "Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration." *Biomaterials research* 23, no. 1 (2019): 1-11.
- [13]. Qi, Chao, Ying-Jie Zhu, Feng Chen, and Jin Wu. "Porous microspheres of magnesium whitlockite and amorphous calcium magnesium phosphate: microwave-assisted rapid synthesis using creatine phosphate, and application in drug delivery." *Journal of Materials Chemistry B* 3, no. 39 (2015): 7775-7786.
- [14]. Wang, G. C., Z. F. Lu, and H. Zreiqat. "Bioceramics for skeletal bone regeneration." In *Bone substitute biomaterials*, pp. 180-216. Woodhead Publishing, 2014.
- [15]. Kamakura, S., Y. Sasano, T. Shimizu, K. Hatori, O. Suzuki, M. Kagayama, and K. Motegi. "Implanted octacalcium phosphate is more resorbable than β -tricalcium phosphate and hydroxyapatite." *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese*

- Society for Biomaterials 59, no. 1 (2002): 29-34.
- [16]. O'Neill, Edward, Guleid Awale, Leila Daneshmandi, Obum Umerah, and Kevin W-H. Lo. "The roles of ions on bone regeneration." *Drug discovery today* 23, no. 4 (2018): 879-890.
- [17]. Cacciotti, Ilaria, Alessandra Bianco, Mariangela Lombardi, and Laura Montanaro. "Mg-substituted hydroxyapatite nanopowders: synthesis, thermal stability and sintering behaviour." *Journal of the European Ceramic Society* 29, no. 14 (2009): 2969-2979.
- [18]. Bauer, Leonard, Maja Antunović, Anamarija Rogina, Marica Ivanković, and Hrvoje Ivanković. "Bone-mimetic porous hydroxyapatite/whitlockite scaffolds: preparation, characterization and interactions with human mesenchymal stem cells." *Journal of Materials Science* 56, no. 5 (2021): 3947-3969.
- [19]. Stipniece, Liga, Kristine Salma-Ancane, Dmitrijs Jakovlevs, Natalija Borodajenko, and Liga Berzina-Cimdina. "The study of magnesium substitution effect on physicochemical properties of hydroxyapatite." *Materials Science and Applied Chemistry* 28 (2013): 51-57.
- [20]. Salma-Ancane, Kristine, Liga Stipniece, Andris Putnins, and Liga Berzina-Cimdina. "Development of Mg-containing porous β -tricalcium phosphate scaffolds for bone repair." *Ceramics International* 41, no. 3 (2015): 4996-5004.
- [21]. Wang, Caifeng, Ki-Jae Jeong, Hee Jeong Park, Mirim Lee, Su-Chak Ryu, Dae Youn Hwang, Kyoung Hyup Nam, In Ho Han, and Jaebeom Lee. "Synthesis and formation mechanism of bone mineral, whitlockite nanocrystals in tri-solvent system." *Journal of Colloid and Interface Science* 569 (2020): 1-11.
- [22]. Luna-Domínguez, Jorge Humberto, Héctor Téllez-Jiménez, Heriberto Hernández-Cocoletzi, Margarita García-Hernández, José Aaron Melo-Banda, and Håkan Nygren. "Development and in vivo response of hydroxyapatite/whitlockite from chicken bones as bone substitute using a chitosan membrane for guided bone regeneration." *Ceramics International* 44, no. 18 (2018): 22583-22591.
- [23]. Shah, Furqan A. "Magnesium whitlockite—omnipresent in pathological mineralisation of soft tissues but not a significant inorganic constituent of bone." *Acta Biomaterialia* 125 (2021): 72-82.
- [24]. Muthiah Pillai, Nivedhitha Sundaram, Kalyani Eswar, Sivashanmugam Amirthalingam, Ullas Mony, Praveen Kerla Varma, and Rangasamy Jayakumar. "Injectable nano whitlockite incorporated chitosan hydrogel for effective hemostasis." *ACS Applied Bio Materials* 2, no. 2 (2019): 865-873.
- [25]. Habraken, W. J. E. M., J. G. C. Wolke, and J. A. Jansen. "Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering." *Advanced drug delivery reviews* 59, no. 4-5 (2007): 234-248.
- [26]. Cheng, Hao, Aditya Chawla, Yafeng Yang, Yuxiao Li, Jin Zhang, Hae Lin Jang, and Ali Khademhosseini. "Development of nanomaterials for bone-targeted drug delivery." *Drug Discovery Today* 22, no. 9 (2017): 1336-1350.
- [27]. Chang, Yuchen, Renliang Zhao, Hui Wang, Libin Pang, Jingxin Ding, Yifan Shen, Yanjie Guo, and Deping Wang. "A novel injectable whitlockite-containing borosilicate bioactive glass cement for bone repair." *Journal of Non-Crystalline Solids* 547 (2020): 120291.



Evaluation of Bioactivity and Biodegradability of Whitlockite Nanoparticles ($\text{Ca}_{18}\text{Mg}_2(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_{12}$) for Bone Regeneration

Sanaz Chaei Kazran^{1*} and Mohammad Rezavani²

¹ Master of materials Science and Engineering student, Materials Engineering Department, Tabriz University

² Full professor, Materials Engineering Department, Tabriz University

* sanazchk4@gmail.com

Abstract: Treatment and repair of bone defects, has been a major challenge for bone regeneration activists for a long time. In treating bone defects, using a proper bone graft is essential. Among various kinds of bone grafts, bio ceramics alloplastic grafts are considered, owing to their excellent non-toxicity, non-allergenicity, anti-inflammatory, biocompatibility and bio-functionality.

The bio-ceramics like Whitlockite (WH: $\text{Ca}_{18}\text{Mg}_2(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_{12}$) possess same chemical, structural and biological properties with human bones, have been widely used as bone substitutes. It is the second most abundant mineral in living bone, which can contain 26-58 wt% of bone tissues.

In this study, we investigated the biocompatibility, bioactivity and biodegradability of Whitlockite nano powders, by immersing samples in Simulated Body Fluid (SBF) for 3, 7, 14 and 21 days. The obtained samples were characterized using X-ray Diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and inductively coupled plasma -optical emission spectrometry (ICP-OES).

Results indicated that, WH nano powders had significantly biocompatibility and biodegradability due to formation of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $(\text{Ca}, \text{Mg})_3(\text{PO}_4)_2$ and Whitlockite on surface of WH samples. Additionally, the WH nano powders exhibited excellent mineralization ability in vitro with continuously released Ca^{2+} , Mg^{2+} and HPO_4^{2-} when immersed in (SBF). Furthermore, the pH changes of both samples were in the range of natural biological pH of the human body, which indicates the appropriate biocompatibility of the samples. However, the stability of whitlockite in SBF is at the highest level in $4 < \text{pH} < 5$.

The results of the ICP analysis of the raw Whitlockite sample showed that about 150 ppm of magnesium ions are released from Whitlockite inside the Simulated Body Fluid during 21 days of immersion, which can provide a part of the body's daily magnesium needs.

Also, by examining the weight changes of the samples within the SBF, it will be seen that the weight loss rate of the raw whitlockite sample is concerning 32.11% quite the heat treated whitlockite sample, which indicates the upper biodegradability.

Keywords: Whitlockite, Nano particles, Bioactive, Biodegradable, Bone regeneration, Bone graft, Calcium Phosphate Bioceramics.