




Optimizing the hydroxyapatite nanocrystals derived from biological sources to increasing efficiency and quality

Mahsa Abbasi¹ , Hossein Derakhshankhah² , Soheila Kashanian^{3,4} , Zhila Izadi^{2*} ,
Mohammad Soleiman Beigi¹ 

¹Dept of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Ilam University, Ilam, Iran

²Pharmaceutical Sciences Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

³Dept of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, Razi University, Kermanshah, Iran

⁴Nano Biotechnology Dept, Faculty of Innovative Science and Technology, Razi University, Kermanshah, Iran

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: Apr. 30, 2024

Received in revised form:

May. 19, 2024

Accepted: Jun. 16, 2024

Published Online: Dec. 05, 2024

* Correspondence to:

Zhila Izadi

Pharmaceutical Sciences
Research Center, Kermanshah
University of Medical Sciences,
Kermanshah, Iran

Email:

Izadi_zh@razi.tums.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: Hydroxyapatite is one of the most essential bioactive and biocompatible ceramics. Due to its unique properties and its structural similarity to bone, it has many applications in medicine, dentistry, and bone tissue engineering. Therefore, many methods and strategies have been studied to prepare hydroxyapatite. The purpose of this study was to optimize hydroxyapatite nanocrystals prepared from biological sources with higher efficiency and quality.

Materials & Methods: This study synthesized and analyzed hydroxyapatite from White Sea shells using simple and affordable methods like ultrasonic, hydrothermal, and thermal-ultrasonic decomposition. White seashells contain carbonate-calcium (CaCO_3). For the synthesis of hydroxyapatite, environmentally friendly solvents such as water (green synthesis) and di ammonium hydrogen phosphate (ADP) were used as a source of phosphate. The data were analyzed using Graph Pad Prism V.10 statistical software, and the level of significance was considered less than 0.05.

Results: Hydroxyapatite was synthesized by the ultrasonic method and was chosen as the most appropriate. Because in the EDX results, the percentage of elements oxygen and phosphorus (O, P) in the hydroxyapatite synthesized by the ultrasonic method corresponds to the data of the standard card, HA-1.67, and for this reason, the ultrasonic method is better than the other two methods (hydrothermal and thermal-ultrasonic decomposition) and is more suitable. In FTIR, phosphate, hydroxide, and carbonate (PO_4^{3-}), OH, and CO_3^{2-} groups were observed, which indicate the synthesis of hydroxyapatite. With SEM and FE-SEM, the morphology and size of hydroxyapatite particles were observed to be between 16.5 and 70.80 nm. XRD analysis, crystallinity, and needle-like structure of hydroxyapatite were observed. The blood compatibility results showed that hydroxyapatite had no significant hemolysis. Examining the cell compatibility of hydroxyapatite on bone-like cells (MG63) showed a survival rate of over 90%, and cell proliferation was statistically (Graph Pad Prism 10) significant ($P < 0.05$).

Conclusion: One of the most effective methods for preparing hydroxyapatite involves conducting the reactions at the bottom; the ultrasonic method's affordability and cost-effectiveness are among its positive features, as it can generate multiple processes throughout the production process. The results demonstrated that this method produced a material with a hexagonal structure, nanometer size, and suitable biocompatibility.

Keywords: Hydroxyapatite, Ultrasonic method, Biocompatibility

How to cite this paper: Abbasi M, Derakhshankhah H, Kashanian S, Izadi Zh, Soleiman Beigi M. Optimizing the hydroxyapatite nanocrystals derived from biological sources to increasing efficiency and quality. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2024;32(5):23-37.

Introduction

Hydroxyapatite (HA) is an excellent biomaterial for various biomedical and medical applications. These compounds are biocompatible and biodegradable, slowly

decomposed into Ca^{2+} , PO_4^{3-} and toxic for local cells. Hydroxyapatite is prepared from biological sources such as fish, mollusk shells, fish scales, and sea shells, which are an unlimited source of CaCO_3 (1). However,

© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences



biomedical fields have been using new biomaterials like hydroxyapatite, leading to significant progress (2). Researchers investigated three methods (ultrasonic, hydrothermal, and thermal-ultrasonic) for the preparation of hydroxyapatite (3). The ultrasonic method provides rapid synthesis and good particle size control, whereas the thermal process is very stable, simple, and has excellent crystallinity. The purpose of this study was to optimize hydroxyapatite nanocrystals prepared from biological sources with higher efficiency and quality.

Methods

First, the shells of White Sea shells were collected from the coastal areas and then washed with a brush in running water. In the next step, the oysters were dried in an oven at 40°C and powdered by a ball mill. The hand powder contains calcium carbonate (CaCO_3), which is used in three ways to synthesize hydroxyapatite. Then, in a flask, 0.5 gram of raw white oyster powder was dissolved in 50 ml of distilled water and placed on a magnetic stirrer at 60°C for 5 min. 0.25 gram of diammonium hydrogen phosphate (ADP) was added to another flask and dissolved with 30 ml of distilled water. In the next step, the solution inside the second flask was added to the first flask. The suspension was placed on a magnetic stirrer at 60°C for 10 min to completely dissolve, and then the pH of the solution was adjusted to 10 with NaOH for one minute. Then the suspension was ultra-sonicated for one hour to synthesize hydroxyapatite. The obtained hydroxyapatite nanoparticles were washed three times with the same ratio of water and ethanol (5 min with a 2000 rpm centrifuge). In addition, that material was placed in an autoclave at a temperature of 180°C and a pressure of 50 to 200 w for different times. According to the previous method, the synthesized nanoparticles were washed and dried. In the further approach, the white seashells obtained were calcined in a thermal furnace at a powder temperature of 800°C for two hours to remove all organic materials and growths. At last, the suspension was ultra-sonicated for one hour to synthesize hydroxyapatite. The obtained hydroxyapatite nanoparticles were washed three times with the same ratio of water and ethanol (5 min with a 2000 rpm centrifuge). The data were analyzed using Graph Pad Prism V.10 statistical software, and the level of significance was

considered less than 0.05.

Results

T Hydroxyapatite was synthesized by the ultrasonic method and was chosen as the most appropriate. Because in the EDX results, the percentage of elements oxygen and phosphorus (O, P) in the hydroxyapatite synthesized by the ultrasonic method corresponds to the data of the standard card, HA~1.67, and for this reason, the ultrasonic method is better than the other two methods (hydrothermal and thermal-ultrasonic decomposition) and is more suitable. FTIR showed phosphate, hydroxide, and carbonate (PO_4^{3-}), OH, and CO_2^{3-} groups, which show that hydroxyapatite is being made. With SEM and FE-SEM, the morphology and size of hydroxyapatite particles were observed to be between 16.5 and 70.80 nm. XRD analysis, crystallinity, and needle-like structure of hydroxyapatite were observed. The blood compatibility results showed that hydroxyapatite had no significant hemolysis. Examining the cell compatibility of hydroxyapatite on bone-like cells (MG63) showed a survival rate of over 90%, and cell proliferation was statistically significant ($P < 0.05$).

Conclusion

One of the most effective methods for preparing hydroxyapatite involves conducting the reactions at the bottom; the ultrasonic method's affordability and cost-effectiveness are among its positive features, as it can generate multiple processes throughout the production process. The results demonstrated that this method produced a material with a hexagonal structure, nanometer size, and suitable biocompatibility.

Authors' Contribution

Conceptualization, Investigation, Data Curation, Supervision, Project Administration: ZI, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Data Curation, writing– Original Draft Preparation, Writing– Review & Editing, Visualization: MA, HD, SK, MS, Funding Acquisition: Kermanshah University of Medical Sciences Research Vice-Chancellor

Ethical Statement

The study was approved by the Ethics Committee of the Kermanshah University of

Medical Sciences (IR.KUMS.REC.1403.024).
The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

This research resulted from a project number (50004081) approved by Kermanshah University of Medical Sciences, which was carried out with the financial support of the Kermanshah University of Medical Sciences Research Vice-Chancellor. The funder has no responsibility in the study design, data collection, analysis, and writing of the article.

Acknowledgment

The authors of the article are extremely grateful to the Kermanshah University of Medical Sciences Research Vice-Chancellor for the approval and financial support of this study. Also, authors sincerely thank and appreciate the research vice-chancellor of Kermanshah University of Medical Sciences for their financial support.

بهینه‌سازی نانوکریستال‌های هیدروکسی آپاتیت تهیه‌شده از منابع زیستی با هدف افزایش کارایی و کیفیت

مهسا عباسی^۱، حسین درخشان‌خواه^۲، سهیلا کاشانیان^۳، ژیلا ایزدی^{۴*}، محمد سلیمان بیگی^۱

^۱ گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

^۲ مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

^۳ دانشکده شیمی، گروه شیمی کاربردی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

^۴ گروه نانویوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری نوآوران، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

مقدمه: هیدروکسی آپاتیت یکی از ضروری‌ترین بیوسرامیک‌های زیست‌فعال و زیست‌سازگار است. به علت خواص منحصر به فرد و شباهت ساختاری آن به استخوان، کاربردهای بسیاری در پزشکی، دندان پزشکی و مهندسی بافت استخوان دارد؛ بنابراین، روش‌ها و راهکارهای فراوانی برای تهیه هیدروکسی آپاتیت مطالعه شده است. هدف از انجام این مطالعه بهینه‌سازی نانوکریستال‌های هیدروکسی آپاتیت تهیه‌شده از منابع زیستی، با کارایی و کیفیت بالاتر بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، هیدروکسی آپاتیت از صدف‌های سفید دریایی با روش‌هایی آسان و مقرون به صرفه از جمله اولتراسونیک، هیدروترمال و تجزیه حرارتی - اولتراسونیک سنتز و تجزیه و تحلیل شد. صدف‌های سفید دریایی حاوی کربنات کلسیم (CaCO₃) هستند. برای سنتز هیدروکسی آپاتیت از حلال‌های دوست‌دار محیط زیست مانند آب (سنتز سبز) و از دی‌آمونیم هیدروژن فسفات (ADP) به عنوان منبع فسفات استفاده گردید.

یافته‌های پژوهش: هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با روش اولتراسونیک به عنوان روش مناسب انتخاب شد؛ زیرا که در نتایج EDX، درصد عناصر موجود اکسیژن و فسفر (O, P) در هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با روش اولتراسونیک با داده‌های کارت استاندارد، HA~1.67 مطابقت دارد و به همین علت، روش اولتراسونیک نسبت به دو روش دیگر (هیدروترمال و تجزیه حرارتی - اولتراسونیک) مناسب‌تر بود. در FTIR گروه‌های فسفات، هیدروکسید و کربنات (OH، PO₄³⁻)، CO₃ - مشاهده گردید که نشان‌دهنده سنتز هیدروکسی آپاتیت هستند. با SEM و FE-SEM مورفولوژی و اندازه ذرات هیدروکسی آپاتیت در 5/16 تا 70/80 دیده شد. در تجزیه و تحلیل XRD، بلورینگی و سوزنی شکل بودن ساختار هیدروکسی آپاتیت تأیید گردید. نتایج سازگاری خونی نشان داد که هیدروکسی آپاتیت همولیز چشمگیری نداشته است و بررسی سازگاری سلولی هیدروکسی آپاتیت بر سلول‌های شبه‌استخوانی (MG63)، نرخ بقای بیش از ۹۰ درصد را نشان داد و تکثیر سلولی از نظر آماری (Graph pad prism vol.10) معنی‌دار بود (P<0.05).

بحث و نتیجه‌گیری: روش اولتراسونیک یکی از بهترین روش‌های تهیه هیدروکسی آپاتیت است که انجام واکنش‌ها در دمای پایین، ارزان و مقرون به صرفه بودن از ویژگی‌های مثبت آن است و می‌تواند موانع صنعتی از جمله طولانی بودن فرایند تولید را برطرف کند. نتایج نشان داد که ماده تولید شده با این روش ساختار شش ضلعی با اندازه نانومتر با زیست‌سازگاری مناسب داشت.

واژه‌های کلیدی: هیدروکسی آپاتیت، روش اولتراسونیک، زیست‌سازگاری

استاد: عباسی مهسا، درخشان‌خواه حسین، کاشانیان سهیلا، ایزدی ژیلا، سلیمان بیگی محمد. بهینه‌سازی نانوکریستال‌های هیدروکسی آپاتیت تهیه‌شده از منابع زیستی با هدف افزایش کارایی و کیفیت. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، آذر ۱۴۰۳؛ ۳۷(۵): ۳۷-۲۳.



مقدمه

طول برهم کنش داربست- بافت، آزادسازی یون‌های Ca^{2+} و PO_4^{3-} به تشکیل سلول‌های استخوانی کمک می‌کند و هیچ‌گونه آثار سمی از خود نشان نمی‌دهد (۱۴). مطالعات کمی روی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت با اندازه‌ها و مورفولوژی‌های مختلف (کروی، سوزنی و میله‌ای) انجام شده است. هر کدام از این‌ها خواص و کاربردهای مختلفی دارند. هیدروکسی آپاتیت‌های کروی از تکثیر ماکروفاژها جلوگیری می‌کنند (۱۵). نانوذرات هیدروکسی آپاتیت میله‌ای شکل و سوزنی‌مانند، شبیه به «بلوک‌های ساختمانی» دندان‌ها و استخوان‌ها هستند و در بافت‌های کلسیفیه شده (تجمع کلسیم) انسان جاسازی می‌گردند. استفاده از این نانوذرات هیدروکسی آپاتیت در کاربردهای زیست‌پزشکی ترجیح داده می‌شود (۱۶). نانوذرات هیدروکسی آپاتیت میله‌ای شکل به‌عنوان حامل داروی پروتئینی استفاده می‌گردد (۱۷)؛ از این‌رو، تهیه هیدروکسی آپاتیت با خواص مناسب برای کاربردهای خاص استفاده می‌شود. (۱۷) بسیاری از منابع زیستی از جمله (استخوان، پوسته نرم‌تنان، فلس ماهی (۱۸) و صدف‌های سفید دریایی به‌طور کلی به‌عنوان منابع کربنات کلسیم ($CaCO_3$) شناخته می‌شوند. هدف از این مطالعه سنتز هیدروکسی آپاتیت با روش مناسب از صدف‌های سفید دریایی به‌عنوان منبع کلسیم کربنات ($CaCO_3$) و از دی‌آمونیم هیدروژن فسفات (ADP) به‌عنوان ترکیب فسفات‌دار بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به روش تحقیق تجربی یا آزمایشگاهی انجام شد و صدف‌های سفید از مناطق ساحل جنوبی جمع‌آوری گردید.

تهیه هیدروکسی آپاتیت از صدف‌های سفید دریایی:

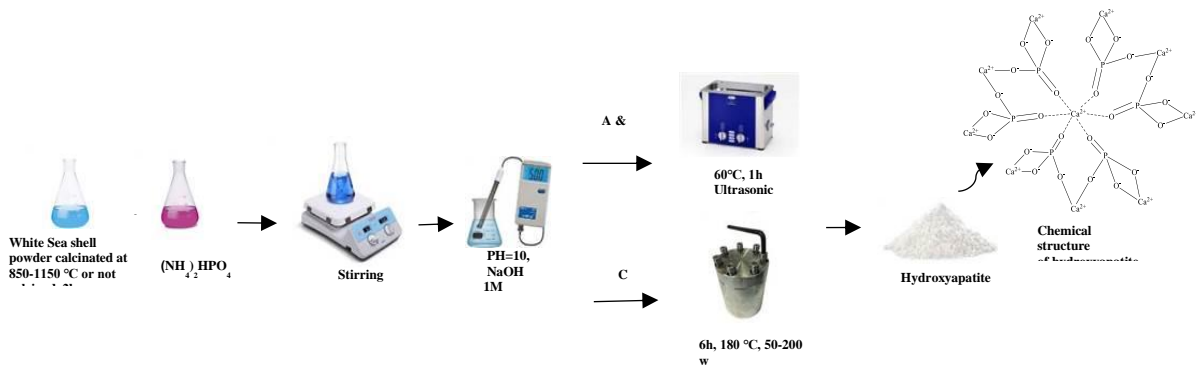
ابتدا پوسته‌های صدف‌های سفید دریایی از نواحی ساحلی جمع‌آوری و سپس با برس در آب جاری شسته شدند. در مرحله بعد، صدف‌ها در آون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک و توسط آسیاب گلوله‌ای پودر گردیدند. پودر به‌دست آمده حاوی کلسیم کربنات ($CaCO_3$) است که به سه روش برای سنتز هیدروکسی آپاتیت استفاده شد: الف. روش

کروید-۱۹ از سال ۲۰۱۹ از کشور چین آغاز و تبدیل به یک هیدروکسی آپاتیت‌ها ((HA نانوسرامیک‌هایی با فرمول شیمیایی $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ هستند. یکی از جنبه‌های حیاتی مهندسی بافت و پزشکی هیدروکسی آپاتیت زیست‌سازگاری بودن آن است (۱)، زمان زیست‌تخریب‌پذیری طولانی دارد و بسیار آرام تجزیه می‌شود یا تقریباً تجزیه‌ناپذیر است (۲). این ماده بسیار شبیه به جزء معدنی ماتریکس استخوان است و خاصیت پیوندی خوبی با استخوان دارد و رشد سلول‌های استخوانی را سرعت می‌بخشد. HA به علت خواص غیرسمی و زیست‌فعالی که دارد، اثر التهابی ندارد (۳)؛ به همین سبب، هیدروکسی آپاتیت به‌عنوان یک عامل دارورسانی (تحویل دارو با دوز مشخص و مدت‌زمان از پیش تعیین شده) در دستگاه دارورسانی استفاده می‌شود (۴). تلاش‌های تحقیقاتی گسترده‌ای برای استفاده از هیدروکسی آپاتیت مصنوعی به‌عنوان جایگزین استخوان در کاربردهای دندان‌پزشکی و زیست‌پزشکی انجام شده است (۵).

فسفات کلسیم در مواد معدنی استخوان و مینای دندان وجود دارد. هیدروکسی آپاتیت به‌عنوان یک ترکیب فسفات کلسیم‌دار در شرایط فیزیولوژیکی مانند pH، دما و غیره پایدار است. ساختاری شش ضلعی هیدروکسی آپاتیت گروه فضایی P63/m و ثابت‌های شبکه a و c به ترتیب با ۰/۹۴۲ و ۰/۶۸۸ نانومتر دارد (۶). هیدروکسی آپاتیت به روش‌های مختلفی از جمله ۱. روش هم‌رسوبی (۳)، ۲. روش هیدروترمال (۷)، ۳. روش تابش اولتراسونیک (۸)، ۴. روش شیمیایی مکانیکی (۹)، ۵. روش تابش به کمک ماکروویو (۱۰)، ۶. روش سل-ژل (۱۱) و تجزیه حرارتی (۱۲) سنتز می‌شود.

ساختار و خواص هیدروکسی آپاتیت تحت تأثیر منبع و روش سنتز تغییر می‌کند؛ به‌عنوان مثال، یون‌های منیزیم و کربنات در هیدروکسی آپاتیت سنتز شده، آن‌ها را زیست‌سازگارتر می‌کند (۱۳). هیدروکسی آپاتیت از یون‌های Ca^{2+} و PO_4^{3-} تشکیل شده است. در سیستم فیزیولوژیکی، در

بعد، محلول داخل بالن دوم به بالن اول اضافه گردید. سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه روی همزن مغناطیسی در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا کاملاً حل گردد؛ سپس pH محلول با NaOH یک مولار به ۱۰ رسید. پس از آن، سوسپانسیون به مدت ۱ ساعت اولتراسونیک شد تا هیدروکسی آپاتیت سنتز گردد. نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به دست آمده سه بار با نسبت یکسان آب و اتانول (مدت زمان ۵ دقیقه با دور 2000 g سانتریفیوژ) شسته شدند (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱. تهیه هیدروکسی آپاتیت. A. روش اولتراسونیک؛ B. روش تجزیه حرارتی- اولتراسونیک؛ C. روش هیدروترومال

کوره حرارتی در دمای ۸۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت کلسینه گردید تا همه مواد آلی و پروتئین‌ها حذف شوند. بر اساس نتایج، در این دما با آزادسازی دی اکسید کربن (CO₂)، اکسید کلسیم باقی می ماند و عاری از هرگونه ناخالصی می شود؛ سپس ۰/۵ گرم پودر کلسینه شده در یک بالن با ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید و به مدت ۵ دقیقه با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد روی همزن قرار گرفت تا کاملاً پخش شود. در بالن دیگری، ۰/۲۵ گرم ADP در ۳۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و به مدت ۵ دقیقه روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. در مرحله بعد، محلول داخل بالن دوم به بالن اول اضافه گردید. سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه روی همزن مغناطیسی در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا کاملاً حل گردد؛ سپس pH محلول با NaOH یک مولار به ۱۰ رسید. پس از آن، سوسپانسیون به مدت ۱ ساعت اولتراسونیک شد تا هیدروکسی آپاتیت سنتز گردد. نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به دست آمده سه بار با نسبت یکسان آب و اتانول (مدت زمان ۵ دقیقه با دور 2000 g سانتریفیوژ) شسته

تابش اولتراسونیک؛ ب. روش هیدروترومال؛ ج. روش تجزیه حرارتی- تابش اولتراسونیک.

روش تابش اولتراسونیک:

در یک بالن، ۰/۵ گرم پودر صدف های سفید دریایی خام در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و به مدت ۵ دقیقه روی همزن مغناطیسی در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. ۰/۲۵ گرم دی آمونیوم هیدروژن فسفات (ADP) به بالن دیگر اضافه و با ۳۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید و به مدت ۵ دقیقه روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. در مرحله

روش هیدروترومال:

در یک بالن، ۰/۵ گرم پودر صدف های سفید دریایی خام در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و به مدت ۵ min روی همزن مغناطیسی در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. ۰/۲۵ گرم ADP به بالن دیگر اضافه و با ۳۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید و به مدت ۵ دقیقه روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. در مرحله بعد، محلول داخل بالن دوم به بالن اول اضافه گردید. سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه روی همزن مغناطیسی در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا کاملاً حل گردد؛ سپس pH محلول با NaOH یک مولار به ۱۰ رسید. پس از آن، در زمان های مختلف (۲، ۴ و ۶ ساعت) در اتوکلاو در دمای ۱۸۰ درجه سانتی گراد و فشار ۵۰ تا ۲۰۰ w قرار گرفت. بر اساس روش پیشین، نانوذرات سنتز شده شسته و خشک شدند (شکل شماره ۱).

روش تجزیه حرارتی و تابش اولتراسونیک:

پودر صدف های سفید دریایی به دست آمده در یک

شدند (شکل شماره ۱).
تجزیه و تحلیل می‌کند. مناطق به‌طور تصادفی از نمونه‌ها برای عکاسی با مدل میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (JSM-840A, JEOL, Japan) انتخاب شدند. زبری و تخلخل سطح توسط یک تداخل‌سنج نوری (Accura 2000, Intekplus, Seoul, Korea) اندازه‌گیری گردید (۱۵).

میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM):

میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM) همان SEM است، با این تفاوت که در میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی FESEM، تصاویر واضح‌تری با وضوح ۱ تا ۵/۰ nm در مقایسه با SEM مشاهده می‌شود. در مقایسه با FE-SEM، SEM در ولتاژ بالا وضوح کمتری دارد (۹).

بررسی زیست‌سازگاری زیستی؛ بررسی سازگاری خون:

خون از داوطلب (انسان) گرفته شد و با محلول PBS با نسبت حجمی ۲/۵:۲ رقیق گردید. نمونه‌ها در سه میکرو تیوب ۲ میلی‌لیتر (سه بار تکرار هر نمونه برای گرفتن میانگین مناسب) ریخته شد و ۲۰۰ میکرولیتر خون رقیق‌شده به هر میکرو تیوب اضافه گردید و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱ ساعت انکوبه شد. در مرحله بعد، نمونه‌ها با سرعت 4000-5000 g در مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند؛ سپس مایع رویی شفاف از نمونه‌های سانتریفیوژ شده با سمپلر گرفته شد و به داخل پلیت تریق گردید و جذب آن‌ها در طول موج ۵۴۵ نانومتر گرفته و توسط دستگاه میکروپلیت ریدر خوانده و ثبت شد؛ سپس مقدار همولیز با فرمول زیر محاسبه گردید (۲۲).

$$\text{Hemolysis} = \frac{(Ct - Cnc)}{(Cpc - Cnc)} \times 100$$

Ct: میانگین نمونه‌ها، Cnc: کنترل منفی و Cpc: کنترل مثبت است.

بررسی زنده ماندنی سلول‌های شبه‌استخوانی: به منظور بررسی سازگاری سلولی و زنده ماندنی از روش (3-4)، 5-diphenyltetrazolium dimethylthiazol-2-yl)-2, (bromide) MTT استفاده شد. در پلیت ۹۶ چاهکی، سلول‌های شبه‌استخوانی MG63 به تعداد 5×10^4 با محیط

شناسایی خصوصیات شیمیایی، فیزیکی و مکانیکی؛ طیف‌سنج مادون‌قرمز تبدیل فوریه (FTIR):

هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با دستگاه FTIR مدل (BRUKER GERMANY VBRTEX 70 FT-IR) گرفته شد. از این تکنیک FTIR برای شناسایی گروه‌های عاملی در ساختار نمونه‌ها و پیوندهای موجود در مواد آلی و معدنی استفاده می‌شود. محدوده اعداد موج در طیف‌سنج فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR) از 100 تا 4000 cm^{-1} است (۱۹).

طیف‌سنجی پراش انرژی اشعه ایکس (EDX):

طیف‌سنجی پراش انرژی اشعه ایکس (EDX) یک تکنیک اشعه ایکس است که عناصر موجود در ترکیبات مختلف را شناسایی و درصد آن‌ها را گزارش می‌کند. این دستگاه‌ها به ابزارهای میکروسکوپ الکترونی متصل هستند و عناصر موجود در نمونه‌ها را با قابلیت تصویربرداری میکروسکوپی شناسایی می‌نمایند (۲۰).

تجزیه و تحلیل XRD:

تجزیه و تحلیل پراش اشعه ایکس (XRD) اطلاعات دقیقی را درباره ترکیب شیمیایی، خواص فیزیکی و ساختار کریستالوگرافی یک ماده را نشان می‌دهد (۲۱). پرتوهای ایکس پرتوهای الکترومغناطیسی با طول‌موج کوتاه‌تر هستند که وقتی ذرات باردار الکتریکی با انرژی کافی کاهش می‌یابند، تولید می‌شوند. در XRD، پرتوهای ایکس تولید شده همسو می‌گردند و به سوی یک نمونه از نانومواد هدایت می‌شوند؛ سپس شناسایی، پردازش و شمارش می‌گردد. پس از آن، شدت پرتوهای پراکنده در زوایای مختلف ماده، برای نشان دادن یک الگوی پراش ترسیم شد.

بررسی ویژگی‌های ظاهری؛ میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM):

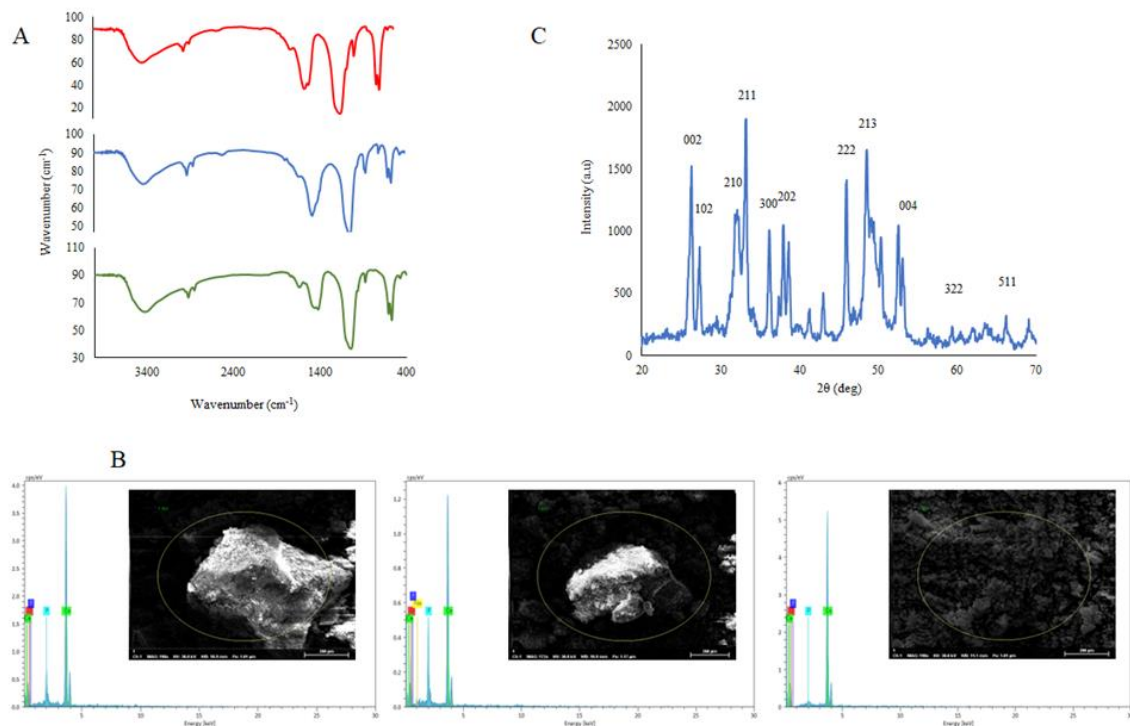
میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) با بزرگ‌نمایی بیش از 300000x و حتی $1000000 \times$ ، تصاویر دقیقی از مواد مختلف به دست آمده را نشان می‌دهد. این روش مواد آلی و معدنی را از نانومتر (nm) تا میکرومتر (μm)

در این طیف، مجموعه‌ای از باند جذبی در هیدروکسی آپاتیت در ناحیه^۱ $825-1080$ cm^{-1} (یک نوار کششی قوی) به وضوح دیده می‌شود و یک باند جذبی در 1565 cm^{-1} (یک نوار جذب خمشی تیز) که مربوط به PO_4^{3-} است؛ مشاهده می‌گردد. این وضوح پیک به علت زمینه^۲ سرامیکی داربست است. یون‌های هیدروکسیل مربوط به نوار جذب خمشی در ناحیه^۱ $565-716 \text{ cm}^{-1}$ و باند جذب کششی گسترده در ناحیه^۱ $3700-3432 \text{ cm}^{-1}$ قابل مشاهده است. کربنات‌های موجود در هیدروکسی آپاتیت‌های طبیعی و مصنوعی، آن‌ها را به هیدروکسی آپاتیت‌های بیولوژیکی با زیست‌سازگاری بالا تبدیل می‌کند. باند جذب در ناحیه^۱ $2146-1409 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به کربنات (CO_3^{2-}) است که در هیدروکسی آپاتیت کربناته مشاهده شد. با توجه به نتایج نشان داده شد که پوسته^۲ صدف‌های سفید دریایی در حالت کلسینه، با حالت غیر کلسینه تفاوتی ندارد. نوارهای مربوط به HPO_4^{2-} که در طیف مرتبط با خاکستر پوسته^۲ صدف‌های سفید دریایی دیده می‌شود، در طیف مربوط به پوسته^۲ صدف‌های سفید دریایی کلسینه نشده نیز وجود دارد و قابل مشاهده است. این شواهد حضور HA را در ماده^۲ سنتز شده اثبات می‌کند (شکل شماره ۲.۱.۸).

کشت کامل RPMI 1640 و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی کشت گردید و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه^۲ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند و به تراکم ۷۰ درصد برسند؛ سپس به هر چاهک حاوی سلول، نانوکریستال‌های ساخته شده با روش‌های مختلف اضافه شد و در دو بازه^۲ زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت، زنده‌مانی سلول‌ها با روش MTT ارزیابی گردید. در روز آزمایش، محیط کشت از چاهک‌ها حذف و محیط کشت تازه حاوی MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به چاهک‌های حاوی سلول اضافه شد و به مدت ۳ ساعت در دمای انکوباتور قرار گرفت؛ سپس محیط کشت چاهک‌ها حذف و حلال DMSO برای حل شدن کریستال‌های فرومازان اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. به منظور بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌ها پس از تیمار با نانوذرات هیدروکسی آپاتیت، با استفاده از دستگاه پلیت ریدر، جذب چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر تعیین گردید (۲۳)

یافته‌های پژوهش

خصوصیات شیمیایی، فیزیکی و مکانیکی؛ تجزیه و تحلیل طیف سنجی مادون قرمز (FTIR):
تجزیه و تحلیل طیفی مادون قرمز (FTIR) نشان داد که



شکل شماره ۲. FTIR. A. هیدروکسی آپاتیت سنتز شده (پیک قرمز. روش اولتراسونیک، پیک آبی. روش هیدروترمال، پیک سبز. روش تجزیه حرارتی-اولتراسونیک)؛ EDX. B. هیدروکسی آپاتیت سنتز شده به روش اولتراسونیک (a. روش تجزیه حرارتی-اولتراسونیک، b. روش هیدروترمال، c. روش اولتراسونیک)؛ XRD. C. هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با روش تابش اولتراسونیک

روش اولتراسونیک بود. نتایج نشان داد (شکل شماره ۲. B) که نسبت اتمی کلسیم به فسفر در هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با روش اولتراسونیک نسبت به سایر روش‌ها (هیدروترمال و تجزیه حرارتی-اولتراسونیک) مناسب است که در جدول شماره ۱ آورده شده است و با داده‌های کارت استاندارد، HA-1.67 مطابقت دارد.

طیف‌سنجی پراش انرژی اشعه ایکس (EDX):

عناصر موجود در هیدروکسی آپاتیت سنتز شده (Ca, P, O) در این طیف مشاهده شدند. EDX استوکیومتری شیمیایی نانوذرات را در شکل شماره ۲. B نشان می‌دهد. در روش سوم، با کلسینه کردن صدف‌های سفید دریایی و سپس فراصوت، مقدار فسفر کمتر از دیگر روش‌ها مشاهده گردید. مقدار کلسیم و فسفر در روش اتوکلاو نزدیک به داده‌های

جدول شماره ۱. نتایج EDX هیدروکسی آپاتیت تهیه شده به روش اولتراسونیک، هیدروترمال و تجزیه حرارتی-اولتراسونیک

Mass Norm [%]Ca	Mass Norm [%]P	روش‌ها
۶۴/۷۳	۶/۹۴	روش اولتراسونیک
۷۶/۴۴	۵/۰۵	روش هیدروترمال
۵۸/۳۱	۷/۴	
۴۴/۴۰	۹/۲۲	روش تجزیه حرارتی-اولتراسونیک
۵۰/۵۶	۴/۰۳	

نتایج بررسی شکل ظاهری کریستال‌های هیدروکسی آپاتیت:

در شکل شماره ۳. A، SEM هیدروکسی آپاتیت سنتز شده به روش اولتراسونیک در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد. SEM اندازه ریز کریستال‌ها را به دقت مشاهده نکرد و تصویری سرامیکی از هیدروکسی آپاتیت را نشان داد؛ بنابراین، ذرات هیدروکسی آپاتیت توسط FESEM مشاهده و اندازه‌گیری شد.

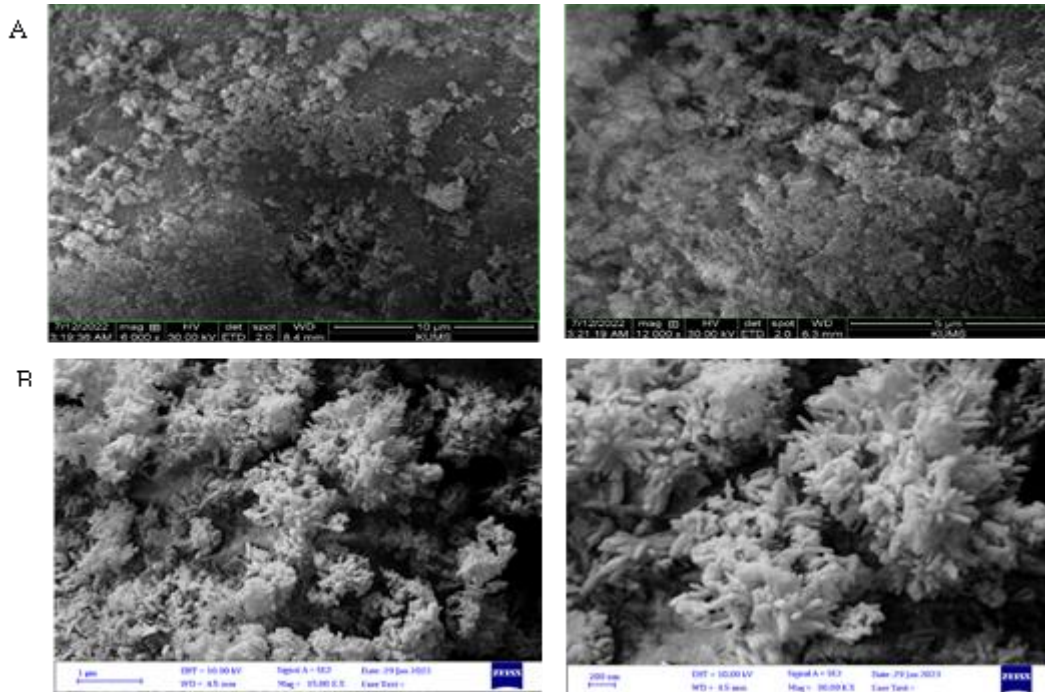
در این تجزیه و تحلیل، مورفولوژی سطح و اندازه بلورهای HA سنتز شده بررسی گردید. در واقع در این روش، تصویر توسط الکترون‌ها ثبت می‌شود که قدرت بزرگ‌نمایی بسیار بالاتری نسبت به میکروسکوپ‌های نوری دارند و می‌توان چندین هزار بار تصویربرداری کرد. FE-SEM در شکل شماره ۳. B هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با روش اولتراسونیک در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد. اندازه بلورها ۱۶/۵ تا ۷۰/۸۰ نانومتر است و علت آن استفاده

نتایج تجزیه و تحلیل XRD:

نتیجه XRD نشان داد که بلورهای هیدروکسی آپاتیت سنتز و قابل مشاهده هستند. JCPDS با شماره ۰۹-۰۴۳۲-۰۹ داده‌ها را شناسایی کرد. شدت پیک‌های XRD با افزایش اندازه ذرات افزایش می‌یابد که بر اساس معادله شرر تأیید می‌شود. با افزایش زمان اولتراسونیک مشاهده شد که شدت پیک‌ها کاهش یافتند. از سوی دیگر، قله‌ها گسترش بیشتری پیدا کردند و این سبب گردید که اندازه ذرات و بلورینگی کاهش یابد. با افزایش زمان از ۱ ساعت به ۲ ساعت، کریستال‌ها کوچک‌تر و در اندازه نانومتری سنتز شدند. با توجه به نتیجه XRD، هیدروکسی آپاتیت کرنات‌دار به روش اولتراسونیک سنتز گردیده است (شکل شماره ۲. C). بر اساس مطالعات مشاهده شد که وجود کرنات در هیدروکسی آپاتیت باعث کاهش اندازه در کریستال‌ها می‌شود (۲۵). با افزایش CO₂، حلالیت ظاهری HA بسیار افزایش می‌یابد (۲۴).

هیدروکسی آپاتیت به دست آمده در میدان اولتراسوند ($Lav <$ 100 نانومتر) در مقایسه با ذرات به دست آمده بدون اولتراسوند، 115 nm کوچک تر است (شکل شماره ۳.A و ۳.B).

از امواج فراصوت و وجود کرنات در ساختار نانوذرات هیدروکسی آپاتیت است. در FE-SEM، ذرات هیدروکسی آپاتیت به صورت ذرات سوزنی شکل تشکیل شدند و قابل مشاهده هستند. اندازه بلورهای

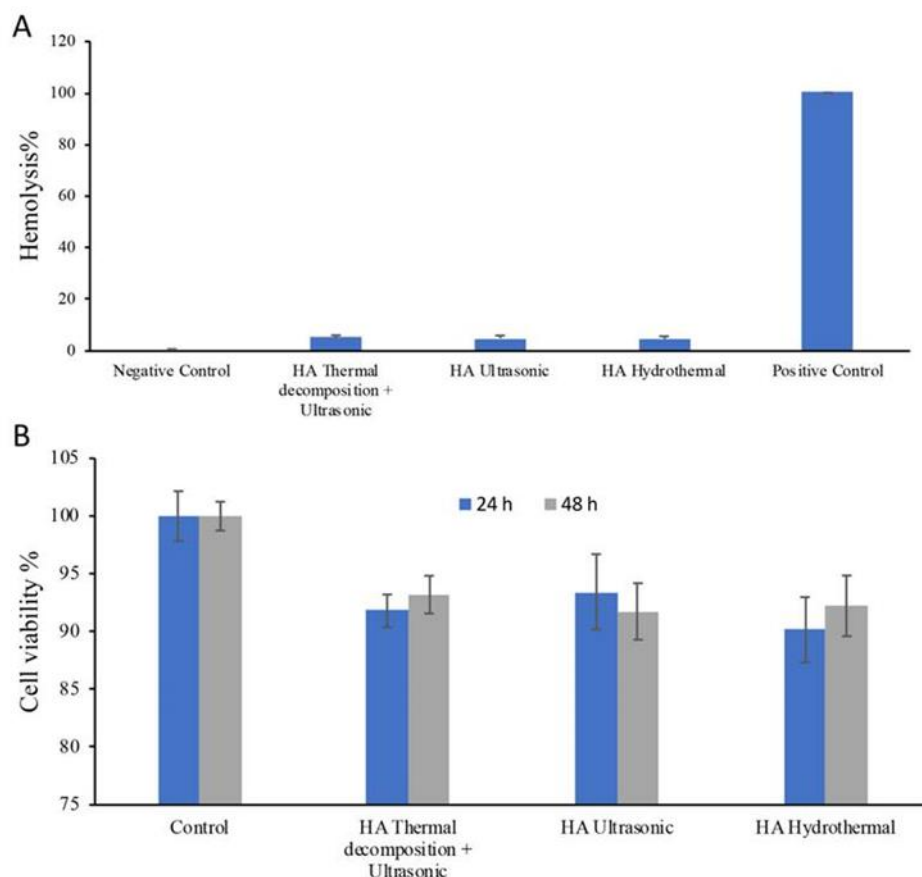


شکل شماره ۳. SEM هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با روش اولتراسونیک؛ B. FE-SEM هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با روش اولتراسونیک

اساس استانداردهای ASTM F756-08، همولیز بالای ۵ درصد همولیتیک، بین ۲ تا ۵ درصد کمی همولیتیک و کمتر از ۲ درصد غیر همولیتیک در نظر گرفته می شود. کنترل مثبت (خون لیز شده با آب) و کنترل منفی (خون رقیق شده با PBS) است (شکل شماره ۴.A).

نتایج زیست سازگاری؛ سازگاری خونی مناسب نانوکریستال های هیدروکسی آپاتیت:

سازگاری خونی با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج 570 nm خوانده شد و نشان داد که همولیز کمتر از (۲-۵ درصد) در HA سنتز شده مشاهده گردید. بر



شکل شماره ۴. A. بررسی سازگاری خونی هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با سه روش (اولتراسونیک، هیدروترمال و تجزیه حرارتی- اولتراسونیک)؛ **B.** سازگاری سلولی هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با سه روش (اولتراسونیک، هیدروترمال و تجزیه حرارتی- اولتراسونیک) روی سلول‌های شبه استخوانی

ماهی، پوسته نرم‌تنان، فلس ماهی و پوسته صدف‌ها تهیه می‌شود که منبع نامحدودی از CaCO_3 هستند (۲۵). با این حال، زیست‌مواد جدید مانند هیدروکسی آپاتیت در زمینه‌های زیست پزشکی استفاده شده و پیشرفت چشمگیری داشته است.

به‌طور خلاصه، روش اولتراسونیک سنتز سریع و کنترل اندازه ذرات خوب را ارائه می‌دهد، در حالی که روش حرارتی یک تکنیک کاملاً ثابت با سادگی و بلورینگی مناسب است. روش‌های رسوب شیمیایی مرطوب، سل-ژل و روش‌های بیومیمتیک، روش‌های جایگزینی را با مزایا و چالش‌های خاص خود ارائه می‌کنند. انتخاب روش سنتز به الزامات خاصی مانند اندازه ذرات، مورفولوژی، خلوص و مقیاس پذیری بستگی دارد (۲۶).

در این پژوهش، نانوذرات هیدروکسی آپاتیت با

نتایج سازگاری سلولی:

نتایج ارزیابی سازگاری سلولی نانوکریستال‌های هیدروکسی آپاتیت روی رده سلول‌های شبه استخوانی (MG63) نشان داد که میزان بقای سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل (گروه بدون تیمار)، بالاتر از ۹۰ درصد است ($P < 0.05$)؛ بنابراین، سازگاری سلولی مناسب برای کاربرد در اهداف مهندسی بافت به‌ویژه در سازه‌های استخوانی را دارند (شکل شماره ۴. B).

بحث و نتیجه گیری

هیدروکسی آپاتیت (HA) یک زیست‌مواد عالی برای کاربردهای مختلف زیست پزشکی و پزشکی است. این ترکیبات زیست‌سازگار و زیست تخریب پذیر هستند، به آرامی به Ca^{2+} ، PO_4^{3-} تجزیه می‌شوند و برای سلول‌ها سمی نیستند. هیدروکسی آپاتیت از منابع زیستی مختلفی از جمله استخوان

استفاده از سه روش (اولتراسونیک، هیدروترمال و تجزیه حرارتی-اولتراسونیک) سنتز شدند. در روش اول، HA به روش اولتراسونیک به مدت ۱ ساعت در pH=10 سنتز گردید. در روش دوم، HA با اتوکلاو در مدت زمان‌های ۲، ۴ و ۶ ساعت، فشار ۲۰۰w-۵۰ درجه دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد سنتز و تجزیه و تحلیل شد. در روش سوم (تجزیه حرارتی-اولتراسونیک) پیش از اولتراسونیک، صدف‌های سفید دریایی با استفاده از کوره (۸۰۰ درجه سانتی‌گراد) کلسینه گردیدند و سپس تحت اولتراسونیک قرار داده شدند. بر اساس نتایج FTIR مشاهده گردید که HA سنتز شده در روش اولتراسونیک، با HA سنتز شده به روش تجزیه حرارتی-اولتراسونیک تفاوتی ندارد و نتیجه گرفته شد که مرحله تجزیه حرارتی در دمای ۸۰۰ درجه سانتی‌گراد باعث حذف CO₂ نمی‌شود؛ به همین علت، از صدف‌های سفید دریایی (خام) برای سنتز HA استفاده گردید. بر اساس نتایج مشاهده شد که هر چه مدت زمان فراصوت بیشتر باشد، نانوذرات در اندازه‌های کوچک‌تر تشکیل می‌شوند.

در FTIR، همه نوارهای جذبی HA در FTIR شناسایی گردیدند. با بررسی FTIR مشاهده شد که این نواحی در هیدروکسی آپاتیت سنتز شده در سه روش (اولتراسونیک، روش هیدروترمال و روش تجزیه حرارتی-اولتراسونیک) قابل مشاهده است. در طیف به دست آمده، همه پیک‌های مشخصه پودر هیدروکسی آپاتیت وجود دارد. علاوه بر این، پیک‌های مربوط به گروه عاملی کربنات نیز حضور یافته‌اند؛ بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که با استفاده از فرایند اولتراسونیک، هیدروکسی آپاتیت کربنات‌دار (نانوساختار) سنتز شده است. در سال ۲۰۲۳، روفینی و همکاران هیدروکسی آپاتیت را از کربنات کلسیم و اسید اورتوفسفریک سنتز کردند (۲۷، ۲۸). طیف FTIR آن نشان داد که گروه‌های فسفات در نواحی 10^3cm^{-1} و 10^2cm^{-1} هیدروکسیل در نواحی 3500 تا 3000cm^{-1} مشاهده شدند (۲۸). استفاده از آزمون طیف‌سنجی (FTIR) نیز روشی عمومی برای نشان دادن حضور بنیان‌های کربناتی در ساختار هیدروکسی آپاتیت است. همان‌طور که مشخص است، سنتز

هیدروکسی آپاتیت معمولاً در محیط آبی صورت می‌گیرد و به علت وجود فازهای آمورف در ساختار پودر هیدروکسی آپاتیت، امکان وارد شدن آب به ساختار هیدروکسی آپاتیت وجود دارد (۲۹). علاوه بر این، منشأ آب جذب شده می‌تواند از محیط اطراف و یا دستگاه طیف‌سنج FTIR نیز باشد؛ بنابراین، همواره در طیف‌های FTIR پیک‌های مربوط به آب جذب شده نیز مشاهده می‌شوند.

نتایج FE-SEM نشان داد که با افزایش مدت زمان فراصوت، اندازه ذرات کوچک‌تر خواهد شد. مورفولوژی و اندازه ذرات HA سنتز شده توسط SEM و FE-SEM، 5/16-80/70 مشاهده شد. در مطالعه ما جی و همکاران در سال ۲۰۱۹، نشان داده شد که مورفولوژی و اندازه نانوذرات هیدروکسی آپاتیت با تغییر شرایط محیطی (دما، حلال و pH) تغییر می‌کند. پودر هیدروکسی آپاتیت با اندازه نانومتریکی در کمتر از ۵۰ نانومتر با روش فعال‌سازی مکانیکی تولید شده است. از آنجایی که هیدروکسی آپاتیت نانوکریستالی با مورفولوژی کروی، سوزنی‌شکل و لوله‌ای‌مانند است در مقایسه با مورفولوژی‌های نامنظم در فرایند استخوان‌سازی از اهمیت بیشتری برخوردار است (۱۵).

سنتز هیدروکسی آپاتیت به روش اولتراسونیک مقرون به صرفه‌تر و راحت‌تر و در زمان کمتری نسبت به دو روش دیگر انجام شد. تک‌فازی بلورهای هیدروکسی آپاتیت سنتز شده در صفحات کریستالوگرافی (۰۰۲)، (۲۱۱)، (۱۱۲)، (۳۰۰)، (۲۰۲)، (۳۱۰)، (۲۲۲)، (۲۱۳)، (۳۲۱) و (۰۰۴) متعلق به HA سنتز شده را نشان می‌دهد که در نتایج قابل مشاهده است. طبق XRD، ذرات HA به صورت کریستال شش‌ضلعی مشاهده گردید. بر اساس نتایج XRD دیده شد که هرچه مدت زمان سنتز HA با روش اولتراسونیک بیشتر باشد، ذرات ریزتر و سوزنی‌مانند سنتز می‌شوند. همان‌طور که در شکل (۲) (C) مشاهده می‌شود، بر اساس استاندارد، همه قله‌ها مربوط به هیدروکسی آپاتیت خالص است (۲۹، ۳۰).

با تجزیه و تحلیل EDX درصد عناصر موجود در HA سنتز شده به روش اولتراسونیک بررسی شد. تجزیه و تحلیل

داده‌ها، نظارت، مدیریت پروژه.

[مهسا عباسی، حسین درخشان‌خواه، سهیلا کاشانیان و محمد سلیمان بیگی]: مشارکت اخلاقی در روش‌شناسی، نرم‌افزار، اعتبارسنجی، تحلیل رسمی، تحقیق، منابع، گردآوری داده‌ها، نگارش - پیش‌نویس اصلی، نگارش - بررسی و ویرایش.

EDX شواهدی از وجود عناصر فسفر، اکسیژن و کلسیم در ماده سنتز شده (هیدروکسی آپاتیت) را نشان داد (۳۰، ۳۱). سازگاری خونی و سلولی نانو کریستال‌های سنتز شده با هر سه روش، نتایج مطلوبی به همراه داشتند. در مطالعات انجام شده مشاهده گردید که هیچ سمیت سلولی، اختلال در چسبندگی سلول و کاهش زنده ماندن سلول وجود ندارد و در نتایج سازگاری خونی و سلولی قابل مشاهده است (۳۲). سازگاری سلولی با روش MTT سنجیده شد و بر اساس نتایج مشاهده گردید که هیدروکسی آپاتیت به دست آمده بقای سلولی و زیست‌سازگاری مناسبی با سلول‌های شبه‌استخوانی (MG63) نشان می‌دهد (۳۳-۳۵).

در مطالعه حاضر، از نانو کریستال‌های هیدروکسی آپاتیت از صدف‌های دریایی به‌عنوان منابع زیستی غنی از هیدروکسی آپاتیت، در دسترس و ارزان‌قیمت برای سنتز این ساختارها بهره گرفته شد. هدف این مطالعه بهینه‌سازی روش سنتز این نانو ساختارها بود که بر اساس نتایج، روش اولتراسونیک در مقایسه با دو روش دیگر، از نظر بازده محصول، مقرون به صرفه بودن و زمان کوتاه‌تر برتری نشان داد. با توجه به کاربرد وسیع هیدروکسی آپاتیت در پزشکی، توسعه منابع و بهینه‌سازی روش‌های سنتز این محصول می‌تواند بسیار ارزشمند باشد.

سپاس‌گزاری

از معاونت محترم تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه به سبب حمایت‌های مالی تقدیر و تشکر می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ تضاد منافع را اعلام نمی‌کنند.

کد اخلاق

این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی مصوب با کد ۵۰۰۴۰۸۱ معاونت تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه با شناسه اخلاق IR.KUMS.REC.1403.024 است.

حمایت مالی

از معاونت محترم تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه به سبب حمایت‌های مالی تقدیر و تشکر می‌گردد.

مشارکت نویسندگان

[ژیلا ایزدی]: مفهوم سازی، ایده‌ها، بررسی، مدیریت

References

- Chitra S, Rajeshkumar S, Ramya R, Bargavi P, Balakumar S. Probing the biocompatibility and antioxidant properties of *Cissus quadrangularis* conjugated bioactive glass and hydroxyapatite towards regeneration application. *Inorg Chem Commun* 2023;157:111398. doi: 10.1016/j.inoche.2023.111398.
- Abdian N, Etminanfar M, Sheykholeslami SOR, Hamishehkar H, Khalil-Allafi J. Preparation and characterization of chitosan/hydroxyapatite scaffolds containing mesoporous SiO₂-HA for drug delivery applications. *Mater Chem Phys* 2023;301:127672. doi: 10.1016/j.matchemphys.2023.127672.
- Arokiasamy P, Abdullah MMAB, Abd Rahim SZ, Luhar S, Sandu AV, Jamil NH, et al. Synthesis methods of hydroxyapatite from natural sources: A review. *Ceram Int* 2022;48:14959-79. doi: 10.1016/j.ceramint.2022.03.064.
- Pavlychev A, Brykalova X, Korneev A, Cherny A, Kornilov N. Specific Features of the Crystal Structure of Calcium Hydroxyapatite in Native Bone Tissue. *Crystallogr Rep* 2024;69:38-44. doi:10.1134/S1063774523601326.
- Xiao D, Zhang J, Zhang C, Barbieri D, Yuan H, Moroni L, et al. The role of calcium phosphate surface structure in osteogenesis and the mechanisms involved. *Acta Biomater* 2020;106:22-33. doi: 10.1016/j.actbio.2019.12.034.
- Yang-Zhou CH, Cao JX, Dong SS, Chen SH, Michael RN. Phosphorus co-existing in water: a new mechanism to boost boron removal by calcined oyster shell powder. *Molecules* 2021;27:54. doi: 10.3390/molecules27010054.
- Sricharoen P, Limchoowong N, Nuengmatcha P, Chanthai S. Ultrasonic-assisted recycling of Nile tilapia fish scale biowaste into low-cost nano-hydroxyapatite: Ultrasonic-assisted adsorption for Hg²⁺ removal from aqueous solution followed by "turn-off" fluorescent sensor based on Hg²⁺-graphene quantum dots. *Ultrason Sonochem* 2020;63:104966. doi: 10.1016/j.ultsonch.2020.104966.
- Anandan D, Jaiswal AK. Synthesis methods of hydroxyapatite and biomedical applications: an updated review. *ACSJ* 2024;60:663-79. doi: 10.1007/s41779-023-00943-2.
- Indira J, Malathi K. Comparison of template mediated ultrasonic and microwave irradiation method on the synthesis of hydroxyapatite nanoparticles for biomedical applications. *Mater Today* 2022;51:1765-9. doi: 10.1016/j.matpr.2021.03.028.
- Osuchukwu OA, Salihi A, Abdullahi I, Etinosa PO, Obada DO. A comparative study of the mechanical properties of sol-gel derived hydroxyapatite produced from a novel mixture of two natural biowastes for biomedical applications. *Sci Rep* 2022;12:17968. doi: 10.1038/s41598-022-22888-5.
- Hajibeygi M, Mousavi M, Shabanian M, Habibnejad N, Vahabi H. Design and preparation of new polypropylene/magnesium oxide micro particles composites reinforced with hydroxyapatite nanoparticles: A study of thermal stability, flame retardancy and mechanical properties. *Mater Chem Phys* 2021;258:123917. doi: 10.1016/j.matchemphys.2020.123917.
- Yinka KM, Olayiwola AJ, Sulaiman A, Ali A, Iqbal F. Preparation and characterization of hydroxyapatite powder for biomedical applications from giant African land snail shell using a hydrothermal technique. *EASR* 2020;47. doi: 10356/66023.
- Lin DJ, Lin HL, Haung SM, Liu SM, Chen WC. Effect of pH on the in vitro biocompatibility of surfactant-assisted synthesis and hydrothermal precipitation of rod-shaped nano-hydroxyapatite. *Polymers* 2021;13:2994. doi: 10.3390/polym13172994.
- Molino G, Palmieri MC, Montalbano G, Fiorilli S, Vitale-Brovarone C. Biomimetic and mesoporous nano-hydroxyapatite for bone tissue application: A short review. *Biomed Mater* 2020;15:022001. doi: 10.1088/1748-605X/ab5f1a.
- Kadu K, Kowshik M, Ramanan SR. Does the nanoparticle morphology influence interaction with protein: A case study with hydroxyapatite nanoparticles. *Mater Today Commun* 2021;26:102172. doi: 10.1016/j.mtcomm.2021.102172.
- Upadhyay P, Ullah A. Facile synthesis of hydroxyapatite nanoparticles from eggshell biowaste using *Azadirachta indica* extract as a green template. *New J Chem* 2024;48:1424-35. doi: 10.1039/D3NJ01715J.
- Prakash VCA, Venda I, Thamizharasi V, Sathya E. A new attempt on synthesis of spherical nano hydroxyapatite powders prepared by dimethyl sulfoxide-poly vinyl alcohol assisted microemulsion method. *Mater Chem Phys* 2021;259:124097. doi: 10.1016/j.matchemphys.2020.124097.
- Orasugh JT, Ghosh SK, Chattopadhyay D. Nanofiber-reinforced biocomposites. *Fiber-reinforced nanocomposites: fundamentals and applications*: Elsevier; 2020. p. 199-233. doi: 10.1016/B978-0-12-819904-6.00010-4.

19. Raja PB, Munusamy KR, Perumal V, Ibrahim MNM. Characterization of nanomaterial used in nanobioremediation. *Nanobioremediation: fundamentals and applications*: Elsevier; 2022. p. 57-83. doi: 10.1016/B978-0-12-823962-9.00037-4.
20. Jia B, Yang H, Han Y, Zhang Z, Qu X, Zhuang Y, et al. In vitro and in vivo studies of Zn-Mn biodegradable metals designed for orthopedic applications. *Acta Biomater* 2020;108:358-72. doi: 10.1016/j.actbio.2020.03.009.
21. Kumar K, Das A, Prasad SB. Biodegradable metal matrix composites for orthopedic implant applications: A review. *Advances in Engineering Materials: Select Proceedings of FLAME 2020*. 2021:557-65. doi: 10.1007/978-981-33-6029-7_52.
22. Díaz-Cuenca A, Rabadjieva D, Sezanova K, Gergulova R, Ilieva R, Tepavitcharova S. Biocompatible calcium phosphate-based ceramics and composites. *Mater Today* 2022;61:1217-25. doi: 10.1016/j.matpr.2022.01.329.
23. Josephin A, Intan N, Basari B, Rahman SF, editors. Extraction of collagen and hydroxyapatite from fish for bone scaffold: A review. *AIP Conference Proceedings*; 2024: AIP Publishing. doi: 10.1063/5.0198630.
24. Sans J, Sanz V, Puiggali J, Turon P, Alemán C. Controlled anisotropic growth of hydroxyapatite by additive-free hydrothermal synthesis. *Crystal Growth Design* 2020;21:748-56. doi: 10.1021/acs.cgd.0c00850.
25. Verma R, Mishra SR, Gadore V, Ahmaruzzaman M. Hydroxyapatite-based composites: Excellent materials for environmental remediation and biomedical applications. *Adv Colloid Interface Sci* 2023;102890. doi: 10.1016/j.cis.2023.102890.
26. Zastulka A, Clichici S, Tomoiaia-Cotisel M, Mocanu A, Roman C, Olteanu CD, et al. Recent trends in hydroxyapatite supplementation for osteoregenerative purposes. *Materials* 2023;16:1303. doi: 10.3390/ma16031303.
27. Rajkumar P, Sarma BK. Role of Zn and Mg substitutions on the mechanical behaviour of biomimetic hydroxyapatite and insight of the emergence of hydroxyapatite-ZnO nanocomposite. *Mater Charact* 2021;176:111107. doi: 10.1016/j.matchar.2021.111107.
28. Filip DG, Surdu VA, Paduraru AV, Andronescu E. Current development in biomaterials—hydroxyapatite and bioglass for applications in biomedical field: a review. *J Funct Biomater* 2022;13:248. doi: 10.3390/jfb13040248.
29. Pu'ad NM, Haq RA, Noh HM, Abdullah H, Idris M, Lee T. Synthesis method of hydroxyapatite: A review. *Mater Today* 2020;29:233-9. doi: 10.1016/j.matpr.2020.05.536.
30. Gani MA, Budiadin AS, Shinta DW, Ardianto C, Khotib J. Bovine hydroxyapatite-based scaffold accelerated the inflammatory phase and bone growth in rats with bone defect. *J Appl Biomater Funct Mater* 2023;21:22808000221149193. doi: 10.1177/22808000221149193.
31. Surya P, Nithin A, Sundaramanickam A, Sathish M. Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite from *Sardinella longiceps* fish bone and its effects on human osteoblast bone cells. *J Mech Behav Biomed Mater* 2021;119:104501. doi: 10.1016/j.jmbbm.2021.104501.
32. Khosalim IP, Zhang YY, Yiu CKY, Wong HM. Synthesis of a graphene oxide/agarose/hydroxyapatite biomaterial with the evaluation of antibacterial activity and initial cell attachment. *Sci Rep* 2022;12:1971. doi: 10.1038/s41598-022-06020-1.
33. Ijaz I, Gilani E, Nazir A, Bukhari A. Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles. *GCLR* 2020;13:223-45. doi: 10.1080/17518253.2020.1802517.
34. Elbasuney S. Green synthesis of hydroxyapatite nanoparticles with controlled morphologies and surface properties toward biomedical applications. *J Inorg Organomet Polym Mater* 2020;30:899-906. doi: 10.1007/s10904-019-01247-4.
35. Vinayagam R, Pai S, Murugesan G, Varadavenkatesan T, Kaviyarasu K, Selvaraj R. Green synthesized hydroxyapatite nanoadsorbent for the adsorptive removal of AB113 dye for environmental applications. *Environ Res* 2022;212:113274. doi: 10.1016/j.envres.2022.113274.