



**INSTYTUT FIZYKI**

**POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

**Otrzymywanie i badanie biomimetycznych,  
cienkich warstw tlenków metali przejściowych**

**mgr Aleksandra Seweryn**

Rozprawa doktorska

wykonana w Oddziale Fizyki Promieniowania i Spektroskopii ON 2.4

pod kierunkiem

**prof. dr. hab. Marka Godlewskiego**

Warszawa 2023



### **Podziękowania:**

*W pierwszej kolejności chciałabym serdecznie podziękować mojemu promotorowi, **prof. dr. hab. Markowi Godlewskiemu** za zapewnienie mi warunków do przeprowadzenia badań stanowiących podstawę do napisania tej rozprawy; za przekazaną cenną wiedzę i opiekę naukową w trakcie realizacji niniejszej dysertacji, oraz za zaufanie, jakim zostałam obdarzona.*

*Jednocześnie chciałabym wyrazić moje gorące podziękowania **dr. hab. Bartłomiejowi S. Witkowskiemu, prof. IF PAN** za wsparcie naukowe, motywację oraz za wykonanie pomiarów skaningowej mikroskopii elektronowej SEM, będącej kluczową techniką obrazową w trakcie prac optymalizacyjnych; **prof. dr. hab. Krystynie Ławniczak-Jabłońskiej i dr. hab. Marcinowi Klepce, prof. IF PAN** za możliwość poznania techniki i przeprowadzania pomiarów warstw ALD z wykorzystaniem XPS.*

*Szczególne wyrazy podziękowania kieruję do osób z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, **prof. dr. hab. Krzysztofa Marycza** oraz **dr. hab. Agnieszki Śmieszek** i wszystkim osobom z zespołu kierowanego przez **prof. dr. hab. Krzysztofa Marycza**, które były zaangażowane w biologiczną część charakteryzacji tlenków metali przejściowych otrzymywanych metodą ALD oraz wspólne publikacje naukowe.*

*Ogromne podziękowania kieruję również do **mgr. Krzysztofa Kopalko** oraz **mgr. Wojciecha Woźniaka** za wsparcie w laboratorium ALD oraz wygrzewanie struktur w RTP, a za pomoc w poznaniu technik pomiarowych od strony praktycznej: **dr. hab. Annie Wolskiej** (XPS) i **dr. Aleksandrze Wierzbickiej** (XRD).*



## Spis treści

|   |    |
|---|----|
| Streszczenie .....  | 4  |
| Wstęp .....   | 6  |
| <b>Cel i przedmiot badań</b> .....                                      | 6  |
| Układ pracy .....   | 11 |
| Lista skrótów .....   | 14 |
| <b>Rozdział 1</b> .....   | 15 |
| <b>1.1. Hierarchiczna budowa tkanki kostnej</b> .....                   | 16 |
| 1.1.1. Organiczny komponent tkanki kostnej .....                        | 18 |
| 1.1.2. Nieorganiczny komponent tkanki kostnej .....                     | 20 |
| 1.1.3. Struktura krystaliczna hydroksyapatytu .....                     | 20 |
| <b>1.2. Proces remodelacji tkanki kostnej</b> .....                     | 21 |
| 1.2.1. Implanty kostne .....  | 23 |
| 1.2.2. Problemy okołoperacyjne w implantologii .....                    | 26 |
| 1.2.3. Funkcjonalizacja powierzchni implantów metodą ALD .....          | 27 |
| 1.2.4. Osteo-regeneracyjny potencjał tlenków metali przejściowych ..... | 33 |
| 1.2.5. Wpływ chorób ogólnoustrojowych na układ kostny .....             | 38 |
| <b>1.3. Motywacja</b> .....   | 39 |
| <b>Rozdział 2</b> .....   | 41 |
| <b>2.1. HfO<sub>2</sub> otrzymywany metodą ALD</b> .....                | 42 |
| <b>5.1. Osadzanie cienkich warstw atomowych: ALD</b> .....              | 46 |

|            |  |    |
|------------|--|----|
| 5.2.       | Podstawy eksperymentu SBF .....  | 52 |
| 5.3.       | Promieniowanie rentgenowskie w oddziaływaniu z materią .....                                     | 53 |
| 5.3.1.     | Spektroskopia fotoelektronów promieniowania X (XPS).....   | 54 |
| 5.3.2.     | Dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego (XRD) .....   | 58 |
| 5.3.3.     | Reflektometria promieniowania X (XRR).....   | 60 |
| 5.4.       | Aparatura technologiczno badawcza.....   | 61 |
| 5.4.1.     | Technologia ALD.....   | 61 |
| 5.4.2.     | Eksperyment SBF.....   | 63 |
| 5.4.3.     | Urządzenia pomiarowe.....  | 64 |
| Rozdział 3 | .....  | 66 |
| 3.1.       | Optymalizacja technologii ALD z nowym prekursorem tlenowym: ozonem<br>67                         |    |
| 3.2.       | Wzrost warstw HfO <sub>2</sub> metodą ALD-ozon .....   | 68 |
| 3.3.       | Dyskusja wyników optymalizacji procesów ALD-ozon .....   | 72 |
| Rozdział 4 | .....  | 74 |
| 4.1.       | Tlenki metali przejściowych otrzymywane metodą ALD w symulowanym<br>środowisku biologicznym..... | 75 |
| 4.2.       | HfO <sub>2</sub> otrzymywany metodą ALD w symulowanym środowisku fizjologicznym<br>77            |    |
| 4.3.       | Podsumowanie etapu optymalizacji procesów ALD .....  | 83 |
| 4.3.1.     | Model biomineralizacji tkanki kostnej .....  | 85 |
| Rozdział 5 | .....  | 88 |
| 5.1.       | HfO <sub>2</sub> otrzymywany metodą ALD RTP .....  | 89 |

**5.1.1. Charakteryzacja fizykochemiczna HfO<sub>2</sub> ALD-woda po procesie RTP**

89

**5.1.2. Modyfikowany termicznie HfO<sub>2</sub> w symulowanym środowisku fizjologicznym** 92

|   |     |
|---|-----|
| <b>Rozdział 6</b> .....   | 95  |
| <b>6.1. Charakteryzacja chemiczna a-CaP na powierzchni HfO<sub>2</sub></b> .....            | 96  |
| <b>6.2. Statystyczna analiza wzrostu populacji a-CaP na powłokach HfO<sub>2</sub></b> ..... | 107 |
| <b>6.2. Dyskusja mechanizmu nukleacji struktur BA</b> .....                                 | 109 |
| <b>Rozdział 7</b> .....   | 115 |
| <b>Podsumowanie</b> .....   | 117 |
| <b>Dorobek naukowy autorki</b> .....  | 119 |
| <b>Spis publikacji naukowych</b> .....  | 120 |
| <b>Spis zgłoszeń patentowych</b> .....  | 121 |
| <b>Wybrane nagrody i wyróżnienia</b> .....  | 123 |
| <b>Bibliografia</b> .....   | 126 |
| <b>Załączone publikacje</b> .....   | 150 |

## Streszczenie

Przedstawiona dysertacja stanowi opis procesu badawczego przeprowadzonego przez autorkę. Główną tezę postawioną w pracy było zoptymalizowanie technologii osadzania cienkich warstw atomowych  $\text{HfO}_2$  metodą ALD umożliwiające osadzanie proapatytu twórczej powłoki implantu kostnego. Jednocześnie zaplanowano obserwację i opis zjawisk zachodzących na granicy ciała stałego i środowiska biologicznego. Do opisu zjawisk wykorzystano metody fizyczne, w szczególności spektroskopię fotoelektronów promieniowania X (XPS).

Motywacją do podjęcia badań była społeczna potrzeba funkcjonalizacji powierzchni implantów kostnych dedykowanych w szczególności pacjentom z osteoporozą (OS). Osteoporoza jest chorobą o podłożu ogólnoustrojowym, wpływa na drastyczne zmniejszenie gęstości kości. Kość jako element układu kostno-szkieletowego pełni funkcje podporowo-lokomocyjne. Z tego względu wytrzymałość kości jest kluczowa dla prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Zmniejszenie gęstości tkanki kostnej zwiększa podatność na złamania oraz utrudnia proces gojenia. Tkanka kostna ma zdolność do regeneracji, jeżeli zachowana zostaje homeostaza pomiędzy procesami tworzenia i resorpcji kości. Ponieważ OS powoduje nadmierną aktywność komórek odpowiedzialnych za resorpcję kości (osteoblastów) również regeneracja kości po urazie jest upośledzona. Osteoporotyczne złamania kości wymagają w zdecydowanej większości leczenia implantologicznego. Jednak proces wszczepienia implantów również bazuje na remodulacyjnej zdolności tkanki kostnej. W implantologii kluczowe jest kostne połączenie powierzchni implantu z tkanką kostną. Tylko wówczas stabilność struktury kość - implant może zostać zachowana i przywrócone zostaną zdolności motoryczne pacjenta. Oprócz procesów tworzenia i resorpcji tkanki kostnej istotny jest drugi etap, a mianowicie biomineralizacja blizny. Mineralnym składnikiem tkanki kostnej jest krystaliczny fosforan wapnia -biologiczny apatyt (BA). Głównym zadaniem badawczym w przedstawionej dysertacji była właśnie ocena, czy na powierzchni  $\text{HfO}_2$  może w sposób spontaniczny krystalizować BA.

Do oceny potencjału funkcjonalności powłoki  $\text{HfO}_2$  wykorzystano plyn o stężeniu jonowym, zbliżonym do osocza człowieka. Przygotowane powłoki na podłożach kwarcowych inkubowano w przygotowanym roztworze w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (temperatura  $37^\circ\text{C}$ ), a następnie przy pomocy metod fizycznych badano czy na powierzchni obecne są struktury mineralne. Okazało się, że możliwe jest przygotowanie powierzchni  $\text{HfO}_2$  umożliwiające indukowanie samoistnego osadzania się amorficznych kulistych struktur o rozwiniętej morfologii powierzchni, typowej dla hydroksyapatytu. Metody fizyczne, a w szczególności XPS i SEM, umożliwiły ocenę jakości, składu chemicznego biomateriału. Zaproponowano również model powstawania struktur na poziomie cząsteczkowym, który wynikał z analizy XPS. Statystyczna analiza na podstawie wyników obserwacji SEM pozwoliła na określenie optymalnych parametrów technologicznych. Dodatkowo wykazano, że proces wzrostu struktur CaP na



powierzchni  $\text{HfO}_2$  jest procesem samoograniczającym się, co jest istotne przyszłościowych aplikacji medycznych powłoki.

The presented dissertation is a description of the research process carried out by the author leading to the assessment of surface biopotential. The main thesis of the work was to optimize the deposition technology of  $\text{HfO}_2$  thin layers by the ALD method, enabling the development of a pro-apatite coating of a bone implant. At the same time, the observation and description of the phenomena occurring at the interface between the solid and the biological environment were planned. Physical methods were used to describe the phenomena, in particular X-ray photoelectron spectroscopy (XPS).

The motivation to undertake the research was the social need to functionalize the surface of bone implants dedicated in particular to patients with osteoporosis (OS). Osteoporosis is a systemic disease that drastically reduces bone density. Bone as an element of the skeletal system performs support and locomotion functions. For this reason, bone strength is crucial for the proper functioning of the human body. Reducing the density of bone tissue increases the susceptibility to fractures and hinders the healing process dramatically. Bone tissue has the ability to regenerate if homeostasis between the processes of bone formation and resorption is maintained. Because OS causes excessive activity of cells responsible for bone resorption (osteoblasts), bone regeneration after injury is also impaired. The vast majority of osteoporotic bone fractures require implantological treatment. However, the implantation process is also based on the remodeling ability of bone tissue. In implantology, the bone connection of the implant surface with the bone tissue is crucial. Only then can the stability of the bone-implant structure be preserved for the patient's motor skills to restore. In addition to the processes of bone formation and resorption, the second stage is important, namely biomineralization of the scar. The mineral component of bone tissue is crystalline calcium phosphate - biological apatite (BA). The main research task in the presented dissertation was to assess whether BA can spontaneously crystallize on the surface of  $\text{HfO}_2$ .

To assess the functional potential of the  $\text{HfO}_2$  coating, a fluid with an ionic concentration similar to human plasma was used. The prepared coatings on quartz substrates were incubated in the prepared solution in conditions close to physiological conditions (temperature  $37^\circ\text{C}$ ), and then, using physical methods, it was tested whether mineral structures were present on the surface. It turned out that it is possible to prepare the  $\text{HfO}_2$  surface that enables the induction of spontaneous deposition of amorphous spherical structures with a developed surface morphology, typical of a hydroxyapatite. Physical methods, in particular XPS and SEM, made it possible to assess the quality and chemical composition of the biomaterial. A model for the formation of structures at the molecular level was also proposed, which resulted from the XPS analysis. Statistical analysis based on the results of SEM observations allowed to determine the optimal technological parameters. In addition, it was shown that the growth process of CaP structures on the  $\text{HfO}_2$  surface is a self-limiting process, which is important for future medical applications of the coating.

# Wstęp

## Cel i przedmiot badań

Nanotechnologia jest interdyscyplinarną dziedziną nauki, której początki datuje się na drugą połowę XX wieku, a za inicjatora jej rozwoju uznawany jest Richard Feynman, który w 1959 roku wygłosił wykład zatytułowany w oryginale „Plenty of Room at the Bottom” omawiając ideę miniaturyzacji, odnosząc się między innymi do naturalnego procesu zapisu danych w cząsteczce kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA) [1]. Ponieważ wraz ze zmniejszaniem rozmiarów obiektu rośnie stosunek powierzchni do objętości materiału, nanomateriały charakteryzują się innymi, często niespodziewanymi właściwościami w porównaniu do ich odpowiedników w rozmiarach makro, nazywanych „objętościowymi”. Nanotechnologia jest zatem dziedziną zajmująca się metodami wytwarzania i charakteryzacją nanomateriałów.

Intensywny rozwój cywilizacji XXI wieku zawdzięczamy w dużej mierze nanotechnologii. Miniaturyzacja tranzystorów przyczyniła się znacząco do globalnej cyfryzacji i szybkiego wzrostu postępu technologicznego [2]. Niestety, wraz z rozwojem technologicznym zmniejszyła się aktywność fizyczna człowieka. Statyczny tryb życia, błędy żywieniowe oraz rosnące zanieczyszczenie środowiska sumują się na dynamiczny rozwój chorób cywilizacyjnych. Cukrzyca, osteoporoza (OS), reumatoidalne zapalenie stawów to kilka z nich, których cechą wspólną jest negatywny wpływ zaburzonej homeostazy organizmu na układ kostny. OS jest, według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), trzecią z kolei pod względem śmiertelności chorobą cywilizacyjną XXI wieku. Specyfika osteoporotycznych złamań kości wskazuje w większości przypadków na konieczność leczenia implantologicznego. Kluczową właściwością materiałów, z których produkowane są implanty jest ich zdolność do integracji z tkanką kostną. Projektowanie biokompatybilnych materiałów implantologicznych stanowi duże wyzwanie dla naukowców, głównie za sprawą wymagającego środowiska biologicznego oraz długoterminowej perspektywy użytkowania, w warunkach cyklicznie powtarzających się obciążeń mechanicznych. Rusztowania kostne, wykonywane są najczęściej ze stopów tytanu, stopów kobaltu lub stali szlachetnej i wymagają dodatkowej modyfikacji

powierzchni, dla zapewnienia właściwego procesu gojenia się tkanki kostnej i funkcjonalnej integracji struktury kostnej z powierzchnią ciała stałego.

Okazuje się, że specjalnie projektowane powłoki, nakładane na powierzchnie implantów kostnych mogą być doskonałym rozwiązaniem na pojawiające się okołoooperacyjne problemy medyczne wynikające z konieczności zaimplementowania ciała stałego jako elementu układu kostnego u człowieka w kilkudziesięcioletniej perspektywie czasu. Badania dotyczące projektowania nanomateriałów do wykorzystania w implantologii prowadzone są w ramach nowej interdyscyplinarnej dziedziny nauki inżynierii materiałowej, która czerpie z nanotechnologii, a prace prowadzone są wspólnie przez naukowców z między innymi takich dziedzin jak fizyka, chemia, biotechnologia, biologia, medycyna i inne. Medycyna regeneracyjna natomiast, której ideą jest rozwój terapii wspomagających procesy gojenia uszkodzonych tkanek w sposób możliwie najwierniej odwzorowujący zdrową tkankę, wyznacza obecnie kierunki rozwoju inżynierii materiałowej.

Przedmiotem badań przedstawianej rozprawy doktorskiej są cienkie warstwy (powłoki) tlenków metali przejściowych, otrzymywane metodą osadzania cienkich warstw atomowych (z ang. Atomic Layer Deposition, ALD [3]), projektowane jako powłoki implantów ortopedycznych, oraz ich biomimetyczne właściwości. Bazując na rozważaniach dotyczących aspektów proregeneracyjnych wytwarzanych nanomateriałów, w zależności od ich właściwości fizykochemicznych [4]–[6], przedstawione zostaną, **inspirowane naturalnym biologicznym procesem kostnienia tkanki twardej**, wyniki optymalizacji procesu wzrostu warstwy ALD tlenku hafnu(IV) ( $\text{HfO}_2$ ) prowadzące do zaprojektowania biomimetycznej powłoki implantu kostnego. Efektem opisywanych działań badawczo-naukowych autorki dysertacji będzie nanopowłoka  $\text{HfO}_2$ , naśladująca atrybuty żywej tkanki kostnej, zgodnie z naturalnym modelem biomineralizacji w warunkach fizjologicznych u kręgowców. Otrzymana w procesie ALD powłoka będzie promowała samoistnie osadzanie się amorficznego fosforanu wapnia (a-CaP), prekursora hydroksyapatytu (HA)<sup>1</sup>. HA jest to polikrystaliczna

---

<sup>1</sup> W ramach rozważań naukowych zostanie zaproponowany innowacyjny model osteointegracji. Na pewnym etapie biomineralizacji kluczowe jest występowanie a-CaP. Wytlumaczenie tego zjawiska wraz z odniesieniami literaturowymi znajdzie się pod koniec rozdziału 4.

substancja mineralna, która występuje w formie niestechiometrycznej z jonami węgla jako domieszka w tkance kostnej. Ta forma HA, jest podstawowym składnikiem nieorganicznej frakcji tkanki kostnej i jest określana mianem biologicznego apatytu (BA).

Pro-apatyto twórcze właściwości powłoki implantu kostnego są kluczowym czynnikiem decydującym o bio-funkcjonalności powierzchni implantów ortopedycznych, a zarazem szczególnie istotne u pacjentów z OS. Wzorowanie się na naturze, szukanie rozwiązań technologicznych prowadzących do odtworzenia naturalnie występujących zjawisk i procesów w środowisku ożywionym, jest sporym wyzwaniem dla inżynierii materiałowej i medycyny regeneracyjnej. Uznając jednak naturę za wzorzec sztandarowy, przydatność przeprowadzonych w przedstawianej dysertacji badań wydaje się być silnie uargumentowana. Prowadzone badania rozwojowe powłok na implanty są niezwykle istotne społecznie, a zapotrzebowanie na multifunkcjonalne powłoki implantów rośnie.

Pomimo, że istnieją już pewne rozwiązania technologiczne opracowane naukowo i stosowane komercyjnie nadal poszukiwana jest powłoka, która rozwiązywałaby wszystkie okołoperacyjne i użytkowe problemy związane ze stosowaniem kostnych implantów metalowych. Potrzebna jest powłoka nierozdzielnie związana z podłożem, stanowiąca pełną i trwałą barierę oddzielającą tkankę kostną od powierzchni metalu i zarazem chroniącą metal od agresywnego środowiska biologicznego. Powszechna antybiotykoodporność, która coraz wyraźniej definiuje problemy XXI wieku, dodatkowo wskazuje na konieczność stosowania alternatywnych metod zabezpieczających przed infekcjami okołoperacyjnymi. Preferowane jest zatem, żeby projektowana powłoka cechowała się antybakteryjnością oraz właściwościami przeciwzapalnymi. Powłoka o wysokiej jakości funkcjonalnej musi aktywnie wspierać proces integracji powierzchni implantu z tkanką kostną, tworząc integralne zespolenie pomiędzy żywą tkanką, a powierzchnią zaimplementowanego ciała stałego. Są to główne argumenty determinujące potrzebę szukania nowych rozwiązań dedykowanych medycynie regeneracyjnej ukierunkowanej na implantologię ortopedyczną.

Prace nad projektowaniem powłok implantów kostnych wymagają szczegółowej wiedzy, dotyczącej zjawisk zachodzących na granicy powierzchni ciała stałego i środowiska biologicznego. Mimo że, wieloletnie badania są mocno skoncentrowane na

tym temacie, istnieje jeszcze wiele zjawisk do wyjaśnienia i zdefiniowania. Jest to zadanie bardzo trudne z uwagi na skomplikowany układ fizyczno-biologiczny, wymagający rozważania wieloaspektowego. Trudnością jest niewątpliwie efekt zatłoczenia<sup>2</sup> i mobilności molekuł w komórce biologicznej. Komórki macierzyste, które inicjują rozwój komórek kostnych i proces integracji z implantem są niezwykle plastyczne, reagują na wszystkie, nawet minimalne zmiany w środowisku, w tym w szczególności na rodzaj powierzchni (powłoki) ciała stałego, z którym się bezpośrednio kontaktują. Opis zjawisk i reakcji materiałów na warunki biologiczne musi być zatem zawsze prowadzony w odniesieniu do konkretnego materiału co sprawia, że tematyka ta jest bardzo rozwojowa i powiązana z danym materiałem.

Istotnym aspektem prac w ramach projektowania nowych bio-materiałów jest skalowalność technologii z poziomu laboratoryjnego do aplikacyjnego, z zachowaniem wymaganych parametrów jakościowych i ekonomicznych. Technologia ALD pierwotnie wprowadzona została do użytku w celach przemysłowych, a dopiero później zyskała zainteresowanie naukowców[3], obecnie rozwija się równolegle: badawczo i aplikacyjnie. Technologia wytwarzania biofunkcjonalnych, spersonalizowanych powłok na implantach kostnych powinna być na tyle ekonomiczna, żeby była społecznie dostępna. Każdy proces projektowania nowych nanomateriałów, w szczególności do zastosowań biologicznych, jest niezwykle żmudny i wymagający. Optymalizacja technologii, również ALD, wymaga wielu szczegółowych prób i badań. Jednak po optymalizacji i opracowaniu wymaganych parametrów jest stosunkowo prosta w implementacji na skalę przemysłową i względnie ekonomiczna. Stąd wydaje się, że wybór metody ALD do projektowania materiałów bio-funkcjonalnych jest uzasadniony.

Opracowanie procedury ALD wytwarzania biomimetycznej, pro-apatyto twórczej powłoki  $\text{HfO}_2$  jest podstawowym zadaniem badawczym, a zrozumienie i opis zjawisk fizycznych prowadzących do pro-apatyto twórczych właściwości powierzchni w funkcji

---

<sup>2</sup> Podstawową jednostką strukturalną życia jest komórka. Jest to układ licznych organelli, cząsteczek, jonów otoczonych lipidową błoną komórkową. Przestrzeń pomiędzy tymi elementami wypełniona jest płynem wewnątrzkomórkowym. Na zewnątrz w płynie międzykomórkowym znajduje się macierz zewnątrzkomórkowa, stanowiąca rusztowanie tkankowe. Komórka poprzez fizyczne mechanizmy dyfuzji kontaktuje się z otoczeniem zewnętrznym. Mnogość elementów oraz nieustanna ruchliwość molekuł wpływają na duże zagęszczenie porównywalne do efektu zatłoczenia.

jej cech fizykochemicznych, indukowanych procesem technologicznym jest kluczowym problemem naukowym podjętym w przedstawianej dysertacji. Opis zachodzących zjawisk na powierzchni był możliwy po wykonaniu szeregu badań, głównie pomiarów z wykorzystaniem promieniowania rentgenowskiego (promieniowanie X), a w szczególności: spektroskopii fotoelektronów w zakresie promieniowania X (XPS) oraz dyfrakcji promieniowania X (XRD).

XPS jako zaawansowana metoda charakteryzacji powierzchni zarówno jakościowej jak i ilościowej stała się głównym narzędziem badawczym w pracach optymalizacyjnych związanych z tematyką przedstawianą w tej dysertacji. Kontrolę jakości optymalizowanych materiałów ALD prowadzono na bieżąco głównie za pomocą pomiarów reflektometrii promieniowania X (XRR) oraz obserwacji mikroskopowych przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM).

Zgodnie z powyższym opisem postawione zostały następujące cele dysertacji:

- 1) ocena osteo-regeneracyjnego potencjału cienkich warstw atomowych tlenków metali przejściowych osadzanych metodą ALD,
- 2) ocena pro-apatyto twórczego potencjału cienkiej warstwy atomowej  $\text{HfO}_2$  osadzanego metodą ALD,
- 3) biomimetyczna optymalizacja procesu przygotowania pro-apatyto twórczej warstwy  $\text{HfO}_2$ ,
- 4) obserwacja, za pomocą fizycznych metod charakteryzacji powierzchni ciała stałego, heterogennej biomineralizacji  $\alpha$ -CaP na powierzchni  $\text{HfO}_2$ , i opis zjawisk.

## Układ pracy

**Rozdział pierwszy** zawiera zwięzły opis budowy tkanki kostnej, podstawowej jednostki strukturalnej układu kostnego człowieka, a zarazem powierzchni integrującej implant kostny. Przedstawione zostały rodzaje implantów metalowych oraz cel i sposoby funkcjonalizacji ich powierzchni jako metoda mająca na celu wsparcie procesów osteointegracyjnych. Główne problemy okołoperacyjne wynikające z reakcji obronnej organizmu na interwencję chirurgiczną i zaimplementowanie ciała obcego opisano w odniesieniu do najnowszych badań naukowych, przy czym uwzględnione zostały zarówno ortopedyczne jak i ogólnoustrojowe kwestie zdrowotne.

Następnie opisane zostały wyniki przesiewowych badań *in vitro* warstw ALD tlenków metali przejściowych w warunkach osteosyntezy. Badania dotyczące właściwości biologicznych powłok wykonano na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu we współpracy z prof. dr. hab. Krzysztofem Maryczem. Uzyskane wyniki badań właściwości biologicznych przygotowanych warstw ALD wskazywały na osteogenne właściwości warstw, co więcej mocno ukierunkowane na potrzeby pacjentów z osteoporozą. Zatrważający wpływ chorób ogólnoustrojowych na stan tkanki kostnej człowieka stał się motywacją autorki dysertacji do prowadzenia badań związanych z tworzeniem powierzchni biomimetycznych. Zatem istota OS i jej konsekwencje na procesy regeneracyjne tkanki kostnej zostały przeanalizowane. W odniesieniu do przedstawionej wiedzy biologicznej dokonano przeglądu roli jaką spełnia nanotechnologia w biologii i medycynie regeneracyjnej tkanki kostnej. Motywacja oparta na zdrowotnych potrzebach społeczeństwa i potrzebach poznawczych autorki dysertacji sformułowana została w formie podsumowania pierwszego rozdziału.

**Rozdział drugi**, w całości związany jest z opisem materiału i metod wykorzystanych w pracy naukowej, której wynikiem jest przedstawiana rozprawa. W pierwszym podrozdziale opisane zostały wyniki przeglądu dostępnej literatury naukowej związanej z tematycznie z właściwościami HfO<sub>2</sub> otrzymywanego metodą ALD. Metoda technologiczna, czyli metoda ALD została, w kolejnym podrozdziale, scharakteryzowana na gruncie naukowym i praktycznym. Poruszone zostały podstawowe, wydaje się kluczowe, aspekty podstaw teoretycznych metody ALD określające jej potencjał w medycynie regeneracyjnej. Opis zjawisk z pogranicza ciała stałego i środowiska

biologicznego jest nauką podstawą do projektowania powłok implantów kostnych dedykowanych pod określone jednostki chorobowe. Wiele metod fizycznych służących do obserwacji powierzchni ciała stałego została zaadoptowana do obserwacji materiałów biologicznych. Scharakteryzowano metody fizyczne, wykorzystane w niniejszej pracy.

**Rozdział trzeci** dotyczy części eksperymentalnej, której podstawą jest optymalizacja technologii ALD, głównie wprowadzenie nowego prekursora tlenowego, opracowanie norm i zasad jego użytkowania w warunkach laboratoryjnych. Wyniki prac optymalizacyjnych wzrostu warstw  $\text{HfO}_2$  przedstawiono jako porównanie materiałów otrzymywanych przy użyciu różnych prekursorów tlenowych: pary wodnej i ozonu.

**Rozdział czwarty** dotyczy części eksperymentalnej ukierunkowanej na ocenę pro-apatyto twórczych właściwości warstw tlenków metali przejściowych w symulowanych warunkach fizjologicznych. Z uwzględnieniem argumentacji podejmowanych kroków badawczych pokazany został proces preselekcji materiału i technologiczny cykl optymalizacyjny technologii ALD zakończony przedstawieniem propozycji pro-apatyto twórczego materiału dedykowanego jako powłoka implantu kostnego.

**Rozdział piąty** przedstawia sposób po procesowej modyfikacji warstw ALD, ukierunkowanej na biomimetyczną funkcjonalizację powierzchni. Wynik optymalizacji metody ALD w nawiązaniu z naturalnym procesem biomineralizacji stał się inspiracją w trakcie procesu badawczego do tej części badań.

**Rozdział szósty** zawiera opis wyników mineralnego materiału nukleującego na powierzchni celowo modyfikowanej powłoki  $\text{HfO}_2$ . Charakter obserwowanych struktur został przedyskutowany w odniesieniu do dostępnej literatury naukowej. Dyskusja wyników w oparciu o literaturę pozwoliła autorce na sformułowanie podsumowania etapu badań oraz przedstawienie ogólnego zarysu perspektywy dalszego rozwoju zainteresowań naukowych autorki i kontynuacji badań.

Projektowanie nano-materiałów dedykowanych do użytku medycznego w głównej mierze opiera się na obserwacji zjawisk z pogranicza powierzchni ciała stałego i środowiska biologicznego. Zarówno możliwości jakie daje nanotechnologia i rozwój nowych materiałów jak i wrażliwość świata żywego na wszelkie bodźce zewnętrzne



sprawa, że temat podjęty w przedstawionej rozprawie jest rozwojowy. Stąd w **rozdziale siódmym** przedstawiono plany przyszłych kierunków badań, które zostaną w pierwszej kolejności wdrożone przez autorkę dysertacji.

## Lista skrótów

- a-CaP – amorficzny fosforan wapnia
- ALD – osadzanie cienkich warstw atomowych (z ang. Atomic Layer Deposition)
- BA – biologiczny apatyt
- CaP – fosforan wapnia
- CHA – koncentryczny hemisferyczny analizator
- DNA – kwas deoksyrybonukleinowy
- HA – hydroksyapatyt
- HfO<sub>2</sub> – tlenku hafnu (IV)
- MC3T3 – linia mysich komórek macierzystych, prekursorzy osteoblastów
- OS – osteoporoza
- promieniowanie X – promieniowanie rentgenowskie
- SEM – skaningowy mikroskop elektronowy
- SM –rozpylanie magnetronowe
- TEMAH – tetrakis(etylometyloamino)hafn
- TDEAH – tetrakis(dietyloamino)hafn
- TDMAH – tetrakis(dimetylolamino)hafn
- TDMAT – tetrakis(dimetylolamino)tytan
- TDMAZ – tetrakis(dimetylolamino)cyrkon
- TiCl<sub>4</sub> – czterochlorek tytanu
- TiO<sub>2</sub> – tlenku tytanu (IV)
- XPS – spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania rentgenowskiego
- XRD – dyfrakcja promieniowania X
- ZrO<sub>2</sub> – tlenku cyrkonu (IV)
- 4B12 – linia mysich komórek macierzystych, prekursorzy osteoklastów

# Rozdział 1

## *Interdyscyplinarność gwarancją rozwoju*

Nanotechnologia jest synonimem interdyscyplinarności. Projektowanie nowych nanomateriałów prowadzone musi być przy ścisłej współpracy specjalistów z odpowiednich dziedzin. Projektowanie materiałów na potrzeby medycyny regeneracyjnej wymaga współpracy specjalistów z nauk ścisłych i biologiczno-przyrodniczych. Szersza znajomość naukowego podłoża problemu, jest konieczna dla wszystkich zaangażowanych stron.

Poznanie biologicznych podstaw budowy i funkcjonowania tkanki kostnej oraz procesu jej regeneracji, jest kluczowe do prowadzenia świadomego procesu projektowania powłoki implantu. Wpisując się w obszar tematyczny przedstawianej dysertacji przegląd podstawowych pojęć i zagadnień biologicznych został zatem przez autorkę dysertacji przedstawiony w części pierwszej rozdziału 1. Zarówno podstawy biologiczne funkcjonowania tkanki kostnej jak i fizykochemiczna charakteryzacja powierzchni implantów są tematem niezwykle szerokim, dlatego wybrane zostały tylko niektóre zagadnienia w celu wytłumaczenia jedynie biofizycznych podstaw funkcjonalizacji powierzchni implantów.

W drugiej części rozdziału 1 dokonany został przegląd literatury naukowej ukierunkowany na wykorzystanie technologii ALD w biologii i medycynie regeneracyjnej kości. Następnie przedstawiono pierwsze wyniki badań osteoregeneracyjnych właściwości warstw ALD tlenków metali przejściowych.

## 1.1. Hierarchiczna budowa tkanki kostnej

Układ kostno-szkieletowy organizmów żywych pełni funkcję ochronną dla narządów wewnętrznych, a wspólnie z układem mięśniowym piastuje ważną rolę podporowo-lokomocyjną. Oprócz, wydawałoby się oczywistych zadań lokomocyjnych tkanka kostna jest swoistym magazynem pierwiastków chemicznych niezbędnych do funkcjonowania organizmu od poziomu komórkowego poprzez poziom układowy, aż do całościowego jako jednostka osobnicza. Funkcjonalność tkanki kostnej uwzględnia dwa aspekty, mechaniczny i wewnątrzwydzielniczy, czyli endokrynologiczny [7].

Tkanka kostna jest podstawowym elementem budulcowym układu szkieletowego kręgowców. Jest to żywa, dynamicznie przebudowująca się struktura, posiadająca zdolność do samo odnawiania. Zdolności regeneracyjne kości powodują, że rozwój medycyny regeneracyjnej, ukierunkowanej w szczególności na wsparcie implantologii kostnej, jest bardzo perspektywistyczny [8]. Przebudowa kości jest nieprzerwanym procesem zachodzącym w organizmie na zasadzie sprzężenia zwrotnego pomiędzy komórkami kostnymi, jest też kluczowym czynnikiem zapewniającym homeostazę organizmu na poziomie układowym [9] i komórkowym [7], a uporządkowana budowa struktur kostnych już od poziomu atomowego jest odpowiedzialna za wysoką wytrzymałość mechaniczną zarówno pojedynczych struktur kostnych jak i całego układu.

Tkanka kostna jest hierarchiczną strukturą [10], o kilku stopniach uporządkowania [11]. Stopniowy system kategoryzacji opisu kości, który jako pierwsi wprowadzili Weiner i Wagner [12], nadal ewoluuje, a wraz z postępem w dziedzinie technik pomiarowych, zwłaszcza tych umożliwiających obrazowanie trójwymiarowe w biologii [13], [14] jest nieustannie uzupełniany. Początkowy podział na zaproponowane przez autorów kategorie wyodrębnione ze względu na złożoność strukturalną kości [14] rozważany w skali od największej do najmniejszej, przedstawia się następująco:

- IX – organ, czyli kość jako funkcjonalna jednostka, element budulcowy szkieletu,
- VIII – tkanka: istota beleczkowata (gąbczasta) i istota zbita,
- VII – element tkanki: beleczka kostna; osteon; włóknisto-błaszka,
- VI – kierunek przebiegu włókien kolagenowych: struktura laminarna[15];

struktura równoległa[16]; struktura o przypadkowym układzie włókienek kolagenowych[17]. Wytrzymałość mechaniczna jest uzależniona od ułożenia i kierunku przebiegu włókienek kolagenowych[16],

- V – super struktura – pęczki,
- IV – wzór, układ: nieuporządkowany, wachlarzowy lub częściowo uporządkowany układ matrycy z macierzy międzykomórkowej i komórek kostnych,
- *IV – V – komórki kostne i macierz międzykomórkowa,*
- III – ustawienie: uporządkowanie zmineralizowanych włókienek kolagenowych,
- II – komponenty strukturalne – zmineralizowane włókienka kolagenowe,
- *III – II- zmineralizowana macierz międzykomórkowa,*
- I – komponenty: kolagen, apatyt biologiczny, czyli niestechiometryczny, zawierający atomy węgla HA; glukozaaminoglikany, białka niekolagenowe.

Struktura tkanki kostnej jest nie izotropowa, a budowa kości jest laminarna. Przekrój poprzeczny kości długich znacznie różni się od przekroju podłużnego. Nawet w obrębie jednej jednostki obserwujemy odmienne ułożenie beleczek kostnych. Włókna kolagenowe układają się zgodnie z kierunkiem działania sił. W trzonach kości równoległe do osi długiej kości [18], w nasadach układ jest inny, mocno zależny od kształtu i pełnionej funkcji. W zależności od układu beleczek kostnych odmienna jest też struktura kości na poziomie atomowym, układ krystalograficzny składnika mineralnego kości zależny jest od mechaniki danego elementu i sił przekazywanych podczas lokomotorycznych czynności układu kostnego.

Wnętrze kości stanowi istota gąbczasta, która jest otoczona istotą zbitą. Struktura kości zbitej jest zorganizowana w osteony. Są to podstawowe jednostki strukturalne i funkcjonalne istoty zbitej kości. Osteony, tzw. blaszki kostne, ułożone są wzdłuż osi długiej w formie rurek, tworząc kanały Harwersa. Kanały Harwersa zapewniają przestrzeń dla naczyń krwionośnych i nerwów [15]. Głównym atrybutem istoty zbitej jest jej wysoka wytrzymałość mechaniczna. Istota gąbczasta jest naturalnym rusztowaniem kostnym [12], występuje w formie porowatej, przestrzennej struktury podobnej do plastra miodu. Istota gąbczasta oprócz przekazywania sił generowanych ruchem zapewnia przestrzeń

metaboliczną i endokrynologiczną [11]. W tej przestrzeni znajdują się naczynia krwionośne oraz szpik kostny z komórkami macierzystymi. Komórki macierzyste, mezychymalne są odpowiedzialne za produkcję komórek kostnych, ale też istoty pozakomórkowej, czyli sieci zbudowanej z różnego typu cząsteczek. Istota pozakomórkowa stanowi przestrzeń do fizjologicznych procesów zachodzących w tkance kostnej, jest swoistą macierzą dla komórek kostnych, budującą system wzajemnych połączeń [19]. W tej przestrzeni funkcjonują dojrzałe komórki kostne. Podstawową jednostką istoty pozakomórkowej są trzeciorzędowe białka kolagenowe w formie włókienek o średnicy 35nm -60nm i długości 1µm [11]. Macierz pozakomórkowa funkcjonuje również jako platforma sygnalizująca, do przekazywania pomiędzy molekułami sygnałów biologicznych w postaci wydzielanych substancji [11]. Najważniejsze biomolekuły odpowiedzialne za przekazanie informacji biologicznej to cytokiny: czynniki wzrostu, czynniki immunomodulujące oraz hormony [20]. Cytokiny są istotnym komponentem mikro środowiska tkanki kostnej, koordynują homeostazę w tkance kostnej.

Oprócz przekazywania sygnałów drogą biochemiczną, macierz pozakomórkowa pełni rolę sygnalizatora bodźców fizycznych. Potencjał różnicowania komórek kostnych jest indukowany mechanicznie, regulowany naprężeniami wewnętrznego i zewnętrznego pochodzenia. Również zmiana ciśnienia hydrostatycznego płynów ustrojowych, generowana poprzez bodźce lokomotoryczne, wpływa na wzrost i remodulację tkanki kostnej. Co więcej, uważa się, że naprężenia pochodzące od przepływu płynów wewnątrzkomórkowych wpływają na różnicowanie komórek osteogennych [11].

Powyższa charakteryzacja jest dość ogólna, ale pokazuje jakim skomplikowanym nano-systemem jest kość. Ten system został perfekcyjnie zaprojektowany przez naturę i spełnia jednoznacznie zdefiniowane funkcje w organizmie, od poziomu makro do poziomu nano. Budowa kości jest wyspecjalizowana do pełnionej funkcji na każdym poziomie kategoryzacji.

### **1.1.1. Organiczny komponent tkanki kostnej**

Z chemicznego punktu widzenia tkanka kostna składa się z komponentu organicznego (25%), nieorganicznego (65%) i wody (10%) [21]. Główny komponent tkanki kostnej, odpowiedzialny za jej możliwości przebudowy, to komponent organiczny,

na który składają się białka kolagenowe i komórki kostne. Około 10% składnika organicznego kości to niekolagenowe białka zaangażowane w formowanie kości, są to między innymi osteopontyna, która jest związana z obszarami wzrostu kości, proteoglikany, które są pozostałością po osteoidach [11], [18] osteokalcyna, fibronektyna, czynniki wzrostu [22]. Białka kolagenowe, odpowiedzialne są za twardość i elastyczność kości [10]. Komórki kostne zapewniają przebudowę kości, zarówno metaboliczną jak i pourazową oraz cechy mechaniczne. Są trzy typy funkcjonalnie i strukturalnie<sup>3</sup> wyspecjalizowanych komórek kostnych:

- komórki kościotwórcze (osteoblasty),
- komórki kościogubne (osteoklasty),
- komórki kostne (osteocyty).

Osteoblasty i osteoklasty aktywują się wzajemnie co zapewnia ciągłą przebudowę kości. Aktywność osteoklastów pobudza aktywność osteoblastów, rozwój osteoblastów natomiast wpływa na działalność osteoklastów. Dojrzałe osteoblasty obumierają przekształcając się w osteocyty, które stanowią ~95% komórek kostnych [21] i wraz ze zmineralizowanymi włóknkami kolagenowymi oraz macierzą międzykomórkową wchodzi w skład komponentu nieorganicznego, czyli mineralnego składnika tkanki kostnej BA. Osteocyty regulują homeostazę kości, przenosząc naprężenia mechaniczne, którym kość jest poddawana [10], [23] pobudzają pozostałe komórki do aktywności tym samym regulują sprzężenie zwrotne pomiędzy osteoblastami i osteoklastami [21], które zapewnia właściwą budowę składnika mineralnego kości, co jest kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania organizmu jako jednostki, czyli wytrzymałości mechanicznej struktur kostnych oraz zapewnienia składników odżywczych wszystkim komórkom organizmu [19].

---

<sup>3</sup> Szczegółowa budowa i różnice strukturalne komórek kostnych w zależności od pełnionej funkcji nie będą w pracy omawiane. Literatura przedmiotu biologicznych właściwości tkanki kostnej jest niezmiernie szeroka, dlatego przygotowany opis został przeprowadzony w oparciu tylko o wybrane aspekty, które wydają się istotne z punktu widzenia projektowania powłok implantów kostnych.

### 1.1.2. Nieorganiczny komponent tkanki kostnej

Nieorganiczna frakcja tkanki kostnej człowieka zbudowana jest głównie z wapnia (Ca) i fosforu (P) [21], [24]. Biologiczny apatyt (BA) to podstawowy składnik chemiczny nieorganicznej frakcji tkanki kostnej. Powstaje u kręgowców w wyniku zjawiska biomineralizacji, czyli mineralizacji tkanek żywych w organizmach [24], [25]. Biomineralizacja może być niepożądana, wówczas powstają uboczne produkty procesów życiowych takie jak kamień nazębny, złogi wapienne. Kontrolowana biologicznie biomineralizacja natomiast jest zjawiskiem fizjologicznym, zachodzi naturalnie w tkance kostnej [25] jako jeden z procesów życiowych. Rusztowanie dla kryształów BA tworzą białka kolagenowe i niekolagenowe zorganizowane super struktury funkcyjne macierzy kostnej [22]. Macierz kostna jest też przestrzenią dla funkcjonowania komórek kostnych. Reguluje aktywność komórek poprzez biomolekuły przylegające do macierzy między innymi białka integryny, które są odpowiedzialne za proces interakcji pomiędzy komórkami kostnymi a macierzą kostną.

### 1.1.3. Struktura krystaliczna hydroksyapatytu

Ca i P są to pierwiastki niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych od poziomu komórki biologicznej, poprzez tkanki (tkanka kostna) do ogólnoustrojowego (układ kostno-szkieletowy). Występują naturalnie w skorupie ziemskiej, a jako kombinacja tlenków tworzą różne odmiany fosforanu wapnia (CaP). Wyróżnia się orto- ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), piro- ( $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ), oraz poli- ( $\text{PO}_3$ )<sub>n</sub><sup>n-</sup> fosforany [24]. Ortofosforany wapnia występują w odmianach o różnym stosunku molowym jonów Ca:P, który może zawierać się od 0.5 do 2 [24] i ma wpływ na rozpuszczalność związku. Szczególnie interesujące biologicznie, bo występujące w ludzkim organizmie, odmiany ortofosforanów wapnia to [26]:

- hydroksyapatyt ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ; HA),
- diwodorofosforan wapnia uwodniony ( $\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; DCPD),
- diwodorofosforan wapnia ( $\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2$ ; DCPA),
- monofosforan wapnia ( $\text{CaHPO}_4$ ; MCP),
- $\beta$ -triwodorofosforan wapnia ( $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ;  $\beta$ -TCP),
- fosforan oktawaopniowy ( $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; OCP).



Z punktu widzenia biologii i medycyny najbardziej interesujący jest HA, który charakteryzuje się najmniejszą rozpuszczalnością wśród wszystkich ortofosforanów, co czyni go ważnym materiałem implantologicznym [27], jest stabilny w temperaturze odpowiedniej dla procesów życiowych i niewrażliwy na zmiany pH [28]. Naturalnym komponentem mineralnym tkanki kostnej występującym u kręgowców jest BA, czyli niestechiometryczny HA, zawierający jony węgla w swojej strukturze lub w śladowych ilościach jony innych pierwiastków. Dwuwartościowy kation  $\text{Ca}^{2+}$  w strukturze HA może być zastąpiony dwu- lub jednowartościowymi kationami  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{N}^+$ ,  $\text{K}^+$  lub anionami  $\text{CO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$  [29]–[31]. Aniony fosforanowe mogą zastępować aniony C, As, V, S. Grupy hydroksylowe podstawić mogą aniony  $\text{O}_2\text{H}^-$ ,  $\text{CO}_3^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ . Zarówno w miejscach Ca lub grup OH mogą tworzyć się luki [32]. P może występować w postaci  $\text{PO}_4^{3-}$  lub  $\text{HPO}_4^{2-}$ . W strukturze krystalograficznej HA możliwe jest umiejscowienie jonów  $\text{CO}_2^-$  na dwa sposoby, jako podstawienie za grupy hydroksylowe, albo jako podstawienie za grupy fosforanowe. W przypadku podstawienia za grupy OH mówi się o podstawieniu typu-A, natomiast gdy wymieniana jest grupa  $\text{PO}_3^-$  mówi się o podstawieniu typu B [29]. HA typu-B występuje naturalnie w tkance kostnej, natomiast HA typu-A otrzymuje się syntetycznie, np. poprzez obróbkę wysokotemperaturową [27], [29]. Określenie stałej sieci może dać odpowiedź o umiejscowieniu jonów węgla, bo w podstawieniu typu-A aniony  $\text{CO}_2$  umiejscawiają się wzdłuż osi c, a w podstawieniu typu-B wzdłuż osi a [29]. Duża różnorodność modyfikacji sieci krystalograficznej wskazuje na dużą różnorodność odmian HA. Skład chemiczny BA jest gatunkowo zależny, ale też organo i tkankowo. Przykładowo stosunek Ca:P w szkliwie to 1.58 a w kościach 1.80 [33].

HA występuje w krystalograficznym układzie heksagonalnym ( $a, b = 9.432 \text{ \AA}$ ;  $c = 6.881 \text{ \AA}$ ;  $\gamma = 120^\circ$ ) i jednoskośnym ( $a = 9.421 \text{ \AA}$ ;  $b = 2a$ ;  $c = 6.881 \text{ \AA}$ ;  $\gamma = 120^\circ$ ). Obydwie fazy charakteryzują się tą samą stechiometrią Ca/P, która jest równa 1.67 [34]. Jony  $\text{PO}_4^{3-}$  tworzą w strukturze HA tetrahedryczną sieć krystalograficzną, które poprzez wiązania wodorowe łączą się z żywą frakcją tkanki kostnej: proteinami, węglowodanami czy tłuszczami [31].

## 1.2. Proces remodelacji tkanki kostnej

Tkanka kostna jest dynamicznie zmieniającą się strukturą funkcjonalną. Jako żywy organ ma zdolność do samo odbudowy, dopasowując się do zmieniających się

warunków otoczenia pod wpływem bodźców mechanicznych. Ta zdolność umożliwia zajście procesów naprawczych w uszkodzonych strukturach.

Krew i jej składniki jako pierwsze kontaktują się z powierzchnią implantu umieszczonego chirurgicznie w kości. Na powierzchni implantu zostają zaadsorbowane białka, komórki i ewentualne bakterie kontaktują z zaadsorbowanym białkiem. Z tymi białkami (zazwyczaj są to fibronektyny i integryny) oddziaływać będą komórki kostne inicjując powstawanie blizny kostnej.

Wszystkie procesy zachodzące w żywym organizmie, a zatem również te zachodzące w tkance kostnej, są regulowane i kontrolowane z poziomu genów. Genom to pełna informacja genetyczna, zapisana jest jako unikalna sekwencja nukleotydów w organizmie. Aktualne warunki wewnętrzne w komórce oraz bodźce zewnętrzne wpływają na ekspresję określonych genów tj. transkrypcję (przepisania informacji genetycznej z DNA na RNA) i translację (przeniesienia informacji genetycznej zawartej sekwencji nukleotydów na sekwencję aminokwasów w procesie biosyntezy białek) [19]. W wyniku zajścia tych procesów dochodzi do przekazania instrukcji do RNA i w efekcie zajścia procesu biologicznego [19].

W procesie naprawczym uszkodzonych struktur kostnych komórki macierzyste (progenitorowe) mezenchymatyczne różnicują do osteoblastów po aktywacji genów *cbfa1/runx2*. Na zasadzie sprzężenia zwrotnego komponenty budulcowe tkanki kostnej zapewniają ciągłość procesu remodelacji, którego głównymi składowymi jest resorpcja i odbudowa zmineralizowanego komponentu kości. Na proces przebudowy kości składa się pięć faz: aktywacja, resorpcja, inwersja, formowanie i terminacja [18]. Kluczowym inicjatorem procesu jest odpowiedź osteoklastów na mechaniczne czynniki zewnętrzne [35]. Proces resorpcji kości możliwy jest po związaniu osteoklastów do macierzy kostnej [22], aktywność osteoklastów reguluje działaniami osteoblastów [23], natomiast białka integryny znajdujące się na macierzy kostnej pełnią rolę mediatorów w procesie dojrzewania osteoblastów i ich transformacji do osteocytów [22], [35]. Również osteocyty, stymulowane mechanicznie, pobudzają aktywność osteoblastów i osteoklastów [10], [23], [35]. W fazie inicjacji uczestniczy receptor RANKL, który jest z kolei aktywowany przez cytokiny (II-1, II-6) [6]. Osteoblasty wytwarzają istotę międzykomórkową tkanki kostnej są też odpowiedzialne za proces jego mineralizacji.

Osteoblasty wytwarzają składniki mineralne kości oraz białka funkcjonalne: kolagen typu I, proteoglikany, osteokalcyna i osteonektyna (białka inicjujące i modelujące mineralizację kości), glikoproteina RANKL.

Otoczone zmineralizowaną istotą komórkową osteoblasty różnicują w osteocyty pod wpływem czynników transkrypcji z uaktywnienia genów *cbfa1/runx2* i *osterix*. Osteocyty są budulcem kości. Wywodzące się ze szpiku kostnego osteoklasty odpowiedzialne są za procesy resorpcji kości. RANKL ma zdolność wiązania się z glikoproteina RANK znajdującą się na powierzchni komórek prekursorowych osteoklastów, pobudzając ich różnicowanie. Sprzężenie zwrotne pomiędzy różnicowaniem się osteoblastów i osteoklastów zapewnia tkance kostnej możliwość regeneracji po uszkodzeniach oraz przebudowy [22]. Jest to kluczowy atrybut tkanki kostnej umożliwiający integrację z powierzchnią implantu kostnego. Implant jako ciało obce powoduje w organizmie natychmiastową aktywację szeregu procesów obronnych z wywołaniem stanu zapalnego i aktywacją komórek tkanki łącznej w pierwszej kolejności. Stworzenie zbliżonych, w maksymalnym stopniu, do naturalnych warunków na powierzchni implantu jest istotą w projektowaniu powierzchni implantów i dedykowanych powłok funkcjonalnych.

Proces kościotworzenia w rozwoju osobniczym może przebiegać według dwóch wzorców. Kostnienie śródbłoniaste, bez etapu chrzęstnego, jest to proces dotyczący pierwszych kości w ciele, kości płaskich twarzoczaszki, kości obojczyka. Komórki mezynchymalne zrębu kostnego różnicują bezpośrednio w osteoblasty [26]. Ten proces zaczyna się w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych, wydzielanych przez osteoblasty [27], [28]. Kostnienie śródchrzęstne jest obserwowane w procesie wzrostu kości długich i w procesach gojenia się uszkodzonych struktur kostnych, zachodzi na podłożu tkanki chrzęstnej. Komórki mezynchymalne zrębu kostnego różnicują w chondrocyty, które wydzielają macierz zewnątrzkomórkową i chrzęstną tkankę szklaną.

### **1.2.1. Implanty kostne**

Wyroby przeznaczone do funkcjonowania w kontakcie z żywą tkanką to biomateriały. Termin ten jest bardzo szeroki, zawierają się w nim zarówno materiały kontaktujące się zewnętrznie z żywym organizmem tj.: opatrunki, protezy, narzędzia chirurgiczne; oraz materiały wszczepiane pod powłoki ciała żywego organizmu tj.

rozzruszniki, stenty, implanty tkanek miękkich i twardych. Każdy biomateriał, niezależnie od przeznaczenia, musi spełniać dwa podstawowe warunki. Pierwszym jest biokompatybilność, czyli biozgodność. Jako materiał biozgodny definiowana jest substancja niewykazująca toksyczności, nie wpływająca na układ odpornościowy oraz nie prowadząca do hemolizy, tj.: rozpadu krwinek czerwonych. Drugim, oczywistym warunkiem jaki musi spełniać materiał biokompatybilny jest jego biofunkcjonalność, czyli pełnienie dedykowanej funkcji w organizmie przez zdefiniowany okres.

Układ kostny pełni funkcje podporowo-lokomocyjne u kręgowców. Uszkodzenie pojedynczego elementu wpływa zazwyczaj na dysfunkcję całego układu. Tkanka kostna posiada zdolności regeneracji pourazowej, są one jednak ograniczone przez zakres urazu i stopień zniszczenia struktury. Warunkiem powstania blizny kostnej jest zachowanie kontaktu pomiędzy uszkodzonymi elementami i unieruchomienie zewnętrzne (gips) lub wewnętrzne (płytki, śruby z implantów czasowych) struktury. Proces zrostu przebiega etapowo. W pierwszej kolejności powstaje blizna kostna, która przy sprzyjających warunkach w fazie remodelacji przeobraża się w pełni funkcjonalną tkanką kostną[9].

Masywne uszkodzenia lub duże ubytki kostne wymagają w procesie leczenia zastosowania rusztowania kostnego w postaci implantów stałych. Implant zastępując element kostny np.: staw biodrowy, staw kolanowy, korzeń zęba przejmuje jego funkcję mechaniczną. Ogromne obciążenia przenoszone na elementy układu kostnego wynikające z pełnionych funkcji motorycznych wyznaczają warunki jakie musi spełniać struktura kość- implant. Żeby struktura złożona z różnych materiałów tj. kość-implant mogła być w pełni funkcjonalnym zamiennikiem zdrowej kości kluczowe są dwa komponenty, mianowicie materiał implantu oraz jakość połączenia. Zjawiska zachodzące na granicy ciała stałego i środowiska biologicznego decydują, czy implant spełnia oczekiwane wymagania[36].

Podstawowym kryterium jest wytrzymałość na działające cyklicznie powtarzające się siły wynikające z pełnionej funkcji lokomotorycznej. Przykładowo obciążenia występujące w stawie biodrowym podczas poruszania odpowiadają 250-360% masy ciała [37], [38] co więcej potykanie się może generować średnie siły odpowiadające 870% masy ciała [39] moment skrętu na szyjkę kości udowej określono na poziomie odpowiadającym 4% masy ciała, moment obrotowy działający na trzon kości udowej

dochodził do 2,5% masy ciała. Implant kostny powinien spełniać swoje zadanie przez kilkanaście lat lub więcej cyklicznie powtarzających się obciążeń. Dlatego metale są podstawowymi materiałami do produkcji implantów kostnych. Odpowiednie zintegrowanie powierzchni implantu z tkanką kostną jest krytycznym punktem w strukturze implant-kość. Stąd olbrzymi wysiłek badawczo naukowy, który jest wkładany w projektowanie i rozwój powierzchni implantu w kierunku funkcjonalnej powierzchni aktywnie wspierającej procesy gojenia.

Wybrane przykłady występujących obciążeń w odniesieniu do szyjki kości udowej człowieka nie są przypadkowe. Szyjka kości udowej jest mianowicie najsłabszym punktem pod względem mechanicznym w układzie kostno-szkieletowym, jeśli rozważamy aspekty generowanych obciążeń. Jest to związane ze specyfiką jej budowy oraz kluczową funkcją lokomotoryczną, którą pełni staw biodrowy. Osłabiona struktura kostna szyjki kości udowej zmianami osteoporotycznymi staje się bardziej podatna na uszkodzenia i praktycznie uniemożliwia powrót do zdrowia pacjenta z osteoporozą po uszkodzeniu tego fragmentu kości bez interwencji chirurgicznej [40]. Leczenie polega zazwyczaj na wszczepieniu implantu stawu biodrowego, a właściwa jego integracja z kością udową jest sporym wyzwaniem również z punktu widzenia wytrzymałości mechanicznej, w tym związania powłoki implantu z między powierzchniami.

Warunkiem powstania blizny kostnej w uszkodzonej strukturze jest zachowanie wielotygodniowego stabilnego kontaktu pomiędzy uszkodzonymi elementami osiąganego zazwyczaj przez zewnętrzny opatrunek gipsowy albo stabilizację wewnętrzną (płytki, śruby z implantów czasowych) powstałych kikutów uszkodzonej struktury. Jeżeli uszkodzona struktura kostna traci swoje właściwości mechaniczne czy to na skutek masywnego urazu, czy osłabiona chorobami metabolicznymi konieczne staje się zastąpienie jej stałym implantem kostnym. Fizjologiczna biomineralizacja jest kluczowa w procesie osteointegracji implantu kostnego, czyli bezpośredniego połączenia tkanki kostnej z powierzchnią implantu. Została po raz pierwszy zaobserwowana i zdefiniowana przez P.I. Branemarka podczas eksperymentów *in vivo* [41]. Istotą osteointegracji jest stabilne, kostne połączenie powierzchni implantu z tkanką kostną, co niezwykle istotne bez współistnienia tkanki łącznej, czyli komórek fibroblastów.

Proces osteointegracji implantu z tkanką kostną jest podobny do przebiegu procesu gojenia tkanki kostnej tj. resorpcji, kościotworzenia i remineralizacji blizny kostnej. Proces zrostu kości przebiega etapowo, powstaje blizna kostna, która przy sprzyjających warunkach podlega procesowi re-modulacji w wyniku czego ubytek kostny zastępowany jest, w zdrowym ogólnoustrojowo organizmie, w pełni funkcjonalną tkanką kostną[9]. Taka wytworzona, prawidłowa blizna kostna jest synonimem sukcesu leczniczego w implantologii [31], [41], [42]. Implanty kostne są znane już od czasów Egipcjan, którzy próbowali zastępować ubytki kostne człowieka elementami z drzewa, kamienia lub kośćmi zwierząt[43]. Pionierską operację wstawienia implantu kości ramiennej przeprowadził w 1893 Jules Pean [44] wszczepiając protezę ze stali hartowanej z gumową kulką posmarowaną parafiną jako głowa kości ramiennej. Po dwóch latach implant z powodu infekcji został usunięty. Na szczęście rozwój medycyny postępuje dynamicznie wraz z rozwojem cywilizacji. Prawdziwą rewolucją w medycynie była pierwsza całkowita artroskopia stawu biodrowego człowieka przeprowadzona w 1943 roku przez M.S. Petersen 'a i P.Wiles 'a [45]–[47]. Ta operacja polegała na zastąpieniu uszkodzonej głowy kości biodrowej implantem metalowym mocowanym do trzonu kości biodrowej śrubami i płytkami chirurgicznymi. Pomimo że historia implantologii jest długa nadal istnieją nierozwiązane problemy śród- i okołoperacyjne w krótko i długoterminowej perspektywie czasu.

### **1.2.2. Problemy okołoperacyjne w implantologii**

Przerwanie ciągłości powłok ciała w trakcie operacji zawsze prowadzi do kontaktu żywych tkanek z drobnoustrojami chorobotwórczymi. Od rodzaju patogenów oraz możliwości obronnych organizmu uzależnione jest ryzyko wystąpienia poważnej infekcji, która w krytycznych przypadkach może skończyć się sepsą, czyli ogólnoustrojową infekcją bakteryjną prowadzącą do śmierci pacjenta.

Powierzchnie implantów metalowych ulegają korozji, po pierwsze elektrochemicznej, ponieważ przebywają w środowisku biologicznym, agresywnym dla metali oraz korozji mechanicznej, bo niestabilne połączenie z przylegającą kością skutkuje występowaniem tarcia. Tarcie pomiędzy dwiema powierzchniami, czyli w tym przypadku tkanką żywą i powierzchnią metalową implantu oraz elektrochemiczna korozja metalu to główne zjawiska generujące proces uwalniania jonów metali do

okolicznych komórek i tkanek żywych, powodując osteolizę (zanik tkanki kostnej) [48]. Produkty degradacji metali, rozprzestrzeniając się po organizmie najczęściej jako tlenki, zasady, fosforki metali kumulują się w tkance łącznej. Małe nanocząstki metali (zazwyczaj poniżej 50 nm) przez układ limfatyczny roznoszą się po organizmie docierając do wątroby, węzłów chłonnych, śledziony[49], [50], koncentrują w erytrocytach i wywołują cytotoksyczne lub genotoksyczne reakcje lokalne oraz ogólnoustrojowe [50].

Jak już wspomniano, każdy implant wszczepiony pod powłoki ciała jest odbierany przez organizm jako ciało obce. Odpowiedzią układu immunologicznego będzie stan zapalny, który mobilizuje układ odpornościowy do rozpoczęcia procesu gojenia. Jednak, gdy stan ten przebiega zbyt gwałtownie to dramatycznie obniża się zdolność regeneracji rany pooperacyjnej. W konsekwencji organizm jako barierę obronną tworzy bliznę łącznotkankową na powierzchni implantu, albo odrzuca implant. Blizna łącznotkankowa na powierzchni implantu stanowi główny przyczynnik do niestabilności układu kość-implant w przyszłości. Międzywarstwa z komórek fibroblastów z uwagi na odmienną strukturę i właściwości mechaniczne może utworzyć elastyczne połączenie pomiędzy tkanką kostną a tkanką łączną. Układ kilku warstw o różnych właściwościach mechanicznych będzie generował niestabilność. Prowadzić to będzie do poważnych komplikacji pooperacyjnych: zaniku tkanki kostnej wokół implantu i powstawaniu wolnej przestrzeni do gromadzenia się płynów poza komórkowych. Są to potencjalne źródła aseptycznych lub wtórnych, bakteryjnych stanów zapalnych. Dolegliwości bólowe, utrata mobilności i konieczność reoperacji to konsekwencje ponoszone przez pacjenta.

Kluczowe badania zaplanowane i przeprowadzone przez autorkę dysertacji, które zostaną przedstawione w dalszej części pracy zostały ukierunkowane na opracowanie biomimetycznej powłoki wspierającej integracją powierzchni implantu metalowego z tkanką kostną poprzez aktywne wsparcie naturalnych procesów biomineralizacji.

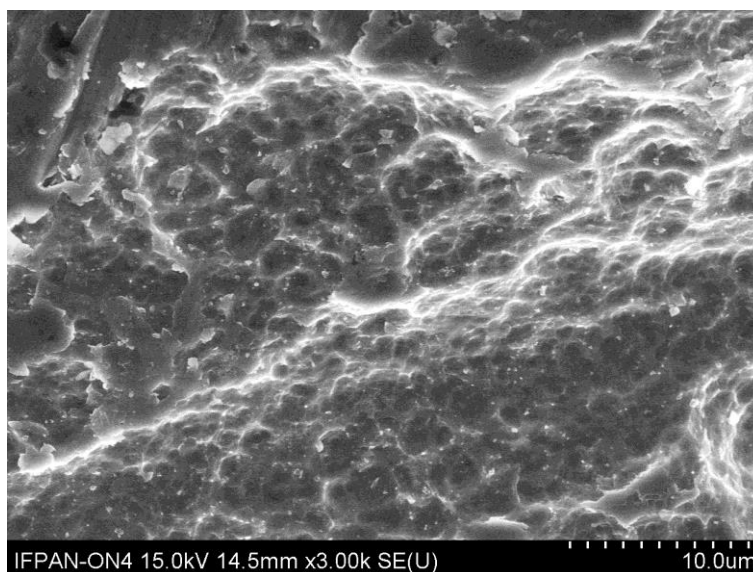
### **1.2.3. Funkcjonalizacja powierzchni implantów metodą ALD**

Stopy metali (tytan-5, stal szlachetna, stopy kobaltu i miedzi) to obecnie najlepsze materiały do produkcji implantów kości długich. Zaletą implantów metalowych jest ich wytrzymałość mechaniczna, wadą jest jednak podatność na korozję i niedostateczna bio-

kompatybilność z tkankami człowieka. Uwaga naukowców skupiona jest zatem na połączeniu kości z powierzchnią implantów. Rozwój medycyny regeneracyjnej prowadzi do poszukiwania rozwiązań technologicznych zapewniających, obok oczywistej biokompatybilności, również aktywne wspieranie procesów regeneracyjnych w żywych tkankach poprzez właściwości bakteriostatyczne, bakteriobójcze, przeciwzapalne, wspierające lub hamujące procesy proliferacji i różnicowania wybranej frakcji komórek macierzystych. Wydajną metodą mającą poprawić trwałość elementów metalowych w środowisku biologicznym i ich bio-zgodność jest nanoszenie nanometrycznych powłok na powierzchnię implantu [51]–[54].

Bezpieczeństwo użytkowania implantów znajdujących się w ciele pacjenta definiuje podstawową właściwość mechaniczną powłoki implantów, czyli jej nierozwalne połączenie z materiałem implantu. Wiadomo również, że osteointegracja powierzchni implantu jest znacznie wydajniejsza, jeżeli powierzchnia implantu jest chropowata [55]. Nierozwalność osadzanych warstw atomowych z podłożem [56] i konforemność, czyli odwzorowanie geometrii podłoża podczas osadzania warstwy [57], to dwa podstawowe atrybuty metody ALD, którą obserwowane jest obecnie wzmożone zainteresowanie do zastosowań w biologii i medycynie. W szczególności jako biokompatybilne powłoki implantów kostnych oraz barierowe powłoki wszczepianych urządzeń elektronicznych materiały ALD wydają się być przyszłościowe. Jak wcześniej wspomniano kształt i rozmiar porów jest istotną właściwością proregeneracyjną powierzchni implantów kostnych. Na Rys. 1 pokazano zdjęcie SEM powierzchni komercyjnie stosowanego implantu stomatologicznego z widoczną porowatością i chropowatością. Zaprezentowana modyfikacja powierzchni implantu jest intencjonalnym działaniem technologicznym w celu poprawy integracji implantu z tkanką kostną. Zachowanie geometrii powierzchni implantu podczas nakładania powłoki funkcjonalnej musi być zatem podstawowym warunkiem podczas wyboru odpowiedniej technologii. Wiadomo, że kształt i rozmiar porów [58] oraz szorstkość powierzchni [59] wpływa na naprężenia wywołane przepływami płynów komórkowych co odczuwane jest przez komórki kostne jako sygnał do różnicowania.

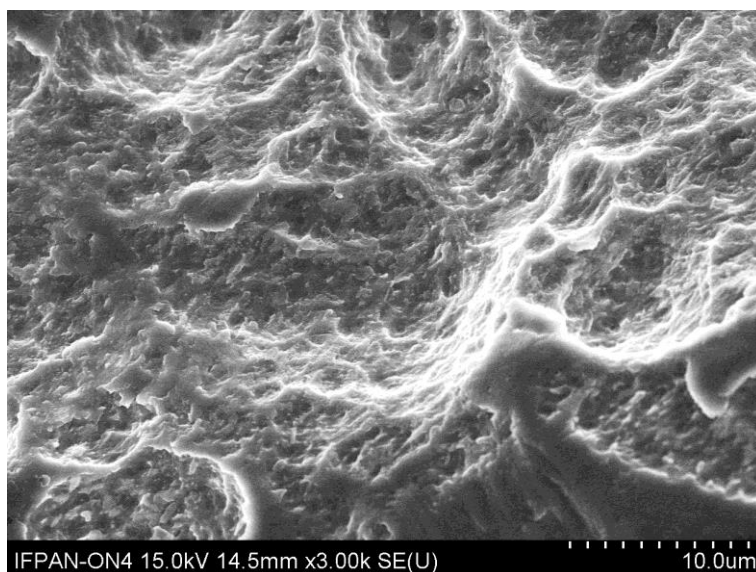




*Rys. 1: Zdjęcie SEM porowatej powierzchni tytanowego implantu stomatologicznego. Detektor elektronów wtórnych, 15 kV AV, powiększenie 3000 x.*

Technologia ALD, która z definicji umożliwia osadzania powłok na rozbudowanych powierzchniach odwzorowując jej geometrię, będzie zatem biernie wspierać różnicowanie się komórek nawet jeżeli powłoka będzie neutralna funkcjonalnie. W ramach prowadzonych testów funkcjonalnych metody ALD osadzona została w niskotemperaturowym procesie ALD powłoka z tlenku cyrkonu (IV) ( $ZrO_2$ ). Na Rys. 2 pokazano obraz SEM powierzchni implantu stomatologicznego po procesie osadzania warstwy  $ZrO_2$ , który pokazuje jak wiernie zachowana została rozbudowana geometria powierzchni. Ten aspekt jest doskonałą rekomendacją dla metody ALD do aplikacji w implantologii.

Tytan i jego stopy są co do zasady materiałami biokompatybilnymi. Elementy tytanowe spełniają też konieczne parametry wytrzymałościowe dla implantów kostnych, dlatego wykorzystywane są w powszechnie w medycynie. Coraz większa ostrożność w aplikacji materiałów tytanowych w implantologii powinna być jednak wdrażana. Doniesienia o wrażliwości pacjentów na tytan lub jony domieszki, wskazują, że nie jest to materiał dla wszystkich [50], [60]. Niepokojące są również doniesienia o toksyczności nanoproszków z  $TiO_2$  [48].



*Rys. 2: Zdjęcie SEM konforemnie pokrytej powierzchni implantu stomatologicznego powłoką ALD. Detektor elektronów wtórnych, 15 kV AV, powiększenie 3000 x.*

Na powierzchni tytanu, po ekspozycji na powietrze samoistnie tworzy się kilku nanometrowa warstwa tlenku tytanu (IV) ( $\text{TiO}_2$ ). Początkowo sądzono się, że tak powstała warstwa  $\text{TiO}_2$  stanowić może odpowiednią warstwę barierową w środowisku biologicznym [61]. Badania dowiodły jednak, że warstwa rodzimego tlenku jest nieciągła i nie stanowi skutecznej bariery ochronnej dla powierzchni implantu [62]. Poszukiwania pewnej i trwałej bariery pomiędzy środowiskiem biologicznym a powierzchnią implantu kostnego o biofunkcjonalnych właściwościach zostały naturalnie ukierunkowane na opracowanie sztucznego wytwarzania powłok z  $\text{TiO}_2$ . Stąd najwięcej publikacji o biowłaściwościach cienkich warstw tlenkowych dotyczy właśnie  $\text{TiO}_2$ . Wiadomo, że  $\text{TiO}_2$  jest materiałem antybakteryjnym [63], [64], biokompatybilnym [65]. Według niektórych doniesień jest również materiałem bioobojętnym [65], ale możliwe jest również takie zoptymalizowanie procesu wytwarzania, że materiał nabiera cech biofunkcjonalnych, aktywnie wspierając proces osteointegracji tkanki kostnej z powierzchnią implantu [5], [63]. Ostatnie doniesienia literaturowe ujawniły, że materiał ma potencjał aplikacyjny u pacjentów z osteoporozą [5].

Metoda ALD doskonale nadaje się do osadzania cienkich warstw  $\text{TiO}_2$ , których proces wytwarzania jest dobrze zoptymalizowany.  $\text{TiO}_2$  jako warstwa osadzana metodą ALD jest scharakteryzowana fizyko-chemicznie [66], [67]. Powszechnie stosowane w metodzie ALD prekursor tytanu to czterochlorek tytanu, tetrakis(dimetylolamino)tytan (TDMAT), izopropanol tytanu [68], [69]. Jako prekursor tlenu stosowana jest woda,

woda utleniona, plazma tlenowa albo ozon. Zasadniczą różnicą w otrzymywanych warstwach w zależności od rodzaju prekursorów jest struktura krystaliczna zależna od temperatury wzrostu [69]. Metoda ALD umożliwia osadzanie wysokiej jakości warstw  $\text{TiO}_2$  zarówno amorficznych jak i krystalicznych. Warstwy krystaliczne otrzymywane są w strukturze anatazu albo rutylu [68].

Znane są właściwości mechaniczne warstw  $\text{TiO}_2$  ALD na powierzchniach metali do wyrobu implantów. Jest kilka grup naukowych badających te właściwości. Basiaga i in. badali warstwy ALD osadzone na powierzchni stali szlachetnej (SL316). Oceniany był wpływ temperatury osadzania ALD na właściwości antykorozyjne powłoki  $\text{TiO}_2$  wzrastanej z  $\text{TiCl}_4$  i wody [70]. Najkorzystniejsze parametry barierowe wykazano dla powłoki osadzonej w  $100^\circ\text{C}$  i  $200^\circ\text{C}$ , natomiast siła adhezji najwyższa była dla temperatur wzrostu warstwy  $200^\circ\text{C}$  i  $300^\circ\text{C}$ . Kontynuując swoje badania autorzy oceniali wpływ przygotowania podłoża przed osadzaniem ALD tj.: polerowanie elektrochemiczne i mechaniczne oceniali też wpływ liczbę cykli ALD (500, 1250 i 2500) tj. grubość warstwy na adhezję do podłoża i twardość powłoki [71]. Okazało się, że najwyższe wartości adhezji i twardości posiada powłoka o najmniejszej grubości (500 cykli ALD). Natomiast sposób przygotowania podłoża, przed procesem ALD, nie miał wpływu na badane parametry wytrzymałości mechanicznej. Właściwości mechaniczne warstwy zależały od rodzaju podłoża. W eksperymencie opisanym w pracy [72] wykazano, że wytrzymałość warstw ALD osadzanych jak opisano w [70], ale na stopach tytanu Ti-6Al-4V i Ti-6Al-7Nb skaluje się wraz z rosnącą grubością powłoki. Podczas gdy siła adhezji do podłoża powłoki  $\text{TiO}_2$  osadzonej na stali szlachetnej skalowała się odwrotnie do liczby cykli.

Autorzy Peron i in. pracują nad oceną korozyjnej ochrony powierzchni metodą ALD [73]–[78]. W pracy [76] porównana została powłoka  $\text{TiO}_2$  osadzana metodą ALD i powłoka otrzymana rozpylaniem magnetronowym (SM). SM jest powszechnie stosowaną technologią w przemyśle i w implantologii. Warstwy osadzone były na powierzchniach gładkich i porowatych. Otrzymane powłoki były według wyników XPS niestechiometryczne (40% tlenu do 60% tytanu) zarówno te osadzone w procesie ALD, jak i otrzymane techniką SM. W obu przypadkach geometrii metoda ALD zapewniała lepszą ochronę antykorozyjną [76].

TiO<sub>2</sub> jest przedmiotem licznych badań naukowych, ale też inne tlenki metali przejściowych tj. ZrO<sub>2</sub>, HfO<sub>2</sub> są przedmiotem zainteresowań. Powłoki ALD o grubości 100 nm osadzone były w 160°C z organicznych prekursorów metali przejściowych tj. TDMAT [74], TDMAZ [73]–[75] i TDMAH [78] oraz wody jako prekursora tlenowego. Tak przygotowane warstwy testowano jako materiał barierowy. Okazało się, że warstwa ZrO<sub>2</sub> efektywniej niż warstwa TiO<sub>2</sub> zwiększała wytrzymałość mechaniczną kompozytu, zmniejszając podatność na naprężenia [77]. Najlepsze parametry barierowe wśród analizowanych tlenków metali przejściowych (Ti, Zr, Hf) zaobserwowano dla HfO<sub>2</sub> [78].

Doniesienia o metodzie ALD jako narzędzia wspierającego fizjologiczne procesy integracji tkanki kostnej z implantem są mniej liczne, jednak niezwykle obiecujące. W tym kierunku również zdecydowanie najwięcej uwagi poświęcane jest warstwie TiO<sub>2</sub>[79], [80]. Wpływ krystalizacji TiO<sub>2</sub> na osteointegracyjne właściwości powłoki ALD opisany został przez Liu i innych w pracy [63]. Autorzy pokazali, że powłoka wzrastana w 160°C cechuje się najkorzystniejszymi bio-właściami, hamuje adhezję i zabija bakterie, które zazwyczaj odpowiedzialne są za infekcję po wszczepieniu implantu tj.: *S. aureus*, *E.coli*. [53], [81] oraz MRSA, czyli patogen odporny na dostępne antybiotyki [81]. Pokazali też, że powłoka TiO<sub>2</sub> promuje adhezję i proliferację osteoblastów jednocześnie zmniejszając adhezję i proliferację fibroblastów. Fibroblasty, czyli komórki tkanki łącznej, bliznowatej zazwyczaj chętnie osadzają się w miejscu urazu w procesie gojenia [82]. W przypadku implantów i urazów kostnych są jednak niepożądane, ponieważ powodują niestabilność połączenia z kością i komplikacje pooperacyjne w późniejszym okresie użytkowania implantu. Osteoindukcyjne właściwości TiO<sub>2</sub> wzrastanego z TiCl<sub>4</sub> i plazmy tlenowej potwierdzono w pracy [83] i jednocześnie pokazano, że wykorzystanie alternatywnego źródła tlenu pozwoliło na obniżenie temperatury procesu. Jest to istotne w odniesieniu do wrażliwych termicznie materiałów.

W pracy [84] pokazano, że krystaliczny, w formie anatazu, TiO<sub>2</sub> wykonany metodą ALD ma pro-apatyto twórcze właściwości. Krystaliczną strukturę materiału otrzymano w temperaturze 300°C aplikując etioxid tytanu jako prekursor metalu. Kluczowa do uzyskania właściwości biologicznych była liczba cykli odpowiadająca grubości 80 nm, która zapewniła krystaliczność. Nie zaobserwowano natomiast efektu pro-apatyto twórczego dla warstwy amorficznej.

#### 1.2.4. Osteo-regeneracyjny potencjał tlenków metali przejściowych

Pierwszym etapem badawczo naukowej działalności autorki dysertacji była charakteryzacja i naukowa ocena biologicznego potencjału tlenków metali przejściowych. Materiały otrzymywano metodą ALD. W ramach współpracy naukowej z prof. dr hab. Krzysztofem Maryczem z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu prowadzona była analiza biologicznych właściwości tych warstw. W wyniku tej współpracy powstały trzy wspólne publikacje naukowe,<sup>4</sup> krótka charakteryzacja głównych wniosków płynących z opublikowanych badań przedstawiona została poniżej.

Krew i jej składniki jako pierwsze kontaktują się z uszkodzoną strukturą kostną, zarówno w wyniku urazu mechanicznego jak i chirurgicznej interwencji np.: wszczepienie implantu kostnego. W miejscu urazu zostają zaadsorbowane proteiny, komórki macierzyste. W organizmie uruchamiany jest proces naprawczy. Ekspresja genów, procesy transkrypcji i translacji są, oprócz cech osobniczych, sterowane czynnikami zewnętrznymi. Ponieważ jak wszystkie procesy w organizmie człowieka, tak również proces regeneracji tkanki kostnej sterowany jest z poziomu molekularnego, proces oceny właściwości osteo regeneracyjnych powłok tlenków metali przejściowych otrzymywanych metodą ALD uwzględniał ocenę poziomu ekspresji głównych genów zaangażowanych w rozwoju komórek macierzystych w początkowych etapach procesów naprawczych w tkance kostnej. Ze względu na genetyczne podobieństwo genomu ludzkiego i mysiego, mysz jest modelowym ssakiem wykorzystywanym w genetyce[19]. Biologiczną charakteryzację powłok ALD przeprowadzono na modelu mysich komórek macierzystych: pre-osteoblastów (MC3T3) i pre-osteoklastów (4B12). Powłoki do badań biologicznych właściwości osadzone były na podłożach szklanych [4], [5]. Badania dotyczyły właściwości warstwy ALD, istotne było zatem, żeby podłoże nie wpływało na interakcję z materiałem biologicznym. Podłoża szklane zostały konformalnie [57] pokryte warstwą ALD. Szorstkość powierzchni szklanej przed procesem ALD była zanedbywalna, co pozwoliło uznać podłoża jako neutralne [4]. Jest to szczególnie istotne, gdyż szorstkość i porowatość powierzchni to parametry mające charakter pro-

---

<sup>4</sup> Prace stanowią załączniki do rozprawy.

osteogeny. Wszystkie badane warstwy miały grubość 100 nm. W pierwszej kolejności przebadane zostały warstwy tlenku cynku zarówno te wzrastane metodą ALD-woda<sup>5</sup> jak i ALD-ozon<sup>6</sup>. Cynk jest pierwiastkiem niezbędnym do życia. Odpowiednie stężenie tego pierwiastka jest odpowiedzialne za regulację procesów fizjologicznych. Okazało się, że w przypadku warstw tlenku cynku zjawisko apoptozy komórek jest znaczne. Przeżywalność komórek preosteoblastów z mysiej linii MC3T3 była znikoma już po okresie 24 h, prawdopodobnie w wyniku zbyt dużego lokalnego stężenia jonów  $Zn^{2+}$ . Wiadomo, że nadmiar jonów  $Zn^{2+}$  może być toksyczny [85] i powodować uszkodzenia błony komórkowej i w następstwie śmierć komórki. Kontynuowano zatem badania z  $TiO_2$ ,  $ZrO_2$  i  $HfO_2$ .

Powyżej wymienione tlenki metali przejściowych to materiały otrzymywane metodą ALD [68], w niektórych przypadkach również w badane w kierunku biologicznych zastosowań. Warstwy tlenków metali przejściowych wytwarzane metodą ALD cechują dobrze zdefiniowane właściwości elektryczne [86] co więcej pokazano, że mogą ograniczać inwazję patogennych bakterii [87], również tych odpornych na dostępne antybiotyki (MRSA). Są też potencjalnymi kandydatami do wykorzystania w medycynie regeneracyjnej. Przykładowo  $TiO_2$ -ALD jest badany dla implantologii jako warstwa barierowa [74], [71] antybakteryjna [63], również pro-osteogenna [63], [88], [89]. Większość doniesień o pro-osteogennych właściwościach  $TiO_2$  dotyczy jednak warstw krystalicznych [63], [89], [90]. Obecne trendy w medycynie regeneracyjnej wskazują, że z uwagi na destrukcyjny wpływ jonów metali na okoliczne tkanki, konieczne jest poszukiwanie innych niż stopy metali materiałów do produkcji implantów. Często są testowane materiały polimerowe [83], [91], których jednak niska wytrzymałość temperaturowa limituje możliwość wykonywani powłok tylko do procesów niskotemperaturowych. Wiadomo, że niskotemperaturowe procesy ALD wzrostu tlenków metali przejściowych umożliwiają osadzanie wysokiej jakości materiałów tlenkowych. Na Rys. 3. przedstawiono reprezentatywne zdjęcie przekroju poprzecznego

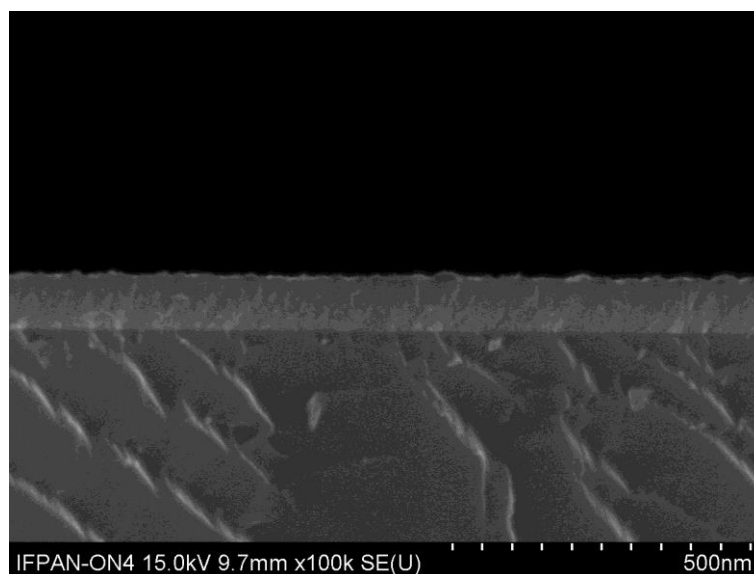
---

<sup>5</sup> ALD-woda określenie odnosi się do osadzania warstw metodą ALD z zastrzeżeniem, że prekursorem tlenu jest woda, metoda ALD oraz znaczenie prekursorów tlenowych zostało szerzej opisane w rozdziale

<sup>6</sup> ALD-ozon określenie odnosi się do osadzania warstw metodą ALD z zastrzeżeniem, że prekursorem tlenu jest ozon, j.w.

jednorodnego pokrycie powierzchni warstwową  $ZrO_2$  osadzanego metodą ALD w  $100^\circ C$ . Powłoka  $ZrO_2$  jest znanym i badanym materiałem barierowym [74], [78], [92], antybakteryjnym [93] i proosteogennym [93]–[95].  $HfO_2$  natomiast nie budził w czasie prac przeprowadzonych w ramach przedstawianej dysertacji zainteresowania naukowców z dziedziny nauk przyrodniczych jako materiał funkcjonalny.

Zaplanowano zatem testy trzech wymienionych tlenków, co miało umożliwić dokonanie przekrojowej oceny potencjału regeneracyjnego niskotemperaturowych warstw ALD.

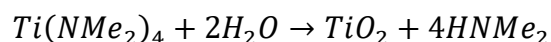


**Rys. 3:** Zdjęcie SEM amorficznej powłoki  $ZrO_2$  otrzymanej w niskotemperaturowym procesie ALD. Przekrój poprzeczny na podłożu krzemowym. Detektor elektronów wtórnych, 15 kV AV, powiększenie 100000 x.

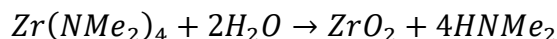
Temperatura procesu ALD jest jednym z kluczowych parametrów definiujących właściwości warstw ALD. Okazało się, że w  $100^\circ C$  możliwe jest otrzymanie stechiometrycznej powłoki  $TiO_2$  o strukturze amorficznej [5].

Kolejnym materiałem przygotowanym do badań było  $ZrO_2$ . Warunki procesu technologicznego ALD były porównywalne ze stosowanymi wcześniej do osadzania  $TiO_2$ . Obydwie powłoki wzrastane były z organicznymi prekursorami metali, związkami amidowymi: TDMAT i tetrakis(dimetylolamino)cyrkon (TDMAZ). Kompleksy amidowe zazwyczaj są reaktywne z wodą, dlatego jako prekursor tlenu wybrano w obydwu przypadkach parę wodną. Wzrost warstw tlenkowych przebiegał w wyniku

reakcji podwójnej wymiany. Proces wzrostu  $TiO_2$  można opisać poniższą reakcją chemiczną:



Proces wzrostu  $ZrO_2$  przebiega natomiast zgodnie z zapisem:



Wybrane do osadzania powłok metodą ALD związki aminowe są w temperaturze pokojowej w postaci stałej, a ich niska prężność pary powoduje, że podczas procesu ALD konieczne jest grzanie tych związków. Odpowiednią do jednorodnego wzrostu prężność pary 130 Pa uzyskuje się w temperaturze  $77^\circ C$  w przypadku prekursora cyrkonu [96], oraz w temperaturze  $60^\circ C$  w przypadku prekursora tytanu.

Powłoka  $TiO_2$  nie była toksyczna dla komórek pre-osteoblastycznych MC3T3, ale co ciekawe wpływała spowalniająco na rozwój prekursorów osteoklastów z linii 4B12, czyli komórek kościogubnych. Zwiększenie poziomu ekspresji genów *Opn*, *miR-17*, *miR-21* i spowolnienie *miR-124* świadczy o indukowaniu różnicowania się komórek MC3T3-E1 w osteoblasty. Zaobserwowano również efekt parakrynowy, to znaczy w kulturze komórek prekursorowych, osteoblastów i osteoklastów, czyli w formie zbliżonej do naturalnej, transkrypcja genów *Opn*, *Ocl*, i *Runx2*, czyli genów osteoklastogenezy, wzrastała, a wymienionych wyżej genów osteoblastogenezy spadała redukując inwazję osteoblastów [5]. Ten wartościowy wynik pozwolił na zaliczenie powłoki  $TiO_2$  wykonanej metodą ALD-woda jako potencjalny materiał osteoregeneracyjny co więcej dedykowany pacjentom z zaburzoną homeostazą tkanki kostnej w wyniku OS [5].

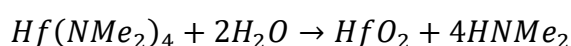
Zaskakująco  $ZrO_2$  wykazał pewną cytotoksyczność w odniesieniu do prekursorów komórek osteoblastycznych z linii mysiej MC3T3 poprzez zwiększenie ekspresji mRNA genów typowych dla apoptozy takich jak *Bcl-2*, *Bax*, *p53* i *p21*. Jednak zwiększona jednocześnie żywotność pozostałych przy życiu komórek, co manifestowało się zwiększonym potencjałem błony mitochondrialnej, pozwoliła na ogólną pozytywną ocenę powłoki  $ZrO_2$ . Profil typowych genów dla osteogenezy był analizowany. A testy z wyciszonym genem *mir-21*, który odpowiedzialny jest za różnicowanie komórek osteoblastów, pokazały, że powłoka  $ZrO_2$  aktywuje proces różnicowania się komórek



prekursorowych w osteoblasty. Ekspresja *mir-21* jest patologicznie wyciszona u pacjentów z OS, stąd wynik uzyskany w badaniach [4] jest wskazaniem do zaliczenia również amorficznego ZrO<sub>2</sub> wykonanego metodą ALD-woda jako materiału ze wskazaniem dla pacjentów z OS.

Kontynuując badania tlenków metali przejściowych postanowiono ocenić właściwości biologiczne HfO<sub>2</sub>. Niezwykle obiecujące wyniki wspólnych badań fizykochemicznych i biologicznych powłok HfO<sub>2</sub> uzyskane przy współpracy z prof. dr. hab. Krzysztofem Maryczem i kierowaną przez niego grupą naukowców zostały opublikowane [6]. Jak wspomniano powyżej do czasu naszej publikacji nie było doniesień literaturowych wskazujących na funkcjonalny charakter materiału HfO<sub>2</sub> wykonanego metodą ALD w implantologii. Do biologicznych właściwości HfO<sub>2</sub> odnieśli się jedynie autorzy w pracy [97], a o hafnie jako metalu o osteogennym potencjale donosił S. Mohammadi i in. w pracy [98], natomiast korozyjną wytrzymałość metalu, w środowisku biologicznym opisano w pracy [99]. W porównaniu jednak do mnogości doniesień o tlenkach tytanu i cyrkonu jako potencjalne materiały osteoregeneracyjne wiedza na temat biologicznych właściwości HfO<sub>2</sub>, w szczególności w kontekście chirurgii ortopedycznej, była znikoma.

Gładka, amorficzna warstwa HfO<sub>2</sub> o grubości 100 nm została przygotowana, w procesie niskotemperaturowego wzrostu, metodą ALD-woda. W tym przypadku temperatura procesu ALD obniżona została do 90°C. Już przy takiej temperaturze możliwe było otrzymanie jednorodnego pokrycia powierzchni. Prekursorem metalu, wykorzystanym do procesu, był podobnie jak w przypadku poprzednich materiałów prekursor organiczny: tetrakis(dimetylolamino)hafn (TDMAH). Ponieważ jest to również prekursor w formie stałej, o niskiej prężności pary konieczne było grzanie prekursora przed i w trakcie procesu osadzania warstwy [96], do uzyskania optymalnej prężności pary, prekursor grzany był do temperatury 60°C. Wzrost warstwy HfO<sub>2</sub> w procesie sekwencyjnego podawania prekursorów do komory reakcyjnej można opisać reakcją podwójnej wymiany:

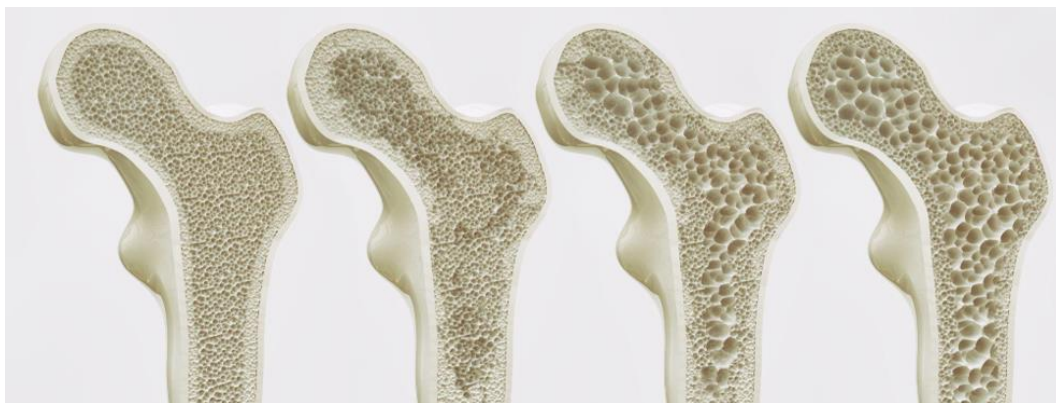


Sprawdzany był poziom ekspresji genów typowych dla osteogenezy prekursorów osteoblastów (MC3T3-E1) i osteoklastów (4B12), oraz makrofagów, które są niezwykle

ważne w reakcji odpornościowej organizmu, czyli odpowiedzialne za występowanie stanu zapalnego. Niestechiometryczny, amorficzny  $\text{HfO}_2$  w postaci 100 nm warstwy ALD reguluje aktywność komórek kostnych i ma właściwości immunomodulujące.

### 1.2.5. Wpływ chorób ogólnoustrojowych na układ kostny

Rozwój cywilizacji wiąże się niestety z rozwojem ogólnoustrojowych chorób cywilizacyjnych zaburzających całościową homeostazę organizmu człowieka. Tkanka kostna jest porowatą strukturą nieorganiczną. Zmniejszenie gęstości tej struktury jest klasycznym objawem osteoporozy (OS).



*Rys. 4: Rysunek przedstawiający stopniowe zmniejszanie się gęstości kości w wyniku zaniku istoty gąbczastej w tkance<sup>7</sup>.*

Istotą OS jest to, że w wyniku zmian hormonalnych, wywołanych wiekiem, innymi chorobami lub polekowo, zaburzona zostaje równowaga pomiędzy komórkami kostnymi tj.: osteoblastami i osteoklastami. W konsekwencji prowadzi to do spadku gęstości tkanki kostnej co schematycznie przedstawia Rys. 4. i jest jednoznaczne z drastycznym zmniejszeniem wytrzymałości mechanicznej struktur kostnych [9]. Jednocześnie proces regeneracji tkanki kostnej, który w zdrowym organizmie zależy głównie od równowagi pomiędzy aktywnością osteoblastów i osteoklastów [8], pozostaje upośledzony [100]. W zdrowym, młodym organizmie równowaga pomiędzy procesami katabolicznymi i anabolicznymi jest zachowana. Po zakończeniu procesu wzrostu człowieka już w wieku około 20-24 lata rozpoczyna się proces starzenia. Procesy anaboliczne zaczynają pomału przewyższać procesy kataboliczne. Gęstość kości z

---

<sup>7</sup> Źródło [www.shutterstock.com](http://www.shutterstock.com), licencja autorki w ramach okresu próbnego

wiekem każdego człowieka zmniejsza się. Również na w okresie postmenopauzalnym na skutek zmian hormonalnych, a w szczególności spadku poziomu estrogenów, prawdopodobieństwo rozwoju OS wzrasta. Tkanka kostna jest narządem wewnątrzwydzielniczym. Proces aktywnego uzupełniania substancji mineralnych jest indukowany bodźcami mechanicznymi, stąd prowadzący siedzący tryb życia są osobami wysokiego ryzyka wystąpienia OS. Również sposób odżywiania wpływa na dostępność potrzebnych dla odbudowy kości pierwiastków w organizmie.

OS jest jedną z głównych chorób cywilizacyjnych, z którymi ma do czynienia społeczeństwo XXI wieku. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) szacuje, że w 2050 można spodziewać się 6 milionów złamań osteoporotycznych rocznie, co jest wzrostem o 50% w stosunku do 2005 [101]. Podatność na złamania i nieoptymalny proces gojenia powodują, że większość kostnych urazów osteoporotycznych musi być leczona operacyjnie, co więcej pojawia się konieczność zastępowania uszkodzonych struktur kostnych implantami stałymi.

### 1.3. Motywacja

Zainteresowania naukowe autorki dysertacji to głównie poznawanie i opis zjawisk fizykochemicznych na granicy fizyki ciała stałego i biologii człowieka, a możliwość modyfikowania strefy fizycznej poprzez nanotechnologię w celu otrzymania ukierunkowanej odpowiedzi ustrojowej żywego organizmu doskonale wpisują się w podjęty przez autorkę problem badawczy. Adaptacja technik pomiarowych typowych dla fizyki ciała stałego do obserwacji procesów z pogranicza fizyki jest podstawowym narzędziem naukowym służącym do realizacji zadań badawczych.

Wyniki przesiewowych badań właściwości osteoregeneracyjnych charakterystyk tlenków tytanu, cyrkonu i hafnu były w ogólności pozytywne. Zwrócona została uwaga na dwie kwestie. Bardzo mocno uwidoczniła się cecha hamowania aktywności rozwoju osteoklastów zarówno poprzez  $TiO_2$  jak i  $HfO_2$ . Różnicowanie komórek osteoblastycznych w warunkach wyciszonej ekspresji genów *mir-21* było wspierane przez powłokę  $ZrO_2$ . Są to szczególnie istotne atrybuty dla pacjentów dotkniętych osteoporozą, podstawowe w opracowywaniu spersonalizowanych powierzchni implantów kostnych, w szczególności stawu biodrowego. Na Rys. 5 przedstawiono

typowy implant stawu biodrowego, strzałkami zaznaczono strefy przewidziane do osteointegracji, miejsca istotne z punktu widzenia właściwej integracji z tkanką kostną.



*Rys. 5: Zdjęcie poglądowe implantu stawu biodrowego ze stali szlachetnej. Strzałki wskazują na powierzchnie przewidziane do osteointegracji<sup>8</sup>.*

Opracowanie biomimetycznej powłoki wspierającej osteointegrację tkanki kostnej z powierzchnią obcą nie jest zadaniem trywialnym, bo naśladowanie wzorca idealnego, którym jest natura zakłada już na wstępie wysoki poziom badań i obserwacji naukowych. Interdyscyplinarność z kolei wyznacza konieczność opanowania wiedzy z różnych dziedzin naukowych na zaawansowanym poziomie. To wyzwanie było główną składową motywacji zakładającej cel naukowy podjętych badań.

Problemy zdrowotne społeczeństwa XXI wieku w postaci chorób cywilizacyjnych wyznaczają obecne trendy w rozwoju nauk biomedycznych. Konieczna jest ścisła współpraca naukowców z wielu dziedzin do opracowywania ulepszonych procedur leczniczych, opracowywania nowych wyrobów medycznych. Spersonalizowana medycyna jest medycyną przyszłości. Dlatego podjęte zostały prace nad opracowaniem nowych rozwiązań i procedur leczniczych, których podstawą będą zaawansowane, inspirowane naturą materiały lecznicze.

---

<sup>8</sup> Źródło [www.shutterstock.com](http://www.shutterstock.com), licencja autorki w ramach okresu próbnego

## **Rozdział 2**

### *Material i metody*

Nanotechnologia jest podstawą technologii XXI w. Specyfika materiałów nanometrycznych otwiera nowe możliwości rozwoju, również w biologii i medycynie. Znana jest rola terapeutyczna [102], diagnostyczna [103] i teranostyczna nanoproszków [104]. Cienkie warstwy atomowe są natomiast projektowane i badane, jako powłoki ochronne lub funkcjonalne wszczepianych pod powłoki ciała pacjenta elementów, mających wspierać funkcjonowanie lub zastępować tkanki lub narządy organizmów żywych. Tak powstający układ, łączący środowisko biologiczne z ciałem stałym, wymaga poznania i opisu w celu zrozumienia jego funkcjonowania. Dokładna znajomość zjawisk i procesów zachodzących na tej płaszczyźnie jest kluczem do rozwoju i jednocześnie gwarancją bezpieczeństwa dla użytkownika. Metody fizyczne są narzędziem służącym do pośredniej obserwacji procesów pomiędzy materiałem a środowiskiem biologicznym. Obok znajomości procesów biologicznych kluczowa jest znajomość cech fizyko-chemicznych materiału, dlatego rozdział drugi rozpoczyna charakteryzacja warstwy  $\text{HfO}_2$  otrzymywanej metodą ALD. Następnie opisane zostały metody: technologiczne i pomiarowe, wykorzystane przez autorkę do przeprowadzenia badań zawartych w niniejszej pracy, wraz z krótką charakteryzacją ich podstaw fizycznych.

## 2.1. HfO<sub>2</sub> otrzymywany metodą ALD

W metodzie ALD kluczowymi czynnikami determinującymi właściwości materiału są dobór prekursorów, zarówno metalu jak i tlenu, oraz temperatura komory, w której odbywa się osadzanie warstwy [105]–[107]. Precyzyjna kontrola parametrów i powtarzalność procesów wzrostu warstw metodą ALD są podstawowymi zaletami tej technologii składającymi się na wysoką jakość otrzymywanych materiałów. Ta, ponad przeciętną jakość pozwala na wykorzystanie materiałów ALD w obszarach nauki i przemysłu o wysokich wymogach materiałowych. HfO<sub>2</sub> z uwagi na wysoką stałą dielektryczną (25) oraz przerwę energetyczną wynoszącą 5.8 eV [2] jest znanym i cenionym materiałem w elektronice i optoelektronice [108]–[110]. Można sformułować stwierdzenie, że jest to materiał „odpowiedzialny” za rewolucję technologiczną XXI wieku, ponieważ jako zamiennik SiO<sub>2</sub> w strukturach tranzystorowych pozwolił na gwałtowny postęp w zakresie miniaturyzacji tranzystorów polowych w elektronice

Pierwsze doniesienia o osadzeniu warstwy HfO<sub>2</sub> metodą ALD pochodzą z 1996 roku i są to prace Kukli [111] i Kattelusa [112]. Autor pracy [111] osadził warstwę HfO<sub>2</sub> w 300°C z prekursorem metalu czterochlorkiem hafnu (HfCl<sub>4</sub>) jako międzywarstwę w matrycy z tlenku tantalum (III). Otrzymana została polikrystaliczna warstwa, w której wielkość krystalitów zależała od jej grubości [111], [113].

W metodzie ALD stosowane są zarówno prekursory organiczne jak i nieorganiczne [68], [114]. W grupie nieorganicznych prekursorów hafnu znajdują się związki z chlorem [112], [113] i jodem [115]–[117]. Pomimo, że nieorganiczne prekursory pozwalają na osadzanie wysokiej jakości warstw bez nieintencjonalnych zanieczyszczeń chemicznych, jak pokazano na przykład w pracy [113] osadzając HfO<sub>2</sub> w temperaturze 500°C, to nie są optymalnym rozwiązaniem w metodzie ALD. Związki nieorganiczne hafnu odpowiednie do aplikacji w metodzie ALD cechują się niską lotnością. To powoduje, że konieczne jest grzanie prekursora, w przypadku HfCl<sub>4</sub> do 140°C, żeby uzyskać odpowiednią prężność pary. To z kolei ogranicza wykorzystanie tego prekursora tylko w wybranych reaktorach. Pomiędzy komorą reaktora a zbiornikiem prekursora znajduje się kolektor, który w większości układów laboratoryjnych jest grzany tylko do 115°C. Ważne jest, żeby temperatura grzania nie przekroczyła temperatury kolektora. Podczas przechodzenia prekursora ze zbiornika do komory reaktora przez

chłodniejszy obszar kolektora nastąpiłoby niekontrolowane osadzanie molekuł prekursora w chłodniejszym obszarze, jeszcze przed komorą wzrostu. W miarę upływu czasu coraz grubsza warstwa mogłoby doprowadzić do zamknięcia światła przewodu linii gazowej układu ALD co w konsekwencji doprowadziłoby do uszkodzenia układu. Kolejnym, negatywnym aspektem stosowania prekursorów z grupy chlorków, jest produkt uboczny reakcji połówkowych w postaci kwasu solnego, który ma dewastujący wpływ na układ technologiczny. Dlatego pomimo wielu zalet prekursorów nieorganicznych poszukiwane są alternatywne źródła hafnu w postaci związków chemicznych w formie reagentów spełniających wymogi metody ALD. Proponowanymi zamiennikami prekursorów nieorganicznych [68] są prekursorzy z grupy amid, czyli zawierające grupy  $-NH_2$ . Do najczęściej stosowanych organicznych prekursorów hafnu w metodzie ALD wymienić należy [68]:

- tetrakis(etylometyloamino)hafn (TEMAH)
- tetrakis(dietyloamino)hafn (TDEAH)
- tetrakis(dimetyloamino)hafn (TDMAH)

Powyżej wymienione związki występują w formie stałej i mają niewystarczającą prężność pary do jednorodnego pokrycia osadzonej powierzchni w warunkach procesu ALD, dlatego wymagają podgrzewania przed podaniem do komory wzrostu. Do osiągnięcia pożądanej lotności wystarczają temperatury już poniżej  $90^\circ C$ . Niestety te związki charakteryzują się też niską odpornością termiczną po stronie wysokich temperatur co ogranicza z kolei możliwości wzrostu warstw w wyższych temperaturach. Ponieważ stopień krystalizacji zależy od warunków termodynamicznych procesu wzrostu  $HfO_2$ , wybór prekursorów organicznych może mieć decydujący wpływ na strukturę materiału. Kluczowy jest dobór właściwego zakresu temperaturowego, który będzie gwarantował wysoki poziom jakości warstw. TEMAH w temperaturze  $160^\circ C - 370^\circ C$  jest stabilnym i wydajnym prekursorem hafnu, ale powyżej tej temperatury następuje gwałtowna dekompozycja i wzrost tempa wzrostu równoległe ze spadkiem jakości warstw [118]. Stopniowy rozpad termiczny zaczyna się już od  $275^\circ C$  [119]. TDEAH musi być podgrzewany do  $80^\circ C$ , z uwagi na niską prężność pary i jest stabilny do  $120^\circ C$ , następnie ulega stopniowemu rozpadowi termicznemu [120], a po osiągnięciu temperatury  $275^\circ C$  następuje jego gwałtowna dekompozycja [121]. TDMAH również wymaga grzania, ale nieznacznie niższa temperatura tj.  $75^\circ C$  gwarantuje już osiągnięcie

wymaganej, w układzie ALD do jednorodnego wzrostu warstwy, lotności związku. Indukowana termicznie częściowa dekompozycja rozpoczyna się od 150°C [120]. Termiczne warunki brzegowe opisujące stabilność prekursorów determinują parametry procesy ALD, a zatem jakość i właściwości warstwy. Przy odpowiednio prowadzonych procesach możliwe jest osadzanie warstw w fazie początkowej dekompozycji prekursora.

Wpływ na właściwości warstwy mają również prekursorzy tlenu. Powszechnie wykorzystywana, bo dostępna i łatwa w aplikacji w metodzie ALD, jest woda dejonizowana. Reaktywność wody może nie zawsze być jednak wystarczająca do zajścia reakcji, jeżeli energia aktywacji w parze z dobranym prekursorem metalu będzie zbyt niska. Woda ma też tendencję do fizysorpcji, dlatego długie czasy płukania są rekomendowane [122], co też nie zawsze odwzorowane jest w jakości warstwy. Dodatkowo długość czasów płukania mogą wpływać znacząco na krystalografię związku. Dynamika reakcji połówkowych będzie więc wpływała też na inne niż strukturalne parametry powłoki.

Woda utleniona i ozon są alternatywnymi źródłami tlenu w procesach ALD, zwłaszcza ozon, który charakteryzuje się wysoką reaktywnością [118] jest godny uwagi. Autorzy Park i in. jako pierwsi wykorzystali ozon w osadzaniu HfO<sub>2</sub> osadzili warstwę z HfCl<sub>4</sub> w 300°C [123]. Ozon był także testowany z innymi prekursorami hafnu: TDMAH [124]–[127], TDEAH, TEMAH [118], [128], [129]. Okazało się, że oprócz wyższej reaktywności zastosowanie ozonu daje inne centra aktywne dostępne w reakcjach połówkowych. Po cyklu wodnym dostępne są, jak wiadomo, grupy -OH, natomiast ozon pozostawia -O jako centrum aktywne. Różna charakterystyka adsorpcji molekuł jest zatem obserwowana [125], [130], [131]. Ma to odzwierciedlenie w różnicach w tempie wzrostu oraz w poziomie zawartości nieintencjonalnych domieszek, tj.: pozostałości po prekursorach organicznych: węgla i wodoru [132]. Warstwy wzrastane metodą ALD-ozon zazwyczaj mają wyższą zawartość węgla i wodoru, którego poziom jednak spadał wraz ze wzrostem temperatury wzrostu warstwy [118]. Podobny trend opisano w pracy dotyczącej wzrostu ZnO [132].

HfO<sub>2</sub> krystalizuje zazwyczaj w strukturze monoklinicznej w grupie przestrzennej P21/a.  $a=5.285 \text{ \AA}$ ,  $b=5.182 \text{ \AA}$ ,  $c=5.116 \text{ \AA}$ ,  $\beta=99.259^\circ$  (00-034-0104), ale również w fazie ortorombowej i tetragonalnej. Faza tetragonalna jest w temperaturze pokojowej



metastabilna, ale może być kontrolowana przez rozmiar ziaren i naprężenia [133]. Fazę ortorombową można uzyskać wprowadzając ozon do procesu ALD [134]. Różne fazy krystalograficzne w  $\text{HfO}_2$  mogą występować pojedynczo, mogą również współistnieć w jednej strukturze [113], [135], [136]. Jednak warstwa ALD  $\text{HfO}_2$  w procesach ALD z organicznych prekursorów występuje zazwyczaj w strukturze nieuporządkowanej, amorficznej, zwłaszcza gdy  $\text{HfO}_2$  osadzany jest w niskich temperaturach [6], [86], [124]. Zjawisko krystalizacji warstw  $\text{HfO}_2$  jest aktywowane termicznie [135]. Zazwyczaj jednak to po procesowe procesy wygrzewania indukują krystalizację materiału. Termodynamiczne parametry procesu osadzania warstwy i po procesowej obróbki termicznej są ściśle powiązane z jej krystalografią. Znany jest również związek wzrostu grubości warstwy z lepszą jakością polikrystaliczną [68]. Model nukleacji kryształów, który opisał Hausman i in. w pracy [136], zakłada, że zarodkami nukleacji są defekty tj.:  $V_o$  i  $O_i$  [126], [137], zapoczątkowujące proces krystalizacji, a ilość wspomnianych zarodków nukleacji jest liniowo zależna od temperatury osadzania warstwy [136], [138]. Oprócz temperatury również prekursor tlenowy ma wpływ na jakość krystalograficzną. W pracy [125] pokazano, że podwójny puls różnych prekursorów tlenowych ( $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{O}_3$ ) w ramach jednej reakcji półokwowej pozytywnie wpływał na krystalizację [139]. Autorzy sugerują, że wzrost warstwy w warunkach bogatych w tlen skutkuje zwiększoną ilością defektów  $O_i$  co jest zgodne z teorią o nukleacji krystalizacji na defektach [126], [137].

## 5.1.Osadzanie cienkich warstw atomowych: ALD

Metoda ALD jest to technologia otrzymywania nanomateriałów w postaci cienkich warstw atomowych, opracowana i wprowadzona przez dr Tuomo Suntola [3] w 1975 roku, początkowo jako metoda przemysłowa. Jej naukowy rozwój nastąpił dopiero w kolejnych latach [56] i dynamicznie trwa nadal. ALD jest odmianą osadzania cienkich warstw z fazy gazowej (CVD; z języka angielskiego Chemical Vapor Deposition). Główną ideą jest powierzchniowy wzrost cienkich warstw atomowych w wyniku zajścia reakcji pomiędzy wprowadzonymi w stanie lotnym produktami (prekursorami, reagentami<sup>9</sup>) reakcji chemicznej. Wzrost warstwy prowadzony jest w komorze osadzania, w której panuje obniżone ciśnienie do poziomu próżni o wartości rzędu kilkudziesięciu Pa. W metodzie CVD podawane prekursorzy kontaktują się ze sobą już bezpośrednio w fazie gazowej, w metodzie ALD natomiast, sekwencyjnie wprowadzane do komory reaktora reagenty są oddzielane fazą przedmuchiwaną komory gazem obojętnym. Przyjęto określać ten etap fazą płukania komory, pomimo, że na żadnym etapie procesu ALD nie są stosowane związki płynne. Z przestrzeni komory usuwane są nieprzereagowane molekuly prekursora oraz uboczne produkty reakcji po każdorazowym ich podaniu [140]. Taki sposób wprowadzania prekursorów do komory uniemożliwia zajście reakcji pomiędzy prekursorami w fazie gazowej. Jest to zasadnicza, technologiczna różnica pomiędzy metodami ALD i CVD, która ma swoje konsekwencje już na etapie doboru rodzaju reagentów. Rodzaj możliwych związków chemicznych odpowiednich jako prekursorzy ALD determinowany jest właśnie metodologią ich wprowadzania do komory reaktora. Prekursorzy muszą gwałtownie reagować ze sobą. Niska energia aktywacji pomiędzy aktywnymi ligandami jest kluczowym parametrem podczas doboru prekursorów w metodzie ALD [114]. Drugim kryterium, przy wyborze prekursorów ALD jest ich lotność. Wysoka prężność pary powinna pozwolić na dyfuzję uwolnionego z pojemnika prekursora, dotarcie do komory i równomierne rozprzestrzenienie się w komorze. Zasadniczo stosowane prekursorzy są w stanie ciekłym, o prężności pary, dla DEZ 0.7 kPa, dla TMA 1.2 kPa, a dla wody 2.646 kPa w temperaturze

---

<sup>9</sup> W opisie merytorycznym metody ALD pojęcie reagenty i prekursorzy stosuje się zamiennie.

pokojujowej, tj. około 22°C. Prekursory o niedostatecznej prężności pary wymagają grzania podczas procesu osadzania warstw, co ma zwiększyć ich lotność.

Charakterystyczną cechą metody ALD jest efekt samo-nasycenia, występujący podczas wzrostu warstwy. Oznacza to, że przy wprowadzeniu w pojedynczym pulsie pewnej granicznej, ściśle określonej ilości prekursora do komory, osiągnię się całkowite wysycenie powierzchni, czyli jednorodne pokrycie powierzchni pojedynczą warstwą atomową. Zwiększanie objętości wprowadzanego prekursora nie zwiększy już tempa wzrostu warstwy, nie przyczyni się do osadzania grubszej kilkuatomowej warstwy. Zjawisko to określane jest jako samoograniczenie tempa wzrostu i jest wyznacznikiem metody ALD. Teoretyczny proces ALD do osadzanie kolejno następujących po sobie pojedynczych warstw atomowych całkowicie pokrywających dostępną powierzchnię stałą. Wzrost warstw ALD powinien odbywać się w reżimie liniowym pomiędzy grubością warstw a ilością cykli. Nie jest jednak na ogół zachowany w początkowej fazie wzrostu ALD, zależy od rodzaju podłoża i sposobu jego przygotowania [141], [142], na ogół jest znacznie wolniejszy dla kilku pierwszych nanometrów grubości. Warto zauważyć, że w praktyce pełne wysycenie powierzchni, czyli otrzymanie jednej mono-warstwy nie jest jednoznaczne z jednokrotnym podaniem prekursora. Przykładowo, stosowane organiczne prekursory zbudowane są z dużych, trójwymiarowo rozbudowanych cząsteczek, po przyłączeniu których do powierzchni obserwowany jest efekt cienia w jej bezpośrednim otoczeniu. Sąsiadujące, wolne wiązania są niedostępne dla ligandów prekursora i pełne wysycenie w jednym cyklu staje się niemożliwe [141]–[143]. W praktyce zazwyczaj trzy pełne plusy odpowiadają za wzrost jednej, pełnej mono-warstwy atomowej. Niemniej jednak obserwuje się ustabilizowanie tempa wzrostu przy odpowiednio dobranej dawce prekursora. Tempo wzrostu warstwy pozostaje stałe.

Model Langmuira opisuje adsorpcje powierzchniową zachodząca na granicy faz (ciała stałego i fazy gazowej) podczas procesu ALD z prekursorami w postaci związków chemicznych [142], [144]. Zakłada się, że warstwa powierzchniowa, czyli adsorbent charakteryzuje się centrami aktywnymi, są to ligandy z wolnym wiązaniem np.: grupy -OH po podaniu prekursora tlenu w procesie osadzania warstwy tlenkowej. Tylko te centra będą oddziaływać z centrami aktywnymi absorbenta. Nie obserwuje się wzajemnych interakcji pomiędzy cząsteczkami prekursora lub są one zaniedbywalne. Wielocząsteczkowe ligandy zbudowane są z centrum aktywnego i n-grup funkcyjnych.

Po wprowadzeniu prekursora do komory, pod wpływem dostarczonej energii, w optymalnych warunkach procesowych jako pierwsze rozerwane zostanie wiązanie pomiędzy centrum aktywnym, a dodatkowymi grupami chemicznymi, pozostawiając wolne wiązanie którym molekula zwiąże się z centrum aktywnym zaadsorbowanym do podłoża w poprzednim cyklu. Umożliwi to zajście reakcji pomiędzy centrum aktywnym wprowadzonym podczas aktualnego pulsu z wolnym wiązaniem aktywnego centrum, które jest już połączone z podłożem w wyniku poprzedniej reakcji. Reakcja chemisorpcji pomiędzy centrami na powierzchni, a centrami w fazie gazowej jest nieodwracalna. Wzrost nanomateriału następuje warstwa atomowa po warstwie. Wiązania pomiędzy ligandami tworzącymi warstwę są nierozdzielne. Proces ALD jest procesem nieodwracalnym. Równowagę adsorpcyjną w stałej temperaturze ( $T = const$ ) i zmiennym ciśnieniu ( $p$ ) można opisać równaniem izotermy  $a = f(p)_T$ . Izoterma Langmuira przyjmuje postać[145]

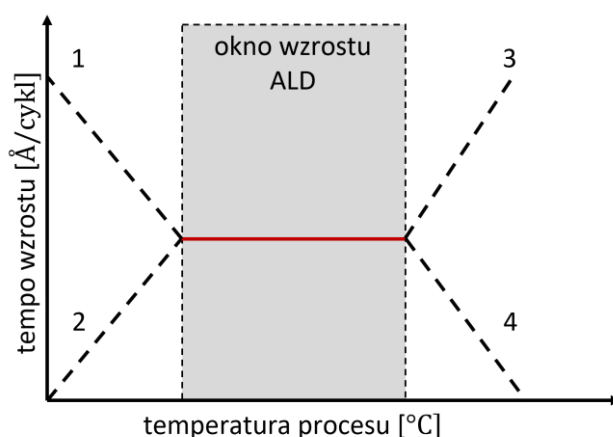
$$a = a_m \frac{K[A]}{1 + K[A]}$$

W równaniu przyjęto oznaczenia:  $a$  – adsorpcja rzeczywista  $a_m$  – adsorpcja odpowiadająca zapełnieniu monowarstwy,  $K$  – stała równowagi adsorpcji,  $[A]$  – koncentracja molowa adsorbenta, która zależne będzie od ciśnienia, ale też od prężności pary wprowadzonego prekursora.

Jeżeli nie zostanie dostarczona energia równa energii potrzebnej do rozerwania wiązania centrum aktywnego z resztą cząsteczki reakcja nie zajdzie albo wbudowana zostanie cała cząsteczka prekursora, w zależności od typu prekursora w procesie chemisorpcji lub adsorpcji fizycznej. Wartość tej energii określana jest jako energia aktywacji. Jeżeli dostarczona energia będzie wyższa niż graniczna, temperaturowa wytrzymałość prekursora nastąpi jego dekompozycja. Prawdopodobieństwo zajścia reakcji pomiędzy ligandami już w fazie lotnej będzie rosło. Reakcja związania z ligandem na powierzchni nie zajdzie lub połączone zostanie kilka grup chemicznych jednocześnie. Typowy dla ALD wzrost warstwa po warstwie zostanie zaburzony. Opisane powyżej typy zachodzących reakcji związane są z dostarczaną energią. W procesie ALD jest to energia cieplna w jakiej prowadzony jest proces ALD konieczna do zajścia reakcji chemicznej pomiędzy prekursorami. W opisie dynamiki procesu wzrostu w metodzie ALD definiuje

się okno wzrostu pokazane na Rys. 6, czyli zakres optymalnej temperatury, dla której zachodzi reakcja pomiędzy centrami aktywnymi prekursorów, produkty uboczne reakcji i nieprzereagowane molekuly prekursorów są usuwane z przestrzeni komory reaktora podczas fazy płukania komory gazem obojętnym. W zakresie temperatur w tzw. oknie wzrostu tempo przyrostu grubości warstwy musi pozostawać stałe. Poza wartościami granicznymi okna wzrostu tempo przyrostu laminarnej grubości powłoki maleje lub rośnie w zależności od dynamiki reakcji i/lub stopnia dekompozycji termicznej związków prekursorowych:

1. niepełna reakcja wymiany w wyniku zbyt niskiej kinetyki reakcji, absorbcja molekuł prekursora
2. niepełne wysycenie powierzchni w jednym cyklu ALD przy niskiej kinetyce reakcji
3. fizysozpcja molekuł prekursora w wyniku dekompozycji prekursora
4. niepełne wysycenie powierzchni w jednym cyklu ALD w wyniku dekompozycji prekursora



**Rys. 6:** Tempo wzrostu warstw ALD w funkcji temperatury procesu osadzania.

Dwa rodzaje adsorpcji powierzchniowej są obserwowane w procesach wzrostu ALD. W zależności od energii kinetycznej molekuly wprowadzonej do komory reaktora zachodzi adsorbcja fizyczna lub adsorbcja chemiczna [122], [144]. Pożądana jest jednak adsorpcja chemiczna, która gwarantuje stabilność, trwałość i nieodwracalność reakcji pomiędzy centrami aktywnymi prekursorów. Zarówno w wyniku adsorpcji chemicznej jak i adsorpcji fizycznej nastąpi początkowo adhezja centrum aktywnego do powierzchni.

Energia wiązania cząsteczki w wyniku zajścia adsorpcji fizycznej jest mniejsza niż tej, która zajdzie w wyniku adsorpcji chemicznej. Zgodnie z podstawami teoretycznymi ALD odpowiednio dobrany czas płukania i energia kinetyczna gazu nośnego powinny usunąć z powierzchni warstwy molekuly związane z podłożem w procesie fizysorpcji. Eksperymentalnie pokazano, że zarówno chemisorpcja jak i fizysorpcja mogą występować w procesie ALD równocześnie [122]. Całościowy udział molekuł, które ulegają najpierw fizysorpcji i dopiero w późniejszych fazach procesu desorpcji powinna być w odpowiednio zoptymalizowanym procesie zaniedbywalna [142]. Zwłaszcza staranny dobór długości czasów płukania pomiędzy podaniem prekursorów będzie tutaj kluczowy. Niekontrolowana desorpcja niezwiązanych chemicznie molekuł może powodować defekty w powierzchni, przewaga fizysorpcji wpływała będzie negatywnie na parametry wytrzymałościowe materiału.

Optymalizacja procesów w metodzie ALD, w reżimie okna wzrostu jest zgodna z podstawowymi założeniami metody ALD, jednak doświadczalnie pokazano, że możliwe jest otrzymywanie cienkich warstw o wysokiej jakości wzrastanych poza oknem wzrostu. Pomimo wyjścia z reżimu okna wzrostu procesy ALD mogą pozostawać kontrolowalne i powtarzalne. Skutkuje to na ogół wprowadzeniem do materiału domieszek nieintencjonalnych i/lub zmianą struktury krystalograficznej. przykładowo warstwy ZnO wzrastane w reżimie okna wzrostu charakteryzują się dobrą jakością polikrystaliczną, zwiększenie temperatury wzrostu skutkuje natomiast uprzywilejowanym wzrostem warstwy w kierunku prostopadłym do płaszczyzny wzrostu i pozwala na poprawę parametrów elektrycznych warstwy [132]. Zawartość nieintencjonalnych domieszek w postaci jonów węgla i wodoru, ale też azotu jest konsekwencją warunków termodynamicznych procesu ALD i przebiegu reakcji [146]. Wprawdzie zarówno węgiel jak i wodór obecny w warstwie może świadczyć o niepełnej reakcji wymiany pomiędzy prekursorami podczas procesu wzrostu [147], często właśnie zawartość tych pierwiastków decyduje o właściwościach warstwy. Trwa dyskusja na temat roli wodoru i węgla jako domieszek nieintencjonalnych, jako czynnik poprawiający właściwości elektryczne warstwy ZnO. Zarówno węgiel jak i wodór mają również kluczowe znaczenie w procesach biologicznych, można się więc spodziewać, że poziom ich zawartości będzie miał odzwierciedlenie w biomedycznej funkcjonalności materiałów.

Kolejną typową cechą metody ALD jest możliwość wzrostu na chropowatych lub porowatych powierzchniach z zachowaniem kształtu matrycy [56], [57], [148]. Konforemne pokrycie powierzchni wynika wprost z modelu wzrostu opisującego proces ALD [144] i może być kluczowe z uwagi na przyszłościowe aplikacje w biologii i medycynie [77], [149]. Zarówno w skali makro (kształt implantów) jak i mikro oraz nano (aktywacja procesów rozwojowych komórek kostnych) chropowatość i porowatość powierzchni są cechami wysoce pożądanymi, w przeciwieństwie do np. elektroniki, gdzie gładkość powierzchni jest kluczowa.

W metodzie ALD możliwy jest wzrost związków chemicznych niemalże wszystkich pierwiastków układu okresowego [68], [114], [150]. Jednak z uwagi na wspomniany warunek o niskiej energii aktywacji pomiędzy prekursorami i wartością prężności pary prekursorów tempo wzrostu i warunki termodynamiczne muszą być dla każdego związku indywidualnie i starannie ustalane. Parametrami sterowanymi w technologii ALD są zatem:

- rodzaje prekursorów i ich wzajemne połączenie,
- dawka prekursora w pojedynczym pulsie, określana w czasie otwarcia zaworów ALD wpuszczających gaz do komory wzrostu reaktora, są to czasy rzędu kilku milisekund do kilku sekund,<sup>10</sup>
- czas płukania komory gazem obojętnym, zazwyczaj azotem lub argonem pomiędzy poszczególnymi dawkami prekursorów, które są sekwencyjnie wprowadzane do komory reakcyjnej, od kilku do kilkudziesięciu sekund,
- przepływ gazu nośnego,
- temperatura komory wzrostu, zasadniczo jest to od temperatury pokojowej do 500°C w zależności od rodzaju prekursorów i układu technologicznego.

Metoda ALD doskonale sprawdza się do prowadzenia wzrostu warstw tlenkowych, głównie tlenków metali przejściowych; czystych i domieszkowanych [68], [69], [110], [151]–[153]. Procesy prowadzone są wówczas z dwoma typami prekursorów: prekursorem tlenowym, na ogół z wodą, ale też z tlenem, wodą utlenioną, ozonem oraz

---

<sup>10</sup> Podane wartości graniczne są orientacyjne, typowe dla układów ALD do użytku laboratoryjnego.

prekursorem metalu, które zasadniczo występują zarówno w formie związków organicznych jak i nieorganicznych jak już opisywano w *rozdziale 2.1.*

## 5.2. Podstawy eksperymentu SBF

W 1970 roku dr Larry Hench zaobserwował w 1970 roku, że istnieją materiały, które mają zdolność do samoistnego wiązania kości bez tworzenia międzywarstwy z tkanki bliznowatej pomiędzy powierzchniami. Pierwszym takim materiałem był  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$  [154]. Kostno-tkankowe połączenie powierzchni implantu z okoliczną tkanką jest kluczową cechą stabilnej struktury protetycznej, jest istotą osteointegracji. Takie połączenie jest możliwe dzięki chemicznym wiązaniom między powierzchnią implantu a mineralną frakcją tkanki kostnej tj.: BA. Fakt istnienia takich materiałów ukierunkował badania inżynierii materiałowej na projektowanie osteointegracyjnych powierzchni implantów. Jedynym możliwym sposobem oceny właściwości takich powierzchni były wówczas badania na zwierzętach, które oprócz etycznych przeciwwskazań były długotrwałe i kosztowne. Brakowało prostego, ale pewnego narzędzia badawczego do oceny tych właściwości zwłaszcza na etapie badań przesiewowych. Narzędzia, które pozwoliłyby na szerokie testy materiałów. W 1991 takie narzędzie zostało zaproponowane przez Kokubo i współautorów [155], którzy zaproponowali wykonywanie eksperymentu w symulowanych, uproszczonych, bo pozbawionych molekuł biologicznych warunkach fizjologicznych. W 1990 roku Kokubo i in. w pracy [155] pokazali, że stosując odpowiednio przygotowany wodny roztwór jonów w stężeniu zbliżonym do płynu fizjologicznego człowieka (z ang. Simulated Body Fluide, SBF) można obserwować powierzchniowe zjawiska istotne z punktu widzenia biologii. Autorzy zaobserwowali wówczas samoistne osadzanie się, na powierzchni podłoża, minerału zgodnego z BA. Obserwacja powierzchniowych zjawisk zachodzących na materiałach w warunkach zbliżonych do biologicznych stała się wartościowym narzędziem do preselekcji materiałów osteointegracyjnych. W *Tab. 1* przedstawiono porównanie zawartości jonów w płynie fizjologicznym człowieka oraz w SBF, zaproponowanym przez Kokubo i in. w pierwszej wersji eksperymentu i po korekcie [156]. Pierwsza wersja płynu SBF-1 zawierała zbyt duże stężenie jonów chloru na niekorzyść jonów węglanowych [155]. Procedura przygotowania płynu została dopracowana i uzyskano odpowiednie stężenie wszystkich jonów w SBF.



Eksperyment polega na inkubowaniu próbki w przygotowanym płynie SBF przez kilka do kilkudziesięciu dni, w stabilnej temperaturze, zbliżonej do temperatury ludzkiego ciała tj. około 37°C. SBF jest roztworem przesyconym, przygotowanie którego wymaga dużej staranności, żeby nie doszło do niekontrolowanej, homogennej krystalizacji już w trakcie przygotowywania płynu. Dokładna receptura i sposób wykonania został ujęty w międzynarodowym standardzie ISO [156], [157].

**Tab. 1:** Zawartość molowa jonów w płynie fizjologicznym człowieka i w płynie SBF[156].

| jony(mM) | Na <sup>+</sup> | K <sup>+</sup> | Mg <sup>2+</sup> | Ca <sup>2+</sup> | Cl <sup>-</sup> | HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | pH      |
|----------|-----------------|----------------|------------------|------------------|-----------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------|
| SBF-1    | 142,0           | 5,0            | 1,5              | 2,5              | 147,8           | 4,2                           | 1,0                            | 0,5                           | 7,4     |
| SBF      | 142,0           | 5,0            | 1,5              | 2,5              | 103             | 27,0                          | 1,0                            | 0,5                           | 7,4     |
| Człowiek | 142,            | 5,0            | 1,5              | 2,5              | 103,0           | 27,0                          | 1,0                            | 0,5                           | 7,2-7,4 |

Etyczna i ekonomiczna zasadność stosowania SBF jako narzędzie do oceny funkcjonalności biomateriałów jest bezsporna, a badania pokazały, że uzyskiwane wyniki są w większości przypadków spójne z wynikami otrzymanymi w badaniach *in vivo* [156], [158]. Oczywiście eksperyment laboratoryjny może nie być wystarczający do końcowej oceny funkcjonalności materiału i badania z wykorzystaniem zwierząt będą konieczne, ale pozwala w znaczący sposób zredukować liczbę przeprowadzanych eksperymentów. Narzędzie to jest doceniane przez naukowców, a ilość publikacji wyników bazujących na eksperymencie z SBF rośnie, w ciągu ostatnich dziesięciu latach kształtuje się na poziomie około sześciuset rocznie<sup>11</sup>.

### 5.3. Promieniowanie rentgenowskie w oddziaływaniu z materiałą

Fala EM to rozchodzące się w przestrzeni zaburzenie wzajemnie do siebie prostopadłych pól elektrycznego i magnetycznego. Zgodnie z teorią klasyczną falę EM rozważamy jako ruch fali o częstotliwości  $\nu$ , zgodnej z oscylatorem, który ją wytwarza. Teoria

---

<sup>11</sup> Dane wg: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>

kwantowa natomiast traktuje falę EM jako strumień cząstek, fotonów o energii ( $E$ ) opisanej równaniem, w którym  $h$ -stała Plancka, a  $\nu$ - częstotliwość fali:

$$E = h \cdot \nu$$

Rodzaj fali EM zależy od wartości propagowanej energii. Mechanizm oddziaływania fali EM z materią jest ściśle definiowany zależnością między liniowym wymiarem materii, a długością fali EM. Interesującym zakresem długości fal EM w odniesieniu do badań ośrodków materialnych jest zakres porównywalny z wielkościami atomowymi, czyli rzędu wielkości 10 pm do 10 nm. Są to wartości wpisujące się w zakres długości promieniowania rentgenowskiego (X), które zostało odkryte i po raz pierwszy opisane przez Wilhelma Roentgena 28 grudnia 1895 roku. Energia odpowiadająca tej długości fali to rząd wielkości kilkunastu do kilkuset eV co z kolei odpowiada energii wiązania elektronów na podpowłokach pierwiastków chemicznych. Dwie szczególnie przydatne techniki do badania powierzchni nanomateriałów wykorzystują zjawisko oddziaływania promieniowania X z materią to dyfrakcja promieniowania X (XRD) oraz spektroskopia fotoelektronów promieniowania X (XPS).

### **5.3.1. Spektroskopia fotoelektronów promieniowania X (XPS).**

Jak wspomniano powyżej, energia promieniowania X jest rzędu wielkości energii wiązania elektronów na podpowłokach pierwiastków chemicznych. Oddziałując na powierzchnię próbki monochromatycznym promieniowaniem X można wzbudzać elektrony z zewnętrznych powłok atomowych, doprowadzając do emisji fotoelektronów. Interpretacja rozkładu energii kinetycznej generowanych fotoelektronów pozwala na określenie ilościowego i jakościowego składu chemicznego próbki. XPS dostarcza też informacji o otoczeniu chemicznym atomów, co czyni tą technikę niezwykle użytecznym narzędziem w analizie strukturalnej materiałów. XPS umożliwia oznaczenie niemalże wszystkich pierwiastków z układu okresowego. Wyjątkami są pierwiastki wodoru i helu.

Prace Heinrich Herz'a [159] z 1887 roku Thomson'a z 1899 roku Hallwachs'a Lanard'a i Wolf'a zostały wytłumaczone w pracy Einstein'a z 1905 roku, postulującej kwantową naturę światła. Na tej podstawie wyjaśniono efekt fotoelektryczny oraz zjawisko emisji elektronu (fotoelektronu) z powierzchni próbki po naświetleniu

promieniowaniem X. Równania energii opisujące zjawisko leżące u podstaw techniki XPS przedstawione są poniżej:

$$h \cdot \nu = \Phi + E_k$$

Gdzie  $\Phi$  jest pracą wyjścia elektronu, a  $E_k$  energią kinetyczną elektronu. Uwzględniając energię wiązania elektronu dla określonego poziomu elektrycznego ( $E_{BE}$ ) otrzymujemy, że maksymalna energia kinetyczna fotoelektronu wynosi:

$$E_k = h\nu - E_{BE} - \Phi$$

Praca wyjścia dla elektronu jest charakterystyczna dla materiału, natomiast energia kinetyczna swobodnego elektronu zależy od energii propagowanej przez promieniowanie X.

W pomiarze XPS monitorowane są tylko te elektrony, które przebyły drogę z powierzchni próbki do detektora bezkolizyjnie. Średnia droga swobodna elektronu wybitego z powłoki odpowiada trzykrotnej odległości pomiędzy nieelastycznymi zderzeniami ( $3\bar{\lambda}$ ).  $\bar{\lambda}$  dla węgla wynosi 3.3 nm co daje w przybliżeniu  $\sim 10$  nm. Taką głębokość uznaje się za zakres detekcji XPS w pozycji normalnej detektora do powierzchni próbki. Równanie opisujące głębokość wnikania wiązki przez powierzchnię próbki, czyli głębokość z jakiej odbierana jest informacja w postaci wybitych fotoelektronów to:

$$d = 3\bar{\lambda} \cdot \cos\theta$$

Manipulując kątem pomiędzy próbka a detektorem możemy tą głębokość zmniejszać, wykonując pomiar tylko dla zewnętrznych warstw powierzchni materiału. W technice XPS wykorzystuje się czyszczenie powierzchni próbki, usuwając powierzchniowo zaadsorbowane atomy wysokoenergetycznymi jonami argonu, o energii 0.5-5 eV. Pozwala to też na wykonanie profilowania głębokościowego i znacznie rozszerza możliwości pomiarowe XPS. Należy wówczas brać pod uwagę, że bombardowanie powierzchni wysokoenergetycznymi jonami wprowadza pewien nieporządek w strukturze atomowej co jest obserwowane w zmienionym kształcie ich linii spektralnych i zwiększonej szerokości. Również obserwowany jest spadek zawartości tlenu, ponieważ podczas czyszczenia atomy tlenu są preferencyjnie usuwane

z powierzchni podczas bombardowania argonem. W przypadku badania materiałów do zastosowań w biologii i medycynie to powierzchnia jest kluczowa w ocenie wpływu materiału na żywe komórki, dlatego nie zawsze konieczne jest profilowanie głębokościowe<sup>12</sup>.

Według teorii kinetycznej gazów średnia droga swobodna pomiędzy kolizją dwóch molekuł ( $L_{kol}$ ) opisywana jest równaniem<sup>13,14,15</sup>:

$$\bar{\lambda} = \frac{kT}{1.414 \cdot p \cdot \sigma_{kol}}$$

Ponieważ  $\bar{\lambda}(m)$  zależy od  $p$ , aby zapobiec rozpraszaniu fotoelektronów na molekułach gazu w drodze do analizatora, ale też, żeby uniknąć osadzania się zanieczyszczeń na powierzchni, pomiary wykonywane są w ultrawysokiej próżni (UHV,  $\sim 1.33 \cdot 10^{-8} Pa$ ). Taka próżnia umożliwia zwiększenie  $\bar{\lambda}$  z  $10^{-7} m$  w atmosferze na  $10^{-4} m$  w UHV (wartości dla molekuly azotu).

W technice pomiarowej wykorzystuje się promieniowanie X, generowane z anody Mg ( $K_{\alpha} = 1253,6 eV$ ) albo z anody Al ( $K_{\alpha} = 1486.6 eV$ ). Promieniowanie charakterystyczne  $K_{\alpha}$  jest wystarczające do uzyskanie wzbudzenia elektronów z powłok atomowych. Najbardziej intensywna jest linia promieniowania charakterystycznego Mg to  $K_{\alpha 1,2}$ . Promieniowanie hamowania i promieniowanie innych linii  $K_{\alpha}$ , w szczególności  $K_{\alpha 3,4}$ , której intensywność jest mniejsza jedynie o 9.2% [160], przyczyniają się do zmniejszenia rozdzielczości. Oczywiście rozdzielczość urządzenia zależy też od szerokości wiązki promieniowania X, która wpływa na aparaturowe poszerzenie linii spektralnych. Stąd często wynika potrzeba stosowania monochromatora [161]. Na Rys. 7 pokazano schemat układu pomiarowego XPS. Badana próbka naświetlana jest monochromatyczną wiązką promieniowania X, w wyniku efektu fotoelektrycznego z

---

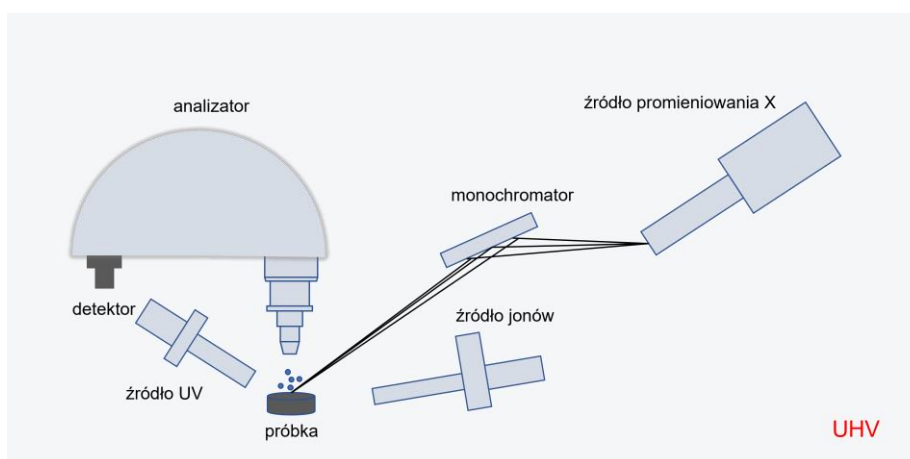
<sup>12</sup> Większość pomiarów XPS przedstawionych w tej rozprawie ograniczała się do badań powierzchni.

<sup>13</sup>  $k = 1.38 \cdot 10^{-23} \frac{J}{K}$ , stała Boltzmana

<sup>14</sup>  $p$  – ciśnienie (Pa)

<sup>15</sup>  $\sigma_{kol} = \frac{d^2\pi}{4}$ , przekrój czynny ( $m^2$ )

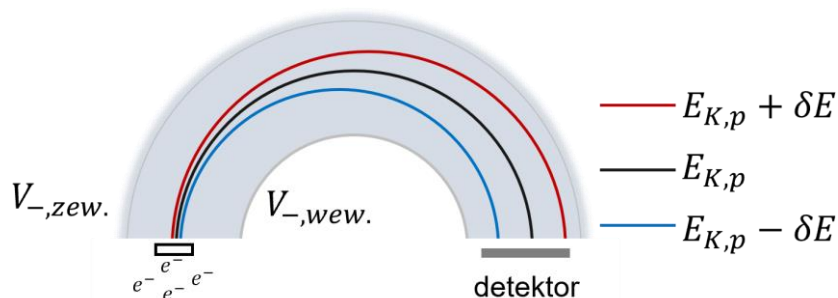
powierzchni emitowane są elektrony, nazywane fotoelektronami, we wszystkich kierunkach. Strumień elektronów przeprowadzany jest przez układ soczewek optycznych, definiujący zakres kątowy elektronów wpadających do szczeliny analizatora. Podłużna szczelina o rozdzielczości kątowej typowo o wartości  $\gamma = 15^\circ$  w kierunku podłużnym i zaniedbywalnej szerokości kątowej  $\theta$  w kierunku prostopadłym przepuszcza strumień elektronów. Do analizatora wpadają jedynie fotoelektrony emitowane pod pewnym stałym kątem, a rozrzut energii elektronów w strumieniu definiuje rozdzielczość urządzenia.



*Rys. 7: Schemat ideowy układu pomiarowego XPS.*

Koncentryczny hemisferyczny analizator (CHA) jest kluczowy w technice XPS, bo zapewnia wysoką rozdzielczość urządzenia. Na Rys. 8 pokazano schemat ideowy CHA. Nominalna różnica potencjałów, pomiędzy zewnętrzną i wewnętrzną powierzchnią hemisfery CHA, pozwala na zakrzywienie toru wpadających pomiędzy jej powierzchnie fotoelektronów polem elektrycznym. Tylko elektrony o określonej energii kinetycznej ( $E_{kin.}$ ), tzw. energii przejścia ( $E_{przejścia}$ ), trafiają do detektora, umieszczonego na przeciwległym końcu hemisfery, bez kolizji z zewnętrzną (gdy  $E_{kin.} > E_{przejścia}$ ) lub wewnętrzną ((gdy  $E_{kin.} < E_{przejścia}$ ) powierzchnią hemisfery. Z detektora zbierane są informacje o wartości energii kinetycznej i kąta padania elektronów na powierzchnię detektora. Te informacje przeliczane są na energię wiązania elektronu w powłoce atomu pierwiastka, z którego został wygenerowany fotoelektron.  $E_{przejścia}$  jest istotnym komponentem definiującym rozdzielczość spektralną urządzenia. Ponieważ promień hemisfery i wartość  $E_{przejścia}$  są ze sobą powiązane, również wielkość analizatora ma

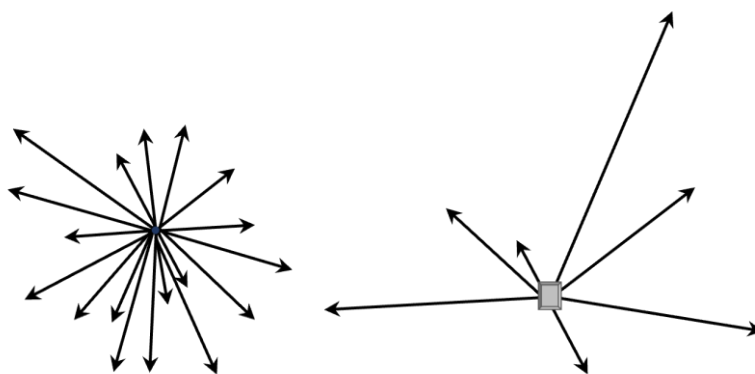
znaczący wkład do rozdzielczości urządzenia. Nowoczesna aparatura XPS posiadać może rozdzielczość dającą 0.5 eV FWHM linii Ag 3d<sub>5/2</sub>.



Rys. 8: Schemat hemisferycznego analizatora energii kinetycznej fotoelektronów.

### 5.3.2. Dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego (XRD)

Charakteryzacja ciał stałych to nie tylko analiza chemiczna, ale również analiza strukturalna, czyli ocena ułożenia atomów w ciele stałym. Struktura krystalograficzna ma zasadniczy wpływ na właściwości materii. Struktura amorficzna to przypadkowy, nieuporządkowany zbiór atomów tworzących zwartą całość. Jeżeli natomiast atomy lub cząsteczki ułożone są w periodycznie powtarzającym się porządku mamy do czynienia z kryształem. Do opisu kryształów wykorzystuje się umowny system płaszczyzn i kierunków krystalograficznych, co ułatwia, a w zasadzie umożliwia ich opis i charakteryzację strukturalną. Odległości pomiędzy tymi umownie zdefiniowanymi płaszczyznami są rzędu kilku angstromów. Ten zakres wpisuje się w zakres długości promieniowania X. Padająca na pojedynczy atom lub zbiór nieuporządkowanych atomów wiązka promieniowania X rozpraszana jest we wszystkich kierunkach (Rys. 9, po lewej). Padając na układ atomów w periodycznie powtarzającym się porządku wiązka monochromatycznych promieni X ulega rozproszeniu na regularnie rozmieszczonych atomach, a w zasadzie na gęstościach elektronowych, które stanowią swego rodzaju centra rozpraszające i ulega wzmocnieniu w wyniku interferencji odbitych fal tylko w kilku ściśle określonych kierunkach Rys. 9, po prawej [162]. W szczególnych przypadkach badania wiązka ulega wzmocnieniu tylko w jednym kierunku, mamy wówczas do czynienia z monokryształem.

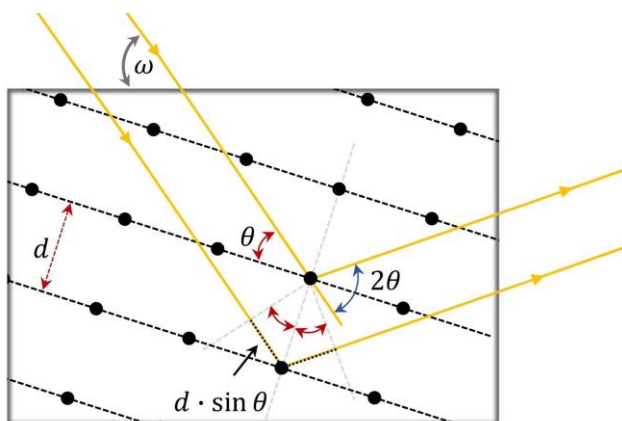


*Rys. 9: Rozpraszanie promieniowania X na pojedynczym atomie (po lewej) i na kryształach (po prawej) [162].*

Jako pierwszy zjawisko wzmocnienia interferencyjnego promieniowania X na kryształach zaobserwował von Laue, którego prace kontynuowali Braggowie i uproszcili opis formułując warunek zajścia dyfrakcji promieni X na sieci periodycznie ułożonych atomów (tzw. prawo Braggów):

$$n\lambda = 2d \cdot \sin \theta$$

Warunek równania wynika z różnicy dróg optycznych którą przebywa fala rozproszona na uporządkowanych atomach wzdłuż zdefiniowanych równoległe do ich uporządkowania kierunkach.



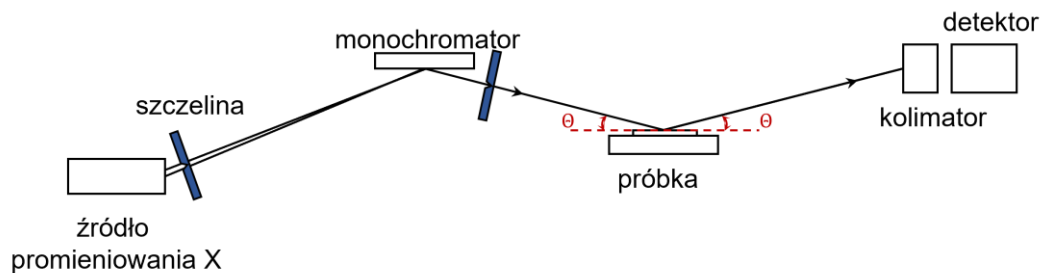
*Rys. 10: Różnica dróg optycznych wiązki światła w sieci periodycznie ułożonych atomów.*

Droga optyczna w stosunku do atomów znajdujących się na różnych poziomach tj. płaszczyznach sieciowych jest różna i powoduje różnicę faz pomiędzy falami. W wyniku sumowania się amplitud fal EM następuje zjawisko wzmocnienia intensywności lub wygaszenie fali. Dyfrakcja promieniowania X na kryształach jest zjawiskiem

wzmacniania i wygaszania promieni rozpraszanych na kryształach, przy czym zjawisko wzmocnienia zachodzi tylko gdy wiązka pada pod pewnym kątem  $\theta$  na równoległe płaszczyzny krystalograficzne oddalone od siebie o stałą odległość  $d$ , określaną jako odległość międzypłaszczyznowa co schematycznie wyjaśniono na Rys. 10. Zjawisko wzmocnienia zachodzi wówczas, gdy różnica dróg optycznych fali ugiętej na dwóch płaszczyznach sieciowych względem siebie równoległych jest równa całkowitej wielokrotności długości fali  $\lambda$  padającej na te płaszczyzny.

### 5.3.3. Reflektometria promieniowania X (XRR)

Zjawisko całkowitego zewnętrznego odbicia promieniowania X od powierzchni jest podstawą kolejnej techniki charakteryzacji powierzchni nazywanej metodą XRR, na Rys. 11 przedstawiono ideowy schemat układu pomiarowego XRR.



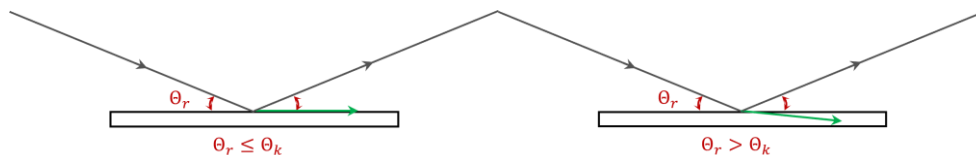
*Rys. 11: Schemat pomiaru XRR.  $\theta$  – kąt padania wiązki promieniowania X. Zgodnie z ref. [163].*

Dla fali EM rozchodzącej się na granicy dwóch ośrodków o współczynnikach załamania  $n_1$  i  $n_2$  wynika określona prawem Snell'a zależność pomiędzy wartością kąta odbicia ( $\Theta_i$ ) i załamania  $\Theta_r$ :

$$\frac{\sin \Theta_i}{\sin \Theta_r} = \frac{n_2}{n_1}$$

Współczynnik załamania promieniowania X ( $\hat{n}$ ) w próżni jest nieznacznie mniejszy od 1 [164]. Stąd, jeżeli kąt padania  $\Theta_i$  wiązki jest większy bądź równy od pewnego kąta krytycznego  $\Theta_k$  następują zjawisko całkowitego odbicia fali od powierzchni płaszczyzny lub fala propaguje równoległe do jej powierzchni. Po przekroczeniu wartości kąta krytycznego  $\Theta_k$  wiązka zacznie wnikać w głąb próbki.





**Rys. 12:** Odbicie promieniowania X od powierzchni ośrodka materialnego w zależności od kąta krytycznego.

Subtelne zmiany w intensywności wiązki odbitej w granicach  $\theta_k$   $1 \div 3^\circ$  są źródłem informacji o materiale. Stopniowo wnikająca wiązka w głąb próbki oscyluje na niejednorodnościach powierzchni tj. gęstości elektronowej materiału  $\rho$  i chropowatości materiału. Im mniejsza gęstość materiału tym kąt krytyczny jest większy. Amplituda oscylacji jest proporcjonalna do zmian gęstości materiału, a szybkość spadku intensywności wiązki odbitej, czyli głębokość wnikania związana jest z szorstkością materiału [165]. Zmianę szerokości tych oscylacji zaobserwował jako pierwszy Heinz Kiessing [166], stąd pochodzi nazwa pierścieni Kiessing'a. Na granicy dwóch ośrodków materialnych różnica prędkości rozchodzenia się promieniowania X spowoduje zmianę kąta odbicia, co zostanie odwzorowane w szerokości oscylacji. Ta zmienna jest powiązana z grubością materiału. Jeżeli pomiar intensywności wiązki odbitej będzie przeprowadzany dla struktury laminarnej, dla każdej międzywarstwy zaobserwowana zostanie różnica w szerokości oscylacji. Co ważne  $\theta_k(\rho)$  zależy tylko od gęstości elektronowej, a nie zależy od struktury atomowej, czyli metoda XRR może być stosowana też w analizie powierzchni materiałów amorficznych [167].

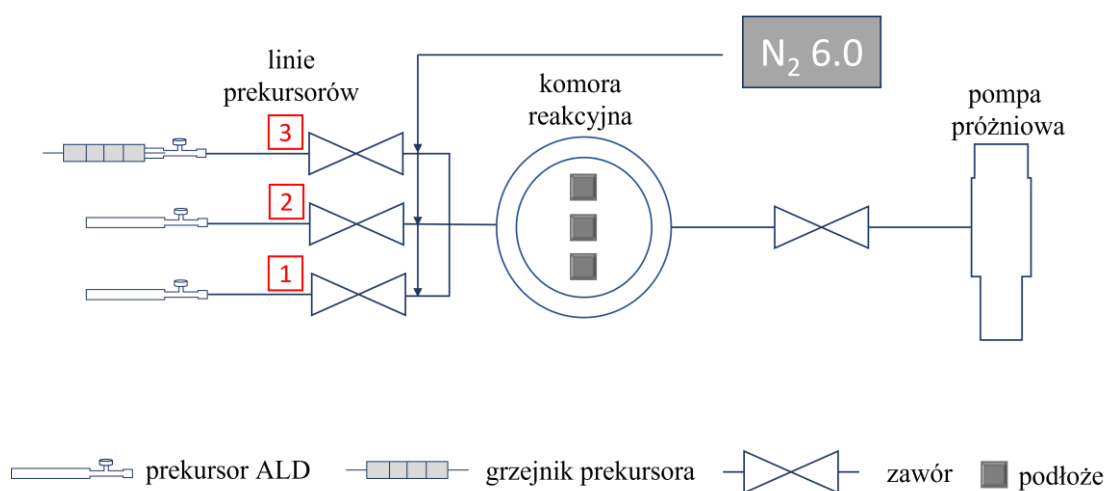
## 5.4. Aparatura technologiczno badawcza

### 5.4.1. Technologia ALD

Cienkie warstwy atomowe tlenków metali przejściowych badanych w ramach przedstawianej dysertacji autorka przygotowywała na stanowisku technologicznym w Instytucie Fizyki PAN. Stanowisko technologiczne wyposażone było w dwa reaktory ALD typu Sawanna-100 Cambridge NanoTech z dostępem do gazu nośnego, azotu o czystości 6.0, oraz sprężonego powietrza.

Ideowy schemat układu do osadzania cienkich warstw atomowych pokazano poniżej na Rys. 13. Neutralny gaz nieustannie przepływający przez komorę nie wpływa na reakcje chemiczne podczas osadzania warstw atomowych, jest jedynie nośnikiem

molekuł prekursorów sekwencyjnie wprowadzanych do komory. Sprężone powietrze służy do pneumatycznego sterowania zaworami ALD, które odpowiadają za dostarczanie dawek prekursora przez odpowiedni czas do komory reakcyjnej. Integralną częścią układu jest pompa próżniowa, ponieważ procesy osadzania warstw ALD przeprowadzane są w warunkach obniżonego ciśnienia. Optymalnie jest, jeżeli poziom próżni utrzymywany zostaje na poziomie 20 Pa - 70 Pa. Pomiędzy komorą reaktora a pompą próżniową znajduje się zawór, tzw. zawór stopu ALD, który ma kluczowe znaczenie w procesach osadzania warstw z funkcją ekspozycji. W klasycznych procesach ALD zawór stopu pozostaje otwarty w trakcie kontynuowania procesu osadzania, a przepływ gazu nośnego, czyli azotu przez komorę ALD jest stały. Stały przepływ neutralnego gazu przez komorę jest też kluczowy podczas faz pomiędzy wprowadzaniem prekursorami. Są to fazy płukania, czyli czas podczas których z przestrzeni komory reakcyjnej usuwane są ligandy pozostałe po zajściu pojedynczej reakcji osadzania.



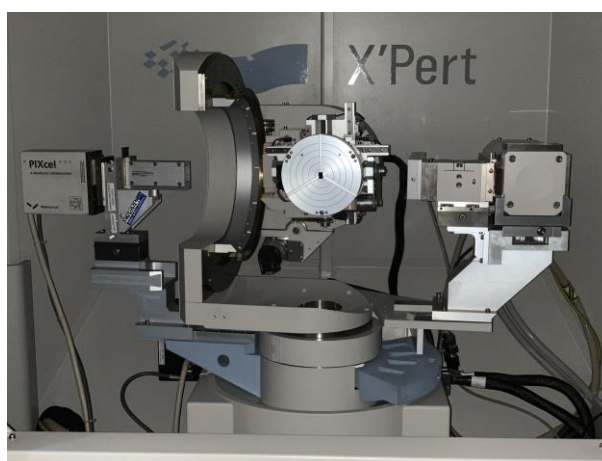
**Rys. 13:** Schemat układu technologicznego do osadzania cienkich warstw atomowych metodą ALD.

Metoda ALD umożliwia również osadzanie warstw z funkcją ekspozycji. Poprzez sterowanie zaworem stopu przed wprowadzeniem prekursora do komory, przepływ azotu zostaje wstrzymany na zazwyczaj kilka sekund. Wprowadzenie prekursora do komory reakcyjnej podczas zamknięcia zaworu stopu umożliwia dłuższe przetrzymanie go w komorze. Podłoża na których osadzana jest warstwa są poddane dłuższej ekspozycji na wprowadzany związek chemiczny. Czas zajścia reakcji chemicznej zostaje wydłużony. Następnie zawór stopu zostaje ponownie otwarty, przepływ azotu jest kontynuowany w fazie płukania. Ważnym elementem układu ALD są zintegrowane płaszcze grzejne do podgrzewania prekursorów o niedostatecznej prężności pary.



Zgodnie z dostępną literaturą czas przydatności roztworu wynosi do 28 dni. Po tym czasie więc przygotowywany był kolejny roztwór, jeśli planowano eksperyment. Przygotowywane powłoki ALD umieszczane były w probówkach laboratoryjnych w 2 ml roztworu SBF. Próbkę inkubowano w cieplarni laboratoryjnej (CLN 32 SMART, POL-EKO APARATURA), w stałej temperaturze 36.6°C. Czas inkubacji zależał od etapu eksperymentu. Co do zasady były to okresy co 24h przez pierwsze cztery dni, następnie w odstępach co 7 dni jednak maksymalnie po 28 dniach. W celu wyeliminowania nieprzewidzianych zmiennych powłoki po wyjęciu z komory reaktora ALD były bezpośrednio umieszczane w roztworze SBF i inkubowane. W ten sposób ograniczono do minimum czas adsorpcji zanieczyszczeń powierzchniowych wynikających z ekspozycji na powietrze.

### 5.4.3. Urządzenia pomiarowe



*Rys. 15: Dyfraktometr rentgenowski Panalytical X'Pert PRO MRD z detektorem PIXcel<sup>16</sup>*

Pomiary jakości krystalograficznej warstw i materiału mineralnego prowadzone były przy użyciu dyfraktometru rentgenowskiego Panalytical X'Pert PRO MRD (Panalytical) wyposażonym w źródło promieniowania rentgenowskiego o długości fali 1.54056 Å, hybrydowy, dwuodbiciowy monochromator z Ge (220) i detektor promieniowania Pixcel, który został pokazany powyżej na Rys. 15.

---

<sup>16</sup> Zdjęcie autorki

Pomiary grubości, gęstości i chropowatości warstw wykonywano na tym urządzeniu z trójosiowym kolimatorem 0.18 przed detektorem. Dopasowanie danych teoretycznych do danych eksperymentalnych zostało wykonane na podstawie symulacji komputerowych wykorzystując oprogramowanie Amass Malvern Panalytical. Wyniki tych badań były wykorzystywane na każdym etapie optymalizacji parametrów technologicznych metody ALD.

Pomiary składu chemicznego próbek oraz otoczenia chemicznego pierwiastków i grup chemicznych w obserwowanych związkach wykonano za pomocą techniki XPS wykorzystując układ od firmy Prevac z monochromatorem promieniowania  $K_{\alpha}$  Al o energii wzbudzenia 1486,7 eV pracującym z mocą 150 W i hemisferycznym analizatorem energii fotoelektronów Scienta. Kalibracja, przeprowadzana przed każdym pomiarem była ustalana dla linii C 1S o nominalnej wartości 285 eV. Oprogramowanie Casa XPS wykorzystywane było do dopasowania linii teoretycznych do wyników eksperymentalnych oraz ustalenia maksimów i wyznaczenia szerokości połówkowych oraz powierzchni pod krzywymi linii składowych[168]. Tło usuwano metodą Shirley'a [169]. Kształt dopasowywanych linii był złożoną funkcją Gauss'a-Lorentz'a (30), i był uzasadniony koniecznością uwzględnienia poszerzenia aparaturowego, szerokości połówkowych linii, charakterystycznego dla urządzenia pomiarowego.

Do obserwacji powierzchni próbek wykorzystany został skaningowy mikroskop elektronowy Hitachi SU-70. Pomiary wykonywane były przy współpracy z dr hab. Bartłomiejem Witkowskim, prof. IF PAN. Do przyspieszania wiązki elektronów wykorzystywano zasadniczo napięcie nominalne 15 kV. Próbki z materiałem mineralnym, ze względu na zbierający się ładunek elektryczny na powierzchni przed pomiarem pokrywano warstwą złota o grubości 10-15 nm.

## Rozdział 3

### *Optymalizacja technologii wzrostu HfO<sub>2</sub>*

W rozdziale pierwszym streszczone zostały wyniki fizykochemicznej i biologicznej charakteryzacji warstw ALD tlenków metali przejściowych, które zostały opublikowane w pracach odpowiednio dla TiO<sub>2</sub> [5], ZrO<sub>2</sub> [4] i HfO<sub>2</sub> [6]. Wykonane i opisane badania stanowiły pierwszy etap prac naukowo-badawczych w ramach rozprawy doktorskiej autorki i miały na celu weryfikację przydatności warstw ALD tlenków metali przejściowych w medycynie regeneracyjnej z uwzględnieniem właściwości fizykochemicznych powierzchni. Okazało się, że HfO<sub>2</sub> wyróżnia największy potencjał aplikacyjny w obszarze spersonalizowanej medycyny regeneracyjnej, ukierunkowanej dla pacjentów z OS. Zdecydowano więc, że kolejne badania skoncentrują się głównie na HfO<sub>2</sub>, a przedstawiony w rozdziale pierwszym przegląd dotychczasowych osiągnięć naukowych autorki w obszarze fizykochemicznej charakteryzacji tlenków metali przejściowych otrzymywanych ALD stanowił będzie bazę wyjściową do kolejnych prac optymalizacyjnych.

Zarówno temperatura komory wzrostu w metodzie ALD jak i dobór prekursorów są kluczowymi zmiennymi wpływającymi na właściwości fizykochemiczne warstw. W ramach niniejszej rozprawy zaplanowano przebadanie właściwości pro-apatyto twórczych HfO<sub>2</sub> wykonanego w różnych temperaturach zarówno z wodą jak i z ozonem. Wpływ tych dwóch parametrów (temperatura i typ prekursora tlenowego) zostanie przedstawiony jednocześnie w postaci analizy porównawczej. Zanim rozpoczęły się jednak testy osadzania warstwy HfO<sub>2</sub> metodą ALD z ozonem przeprowadzona została kalibracja metody ALD-ozon. W tym celu przeprowadzono wzrost i charakteryzację warstw tlenku cynku (ZnO) z ozonem, a zebrane w ten sposób doświadczenie zostało wykorzystane następnie w pracy z HfO<sub>2</sub>. Krótkie streszczenie wyników, opublikowanych w pracy [132] zostało przedstawione poniżej.

### 3.1. Optymalizacja technologii ALD z nowym prekursorem tlenowym: ozonem

Ozon, w przeciwieństwie do pary wodnej, nie jest powszechnie stosowanym jako prekursorem tlenowym w środowisku naukowym zajmującym się metodą ALD. Niemniej jednak wiadomo, że ozon charakteryzuje się wysoką reaktywnością [57], [170], ale też dostarcza innego rodzaju wolnych wiązań dostępnych w cyklach połówkowych składających się na proces osadzania warstw atomowych w metodzie ALD [139]. Potencjał ozonu wynikający z tych doniesień był motywacją autorki dysertacji do podjęcia badań wzrostu warstw ALD z tym prekursorem. Z uwagi na to, że podstawowym i najlepiej poznanym materiałem otrzymywanym metodą ALD jest tlenek cynku (ZnO) rozpoczęto testy nowego prekursora tlenowego bazując na ZnO, w ten sposób ograniczając wstępnie liczbę zmiennych w procesie optymalizacji technologii tylko do prekursora tlenu. Dietylocynk ( $Zn(CH_3)_2$ , DEZ) wykorzystywano jako prekursor metalu, a testy wzrostu prowadzono w szerokim zakresie temperaturowym, od 50°C do 250°C [132]. Po ustaleniu optymalnych dawek prekursorów w procesach ALD-ozon, zapewniających jednorodny wzrost warstwy ZnO na całej powierzchni podłoża w komorze reakcyjnej, oszacowano tempo wzrostu w zależności od temperatury osadzania i zestawiono z wartościami ZnO otrzymanego metodą ALD-woda [132]. Wprowadzenie ozonu do procesu ALD znacząco zredukowało tempo wzrostu warstwy oraz wpłynęło na mechanizm wzrostu warstwy.

Ponieważ DEZ jest prekursorem organicznym tj.: bogatym w grupy  $-CH_3$  wiadomo, że warstwy ALD są nieintencjonalnie domieszkowane węglem i wodorem. Ponieważ wiadomo, że w zależności od użytego prekursora tlenu odmienne wiązania chemiczne są dostępne na powierzchni [139], można było spodziewać różnic w poziomie zawartości tych pierwiastków w zależności od prekursora tlenowego. Co więcej w zależności od temperatury procesu mogą zachodzić niepełne reakcje połówkowe, które skutkują wbudowywaniem się organicznych grup  $-CH_3$  i  $-CH_2$ , ale też inne mechanizmy wzrostu warstwy wykonane zostały badania SIMS, prowadzące do oceny poziomu zanieczyszczeń. Na podstawie wyników, zaprezentowanych w pracy [132] jednoznacznie można powiązać poziom nieintencjonalnych domieszek w warstwie ZnO z typem prekursora tlenowego oraz temperaturą osadzania warstwy. Zawartość zarówno węgla jak i wodoru w procesach ALD-ozon maleje wraz ze wzrostem temperatury osadzania.

W procesach ALD-woda obserwowany jest natomiast trend przeciwny, tj. w niższych temperaturach osadzania (100°C-150°C) zawartość węgla jest mniejsza w porównaniu do temperatur z zakresu 200°C-250°C. Zawartość wodoru maleje natomiast w procesach ALD-woda wraz ze spadkiem temperatury. W ogólności jednak zawartość węgla w warstwach otrzymanych metodą ALD-ozon jest o jeden rząd wielkości, w procentach atomowych, większa niż w warstwach otrzymanych metodą ALD-woda. Zawartość wodoru natomiast pozostaje na porównywalnym poziomie.

Podstawowym parametrem charakteryzacji procesów ALD jest tempo wzrostu. W procesach osadzania ZnO metodą ALD-woda maksymalne tempo wzrostu odnotowano dla temperatury osadzania wynoszącej 150°C. Ten wynik jest zgodny z danymi dotyczącymi okna wzrostu dla ZnO w procesach ALD-woda, którego wartość zawiera się pomiędzy 150-175°C [171]. Zarówno niższa jak i wyższa temperatura osadzania wpływa na zmniejszenie tempa wzrostu warstwy.

Jednorodne pokrycie powierzchni krzemowych, szklanych i kwarcowych było możliwe w całym testowanym zakresie temperaturowym. Jak się okazało ozon nie tylko wpływał na tempo wzrostu i zawartość domieszek nieintencjonalnych, ale również na jakość krystalograficzną i kształt ziaren. Wszystko to wpłynęło na zmianę parametrów elektrycznych warstw co pokazano szczegółowo w pracy [132].

### **3.2. Wzrost warstw HfO<sub>2</sub> metodą ALD-ozon**

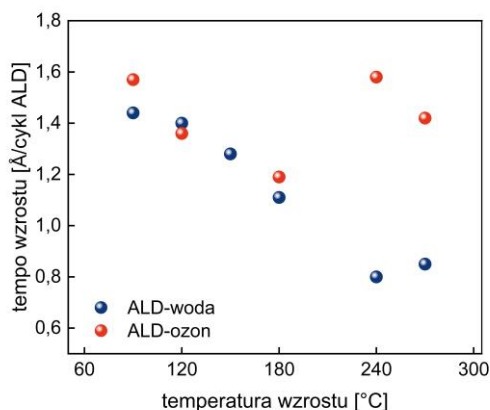
Po zoptymalizowaniu wzrostu warstw ZnO metodą ALD-ozon kolejnym etapem była ocena jakości warstw HfO<sub>2</sub> z nowym prekursorem. Optymalizacja wzrostu metodą ALD-ozon prowadzona była, podobnie jak w przypadku osadzania ZnO, w różnych temperaturach wzrostu, od 90°C do 270°C. Ponieważ w temperaturze powyżej 270°C wzrost warstwy był niejednorodny nie były prowadzone procesy w wyższych temperaturach. Warstwy wzrastane metodą ALD-ozon w temperaturze do 270°C spełniały kryteria jakościowe stawiane cienkim warstwom w nanotechnologii tj.: jednorodność, niski RMS, kontrolowalność i powtarzalność procesowa. Jako prekursor metalu również zastosowano związek organiczny, TDMAH ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N)<sub>4</sub>Hf, jak wynika z jego budowy bogaty w grupy metylowe: -CH<sub>3</sub>, które, podobnie jak w przypadku DEZ są potencjalnym źródłem nieintencjonalnych domieszek w otrzymywanych materiałach ALD. Zawartość dostarczanego ozonu podczas pulsu tlenowego ustalona została na



podstawie pomiarów tempa wzrostu warstwy i oceny gęstości materiału według wyników uzyskanych dzięki pomiarom XRR. Generator ozonu wykorzystany w procesie według producenta ma maksymalną wydajność generowania 120mg/l, co odpowiada w przybliżeniu wysyceniu podawanego tlenu w 7.5% ozonem. Zarówno ciśnienie podawanego tlenu jaki i szybkość przepływu była regulowana i kontrolowana stale podczas prowadzenia procesów. Zalecane jest utrzymanie stałej wartości przepływu tlenu podczas pracy urządzenia, co zapewni optymalną pracę zaworu iglicowego w ozonatorze. Układ umożliwia sterowanie szybkością przepływu dostarczanego tlenu i jest ograniczony pomiędzy. Zmniejszenie podawanego ciśnienia tlenu do urządzenia umożliwia wyższe wysycenie tlenu ozonem. Wykonywane pomiary XRR dowiodły, że pomimo zachowanego tempa wzrostu warstw zmieniała się gęstość elektronowa materiału. Optymalizacja procesów ALD często ograniczana jest do etapu samonasycenia. Jak widać nie jest to parametr wystarczający, a kontrola składu chemicznego już na etapie określania dawek prekursora jest uzasadniona. Tutaj pomiar XRR okazał się nieocenionym narzędziem badawczym wspierającym procesy osadzania warstw ALD na etapie optymalizacji technologicznej. Podczas optymalizacji tempa wzrostu wykonywane były kontrolne pomiary XRR. Na podstawie otrzymanych wyników ustalana była grubość powłoki oraz jej gęstość. Okazało się, gęstość materiału wzrasta wraz ze zwiększonym wysyceniem pulsu powietrza ozonem podawanego do komory reakcyjnej oraz temperaturą tej komory. W procesach wzrostu zastosowano zatem najniższe możliwe, bo ograniczone warunkami technologicznymi, ciśnienie tlenu podawanego do urządzenia.

Poniżej na Rys. 16 pokazano, jak kształtuje się tempo wzrostu warstw  $\text{HfO}_2$  w procesach ALD z różnymi prekursorami tlenowymi. Tempo wzrostu  $\text{HfO}_2$  metodą ALD-ozon jest, w zakresie temperatur od  $90^\circ\text{C}$  do  $180^\circ\text{C}$ , porównywalne do wartości uzyskanych dla metody ALD-woda. W temperaturach powyżej  $180^\circ\text{C}$  obserwowany jest natomiast trend odwrotny. Tempo wzrostu warstwy rośnie, jeśli proces prowadzony jest z ozonem, natomiast znacznie spowalnia, jeśli do komory wprowadzana jest para wodna. Warstwy otrzymane metodą ALD-ozon charakteryzuje prawie dwukrotnie wyższe tempo wzrostu, niż warstwy otrzymane metodą ALD-woda ( $1.6 \text{ \AA/cykl}$  dla metody ALD-ozon i  $0.8 \text{ \AA/cykl}$  dla metody ALD-woda, wartości podano dla temperatury wzrostu warstwy  $240^\circ\text{C}$ ). Świadczy to o odmiennej dynamice wzrostu warstwy  $\text{HfO}_2$  w wyższych

temperaturach w zależności od rodzaju użytego źródła tlenu. Dekompozycja prekursora metalu w połączeniu z potencjałem utleniającym prekursora tlenowego w wyższych temperaturach prawdopodobnie miała znaczący wpływ na zachodzące mechanizmy wzrostu. Można przypuszczać, że wysoka reaktywność ozonu miała w tym zakresie temperatur wiodący wpływ na zajście reakcji wymiany pomimo termicznego rozpadu prekursora metalu.



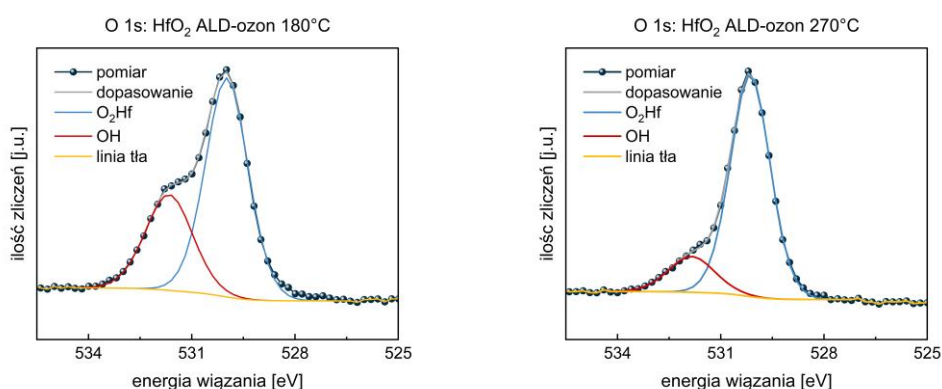
**Rys. 16:** Tempo wzrostu warstw  $HfO_2$ . Porównanie metod ALD-woda i ALD-ozon w funkcji temperatury wzrostu.

Po optymalizacji długości pulsów podawania prekursorów do komory reakcyjnej i ustaleniu tempa wzrostu warstw w temperaturach od 90° C do 270°C wykonana została analiza XPS warstw o grubości 50 nm. Na podstawie otrzymanych wyników nie stwierdzono obecności innych pierwiastków niż Hf, O oraz C. Obecność węgla była spodziewana, gdyż jak już wcześniej wyjaśniono może to być konsekwencją stosowania organicznych prekursorów metalu. Poniżej w Tab. 2 przedstawiono procentową zawartość wykrytych pierwiastków chemicznych w warstwach  $HfO_2$  osadzanych w zależności od prekursora tlenowego i temperatury komory reakcyjnej. Szczegółowa analiza linii poszczególnych pierwiastków dostarczyła informacji strukturze chemicznej.

Linia tlenu O 1s warstw  $HfO_2$  kształtuje się w zależności od użytego prekursora tlenowego i temperatury osadzania, co dla warstw osadzanych metodą ALD-ozon pokazano na Rys. 17 poniżej .

**Tab. 2:** Zawartość procentowa pierwiastków chemicznych w warstwach HfO<sub>2</sub> osadzanych metodą ALD na podstawie analizy wyników pomiaru metodą XPS.

|       | ALD-ozon    |             |             | ALD-woda    |             |             |
|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|       | Hf [% at.]  | O [% at.]   | C [% at.]   | Hf [% at.]  | O [% at.]   | C [% at.]   |
| 90°C  | <b>20.7</b> | <b>42.2</b> | <b>37.1</b> | <b>21.5</b> | <b>47.4</b> | <b>31.3</b> |
| 180°C | <b>27.7</b> | <b>51.9</b> | <b>23.3</b> | <b>26.1</b> | <b>53.2</b> | <b>20.8</b> |
| 240°C | <b>29.4</b> | <b>50.3</b> | <b>20.3</b> | <b>25.7</b> | <b>52</b>   | <b>22.3</b> |



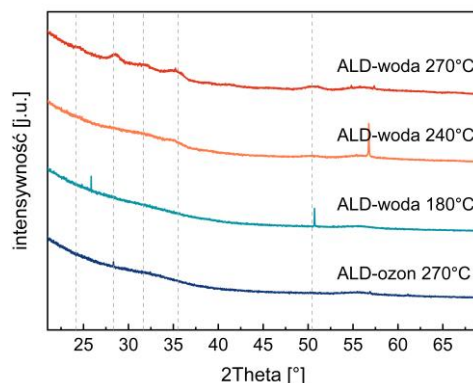
**Rys. 17:** Analiza składowych linii O1s warstw HfO<sub>2</sub> osadzanych metodą ALD-ozon otrzymanych w pomiarze XPS.

Procentowa zawartość poszczególnych pierwiastków w zależności od temperatury wzrostu i procentowy udział w składowych linii O 1s warstw HfO<sub>2</sub> osadzanych metodą ALD-ozon zebrano w Tab. 3. Warstwy HfO<sub>2</sub> osadzone metodą ALD-woda wydawały się stabilniejsze chemicznie. Wartość temperatury osadzania nie miała wpływu na procentowy udział poszczególnych składowych w próbkach.

**Tab. 3:** Procentowa analiza składu pierwiastkowego warstw HfO<sub>2</sub> wykonanych metodą ALD-ozon. Procentowa zawartość składowych linii O 1s.

|       | Hf   | O    | O(Hf) | O(OH) | C    | Hf/O |
|-------|------|------|-------|-------|------|------|
| 90°C  | 20.7 | 42.2 | 21.2  | 21.2  | 37.1 | 1    |
| 180°C | 27.7 | 51.9 | 34.9  | 32.7  | 23.3 | 0,8  |
| 240°C | 29.4 | 50.3 | 42.3  | 15.8  | 20.3 | 0,7  |

Na następnym etapie charakteryzacji warstw  $\text{HfO}_2$  wykonane zostały pomiary XRD. Dyfraktogram przedstawiający jakość krystalograficzną warstw  $\text{HfO}_2$  zaprezentowano na Rys. 18. Linie przerywane wskazują wartości kąta  $2\theta$ , dla których następuje wzmocnienie interferencyjne w obrazie dyfrakcyjnym monoklinicznego  $\text{HfO}_2$ . Okazało się, że ozon wpływał na jakość krystalograficzną warstw w sposób ograniczający krystalizację.



**Rys. 18:** Dyfraktogram warstw  $\text{HfO}_2$  osadzanych metodą ALD.

Zgodnie z teorią zjawiska krystalizacji od grubości warstwy zależy stopień krystalizacji. Badane warstwy miały po około 50 nm, co mogło być niewystarczające do uzyskania warstw polikrystalicznych o dobrze zdefiniowanych rozmiarach krystalitów.

### 3.3. Dyskusja wyników optymalizacji procesów ALD-ozon

Przedstawione zostały powyżej wyniki optymalizacji procesów osadzania  $\text{HfO}_2$  metodą ALD-ozon. Zostało pokazane, że metoda ALD-ozon umożliwia wzrost jednorodnych warstw  $\text{HfO}_2$  w szerokim zakresie temperatur. Zarówno z wodą jak i z ozonem występują problemy z jednorodnością pokrycia jedynie w temperaturach bliskich 300°C. Warstwy ALD wzrastane w ekstremalnie niskich, jak na proces ALD temperaturach tj. 90°C charakteryzuje oprócz wysokiego tempa wzrostu wysoka zawartość nieintencjonalnej domieszki w postaci węgla związanego na powierzchni (Tab. 2). Zwiększenie temperatury procesu spowodowało spadek zawartości tej domieszki o około 10%. Co ciekawe nie odnotowano znacząco wyższego poziomu zanieczyszczeń  $\text{HfO}_2$  osadzanego metodą ALD-ozon, jak wcześniej raportowano [118]. Okazało się, natomiast, że wraz ze wzrostem temperatury procesu dynamicznie zmienia się składowa

linii tlenu związana z wiązaniem wody na powierzchni. Prawdopodobnie wysoka temperatura w połączeniu z ozonem w warunkach procesu ALD zmniejsza ilość wolnych grup -OH na powierzchni, co pokazano w pracach [149], [154], [155]. Ustalono stosunek stechiometryczny w materiale, odejmując od całkowitej linii tlenu składową związaną z zaadsorbowaną powierzchniowo wodą. Okazało się, że wszystkie warstwy są ubogie w tlen. Podczas gdy idealny stosunek Hf/O wynosi 0.5, to jak widzimy w Tab. 3 w warstwach osadzanych metodą ALD-ozon wprawdzie wraz ze wzrostem temperatury ta zależność poprawia się jednak nadal jest zbyt wysoka, bo dla powierzchni przygotowanej w 270°C wynosi 0.7. Natomiast warstwy HfO<sub>2</sub> wzrastane metodą ALD-woda wydają się być materiałem bardzo stabilnym chemicznie. Różnice w temperaturze osadzania warstw w zakresie 180-240°C nie wpływały na stechiometrię tlenku, która z wartością 0.6 kształtowała się na bliższym idealnemu poziomie, jednak nadal była to wartość wyższa o 20% od idealnej.

Analizowane warstwy były amorficzne, jedynie powłoka osadzana metodą ALD-woda w 240°C i 270°C miała tendencję do zaczątków krystalizacji, która stawała się wyraźniejsza wraz ze wzrostem temperatury procesu ALD. Znaczna szerokość połówkowa linii dyfrakcyjnych wskazuje raczej na tym etapie na formowanie się materiału nanokrystalicznego. W przypadku warstwy osadzonej metodą ALD-ozon nieuporządkowana struktur atomowa pozostawała bez względu na temperaturowe warunki wzrostu, podobna sytuacja została opisana w pracy [163], jednak autorzy zwrócili uwagę, że podwójny puls woda-ozon w jednym cyklu ALD aktywował zjawisko krystalizacji warstw podczas osadzania metodą ALD.

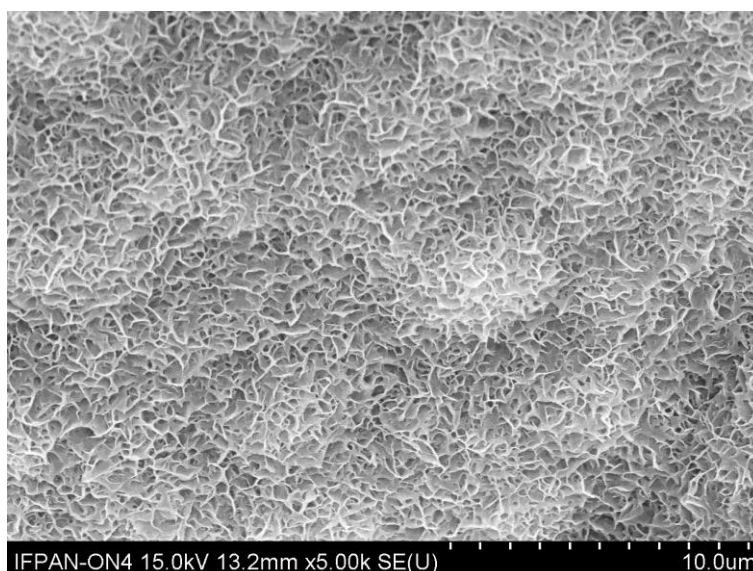
## Rozdział 4

### *Warstwy ALD w symulowanym środowisku biologicznym*

Wysokie wymagania jakościowe jakie muszą spełniać biomateriały wynikają przede wszystkim z konieczności zapewnienia bezpiecznego użytkowania ich w kontakcie z żywą tkanką, w perspektywie krótko i długoterminowej. Perspektywa długoterminowa oznacza w implantologii kilkanaście lat, chociaż obecnie oczekuje się, że nawet do kilkudziesięciu lat wydłuży się czas użytkowania implantu przez pacjenta, bez konieczności re-operacji. Obecnie znane barierowe powłoki implantów nie są w stanie sprostać takim wymaganiom. Dla zapewnienia optymalnych warunków zespolenia i regeneracji tkanki kostnej z powierzchnią implantu potrzebne są funkcjonalne powierzchnie implantów. Obecne badania ukierunkowane są na projektowanie powłok osteo-konduktywnych [172], czyli zapewniających optymalne warunki do wzrostu kości w postaci rusztowania oraz osteo-indukcyjnych [173], czyli inicjujących proces różnicowania komórek kostnych. Badania wskazują, że tlenki metali przejściowych osadzone na podłożach neutralnych metodą ALD można jednoznacznie określić jako bio-indukcyjne [4]–[6], [63]. Proces projektowania bio-konduktywnych powłok implantów kostnych z  $\text{HfO}_2$  zostanie przedstawiony w kolejnych dwóch rozdziałach. Główny nacisk w badaniach został położony na opracowanie materiału, który będzie samoistnie inicjował proces tworzenia się komponentu nieorganicznej tkanki kostnej (BA), na powierzchni ciała stałego (implantu) czyli będzie to materiał o potencjale pro-apatyto twórczym.

#### 4.1. Tlenki metali przejściowych otrzymywane metodą ALD w symulowanym środowisku biologicznym

Wyniki prac badawczych prowadzonych przez autorkę dysertacji prowadzone na amorficznych warstwach ALD [4]–[6] jednoznacznie wskazywały na preosteogeny charakter tych materiałów. Literatura przedmiotu dotycząca pro-apatyto twórczych właściwości powierzchni tlenkowych wskazuje natomiast, że  $ZrO_2$  z uwagi na obecność wolnych grup  $-OH$  na powierzchni ma zdolność łączenia jonów  $Ca^{2+}$  [174]. Bazując na dostępnej wiedzy w pierwszej kolejności została osadzona na stomatologicznym implancie kostnym powłoka  $ZrO_2$  i testowana z uwagi na biokondukcyjne właściwości w eksperymencie z SBF<sup>17</sup>.



*Rys. 19: Zdjęcie SEM powierzchni implantu stomatologicznego z pokrytego warstwą  $ZrO_2$  i inkubowanego w roztworze SBF. Widoczna jest, typowa dla HA, rozbudowana morfologia powierzchni, o płatkowatej strukturze [175]. Detektor elektronów wtórnych, 15 kV AV, powiększenie 5000 x.*

Przez 3 tygodnie implant, którego powierzchnia została pokazana na Rys. 2, z powłoką  $ZrO_2$  zanurzony był w przygotowanym roztworze SBF i utrzymywany w stabilnych, zbliżonych do fizjologicznych warunkach, tj.: w temperaturze  $37^{\circ}C$ . Po zakończeniu eksperymentu przeprowadzone zostały obserwacje mikroskopowe SEM

---

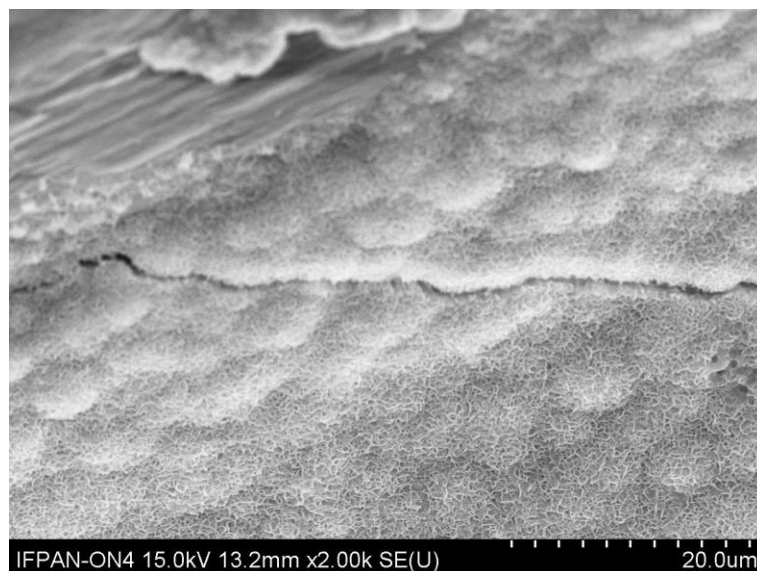
<sup>17</sup> Eksperyment przygotowany zgodnie z opisem w rozdziale 5.4.2

powierzchni, które potwierdziły, jak pokazano na Rys. 19, że  $ZrO_2$  ma pro-apatyto twórczy potencjał.

Jednocześnie poprawność wykonania oraz skuteczność eksperymentu SBF jako narzędzie badawcze do oceny biokonduktywności materiałów zostały potwierdzone [156]. Na powierzchni implantu obserwowana była warstwa  $\alpha$ -CaP o rozbudowanej morfologii powierzchni i płatkowatej strukturze, typowej dla HA [175].

Wpisując się w trend maksymalnego ograniczania testów z wykorzystaniem zwierząt w badaniach laboratoryjnych eksperyment z SBF zaadoptowano jako narzędzie badawcze w procesie optymalizacji osteokonduktywnych właściwości  $HfO_2$ .

Dokładne obserwacje powierzchni implantu po inkubacji w SBF niespodziewanie uwidoczniły jednak pewne problemy z ciągłością pokrycia HA. Zaobserwowano propagujące podłużne pęknięcia powłoki mineralnej (Rys. 20). Ponieważ nadrzędnym kryterium doboru materiałów w medycynie jest bezpieczeństwo użytkowania, to wytrzymałość mechaniczna powłoki jest kluczowa. O potencjalnie słabej przyczepności powłoki HA do powierzchni wspomniano już w pracy [88]. Obserwowano formowanie się HA na powierzchni  $TiO_2$ , ale o słabej integracji. Podobne, wzdłuż propagujące pęknięcia są do zaobserwowania na powierzchniach.



**Rys. 20:** Zdjęcie SEM powierzchni implantu stomatologicznego z pokrytego warstwą  $ZrO_2$  i inkubowanego w roztworze SBF. Widoczne jest pęknięcie powłoki HA. Detektor elektronów wtórnych, 15 kV AV, powiększenie 2000 x.



Oczywistym było, że przed kontynuacją badań z  $ZrO_2$  istnieje konieczność przeprowadzenia badań wytrzymałościowych. Takie badania nie mieściły się jednak w zakresie niniejszej rozprawy. Pojawiła się konieczność rozważenia dalszego kierunku technologicznej optymalizacji procesów ALD ukierunkowanej biofunkcjonalnie.

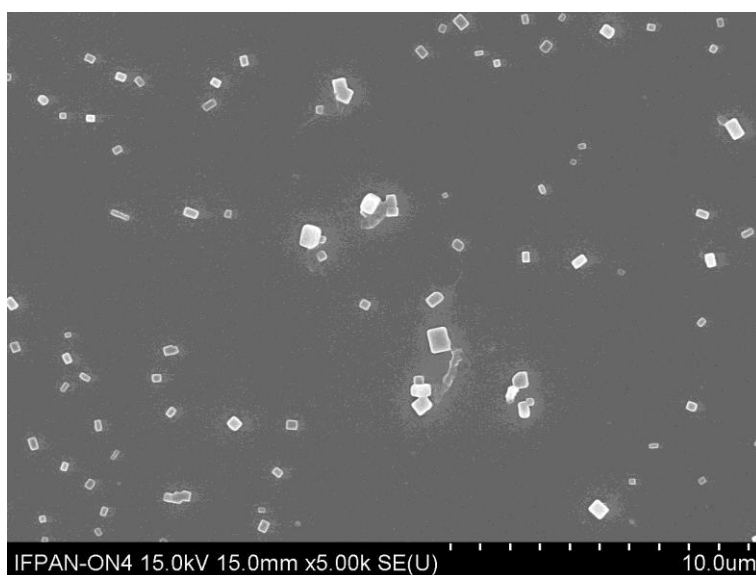
Częściowa toksyczność amorficznego  $ZrO_2$  opisana w pracy [4], wymagające badań wytrzymałościowych wyniki eksperymentu z powłoką  $ZrO_2$  spowodowały, że nie kontynuowano badań nad  $ZrO_2$  w ramach niniejszej rozprawy. Niepokojące doniesienia o potencjalnej cytotoksyczności  $TiO_2$  [48] oraz praca donosząca o obecności jonów metali w okolicznych tkankach i kinetyce ich toksyczności [50] pochodzących z implantów bazujących na tytanie były natomiast przyczynkiem do podjęcia decyzji o nie podejmowaniu testów z  $TiO_2$ . Tym samym potwierdziła się słuszność decyzji podjętej przez autorkę dysertacji, dotycząca wyboru  $HfO_2$  do badań optymalizacyjnych jako materiału o najwyższym potencjale osteo regeneracyjnym [6].

Spółeczna potrzeba prowadzenia badań w obszarze zapewnienia kompleksowej opieki medycznej była głównym aspektem motywującym do rozpoczęcia kolejnego etapu prac w tematyce projektowania pre-osteogennych powłok implantów ze wskazaniem medycznym dla pacjentów z OS. Zaobserwowany potencjał do hamowania proliferacji osteoklastów i przeciwzapalny potencjał to kluczowe cechy biofunkcjonalnej powłoki implantu na bazie  $HfO_2$  [6]. Co ważne, w przeprowadzonych badaniach na linii komórek pre-osteoblastycznych materiał nie wykazywał cech cytotoksyczności [6]. Do komplementarnej analizy materiału na poziomie badań przesiewowych pozostawała do wyjaśnienia istotna kwestia pro-apatyto twórczych możliwości powłoki z  $HfO_2$ .

#### **4.2. $HfO_2$ otrzymywany metodą ALD w symulowanym środowisku fizjologicznym**

Powłoka amorficznego  $HfO_2$  osadzanego metodą ALD-woda w temperaturze  $90^\circ C$ , dedykowana pacjentom z OS [6], została poddana w pierwszej kolejności testom w symulowanych warunkach fizjologicznych. Głównym celem była ocena potencjału do spontanicznego inicjowania osadzania się jonów  $Ca^{2+}$  i  $PO_4^{3-}$  na powierzchni. Obserwacje mikroskopowe SEM prowadzono po 24h, 48h, 7 i 28 dniach inkubacji w płynie SBF. Pierwsza seria obserwacji SEM dała pozytywne wyniki dotyczące wytrzymałości materiału w niesprzyjających warunkach środowiskowych. Wodny roztwór soli

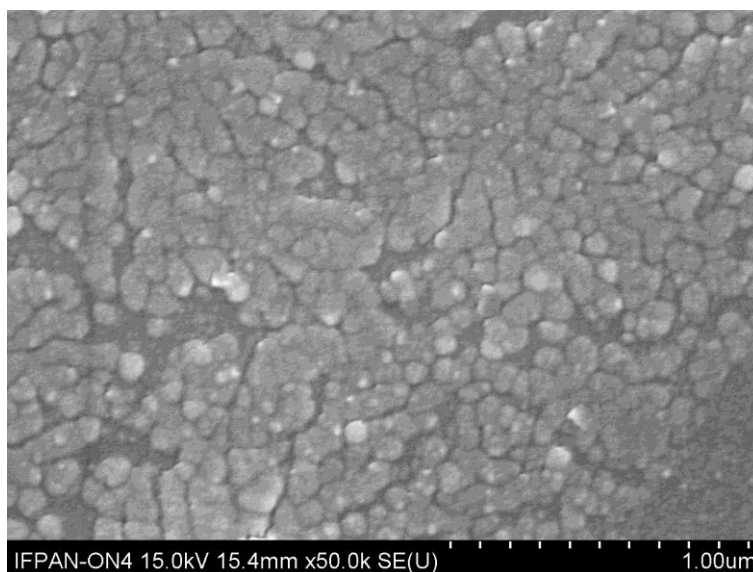
fizjologicznej w temperaturze 37°C jest agresywnym środowiskiem dla materiałów o powierzchniach metalowych i tlenkowych, dlatego ważna jest funkcja barierowa powłoki oddzielająca powierzchnię metalu od środowiska biologicznego. Ponadto wytrzymałość powłoki jest kluczowa ze względów bezpieczeństwa. Wolne fragmenty powłoki mogłyby rozprzestrzeniać się po organizmie wraz z płynami ustrojowymi, kumulować bądź tworzyć zatory. W przypadku testowanej powłoki nie zaobserwowano pęknięć, nieciągłości ani delaminacji warstwy od podłoża.



*Rys. 21: Zdjęcie SEM powierzchni warstwy HfO<sub>2</sub> osadzonej metodą ALD-woda w temperaturze 90°C po czterech tygodniach inkubacji w roztworze SBF. Detektor elektronów wtórnych, 15 kV AV, powiększenie 3000 x*

Wykonując pomiar EDX, na żadnym etapie nie stwierdzono jednak obecności pierwiastków Ca i P. Po okresie czterech tygodni pojawiły się na powierzchni kryształki NaCl co ilustruje Rys. 21 powyżej. Ponieważ obserwowany NaCl na powierzchni powłoki implantu nie był wynikiem oczekiwanym, podjęte zostały kolejne działania optymalizacyjne.

Głównym, zmiennym parametrem technologii ALD, a jednocześnie znacząco wpływającym na właściwości warstw jest temperatura panująca w komorze reakcyjnej podczas procesu osadzania. Kolejną zmienną jest liczba cykli ALD mająca swoje odwzorowanie w grubości powłoki. Jak wiadomo struktura krystalograficzna HfO<sub>2</sub> zmienia się wraz z grubością powłoki. Początkowo mogą pojawiać się mikro ziarna, będące zaczątkami krystalizacji.

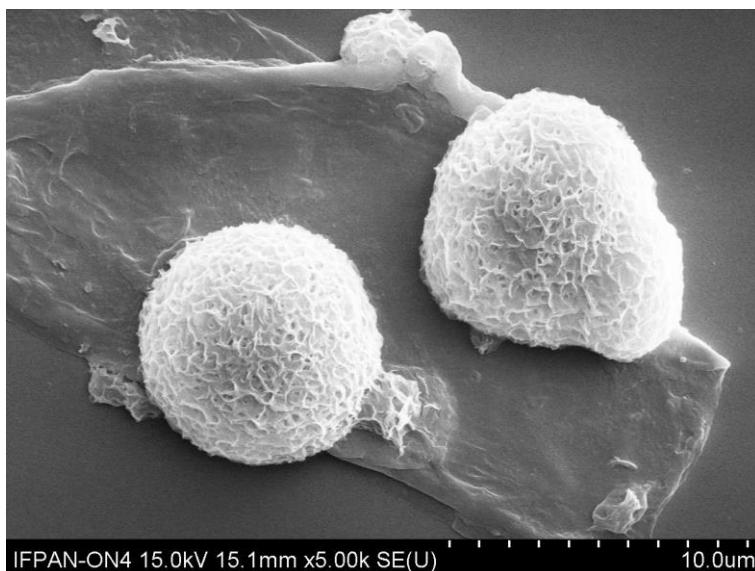


**Rys. 22:** Zdjęcie SEM powierzchni warstwy  $\text{HfO}_2$  osadzanego metodą ALD-woda w temperaturze  $180^\circ\text{C}$  po czterech tygodniach inkubacji w roztworze SBF w temperaturze  $36.6^\circ\text{C}$ . Detektor elektronów wtórnych,  $15\text{ kV AV}$ , powiększenie  $50000\times$ .

Ze względu na wytrzymałość mechaniczną i odwzorowanie chropowatości i porowatości powierzchni, a jednocześnie ze względów społeczno-ekonomicznych ograniczenie grubości powłoki wydawało się jednak kluczowe. Postanowiono przeprowadzenie cyklu optymalizacyjnego przy stałej grubości powłoki. Wszystkie badane powłoki w ramach tej pracy miały zatem stałą grubość  $50\text{ nm}$ . Została następnie zwiększona temperatura procesu ALD. Okazało się, że dostarczenie energii do układu podczas osadzania powłoki znacząco wpłynęło na wzajemną interakcję powierzchni powłoki i jonów zawartych w roztworze fizjologicznym, co można zaobserwować na Rys. 22, powyżej. Na całej powierzchni powłoki  $\text{HfO}_2$  przygotowanej metodą ALD w temperaturze  $180^\circ\text{C}$  osadzały się jony zawarte w roztworze SBF. Ponieważ jednak nadal nie odnotowano obecności pierwiastków Ca ani P kontynuowano testy.

Okazało się, że maksymalne zwiększenie temperatury wzrostu ALD, na jaką pozwalał dostępny reaktor ALD, tj. do  $300^\circ\text{C}$  umożliwiło wzrost warstwy o oczekiwanych właściwościach bio-konduktywnych.

Po inkubacji w warunkach fizjologicznych przez dwa tygodnie zaobserwowano na powierzchni sferyczne struktury o średnicy kilku  $\mu\text{m}$  co pokazano na Rys. 23. powyżej. Odnotowano również sygnał od Ca i P w pomiarze EDX. Struktury o kulistym kształcie oraz rozbudowanej morfologii powierzchni, o płatkowatej strukturze były rozsiane w pewnych odległościach, ale jednorodnie na powierzchni próbki.

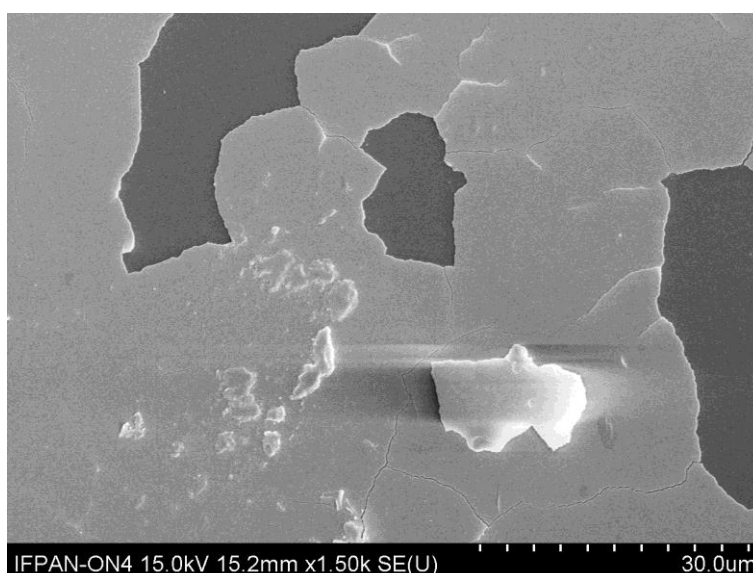


**Rys. 23:** Zdjęcie SEM sferycznych struktur na powierzchni warstwy  $\text{HfO}_2$  osadzanego metodą ALD-woda w temperaturze  $300^\circ\text{C}$ . po czterech tygodniach inkubacji w roztworze. Detektor elektronów wtórnych, 15 kV AV, powiększenie 5000 x.

Tym samym potwierdzona została główna hipoteza przedstawianej dysertacji. Wykazano, że odpowiednio przygotowana warstwa  $\text{HfO}_2$  posiada właściwości samoistnego promowania osadzania się jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$  na swojej powierzchni, czyli posiada cechy powłoki biofunkcjonalnej o pro-apatytu twórczych właściwościach.

Niestety na krawędziach próbki spostrzeżono znaczne ubytki powłoki. Na dużych obszarach widoczne były uszkodzenia pokazane poniżej na Rys. 24. Oczywiście mógł to być efekt powstałych naprężeń podczas preparatyki próbki do pomiaru (próbki były łamane mechanicznie). Jakkolwiek, świadczył o zmniejszonej adhezji powłoki do podłoża, w tym przypadku kwarcowego. Mimo że, nowa, biomimetyczna właściwość materiału została zaobserwowana, to wiadome było, że obserwowane uszkodzenia dyskwalifikują tak wykonaną powłokę z dalszych badań z uwagi na brak wytrzymałości mechanicznej powłoki.

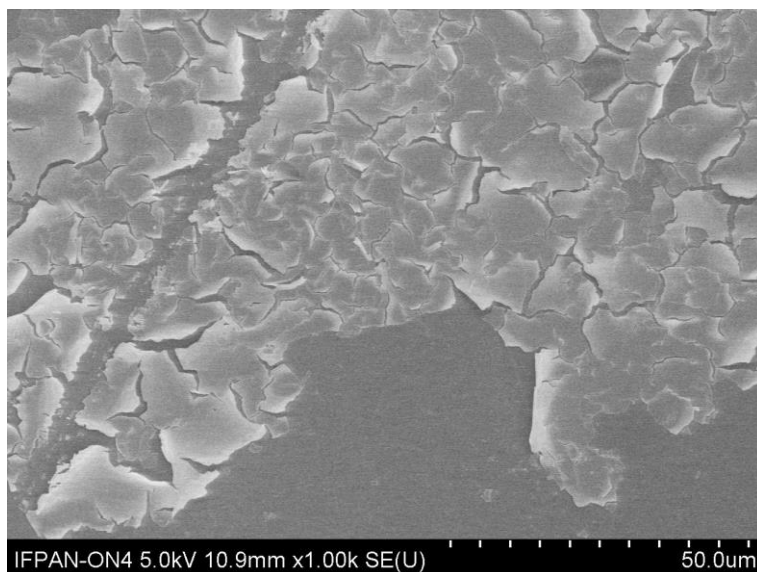
Kolejnym istotnym modyfikowalnym parametrem w technologii ALD jest dobór prekursorów. Ponieważ zarówno z zebranego doświadczenia jak i przeglądu literatury naukowej wiadomo było, że TDMAH jest wysokiej jakości prekursorem hafnu w procesach ALD, nie planowane były w tym obszarze modyfikacje. Zmieniony został prekursor tlenowy. Wysoko reaktywna forma tlenu w postaci ozonu zastąpiła parę wodną, dotychczas traktowaną jako prekursor pierwszego wyboru. Testy biokonduktywności warstw ALD-ozon przebiegały podobnie jak w przypadku warstw wykonanych metodą ALD-woda. W pierwszej kolejności testowana była niskotemperaturowa powłoka z procesów ALD-ozon.



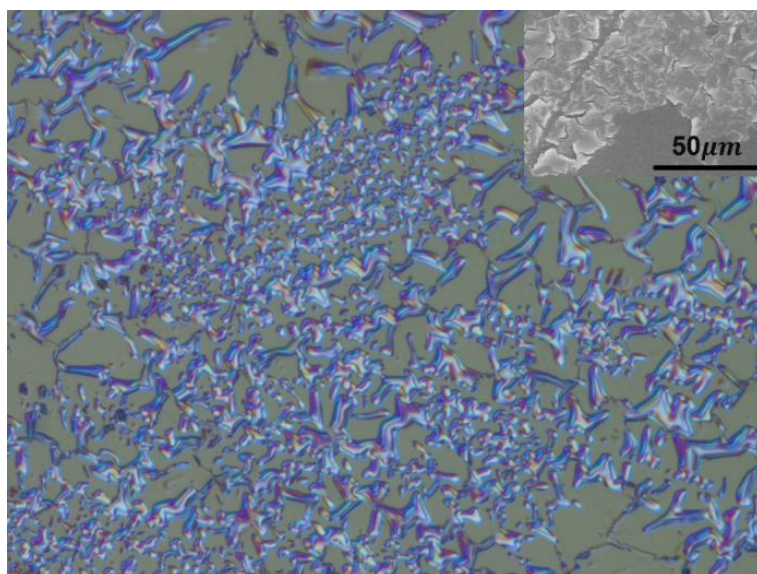
**Rys. 24:** Zdjęcie SEM uszkodzonej powierzchni powłoki  $\text{HfO}_2$  osadzonej metodą ALD-woda w  $300^\circ\text{C}$ . Detektor elektronów wtórnych, 15 kV AV, powiększenie 50000 x.

Jednorodna po procesie ALD warstwa  $\text{HfO}_2$ , przygotowana w  $90^\circ\text{C}$  metodą ALD-ozon, po inkubacji w płynie SBF niespodziewanie uległa delaminacji, co ciekawe względnie jednorodnie na całej powierzchni próbki co zostało przedstawione poniżej na Rys. 25. Delaminacja powłoki, jak wcześniej zostało podkreślone, jest warunkiem całkowicie dyskwalifikującym materiał do aplikacji jako powłoka stałych implantów kostnych, z uwagi na bezpieczeństwo pacjenta. Ponieważ jednak istnieje wysokie zapotrzebowanie na biodegradowalne materiały implantologiczne to właśnie jednorodność w delaminacji dobrze widoczna poniżej na (Rys. 26) sugeruje, że może to

być przyszłościowy obszar aplikacyjny powłoki  $\text{HfO}_2$  wykonanej niskotemperaturową metodą ALD-ozon.



**Rys. 25:** Zdjęcie SEM delaminacji warstwy  $\text{HfO}_2$  osadzonej metodą ALD-ozon w temperaturze  $90^\circ\text{C}$  po inkubacji w roztworze SBF. Detektor elektronów wtórnych, 15 kV AV, powiększenie 1000 x.

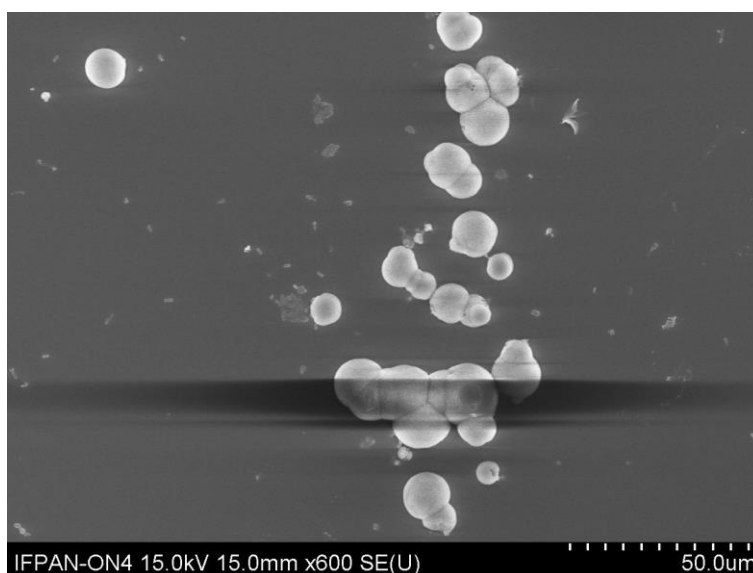


**Rys. 26** Zdjęcie z mikroskopu optycznego zniszczonej powierzchni warstwy  $\text{HfO}_2$  osadzonej metodą ALD-ozon w temperaturze  $90^\circ\text{C}$ . Wstawka pokazuje obraz z mikroskopu SEM.

Biowchłaniaalne rusztowania wytwarzane są najczęściej z materiałów polimerowych, o niskiej wytrzymałości temperaturowej (w temperaturze powyżej  $100^\circ\text{C}$  ulegają rekrytalizacji i tracą swoje właściwości mechaniczne). Możliwość wykonania powłoki  $\text{HfO}_2$  w temperaturze  $90^\circ\text{C}$  otwierałaby zatem możliwość zastosowanie technologii ALD na materiałach polimerowych, jednak wymaga dokładnych badań i

testów biokompatybilności z uwagi na możliwość przenikania wolnych fragmentów degradującej powłoki do okolicznych tkanek. Jednak wydaje się, że taka powolna i jednorodna biodegradacja powłoki jest przyczynkiem do podjęcia badań nad biowchłanianością. Jest to również tematyka wykraczająca poza aktualny zakres dysertacji, dlatego planowana jest do podjęcia przez autorkę w przyszłości.

Zwiększenie temperatury procesu ALD-ozon, wpłynęło pozytywnie na wytrzymałość powłok w środowisku fizjologicznym, a problem delaminacji warstwy od podłoża został wyeliminowany. Co więcej okazało się, że już 270°C wystarczyło na otrzymanie warstwy promującej osadzanie się jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$  na powierzchni. Kuliste struktury obserwowane były na wybranych obszarach powierzchni, tworząc aglomeraty po kilkanaście-kilkadziesiąt struktur umiejscowionych w bliskim sąsiedztwie, lub występowały pojedynczo (Rys. 27).



Rys. 27: Zdjęcie SEM kulistych struktur z CaP na powierzchni warstwy  $\text{HfO}_2$  osadzonej metodą ALD-ozon w temperaturze 270°C po trzech tygodniach inkubacji w roztworze SBF. Detektor elektronów wtórnych, 15 kV AV, powiększenie 600 x.

### 4.3. Podsumowanie etapu optymalizacji procesów ALD

Warstwy  $\text{HfO}_2$  są zasadniczo odporne chemicznie [176]. Powłoka przygotowana w niskotemperaturowym (90°C) procesie technologicznym ALD-ozon charakteryzuje się amorficzną strukturą i niską gęstością elektronową. Przymuszczalnie to luźno upakowane atomy stanowiły główny przyczynek do niskiej wytrzymałości powłoki w warunkach fizjologicznych. Zwiększenie temperatury procesu do 270°C umożliwiło

zaprojektowanie wydajnej powłoki pro-apatyto twórczej wytrzymałej mechanicznie na wpływ agresywnego środowiska biologicznego. Warstwa  $\text{HfO}_2$  o grubości 50 nm wzrastana w temperaturze  $270^\circ\text{C}$  metodą ALD-ozon jest powłoką amorficzną (Rys. 18), ale ma zdecydowanie lepszą gęstość elektronową. Na tej podstawie można wnioskować, że gęstość elektronowa materiału ma kluczowe znaczenie dla wytrzymałości cienkich warstw w środowisku wodnym.

Odpowiednio zoptymalizowana metoda ALD umożliwiła osadzenie na neutralnych podłożach (o zaniedbywalnej szorstkości) osteo-konduktywnych warstw  $\text{HfO}_2$ . Wykonana do tego etapu ukierunkowana biologicznie optymalizacja wzrostu warstw ALD potwierdzała jednoznacznie hipotezę o pro-apatyto twórczym potencjale powłok  $\text{HfO}_2$  wytrzymałych na działanie warunków zbliżonych do fizjologicznych.

W świetle uzyskanych wyników zdefiniowane zostały kolejne problemy badawcze do wyjaśnienia:

- niejednorodny wzrost CaP na powierzchni warstwy: pojedynczych struktur w metodzie ALD-woda i aglomeratów struktur w metodzie ALD-ozon (Rys. 27),
- kulisty charakter struktur CaP (Rys. 23, Rys. 27 ).

Otrzymane wyniki sugerują potrzebę następujących aspektów do rozważenia. Czy możliwa jest taka modyfikacja powierzchni, żeby zwiększyć powinowactwo CaP do powierzchni  $\text{HfO}_2$ , żeby uzyskać większe zagęszczenie materiału? Kluczową kwestią do wyjaśnienia było też pytanie czy punktowe powinowactwo CaP do warstwy  $\text{HfO}_2$  spełni wymogi pro-apatyto twórczej powierzchni?

Uwzględniając wyniki testów z SBF na powłokach  $\text{ZrO}_2$  oraz problemy z nieciągłością warstwy CaP (Rys. 20) pojawiła się hipoteza o wyższości punktowego powinowactwo jonów CaP do powierzchni powłoki. Autorka dysertacji postanowiła w pierwszej kolejności zweryfikować swoje przypuszczenia przeglądem literatury naukowej. Kluczowe wnioski zostały przytoczone w kolejnym podrozdziale.



### 4.3.1. Model biomineralizacji tkanki kostnej

Model zjawiska biomineralizacji kości, zarówno na etapie kościotworzenia w rozwoju embrionalnym, jak i podczas procesów kostnienia śródchrzęstnego w trakcie późniejszego rozwoju osobnika, okazał się cennym źródłem wiedzy przy wyborze kierunku optymalizacji technologii ALD w procesie projektowania powłoki implantu kostnego. Kluczowym zadaniem w prowadzonych badaniach było zaprojektowanie biomimetycznej, pro-apatyto twórczej powłoki implantu kostnego. Powłoka ma z założenia samoistnie inicjować i wspierać proces osteointegracji w zbliżony do zaprojektowanego przez naturę sposób.

Kość jest wysoko wyspecjalizowaną jednostką strukturalną układu kostnego, który odpowiada za zdolności podporowe i motoryczne. Budowa kości jest zróżnicowana w zależności od umiejscowienia i pełnionej funkcji. Atuty mechaniczne kości zależą od jej komponentu nieorganicznego tj.: BA. Struktura krystalograficzna, kształt i rozmiar krystalitów oraz ich umiejscowienie w matrycy z włókien kolagenowych są kluczowymi czynnikami wpływającymi na mechaniczne właściwości kości. Okazuje się, że składnik mineralny tworzy płytki o grubości około 5 nm, średnicy 80-kilkaset nm, które są uporządkowane prostopadle wzdłuż włókienek kolagenowych na zewnętrznej powierzchni włókna. Symulacje matematyczne pokazały, że w ten sposób uporządkowane minerały zapewniają większą sztywność i twardość kości w przeciwieństwie do równomiernego ułożenia BA względem włókna [18]. Kierunek wzrostu kryształów BA jest kluczowy dla funkcjonalności elementu, bo odpowiada za przenoszenie generowanych sił i momentów sił.

Biomineralizacja tkanki kostnej polega na uporządkowanym osadzeniu się minerałów na organicznej matrycy zewnątrzkomórkowej. Układ struktur nie jest zjawiskiem przypadkowym. Jest procesem uporządkowanym już od poziomu atomowego. Zarówno jakość krystalograficzna HA, wielkość i umiejscowienie krystalitów, równoległe do kierunku działania sił na element układu kostnego ułożenie włókien kolagenowych są uzasadnione funkcjonalnością całego układu kostnego. Biomineralizacja jest kontrolowana przez szereg wzajemnie po sobie następujących procesów i reakcji [21].

Klasyczna teoria zarodkowania krystalizacji minerałów obejmuje kilkustopniowy proces, którego zainicjowanie w roztworze jonowym nie zawsze jest termodynamicznie najkorzystniejsze, ale najbardziej dostępne z punktu widzenia energii kinetycznej [177]. Do koncepcji tej teorii doskonale wpisuje się zaczątek krystalizacji z fazy amorficznej [21], [177]. Powstawanie klastrów zarodkowania jako pierwsi zasugerowali Posner i Betts [178]. Ideą było, że ACP w aglomerując w sferycznych albo nieregularnych kształtach może stanowić punkt inicjujący transformację ACP do HA. Stąd nazywa się aglomeraty ACP jako klastry Posnera [179]. Sferyczne struktury o średnicy 50 – 80 nm krystalizują w roztworze jonowym przez dysocjację do płytek o wymiarach 50 × 30 × 2 nm [179], [180].

Są dwa możliwe procesy mineralizacji tkanki twardej w żywym organizmie. Kryształy BA mogą nukleować w unikalny sposób w przerwach pomiędzy włóknami kolagenowymi [15], [18], albo na matrycy z pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Zapoczątkowanie procesu krystalizacji, zgodnie z teorią o wiodącej roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, wynika z powstawania obszarów o zwiększonej gęstości elektronowej. Zjawisko to tłumaczy się gromadzeniem niekrystalicznego CaPO<sub>4</sub> na pęcherzykach [180]. Wiedza o biogenezie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jest niepełna jednak przypuszcza się, że istnieją obszary w błonie komórkowej preferencyjnie bogate w białka i lipidy ułatwiające inicjację zjawiska krystalizacji, w szczególności grupa białek annexyn, które są kanałami dla jonów Ca<sup>2+</sup>, ma zdolność ich wiązania z fosfolipidami błony komórkowej [180]. Początkowo osadzający się wewnątrz pęcherzyka minerał, wydostaje się na zewnątrz, gdzie mając kontakt z roztworem przesyconym względem apatytu, wzrost kryształu jest kontynuowany [181]. Proces krystalizacji jest uzależniony od wysycenia płynów ustrojowych jonami Ca<sup>2+</sup> i PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, wartości pH i obecności innych molekuł.

Nanometryczne fragmenty błony komórkowej chondrocytów są natomiast zaczątkiem nukleacji BA w procesie kostnienia śródchrzęstnego [182]. Sferyczne, amorficzne struktury CaP o średnicy 50-80 nm są uważane za prekursorsy BA. Przypuszcza się, że w początkowej fazie procesu krystalizacji a-CaP gromadzi się w przerwach pomiędzy włóknami kolagenowymi w formie sferycznych struktur (50-80 nm). Ten proces zainicjowany zostaje wydzielanymi przez osteoblasty pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi [183], [184]. Struktury a-CaP stopniowo krystalizują w

obecności dodatkowych jonów  $\text{OH}^-$  i  $\text{Ca}^{2+}$  [177] i tworzą płytkowe struktury pomiędzy włóknkami kolagenu [179]. Lotsari i in. w pracy [179] wskazują, że proces krystalizacji zachodzi bezpośrednio z fazy  $\alpha$ -CaP do apatyty. W innych pracach sugeruje się obecność OCP jako formy przejściowej pomiędzy  $\alpha$ -CaP a fosforanem wapnia [177], [185], ale też na trudności w odróżnieniu fazy OCP i apatyty ze względu na duże podobieństwo strukturalne [138]. W każdym razie jednak obecność OCP może być wskaźnikiem procesu krystalizacji [138]. Początkowo  $\alpha$ -CaP w warunkach fizjologicznego pH może przereagować do OCP, a następnie ewoluować do BA (HA z jonami węgla [186]). Amorficzne, sferyczne struktury BA przybierają następnie postać krystalitów w formie płaskich płytek [179] ułożonych w sieci włókien kolagenowych prostopadle do ich kierunku. Kryształy BA wzrastają w klastrach, przy czym klastry powstałe w wyniku kostnienia śródbłoniastego są około 10 razy mniejsze niż klastry powstałe podczas kostnienia śródchrzęstnego [184]. Uważa się, że transformacja amorficznych prekursorów BA następuje w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , również musi zachodzić proces rozpuszczenia z uwagi na różnice w objętości struktur w fazie początkowej i końcowej.

W naturalnym środowisku organizmów żywych nie występuje też ciągła warstwa HA, ale krystality o dobrze zdefiniowanym kształcie i wielkości.

## **Rozdział 5**

### *Wysokotemperaturowa modyfikacja warstw HfO<sub>2</sub> ALD*

Obecnie medycyna regeneracyjna wyznacza trendy i kierunki rozwoju skoncentrowane na spersonalizowanych metodach leczenia, dedykowanych konkretnym jednostkom chorobowym i osobniczo zmiennych. Dotyczy to zarówno wytycznych terapii i projektowania leków oraz wyrobów przeznaczenia medycznego.

Model naturalnie zachodzącej w organizmach żywych biomineralizacji CaP stał się inspiracją do dalszego, ukierunkowanego rozwoju powłoki ALD HfO<sub>2</sub>. Założonym celem niniejszego etapu było opracowanie takich metod modyfikacji powłoki HfO<sub>2</sub>, które przy zachowaniu punktowego powinowactwa jonów Ca/P do powierzchni pozwolą na intencjonalne sterowanie zagęszczeniem punktów inicjujących osadzanie się  $\alpha$ -CaP. Sporadycznie występujące struktury  $\alpha$ -CaP na powierzchni warstw otrzymanych w procesie ALD-woda (Rys. 23) i niejednorodnie rozłożone aglomeraty na warstwach po procesie ALD-ozon (Rys. 27) wskazywały na pewne ograniczenia technologii ALD. Z doniesień naukowych wynika jednak, że warstwa HfO<sub>2</sub> po procesie wygrzewania nabiera wrażliwości na poziom jonów zawartych w roztworze elektrolitowym [187]. Ten kierunek został przetestowany w kontekście zastosowań biologicznych.

## 5.1. HfO<sub>2</sub> otrzymywany metodą ALD RTP

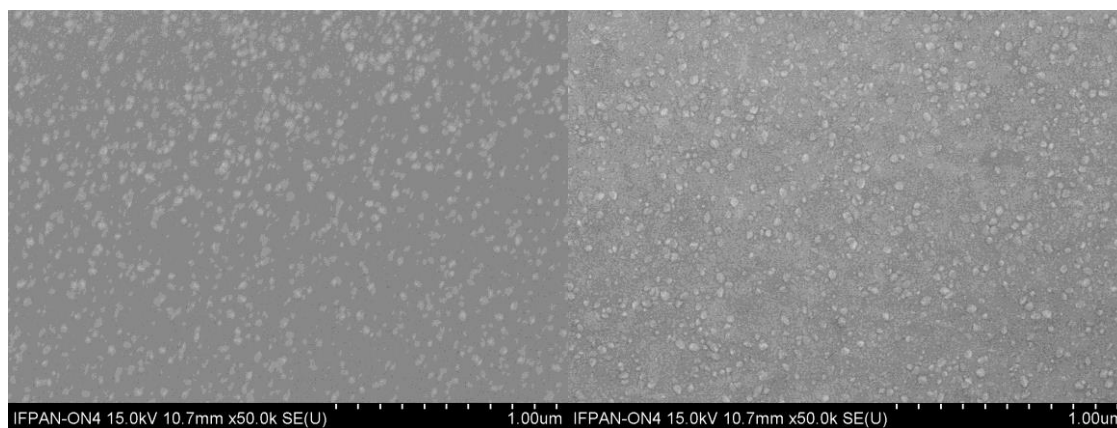
Okazuje się, że HfO<sub>2</sub> jest też badany jako potencjalny materiał sensorowy ze względu na zmienne reakcje na poziom jonów w roztworach wodnych o składzie zbliżonym do występującego w płynach ustrojowym. Stężenie jonowe SBF powinno wynosić 140mM [188] co jest porównywalnie z osoczem krwi [189]. HfO<sub>2</sub> jest wrażliwy na stężenie jonowe powyżej 10mM [187]. Zatem nawet mała zmiana w stężeniu jonowym(pH) środowiska fizjologicznego będzie indukować odpowiedź sensoryczną powierzchni [187].

Z doniesień literaturowych wynika, że potencjał powierzchni izolatora w roztworze elektrolitowym zależy od adsorpcji i dysocjacji stanów powierzchniowych [190], [191] a gęstość stanów powierzchniowych jest proporcjonalna do całkowitej powierzchni ( $R_{RMS}^2$ ) [191]. Zgodnie z modelem zaproponowanym w pracy [191] w materiałach z HfO<sub>2</sub> po wygrzaniu w temperaturach poniżej 500°C od gęstości stanów powierzchniowych, uzależniona była wrażliwość materiału na roztwór jonów w roztworze, w temperaturach wyższych wrażliwość ta zależała od stałej dysocjacji. W pracy [192] zwrócono natomiast uwagę na wpływ wygrzewania cienkiej 8 nm warstwy HfO<sub>2</sub> na jej właściwości elektryczne w zależności od pH roztworu. Autorzy pracy [187] pokazali, że tylko aniony są adsorbowane do powierzchni, reagując bezpośrednio z grupami hydroksylowymi, zastępując protony związane z powierzchnią.

### 5.1.1. Charakteryzacja fizykochemiczna HfO<sub>2</sub> ALD-woda po procesie RTP

Kierując się doniesieniami o aktywującym wpływie wysokotemperaturowego wygrzewania warstw HfO<sub>2</sub> na jego wrażliwość chemiczną przeprowadzono serię wygrzewań powłok, które następnie testowano w eksperymencie z SBF. Do procesów wygrzewania wybrane zostały warstwy wykonane metodą ALD-woda w temperaturze 180°C, 240°C, i 270°C. Warstwy wygrzewane były w atmosferze tlenu. Zakres temperatur wynosił od 400°C do 600°C. W pierwszej kolejności, po procesach RTP wykonano obrazowanie SEM. Nie zaobserwowano uszkodzeń powierzchni co świadczy o dobrej wytrzymałości materiału na gwałtowne zmiany temperatury. Morfologia uległa zmianie, na powierzchni zaobserwowano wyraźniejszą strukturę ziarnistą (Rys. 28). Wykonano pomiary XRD. Pomiar potwierdził zmianę struktury krystalicznej materiału. Otrzymany materiał, zgodnie z analizą otrzymanych dyfraktogramów, uległ

rekrytalizacji. Pomiary XRD wykonane zostały na dwóch rodzajach podłoża: krzemie i kwarcu. Powłoki osadzone na amorficznych podłożach kwarcowych były zasadniczo przygotowywane do testów z SBF, natomiast powłoki osadzone na podłożach krzemowych wykorzystywano do badań strukturalnych. Z doświadczenia grupy kierowanej przez promotora autorki dysertacji i jej własnych te dwa podłoża nie mają znaczącego wpływu na jakość warstw tlenków metali przejściowych<sup>18</sup>. Ponieważ materiał biologiczny z uwagi na plastyczność żywych komórek, jest wrażliwy na nawet niewielkie bodźce zewnętrzne wykonano kontrolny pomiar XRD zarówno na kwarcu jak i krzemie w celu potwierdzenia również w tym przypadku wpływ podłoża jest zanedbywalny. Sygnały pochodzące od HfO<sub>2</sub> pokrywały się, a zmierzony rozmiar krystalitów różnił się o  $\pm 2$  nm co mieściło się w granicach błędu pomiarowego (Tab. 4).



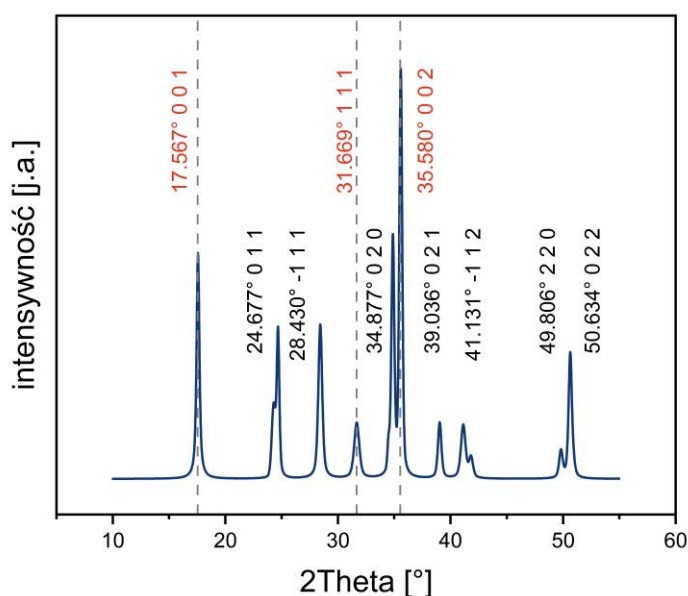
**Rys. 28:** Obrazy SEM warstwy HfO<sub>2</sub> osadzonej metodą ALD-woda w 240°C: po lewej przed procesem RTP. Po prawej po procesie RTP w 500°C w czasie 30 minut. Detektor elektronów wtórnych, 15 kV AV, powiększenie 50000 x.

Opisywane warstwy zgodnie ze wzorcem z bazy krystalograficznej (ref. 00-034-0104) mają charakter polikrystaliczny. Na dyfraktogramie zaobserwowano piki interferencyjne dla kilku kątów, wszystkie pokrywające się z wzorcowym obrazem polikrystalicznego HfO<sub>2</sub>. Wyróżniono dwa dość intensywne piki dla kąta 2Theta 17.544° i 35.534°, które pochodzą od interferencyjnego wzmocnienia rozpraszanej wiązki promieniowania X w kierunku (0 0 1), czyli prostopadłym do podłoża oraz przesunięcie pozostałych pików w kierunku kątów większych. Zgodnie z prawem Braggów stała sieci

---

<sup>18</sup> Doprecyzowując powyższe, sformułowanie dotyczy warstw amorficznych i polikrystalicznych. Wiadomo, że w przypadku warstw epitaksjalnych rodzaj podłoża jest kluczowy, nie odnosi się to jednak do tematyki niniejszej dysertacji.

kryształu jest wówczas mniejsza od wzorca. Są dwie przyczyny zmniejszenia się stałej sieci w kryształach. Naprężenia ściskające albo występujące w sieci krystalograficznej materiału luki lub podstawienia atomów w węzłach o mniejszym promieniu. Ponieważ nie zaobserwowano przesunięcia pików odwzorowujących wzmocnienie interferencyjne dla kierunku wzrostu prostopadłego do powierzchni (001) można empirycznie wnioskować o prawdopodobnych nieprężeniach w pozostałych kierunkach.



**Rys. 29:** Dyfraktogram warstwy  $HfO_2$  osadzonej metodą ALD w  $240^\circ C$  i wygrzewanej w procesie RTP w  $500^\circ C$ .

Średnia wielkość krystalitów oszacowana została metodą Sherrer'a dla mierzonych warstw na krzemie, a wyniki przedstawiono w Tab. 4. Wynik wskazuje na polikrystaliczny charakter materiału. Zasadniczo dyfraktogramy dla warstw ALD wzrastanych w różnych temperaturach, ale wygrzewanych w porównywalnych warunkach były ze sobą spójne. Jedyna zauważalna różnica to mniejszy rozmiar krystalitów o około 35% warstw ALD osadzanych w  $240^\circ C$  i  $270^\circ C$ . Również temperatura wygrzewania nie miała znaczącego wpływu na rozmiar krystalitów. Rozmiar krystalitów wyznaczony metodą Sherrer'a z uwagi na empiryczny charakter formuły jest mocno przybliżony, dlatego musi być traktowany z dużą ostrożnością. Ponieważ jednak wyniki są zbieżne dla wszystkich zmierzonych warstw i kierunków krystalograficznych

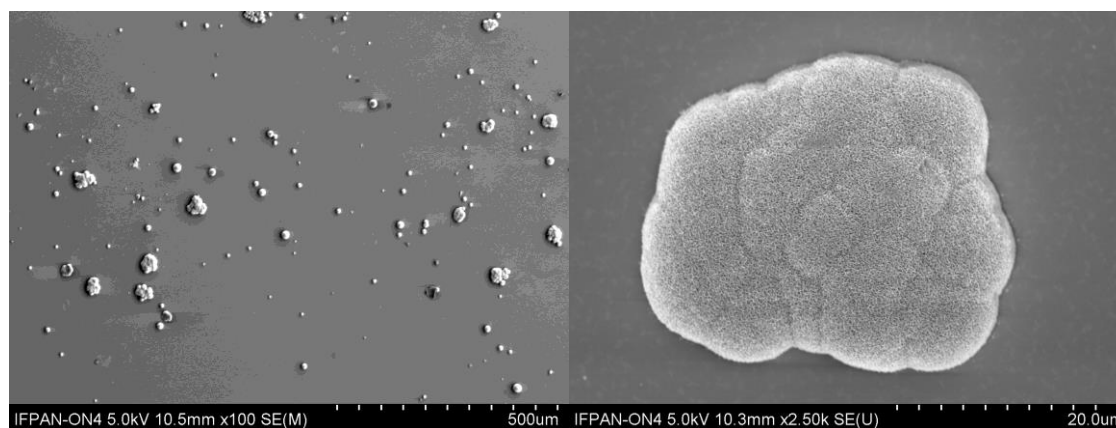
przyjęto, że w granicach błędu<sup>19</sup> nie zaobserwowano znaczącego wpływu temperatury procesu ALD i temperatury RTP na jakość krystalograficzną.

**Tab. 4:** Średni rozmiar krystalitów-D, oszacowany na podstawie formuły Sherer'a.  $\sigma$ -odchylenie standardowe

| ALD-woda<br>180°C    |                  | ALD-woda<br>240°C    |                  | ALD-woda<br>270°C    |                  | ALD-woda<br>240°C    |                  | ALD-woda<br>240°C    |                  | ALD-woda<br>240°C    |                  |
|----------------------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|
| RTP 500°C 30<br>min. |                  | RTP 500°C 30<br>min. |                  | RTP 500°C 30<br>min. |                  | RTP 400°C 30<br>min. |                  | RTP 500°C 30<br>min. |                  | RTP 600°C 30<br>min. |                  |
| krzem                |                  | krzem                |                  | krzem                |                  | kwarc                |                  | kwarc                |                  | kwarc                |                  |
| D<br>[nm]            | $\sigma$<br>[nm] | D<br>[nm]            | $\sigma$<br>[nm] | D<br>[nm]            | $\sigma$<br>[nm] | D<br>[nm]            | $\sigma$<br>[nm] | D<br>[nm]            | $\sigma$<br>[nm] | D<br>[nm]            | $\sigma$<br>[nm] |
| 26                   | 5                | 17                   | 5                | 17                   | 4                | 18                   | 3                | 15                   | 4                | 16                   | 3                |

### 5.1.2. Modyfikowany termicznie HfO<sub>2</sub> w symulowanym środowisku fizjologicznym

Przeprowadzony został ponownie eksperyment z SBF z wygrzewanymi warstwami HfO<sub>2</sub>.



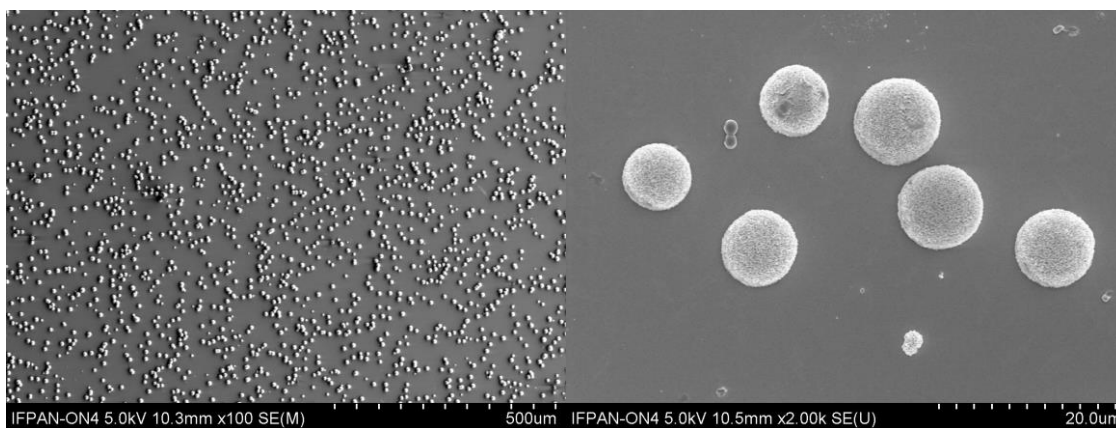
*Rys. 30: Obraz SEM struktur CaP na powierzchni powłoki HfO<sub>2</sub> osadzonej w 180°C metodą ALD-woda i wygrzewanej w 500°C przez 30 minut. Detektor elektronów wtórnych, 15 kV AV, powiększenie 100 x (po lewej) i 2000 x (po prawej).*

<sup>19</sup> Podawany jest średni wynik dla wszystkich kierunków krystalograficznych, dla których odebrano wzmacnienie interferencyjne. Błąd został wyznaczony metodą najmniejszych kwadratów.



Wyrzwanie warstw HfO<sub>2</sub> ALD-woda ma, jak się okazało, kluczowy wpływ na zwiększenie powinowactwa chemicznego jonów Ca i/lub P.

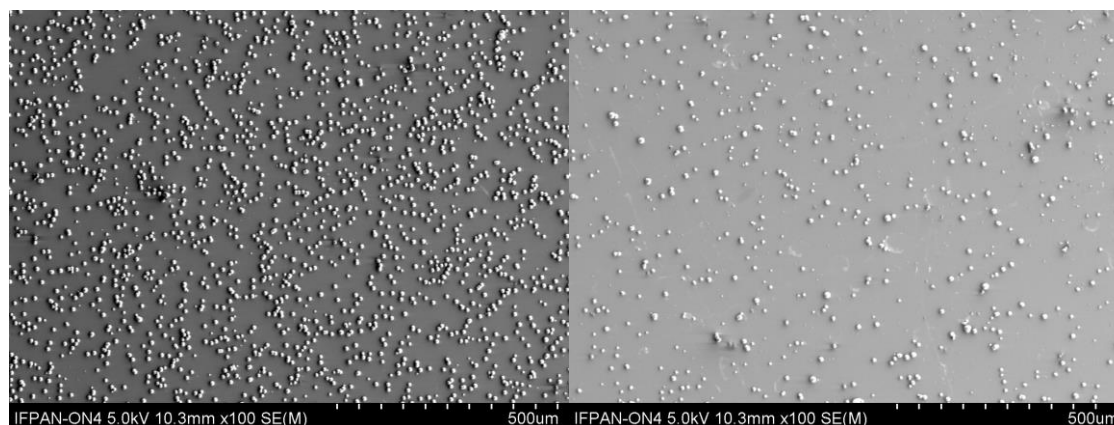
Powyżej na Rys. 30 pokazano reprezentatywne zdjęcia SEM w dwóch różnych powiększeniach dla powierzchni HfO<sub>2</sub> osadzanej w procesie ALD w 180°C i wygrzewanej w procesie RTP w 500°C przez 30 minut. Natomiast poniżej na Rys. 31 pokazano reprezentatywne zdjęcia SEM w dwóch różnych powiększeniach dla powierzchni HfO<sub>2</sub> osadzanej w procesie ALD w 240°C i wygrzewanej w procesie RTP w 500°C przez 30 minut. Powiększenia z jakimi wykonano zdjęcia SEM są parami odpowiadające co umożliwia analizę porównawczą już na podstawie obserwacji mikroskopowych.



Rys. 31: Obraz SEM struktur CaP na powierzchni powłoki HfO<sub>2</sub> osadzanej w 240°C metodą ALD-woda i wygrzewanej w 500°C przez 30 minut. Detektor elektronów wtórnych, 15 kV AV, powiększenie 100 x (po lewej) i 2000 x (po prawej).

W celu zweryfikowania wpływu temperatury procesu wygrzewania warstwa HfO<sub>2</sub> osadzana metodą ALD-woda w 240°C została wygrzana w 400°C, 500°C i 600°C (Rys. 32). Prezentowane wyniki otrzymano po 2 tygodniach inkubacji. Warto też podkreślić, że eksperyment był kilkakrotnie powtarzany, a porównywalność wyników potwierdzona została obserwacjami SEM. Jest to ważny przyczynek do stosowania eksperymentu SBF w przesiewowych testach optymalizacyjnych biomateriałów [158], [193], [194], oraz do jakościowej analizy wyników szczegółowych. Już na tym etapie badań można z dużym prawdopodobieństwem stwierdzić, że o pro-apatyto twórczych właściwościach powierzchni HfO<sub>2</sub> otrzymanego w procesie ALD ma decydujące znaczenie fakt wygrzewania po osadzeniu powłoki w procesie RTP, natomiast o jakości struktur CaP, ich kształcie i zagęszczeniu decyduje temperatura wzrostu warstwy w

komorze ALD. Uwzględniając powyższy wniosek zweryfikowano wpływ temperatury wygrzewania. Procesy wygrzewania przeprowadzono na warstwach wzrastanych w procesie ALD w temperaturze 240°C. Wygrzewano warstwę w temperaturze 400°C i 600°C. Zdjęcia SEM wykonane na przygotowanych zgodnie z opisem powierzchniach i inkubowanych przez 2 tygodnie w roztworze SBF pokazano poniżej, na **Rys. 32**.



**Rys. 32:** *Obraz SEM struktur CaP na powierzchni powłoki HfO<sub>2</sub> osadzonej w 240°C metodą ALD-woda i wygrzewanej w: 400°C przez 30 minut (po lewej) i 600°C przez 30 minut (po prawej). Detektor elektronów wtórnych, 15 kV AV, powiększenie 100 x.*

Porównując wynik stopień zagęszczeni struktur na powierzchni warstwy HfO<sub>2</sub> obserwuje się zależność od temperatury wygrzewania. Przy czym znaczące zmniejszenie pokrycia powierzchni powłoki biomateriałem odnotowano dla powierzchni wygrzewanej w 600°C. Co zostanie przedyskutowane w kolejnym rozdziale.

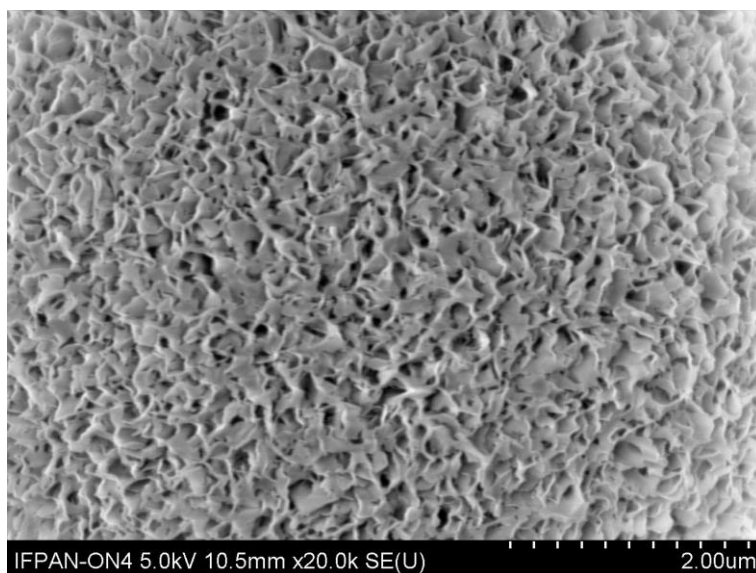
## **Rozdział 6**

### ***a-CaP amorficzny prekursor mineralnego składnika kości***

Niestechiometryczny HA zawierający w swoim składzie atomy węgla, oraz innych pierwiastków śladowych to naturalny składnik mineralny tkanki kostnej. Odpowiada za wytrzymałość mechaniczną struktur kostnych. Pełni też funkcję wewnątrzwydzielniczą. Stanowi pewnego rodzaju magazyn pierwiastków śladowych niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu jako całość. Jest kluczowym ogniwem łączącym zdrową część struktury kostnej z implantem. Jakość tego połączenia wynika ze złożonych mechanizmów sterujących procesami odbudowy tkanki kostnej. W rozdziale szóstym przeprowadzona zostanie dyskusja wyników zebranych w badaniach powłoki HfO<sub>2</sub> po inkubacji w SBF.

## 6.1. Charakteryzacja chemiczna $\alpha$ -CaP na powierzchni $\text{HfO}_2$

Inkubacja cienkich warstw  $\text{HfO}_2$  osadzanych odpowiednio zoptymalizowaną metodą ALD na neutralnym podłożu skutkowałą nukleacją kulistych struktur, o mocno rozwiniętej morfologii powierzchni, jak pokazano na Rys. 33.



*Rys. 33: Rozwiniętą morfologię powierzchni struktury  $\alpha$ -CaP na powłoce  $\text{HfO}_2$ .*

Punktowy pomiar EDX pokazał, że na powierzchni powłoki  $\text{HfO}_2$  obecne są pierwiastki Ca i P oraz tlen, węgiel i hafn i krzem, czyli pierwiastki od powłoki i podłoża. Natomiast na powierzchni w otoczeniu struktur nie stwierdzono obecności Ca i P.

Analiza jakości strukturalnej wykonana została na podstawie pomiarów XRD. BA to niestechiometryczna odmiana HA o polikrystalicznej strukturze. Jest to krystaliczny biominerał zatem detekcja XRD powinna potwierdzić jego obecność w próbce. Wykonano szereg pomiarów XRD w różnych konfiguracjach tj.: Bragga-Brentano i pomiar ślizgowy. Pomiary XRD nie wykazały jednak obecności krystalicznego CaP co sugerowało amorficzny charakter materiału.

Zjawiska zachodzące na powierzchni ciała stałego w roztworze elektrolitowym mogą mieć wpływ zmianę na skład chemiczny, zarówno na poziomie rodzaju pierwiastków jak i ich otoczenie. Wykonano szczegółową analizę linii spektralnych pochodzących od pierwiastków obecnych na badanej powierzchni. Te pomiary miały na celu dostarczenie informacji o rodzajach i mechanizmach zachodzących na powierzchni

zjawisk, które prowadziły do nukleacji  $\alpha$ -CaP. Szczegółowo przeanalizowano następującą serię próbek:

- HfO<sub>2</sub> ALD-woda 240°C – warstwa osadzana metodą ALD-woda w temperaturze 240°C, referencja

- HfO<sub>2</sub> ALD-woda 240°C – warstwa osadzana metodą ALD-woda w temperaturze 240°C, a następnie inkubowana przez 2 tygodnie w symulowanych

- HfO<sub>2</sub> ALD-woda 240°C RTP 500°C – warstwa osadzana metodą ALD-woda w temperaturze 240°C i wygrzewana następnie w temperaturze 500°C przez 30 minut, referencja

- HfO<sub>2</sub> ALD-woda 240°C RTP 500°C – warstwa osadzana metodą ALD-woda w temperaturze 240°C, wygrzewana w temperaturze 500°C przez 30 minut a następnie inkubowana przez 2 tygodnie w symulowanych warunkach fizjologicznych

Oraz próbki:

- HfO<sub>2</sub> ALD-woda 240°C RTP 400°C – warstwa osadzana metodą ALD-woda w temperaturze 240°C, wygrzewana w temperaturze 500°C przez 30 minut a następnie inkubowana przez 2 tygodnie w symulowanych warunkach fizjologicznych

- HfO<sub>2</sub> ALD-woda 240°C RTP 600°C – warstwa osadzana metodą ALD-woda w temperaturze 240°C, wygrzewana w temperaturze 500°C przez 30 minut a następnie inkubowana przez 2 tygodnie w symulowanych warunkach fizjologicznych.

W pierwszej kolejności oszacowana została zawartość procentowa pierwiastków Ca i P oraz Hf jako wartość referencyjna. Wartości, które podano w Tab. 5 podano w procentach atomowych, policzono stosunek Ca do P oraz sumę zawartości Ca i P do zawartości Hf.

**Tab. 5:** Zawartość pierwiastków Ca i P oraz Hf jako wartość referencyjna w powłokach HfO<sub>2</sub> po inkubacji w SBF.

|  | Ca<br>[% at.] | P<br>[% at.] | Ca/P       | Hf<br>[% at.] | Ca+P/Hf    |
|--|---------------|--------------|------------|---------------|------------|
| HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C SBF 2 tygodnie           | <b>1.2</b>    | <b>2.3</b>   | <b>0.5</b> | <b>24</b>     | <b>0.2</b> |
| HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C RTP 400°C SBF 2 tygodnie | <b>3</b>      | <b>3.7</b>   | <b>0.8</b> | <b>25.7</b>   | <b>0.3</b> |
| HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C RTP 500°C SBF 2 tygodnie | <b>3</b>      | <b>3</b>     | <b>1</b>   | <b>23.1</b>   | <b>0.3</b> |
| HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C RTP 600°C SBF 2 tygodnie | <b>2.2</b>    | <b>2.1</b>   | <b>1.1</b> | <b>26.8</b>   | <b>0.2</b> |

Ponieważ podczas pomiarów XPS analizowany był materiał dwuskładnikowy, odbierany był sygnał zarówno od warstwy HfO<sub>2</sub> i od materiału CaP. W celu normalizacji wyników składu pierwiastkowego zawartość pierwiastków Ca i P pokazano w stosunku do zawartości w % at. Hf, który jak pokazano w Tab. 5 kształtował się na względnie stałym poziomie 25% at. Zarówno intensywność i FWHM linii spektralnych O i C pochodziła od dwóch materiałów, dlatego przeprowadzona została normalizacja do Hf. Stosunek stechiometryczny Ca do P zmienia się w zależności od przygotowania powierzchni powłoki HfO<sub>2</sub>. Podczas gdy warstwa ALD nie modyfikowana termicznie po procesie ALD cechuje się silniejszym powinowactwem do P w stosunku do Ca, to powłoki wygrzewane w tlenie w procesie RTP w zakresie od 400°C do 600°C posiadają możliwość promowania a-CaP w stosunku zbliżonym do idealnej stechiometrii z niewielkimi odstępstwami, które przedyskutowane zostaną w kolejnym rozdziale.

Do komplementarnego opisu zjawisk powierzchniowych konieczna była szczegółowa analiza głównych linii spektralnych wykrytych pierwiastków, czyli Hf 4f, O 1s i C 1s. W tabelach poniżej zebrane zostały wartości procentowego udziału poszczególnych komponentów oraz ich szerokości połówkowe poszczególnych linii spektralnych widm z pomiarów XPS.

**Tab. 6: Analiza linii Hf 4f**

|                  | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C |               | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C<br>SBF 2 tygodnie |               | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C<br>RTP 500°C |               | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C<br>RTP 500°C SBF 2<br>tygodnie |               |
|------------------|---------------------------------|---------------|---|---------------|--|---------------|--|---------------|
|                  | FWHM<br>[eV]                    | obszar<br>[%] | FWHM<br>[eV]                                      | obszar<br>[%] | FWHM<br>[eV]                                 | obszar<br>[%] | FWHM<br>[eV]   | obszar<br>[%] |
| HfO <sub>2</sub> | <b>1.4</b>                      | <b>97.9</b>   | <b>1.4</b>  | <b>64,1</b>   | <b>1.3</b>                                   | <b>67.7</b>   | <b>1.3</b>   | <b>74</b>     |
| HfO <sub>x</sub> | <b>1.1</b>                      | <b>2.1</b>    | <b>2.2</b>  | <b>35.9</b>   | <b>1.9</b>                                   | <b>32.3</b>   | <b>1.7</b>   | <b>36</b>     |

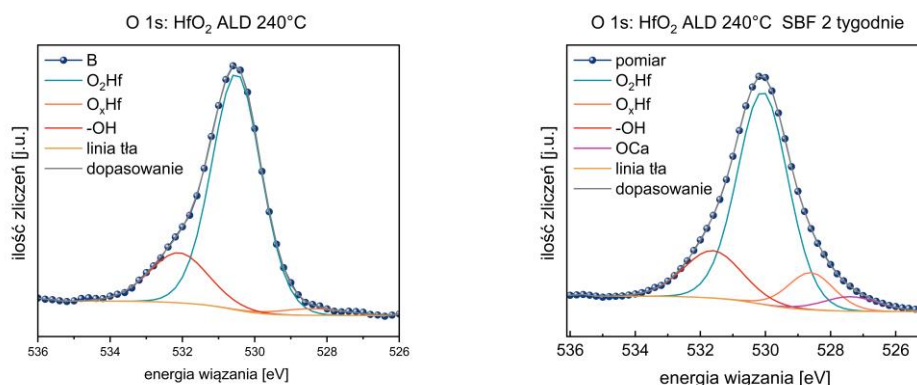
Analizowana powyżej w Tab. 6 linia hafnu to linia Hf 4f, która jest dubletem spin-orbita z różnicą energii wiązania  $\Delta=1,7$  eV, co jest zgodne z wartościami tablicowymi[195]. Okazuje się, że typowym zjawiskiem dla powłoki HfO<sub>2</sub> po inkubacji w fizjologicznym płynie elektrolitowym SBF, powoduje pojawienie się składowej związanej z niestechiometrycznym HfO<sub>x</sub>, zwrócono uwagę, że proces RTP wygrzewania powłoki HfO<sub>2</sub> również wpływa na pojawienie się składowej HfO<sub>x</sub>.

**Tab. 7: Analiza linii O 1s.**

|                      | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C |               | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C<br>SBF 2 tygodnie |               | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C<br>RTP 500°C |               | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C<br>RTP 500°C SBF 2<br>tygodnie |               |
|----------------------|---------------------------------|---------------|---|---------------|--|---------------|--|---------------|
|                      | FWHM<br>[eV]                    | obszar<br>[%] | FWHM<br>[eV]                                      | obszar<br>[%] | FWHM<br>[eV]                                 | obszar<br>[%] | FWHM<br>[eV]   | obszar<br>[%] |
| eV O <sub>2</sub> Hf | <b>1.6</b>                      | <b>77.7</b>   | <b>1.8</b>  | <b>67.2</b>   | <b>1.7</b>                                   | <b>81.8</b>   | <b>1.8</b>   | <b>65.5</b>   |
| O <sub>x</sub> Hf    | <b>2.1</b>                      | <b>2.8</b>    | <b>1.7</b>  | <b>10.6</b>   | <b>1.7</b>                                   | <b>8.7</b>    | <b>2.6</b>   | <b>19.9</b>   |
| -OH                  | <b>1.9</b>                      | <b>19.6</b>   | <b>2.1</b>  | <b>17.3</b>   | <b>1.5</b>                                   | <b>9.5</b>    | <b>2.1</b>   | <b>14.7</b>   |
| O w CaO              | -                               | -             | <b>2</b>  | <b>5</b>      | -  | -             | -  | -             |

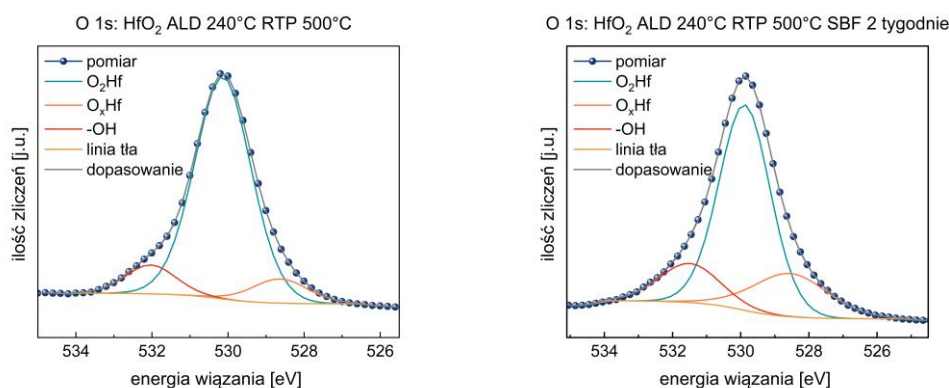
Niedobór tlenu w powłoce ALD zarówno po inkubacji w SBF jak i po procesie RTP potwierdził się też w analizie linii O 1s co pokazano powyżej w Tab. 7. Udział linii tlenu związanej z zaadsorbowaną wodą na powierzchni po wygrzewaniu znacząco zmalał, bo z około 19.6% na próbce referencyjnej do około 9.5%, następnie wzrastał po inkubacji w płynie SBF ze wspomnianych 9.5% do 14.7%.

Graficzne przedstawienie zmian w udziale poszczególnych komponentów w próbkach nie modyfikowanych w RTP pokazano poniżej na Rys. 34. Dodatkowa linia spektralna z energią wiązania niższą niż komponent odpowiadający  $\text{HfO}_x$  pojawiła się w próbce niemodyfikowanej termicznie, po jej inkubacji w SBF. Ta składowa jest prawdopodobnie związana z zawartością O w  $\text{CaO}$ [195], co zostanie przedyskutowane w dalszej kolejności.



**Rys. 34:** Analiza linii spektralnej XPS, O 1s warstw  $\text{HfO}_2$  bez modyfikacji termicznej.

Natomiast graficzne przedstawienie linii spektralnej O1s mierzonej na powłoce  $\text{HfO}_2$  po procesie RTP przedstawiono poniżej, na Rys. 35:



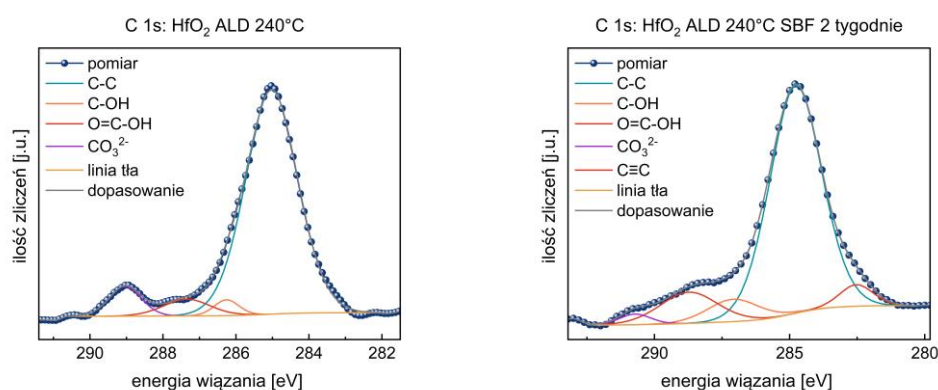
**Rys. 35:** Analiza linii spektralnej XPS, O 1s warstw  $\text{HfO}_2$  po procesie wygrzewania RTP.

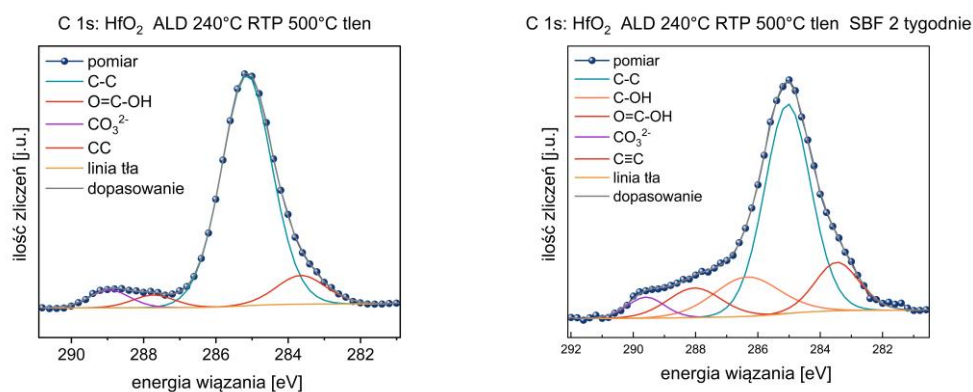


**Tab. 8:** Analiza linii C 1s

|  | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C |               | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C<br>SBF 2 tygodnie |               | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C<br>RTP 500°C |               | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C<br>RTP 500°C SBF 2<br>tygodnie |               |
|--|---------------------------------|---------------|---|---------------|--|---------------|--|---------------|
|  | FWHM<br>[eV]                    | obszar<br>[%] | FWHM<br>[eV]                                      | obszar<br>[%] | FWHM<br>[eV]                                 | obszar<br>[%] | FWHM<br>[eV]   | obszar<br>[%] |
| 285 eV C-C                             | <b>1.7</b>                      | <b>84.6</b>   | <b>2.3</b>  | <b>74.8</b>   | <b>1.6</b>                                   | <b>81.4</b>   | <b>1.6</b>   | <b>57.7</b>   |
| 286.5 eV C-OH                          | <b>0.8</b>                      | <b>2.8</b>    | <b>2.2</b>  | <b>7.2</b>    | -  | -             | <b>2.5</b>   | <b>15.4</b>   |
| 288.5 eV O=C-OH                        | <b>1.5</b>                      | <b>5.7</b>    | <b>2.5</b>  | <b>11.3</b>   | <b>1.4</b>                                   | <b>3.7</b>    | <b>2</b>   | <b>9.4</b>    |
| 289.3 eV CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> | <b>1.1</b>                      | <b>6.9</b>    | <b>1.4</b>  | <b>2.1</b>    | <b>1.3</b>                                   | <b>5</b>      | <b>1.4</b>   | <b>4.7</b>    |
| 284 eV C≡C                             | -                               | -             | <b>1.4</b>  | <b>4.5</b>    | <b>1.6</b>                                   | <b>9.9</b>    | <b>1.7</b>   | <b>12.7</b>   |

Obserwując natomiast zmiany w poszczególnych składowych linii węgla, co pokazano powyżej w **Tab. 8** można wnioskować, że zarówno rodzaj komponentów jak i skład procentowy zmienia się w zależności od typu badanego materiału. Proces wygrzewania RTP i inkubacja w płynie SBF powoduje nietypowe zjawisko pojawienia się składowej o energii wiązania niższej niż składowa odpowiadająca wiązaniom C-C, typowym dla zanieczyszczeń powierzchniowych. Jest to linia o energii zbliżonej do 284 eV i według literatury odpowiada wiązaniu potrójnemu pomiędzy atomami węgla (C≡C) [195]. Ewolucja linii węgla została pokazana na wykresach poniżej, powłoki nie modyfikowanej termicznie na Rys. 36 i powłoki modyfikowanej termicznie na Rys. 37.

**Rys. 36:** Analiza linii spektralnej XPS, C 1s warstw HfO<sub>2</sub> bez modyfikacji termicznej.



**Rys. 37:** Analiza linii spektralnej XPS, C 1s warstw HfO<sub>2</sub> modyfikowanych termicznie RTP.

W ramach niniejszej rozprawy badany był również wpływ temperatury wygrzewania na rodzaj i jakość struktur a-CaP.

Szczegółowe wyniki analizy procentowej zawartości składowych linii spektralnych tlenu (O 1s) i węgla (C 1s) wyników powierzchni warstwy HfO<sub>2</sub> osadzonej w procesie ALD w 240°C i wygrzewanej w 400°C, 500°C, 600°C a następnie przez dwa tygodnie inkubowanej w roztworze SBF zebrano w kolejnych, poniższych tabelach, odpowiednio Tab. 9 dla tlenu i w Tab. 10 dla węgla:

**Tab. 9:** Analiza linii O1s materiałów po procesie RTP

|                      | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C<br>SBF 2 tygodnie |               | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°<br>RTP 400°C SBF 2<br>tygodnie |               | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C<br>RTP 500°C SBF 2<br>tygodnie |             | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C<br>RTP 600°C SBF 2<br>tygodnie |               |
|----------------------|---|---------------|---|---------------|--|-------------|--|---------------|
|                      | FWHM<br>[eV]                                      | obszar<br>[%] | FWHM<br>[eV]  | obszar<br>[%] | FWHM<br>[eV]   | obszar c    | FWHM<br>[eV]   | obszar<br>[%] |
| eV O <sub>2</sub> Hf | <b>1.8</b>  | <b>67.2</b>   | <b>1.8</b>  | <b>80.4</b>   | <b>1.8</b>   | <b>65.5</b> | <b>1.3</b>   | <b>59.6</b>   |
| O <sub>n</sub> Hf    | <b>1.7</b>  | <b>10.6</b>   | <b>2</b>  | <b>8.5</b>    | <b>2.6</b>   | <b>19.9</b> | <b>2.5</b>   | <b>21.3</b>   |
| -OH                  | <b>2.1</b>  | <b>17.3</b>   | <b>1.8</b>  | <b>11.1</b>   | <b>2.1</b>   | <b>14.7</b> | <b>2.5</b>   | <b>19</b>     |
| O w CaO              | <b>2</b>  | <b>5</b>      | -   | -             | -  | -           | -  | -             |

Szerokość połówkowa głównego komponentu linii tlenu, czyli związanego z HfO<sub>2</sub> pozostaje stabilna, zatem termiczne przygotowanie próbek nie ma wpływu na uprządkowanie atomowe wokół stechiometrycznego HfO<sub>2</sub>. Zmienia się to w przypadku

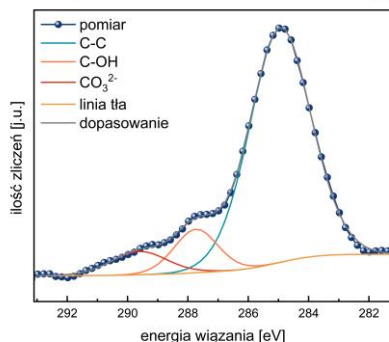
komponentu  $\text{HfO}_x$ . Zważywszy, że po inkubacji powłok w płynie SBF procentowy udział tej składowej wzrasta, co może mieć związek z udziałem tlenu z powłoki w tworzeniu się struktur a-CaP, można spodziewać się różnych mechanizmów, zależnych od temperatury procesu RTP, który z kolei miał wpływ na stosunek pierwiastków Ca:P (Tab. 5).

*Tab. 10: Analiza linii C1s materiałów po procesie RTP*

|                          | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C<br>SBF 2 tygodnie |               | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C<br>RTP 400°C SBF 2<br>tygodnie |               | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C<br>RTP 500°C SBF 2<br>tygodnie |               | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C<br>RTP 600°C SBF 2<br>tygodnie |               |
|--------------------------|---|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|
|                          | FWHM<br>[eV]                                      | obszar<br>[%] | FWHM<br>[eV]   | obszar<br>[%] | FWHM<br>[eV]   | obszar<br>[%] | FWHM<br>[eV]   | obszar<br>[%] |
| 285 eV C-C               | <b>2.3</b>  | <b>74.8</b>   | <b>2.5</b>   | <b>59.3</b>   | <b>1.6</b>   | <b>57.7</b>   | <b>2.4</b>   | <b>81.7</b>   |
| 286.5 eV C-OH            | <b>2.2</b>  | <b>7.2</b>    | <b>1.7</b>   | <b>12.6</b>   | <b>2.5</b>   | <b>15.4</b>   | -  | -             |
| 288.5 eV O=C-OH          | <b>2.5</b>  | <b>11.3</b>   | <b>2.2</b>   | <b>18.4</b>   | <b>2</b>   | <b>9.4</b>    | <b>1.7</b>   | <b>10.9</b>   |
| 289.3 eV CO <sub>3</sub> | <b>1.4</b>  | <b>2.1</b>    | <b>1.4</b>   | <b>5.9</b>    | <b>1.4</b>   | <b>4.7</b>    | <b>2.2</b>   | <b>7.4</b>    |
| 284 eV C≡C               | <b>1.4</b>  | <b>4.5</b>    | <b>1.2</b>   | <b>4</b>      | <b>1.7</b>   | <b>12.7</b>   | -  | -             |

Detekcja linii węgla o wartości energii wiązania mniejszej niż 285 eV była możliwa we wszystkich w tej serii przypadkach, poza próbką wygrzewaną w 600°C, czyli najwyższej temperaturze analizowanej w ramach niniejszej rozprawy. Procentowy udział tej linii jest zdecydowanie największy, jeśli powłoka HfO<sub>2</sub> po procesie osadzania ALD została wygrzana w 500°C. Natomiast w przypadku wspomnianej obróbki termiczna powłoki ALD w 600°C, co pokazano poniżej na Rys. 38 nie odnotowano również składowej o energii wiązania bliskiej 286.5 eV, czyli odpowiadającej pojedynczemu wiązaniu węgla z tlenem, czyli z grupą hydroksylową (C-OH). Można przypuszczać, że wzrost temperatury procesów RTP do wartości 600°C wpływa na charakter grup organicznych związanych w powłoce w wyniku stosowania prekursorów organicznych w procesie osadzania ALD powłoki HfO<sub>2</sub>.

C 1s: HfO<sub>2</sub> ALD 240°C RTP 500°C tlen SBF 2 tygodnie



**Rys. 38:** Analiza linii spektralnej XPS C 1s powłoki ALD HfO<sub>2</sub> po procesowo wygrzewanej w 600°.

Pomimo niewielkiej ilości procentowej zawartości pierwiastków Ca i P możliwe było wyodrębnienie poszczególnych komponentów również dla tych pierwiastków, a uzyskane dane są pokazane poniżej w tabelach odpowiednio dla składowych: linii Ca 2p w Tab. 11, i dla P 2p w Tab. 12.

**Tab. 11:** Analiza linii spektralnej Ca 2p

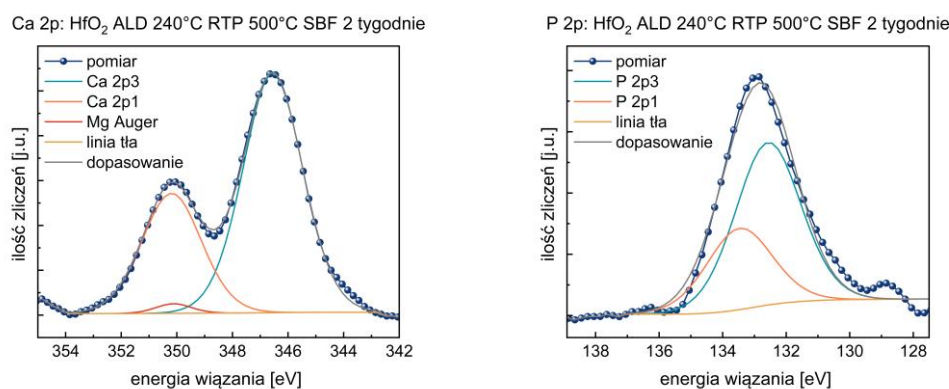
|                             | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C SBF 2 tygodnie |             | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C RTP 400°C SBF 2 tygodnie |             | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C RTP 500°C SBF 2 tygodnie |             | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C RTP 600°C SBF 2 tygodnie |            |
|-----------------------------|--|-------------|--|-------------|--|-------------|--|------------|
|                             | FWHM [eV]                                      | obszar [%]  | FWHM [eV]  | obszar [%]  | FWHM [eV]  | obszar [%]  | FWHM [eV]  | obszar [%] |
| 346.5 eV Ca=CO <sub>3</sub> | <b>3.1</b>                                     | <b>27.1</b> | <b>2</b>   | <b>84</b>   | <b>2.5</b>   | <b>98.5</b> | <b>2.5</b>   | <b>100</b> |
| 347 eV CaO                  | <b>2.3</b>                                     | <b>72.9</b> | <b>2</b>   | <b>10.5</b> | <b>1.5*</b>  | <b>1.5*</b> | -  | -          |

\* - energia wiązania bliska 350.1 eV

**Tab. 12:** Analiza linii spektralnej P 2p

|               | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C SBF 2 tygodnie |             | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C RTP 400°C SBF 2 tygodnie |             | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C RTP 500°C SBF 2 tygodnie |            | HfO <sub>2</sub> ALD-woda 240°C RTP 600°C SBF 2 tygodnie |            |
|---------------|--|-------------|--|-------------|--|------------|--|------------|
|               | FWHM [eV]                                      | obszar [%]  | FWHM [eV]  | obszar [%]  | FWHM [eV]  | obszar [%] | FWHM [eV]  | obszar [%] |
| 346.5 eV Ca-O | <b>1.9</b>                                     | <b>92.3</b> | <b>2.3</b>   | <b>80.1</b> | <b>2.4</b>   | <b>100</b> | <b>2.1</b>   | <b>100</b> |
| 347 eV /      | <b>1.2</b>                                     | <b>7.7</b>  | <b>2.5</b>   | <b>19.9</b> | -  | -          | -  | -          |

Zebrane wyniki dopasowania teoretycznego do otrzymanych danych eksperymentalnych linii pierwiastków budujących struktury  $\alpha$ -CaP pozwalają na wyciągnięcie pewnych wniosków o charakterze ich otoczenia chemicznego. Fosfor występuje w przyrodzie z tlenem w różnym stosunku jonowym, jednak w organizmach żywych mamy do czynienia z grupami ortofosforowymi [24]. Energia wiązania fosforu w obserwowanych strukturach  $\alpha$ -CaP była bliska 133.5 eV. Różnica energii pomiędzy linią P 2p i C1s wynosiła 151.5 eV co wskazuje, zgodnie z pracą [196], że fosfor występował w wiązaniu z tlenem jako grupa ortofosforanowa ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) co pokazano poniżej na Rys. 39, po prawej.



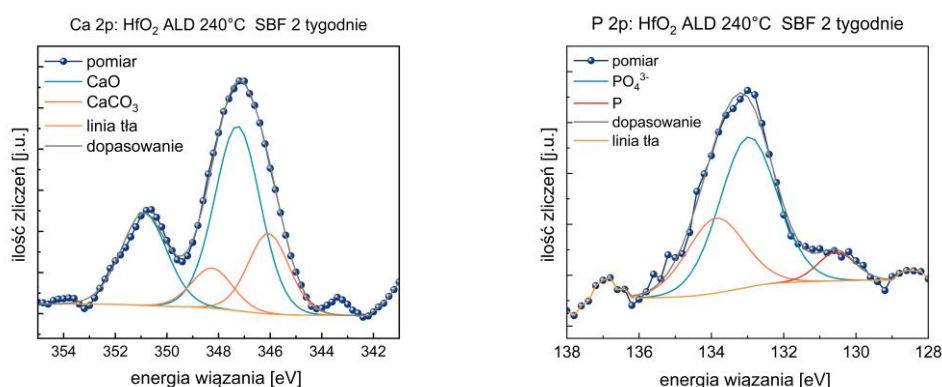
Rys. 39: Analiza linii spektralnych XPS powłoki  $\text{HfO}_2$  wygrzewanej w procesie RTP, po inkubacji w SBF: Ca 2p (po lewej), P 2p (po prawej).

Ciekawy jest fakt detekcji dodatkowej linii w dopasowaniu do eksperymentalnych wyników linii Ca 2s, w przypadku powłoki wygrzewanej w 500°C z energią wiązania bliską 350eV jak pokazano powyżej na Rys. 39, po prawej. Ten komponent był obserwowany w materiale zawierającym Mg w składzie  $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ . Zasadniczo linia Ca 2p, która jest dubletem spin-orbita występuje z energią wiązania 246.3 eV różnicą energii wiązania  $\Delta = 5.5 \text{ eV}$  zgodnie z wartościami tablicowymi [195]. Dodatkowe linie spektralne z energią wiązania bliską 351.67 eV są przypisywane pikom Augera dla Mg<sup>20</sup>. Jeżeli obserwowalibyśmy wbudowywanie jonów Mg w struktury  $\alpha$ -CaP w charakterze domieszki byłby to niezwykle ciekawy a zarazem obiecujący wynik. Naturalnie

<sup>20</sup> Zgodnie z: <https://xps-database.com/calcium-ca-z20-chemicals/>; dostęp 13.05.2023

występujący w tkance kostnej BA ma w swoim składzie śladowe ilości innych pierwiastków w tym Mg. Udział procentowy na poziomie 1.5% pików przypisywanego elektronom Augera w analizie fotoelektronów należy traktować raczej jakościowo, nie ilościowo.

Na powierzchni powłoki  $\text{HfO}_2$  nie wygrzewanej w procesie RTP po osadzeniu w ALD nie zaobserwowano struktur a-CaP, jednak obserwowano sygnał od pierwiastków Ca i P. Poniżej na Rys. 40 pokazano dopasowanie linii teoretycznych do eksperymentalnego wyniku XPS.



**Rys. 40:** Analiza linii spektralnych XPS powłoki  $\text{HfO}_2$  osadzonej metodą ALD, po inkubacji w SBF: Ca 2p (po lewej), P 2p (po prawej).

Pojawienie się dodatkowych linii spektralnych zaobserwowano zarówno dla Ca i P. Główna linia Ca odpowiada energii wiązania w CaO, co koreluje z pojawieniem się dodatkowej linii w analizie linii tlenu (Rys. 34, po prawej). Z analizy linii P wnioskuje się, że otoczenie chemiczne P jest inne niż obserwowane w przypadku powierzchni wygrzewanych. Dodatkowy komponent z energią wiązania bliską 130.6 eV może być związany z P który nie występuje jako składowa grup ortofosforanowych, które to są składnikami BA. Na powierzchni prawdopodobnie osadził się P i Ca jednak nie w innym otoczeniu chemicznym.

## 6.2. Statystyczna analiza wzrostu populacji a-CaP na powłokach HfO<sub>2</sub>

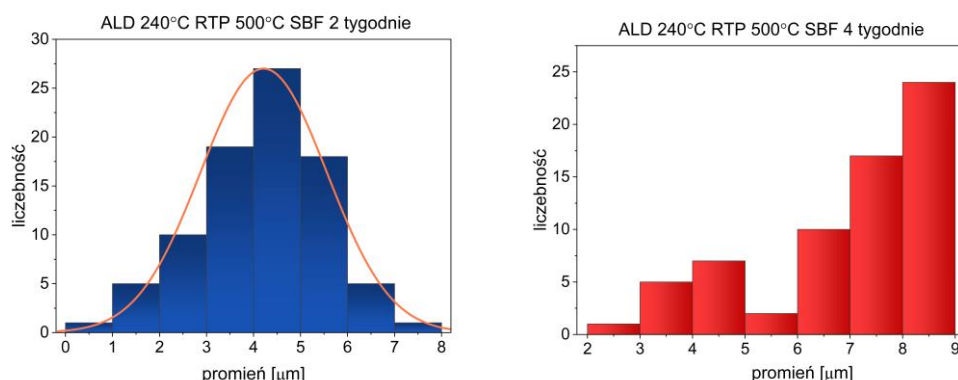
Zdjęcia SEM struktur a-CaP wskazują na istniejące zależności pomiędzy sposobem przygotowania powłoki, zarówno od temperatury osadzania HfO<sub>2</sub> metodą ALD, jak i od późniejszego wygrzewania w procesie RTP w tlenie w temperaturach 400°C, 500°C i 600°C. Żeby zweryfikować jak duży jest wpływ tych parametrów na całościowy obraz populacji przeprowadzono pomiar wielkości struktur a-CaP oraz stopień pokrycia powierzchni w zależności od przygotowania powierzchni. W tym celu zmierzony został promień i pole powierzchni zajmowane przez sferyczne struktury a-CaP. Pomiar wykonywano na podstawie obrazów SEM powierzchni, a więc w dwóch wymiarach, w kierunku prostopadłym do powierzchni próbki. Wykonano po około 100 pomiarów dla każdej próbki, poprzez dopasowanie okręgu. Wartości średnie promienia i niepewność pomiaru oszacowaną metodą najmniejszych kwadratów przedstawiono w Tab. 13. Oznaczenia w tabeli:  $r_{\text{sr}}$ -promień średni struktur a-CaP,  $\delta$ -odchylenie standardowe pomiaru średniego promienia,  $S_{\text{CaP}}$ - całkowite pokrycie powierzchni przez struktury a-CaP

**Tab. 13:** Średni promień i pokrycie powierzchni powłoki HfO<sub>2</sub> strukturami a-CaP.

|                                   | HfO <sub>2</sub> ALD-<br>woda 180°C<br>RTP 500°C | HfO <sub>2</sub> ALD-<br>woda 240°C<br>RTP 400°C | HfO <sub>2</sub> ALD-<br>woda 240°C<br>RTP 500°C | HfO <sub>2</sub> ALD-<br>woda 240°C<br>RTP 600°C | HfO <sub>2</sub> ALD-<br>woda 240°C<br>RTP 500°C |
|-----------------------------------|--|--|--|--|--|
| okres inkubacji w SBF             | 2 tygodnie                                       |  |  |  | 4 tygodnie                                       |
| $r_{\text{sr}}$ [ $\mu\text{m}$ ] | <b>5.1</b>                                       | <b>4.1</b>                                       | <b>5.2</b>                                       | <b>2.9</b>                                       | <b>6.6</b>                                       |
| $\delta$ [ $\mu\text{m}$ ]        | <b>1.2</b>                                       | <b>0.7</b>                                       | <b>0.1</b>                                       | <b>0.4</b>                                       | <b>1</b>   |
| $S_{\text{CaP}}$ [%]              | <b>1.9</b>                                       | <b>9.8</b>                                       | <b>12</b>  | <b>1.9</b>                                       | <b>9.9</b>                                       |

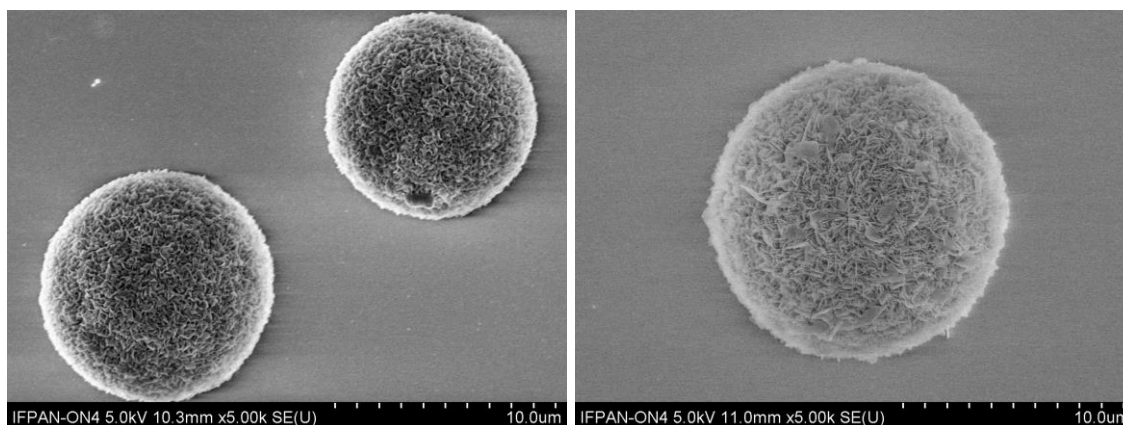
Ponieważ w trakcie badań i analizy wyników okazało się, że optymalne warunki wykonania powłoki o właściwościach pro-apatyto twórczych to wzrost ALD w temperaturze 240°C, a następnie wygrzewanie w RTP w tlenie przez 30 minut w temperaturze 500°C, postanowiono wydłużyć okres inkubacji próbki do 4 tygodni.

Porównanie dynamiki wzrostu struktur a-CaP pokazano na poniższych histogramach (Rys. 41) oraz zdjęciach SEM na Rys. 42.



**Rys. 41:** Histogramy dynamiki wzrostu populacji struktur a-CaP po 2 tygodniach i po 4 tygodniach inkubacji w SBF.

Okazało się, że proces zmienił swoją dynamikę. Ze wzrostu opisywanego krzywą Gaussa przechodzi do procesu samo ograniczającego.



**Rys. 42:** Zdjęcia SEM pojedynczych struktur BA na powierzchni  $\text{HfO}_2$  ALD woda, 240° RTP 500°C po inkubacji w płynie SBF: przez dwa tygodnie (po lewej) i przez cztery tygodnie (po prawej).

Nie widać jednak aglomeratów, kształt kulisty jest zachowany, co doskonale widać poniżej na Rys. 42. Struktury a-CaP osiągają pewien krytyczny rozmiar, co więcej, ponieważ nie obserwujemy zwiększenia pokrycia powierzchni materiałem BA, następować może wzajemne łączenie się struktur.



## 6.2. Dyskusja mechanizmu nukleacji struktur BA

Powinowactwo jonów Ca/P do powierzchni modyfikowanej powłoki HfO<sub>2</sub> jest, jak się okazuje funkcją wielu zmiennych  $f(x_n)$ , z których możemy na obecnym etapie badań zdefiniować trzy podstawowe:

$x_1$ - temperatura osadzania powłoki ALD (180-300°C)

$x_2$ - prekursor tlenowy w procesie ALD (HfO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>)

$x_3$ - temperatura wygrzewania powłoki po procesie ALD (400-600°C)

W nawiasach podano warunki brzegowe parametrów, które w ramach rozprawy były modyfikowane i mają kluczowe znaczenie dla pro-apatyto twórczych atrybutów powierzchni HfO<sub>2</sub>. Na podstawie wyników eksperymentalnych stwierdzono, że zmienne korelują ze sobą. Dobór odpowiedniej kombinacji parametrów pozwolił na otrzymanie warstwy HfO<sub>2</sub> lokalnie wspierającej wzrost a-CaP, który może być prekursorem krystalicznego HA [178], [179], [186].

Niezwykle istotne jest zrozumienie mechanizmu obserwowanego zjawiska, co w przyszłości umożliwiłoby dalsze, celowe sterowanie właściwościami powłoki. Jakość struktur a-CaP, obserwowanych na powierzchni powłoki HfO<sub>2</sub> oceniana była na podstawie szczegółowych wyników XPS i obserwacji SEM. W ogólności zawartość Ca i P analizowana na podstawie linii P 2p i Ca 2p kształtowała się na poziomie około 3% odpowiednio dla wapnia i fosforu. Otrzymany w badaniach XPS sygnał pochodził od dwóch materiałów tj. od powłoki i biomateriału jednocześnie. Niska zawartość tych pierwiastków jest zależna od niekompletnego pokrycia powierzchni HfO<sub>2</sub> materiałem a-CaP. Jak pokazano w Tab. 13 całkowite pokrycie powierzchni wynosiło ~10%. Obserwowana była zależność pomiędzy rosnącym udziałem Ca w stosunku do P, w stosunku do sposobu przygotowania powierzchni. Wiadomo też, że wapń jest pierwiastkiem trudnym do detekcji XPS [26], kształt powierzchni ma wpływ na wynik pomiaru oraz że materia może ulegać degradacji pod wpływem ekspozycji na promieniowanie X[197]. Pomimo tego uzyskane wyniki z analizy, zwłaszcza linii Ca i P, bo obarczone dużym prawdopodobieństwem błędu wydają się być spójne i korelują z pozostałymi obserwacjami. Postanowiono uwzględnić obserwowane zależności w

analizie modelu wzrostu. Oceniono, że na powierzchni  $\text{HfO}_2$  modyfikowanym termicznie wytworzył się stechiometryczny  $\alpha$ -CaP. Natomiast powierzchnia warstwy nie wygrzewanej, w warunkach fizjologicznych indukuje preferencyjne wiązanie jonów fosforanowych w stosunku do wapnia. Proces RTP warstw  $\text{HfO}_2$  powoduje rekrytalizację powłok. Jakość krystalograficzna nie zależy od temperatury wzrostu warstwy w metodzie ALD. Ma jednak kluczowy wpływ na jakość struktur  $\alpha$ -CaP, które w warunkach zbliżonych do fizjologicznych nukleowały na powierzchni. Ma też istotny wpływ na jakość materiału mineralnego, bo wpływa na stosunek stechiometryczny Ca i P, co pokazano w Tab. 5.

Stosunek jonów wapniowych do fosforanowych BA w kościach człowieka kształtuje się na poziomie 1.6 jednak jest to już forma krystaliczna. Nawiązując do pracy [182]  $\alpha$ -CaP w formie MCP jest formą prekursorową dla BA w środowisku fizjologicznym. Kuliste MCP w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w wyniku procesów dysocjacji i rozpuszczania krystalizują przybierając kształt płaskich płytek umieszczonych w przerwach pomiędzy matrycą z włókienek kolagenowych [179]. Zasadniczymi różnicami pomiędzy MCP, a BA są struktura krystalograficzna i stosunek zawartości jonów Ca do P. Podczas gdy MCP jest amorficzną, stechiometryczną odmianą CaP, to BA jest polikrystaliczną formą CaP o stosunku Ca do P  $\sim 1.6$  w zależności od rodzaju struktury kostnej. Uważa się, że skład chemiczny, w szczególności ilościowa zawartość Ca i P są decydującym parametrem, jeżeli chodzi o określenie typu danego ortofosforanu. Stąd możliwość sterowania składem chemicznym struktur na tak subtelnym poziomie poprzez zmianę parametrów technologicznych jest ważna.

Ponieważ struktury  $\alpha$ -CaP nukleowały w charakterystyczny, jednorodny sposób tylko na powłokach  $\text{HfO}_2$  po procesie RTP pojawiło się pytanie jaka właściwość wygrzewanej powłoki jest kluczowa do sterowania powinowactwem jonów Ca i P do warstwy  $\text{HfO}_2$ . Obserwowano zmiany w składowych linii spektralnych pierwiastków. Ciekawie przedstawiała się ewolucja składowych linii węgla. Okazało się, że proces RTP spowodował pojawienie się dodatkowej składowej linii węgla z energią wiązania bliską 284 eV, co odpowiada potrójnemu wiązaniu pomiędzy atomami węgla i jest typowym wiązaniem dla węglowodorów nienasyconych, acetylenów. Wiadomo też, że ta forma węgla może przyłączyć Ca, tworząc węglík wapnia. Ta składowa jest obecna w HA [198]. Po inkubacji w SBF całkowity udział tej składowej zwiększał się. Może to

świadczyć o udziale grup  $C\equiv C$  w wiązaniu jonów zawartych w płynie elektrolitowym do powierzchni.

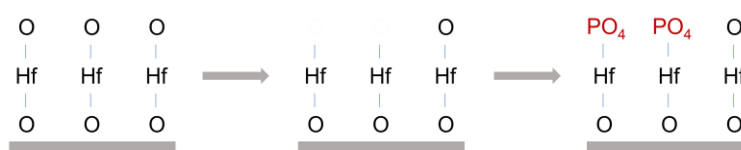
Zaobserwowano również, że termiczna modyfikacja warstwy osadzonej metodą ALD-woda powoduje pojawienie się komponentu niestechiometrycznego, z niedoborem tlenu. Generowane są luki tlenowe, które mogą być zgodnie z modelem krystalizacji  $HfO_2$  [136], inicjatorami krystalizacji warstwy, co pokazano na Rys. 15. Po inkubacji w płynie SBF obserwujemy zwiększenie udziału komponentu  $HfO_x$  w stosunku do  $HfO_2$  (potwierdzone w analizie zarówno linii tlenu jak i hafnu; Tab. 9), co może świadczyć o udziale tlenu w tworzeniu się struktur a-CaP na powierzchni.

Pojawienie się linii dedykowanej  $HfO_x$  po inkubacji w roztworze SBF zaobserwowano również w przypadku warstwy niewygrzewanej. Na tych powłokach nie tworzyły się kuliste struktury. Jednak, zgodnie z wynikiem XPS, jony  $Ca^{2+}$  i  $PO_4^{3-}$  osadziły się na powierzchni, w stosunku 0.52. Świadczyć to może o innym modelu ich osadzania się na powierzchni, ale też przy udziale tlenu. Tym bardziej, że obserwacje mikroskopowe nie wykazały ich obecności struktur na powierzchni. Obserwujemy więc jedynie preferowane powinowactwo jonów fosforanowych do powierzchni. Oprócz linii odpowiadającej dubletowi spin-orbita z energią wiązania bliską 132.2 eV, co zgodnie z wartościami tablicowymi odpowiada fosforowi związanemu w grupie ortofosforanowej, wyodrębniono składową z energią wiązania bliską 131 eV. Zgodnie z [195] składowa z energią wiązania 130.6 eV pochodzi od fosforu niezwiązanego z tlenem. Zatem zmieniło się otoczenie chemiczne fosforu, co mogło zablokować adsorpcję jonów  $Ca^{2+}$ . Na Rys. 34 pojawiła się dodatkowa linia spektralna z energią wiązania bliską 529.5 eV, co według wartości tablicowych z kolei odpowiada możliwym wiązaniom O w CaO.

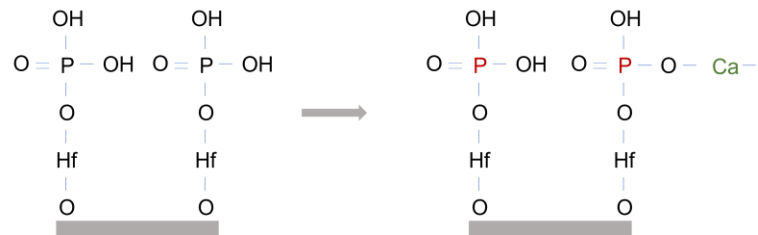
Proces biomineralizacji zachodzący w środowisku wodnym, jak zdefiniowano w pracy [199] może być indukowany materiałem pochodzenia organicznego lub nieorganicznego. Pochodzenie organiczne wynika z biomineralizacji zachodzącej na biomolekułach (komórkach, organellach komórkowych w tym pęcherzykach zewnątrzkomórkowych, fragmentach obumarłych komórek, np. fosfolipidowych błonach komórkowych. W większości biomineralizacja na podłożu organicznym inicjowana jest na ogół negatywnie naładowanymi grupami funkcyjnymi. Proces biomineralizacji inicjowany na podłożu nieorganicznym zależy od dostępnych grup funkcyjnych. W

literaturze opisywane są różne modele osadzania warstwy HA na powierzchni ciała stałego. Uważa się, że wzrost struktur HA, po zapoczątkowaniu nukleacji zachodzi poprzez naprzemienne osadzanie jonów wapniowych i fosforanowych. Jest to proces zachodzący w środowisku wodnym w wyniku nukleacji heterogennej, inicjowanej na powierzchni ciała stałego. W literaturze proponowane są różne modele wzrostu struktur HA na powierzchni ciała stałego. Uważa się na przykład, że to powierzchniowa adsorpcja pozytywnie naładowanych jonów  $\text{Ca}^{2+}$  inicjuje mineralizację w warunkach symulowanych [199]. W pracy [88] pokazano natomiast, że do powierzchni  $\text{TiO}_2$  zoptymalizowanej do wartości zeta potencjału  $+2 \pm 2.7 \text{ mV}$  w pierwszej kolejności adsorbują negatywnie naładowane jony fosforanowe, a na powierzchni  $\text{TiO}_2$  zoptymalizowanej do wartości ujemnej adsorpcja jonów wapniowych była niewystarczająca do zainicjowania wzrostu HA na tej powierzchni. Zaproponowano też, że zachodzi reakcja redukcji tlenu na powierzchni umieszczonej w wodnym roztworze, elektrolitowym, umożliwiając osadzanie się w pierwszej kolejności jonów wapnia, a następnie jonów fosforanowych na powierzchni [175], [200]. Do zajścia tych reakcji potrzebny był jednak ujemny ładunek, który generowano przepływem prądu elektrycznego. Natomiast zgodnie z modelem zaproponowanym w pracy [191] ujemnie naładowane jony fosforanowe musiałyby w pierwszej kolejności, zastępując jon wodoru w grupie  $-\text{OH}$ , tworzyć wiązania z powierzchnią.

Na badanej powierzchni  $\text{HfO}_2$  po umieszczeniu powłoki w roztworze zmniejsza się całkowita ilość tlenu związana w stosunku stechiometrycznym z Hf. Muszą zatem pojawiać się niewysyczone wiązania w komponencie niestechiometrycznym, co potencjalnie może być miejscem przyłączenia grup  $\text{PO}_4^{3-}$ . To przypuszczenie poparte jest też faktem zwiększenia się FWHM składowej tlenu przypisanej  $\text{HfO}_x$ . Zmiana szerokości połówkowej linii spektralnych w metodzie XPS świadczy o zmianie otoczenia chemicznego, wzroście nieporządku [161], [195]. Może to sugerować, że po oddaniu tlenu w roztworze SBF pojawia się wolne wiązanie, będące potencjalnie miejscem przyłączenia grup ortofosforowych. Wówczas możliwy mechanizm tworzenia się a-CaP na powierzchni zachodziłby w następujący sposób:



A w kolejnym kroku:



Na Rys. 39 pokazano dopasowanie linii teoretycznych do wyniku eksperymentalnego pomiaru XPS Ca i P. Powłoka HfO<sub>2</sub> przygotowana była metodą ALD-woda w 240°C i następnie wygrzana w procesie RTP w 500°C w tlenie przez 30 minut. Pomimo że oprócz Hf, O, C, Ca i P nie wykryto innych pierwiastków na powierzchni to w dopasowaniu linii Ca pojawiła się dodatkowa linia z energią wiązania bliską 351 eV. Taka energia wiązania została przypisana elektronom Augera z powłoki Mg. W płynie SBF zawarte są jony Mg, a domieszkowanie HA jonami innych pierwiastków śladowych, również Mg jest zjawiskiem typowym dla BA. Oczywiście wynik wymaga potwierdzenia, jednak byłby mocno obiecujący w ocenie jakości biomimetycznych powłok implantów z HfO<sub>2</sub>.

Zaproponowano[175], [200], że zachodzi reakcja redukcji tlenu na powierzchni umieszczanej w wodnym roztworze, elektrolitowym. Umożliwiają osadzanie się w pierwszej kolejności jonów wapnia, a następnie jonów fosforanowych na powierzchni. Do zajścia tych reakcji potrzebny jest ujemny ładunek generowany przepływem prądu elektrycznego. W pracy [88] pokazano, że powinowactwo jonów fosforanowych do powierzchni zapoczątkowywało osadzanie się apatytu. Zgodnie z modelem zaproponowanym w [191] ujemnie naładowane jony fosforanowe musiałyby w pierwszej kolejności, zastępując jon wodoru w grupie -OH, tworzyć wiązania z powierzchnią.

Proces biomineralizacji niezależnie od inicjacji jest kompleksowym zjawiskiem zachodzącym w środowisku organizmów żywych. Sterowany wielopłaszczyznowo jest uwarunkowany wieloma czynnikami środowiskowymi. Nie tylko ładunek grup funkcyjnych jest istotny w procesie inicjowania heterogennej nukleacji na powierzchni ciała stałego. Jak pokazano w pracy [199] oprócz oddziaływań jonowych też polarność oddziaływania powinna być rozważana. Obrazy SEM obserwowanych powierzchni po wyjęciu z roztworu SBF wskazują, że zachodzi proces nukleacji heterogennej. Przypuszcza się, że muszą występować czynniki inicjujące nukleację w obserwowany, punktowy charakter. Są stany powierzchniowe, które inicjują powinowactwo jonów. Lokalnie zmieniona gęstość elektronowa tłumaczyłaby zjawisko punktowej nukleacji a-CaP.

Optymalne warunki temperaturowe do przygotowania biomimetycznej powłoki to osadzanie metodą ALD w 240°C i następnie wygrzewanie w procesie RTP w 500°C. Po dwóch tygodniach inkubacji rozkład wielkości struktur a-CaP opisano rozkładem Gaussa. Ten rozkład jest najczęstszym i najbardziej zrównoważonym energetycznie rozkładem występującym w przyrodzie. Opisuje optymalne warunki dla zjawiska. Co ciekawe, po kolejnych dwóch tygodniach proces ewoluował do wzrostu samoograniczającego. Jest to ważne, ponieważ oczekuje się, że spontaniczna nukleacja struktur a-CaP na powłoce implantu jest kontrolowalna i przewidywalna. Wynik może być potwierdzeniem właściwej drogi rozwoju materiału ze ściśle zdefiniowanymi wskazaniami medycznymi.

## Rozdział 7

### *Plany przyszłych badań naukowych autorki*

Implantologia, pomimo swojej długiej historii i dynamicznego rozwoju, jest dziedziną z ogromnym potencjałem naukowym i społecznym. Kluczowe zjawiska związane z funkcjonowaniem ciała stałego w organizmie człowieka nie są w zadawalającym stopniu jeszcze poznane i zrozumiane. Dotyczy to w szczególności kostnych implantów stałych, w perspektywie długoterminowego ich użytkowania. Okołooperacyjne komplikacje zdrowotne pacjentów wyznaczają zatem trendy i obszary badawcze ważne z punktu widzenia medycyny regeneracyjnej oraz inżynierii materiałowej.

Poznanie szczegółowych mechanizmów oddziaływania, zależności fizykochemicznych i biologicznych powierzchni ciała stałego ze środowiskiem biologicznym to podstawowa rola dziedziny. Przedstawiony przez autorkę wynik wraz z zaproponowanym modelem osteointegracji jest pewnym wkładem naukowym w rozwój medycyny regeneracyjnej, co więcej otwiera perspektywę dalszego rozwoju biomimetycznej spersonalizowanej powłoki metalowego implantu kostnego.

Otrzymany wynik otwiera drogę do kontynuacji działań naukowych. Z uwagi na wysoką plastyczność komórek kostnych, i zauważalny wpływ procesu technologicznego na sposób wiązania a-CaP do powierzchni, wybiórczą reakcję HfO<sub>2</sub> na zmiany chemiczne środowiska autorka ma świadomość, że dalsze, uszczegółowione badania są konieczne, a w szczególności:

- eksperymentalnym wyzwaniem będzie obniżenie temperatury procesu wytwarzania pro-apatyto twórczej powłoki, w szczególności ominięcie etapu wygrzewania po procesie osadzania warstwy ALD. Obecnie optymalne warunki technologiczne to wzrost warstwy w komorze ALD w 180°C-270°C i wygrzewanie w temperaturze 400°C-600°C. Przedstawione parametry są temperaturowymi warunkami brzegowymi, które gwarantowały jednorodnie rozmieszczone sferyczne struktury a-CaP na całej powierzchni próbki. Obniżenie temperatury otworzyłoby drogę do funkcjonalizacji również implantów z innych materiałów niż metal, na przykład polimery

(PLLA). Ciekawą alternatywą dla wygrzewania po procesowego może okazać się domieszkowanie jonami Zn i Mg. Badania zostały już zapoczątkowane.

- struktury  $\alpha$ -CaP, które nukleują na powierzchni  $\text{HfO}_2$  mają w warunkach symulowanych średnicę rzędu kilku  $\mu\text{m}$ . Według modelu biomineralizacji tkanki kostnej kryształy apatytu po transformacji w z mają wymiary rzędu kilkudziesięciu nm. Dlatego planuje się rozwój technologii, która w większym stopniu pozwoli na kontrolowanie procesem nukleacji. U podstaw tej pracy będzie zrozumienie istoty punktowego wzrostu struktur  $\alpha$ -CaP.

- planowana jest szczegółowa analiza termodynamiczna procesu samoorganizacji struktur  $\alpha$ -CaP i wytłumaczenie mechanizmu wzrostu ograniczonego ich rozmiaru.



## Podsumowanie

W wyniku prac badawczo - technologicznych scharakteryzowano potencjał osteogenny tlenków metali przejściowych otrzymywanych metodą ALD. Analiza została oparta na pracach technologicznych wzrostu i optymalizacji warstw, eksperymentach z wykorzystaniem SBF oraz fizycznych metodach charakteryzacji powierzchni jak XPS i XRD. Amorficzne tlenki tytanu, cyrkonu i hafnu oceniono jako przyszłościowe materiały implantologiczne dedykowane pacjentom z osteoporozą. Powłoka  $\text{HfO}_2$  przygotowana metodą ALD została scharakteryzowana jako wartościowy materiał osteo-regeneracyjny, o właściwościach hamujących aktywność osteoklastów, wspierających proliferację osteoblastów oraz przeciwzapalnych. Kikuty kości muszą w sposób naturalny integrować powierzchnie implantów kostnych, tworząc stabilne, jednorodne zespolenie. W ogromnym stopniu zależy jakość tego zespolenia od funkcjonalizacji powierzchni implantu. W wyniku złożonej budowy tkanki kostnej istnieje kilka kluczowych parametrów opisujących funkcjonalną powierzchnię implantu. Należą do nich te związane z oddziaływaniami na poziomie składnika organicznego kości, czyli komórek kostnych albo na poziomie składnika nieorganicznego, czyli BA. Komplementarna charakteryzacja powierzchni implantu powinna obejmować zarówno interakcje na poziomie komórkowym, jak i mineralnym.

W badaniach przedwstępnych ocenione zostały atrybuty powłok ALD tlenków metali przejściowych, a po wybraniu  $\text{HfO}_2$  jako materiału o największym potencjale osteo-regeneracyjnym przeprowadzono charakteryzację pro-apatyto twórczą materiału.

Działania technologiczne oparte na dostępnej literaturze i prowadzone wspólnie z analizą fizykochemiczną materiału pozwoliły na opracowanie materiału o biomimetycznych właściwościach. Ustalono etapy procesu technologicznego i optymalne warunki przygotowania. Komplementarne wyniki badań powłoki  $\text{HfO}_2$  wskazują, że posiada właściwości kluczowe dla funkcjonalnej powłoki metalowego implantu kostnego, a mianowicie:

- pozytywnie wpływa na proliferację prekursorów osteoblastów,
- hamuje aktywność osteoklastów,
- ogranicza reakcje obronne organizmu,
- **posiada właściwości pro-apatyto twórcze.**

Optymalizacja procesu technologicznego była inspirowana naturalnie zachodzącym w żywej tkance kostnej procesem biomineralizacji. Zaobserwowane na powierzchni warstwy jednorodnie umiejscowione struktury  $\alpha$ -CaP charakteryzuje podobieństwo do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez osteoblasty w procesach naturalnej i pourazowej remodulacji kości. Wskazany został przypuszczalny mechanizm lokalnego wiązania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do powierzchni powłoki  $\text{HfO}_2$  a w konsekwencji wzrostu sferycznej, amorficznej struktury  $\alpha$ -CaP. Biomimetyczny potencjał, czyli naśladujący model biomineralizacji tkanki kostnej, o niejednorodnym umiejscowieniu płytek z kryształów apatyty na matrycy z włókien kolagenowych jest głównym walorem naukowym otrzymanych wyników. Analiza i opis mechanizmu osadzania się struktur  $\alpha$ -CaP na powierzchni ciała stałego w zależności od fizykochemicznych parametrów tej powierzchni nadają pracy uniwersalnego charakteru, bo mogą być wykorzystane przy projektowaniu też innych materiałów. Otrzymane wyniki są innowacyjne i stanowią cenny wkład naukowy w obszarze funkcjonalizowania powierzchni implantów, zwłaszcza metalowych rusztowań dedykowanych pacjentom z zaburzoną homeostazą tkanki kostnej. Z uwagi na ważność podjętego problemu naukowego i znaczenie otrzymanych wyników planowana jest kontynuacja badań, która będzie ukierunkowana w pierwszej kolejności na doprecyzowanie opisu zależności parametrów  $\text{HfO}_2$  i zjawisk powierzchniowych w roztworze elektrolitowym. Możliwie nieskomplikowany proces wytwarzania biomateriału ma zagwarantować, na przyszłym etapie aplikacji, szeroką dostępność społeczną z uwagi na walory ekonomiczne co jest dodatkowym przyczynkiem do kontynuacji badań.

## Dorobek naukowy autorki

W ciągu pierwszych trzech lat studiów doktoranckich autorka skupiła się na opanowaniu metody ALD, w szczególności na optymalizacji metody ALD-ozon i charakterystyce właściwości warstw wzrastanych tą metodą co zostało udokumentowane pracami [124], [132]

Wpisując się w główny nurt tematyki rozprawy wykonane w tym etapie zostały też badania właściwości osteoregeneracyjnych niskotemperaturowych warstw ALD, co z kolei zostało opublikowane w [4]–[6], te prace powstały przy ścisłej współpracy z prof. dr. hab. Krzysztofem Maryczem oraz grupą przez niego kierowaną, z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Przez okres studiów doktoranckich autorka, oprócz wspomnianego rozwoju metody ALD, opanowała dwie techniki charakteryzacji struktury ciała stałego (XRD i XPS), samodzielnie wykonuje pomiary i analizuje wyniki czego efektem jest współautorstwo w publikacjach [201], [202].

Drugi etap studiów doktoranckich to intensywna praca autorki nad wdrożeniem jej innowacyjnego pomysłu dotyczącego charakteryzacji pro-apatyto twórczych właściwości  $\text{HfO}_2$ .

Z uwagi na wysoki potencjał naukowy i społeczny otrzymanych wyników, autorka w pierwszej kolejności przygotowała kilka zgłoszeń patentowych bazujących na ww. wynikach, stąd brak jest aktualnej publikacji dotyczącej wyników prac z drugiego etapu jej studiów, w sumie autorka jest współtwórczynią w 9 zgłoszeniach patentowych. Pomimo tego aktywność autorki w obszarze publikacyjnym pozwoliła na uzyskanie pewnego dorobku naukowego: sumarycznie 11 artykułów opublikowanych w wysoko punktowanych czasopismach naukowych, 92 cytowań, indeks-Hirscha 6.

## Spis publikacji naukowych

*Publikacje bezpośrednio związane z tematyką rozprawy doktorskiej:*

Seweryn Aleksandra, Krystyna Lawniczak-Jablonska, Piotr Kuzmiuk, Sylwia Gieraltowska, Marek Godlewski, and Robert Mroczynski. 2021. “**Investigations of Structural and Electrical Properties of ALD Films Formed with the Ozone Precursor.**” *Materials* 14 (18): 1–14. <https://doi.org/10.3390/ma14185395>.

Seweryn A., M. Alicka, A. Fal, K. Kornicka-Garbowska, K. Lawniczak-Jablonska, M. Ozga, P. Kuzmiuk, M. Godlewski, and K. Marycz. 2020. “**Hafnium (IV) Oxide Obtained by Atomic Layer Deposition (ALD) Technology Promotes Early Osteogenesis via Activation of Runx2-OPN-Mir21A Axis While Inhibits Osteoclasts Activity.**” *Journal of Nanobiotechnology* 18 (132): 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00692-5>.

Smieszek Agnieszka, Aleksandra Seweryn, Klaudia Marcinkowska, Mateusz Sikora, Krystyna Lawniczak-Jablonska, Bartłomiej S. Witkowski, Piotr Kuzmiuk, Marek Godlewski, and Krzysztof Marycz. 2020. “**Titanium Dioxide Thin Films Obtained by Atomic Layer Deposition Promotes Osteoblasts’ Viability and Differentiation Potential While Inhibiting Osteoclast Activity — Potential Application for Osteoporotic.**” *Materials* 13 (4817): 1–20. <https://doi.org/10.3390/ma13214817>.

Seweryn Aleksandra, Ariadna Pielok, Krystyna Lawniczak-Jablonska, Rafal Pietruszka, Klaudia Marcinkowska, Mateusz Sikora, Bartłomiej S. Witkowski, Marek Godlewski, Krzysztof Marycz, and Agnieszka Smieszek. 2020. “**Zirconium Oxide Thin Films Obtained by Atomic Layer Deposition Technology Abolish the Anti-Osteogenic Effect Resulting from MiR-21 Inhibition in the Pre-Osteoblastic MC3T3 Cell Line.**” *International Journal of Nanomedicine* 15: 1595–1610. <https://doi.org/10.2147/IJN.S237898>.

Seweryn Aleksandra, Rafal Pietruszka, Bartłomiej S. Witkowski, Aleksandra Wierzbicka, Rafal Jakiela, Piotr Sybilski, Marek Godlewski, et al. 2019. “**Structural and Electrical Parameters of ZnO Thin Films Grown by ALD with Either Water or Ozone as Oxygen Precursors.**” *Crystals* 9 (554): 16–19. <https://doi.org/10.3390/cryst9110554>.

*Publikacje nie bezpośrednio związane z tematyką rozprawy doktorskiej*

Puźniak Mirosław, Wojciech Gajewski, Aleksandra Seweryn, Marcin T. Klepka, Bartłomiej S. Witkowski, Marek Godlewski, and Robert Mroczyński. 2023. "Studies of Electrical Parameters and Thermal Stability of HiPIMS Hafnium Oxynitride (HfOxNy) Thin Films." *Materials* 16 (6): 2539. <https://doi.org/10.3390/ma16062539>.

Gnida Paweł, Aneta Słodek, Pavel Chulkin, Marharyta Vasylieva, Agnieszka Katarzyna Pająk, Aleksandra Seweryn, Marek Godlewski, Bartłomiej S. Witkowski, Grażyna Szafranec-Gorol, and Ewa Schab-Balcerzak. 2022. "Impact of Blocking Layer on DSSC Performance Based on New Dye -Indolo[3,2,1-Jk]Carbazole Derivative and N719." *Dyes and Pigments* 200 (April). <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110166>.

Przeździecka Ewa, P Strąk, A Wierzbicka, A Adhikari, A Lysak, P Sybilski, and J M Sajkowski. 2021. "The Band Gap Studies of Short Period CdO / MgO Superlattices." *Nanoscale Research Letters* 16 (59): 1–9. <https://doi.org/10.1186/s11671-021-03517-y>.

Pietraszewicz Joanna, Aleksandra Seweryn, and Emilia Witkowska. 2021. "Multifaceted Phase Ordering Kinetics of an Antiferromagnetic Spin 1 Condensate." *Scientific Reports* 11 (9296): 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88454-7>.

Ozga M., J. Kaszewski, A. Seweryn, P. Sybilski, M. Godlewski, and B. S. Witkowski. 2020. "Ultra-Fast Growth of Copper Oxide (II) Thin Films Using Hydrothermal Method." *Materials Science in Semiconductor Processing* 120 (105279): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.mssp.2020.105279>.

### **Spis zgłoszeń patentowych**

*Patenty związane bezpośrednio z główną tematyką dysertacji*

1. Zgłoszenie patentowe nr P.433753z dnia 30.04.2020

**Sposób wytwarzania warstwy wspomagającej zasiedlanie komórek macierzystych/progenitorowych na powierzchni implantów dokostnych oraz implant dokostny z warstwą wspomagającą zasiedlanie komórek macierzystych.**

*Marek Godlewski, Krzysztof Marycz, Aleksandra Seweryn, Agnieszka Śmieszek,  
Bartłomiej S. S. Witkowski*

2. Zgłoszenie patentowe nr P.442835 z dnia 15.11.2022

**Implant z biomimetyczną powłoką wspierającą osteointegrację tkanki kostnej z powierzchnią implantu i sposób pokrycia implantu taką powłoką**

*Aleksandra Seweryn Bartłomiej Witkowski Marek Godlewski*

3. Zgłoszenie patentowe nr P.442836 z dnia 15.11.2022

**Sposób wytwarzania biomimetycznej spersonizowanej powłoki na implancie kostnym wspierającej osadzanie się apatyty biologicznego na powierzchni tego implantu**

*Aleksandra Seweryn, Bartłomiej Witkowski Marek Godlewski, Marcin Klepka,  
Wojciech Woźniak*

4. Zgłoszenie patentowe nr P. 442840 z dnia 15.11.2022

**Implant z biomimetyczną powłoką promującą osteointegrację tkanki kostnej z powierzchnią implantu oraz sposób wytwarzania biomimetycznej powłoki na powierzchni tego implantu**

*Aleksandra Seweryn, Bartłomiej Witkowski Marek Godlewski, Marcin Klepka,  
Anna Wolska*

5. Zgłoszenie patentowe nr P.442837 z dnia 15.11.2022

**Sposób wytwarzania biomimetycznej powłoki wspierającej osteointegrację tkanki kostnej z powierzchnią implantu**

*Aleksandra Seweryn, Bartłomiej Witkowski Marek Godlewski*

*Patenty niebezpośrednio związane z główną tematyką dysertacji*

6. Zgłoszenie patentowe nr P.434380 z dnia 19.06.2020

**Sposób osadzania warstwy promującej gojenie rany pooperacyjnej na siateczkach protetycznych przepuklin oraz warstwa promująca gojenie.**

*Marek Godlewski, Michał M. Godlewski, Sławomir Giziński, Rafał Pietruszka, Anna Słońska-Zielonka, Aleksandra Seweryn*

7. Zgłoszenie patentowe nr P.442830 z dnia 15.11.2022

**Folia termoizolacyjna oraz sposób wytwarzania folii termoizolacyjnej**

*Bartłomiej Witkowski, Aleksandra Seweryn, Marek Godlewski, Piotr Sybilski*

8. Zgłoszenie patentowe nr P.442831 z dnia 15.11.2022

**Sposób osadzania warstw termoizolacyjnych na szybach**

*Bartłomiej S. Witkowski, Aleksandra Seweryn, Marek Godlewski, Piotr Sybilski*

9. Zgłoszenie patentowe nr P.442834 z dnia 15.11.2022

**Optyczny filtr krawędziowy górnoprzepustowy oraz sposób wykonania takiego filtra**

*Bartłomiej Witkowski, Aleksandra Seweryn, Marek Godlewski, Jacek Szczepkowski*

**Wybrane nagrody i wyróżnienia**

**Prix Eiffel 2022 and Global Industrie 2022. 17-20 Maj 2022, Paryż, Francja**

*Nagroda Platynowa: Oxide layers for applications in implantology*

*Aleksandra Seweryn, Bartłomiej S. Witkowski, Marek Godlewski- Instytut Fizyki PAN  
Warszawa*

**XV International Invention and Innovation Show, INTARG 2022, 11-12 maj 2022  
Katowice, Polska**

**Nagroda Platynowa:** Warstwy tlenkowe dla zastosowań w implantologii

*Aleksandra Seweryn, Bartłomiej S. Witkowski, Marek Godlewski- Instytut Fizyki PAN, Warszawa*

**XIV International Invention and Innovation Show, INTARG 2021, 15-16 czerwiec 2021, Katowice, Polska**

**Złoty medal:** Warstwy tlenkowe dla zastosowań w implantologii

*mgr Aleksandra Seweryn, dr hab. Bartłomiej S. Witkowski, prof dr hab. Marek Godlewski - Instytut Fizyki PAN Warszawa,*

*dr Agnieszka Śmieszek, prof. dr hab. Krzysztof Marycz - Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu*

**Innovation week IWA 2020, 16-21 listopad 2020 Maroko, Maroko**

**Gold medal:** Atomic Layer Deposition Technology as a method allowing functionalization of the implant surfaces designed for the osteoporotic patient.

*Aleksandra Seweryn, Bartłomiej S. Witkowski, Marek Godlewski – Instytut Fizyki PAN Warszawa*

*Agnieszka Śmieszek, Krzysztof Marycz – Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu*

**Japan Design Idea and Invention Expo, 1-3 lipiec 2020, Japonia**

**Srebrny medal:** Nanocoatings by Atomic Layer Deposition on thermally sensitive substrates – new applications in medicine and food industry

*Aleksandra Seweryn, Rafał Pietruszka, Piotr Caban, Bartłomiej S. Witkowski, Marek Godlewski - Instytut Fizyki PAN Warszawa*

*Anna Słońska-Zielonka, Joanna Cymerys-Bulenda, Michał M. Godlewski – SGGW*



**XIII International Show INTARG 2020 – Social Innovations, 18-19 czerwiec 2020,  
Katowice, Polska**

***Nagroda Specjalna:*** Atomic Layer Deposition Technology as a method allowing functionalization of the implant surfaces designed for the osteoporotic patient (Nowe nanomateriały dla implantologii)

*Aleksandra Seweryn, Bartłomiej S. Witkowski, Marek Godlewski – Instytut Fizyki PAN  
Warszawa*

*Agnieszka Śmieszek, Krzysztof Marycz – Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu*

***Złoty medal:*** Atomic Layer Deposition Technology as a method allowing functionalization of the implant surfaces designed for the osteoporotic patient (Nowe nanomateriały dla implantologii)

*Aleksandra Seweryn, Bartłomiej S. Witkowski, Marek Godlewski – Instytut Fizyki PAN  
Warszawa*

*Agnieszka Śmieszek, Krzysztof Marycz – Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu*

## Bibliografia

- [1] R. P. Feynman, “Plenty of Room at the Bottom,” Pasadena: American Physical Society, Dec. 1959, pp. 1–7.
- [2] J. Robertson, “High dielectric constant oxides,” *The European Physical Journal Applied Physics*, vol. 28, no. 3, pp. 265–291, Dec. 2004, doi: 10.1051/epjap:2004206.
- [3] Suntola Tuomo and Anston Jorma, “Method for producing thin films,” US4058430A, Nov. 25, 1975
- [4] A. Seweryn *et al.*, “Zirconium oxide thin films obtained by atomic layer deposition technology abolish the anti-osteogenic effect resulting from miR-21 inhibition in the pre-osteoblastic MC3T3 cell line,” *Int J Nanomedicine*, vol. 15, pp. 1595–1610, 2020, doi: 10.2147/IJN.S237898.
- [5] A. Smieszek *et al.*, “Titanium Dioxide Thin Films Obtained by Atomic Layer Deposition Promotes Osteoblasts’ Viability and Differentiation Potential While Inhibiting Osteoclast Activity — Potential Application for Osteoporotic,” *Materials*, vol. 13, no. 4817, pp. 1–20, 2020, doi: 10.3390/ma13214817.
- [6] A. Seweryn *et al.*, “Hafnium (IV) oxide obtained by atomic layer deposition (ALD) technology promotes early osteogenesis via activation of Runx2-OPN-mir21A axis while inhibits osteoclasts activity,” *J Nanobiotechnology*, vol. 18, no. 132, pp. 1–16, 2020, doi: 10.1186/s12951-020-00692-5.
- [7] D. J. DiGirolamo, T. L. Clemens, and S. Kousteni, “The skeleton as an endocrine organ,” *Nat Rev Rheumatol*, vol. 8, no. 11, pp. 674–683, Nov. 2012, doi: 10.1038/nrrheum.2012.157.
- [8] R. Marsell and T. A. Einhorn, “The biology of fracture healing,” *Injury*, vol. 42, no. 6, pp. 551–555, 2011, doi: 10.1016/j.injury.2011.03.031.

- [9] J. Y. Noh, Y. Yang, and H. Jung, “Molecular mechanisms and emerging therapeutics for osteoporosis,” *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 20, pp. 1–22, Oct. 2020, doi: 10.3390/ijms21207623.
- [10] S. Kuroshima, M. Kaku, T. Ishimoto, M. Sasaki, T. Nakano, and T. Sawase, “A paradigm shift for bone quality in dentistry: A literature review,” *Journal of Prosthodontic Research*, vol. 61, no. 4. Elsevier Ltd, pp. 353–362, Dec. 01, 2017. doi: 10.1016/j.jpor.2017.05.006.
- [11] G. Zhu *et al.*, “Bone physiological microenvironment and healing mechanism: Basis for future bone-tissue engineering scaffolds,” *Bioact Mater*, vol. 6, no. 11, pp. 4110–4140, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.03.043.
- [12] S. Weiner and H. D. Wagner, “THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations,” *Annual Review of Materials Science*, vol. 28, no. 1, pp. 271–298, Aug. 1998, doi: 10.1146/annurev.matsci.28.1.271.
- [13] J. A. W. Heymann, M. Hayles, I. Gestmann, L. A. Giannuzzi, B. Lich, and S. Subramaniam, “Site-specific 3D imaging of cells and tissues with a dual beam microscope,” *J Struct Biol*, vol. 155, no. 1, pp. 63–73, Jul. 2006, doi: 10.1016/j.jsb.2006.03.006.
- [14] N. Reznikov, R. Shahar, and S. Weiner, “Bone hierarchical structure in three dimensions,” in *Acta Biomaterialia*, Elsevier Ltd, 2014, pp. 3815–3826. doi: 10.1016/j.actbio.2014.05.024.
- [15] S. Weiner, W. Traub, and H. Daniel Wagner, “Lamellar Bone: Structure-Function Relations,” 1999. [Online]. Available: <http://www.idealibrary.com>
- [16] V. Ziv, H. D. Wagner, and S. Weiner, “Microstructure-Microhardness Relations in Parallel-Fibered and Lamellar Bone,” *Bone*, vol. 18, no. 5, pp. 417–445, 1996.
- [17] F. Shapiro and J. Y. Wu, “Woven bone overview: Structural classification based on its integral role in developmental, repair and pathological bone formation throughout vertebrate groups,” *Eur Cell Mater*, vol. 38, pp. 137–167, 2019, doi: 10.22203/eCM.v038a11.

- [18] H. P. Schwarcz, D. Abueidda, and I. Jasiuk, “The ultrastructure of bone and its relevance to mechanical properties,” *Frontiers in Physics*, vol. 5, no. SEP. Frontiers Media S.A., Sep. 05, 2017. doi: 10.3389/fphy.2017.00039.
- [19] Alberts B., Hopkin P., Johnson A.D., and Lewis J., *Essential cell biology*, vol. 1. Garland Science Taylor&Francis Group. LLC, 2015.
- [20] S. Toosi and J. Behravan, “Osteogenesis and bone remodeling: A focus on growth factors and bioactive peptides,” *BioFactors*, vol. 46, no. 3. Blackwell Publishing Inc., pp. 326–340, May 01, 2020. doi: 10.1002/biof.1598.
- [21] V. Sharma, A. Srinivasan, F. Nikolajeff, and S. Kumar, “Biom mineralization process in hard tissues: The interaction complexity within protein and inorganic counterparts,” *Acta Biomater*, vol. 120, pp. 20–37, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.actbio.2020.04.049.
- [22] R. Florencio-Silva, G. R. D. S. Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simões, and P. S. Cerri, “Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells,” *Biomed Res Int*, vol. 2015, pp. 1–18, 2015, doi: 10.1155/2015/421746.
- [23] R. F. M. van Oers, J. Klein-Nulend, and R. G. Bacabac, “The osteocyte as an orchestrator of bone remodeling: An engineer’s perspective,” *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, vol. 12, no. 1. pp. 2–13, Mar. 2014. doi: 10.1007/s12018-014-9154-9.
- [24] Dorozhkin Sergey V. and Epple Mattias, “Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates,” *Angewandte Chemie Int Ed Engl*, vol. 41, no. 17, pp. 3130–3146, 2002, doi: 10.1002/1521-3773(20020902)41:17.
- [25] Lowenstam H. A. and Weiner S., “On Biom mineralization,” *Mineral Mag*, vol. 54, no. 375, pp. 344–345, 1989.
- [26] H. B. Lu, C. T. Campbell, D. J. Graham, and B. D. Ratner, “Surface characterization of hydroxyapatite and related calcium phosphates by XPS and

- TOF-SIMS,” *Anal Chem*, vol. 72, no. 13, pp. 2886–2894, Jul. 2000, doi: 10.1021/ac990812h.
- [27] Sobczak-Kupiec A. and Wzorek Z., “Właściwości fizykochemiczne ortofosforanów wapnia Istotnych dla medycyny - TCP i HAp,” *Technical Transactions*, vol. 107, no. 10, 2010.
- [28] H. Kim, R. P. Camata, Y. K. Vohra, and W. R. Lacey, “Control of phase composition in hydroxyapatite/tetracalcium phosphate biphasic thin coatings for biomedical applications.”
- [29] T. Kono, T. Sakae, H. Nakada, T. Kaneda, and H. Okada, “Confusion between Carbonate Apatite and Biological Apatite (Carbonated Hydroxyapatite) in Bone and Teeth,” *Minerals*, vol. 12, no. 2, p. 170, Jan. 2022, doi: 10.3390/min12020170.
- [30] R.A. Young, “Biological Apatite vs Hydroxyapatite at the Atomic Level,” *Clin Orthop Relat Res*, vol. 113, pp. 249–262, 1974.
- [31] Branemark Per I. and Thureson af Ekenstam B., “Element for implantation in body tissue, particularly bone tissue,” 1979
- [32] Q. Liu, S. Huang, J. P. Matinlinna, Z. Chen, and H. Pan, “Insight into biological apatite: Physicochemical properties and preparation approaches,” *Biomed Res Int*, vol. 2013, pp. 1–13, 2013, doi: 10.1155/2013/929748.
- [33] Niragu J.O. and Moore P.B., *Photosphate Minerals*. Springer Berlin Heidelberg, 1984. doi: 10.1007/978-3-642-61736-2.
- [34] G. Ma and X. Y. Liu, “Hydroxyapatite: Hexagonal or monoclinic?” *Cryst Growth Des*, vol. 9, no. 7, pp. 2991–2994, Jul. 2009, doi: 10.1021/cg900156w.
- [35] D. Zimmerman, F. Jin, P. Leboy, S. Hardy, and C. Damsky, “Impaired bone formation in transgenic mice resulting from altered integrin function in osteoblasts,” *Dev Biol*, vol. 220, no. 1, pp. 2–15, Apr. 2000, doi: 10.1006/dbio.2000.9633.

- [36] D. A. Puleo and A. Nanci, “Understanding and controlling the bone implant interface,” 1999.
- [37] N. Hashimoto *et al.*, “Dynamic analysis of the resultant force acting on the hip joint during level walking,” *Artif Organs*, vol. 29, no. 5, pp. 387–392, 2005, doi: 10.1111/j.1525-1594.2005.29065.x.
- [38] H. Haffer, S. Popovic, F. Martin, S. Hardt, T. Winkler, and P. Damm, “In vivo loading on the hip joint in patients with total hip replacement performing gymnastics and aerobics exercises,” *Sci Rep*, vol. 11, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-92788-7.
- [39] G. Bergmann, F. Graichen, and A. Rohlmann, “Hip joint loading during walking and running, measured in two patients,” *J Biomech*, vol. 26, no. 8, pp. 969–990, Aug. 1993, doi: 10.1016/0021-9290(93)90058-M.
- [40] T. S. Karachalios, A. A. Koutalos, and G. A. Komnos, “Total hip arthroplasty in patients with osteoporosis,” *HIP International*, vol. 30, no. 4, pp. 370–379, Jul. 2020, doi: 10.1177/1120700019883244.
- [41] P.-I. Branemark, “Osseointegration and its experimental background,” *Thr Journal of Prosthetic Dentistry*, vol. 50, no. 3, pp. 399–410, 1983.
- [42] J. S. Hoellwarth, K. Tetsworth, M. A. Akhtar, and M. al Muderis, “The Clinical History and Basic Science Origins of Transcutaneous Osseointegration for Amputees,” *Advances in Orthopedics*, vol. 2022. Hindawi Limited, 2022. doi: 10.1155/2022/7960559.
- [43] N. Eliaz, “Corrosion of metallic biomaterials: A review,” *Materials*, vol. 12, no. 3, pp. 1–91, Jan. 2019, doi: 10.3390/ma12030407.
- [44] K. Markatos, S. Sardiniari, E. Brilakis, I. Apostolopoulos, G. Tsoucalas, and E. Chronopoulos, “Jules Pean (1830-1898)—A Pioneer Surgeon: His Achievements and His Total Shoulder Arthroplasty,” *Surg Innov*, vol. 26, no. 6, pp. 763–765, Dec. 2019, doi: 10.1177/1553350619875303.

- [45] I. D. Learmonth, C. Young, and C. Rorabeck, “The operation of the century: total hip replacement,” *www.thelancet.com*, vol. 370, 2007, doi: 10.1016/S0140.
- [46] S. R. Knight, R. Aujla, and S. P. Biswas, “Total Hip Arthroplasty-over 100 years of operative history”, doi: 10.4081/or.2011.16.
- [47] Smith-Petersen M.N., “Evolution of mould arthroplasty of the hip joint,” *The Bone&Joint Journal*, vol. 30-B, no. 1, pp. 59–75, Feb. 1948, doi: 10.1302/0301-620X.30B1.59.
- [48] C. C. Chusuei *et al.*, “Cytotoxicity in the age of nano: The role of fourth period transition metal oxide nanoparticle physicochemical properties,” *Chem Biol Interact*, vol. 206, no. 2, pp. 319–326, 2013, doi: 10.1016/j.cbi.2013.09.020.
- [49] R. M. URBAN, J. J. JACOBS, M. J. TOMLINSON, J. GAVRILOVIC, J. BLACK, and M. PEOC’H, “Dissemination of Wear Particles to the Liver, Spleen, and Abdominal Lymph Nodes of Patients with Hip or Knee Replacement\*,” *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, vol. 82, no. 4, pp. 457–477, Apr. 2000, doi: 10.2106/00004623-200004000-00002.
- [50] J. Schoon *et al.*, “Metal-Specific Biomaterial Accumulation in Human Peri-Implant Bone and Bone Marrow,” *Advanced Science*, vol. 7, no. 20, Oct. 2020, doi: 10.1002/advs.202000412.
- [51] M. Hussain *et al.*, “Recent developments in coatings for orthopedic metallic implants,” *Coatings*, vol. 11, no. 7. MDPI AG, Jul. 01, 2021. doi: 10.3390/coatings11070791.
- [52] V. Vishwakarma, G. S. Kaliaraj, and K. K. Amirtharaj Mosas, “Multifunctional Coatings on Implant Materials—A Systematic Review of the Current Scenario,” *Coatings*, vol. 13, no. 1. MDPI, Jan. 01, 2023. doi: 10.3390/coatings13010069.
- [53] S. Bohara and J. Suthakorn, “Surface coating of orthopedic implant to enhance the osseointegration and reduction of bacterial colonization: a review,” *Biomaterials Research*, vol. 26, no. 1. BioMed Central Ltd, Dec. 01, 2022. doi: 10.1186/s40824-022-00269-3.

- [54] J. Raphael, M. Holodniy, S. B. Goodman, and S. C. Heilshorn, “Multifunctional coatings to simultaneously promote osseointegration and prevent infection of orthopaedic implants,” *Biomaterials*, vol. 84. Elsevier Ltd, pp. 301–314, Apr. 01, 2016. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.016.
- [55] L. M. Czumbel *et al.*, “Sandblasting reduces dental implant failure rate but not marginal bone level loss: A systematic review and meta-analysis,” *PLoS One*, vol. 14, no. 5, May 2019, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0216428.
- [56] R. L. Puurunen, “A short history of atomic layer deposition: Tuomo Suntola’s atomic layer epitaxy,” *Chemical Vapor Deposition*, vol. 20, no. 10–12. Wiley-VCH Verlag, pp. 332–344, Dec. 01, 2014. doi: 10.1002/cvde.201402012.
- [57] V. Cremers, R. L. Puurunen, and J. Dendooven, “Conformality in atomic layer deposition: Current status overview of analysis and modelling,” *Applied Physics Reviews*, vol. 6, no. 2. American Institute of Physics Inc., Jun. 01, 2019. doi: 10.1063/1.5060967.
- [58] W. J. Hendrikson *et al.*, “Influence of additive manufactured scaffold architecture on the distribution of surface strains and fluid flow shear stresses and expected osteochondral cell differentiation,” *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 5, no. FEB, Feb. 2017, doi: 10.3389/fbioe.2017.00006.
- [59] D. Ali and S. Sen, “Computational Fluid Dynamics Study of the Effects of Surface Roughness on Permeability and Fluid Flow-Induced Wall Shear Stress in Scaffolds,” *Ann Biomed Eng*, vol. 46, no. 12, pp. 2023–2035, Dec. 2018, doi: 10.1007/s10439-018-2101-z.
- [60] A. Mirzajavadkhan, S. Rafieian, and M. H. Hasan, “Toxicity of Metal Implants and Their Interactions with Stem Cells: A Review,” *International Journal of Engineering Materials and Manufacture*, vol. 5, no. 1, pp. 2–11, Mar. 2020, doi: 10.26776/ijemm.05.01.2020.02.
- [61] S. Wu, Z. Weng, X. Liu, K. W. K. Yeung, and P. K. Chu, “Functionalized TiO<sub>2</sub> based nanomaterials for biomedical applications,” *Adv Funct Mater*, vol. 24, no. 35, pp. 5464–5481, Sep. 2014, doi: 10.1002/adfm.201400706.



- [62] D. Rodrigues *et al.*, “Titanium Corrosion Mechanisms in the Oral Environment: A Retrieval Study,” *Materials*, vol. 6, no. 11, pp. 5258–5274, Nov. 2013, doi: 10.3390/ma6115258.
- [63] L. Liu, R. Bhatia, and T. J. Webster, “Atomic layer deposition of nano-TiO<sub>2</sub> thin films with enhanced biocompatibility and antimicrobial activity for orthopedic implants,” *Int J Nanomedicine*, vol. 12, pp. 8711–8723, Nov. 2017, doi: 10.2147/IJN.S148065.
- [64] K. S. Brammer, C. J. Frandsen, and S. Jin, “TiO<sub>2</sub> nanotubes for bone regeneration,” *Trends in Biotechnology*, vol. 30, no. 6, pp. 315–322, Jun. 2012. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.02.005.
- [65] li J. and Hastings G.W., *Oxide ceramics: inert ceramic materials in medicine and dentistry*. Chapman & Hall, London, 1998.
- [66] J. P. Niemelä, G. Marin, and M. Karppinen, “Titanium dioxide thin films by atomic layer deposition: A review,” *Semiconductor Science and Technology*, vol. 32, no. 9. Institute of Physics Publishing, Aug. 23, 2017. doi: 10.1088/1361-6641/aa78ce.
- [67] J. Aarik, A. Aidla, T. Uustare, M. Ritala, and M. Leskela, “Titanium isopropoxide as a precursor for atomic layer deposition: characterization of titanium dioxide growth process,” 2000. [Online]. Available: [www.elsevier.nl/locate/apsusc](http://www.elsevier.nl/locate/apsusc)
- [68] V. Miikkulainen, M. Leskelä, M. Ritala, and R. L. Puurunen, “Crystallinity of inorganic films grown by atomic layer deposition: Overview and general trends,” *J Appl Phys*, vol. 113, no. 2, Jan. 2013, doi: 10.1063/1.4757907.
- [69] J. P. Niemelä, G. Marin, and M. Karppinen, “Titanium dioxide thin films by atomic layer deposition: A review,” *Semiconductor Science and Technology*, vol. 32, no. 9. Institute of Physics Publishing, Aug. 23, 2017. doi: 10.1088/1361-6641/aa78ce.

- [70] M. Basiaga, W. Walke, M. Staszuk, W. Kajzer, A. Kajzer, and K. Nowińska, “Influence of ALD process parameters on the physical and chemical properties of the surface of vascular stents,” *Archives of Civil and Mechanical Engineering*, vol. 17, no. 1, pp. 32–42, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.acme.2016.08.001.
- [71] M. Basiaga, M. Staszuk, W. Walke, and Z. Opilski, “Mechanical properties of atomic layer deposition (ALD) TiO<sub>2</sub> layers on stainless steel substrates,” in *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, Wiley-VCH Verlag, Jun. 2016, pp. 512–520. doi: 10.1002/mawe.201600527.
- [72] M. Basiaga, W. Kajzer, W. Walke, A. Kajzer, and M. Kaczmarek, “Evaluation of physicochemical properties of surface modified Ti6Al4V and Ti6Al7Nb alloys used for orthopedic implants,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 68, pp. 851–860, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.07.042.
- [73] M. Peron, F. Berto, and J. Torgersen, “Stress corrosion cracking behavior of zirconia ALD-coated AZ31 alloy in simulated body fluid,” *Material Design and Processing Communications*, vol. 2, no. 6, Dec. 2020, doi: 10.1002/mdp2.126.
- [74] M. Peron, R. Bertolini, and S. Cogo, “On the corrosion, stress corrosion and cytocompatibility performances of ALD TiO<sub>2</sub> and ZrO<sub>2</sub> coated magnesium alloys,” *J Mech Behav Biomed Mater*, vol. 125, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.jmbbm.2021.104945.
- [75] M. Peron, J. Torgersen, and F. Berto, “Effect of Zirconia ALD coating on stress corrosion cracking of AZ31 alloy in simulated body fluid,” in *Procedia Structural Integrity*, Elsevier B.V., 2019, pp. 538–548. doi: 10.1016/j.prostr.2019.08.198.
- [76] M. Peron, A. Bin Afif, A. Dadlani, F. Berto, and J. Torgersen, “Comparing physiologically relevant corrosion performances of Mg AZ31 alloy protected by ALD and sputter coated TiO<sub>2</sub>,” *Surf Coat Technol*, vol. 395, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.surfcoat.2020.125922.
- [77] M. Peron, A. Bin Afif, A. L. Dadlani, F. Berto, and J. Torgersen, “Improving stress corrosion cracking behavior of AZ31 alloy with conformal thin titania and

- zirconia coatings for biomedical applications,” *J Mech Behav Biomed Mater*, vol. 111, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.jmbbm.2020.104005.
- [78] M. Peron *et al.*, “On the evaluation of ALD TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub> and HfO<sub>2</sub> coatings on corrosion and cytotoxicity performances,” *Journal of Magnesium and Alloys*, vol. 9, no. 5, pp. 1806–1819, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.jma.2021.03.010.
- [79] F. Blendinger, D. Seitz, A. Ottenschläger, M. Fleischer, and V. Bucher, “Atomic Layer Deposition of Bioactive TiO<sub>2</sub> Thin Films on Polyetheretherketone for Orthopedic Implants,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 13, no. 3, pp. 3536–3546, Jan. 2021, doi: 10.1021/acsami.0c17990.
- [80] M. Motola *et al.*, “Thin TiO<sub>2</sub> Coatings by ALD Enhance the Cell Growth on TiO<sub>2</sub> Nanotubular and Flat Substrates,” *ACS Appl Bio Mater*, vol. 3, no. 9, pp. 6447–6456, Sep. 2020, doi: 10.1021/ACSABM.0C00871.
- [81] B. Li and T. J. Webster, “Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant-associated orthopedic infections,” *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 36, no. 1, pp. 22–32, Jan. 2018, doi: 10.1002/jor.23656.
- [82] A. Boddupalli, L. Zhu, and K. M. Bratlie, “Methods for Implant Acceptance and Wound Healing: Material Selection and Implant Location Modulate Macrophage and Fibroblast Phenotypes,” *Advanced Healthcare Materials*, vol. 5, no. 20, Wiley-VCH Verlag, pp. 2575–2594, Oct. 26, 2016. doi: 10.1002/adhm.201600532.
- [83] F. Blendinger, D. Seitz, A. Ottenschläger, M. Fleischer, and V. Bucher, “Atomic Layer Deposition of Bioactive TiO<sub>2</sub> Thin Films on Polyetheretherketone for Orthopedic Implants,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 13, no. 3, pp. 3536–3546, Jan. 2021, doi: 10.1021/acsami.0c17990.
- [84] I. P. Grigal, A. M. Markeev, S. A. Gudkova, A. G. Chernikova, A. S. Mityaev, and A. P. Alekhin, “Correlation between bioactivity and structural properties of titanium dioxide coatings grown by atomic layer deposition,” *Appl Surf Sci*, vol. 258, no. 8, pp. 3415–3419, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.apsusc.2011.11.082.

- [85] P. Xia, S. Lian, Y. Wu, L. Yan, G. Quan, and G. Zhu, “Zinc is an important inter-kingdom signal between the host and microbe,” *Veterinary Research*, vol. 52, no. 1. BioMed Central Ltd, Dec. 01, 2021. doi: 10.1186/s13567-021-00913-1.
- [86] S. Gierałtowska, Ł. Wachnicki, B. S. Witkowski, M. Godlewski, and E. Guziewicz, “Properties of thin films of high-k oxides grown by atomic layer deposition at low temperature for electronic applications,” *Optica Applicata*, vol. 43, no. 1, pp. 17–25, 2013, doi: 10.5277/oa130102.
- [87] M. Godlewski *et al.*, “High-k oxides by atomic layer deposition—Applications in biology and medicine,” *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, vol. 35, no. 2, p. 021508, Mar. 2017, doi: 10.1116/1.4974314.
- [88] T. Kizuki, T. Matsushita, and T. Kokubo, “Apatite-forming PEEK with TiO<sub>2</sub> surface layer coating,” *J Mater Sci Mater Med*, vol. 26, no. 1, pp. 1–9, Nov. 2015, doi: 10.1007/s10856-014-5359-1.
- [89] L. Lv, K. Li, Y. Xie, Y. Cao, and X. Zheng, “Enhanced osteogenic activity of anatase TiO<sub>2</sub> film: Surface hydroxyl groups induce conformational changes in fibronectin,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 78, pp. 96–104, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.04.056.
- [90] N. Li *et al.*, “TiO<sub>2</sub> Nanocoatings with Controllable Crystal Type and Nanoscale Topography on Zirconia Implants to Accelerate Bone Formation,” *Bioinorg Chem Appl*, vol. 2022, pp. 1–17, Apr. 2022, doi: 10.1155/2022/8650659.
- [91] M. Shahmohammadi, B. E. Nagay, V. A. R. Barão, C. Sukotjo, G. Jursich, and C. G. Takoudis, “Atomic layer deposition of TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>/ZrO<sub>2</sub> mixed oxide nanofilms on PMMA for enhanced biomaterial functionalization,” *Appl Surf Sci*, vol. 578, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.apsusc.2021.151891.
- [92] Q. Yang *et al.*, “Atomic layer deposited ZrO<sub>2</sub> nanofilm on Mg-Sr alloy for enhanced corrosion resistance and biocompatibility,” *Acta Biomater*, vol. 58, pp. 515–526, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2017.06.015.

- [93] Y. Jo, Y. T. Kim, H. Cho, M. K. Ji, J. Heo, and H. P. Lim, “Atomic layer deposition of ZrO<sub>2</sub> on titanium inhibits bacterial adhesion and enhances osteoblast viability,” *Int J Nanomedicine*, vol. 16, pp. 1509–1523, 2021, doi: 10.2147/IJN.S298449.
- [94] W. Yuan *et al.*, “Controllable biodegradation and enhanced osseointegration of ZrO<sub>2</sub>-nanofilm coated Zn-Li alloy: In vitro and in vivo studies,” *Acta Biomater*, vol. 105, pp. 290–303, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.actbio.2020.01.022.
- [95] M. Shahmohammadi, B. E. Nagay, V. A. R. Barão, C. Sukotjo, G. Jursich, and C. G. Takoudis, “Atomic layer deposition of TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>/ZrO<sub>2</sub> mixed oxide nanofilms on PMMA for enhanced biomaterial functionalization,” *Appl Surf Sci*, vol. 578, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.apsusc.2021.151891.
- [96] D. M. Hausmann, E. Kim, J. Becker, and R. G. Gordon, “Atomic layer deposition of hafnium and zirconium oxides using metal amide precursors,” *Chemistry of Materials*, vol. 14, no. 10, pp. 4350–4358, Oct. 2002, doi: 10.1021/cm020357x.
- [97] Z. Fohlerova and A. Mozalev, “Anodic formation and biomedical properties of hafnium-oxide nanofilms,” *J Mater Chem B*, vol. 7, no. 14, pp. 2300–2310, 2019, doi: 10.1039/c8tb03180k.
- [98] S. Mohammadi, M. Esposito, M. Cucu, L. E. Ericson, and P. Thomsen, “Tissue response to hafnium.”
- [99] J. Rituerto Sin, A. Neville, and N. Emami, “Corrosion and tribocorrosion of hafnium in simulated body fluids,” *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, vol. 102, no. 6, pp. 1157–1164, 2014, doi: 10.1002/jbm.b.33097.
- [100] F. Marco, F. Milena, G. Gianluca, and O. Vittoria, “Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis,” *Micron*, vol. 36, no. 7–8, pp. 630–644, Oct. 2005. doi: 10.1016/j.micron.2005.07.008.
- [101] D. Patel and S. Wairkar, “Bone regeneration in osteoporosis: opportunities and challenges,” *Drug Deliv Transl Res*, vol. 13, no. 2, pp. 419–432, Feb. 2023, doi: 10.1007/s13346-022-01222-6.

- [102] M. M. Godlewski *et al.*, “New generation of oxide-based nanoparticles for the applications in early cancer detection and diagnostics,” *Nanotechnology Reviews*, vol. 9, no. 1. De Gruyter, pp. 274–302, Jan. 01, 2020. doi: 10.1515/ntrev-2020-0022.
- [103] M. A. Ackun-Farmmer, C. T. Overby, B. E. Haws, R. Choe, and D. S. W. Benoit, “Biomaterials for orthopedic diagnostics and theranostics,” *Current Opinion in Biomedical Engineering*, vol. 19. Elsevier B.V., Sep. 01, 2021. doi: 10.1016/j.cobme.2021.100308.
- [104] M. Alicka, P. Sobierajska, K. Kornicka, R. J. Wiglusz, and K. Marycz, “Lithium ions ( $\text{Li}^+$ ) and nanohydroxyapatite (nHAp) doped with  $\text{Li}^+$  enhance expression of late osteogenic markers in adipose-derived stem cells. Potential theranostic application of nHAp doped with  $\text{Li}^+$  and co-doped with europium (III) and samarium (III) ions,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 99, pp. 1257–1273, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.02.073.
- [105] R. L. Puurunen, “A short history of atomic layer deposition: Tuomo Suntola’s atomic layer epitaxy,” *Chemical Vapor Deposition*, vol. 20, no. 10–12. Wiley-VCH Verlag, pp. 332–344, Dec. 01, 2014. doi: 10.1002/cvde.201402012.
- [106] B. S. Lim, A. Rahtu, and R. G. Gordon, “Atomic layer deposition of transition metals,” *Nat Mater*, vol. 2, no. 11, pp. 749–754, 2003, doi: 10.1038/nmat1000.
- [107] R. W. Johnson, A. Hultqvist, and S. F. Bent, “A brief review of atomic layer deposition: From fundamentals to applications,” *Materials Today*, vol. 17, no. 5. Elsevier B.V., pp. 236–246, 2014. doi: 10.1016/j.mattod.2014.04.026.
- [108] J. Gao *et al.*, “Microstructure, wettability, optical and electrical properties of  $\text{HfO}_2$  thin films: Effect of oxygen partial pressure,” *J Alloys Compd*, vol. 662, pp. 339–347, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.jallcom.2015.12.080.
- [109] W. Banerjee, A. Kashir, and S. Kamba, “Hafnium Oxide ( $\text{HfO}_2$ ) – A Multifunctional Oxide: A Review on the Prospect and Challenges of Hafnium Oxide in Resistive Switching and Ferroelectric Memories,” *Small*, vol. 18, no. 23, pp. 2107575–2107575–50, Jun. 2022, doi: 10.1002/sml.202107575.

- [110] J. T. Gaskins *et al.*, “Review-Investigation and Review of the Thermal, Mechanical, Electrical, Optical, and Structural Properties of Atomic Layer Deposited High- k Dielectrics: Beryllium Oxide, Aluminum Oxide, Hafnium Oxide, and Aluminum Nitride,” *ECS Journal of Solid State Science and Technology*, vol. 6, no. 10, pp. N189–N208, 2017, doi: 10.1149/2.0091710jss.
- [111] K. Kukli, J. Ihanus, M. Ritala, and M. Leskela, “Tailoring the dielectric properties of HfO<sub>2</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> nanolaminates,” *Appl Phys Lett*, vol. 68, no. 26, pp. 3737–3739, 1996, doi: 10.1063/1.115990.
- [112] H. Kattelus, M. Ylilammi, J. Salmi, T. Ranta-Aho, E. Kanen, and A. Suni, “Electrical Properties of Tantalum Based Composite Oxide Films,” *MRS Proceedings*, vol. 284, pp. 511–512, Feb. 1992, doi: 10.1557/PROC-284-511.
- [113] M. Ritala, M. Leskelä, L. Niinistö, T. Prohaska, G. Friedbacher, and M. Grasserbauer, “Development of crystallinity and morphology in hafnium dioxide thin films grown by atomic layer epitaxy,” *Thin Solid Films*, vol. 250, no. 1–2, pp. 72–80, Oct. 1994, doi: 10.1016/0040-6090(94)90168-6.
- [114] M. Leskela and M. R. Ritalä, “Atomic layer deposition (ALD): from precursors to thin film structures,” *Thin Solid Films*, vol. 409, pp. 138–146, 2002.
- [115] K. Kukli, M. Ritala, T. Sajavaara, J. Keinonen, and M. Leskela, “Comparison of hafnium oxide films grown by atomic layer deposition from iodide and chloride precursors,” *Thin Solid Films*, vol. 416, no. 1–2, pp. 72–79, 2002, doi: 10.1016/S0040-6090(02)00612-0.
- [116] J. Aarik *et al.*, “Hafnium tetraiodide and oxygen as precursors for atomic layer deposition of hafnium oxide thin films,” *Thin Solid Films*, vol. 418, no. 2, pp. 69–72, 2002, doi: 10.1016/S0040-6090(02)00765-4.
- [117] K. Kukli *et al.*, “Properties of hafnium oxide films grown by atomic layer deposition from hafnium tetraiodide and oxygen,” *J Appl Phys*, vol. 92, no. 10, pp. 5698–5703, Nov. 2002, doi: 10.1063/1.1515107.

- [118] X. Liu *et al.*, “ALD of Hafnium Oxide Thin Films from Tetrakis(ethylmethylamino)hafnium and Ozone,” *J Electrochem Soc*, vol. 152, no. 3, pp. G213–G219, 2005, doi: 10.1149/1.1859631.
- [119] N. K. Oh, J.-T. Kim, J.-K. Ahn, G. Kang, S. Y. Kim, and J.-Y. Yun, “ The Effects of Thermal Decomposition of Tetrakis-ethylmethylaminohafnium (TEMAHf) Precursors on HfO<sub>2</sub> Film Growth using Atomic Layer Deposition ,” *Applied Science and Convergence Technology*, vol. 25, no. 3, pp. 56–60, May 2016, doi: 10.5757/asct.2016.25.3.56.
- [120] A. Soulet *et al.*, “Optimizing the selection and supply of Hf precursor candidates for gate oxide,” in *Semiconductor Fabtech - 27th edition* , 2006, pp. 74–81.
- [121] R. Katamreddy, R. Inman, G. Jursich, A. Soulet, and C. Takoudis, “Atomic layer deposition of HfO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and HfAlO<sub>x</sub> using O<sub>3</sub> and metal(diethylamino) precursors,” *J Mater Res*, vol. 22, no. 12, pp. 3455–3464, Dec. 2007, doi: 10.1557/jmr.2007.0439.
- [122] H. Liu, P. Ma, Y. Pu, and Z. Zhao, “Atomic layer deposition of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and HfO<sub>2</sub> for high power laser application,” *J Alloys Compd*, vol. 859, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.jallcom.2020.157751.
- [123] H. B. Park *et al.*, “Comparison of HfO<sub>2</sub> films grown by atomic layer deposition using HfCl<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>O or O<sub>3</sub> as the oxidant,” *J Appl Phys*, vol. 94, no. 5, pp. 3641–3647, Sep. 2003, doi: 10.1063/1.1599980.
- [124] A. Seweryn, K. Lawniczak-Jablonska, P. Kuzmiuk, S. Gieraltowska, M. Godlewski, and R. Mroczynski, “Investigations of structural and electrical properties of ALD films formed with the ozone precursor,” *Materials*, vol. 14, no. 18, pp. 1–14, 2021, doi: 10.3390/ma14185395.
- [125] B. G. Ko *et al.*, “Growth modulation of atomic layer deposition of HfO<sub>2</sub> by combinations of H<sub>2</sub>O and O<sub>3</sub> reactants,” *Dalton Transactions*, vol. 50, no. 48, pp. 17935–17944, Dec. 2021, doi: 10.1039/d1dt03465k.



- [126] S. Y. Lee, H. K. Kim, J. H. Lee, I. H. Yu, J. H. Lee, and C. S. Hwang, "Effects of O<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>O as oxygen sources on the atomic layer deposition of HfO<sub>2</sub> gate dielectrics at different deposition temperatures," *J Mater Chem C Mater*, vol. 2, no. 14, pp. 2558–2568, Apr. 2014, doi: 10.1039/c3tc32561j.
- [127] M. Cho *et al.*, "Comparison between atomic-layer-deposited HfO<sub>2</sub> films using O<sub>3</sub> or H<sub>2</sub>O oxidant and Hf [N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>4</sub> precursor," *Appl Phys Lett*, vol. 85, no. 24, pp. 5953–5955, Dec. 2004, doi: 10.1063/1.1829773.
- [128] Y. Wang, M. Dai, M. T. Ho, L. S. Wielunski, and Y. J. Chabal, "Infrared characterization of hafnium oxide grown by atomic layer deposition using ozone as the oxygen precursor," *Appl Phys Lett*, vol. 90, no. 2, 2007, doi: 10.1063/1.2430908.
- [129] J. H. Kim *et al.*, "Chemical structures and electrical properties of atomic layer deposited HfO<sub>2</sub> thin films grown at an extremely low temperature ( $\leq 100$  C) using O<sub>3</sub> as an oxygen source," *Appl Surf Sci*, vol. 292, pp. 852–856, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.apsusc.2013.12.061.
- [130] S. C. Ha, E. Choi, S. H. Kim, and J. S. Roh, "Influence of oxidant source on the property of atomic layer deposited Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on hydrogen-terminated Si substrate," *Thin Solid Films*, vol. 476, no. 2, pp. 252–257, Apr. 2005, doi: 10.1016/j.tsf.2004.09.035.
- [131] H. G. Kim and H. B. R. Lee, "Atomic Layer Deposition on 2D Materials," *Chemistry of Materials*, vol. 29, no. 9, pp. 3809–3826, May 2017, doi: 10.1021/acs.chemmater.6b05103.
- [132] A. Seweryn *et al.*, "Structural and electrical parameters of ZnO thin films grown by ALD with either water or ozone as oxygen precursors," *Crystals (Basel)*, vol. 9, no. 554, pp. 16–19, 2019, doi: 10.3390/cryst9110554.
- [133] J. Wang, H. P. Li, and R. Stevens, "Review Hafnia and hafnia-toughened ceramics," *Journal of Material Sciences*, vol. 27, pp. 5397–5430, 1992.

- [134] A. J. Cho *et al.*, “Effects of oxygen sources on properties of atomic-layer-deposited ferroelectric hafnium zirconium oxide thin films,” *Ceram Int*, vol. 48, no. 3, pp. 3280–3286, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.ceramint.2021.10.102.
- [135] M. Y. Ho *et al.*, “Morphology and crystallization kinetics in HfO<sub>2</sub> thin films grown by atomic layer deposition,” *J Appl Phys*, vol. 93, no. 3, pp. 1477–1481, Feb. 2003, doi: 10.1063/1.1534381.
- [136] D. M. Hausmann and R. G. Gordon, “Surface morphology and crystallinity control in the atomic layer deposition (ALD) of hafnium and zirconium oxide thin films,” *J Cryst Growth*, vol. 249, pp. 251–261, 2003.
- [137] J. L. Lyons, A. Janotti, and C. G. van de Walle, “The role of oxygen-related defects and hydrogen impurities in HfO<sub>2</sub> and ZrO<sub>2</sub>,” *Microelectron Eng*, vol. 88, no. 7, pp. 1452–1456, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.mee.2011.03.099.
- [138] K. Tapily *et al.*, “Nanoindentation Investigation of HfO<sub>2</sub> and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Films Grown by Atomic Layer Deposition,” *J Electrochem Soc*, vol. 155, no. 7, p. H545, 2008, doi: 10.1149/1.2919106.
- [139] B. G. Ko *et al.*, “Growth modulation of atomic layer deposition of HfO<sub>2</sub> by combinations of H<sub>2</sub>O and O<sub>3</sub> reactants,” *Dalton Transactions*, vol. 50, no. 48, pp. 17935–17944, Dec. 2021, doi: 10.1039/d1dt03465k.
- [140] S. M. George, “Atomic Layer Deposition: An Overview,” 1996, doi: 10.1021/cr900056b.
- [141] M. A. Alam and M. L. Green, “Mathematical description of atomic layer deposition and its application to the nucleation and growth of HfO<sub>2</sub> gate dielectric layers,” *J Appl Phys*, vol. 94, no. 5, pp. 3403–3413, Sep. 2003, doi: 10.1063/1.1599978.
- [142] R. L. Puurunen, “Growth per cycle in atomic layer deposition: A theoretical model,” *Chemical Vapor Deposition*, vol. 9, no. 5, pp. 249–257, Oct. 2003, doi: 10.1002/cvde.200306265.

- [143] X. Nie, F. Ma, D. Ma, and K. Xu, "Growth mode evolution of hafnium oxide by atomic layer deposition," *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, vol. 32, no. 1, p. 01A109, Jan. 2014, doi: 10.1116/1.4832224.
- [144] H. Swenson and N. P. Stadie, "Langmuir's Theory of Adsorption: A Centennial Review," *Langmuir*, 2019, doi: 10.1021/acs.langmuir.9b00154.
- [145] Y. Liu, "Some consideration on the Langmuir isotherm equation," *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 274, no. 1–3, pp. 34–36, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.colsurfa.2005.08.029.
- [146] S. T. Barry, A. v. Teplyakov, and F. Zaera, "The Chemistry of Inorganic Precursors during the Chemical Deposition of Films on Solid Surfaces," *Acc Chem Res*, vol. 51, no. 3, pp. 800–809, Mar. 2018, doi: 10.1021/acs.accounts.8b00012.
- [147] B. Xia, J. J. Ganem, E. Briand, S. Steydli, H. Tancrez, and I. Vickridge, "The carbon and hydrogen contents in ALD-grown ZnO films define a narrow ALD temperature window," *Vacuum*, vol. 190, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.vacuum.2021.110289.
- [148] M. Ritala and M. Leskelä, *Handbook of Thin Film Materials. Deposition and Processing of Thin Films.*, Academic Press., vol. 1. 2001.
- [149] J. Jeong *et al.*, "Conformal Hermetic Sealing of Wireless Microelectronic Implantable Chiplets by Multilayered Atomic Layer Deposition (ALD)," *Adv Funct Mater*, vol. 29, no. 5, Feb. 2019, doi: 10.1002/adfm.201806440.
- [150] R. W. Johnson, A. Hultqvist, and S. F. Bent, "A brief review of atomic layer deposition: From fundamentals to applications," *Materials Today*, vol. 17, no. 5. Elsevier B.V., pp. 236–246, 2014. doi: 10.1016/j.mattod.2014.04.026.
- [151] T. Tynell and M. Karppinen, "Atomic layer deposition of ZnO: a review," *Semicond Sci Technol*, vol. 29, no. 4, p. 043001, Apr. 2014, doi: 10.1088/0268-1242/29/4/043001.

- [152] M. Shahmohammadi, R. Mukherjee, C. Sukotjo, U. M. Diwekar, and C. G. Takoudis, “Recent Advances in Theoretical Development of Thermal Atomic Layer Deposition: A Review,” *Nanomaterials*, vol. 12, no. 5, p. 831, Mar. 2022, doi: 10.3390/nano12050831.
- [153] A. di Mauro, M. E. Fragalà, V. Privitera, and G. Impellizzeri, “ZnO for application in photocatalysis: From thin films to nanostructures,” *Materials Science in Semiconductor Processing*, vol. 69. Elsevier Ltd, pp. 44–51, Oct. 01, 2017. doi: 10.1016/j.mssp.2017.03.029.
- [154] T. K. G. L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, “Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials,” *J Biomed Mater Res*, vol. 117, pp. 117–141, 1972, doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.820050611>.
- [155] T. Kokubo, “Bioactive glass ceramics: properties and applications,” *Biomaterials*, vol. 12, no. 2, pp. 155–163, 1991, doi: 10.1016/0142-9612(91)90194-F.
- [156] T. Kokubo and H. Takadama, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, May 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
- [157] C. Drouet, “Apatite formation: Why it may not work as planned, and how to conclusively identify apatite compounds,” *Biomed Res Int*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/490946.
- [158] F. Baino and S. Yamaguchi, “The use of simulated body fluid (SBF) for assessing materials bioactivity in the context of tissue engineering: Review and challenges,” *Biomimetics*, vol. 5, no. 4. MDPI AG, pp. 1–19, Dec. 01, 2020. doi: 10.3390/biomimetics5040057.
- [159] H. Hertz, “Ueber einen Einfluss des ultravioletten Lichtes auf die electrische Entladung,” *Annalen der Physik und Chemie*, vol. 267, no. 8, pp. 983–1000, 1887, doi: 10.1002/andp.18872670827.

- [160] F. A. Stevie and C. L. Donley, “Introduction to x-ray photoelectron spectroscopy,” *Journal of Vacuum Science & Technology A*, vol. 38, no. 6, p. 063204, Dec. 2020, doi: 10.1116/6.0000412.
- [161] Hofman Sigfried, *Auger- and X-Ray Photoelectron Spectroscopy in Materials Science*, vol. 49. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. doi: 10.1007/978-3-642-27381-0.
- [162] B. D. Cullity, *Elements of x-ray diffraction*, vol. 34. American Chemical Society and Division of Chemical Education, Inc., 1957. doi: /10.1021/ed034pA178.
- [163] L. G. Parratt, “Surface Studies of Solids by Total Reflection of X-Rays\*,” *Physical Review*, vol. 95, no. 2, pp. 359–370, 1954.
- [164] P. F. Miceli, D. A. Neumann, and H. Zabel, “X-ray refractive index: A tool to determine the average composition in multilayer structures,” *Appl Phys Lett*, vol. 48, no. 1, pp. 24–26, 1986, doi: 10.1063/1.96749.
- [165] E. Chason and T. M. Mayer, “Thin film and surface characterization by specular X-ray reflectivity,” *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, vol. 22, no. 1, pp. 1–67, 1997, doi: 10.1080/10408439708241258.
- [166] H. Kiessig, “Untersuchungen zur Totalreflexion von Röntgenstrahlen,” *Ann Phys*, vol. 402, no. 6, pp. 715–768, 1931, doi: 10.1002/andp.19314020607.
- [167] J. Tiilikainen *et al.*, “Accuracy in x-ray reflectivity analysis,” *J Phys D Appl Phys*, vol. 40, no. 23, pp. 7497–7501, Dec. 2007, doi: 10.1088/0022-3727/40/23/037.
- [168] A. G. Shard, “Practical guides for x-ray photoelectron spectroscopy: Quantitative XPS,” *Journal of Vacuum Science & Technology A*, vol. 38, no. 4, p. 041201, Jul. 2020, doi: 10.1116/1.5141395.
- [169] J. Végh, “The Shirley background revised,” *J Electron Spectros Relat Phenomena*, vol. 151, no. 3, pp. 159–164, May 2006, doi: 10.1016/j.elspec.2005.12.002.

- [170] G. Audran, S. R. A. Marque, and M. Santelli, "Ozone, chemical reactivity and biological functions," *Tetrahedron*, vol. 74, no. 43, pp. 6221–6261, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.tet.2018.09.023.
- [171] B. Xia, J. J. Ganem, E. Briand, S. Steydli, H. Tancrez, and I. Vickridge, "The carbon and hydrogen contents in ALD-grown ZnO films define a narrow ALD temperature window," *Vacuum*, vol. 190, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.vacuum.2021.110289.
- [172] E. A. Al-Moraissi, A. S. Alkhatari, B. Abotaleb, N. H. Altairi, and M. Del Fabbro, "Do osteoconductive bone substitutes result in similar bone regeneration for maxillary sinus augmentation when compared to osteogenic and osteoinductive bone grafts? A systematic review and frequentist network meta-analysis," *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 49, no. 1. Churchill Livingstone, pp. 107–120, Jan. 01, 2020. doi: 10.1016/j.ijom.2019.05.004.
- [173] H. D. Kim, S. Amirthalingam, S. L. Kim, S. S. Lee, J. Rangasamy, and N. S. Hwang, "Biomimetic materials and fabrication approaches for bone tissue engineering," *Adv Healthc Mater*, vol. 6, no. 23, Dec. 2017, doi: 10.1002/adhm.201700612.
- [174] A. A. Aguiar, V. Ussui, C. Ribeiro, M. A. Scapin, D. Ribeiro Ricci, and N. B. de Lima, "Characterization of the Apatite Formation on the Surfaces of Zirconia and Alumina Ceramics in Body Environments," *Materials Science Forum*, vol. 591–593, pp. 697–702, Aug. 2008, doi: 10.4028/www.scientific.net/MSF.591-593.697.
- [175] D. T. M. Thanh *et al.*, "Controlling the electrodeposition, morphology and structure of hydroxyapatite coating on 316L stainless steel," *Materials Science and Engineering C*, vol. 33, no. 4, pp. 2037–2045, May 2013, doi: 10.1016/j.msec.2013.01.018.
- [176] H. Gröger, C. Kunath, E. Kurth, S. Sorge, W. Pufe, and T. Pechstein, "High quality r.f. sputtered metal oxides (Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, HfO<sub>2</sub>) and their properties after

- annealing,” in *Thin Solid Films*, Jan. 2004, pp. 509–515. doi: 10.1016/j.tsf.2003.07.013.
- [177] W. J. E. M. Habraken *et al.*, “Ion-association complexes unite classical and non-classical theories for the biomimetic nucleation of calcium phosphate,” *Nat Commun*, vol. 4, no. 1507, pp. 1–12, Feb. 2013, doi: 10.1038/ncomms2490.
- [178] A. S. Posner *et al.*, “Fluoride Drinking Waters,” UTC, 1975. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- [179] A. Lotsari, A. K. Rajasekharan, M. Halvarsson, and M. Andersson, “Transformation of amorphous calcium phosphate to bone-like apatite,” *Nat Commun*, vol. 9, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-06570-x.
- [180] H. C. Anderson, R. Garimella, and S. E. Tague, “The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization,” *Frontiers in Bioscience*, vol. 10, pp. 822–837, 2005, doi: doi.org/10.2741/1576.
- [181] H. Clarke Anderson, “Matrix Vesicles and Calcification,” *Curr Rheumatol Rep*, vol. 5, pp. 222–226, 2003.
- [182] E. S. Hara, M. Okada, T. Kuboki, T. Nakano, and T. Matsumoto, “Rapid bioinspired mineralization using cell membrane nanofragments and alkaline milieu,” *J Mater Chem B*, vol. 6, no. 38, pp. 6153–6161, 2018, doi: 10.1039/C8TB01544A.
- [183] R. E. Wuthier, “Matrix vesicles: structure, composition, formation and function in calcification,” 2011.
- [184] E. S. Hara, N. Nagaoka, M. Okada, T. Nakano, and T. Matsumoto, “Distinct Morphologies of Bone Apatite Clusters in Endochondral and Intramembranous Ossification,” *Adv Biol*, vol. 6, no. 11, Nov. 2022, doi: 10.1002/adbi.202200076.
- [185] M. Robin *et al.*, “Insights into OCP identification and quantification in the context of apatite biomineralization,” *CrystEngComm*, vol. 22, no. 16, pp. 2728–2742, Apr. 2020, doi: 10.1039/c9ce01972c.

- [186] Mann Stephen, Webb John, and Williams R.J.P., *Biomaterialization : chemical and biochemical perspectives*. Weinheim, Federal Republic of Germany: VVCH, 1989.
- [187] A. Tarasov *et al.*, “Understanding the electrolyte background for biochemical sensing with ion-sensitive field-effect transistors,” *ACS Nano*, vol. 6, no. 10, pp. 9291–9298, Oct. 2012, doi: 10.1021/nn303795r.
- [188] M. Bohner and J. Lemaitre, “Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 12, pp. 2175–2179, Apr. 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.008.
- [189] Black Jonathan and Hastings Garth, *Handbook of Biomaterial Properties*. Springer US, 1998. doi: 10.1007/978-1-4615-5801-9.
- [190] C. D. Fung, P. W. Cheung, and W. H. Ko, “Electrolyte insulator-semiconductor field-effect transistor,” in *Technical Digest - International Electron Devices Meeting*, IEEE, 1980, pp. 689–692. doi: 10.1109/iedm.1980.189929.
- [191] C. D. Fung, P. W. Cheung, and W. H. Ko, “Generalized theory of an electrolyte-insulator-semiconductor field-effect transistor,” *IEEE Trans Electron Devices*, vol. ED-33, no. 1, pp. 8–18, 1986, doi: 10.1109/t-ed.1986.22429.
- [192] C. S. Lai, C. M. Yang, and T. F. Lu, “PH sensitivity improvement on 8 nm thick hafnium oxide by post deposition annealing,” *Electrochemical and Solid-State Letters*, vol. 9, no. 3, 2006, doi: 10.1149/1.2163550.
- [193] T. Kokubo and S. Yamaguchi, “Simulated body fluid and the novel bioactive materials derived from it,” *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, vol. 107, no. 5, pp. 968–977, 2019. doi: 10.1002/jbm.a.36620.
- [194] A. A. Zadpoor, “Relationship between in vitro apatite-forming ability measured using simulated body fluid and in vivo bioactivity of biomaterials,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 35, no. 1, pp. 134–143, 2014. doi: 10.1016/j.msec.2013.10.026.



- [195] B. V. Crist, *Handbooks of Monochromatic XPS Spectra*. 3408 Emerald Drive, Ames, Iowa, 50010 USA: XPS International, Inc., 1999. [Online]. Available: <http://www.xpsdata.com>
- [196] P. M. A. Sherwood, "Introduction to Studies of Phosphorus-Oxygen Compounds by XPS," *Surface Science Spectra*, vol. 9, no. 1, pp. 62–66, Dec. 2002, doi: 10.1116/11.20030101.
- [197] D. N. G. Krishna and J. Philip, "Review on surface-characterization applications of X-ray photoelectron spectroscopy (XPS): Recent developments and challenges," *Applied Surface Science Advances*, vol. 12. Elsevier B.V., Dec. 01, 2022. doi: 10.1016/j.apsadv.2022.100332.
- [198] G. N. Raikar, J. L. Ong, and L. C. Lucas, "Hydroxyapatite Characterized by XPS," *Surface Science Spectra*, vol. 4, no. 1, pp. 9–13, Jan. 1996, doi: 10.1116/1.1247808.
- [199] M. Tanahashi and T. Matsuda, "Surface functional group dependence on apatite formation on self- assembled monolayers in a simulated body fluid," *J Biomed Mater Res*, vol. 34, no. 3, pp. 305–315, Mar. 1997, doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(19970305)34:3<305::AID-JBM5>3.0.CO;2-O.
- [200] M. C. Kuo and S. K. Yen, "The process of electrochemical deposited hydroxyapatite coatings on biomedical titanium at room temperature," *Materials Science and Engineering C*, vol. 20, pp. 153–160, 2002, [Online]. Available: [www.elsevier.com/locate/msec](http://www.elsevier.com/locate/msec)
- [201] M. Ozga, J. Kaszewski, A. Seweryn, P. Sybilski, M. Godlewski, and B. S. Witkowski, "Ultra-fast growth of copper oxide (II) thin films using hydrothermal method," *Mater Sci Semicond Process*, vol. 120, no. 105279, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1016/j.mssp.2020.105279.
- [202] E. Przeździecka *et al.*, "The Band - Gap Studies of Short - Period CdO / MgO Superlattices," *Nanoscale Res Lett*, vol. 16, no. 59, pp. 1–9, 2021, doi: 10.1186/s11671-021-03517-y.

## **Załączone publikacje**

# Zirconium Oxide Thin Films Obtained by Atomic Layer Deposition Technology Abolish the Anti-Osteogenic Effect Resulting from miR-21 Inhibition in the Pre-Osteoblastic MC3T3 Cell Line

This article was published in the following Dove Press journal:  
*International Journal of Nanomedicine*

Aleksandra Seweryn <sup>1</sup>  
Ariadna Pielok <sup>2</sup>  
Krystyna Lawniczak-  
Jablonska <sup>1</sup>  
Rafal Pietruszka <sup>1</sup>  
Klaudia Marcinkowska <sup>2</sup>  
Mateusz Sikora <sup>2</sup>  
Bartłomiej S Witkowski <sup>1</sup>  
Marek Godlewski <sup>1</sup>  
Krzysztof Marycz <sup>2,3</sup>  
Agnieszka Smieszek <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Physics, Polish Academy of Sciences, Warsaw PL-02668, Poland;

<sup>2</sup>Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Department of Experimental Biology, Wrocław PL-50375, Poland; <sup>3</sup>Cardinal Stefan Wyszyński University, Collegium Medicum, Warsaw PL-01938, Poland

Correspondence: Aleksandra Seweryn  
Polish Academy of Sciences, Aleja  
Lotników 32/46, Warsaw PL-02668,  
Poland  
Tel +48 22 116 33 99  
Fax +48 22 843 09 26  
Email aseweryn@ifpan.edu.pl

Agnieszka Smieszek  
Wrocław University of Environmental and  
Life Sciences, Norwida St. 27 B, Wrocław  
PL-50-375, Poland  
Tel +48 71 320 5229  
Fax +48 22 843 09 26  
Email agnieszka.smieszek@upwr.edu.pl

**Introduction:** The development of the field of biomaterials engineering is rapid. Various bioactive coatings are created to improve the biocompatibility of substrates used for bone regeneration, which includes formulation of thin zirconia coatings with pro-osteogenic properties. The aim of this study was to assess the biological properties of ZrO<sub>2</sub> thin films grown by Atomic Layer Deposition (ALD) technology (ZrO<sub>2</sub><sup>ALD</sup>).

**Methodology:** The cytocompatibility of the obtained layers was analysed using the mice pre-osteoblastic cell line (MC3T3) characterized by decreased expression of microRNA 21-5p (miR-21-5p) in order to evaluate the potential pro-osteogenic properties of the coatings. The in vitro experiments were designed to determine the effect of ZrO<sub>2</sub><sup>ALD</sup> coatings on cell morphology (confocal microscope), proliferative activity (cell cycle analysis) and metabolism, reflected by mitochondrial membrane potential (cytometric-based measurement). Additionally, the influence of layers on the expression of genes associated with cell survival and osteogenesis was studied using RT-qPCR. The following genes were investigated: B-cell lymphoma 2 (*Bcl-2*), Bcl-2-associated X protein (*Bax*), *p53* and *p21*, as well as osteogenic markers, i.e. collagen type 1 (*Coll-1*), osteopontin (*Opn*), osteocalcin (*Ocl*) and runt-related transcription factor 2 (*Runx-2*). The levels of microRNA (miRNA/miR) involved in the regulation of osteogenic genes were determined, including miR-7, miR-21, miR-124 and miR-223.

**Results:** The analysis revealed that the obtained coatings are cytocompatible and may increase the metabolism of pre-osteoblast, which was correlated with increased mitochondrial membrane potential and extensive development of the mitochondrial network. The obtained coatings affected the viability and proliferative status of cells, reducing the population of actively dividing cells. However, in cultures propagated on ZrO<sub>2</sub><sup>ALD</sup> coatings, the up-regulation of genes essential for bone metabolism was noted.

**Discussion:** The data obtained indicate that ZrO<sub>2</sub> coatings created using the ALD method may have pro-osteogenic properties and may improve the metabolism of bone precursor cells. Given the above, further development of ZrO<sub>2</sub><sup>ALD</sup> layers is essential in terms of their potential clinical application in bone regenerative medicine.

**Keywords:** ALD, zirconia-based coatings, pro-osteogenic properties, cytocompatibility, osteoblasts precursors

Over the years, various methods aimed at improving the healing process of bone tissue have been tested.<sup>1</sup> This is largely due to the fact that bone fractures, even when

attended to properly, need a prolonged period of time to fully heal as the formation of new, functional bone tissue is multi-staged and complicated.<sup>2</sup> Some diseases<sup>3</sup> can further extend the convalescence time; therefore, it is a great challenge for regenerative medicine to develop novel methods that would shorten the healing time and ensure better resistance to the recurrence of injury.

The development of nanomaterials/nanocoatings that can positively affect the quality and speed of healing processes perfectly fits this trend. In recent years, zirconium oxide ( $ZrO_2$ ) materials have become well known due to their biological properties.<sup>4,5</sup> Especially interesting evidence has been published regarding the use of zircon oxide as a coating that could improve the osteointegration of implants.<sup>5</sup> For these reasons, this study is aimed at evaluating the  $ZrO_2$  coatings obtained by Atomic Layer Deposition (ALD)<sup>6</sup> technology.  $ZrO_2$  is a biocompatible material showing effective anti-bacterial activity.<sup>7</sup>

The basis of the ALD method is a sequential introduction of selected chemical compounds into the reaction chamber. Each dose of the precursor is separated by a purge of the growth chamber by an inert gas, e.g. argon or nitrogen.<sup>8</sup> Due to pulse separation, the reaction between reagents occurs only on the substrate. The ALD processes are self-limiting, since deposition is blocked once the surface is saturated with a given precursor. After optimizing the parameters of the process, only the number of ALD cycles has to be estimated to reach a desired film thickness.<sup>9</sup> The obtained films are highly reproducible, and the deposition process depends weakly on the substrate used. Time separation of precursor pulses provides the possibility of using highly reactive chemicals and thus a low deposition temperature. Even at room temperature, deposition of layers is possible.<sup>10</sup> Despite the low temperature of growth, the resulting layers are of high quality and are highly homogeneous.<sup>11</sup> The conformal growth of ALD coatings allows the formation of homogeneous layers on complex surfaces.<sup>12,13</sup> This is a huge advantage of ALD technology for applications in biology and medicine. Another advantage of ALD is the possibility of obtaining biocompatible films. Hydroxyapatite growth by ALD has already been tested and proven to improve the attachment pre-osteoblast (MC3T3 cell line).<sup>14–16</sup>

The bioactivity of implant coating can be guaranteed by low-temperature deposition of films and this can be assured by the application of ALD technology.

For the growth of  $ZrO_2$  coatings by ALD technology, various precursors of zirconium (Zr) were tested, such as tetrakisdimethylamidozirconium ( $Zr(NMe_2)_4$ ), tetrakisethylmethylamidozirconium  $Zr(NMeEt)_4$ , tetrakisdiethylamidozirconium  $Zr(NEt_2)_4$ .<sup>6</sup> As an oxidant (oxygen precursor), water vapors,<sup>17</sup> ozone<sup>18</sup> or pure oxygen<sup>19</sup> were reported. The proper selection of process condition is crucial, as the crystallographic phase of the zirconium oxide layers depends on the precursors used and the deposition temperature.<sup>10</sup> It also turned out that the thickness of the layer influences crystallization. Initially, the layer is amorphous; later, with increasing film thickness, it becomes crystalline.<sup>10</sup> Amorphous films form high-quality interfaces between the substrate and the layer. This is of great importance for its toughness and smoothness.<sup>11</sup>

Moreover, there were first reports that zirconium oxide thin films have potential applications in regenerative medicine.<sup>5,20–22</sup> This is because  $ZrO_2$  coatings are cyto-compatible with immunocompetent cells like monocytes/macrophages. Together with its antibacterial effect,  $ZrO_2$ <sup>7</sup> may prevent peri-implant bone resorption and peri-implant soft inflammation.<sup>23</sup> Moreover, it was previously shown that  $ZrO_2$  coatings may promote adhesion and spreading of progenitor cells and bone-forming cells, i.e. osteoblasts. The  $ZrO_2$  coatings influenced proliferative activity, enhancing both cell division and the formation of a well-organized, firm monolayer of cells. More importantly,  $ZrO_2$  induces the differentiation of multipotent stromal cells. The osteogenic potential of  $ZrO_2$  coatings was confirmed using multipotent cells of mesenchymal origin (MSC) including bone-marrow and adipose tissue-derived stromal cells (BMSC and ASC, respectively). The pro-osteogenic properties of  $ZrO_2$  coatings are reflected by their ability to promote mineralization of extracellular matrix and formation of osteonodules rich in calcium and phosphorous deposits. Bearing in mind the high bioactivity of thin  $ZrO_2$  layers and their positive effect on bone healing confirmed by in vivo studies, these coatings are commonly used to enhance the biocompatibility of various implants.<sup>22</sup>

The biological activity of zirconium oxide coatings can be also improved by conjugation with silicon-based layers. We have previously shown<sup>22</sup> that  $SiO_2/ZrO_2$  coatings exert pro-osteogenic properties and can serve as an ideal carrier for drug delivery.<sup>22</sup>  $SiO_2/ZrO_2$  coatings obtained using the sol-gel technique on stainless steel were functionalized with a popular anti-diabetic drug – metformin. Such hybrid coatings improved the differentiation of ASC and

resulted in the formation of a highly mineralized extracellular matrix.

As we showed above, the biocompatible properties of  $ZrO_2$  are known, but influence of zirconia coatings obtained by the ALD on pre-osteogenic cells has not been yet studied. The technology can influence surface topography and chemical composition of the materials, which have a direct impact on cell behavior. Sensitivity of osteoblasts to very subtle chemical changes of the surface is known.<sup>24</sup> Additionally, the ALD technology allows the deposition of high-quality layer by relatively low temperature (even below 100°C). Low process temperatures may enable the layer deposition on temperature-sensitive materials, which is important for new implant materials such as biopolymers.

Bearing in mind the above reports (i.e. the high bioactivity of  $ZrO_2$  and the great potential of ALD technology) the aim of the present study was to obtain  $ZrO_2$  films as a biomaterial with pro-osteogenic properties. Films deposited by ALD were investigated. In order to test the cytocompatibility of the obtained coatings, in this study we used the well-established MC3T3 model. In order to determine the pro-osteogenic activity of the layers, we used MC3T3 transfected with miR-21 inhibitor (MC3T3<sub>inh21</sub>).

The miR-21-5p molecule is considered to be the key regulator of osteogenic differentiation of progenitor cells. This miRNA was shown to play a crucial role in terms of the regulation of the metabolism of bone-forming and bone-resorbing cells. It was shown that exogenously added miR-21 mimics into BMSC cultures, induces differentiation of osteoblasts and promotes the formation of a functional extracellular matrix, rich in mineralized nodules. This was also associated with an increased expression of mRNA for main early- and late osteogenic markers including alkaline phosphatase (*ALP*), osteocalcin (*OCL*), bone morphogenetic protein 2 (*BMP-2*) and the master regulator of the osteogenesis, i.e. runt-related transcription factor (*RUNX-2*). It was also shown that inhibition of miR-21 had the opposite effect, which resulted in the decreased osteogenic ability of BMSC.<sup>25</sup> Moreover, miR-21 was recognized as a molecule that promotes angiogenesis, crucial for proper bone healing. The angiogenic potential of miR-21 increased the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ).<sup>26</sup>

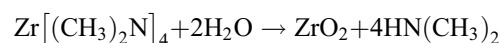
The present study was performed for ALD-deposited  $ZrO_2$  films on glass cover slips. We report that such films are highly cytocompatible and we present a physicochemical analysis of such layers deposited onto

a silicon substrate. We determined the influence of coatings on cell proliferation, viability and metabolic potential. The studies included analysis of the mRNA and miRNA of osteogenic-related molecules.

## Materials and Methods

### ALD Growth Method

The layers were obtained using a Savannah-100 Cambridge NanoTech ALD reactor (now Veeco Savannah S100). Tetrakis(dimethylamido)zirconium: TDMA-Zr (CAS number 19756-04-8) and deionized water were used as precursors of metal and oxygen, respectively. High purity nitrogen gas (6N) was used to purge the chamber. With such precursors, ALD growth proceeded according to the double exchange reaction:<sup>19</sup>



Before the process, the reaction chamber and the zirconium precursor were preheated to 100° and 65° C, respectively. Constant temperature was maintained throughout the process. The reactor chamber was under controlled vacuum (below 66 Pa). The process was carried out in cycles. One cycle consisted of a metal precursor pulse, a purge pulse, an oxygen precursor pulse and a purge pulse. The pulse length of the precursors was selected to be 0.04 s for water and 0.2 s for TDMA-Zr. The purge time after metal and oxygen precursor pulses was 10 s. Additionally, after each precursor dose, a 3 s waiting phase was applied. The growth rate by such established times was estimated to be 1.9 Å/cycle.

### Substrate

The layers used for physical investigations were grown on a silicon wafer (100), which was cut into 1 cm x 1 cm pieces. Layers used for bio experiments were deposited on cover slips with a diameter of 13 mm. In order to eliminate any contaminants that could affect the adhesion of the layer to the substrate or its homogeneity, the substrates were washed three times for 5 min, using an ultrasonic cleaner at 37°C. The first bath was carried out in isopropanol and the following two in deionized water. After the completed purification process, all substrates were dried in a high purity nitrogen (5N) stream and then placed in the growth chamber of the ALD reactor.

### Test Equipment

A NanoCalc 2000-UV/VIS Mikropack (GmbH) spectrometer with software was used to determine the thicknesses

of the resulting coatings. Measurements of surface morphology and thicknesses distribution were made using a Hitachi SU 70 Scanning Electron Microscope (SEM) with 1.5-nm resolution capacity. A secondary electron detector and an electron-accelerating voltage of 15 kV were used. Top-view and cross-section (CS) images were obtained. To determine the quality of the surface and interface of the considered  $ZrO_2$  layer, X-ray reflectometry (XRR) analysis was made. A Panalytical X'Pert Pro MRD diffractometer equipped with an X-ray tube generating radiation with a wavelength 1.54056 Å, hybrid two-bounce Ge (220) monochromator and Pixel detector was used. In front of the detector, a Parallel Plate Collimator with 0.4 rad Soller slits and 0.18 deg divergence slit was used. XRR data were simulated by using software from Panalytical. This commercial software is based on Parratt theory.<sup>27</sup> This method allowed us to determine thickness of the layer, electron density and roughness of the sample's surface and interface.<sup>28,29</sup> It should be mentioned that this method allows the determination of the global roughness of the sample.

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) measurements were made using a Scienta R4000 hemispherical analyzer (pass energy 200 eV) and Al  $K_{\alpha}$  (1486.6 eV) excitation. The full width at half maximum (FWHM) of the  $4f_{7/2}$  Au line measured at the same experimental condition was 1.1 eV. The energy scale was calibrated setting the carbon (C) 1s line at the position 285 eV. To avoid significant sample charging, the neutralization gun was used. Samples were measured as received. A significant amount of carbon was detected. To check if the carbon was present only at the surface the 5 min sputtering applying  $Ar^+$  ion gun with 3 kV and 5 mA was performed.

## Culture of Pre-Osteoblastic Mice Cell Line (MC3T3)

The MC3T3 cell line derived from European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). The cells were cultured under stable and aseptic conditions in a  $CO_2$  incubator at 37°C and 95% humidity. The cells were cultured in complete growth medium (CGM) consisting of Minimum Essential Media Alpha (MEM- $\alpha$ , Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Warsaw, Poland) supplemented with 10% FBS (Fetal Bovine Serum).

The medium was changed three times a week. Cultures were passaged using trypsin and EDTA solution (Trypsin-EDTA solution 0.25%, sterile-filtered Sigma Aldrich Sp.

z o.o., Poznan, Poland) after reaching 90% confluence. The cells used for the experiment were subcultured for twenty passages (p20). A miR-21 specific inhibitor (hsamiR-21a-5p Anti-miR™ miRNA Inhibitor, Ambition, Thermo Fisher Scientific, Warsaw, Poland) was used according to the manufacturer's protocol as previously described.<sup>30</sup> The chosen concentration of a miR-21 specific inhibitor and ESCORT III transfection reagent was based on a screening test performed prior to the experiment (data not shown). The dilution of the miR-21 specific inhibitor was performed using Gibco™ MEM ALPHA MEDIUM no ascorbic acid (Thermo Fisher Scientific, Warsaw, Poland) to reach 30nM concentration. For the transfection, we used ESCORT III Transfection reagent (Sigma-Aldrich Sp. Z o. o. Poznan, Poland) in 1:100 concentration, according to the manufacturer's protocol. The cells were seeded on a 6-well plate in concentration 30,000 per well and divided into two experimental groups as follows: negative control of MC3T3 (MC3T3<sub>NC</sub>) and MC3T3<sub>inh21</sub>. The inhibition of miR-21 was confirmed using Two-tailed qPCR as well as miR-X assay, described below.

## Cytocompatibility of $ZrO_2^{ALD}$ Coatings

The experiment was carried out in 24-well plates coated with cover slips covered by  $ZrO_2^{ALD}$  coatings. Both MC3T3<sub>NC</sub> and MC3T3<sub>inh21</sub> were inoculated at a density equal to 30,000 cells per well. The cells were suspended in 0.5 mL of CGM. Cultures propagated in wells coated with blank cover slips (i.e. without coating) served as the control for the experiment. The cultures were propagated for 96 hrs.

The morphology and ultrastructure of cells in experimental and control cultures were analyzed based on the localization and distribution of the nuclei, cytoskeleton and mitochondrial network. The morphology of cells was investigated after 96 h using well-described protocols.<sup>31,32</sup>

In order to visualize the mitochondria, cells were stained with MitoRed dye (Sigma Aldrich Sp. z o.o., Poznan, Poland) prepared in CGM at concentration (1:1000). The cultures were incubated with the dye in a  $CO_2$  incubator for 30 mins. After staining, cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 30 mins at room temperature. Following fixation, cells were washed three times with HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). Later, cell membranes were permeabilized with 0.2% Tween for 20 mins at room temperature. Next, cells were washed again with HBSS, as described above, and actin fibers were stained

with phalloidin-atto 488 prepared in HBSS (1:800). The staining was performed in a CO<sub>2</sub> incubator at 37°C for 30 mins, following which these cells were washed again with HBSS. Subsequently, biomaterials and cover slips were mounted on microscopic slides using a mounting medium (ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI, Thermo Fisher Scientific, Warsaw, Poland). 4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI) was used to visualize the nuclei. The prepared specimens were observed under a confocal microscope (Leica TCS SPE, Leica Microsystems, KAWA.SKA Sp. z o.o., Zalesie Gorne, Poland) and analyzed with Fiji is just ImageJ (ImageJ 1.52n, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). The proliferative activity of MC3T3<sub>Inh21</sub> and MC3T3<sub>NC</sub> was determined based on the distribution of cells in the cell cycle and DNA synthesis. The cell cycle was analyzed using a Muse® Cell Cycle Assay Kit (Merck, Warsaw, Poland). Cells were harvested after the experiment and fixed overnight using 70% ethanol. Further, cells were stained with the reagent provided with the kit. The cells were incubated with a reagent for 30 mins in the dark at room temperature. Next, the samples were analyzed using a Muse™ Cell Analyzer (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Additionally, after 96hrs of the experiment, cells were harvested and seeded onto a 96-plate well in order to determine the influence of the coatings on cell proliferation. Analysis was performed using a colorimetric assay based on bromodeoxyuridine/5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. For this purpose, a BrdU Cell Proliferation ELISA Kit (Abcam, Cambridge, UK) was used according to the instructions provided with the kit and protocol described previously.<sup>33</sup> The absorbance was measured spectrophotometrically (Epoch, Biotek, Bad Friedrichshall, Germany) at a wavelength of 450 nm and 550 nm as a reference wavelength.

A Muse™ Cell Analyzer was used to determine cell viability and mitochondrial membrane potential. After culture, cells were harvested using trypsin solution and stained with Muse® Annexin V and Dead Cell Assay Kit following the protocol provided by the manufacturer (Merck, Warsaw, Poland) to evaluate necrosis and apoptosis in the experimental cultures. Staining with a MitoPotential Kit (Merck, Warsaw, Poland) performed according to the manufacturer's protocol, provided information on the MC3T3 mitochondrial membrane potential. Each measurement was performed a minimum of three times.

Total RNA was isolated using the phenol-chloroform method.<sup>34</sup> For this purpose, after the experiment cells were homogenized, 1 mL of Extrazol® (Blirt DNA Gdansk, Gdansk, Poland) was used. The protocol of RNA isolation was performed according to the instructions of the manufacturer. The RNA intact was determined based on spectrophotometric measurement (Epoch, Biotek, Bad Friedrichshall, Germany) at a wavelength of 260/280. The obtained RNA was used for the cDNA synthesis in reverse transcription (RT). Before each reaction, total RNA was purified by DNase I digestion. Reaction was performed using PrecisionDNase kit (PrimerDesign, BLIRT S.A. Dzial DNA-Gdansk, Gdansk, Poland) using the well-established protocol. For two-tailed qPCR, 50ng/mL of RNA was used for cDNA synthesis, while for mRNA detection 500 ng of RNA was used. The details of the protocols were described earlier.<sup>35,36</sup> The reverse transcription was performed using a Tetro cDNA Synthesis Kit (Bioline Reagents Ltd., London, United Kingdom) according to the protocol provided by the manufacturer. Additionally, cDNA was synthesized from 375 ng of total RNA using Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis Kit (Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, France). All reactions included no-RT control. Both DNA digestion and reverse transcription were performed in a T-100 Thermal Cycler (Bio-Rad Poland Sp. z. o.o., Warsaw, Poland). The matrices obtained in reverse transcription were used for quantitative PCR (final volume 10 µL) with a SensiFast SYBR & Fluorescein Kit (Bioline Reagents Ltd., London, United Kingdom). The reaction conditions were described previously.<sup>35,37,38</sup> The list of primers is presented in [Supplementary Material](#). The average fold change in the gene expression was calculated using the RQ<sub>MAX</sub> algorithm, ie scaled to the sample having the lowest expression and converted into log<sub>2</sub> scale as described previously.<sup>35</sup> The analysis was performed in relation to the housekeeping gene-GAPDH for target genes, and U6snRNA for miRNA.

## Statistical Analysis

The mean was calculated from a minimum of three measurements. The data obtained were analyzed using GraphPadPrism 5 software (La Jolla, CA, USA). Differences between groups were determined using parametric assays, unpaired Student's *t*-test or one-way analysis of variance (ANOVA). Differences with a probability of *p* < 0.05 were considered to be significant.

## Results

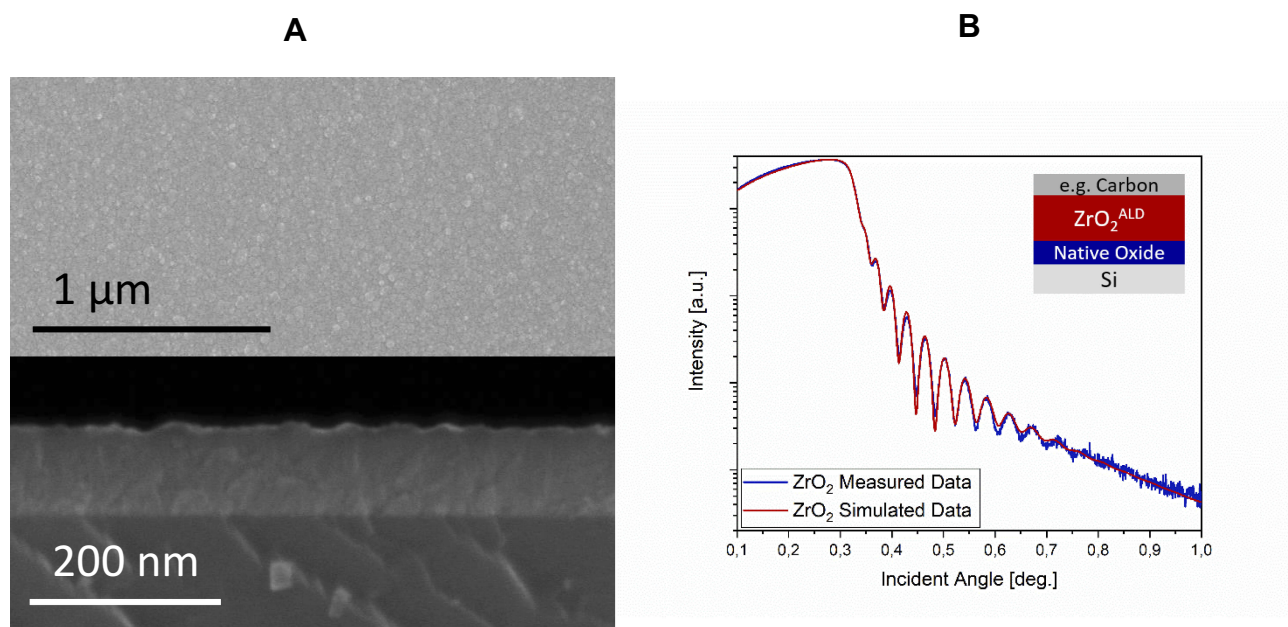
### Physicochemical Properties of the $\text{ZrO}_2^{\text{ALD}}$ Coatings

The  $\text{ZrO}_2^{\text{ALD}}$  layers deposited on silicon substrates were used for the SEM investigation shown in Figure 1A. Analysis of top-view SEM images (confirmed by lack of signal by the XRD investigations, not shown here) indicates the amorphous nature of the coating and the high quality of the resulting layer, without noticeable cracks or unevenness (Figure 1A, top panel). The homogeneous thickness on the SEM (CS) image was observed as shown in Figure 1A, bottom panel.

In the XPS wide scan, only Zr, O and C signals were detected. The analysis of the Zr 3d and O 1s narrow scan lines proved that in the as-grown sample only one chemical bond of Zr was detected (183 eV) and two kinds of O bonds. The binding energy of the main oxygen line was 530.8 eV. The binding energies of both elements are very close to those reported in the reference tables and spectra (182.5 and 530.4 eV, respectively) indicating a small charging shift.<sup>39,40</sup> The second compound of oxygen has its bonding energy shifted by 1.8 eV from the main line, which is common for absorbed water and adventitious carbon contaminations. The FWHM of spin orbit doublet is 1.44 eV, only slightly wider than that reported in the reference tables measured with monochromatic excitation.

The ratio of the Zr to O (1:1.75) resulting from XPS measurements indicated that the surface is depleted of oxygen. A significant amount of C (23%) was detected at the surface. To check if this is only surface contamination due to exposure to air, 5 mins of Ar sputtering was performed. The amount of C was reduced to ~3% but due to preferential sputtering of oxygen, the ratio of oxygen to zirconium decreased to 1.4. This was evidence of the structural disorder introduced by sputtering, as was reported previously.<sup>41</sup>

The results of the simulation of curve fitting to the XRR measurement data are shown in Figure 1B. The simulation model included the presence of interlayers between the Si substrate and the coating and took into account possible surface contamination. The estimated  $\text{ZrO}_2^{\text{ALD}}$  film thickness (83.7 nm) corresponds well with estimations from SEM cross-sections and reflectometry measurement, using a NanoCalc spectrometer (84 nm). A thin layer (2.7 nm) between the Si substrate and the  $\text{ZrO}_2^{\text{ALD}}$  layer was observed, which is due to the forming of an ultra-thin layer of native oxide when the substrate comes into contact with the air or with water during the washing processes.<sup>42,43</sup> On the  $\text{ZrO}_2$  surface, we observed a 3 nm thick layer due to the presence of surface contaminants, e.g. carbon formed after contact with air, as confirmed by the XPS measurements. The roughness of the  $\text{ZrO}_2^{\text{ALD}}$  was calculated as 3.3 nm.



**Figure 1** The SEM images of  $\text{ZrO}_2^{\text{ALD}}$  coatings (A). The top-view image (top panel) shows the homogeneity of the coating, the cross-section image (bottom panel) indicates the even thickness distribution of the layer. Measured and simulated data XRR (X-ray Reflectivity) are shown (B). The insert shows the model used for simulation to estimate thickness and electron density of the obtained coating.



## Biological Properties of the Coatings

### The Influence of $ZrO_2^{ALD}$ Coatings on Cells Morphology and Ultrastructure Organization

The morphology of cells and their ultrastructure were analyzed after 96h of experiment. Observation revealed that both in experimental and control culture cells maintained proper morphology. In all cultures, MC3T3 were characterized by heterogenous appearance, typical for the early stage of their differentiation. Both multipolar fibroblast-like cells and round or oval cells were observed. The nuclei were located centrally within the cell. No formation of apoptotic bodies was noted. Inhibition of miR-21 in cultures on plain cover slip, as well as on biomaterial with  $ZrO_2^{ALD}$  coating resulted in formation of more complex intracellular connections with visible projections, i.e. lamellipodia and filopodia. However, the architecture of growth was more complex in cultures on  $ZrO_2^{ALD}$  coatings, both in MC3T3<sub>NC</sub> and in MC3T3<sub>inh21</sub>. Additionally, the cells cultured on  $ZrO_2^{ALD}$  coatings had well-developed mitochondrial networks visualized after mitoRed staining (Figure 2).

### The Influence of $ZrO_2^{ALD}$ Coatings on Cells Proliferation

The proliferative activity of MC3T3 was analyzed based on cell distribution in the cell cycle as well as based on the incorporation of BrdU during the S-phase of the cell cycle (Figure 3). Analysis revealed that inhibition of miR-21 may affect the proliferative activity of cells, decreasing cell numbers in the S phase (Figure 3A and B). This was evidenced especially in cultures propagated on  $ZrO_2^{ALD}$  coatings. The distribution of cells in the cell cycle showed that inhibition of miR-21 in cultures on plain cover slips also significantly reduces the cells in the G2/M phase. MC3T3<sub>inh21</sub> propagated on  $ZrO_2$  coatings were characterized by a significant decrease of cells in the S-phase. This status was correlated with an increase of the population shifted toward the G0/G1 phase and with a decrease of cells in the G2/M phase (Figure 4A and B). In turn, the results of BrdU assay (Figure 3C) indicated that  $ZrO_2^{ALD}$  had a slight pro-proliferative effect on pre-osteoblasts.

### The Influence of $ZrO_2^{ALD}$ Coatings on Mitochondrial Membrane Potential

Analysis of mitochondrial membrane potential performed using a MUSE Cell Analyzer showed that MC3T3 propagated on  $ZrO_2^{ALD}$  coatings were characterized by higher mitochondrial potential, when compared to cultures on

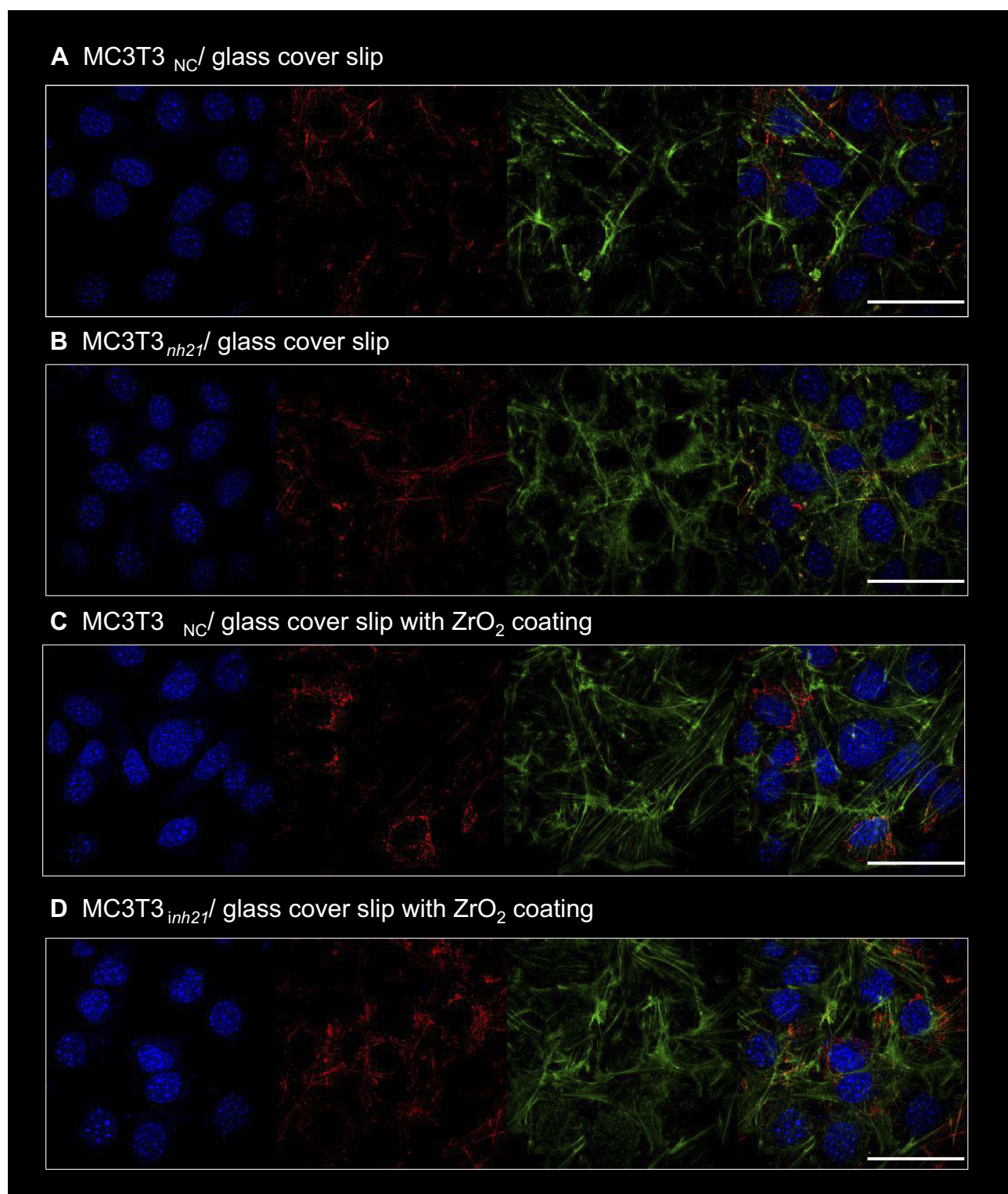
cover slips (Figure 4A and B). Additionally, it was shown that inhibition of miR-21 in cultures maintained on plain cover slips may influence the decrease of mitochondrial activity. In turn, the MC3T3<sub>inh21</sub> propagated on  $ZrO_2^{ALD}$  cultures were distinguished by increased mitochondrial membrane potential (Figure 4A and B). The results were also confirmed by the analysis of metabolic activity performed using an Alamar Blue assay (Figure 4C). The analysis of cell metabolism during the adaptive phase of their growth showed that inhibition of miR-21 may affect the activity of cells, both in cultures on plain cover slip, and on the biomaterial. The decreased metabolic activity of MC3T3<sub>inh21</sub> was maintained in cultures on plain cover slip, which was noticed after 72 and 96 hrs of culture. In turn, MC3T3 propagated on biomaterial showed increased activity at later stages of culture.

### The Influence of $ZrO_2^{ALD}$ Coatings on Apoptosis Profile

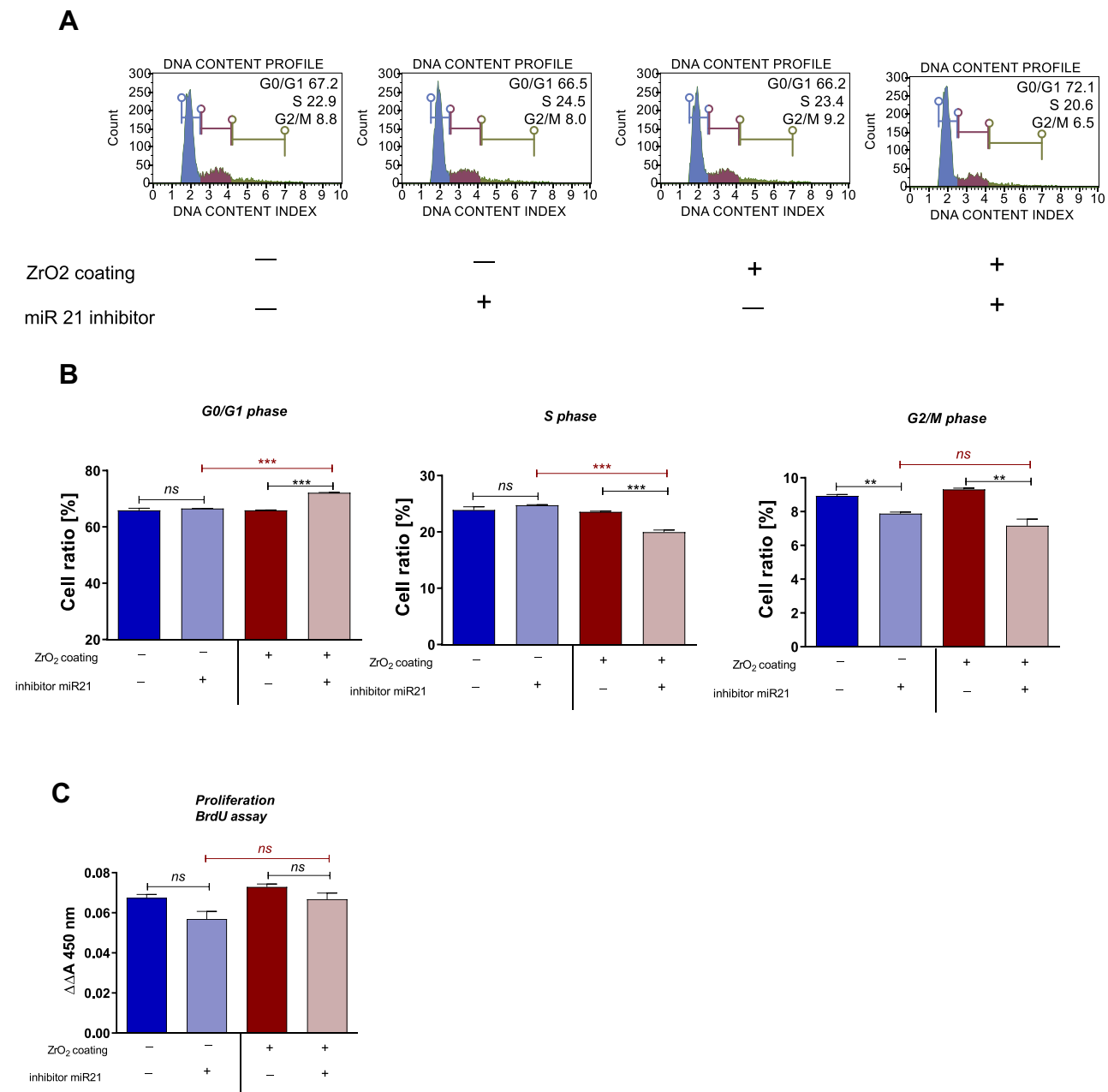
The apoptosis profile was established based on cell distribution after Annexin V/7-AAD staining. Analysis revealed that cultures propagated on  $ZrO_2^{ALD}$  coatings were characterized by increased apoptosis. In cultures maintained on plain cover slip, the inhibition of miR-21 was associated with increased viability of cells. The opposite tendency was noted in MC3T3<sub>inh21</sub> cultures propagated on  $ZrO_2^{ALD}$  coatings (Figure 5A–C). Additionally, analysis of apoptosis was performed based on the expression profile of genes associated with cell death. The expression of mRNA for *Bcl-2*, *Bax*, *p53* and *p21* was tested. The obtained results indicated increased expression of all transcripts, which confirms the cytotoxic effect of  $ZrO_2^{ALD}$  coatings toward MC3T3 (Figure 5D–G).

### $ZrO_2^{ALD}$ Coatings Upregulate Osteogenic Genes Expression in MC3T3 Cells with and Without miR-21 Inhibition (mRNA/miRNA Level)

The influence of  $ZrO_2^{ALD}$  coatings on osteogenesis was evaluated based on the expression profiles of genes and miRNA crucial in osteogenesis, including *Coll-1*, *Opn*, *Ocl* and *Runx-2* (Figure 6A–D). The  $ZrO_2^{ALD}$  induced higher mRNA levels of osteogenic markers also in cells with decreased activity of miR-21 (Figure 6). The expression of all the mentioned transcripts was noticeably higher in cultures propagated on  $ZrO_2^{ALD}$ , based on the obtained results. Subsequently, the transcript levels of miR-7, miR-21 and miR-223 were tested. Analysis showed that miR-21 inhibition was correlated with downregulation of miR-7, regardless of the culture conditions (Figure 6E and F). The



**Figure 2** The morphology of pre-osteoblasts cultured in control cultures (glass cover slip, **A** and **B**) and cultured on ZrO<sub>2</sub> coatings (**C**, **D**). The MC3T3 model of pre-osteoblast was used – both MC3T3<sub>NC</sub> and MC3T3<sub>inh21</sub>. The cells were stained with DAPI, in order to visualize the nuclei (blue). The mitochondria network is visualized after MitoRed staining (red), while cytoskeleton with phalloidin atto488 (green). The cells were observed using confocal microscopy under 60-fold magnification. Scale bar is 50  $\mu$ m, included on the merged photograph.



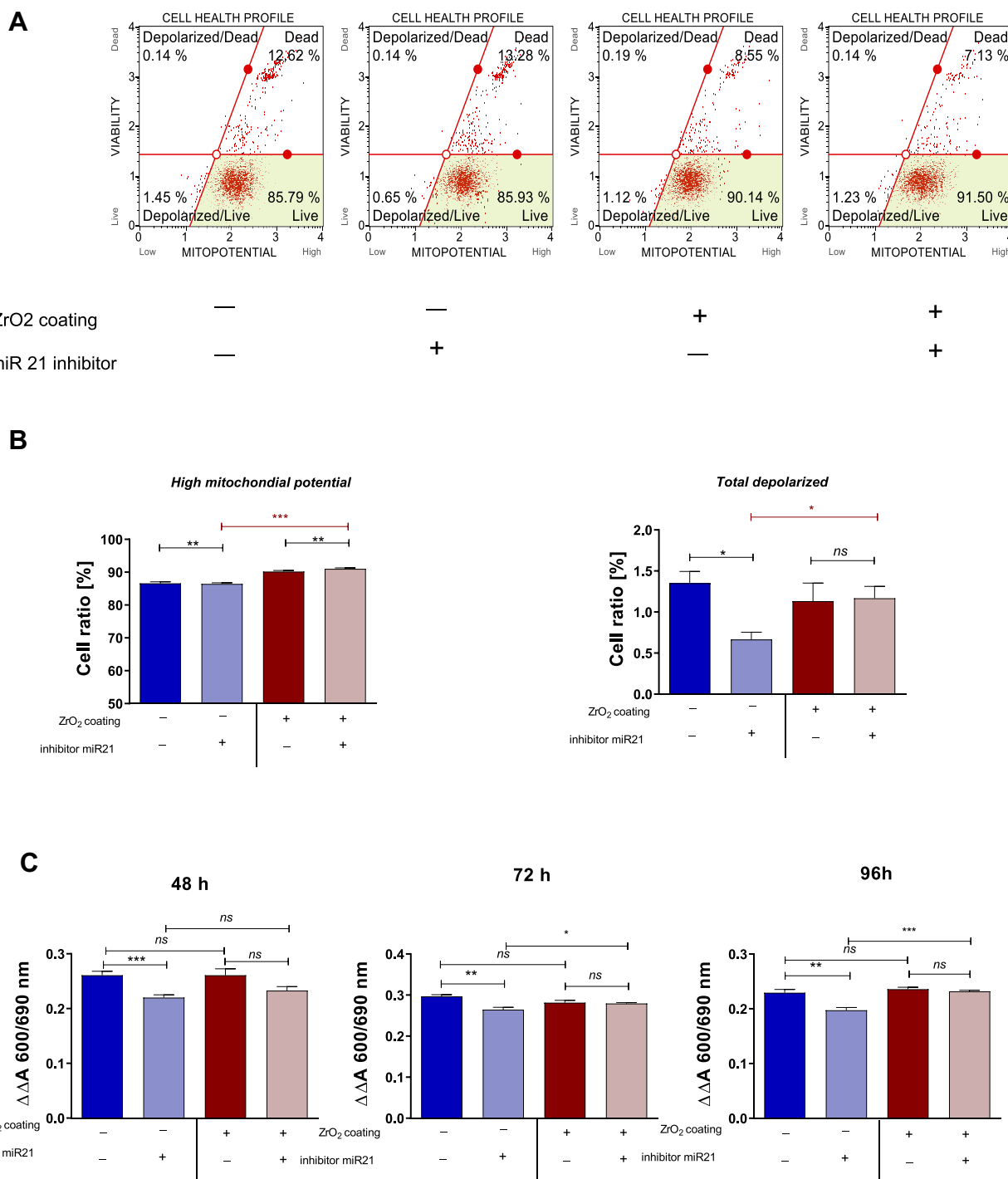
**Figure 3** Results of analysis of proliferative status of MC3T3 cells in cultures on substrate with and without ZrO<sub>2</sub><sup>ALD</sup> coating. **(A)** Representative images showing the distribution of cells within the cell cycle. **(B)** Statistical analysis of the results obtained for cytometric measurements. **(C)** Statistical analysis of results obtained in BrdU assay. An asterisk marks a statistically significant difference (\*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001). Differences without significant impact were indicated using the symbol ns (not significant).

levels of pro-osteogenic miR-223 were increased in cultures propagated on ZrO<sub>2</sub><sup>ALD</sup> coating (Figure 6G). The presented results confirm the pro-osteogenic properties of ZrO<sub>2</sub><sup>ALD</sup>.

## Discussion

Currently, medicine is faced with the urgent need to establish new methods of treatment that would improve

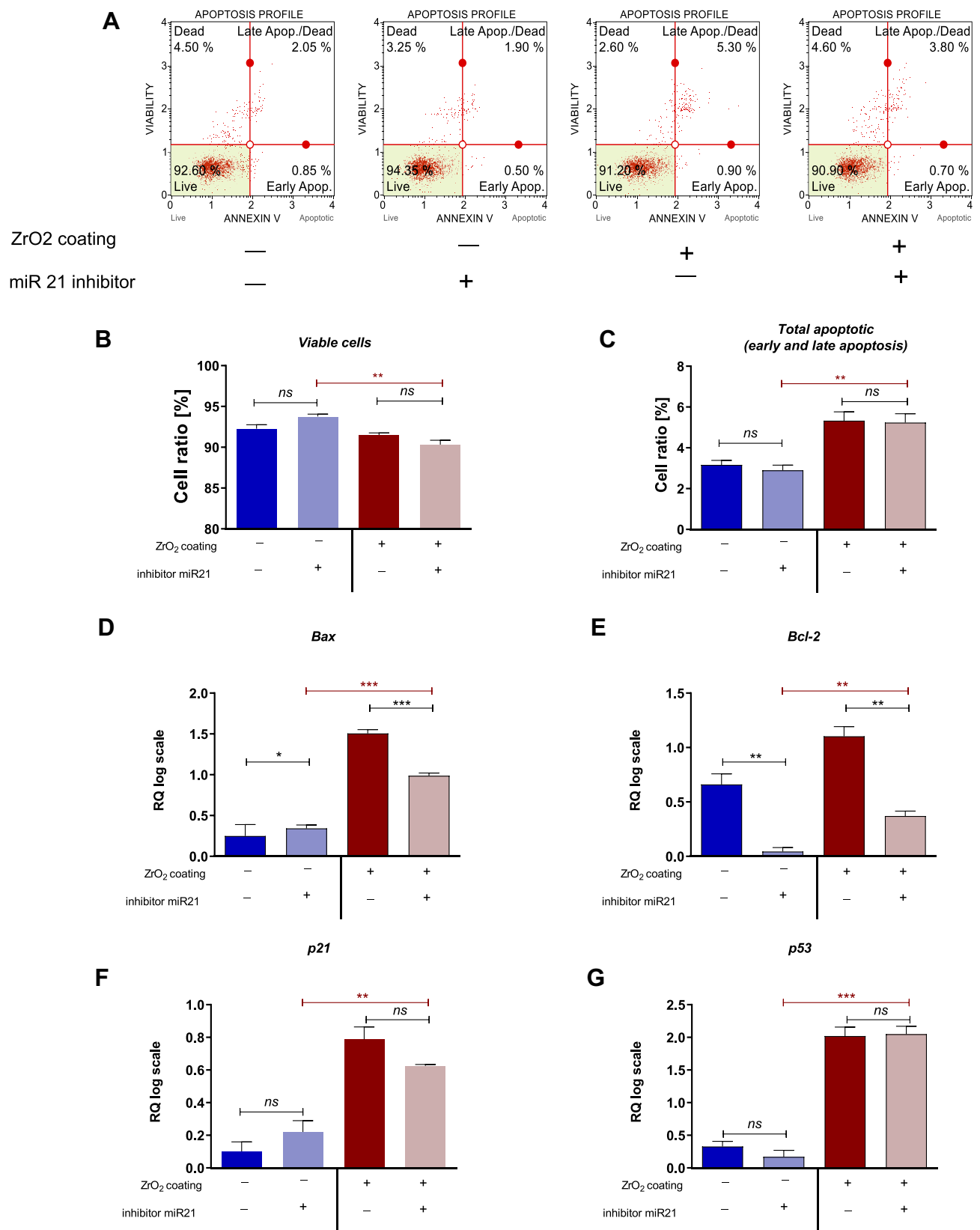
the regenerative potential of an organism. This is closely connected with the ongoing senescence of modern societies followed by a growing prevalence of lifestyle diseases, including osteoporosis. Additionally, trauma in geriatric patients increases with age; thus, there is a great need to develop new therapeutic strategies promoting healing and having a bridging function, enhancing functional recovery. Tissue engineering combined



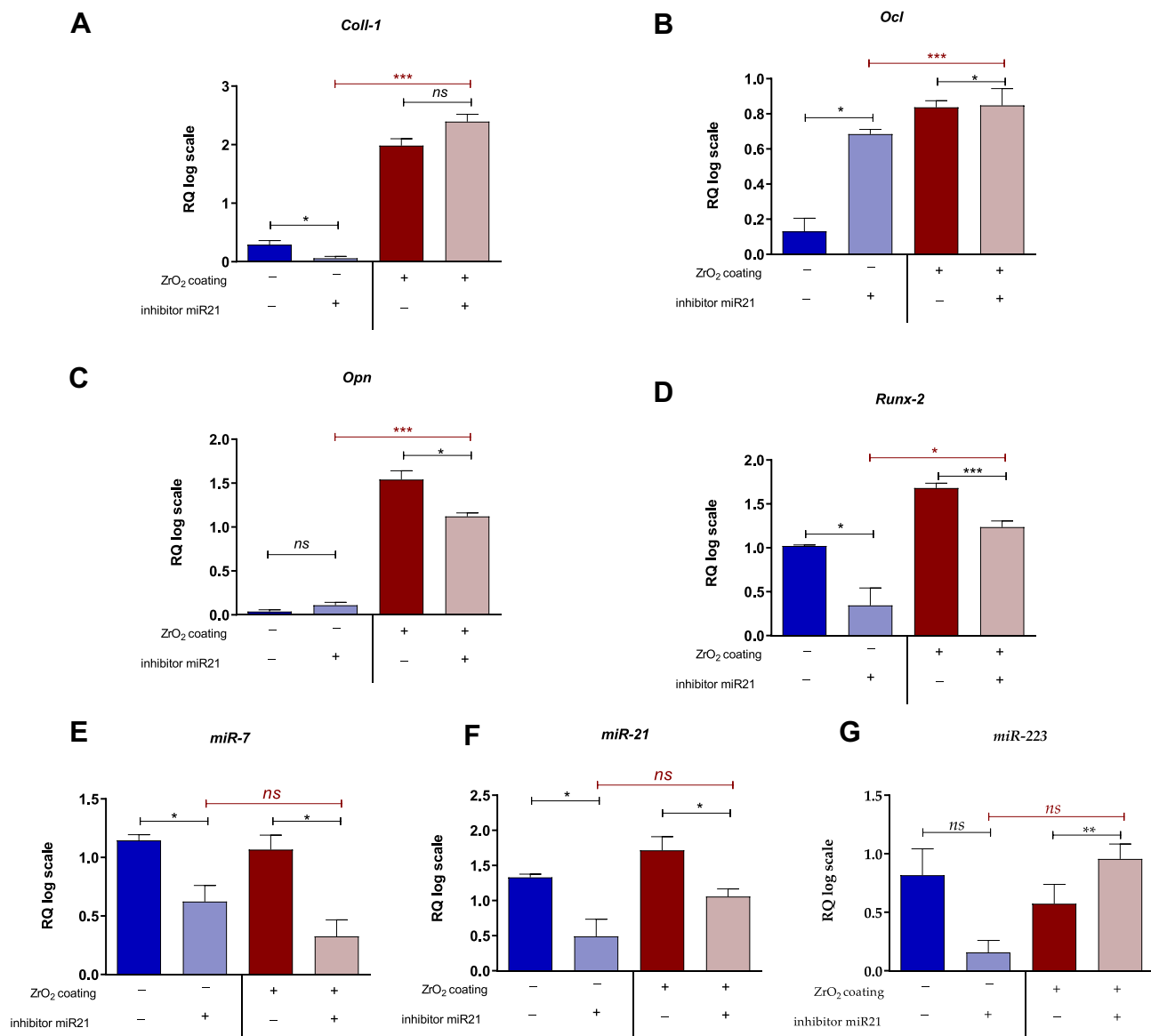
**Figure 4** Results of analysis of metabolic activity of MC3T3 in cultures on substrate with and without ZrO<sub>2</sub> coating. **(A)** Representative images showing the distribution of cells based on mitochondrial membrane potential **(B)** Statistical analysis of the results obtained for cytometric measurements. **(C)** Statistical analysis of results obtained for Alamar blue assay. An asterisk marks a statistically significant difference (\*\**p* < 0.001; \*\**p* < 0.01 and \**p* < 0.05). Differences without significant impact were indicated using ns.

with biomaterials engineering helps in finding new solutions in terms of regenerative medicine, foremost in orthopedics. In the past few years, next to titanium, zirconium oxide has become the focal point of numerous works of published research due to its beneficial

mechanical characteristics and the positive effect it exerts on osteogenesis. The purpose of this study was to determine if ZrO<sub>2</sub> coatings could be used in the development of new, highly biocompatible implants with application in bone fracture treatment, especially in patients with



**Figure 5** Results of apoptosis analysis in control cultures (glass substrate) and experimental cultures (substrate with ZrO<sub>2</sub><sup>ALD</sup>). **(A)** Representative images showing the distribution of cells based on their viability. **(B, C)** Statistical analysis of the results obtained for cytometric measurements. **(D–G)** Analysis of transcript levels for genes associated with apoptosis. An asterisk marks a statistically significant difference (\*\**p* < 0.001; \**p* < 0.01 and \**p* < 0.05). Differences without significant impact were indicated using ns.



**Figure 6** Transcript levels of osteogenic markers. The analysis included measurement of mRNA level for *Coll-1* (A), *Ocl* (B), *Opn* (C) and *Runx-2* (D). The miRNA levels were also established. MiR-7 (E) and miR-21 (F) revealed a similar expression pattern. The miR-223 (G) was significantly increased in MC3T3<sub>inh21</sub> propagated on ZrO<sub>2</sub> coating. An asterisk marks a statistically significant difference (\*\*p < 0.001; \*p < 0.01 and \*p < 0.05). Differences without significant impact were indicated using ns.

lowered regenerative potential, e.g. senile osteoporosis. For this purpose, we created ZrO<sub>2</sub> coated coverslips using the ALD method which has gained attention as a precise technique allowing to create a uniform, thin film on various materials in layer-by-layer fashion.

The unquestionable advantage of ALD technology is the possibility of the growth of uniform and conformal layers,<sup>9</sup> which in the present work was confirmed by the SEM study of the ZrO<sub>2</sub><sup>ALD</sup> coating under consideration.<sup>11</sup> The measurement was made for the films deposited on Si substrate but, based on our experience, the ALD method allows also the deposition of high-quality film growth on

other substrates, including glass. The ZrO<sub>2</sub><sup>ALD</sup> layer density (5.5 g/cm<sup>3</sup>), as simulated by the XRR data measurement, corresponds well to the bulk density of ZrO<sub>2</sub> (5.68 g/cm<sup>3</sup>) and confirms the relatively high quality of the ALD layer.

Carbon was found in the deposited films, as observed by XPS investigations. Pollution at the level of ~3% might be a result of using organic precursors rich in carbon (TDMA-Zr in the present work). In fact, the presence of carbon in the films is known for various coatings obtained by ALD technology, e.g. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.<sup>44</sup> The observed oxygen deficiency in the layer (non-stoichiometric oxide) indicates

the formation of defects during the deposition process and/or unintentional dopants. In the present case, this may be carbon contamination as mentioned above. The non-stoichiometric nature of  $ZrO_2$  was tested for its effect on the electrical properties of the films.<sup>45</sup> Regarding the biological properties in conjunction with the stoichiometry of the  $ZrO_2$  coatings, no studies in this field have been reported to date.

To assess the possible pro-osteogenic properties of acquired  $ZrO_2^{ALD}$  coatings, an experimental MC3T3 cell culture was used. The cells were transfected with miR-21 inhibitor to obtain a cell line with disturbed osteogenic potential. The selection of the miR-21 molecule as a target was made based on its crucial role as a regulator of various osteogenic markers, including Runx-2, which is a key molecule mediating the differentiation of osteoblasts. Additionally, several studies showed that miR-21 levels are decreased in bone tissue and serum of patients with osteoporosis.<sup>25</sup> Lowered levels of miR-21 correspond with lowered bone mineral density (BMD) and thus miR-21 began to be acknowledged as a potential biomarker of bone diseases, such as osteoporosis and osteopenia.<sup>46</sup> Since miR-21 was proven to affect the differentiation and proliferation of both osteoblasts and osteoclasts, the mechanism underlying its pro-osteogenic activity is very complex and not fully explained. However, it was shown that by positively mediating MMP-2, MMP-9, MMP-13 and downregulating pro-apoptotic TNF- $\alpha$  expression miR-21 may promote osteoblast differentiation and proliferation.<sup>47</sup> The performed analysis of the MC3T3 cycle confirmed that miR-21 may regulate the proliferative activity of pre-osteoblasts. Cells transfected with miR-21 inhibitor were characterized by a shift towards the G1/S phase with decrease of population in both the S and the G2/M phase. Furthermore, it was also proven that downregulation of miR-21 is associated with osteoclast differentiation and as such may contribute to osteoporosis progression.<sup>48</sup> Zirconia-based coatings reportedly improve the osteointegration of metallic implants, which is associated with increased adhesion of progenitor cells to the biomaterial surface, as was previously described in both experimental models: in vivo and in vitro.<sup>5,49</sup> However, da Cota Fernandes et al<sup>20</sup> presented a contradictory conclusion, stating that  $ZrO_2$  may weaken pre-osteoblast adhesion by enhancing extracellular matrix remodelling as a precedence to intensified proliferation. Our data showed that zirconium improves both proliferation and adhesion of pre-osteoblast. The  $ZrO_2^{ALD}$  coatings affect the

architecture of pre-osteoblast growth, promoting the formation of intracellular connections, crucial for proper differentiation and formation of the extracellular matrix network.<sup>50</sup> Rizzi et al<sup>49</sup> also observed that the MC3T3 pre-osteoblasts growing on screws coated with zirconium were characterized by higher proliferative potential.<sup>49</sup> Similarly, the proliferation of human osteoblast cells (HOB) was increased in response to zirconia.<sup>20,51</sup> All collected evidence is in line with our results and proves that biological activity of zirconia is related to its pro-proliferative potential. The proliferation of progenitor cells during the process of differentiation is modulated and should be correlated with the metabolic status of cells. In this study, we have shown that miR-21 inhibition has a negative impact on pre-osteoblast metabolic activity, while  $ZrO_2$  may alleviate decreased metabolism. The attenuated metabolic activity of osteoblasts disturbs the homeostasis of bone and may result in osteoporosis. Thus, obtained results are promising in light of new treatment strategies for the treatment of osteoporotic fractures.<sup>52</sup> The increased metabolic activity of pre-osteoblast cultured on  $ZrO_2^{ALD}$  coatings was associated with developed mitochondrial networks and improved mitochondrial membrane potential. However, as was also previously observed by Ye et al<sup>53</sup> zirconium nanoparticles may increase Reactive Oxygen Species (ROS) generation, which may lead to the induction of apoptosis in pre-osteoblastic cells, but this mechanism greatly depends on the concentration of nanoparticles. This study may explain the increased number of cells with total depolarized mitochondrial membranes and increased apoptosis in cultures on  $ZrO_2^{ALD}$  coatings. The observed cytotoxic effect of  $ZrO_2^{ALD}$  coatings can be described as mild, as it did not affect cell morphology and proliferative status. ROS generation induced by  $ZrO_2$  may trigger miR-21 overexpression, which was previously shown using the model of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) during oscillating and high glucose exposures. This may explain the increased expression of mRNA for essential osteogenic markers, such as Coll-1, OCL, OPN and Runx-2. The obtained data indicate that  $ZrO_2^{ALD}$  is able to enhance pro-osteogenic gene expression, possibly via upregulating miR-21 expression that targets Runx-2, promoting osteogenic differentiation. We have also indicated that pre-osteoblasts with inhibited activity of miR-21 were also characterized by decreased levels of miR-7. The role of miR-7 in the course of osteogenesis is not well studied; however, it may be relevant in terms of metabolic activity of differentiating

pre-osteoblasts, as well as may modulate osteoblasts viability.<sup>54</sup> The expression profile of miR-223 is in good agreement with mRNA levels of osteogenic markers. Increased levels of miR-223 were noted in MC3T3 cultures propagated on ZrO<sub>2</sub><sup>ALD</sup> coatings. MiR-223 was recently identified as a key modulator of osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells, which targets histone deacetylase 2 (HDAC2).<sup>55</sup>

To summarize, the obtained ZrO<sub>2</sub><sup>ALD</sup> coatings are cyto-compatible toward the MC3T3 osteoblastic cell line. The coatings promote the metabolic potential and may mitigate the effect of miR-21 inhibition, increasing expression of osteogenic markers, both at mRNA and miRNA level.

## Conclusion

Physical and chemical analysis indicated the presence of an amorphous zirconium oxide layer, grown by ALD technology, with a thickness of 84 nm. The obtained coating is characterized by a high homogeneity and a low roughness. The ALD technology allowed us to obtain uniform thickness distribution on the surface of the substrate. The only chemical elements detected in the investigated thin film are zircon, oxide and carbon. The detected carbon was mostly due to surface contamination. The XPS measurement after Ar bombardment shows that the concentration of carbon dropped dramatically, and the value of inner carbon pollution may be about 3 Atom %. This may be related to the precursors used in the ALD process. A slight nonstoichiometry of the samples was observed, indicating the presence of oxygen defects in the film.

The obtained coatings are highly cytocompatible, which was shown using the model of MC3T3 pre-osteoblasts. The coatings have biomimetic properties, promoting cell adhesion and spreading. The obtained coatings improved the metabolism of cells, increasing the mitochondrial membrane potential and the development of mitochondrial networks. Moreover, ZrO<sub>2</sub><sup>ALD</sup> coatings promoted increased expression of typical osteogenic markers, which was confirmed using MC3T3<sub>inh21</sub>. Bearing these results in mind, ZrO<sub>2</sub><sup>ALD</sup> coatings with pro-osteogenic potential may find application in bone tissue engineering.

## Abbreviations

ALD, atomic layer deposition; ALP, alkaline phosphatase; ASC, adipose tissue-derived stromal cells; BAX, Bcl-2-associated X protein; BCL-2, B-cell lymphoma 2; BMP-2, bone morphogenetic protein 2; BMSC, bone-marrow multipotent stromal cells; BrdU, bromodeoxyuridine/5-bromo-2'-

deoxyuridine; CGM, complete growth medium; Coll-1, collagen type 1; ECM, extracellular matrix; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HBSS, Hank's Balanced Salt Solution; HIF-1 $\alpha$ , hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ; HOB, human osteoblast cells; MC3T3, pre-osteoblastic mice cell line; MC3T3<sub>inh21</sub>, MC3T3 cells with miR21 inhibitor; MC3T3<sub>NC</sub>, negative control; miRNA/miR, micro ribonucleic acid; MMP, matrix metalloproteinases; mRNA, messenger ribonucleic acid; MSC, multipotent cells of mesenchymal origin; ns, not significant; OCL, osteoclast; OPN, osteopontin; PCR, polymerase chain reaction; PFA, paraformaldehyde; ROS, Reactive Oxygen Species; RT, reverse transcriptase; Runx-2, runt-related transcription factor 2; SEM, Scanning Electron Microscope; TDMA-Zr, Tetrakis (dimethylamido) zirconium; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; VEGF, vascular endothelial growth factor; XPS, X-ray photoelectron spectroscopy; XRR, X-ray reflectometry; ZrO<sub>2</sub>, zirconium oxide; ZrO<sub>2</sub><sup>ALD</sup>, zirconium oxide thin film obtained by ALD technology.

## Acknowledgments

Financial support from the National Science Centre over the course of the realization of the project Harmonia 10 titled "New, two-stage scaffolds based on calcium nanoapatite (nHAP) incorporated with iron nanotoxides (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) with the function of controlled release of miRNA in a static magnetic field for the regeneration of bone fractures in osteoporotic patients" (Grant No. UMO 2017/26/M/NZ5/01184) is gratefully acknowledged.

## Disclosure

Dr Agnieszka Śmieszek reports grants from National Science Centre (Poland), during the conduct of the study. The authors report no other conflicts of interest in this work.

## References

- Ghiasi MS, Chen J, Vaziri A, Rodriguez EK, Nazarian A. Bone fracture healing in mechanobiological modeling: a review of principles and methods. *Bone Rep.* 2017;6:87–100. doi:10.1016/j.bonr.2017.03.002
- Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(1):45–54. doi:10.1038/nrrheum.2014.164
- Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ernhaller C, Gerbhard F. Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone.* 2015;70:93–101. doi:10.1016/j.bone.2014.07.033
- Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a biomaterial. *Biomaterials.* 1997;18:1–25.
- Sollazzo V, Pezzetti F, Scarano A, et al. Zirconium oxide coating improves implant osseointegration in vivo. *Dent Mater.* 2008;24(3):357–361. doi:10.1016/j.dental.2007.06.003



6. Hausmann DM, Kim E, Becker J, Gordon RG. Atomic layer deposition of hafnium and zirconium oxides using metal amide precursors. *Chem Mater*. 2002;14(10):4350–4358. doi:10.1021/cm020357x
7. Godlewski M, Gieraltowska S, Wachnicki Ł, et al. High-k oxides by atomic layer deposition—applications in biology and medicine. *J Vac Sci Technol a Vac Surf Film*. 2017;35(2):021508. doi:10.1116/1.4974314
8. Suntola T. *Atomic Layer Epitaxy*. Espo: Microchemistry Ltd; 1989.
9. Ritala M, Leskelä M. Atomic layer epitaxy - a valuable tool for nanotechnology? *Nanotechnology*. 1999;10(1):19–24. doi:10.1088/0957-4484/10/1/005
10. Miikkulainen V, Leskelä M, Ritala M, Puurunen RL. Crystallinity of inorganic films grown by atomic layer deposition: overview and general trends. *J Appl Phys*. 2013;113(2):021301. doi:10.1063/1.4757907
11. Gieraltowska S, Wachnicki L, Witkowski BS, Mroczynski R, Dluzewski P, Godlewski M. Characterization of dielectric layers grown at low temperature by atomic layer deposition. *Thin Solid Films*. 2015;577:97–102. doi:10.1016/j.tsf.2015.01.059
12. Knez M, Nielsch K, Niinistö L. Synthesis and surface engineering of complex nanostructures by atomic layer deposition. *Adv Mater*. 2007;19(21):3425–3438. doi:10.1002/adma.200700079
13. Cremers V, Puurunen RL, Dendooven J. Conformality in atomic layer deposition: current status overview of analysis and modelling. *Appl Phys Rev*. 2019;6(2):021302. doi:10.1063/1.5060967
14. Nilsen O, Fjellvåg H, Kjekshus A. Growth of calcium carbonate by the atomic layer chemical vapour deposition technique. *Thin Solid Films*. 2004;450(2):240–247. doi:10.1016/j.tsf.2003.10.152
15. Putkonen M, Sajavaara T, Rahkila P, et al. Atomic layer deposition and characterization of biocompatible hydroxyapatite thin films. *Thin Solid Films*. 2009;517(20):5819–5824. doi:10.1016/j.tsf.2009.03.013
16. Holopainen J, Kauppinen K, Mizohata K, et al. Preparation and bioactive properties of nanocrystalline hydroxyapatite thin films obtained by conversion of atomic layer deposited calcium carbonate. *Biointerphases*. 2014;9(3):031008. doi:10.1116/1.4889975
17. Niinistö L, Päiväsari J, Niinistö J, Putkonen M, Nieminen M. Advanced electronic and optoelectronic materials by atomic layer deposition: an overview with special emphasis on recent progress in processing of high-k dielectrics and other oxide materials. *Phys Status Solidi Appl Res*. 2004;201(7):1443–1452. doi:10.1002/pssa.200406798
18. Seppälä S, Vehkamäki M, Mizohata K, et al. Comparative study on the use of novel heteroleptic cyclopentadienyl-based zirconium precursors with H<sub>2</sub>O and O<sub>3</sub> for atomic layer deposition of ZrO<sub>2</sub>. *J Vac Sci Technol A*. 2019;37(2):020912. doi:10.1116/1.5079539
19. Leskelä M, Ritala M. Atomic layer deposition (ALD): from precursors to thin film structures. *Thin Solid Films*. 2002;409(1):138–146. doi:10.1016/S0040-6090(02)00117-7
20. da Cota Fernandes CJ, Ferreira MR, Bezerra FJB, Zambuzzi WF. Zirconia stimulates ECM-remodeling as a prerequisite to pre-osteoblast adhesion/proliferation by possible interference with cellular anchorage. *J Mater Sci Mater Med*. 2018;29(41). doi:10.1007/s10856-018-6041-9
21. Śmieszek A, Donesz-Sikorska A, Grzesiak J, Krzak J, Marycz K. Biological effects of sol-gel derived ZrO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub>/ZrO<sub>2</sub> coatings on stainless steel surface—in vitro model using mesenchymal stem cells. *J Biomater Appl*. 2014;29(5):699–714. doi:10.1177/0885328214545095
22. Śmieszek A, Szydłarska J, Mucha A, Chrapiec M, Marycz K. Enhanced cytocompatibility and osteoinductive properties of sol-gel-derived silica/zirconium dioxide coatings by metformin functionalization. *J Biomater Appl*. 2017;32(5):570–586. doi:10.1177/0885328217738006
23. Sivaraman K, Chopra A, Narayan AI, Balakrishnan D. Is zirconia a viable alternative to titanium for oral implant? A critical review. *J Prosthodont Res*. 2018;62(2):121–133. doi:10.1016/j.jpor.2017.07.003
24. Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*. 1996;17(2):137–146. doi:10.1016/0142-9612(96)85758-9
25. Zhao Z, Li X, Zou D, Lian Y, Tian S, Dou Z. Expression of microRNA-21 in osteoporotic patients and its involvement in the regulation of osteogenic differentiation. *Exp Ther Med*. 2019;17:709–714. doi:10.3892/etm.2018.6998
26. Yang C, Liu X, Zhao K, Zhu Y, Hu B, Zhou Y, Wang M, Wu Y, Zhang C, Xu J, Ning Y, Zou D. miRNA-21 promotes osteogenesis via the PTEN/PI3K/Akt/HIF-1 $\alpha$  pathway and enhances bone regeneration in critical size defects. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):65. doi:10.1186/s13287-019-1168-2.
27. Wierzbicka A, Zytewicz ZR, Sobańska M, Kłosek K, Lusakowska E. Influence of substrate on crystallographic quality of AlGaIn/GaN HEMT structures grown by plasma-assisted MBE. *Acta Phys Pol A*. 2012;121(4):899–902. doi:10.12693/APhysPolA.121.899
28. Colombi P, Zanola P, Bontempi E, Roberti R, Gelfi M, Depero LE. Glancing-incidence X-ray diffraction for depth profiling of polycrystalline layers. *J Appl Crystallogr*. 2006;39(2):176–179. doi:10.1107/S0021889805042779
29. van der Lee A, Roualdes S, Berjoan R, Durand J. Mass density determination of thin organosilicon films by X-ray reflectometry. *Appl Surf Sci*. 2001;173(1–2):115–121. doi:10.1016/S0169-4332(00)00890-4
30. Burnier M, Fricker AF, Hayoz D, Nussberger J, Brunner HR. Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of YM087, a combined V<sub>1</sub>/V<sub>2</sub> vasopressin receptor antagonist in normal subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 1999;55(9):633–637. doi:10.1007/s002280050685
31. Śmieszek A, Giezek E, Chrapiec M, et al. The influence of Spirulina platensis filtrates on caco-2 proliferative activity and expression of apoptosis-related microRNAs and mRNA. *Mar Drugs*. 2017;15:3. doi:10.3390/md15030065
32. Marycz K, Weiss C, Śmieszek A, Kornicka K. Evaluation of oxidative stress and mitophagy during adipogenic differentiation of adipose-derived stem cells isolated from Equine Metabolic Syndrome (EMS) Horses Krzysztof. *Stem Cells Int*. 2018;2018:13–15. doi:10.1155/2018/5340756
33. Śmieszek A, Czyrek A, Basinska K, et al. Effect of metformin on viability, morphology, and ultrastructure of mouse bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells and Balb/3T3 embryonic fibroblast cell line. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1–14. doi:10.1155/2015/769402
34. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(October 1987):156–159. doi:10.1006/abio.1987.9999
35. Śmieszek A, Kornicka K, Szlapka-Kosarzewska J, et al. Metformin increases proliferative activity and viability of multipotent stromal stem cells isolated from adipose tissue derived from horses with equine metabolic syndrome. *Cells*. 2019;8:2. doi:10.3390/cells8020080
36. Śmieszek A, Giezek E, Chrapiec M, et al. The Influence of spirulina platensis filtrates on Caco-2 proliferative activity and expression of apoptosis-related microRNAs and mRNA. *Mar Drugs*. 2017;15(3):65. doi:10.3390/md15030065
37. Marycz K, Śmieszek A, Trynda J, et al. Nanocrystalline hydroxyapatite loaded with resveratrol in colloidal suspension improves viability, metabolic activity and mitochondrial potential in human adipose-derived mesenchymal stromal stem cells (hASCs). *Polymers (Basel)*. 2019;11:1. doi:10.3390/polym11010092
38. Lis-Bartos A, Śmieszek A, Frańczyk K, Marycz K. Fabrication, characterization, and cytotoxicity of thermoplastic polyurethane/poly(lactic acid) material using human adipose derived mesenchymal stromal stem cells (hASCs). *Polymers (Basel)*. 2018;10:10. doi:10.3390/polym10101073
39. Crist B. *Handbooks of Monochromatic XPS Spectra*. XPS International LLC;2005:1.

40. Sygellou L, Gianneta V, Xanthopoulos N, et al. ZrO<sub>2</sub> and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> thin films on Ge(100) grown by ALD: an XPS investigation. *Surf Sci Spectra*. 2011;18(1):58–67. doi:10.1116/11.20100901
41. Pétigny S, Mostéfa-Sba H, Domenichini B, Lesniewska E, Steinbrunn A, Bourgeois S. Superficial defects induced by argon and oxygen bombardments on (110) TiO<sub>2</sub> surfaces. *Surf Sci*. 1998;410(2–3):250–257. doi:10.1016/S0039-6028(98)00297-0
42. Morita M, Ohmi T, Hasegawa E, Kawakami M, Ohwada M. Growth of native oxide on a silicon surface. *J Appl Phys*. 1990;68(3):1272–1281. doi:10.1063/1.347181
43. Morita M, Ohmi T. Characterization and control of native oxide on silicon. *Jpn J Appl Phys*. 1994;33(1):370–374. doi:10.1143/JJAP.33.370
44. Uenuma M, Takahashi K, Sonehara S, et al. Influence of carbon impurities and oxygen vacancies in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> film on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/GaN MOS capacitor characteristics. *AIP Adv*. 2018;8:105103. doi:10.1063/1.5041501
45. Kuo D-H, Tzeng K-H, Chien C-H. Characterization of nonstoichiometric TiO<sub>2</sub> and ZrO<sub>2</sub> thin films stabilized by Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and SiO<sub>2</sub> additions. *J Vac Sci Technol a Vac Surf Film*. 2003;21(6):1996–2002. doi:10.1116/1.1622675
46. Li H, Wang Z, Fu Q, Zhang J. Plasma miRNA levels correlate with sensitivity to bone mineral density in postmenopausal osteoporosis patients. *Biomarkers*. 2014;19(7):553–556. doi:10.3109/1354750X.2014.935957
47. Ma Y, Shan Z, Ma J, et al. Validation of downregulated microRNAs during osteoclast formation and osteoporosis progression. *Mol Med Rep*. 2016;13(3):2273–2280. doi:10.3892/mmr.2016.4765
48. Zhao W, Dong Y, Wu C, Ma Y, Jin Y, Ji Y. MiR-21 overexpression improves osteoporosis by targeting RECK. *Mol Cell Biochem*. 2015;405(1–2):125–133. doi:10.1007/s11010-015-2404-4
49. Rizzi M, Gatti G, Migliario M, Marchese L, Rocchetti V, Renò F. Effect of zirconium nitride physical vapor deposition coating on preosteoblast cell adhesion and proliferation onto titanium screws. *J Prosthet Dent*. 2014;112(5):1103–1110. doi:10.1016/j.prosdent.2014.04.010
50. Stains JP, Civitelli R. Cell-cell interactions in regulating osteogenesis and osteoblast function. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev*. 2005;75(1):72–80. doi:10.1002/bdrc.20034
51. Chen Y, Roohani-Esfahani SI, Lu ZF, Zreiqat H, Dunstan CR. Zirconium ions up-regulate the BMP/SMAD signaling pathway and promote the proliferation and differentiation of human osteoblasts. *PLoS One*. 2015;10(1):1–17. doi:10.1371/journal.pone.0113426
52. Lee WC, Guntur AR, Long F, Rosen CJ. Energy metabolism of the osteoblast: implications for osteoporosis. *Endocr Rev*. 2017;38(3):255–266. doi:10.1210/er.2017-00064
53. Ye M, Shi B. Zirconia nanoparticles-induced toxic effects in osteoblast-like 3T3-E1 cells. *Nanoscale Res Lett*. 2018;13(1):1–2. doi:10.1186/s11671-018-2747-3
54. Fan JB, Liu W, Zhu XH, Cui SY, Cui ZM, Zhao JN. microRNA-7 inhibition protects human osteoblasts from dexamethasone via activation of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biochem*. 2019;460(1–2):113–121. doi:10.1007/s11010-019-03575-y. Epub 2019 Jul 16
55. Zhang S, Liu Y, Zheng Z, et al. MicroRNA-223 suppresses osteoblast differentiation by inhibiting DHRS3. *Cell Physiol Biochem*. 2018;47(2):667–679. doi:10.1159/000490021

## International Journal of Nanomedicine

Dovepress

### Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>

RESEARCH

Open Access



# Hafnium (IV) oxide obtained by atomic layer deposition (ALD) technology promotes early osteogenesis via activation of Runx2-OPN-mir21A axis while inhibits osteoclasts activity

A. Seweryn<sup>1</sup>, M. Alicka<sup>2</sup>, A. Fal<sup>3</sup>, K. Kornicka-Garbowska<sup>2,4</sup>, K. Lawniczak-Jablonska<sup>1</sup>, M. Ozga<sup>1</sup>, P. Kuzmiuk<sup>1</sup>, M. Godlewski<sup>1</sup> and K. Marycz<sup>2,3,4\*</sup>

## Abstract

**Background:** Due to increasing aging of population prevalence of age-related disorders including osteoporosis is rapidly growing. Due to health and economic impact of the disease, there is an urgent need to develop techniques supporting bone metabolism and bone regeneration after fracture. Due to imbalance between bone forming and bone resorbing cells, the healing process of osteoporotic bone is problematic and prolonged. Thus searching for agents able to restore the homeostasis between these cells is strongly desirable.

**Results:** In the present study, using ALD technology, we obtained homogeneous, amorphous layer of hafnium (IV) oxide (HfO<sub>2</sub>). Considering the specific growth rate (1.9Å/cycle) for the selected process at the temperature of 90 °C, we performed the 100 nm deposition process, which was confirmed by measuring film thickness using reflectometry. Then biological properties of the layer were investigated with pre-osteoblast (MC3T3), pre-osteoclasts (4B12) and macrophages (RAW 264.7) using immunofluorescence and RT-qPCR. We have shown, that HfO<sub>2</sub> (i) enhance osteogenesis, (ii) reduce osteoclastogenesis (iii) do not elicit immune response and (iv) exert anti-inflammatory effects.

**Conclusion:** HfO<sub>2</sub> layer can be applied to cover the surface of metallic biomaterials in order to enhance the healing process of osteoporotic bone fracture.

**Keywords:** Hafnium (IV) oxide, Atomic layer deposition, Osteoblasts, Osteoclasts, Biomaterials, Osteoporosis

## Background

Regenerative medicine is a fast-growing field that is being successfully applied in traumatology or reconstructive surgery, where it is showing to be a promising avenue for the treatment of elderly patients [1]. Due to rapid aging of

populations, there is an urgent need to develop personalized therapies for aged-related diseases. One of the most common disorder affecting elderly population worldwide is osteoporosis (OP) which deteriorates bone mass and architecture [2]. In accordance to recent data, around 200 million people suffer from OP and 8.9 million fractures are caused by the disease [3]. Besides being a great concern of the health care system, OP comes with economic burden. In the United States of America, costs of OP-related fractures is estimated to \$13.8 billion. Therefore,

\*Correspondence: krzysztof.marycz@upwr.edu.pl

<sup>2</sup> Department of Experimental Biology, Faculty of Biology and Animal Science, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Norwida 27B, 50-375 Wrocław, Poland

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

OP represents not only clinical and public issue but due to significant morbidity, mortality and health care costs it represents a major challenge for world economies.

Metallic implants have been utilized for different medical purposes including orthopedics for short as well as long term fixations since many years [4]. So far, the most frequently applied metallic materials in traumatology are stainless steel (SS), titanium or cobalt alloys [5]. For the fixation of simple fractures, usually SS is applied due to much lower costs than titanium alloys. However, due to its corrosive nature and risk of allergic reaction due to released ions, SS is recommended for short term fixation procedures [6]. In turn, titanium alloys are characterized by good corrosion resistance and biocompatibility in contact with human body fluids, but their biomechanical properties are less attractive, when compared to SS. Metallic materials seem to be still an irreplaceable in reconstructive surgery, although there are many reports indicating on their disadvantages including postoperative complications, distortion of post-operative metallic screws and inflammatory reactions [5].

Methods have been devised to modify and improve the properties of the base material in order to enhance the medical outcome of the therapy. One of the approach to enhance the properties of metallic materials is their surface modifications by the application of various techniques including Atomic Layer Deposition (ALD). This technique allows to deposit a thin film onto various materials, such as metal, glass and polymers [7]. The ALD method is based on sequential introduction of selected chemical compounds (precursors) into the reaction chamber. As a result of chemical reactions between precursors on the substrate, a thin film grows closely attached to the substrate. The introduction of selected precursors is separated by the neutral gas fraction e.g. argon or nitrogen, which allows removal of the unreacted precursor molecules and reaction by-products from the reactor chamber [8]. Thickness of a newly formed layer is controlled by number of ALD cycles and the growth process is self-limiting. In optimal case only one monolayer may be grown during one ALD cycle (precursor doses separated by purging of a growth chamber). Such deposition model allows precise control of the layer thicknesses. The required thickness is controlled by estimated number of the ALD cycles [9]. One of the biggest advantages of the ALD technique is ability to obtain highly reproducible, homogenous coatings while the deposition process does not depend on source of the substrates [10]. What is more, the growth process can be performed even at room temperature [11], which allows to consider future functionalization of biological factors, even such as cells or drugs [12, 13]. Despite low temperature of growth, the resulting layers are of high quality and are highly

homogeneous. Due to its multiple advantages, ALD technology allows to obtain nanolayers characterized by specific biological properties. In particular, the ALD method leads to deposit of transition metal oxides. Recently our group reported that zirconium (IV) oxide ( $ZrO_2$ ) thin films, deposited using ALD technology, improve metabolic as well as pro-osteogenic potential of bone precursor cell line through activation of miR-21 [14], which become an motivation for the present study.

Intelligent, smart scaffolds, including metallic materials, dedicated for osteoporotic bone regeneration, should be designed to represent not only great biocompatibility but also bioactivity in order to modulate microenvironment of surrounding tissue [15, 16]. It is strongly required for a scaffold to enhance osteogenesis via promotion of osteoblast differentiation, while silencing osteoclasts differentiation and maturation. What is more, in the course of bone fracture healing triggering of intrinsic, natural processes in order to reduce inflammation is strongly required. For that reason, we decided to investigate whether hafnium (IV) oxide ( $HfO_2$ ) layer can be utilized in the fabrication of personalized biomaterials for elderly patients during OP fractures. In presented paper, we analyzed physicochemical and biological properties of the layer revealing its pro-osteogenic properties. Obtained results shed a promising light for  $HfO_2$  future application in the field of nanometric coatings for biomedical applications.

## Results

### Physicochemical analysis

The X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis (Fig. 1) indicated that  $HfO_2$  was formed on the surface during the ALD growth process. Only oxygen (O) and hafnium (Hf), in the ratio of 2.2, and carbon (C) were detected (Fig. 1a) [17]. The high C content (about 31%) and oxygen surplus probably comes from atmospheric pollution. The oxygen line analysis (Fig. 1c) confirms that many of oxygen atoms (about 75%) were bound with hafnium atoms with the binding energy equal to 530.6 eV [18]. The 25% of the oxygen line is answering the surface contamination with the value of binding energy 532.6 eV.

The results of depth profiling are presented in Fig. 1b. The concentration of elements was measured after 5,10,15,20 and 25 min of sputtering. The Hf 4f lines (19.6 eV) (Fig. 1c) were analyzed to estimate the hafnium content. [18] Unlike the more surface sensitive Hf 4d lines (213.8 eV), the Hf 4f lines come from less strongly bound electron shells, therefore photoelectrons have higher kinetic energy and released from larger depths, which gives more accurate results of measurements minimizing disorder introduced by the sputtering. The final tests depth was estimated to be about 35–40 nm.

Therefore, we can claim the homogeneity of the element's distribution in the coating. After the first 5 min of sputtering, the carbon content dropped to 10 at % and remained constant in subsequent measurements. The ratio of oxygen atoms to hafnium atoms was also stable at the level 1.6. This change in respect to as received film results from the preferential sputtering of oxygen what is seen in the change of Hf 4f line during sputtering (Fig. 1e). After 5 min sputtering the Hf 4f line bounded to 7 oxygen atoms (metal centres in HfO<sub>2</sub> are coordinated by seven oxygen atoms [11]) simulated by the mixed Gaussian (40%) and Lorentzian (60%) function is broadening from FWHM equal to 1.4 eV to 1.6 eV. Moreover, the second doublet (20% of the line area) should be added to account for the Hf atoms bounded to less than 7 oxygen atoms with FWHM equal to 2.2 eV, what evidences the disorder introduced during the sputtering [19].

The thickness of the oxide layer was determined by comparing the reflection spectrum of white light from the substrate (Si) to the reflection spectrum of light from a HfO<sub>2</sub> layer deposited on the silicon substrate. A 100 nm thick HfO<sub>2</sub> layer was successfully deposited onto the substrate. Additionally, lack of an X-ray diffraction (XRD) signal confirms the amorphous nature of the films. XRD can only occur on the ordered structure of the atoms.

The morphology was investigated using Atomic Force Microscope (AFM) (Fig. 1f, g). Surface images were made for areas of the size 10 μm × 10 μm (Fig. 1g), 2 μm × 2 μm (Fig. 1f) and 1 μm × 1 μm. The surface roughness of the layer was determined from the obtained AFM data. Ra is an arithmetic average of the absolute values of the surface height deviations and Rq is the root mean square (RMS) average of height values. The calculated surface roughness Ra is 0.422 nm, 0.537 nm and 0.536 nm while Rq is equal to 0.535 nm, 0.678 nm and 0.675 nm respectively for 100 μm<sup>2</sup>, 4 μm<sup>2</sup> and 1 μm<sup>2</sup> area. Uniformly distributed peaks can be observed on the surface of the layer there. Their maximal peak-to-valley value is only 6.5 nm over 100 μm<sup>2</sup> area. Such a small maximum value of the height of irregularities occurring on the surface indicates uniform growth of the layer and lack of contamination on the surface.

#### **Hafnium (IV) oxide (HfO<sub>2</sub>) significantly affects proliferation activity and viability of osteoblast precursors and pre-osteoclasts**

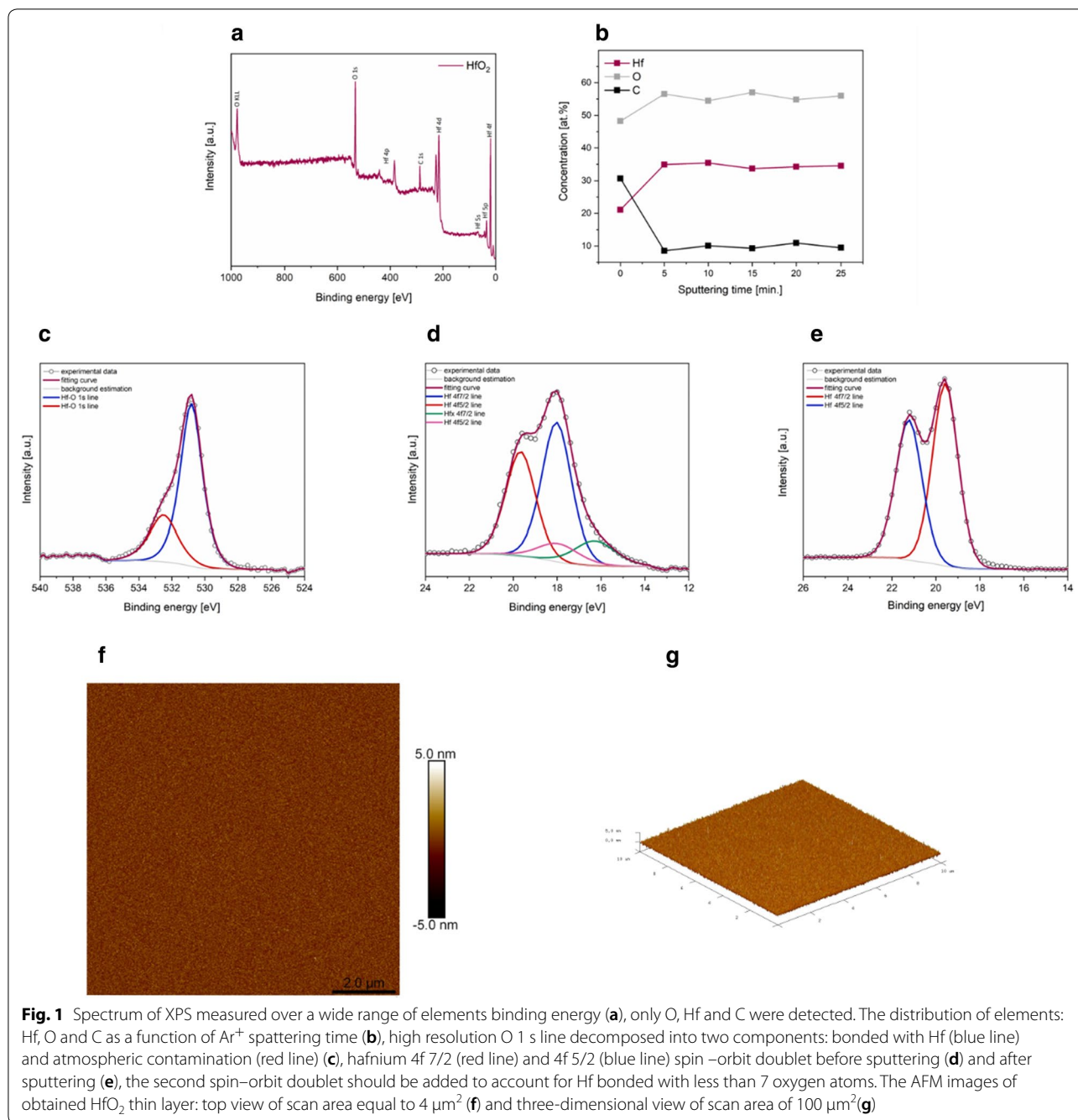
The effect of HfO<sub>2</sub> on proliferation activity pre-osteoblasts (MC3T3-E1) and pre-osteoclasts (4B12) was evaluated with resazurin based assay. Cell proliferation was monitored during 144 h of culture in normal condition or in the presence of HfO<sub>2</sub>. We noted that HfO<sub>2</sub>

significantly enhanced proliferation of MC3T3-E1 after 48 h ( $p < 0.001$ ), while HfO<sub>2</sub> did not affect proliferation of pre-osteoclast cell line (Fig. 2a). Based on data obtained from repeated resazurin-based in vitro toxicology assay (TOX8), population doubling time (PDT)- the time required for a cell population to double their number- was determined. The assay revealed that HfO<sub>2</sub> significantly decreased PDT value of pre-osteoblasts ( $p < 0.05$ ), while did not change proliferation rate of 4B12 (Fig. 2b).

To determine whether HfO<sub>2</sub> affects cell apoptosis, the cells were cultured for 144 h (6 days) in normal condition or in the presence of HfO<sub>2</sub>. Relative expression of apoptosis-related genes was estimated using RT-qPCR. We detected that several genes expression was affected by HfO<sub>2</sub> in both MC3T3-E1 and 4B12 cell lines. Exposition to HfO<sub>2</sub> significantly increased expression of anti-apoptotic *BCL2* (B cell lymphoma 2 gene) ( $p < 0.05$ ) and downregulated pro-apoptotic *BAX* (BCL2 associated X protein) ( $p < 0.05$ ) that resulted in higher *BCL2/BAX* ratio ( $p < 0.001$ ) in MC3T3-E1 exposed to HfO<sub>2</sub> indicating lower apoptosis rate (Fig. 3a). On the contrary, treatment with HfO<sub>2</sub> evidently decreased mRNA level of anti-apoptotic *BCL2* ( $p < 0.05$ ) caused low *BCL2/BAX* ratio ( $p < 0.01$ ). Interestingly, mRNA level of pro-apoptotic caspase 9 encoded by *CASP9* ( $p < 0.001$ ) and *P53* (tumor protein p53) ( $p < 0.05$ ) were significantly decreased in 4B12 after exposition to HfO<sub>2</sub> compared to control group (Fig. 3b). Additionally, we noted that HfO<sub>2</sub> markedly enhanced expression of miR-7a-5p ( $p < 0.001$ ) and miR-17-5p ( $p < 0.001$ ) in MC3T3-E1, a widely known miRNA involved in promotion of cell proliferation and inhibition of apoptosis (Fig. 3c) [20, 21]. Conversely, those miRNAs are downregulated in 4B12 (Fig. 3d). To conclude, HfO<sub>2</sub> upregulated *BCL2/BAX* ratio and expression of miR-7a-5p and miR-17-5p in MC3T3, while in 4B12 was observed inverse relation. In those cells, HfO<sub>2</sub> diminished mRNA levels of *CASP9* and *P53*, thus suggesting that HfO<sub>2</sub> may inhibit cells apoptosis affecting different signaling pathways depending on cell type.

#### **HfO<sub>2</sub> modulates expression of osteogenic and osteoclastogenic markers**

The effect of HfO<sub>2</sub> on expression of specific markers involved in pre-osteoblast differentiation and bone formation after 144 h of culture was determined using RT-qPCR technique and immunofluorescence staining. We observed overexpression of runt-related transcription factor 2 (*RUNX2*) ( $p < 0.001$ ) and transforming growth factor β encoded by *TGFβ* in MC3T3-E1 cells exposed to HfO<sub>2</sub> (Fig. 4a). In addition, osteopontin (*OPN*) ( $p < 0.05$ ) was upregulated, while osteocalcin encoded by *OCN* ( $p < 0.05$ ) was downregulated in HfO<sub>2</sub> group (Fig. 4a). Additionally, HfO<sub>2</sub> positively regulated expression of



two key miRNA involved in osteogenesis: miR-21-5p ( $p < 0.01$ ) and miR-16-5p ( $p < 0.001$ ) (Fig. 2b). miR-21-5p is widely known osteogenesis stimulator, whereas miR-16 suppress expression of key osteogenic markers and mineral calcium deposition by mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation [22, 23]. Immunofluorescence staining revealed significant differences in distribution of RUNX2 and osteoprotegerin (OPG), as well as substantial alternation in the expression of OPN

between experimental groups. In normal culture condition, RUNX2 exhibited perinuclear localization in MC3T3-E1, while HfO<sub>2</sub> induced subcellular distribution of this protein (Fig. 4c). Similarly, exposition to HfO<sub>2</sub> caused shift in fluorescence from nucleus area to cytoplasm of OPG (Fig. 4d). It is also worth noting that HfO<sub>2</sub> increased expression of OPN protein (Fig. 4d).

RT-qPCR results revealed that after 144 h of culture, HfO<sub>2</sub> negatively regulated expression of genes involved

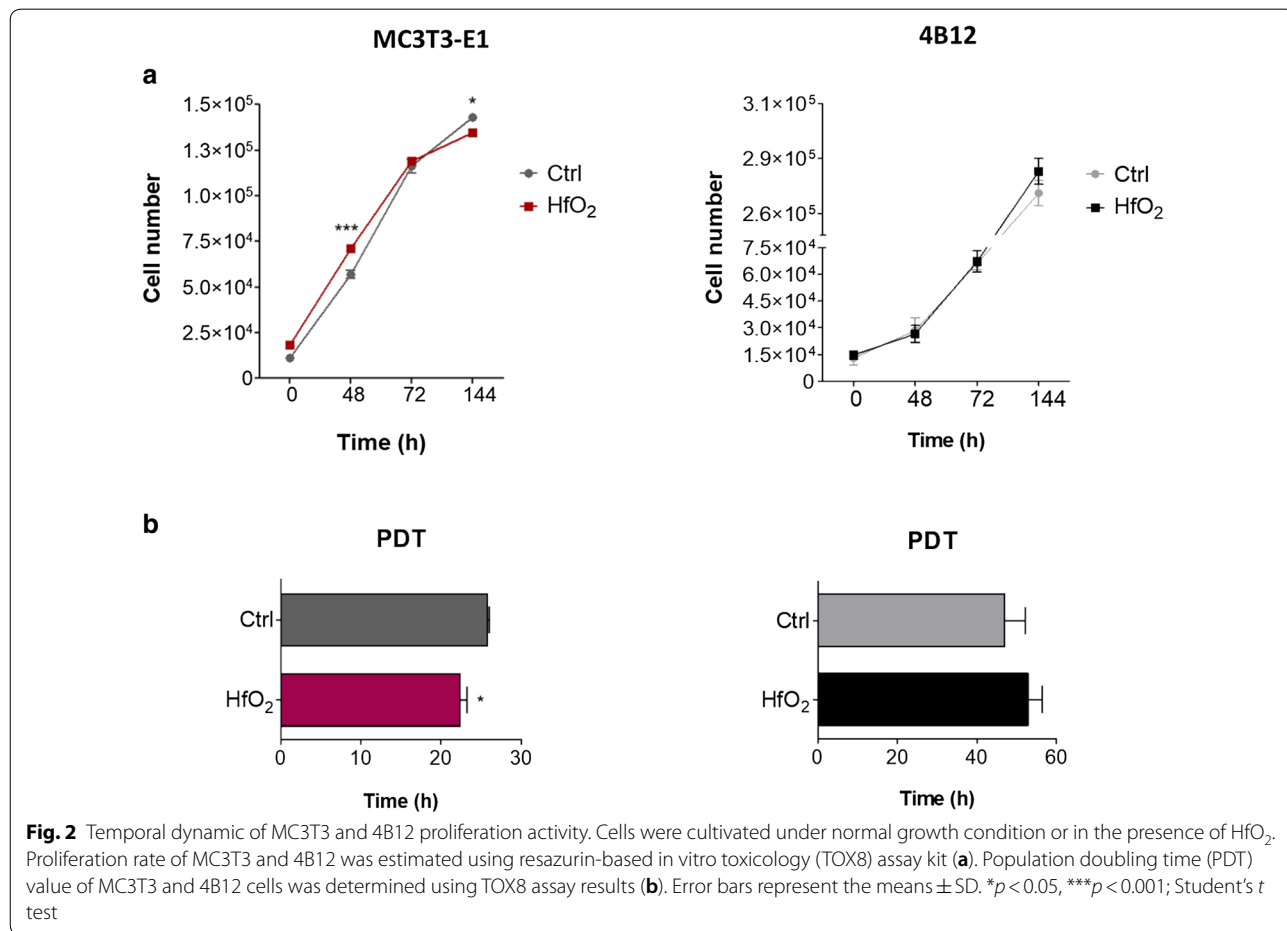
in osteoclastogenesis. We observed significant decline in expression of *c.FOS* ( $p < 0.001$ ), *PDL1* ( $p < 0.001$ ), *RANK* (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  B) ( $p < 0.001$ ) and *TRAP* (tartrate-resistant acid phosphatase), whereas upregulation of calcitonin receptor isoform 1a encoded by *CRIA* ( $p < 0.01$ ) in HfO<sub>2</sub> group (Fig. 5). These data indicated that HfO<sub>2</sub> induces overexpression of osteoblastogenic markers, affects the content of OPN, as well as distribution profile of RUNX and OPG, while inhibits expression of genes crucial for pre-osteoclast differentiation.

**Biocompatibility analysis of HfO<sub>2</sub> on RAW 264.7 cells**

Biocompatibility of HfO<sub>2</sub> was evaluated using macrophage cell line RAW 264.7. Cells were seeded on standard glass slides or glass slides coated with HfO<sub>2</sub> and allowed to attach overnight. Next, cells were exposed to lipopolysaccharide (LPS) for another 4 and 24 h. Cells treated with LPS (1  $\mu$ g/mL) served as positive control for macrophage activation. F-actin staining revealed multiple morphological alternations in LPS positive groups after only a 4 h of treatment. When RAW 264.7 were exposed

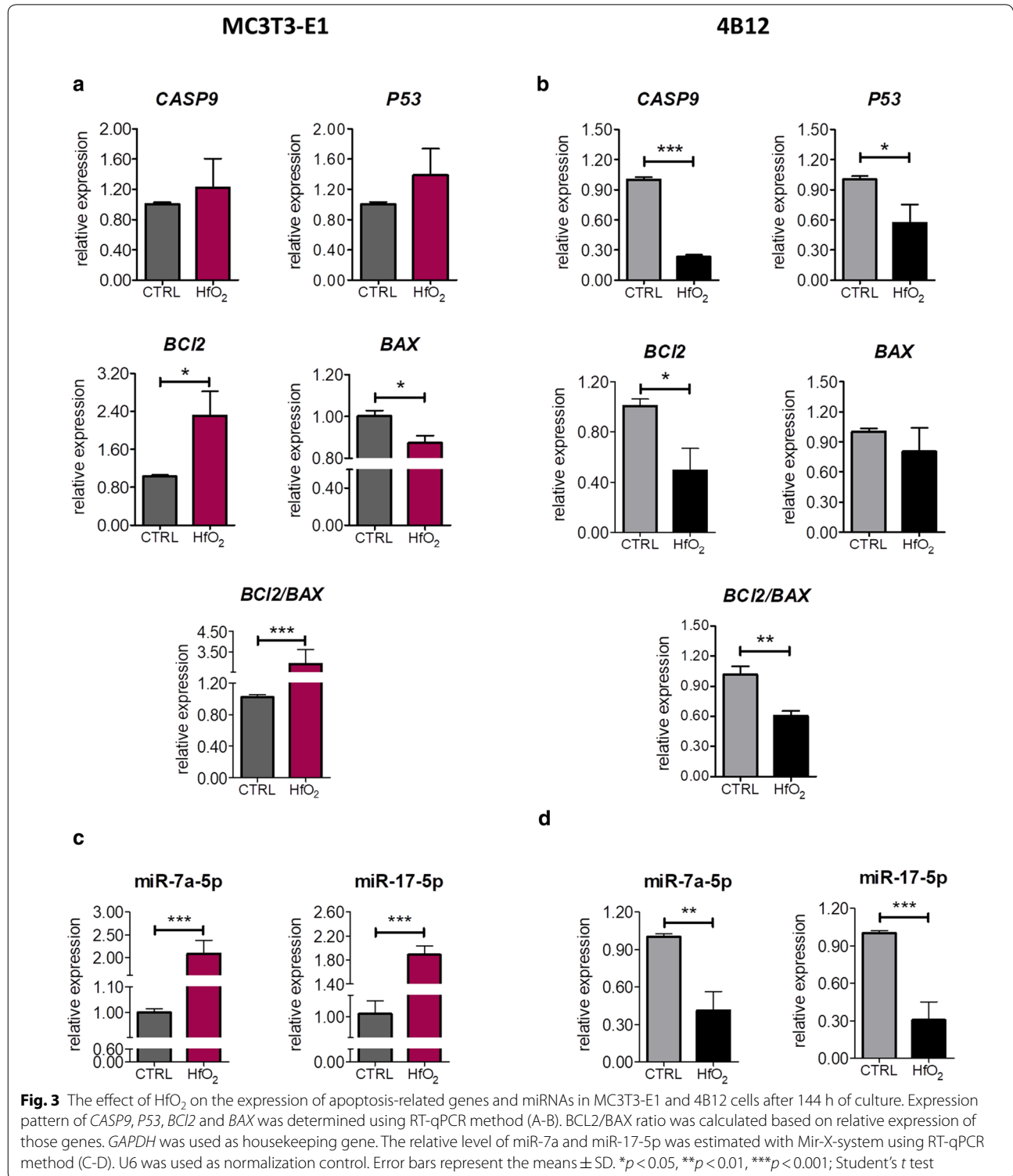
for 4 h, pseudopodia were formed and extended from few sides of cells (Fig. 6a). Pseudopodia were further extended after 24 h of LPS-stimulated macrophages (indicated with white arrows), whereas treatment with HfO<sub>2</sub> diminished those LPS-induced morphological changes (Fig. 6b). Interestingly, we observed significant increase in cell size of macrophages induced with LPS after 24 h of exposition. In addition, co-treatment of HfO<sub>2</sub> and LPS reversed LPS-induced alternations. Those cells displayed spherical shape and smooth surface similarly to negative control (RAW cultured in standard condition).

In the second step of the experiment polarization of macrophage M1/M2 using RT-qPCR method was investigated. We noted that LPS-treated macrophages exhibited overexpression of cytokines involved in M1 polarization, such as nitric oxide synthase (*INOS*), tumor necrosis factor alpha (*TNFA*), interleukin 6 (*IL6*) and interleukin (*IL1B*) after 4 h of LPS stimulation (Fig. 7a). Interestingly, HfO<sub>2</sub> significantly increased expression of anti-inflammatory interleukin 10 (*IL10*) ( $p < 0.05$ ) (Fig. 7b) after 4 h of treatment.



Expression of *INOS*, *TNFA*, *IL6* and *IL1B* was increased while *IL6* decreased after 24 h ( $p < 0.001$ ) of exposition with LPS (Fig. 7c). No statistically significant differences were noted in the expression of *IL10*, *IL4* and *TGFB* after

24 h of LPS stimulation (Fig. 7d). In addition,  $HfO_2$  alone did not affect macrophages activation suggesting its biocompatibility. The obtained results indicate on anti-inflammatory properties of  $HfO_2$ .





## Discussion

In presented paper we described a deposition of a smooth amorphous layers of  $\text{HfO}_2$  using the ALD process and its characterization studies with XRD and AFM. It is well known that, the selection of the ALD parameters determines the surface structure. The temperature and the number of cycles are most crucial parameters affecting ALD [11]. The layers obtained in the low-temperature ALD process are amorphous, which in turn ensures perfect adhesion to the substrate [24]. On the other hand, appropriate selection of ALD cycles determines the thickness of the layer. As we have shown in our previous research, hafnium (IV) oxide coatings tend to crystallize during deposition of the thicker layers and at increased process temperature [24]. Considering the specific growth rate ( $1.9\text{\AA}/\text{cycle}$ ) for the selected process at the temperature of  $90\text{ }^\circ\text{C}$ , here we performed the 100 nm deposition process, which was confirmed by measuring film thickness using reflectometry. The characteristic feature of ALD is thickness adjustment of the films by determining the number of full ALD cycles in relation to the growth rate under given thermodynamic conditions [9].

Strong adhesion of the amorphous layer with the substrate will guarantee its strength in conditions of mechanical load to which hard tissue implants are subjected. Among the high material requirements for implant coatings a lack of cracks, both on the surface and on the interface of the materials, should be considered. Damage on the interfaces weakens the mechanical properties of the coating and, propagating towards the surface, can cause separation of micro fragments of the layer, which will lead to destruction of the coating during use of the implant.

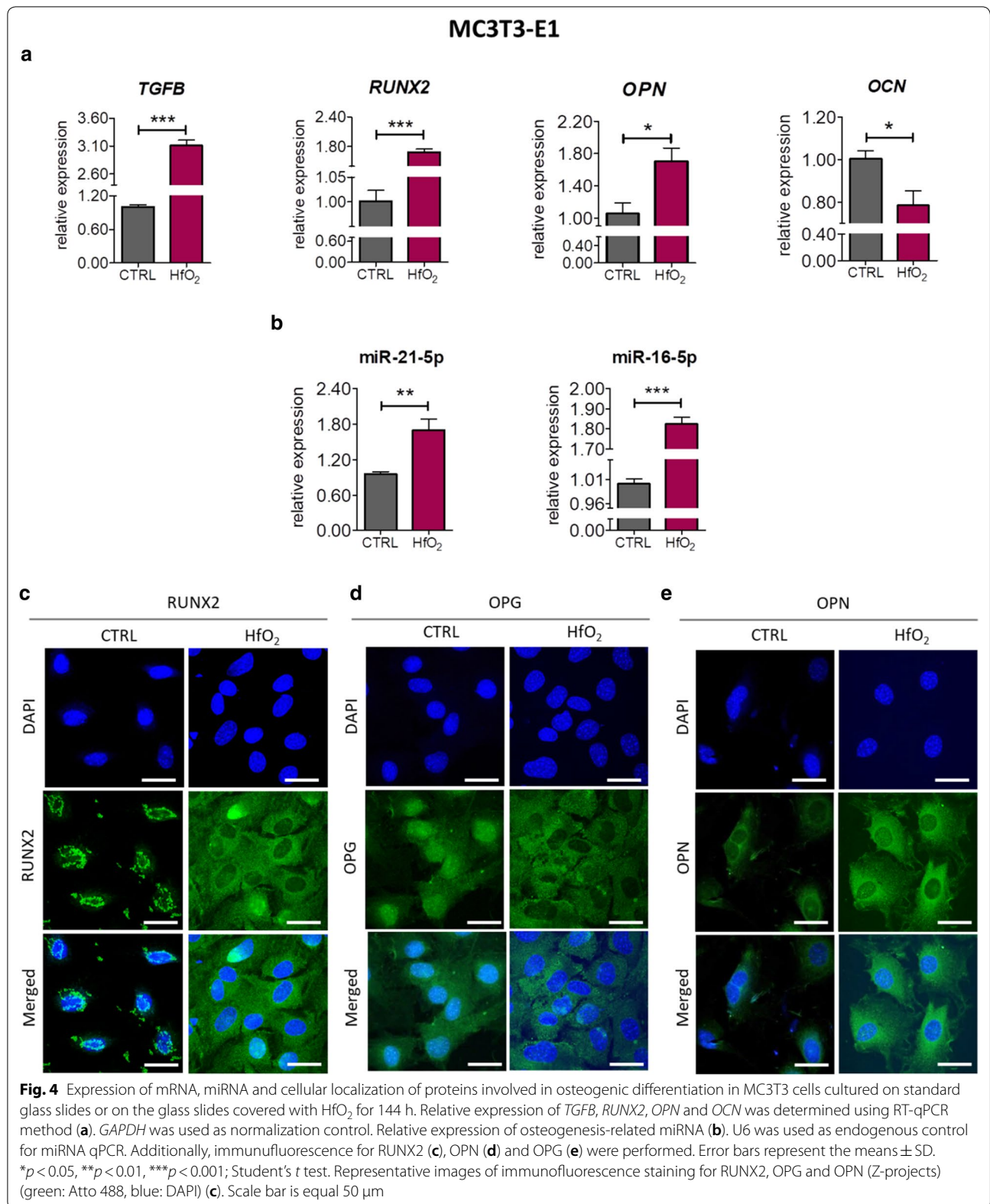
XPS analysis of the chemical composition showed an excess of oxygen on the surface. About 25% of the oxygen was associated with surface pollution, clearly more than stoichiometric value for  $\text{HfO}_2$ . This indicate on hydrophilic nature of the substrate, which significantly improves the biological properties of the surface [25]. Ultimately, the ratio of oxygen to hafnium is 1.86, which is close to the ideal stoichiometry. The lower ratio of O to Hf during sputtering results from the fact that 2 keV Ar ions preferentially remove O from the surface. Nevertheless, XPS depth profiling confirmed the homogeneity of the formed film.

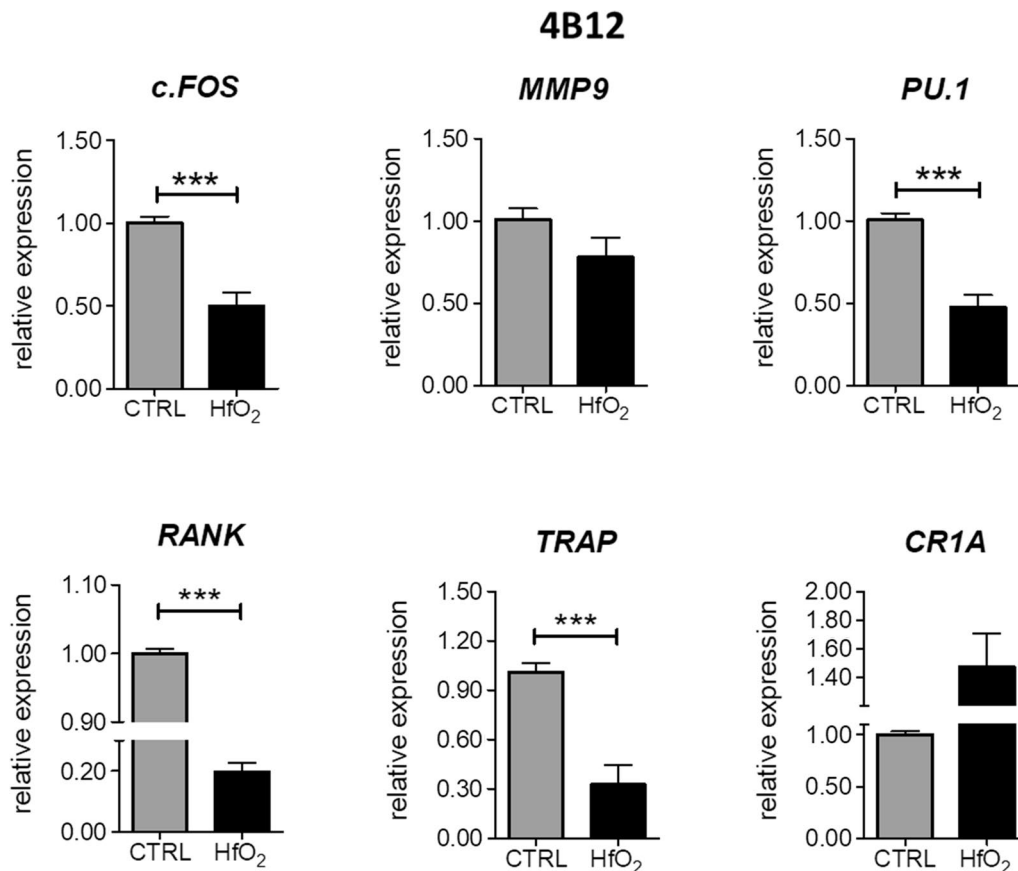
Although the  $\text{HfO}_2$  layer is a widely studied material by many research groups [26, 27], its application in regenerative medicine is a new approach. In our previous research we have showed that  $\text{HfO}_2$  films obtained by ALD technology are characterized by high cytocompatibility and antimicrobial properties [28, 29]. In the present study, we investigated whether  $\text{HfO}_2$  layers are able to modulate metabolic activity of both osteoblasts

and osteoclasts and thus may be utilized in the fabrication of implants used in the fixation of osteoporotic bone fractures. Since now, limited number of studies regarding biological properties of hafnium oxide have been performed and none of them related to bone remodeling. A study performed by Fohlerova and Mozalev revealed that hafnium-oxide thin films on substrates via self-organized electrochemical anodization were characterized by good cytocompatibility (tested with MG-63 osteoblast-like cells) and anti-microbial properties (tested with Gram-negative *E. coli* bacteria) [30]. It was also shown that hafnium oxide nanoparticles can induce DNA damage and apoptosis in human colorectal cancer cells [31]. Cytotoxicity of hafnium oxide nanoparticles was also tested by Field et al. [32], who revealed that these particles are relatively non-toxic in human HaCaT skin cells. Here we observed, that  $\text{HfO}_2$  promotes pre-osteoblasts, while inhibits pre-osteoclasts viability. What is more important,  $\text{HfO}_2$  protects pre-osteoblast against apoptosis through enhanced expression of BCL-2 transcript and at the same time induces pre-osteoclasts apoptosis. Obtained data delivers interesting scientific findings which can be utilized as a strategy in the course of osteoporotic bone regeneration via silencing osteoclasts overactivity [33]. Interestingly, we observed, that  $\text{HfO}_2$  protects pre-osteoblasts against apoptosis not only by activation particular osteogenesis related genes but also by induction of miR-17-5p and miR-7a-5p expression-crucial regulators of osteoblasts proliferation activity as well as inhibition of apoptosis [34, 35]. For that reason, we speculate that the application of  $\text{HfO}_2$  on the surface of implantable metallic materials might become an effective anti-apoptotic strategy for osteoblast protection and at the same time enhance regenerative potential.

Restoring the balance between bone formation and bone resorption processes during OP is thought to be the most effective approach to prevent fractures and improve tissue homeostasis [36]. In the present study, we have found, that  $\text{HfO}_2$  promotes expression of runt-related transcription factor 2 (RUNX2), transforming growth factor  $\beta$  encoded by TGFB and osteopontin (OPN) in osteoblasts on the both mRNA as well as protein level. In numerous studies, RUNX2 has been shown to participate in osteoblast growth and differentiation by triggering the expression of subsequent biomarkers of mature osteoblasts [36–39]. Moreover, RUNX2 is up-regulated in early stages of osteoblast differentiation, then down-regulated in mature osteoblasts [40].

Obtained results indicated on beneficial effect of  $\text{HfO}_2$  in the context of the osteogenesis initiation. Moreover, we have demonstrated, that pre-osteoblasts exposed for  $\text{HfO}_2$  are characterized by enhanced expression of miR-21-5p and miR-16-5p- two critical transcripts involved





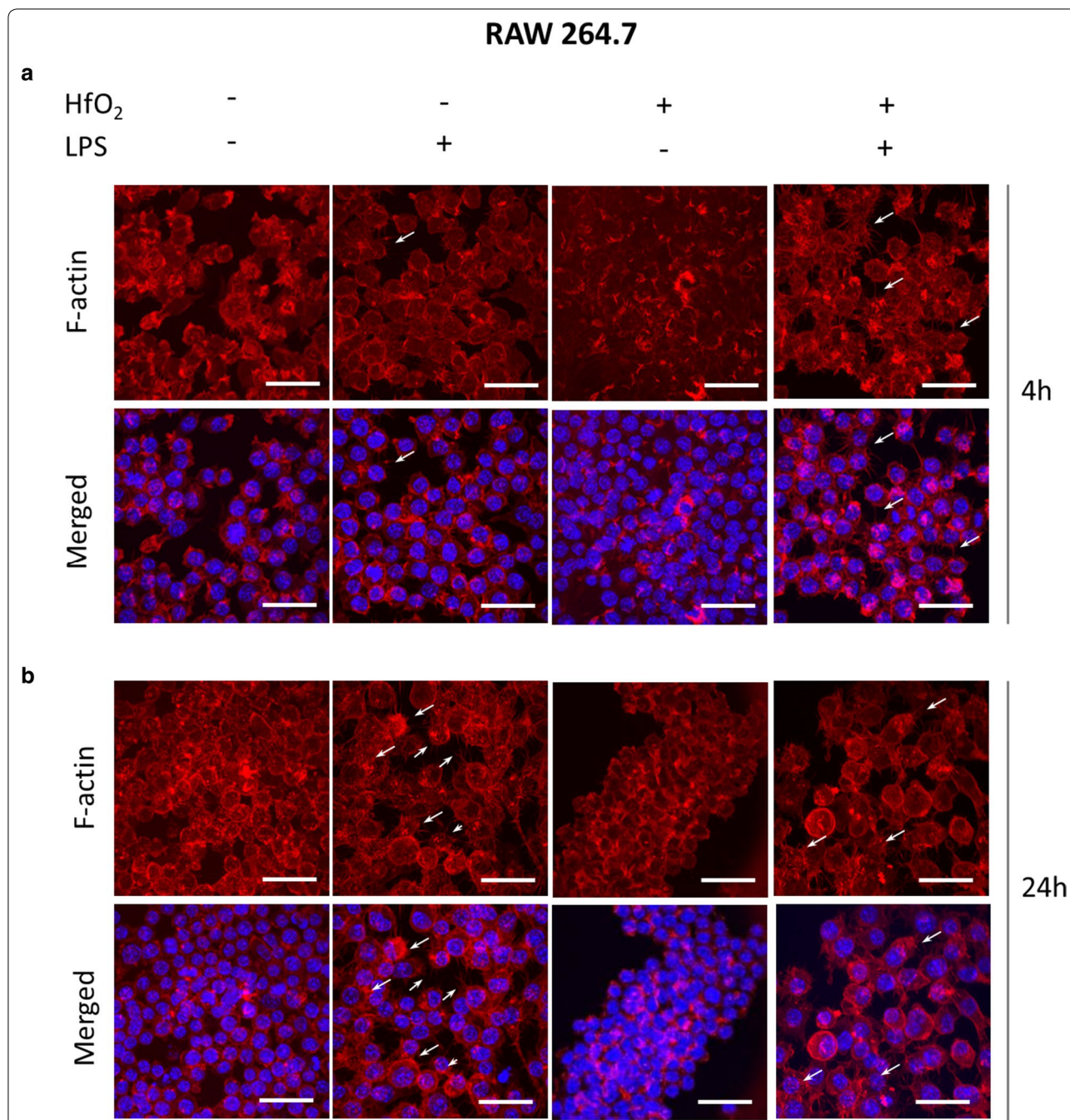
**Fig. 5** Expression of osteoclast-specific genes in 4B12 cells after 144 h of culture in normal condition or in the presence of HfO<sub>2</sub>. mRNA level of *c.FOS*, *MMP9*, *PU.1*, *RANK*, *TRAP* and *CR1A* was determined using RT-qPCR method. Gene expression data was normalized to the expression of *GAPDH*. Error bars represent the means  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; Student's *t* test

in osteogenesis and bone mineralization. Interestingly, when compared to control cells, HfO<sub>2</sub> did not promote osteocalcin expression, which mediates biomineralization during osteogenic maturation [41]. For that reason, we speculate that HfO<sub>2</sub> might serve as a bioactive agent able to modulate and trigger osteoblastogenesis. On the other hand, we have shown that besides activation of osteogenesis, HfO<sub>2</sub> inhibits osteoclastogenesis. We have shown, that HfO<sub>2</sub> reduce the expression of key factors regulating osteoclasts differentiation- *c.FOS*, *MMP9*, *PU.1*, *RANK* and *TRAP*. Furthermore, It was also shown, that certain proinflammatory cytokines could induce osteoclastogenesis and can target osteoclasts via directly or via *RANK/OPG* axis [42]. Numerous studies indicated on systemic and local inflammation as an events negatively affecting bone remodeling supporting the theory regarding inflammation-related OP pathogenesis [43]. In the present study we have shown, that HfO<sub>2</sub> exerts immunomodulatory effect, since it increased expression of anti-inflammatory *IL10* in LPS-treated macrophages propagated onto HfO<sub>2</sub>. Moreover, we noted significantly

reduced expression of *IL-6* which is common cytokine characteristic for osteoporosis [44]. Obtained results strongly suggests, that HfO<sub>2</sub> exerts anti-inflammatory effect, which might become an important factor, when its application in future implantology is considered.

## Conclusions

Recently, there is an urgent need to develop a smart, bioactive materials for OP bone regeneration that would be able to modulate osteoblasts-osteoclasts axis in order to improve fracture healing. In the present study, using ADL technology we obtained homogeneous, amorphous layer of HfO<sub>2</sub> which exerted anti-apoptotic and pro-osteogenic effects in vitro. We have shown, that HfO<sub>2</sub> promotes osteogenic differentiation through the activation of early markers of osteogenesis while inhibits viability and maturation of osteoclasts. Furthermore, HfO<sub>2</sub> was characterized by immunomodulatory effects which shed a promising light for its future application as an active layer for covering metallic materials.



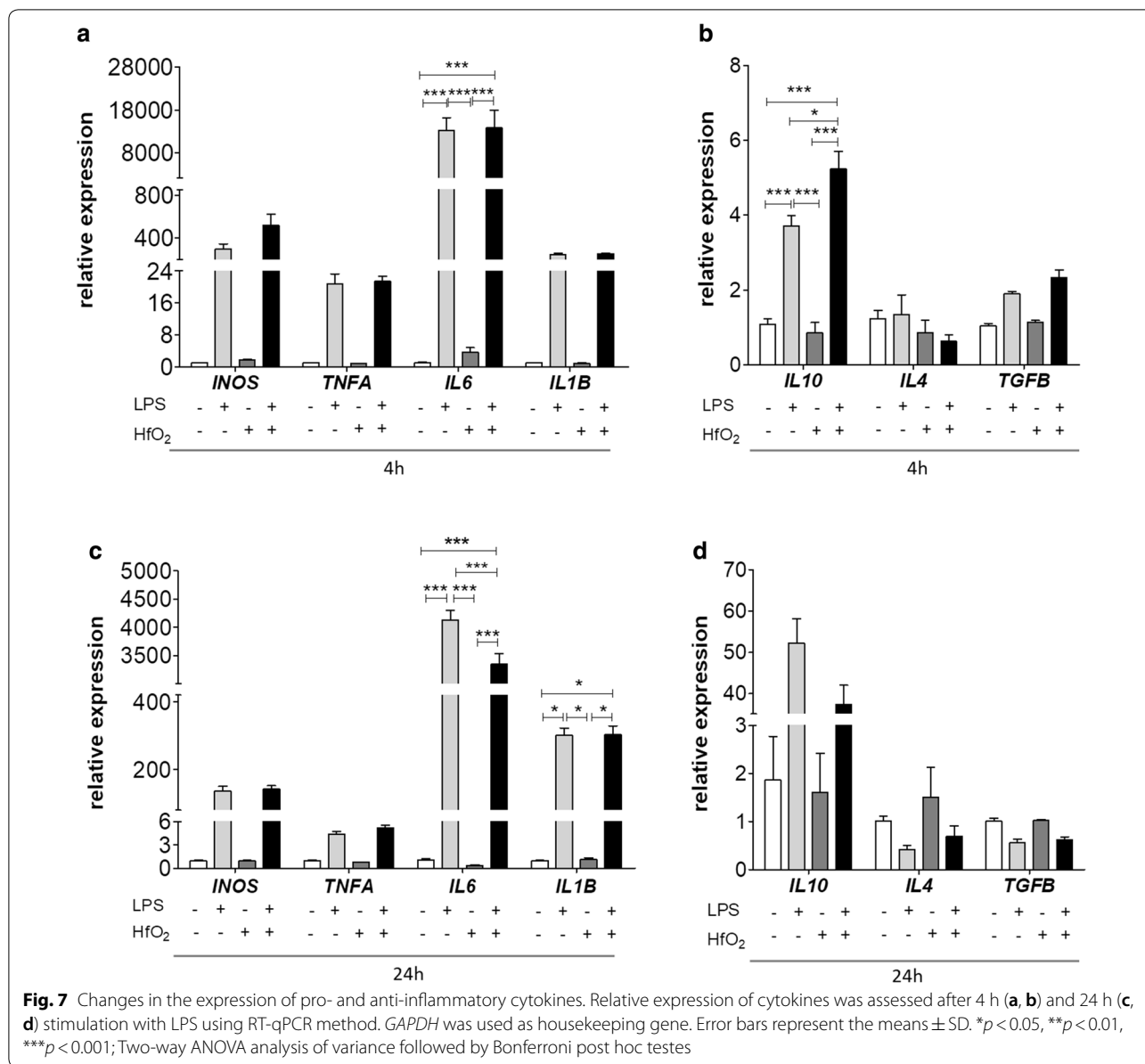
**Fig. 6** Representative images of staining for F-actin structures in RAW 264.7 after 4 h (a) and 24 h (b) incubation with LPS. F-actin was stained with Phalloidin 590, while cell nuclei were counterstained with DAPI (blue). White arrows indicated morphological alternations of macrophages after LPS treatment. Scale bar is equal 50 μm

**Methods**

**Substrate preparation**

The HfO<sub>2</sub> layers were deposited on 10 mm x10 mm silicon plates for physicochemical evaluations and on glass cover slips with a diameter of 12 mm for biological evaluation. Superficial contaminants may affect the adherence

of the ALD films to the substrate and negatively affect the homogeneity of the layer. Thus, we have prepared the substrates by three washing cycles before the deposition process. The first bath was carried out in isopropanol, the next two in deionized water. All of them were performed



in the ultrasound cleaner with bath in 37 °C. Afterwards all substrates were dried in nitrogen of 5 N purity.

**ALD technology**

A Savannah-100 Cambridge NanoTech ALD reactor was used to perform the deposition of HfO<sub>2</sub> films. We selected Tetrakis(dimethylamido)hafnium (TDMA-Hf, Hf[(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N]<sub>4</sub>, CAS number 19782-68-4) as the metal precursor and deionized water as the oxygen precursor. Forming of HfO<sub>2</sub> occurs through a double exchange reaction [45]:



Precursors cycles were introduced sequentially into the growth chamber separated by purge phase of a growth chamber with nitrogen (6 N). The pulse times were equal 0.2 s and 0.04 s for hafnium precursor and for oxidant precursor respectively, with purge times equal 8 s after hafnium precursor doses and 22 s after oxygen precursor doses. The growth process of HfO<sub>2</sub> consisted of 519 ALD cycles. The creation of films was carried out in the temperature 90 °C and vacuum below 66 Pa. At such process parameters the deposition rate was equal to 1.9 Å per one ALD cycle.

### Tests equipment for physicochemical analysis

To determine the thickness of the layer a NanoCalc 2000-UV/VIS (Micropack GmbH) system with specific software was used. The layer thickness was measured on a silicon substrate. The reflection spectrum from the silicon substrate without the layer was used as a reference measurement.

The crystallinity of the coatings was checked by XRD investigations. A Panalytical X'Pert Pro MRD diffractometer was used, equipped with an X-ray tube generating radiation at a wavelength of 1.54056 Å, a hybrid two-bounce Ge (220) monochromator, and a Pixcel detector.

A Scienta R4000 hemispherical analyzer (with pass energy 200 eV) and non-monochromatic Al K $\alpha$  emission line with excitation energy equal to 1486.6 eV, was used for XPS measurements. At those experimental setting, the measured full width at half maximum of the Au 4f<sub>7/2</sub> line was 1.1 eV. The carbon (C) 1 s line was bonded with the energy 285 eV and used to calibrate the energy scale. The neutralization gun was applied to avoid meaningful sample charging. A notable amount of carbon was found in as received sample. The depth profiling with 2 kV Ar ion gun was performed to test if the carbon was immanent at the surface only and to check the film homogeneity. The spectra were analysed using CASA program (Casa Software Ltd version 2.3.17).

Surface morphology was examined using the AFM Dimension Icon from Bruker. The equipment was operated in the PeakForce Tapping mode using silicon nitride SCANASYST-AIR probe with tip radius of 2 nm. The applied mode of operation allows imaging of the surface based directly on interaction forces between the probe and the sample. In addition, the ScanAsyst algorithm was used for the measurements. It allows continuous monitoring the image quality and automatic optimization of the selected parameters (ScanAsyst Auto Gain and ScanAsyst Auto Setpoint) according to sample condition during scanning. Measurements were performed in air under ambient conditions with a scan rate of 0.70 Hz. Each area was scanned with 512 × 512 pixels resolution. AFM data analysis was made with NanoScope Analysis software.

### In vitro cell culture

Murine MC3T3-E1 pre-osteoblasts were cultured in Minimum Essential Media Alpha without ascorbic acid (MEM- $\alpha$ , Gibco™ Thermo Fisher Scientific, MA, USA) supplemented with 10% feta bovine serum (FBS, Sigma Aldrich, Munich, Germany). The murine osteoclast precursor cell line 4B12 was kindly provided by Shigeru Amano from Department of Oral Biology and Tissue Engineering, Meikai University School of Dentistry [46]. The 4B12 cells were propagated in complete growth

medium consisting of  $\alpha$ -MEM (Sigma Aldrich, Munich, Germany) supplemented with 30% of calvaria-derived stromal cell conditioned medium (CSCM) and 10% FBS. Murine macrophage cell line RAW 264.7 was cultured in complete growth medium consisted of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma Aldrich, Munich, Germany) with 500 mg/L glucose supplemented with 10% FBS. Cells were cultivated in the CO<sub>2</sub> incubator at constant conditions (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, and 95% humidity). Medium was refreshed every 2–3 days. The cells were passaged when population reached 80% confluence using recombinant cell-dissociation enzyme StableCell Trypsin (Sigma Aldrich, Munich, Germany) or by gentle scraping and pipetting (4B12).

### Cell proliferation assay

Cell proliferation rate was estimated using a resazurin-based assay kit (TOX8) (Sigma Aldrich, Munich, Germany) in accordance to manufacturer's protocol [47]. For the assay MC3T3-E1 and 4B12 cells were seeded in 24-well plates on regular glass slides (control group) or on glass slides coated with HfO<sub>2</sub> at a density of 2·10<sup>4</sup> cell/well. The test was performed at 48, 72 and 144 h of experiment. Briefly, culture media was replaced with fresh media supplemented with 10% v/v resazurin dye, and incubation was carried out for 2 h at 37 °C in the CO<sub>2</sub> cell culture incubator (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Then, supernatants were transferred to 96-well plate in the volume of 100  $\mu$ l per well and measured spectrophotometrically at a wavelength of 600 nm and 690 nm reference length (Epoch, Biotek, Germany) Population doubling time (PDT) was calculated using an algorithm available on-line [48].

### Macrophage activation

RAW 264.7 cells were seeded in 24-well plate on regular glass slides (control) or on glass slides coated with HfO<sub>2</sub> a density of 3·10<sup>5</sup> cells/well. After 24 h lipopolysaccharide (LPS, 1  $\mu$ g/mL, Sigma Aldrich, Munich, Germany) was added to culture media for another 4 and 24 h. Macrophage activation was analyzed using RT-qPCR technique and confocal microscopy.

### Confocal microscopy

Cellular distribution and expression of runt-related transcription factor 2 (RUNX2), osteoprotegerin (OPG), and osteopontin (OPN) in MC3T3-E1 cells were determined using immunofluorescence [49]. Cells were cultivated for 6 days on glass slides with and without HfO<sub>2</sub> layer (control group). First, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 30 min at room temperature, washed three times with Phosphate Buffered Saline (PBS, Sigma Aldrich, Munich, Germany), and then incubated with

**Table 1 Sequence of primers used for mRNA expression analysis using RT-qPCR method**

| Gene abbreviation | Gene full name                           | Sequence of primer (5' → 3')                               | Amplicon length | Accession No.  |
|-------------------|--|--|-----------------|----------------|
| <i>CASP9</i>      | Caspase-9                                | F: CCGGTGGACATTGGTTCTGG<br>R: GCCATCTCCATCAAAGCCGT         | 278             | NM_001355176.1 |
| <i>P53</i>        | p53 tumor suppressor                     | F: AGTCACAGCACATGACGGAGG<br>R: GGAGTCTTCCAGTGTGATGATGG     | 287             | XM_030245924.1 |
| <i>BCI2</i>       | B-cell lymphoma 2                        | F: GGATCCAGGATAACGGAGGC<br>R: ATGCACCCAGAGTGATGCAG         | 141             | NM_009741.5    |
| <i>BAX</i>        | Bcl-2-like protein 4                     | F: AGGACGCATCCACCAAGAAGC<br>R: GGTTCGATCAGCTCGGGCA         | 251             | XM_011250780.3 |
| <i>TGFB</i>       | Transforming growth factor beta 1        | F: GGAGAGCCCTGGATACCAAC<br>R: CAACCCAGGTCCTTCTAAA          | 94              | NM_011577.2    |
| <i>RUNX2</i>      | Runt-related transcription factor 2      | F: TCCGAAATGCCTCTGCTGTT<br>R: GCCACTTGGGGAGGATTTGT         | 130             | NM_001271630.1 |
| <i>OPN</i>        | Osteopontin                              | F: AGACCATGCAGAGAGCGAG<br>R: GCCCTTCCGTTGTTGTCCT           | 340             | NM_001204203.1 |
| <i>OCN</i>        | Osteocalcin                              | F: GGTGCAGACCTAGCAGACACCA<br>R: CGCTGGGCTTGGCATCTGTAA      | 100             | NM_001032298.3 |
| <i>c.FOS</i>      | c-fos proto-oncogene                     | F: CCAGTCAAGAGCATCAGCAA<br>R: TAAGTAGTGCAGCCCGGAGT         | 248             | NM_010234.3    |
| <i>MMP9</i>       | Matrix metalloproteinase 9               | F: TTGCCCTACTGGAAGGTATTAT<br>R: GAGAATCTCTGAGCAATCCTTGA    | 172             | XM_006498861.3 |
| <i>PU.1</i>       | Transcription factor PU.1                | F: GAGAAGCTGATGGCTTGAG<br>R: TTGTGCTTGGACGAGAAGCTG         | 175             | XM_017316733.2 |
| <i>RANK</i>       | Receptor activator of nuclear factor κ B | F: TTAAGCCAGTGCTTACGGG<br>R: ACGTAGACCACGATGATGTCGC        | 473             | NM_009399.3    |
| <i>TRAP</i>       | Tartrate-resistant acid phosphatase      | F: GTCTCTGGGGGACAATTTCTACT<br>R: GTTTGTACGTGGAATTTGAAGC    | 241             | XM_006509945.3 |
| <i>CR1A</i>       | Calcitonin receptor isoform 1a           | F: TGCGGCGGATCCTATAA<br>R: AGCCAGCAGTTGCTGTTGTA            | 238             | NM_001355192.1 |
| <i>INOS</i>       | Nitric oxide synthase                    | F: GACAAGCTGCATGTGACATC<br>R: GCTGGTAGGTTCTGTTGTT          | 325             | NM_001313922.1 |
| <i>TNFA</i>       | Tumor necrosis factor α                  | F: ACAGAAAGCATGATCCGCGA<br>R: CTTGGTGGTTGCTACGACG          | 295             | NM_013693.3    |
| <i>IL6</i>        | Interleukin 6                            | F: GAGGATACCACTCCCAACAGACC<br>R: AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA | 141             | NM_001314054.1 |
| <i>IL1B</i>       | Interleukin 1 beta                       | F: TGCCACCTTTTGACAGTGATG<br>R: TGATGTGCTGCTGCGAGATT        | 138             | NM_008361.4    |
| <i>L10</i>        | Interleukin 10                           | F: ATTTGAATTCCTGGGTGAGAAG<br>R: CACAGGGGAGAAATCGATGACA     | 75              | NM_010548.2    |
| <i>IL4</i>        | Interleukin 4                            | F: GAATGTACCAGGAGCCATAT<br>R: CTCAGTACTACGAGTAATCCA        | 385             | NM_021283.2    |
| <i>GAPDH</i>      | Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase | F: TGCACCACCAACTGCTTAG<br>R: GGATGCAGGGATGATGTTTC          | 177             | XM_017321385.2 |

0.2% Tween 20 (Sigma Aldrich, Munich, Germany) solution in PBS for another 15 min. Then, samples were blocked with 5% goat serum (Sigma Aldrich, Munich, Germany) for 1 h and incubated with primary antibodies at 4 °C overnight. The following antibodies were used:

OPN (dilution 1:1000 in PBS, ab8448, Abcam, Cambridge, UK), OPG (dilution 1:50 in PBS, sc-390518, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), RUNX2 (dilution 1:50 in PBS, sc-390351, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). After the primary antibody incubation,

cells were rinsed three times with PBS and incubated with secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor 488 (room temperature, 1 h). Finally, cells were fixed on slides and nuclei were counterstained using mounting medium with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI, Thermo Fisher Scientific, Warsaw, Poland). Cells were observed and imaged using confocal microscope (LEICA TSC SPE). Photos were analyzed with Image J software.

Changes in RAW 264.7 morphology after LPS-induced activation were estimated using F-actin staining. Prior staining, cells were fixed with 4% PFA after 4 and 24 h incubation with LPS and permeabilized using 0.2% Tween 20 as described above. Phalloidin Atto 590 was diluted in PBS (1:800, Sigma Aldrich, Munich, Germany) and added to cells for 40 min. After three washing steps cells were mounted using ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI, observed and imaged using confocal microscope (LEICA TSC SPE).

#### Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total RNA was isolated from MC3T3-E1 and 4B12 after 6 days of culture in normal condition or in the presence of HfO<sub>2</sub>, whereas total RNA extraction from RAW 264.7 was performed after 4 and 24 h of cultivation in normal condition or in the presence of HfO<sub>2</sub> and/or LPS. RNA was isolated using phenol–chloroform method, as previously described by Chomczynski and Sacchi [50]. RNA quality and quantity were estimated spectrophotometrically at 260 and 280 nm wavelengths (Epoch, Biotek, Germany). *thic*.

Nawrocka et al. [51] for gene expression analysis, total RNA (150 ng per one reaction) was treated with DNase I using PrecisionDNase kit (BLIRT S.A, Gdansk, Poland) followed by cDNA synthesis using RevertAidFirst Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). cDNA was subjected to real-time PCR with 5 µl of SensiFast SYBR & Fluorescein Kit (Bioline, UK), 1 µl of cDNA and 500 nM of each specific primer (see Table 1) in the total volume of 10 µl. All qPCR reactions were performed using CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Obtained data was normalized to the mean of GAPDH used as the housekeeping gene. The average fold change in the gene expression was analyzed using the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method described by Livak and Schmittgen [52]. Furthermore, the expression ratio of *BCI2/BAX* was determined by dividing the ΔΔCT of those genes.

For miRNA expression analysis, 500 ng of total cellular RNA was served for digestion of gDNA, as described above. RNA was polyadenylated and reverse transcribed

**Table 2** Sequence of primers used for miRNA expression analysis using qPCR method

| miRNA     | Sequence of primer (5' → 3') | Accession No. |
|-----------|------------------------------|---------------|
| miR-7a-5p | TGGAAGACTAGTGATTTTGTGT       | MIMAT0000677  |
| miR-17-5p | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG      | MIMAT0000070  |
| miR-21-5p | TAGCTTATCAGACTGATGTTGA       | MIMAT0000530  |
| miR-16-5p | TAGCAGCACGTAATATTGGCG        | MIMAT0000069  |

using the Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (Takara Bio, Japan) according to the manufacturer's protocol. Each qPCR reaction was performed in a total reaction mixture volume of 25 µl. Expression data were normalized using the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method after normalization to the U6 snRNA used as a housekeeping gene. Sequence of the primers are listed in the Table 2.

#### Statistical analysis

All experiments included at least three technical repetitions. Comparison between two groups were analyzed using two-tailed Student's *t* test. Differences among more than two groups were analyzed using two-way ANOVA analysis of variance followed by Bonferroni post hoc testes. Values of *p* < 0.05 were considered statistically significant. All data are means ± SD.

#### Acknowledgements

4B12 cell line was kindly provided by Dr Shigeru Amano- Division of Microbiology and Immunology, Department of Oral Biology and Tissue Engineering, Meikai University School of Dentistry, Keyakidai, Sakado City, Saitama 350-0283, Japan.

#### Authors' contributions

AS, MG, KKG and KM designed the research. AS, MA, KLJ, MO, PK, MG performed the experiments and collected and analyzed the data. AS, MA, AF, KLJ, MO, PK and validated the results. AS, MG, KM, MG wrote the manuscript text and prepared the figures. KM, MG, KKG and AS have read critically and edited the manuscript. KM acquired the funding. All authors reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Funding

Research was founded by National Science Centre Poland Grant no: 2017/26/M/NZ5/01184 (Novel, two-stage delivery, nanohydroxyapatite (nHAp)—iron oxide (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)—miRNA scaf-fold with controlled by static magnetic field payload release for osteo-porotic bone fracture regeneration).

#### Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

#### Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.



**Author details**

<sup>1</sup> Institute of Physics, Polish Academy of Sciences, 02668 Warsaw, Poland. <sup>2</sup> Department of Experimental Biology, Faculty of Biology and Animal Science, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Norwida 27B, 50-375 Wrocław, Poland. <sup>3</sup> Cardinal Stefan Wyszyński University, Collegium Medicum, 01938 Warsaw, Poland. <sup>4</sup> International Institute of Translational Medicine, Jesionowa 11, Malin, Wisznia Mała, 55-114 Wrocław, Poland.

Received: 6 May 2020 Accepted: 9 September 2020

Published online: 15 September 2020

**References**

- Miller RR, Roubenoff R. emerging interventions for elderly patients—the promise of regenerative medicine. *Clin Pharmacol Ther.* 2019;105:53–60.
- Akkawi I, Zmerly H. Osteoporosis: Current Concepts. *Joints.* 2018;6:122–7.
- Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, et al. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos.* 2013;8:136.
- Prakasam M, Locs J, Salma-Ancane K, Loca D, Largeteau A, Berzina-Cimdina L. Biodegradable materials and metallic implants—a review. *J Funct Biomater.* 2017; (cited 2020 May 3); 8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5748551/>.
- Prasad K, Bazaka O, Chua M, Rochford M, Fedrick L, Spoor J, et al. Metallic biomaterials: current challenges and opportunities. *Materials (Basel).* 2017; (cited 2020 May 3); 10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5578250/>.
- Eliaz N. Corrosion of Metallic biomaterials: a review. *Materials (Basel).* 2019; (cited 2020 May 3). 12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6384782/>.
- Oviroh PO, Akbarzadeh R, Pan D, Coetzee RAM, Jen T-C. New development of atomic layer deposition: processes, methods and applications. *Sci Technol Adv Mater.* 2019;20:465–96.
- Im H, Wittenberg NJ, Lindquist NC, Oh S-H. Atomic layer deposition (ALD): a versatile technique for plasmonics and nanobiotechnology. *J Mater Res.* 2012;27:663–71.
- Suntola T. Atomic Layer Epitaxy. *Espo: Microchemistry Ltd;* 1989.
- Knez M, Nielsch K, Niinistö L. Synthesis and surface engineering of complex nanostructures by atomic layer deposition. *Advanced Materials.* 2007. p. 3425–38.
- Miikkulainen V, Leskelä M, Ritala M, Puurunen RL. Crystallinity of inorganic films grown by atomic layer deposition: overview and general trends. *J Appl Phys.* 2013;113:021301.
- Knez M. Application of ALD to biomaterials and biocompatible coatings. Atomic layer deposition of nanostructured materials. *Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA;* 2012. p. 301–25.
- Graniel O, Weber M, Balme S, Miele P, Bechelany M. Biosensors and bioelectronics atomic layer deposition for biosensing applications. *Biosens Bioelectron.* 2018;122:147–59.
- Seweryn A, Pielok A, Lawniczak-Jablonska K, Pietruszka R, Marcinkowska K, Sikora M, et al. Zirconium oxide thin films obtained by atomic layer deposition technology abolish the anti-osteogenic effect resulting from miR-21 inhibition in the pre-osteoblastic MC3T3 cell line. *Int J Nanomed.* 2020;15:1595–610.
- Marycz K, Sobierajska P, Roecken M, Kornicka-Garbowska K, Kępska M, Idczak R, et al. Iron oxides nanoparticles (IOs) exposed to magnetic field promote expression of osteogenic markers in osteoblasts through integrin alpha-3 (INTa-3) activation, inhibits osteoclasts activity and exerts anti-inflammatory action. *J Nanobiotechnol.* 2020;18:33.
- Marycz K, Grzesiak J, Wrzeszcz K, Golonka P. Adipose stem cell combined with plasma-based implant bone tissue differentiation in vitro and in a horse with a phalanx digitalis distalis fracture: a case report. *Veterinarni Medicina (Czech Republic) [Internet].* 2012.
- Rudenja S, Minko A, Buchanan DA. Low-temperature deposition of stoichiometric HfO<sub>2</sub> on silicon: analysis and quantification of the HfO<sub>2</sub>/Si interface from electrical and XPS measurements. *Appl Surf Sci.* 2010;257:17–21.
- Crist BV. Handbooks of monochromatic XPS Spectra. XPS International LLC: Handbooks of monochromatic XPS spectra; 2005.
- Sokolov AA, Filatova EO, Afanas' Ev VV, Taracheva EY, Brzhezinskaya MM, Ovchinnikov AA. Interface analysis of HfO<sub>2</sub> films on (1 0 0) Si using x-ray photoelectron spectroscopy. *J Phys D Appl Phys.* 2008;42:035308.
- Wang J-X, Jia X-J, Liu Y, Dong J-H, Ren X-M, Xu O, et al. Silencing of miR-17-5p suppresses cell proliferation and promotes cell apoptosis by directly targeting PIK3R1 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Cell Int.* 2020;20:14.
- Li S, Lv X, Zhai K, Xu R, Zhang Y, Zhao S, et al. MicroRNA-7 inhibits neuronal apoptosis in a cellular Parkinson's disease model by targeting Bax and Sirt2. *Am J Transl Res.* 2016;8:993–1004.
- Smieszek A, Marcinkowska K, Pielok A, Sikora M, Valihrach L, Marycz K. The Role of miR-21 in osteoblasts-osteoclasts coupling in vitro. *Cells.* 2020;9:479.
- Mencía Castaño I, Curtin CM, Duffy GP, O'Brien FJ. Harnessing an inhibitory role of miR-16 in osteogenesis by human mesenchymal stem cells for advanced scaffold-based bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2019;25:24–33.
- Gieraltowska S, Wachnicki L, Witkowski BS, Mroczynski R, Dłuzewski P, Godlewski M. Characterization of dielectric layers grown at low temperature by atomic layer deposition. *Thin Solid Films.* 2015;577:97–102.
- Bang SM, Moon HJ, Kwon YD, Yoo JY, Pae A, Kwon IK. Osteoblastic and osteoclastic differentiation on SLA and hydrophilic modified SLA titanium surfaces. *Clin Oral Implant Res.* 2014;25:831–7.
- Zhang X-Y, Hsu C-H, Lien S-Y, Wu W-Y, Ou S-L, Chen S-Y, et al. Temperature-dependent HfO<sub>2</sub>/Si interface structural evolution and its mechanism. *Nanoscale Res Lett.* 2019; (cited 2020 May 3). 14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6405792/>.
- Xu J, Wen M, Zhao X, Liu L, Song X, Lai P-T, et al. Effects of HfO<sub>2</sub> encapsulation on electrical performances of few-layered MoS<sub>2</sub> transistor with ALD HfO<sub>2</sub> as back-gate dielectric. *Nanotechnology.* 2018;29:345201.
- Liu L, Bhatia R, Webster TJ. Atomic layer deposition of nano-TiO<sub>2</sub> thin films with enhanced biocompatibility and antimicrobial activity for orthopedic implants. *Int J Nanomed.* 2017;12:8711–23.
- Godlewski M, Gieraltowska S, Wachnicki L, Pietruszka R, Witkowski BS, Słowska A, et al. High-k oxides by atomic layer deposition—applications in biology and medicine. *J Vacuum Sci Technol A.* 2017;35:021508.
- Fohlerova Z, Mozalev A. Anodic formation and biomedical properties of hafnium-oxide nanofilms. *J Mater Chem B R Soc Chem.* 2019;7:2300–10.
- Marill J, Mohamed Anesary N, Paris S. DNA damage enhancement by radiotherapy-activated hafnium oxide nanoparticles improves cGAS-STING pathway activation in human colorectal cancer cells. *Radiother Oncol.* 2019;141:262–6.
- Field JA, Luna-Velasco A, Boitano SA, Shadman F, Ratner BD, Barnes C, et al. Cytotoxicity and physicochemical properties of hafnium oxide nanoparticles. *Chemosphere.* 2011;84:1401–7.
- Charles JF, Aliprantis AO. Osteoclasts: more than 'bone eaters'. *Trends Mol Med.* 2014;20:449–59.
- Wang X, Li Z, Bai J, Song W, Zhang F. miR-17-5p regulates the proliferation and apoptosis of human trabecular meshwork cells by targeting phosphatase and tensin homolog. *Molecular Medicine Reports.* Spandidos Publications. 2019;19:3132–8.
- Jia J, Feng X, Xu W, Yang S, Zhang Q, Liu X, et al. MiR-17-5p modulates osteoblastic differentiation and cell proliferation by targeting SMAD7 in non-traumatic osteonecrosis. *Exp Mol Med.* 2014;46:e107.
- Guido G, Scaglione M, Fabbri L, Ceglie MJ. The "osteoporosis disease". *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2009;6:114–6.
- Ling M, Huang P, Islam S, Heruth DP, Li X, Zhang LQ, et al. Epigenetic regulation of Runx2 transcription and osteoblast differentiation by nicotineamide phosphoribosyltransferase. *Cell Biosci.* 2017;7:27.
- Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Adv Exp Med Biol.* 2010;658:43–9.
- Kawane T, Qin X, Jiang Q, Miyazaki T, Komori H, Yoshida CA, et al. Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3. *Sci Rep.* 2018;8:1–17.
- Komori T. Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. *Int J Mol Sci.* 2019 (cited 2020 Apr 1);20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6480215/>.

41. Moser SC, van der Eerden BCJ. Osteocalcin—a versatile bone-derived hormone. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 (cited 2020 May 3);9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6335246/>.
42. Zupan J, Jeras M, Marc J. Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. *Biochem Med (Zagreb)*. 2013;23:43–63.
43. Ginaldi L, Di Benedetto MC, De Martinis M. Osteoporosis, inflammation and ageing. *Immun Ageing*. 2005;2:14.
44. Edwards CJ, Williams E. The role of interleukin-6 in rheumatoid arthritis-associated osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2010;21:1287–93.
45. Leskelä M, Ritala M. Atomic layer deposition (ALD): from precursors to thin film structures. *Thin Solid Films*. 2002;409:138–46.
46. Amano S, Chang Y-T, Fukui Y. ERK5 activation is essential for osteoclast differentiation. *PLoS ONE*. 2015;10:e0125054.
47. Starosta R, Brzuszkiewicz A, Bykowska A, Komarnicka UK, Bażanów B, Florek M, et al. A novel copper(I) complex, [Cu(2,2'-biquinoline)P(CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>] – Synthesis, characterisation and comparative studies on biological activity. *Polyhedron*. 2013;50:481–9
48. Doubling Time—online computing with 2 points. (cited 2018 Oct 3). <http://www.doubling-time.com/compute.php>.
49. Marycz K, Kornicka K, Grzesiak J, Śmieszek A, Szłapka J. Macroautophagy and Selective Mitophagy Ameliorate Chondrogenic Differentiation Potential in Adipose Stem Cells of Equine Metabolic Syndrome: New Findings in the Field of Progenitor Cells Differentiation [Internet]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016 [cited 2019 Jun 27]
50. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156–9.
51. Nawrocka D, Kornicka K, Śmieszek A, Marycz K. *Spirulina platensis* Improves Mitochondrial Function Impaired by Elevated Oxidative Stress in Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells (ASCs) and Intestinal Epithelial Cells (IECs), and Enhances Insulin Sensitivity in Equine Metabolic Syndrome (EMS) Horses. *Mar Drugs* [Internet]. 2017
52. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402–8.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year






At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



Article

# Titanium Dioxide Thin Films Obtained by Atomic Layer Deposition Promotes Osteoblasts' Viability and Differentiation Potential While Inhibiting Osteoclast Activity—Potential Application for Osteoporotic Bone Regeneration

Agnieszka Smieszek <sup>1</sup>, Aleksandra Seweryn <sup>2,\*</sup>, Klaudia Marcinkowska <sup>1</sup>,  
Mateusz Sikora <sup>1</sup>, Krystyna Lawniczak-Jablonska <sup>2</sup>, Bartłomiej. S. Witkowski <sup>2</sup>,  
Piotr Kuzmiuk <sup>2</sup>, Marek Godlewski <sup>2</sup> and Krzysztof Marycz <sup>3,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Experimental Biology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Norwida St. 27 B, PL-50375 Wrocław, Poland; agnieszka.smieszek@upwr.edu.pl (A.S.); klaudia.marcinkowska@upwr.edu.pl (K.M.); mateusz.sikora@upwr.edu.pl (M.S.)

<sup>2</sup> Institute of Physics, Polish Academy of Sciences, Aleja Lotników 32/46, PL-02668 Warsaw, Poland; jablo@ifpan.edu.pl (K.L.-J.); bwitkow@ifpan.edu.pl (B.S.W.); kuzmiuk@ifpan.edu.pl (P.K.); godlew@ifpan.edu.pl (M.G.)

<sup>3</sup> International Institute of Translational Medicine, Jesionowa 11 Street, 55-124 Malin, Poland

<sup>4</sup> Collegium Medicum, Institute of Medical Science, Cardinal Stefan Wyszyński University (UKSW), Wóycickiego 1/3, 01-938 Warsaw, Poland

\* Correspondence: aseweryn@ifpan.edu.pl (A.S.); krzysztof.marycz@upwr.edu.pl (K.M.)

Received: 18 September 2020; Accepted: 26 October 2020; Published: 28 October 2020



**Abstract:** Atomic layer deposition (ALD) technology has started to attract attention as an efficient method for obtaining bioactive, ultrathin oxide coatings. In this study, using ALD, we have created titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) layers. The coatings were characterised in terms of physicochemical and biological properties. The chemical composition of coatings, as well as thickness, roughness, wettability, was determined using XPS, XRD, XRR. Cytocompatibility of ALD TiO<sub>2</sub> coatings was assessed applying model of mouse pre-osteoblast cell line MC3T3-E1. The accumulation of transcripts essential for bone metabolism (both mRNA and miRNA) was determined using RT-qPCR. Obtained ALD TiO<sub>2</sub> coatings were characterised as amorphous and homogeneous. Cytocompatibility of the layers was expressed by proper morphology and growth pattern of the osteoblasts, as well as their increased viability, proliferative and metabolic activity. Simultaneously, we observed decreased activity of osteoclasts. Obtained coatings promoted expression of Opn, Coll-1, miR-17 and miR-21 in MC3T3-E1 cells. The results are promising in terms of the potential application of TiO<sub>2</sub> coatings obtained by ALD in the field of orthopaedics, especially in terms of metabolic- and age-related bone diseases, including osteoporosis.

**Keywords:** atomic layer deposition; titanium dioxide; ultrathin layers; oxide layers; TiO<sub>2</sub> coating; improved viability; osteogenic properties

## 1. Introduction

The coating of surgical implants is designed to improve their biocompatibility and bioactivity. The promotion of bone healing and the restoration of tissue homeostasis are essential factors to be considered when designing new coatings for bone regeneration. Much attention is paid to novel modified coatings with improved biological activity that affects the metabolism of progenitor cells

by enhancing their viability and proliferation, as well as supporting cellular adhesion and increasing cellular differentiation. This aspect is crucial, especially in relation to bone metabolic disorders, such as osteoporosis. A thorough analysis of cells' response to a biomaterial surface can provide some insight into the cellular mechanisms controlling bone metabolism and homeostasis. Insufficient integration of bone tissue with the implant surface can cause the implant to be rejected, leading to severe complications, most often requiring revision surgeries [1]. Thus, tailoring biocompatibility of biomaterials is usually associated with modifying its surface in order to improve the cells' adhesion, proliferation, and tissue-specific differentiation. Mechanical modifications are aimed at introducing changes in the material's topography to achieve optimal cell adhesion to the surface, while chemical methods, for example those associated with anodising the titanium surface, yield nanotubes that improve the biological and anti-microbial properties of the biomaterial [2]. Furthermore, sol-gel methods were shown to improve the corrosion resistance of metal substrates and to enhance the osteogenic differentiation of progenitor cells [3,4]. In addition, magnetron sputtering is a useful tool for biofunctionalization of implant surfaces. However, it recently has been shown that the TiO<sub>2</sub> obtained by ALD technology provides better anti-corrosion properties independent of surface topography in comparison to sputtered TiO<sub>2</sub> [5]. It is also possible to obtain the high quality layer of TiO<sub>2</sub> with a Pulsed Laser Deposition (PLD) technique. PLD allows for depositing the films with variable porosity and density [6].

Recently, there has been a growing interest in the application of atomic layer deposition (ALD) technology for tissue-engineering applications and improving implants' surfaces. ALD technology allows us to fabricate ultrathin, highly uniform, and reproducible coverings with a broad range of potential biological applications thanks to their biomimetic features [7]. Additionally, conformal growth provides the possibility for functionalising the multidimensional surfaces [8]. Furthermore, ALD technology can be used for temperature sensible materials that support tissue regeneration, e.g., polymer-based scaffolds, or composites. It was reported that homogenous ALD layers can be created even at room temperature, which significantly extends their application in terms of scaffold modification and the functionalisation of biomolecules, as well as other temperature-sensitive nanoparticles [9]. For instance, ALD technology was previously used for the deposition of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) coverings onto tobacco mosaic virus (TMV) and ferritin. The application of ALD yielded pores and channels with diameters less than 4 nm on the TMV, while nanotubes were fabricated with ferritin molecules [10].

The applicability of ALD technology is emerging in the field of bioengineering and regenerative medicine, especially in the light of the significant advantages of this method over other techniques used for depositing oxide coatings onto sensitive substrates. Previously, ALD technology was used to obtain uniform TiO<sub>2</sub> coatings with controllable thickness, not exceeding 2 nm. The coatings were deposited on porous materials and three-dimensional objects, which indicated their high potential for application in the functionalisation of implants designed for dentistry and orthopaedics [11]. However, Liu et al. for the first time used ALD technology to obtain TiO<sub>2</sub> nano-coatings with anti-bacterial properties and high bioactivity. Their study showed a wide range of anti-microbial efficacy of ALD TiO<sub>2</sub> coatings that inhibit the growth of gram-positive bacteria (*S. aureus*), Gram-negative bacteria (*E. coli*), and antibiotic-resistant bacteria (MRSA). Moreover, it was shown that ALD TiO<sub>2</sub> coatings have a potential selective function, promoting osteoblasts while suppressing fibroblast adhesion and proliferation. This feature is of the utmost importance for orthopaedic implants that are designed to minimise fibrous tissue formation and simultaneously maximise the formation of functional bone tissue [12].

In addition, a study by Yang et al. indicated further potential biomedical application of TiO<sub>2</sub> coatings, showing that these nano-layers can be deposited on Mg-Zn alloy stents to enhance human coronary artery endothelial cell adhesion and growth. The study revealed that an optimised processing temperature control of the ALD TiO<sub>2</sub> coatings is essential in order to achieve the proper biological function of the biomaterial. Yang et al. have indicated that coatings deposited at 150 °C have a greater potential to promote the proliferation of endothelial cells than coatings deposited at 200 °C [13]. Furthermore, Basiaga et al. indicated that the mechanical properties of TiO<sub>2</sub> coatings obtained by

ALD technology strictly depend on the number of cycles during the process of deposition [14]. This information is also of practical importance in terms of the application of ALD coatings for designing implants, both for bone regeneration as well as for contact with blood, such as coronary stents. Recently, Motola et al. showed the possibility to enhance the functionality of the Ti surface. They investigated flat and nanotubular interfaces modified with ALD processes and considered the influence of osteoblast, fibroblast, and neuroblast cells' growth and proliferation [15]. Thin TiO<sub>2</sub> coatings obtained by photocatalytic patterning can also be improved by flower-like hierarchical Au structures that promote the adhesion and proper growth of the osteoblast cells [16]. Moreover, the TiO<sub>2</sub> coatings covered with Au nanoparticles may significantly improve their photocatalytic activity [17] and increase their potential application for example as a sensitive detectors of 17β-estradiol [6].

The response of cells to the contact surface is induced with both chemical and physical properties. Wettability, roughness, and isotropic qualities of the materials are an important factor which can determine cell response to the solid state surface and should be taken into account when designing multifunctional coatings [18]. Mendonca et al. analyze the influence of nanoscale roughness and chemical composition on the osteogenesis gene expression [19]. Given the emerging importance of ALD technology in preparing TiO<sub>2</sub> coatings for contact with bone tissue, we aimed to obtain TiO<sub>2</sub> coatings that regulate the activity of both bone-forming and bone-resorbing cells. In the current research, we were able to produce homogenous coatings at low temperatures with a thickness of 90 nm. We have investigated their cytocompatibility using a model of mice pre-osteoblasts (MC3T3-E1 cell line) as well as a co-culture with pre-osteoclasts (i.e., 4B12 cell line). We have established the influence of TiO<sub>2</sub> coatings obtained by ALD and MC3T3-E1's viability, proliferative potential, metabolic activity, morphology, and growth pattern. In the co-culture model of osteoblasts and osteoclasts, we have also evaluated the influence of TiO<sub>2</sub> coatings on the expression of markers associated with bone metabolism. The biomarkers were evaluated at the messenger ribonucleic acid (mRNA) and micro ribonucleic acid miRNA levels. This study shows, for the first time, the modulatory effect of TiO<sub>2</sub> coatings obtained by ALD on the osteoblast–osteoclast coupling.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Substrate

The thin TiO<sub>2</sub> films were deposited on glass coverslips 13 mm in diameter for biological testing and physicochemical characterisation. The adhesion and quality of the layer deposited by the ALD may be limited by possible surface contamination. This is why all the substrates were thoroughly washed in an ultrasonic cleaner and then dried before the ALD process. The first bath took place in isopropanol, the next two in deionised water. All wash cycles were carried out for 5 min in a temperature bath of 37 °C. Subsequently, nitrogen gas with a purity of 5.0 was used to dry the substrates after the cleaning process.

### 2.2. ALD Growth Method

The deposition of TiO<sub>2</sub> film was carried out in a Savannah-100 Cambridge NanoTech (now Veeco) reactor. Two precursors were alternately introduced into the reaction chamber. First, an organic precursor was selected as a metal precursor: Tetrakis(dimethylamino)titanium (CAS no.: 3275-24-9, Strem Chemicals, Inc., Newburyport, MA, USA). The second one, an oxygen precursor, was deionised water. The purging phase after each dose of precursors was carried out with nitrogen gas with a purity of 6.0. The precursor feeding was as follows: 0.2 s dose of metal precursors, 3 s waiting phase, 15 s pulse of purging gas, 0.04 s pulse of oxygen precursor, 3 s waiting phase, and another purging gas dose of 15 s. This protocol was repeated 1220 times. The process was carried out under stable temperature (100 °C) and pressure (66 Pa). Additionally, the titanium precursor was preheated to 70 °C. The heaters of the reactor chamber and precursor were turned on an hour before the start of the process to ensure that the correct temperature was reached and stabilised and held during the layer growth. After ALD

processes, the samples were vacuum packed and transferred to further biological and physical research. There were no additional cleaning procedures before the physical measurements.

### 2.3. Analysis of the Physicochemical Properties of the Coatings

The X-ray diffraction (XRD) assays were used to determine the crystallinity of the TiO<sub>2</sub> films. The panalytical X'Pert Pro MRD diffractometer was used in the XRR analysis. The generated X-ray radiation was at a wavelength of 1.54056 Å. The Pixcel detector and Parallel Plate Collimator with 0.4-rad Soller slits and a 0.18-deg divergence slit were applied. Based on Parratt's theory, Panalytical software [20] was used to determine the thickness, electron density, and roughness of the resulting coating. The rate of decay of the X-ray signal can determine the roughness of the surface: the amplitude of the oscillations observed is related to the thickness of the layer on the surface of the substrate and the width of the oscillations changes with the electrons' density of the material.

The Scanning Electron Microscopy (SEM) investigations were performed using a Hitachi SU-70 system. Images were taken at 15 kV of accelerating voltage using detector of secondary electrons.

To determine the chemical compounds of the layers obtained, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) measurements were taken. The XPS measurements were carried out according to a previously described protocol [21] using a Scienta R4000 hemispherical analyser (pass energy: 200 eV) and Al K<sub>α</sub> (1486.7 eV) with non-monochromatic excitation. The analysis of full width at half maximum (FWHM) of the 4f7/2 Au line was measured under the same experimental conditions as TiO<sub>2</sub> layer was 1.1 eV. The energy scale was calibrated by setting the C 1s line at the position of 285.6 eV [21].

The wettability of the surface is a crucial parameter in determining the biocompatibility of the material. We assessed the hydrophilic/hydrophobic properties of biologically tested substrates by measuring the contact angle of a drop of water deposited on the surface. A goniometer OCA 25 from DataPhysik was utilised to obtain the contact angle for fluid on the TiO<sub>2</sub> surface deposited onto a coverslip. The test fluid was water. The measurement was performed under normal conditions (temperature: 25 °C; air humidity: 50%). As a reference, the wettability measurement on an uncoated coverslip was taken. All tests were repeated three times at different sites on the samples, a TiO<sub>2</sub>-coated coverslip, and an uncoated coverslip. The result for links and rights contact angle was taken into account.

### 2.4. Evaluation of the Cytocompatibility of TiO<sub>2</sub> Coatings Obtained by ALD

Culture of pre-osteoblastic mice cell line: MC3T3-E1 cell line cells were maintained in Minimum Essential Media Alpha (MEM- $\alpha$ , Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Warsaw, Poland). The culture conditions have been thoroughly described by other authors [21,22]. The medium was supplemented with 10% Fetal Bovine Serum, (FBS, Sigma Aldrich, Munich, Germany) and changed every 2–3 days. The cells were cultured at constant, aseptic conditions in a CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C and 95% humidity. The cultures were passaged using a trypsin solution (StableCell Trypsin, Sigma Aldrich, Munich, Germany) after reaching 90% confluence. The protocol was previously described in detail [22]. Before the trypsinisation step, the cells were washed in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) without calcium or magnesium. The cells were passaged using trypsin solutions and common protocols [22]. For the digestion, 3 mL of trypsin solution was added to a T75 culture flask (Nunc, USA), and the cells were incubated for 5 min at 37 °C in a CO<sub>2</sub> incubator. The cells used for these experiments were at passage number 24 (p24). For the experiment, MC3T3-E1 cells were inoculated in 24-well plates at a density equal to  $2 \times 10^5$  cells per well. The cells were maintained in 0.5 mL of CGM (MEM- $\alpha$  with 10% FBS). The medium was refreshed 3 times per week.

The influence of TiO<sub>2</sub> coatings obtained by ALD on the apoptosis profile: The apoptosis profile was analysed using a MUSE Annexin V & Dead Cell Kit (Merck, Sigma-Aldrich, Poznan, Poland) according to the manufacturer's protocols and previously published information [22]. To put it briefly, cells were detached with trypsin, centrifuged (5 min, 300× g), and diluted with 100  $\mu$ L of PBS containing 1% FBS. The cell suspension and 100  $\mu$ L of Annexin V/dead reagent were mixed in a 1.5-mL centrifuge tube and incubated for 20 min at room temperature in the dark. Then, the cells were analysed using

a Muse Cell Analyser (Merck, Sigma-Aldrich, Poznan, Poland). The apoptotic cell distribution was evaluated by identifying four populations: non-apoptotic (viable) cells: Annexin V (-), 7-AAD (-); early apoptotic cells: Annexin V (+), 7-AAD (-); late apoptotic/dead cells: Annexin V (+), 7-AAD (+); and dead cells: Annexin V (-) and 7-AAD (+).

The influence of TiO<sub>2</sub> coatings obtained by ALD on cell proliferation: The proliferative activity was evaluated using a MUSE Cell Cycle Kit (Merck, Sigma-Aldrich, Poznan, Poland) according to the manufacturer's instructions. A detailed protocol was published by other authors [22]. For the analysis, the cells were collected after detachment from the culture flask with trypsin solution, centrifuged (5 min, 300× g), washed with 1X PBS, fixed with 1 mL of 70% cold ethanol, and incubated overnight. Then, the cells were centrifuged and washed, as described previously [22]. The cell pellet was suspended in 200 µL of Muse Cell Cycle Reagent (Merck, Warsaw, Poland) and incubated at room temperature for 30 min in the dark. The distribution of cells in G0/G1, S, and G2/M phases was estimated using a Muse Cell Analyser (Merck, Sigma-Aldrich, Poznan, Poland).

The influence of TiO<sub>2</sub> coatings obtained by ALD on the cells' metabolic activity: The metabolic activity of the cells was estimated using a TOX-8 resazurin-based in vitro Toxicology Assay Kit (Sigma Aldrich, Munich, Germany) according to the manufacturer's instructions and previously published protocols [23]. The complete growth medium was replaced with fresh CGM supplemented with 10% resazurin solution (Sigma Aldrich, Munich, Germany). The cells were incubated for 2 h at 37 °C in a CO<sub>2</sub> incubator. Then, the supernatants were transferred to a 96-well plate (100 µL per well). The absorbance was measured as indicated before [4,21,22]. The effect of TiO<sub>2</sub> coatings on the cells' metabolic activity was assessed after 24, 48, 72, 96, and 168 h of culture (not all data are shown).

The influence of TiO<sub>2</sub> coatings obtained by ALD on mitochondrial potential: changes in the mitochondrial potential of MC3T3-E1 cells cultured in TiO<sub>2</sub> were monitored using a MUSE MitoPotential Kit (Merck, Warsaw, Poland) according to the supplier's protocols. The cells were harvested by trypsinisation, centrifuged (5 min, 300× g), and suspended in 100 µL of Assay Buffer (Merck, Warsaw, Poland). Next, 95 µL of MitoPotential working solution was added to the cell suspension. Assay tubes were vortexed for 3 s and incubated for 20 min in a CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C. Then, 5 µL of Muse MitoPotential 7-AAD reagent (Merck, Warsaw, Poland) was added to the cell suspension and the samples were incubated for 5 min at room temperature. The mitochondrial potential was assessed using a Muse Cell Analyser (Merck, Warsaw, Poland) by the identification of four populations: live cells with depolarised mitochondrial membrane: MitoPotential (-), 7-AAD (-); live cells with intact mitochondrial membrane: MitoPotential (+), 7-AAD (-); dead cells with depolarised mitochondrial membrane: MitoPotential (+), 7-AAD (+); and dead cells with disturbed mitochondrial membrane potential: MitoPotential (-) and 7-AAD (+).

Determination of the TiO<sub>2</sub> coatings' obtained by ALD influence on cell morphology, ultrastructure, and adhesion rate: The morphology and ultrastructure of the MC3T3-E1 cells were analysed after 72 h of culturing. The detailed protocol of culture staining and preparation for confocal imaging was described by other authors [24]. The specimens were analysed using a confocal microscope (Leica TCS SPE, Leica Microsystems, KAWA.SKA Sp. z o.o., Zalesie Gorne, Poland) and the microphotographs obtained were then analysed using Fiji (ImageJ 1.52n, Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA), as described previously [22]. The figures presented herein were obtained using the maximum intensity projection (Z-projection). In addition, the ultrastructure of cultures was examined with a scanning electron microscope (SEM, Zeiss Evo LS 15, Oberkochen, Germany). Before SEM analysis, the cells were fixed (in 4% paraformaldehyde [PFA] as described above) and dehydrated in an ethanol series (concentrations from 50% to 100%, each incubation for 5 min). The specimens were sputtered with gold and observed using an SE1 detector at 10 kV of filament tension [4]. The adhesion rate of the MC3T3-E1 cells was determined using the protocol published by Huang et al. [25] and used previously [26,27].

Co-culture with pre-osteoclastic cell line 4B12: The osteoclast precursor cell line 4B12 was kindly provided by Shigeru Amano from the Department of Oral Biology and Tissue Engineering, Meikai

University School of Dentistry. The detailed description of the culture method was published before [22]. The cells used in the experiment were at passage number 28 (p28). The 4B12 cells were cultured with pre-seeded MC3T3 cells. For co-culturing, the 4B12 cells were inoculated at a density equal to  $3.5 \times 10^4$  in a chamber of an 8- $\mu$ m Transwell system membrane (Corning, Biokom, Warsaw, Poland). The cells were maintained in 0.3 mL of  $\alpha$ -MEM with 10% FBS and 30% CSCM; half of the medium was changed 3 times per week. The detailed protocol of co-culturing was described elsewhere [22]. The invasion of 4B12 was determined based on SEM images.

The influence of TiO<sub>2</sub> coatings obtained by ALD on osteogenesis marker gene expression and miRNA levels: To determine the mRNA and miRNA levels, the experimental cultures were homogenised using 1 mL of Extrazol® (Blirt DNA, Gdansk, Poland). The protocol for total RNA isolation was performed according to the manufacturer's instructions and the modified phenol-chloroform method described by Chomczyński and Sacchi [28]. The resulting RNA was diluted in DEPC-treated water. The quantity and purity of RNA specimens were determined spectrophotometrically at 260- and 280-nm wavelengths (Epoch, Biotek, Bad Friedrichshall, Germany). Before reverse transcription, the total RNA obtained (500 ng) was purified using DNase I (PrecisionDNase, PrimerDesign, BLIRT S.A. Gdansk, Poland). The reverse transcription was performed using a Tetro cDNA Synthesis Kit (Bioline Reagents Limited, London, UK). Both processes were performed according to well-established protocols [14,15]. The DNA digestion and cDNA synthesis were carried out in a T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The resulting matrices were used for RT-qPCR analysis using a SensiFAST SYBR® & Fluorescein Kit (Bioline Reagents Ltd., London, UK). The final reaction volume was 10  $\mu$ l, where 1  $\mu$ l of cDNA was used and the concentration of primers was 0.5  $\mu$ M. Quantitative PCR was performed in a CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The details of the protocols and the reaction conditions were described previously [22]. Additionally, to evaluate the miRNA levels, cDNA was also synthesised using 375 ng of total RNA with a Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis Kit (Takara Bio Europe, Saint-Germainen, Laye, France) as described by other authors [21]. The primer sequences are summarised in Table S1. All qPCR reactions were carried out in at least three repetitions. The relative values of gene expression were determined with the RQ<sub>MAX</sub> algorithm as described previously [29]; for normalisation, Gapdh (glyceraldehyde 3-phosphatedehydrogenase) was used as a reference gene and U6snRNA (Takara Bio Europe, Saint-Germainen, Laye, France) was used to determine the levels of miRNA.

### 2.5. Statistical Analysis

The results obtained during in vitro studies are presented as the mean of a minimum of three trials. The means are presented with standard deviations ( $\pm$  SD). Statistical comparisons between the data were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) and unpaired Student's *t*-test. The results were analysed using GraphPadPrism 5 software (La Jolla, CA, USA). Differences with a probability of  $p < 0.05$  were considered to be statistically significant.

## 3. Results

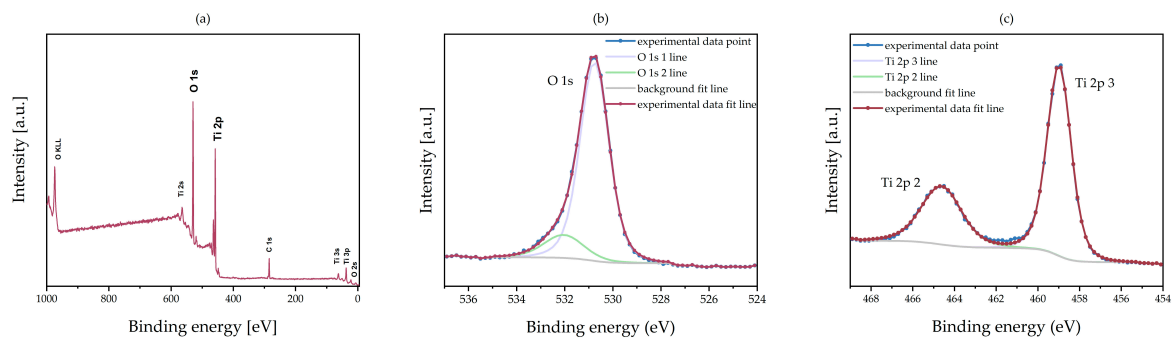
### 3.1. Physicochemical Properties of TiO<sub>2</sub> Coatings Obtained by ALD

The thin layer of titanium dioxide was successfully deposited onto glass substrates for biological investigations and physicochemical tests.

The XPS measurement of O 1s, C 1s, and Ti 2p lines correspond to a content of 22.1 at.% of titanium (Ti), 52.3 at.% of oxygen (O), and 25.6 at.% of carbon (C) on the sample surface. No other elements were found (Figure 1a). The relatively high adventitious carbon originated mostly from contamination of the surface due to air exposition of the sample before XPS measurements and was used for energy scale calibration (C 1s binding energy [BE] 285.6 eV). The stoichiometry ratio in the oxide compound is determined by the content of the metal ions and the oxygen ions. The ratio of O:Ti content was 2.4, confirming the growth of an amorphous layer with stoichiometry close to TiO<sub>2</sub>. The excess oxygen may

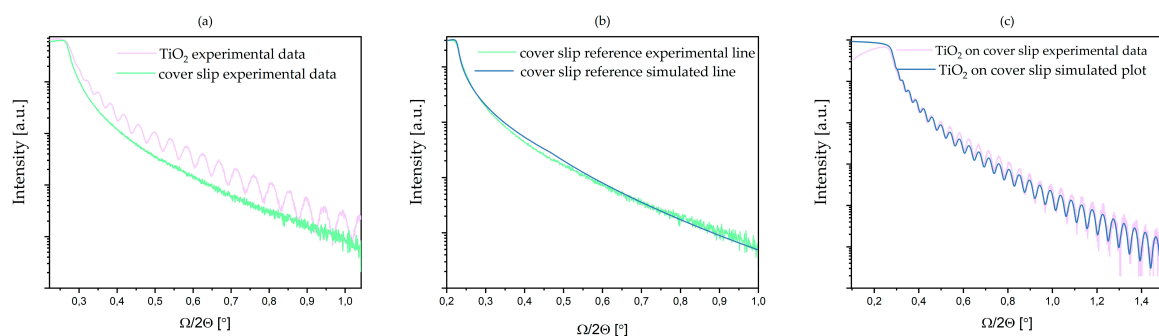


have resulted from the adsorption of water and carbon oxide on the surface. The result was confirmed by analysis of the oxygen 1s line (Figure 1b). Two components fit this line well: the main component at BE = 530.8 eV covers 86% of the line and the second component BE = 532 eV covers only 14%. Taking into account only the main component at 530.8 eV of energy—which is close to the oxygen-binding energy in TiO<sub>2</sub> [30,31]—the corrected ratio of oxygen to titanium is 2.04. It confirms the formation of an amorphous titanium dioxide with stoichiometry close to the ideal. The energy positions (459 eV and 464 eV) and the separation in the Ti 2p spin-orbit doublet (5.6 eV) agree within the limit of energy calibration error ( $\pm 0.2$  eV) with the values reported in the reference table and other publications (Figure 1c) [32]. Moreover, in the case when the many O defects are present and stoichiometry of ALD layer is strongly changed, the presence of Ti<sup>+3</sup> is observed in Ti 2p line as e.g., in [5].



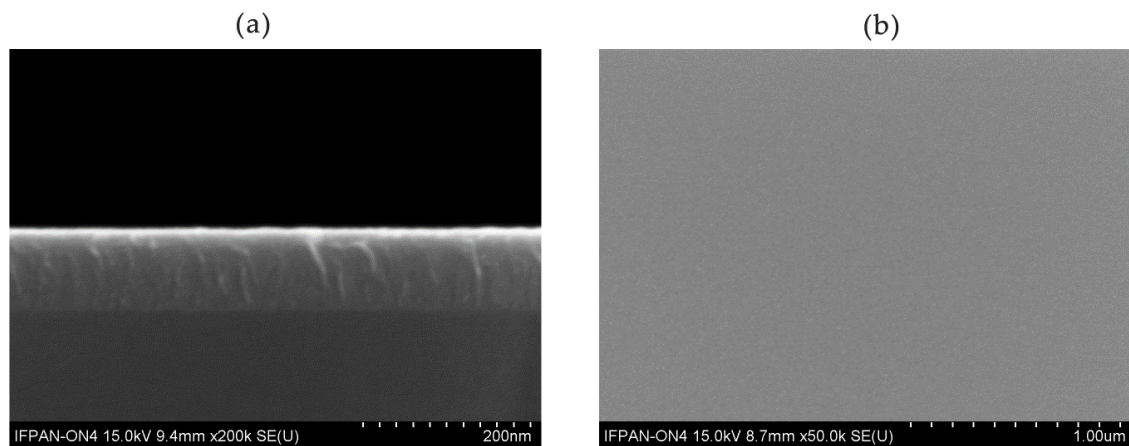
**Figure 1.** The XPS data plot of TiO<sub>2</sub> obtained by ALD on a glass substrate: (a) wide XPS spectra—only lines of O, Ti, and C were detected, C 1s binding energy (BE) 285.6 eV was used for energy scale calibration; (b) O1s experimental and fitting line; (c) Ti 2p experimental and fitting line.

The XRR measurement was performed on the coverslip deposited with the TiO<sub>2</sub> coating as well as on the coverslip. We observed a change in the surface roughness of the samples. The simulation of experimental data indicates that the roughness of the surface of the coverslip is 0.7 nm (Figure 2b); for the TiO<sub>2</sub> coating, the roughness parameter was simulated to the value of 2.4 nm (Figure 2c). The simulated density is equal to 3.88 g/cm<sup>3</sup>, which is lower than the table data from bulk 4.23 g/cm<sup>3</sup> titanium dioxide material. The thickness of the deposited coating was estimated to 90 nm.



**Figure 2.** The XRR data plots of TiO<sub>2</sub> obtained by ALD on a glass substrate (green colour) and uncoated coverslip (magenta colour): (a) the experimental line; (b) the fitting line (blue colour): for the coverslip sample; (c) the fitting line for TiO<sub>2</sub> on the coverslip sample (fit simulation made using Parratt's theory).

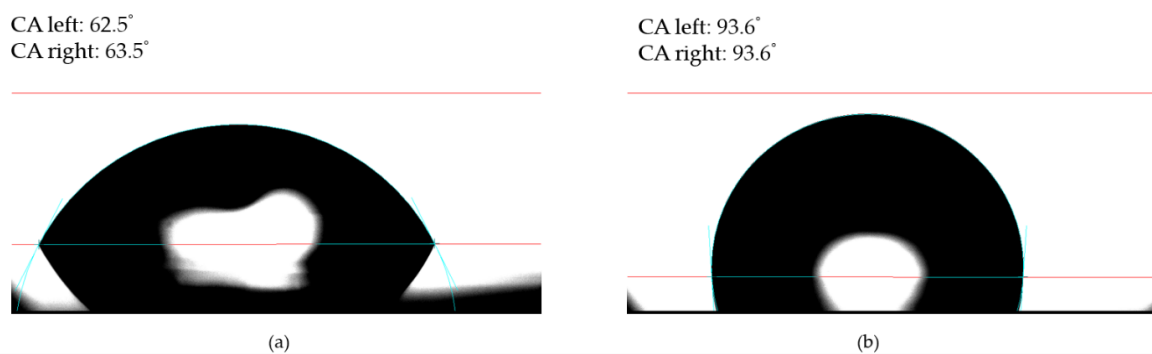
To determine the quality of the coating, we performed SEM measurements. The images presented in Figure 3 show a very high uniformity (Figure 3a) of the coating. No larger crystallites are visible on the surface, which is characteristic of amorphous layers (Figure 3a,b).



**Figure 3.** The SEM images of  $\text{TiO}_2$  obtained by ALD on Si substrate as a reference: cross-section view (a) and top view (b). Images were taken at 15 kV of accelerating voltage using a detector of secondary electrons.

Additionally, to confirm the amorphous phase of the coating, we performed X-ray diffraction measurements in the Theta/2Theta configuration. We did not detect any additional signal in comparison to the broad peak of an uncoated cover glass (Figure S1). A broad peak from the substrate confirmed the amorphous nature of glass, and the absence of a signal from the layer also points to an amorphous structure. The obtained result is in good agreement with our previous report [33] and other research [9].

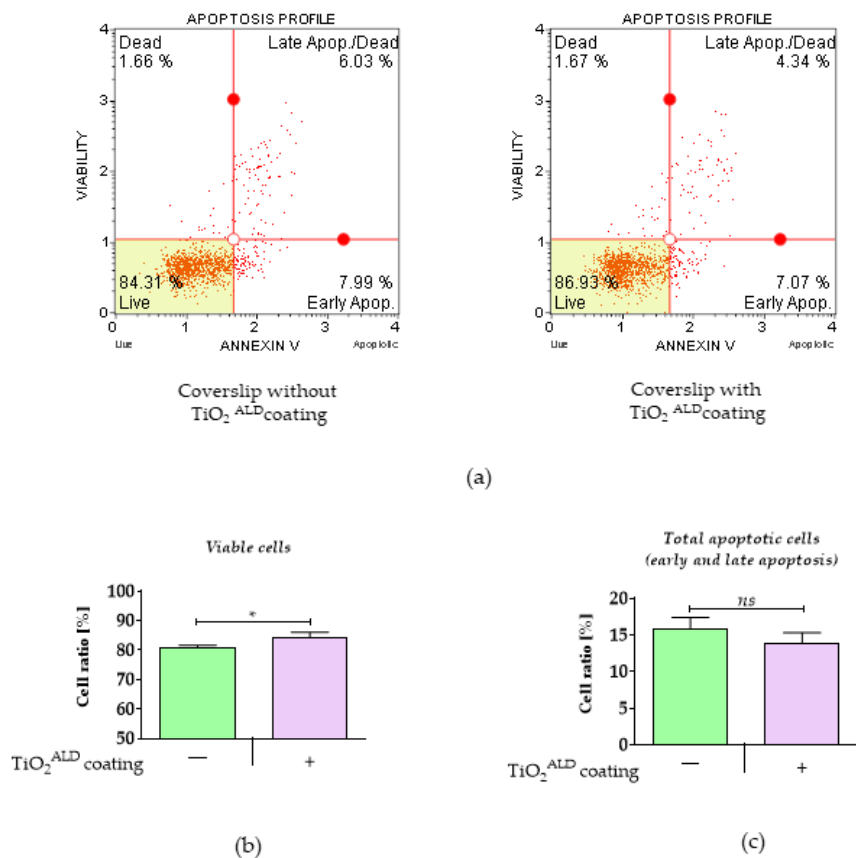
The evaluation of the wettability data (Figure 4) shows that, in relation to the surface of the coverslip (Figure 4a), the  $\text{TiO}_2$  sample (Figure 4b) has a much higher value of the contact angle. The value of the contact angle is for coverslip  $62.9^\circ$  and  $93.3^\circ$  for  $\text{TiO}_2$  sample. This finding indicates a more substantial hydrophobic property of  $\text{TiO}_2$  compared to a pure coverslip.



**Figure 4.** The images of water contact angle (wettability) measurement for (a) a coverslip and (b)  $\text{TiO}_2$  on a coverslip (CA left indicates measured links' contact angle, while CA right indicates measured right contact angle).

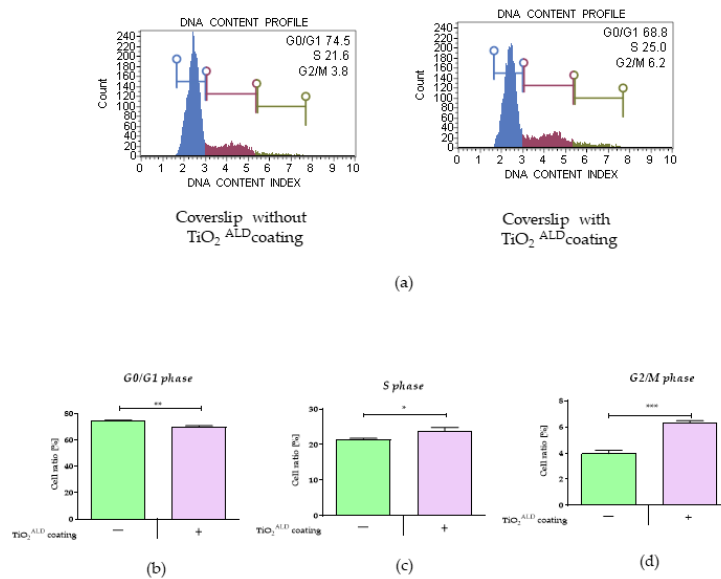
### 3.2. Cytocompatibility of the $\text{TiO}_2$ Coatings Obtained by ALD

The analysis of cell viability indicated that the  $\text{TiO}_2$  coating exhibited non-toxic properties toward the MC3T3-E1 cell line (Figure 5). The biomaterial significantly improved the viability of preosteoblasts (Figure 4a,b). Moreover, we observed decreased apoptosis in MC3T3-E1 cultures propagated on  $\text{TiO}_2$  obtained by ALD, though the differences were not statistically significant (Figure 5c).



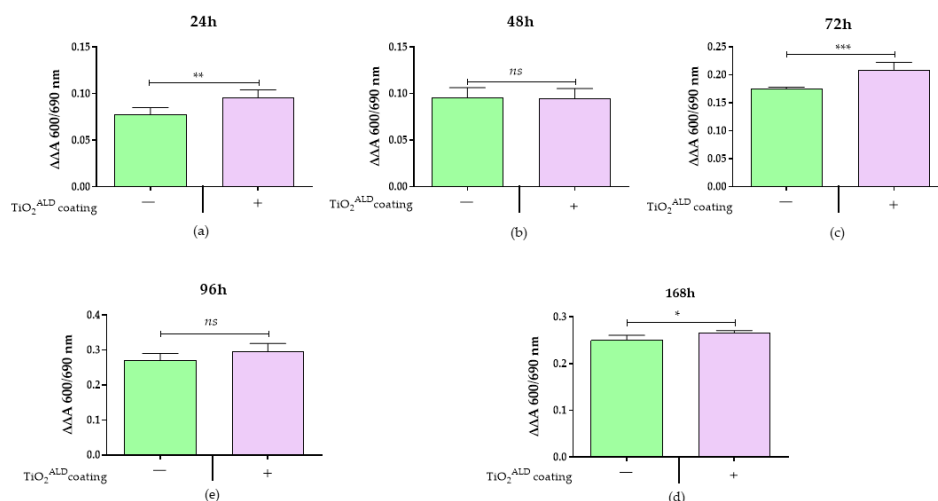
**Figure 5.** The cell viability and apoptosis profile in the control culture ( $\text{TiO}_2^{\text{ALD}}$  coatings-) and the culture propagated on  $\text{TiO}_2$  coatings ( $\text{TiO}_2^{\text{ALD}}$  coatings +; experimental culture): (a) representative graphs obtained during analysis, showing the distribution of cells on four populations: live (Live—bottom-left corner), early apoptotic (Early Apop.—bottom-right corner), late apoptotic (Late Apop./Dead—upper-right corner), and dead (Dead—upper-left corner); results of statistical analysis showing a comparison of viable cells (b) and apoptotic cells (c) in control and experimental cultures (significant differences are marked with asterisks (\*  $p < 0.05$ ), non-significant results are marked as ns).

The analysis of the distribution of cells in the cell cycle revealed that preosteoblast MC3T3-E1 cells cultured on  $\text{TiO}_2$  surfaces obtained by ALD (Figure 6) showed increased proliferative activity, which was reflected in the accumulation of cells in the S phase (Figure 6a,c). Moreover, in cultures propagated on  $\text{TiO}_2$  coatings obtained by ALD, we observed more cells in the G2/M phase (Figure 6a,d). The shift of cells toward the G2/M phase was accompanied by fewer cells in the G0/G1 phase (Figure 6a,b).



**Figure 6.** The results of the analysis of the control culture (TiO<sub>2</sub> ALD coatings-) and a culture propagated on TiO<sub>2</sub> coatings (TiO<sub>2</sub> ALD coatings +; experimental culture), showing the distribution of cells in the cell cycle: (a) Representative histograms show the distribution of MC3T3 cells in the cell cycle phase under both culture conditions. The cells were separated into three populations: G0/G1 phase (the left side), S phase (the middle), and G2/M phase (the right side). The results of statistical analysis revealed differences in cell distribution during the (b) G0/G1 phase, (c) S phase, and (d) G2/M phase. (significant differences are marked with asterisks (\*\**p* < 0.01; \*\*\* *p* < 0.001; \* *p* < 0.05).

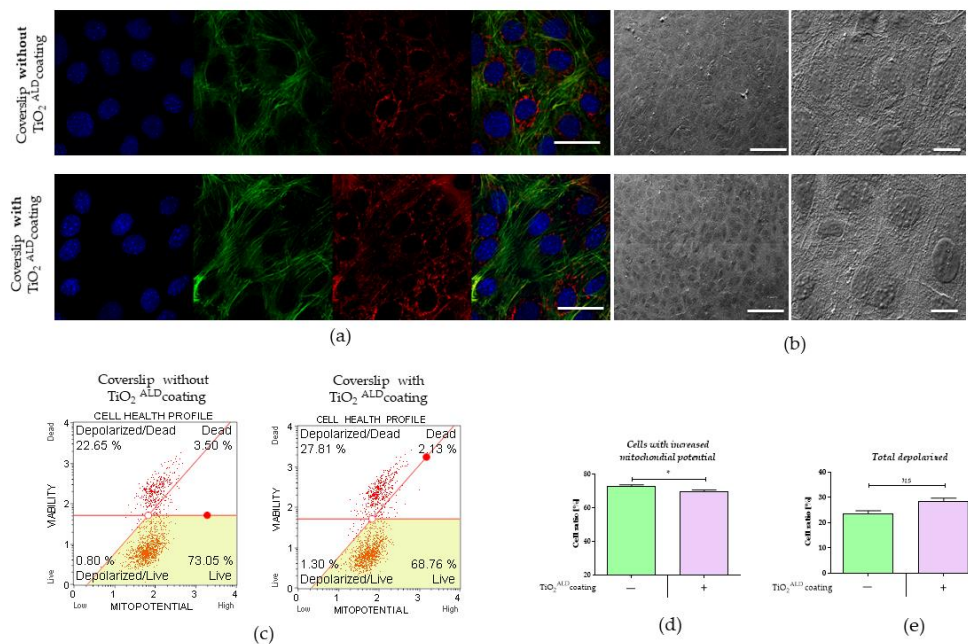
The Alamar Blue test indicated increased metabolic activity of MC3T3-E1 cells cultured in the presence of TiO<sub>2</sub> coatings (Figure 7). The MC3T3-E1 cells demonstrated a significantly faster metabolism in response to TiO<sub>2</sub> coating obtained by ALD at the initial stage of culturing, i.e., after 24 h of propagation (Figure 7a), but also after 72 h and 168 h of culturing (Figure 7c,e).



**Figure 7.** The metabolic activity in the control culture (TiO<sub>2</sub> ALD coatings-) and a culture propagated on TiO<sub>2</sub> coatings (TiO<sub>2</sub> ALD coatings +; experimental culture): comparative analysis of metabolic activity after (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h, (d) 96 h, and (e) 168 h of propagation. (significant differences are marked with asterisks (\*\**p* < 0.01; \*\*\* *p* < 0.001; \* *p* < 0.05), non-significant results are marked as ns).

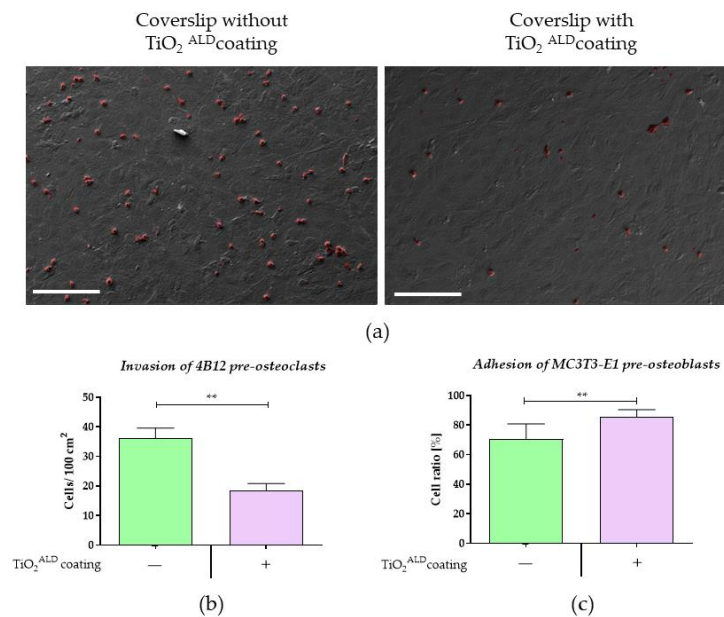
The analysis of cells morphology showed no significant influence of TiO<sub>2</sub> coating on the cells' morphology or mitochondrial network development (Figure 8a). Our observations revealed that both the control cultures and the experimental cultures had a properly expanded network of the actin

cytoskeleton, maintained cell–cell contact, and appropriately adhered to the substrate. Moreover, both the MC3T3-E1 cells cultured on a plain coverslip and those coated by ALD with TiO<sub>2</sub> had well-developed mitochondrial networks (Figure 8a). The MC3T3-E1 cells maintained proper morphology and ultrastructure in both the control and experimental cultures. In addition, no occurrence of apoptotic bodies was observed in the MC3T3 cultures (Figure 8b). Nevertheless, we found that MC3T3-E1 cells propagated onto TiO<sub>2</sub> surfaces were characterised by lower mitochondrial potential in comparison to the control cultures; this difference was statistically significant (Figure 8c,d). At the same time, we did not observe significant differences in the percentage of total depolarised cells between the control and experimental cultures propagated on TiO<sub>2</sub> layers (Figure 8c,e).



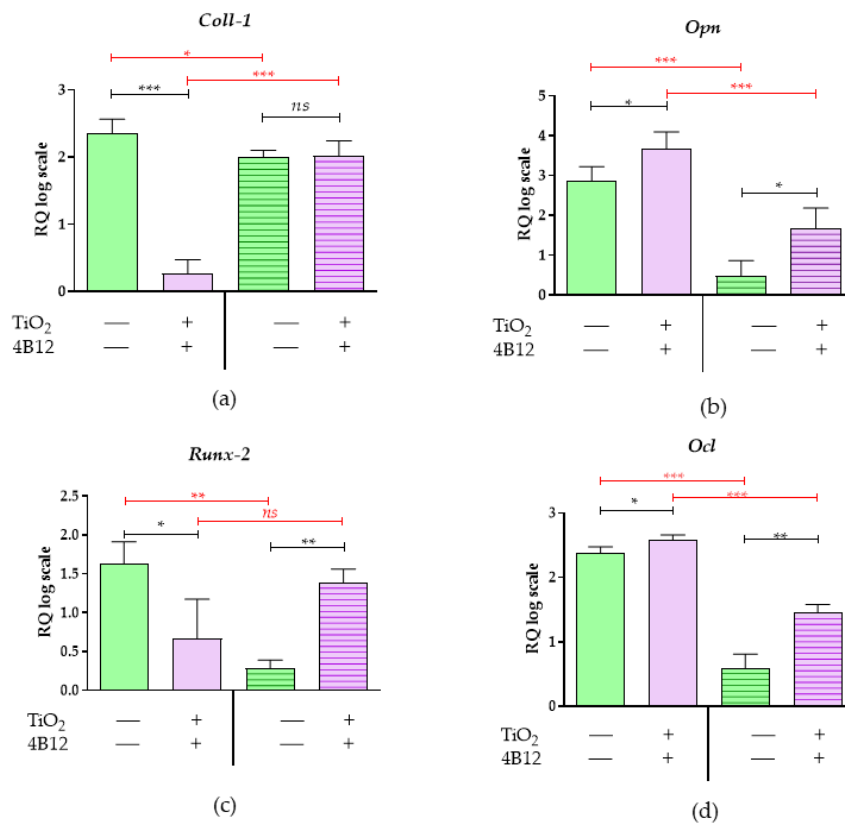
**Figure 8.** The results of the ultrastructural analysis of MC3T3 cells in the control culture (TiO<sub>2</sub> ALD coatings -) and a culture propagated on TiO<sub>2</sub> coatings obtained by ALD (TiO<sub>2</sub> ALD coatings +; experimental culture): (a) confocal imaging showing nuclei organisation (blue—stained with DAPI), an actin cytoskeleton (green—Atto 488 Phalloidin), and the distribution of the mitochondrial network (red—mitoRed). The pictures were captured under magnification equal to 630× (scale bar = 40 μm); (b) the ultrastructure of the MC3T3-E1 cells. The pictures were captured using SEM under 500× magnification (scale bar = 100 μm and magnification equal to 2500×); (c) Dot-plots presenting distribution of cells based on mitochondrial membrane potential. Cells were separated into four populations: live (Live—bottom-right corner), live with the depolarised mitochondrial membrane (Depolarized/Live—bottom-left corner), dead with the depolarised mitochondrial membrane (Depolarised/Dead—upper-left corner), and dead (Dead—upper-right corner). The results of the statistical analysis showing the percentage of cells with (d) high mitochondrial potential and (e) total depolarised cells. (significant differences are marked with asterisks (\*  $p < 0.05$ ), non-significant results are marked as ns).

The analysis of preosteoclast invasion properties indicated that the number of preosteoclasts is significantly lower in the cultures of the preosteoblast MC3T3 propagated on a TiO<sub>2</sub> coating, (Figure 9a,b). In addition, the measurement of MC3T3-E1 adhesion indicated that TiO<sub>2</sub> coatings promote osteoblast attachment to surfaces. The results are in agreement with the increased metabolic activity of MC3T3-E1 preosteoblasts propagated on a TiO<sub>2</sub> layer, measured when they first interact with the biomaterial, which strictly depends on the adhesive properties of the surface.



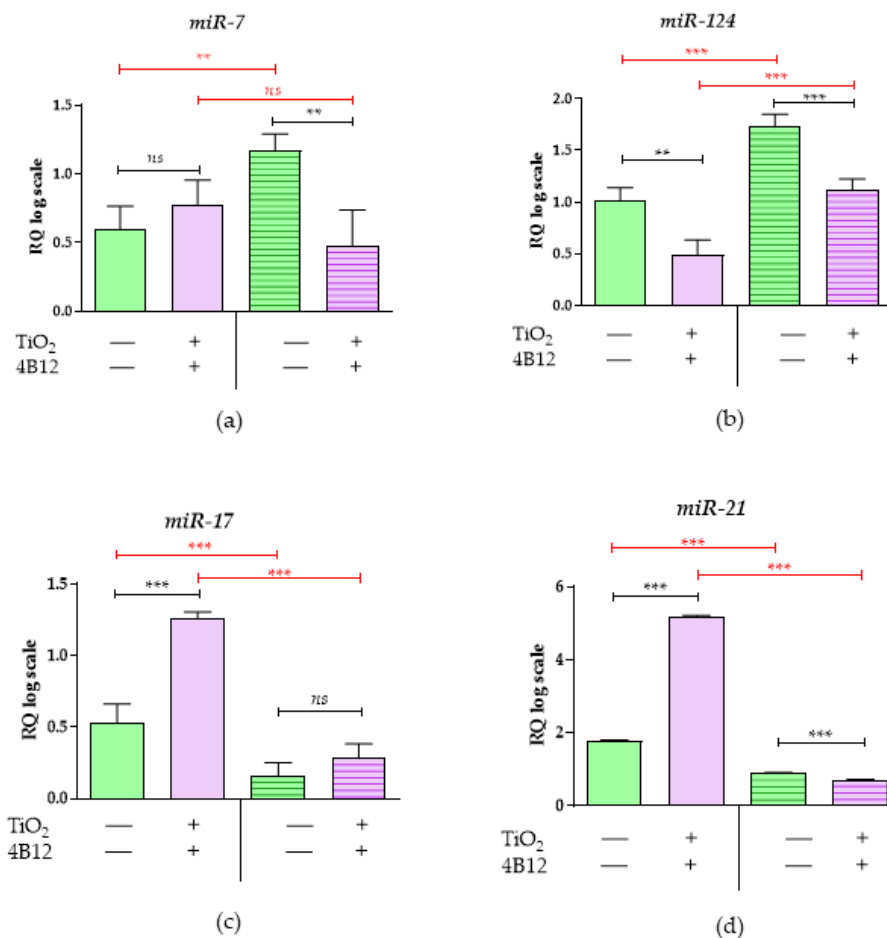
**Figure 9.** The invasion of preosteoclasts in the control co-culture (TiO<sub>2</sub>-) and the culture propagated on TiO<sub>2</sub> coatings obtained by ALD (TiO<sub>2</sub><sup>ALD</sup> coatings+; experimental co-culture): (a) the representative pictures of MC3T3-E1 co-cultured with pre-osteoclasts. 4B12 cells were visualised and coloured red (GNU Image Manipulation Program 2.10.18). The pictures were captured using SEM under 500× magnification (scale bar = 20 μm); (b) the results of statistical analysis showing the number of preosteoclasts. (significant differences are marked with asterisks (\*\*  $p < 0.01$ )).

The pro-osteogenic properties of the TiO<sub>2</sub> coatings were confirmed by the expression of genes involved in the process of osteogenesis and proper bone mineralisation. The analysis was performed for the MC3T3-E1 cell line, as well as for co-cultures of MC3T3-E1 with pre-osteoclastic cell line 4B12. In the MC3T3-E1 cultures propagated on TiO<sub>2</sub> surfaces, we observed a higher expression of late osteogenesis markers, such as osteopontin (*Opn*) and osteocalcin (*Ocl*) (Figure 10b,d). Simultaneously, the same cultures were characterised by lower levels of mRNA for other osteogenic markers, i.e., collagen type 1 (*Coll-1*) and runt-related transcription factor 2 (*Runx2*) (Figure 10a,c). Interestingly, the profile of osteogenic markers for MC3T3-E1 cultured with 4B12 was maintained in the cultures propagated on the TiO<sub>2</sub> coating. As a result of the paracrine effects of preosteoclasts, MC3T3-E1 cultured in control conditions had lower levels of osteogenic genes. Obtained results correspond with the increased invasiveness of 4B12 noted in the control cultures. In turn, the MC3T3-E1 propagated on TiO<sub>2</sub> and in direct contact with 4B12 were characterised by a higher accumulation of transcripts for *Opn*, *Ocl*, and *Runx2* (Figure 9b,c and Figure 10a–d).



**Figure 10.** The mRNA expression of genes associated with osteogenic potential. The analysis of the control culture (TiO<sub>2</sub><sup>ALD</sup> coatings -) and the culture propagated on TiO<sub>2</sub> coatings (TiO<sub>2</sub><sup>ALD</sup> coatings +; experimental culture) examined (a) Coll-1, (b) Opn, (c) Runx-2, and (d) Ocl. The transcripts' profiles were measured using the RT-qPCR technique. The relative quantification (RQ) was performed using the RQMAX method and the results are presented in a log scale. (significant differences are marked with asterisks (\*\*\*)  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ), non-significant results are marked as ns).

The levels of microRNAs involved in bone metabolism were also altered in response to TiO<sub>2</sub> coatings (Figure 11). In the MC3T3-E1 cells cultured onto TiO<sub>2</sub> obtained by ALD surfaces, we observed a significantly higher expression of miR-17 (Figure 11c) and miR-21 (Figure 11d), while miR-124 (Figure 11b) levels were lowered. This profile corresponds with mRNA levels for osteogenic markers, i.e., *Opn* and *Ocl*, showing that the TiO<sub>2</sub> layer may provide pro-osteogenic conditions, inducing differentiation of MC3T3-E1 cells into osteoblasts. However, the MC3T3-E1 cells propagated on ALD covered with TiO<sub>2</sub> samples and influenced by the paracrine activity of preosteoclasts showed significantly lower levels of miR-7 and miR-21, which are considered osteogenic miRNAs. Nevertheless, the lower levels of miRNAs promoting osteoclast activity, i.e., miR-7 and miR-124, were significantly lower, a finding which also correlates with the decreased invasion of 4B12 preosteoclasts in this condition.



**Figure 11.** The expression of miRNA associated with osteogenic potential. The analysis of the control cultures (TiO<sub>2</sub><sup>ALD</sup> coatings -) and the cultures propagated on TiO<sub>2</sub> coatings obtained by ALD (TiO<sub>2</sub><sup>ALD</sup> coatings +; experimental culture) examined (a) miR-7, (b) miR-124, (c) miR-17, and (d) miR-21. The transcripts' profiles were measured using the RT-qPCR technique. The relative quantification (RQ) was performed using the RQ<sub>MAX</sub> method, and the results are presented in a log scale. (significant differences are marked with asterisks (\*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ), non-significant results are marked as ns).

#### 4. Discussion

Currently, much interest can be observed in the development and application of ALD technology as a method for creating bioactive coatings for orthopaedic implants. Mounting evidence indicates that ALD technology provides a new option for functionalising the biomaterials' surface, improving the metabolism of bone progenitor cells, and promoting osseointegration. In this study, we used ALD technology to obtain thin TiO<sub>2</sub> films distinguished by selective biological properties: activating pro-osteogenic signals and inhibiting the invasion of osteoclast precursors. TiO<sub>2</sub> coatings had previously been described and characterised in terms of their antibacterial properties and their cytocompatibility toward progenitor cells, including preosteoblasts [1,2]. It was indicated that thin, ALD-fabricated TiO<sub>2</sub> meets the criteria of pro-osteogenic coatings that promote bone-forming cell growth and proliferation [12]. The quality of the TiO<sub>2</sub> layers obtained by ALD meets the requirements of coatings for implant materials. A thin TiO<sub>2</sub> layer was deposited on scaffolds made of titanium powder, mimicking the biological functions of the substrate. The TiO<sub>2</sub> was coated on the porous metallic biomaterial uniformly and with high quality [11]. Additionally, TiO<sub>2</sub> films deposited on 316 LVM steel surfaces have been investigated mechanically. Basiaga et al. demonstrated that modifying



the surface of vascular stents is possible; the mechanical properties of such layers—the thicknesses of the layers—depend on the number of ALD cycles used in the process [14].

The ALD technique attracts attention as a promising technology that allows for tailored, unique biocompatible coatings to be fabricated. However, the TiO<sub>2</sub> coatings obtained by ALD and designed for potential biomedical application are usually created in temperatures significantly higher than 100 °C. For example, Liu et al. deposited TiO<sub>2</sub> at 200 °C [34], while Liu et al. created coatings with ALD in the 120–190 °C temperature range [35]. In this study, we performed the TiO<sub>2</sub> growth process at a temperature of 100 °C. The selection of precursors, the metal precursor in particular, and the temperature during the ALD growth process are the key parameters which determine the phase composition of the thin TiO<sub>2</sub> coating. The tetrakisdimethyloamino used by us in this study has a low growth rate of TiO<sub>2</sub>, indicating inefficient surface reactions. For comparison, the growth rate when using tetrakisdimethyloamino of metals such as hafnium or zirconium is twice as high [33]. However, despite the low growth rate, the high quality of the coating indicates the stoichiometry of this dioxide was preserved. TiO<sub>2</sub> occurs in various crystallographic phases—amorphous, rutile, anatase, and brookite—or it can coexist in several phases [35]. The crystal phase of TiO<sub>2</sub> obtained by ALD depends strongly on the deposition temperature [9], while the amorphous layer is formed at low deposition temperatures, anatase at medium temperatures, and rutile at the highest temperatures. It has also been proven that crystallography influences the biological properties of the coating. For example, Rossi et al. have shown that TiO<sub>2</sub> coating which contains an anatase and rutile phase absorbing the proteins from physiological fluids better [36]. The initial protein adhesion to the surface determines the developmental phases of the cells (differentiation and proliferation) and whether osseointegration is successful. Despite a lack of noticeable crystallographic order of the Ti and O atoms, we found excellent osteogenic properties of the TiO<sub>2</sub> coating.

An amorphous structure leads to better adhesion to the substrate as compared to the corresponding crystalline layer [33]. Moreover, a low temperature of deposition is a significant advantage, allowing such a coating to be applied on polymer surfaces that can change their structure at high temperatures. Amorphous oxides obtained by low temperature are often far from stoichiometric. Park et al. showed in their work the formation of crystallites with higher oxygen content while depositing TiO<sub>2</sub> with plasma-enhanced ALD. While the TiO<sub>1.6</sub> layer was amorphous, the increased oxygen content (TiO<sub>1.7</sub>) resulted in the formation of crystallites [37]. In our study, we obtained amorphous TiO<sub>2</sub> coating close to ideal stoichiometry. The reason for this phenomena can be the fact that the generation of oxygen vacancies was thermodynamically blocked at low temperatures during the growth process.

The TiO<sub>2</sub> coating increased the hydrophobicity of the surface. This result is contrary to data reported by Liu et al. They found a lower water contact angle with the deposition of an ALD layer. However, in such a case, the wettability was determined by the substantial increase of surface roughness rather than the surface chemistry. Cell adhesion is generally strongly correlated with the hydrophilic properties of the materials. We found better cell adhesion despite the higher water contact angle. It appears that their finding depended on the surface chemistry, and that the nearly ideal stoichiometry may influence the biological properties of TiO<sub>2</sub>.

In this study, we found that 90-nm TiO<sub>2</sub> coatings obtained by ALD may promote proper bone formation and may enhance the viability, proliferation, and metabolic activity of preosteoblasts. We were able to determine the influence of TiO<sub>2</sub> coatings obtained by ALD on both osteoblast and osteoclast activity. We have indicated that TiO<sub>2</sub> layers improve the metabolic activity and viability at the early stages of cell–biomaterial contact and that they lesson the invasion of osteoclast progenitors. These features are extremely desirable and are required for bone implant coverings, as they can ensure the proper integration of biomaterials with bone tissue and can guarantee active bone remodelling. We have also found that TiO<sub>2</sub> coatings promote the adhesion of preosteoblasts and have the features of a biomimetic structure, allowing for the control of cell–surface interaction.

The improved adhesion of osteoblast to TiO<sub>2</sub> coverings was noted previously. For example, Shokuhfar et al. reported that Ti surfaces treated with amorphous and crystalline TiO<sub>2</sub> nanotube

are effective in increasing the number of attached MC3T3-E1 preosteoblasts. In addition, using SEM and FIB analysis, Shokuhfaret al. provided direct evidence on the interlocked mechanism between the cell and TiO<sub>2</sub>. It was shown that osteoblasts growing on nanostructured TiO<sub>2</sub> coatings create filopodia extensions, increasing the contact area and resulting in better anchorage to the surfaces [38]. The increased adhesion of osteoblasts to TiO<sub>2</sub> coatings was also described by Rivera-Chacon et al., who explained this phenomenon by the selective absorbance of vitronectin and fibronectin by substrates with nanostructures [39]. This finding partially explains our results, which indicate the improved attachment of osteoblasts into the TiO<sub>2</sub> layer and the inhibited invasion of osteoclasts. Vitronectin was shown to promote osteoblast differentiation and activity, whilst concomitantly restraining osteoclast differentiation and resorptive function [40].

The increased adhesion, as well as the improved proliferation and viability of progenitor cells, ensures the guided regeneration of bone and the formation of functional tissue. In this study, we showed that TiO<sub>2</sub> coatings exert an anti-apoptotic effect towards preosteoblasts, significantly increasing their viability and promoting cellular metabolism. Such features were described previously in relation to the cytocompatibility of TiO<sub>2</sub> coatings. TiO<sub>2</sub> coatings obtained through ALD had been reported as bioactive layers that modulate the metabolism of progenitor cells, affecting their osteogenic potential. In this study, we confirmed that TiO<sub>2</sub> coatings obtained by ALD activate transcripts associated with preosteoblast differentiation into bone-forming cells. We found that TiO<sub>2</sub> layers increased the mRNA levels of osteopontin and osteocalcin in the pre-osteoblastic MC3T3-E1 cell line, which is in line with the results presented by Vercellino et al., who showed that titanium dioxide nanostructured coatings promote the differentiation of bone marrow stromal cells, elevating the expression of osteopontin and osteocalcin [41].

In addition, we found that the gene expression pattern correlates with higher levels of regulatory microRNAs, such as miR-17 and miR-21. It was previously reported that TiO<sub>2</sub>-nanotube arrays regulate the miRNA levels in human adipose-tissue-derived stem cells (hASCs) propagated under osteogenic conditions. The increasing interest in microRNA involvement in the regulation of pro-osteogenic signals also reinforces the studies on the effect of biomaterial and nanotopography-guided differentiation of progenitor cells. Understanding mRNA–miRNA networks as an axis regulating the fate of progenitor cells can be paramount when designing biomaterial-based therapies for metabolic disorders, including osteoporosis. For example, it was previously reported by various groups, including ours, that miR-21 promotes osteogenesis, but also acts as a regulator of osteoclastogenesis and a promoter of osteoclast differentiation [22,42]. Similarly, it was indicated that miR-17-5p improves cell proliferation and osteoblastic differentiation of human multipotent stromal cells. Furthermore, it was shown that decreased expression of miR-17-5p is correlated with worse clinical characteristics and poor survival rate in patients with non-traumatic osteonecrosis [43]. Instead, miR-7 levels have not been thoroughly described in terms of osteoblast biology, and it was found that it can be differentially expressed, depending on bone metabolism [44,45]. It seems that the inhibition of miR-7 targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR) may inhibit the development of osteoporosis [45]. This conclusion is in agreement with the profile of miR-124, which is an essential molecule regulating osteoclastogenesis. The overexpression of miR-124 could inhibit osteoclastogenic differentiation of bone-marrow-derived monocyte cells, indicating that the inhibition of miR-124 expression might be a potential therapeutic strategy for the treatment of osteoporosis [46].

Pro-osteogenic properties of TiO<sub>2</sub> layers obtained by ALD can also be expressed by decreased mitochondrial membrane potential. This is the characteristic feature of differentiated MC3TC3-E1 osteoblasts, as described by Guntur et al. Moreover, a lack of a significant increase in mitochondrial volume fraction during the differentiation of MC3T3-E1 cells to osteoblasts was also observed, which can be explained by the fact that differentiated osteoblasts are not programmed to use oxidative phosphorylation to supply their ATP demand [47]. Our results indicated that TiO<sub>2</sub> coatings obtained by ALD can play the role of a regulator mitochondrial adaptation and can exert anti-apoptotic

effects toward osteoblast precursors. This suggests that their potential application in metabolic- and age-related bone diseases.

## 5. Conclusions

Nanoscale and biomimetic TiO<sub>2</sub> coatings obtained by ALD have displayed promising pro-osteogenic properties, activating the osteogenic biomarkers associated with proper bone remodelling and regulating mitochondrial activity. We demonstrated that TiO<sub>2</sub> coverings significantly promote the adhesion of preosteoblast cells and inhibit the invasion of preosteoclasts, lowering the levels of microRNAs (miR-7 and miR-124), which are crucial for osteoclast survival and maturation. The TiO<sub>2</sub> coatings obtained by ALD can be a suitable layer for enhancing the osteogenic properties and biofunctionality of substrates used in the field of orthopaedics, especially in terms of metabolic- and age-related bone diseases.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/1996-1944/13/21/4817/s1>, Figure S1: The XRD data of: TiO<sub>2</sub> coating obtained by ALD on the cover slip (a), blank cover slip as a reference (b). Table S1: The list of oligonucleotides used for determination of specific transcripts.

**Author Contributions:** Conceptualisation, A.S. (Agnieszka Smieszek), A.S. (Aleksandra Seweryn), M.G.; methodology, A.S. (Agnieszka Smieszek), K.M. (Klaudia Marcinkowska), M.S., A.S. (Aleksandra Seweryn), B.S.W., P.K., K.L.-J.; software, A.S. (Agnieszka Smieszek), K.M. (Klaudia Marcinkowska), A.S. (Aleksandra Seweryn); validation, A.S. (Agnieszka Smieszek); K.M. (Klaudia Marcinkowska), A.S. (Aleksandra Seweryn), K.L.-J.; formal analysis, A.S. (Agnieszka Smieszek), A.S. (Aleksandra Seweryn), K.L.-J., M.G.; investigation, K.M. (Klaudia Marcinkowska), M.S., B.S.W., P.K.; resources, M.G., K.M. (Krzysztof Marycz); data curation, A.S. (Agnieszka Smieszek), K.M. (Klaudia Marcinkowska), A.S. (Aleksandra Seweryn), K.L.-J., B.S.W.; writing—original draft preparation, A.S. (Agnieszka Smieszek), A.S. (Aleksandra Seweryn), K.L.-J., M.G.; writing—review and editing, A.S. (Agnieszka Smieszek), A.S. (Aleksandra Seweryn), K.L.-J., M.G.; visualisation, A.S. (Agnieszka Smieszek), A.S. (Aleksandra Seweryn); supervision, A.S. (Agnieszka Smieszek), K.Marycz, M.G.; project administration, A.S. (Agnieszka Smieszek), A.S. (Aleksandra Seweryn), M.G., K.Marycz; funding acquisition, M.G., K.M. (Krzysztof Marycz). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The financial support from the National Science Centre over the course of the Harmonia 10 project, entitled ‘New, two-stage scaffolds based on calcium nanoapatite (nHAP) incorporated with iron nano-oxides (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) with the function of controlled release of miRNA in a static magnetic field for the regeneration of bone fractures in osteoporotic patients’ (Grant No. UMO 2017/26/M/NZ5/01184) is gratefully acknowledged.

**Acknowledgments:** We are grateful to Ariadna Pielok for helping with qPCR measurements and to Aleksandra Wierzbicka for support with XRR measurements.

**Conflicts of Interest:** The authors report no conflicts of interest in this work.

## References

- Landgraeber, S.; Jäger, M.; Jacobs, J.J.; Hallab, N.J. The pathology of orthopedic implant failure is mediated by innate immune system cytokines. *Mediat. Inflamm.* **2014**, *2014*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Minagar, S.; Berndt, C.C.; Wang, J.; Ivanova, E.; Wen, C. A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 2875–2888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Smieszek, A.; Donesz-Sikorska, A.; Grzesiak, J.; Krzak, J.; Marycz, K. Biological effects of sol-gel derived ZrO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub>/ZrO<sub>2</sub> coatings on stainless steel surface—In vitro model using mesenchymal stem cells. *J. Biomater. Appl.* **2014**, *29*, 699–714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Śmieszek, A.; Szydlarska, J.; Mucha, A.; Chrapiec, M.; Marycz, K. Enhanced cytocompatibility and osteoinductive properties of sol-gel-derived silica/zirconium dioxide coatings by metformin functionalization. *J. Biomater. Appl.* **2017**, *32*, 570–586. [[CrossRef](#)]
- Peron, M.; Bin Afif, A.; Dadlani, A.; Berto, F.; Torgersen, J. Comparing physiologically relevant corrosion performances of Mg AZ31 alloy protected by ALD and sputter coated TiO<sub>2</sub>. *Surf. Coatings Technol.* **2020**, *395*, 125922. [[CrossRef](#)]
- Brogna, A.; Nasri, I.F.M.A.; Bricchi, B.R.; Bassi, A.L.; Gauchotte-Lindsay, C.; Ghidelli, M.; Lidgi-Guigui, N. Highly sensitive detection of estradiol by a SERS sensor based on TiO<sub>2</sub> covered with gold nanoparticles. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2020**, *11*, 1026–1035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Oviroh, P.O.; Akbarzadeh, R.; Pan, D.; Coetzee, R.A.M.; Jen, T.-C. New development of atomic layer deposition: Processes, methods and applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2019**, *20*, 465–496. [[CrossRef](#)]
8. Cremers, V.; Puurunen, R.L.; Dendooven, J. Conformality in atomic layer deposition: Current status overview of analysis and modelling. *Appl. Phys. Rev.* **2019**, *6*, 021302. [[CrossRef](#)]
9. Miikkulainen, V.; Leskelä, M.; Ritala, M.; Puurunen, R.L. Crystallinity of inorganic films grown by atomic layer deposition: Overview and general trends. *J. Appl. Phys.* **2013**, *113*, 021301. [[CrossRef](#)]
10. Jeske, H. Atomic Layer Deposition on Biological Macromolecules: Metal Oxide Coating of Tobacco Mosaic Virus and Ferritin. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1172–1177.
11. Dobrzański, L.A.; Dobrzańska-Danikiewicz, A.D.; Szindler, M.; Achteлик-Franczak, A.; Pakieła, W. Atomic layer deposition of TiO<sub>2</sub> onto porous biomaterials. *Arch. Mater. Sci. Eng.* **2015**, *75*, 5–11.
12. Liu, L.; Bhatia, R.; Webster, T.J. Atomic layer deposition of nano-TiO<sub>2</sub> thin films with enhanced biocompatibility and antimicrobial activity for orthopedic implants. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 8711–8723. [[CrossRef](#)]
13. Yang, F.; Chang, R.; Webster, T.J. Atomic layer deposition coating of tio2 nano-thin films on magnesium-zinc alloys to enhance cytocompatibility for bioresorbable vascular stents. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 9955–9970. [[CrossRef](#)]
14. Basiaga, M.; Staszuk, M.; Walke, W.; Opilski, Z. Mechanical properties of atomic layer deposition (ALD) TiO<sub>2</sub> layers on stainless steel substrates. *Materwiss. Werksttech.* **2016**, *47*, 512–520. [[CrossRef](#)]
15. Motola, M.; Capek, J.; Zappe, R.; Bacova, J.; Hromadko, L.; Bruckova, L.; Ng, S.; Handl, J.; Spatz, Z.; Knotek, P.; et al. Thin TiO<sub>2</sub> Coatings by ALD Enhance the Cell Growth on TiO<sub>2</sub> Nanotubular and Flat Substrates. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3*, 6447–6456. [[CrossRef](#)]
16. Kalantzis, S.; Veziroglu, S.; Kohlhaas, T.; Flörke, C.; Mishra, Y.K.; Wiltfang, J.; Açil, Y.; Faupel, F.; Aktas, O.; Gülses, A. Early osteoblastic activity on TiO<sub>2</sub> thin films decorated with flower-like hierarchical Au structures. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 28935–28940. [[CrossRef](#)]
17. Bricchi, B.R.; Ghidelli, M.; Mascaretti, L.; Zapelli, A.; Russo, V.; Casari, C.; Terraneo, G.; Alessandri, I.; Ducati, C.; Bassi, A.L. Integration of plasmonic Au nanoparticles in TiO<sub>2</sub> hierarchical structures in a single-step pulsed laser co-deposition. *Mater. Des.* **2018**, *156*, 311–319. [[CrossRef](#)]
18. Damiani, L.; Eales, M.G.; Nobbs, A.H.; Su, B.; Tsimbouri, P.M.; Salmeron-Sanchez, M.; Dalby, M.J. Impact of surface topography and coating on osteogenesis and bacterial attachment on titanium implants. *J. Tissue Eng.* **2018**, *9*, 1–16. [[CrossRef](#)]
19. Mendonca, G.; Mendonça, D.B.; Simões, L.G.; Araujo, A.L.; Leite, E.R.; Duarte, W.R.; Aragão, F.J.; Cooper, L.F. The effects of implant surface nanoscale features on osteoblast-specific gene expression. *Biomaterials* **2009**, *30*, 4053–4062. [[CrossRef](#)]
20. Wierzbicka, A.; Żytkiewicz, Z.; Sobańska, M.; Kłosek, K.; Łusakowska, E. Influence of substrate on crystallographic quality of AlGaIn/GaN HEMT structures grown by plasma-assisted MBE. *Acta Phys. Pol. A* **2012**, *121*, 899–902. [[CrossRef](#)]
21. Seweryn, A.; Pielok, A.; Lawniczak-Jablonska, K.; Pietruszka, R.; Marcinkowska, K.; Sikora, M.; Witkowski, B.S.; Godlewski, M.; Marycz, K.; Śmieszek, A. Zirconium oxide thin films obtained by atomic layer deposition technology abolish the anti-osteogenic effect resulting from miR-21 inhibition in the pre-osteoblastic MC3T3 cell line. *Int. J. Nanomed.* **2020**, *15*, 1595–1610. [[CrossRef](#)]
22. Śmieszek, A.; Marcinkowska, K.; Pielok, A.; Sikora, M. The Role of miR-21 in Osteoblasts—Osteoclasts. *Cells* **2020**, *9*, 479. [[CrossRef](#)]
23. Śmieszek, A.; Stręk, Z.; Kornicka, K.; Grzesiak, J.; Weiss, C.; Marycz, K. Antioxidant and anti-senescence effect of metformin on mouse olfactory ensheathing cells (mOECs) may be associated with increased brain-derived neurotrophic factor levels—An ex vivo study. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 872. [[CrossRef](#)]
24. Seweryn, A.; Pietruszka, R.; Witkowski, B.S.; Wierzbicka, A.; Jakiela, R.; Sybilski, P.; Godlewski, M. Structural and Electrical Parameters of ZnO Thin Films Grown by ALD with either Water or Ozone as Oxygen Precursors. *Crystals* **2019**, *9*, 554. [[CrossRef](#)]
25. Huang, J.; Xiong, J.; Liu, J.; Zhu, W.; Chen, J.; Duan, L.; Zhang, J.; Wang, D. Evaluation of the novel three-dimensional porous poly (L-lactic acid)/nanohydroxyapatite composite scaffold. *Biomed. Mater. Eng.* **2015**, *26*, S197–S205.

26. Marycz, K.; Śmieszek, A.; Trynda, J.; Sobierajska, P.; Targonska, S.; Grosman, L.; Wiglusz, R.J. Nanocrystalline hydroxyapatite loaded with resveratrol in colloidal suspension improves viability, metabolic activity and mitochondrial potential in human adipose-derived mesenchymal stromal stem cells (hASCs). *Polymers* **2019**, *11*, 92. [[CrossRef](#)]
27. Śmieszek, A.; Marycz, K.; Szustakiewicz, K.; Kryszak, B.; Targonska, S.; Szyszka, K.; Watras, A.; Wiglusz, R.J. New approach to modification of poly (L-lactic acid) with nano-hydroxyapatite improving functionality of human adipose-derived stromal cells (hASCs) through increased viability and enhanced mitochondrial activity. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *98*, 213–226. [[CrossRef](#)]
28. Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **1987**, *162*, 156–159. [[CrossRef](#)]
29. Śmieszek, A.; Kornicka, K.; Szłapka-Kosarzewska, J.; Androvic, P.; Valihrach, L.; Langerova, L.; Rohlova, E.; Kubista, M.; Marycz, K. Metformin Increases Proliferative Activity and Viability of Multipotent Stromal Stem Cells Isolated from Adipose Tissue Derived from Horses with Equine Metabolic Syndrome. *Cells* **2019**, *8*, 80. [[CrossRef](#)]
30. Crist, B. *Handbooks of Monochromatic XPS Spectra*; XPS International LLC: Mountain View, CA, USA, 2005; Volume 2.
31. Zhu, L.; Lu, Q.; Lv, L.; Wang, Y.; Hu, Y.; Deng, Z.; Lou, Z.; Hou, Y.; Teng, F. Ligand-free rutile and anatase TiO<sub>2</sub> nanocrystals as electron extraction layers for high performance inverted polymer solar cells. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 20084–20092. [[CrossRef](#)]
32. Diebold, U.; Madey, T.E. TiO<sub>2</sub> by XPS. *Surf. Sci. Spectra* **1996**, *4*, 227–231. [[CrossRef](#)]
33. Gieraltowska, S.; Wachnicki, L.; Witkowski, B.S.; Mroczynski, R.; Dluzewski, P.; Godlewski, M. Characterization of dielectric layers grown at low temperature by atomic layer deposition. *Thin Solid Films* **2015**, *577*, 97–102. [[CrossRef](#)]
34. Lv, L.; Li, K.; Xie, Y.; Cao, Y.; Zheng, X. Enhanced osteogenic activity of anatase TiO<sub>2</sub> film: Surface hydroxyl groups induce conformational changes in fibronectin. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *78*, 96–104. [[CrossRef](#)]
35. Li, J.G.; Ishigaki, T. Brookite → rutile phase transformation of TiO<sub>2</sub> studied with monodispersed particles. *Acta Mater.* **2004**, *52*, 5143–5150. [[CrossRef](#)]
36. Rossi, S.; Tirri, T.; Paldan, H.; Kuntsi-Vaattovaara, H.; Tulamo, R.; Närhi, T.O. Peri-implant tissue response to TiO<sub>2</sub> surface modified implants. *Clin. Oral Implant. Res.* **2008**, *19*, 348–355. [[CrossRef](#)]
37. Park, S.-J.; Lee, J.-P.; Jang, J.S.; Rhu, H.; Yu, H.; You, B.Y.; Kim, C.S.; Kim, K.J.; Cho, Y.J.; Baik, S.; et al. In situ control of oxygen vacancies in TiO<sub>2</sub> by atomic layer deposition for resistive switching devices. *Nanotechnology* **2013**, *24*, 295202. [[CrossRef](#)]
38. Hamlekhan, A.; Shokuhfar, T.; Chang, J.-Y.; Choi, C.K.; Sukotjo, C.; Friedrich, C. Biophysical evaluation of cells on nanotubular surfaces: The effects of atomic ordering and chemistry. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 3737–3748. [[CrossRef](#)]
39. Rivera-Chacon, D.M.; Alvarado-Velez, M.; Acevedo-Morantes, C.; Singh, S.P.; Gultepe, E.; Nagesha, D.; Sridhar, S.; Ramirez-Vick, J.E. Fibronectin and vitronectin promote human fetal osteoblast cell attachment and proliferation on nanoporous titanium surfaces. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2013**, *9*, 1092–1097. [[CrossRef](#)]
40. Min, S.-K.; Kang, H.K.; Jung, S.Y.; Jang, D.H.; Min, B.-M. A vitronectin-derived peptide reverses ovariectomy-induced bone loss via regulation of osteoblast and osteoclast differentiation. *Cell Death Differ.* **2017**, *25*, 268–281. [[CrossRef](#)]
41. Vercellino, M.; Ceccarelli, G.; Cristofaro, F.; Balli, M.; Bertoglio, F.; Bruni, G.; Benedetti, L.; Avanzini, M.A.; Imbriani, M.; Visai, L. Nanostructured TiO<sub>2</sub> surfaces promote human bone marrow mesenchymal stem cells differentiation to osteoblasts. *Nanomaterials* **2016**, *6*, 124. [[CrossRef](#)]
42. Hu, C.-H.; Sui, B.-D.; Du, F.-Y.; Shuai, Y.; Zheng, C.-X.; Zhao, P.; Yu, X.-R.; Jin, Y. Mir-21 deficiency inhibits osteoclast function and prevents bone loss in mice. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Hu, C.-H.; Sui, B.-D.; Du, F.-Y.; Shuai, Y.; Zheng, C.-X.; Zhao, P.; Yu, X.-R.; Jin, Y. miR-17-5p modulates osteoblastic differentiation and cell proliferation by targeting SMAD7 in non-traumatic osteonecrosis. *Exp. Mol. Med.* **2014**, *46*, e107–e108.
44. Yavropoulou, M.P.; Yovos, J.G. The ‘dark matter’ of DNA and the regulation of bone metabolism: The role of non-coding rnas. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **2018**, *18*, 18–31.

45. Fan, J.-B.; Liu, W.; Zhu, X.-H.; Cui, S.-Y.; Cui, Z.-M.; Zhao, J.-N. microRNA-7 inhibition protects human osteoblasts from dexamethasone via activation of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol. Cell. Biochem.* **2019**, *460*, 113–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Tang, L.; Yin, Y.; Liu, J.; Li, Z.; Lu, X. MIR-124 Attenuates Osteoclastogenic Differentiation of Bone Marrow Monocytes Via Targeting Rab27a. *Cell. Physiol. Biochem.* **2017**, *43*, 1663–1672. [[CrossRef](#)]
47. Guntur, A.R.; Gerencser, A.A.; Le, P.T.; DeMambro, V.E.; Bornstein, S.A.; Mookerjee, S.A.; Maridas, D.E.; Clemmons, D.E.; Brand, M.D.; Rosen, C.J. Osteoblast-like MC3T3-E1 Cells Prefer Glycolysis for ATP Production but Adipocyte-like 3T3-L1 Cells Prefer Oxidative Phosphorylation. *J. Bone Miner. Res.* **2018**, *33*, 1052–1065. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).