

## سنتز و شناسایی هیدروکسی آپاتیت به روش درجا و بررسی تأثیر جایگزینی آهن برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان

مریم مسکنتی<sup>۱</sup>، حمیدرضا آقابرگ<sup>۲\*</sup>، معصومه مسکین فام<sup>۳</sup>، و فرشته مطیعی<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی دکتری شیمی معدنی، دانشکده شیمی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. استاد شیمی معدنی، دانشکده شیمی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳. استادیار شیمی معدنی، دانشکده شیمی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.

۴. استادیار شیمی کاربردی، دانشکده شیمی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

دریافت: دی ۱۴۰۰ بازنگری: بهمن ۱۴۰۰ پذیرش: بهمن ۱۴۰۰



10.30495/JACR.2022.1949138.2008



20.1001.1.17359937.1401.16.4.6.4

### چکیده

در این پژوهش، پودر نانوبلور هیدروکسی آپاتیت اصلاح شده با آهن (FeHAp) از ترکیب یون های آهن، کلسیم نترات و بنتوکسیدفسفر با روش درجا تهیه شد. این نانوپندسازه برای تهیه داربستی بر بستر کیتوسان و سازگار با بافت استخوان، به کار گرفته شد. نمونه های تهیه شده با روش های پراش پرتو ایکس (XRD)، طیف سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR)، مغناطیس سنج نمونه ارتعاشی (VSM)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و طیف شناسی تفکیک انرژی (EDS) شناسایی شدند. نتیجه های به دست آمده تهیه هیدروکسی آپاتیت اصلاح شده با آهن را تایید کردند. ریخت شناسی داربست ها نشان داد که ذره های FeHAp به خوبی بر بستر متخلخل کیتوسان (CS) پراکنده شده اند. نمونه های به دست آمده از نظر سمیت در برابر سلول های فیروبللاست و نیز برای ارزیابی کمی سلول های زنده متصل و رشد یافته بر داربست ها مورد آزمون برون تنی MTT قرار گرفتند. نتیجه ها نشان دادند که داربست تهیه شده، نمونه مناسبی برای بازسازی بافت استخوانی، می تواند باشد.

**واژه های کلیدی:** کیتوسان، هیدروکسی آپاتیت، آهن، درجا، مهندسی بافت.

### مقدمه

و یک بستر با قابلیت استخوان سازی است. برای بازسازی بافت سخت، داربست سه بعدی چندسازه ای با شبکه بهم پیوسته و متخلخل و اندازه تخلخل بالا اجازه می دهد تا عملکرد سلول برای ترمیم مناسب شود [۱ و ۲]. هیدروکسی آپاتیت (HAp) بخش معدنی استخوان را تشکیل

مهندسی بافت بر پایه تقلید از فرایند ساخت و ترمیم استخوان در آزمایشگاه استوار است. سه عامل اصلی در مهندسی بافت استخوان، سلول، عامل رشد یا تمایز استخوانی

CS خالص را افزایش دهد. در سال ۲۰۱۹، فن و همکارانش میکروسفرهای مرکب کیتوسان-هیدروکسی آپاتیت مغناطیسی را تهیه و از آن‌ها برای جذب مواد فنی استفاده کردند [۱۱]. طیف گسترده‌ای از کاربردهای زیست‌پزشکی برای مواد مغذی زیست‌سازگار و مغناطیسی مانند تحویل دارو، جداسازی سلول، تصویربرداری تشدید مغناطیسی و برنامه هایپرترمیا وجود دارد [۱۲ تا ۱۵]. از نانوذرات آهن اکسید درحال حاضر برای این کاربردها استفاده می‌شود، ولی نگرانی‌هایی در مورد سمیت حاد وجود دارد. از آنجا که HAp سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر است، استفاده از HAp مغناطیسی این نگرانی‌ها را کاهش می‌دهد. عنصر متداول برای تهیه HAp مغناطیسی، آهن است [۱۶ و ۱۷]. سایر فلزها نیز قابلیت مغناطیسی کردن را دارند. هرچند که با محدودیت‌هایی روبه‌رو هستند. برای مثال، باوجود اینکه کبات برای عملکرد ویتامین B12 در بدن نیاز است، ولی مقدار بیش‌ازحد آن موجب سمیت شدید می‌شود [۱۸ تا ۲۰]. در این پژوهش، چندسازه FeHAp تهیه و با به‌کارگیری آن بر بستر کیتوسان داربست CS/ FeHAp با یک روش ساده در دمای اتاق تهیه شد. نمونه‌های به‌دست آمده با روش‌های XRD، FTIR، SEM و EDS شناسایی و از نظر سمیت در برابر سلول‌های فیبروبلاست با آزمون MTT بررسی شدند.

### بخش تجربی

#### مواد و دستگاه‌ها

برای سنتر نمونه‌ها، کیتوسان، آهن (II) کلرید چهارآبه، آهن (III) کلرید شش‌آبه، کلسیم‌نیترات چهارآبه، کلسیم‌هیدروکسید، دی‌آمونیم‌هیدروژن فسفات ساخت شرکت سیگما-آلدریج، محلول‌های آمونیاک ۲۵٪ و اتانول ۹۸٪ ساخت شرکت مرک و سلول‌های فیبروبلاست (Fibroblast L929) از مرکز تحقیقات سرطان دانشگاه علوم پزشکی

می‌دهد و ترکیبی زیست‌سازگار و از نظر شیمیایی پایدار است به گونه‌ای که پس از کاشت آن در بدن، بافت استخوان جدیدی بر آن رشد می‌کند و پیوند محکمی میان این نوع کاشتنی با بدن برقرار می‌شود [۳]. به‌بیان‌دیگر، برهم‌کنش ذرات HAp با مولکول‌های آلی (پروتئین و پلی‌ساکاریدها) برای ویژگی‌های مکانیکی استخوان از اهمیت زیادی برخوردار است. هیدروکسی آپاتیت ساختاری هگزاگونال دارد و فرمول شیمیایی آن به‌صورت  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  است. ترکیبات گوناگونی از این ترکیب به‌دلیل جایگزینی‌های متفاوت به‌وجود می‌آید. این جایگزینی‌ها می‌تواند در موقعیت کاتیون‌های کلسیم، گروه فسفات و یا گروه‌های هیدروکسیل صورت پذیرد [۴ تا ۶]. به‌دلیل وجود آهن در استخوان و دندان، این عنصر به‌عنوان یکی از کاتیون‌های جایگزین مورد توجه است [۷]. لی و همکارانش نمونه‌های هیدروکسی آپاتیت اصلاح‌شده با آهن را در درصدهای متفاوت تهیه کردند و آزمون سمیت ( $MTT$ ) را بر آن‌ها انجام دادند. همه نمونه‌های سنترشده فاقد سمیت سلولی بودند [۸]. در پژوهشی که توسط کرامر و همکارانش در سال ۲۰۱۳ انجام شد، یون‌های آهن با روش غوطه‌وری وارد ساختار آپاتیت شدند. به این صورت که نمونه‌ها در دو محلول فریک کلرید و فروس کلرید برای مدت زمان‌های معینی خیسانده شدند. نتایج EDS نشان داد نمونه‌های خیسانده شده در محلول فریک کلرید حاوی یون‌های آهن بیشتری بودند و نتایج VSM رفتار پارامغناطیسی پودرها را تاییدکرد [۹]. در سال ۲۰۱۸، حیدری و همکارانش چندسازه‌های CS / HAp / nano-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> را تهیه و ویژگی مکانیکی آن‌ها، تجزیه زیستی در شرایط آزمایشگاهی و سازگاری سلول را ارزیابی کردند [۱۰]. آن‌ها دریافتند که افزودن HAp و Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> به بستر CS می‌تواند به‌طور قابل توجهی ویژگی‌های مکانیکی

ایران، خریداری شدند. برای بررسی ساختارچندسازه‌ها، دستگاه‌های پراش پرتو ایکس (XRD) فیلیپس مدل PW 1800، ساخت هلند، طیف‌سنج فرورسرخ تبدیل فوریه (FTIR) مدل Perkin Elmer 100، ساخت آمریکا، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل KYKY-EM3200 مجهز به دستگاه طیف‌سنج تفکیک انرژی (EDS)، ساخت چین و طیف‌نورسنج ساخت شرکت BioTek آمریکا استفاده شد. همچنین، دستگاه pH متر مدل Metrohm-827، ساخت سوئیس، دستگاه گریزانه مدل Kokusan HL-7، ساخت ژاپن، گرم‌خانه Binder، ساخت آلمان و طیف‌نورسنج ساخت شرکت Biotek به کارگرفته شدند.

#### سنتر داربست نانوجندسازه‌ها

پودر کیتوسان (درجه استحصال ۸۵٪، سیگما-آلدریج) در استیک اسید (۱٪، سیگما-آلدریج) حل شد تا محلول ۱٪ کیتوسان به دست آید. مقدار مشخصی از HAp و FeHAp به طور جداگانه به محلول یادشده، افزوده شد. نمونه‌های به دست آمده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس به مدت ۶ ساعت جامد شدند. برای خشک کردن مخلوط‌های جامد یادشده در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۶ ساعت از دستگاه خشک‌کن اتجمادی استفاده شد. فرآورده‌های نهایی به صورت CS/FeHAp و CS/HAp نام‌گذاری شدند.

#### آزمون زیست‌سازگاری MTT

آزمون MTT برای سنجش مقدار یا نسبت تکثیرسلولی کاربرد دارد و پایه آن رنگ‌سنجی برای اندازه‌گیری کاهش ۳- (۴، ۵-دی‌متیل‌تيازول-۲-ایل)-۲، ۵-دی‌فنیل‌تترازولیم (MTT) زردرنگ در حضور آنزیم سوکسینات‌دهیدروژناز است. MTT در هنگام ورود به سلول و عبور از میتوکندری به فرآورده بنفش‌رنگ و نامحلول فرمازان کاهیده می‌شود. سپس، سلول‌ها در یک حلال‌آلی (مانند دی‌متیل‌سولفوکسید) حل می‌شوند. واکنشگر آزادشده فرمازان به روش طیف‌نورسنجی اندازه‌گیری می‌شود. از آنجا که کاهش MTT تنها می‌تواند در سلول‌های فعال دگرگشتی<sup>۱</sup> رخ دهد، سطح فعالیت می‌تواند معیاری از بقای سلولی باشد.

سنتر درجا نانوجندسازه‌ها

در ابتدا محلول‌های، ۲۳/۴۰ گرم از کلسیم هیدروکسید در ۴۰۰ میلی‌لیتر آب، ۲۰/۷۵ گرم فسفریک‌اسید در ۳۰۰ میلی‌لیتر آب، ۶/۰۳ گرم آهن (II) کلرید چهارآبه در ۷۵ میلی‌لیتر آب و ۸/۲۳ گرم از آهن (III) کلرید شش‌آبه در ۷۵ میلی‌لیتر آب به طور جداگانه تهیه و با همزن مغناطیسی به مدت ۳۰ دقیقه هم‌زده شدند. سپس، مخلوط‌های آهن (II) کلرید چهارآبه، آهن (III) کلرید شش‌آبه و فسفریک‌اسید با بورت هم‌زمان و به صورت قطره‌قطره به بشر حاوی محلول کلسیم هیدروکسید در دمای محیط افزوده و به مدت یک‌شبانه روز در دمای محیط و به طور ساکن در آزمایشگاه قرار داده شدند. فرآورده به دست آمده پس از ۲۴ ساعت با آب یون‌زدوده برقیف بوختر شسته شد تا pH محلول زیر قیف برابر با ۷ شود. رسوب به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۸۰ درجه سلسیوس در آون قابل برنامه‌ریزی قرار داده شدند. رنگ رسوب‌های به دست آمده نارنجی بود. یک روش تبادل یونی ساده برای جایگزینی یون‌های  $Ca^{2+}$  با  $Fe^{2+}$  و  $Fe^{3+}$  در شبکه بلوری HAp به کارگرفته شد. منابع تأمین‌کننده یون‌های کلسیم، فسفر و آهن به ترتیب کلسیم نیترات چهارآبه  $(Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O)$ ، دی‌آمونیم هیدروژن فسفات

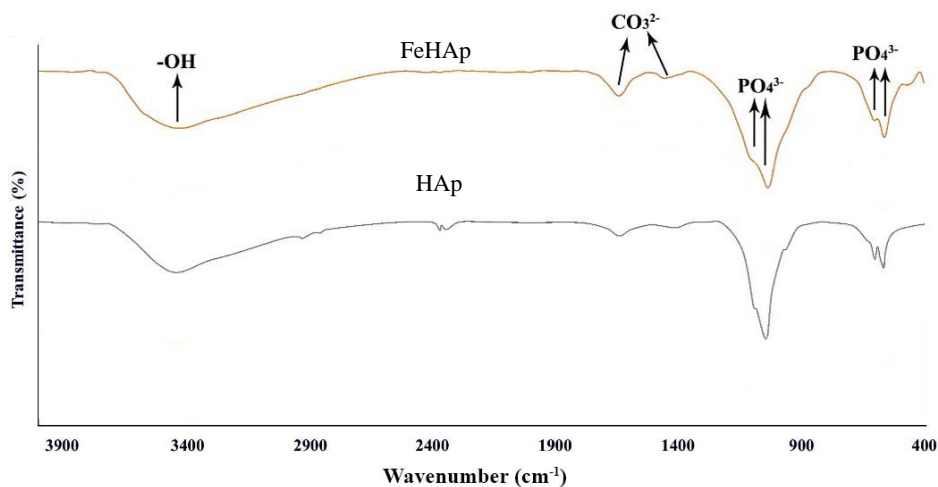
همچنین، نوارهای  $1410$  و  $1460$   $\text{cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش کششی گروه کربنات است. به طور تقریبی طیف هر دو نمونه یکسان است. این نشان می‌دهد که FeHAp و HAp خالص گروه‌های عاملی مشابه دارند. نتایج به دست آمده با نتایج گزارش شده همخوانی دارند [۲۱ تا ۲۳]. شکل ۲، الگوهای پراش پرتو ایکس نمونه هیدروکسی آپاتیت اصلاح شده با آهن به روش درجا و الگوی هیدروکسی آپاتیت را در گستره  $2\theta$  از  $4^\circ$  تا  $60^\circ$  نشان می‌دهد. پیک‌های اصلی هیدروکسی آپاتیت را می‌توان در الگوی این نمونه‌ها مشاهده کرد. وجود سه پیک شدید در  $2\theta$  برابر با  $25/90$ ،  $31/95$  و  $49/50^\circ$  متناظر با صفحه‌های بلوری  $(002)$ ،  $(211)$  و  $(213)$  و همخوانی این الگو با الگوی استاندارد (JCPDS No. = 09-432)، بیانگر تشکیل فاز بلوری هیدروکسی آپاتیت است [۲۴ تا ۲۵]. در این الگوها هیچ ناخالصی مشاهده نمی‌شود. پهن بودن پیک‌ها مربوط به بلورینگی پایین هیدروکسی آپاتیت تشکیل شده است که به ساختار استخوان طبیعی نزدیک است. مقایسه الگوی نمونه هیدروکسی آپاتیت اصلاح شده با آهن با الگوی هیدروکسی آپاتیت، بیانگر جایگزینی آهن در ساختار هیدروکسی آپاتیت است. توزیع اندازه نمونه‌های تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مطالعه شد. شکل ۳، تصویر SEM از چندسازه FeHAp را به همراه نمودار توزیع اندازه مربوط نشان می‌دهد. همان گونه که مشاهده می‌شود، ذرات یکنواخت و کروی هستند و ابعاد آن‌ها بیشتر در مقیاس نانو است. بررسی طیف‌های EDS نمونه‌های HAp و FeHAp نشان داد که P، Ca و O هر دو نمونه و عنصر Fe نیز در نمونه FeHAp وجود دارد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که Fe در ساختار HAp جایگزین شده است. نتیجه کمی تجزیه عنصری نمونه‌های HAp و FeHAp با روش EDS در جدول ۱ نشان داده شده است که همخوانی خوبی با نتیجه پژوهش کرامر و همکارانش دارد [۲۵].

تکثیر سلول‌های کشت شده همراه با چندسازه مورد نظر و بدون آن با آزمون MTT اندازه‌گیری می‌شود.

برای انجام این آزمون، از سلول‌های فیروبلاست تهیه شده از مرکز تحقیقات سرطان دانشگاه علوم پزشکی ایران استفاده شد. نمونه‌ها پیش از کشت سلولی به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت داخل گرم‌خانه سترون و با سلول‌ها به طور یکنواخت مخلوط شدند. سپس، مخلوط به دست آمده به چاهک‌های یک صفحه از جنس پلی‌استایرن منتقل شدند. به هر کدام از چاهک‌های نمونه‌ها پس از کشت به مدت ۱، ۳ و ۷ روز،  $100$  میکرولیتر محلول MTT افزوده شد. نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در گرم‌خانه حاوی  $5\%$  کربن دی‌اکسید در دمای  $37$  درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس مایع‌رویی (شناور) هر نمونه دور ریخته شد. در این مرحله،  $100$  میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) به هر چاهک نمونه افزوده شد تا فرمازان تولید شده به طور کامل حل شود. جذب‌نوری (OD) هر نمونه در طول موج  $540$  نانومتر با دستگاه طیف‌نورسنج اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار Microsoft Excel Worksheet 2016 انجام شد. مقایسه آماری بین همه گروه‌ها با تحلیل‌وردایی یک‌سویه و دوسویه محاسبه شد. برای همه نمونه‌ها  $P < 0.05$  بود که نشان‌دهنده معنی‌دار بودن نتیجه به دست آمده بود.

## نتیجه‌ها و بحث

شکل ۱، طیف‌های FTIR نمونه‌های HAp و FeHAp را در گستره  $400$  تا  $4000$   $\text{cm}^{-1}$  نشان می‌دهد. همان گونه که مشاهده می‌شود، نوارهای گستره  $560$  تا  $1100$   $\text{cm}^{-1}$  و همچنین، نوارهای گستره  $1020$  تا  $1100$   $\text{cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش‌های گروه فسفات است. نوار پهن گستره  $3400$  تا  $3569$   $\text{cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش گروه OH است.

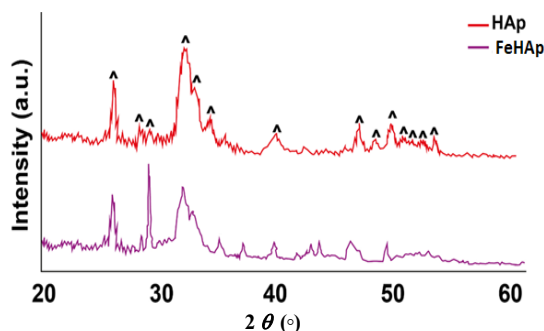


شکل ۱ طیف‌های FTIR پودرهای سنتز شده HAp و FeHAp

(بیک‌های شاخص شدید هیدروکسی‌آپاتیت با ۸ در شکل مشخص شده‌اند.)

ویژگی مغناطیسی FeHAp

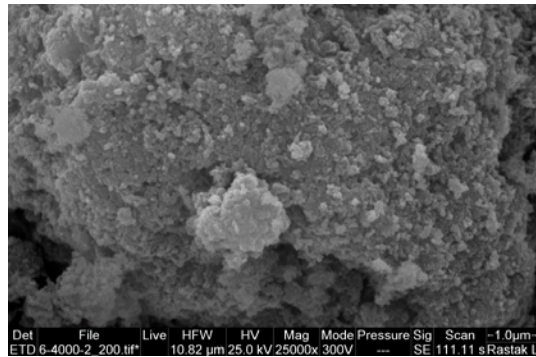
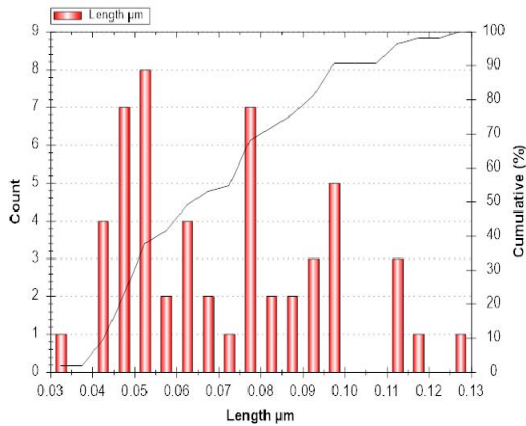
آزمون VSM برای ارزیابی ویژگی مغناطیسی FeHAp در دمای محیط در یک میدان ۱۰ کیلوولت انجام شد (شکل ۴). همان‌گونه که مشاهده می‌شود، نمونه FeHAp ویژگی پارامغناطیسی را نشان می‌دهد.



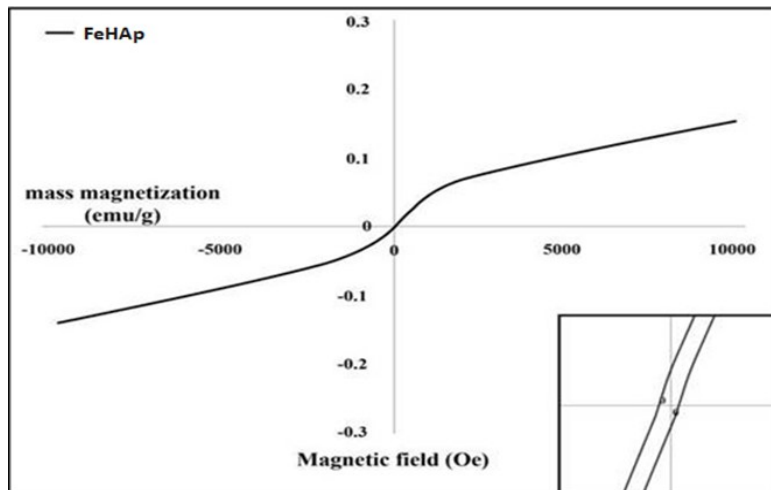
شکل ۲ مقایسه الگوهای پراش پرتو ایکس نمونه‌های هیدروکسی‌آپاتیت و هیدروکسی‌آپاتیت اصلاح‌شده با آهن به روش درجا

جدول ۱ نتیجه تجزیه عنصری هیدروکسی‌آپاتیت و هیدروکسی‌آپاتیت اصلاح‌شده با آهن

عنصر						نمونه
Fe		Ca		P		
درصد وزنی	درصد اتمی	درصد وزنی	درصد اتمی	درصد وزنی	درصد اتمی	
-	-	۵۱٫۶	۳۵٫۷	۲۳٫۳	۲۰٫۸	HAp
۲۴٫۵	۱۰٫۵	۹٫۸	۲۷٫۳	۲۴٫۳	۲۱٫۰	FeHAp



شکل ۳ تصویر SEM و نمودار توزیع اندازه ذره‌های FeHAp



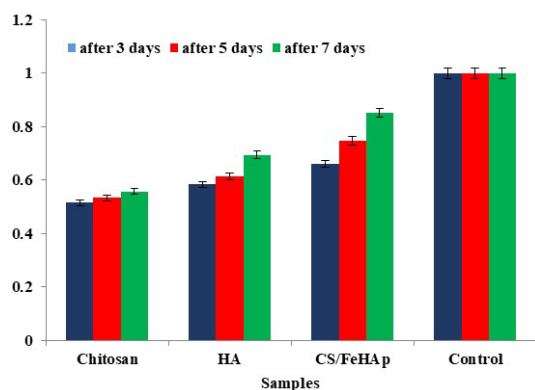
شکل ۴ نمودار مغناطیسی FeHAp

علت این پدیده می‌تواند جاذبه مغناطیسی بین ذرات FeHAp باشد که با نتایج VSM همخوانی دارد. از طرفی دیگر، ذرات مغناطیسی FeHAp با کاهش تخلخل بستر CS، ساختار داربست را تحت تأثیر قرار داده‌اند (شکل ۴-۴).

شکل ۵، تصویرهای SEM بستر کیتوسان و داربست‌های CS/HAp و CS/FeHAp را نشان می‌دهند. همان‌گونه که مشاهده می‌شود نانوذره‌های HAp و FeHAp به‌طور یکنواخت بر بستر CS توزیع شده‌اند. هرچند که تجمع اندک نانوذره‌های FeHAp نیز بر بستر کیتوسان مشاهده می‌شود.

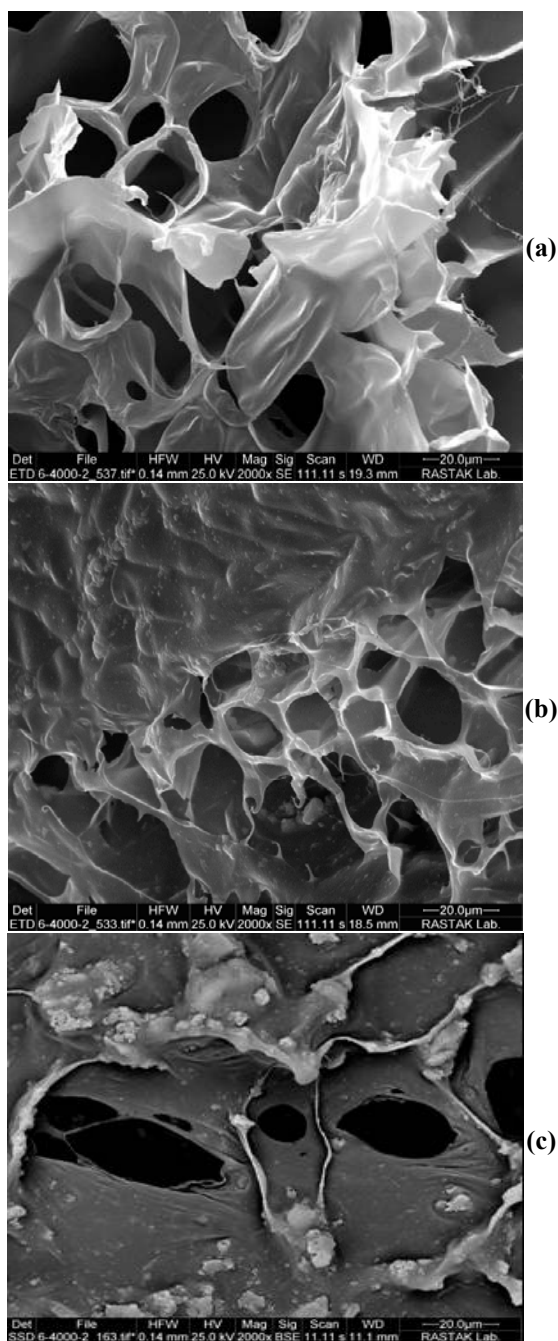
## آزمون برون‌تنی (MTT)

برای ارزیابی کمی سلول‌های زنده متصل و رشد یافته بر داربست‌ها، روش MTT انجام شد [۱۵]. ماندگاری سلول‌های فیبروبلاست با تعداد سلول در واحد سطح نمونه‌ها محاسبه شد. همان‌طور که در شکل ۶ نشان داده شده است، روشن است که CS زیست‌سازگاری خوبی دارد.



شکل ۶ آزمون برون‌تنی سلول فیبروبلاست در داربست‌های CS. CS/HAp و CS/FeHAp پس از ۳، ۵، و ۷ روز کشت سلول

با این‌حال، تعداد سلول‌ها به معنای سمی بودن نمونه‌های دیگر با ماندگاری پایین نیست. ماندگاری سلول‌های فیبروبلاست با استفاده از تعداد سلول در واحد سطح نمونه‌ها محاسبه شد. به‌بیان‌دیگر، همه نمونه‌ها با تفاوت کمی در پتانسیل پیوند سلول با یکدیگر سازگار هستند و وجود ذرات مغناطیسی FeHAp هیچ تأثیر معکوس بر زیست-سازگاری آزمایشگاهی نمونه‌ها ندارد. نتایج به‌دست‌آمده با نتایج به‌دست‌آمده توسط چاندرا و همکارانش همخوانی دارد. [۲۸]. آن‌ها از روش‌های ترکیبی ریزموج و آب‌گرمایی، HAp طبیعی دوپه‌شده با آهن را تهیه کردند. آن‌ها دریافتند که وجود یون‌های آهن هنگام آزمایش در محلول SBF منجر به فعالیت زیستی بالاتری می‌شود. داربست CS/FeHAp بیشترین سازگاری سلول را در مقایسه با سایر نمونه‌ها پس از



شکل ۵ تصویرهای SEM بستر کیتوسان (a) و داربست‌های CS/HAp (b) و CS/FeHAp (c)

انجام داد. نوارهای جذبی طیفسنجی فرسرخ و الگوهای پراش پرتو X، تشکیل فاز معدنی در بستر آلی کیتوسان را تأیید کردند. تصویرهای میکروسکوپ الکترونی و تجزیه عنصری، تشکیل و توزیع ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت و نانوهیدروکسی آپاتیت اصلاح شده با آهن را در بستر زیست بسپار تحت روش سنتر درجا نشان دادند. همچنین، نتیجه‌های به دست آمده نشان دادند که کیتوسان بستر مناسبی برای رشد و هسته‌زایی نانوبلورهای هیدروکسی آپاتیت و نانوهیدروکسی آپاتیت اصلاح شده با آهن است. همچنین، تهیه داربست‌های چندسازه کیتوسان-هیدروکسی آپاتیت اصلاح شده با آهن به روش خشکاندن انجمادی به دلیل شباهت داشتن به ساختار استخوان و همچنین داشتن تخلخل‌های مناسب، می‌تواند در کاربردهای مهندسی بافت استخوان به کار گرفته شود.

۷ روز کشت نشان داد که دلیل آن را می‌توان به ترکیب شیمیایی متفاوت آن و جایگزینی خوب آهن در ذرات HAP نسبت داد. سازگاری زیستی HAP دوپه شده با آهن توسط پنسیریت و همکارانش نیز گزارش شده است [۲۶] که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد. آن‌ها با استفاده از سلول‌های کشت شده استئوبلاست انسانی Saos-2 اثر غلظت‌های متفاوت FeHAP را در شرایط برون‌تنی بررسی کردند. این آزمایش‌ها با و بدون قرار گرفتن در معرض یک میدان مغناطیسی استاتیک انجام شد. نتایج آن‌ها در مقایسه با نانوذرات خالص HAP، زنده ماندن استئوبلاست و تکثیر سلولی بالا را نشان داد.

### نتیجه گیری

سنتر نانوسازه هیدروکسی آپاتیت اصلاح شده با یون آهن را می‌توان با روش تقلید زیستی در بستر کیتوسان

### مراجع

- [1] Kim, C.W.; Talac, R.; Lichun, Lu.; Moore, M.; Bradford, L.; Currier, M.J.; Yaszemski, J ; Biomed. Mater. Res. A 85, 1114-9, 2008.
- [2] Shi, X.; Sitharaman, B.; Pham, Q.P.; Liang, F.; Wu, K.; Billups, W.E.; Wilson, L.J.; Mikos, A.G.; J. Biomaterials. 28, 4078-90, 2007.
- [3] Song, K.; Liu, T.; Cui, Z.; Li, X.; Ma, X.; J. Biomed. Mater. Res. A. 86, 323-32, 2008.
- [4] Cengiz, B.; Gokce, Y.; Yildiz, N.; Aktas, Z.; Calimli, A.; Colloid Surface 32, 29-33, 2008.
- [5] Wakamura, M.; Kandori, K.; Ishikawa, T.; Colloids and Surfaces 164, 297-305, 2000.
- [6] Zhu, Y.; Zhou, D.; Zan, X.; Sheng, S. and Ye, Q.; Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. In Press, 112319, 2022.
- [7] Beattie, J.H.; Avenell, A.; Nutrition Research 5, 167-188, 1992.
- [8] Li, Y.; Nam, C.T.; Ooi, C.P.; Journal of Physics: Conference Series 187 012024, 2009.
- [9] Kramer, E.R.; Morey, A.M.; Staruch, M.; Suib, S.L.; Jain, M.; Budnick, J.I.; Wei, M.; Materials Science and Engineering 48, 665-673, 2013.
- [10] Kim, S.S.; Park, M.S.; Gwak, S.J.; Choi, C.Y.; Kim, B.S.; Tissue Eng 12, 2997-3006, 2006.
- [11] Nie, H.; and Wang, C.H.; J. Control. Release 120, 111-121, 2007.
- [12] Ren, J. Ren, T.; Zhao, P.; Huang, Y.; Pan, K.; J. Biomater. Sci. Polym. Ed 18, 505-517, 2007.
- [13] Saravanan, S.; Leena, R.S.; Selvamurugan, N.; J. Biol. Macromol 93, 1354-1365, 2016.
- [14] Aslani, M.; Meskinfam, M.; Aghabozorg, H.R.; Passdar, H.; Motiee, F.; Journal of



- Applied Research in Chemistry 10(4), 41-48, 2017.
- [15] Yang, L.; Jin, S.; Shi, L.; Ullah, I.; Yu, K.; Zhang, W.; Bo, L.; Zhang, X. and Guo, X.; Chemical Engineering Journal 431(4), 133459, 2022.
- [16] Khan, M.N.; Islam, J.M. and Khan, M.A.; J. Biomed. Mater. Res. 100, 3020-3028, 2012.
- [17] Oliveira, S.M.; Ringshia, R.A.; Legeros, R.Z.; Clark, E.; Yost, M.J.; Terracio, L.; Teixeira, C.C.; J Biomed Mater Res A. 94, 371-379, 2010.
- [18] Valente, J.F.A.; Valente, T.A.M.; Alves, P.; Ferreira, P.; Silva, A. and Correia, I.J.; Mater. Sci. Eng. C. 32, 2596-2603, 2012.
- [19] Kim, J.; Kim, I.S.; Cho, T.H.; Lee, K.B.; Hwang, S.J.; Tae, G., Noh, I.; Lee, S.H.; Park, Y. and Sun, K.; Biomaterials 12, 2997-3006, 2007.
- [20] Park, K.H.; Kim, S.J.; Lee, W.Y.; Song, H.J. and Park, Y.J.; Ceram. Int. 43, 2786-2790, 2017.
- [21] Xianmiao, C.; Yubao, L.; Yi, Z., Li, Z.; Jidong, L.; Huanan, W.; Materials Science and Engineering: C. 29, 29-35, 2009.
- [22] Sarath Chandra, V.; Baskar, G.; Suganthi, R.V.; Elayaraja, K.; Ahymah Joshy, M.I.; Sofi Beaula, W.; Mythili, R.; Venkatraman, G.; Narayana Kalkura, S.; ACS Applied Materials & Interfaces 4, 1200-1210, 2012.
- [23] Heidari, F.; Razavi, M.; Bahrololoom, M.E.; Yazdimamaghani, M.; Tahriiri, M.; Kotturi, H. and Tayebi, L.; Ceramics International 44, 275-281, 2018.
- [24] Silva, D.M.; Caseiro, A.R.; Amorim, I.; Pereira, I.; Faria, F.; Pereira, T.; Santos, J.D.; Gama, F.M.; Mauricio, A.C.; Biomedical Materials 11, 065004, 2016.
- [25] Sarath Chandra, V.; Baskar, G.; Suganthi, R.V.; Elayaraja, K.; Ahymah Joshy, M.I.; Sofi Beaula, W.; Mythili, R.; Venkatraman, G. and Narayana Kalkura, S.; ACS Applied Materials & Interfaces 4, 1200-1210, 2012.
- [26] Panseri, S.; Cunha, C.; D'Alessandro, T.; Sandri, M.; Giavaresi, G.; Marcacci, M.; Hung, C.T.; Tampieri, A.; Journal of Nanobiotechnology 10, 1-10, 2012.
- [28] Sarath Chandra, V.; Baskar, G.; Suganthi, R.V.; Elayaraja, K.; Ahymah Joshy, M.I.; Sofi Beaula, W.; Mythili, R.; Venkatraman, G. and Narayana Kalkura, S.; ACS Applied Materials & Interfaces 4, 1200-1210, 2012.

## Synthesis and characterization of Fe-Doped hydroxyapatite by in-situ method for use in bone tissue engineering: scaffold application, Biocompatibility and degradation studies

M. Maskanati<sup>1</sup>, H.R. Aghabozorg<sup>2,\*</sup>, M. Meskinfam<sup>3</sup> and F. Motiee<sup>4</sup>

1. PhD Student of Inorganic Chemistry, Faculty of Chemistry, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Professor of Inorganic Chemistry, Faculty of Chemistry, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Assistant Prof. of Inorganic Chemistry, Chemistry Department, Lahijan branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.
4. Assistant Prof. of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

**Abstract:** In the present study, calcium hydroxyapatite-Fe (Fe-HAp) nanocrystalline powder was prepared from a combination of iron ions, calcium nitrate and phosphorus pentoxide by in-situ method. The properties and structure of the synthesized nanocomposite were investigated using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), vibrating sample magnetometry (VSM), and scanning electron microscopy (SEM), and energy-dispersive spectroscopy (EDS). The obtained results confirmed that the produced powder was hydroxyapatite-iron. The morphological properties of the scaffolds also confirmed that Fe-HAp particles distributed properly in the porous structure of chitosan (CS). The obtained samples were subjected to MTT in vitro test in terms of toxicity against fibroblast cells and also for quantitative evaluation of live cells attached and grown on the scaffolds. Therefore, according to the obtained results, this scaffold can be a suitable candidate for bone tissue reconstruction applications.

**Keywords:** Chitosan, Hydroxyapatite, Iron, In-situ, Tissue engineering.