



بهبود خواص سطحی ایمپلنت‌های Ti6Al4V با رسوب‌دهی الکتروفوریتیک دو کسوروبیسین پراکنده در زمینه کیتوسان بر پوشش پایه کلسیم فسفات اعمال شده به روش PEO

نسرین کریمی^{*}، مسعود عطاپور^۱، ابوذر طاهری‌زاده^۱، مریم رحمتی^۱، فاطمه داور^۲

۱. دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

۲. دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

واژگان کلیدی:

دارورسانی هدفمند می‌تواند نقش مهمی در کاهش عوارض و درمان سرطان استخوان ایفا کند. در مطالعه‌ی حاضر، دوکسوروبیسین پخش‌شده در یک ماتریس پلیمری کیتوسان از طریق رسوب‌گذاری الکتروفوریتیک بر روی یک پوشش فسفات کلسیم حاوی نانوذرات اکسید روی اعمال شد. پوشش پایه‌ی فسفات کلسیم توسط اکسیداسیون الکترولیتی پلازما (PEO) بر روی داربست‌های Ti6Al4V ساخته‌شده از طریق ساخت افزایشی (AM) رسوب داده شد. رسوب‌گذاری در ولتاژ و زمان بهینه ۳۰ ولت و ۱۰ دقیقه انجام شد، پس از آن پوشش‌ها ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که پوشش با موفقیت بر داربست‌ها اعمال شده و پوشش زیرین به دلیل ماهیت روش PEO و پوشش رویی به دلیل حضور در حفرات پوشش PEO و پیوند عرضی ایجاد شده در نتیجه استفاده از تری سدیم فسفات، چسبندگی قوی ایجاد کرده است و همچنین در همه جای سطح حضور دارد. همچنین آب‌دوستی افزایش یافته نسبت به پوشش پایه را نشان داد. علاوه بر این، سمیت محلول از ۹۲٪ (کنترل) برای نمونه‌ی پوشش داده‌شده با اکسیداسیون الکترولیتی پلازما به حدود ۳۲٪ (کنترل) برای نمونه‌ی پوشش داده‌شده‌ی دولایه کاهش یافت، که نشان می‌دهد این پوشش باعث پیری سلولی و در نهایت مرگ سلولی در سلول‌های MG-63 می‌شود. بنابراین، سیستم پوششی توسعه‌یافته پتانسیل امیدوارکننده‌ای برای کاربردهای ارتوپدی، به‌ویژه در درمان موضعی سرطان استخوان، به‌دلیل آزادسازی کنترل‌شده‌ی دارو و زیست‌سازگاری بهبودیافته نشان می‌دهد.

سرطان استخوان

دوکسوروبیسین

کیتوسان

کلسیم فسفات

PEO

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۵/۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۶/۱۹

DOI: 10.22034/ISSST.2025.2066726.1656

Enhancing Surface Properties of Ti6Al4V Implants via Electrophoretic Deposition of Doxorubicin Dispersed in a Chitosan Matrix on PEO-Based Calcium Phosphate Coatings

Abstract

Targeted drug delivery can play an important role in reducing complications and treating bone cancer. In the present study, doxorubicin dispersed in a chitosan polymer matrix was applied via electrophoretic deposition onto a calcium phosphate coating containing zinc oxide nanoparticles. The base calcium phosphate coating was deposited by plasma electrolytic oxidation (PEO) onto Ti6Al4V scaffolds fabricated via additive manufacturing (AM). The deposition was carried out at the optimized voltage and time of 30 V and 10 minutes, after which the coatings were evaluated. The results showed that the coating was successfully applied on the scaffolds, and the underlying layer exhibited strong adhesion due to the nature of the PEO method, while the top layer achieved strong adhesion owing to its presence in the PEO coating pores and the crosslinking formed as a result of using trisodium phosphate. Furthermore, it is present uniformly across the entire surface.. It also exhibited enhanced hydrophilicity compared to the base coating. Moreover, the sol toxicity decreased from 92% (control) for the plasma electrolytic oxidation-coated sample to approximately 32% (control) for the bilayer-coated sample, indicating that this coating induces cellular senescence and ultimately cell death in MG-63 cells. Therefore, the developed coating system demonstrates promising potential for orthopedic applications, particularly in the localized treatment of bone cancer, due to its controlled drug release and improved biocompatibility.

Keywords: Bone cancer, doxorubicin, chitosan, calcium phosphate, PEO

* Corresponding author E-mail: nkarimi.m90@gmail.com.

۱- مقدمه

با تخریب درهم‌رفتگی نوکلئوتیدها^۶ و مهار آنزیم توپوایزومراز^۸ II، باعث توقف رشد سلولی می‌شود [۹].

اما به دلیل عوارض جانبی بسیار زیاد، مانند تب، ریزش مو، استفراغ، زخم‌های دهانی و غیره روش‌های هدفمند درمانی بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۱۰-۱۲]. در این روش‌ها دارو در یک حامل دارای بار مثبت مثل کیتوسان قرار گرفته می‌شود تا در هنگام قرارگیری در بدن با رهایش کنترل شده علاوه بر ایجاد خاصیت ضد توموری، از عوارض ناشی از استفاده دارو در دوزهای زیاد جلوگیری کند [۱۳، ۱۴].

علاوه بر این، جراحی و برداشت تومورهای استخوانی ممکن است باعث ایجاد نقص‌های استخوانی وسیعی شود که معمولاً با استفاده از پیوندهای اتوگرافت^۹، آلوگرافت^{۱۰} و ایمپلنت‌های مصنوعی ترمیم می‌شوند [۱۵، ۱۶]. هرچند پیوند اتوگرافت گزینه مناسبی برای ایجاد پیوند استخوانی محسوب می‌شود، اما محدودیت‌هایی نظیر دسترسی محدود، احتمال شکست بیشتر در محیط‌های پیچیده، و ناتوانی در ترمیم نقص‌های وسیع، کاربرد آن را محدود می‌سازد [۱۷]. بنابراین، نیاز به استفاده از ایمپلنت‌های مصنوعی فلزی است. یک راه حل نوید بخش استفاده از داربست‌های استخوانی تولید شده به روش ساخت افزایشی^{۱۱} (AM) است [۱۸، ۱۹].

AM، یک فرایند نوین برای ساخت داربست‌های فلزی متخلخل محسوب می‌شود. این فرایند توانایی تولید ساختارهای سه‌بعدی پیچیده با وزن کمتر و تخلخل منظم را دارد که ساختار متخلخل به هم پیوسته باعث القای بیشتر استخوان‌سازی می‌شود [۲۰]. داربست‌های Ti6Al4V یکی از موادی است که به دلیل خواصی مانند نسبت استحکام به وزن

سرطان استخوان همواره یک چالش بزرگ برای پژوهشگران و متخصصان پزشکی محسوب می‌شود [۱] که علت آن تنوع فردی، ناهمگونی تومور، شیوع پایین و در نتیجه تأخیر در تشخیص و درمان، عوارض جانبی مرتبط با روش‌های درمانی و در نهایت احتمال عود بیماری است [۲]. جراحی معمولاً اولین اقدام در درمان سرطان استخوان است و شیمی درمانی، پرتودرمانی یا درمان هدفمند، گزینه‌های بعدی درمان هستند به خصوص اگر تومورهای استخوانی در ناحیه‌ای پرخطر بوده یا متاستاز داده باشند [۱].

شیمی درمانی معمولاً متداول‌ترین روش برای جلوگیری از عود مجدد بیماری محسوب می‌شود و داروهای مختلفی نظیر دوکسوروبیسین^۱ (Dox)، پاکلیتاکسل^۲ و سیس‌پلاتین^۳ برای این منظور مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳]. Dox که با نام‌های دوکسوروبیسین هیدروکلراید یا آدریامایسین^۴ (نام تجاری) نیز شناخته می‌شود، دارویی به رنگ نارنجی مایل به قرمز است که در شیمی درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۴]. این دارو جزو آنتی‌بیوتیک‌های آنتراسایکلین^۵ کلاس I است و برای درمان انواع مختلفی از تومورها نظیر سرطان معده، سینه، استخوان، لوسمی و ریه به کار می‌رود [۵، ۶]. اثر ضد توموری قوی Dox، ناشی از ساختار آن است که شامل لیگاند چربی‌دوست آنتراسایکلین، گلیکوزآمینوگلیکان^۶ آبدوست قرمز رنگ، گروه فنولی اسیدی و گروه آمینی قلیایی می‌باشد [۷، ۸]. این دارو در تمام مراحل چرخه سلولی، به‌ویژه فاز S که مربوط به سنتز و همانندسازی DNA است، فعال بوده و

⁶ Glycosaminoglycan

⁷ Nucleotides

⁸ Topoisomerase

⁹ Autograft

¹⁰ Allograft

¹¹ Additive Manufacturing (AM)

¹ Doxorubicin

² Paclitaxel

³ Cisplatin

⁴ Adriamycin

⁵ Anthracycline

بر اساس دانسته‌های ما، تاکنون پوشش دولایه‌ای که شامل داروی دوکسوروبیسین پراکنده در زمینه پلیمری کیتوسان و کلسیم فسفات حاوی نانوذرات اکسید روی باشد، بر روی داربست‌های Ti6Al4V ساخته شده با روش AM برای رهایش هدفمند دارو در درمان سرطان استخوان بررسی نشده است. ترکیب این دو لایه باعث می‌شود که دارو به صورت موضعی و کنترل شده آزاد شود، رشد سلول‌های سرطانی مهار گردد، و سلول‌های سالم تا حد امکان آسیب کمتری ببینند. بنابراین، طراحی پوشش دولایه، هم حفاظت زیستی و هم اثر ضدسرطانی هدفمند را همزمان فراهم می‌کند. برای این منظور، پوشش رویی حاوی داروی Dox پراکنده شده در زمینه پلیمری کیتوسان به روش رسوب‌دهی الکتروفوریتیک^۱ (EPD) بر پوشش پایه کلسیم فسفاتی حاوی نانوذرات اکسید روی اعمال شده به روش اکسیداسیون الکترولیتی پلاسمایی^۲ (PEO) بر داربست Ti6Al4V اعمال و سپس از نظر مشخصات فیزیکی، و پاسخ‌های سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد مورد استفاده در پژوهش

از داربست‌های Ti6Al4V ساخته شده با استفاده از دستگاه EB-PBF مدل Arcam A2X و (با ابعاد ۷/۵×۷/۵×۷/۵ میلی - متر مکعب - سطح ویژه ۱۵/۰۶ سانتی متر مربع - مدول یانگ ۰/۷ گیگاپاسکال و تخلخل‌های با شکل دوازده وجهی لوزوی) به عنوان زیرلایه استفاده شد. برای پوشش زیرین و رویی، از تری سدیم فسفات (Na₃PO₄·12H₂O) با خلوص بالای ۹۹٪ و چگالی ۱/۶۲ گرم بر میلی‌لیتر شرکت مرک^۳ استفاده شد. همچنین، برای پوشش زیرین، از هیدروکسید کلسیم (Ca(OH)₂) با چگالی ۲/۲۴ گرم بر سانتی‌متر مکعب شرکت

بالا، چگالی کم، نزدیک بودن مدول یانگ به استخوان طبیعی، زیست‌سازگاری و غیره در بحث ایمپلنت‌ها، بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۱، ۲۲].

با این حال، علی‌رغم مزایای فراوان فرایند AM، کیفیت سطحی قطعات تولیدی بسیار پایین است و ذرات باقی‌مانده روی سطح ممکن است در هنگام کاشت بدن جدا شده و در نهایت منجر به تحلیل استخوان شوند [۲۳]. از سوی دیگر، ماهیت تقریباً زیست خنثای اکسید تیتانیوم روی سطح ایمپلنت‌های مبتنی بر تیتانیوم در نهایت منجر به ایجاد پیوند ضعیف میان ایمپلنت و استخوان می‌شود که به شکست کاربردهای ارتوپدی منجر می‌گردد. بنابراین، این قطعات نیاز به اصلاح‌سازی سطحی دارند [۲۴].

استفاده از پوشش‌های زیست‌فعال کلسیم فسفات برای بهبود خواص زیستی بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرند [۲۵]. علاوه بر این، استفاده از نانوذرات با خاصیت ضدباکتری، نظیر اکسید روی می‌تواند از رشد میکروبی جلوگیری کرده و به موفقیت ایمپلنت‌ها کمک کند [۲۶، ۲۷].

تاکنون پوشش‌های بسیاری با استفاده از Dox به منظور رهایش هدفمند دارو در درمان سرطان استفاده شده‌اند [۲۸-۳۱] برای مثال، لی و همکاران [۳۲]، پوشش حاوی Dox-کیتوسان-هیدروکسی‌آپاتیت را روی زیرلایه تیتانیومی اعمال کرده و بیان کردند که این پوشش در شرایط آزمایشگاهی از تکثیر سلول‌های توموری جلوگیری می‌کند. همچنین، سوماترا و همکاران [۳۳]، پوشش حاوی Dox را روی زیرلایه تیتانیومی اعمال کرده و پس از بررسی در شرایط درون‌تنی، به این نتیجه رسیدند که پوشش حاصل باعث تشکیل سریع استخوان جدید پس از ۴ هفته شده است.

³ Merck

¹ Electrophoretic Deposition (EPD)

² Plasma Electrolytic Oxidation (PEO)

۲-۴- اعمال پوشش رویی به روش EPD

ابتدا محلول با غلظت موجود در جدول ۱ تهیه شد:

جدول ۱. غلظت مواد مورد استفاده در پوشش رویی	
مواد	کیتوسان: تری‌سدیم فسفات - دوکسوروبیسین
غلظت	۳۶: ۱۸ - ۴
	$(\text{mg/ml}) \times 100$

مقادیر گزارش شده در جدول فوق در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب شامل ۰/۳۳٪ استیک اسید حل شده بدین صورت که ابتدا کیتوسان در ۵۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر شامل ۰/۳۳ میلی‌لیتر استیک اسید و تری‌سدیم فسفات و Dox به ترتیب در ۴۰ و ۱۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل شده و پس از همگن شدن، هر سه محلول به یکدیگر اضافه شدند و محلول حاصل به مدت ۲ دقیقه آلتراسونیک شد.

پس از ترکیب محلول‌ها، pH محلول با استفاده از اسید استیک در ۴ تنظیم شد. باید توجه داشت که Dox و محلول آن باید از نور دور نگه داشته شوند تا از تجزیه آن جلوگیری شود. (لازم به ذکر است که از تری‌سدیم فسفات در کنار کیتوسان به منظور ایجاد پیوند دهنده عرضی و جلوگیری از تخریب سریع آن استفاده شد).

داربست‌ها کاتد و فولاد زنگ نزن در محل آند قرار داده و فاصله الکترودها ۲ سانتی‌متر تنظیم شد. فرایند پوشش دهی در ولتاژ و زمان بهینه ۳۰ ولت و ۱۰ دقیقه، در دمای اتاق و در محیط تاریک انجام گرفت و سپس داربست‌ها به آرامی از محلول خارج شده و در همان شرایط (دمای اتاق و محیط تاریک) خشک شدند.

مرک و نانوذرات اکسید روی (ZnO) با اندازه ذرات کمتر از ۸۰ نانومتر و خلوص بالای ۹۹٪ شرکت روس-نانو^۱ استفاده گردید. برای پوشش رویی، از داروی دوکسوروبیسین هیدروکلراید، با فرمول شیمیایی (C₂₇H₂₉NO₁₁·HCl) از شرکت ابوا-فارما^۲ (اتریش) و کیتوسان با وزن مولکولی پایین شرکت سیگما^۳، بهره گرفته شد.

۲-۲- آماده‌سازی زیرلایه

به‌منظور حذف آلودگی‌ها، اکسیداسیون سطحی و ذرات باقی‌مانده از فرایند ساخت، عملیات فعال‌سازی سطحی در محلول HNO₃:HF:H₂O به نسبت ۲۰:۱:۷۹ به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد و پس از شستشو و آلتراسونیک، فرایند پوشش‌دهی انجام شد.

۲-۳- اعمال پوشش زیرین به روش PEO

ابتدا مطابق با پژوهش پیشین [۳۴] با استفاده از یک سیم تیتانیوم با قطر تقریبی ۱ میلی‌متر که داخل حفرات ساختار قرار داده شد، اتصال الکتریکی برقرار گردید. سپس فرایند پوشش‌دهی در ۳٫۵ لیتر الکترولیت شامل ۱۲ گرم بر لیتر تری‌سدیم فسفات، ۲ گرم بر لیتر هیدروکسید کلسیم، و ۳ گرم بر لیتر نانوذرات اکسید روی که در آب دی‌یونیزه حل شده بودند، انجام گرفت. این فرایند در یک سل الکتروشیمیایی از جنس فولاد ۳۱۶L که به پمپ سانتریفیوژ الکتریکی برای هم‌زدن محلول مجهز بود، در دمای ۱۵±۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، با سیکل مثبت ۲۰٪ به صورت تک قطبی و با حداکثر پتانسیل ۴۰۰ ولت، در فرکانس ۱ کیلوهرتز اجرا شد.

³ Sigma

¹ Rus-nano

² Ebewa-pharma

۲-۵- مشخصه یابی فیزیکی ساختار

با محیط کشت کامل DMEM^۶ همراه با ۱۰ درصد (v/v) سرم جنین گاوی^۵ (FBS)، ۱ درصد (v/v) پنی سیلین/استرپتومایسین کشت داده شدند. در چاهک های یک صفحه ۱۲ چاهی ریخته شد و نمونه ها و صفحه کشت بافت^۶ (TCP، کنترل) در داخل چاهک قرار گرفتند (با سه تکرار برای مطالعه بقای سلولی) و سپس در انکوباتور حاوی ۵٪ (v/v) گاز CO₂ و دمای ۳۷±۱ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴±۲ ساعت برای مطالعه زنده ماندن سلول و ۴۸±۲ ساعت برای مطالعه مورفولوژی سلولی قرار داده شدند. نتایج سه مرتبه تکرار شدند.

الف) بررسی میزان سمیت سلولی

بررسی زنده ماندن سلولی تحت تأثیر نمونه آزمایش با استفاده از آزمون MTT^۷، مطابق با استاندارد ISO 10993-5:2009 برای به دست آوردن معیاری از زیست سازگاری همه نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت، انجام شد. رنگ MTT در میتوکندری سلول های زنده از زرد به کریستال های بنفش فورمازان^۸ تغییر می کند و غلظت رنگ معیاری از تعداد سلول های زنده است که می توان با نورسنج اندازه گیری کرد.

پس از ۲۴±۲ ساعت از قرار دادن نمونه ها در انکوباتور، ۱۰۰ میکرولیتر رنگ MTT با غلظت ۵ mg/ml به هر چاهک اضافه شد. پس از ۳ ساعت رنگ MTT از چاهک ها خارج شد و حلال دی متیل سولفوکسید^۹ (DMSO) به همه چاهک ها اضافه شد تا کریستال های بنفش تشکیل شده و کاملاً حل شوند. در پایان، میزان رنگ محلول در حلال DMSO با استفاده از دستگاه ELISA (Agilent - BioTek 800 TS- USA) محاسبه شد. چاههایی که سلول های زنده دارند،

مورفولوژی و توزیع عناصر سطح نمونه ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی^۱، QUANTA (SEM/EDS, FEG-450, FEI CO, USA) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین اندازه حفره ها در داربست با استفاده از نرم افزار Image-J به صورت نرم افزاری اندازه گیری شد.

برای شناسایی گروه های عاملی موجود در پوشش ها از طیف سنجی مادون قرمز با بازتاب کلی تضعیف شده^۲ (ATR) IRS, Bomem, MB100 در بازه طیفی ۶۰۰ تا ۴۰۰۰ cm⁻¹ و با سرعت اسکن ۲ cm⁻¹ استفاده شد.

ترشوندگی نمونه ها با استفاده از روش قطره ای استاتیک با استفاده از آب دیوار تقطیر در حداقل سه محل متفاوت از سطوح پوشش تعیین شد. برای انجام این کار، ۳ میکرولیتر قطره روی نمونه ها چکانده و پس از ۳ ثانیه تصاویر گرفته شد. زاویه تماس^۳ (CA) با استفاده از یک تانسیمتر نوری مجهز به منبع نور سرد تک رنگ (Theta Attention optical tensiometer, KSV Instruments Ltd., Finland) توزیع کننده خودکار چند مایع و نرم افزار همراه، با استفاده از روش برازش پروفایل قطره یانگ-لاپلاس تعیین شد.

۲-۶- کشت سلول

به منظور بررسی برهمکنش بین سلول ها و داربست ها و پوشش های اعمال شده، آزمایش کشت سلولی به دو روش بررسی زنده ماندن سلولی و بررسی مورفولوژی سلولی انجام شد. برای انجام آزمایش، ابتدا نمونه ها با استفاده از اشعه ماوراء بنفش استریل شدند و سپس ۱۰^۴ × ۵ سلول MG-63

⁶ Tissue Culture Plate (TCP)

⁷ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

⁸ Formazan

⁹ 3-Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

¹ Scanning Electron Microscope (SEM)

² Attenuated Total Reflectance (ATR)

³ Contact Angle (CA)

⁴ Dulbecco's Modified Eagle's Medium

⁵ Fetal Bovine Serum (FBS)

قطعه حاصل وجود دارند و پس از استفاده، می توانند از سطح جدا شده و خطرات سلامتی ایجاد کنند [۳۷، ۳۸]. به عنوان مثال، در تحقیقات جیانگ و همکاران [۳۹]، گزارش شده است که ذرات تیتانیوم جدا شده می توانند منجر به از دست رفتن استخوان یا استئولیز شوند. بنابراین در پژوهش حاضر، سعی شده است تا حد امکان این ذرات با فرآیند اچینگ اسیدی حذف شوند.

شکل های ۱-ب نشان می دهند که پوشش حاصل از فرآیند PEO به خوبی روی سطح اعمال شده است و میکرو حفره هایی که در اثر تخلیه ناگهانی و شکستن فیلم در فرآیند PEO ایجاد می شود را بوجود آورده است، طبق اندازه گیری، اندازه این میکرو حفرات تا ۹/۳۲ میکرومتر می رسد. همچنین، ذرات سفید روی سطح پوشش، نشان دهنده وجود و توزیع مناسب نانوذرات ZnO هستند.

شکل ۱-ج، مربوط به سطح پوشش دو لایه هستند، همانطور که مشخص است، پوشش رویی شامل دوکسوروبیسیان پراکنده شده در زمینه پلیمری کیتوسان به صورت یک لایه روی سطح پوشش اول قرار گرفته است، که در شکل ۱-ج علاوه بر نفوذ به داخل ریزمنافذ پوشش PEO، یک لایه با چسبندگی خوب روی سطح ایجاد کرده است و همانطور که به نظر می رسد، عدم چسبندگی و یا کندگی از پوشش مشاهده نمی شود.

چگالی نوری^۱ (OD) بالاتری نسبت به چاه هایی با سلول های مرده نشان می دهند. بنابراین با توجه به فرمول زیر (۱) می توان چگالی نوری چاهک های نمونه آزمایش شده را با چاهک های نمونه شاهد مقایسه کرد.

$$(1) \quad \text{درصد بقای سلولی} = \frac{\text{متوسط چگالی نوری نمونه ها}}{\text{متوسط چگالی نوری نمونه ی کنترل}} \times 100$$

ب) بررسی میزان چسبندگی سلولی

برای بررسی سطح چسبندگی سلول، از روش اتصال سلولی مطابق با استانداردهای ISO 19090:2018 و ISO/TS 23565:2021 استفاده شد. پس از 48 ± 2 ساعت از قرار دادن نمونه ها در انکوباتور، سطح نمونه با محلول بافر فسفات^۲ (PBS) شسته شد و سلول ها با محلول گلو تار آلدئید^۳ روی سطح ثابت شدند. پس از شستشوی سطح، از حلال اتانول با نسبت های (۴۰، ۵۰، ۷۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد) روی نمونه استفاده شد و پس از خشک شدن در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، با FE-SEM تصویربرداری شد.

۳- نتایج و بحث

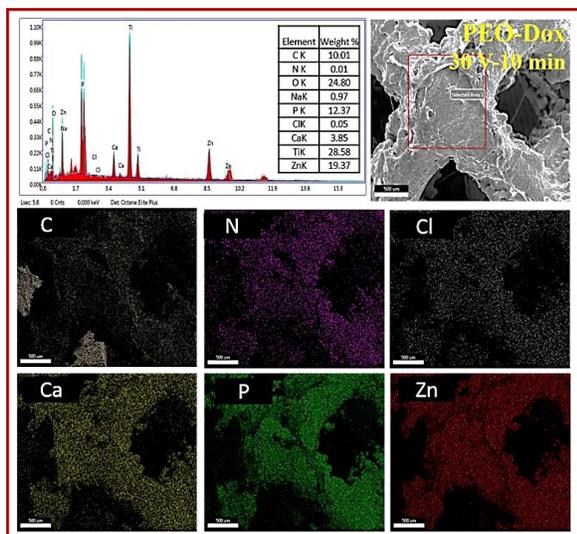
۳-۱- مشخصه یابی فیزیکی

طبق شکل ۱-الف، تخلخل های دوازده وجهی لوزوی با اندازه های ۳/۶ میلی متری و همچنین سطوح زبر و ناهموار نمونه حاصل از فرآیند تولید (EB-PBF)، به وضوح قابل مشاهده است. طبق تحقیقات قبلی، سطوح ناهموار توانایی چسبندگی، تمایز و تکثیر سلول ها و در نهایت، کاربرد موفقیت آمیز ایمپلنت ها را افزایش می دهند [۳۵، ۳۶]. در فرآیند EB-PBF، پودر های اضافی که نزدیک مسیر اسکن پرتو های پراثری هستند، به طور نامطلوبی سینتر شده و در

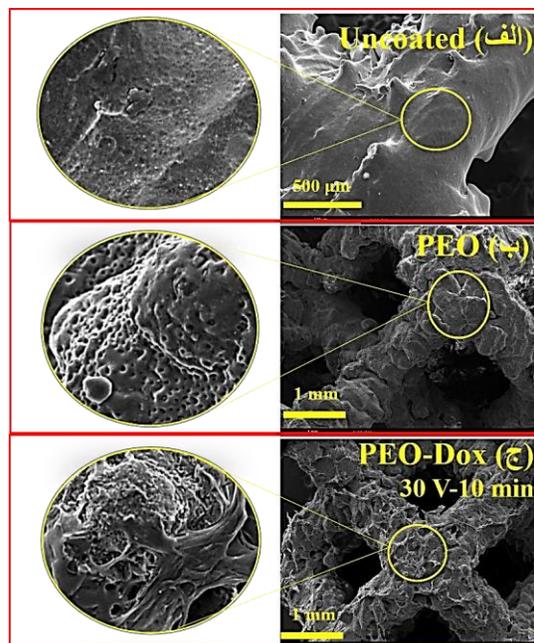
³ Glutaraldehyde

¹ Optical Density (OD)

² Phosphate-Buffered Saline (PBS)



شکل ۲. طیف‌سنجی پراکندگی انرژی پرتو ایکس (EDS) و نقشه‌های توزیع عنصری سطح نمونه‌های دارای پوشش دولایه شامل پوشش PEO و Dox



شکل ۱. تصویر الکترونی روبشی از سطح نمونه‌های (الف) بدون پوشش، (ب) دارای پوشش PEO، (ج) دارای پوشش دولایه شامل پوشش PEO و Dox

به منظور تأیید حضور پوشش دوم (پوشش پلیمری حاوی داروی دوکسوروبیسین)، طیف‌سنجی ATR استفاده شد. (شکل ۳) و پیوندهای جذبی مربوط به اجزا در جدول ۲ گزارش شده است. طیف مربوط به پوشش PEO، شامل پیوندهای جذبی در 640 cm^{-1} و محدوده $1028\text{--}1110\text{ cm}^{-1}$ که هر دو مربوط به گروه فسفات (PO_4^{3-}) و پیوندهای جذبی موجود در ناحیه $3000\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$ را می‌توان به آب جذب شده در نمونه نسبت داد [۴۱، ۴۲].

پیوندهای جذبی موجود در طیف PEO-Dox شامل پیوندهای جذبی مربوط به گروه‌های عاملی موجود در ساختار دوکسوروبیسین و پیوندهای جذبی مربوط به کیتوسان است. پیوندهای جذبی مربوط به داروی دوکسوروبیسین در 994 ، 1245 ، 1284 ، 1414 ، 1515 ، 1735 و 2929 cm^{-1} هست که به ترتیب مربوط به $\text{C}=\text{C}$ ، $\text{N}-\text{H}$ ، $\text{C}-\text{C}$ ، $\text{C}-\text{N}$ ، $\text{C}-\text{OH}$ (Aromatic rings)، $\text{C}-\text{H}$ و $\text{C}=\text{O}$ ، و پیوندهای جذبی موجود در 1614 ، 1585 cm^{-1} مربوط به Phenol (ring) می‌باشند [۴۲]. همچنین پیوندهای جذبی مربوط به کیتوسان در

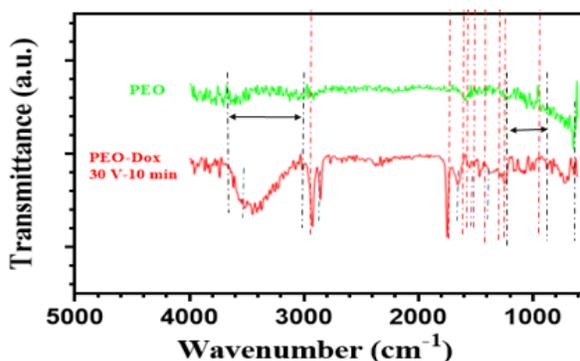
به منظور تأیید وجود عناصر کلسیم، فسفر و روی در پوشش اول و وجود دوکسوروبیسین در کل سطح پوشش رویی، طیف‌سنجی پراکندگی انرژی پرتو ایکس (EDS) و نقشه‌های توزیع عناصر از سطح نمونه‌های دولایه در ولتاژ و زمان بهینه، گرفته شد (شکل ۲). وجود عنصر روی و توزیع یکنواخت آن در سطح پوشش اول و همچنین وجود عناصر کلسیم و فسفر به وضوح قابل مشاهده است که نشان‌دهنده اعمال موفق پوشش زیرین بوده است. همچنین، طبق گفته کیانی و همکاران [۴۰]، وجود عناصر Cl، N و C می‌تواند وجود داروی "Dox" را در سطح تأیید کند و همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، این عناصر در کل سطح وجود دارند. بنابراین، پوشش پلیمری حاوی دوکسوروبیسین در کل سطح وجود دارد، اما تجمع آن در مکان‌های متفاوت سطح نمونه، نشان‌دهنده ضخامت بیشتر پوشش در این نواحی است.

جدول ۲. پیوندهای جذبی مربوط به گروه‌های عاملی مختلف پوشش (رنگ متفاوت مواد مربوط به خطوط شکل ۳ است)

نوع ماده	طول موج (cm ⁻¹)	گروه عاملی
C-H	۲۹۲۹	
C=O	۱۷۳۵	
Phenol (ring)	۱۶۱۴	
Phenol (ring)	۱۵۸۵	
C=C (Aromatic rings)	۱۵۱۵	
N-H	۱۴۱۴	
C-C	۱۲۸۴	
C-N	۱۲۴۵	
C-OH	۹۹۴	
O-H (hydroxyl)	۳۴۵۰	
C-H	۲۸۷۸	
C-N (amide I)	۱۶۶۱	
C-N (amide II)	۱۵۵۰	
C-N (amide III)	۱۳۲۰	
H ₂ O	۳۷۰۰-۳۰۰۰	
phosphate group (PO ₄ ³⁻)	۱۱۱۰-۱۰۲۸	
phosphate group (PO ₄ ³⁻)	۶۴۰-۵۶۰	

در مورد پوشش رویی (PEO-Dox)، با توجه به آبدوستی ذاتی دوکسوروبیسین و پلیمر کیتوسان، انتظار می‌رود که

در ۱۳۲۰ cm⁻¹، ۱۵۵۰ و ۱۶۶۱ به ترتیب مربوط به C-N (amide III)، (amide II) و (amide I) هست و پیوندهای جذبی ۲۸۷۸ cm⁻¹ و ۳۴۵۰ به ترتیب مربوط به C-H و (hydroxyl) و O-H هستند. لذا، طیف مربوط به پوشش دولایه، شامل پیک‌های مشخصه اصلی اجزا می‌باشد، که می‌تواند دلیلی بر اعمال موفقیت‌آمیز پوشش بر سطح باشد [۴۲].



شکل ۳. طیف‌سنجی ATR از سطح نمونه‌های دارای پوشش PEO و Dox-PEO

در داربست‌های مورد استفاده در کاربردهای پزشکی، ترشوندگی سطح، نقش حیاتی در میزان چسبندگی و تکثیر سلول و در نهایت تشکیل استخوان جدید دارد. بنابراین در پژوهش حاضر میزان ترشوندگی مورد ارزیابی قرار گرفته است و نتایج در جدول ۳ گزارش شده است. به طور کلی پوشش‌های کلسیم فسفاتی دارای خاصیت آبدوست هستند ولی اکسید روی اضافه شده در الکترولیت آبگریز هست، به طوری که در پژوهش اولشکو و همکاران [۴۳]، بیان شده که اکسید روی اضافه شده در پوشش می‌تواند باعث تغییر رفتار پوشش از آبدوست به آبگریز شود. با این وجود و با توجه به درصد اکسید روی موجود در پوشش‌ها، میزان ترشوندگی پوشش‌ها مقداری از زیرلایه کمتر هست که همانطور که بیان شد به علت حضور ذرات اکسید روی با خاصیت آنتی‌باکتریال در پوشش است.

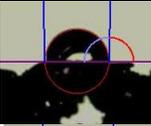
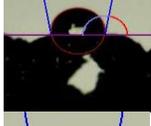
کلسیم و فسفر [۴۷, ۴۸] و اکسید روی [۴۸] نشان داده شده است.

همچنین، حضور داروی Dox در لایه های پوششی موجب کاهش چشمگیر زندهمانی سلول ها شده و به طور بارزی خاصیت سمیت سلولی خود را نشان داده است. کاهش میزان متابولیسم سلولی که به صورت افت جذب رنگ MTT در تست قابل رویت هست، بیانگر فعال شدن مسیره های القاکننده ی پیری و آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده سلول) در سلول های MG-63 است.

Dox، به عنوان یک داروی ضدسرطان با عملکرد مهاری روی توپوایزومراز II، منجر به شکست DNA دو رشته ای و تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) می شود که نهایتاً موجب توقف چرخه سلولی و در نتیجه مرگ سلولی می گردد [۴۹]. بنابراین، ایجاد سمیت سلولی در حضور Dox، به ویژه پس از ۲۴ ساعت، انتظار می رفت و با یافته های گزارش شده در مطالعات پیشین کاملاً هم راستا است. مطالعات متعددی این تأثیر سمیت Dox بر سلول های سرطانی، از جمله MG-63، را تأیید کرده اند. برای نمونه گاش و همکاران [۵۰] اثرات آپوپتوتیک و ممانعت کننده Dox بر رشد سلول های MG-63 را گزارش کرده اند. همچنین، تحقیقات صورت گرفته دیگری نیز به اثبات رسانده اند که Dox به طور مؤثری باعث القای مرگ سلولی در سلول های بدخیم شده و پتانسیل بالایی برای استفاده در طراحی سامانه های هدفمند دارورسانی ضدسرطان دارد [۳۳, ۴۰, ۵۱]. نتیجه کلی این بررسی ها حاکی از آن است که پوشش های حاوی Dox در این پژوهش، نه تنها دارای عملکرد مؤثر در مهار رشد سلول های MG-63 هستند، بلکه رفتار زیستی آنها نیز با یافته های تجربی همخوانی دارد و می تواند مبنایی برای طراحی پوشش های دارویی هدفمند در کاربردهای ضدسرطانی باشد. به منظور ارزیابی کامل تر اثر ضدسرطانی پوشش، مقایسه درصد مرگ سلول های سرطانی با سلول های نرمال استخوانی اهمیت دارد. به دلیل

میزان ترشوندگی پوشش به میزان قابل توجهی افزایش یابد. اما مطابق با جدول ۳ تنها مقدار اندکی افزایش یافته که علت آن را می توان به ضخامت کم پوشش و وجود زبری سطح زیرلایه و پوشش اول نسبت داد. زیرا مطابق با پژوهش های پیشین، زبری سطح باعث کاهش میزان ترشوندگی می شود [۴۴, ۴۵].

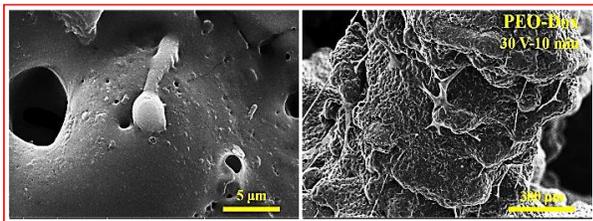
جدول ۳. زاویه تماس داربست های بدون پوشش و پوشش دار

نمونه	زاویه تماس با آب (°)	تصاویر
Uncoated	$89/7 \pm 4/1$	
PEO	$101/5 \pm 5/2$	
PEO-Dox	$95/5 \pm 1/2$	

۳-۲- کشت سلول

به منظور ارزیابی برهمکنش سلول های MG-63 با داربست و پوشش های اعمال شده، سنجش MTT در زمان ۲۴ ساعت انجام شد (شکل ۴). تکثیر سلول های MG63 روی داربست ساخته شده با روش AM، قابل توجه بود. به طور مشابه، پاپازوگلو و همکاران [۴۶]، نشان دادند که پس از کشت سلول های MG-63 روی سازه های AM، صرف نظر از اندازه منافذ یا هندسه سلول واحد، تمام سازه های تولید شده به روش افزایشی قادر به افزایش رشد و تکثیر سلول و در نهایت تسریع رشد استخوان جدید بودند. علاوه بر این، در نمونه ی پوشش داده شده با PEO، به دلیل وجود ترکیبات کلسیم، فسفر و اکسید روی، سرعت رشد و تکثیر سلول ها، افزایش یافت. به طور مشابه، بهبود تکثیر سلولی در حضور ترکیبات

مشاهدات موجود در پژوهش‌های پیشین مطابقت دارد [۳۲، ۴۹].

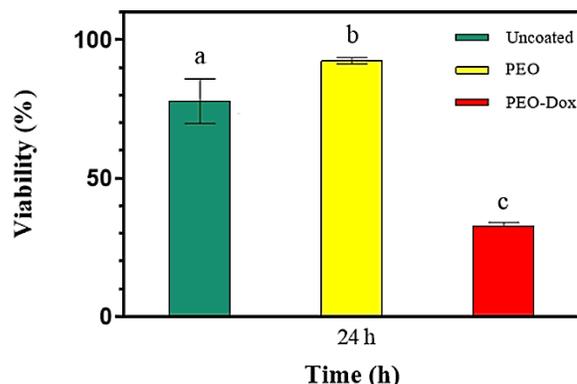


شکل ۵. تصویر FE-SEM از چسبیدن سلول‌ها بر روی سطح داربست‌های دارای پوشش دولایه در دو مکان مختلف، پس از ۴۸ ساعت.

۴- نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر به ساخت و مشخصه‌یابی پوشش حاوی داروی Dox پراکنده در زمینه پلیمری کیتوسان به روش EPD بر پوشش کلسیم فسفاتی حاوی نانوذرات اکسید روی که با روش PEO روی داربست‌های Ti6Al4V ساخته شده به روش AM رسوب داده شده بود، در ولتاژ و زمان بهینه، می‌پردازد. نتایج نشان از ایجاد پوششی با چسبندگی مناسب به پوشش زیرین، در ولتاژ ۳۰ ولت و زمان ۱۰ دقیقه دارد. همچنین نتایج ترشوندگی نشان داد که پوشش رویی منجر به بهبود آبدوستی نسبت به پوشش زیرین می‌شود. به علاوه، این پوشش سمیت سلولی قابل ملاحظه‌ای (حدود ۳۲٪ کنترل) را نشان می‌دهد و باعث پیری و مرگ سلول‌های MG-63 شده و مروفولوژی کرومی شکل حاصل تست چسبندگی گواهی ایجاد سمیت سلولی پوشش می‌باشد. بنابراین، با توجه به تمام بررسی‌های انجام‌شده، نمونه پوشش‌دهی شده در ولتاژ ۳۰ ولت و زمان ۱۰ دقیقه، دارای ویژگی‌های سطحی مناسب بوده و می‌تواند باعث مرگ سلول‌های سرطانی باقی مانده در اطراف در هنگام کاشت در بدن پس از برداشت تومورهای استخوانی شود.

محدودیت‌های مالی و زمانی، این آزمایش در مطالعه حاضر انجام نشده است و پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده مورد بررسی قرار گیرد تا توانایی درمان موضعی سرطان با دقت بیشتری ارزیابی شود.



شکل ۴. زنده ماندن سلول‌های MG-63 بر روی داربست‌های بدون پوشش و پوشش داده شده به روش PEO و دارای پوشش دولایه (PEO-Dox) با سه تکرار پس از گذشت ۲۴ ساعت (حروف غیرمشابه در نمودار نشان دهنده تفاوت معنی داری در مقدار میانگین هر پارامتر است که با استفاده از روش دانکن ارزیابی شد ($P < 0.05$)).

مورفولوژی سلول‌های MG-63 کشت داده شده روی نمونه‌ها پس از ۴۸ ساعت با استفاده از تصاویر FE-SEM ارزیابی شد. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، در نمونه‌های دارای پوشش دو لایه، چسبندگی و پخش شدن سلول‌ها روی سطح به طور قابل توجهی کم است این کم بودن چسبندگی، عمدتاً به حضور داروی Dox در لایه سطحی نسبت داده می‌شود. همانطور که بیان شد، Dox، به عنوان یک عامل ضدسرطانی، از طریق وارد کردن آسیب به DNA سلول، مسیرهای سلولی مرتبط با پیری و آپوپتوز را فعال می‌کند. در نتیجه، سلول‌های MG-63 پس از قرار گرفتن در معرض این ترکیب، توانایی تقسیم، مهاجرت و اتصال مؤثر به سطح را از دست می‌دهند. این مسئله منجر به کاهش میزان چسبندگی و پخش سلول‌ها روی سطح نمونه می‌شود که این موضوع به خوبی با

Health and Toxicology Issues Drug Research, Volume 2, Elsevier, 2024, pp. 353-379.

[11] U. Anand, A. Dey, A.K.S. Chandel, R. Sanyal, A. Mishra, D.K. Pandey, V. De Falco, A. Upadhyay, R. Kandimalla, A. Chaudhary, Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics, *Genes & diseases*, 10 (2023) 1367-1401.

[12] A. Bisht, D. Avinash, K.K. Sahu, P. Patel, G. Das Gupta, B.D. Kurmi, A comprehensive review on doxorubicin: mechanisms, toxicity, clinical trials, combination therapies and nanoformulations in breast cancer, *Drug Delivery and Translational Research*, 15 (2025) 102-133.

[13] M.L. Tan, P.F. Choong, C.R. Dass, Doxorubicin delivery systems based on chitosan for cancer therapy, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61 (2009) 131-142.

[14] R. Biswas, S. Mondal, M.A. Ansari, T. Sarkar, I.P. Condiuc, G. Trifas, L.I. Atanase, Chitosan and its derivatives as nanocarriers for drug delivery, *Molecules*, 30 (2025) 1297.

[15] F. Migliorini, G. La Padula, E. Torsiello, F. Spiezia, F. Oliva, N. Maffulli, Strategies for large bone defect reconstruction after trauma, infections or tumour excision: a comprehensive review of the literature, *European journal of medical research*, 26 (2021) 1-10.

[16] J. Zhang, W. Zhang, W. Yue, W. Qin, Y. Zhao, G. Xu, Research Progress of Bone Grafting: A Comprehensive Review, *International Journal of Nanomedicine*, (2025) 4729-4757.

[17] R.R. Betz, Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions, *Orthopedics*, 2025 (02S561-S570).

[18] X. Wang, S. Xu, S. Zhou, W. Xu, M. Leary, P. Choong, M. Qian, M. Brandt, Y.M. Xie, Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review, *Biomaterials*, 83 (2016) 127-141.

[19] K. Gupta, K. Meena, Artificial bone scaffolds and bone joints by additive

[1] J.L. Ferguson, S.P. Turner, Bone cancer: diagnosis and treatment principles, *American family physician*, 98 (2018) 205-213.

[2] P. Whig, B.Y. Kasula, N. Yathiraju, A. Jain, S. Sharma, Bone cancer classification and detection using machine learning technique, in: *Diagnosing Musculoskeletal Conditions using Artificial Intelligence and Machine Learning to Aid Interpretation of Clinical Imaging*, Elsevier, 2025, pp. 65-80.

[3] D. Tsvetkova, S. Ivanova, Application of approved cisplatin derivatives in combination therapy against different cancer diseases, *Molecules*, 27 (2022) 2466.

[4] R. Hayward, D.S. Hydock, Doxorubicin cardiotoxicity in the rat: an in vivo characterization, *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 46 (2007) 20-32.

[5] M. Sohail, Z. Sun, Y. Li, X. Gu, H. Xu, Research progress in strategies to improve the efficacy and safety of doxorubicin for cancer chemotherapy, *Expert review of anticancer therapy*, 21 (2021) 1385-1398.

[6] S. Sritharan, N. Sivalingam, A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin, *Life sciences*, 278 (2021) 119527.

[7] O. Tacar, P. Sriamornsak, C.R. Dass, Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems, *Journal of pharmacy and pharmacology*, 65 (2013) 157-170.

[8] A. Berdiaki, M. Neagu, E.-M. Giatagana, A. Kuskov, A.M. Tsatsakis, G.N. Tzanakakis, D. Nikitovic, Glycosaminoglycans: Carriers and targets for tailored anti-cancer therapy, *Biomolecules*, 11 (2021) 395.

[9] K.d.A. Mesquita, Role of mitochondria and DNA damage responses in cancer stem cells resistance to chemotherapy, in: 2016.

[10] S. Ingole, N. Vasdev, M. Tekade, T. Gupta, B. Pawar, M. Mhatre, A.G. Prasad, R.K. Tekade, Toxic effects of cancer therapies, in: *Public*

system and its drug release behavior, *Journal of Controlled Release*, 290 (2018) 56-74.

[29] Y. Yuan, B. Guo, L. Hao, N. Liu, Y. Lin, W. Guo, X. Li, B. Gu, Doxorubicin-loaded environmentally friendly carbon dots as a novel drug delivery system for nucleus targeted cancer therapy, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 159 (2017) 349-359.

[30] W. Arap, R. Pasqualini, E. Ruoslahti, Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model, *Science*, 279 (1998) 377-380.

[31] S. Chen, H. Lan, M. Liu, C. He, Q. Li, S. Zheng, Y. Zheng, Z. Wu, T. Liu, B. Zhao, Less is More: Biomimetic Hybrid Membrane Nanocarriers for Highly Efficient Tumor Targeted Drug Delivery, *Small*, (2025) 2407245.

[32] Y.-L. Lai, Y.-M. Cheng, S.-K. Yen, Doxorubicin-chitosan-hydroxyapatite composite coatings on titanium alloy for localized cancer therapy, *Materials Science and Engineering: C*, 104 (2019) 109953.

[33] M. Sumathra, M. Rajan, R. Amarnath Praphakar, N. Marraiki, A.M. Elgorban, In vivo assessment of a hydroxyapatite/κ-carrageenan-maleic anhydride-casein/doxorubicin composite-coated titanium bone implant, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 6 (2020) 1650-1662.

[34] N. Karimi, M. Atapour, A. Taherizadeh, B. Ercan, M. Galati, A. Saboori, Surface functionalization of additively manufactured Ti6Al4V scaffolds with CaP/ZnO coatings, *Progress in Additive Manufacturing*, 2-10, (2025).

[35] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml, V. Svorcik, Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants, *Biotechnology advances*, 29 (2011) 739-767.

[36] B. Boyan, A. Cheng, R. Olivares-Navarrete, Z. Schwartz, Implant surface design regulates mesenchymal stem cell differentiation and maturation, *Advances in dental research*, 28 (2016) 10-17.

manufacturing: A review, *Bioprinting*, 31 (2023) e00268.

[20] A. Bandyopadhyay, I. Mitra, J.D. Avila, M. Upadhyayula, S. Bose, Porous metal implants: processing, properties, and challenges, *International Journal of Extreme Manufacturing*, 5 (2023) 032014.

[21] N. Koju, S. Niraula, B. Fotovvati, Additively manufactured porous Ti6Al4V for bone implants: a review, *Metals*, 12 (2022) 687.

[22] R. Shukla, M.K. Yadav, L.Y.C. Madruga, J. Jayaraj, K. Popat, Z. Wang, L. Xi, K.G. Prashanth, A novel Ti-eggshell-based composite fabricated by combined additive manufacturing-powder metallurgical routes as bioimplants, *Ceramics International*, 51 (2025) 6281-6291.

[23] M.-M. Germaini, S. Belhabib, S. Guessasma, R. Deterre, P. Corre, P. Weiss, Additive manufacturing of biomaterials for bone tissue engineering—A critical review of the state of the art and new concepts, *Progress in Materials Science*, 130 (2022) 100963.

[24] T. Hanawa, Biocompatibility of titanium from the viewpoint of its surface, *Science and Technology of Advanced Materials*, 23 (2022) 457-472.

[25] S.R. Paital, N.B. Dahotre, Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 66 (2009) 1-70.

[26] P.P. Mahamuni-Badiger, P.M. Patil, M.V. Badiger, P.R. Patel, B.S. Thorat-Gadgil, A. Pandit, R.A. Bohara, Biofilm formation to inhibition: Role of zinc oxide-based nanoparticles, *Materials Science and Engineering: C*, 108 (2020) 110319.

[27] C. Pushpalatha, J. Suresh, V. Gayathri, S. Sowmya, D. Augustine, A. Alamoudi, B. Zidane, N.H. Mohammad Albar, S. Patil, Zinc oxide nanoparticles: a review on its applications in dentistry, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 10 (2022) 917990.

[28] Z. Wang, Y. Duan, Y. Duan, Application of polydopamine in tumor targeted drug delivery

- [46] D.P. Papazoglou, L. Hobbs, Y. Sun, A. Neidhard-Doll, In Vitro Proliferation of MG-63 Cells in Additively Manufactured Ti-6Al-4V Biomimetic Lattice Structures with Varying Strut Geometry and Porosity, *Materials*, 17 (2024) 4608.
- [47] M. Mailland, R. Waelchli, M. Ruat, H.G. Boddeke, K. Seuwen, Stimulation of cell proliferation by calcium and a calcimimetic compound, *Endocrinology*, 138 (1997) 3601-3605.
- [48] A. Bandyopadhyay, E.A. Withey, J. Moore, S. Bose, Influence of ZnO doping in calcium phosphate ceramics, *Materials Science and Engineering: C*, 27 (2007) 14-17.
- [49] H. Zhu, S. Sarkar, L. Scott, I. Danelisen, M.A. Trush, Z. Jia, Y.R. Li, Doxorubicin redox biology: redox cycling, topoisomerase inhibition, and oxidative stress, *Reactive oxygen species (Apex, NC)*, 1 (2016) 189.
- [50] S. Ghosh, R.S.K. Raju, N. Ghosh, K. Chaudhury, S. Ghosh, I. Banerjee, N. Pramanik, Development and physicochemical characterization of doxorubicin-encapsulated hydroxyapatite-polyvinyl alcohol nanocomposite for repair of osteosarcoma-affected bone tissues, *Comptes Rendus Chimie*, 22 (2019) 46-57.
- [51] M. Kciuk, A. Giełecińska, S. Mujwar, D. Kołat, Ż. Kałuzińska-Kołat, I. Celik, R. Kontek, Doxorubicin—an agent with multiple mechanisms of anticancer activity, *Cells*, 12 (2023) 659.
- [37] L.P. Mocanu, Influence of powder reuse on metallurgical and mechanical properties of Ti-6Al-4V EB-PBF manufactured components, 2024.
- [38] A. Raza, Powder degradation during powder bed fusion processing, *Chalmers Tekniska Hogskola*, 2021.
- [39] Y. Jiang, T. Jia, W. Gong, P.H. Wooley, S.-Y. Yang, Titanium particle-challenged osteoblasts promote osteoclastogenesis and osteolysis in a murine model of periprosthetic osteolysis, *Acta biomaterialia*, 9 (2013) 7564-7572.
- [40] A. Kiani, F. Davar, M. Bazarganipour, Influence of verjuice extract on the morphology, phase, and magnetic properties of green synthesized CoFe₂O₄ nanoparticle: its application as an anticancer drug delivery, *Ceramics International*, 48 (2022) 34895-34906.
- [41] J. Vecstaudza, M. Gasik, J. Locs, Amorphous calcium phosphate materials: Formation, structure and thermal behaviour, *Journal of the European Ceramic Society*, 39 (2019) 1642-1649.
- [42] A. Boyd, G. Burke, H. Duffy, M. Cairns, P. O'Hare, B. Meenan, Characterisation of calcium phosphate/titanium dioxide hybrid coatings, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19 (2008) 485-498.
- [43] O. Oleshko, Y. Husak, V. Korniienko, R. Pshenychnyi, Y. Varava, O. Kalinkevich, M. Pisarek, K. Grundsteins, O. Pogorielova, O. Mishchenko, Biocompatibility and antibacterial properties of zno-incorporated anodic oxide coatings on TiZrNb alloy, *Nanomaterials*, 10 (2020) 2401.
- [44] K. Kubiak, M. Wilson, T. Mathia, P. Carval, Wettability versus roughness of engineering surfaces, *Wear*, 271 (2011) 523-528.
- [45] A. AlRatrou, M.J. Blunt, B. Bijeljic, Wettability in complex porous materials, the mixed-wet state, and its relationship to surface roughness, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115 (2018) 8901-8906.