Iranian Journal of Medical Microbiology | ISSN:2345-4342

Review on Biological Synthesis of Nano-Hydroxyapatite and Its Application in Nano-Medicine

Sabere Nouri[1], Rasoul Roghanian[1]*, Giti Emtiazi[1]

1. *Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran*

10.30699/ijmm.15.4.369

ABSTRACT

Hydroxyapatite (HA) has many applications in medicine, dentistry, diagnosis, drug delivery systems, sewage treatment, bone remodeling, concentrating bacteria, covering implants, and antibacterial activity. Despite the numerous current applications of calcium phosphate compounds, particularly HA, their producing methods are being investigated to find the best processes. Several chemical and biological methods are used in calcium phosphate compounds synthesis. Researches have shown that compared to micrometer models, nanostructured HA has higher mechanical features and better biocompatibility in the human body. These properties optimize when nanometer components of HA are in similar size and shape with the least agglomerations. Biomineralization by microorganisms, which is a bacterial route, is a recent HA synthesis method. This paper is a review on the biosynthesis of HA emphasizing microbial methods. In this method, some bacteria and mold could be used in the nanometer production of HA. This type of bacterium commonly has a high amount of alkaline phosphatase enzymes. Desirable similarity to natural HA in the human body is the noticeable features of bacterial HA. Uniformity in the shape and size of synthesized particles that have the same crystallization is of other merits. Producing bacterial HA is easily reachable, one-step, inexpensive, harmless, and with high purity, and contrary to chemical synthesis, does not need heat treatment and precise pH adjustment.

Keywords: Nanostructure, Hydroxyapatite, Alkaline phosphatase, Biomineralization

Received: 2021/03/02; **Accepted**: 2021/07/11; **Published Online:** 2021/08/16

Corresponding Information: **Rasoul Roghanian,** , Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
Email: rasoul_roghanian@yahoo.co.uk

Copyright © 2021, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online

Nouri S, Roghanian R, Emtiazi G. Review on Biological Synthesis of Nano-Hydroxyapatite and Its Application in Nano-Medicine. Iran J Med Microbiol. 2021; 15 (4) :369-383

Download citation: BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks

Send citation to: Mendeley Zotero RefWorks

Introduction

Hydroxyapatite (HA) is one of the most important bioceramics utilized in medicine, and it has been intensively explored in recent years. It has a chemical composition and structure that is remarkably similar to bone and teeth minerals. After being implanted in the body, this bioactive and biocompatible substance interacts well with bone tissue and forms a direct bond with it **(1, 2)**. HA binds, grows, and stimulates the synthesis of new bone tissue and stimulates bone growth into its porous space. This compound has the bone tendency, doesn't absorb and decompose, and ultimately achieves good adhesion to bone tissue **(3, 2)**. Therefore, due to the compatibility of HA with bone tissue and soft tissues, this substance is the best substitute for hard tissues of the body such as bones and teeth. Generally, HA forms up 70% of human hard tissue as a mineral phase. The term "apatite" refers to a group of compounds that are structurally similar but

not chemically identical. As a result, the term apatite refers to a description rather than a substance **(4, 2)**.

Materials and Methods

The current study is a review, and all sources were gathered and retrieved from authentic databases in English. The search was conducted using the keywords nano, hydroxyapatite, biological synthesis, nanobiotechnology, and microorganisms on Google Scholar, Science Direct, and PubMed. It should also be noted that this research is based on articles published by the corresponding authors, Dr. Giti Emtiazi and Dr. Rasoul Roghnian.

Results

1- Properties and crystallography of HA

The apatite family is crystallized by the arrangement of a hexagonal prism with parallelograms. HA also ideally has a hexagonal structure with dimensions of 2 x 30 x 50 nm and has a specific composition of $Ca_{10}(HPO_4)_6(OH)_2$ and a definite crystallographic structure. The chemical composition of pure hydroxyapatite is as follows: 39.68 percent calcium, 18.45 percent phosphorus, with a weight ratio of calcium to phosphorus of 2.151 and a molar ratio of calcium to phosphorus of 1.67. **(5)**.

HA has a complex and relatively large single cell in which the integrity is likely to be lost. When the atomic ratio of calcium to phosphorus in hydroxyapatite is 1.6, it is totally stoichiometric. Therefore, due to the possibility of changes in the structure and its composition, which leads to the formation of nonstoichiometric HAs. Phosphate ions, calcium ions, and hydroxyl groups in HA can be replaced by other ions. These changes have a special effect on physical properties, crystal structure, the molar ratio of calcium to phosphorus, and the solubility of HA under physiological conditions **(1, 2)**. Although it is insoluble in water, this substance is regarded as a degradable material (with slow disintegration rate) **(6)**.

2- Applications of HA

The main applications of HA in medicine, dentistry, diagnostics, catalysis, and sewage treatment are briefly outlined here. Direct application in orthopaedics **(7)**, bone tissue engineering **(8)**, implant coating **(9)**, antibacterial effect **(10)**, drug delivery systems (**11, 12**), and application in dentistry **(15)** are some medical applications.

In general, bone tissue can self-repair; however, in cases such as serious bone tissue damage and aging, the bone's ability to self-repair is eliminated. The researchers then introduced HA for replacement in bone tissue. Because of HA's biocompatibility and bioactivity, it can drive the growth of bone cells into its porous space, resulting in bone cell differentiation and proliferation. Therefore, this material is used in bone tissue engineering and bone cement engineering. Therefore, HA has made significant progress in orthopedics and the placement of implants and bone grafts. HA is also used in oral and maxillofacial implants to increase the height of decayed gums that are unable to mount dentures and implant grafts. Tooth enamel caries can also be partially regenerated using HA toothpaste, according to studies. Because HA has a high affinity for biological substances, it can lead to successful transplantation by replacing drugs, especially antibiotics and immunosuppressive drugs, in implants coated with HA **(7-12, 15)**.

Other applications such as non-medical included bacterial concentration **(13)**, removal of radioactive metals **(14)**, use in biosensors **(16)**, and the use of HA as a catalyst **(17)**.

3- Methods of synthesis of HA

Although calcium phosphate compounds had a wide range of uses in recent years, the optimal production methods are still being researched, particularly in the case of HA. Numerous chemical and biological methods are used to synthesize this substance, as follows **(1)**.

3-1- Chemical synthesis of HA

Nowadays, various chemical methods are used to produce HA nanocrystals, which depending on the type of method, produce products with different structures, appearance, and crystalline characteristics. Generally, chemical methods for the synthesis of HA can be divided into two categories: wet chemical synthesis methods and dry chemical synthesis methods **(18)**. Dry synthesis methods or anhydrous mechanical synthesis methods include solid-state reaction and mechano-chemical reaction **(19)**.

Considering raw materials, wet chemical reactions, including acid-base method, sol-gel method, ultrasonic-chemical synthesis, microwave synthesis reaction, multiple emulsion technique using templates or micelles, chemical deposition technique, preparation method using conversion hydrothermal and soluble ignition method. These methods usually use soluble salts such as calcium nitrate and calcium chloride, ammonium dihydrogen phosphate or diammonium hydrogen phosphate, and potassium phosphate. Table 1 summarizes the chemical synthesis methods of HA. **(1, 19)**.

Table 1. Comparison of chemical synthesis methods of HA (1, 18, 19).

	Method	Precursors	Conditions and mechanisms of synthesis	Size	Morphology	Crystallinity
Dry synthesis	Solid-state	$CaCO_3$ $CaHPO_4.2H_2O$	Temperatures above c1000	More than 500nm	variable	Almost high
	Mechano-chemical	CaO $CaHPO_4$	Mill with speed above 600rmp	More than 200nm	Variable	Almost high
Wet synthesis	Acid-base	$Ca(OH)_2$ H_3PO_4	Reaction between acid and base	Micron	Variable	Low
	Sol-ge	Urea EDTA $Ca(NO_3)_2$ NH_2PO_4	Molecular mixing of calcium and phosphorus in a jelly-like atmosphere	Nano	Generally spherical	Almost high
	Ultrasonic-chemical	$Ca(OH)_2$ H_3PO_4 $Ca(CH_3CO)_2$ $PO(OCH3)_3$	Create bubbles, burst bubbles and collide raw materials	Nano and micron	Generally needles like	Almost low
	Microwave	Ca PO_4	Heat and radiation waves	Micron	Variable	Almost low
	Multiple emulsion	Ca PO_4	Dissolve the reactant in water and emulsify water in oil	Nano and micron	Generally spherical	Almost low
	Chemical deposition	$Ca(NO_3)_2$ $(NH_4)_3HPO_4$	Sedimentation	Micron	Variable	Low
	Conversion hydrothermal	Ca PO_4	High pressure, high temperature	Micron	Variable (Generally dandelion like)	Almost low
	Soluble ignition	NH_2PO_4 $Ca(NO_3)_2$	Add oxidizing agents	Nano and micron	Variable (Generally needles like)	Almost low

According to the findings of Hsieh et al., the sol-gel method has advantages over the other chemical methods listed in Table 1. This method requires low-temperature treatment compared to other methods. Because chemical methods usually use very high temperatures to form crystals. However, the temperature required for the HA formation operation in the sol-gel method is much lower. It is more cost-effective than others, and compared to the products of other methods, the HA synthesized from this method has a unique form. It is also possible to achieve nano size in this method. Another advantage of sol-gel compared to other chemical methods is the ability of this method to synthesize HA nanoparticles with almost higher purity **(40)**.

3-2- Biological synthesis of HA

The bone tissue of most mammals, poultry, and fish is a major source of HA. This type of HA, as opposed to its synthetic type, is called biological or natural HA. Other sources of natural HA include coral, shrimp shells, snakeskin, hedgehog thorns, and some plants and algae. One of the most common sources of natural HA is mammalian bones such as livestock. This compound is obtained during long heat treatment at temperatures of about 1000 degrees Celsius. One of the major advantages of natural HA over chemical HA is that its physical structure and chemical makeup are identical to that of human bone tissue. For bioceramics like HA, the presence of a porous struc-ture with appropriate porosity is highly desirable, and the natural kind of HA provides this porous structure. The chemical composition also greatly affects the performance of HA. Large crystal bridges and large amounts of calcium oxide result in lower biocompatibility of HA. Components from the decomposition of HA also cause pH changes around the planting site. The benefits of natural HA include the presence of trace elements in bone tissue. Elements such as magnesium, sodium, potassium, iron, zinc, and other similar elements are present in very small amounts in bone tissue and play an important role in the process of bone repair and regeneration. Another significant advantage of natural HA is its relatively inexpensive and cost-effective process **(20, 21)**.

3-2-1- Bacterial Synthesis of HA

One of the new methods of synthesis of nanosized and natural HA is the microbial method or biomineralization method by microorganisms. As Emtiazi et al. previously proved that the bacterium can produce copper oxide and zinc oxide nanoparticles and listed many properties such as antibacterial properties for them, we decided that microorganism should be studied as a factory for the production of other nanoparticles **(22-26)**.

3-2-1-1- The role of Phosphatase Enzyme in the Formation of HA

Biomineralization is the process through which HA settles in the extracellular matrix during the osteogenesis process. Physiological mineralization occurs in hard tissue while calcification occurs in soft tissue. Tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) hydrolyzes pyrophosphate and supplies inorganic phosphate to promote mineralization. This enzyme is also present in the bacterium and the process mentioned in this microbe is also possible **(28)**.

Generally, there are two types of phosphatase enzymes in microorganisms. Generally, Acid phosphatase is outside the bacterial membrane, and Alkaline phosphatase is located in the periplasmic region of the bacterial membrane **(27, 29)**. Acid phosphatase enzymes can be used to make HA, although nanometer-sized HA crystals are larger since these enzymes are extracellular. Furthermore, the optimal pH for the activity of acidic phosphatase enzymes is below 5.8, at which point HA is demineralized and eliminated, albeit with the use of bacteria in the pericardial region that contains alkaline phosphatase. However, by using bacteria that have a high level of alkaline phosphatase in the periplasmic region and controlling the conditions, nanometer dimensions of HA with biocompatibility and bioactivity properties can be achieved. The optimum pH for the activity of alkaline phosphatase enzymes is 9 **(4, 30)**.

All alkaline phosphatase enzymes belong to the hydrolase enzymes group, which nonspecifically transfer phosphate groups from all phosphomonoester compounds $[R\text{-}O\text{-}PO_3]_n$ to hydroxyl-containing polyamines (OH) such as ethanolamines. In the structure of these metalloenzymes, there are two protein monomeric chains, two active zinc nuclei, and two cofactor sites for magnesium and calcium (Figure 1).

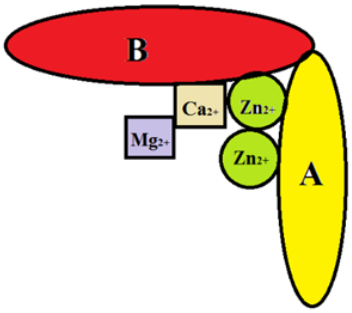


Figure 1. Schematic picture of alkaline phosphatase metaloenzyme. A and B: protein monomeric chain, Zn^{2+}: active site of zinc, Mg^{2+} and Ca^{2+}: cofactor site for magnesium and calcium. (Source: Authors)

The function of these enzymes can be described as follows: first, they release phosphate groups from phosphomonoester compounds. Then offer phosphate groups to hydroxyl in the limited periplasmic space. In the next step, cation attachment of Zn, Mg, and Ca will complete the nano crystallin HA synthesis.

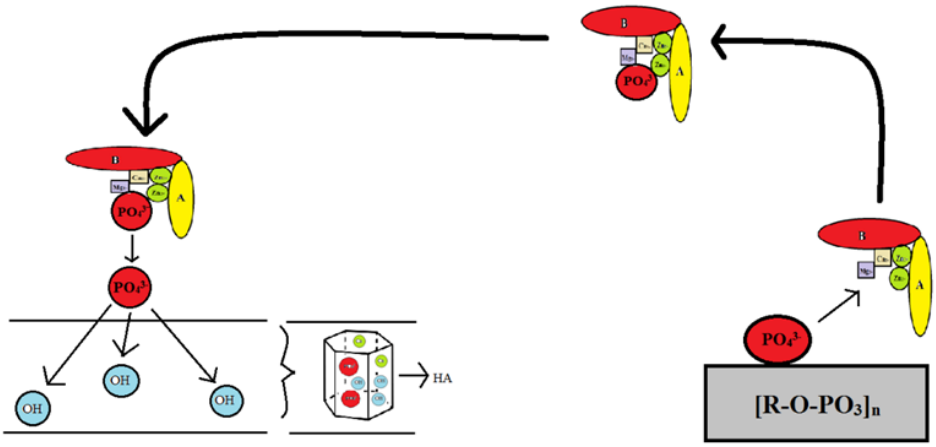


Figure 2. Expected process of HA crystals formation in bacteria and the role of alkaline phosphatase enzyme in this process. (Source: Authors)

Some gram-negative bacteria contain a group of alkaline phosphatase enzymes that can be hydroxylated by using these bacteria and adding simple phosphomonoester compounds such as glycerol-2-phosphate, using an alcohol receptor such as Tris, and by adding calcium ions, synthesized nanometer apatite in the bacterial periplasmic space. This spatial constraint plays a key role in the formation of HA in the form of hexagonal prisms and nanometer crystal clusters **(32)**.

3-2-1-2- The role of urease enzyme in the formation of HA

The enzyme urease is widely found in bacteria and is often used to produce microbial calcite. There are four regulatory models for the synthesis of urease enzymes in the microbial system. Constitutive urease is expressed steadily and independent of external conditions in the cell. Inducible urease is induced by an inducing molecule such as urea or other environmental conditions. Repressible urease is suppressed in the presence of ammonia, which is removed under nitrogen restriction and enzymatic activity is increased. Finally, developmental urease means that the organism expresses a variable expression of urease in different evolutionary stages **(33, 34)**.

Most microorganisms, with their ability to break down urea, use it as a source of nitrogen that is transported into the cellular cytoplasm by active transfer or inactive diffusion, where hydrolysis of urea releases ammonia molecules. Ammonia can then be absorbed directly by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway or by the action of glutamate dehydrogenase. An ideal microorganism for biocementation should be resistant to high concentrations of urea and calcium. This microorganism often has to have a high level of urease activity that is permanently produced or can be significantly induced. Urease-producing bacteria are divided into two groups based on their response to ammonia. There is a group in which the enzyme activity is not suppressed in the presence of ammonia and a group in which the urease activity is suppressed **(34, 35)**.

In the synthesis of urease HA, different amounts of $CaCl_2$ and NaH_2PO_4 are used, in which case the decomposition of urea by urease causes homogeneous deposition of HA, due to the release of OH ions during the process of hydrolysis of urea. The carbonate ions formed in these reactions can also enter the crystal structure of HA particles. Thus, a type of carbonate HA is formed that may have a very similar structure to apatite in human bones. The experimental results show that reducing the ratio of material concentration to urease concentration reduces the particle size to less than 100 nm and their morphology changes to a spherical shape. One of the advantages of urease enzyme in the formation of HA is that the presence of urease allows the decomposition of urea at a lower temperature and the enzyme is not consumed during the reaction **(36)**.

3-2-2- Fungal synthesis of HA

In the results of HA experiments, it has been observed that some fungi such as *Aspergillus niger* have the ability to stimulate the synthesis of HA in Potato Dextrose Agar (PDA) medium with appropriate concentrations of substances such as Na_2HPO_4 and $CaCo_3$, which are the main cause of HA crystals formation. Fungal metabolism produces an acidic subst-ance to dissolve CaCo, and the growth of micelles causes the uptake of Ca^{2+}, which leads to calcium-rich levels to promote the production of secondary apatite, which is eventually converted to HA (Figure 3) **(37)**.

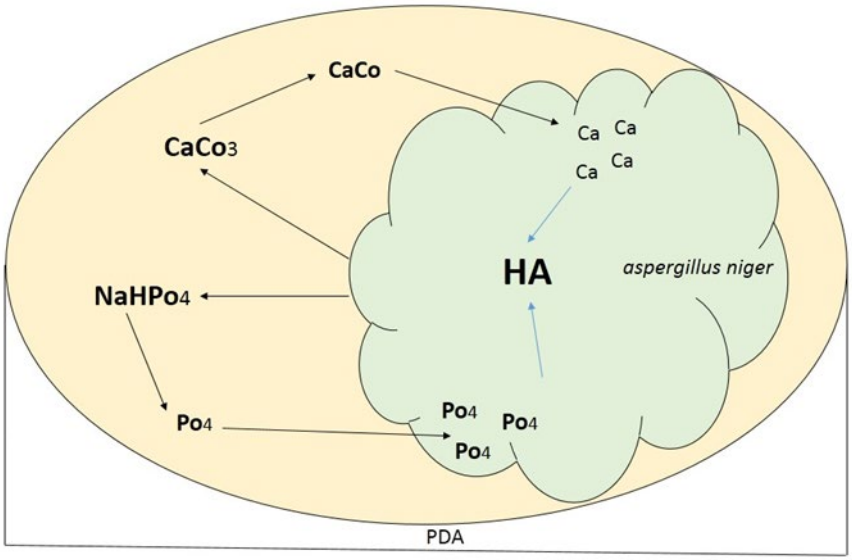


Figure 3. Predicted trend for HA formation in micelles and fungal hyphae (Source: Authors)

Alternatively, Aspergillus niger and wheat bran (as a source of phosphorus) have been used for the synthesis of HA. Wheat bran contains a significant amount of phosphorus (in the form of phytic acid), which is considered a cheap agricultural waste. This reaction is performed by using an extracellular phytase enzyme produced by fermentation of wheat bran with the mentioned fungus. Phytase is a class of phosphohydrolases that catalyzes the hydrolysis of phytic acid to the mineral monophosphate. Finally, calcium chloride is added to the fermented mushroom and wheat bran mixture, which a white precipitate is observed in the mixture after 24 h. Following the identification procedures, HA with characteristics similar to human bone HA was discovered. Nanostructured HA is naturally the major component of bone and teeth in humans

Conclusion

HA has been produced for bone tissue engineering, implant coating, bone cement engineering, drug delivery systems, and other medical and non-medical uses in recent decades using different chemical and biological methods. Various chemical approaches have been proposed for the production of HA up to this point. According to the results and studies, the sol-gel approach is more suitable than other methods in the chemical synthesis of HA **(1, 39 - 41)**. Generally, chemical methods have disadvantages compared to biological and natural approaches. These disadvantages included the need for precise pH adjustment, the lack of biocompatibility, the high cost of raw materials, and finally that it is not possible to achieve high purity of crystallinity and uniformity in shape and size. On the other hand, microbial HA size is between 25 and 30 nanometers (which is very close to natural HA in the human body). This subject draws the attention of scientists to the synthesis of microbial HA. The size and shape of the produced particles are homogeneous and have appropriate crystallinity in microbial synthesis, which improves the material's biocompatibility and bioactivity while also contributing to the mechanical qualities of the final HA part. Production of microbial HA is one-step, inexpensive, non-toxic, and has high purity. Unlike chemical synthesis, it does not require temperature treatment and precise pH adjustment and is easily achievable. Also, the antibacterial properties of these particles are very significant. However, with these interpretations, microbial synthesis of HA on a large scale is not possible as much as chemical synthesis. However, because bone cell differentiation does not necessitate a large amount of HA, this kind of HA can be used in cell differentiation **(1, 27, 42, 43)**.

Microbial HA in animal *in-vivo* experiments has shown the ability of osteogeneration and degradability than chemically synthesized samples. Due to this property, in addition to cost-effectiveness, it is possible to achieve more suitable HA for medical purposes by developing a microbial approach.

Bio-nano-HA can play an important role as a revolution in nanomedicine. Bone injuries in modern life and the risk of rejection of bone implants have led scientists to discover new materials to improve bone repair, and scientists have turned to life sciences to build alternatives to bone grafts. Due to the morphological similarity of biological HA with natural HA and its dimensional similarity (at the nanoscale), significant application of this material is expected in the nanomedical industry, bone tissue engineering, and bone cement engineering. The use of engineering principles in the creation of tools to study, modify, and produce tissue from natural or synthetic sources is known as bone tissue engineering. The primary goal of this approach is tissue regeneration and organ function improvement through the use of three-dimensional HA scaffolds. Cells from the patient's body (or human or animal transplant cells) or bone marrow are implanted into these scaffolds, which are then implanted in the patient's body. These scaffolds need to be as similar as possible to bone tissue. The engineering of bone cements is also created as a filler for cavities and bone defects, the most important of which is nano-HA **(7)**. Biological nano-HA is used to make composites, dental filling cement, and oral and maxillaofacial implants. It was offered as a substance to prevent the formation of dental enamel decay and its partial restoration in the form of nano-HA toothpaste. There have also been reports of this bacterial bio cement used in the laboratory to repair rabbit jaw bone **(15, 4)**.

Acknowledgment

None

Conflict of Interest

The authors did not report any conflict of interest.

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۵ ـ شماره ۴ ـ ۱۵مرداد و شهریور ۱۴۰۰

Journal homepage: www.ijmm.ir

مروری بر مکانیسم سنتز بیولوژیکی نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت و کاربرد آن در نانوپزشکی

صابره نوری، رسول روغنیان*. گیتی امتیازی

گروه زیست شناسی سلولی ملکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۲

پذیرش:۱۴۰۰/۰۴/۲۰

انتشار آنلاین: ۱۴۰۰/۰۵/۲۵

موضوع: نانو بیوتکنولوژی در پزشکی

نویسندهٔ مسئول:

رسول روغنیان ، گروه زیست‌شناسی سلولی ملکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

ایمیل:

rasoul_roghanian@yahoo.co.uk

چکیده

هیدروکسی آپاتیت کاربردهای فراوانی در زمینه‌های پزشکی، دندانپزشکی، تشخیصی، سیستم‌های رهایش دارو، تصفیه فاضلاب، جایگزین سازی بافت استخوانی، تغلیظ باکتری‌ها، پوشش دهی کاشتنی‌های بدن و کاربرد ضد باکتریایی دارد. گرچه در حال حاضر ترکیبات کلسیم فسفاتی مانند هیدروکسی‌آپاتیت کاربرد زیادی دارند اما هنوز روش‌های تهیه آن‌ها برای رسیدن به بهترین فرایند تولید، به‌ویژه در مورد هیدروکسی‌آپاتیت در دست تحقیق است.روش‌های بسیار متعددی جهت سنتز این ماده بکار می‌رود که به‌طور کلی به روش‌های شیمیایی و زیستی تقسیم می‌شود. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که هیدروکسی‌آپاتیت نانوساختار خواص مکانیکی بالاتر و زیست سازگاری مطلوب‌تری نسبت به نمونه‌های میکرومتری در محیط بدن از خود نشان می‌دهد. این خواص هنگامی در حالت بهینه قرار می‌گیرند که ذرات نانومتری هیدروکسی‌آپاتیت از اندازه و شکل یکنواخت و کمترین میزان آگلومره شدن برخوردار باشند. مقاله پیش رو، مطالعه‌ای مروری بر سنتز بیولوژی هیدروکسی‌آپاتیت با تاکید بر روش های میکروبی است. از جمله روش‌های نوین سنتز هیدروکسی‌آپاتیت نانومتری، روش میکروبی یا همان روش رسوب‌دهی زیستی به وسیله میکروارگانیسم‌ها است. در این روش با استفاده از برخی باکتری‌ها و قارچ‌ها، می‌توان هیدروکسی‌آپاتیت را در ابعاد نانومتری تولید کرد. باکتری‌هایی که در این روش استفاده می‌شوند معمولاً دارای آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز بالایی هستند. از مزایای هیدروکسی‌آپاتیت میکروبی این است که بسیار نزدیک به هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی در بدن انسان است. اندازه و شکل ذرات سنتز شده واحد و یک شکل است و کریستالیتی یکسان دارد. ساخت هیدروکسی‌آپاتیت میکروبی یک مرحله‌ای، ارزان، غیر سمی و با خلوص بالاست که بر خلاف سنتز شیمیایی نیاز به تیمار دمایی و تنظیم دقیق pH ندارد و به راحتی قابل دستیابی است.

کلید واژه‌ها: نانوساختار، هیدروکسی‌آپاتیت، آلکالین فسفاتاز، رسوب‌دهی زیستی

کپی‌رایت © مجله میکروب شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

از مهم‌ترین سرامیک‌های زیستی مورد استفاده در پزشکی که در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی را به خود اختصاص داده است هیدروکسی‌آپاتیت است. هیدروکسی‌آپاتیت از نظر ترکیب شیمیایی و ساختار، بسیار شبیه به بخش معدنی استخوان و دندان است. این ماده زیست فعال و زیست سازگار پس از کاشت در بدن، برهم کنش مناسبی با بافت استخوان می‌تواند داشته باشد و پیوند مستقیمی با آن ایجاد می‌کند (۱ و ۲). هیدروکسی‌آپاتیت سبب اتصال، رشد و تحریک سنتز بافت استخوانی جدید می‌شود و رشد استخوان را به درون فضای متخلخل خود تحریک می‌کند. این ترکیب استخوان دوست است، جذب نمی‌شود و تحلیل نمی‌رود و در نهایت چسبندگی مطلوبی با بافت‌های استخوانی حاصل می‌کند (۳ و ۲). از این جهت، با توجه به سازگاری هیدروکسی‌آپاتیت با بافت استخوان و بافت‌های نرم، این ماده بهترین جانشین برای بافت‌های سخت بدن مانند استخوان و دندان است. به‌طور کلی هیدروکسی‌آپاتیت به‌عنوان یک فاز معدنی ۷۰٪ بافت سخت انسان را تشکیل می‌دهد. کلمهٔ آپاتیت به دسته‌ای از ترکیبات گفته می‌شود که ساختاری مشابه دارند ولی حتما ترکیب یکسانی نخواهند داشت. بنابراین واژهٔ آپاتیت یک توصیف است و نه یک ترکیب (۴ و ۲).

مواد و روش‌ها

مطالعهٔ حاضر از نوع مروری بوده و تمامی منابع مورد استفاده از پایگاه‌های دادهٔ معتبر به زبان انگلیسی استخراج و جمع‌آوری شده‌اند. این جست و جو با استفاده از کلمات کلیدی نانو، هیدروکسی‌آپاتیت، سنتز بیولوژیکی، نانوبیوتکنولوژی و میکروارگانیسم در پایگاه‌های اینترنتی Google Scolar, Science Direct, PubMed انجام گرفت.

همچنین لازم به ذکر است که این تحقیق بر پایه مقالات چاپ شده از نویسندگان مسئول، دکتر گیتی امتیازی و دکتر رسول روغنیان تدوین شده است.

یافته‌ها

۱- خواص و کریستالوگرافی هیدروکسی‌آپاتیت

خانواده آپاتیتی با آرایش منشور شش گوش با وجوه متوازی الاضلاع متبلور می‌شود. هیدروکسی‌آپاتیت نیز در حالت ایدئال دارای ساختمانی هگزاگونال با ابعاد ۳۰×۵۰×۲ نانومتر است و دارای ترکیب مشخص $Ca_{10}(HPO_4)_6(OH)_2$ و ساختار کریستالوگرافی معین است. هیدروکسی‌آپاتیت خالص با ترکیب شیمیایی ذکر شده دارای۳۹/۶۸ درصد وزنی کلسیم، ۱۸/۴۵ درصد وزنی فسفر است که نسبت وزنی کلسیم به فسفر ۲/۱۵۱ و نسبت مولی کلسیم به فسفر ۱/۶۷ است (۵).

هیدروکسی‌آپاتیت دارای سلول واحد پیچیده و نسبتاً بزرگی است که احتمال از دست رفتن یکپارچگی در آن زیاد است. اگر نسبت اتمی کلسیم به فسفر در هیدروکسی‌آپاتیت ۱/۶ باشد هیدروکسی‌آپاتیت کاملاً استوکیومتری است. پس با توجه به امکان‌پذیر بودن تغییرات در ساختار و ترکیب آن که منجر به تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت‌های غیراستوکیومتری می‌شود. یون‌های فسفات، کلسیم و گروه‌های هیدروکسیل موجود در هیدروکسی آپاتیت می‌توانند با یون‌های دیگر جایگزین شوند. این تغییرات در ویژگی‌های فیزیکی، ساختار بلوری، نسبت مولار کلسیم به فسفر و انحلال‌پذیری هیدروکسی‌آپاتیت در شرایط فیزیولوژیک تأثیر ویژه‌ای دارد (۱ و ۲). این ماده هرچند در آب غیرقابل حل است، لیکن جز مواد تخریب پذیر محسوب می‌شود و سرعت تجزیه‌ی آن بسیار کم است (۶).

۲- کاربردهای هیدروکسی‌آپاتیت

هیدروکسی‌آپاتیت در زمینه‌های مختلف پزشکی، دندانپزشکی، تشخیصی، کاتالیستی و تصفیه فاضلاب کاربرد دارد که کاربردهای مهم آن به صورت اجمالی در ذیل ذکر شده است.

کاربرد های پزشکی: کاربرد مستقیم در ارتوپدی (۷)، مهندسی بافت استخوان (۸)، کاربرد در پوشش دهی ایمپلنت‌ها (۹)، اثر ضد باکتریایی (۱۰)، کاربرد در سیستم‌های رهایش دارو[1] (۱۱ و ۱۲)، کاربرد در دندان پزشکی (۱۵).

به‌طور کلی بافت استخوان توانایی خود ترمیمی دارد، اما مواردی از جمله آسیب جدی به بافت استخوان و کهولت سن، توانایی استخوان در خود ترمیمی را از بین می‌برد. سپس محققان هیدروکسی‌آپاتیت را برای جایگزینی در بافت استخوان معرفی کردند. با توجه به خصوصیت زیست سازگاری و زیست فعالی هیدروکسی‌آپاتیت، این بیوسرامیک توانایی تحریک رشد سلول‌های استخوان را به درون فضای متخلخل خود دارد و در نتیجه باعث تمایز و رشد سلول‌های استخوانی می‌شود. لذا این ماده در مهندسی بافت استخوان و مهندسی سیمان‌های استخوانی استفاده می‌شود. از این جهت هیدروکسی‌آپاتیت پیشرفت چشمگیری را در ارتوپدی و پوشش دهی ایمپلنت و پیوندهای استخوانی سبب شده است. هیدروکسی‌آپاتیت در ایمپلنت‌های فک و دهان برای بالا بردن ارتفاع لثه‌های تحلیل رفته که توانایی سوار کردن دندان مصنوعی و پیوند ایمپلنت را ندارند نیز کاربرد دارد. همچنین مطالعات نشان داده‌اند با استفاده از خمیردندان‌های حاوی هیدروکسی‌آپاتیت، پوسیدگی مینای دندان تا حدودی قابل بازسازی است. از آنجایی که هیدروکسی‌آپاتیت میل ترکیبی بالایی با مواد بیولوژیک دارد، با جایگزینی داروها به خصوص آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای سرکوب‌کنندهٔ سیستم ایمنی، درون ایمپلنت‌های پوشش داده شده با هیدروکسی‌آپاتیت می‌تواند به پیوند موفق منجر شود (۷-۱۲ و ۱۵).

کاربرد غیر پزشکی: تغلیظ باکتری‌ها (۱۳)، حذف فلزات رادیواکتیو (۱۴)، کاربرد در حسگرهای زیستی (۱۶)، کاربرد هیدروکسی‌آپاتیت به‌عنوان کاتالیست (۱۷).

۳- روش‌های سنتز هیدروکسی‌آپاتیت

اگرچه در سال‌های اخیر ترکیبات کلسیم فسفاتی کاربردهای بسیاری دارند اما همچنان روش‌های تولید آن‌ها برای دستیابی به بهترین فرایند تولید، به‌خصوص در مورد هیدروکسی‌آپاتیت در دست تحقیق است. روش‌های بسیار متعددی به‌صورت شیمیایی و زیستی برای سنتز این ماده به‌کار می‌رود که بدین شرح است (۱).

۳-۱- سنتز شیمیایی هیدروکسی‌آپاتیت

امروزه روش‌های شیمیایی متنوعی به‌منظور تولید نانوکریستال‌های هیدروکسی‌آپاتیت به کار گرفته می‌شوند که بسته به نوع روش، محصولاتی با مشخصات ساختاری، ظاهری و درجهٔ‌بلوری متفاوت حاصل می‌شوند. به‌طورکلی می‌توان روش‌های

[1] Drug Delivery Systems (DDS)

شیمیایی سنتز هیدروکسی‌آپاتیت را به دو دسته روش‌های شیمیایی تر و روش‌های سنتز خشک تقسیم کرد (۱۸). روش‌های سنتز خشک یا روش‌های سنتز مکانیکی بدون آب شامل واکنش حالت جامد[1] و واکنش مکانیکی- شیمیایی[2] است (۱۹).

با در نظر داشتن مواد اولیه، واکنش‌های شیمیایی تر شامل روش اسید-باز[3]، سل– ژل[4]، سنتز فراصوتی- شیمیایی[5]، واکنش سنتز به‌وسیله ماکروویو[6]، تکنیک امولسیون چندگانه با استفاده از تمپلیت یا مایسل‌ها[7]، تکنیک رسوب‌گیری شیمیایی[8]، روش تهیه با استفاده از ، تبدیل هیدروترمال[9] و روش اشتعال محلول[10] است.در این روش‌ها معمولا از نمک‌های محلول مانند نیترات و کلریدکلسیم، آمونیوم‌دی‌هیدروژن فسفات یا دی‌آمونیوم هیدروژن فسفات و فسفات پتاسیم استفاده می‌شود. جدول ۱ به‌طور خلاصه روش‌های سنتز شیمیایی هیدروکسی‌آپاتیت را نمایش می‌دهد. (۱ و ۱۹).

جدول ۱. مقایسهٔ روش‌های سنتز شیمیایی هیدروکسی‌آپاتیت (۱، ۱۸و ۱۹).

	روش	مواد پیشنیاز	شرایط و مکانیسم سنتز	اندازه	شکل	درجه بلورینگی
سنتز خشک	حالت جامد	$CaCO_3$ $CaHPO_4.2H_2O$	دمای بالای ۱۰۰۰c	بیشتر از ۵۰۰ nm	متنوع	**تقریبا بالا**
	مکانیکی-شیمیایی	CaO $CaHPO_4$	آسیاب با دور بالای rmp۶۰۰	بیشتر از ۲۰۰ nm	متنوع	**تقریبا بالا**
سنتز تر	اسید-باز	$Ca(OH)_2$ H_3PO_4	واکنش میان اسید و باز	محدوده میکرون	متنوع	**پایین**
	سل– ژل	Urea EDTA $Ca(NO_3)_2$ NH_2PO_4	اختلاط مولکولی کلسیم و فسفر در فضایی ژله مانند	محدوده نانو	عموما کروی	**تقریبا بالا**
	فراصوتی- شیمیایی	$Ca(OH)_2$ H_3PO_4 $Ca(CH_3CO)_2$ $PO(OCH3)_3$	ایجاد حباب، ترکیدن حباب و برخورد مواد اولیه	نانو و میکرون	عموما سوزنی شکل	**تقریبا پایین**
	ماکروویو	Ca PO_4	حرارت و تابش امواج	میکرون	متنوع	**تقریبا پایین**
	امولسیون چندگانه	Ca PO_4	حل کردن واکنش دهنده در آب و امولسیون کردن آب در روغن	نانو و میکرون	عموما کروی	**تقریبا پایین**
	رسوب‌گیری شیمیایی	$Ca(NO_3)_2$ $(NH_4)_3HPO_4$	رسوب گیری	میکرون	متنوع	**پایین**
	تبدیل هیدروترمال	Ca PO_4	فشار بالا، دمای بالا	میکرون	متنوع (عموما قاصدکی)	**تقریبا پایین**
	اشتعال محلول	NH_2PO_4 $Ca(NO_3)_2$	افزودن عوامل اکساینده	نانو و میکرون	متنوع (عموما سوزنی)	**تقریبا پایین**

بنابر یافته‌های Hsieh و همکاران روش سل ژل دارای مزایایی نسبت به سایر روش‌های شیمیایی لیست شده در جدول ۱ هست. این روش در مقایسه با سایر روش‌ها به تیمار دمایی پایین نیاز دارد. زیرا در روش‌های شیمیایی معمولا درجه حرارت بسیار بالایی برای تشکیل کریستال‌ها استفاده می‌شود. این درحالی است که درجه حرارت مورد نیاز برای عملیات تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت در روش سل-ژل بسیار پایین‌تر است. از نظر هزینه نسبت به سایرین مقرون به صرفه‌تر است و در قیاس با محصولات سایر روش‌ها،

[1] Solid-state reaction
[2] Mechanochemical reaction
[3] Alkali-Acid method
[4] Sol-gel process
[5] Sonochemical synthesis
[6] Microwave-assisted synthesis
[7] Multiple emulsion technique
[8] Precipitation technique
[9] Hydrothermal conversion
[10] Solution combustion method

هیدروکسی‌آپاتیت‌های سنتزشده از این روش یک شکلی بیشتری دارند. همچنین دستیابی به سایز نانو در این متد قابل امکان پذیرتر است. از دیگر مزایای سل ژل در مقایسه با سایر روش‌های شیمیایی، توانایی این روش در سنتز نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت با درجه خلوص تقریبا بالاتری است (۴۰).

۳-۲- سنتز بیولوژیک هیدروکسی‌آپاتیت

بافت استخوانی اغلب پستانداران، ماکیان و ماهی‌ها یکی از منابع اصلی برای تهیه هیدروکسی‌آپاتیت به شمار می‌رود .این نوع هیدروکسی‌آپاتیت، در مقابل نوع سنتزی و مصنوعی آن به نام هیدروکسی‌آپاتیت بیولوژیک یا طبیعی نامیده می‌شود .از منابع دیگر تهیهٔ هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی مرجان دریایی، پوستهٔ میگو، پوست مار، خار جوجه تیغی، برخی گیاهان و جلبک‌ها است. از فراوان‌ترین منابع تهیهٔ هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی، استخوان‌های پستاندارانی نظیر دام است. این ترکیب طی یک عملیات حرارتی طولانی در دماهای حدود ۱۰۰۰ درجهٔ سلسیوس حاصل می‌شود. تشابه ساختار فیزیکی و ترکیب شیمیایی هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی با بافت استخوانی بدن از جمله برتری‌های مهم آن نسبت به هیدروکسی‌آپاتیت شیمیایی قلمداد می‌شود. همانند بافت استخوانی بدن، وجود یک ساختار متخلخل با اندازهٔ تخلخل کافی در مورد بیوسرامیک‌هایی نظیر هیدروکسی‌آپاتیت بسیار مطلوب است و نوع طبیعی هیدروکسی‌آپاتیت این ساختار متخلخل را فراهم می‌سازد. همچنین ترکیب شیمیایی نیز به میزان زیادی بر عملکرد هیدروکسی‌آپاتیت مؤثر است. پل‌های کریستالی بزرگ و مقادیر زیاد اکسید کلسیم، زیست‌سازگاری کمتر هیدروکسی آپاتیت را سبب می‌شوند. همچنین اجزای ناشی از تجزیهٔ هیدروکسی‌آپاتیت نیز باعث تغییرات pH در اطراف محل کاشت می‌شوند. از محسنات هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی می‌توان به دارا بودن عناصر کمیاب موجود در بافت استخوانی اشاره کرد. عناصری مانند منیزیم، سدیم، پتاسیم، آهن، روی و دیگر عناصر مشابه در مقادیر بسیار کمی در بافت استخوانی وجود دارند و نقش مهمی را در فرایند ترمیم و بازسازی استخوان ایفا می‌کنند. دیگر مزیت قابل توجه هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی، فرایند حصول نسبتاً ارزان و مقرون به صرفهٔ آن است (۲۰، ۲۱).

۳-۲-۱- سنتز باکتریایی هیدروکسی‌آپاتیت

همانگونه که پیش از این امتیازی و همکاران ثابت کردند که باکتری توانایی تولید نانو ذرات اکسید مس و اکسید روی را دارد و ویژگی‌های فراوانی مانند خاصیت آنتی‌باکتریال را برای آن‌ها برشمرد، بر آن شدیم که این میکروارگانیسم به‌عنوان کارخآن‌های برای تولید سایر نانو ذرات مورد مطالعه قرار گیرد (۲۲-۲۶).

از جمله روش‌های جدید سنتز هیدروکسی‌آپاتیت نانومتری و طبیعی، روش میکروبی یا روش رسوب‌دهی زیستی[12] به‌وسیلهٔ میکروارگانیسم‌ها است. در این روش با استفاده از برخی باکتری‌ها و قارچ‌ها، می‌توان هیدروکسی‌آپاتیت را در ابعاد نانومتری تولید کرد. باکتری‌هایی که در این روش استفاده می‌شوند معمولاً دارای آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی[13] یا اوره آزی بالایی هستند (۱، ۲۷).

۳-۲-۱-۱- نقش آنزیم فسفاتاز در تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت

در فرایند استخوان سازی، رسوب‌دهی زیستی پروسه‌ای است که طی آن، هیدروکسی‌آپاتیت در ماتریکس خارج سلولی ته‌نشین می‌شود. مینرالیزیشن فیزیولوژیکال در بافت سخت انجام می‌شود در حالی که کلسیفیکیشن در بافت نرم اتفاق می‌افتد. پیروفسفات توسط آلکالین فسفاتاز غیر اختصاصی بافت(TNAP[14])، هیدرولیز می‌شود و فسفات غیر معدنی را برای تحریک مینرالیزیشن فراهم می‌سازد. آنزیم یاد شده در باکتری نیز موجود است و پروسهٔ ذکر شده در این میکروب نیز محتمل است (۲۸).

به‌طورکلی دو نوع آنزیم فسفاتاز در میکروارگانیسم‌ها وجود دارد. فسفاتاز اسیدی[15] که در خارج از غشای باکتری است و فسفاتاز قلیایی که عموما در ناحیهٔ پری پلاسمیک[16] غشای باکتری قرار دارد (۲۷، ۲۹).

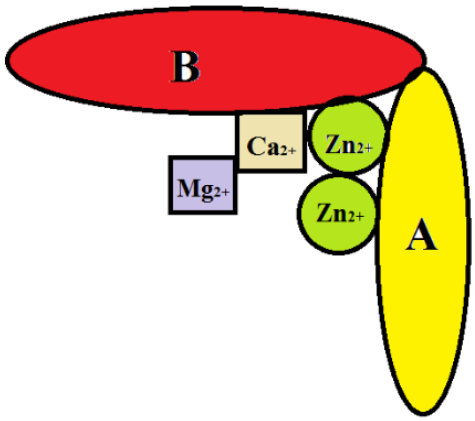
با استفاده از آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی می‌توان هیدروکسی آپاتیت را سنتز کرد، اما چون این آنزیم‌ها خارج غشایی هستند بلورهای هیدروکسی‌آپاتیت ساخته شده از ابعاد نانومتری بالاتر می‌روند. بعلاوه pH مناسب برای فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی پایین‌تر از ۵/۸ است که هیدروکسی‌آپاتیت در این pH دمینرالیزه شده و از بین می‌رود، اما با استفاده از باکتری‌هایی که میزان فسفاتاز قلیایی محصور در ناحیه پری پلاسمیک بالایی دارند و کنترل شرایط، می‌توان به ابعاد نانومتری از هیدروکسی‌آپاتیت با

[12] Biomineralization
[13] Alkaline phosphatase (ALP)
[14] Tissue nonspecific alkaline phosphatase
[15] Acid phosphatase
[16] Preplasmic aeria

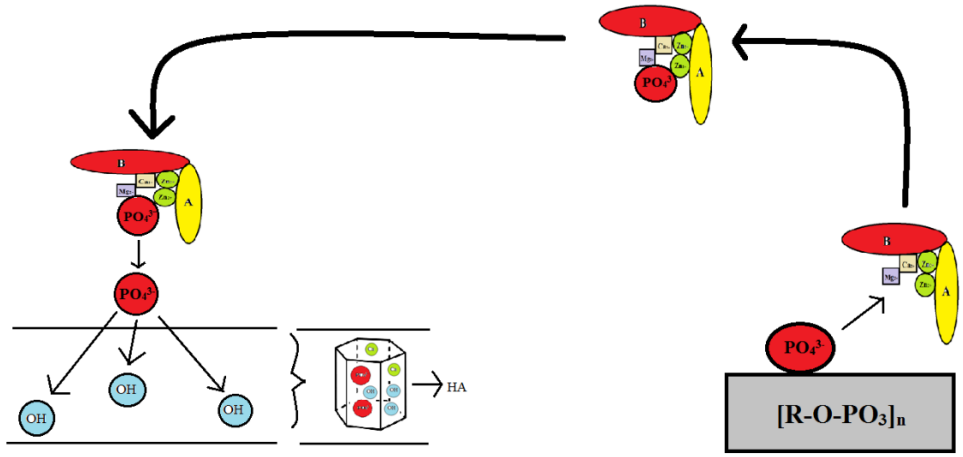
ویژگی‌های زیست سازگاری و زیست فعالی رسید. همچنین pH بهینه برای فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی ۹ است (۴ و ۳۰).

تمامی آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی از گروه آنزیم‌های هیدرولاز هستند که به‌طور غیر اختصاصی، گروه‌های فسفات را از تمامی ترکیبات فسفومنواستری $[R\text{-}O\text{-}PO_3]_n$ به پلی آمین‌های دارای عامل هیدروکسیل (OH) مانند اتانل آمین منتقل می‌کنند. در ساختار این متالوآنزیم‌ها، دو زنجیره مونومری پروتئینی، دو هسته فعال روی و دو جایگاه کوفاکتوری برای منیزیم و کلسیم وجود دارد (شکل ۱).

عملکرد این آنزیم‌ها بدین صورت است که پس از آزاد سازی گروه‌های فسفات از ترکیبات فسفومنواستری، این گروه‌ها را در فضای محدود پری پلاسمیک، در اختیار عوامل هیدروکسی (OH) قرار می‌دهد و به دنبال آن، کاتیون های Zn و Ca و Mg نیز با اتصال خود روند سنتز بلور نانومتری هیدروکسی‌آپاتیت را کامل می‌کنند (شکل ۲)، (۳۱ و ۳۰).



شکل ۱. تصویر شماتیک متالوانزیم فسفاتاز قلیایی. A و B: زنجیره مونومری پروتئینی، Zn^{2+} : هسته فعال روی ، Mg^{2+} و Ca^{2+}: جایگاه کوفاکتوری برای منیزیم و کلسیم. (منبع: نویسندگان)



شکل ۲. روند مورد انتظار تشکیل کریستال‌های هیدروکسی‌آپاتیت (HA) در باکتری و نقش آنزیم فسفاتاز قلیایی در این فرایند. (منبع: نویسندگان)

۳-۲-۱-۲- نقش آنزیم اوره‌آز در تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت

آنزیم اوره‌آز به صورت گسترده در میان باکتری‌ها دیده می‌شود و اغلب برای تولید کلسیت میکروبی به کار برده می‌شود.

چهار مدل تنظیمی برای سنتز آنزیم اوره‌آز در سیستم میکروبی وجود دارد. اوره‌آز ساختمانی [1] که این آنزیم بطور ثابت و مستقل از شرایط خارجی در سلول بیان می‌شود. اوره‌آز القایی [2] که به‌وسیلهٔ یک مولکول القاء کننده مثل اوره یا شرایط محیطی دیگر القاء می‌شود. اوره‌آز سرکوب شدنی [3] در حضور آمونیاک سرکوب می‌شود که این سرکوب در شرایط محدودیت نیتروژن برداشته شده و فعالیت آنزیمی افزایش می‌یابد و در نهایت اوره‌آز تکاملی [4] به این معنا که ارگانیسم در مراحل تکاملی متفاوت بیان متغیری از اوره‌آز را دارد (۳۳ و ۳۴).

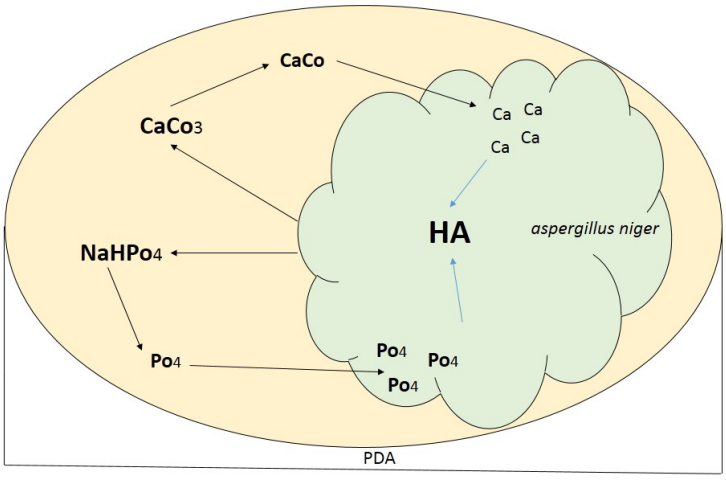
[1] Constitutive
[2] Inducible
[3] Repressible
[4] Developmental

اغلب میکروارگانیسم‌ها با توانایی تجزیه اوره، از آن به‌عنوان یک منبع نیتروژن استفاده می‌کنند که به‌وسیلهٔ انتقال فعال یا انتشار غیر فعال به درون سیتوپلاسم سلولی منتقل می‌شود، که در این مکان هیدرولیز اوره مولکول‌های آمونیاک را آزاد می‌کند. سپس آمونیاک می‌تواند به‌طور مستقیم به واسطهٔ مسیر گلوتامین سنتتاز-گلوتامات سنتاز یا به‌وسیلهٔ عملکرد گلوتامات دِهیدروژناز جذب بیومس شود. یک میکروارگانیسم ایده‌آل برای سیمانکاری زیستی[1] باید به غلظت‌های بالای اوره و کلسیم مقاوم باشد. این میکروارگانیسم اغلب باید سطح بالایی از فعالیت اوره‌آزی را که بطور دائمی تولید شود یا بتواند بطور قابل ملاحظه‌ای القاء شود، داشته باشد. باکتری‌های مولد آنزیم اوره‌آز بر مبنای پاسخ به آمونیاک به دو گروه تقسیم می‌شوند. گروهی که فعالیت آنزیم در آن‌ها در حضور آمونیاک سرکوب نمی‌شود و گروهی که فعالیت اوره‌آز در آن‌ها سرکوب می‌شود (۳۴ و ۳۵).

در سنتز اوره‌آزی هیدروکسی‌آپاتیت مقادیر مختلفی از $CaCl_2$, NaH_2PO_4 استفاده می‌شود که در این شرایط تجزیهٔ اوره توسط اوره‌آز باعث رسوب همگن هیدروکسی‌آپاتیت، به دلیل آزاد شدن یون OH در طول فرایند هیدرولیز اوره، می‌شود. همچنین یون‌های کربناتی که در این واکنش‌ها تشکیل شده‌اند می‌توانند به ساختار بلوری ذرات هیدروکسی‌آپاتیت وارد شوند. بنابراین نوعی هیدروکسی‌آپاتیت کربناتی تشکیل می‌شود که می‌تواند ساختار بسیار شبیه به آپاتیت در استخوان‌های انسان داشته باشد. نتایج آزمایشات نشان داده است که کاهش نسبت غلظت مواد به غلظت اوره‌آز باعث کاهش اندازه ذرات به کمتر از ۱۰۰ نانومتر می‌شود و مورفولوژی آن‌ها به صورت کروی تغییر شکل پیدا می‌کند. از مزایای سنتزاوره‌آزی هیدروکسی‌آپاتیت این است که حضور اوره آز تجزیه ی اوره را در دمای کمتر امکان پذیر می‌نماید و خود آنزیم در طی واکنش مصرف نمی‌شود (۳۶).

۳-۲-۲- سنتز قارچی هیدروکسی‌آپاتیت

در نتایج آزمایشات مربوط هیدروکسی‌آپاتیت، مشاهده شده است که برخی از قارچ ها مانند *Aspergillus niger* توانایی تحریک سنتز هیدروکسی‌آپاتیت را در محیط PDA[2] با غلظت مناسب موادی مانند Na_2HPO_4 و $CaCo_3$ دارند که علت اصلی ایجاد کریستال‌های هیدروکسی‌آپاتیت به شرح زیر است. متابولیسم قارچی ماده اسیدی برای انحلال CaCo تولید می‌کند و رشد میسل‌ها باعث جذب Ca^{2+} که منجر به سطح غنی از کلسیم می‌شود تا تولید آپاتیت ثانویه را ارتقا دهد که آپاتیت ثانویه در نهایت به هیدروکسی‌آپاتیت تبدیل می‌شود (شکل ۳) (۳۷).



شکل ۳. روند پیش بینی شده برای تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت در مایسل و هیف قارچی (منبع: نویسندگان)

در روشی دیگر با استفاده از قارچ *Aspergillus niger* و سبوس گندم به‌عنوان منبع فسفر هیدروکسی‌آپاتیت سنتز شده است. سبوس گندم دارای مقدار قابل توجهی فسفر (به فرم Phytic acid) است که جزو زباله‌های ارزان قیمت کشاورزی محسوب می‌شود. با استفاده از آنزیم فیتاز خارج سلولی تولیدشده توسط تخمیر سبوس گندم با قارچ مذکور این واکنش صورت می‌گیرد. فیتاز یک کلاس از فسفوهیدرولاز هاست که هیدرولیز Phytic acid به مونوفسفات معدنی را کاتالیز می‌کند. در نهایت به مخلوط قارچ

[1] Biocementation

[2] Potato dextrose agar

و سبوس گندم که تخمیر در آن‌ها صورت گرفته است کلرید کلسیم اضافه می‌شود و در دمای اتاق پس از ۲۴ ساعت یک رسوب سفید رنگ در مخلوط دیده شده است که پس از انجام فرایندهای شناسایی مشاهده شد که هیدروکسی‌آپاتیت با ویژگی‌های نزدیک به هیدروکسی‌آپاتیت استخوان انسان بدست آمده است. (۳۸).

بحث

هیدروکسی‌آپاتیت نانوساختار به‌طور طبیعی بخش اصلی استخوان و دندان در انسان است. در چند دهه ی اخیر این ماده به روش‌های مختلف شیمیایی و زیستی برای مهندسی بافت استخوان، پوشش‌دهی ایمپلنت‌ها، مهندسی سیمآن‌های استخوانی، سیستم رهایش دارو و موارد بسیاری از کاربردهای پزشکی و همچنین غیر پزشکی سنتز شده است. تا امروز روش‌های شیمیایی گوناگونی برای سنتز هیدروکسی‌آپاتیت ارائه شده است. با توجه به نتایج و مطالعات حاصله روش سل ژل، در مقایسه با سایر روش‌های شیمیایی در سنتز هیدروکسی‌آپاتیت، مناسب‌تر است (۱، ۳۹، ۴۰ و ۴۱). اما در مجموع روش‌های شیمیایی در مقایسه با روش‌های زیستی و طبیعی دارای معایبی هستند مانند نیاز به تنظیم دقیق pH، عدم زیست سازگاری، هزینهٔ بالای مواد اولیه و در نهایت اینکه دستیابی به درجه خلوص بالای کریستالیتی ممکن نیست و یکنواختی در شکل و اندازه پایین است. در مقایسه، اندازهٔ هیدروکسی‌آپاتیت میکروبی بین ۲۵ تا ۳۰ نانومتر است که بسیار نزدیک به هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی در بدن انسان است. این موضوع توجه دانشمندان را به سمت سنتز هیدروکسی‌آپاتیت میکروبی جلب می‌کند. در سنتز میکروبی اندازه و شکل ذرات سنتز شده واحد و یکسان است و کریستالیتی یکسان دارد که باعث افزایش زیست سازگاری و زیست فعالی این ماده شده و به خصوصیات مکانیکی قطعهٔ نهایی ساخته شده از هیدروکسی‌آپاتیت کمک می‌کند. ساخت هیدروکسی‌آپاتیت میکروبی یک مرحله‌ای، ارزان، غیر سمی و با خلوص بالاست که بر خلاف سنتز شیمیایی نیاز به تیمار دمایی و تنظیم دقیق pH ندارد و به راحتی قابل دستیابی است. همچنین خاصیت آنتی باکتریال این ذرات بسیار قابل توجه است. اما با این تفاسیر سنتز میکروبی هیدروکسی‌آپاتیت در مقیاس بالا به اندازهٔ سنتز شیمیایی امکان پذیر نیست، لیکن تمایز سلول‌های استخوانی به مقدار بالایی هیدروکسی‌آپاتیت نیاز ندارد و از این نوع هیدروکسی‌آپاتیت می‌توان در تمایز سلولی بهره جست (۱، ۲۷، ۴۲ و ۴۳).

با توجه به مقرون به صرفه بودن روش میکروبی و کیفیت بالاتر هیدروکسی‌آپاتیت سنتز شده با این روش که در آزمون‌های درون‌تنی در بدن حیوانات مدل، توانایی استخوانسازی و تجزیه پذیری نسبت به نمونهٔ سنتزشده به روش‌های شیمیایی را از خود نشان دادند، می‌توان با توسعه این روش به هیدروکسی‌آپاتیت مناسب تری برای مصارف پزشکی دست یافت. نانو هیدروکسی‌آپاتیت زیستی به‌عنوان انقلابی در زمینهٔ نانوپزشکی نقش مهمی را می‌تواند ایفا کند. آسیب‌ها و جراحات استخوانی در زندگی مدرن امروزی و خطر پس زدن ایمپلنت‌های استخوانی، دانشمندان را بر آن داشته که در صدد کشف مواد جدید در جهت بهبود ترمیم بافت استخوانی باشند و دانشمندان علوم زیستی را بر روی ساخت جایگزین‌هایی برای پیوندهای استخوانی معطوف کرده است. لذا به دلیل شباهت مورفولوژیکی بیوهیدروکسی‌آپاتیت با نوع طبیعی و استخوانی آن و شباهت ابعادی آن (در مقیاس نانو)،کاربرد چشمگیر این ماده در صنعت نانوپزشکی، مهندسی بافت استخوان و مهندسی سیمان‌های استخوان تحت انتظار است. مهندسی بافت استخوان در واقع استفاده از مبانی مهندسی در پدیدار کردن ابزار برای بررسی، اصلاح و ساختن بافت از منابع طبیعی یا سنتزی است که مهمترین هدف این تکنیک بازسازی بافت و بهبود عملکرد اعضا از طریق ساخت داربست‌های سه‌بعدی از جنس هیدروکسی‌آپاتیت است. سلول‌های بدن بیمار (یا سلول های پیوندی از انسان یا حیوان) یا مغز استخوان درون این داربست ها کاشت می‌شوند و سپس داربست‌ها در بدن بیمار جایگذاری می‌شوند. این داربست‌ها نیاز است که تا حد امکان شبیه بافت استخوانی باشند. مهندسی سیمان‌های استخوان نیز به‌عنوان پرکنندهٔ حفرات ایجادشده و نقایص استخوانی اشاره دارد که از مهمترین این سیمان‌ها هیدروکسی‌آپاتیت نانومتری است (۷). نانو هیدروکسی‌آپاتیت زیستی در ساخت کامپوزیت‌ها و سیمان‌های پرکننده دندانی و ایمپلنت‌های فک و دهانی کاربرد دارد. این ماده به‌عنوان مواد پیشگیری کننده از توسعهٔ پوسیدگی مینای دندان و ترمیم جزئی آن در غالب خمیردندان‌های حاوی نانوهیدروکسی‌آپاتیت وارد بازار شد. همچنین گزارشاتی مبنی بر استفاده از این بیوسیمان باکتریایی در ترمیم استخوان فک خرگوش در مقیاس آزمایشگاهی به صورت موفقیت آمیز در دسترس است (۱۵ و ۴).

سپاسگزاری

ندارد.

تعارض در منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارضی در منافع گزارش نکرده اند.

منابع مالی

ندارد.

Referance

1. Emtiazi G, Shapoorabadi FA, Mirbagheri M. Chemical and Biological Synthesis of HydroxyApatite: Advantage and Application. Int J Microbiol Curr Res 2019; 1(1):20-2. [DOI:10.18689/ijmr-1000103]
2. Wang L, Nancollas GH. Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution. Chem Rev. 2008; 108(11):4628-69. [DOI:10.1021/cr0782574] [PMID] [PMCID]
3. Kumar RR, Wang M. Functionally graded bioactive coatings of hydroxyapatite/titanium oxide composite system. Mater Lett .2002; 55(3):133-7. [DOI:10.1016/S0167-577X(01)00635-8]
4. Ahmadzadeh E, Talebnia F, Tabatabaei M, Ahmadzadeh H, Mostaghaci B. Osteoconductive composite graft based on bacterial synthesized hydroxyapatite nanoparticles doped with different ions: from synthesis to in vivo studies. Nanomed Nanotechnol Biol Med. 2016; 12(1):1387-95. [DOI:10.1016/j.nano.2016.01.020] [PMID]
5. Chopra Y, Kumar R, Begam H. Effect of Temperature and Titania Doping on Structure of Hydroxyapatite. In: Rizvanov AA, Singh BK, Ganasala P. Advances in Biomedical Engineering and Technology. Lecture Notes in Bioengineering. Singapore: Springer;2021. [DOI:10.1007/978-981-15-6329-4_24] [PMCID]
6. Corno M, Busco C, Bolis V, Tosoni S, Ugliengo P.Water adsorption on the stoichiometric (001) and (010) surfaces of hydroxyapatite: a periodic B3LYP study. Langmuir. 2009; 25(4):2188-98. [DOI:10.1021/la803253k] [PMID]
7. Benaqqaa C, Chevaliera J, Daouia MS, Fantozzi G. Slow crack growth behavior of hydroxyapatite ceramics. Biomaterials. 2005; 26(31):6106-12. [DOI:10.1016/j.biomaterials.2005.03.031] [PMID]
8. Padmanabhan SK, Gervaso F, Sannino A, Licciulli A. Preparation and characterization of Collagen/hydroxyapatite microsphere composite scaffold for bone regeneration. Key Eng Mater. 2014; 587(1-3):239-44. [DOI:10.4028/www.scientific.net/KEM.587.239]
9. Babu NR, Manwatkar S, Rao KP, Kumar TSS. Bioactive coatings on 316L stainless steel implants. Trends Biomater Artif Organs. 2004; 17(2):43-7.
10. Tin-Oo MM, Gopalakrishnan V, Samsuddin AR, Al Salihi KA, Shamsuria O. Antibacterial property of locally produced hydroxyapatite. Arch Orofac Sci .2007; 2:41-4.
11. Assadi z, Emtiazi G, Zarrabi A. Hyperbranched polyglycerol coated on copper oxide nanoparticles as a novel core-shell nano-carrier hydrophilic drug delivery model. J Mol Liq. 2018; 250(1):375-80. [DOI:10.1016/j.molliq.2017.12.031]
12. Palazzoa B, Sidotia TMC, Roveria N, Tampierib A, Sandrib M, Bertolazzic L, et.al. Controlled drug delivery from porous hydroxyapatite grafts: An experimental and theoretical approach. Mater Sci Eng C. 2005; 25(2):207-13. [DOI:10.1016/j.msec.2005.01.011]
13. Berry ED, Siragusa GR. Hydroxyapatite adherence as a means to concentrate bacteria. Appl Environ Microbiol. 1997; 6(1):4069-74. [DOI:10.1128/aem.63.10.4069-4074.1997] [PMID] [PMCID]
14. Handley-Sidhu S, Renshaw JC, Yong P, Kerley R, Macaskie LE. Nano-crystalline hydroxyapatite bio-mineral for the treatment of strontium from aqueous solutions. Biotechnol Lett. 2011; 33:79-87. [DOI:10.1007/s10529-010-0391-9] [PMID]
15. Tschoppe P, Zandim D L, Martus P, Kielbassa AM. Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite. J Dent. 2011; 39(6): 430-7. [DOI:10.1016/j.jdent.2011.03.008] [PMID]
16. Wang S, Lei Y, Zhang Y, Tang J, Shen G, Yu R. Hydroxyapatite nanoarray-based cyanide biosensor. Anal Biochem. 2010; 398(2):191-7. [DOI:10.1016/j.ab.2009.11.029] [PMID]
17. Tsuchida T, Yoshioka T, Sakama S, Takeguchi T, Ueda W. Synthesis of Biogasoline from Ethanol over Hydroxyapatite Catalyst. Ind Eng Chem Res. 2008; 47(1):1443-52. [DOI:10.1021/ie0711731]
18. Rhee SH. Synthesis of hydroxyapatite via mechanochemical treatment. Biomaterials. 2002; 23(4):1147-52. [DOI:10.1016/S0142-9612(01)00229-0]
19. Shojai MS, Khorasani MT, Dinpanah-Khoshdargi E, Jamshidi A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. Acta Biomater. 2013; 9(8):7591-621. [DOI:10.1016/j.actbio.2013.04.012] [PMID]
20. Rahavi SS, Ghaderi O, Monshi, Fathi MH. A comparative study on physicochemical properties of hydroxyapatite powders derived from natural and synthetic sources. Russ J Non-ferrous Metals. 2017; 58: 276-86. [DOI:10.3103/S1067821217030178]
21. Ruksudjarit A, Pengpat K, Rujijanagul G, Tunkasiri T. Synthesis and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite from natural bovine bone. Curr Appl Phys. 2008; 8:270-2. [DOI:10.1016/j.cap.2007.10.076]
22. Assadi z, Emtiazi G, Zarrabi A. Novel synergistic activities of tetracycline copper oxide nanoparticles integrated into chitosan micro particles for delivery against multiple drug resistant strains: Generation of reactive oxygen species (ROS) and cell death. J Drug Deliv Sci Technol. 2018; 44(1):65-70. [DOI:10.1016/j.jddst.2017.11.017]
23. Assadi z, Emtiazi G, Zarrabi A. Opto-electronic and antibacterial activity investigations of mono-dispersed nanostructure copper oxide prepared by a novel method: reduction of reactive oxygen species (ROS). J Mater Sci Mater. 2018; 29(3):1798-807. [DOI:10.1007/s10854-017-8088-7]
24. Mirhendi M, Emtiazi G, Roghanian R. Production of nano zinc, zinc sulphide and nanocomplex of magnetite zinc oxide by Brevundimonas diminuta and Pseudomonas stutzeri. IET

Nanobiotechnol. 2013; 7(4):135-9. [DOI:10.1049/iet-nbt.2012.0032] [PMID]

25. Mirhendi M, Emtiazi G, Roghanian R. Antibacterial Activities of Nano Magnetite ZnO Produced in Aerobic and Anaerobic Condition by Pseudomonas stutzeri. Jundishapur J Microbiol. 2013; 6(10): e10254. [DOI:10.5812/jjm.10254]
26. Soltani Nezhad S, Rabbani Khorasgani M, Emtiazi G, Yaghoobi MM, Shakeri Sh. Isolation of copper oxide (CuO) nanoparticles resistant Pseudomonas strains from soil and investigation on possible mechanism for resistance. World J Microbiol Biotechnol. 2014; 30:809-17. [DOI:10.1007/s11274-013-1481-3] [PMID]
27. Emtiazi G. Microbial enzymes induced nano-hydroxyapatite and calcite precipitation. DBpia korean confrancce. 2017; 26.
28. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. J Nippon Med Sch. 2010; 77:4-12. [DOI:10.1272/jnms.77.4] [PMID]
29. Ghashghaei S, Emtiazi G. Production of hydroxyapatite nanoparticles using tricalcium- phosphate by alkanindiges illinoisensis. J Nanomater Mol Nanotechnol. 2013; 2:5. [DOI:10.4172/2324-8777.1000121]
30. Ledo H M, Thackray AC, Jones IP, Marquis PM, Macaskie LE, Sammons RL. Microstructure and composition of biosynthetically synthesized hydroxyapatite. J Mater Sci Mate Med. 2008; 19(11):3419-27. [DOI:10.1007/s10856-008-3485-3] [PMID]
31. Kim EE, Wyckoff HW. Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis. J Mol Biol. 1991; 218(2):449-64. [DOI:10.1016/0022-2836(91)90724-K]
32. Mostaghaci B, Fathi MH, SheikhZeinoddin M, Soleimanianzad S. Bacterial synthesis of nanostructured hydroxyapatite using Serratia marcescens PTCC1187, Int J Nanotechnol. 2009; 6:1015-30. [DOI:10.1504/IJNT.2009.027564]
33. Fujita Y, Ferris FG, Lawson RD, Colwell FS, Smith RW. Calcium carbonate precipitation by ureolytic subsurface bacteria. Geomicrobiol J .2000; 17:305-18. [DOI:10.1080/782198884]
34. Ghashghaei S, Emtiazi G. Production of calcite nanocrystal by a urease-positive strain of Enterobacter ludwigii and study of its structure by SEM. Curr microbiol. 2013; 67(4):406-13. [DOI:10.1007/s00284-013-0379-5] [PMID]
35. Ghashghaei S, Emtiazi G. The Methods of Nanoparticle Synthesis Using Bacteria as Biological Nanofactories, their Mechanisms and Major Applications. Curr Bionanotechnol. 2016; 1(1):3-17. [DOI:10.2174/2213529401999140310104655]
36. Jokic B, Tanaskovic D, Jankovic-Castvan I, Drmanic S, Petrovic R. Synthesis of nanosized calcium hydroxyapatite particles by the catalytic decomposition of urea with urease. J Mater Res. 2006; 22(5):1156-61. [DOI:10.1557/jmr.2007.0170]
37. He F, Lian B, Liu SR, Gong GH. Induced synthesis of hydroxyapatite by Aspergillus niger. Wei Sheng Wu Xue Bao. 2011. 51(3):417-22.
38. Soni SK. Phytase from Aspergillus niger NCIM 563: Isolation Purification, Characterization and its Applications [PhD thesis]. Maharashtra India: univ. Pune; 2009.
39. Gupta R, Mozumdar S, Chaudhury NK. Effect of ethanol variation on the internal environment of sol-gel bulk and thin films with aging. Biosens Bioelectron. 2005; 21(4):549-56. [DOI:10.1016/j.bios.2004.12.002] [PMID]
40. Hsieh M, Perng L, Chin T, Perng H. Phase purity of sol-gel-derived hydroxyapatite ceramic. Biomaterials. 2001; 22(19): 2601-7. [DOI:10.1016/S0142-9612(00)00448-8]
41. Satta G, Pompei R, Grazi G, Cornaglia G. Phosphatase activity is a constant feature of all isolates of all major specice of the family Entrrobacteriaceae. J Clin Microbiol. 1988; 26(12): 2637-41. [DOI:10.1128/jcm.26.12.2637-2641.1988] [PMID] [PMCID]
42. Ganachari SV, Bevinakatti AA, Yaradoddi JS, Banapurmath NR, Hunashyal AM, Shettar AS. Rapid synthesis, characterization, and studies of hydroxyapatite nanoparticles. Adv Mater Sci Res .2017; 1:1-8.
43. Sassoni E. Hydroxyapatite and other calcium phosphates for the conservation of cultural heritage: A Review. Materials. 2018; 11(4):557. [DOI:10.3390/ma11040557] [PMID] [PMCID]