



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
Cel i przedmiot badań.....	6
Układ pracy.....	11
Lista skrótów	14
Rozdział 1.....	15
1.1. Hierarchiczna budowa tkanki kostnej	16
1.1.1. Organiczny komponent tkanki kostnej.....	18
1.1.2. Nieorganiczny komponent tkanki kostnej	20
1.1.3. Struktura krystaliczna hydroksyapatytu	20
1.2. Proces remodelacji tkanki kostnej	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
1.3. Motywacja.....	39
Rozdział 2.....	41
2.1. HfO₂ otrzymywany metodą ALD.....	42
5.1. Osadzanie cienkich warstw atomowych: ALD	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 67	
3.2.	Wzrost warstw HfO ₂ 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 środowisku biologicznym.....	75
4.2.	HfO ₂ otrzymywany metodą ALD w symulowanym środowisku fizjologicznym 77	
4.3.	Podsumowanie etapu optymalizacji procesów ALD	83
4.3.1.	Model biomineralizacji tkanki kostnej	85
Rozdział 5	88
5.1.	HfO ₂ otrzymywany metodą ALD RTP	89

5.1.1. Charakteryzacja fizykochemiczna HfO₂ ALD-woda po procesie RTP

89

5.1.2. Modyfikowany termicznie HfO₂ w symulowanym środowisku fizjologicznym 92

Rozdział 6	95
6.1. Charakteryzacja chemiczna a-CaP na powierzchni HfO₂	96
6.2. Statystyczna analiza wzrostu populacji a-CaP na powłokach HfO₂	107
6.2. Dyskusja mechanizmu nukleacji struktur BA	109
Rozdział 7	115
Podsumowanie	117
Dorobek naukowy autorki	119
Spis publikacji naukowych	120
Spis zgłoszeń patentowych	121
Wybrane nagrody i wyróżnienia	123
Bibliografia	126
Załączone publikacje	150

Streszczenie

Przedstawiona dysertacja stanowi opis procesu badawczego przeprowadzonego przez autorkę. Główną tezę postawioną w pracy było zoptymalizowanie technologii osadzania cienkich warstw atomowych 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 HfO_2 może w sposób spontaniczny krystalizować BA.

Do oceny potencjału funkcjonalności powłoki 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°C), a następnie przy pomocy metod fizycznych badano czy na powierzchni obecne są struktury mineralne. Okazało się, że możliwe jest przygotowanie powierzchni 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 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 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 HfO_2 .

To assess the functional potential of the 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°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 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 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) (HfO_2) prowadzące do zaprojektowania biomimetycznej powłoki implantu kostnego. Efektem opisywanych działań badawczo-naukowych autorki dysertacji będzie nanopowłoka 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 (α -CaP), prekursora hydroksyapatytu (HA)¹. HA jest to polikrystaliczna

¹ W ramach rozważań naukowych zostanie zaproponowany innowacyjny model osteointegracji. Na pewnym etapie biomineralizacji kluczowe jest występowanie α -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 zatłoczenia² 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 HfO₂ jest podstawowym zadaniem badawczym, a zrozumienie i opis zjawisk fizycznych prowadzących do pro-apatyto twórczych właściwości powierzchni w funkcji

² 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 HfO_2 osadzanego metodą ALD,
- 3) biomimetyczna optymalizacja procesu przygotowania pro-apatyto twórczej warstwy HfO_2 ,
- 4) obserwacja, za pomocą fizycznych metod charakteryzacji powierzchni ciała stałego, heterogennej biomineralizacji α -CaP na powierzchni 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 osteo-integracyjnych. 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 HfO₂ 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 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 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
- HfO₂ – 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
- TiCl₄ – czterochlorek tytanu
- TiO₂ – tlenku tytanu (IV)
- XPS – spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania rentgenowskiego
- XRD – dyfrakcja promieniowania X
- ZrO₂ – 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; glukozoaminoglikany, 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 strukturalnie³ 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].

³ 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- (PO_4^{3-}), piro- ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$), oraz poli- (PO_3)_nⁿ⁻ 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 (CaHPO_4 ; MCP),
- β -triwodorofosforan wapnia ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; β -TCP),
- fosforan oktawapniowy ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 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 Ca^{2+} w strukturze HA może być zastąpiony dwu- lub jednowartościowymi kationami Mg^{2+} , N^+ , K^+ lub anionami CO_3^- , Cl^- , F^- [29]–[31]. Aniony fosforanowe mogą zastępować aniony C, As, V, S. Grupy hydroksylowe podstawić mogą aniony O_2H^- , CO_3^- , F^- , Cl^- . Zarówno w miejscach Ca lub grup OH mogą tworzyć się luki [32]. P może występować w postaci PO_4^{3-} lub HPO_4^{2-} . W strukturze krystalograficznej HA możliwe jest umiejscowienie jonów 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 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 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 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 (IL-1, IL-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 okołooperacyjne w krótko i długoterminowej perspektywie czasu.

1.2.2. Problemy okołooperacyjne 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.

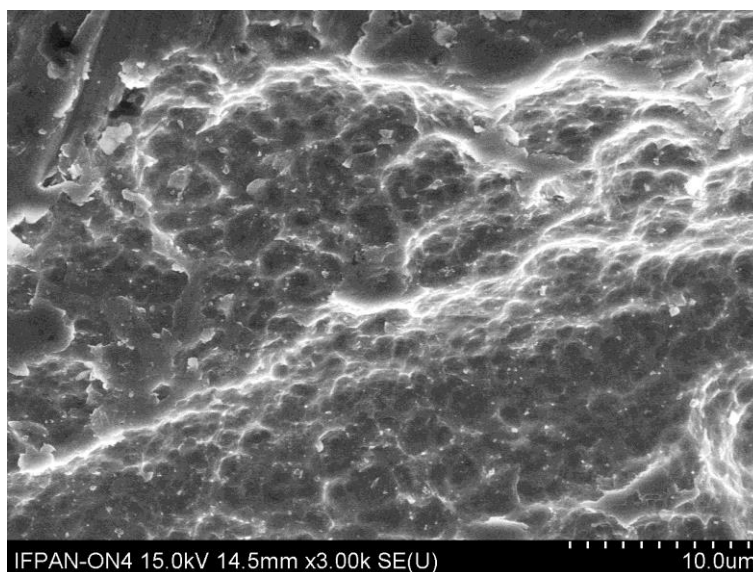
Kluczowe badania zaplanowane i przeprowadzone przez autorkę dysertacji, które zostaną przedstawione w dalszej części pracy zostały ukierunkowane na opracowanie biomimetycznej powłoki wspierającej integracją powierzchni implantu metalowego z tkanką kostną poprzez aktywne wsparcie naturalnych procesów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

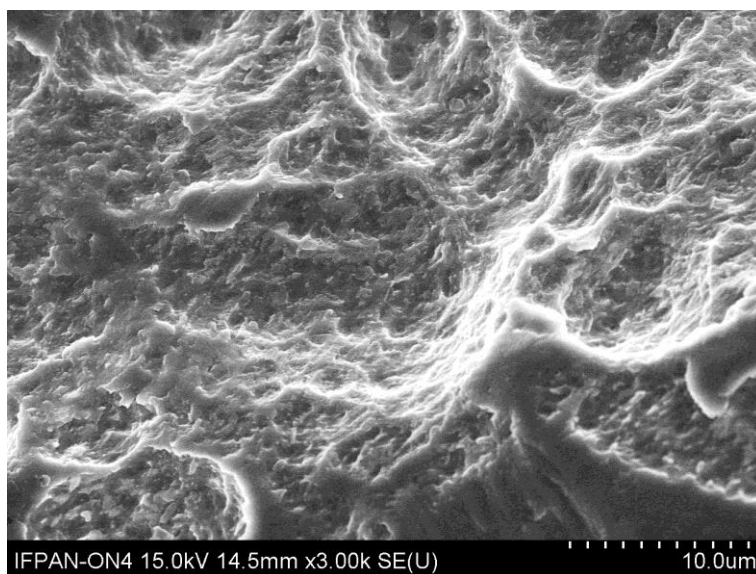
Bezpieczeństwo użytkowania implantów znajdujących się w ciele pacjenta definiuje podstawową właściwość mechaniczną powłoki implantów, czyli jej nierozwalne połączenie z materiałem implantu. Wiadomo również, że osteointegracja powierzchni implantu jest znacznie wydajniejsza, jeżeli powierzchnia implantu 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) (TiO_2). Początkowo sądzono się, że tak powstała warstwa 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 TiO_2 . Stąd najwięcej publikacji o biowłaściwościach cienkich warstw tlenkowych dotyczy właśnie TiO_2 . Wiadomo, że 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 TiO_2 , których proces wytwarzania jest dobrze zoptymalizowany. 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 TiO_2 zarówno amorficznych jak i krystalicznych. Warstwy krystaliczne otrzymywane są w strukturze anatazu albo rutylu [68].

Znane są właściwości mechaniczne warstw 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 TiO_2 wzrastanej z TiCl_4 i wody [70]. Najkorzystniejsze parametry barierowe wykazano dla powłoki osadzonej w 100°C i 200°C , natomiast siła adhezji najwyższa była dla temperatur wzrostu warstwy 200°C i 300°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 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 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].

TiO₂ jest przedmiotem licznych badań naukowych, ale też inne tlenki metali przejściowych tj. ZrO₂, HfO₂ 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 ZrO₂ efektywniej niż warstwa TiO₂ zwiększała wytrzymałość mechaniczną kompozytu, zmniejszając podatność na naprężenia [77]. Najlepsze parametry barierowe wśród analizowanych tlenków metali przejściowych (Ti, Zr, Hf) zaobserwowano dla HfO₂ [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 TiO₂ [79], [80]. Wpływ krystalizacji TiO₂ 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 TiO₂ 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 TiO₂ wzrastanego z TiCl₄ 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, TiO₂ 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,⁴ 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-

⁴ 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-woda⁵ jak i ALD-ozon⁶. 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 .

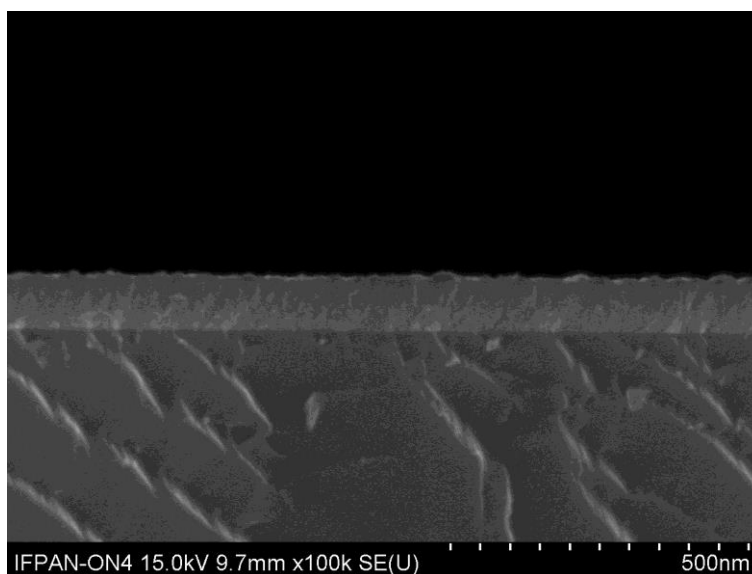
Powyżej wymienione tlenki metali przejściowych to materiały otrzymywane metodą ALD [68], w niektórych przypadkach również w badane w kierunku biologicznych zastosowań. Warstwy tlenków metali przejściowych wytwarzane metodą ALD cechują dobrze zdefiniowane właściwości elektryczne [86] co więcej pokazano, 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

⁵ 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

⁶ 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.

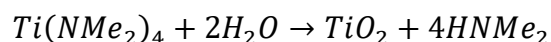


Rys. 3: Zdjęcie SEM amorficznej powłoki ZrO_2 otrzymanej w niskotemperaturowym procesie ALD. Przekrój poprzeczny na podłożu krzemowym. Detektor elektronów wtórnych, 15 kV AV, powiększenie 100000 x.

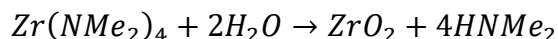
Temperatura procesu ALD jest jednym z kluczowych parametrów definiujących właściwości warstw ALD. Okazało się, że w $100^\circ C$ możliwe jest otrzymanie stechiometrycznej powłoki TiO_2 o strukturze amorficznej [5].

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.

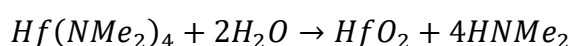
Powłoka TiO_2 nie była toksyczna dla komórek pre-osteoblastycznych MC3T3, ale co ciekawe wpływała spowalniająco na rozwój prekursorów osteoklastów z linii 4B12, czyli komórek kościogubnych. Zwiększenie poziomu ekspresji genów *Opn*, *miR-17*, *miR-21* i spowolnienie *miR-124* świadczy o indukowaniu różnicowania 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 ZrO₂ wykonanego metodą ALD-woda jako materiału ze wskazaniem dla pacjentów z OS.

Kontynuując badania tlenków metali przejściowych postanowiono ocenić właściwości biologiczne HfO₂. Niezwykle obiecujące wyniki wspólnych badań fizykochemicznych i biologicznych powłok HfO₂ 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 HfO₂ wykonanego metodą ALD w implantologii. Do biologicznych właściwości HfO₂ 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 HfO₂, w szczególności w kontekście chirurgii ortopedycznej, była znikoma.

Gładka, amorficzna warstwa HfO₂ 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 HfO₂ w procesie sekwencyjnego podawania prekursorów do komory reakcyjnej można opisać reakcją podwójnej wymiany:

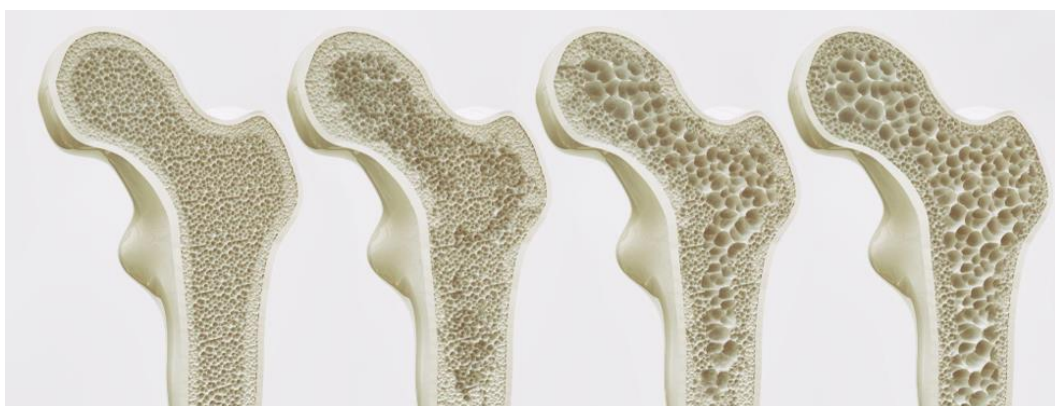


Sprawdzany był poziom ekspresji genów typowych dla osteogenezy prekursorów osteoblastów (MC3T3-E1) i osteoklastów (4B12), oraz makrofagów, które są niezwykle

ważne w reakcji odpornościowej organizmu, czyli odpowiedzialne za występowanie stanu zapalnego. Niestechiometryczny, amorficzny 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 tkance⁷.

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

⁷ Źródło 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 osteointegracji⁸.

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.

⁸ Źródło 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 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. HfO₂ 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. HfO₂ 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 SiO₂ w strukturach tranzystorowych pozwolił na gwałtowny postęp w zakresie miniaturyzacji tranzystorów polowych w elektronice

Pierwsze doniesienia o osadzeniu warstwy HfO₂ metodą ALD pochodzą z 1996 roku i są to prace Kukli [111] i Kattelusa [112]. Autor pracy [111] osadził warstwę HfO₂ w 300°C z prekursorem metalu czterochlorkiem hafnu (HfCl₄) 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 HfO₂ 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 HfCl₄ 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 HfO₂ osadzili warstwę z HfCl₄ 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].

HfO₂ 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 HfO_2 mogą występować pojedynczo, mogą również współistnieć w jednej strukturze [113], [135], [136]. Jednak warstwa ALD HfO_2 w procesach ALD z organicznych prekursorów występuje zazwyczaj w strukturze nieuporządkowanej, amorficznej, zwłaszcza gdy HfO_2 osadzany jest w niskich temperaturach [6], [86], [124]. Zjawisko krystalizacji warstw 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 (H_2O i 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, reagentami⁹) 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

⁹ 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]

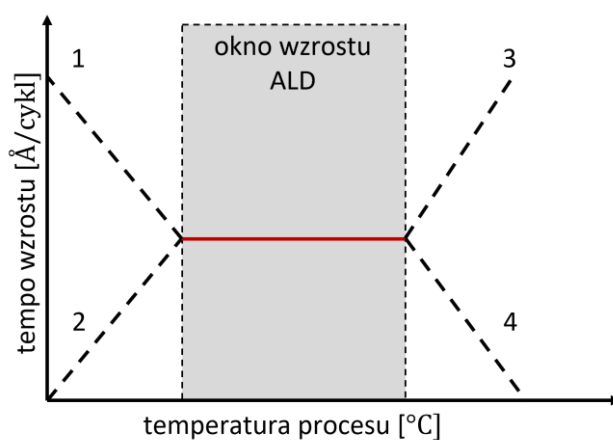
$$a = a_m \frac{K[A]}{1 + K[A]}$$

W równaniu przyjęto oznaczenia: a – adsorpcja rzeczywista a_m – adsorpcja odpowiadająca wypełnieniu 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,¹⁰
- 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

¹⁰ 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 Fluid, 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 ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	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 rocznie¹¹.

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 ν , zgodnej z oscylatorem, który ją wytwarza. Teoria

¹¹ 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 ν - 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 Φ 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 ~ 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 głębokościowe¹².

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

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

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_{α} 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_{α} , 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

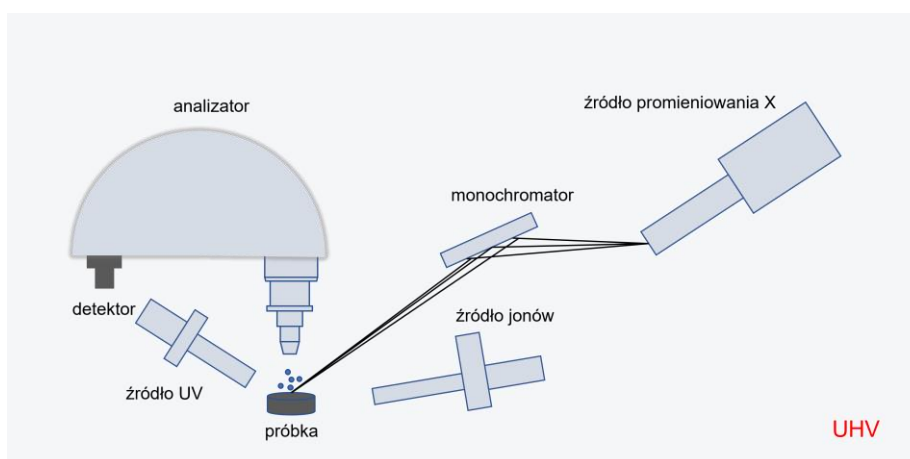
¹² Większość pomiarów XPS przedstawionych w tej rozprawie ograniczała się do badań powierzchni.

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

¹⁴ p – ciśnienie (Pa)

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

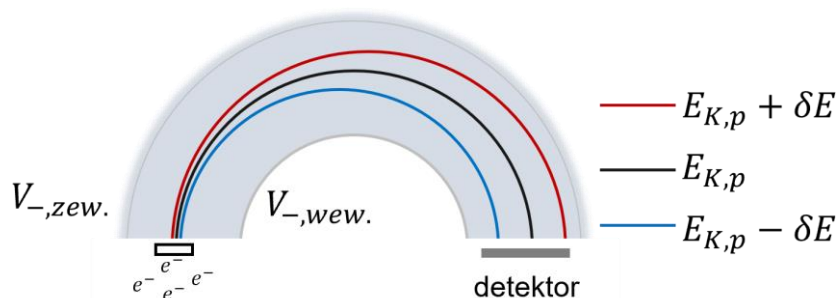
powierzchni emitowane są elektrony, nazywane fotoelektronami, we wszystkich kierunkach. Strumień elektronów przeprowadzany jest przez układ soczewek optycznych, definiujący zakres kątowy elektronów wpadających do szczeliny analizatora. Podłużna szczelina o rozdzielczości kątowej typowo o wartości $\gamma = 15^\circ$ w kierunku podłużnym i zaniedbywalnej szerokości kątowej θ 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

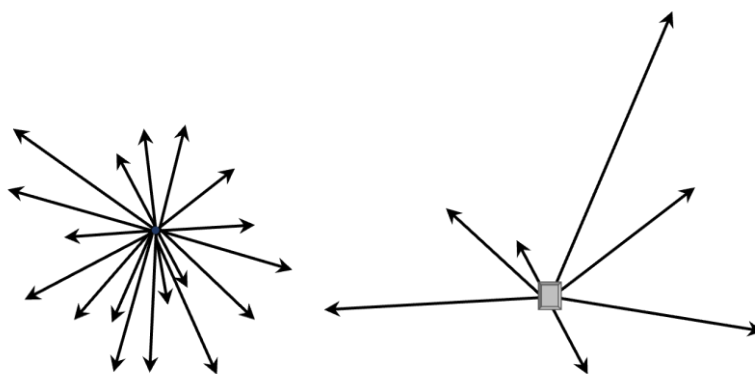
znaczący wkład do rozdzielczości urządzenia. Nowoczesna aparatura XPS posiadać może rozdzielczość dającą 0.5 eV FWHM linii Ag 3d_{5/2}.



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.

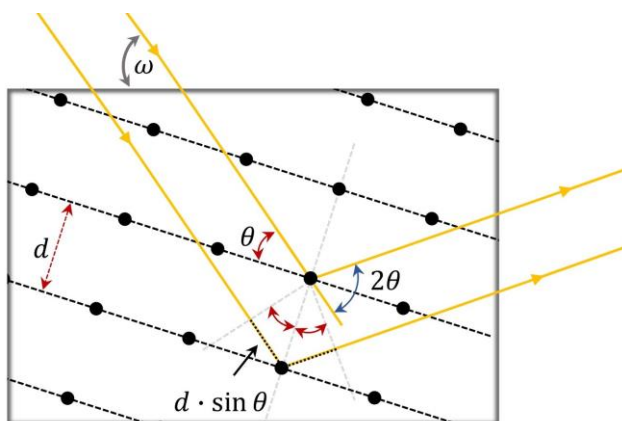


Rys. 9: Rozpraszanie promieniowania X na pojedynczym atomie (po lewej) i na kryształach (po prawej) [162].

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.



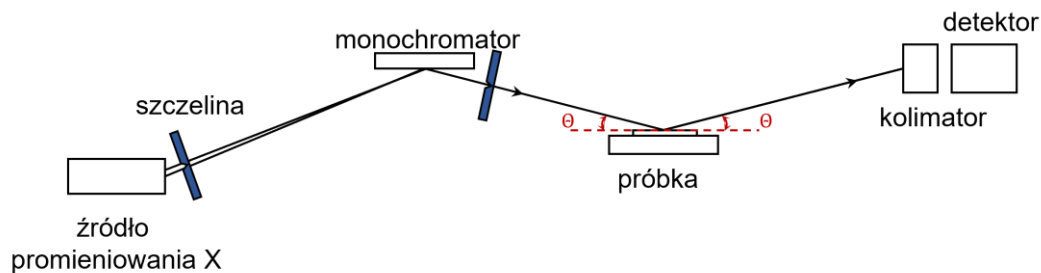
Rys. 10: Różnica dróg optycznych wiązki światła w sieci periodycznie ułożonych atomów.

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 θ 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 λ 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.

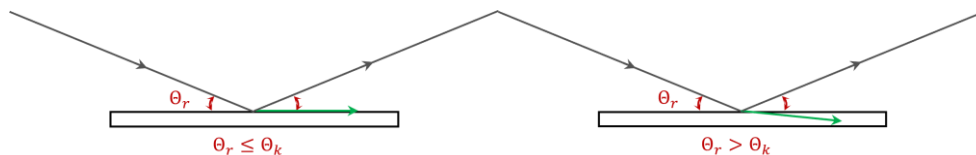


Rys. 11: Schemat pomiaru XRR. θ – kąt padania wiązki promieniowania X. Zgodnie z ref. [163].

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 (Θ_i) i załamania Θ_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 Θ_i wiązki jest większy bądź równy od pewnego kąta krytycznego Θ_k następują zjawisko całkowitego odbicia fali od powierzchni płaszczyzny lub fala propaguje równoległe do jej powierzchni. Po przekroczeniu wartości kąta krytycznego Θ_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 θ_k $1 \div 3^\circ$ są źródłem informacji o materiale. Stopniowo wnikająca wiązka w głąb próbki oscyluje na niejednorodnościach powierzchni tj. gęstości elektronowej materiału ρ 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].

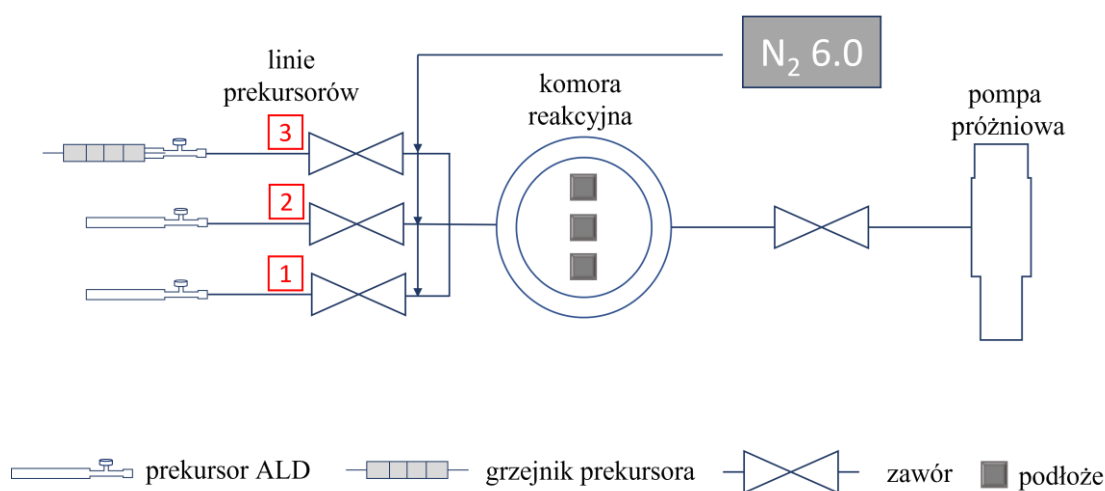
5.4. Aparatura technologiczno badawcza

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 wprowadzanymi prekursorami. Są to fazy płukania, czyli czas podczas których z przestrzeni komory reakcyjnej usuwane są ligandy pozostałe po zajściu pojedynczej reakcji osadzania.

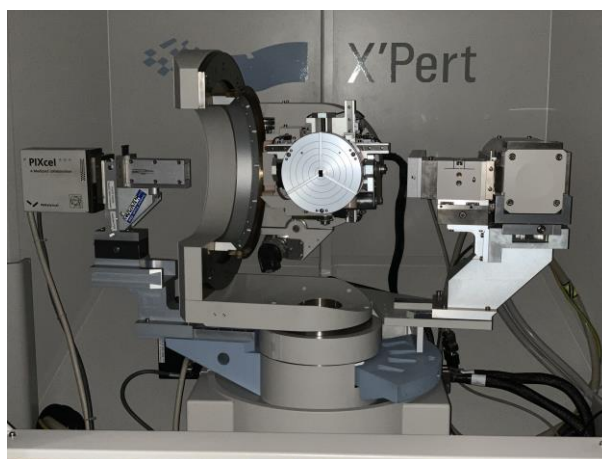


Rys. 13: Schemat układu technologicznego do osadzania cienkich warstw atomowych metodą ALD.

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 PIXcel¹⁶

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.

¹⁶ 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_{α} 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 HfO₂

W rozdziale pierwszym streszczone zostały wyniki fizykochemicznej i biologicznej charakteryzacji warstw ALD tlenków metali przejściowych, które zostały opublikowane w pracach odpowiednio dla TiO₂ [5], ZrO₂ [4] i HfO₂ [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 HfO₂ wyróżnia największy potencjał aplikacyjny w obszarze spersonalizowanej medycyny regeneracyjnej, ukierunkowanej dla pacjentów z OS. Zdecydowano więc, że kolejne badania skoncentrują się głównie na HfO₂, 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 HfO₂ 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 HfO₂ 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 HfO₂. 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].

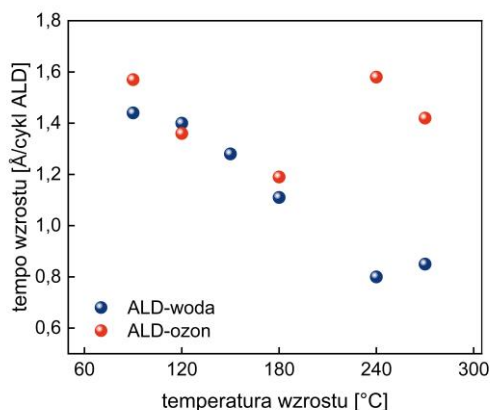
3.2. Wzrost warstw HfO₂ metodą ALD-ozon

Po zoptymalizowaniu wzrostu warstw ZnO metodą ALD-ozon kolejnym etapem była ocena jakości warstw HfO₂ 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 ((CH₃)₂N)₄Hf, jak wynika z jego budowy bogaty w grupy metylowe: -CH₃, 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 HfO_2 w procesach ALD z różnymi prekursorami tlenowymi. Tempo wzrostu HfO_2 metodą ALD-ozon jest, w zakresie temperatur od 90°C do 180°C , porównywalne do wartości uzyskanych dla metody ALD-woda. W temperaturach powyżej 180°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 ($1.6 \text{ \AA}/\text{cykl}$ dla metody ALD-ozon i $0.8 \text{ \AA}/\text{cykl}$ dla metody ALD-woda, wartości podano dla temperatury wzrostu warstwy 240°C). Świadczy to o odmiennej dynamice wzrostu warstwy 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.



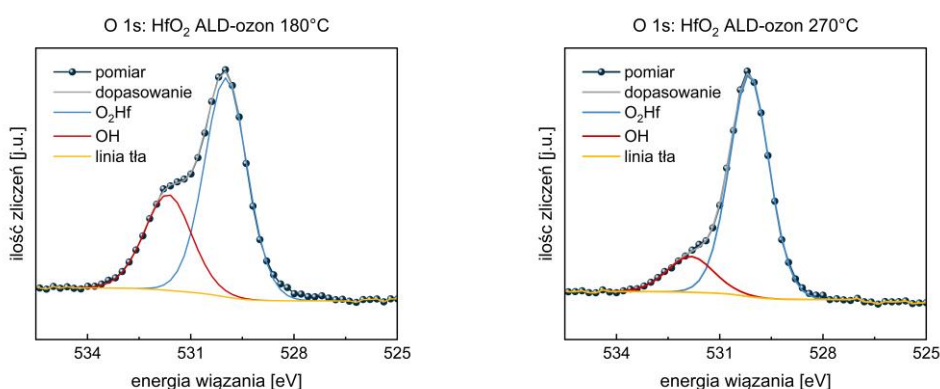
Rys. 16: Tempo wzrostu warstw HfO_2 . Porównanie metod ALD-woda i ALD-ozon w funkcji temperatury wzrostu.

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 HfO₂ 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	20.7	42.2	37.1	21.5	47.4	31.3
180°C	27.7	51.9	23.3	26.1	53.2	20.8
240°C	29.4	50.3	20.3	25.7	52	22.3



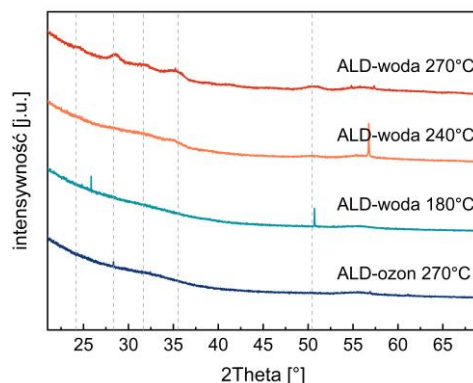
Rys. 17: Analiza składowych linii O1s warstw HfO₂ osadzanych metodą ALD-ozon otrzymanych w pomiarze XPS.

Procentowa zawartość poszczególnych pierwiastków w zależności od temperatury wzrostu i procentowy udział w składowych linii O 1s warstw HfO₂ osadzanych metodą ALD-ozon zebrano w Tab. 3. Warstwy HfO₂ 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 HfO₂ 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 HfO_2 wykonane zostały pomiary XRD. Dyfraktogram przedstawiający jakość krystalograficzną warstw HfO_2 zaprezentowano na Rys. 18. Linie przerywane wskazują wartości kąta 2θ , dla których następuje wzmocnienie interferencyjne w obrazie dyfrakcyjnym monoklinicznego HfO_2 . Okazało się, że ozon wpływał na jakość krystalograficzną warstw w sposób ograniczający krystalizację.



Rys. 18: Dyfraktogram warstw 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 HfO_2 metodą ALD-ozon. Zostało pokazane, że metoda ALD-ozon umożliwia wzrost jednorodnych warstw 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 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 HfO₂ 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.

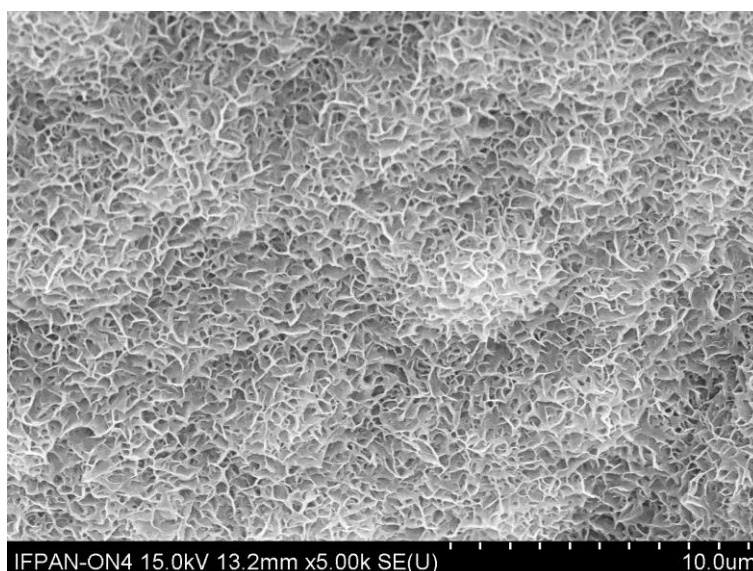
Rozdział 4

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 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 SBF¹⁷.



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

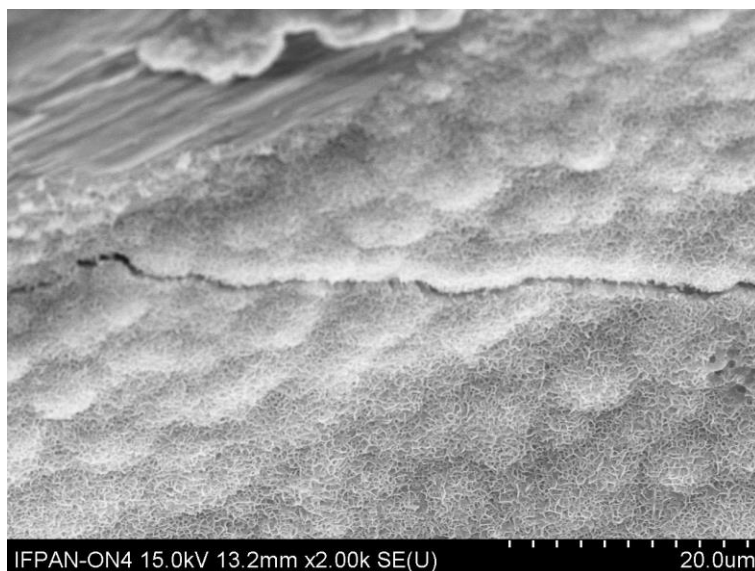
¹⁷ Eksperyment przygotowany zgodnie z opisem w rozdziale 5.4.2

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 α -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.

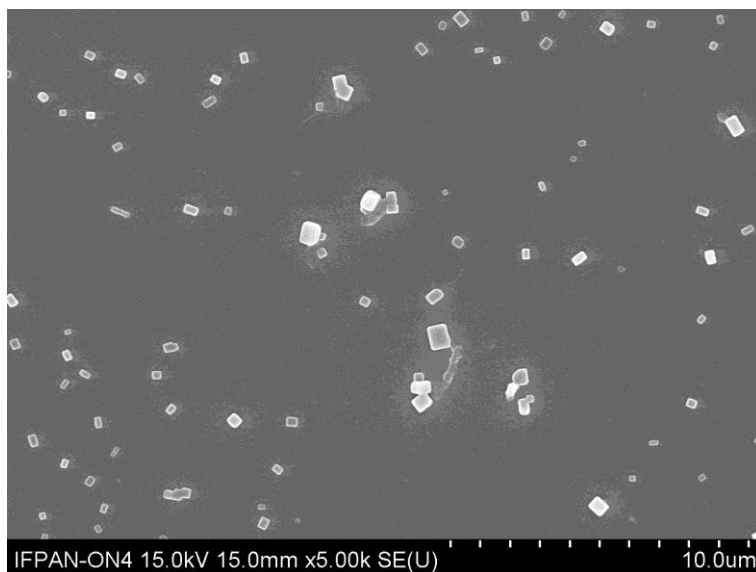
Częściowa toksyczność amorficznego ZrO_2 opisana w pracy [4], wymagające badań wytrzymałościowych wyniki eksperymentu z powłoką ZrO_2 spowodowały, że nie kontynuowano badań nad ZrO_2 w ramach niniejszej rozprawy. Niepokojące doniesienia o potencjalnej cytotoksyczności TiO_2 [48] oraz praca donosząca 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

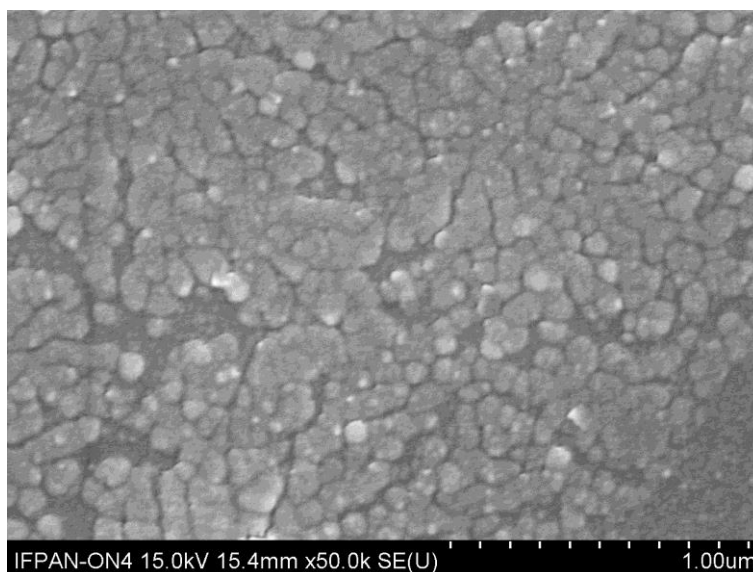
fizjologicznej w temperaturze 37°C jest agresywnym środowiskiem dla materiałów o powierzchniach metalowych i tlenkowych, dlatego ważna jest funkcja barierowa powłoki oddzielająca powierzchnię metalu od środowiska biologicznego. Ponadto wytrzymałość powłoki jest kluczowa ze względów bezpieczeństwa. Wolne 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 HfO₂ 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 HfO₂ zmienia się wraz z grubością powłoki. Początkowo mogą pojawiać się mikro ziarna, będące zaczątkami krystalizacji.

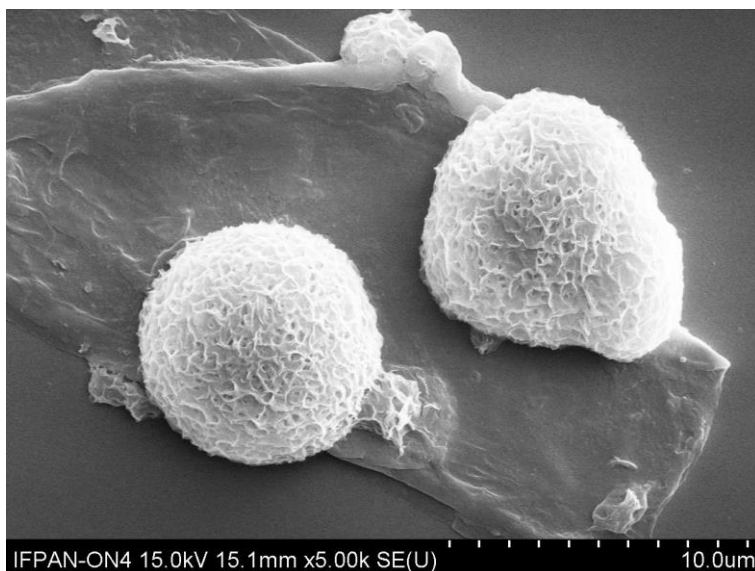


Rys. 22: Zdjęcie SEM powierzchni warstwy HfO_2 osadzanego metodą ALD-woda w temperaturze 180°C po czterech tygodniach inkubacji w roztworze SBF w temperaturze 36.6°C . Detektor elektronów wtórnych, 15 kV AV, powiększenie 50000 x.

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 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 HfO_2 przygotowanej metodą ALD w temperaturze 180°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°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 μm 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.

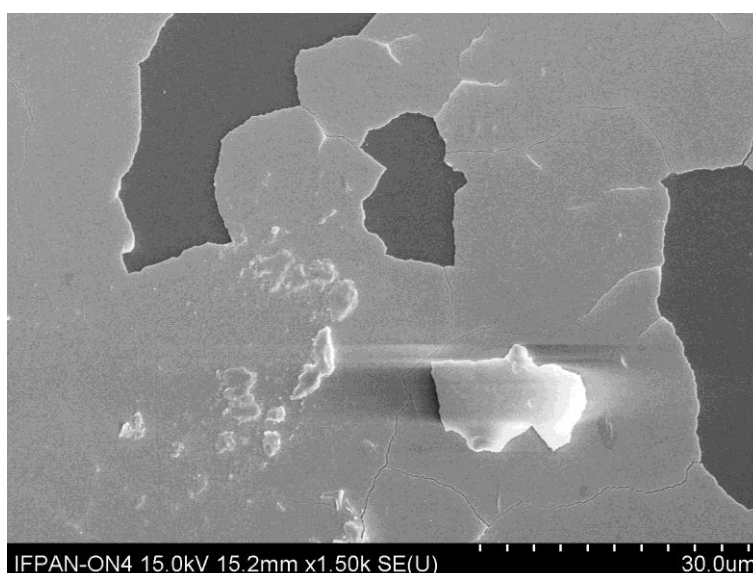


Rys. 23: Zdjęcie SEM sferycznych struktur na powierzchni warstwy HfO_2 osadzanego metodą ALD-woda w temperaturze 300°C . po czterech tygodniach inkubacji w roztworze. Detektor elektronów wtórnych, 15 kV AV, powiększenie 5000 x.

Tym samym potwierdzona została główna hipoteza przedstawianej dysertacji. Wykazano, że odpowiednio przygotowana warstwa HfO_2 posiada właściwości samoistnego promowania osadzania się jonów Ca^{2+} i PO_4^{3-} na swojej powierzchni, czyli posiada cechy powłoki biofunkcjonalnej o pro-apatyto 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.

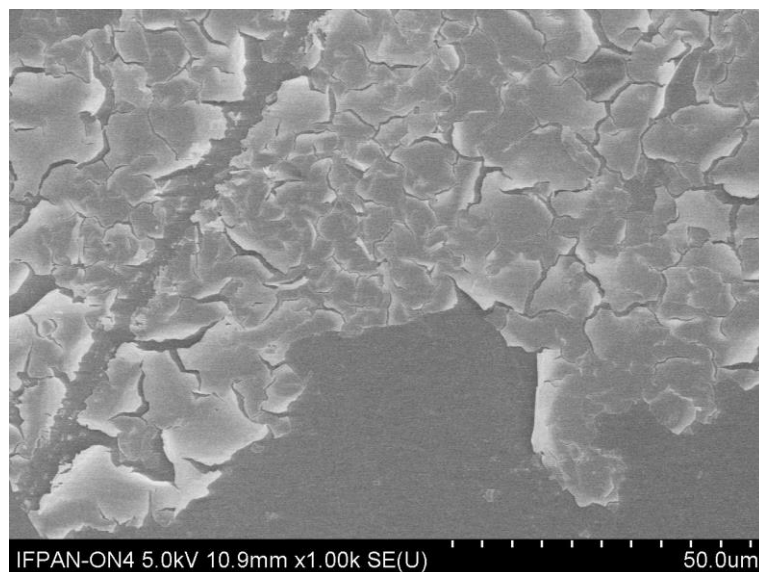
Kolejnym istotnym modyfikowalnym parametrem w technologii ALD jest dobór prekursorów. Ponieważ zarówno z zebranego doświadczenia jak i przeglądu literatury naukowej wiadomo było, że TDMAH jest wysokiej jakości prekursorem hafnu w procesach ALD, nie planowane były w tym obszarze modyfikacje. Zmieniony 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.



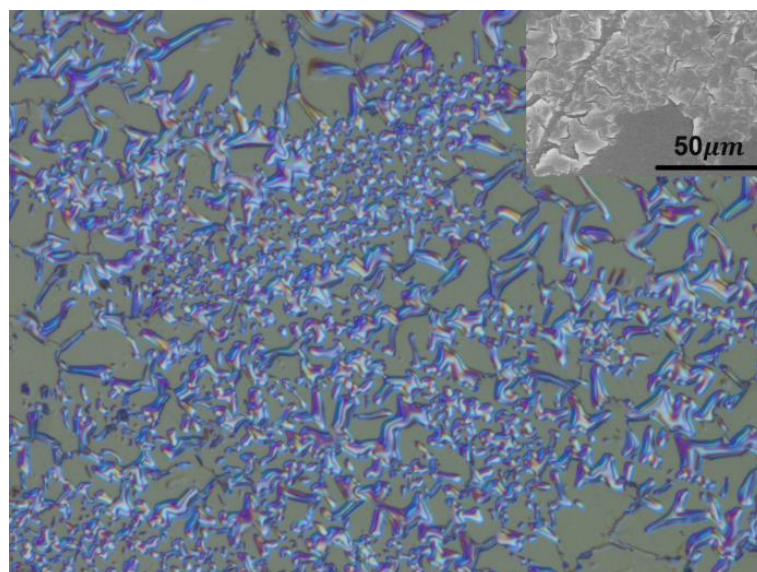
Rys. 24: Zdjęcie SEM uszkodzonej powierzchni powłoki HfO_2 osadzonej metodą ALD-woda w 300°C . Detektor elektronów wtórnych, 15 kV AV, powiększenie 50000 x.

Jednorodna po procesie ALD warstwa HfO_2 , przygotowana w 90°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 HfO_2 wykonanej niskotemperaturową metodą ALD-ozon.



Rys. 25: Zdjęcie SEM delaminacji warstwy HfO_2 osadzonej metodą ALD-ozon w temperaturze 90°C po inkubacji w roztworze SBF. Detektor elektronów wtórnych, 15 kV AV, powiększenie 1000 x.

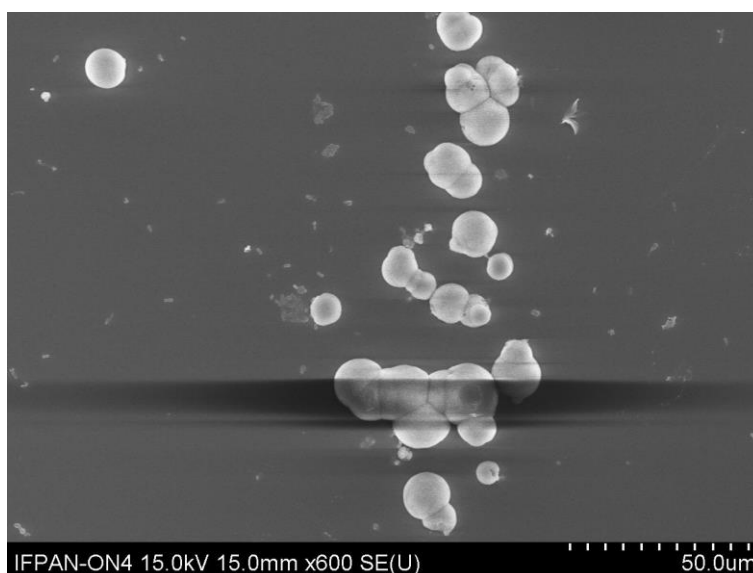


Rys. 26 Zdjęcie z mikroskopu optycznego zniszczonej powierzchni warstwy HfO_2 osadzonej metodą ALD-ozon w temperaturze 90°C . Wstawka pokazuje obraz z mikroskopu SEM.

Biowchłaniaalne rusztowania wytwarzane są najczęściej z materiałów polimerowych, o niskiej wytrzymałości temperaturowej (w temperaturze powyżej 100°C ulegają rekrytalizacji i tracą swoje właściwości mechaniczne). Możliwość wykonania powłoki HfO_2 w temperaturze 90°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 Ca^{2+} i 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 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 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 HfO_2 o grubości 50 nm wzrastana w temperaturze 270°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 HfO_2 . Wykonana do tego etapu ukierunkowana biologicznie optymalizacja wzrostu warstw ALD potwierdzała jednoznacznie hipotezę o pro-apatyto twórczym potencjale powłok 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 HfO_2 , żeby uzyskać większe zagęszczenie materiału? Kluczową kwestią do wyjaśnienia było też pytanie czy punktowe powinowactwo CaP do warstwy HfO_2 spełni wymogi pro-apatyto twórczej powierzchni?

Uwzględniając wyniki testów z SBF na powłokach 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 CaPO₄ 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 Ca²⁺, 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 Ca²⁺ i PO₄³⁻, 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 OH^- i 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 α -CaP do apatytu. W innych pracach sugeruje się obecność OCP jako formy przejściowej pomiędzy α -CaP a fosforanem wapnia [177], [185], ale też na trudności w odróżnieniu fazy OCP i apatytu ze względu na duże podobieństwo strukturalne [138]. W każdym razie jednak obecność OCP może być wskaźnikiem procesu krystalizacji [138]. Początkowo α -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 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 HfO₂ 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 HfO₂. Założonym celem niniejszego etapu było opracowanie takich metod modyfikacji powłoki HfO₂, które przy zachowaniu punktowego powinowactwa jonów Ca/P do powierzchni pozwolą na intencjonalne sterowanie zagęszczeniem punktów inicjujących osadzanie się α -CaP. Sporadycznie występujące struktury α -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 HfO₂ po procesie wygrzewania nabiera wrażliwości na poziom jonów zawartych w roztworze elektrolitowym [187]. Ten kierunek został przetestowany w kontekście zastosowań biologicznych.

5.1. HfO₂ otrzymywany metodą ALD RTP

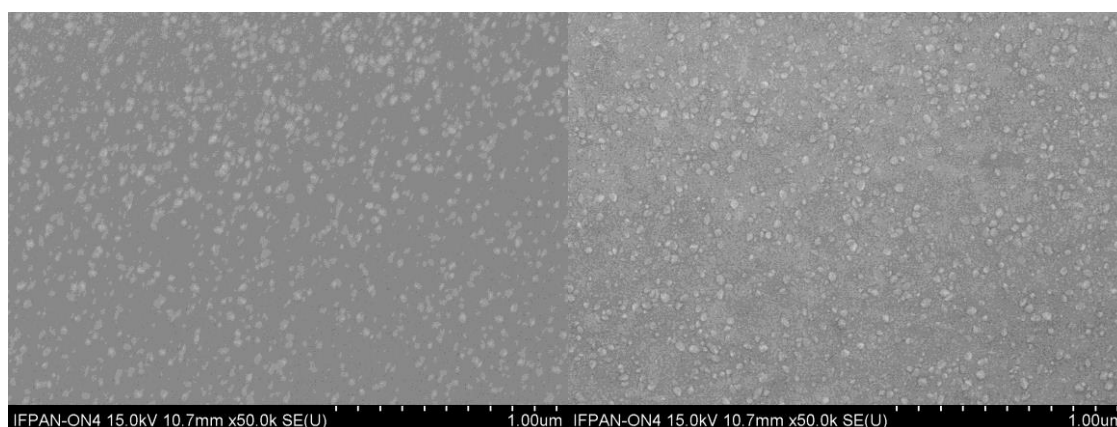
Okazuje się, że HfO₂ jest też badany jako potencjalny materiał sensorowy ze względu na zmienne reakcje na poziom jonów w roztworach wodnych o składzie zbliżonym do występującego w płynach ustrojowych. Stężenie jonowe SBF powinno wynosić 140mM [188] co jest porównywalnie z osoczem krwi [189]. HfO₂ jest 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 HfO₂ 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 HfO₂ 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 HfO₂ ALD-woda po procesie RTP

Kierując się doniesieniami o aktywującym wpływie wysokotemperaturowego wygrzewania warstw HfO₂ 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 przejściowych¹⁸. 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 HfO₂ pokrywały się, a zmierzony rozmiar krystalitów różnił się o ± 2 nm co mieściło się w granicach błęd pomiarowego (Tab. 4).

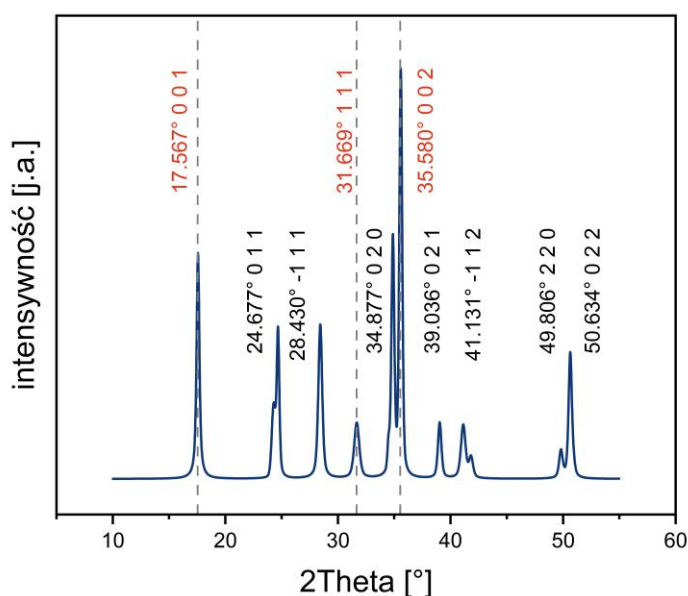


Rys. 28: Obrazy SEM warstwy HfO₂ osadzonej metodą ALD-woda w 240°C: po lewej przed procesem RTP. Po prawej po procesie RTP w 500°C w czasie 30 minut. Detektor elektronów wtórnych, 15 kV AV, powiększenie 50000 x.

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 HfO₂. 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

¹⁸ 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

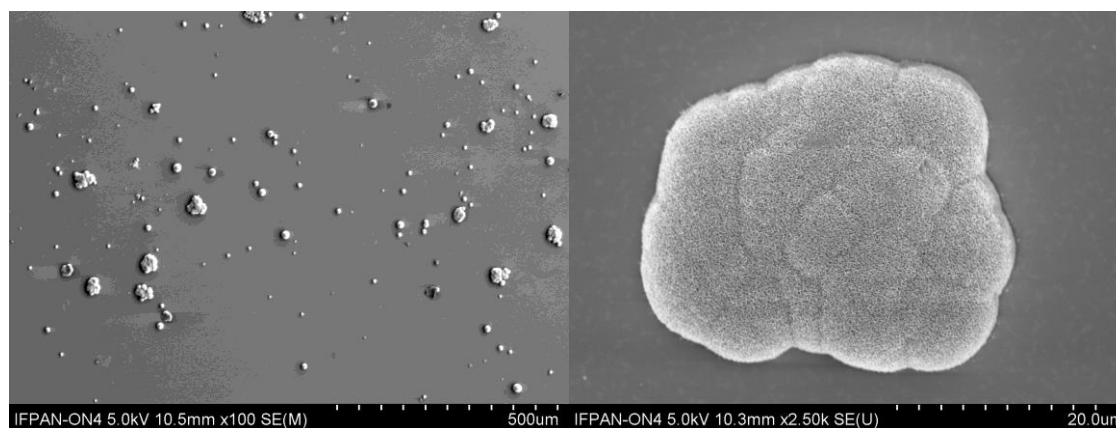
przyjęto, że w granicach błędu¹⁹ nie zaobserwowano znaczącego wpływu temperatury procesu ALD i temperatury RTP na jakość krystalograficzną.

Tab. 4: Średni rozmiar krystalitów-D, oszacowany na podstawie formuły Sherer'a. σ -odchylenie standardowe

ALD-woda 180°C		ALD-woda 240°C		ALD-woda 270°C		ALD-woda 240°C		ALD-woda 240°C		ALD-woda 240°C	
RTP 500°C 30 min.		RTP 500°C 30 min.		RTP 500°C 30 min.		RTP 400°C 30 min.		RTP 500°C 30 min.		RTP 600°C 30 min.	
krzem		krzem		krzem		kwarc		kwarc		kwarc	
D [nm]	σ [nm]	D [nm]	σ [nm]	D [nm]	σ [nm]	D [nm]	σ [nm]	D [nm]	σ [nm]	D [nm]	σ [nm]
26	5	17	5	17	4	18	3	15	4	16	3

5.1.2. Modyfikowany termicznie HfO₂ w symulowanym środowisku fizjologicznym

Przeprowadzony został ponownie eksperyment z SBF z wygrzewanymi warstwami HfO₂.

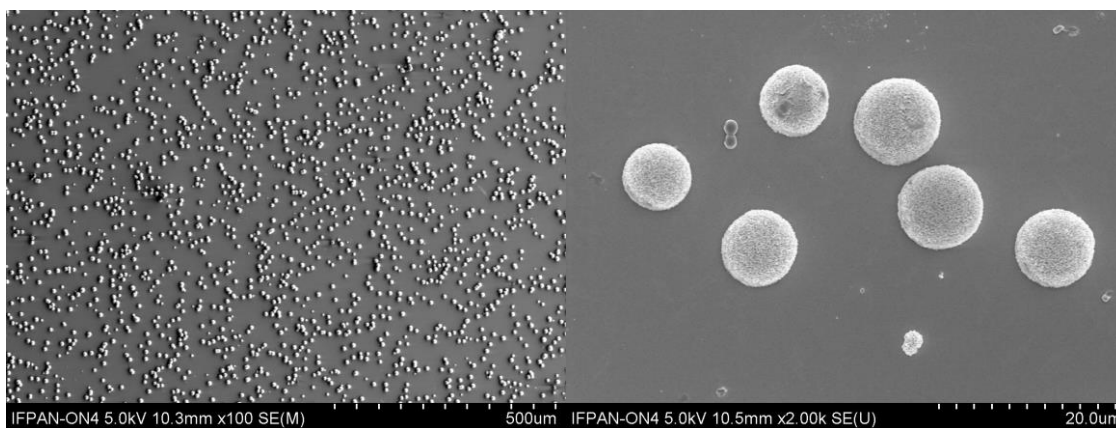


Rys. 30: Obraz SEM struktur CaP na powierzchni powłoki HfO₂ osadzonej w 180°C metodą ALD-woda i wygrzewanej w 500°C przez 30 minut. Detektor elektronów wtórnych, 15 kV AV, powiększenie 100 x (po lewej) i 2000 x (po prawej).

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

Wyrzwanie warstw HfO_2 ALD-woda ma, jak się okazało, kluczowy wpływ na zwiększenie powinowactwa chemicznego jonów Ca i/lub P.

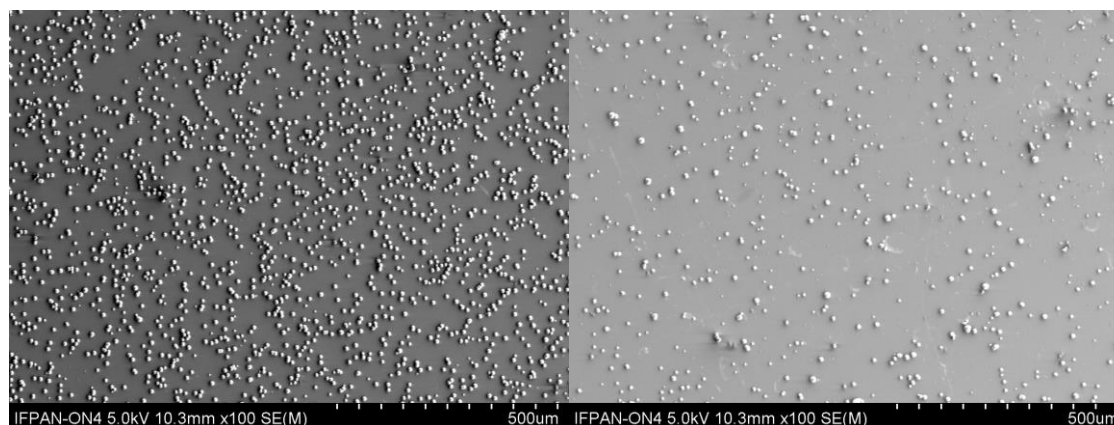
Powyżej na Rys. 30 pokazano reprezentatywne zdjęcia SEM w dwóch różnych powiększeniach dla powierzchni HfO_2 osadzanej w procesie ALD w 180°C i wygrzewanej w procesie RTP w 500°C przez 30 minut. Natomiast poniżej na Rys. 31 pokazano reprezentatywne zdjęcia SEM w dwóch różnych powiększeniach dla powierzchni HfO_2 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_2 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_2 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_2 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 HfO₂ 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 HfO₂ 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.

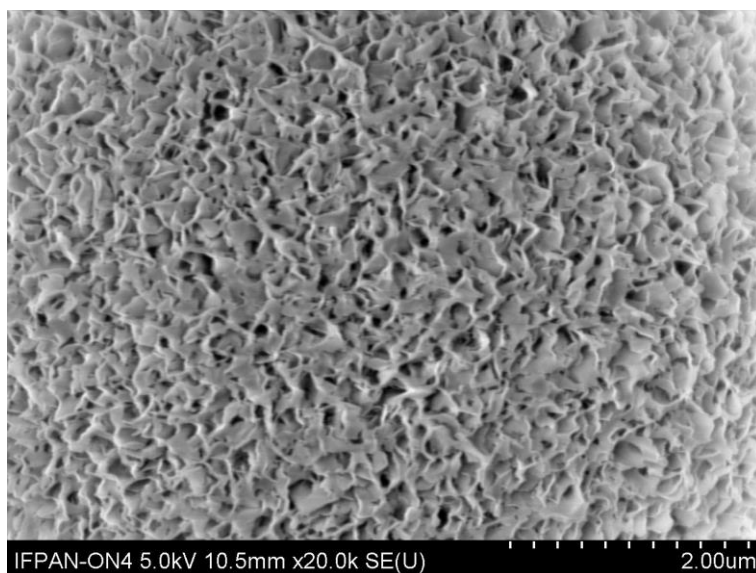
Rozdział 6

α -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 HfO₂ po inkubacji w SBF.

6.1. Charakteryzacja chemiczna α -CaP na powierzchni HfO_2

Inkubacja cienkich warstw 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 α -CaP na powłoce HfO_2 .

Punktowy pomiar EDX pokazał, że na powierzchni powłoki 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 α -CaP. Szczegółowo przeanalizowano następującą serię próbek:

- HfO₂ ALD-woda 240°C – warstwa osadzana metodą ALD-woda w temperaturze 240°C, referencja

- HfO₂ ALD-woda 240°C – warstwa osadzana metodą ALD-woda w temperaturze 240°C, a następnie inkubowana przez 2 tygodnie w symulowanych

- HfO₂ 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

- HfO₂ 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:

- HfO₂ 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

- HfO₂ 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 HfO₂ po inkubacji w SBF.

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

Ponieważ podczas pomiarów XPS analizowany był materiał dwuskładnikowy, odbierany był sygnał zarówno od warstwy HfO₂ 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 HfO₂. 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 ₂ ALD-woda 240°C		HfO ₂ ALD-woda 240°C SBF 2 tygodnie		HfO ₂ ALD-woda 240°C RTP 500°C		HfO ₂ ALD-woda 240°C RTP 500°C SBF 2 tygodnie	
	FWHM [eV]	obszar [%]	FWHM [eV]	obszar [%]	FWHM [eV]	obszar [%]	FWHM [eV]	obszar [%]
HfO ₂	1.4	97.9	1.4	64,1	1.3	67.7	1.3	74
HfO _x	1.1	2.1	2.2	35.9	1.9	32.3	1.7	36

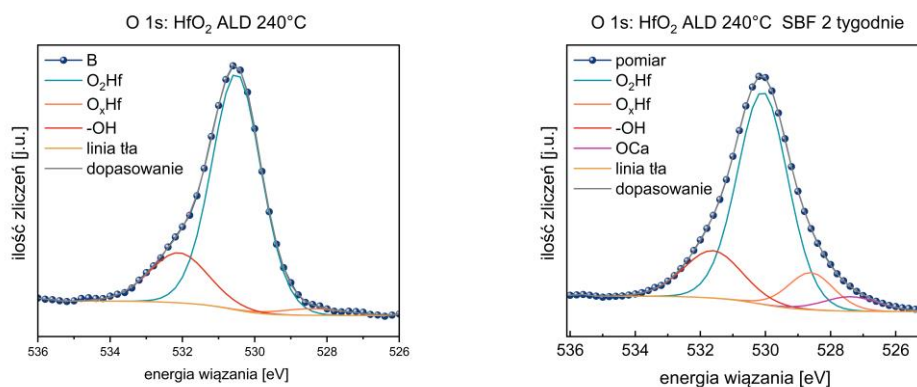
Analizowana powyżej w Tab. 6 linia hafnu to linia Hf 4f, która jest dubletem spin-orbita z różnicą energii wiązania $\Delta=1,7$ eV, co jest zgodne z wartościami tablicowymi[195]. Okazuje się, że typowym zjawiskiem dla powłoki HfO₂ po inkubacji w fizjologicznym płynie elektrolitowym SBF, powoduje pojawienie się składowej związanej z niestechiometrycznym HfO_x, zwrócono uwagę, że proces RTP wygrzewania powłoki HfO₂ również wpływa na pojawienie się składowej HfO_x.

Tab. 7: Analiza linii O 1s.

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

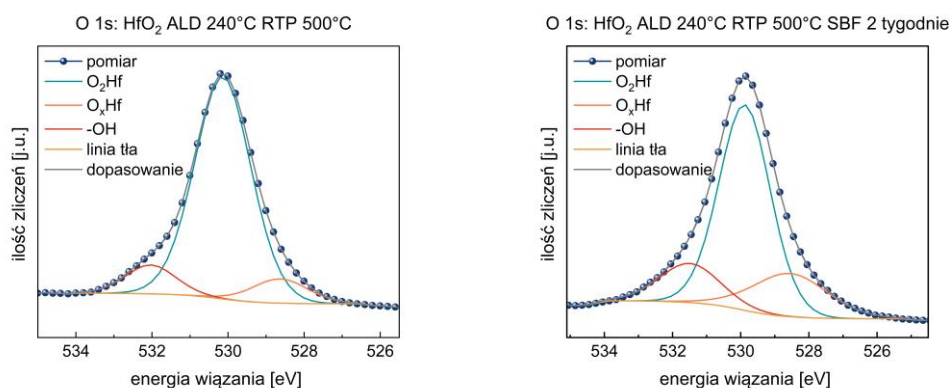
Niedobór tlenu w powłoce ALD zarówno po inkubacji w SBF jak i po procesie RTP potwierdził się też w analizie linii O 1s co pokazano powyżej w Tab. 7. Udział linii tlenu związanej z zaadsorbowaną wodą na powierzchni po wygrzewaniu znacząco zmalał, bo z około 19.6% na próbce referencyjnej do około 9.5%, 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 HfO_x pojawiła się w próbce niemodyfikowanej termicznie, po jej inkubacji w SBF. Ta składowa jest prawdopodobnie związana z zawartością O w CaO [195], co zostanie przedyskutowane w dalszej kolejności.



Rys. 34: Analiza linii spektralnej XPS, O 1s warstw HfO_2 bez modyfikacji termicznej.

Natomiast graficzne przedstawienie linii spektralnej O1s mierzonej na powłoce HfO_2 po procesie RTP przedstawiono poniżej, na Rys. 35:

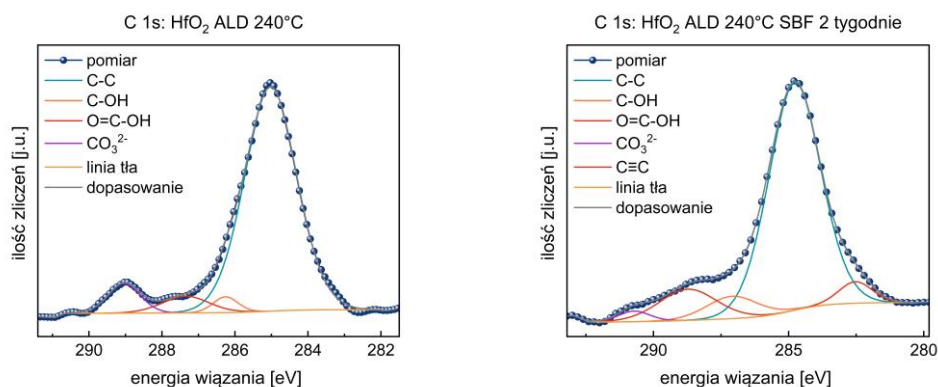


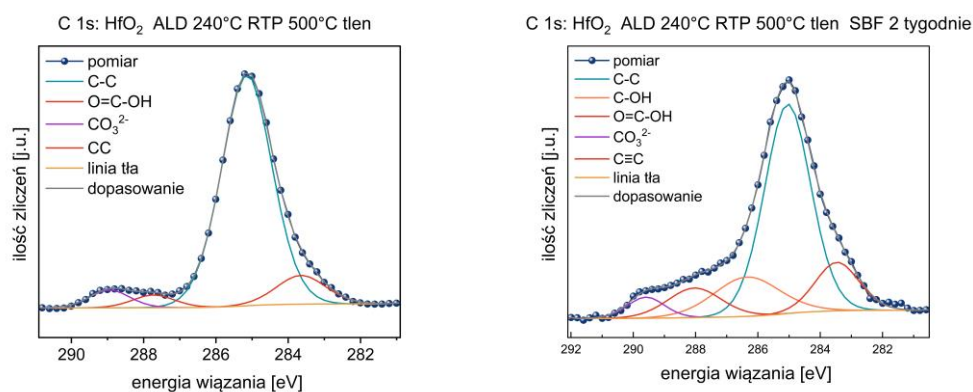
Rys. 35: Analiza linii spektralnej XPS, O 1s warstw HfO_2 po procesie wygrzewania RTP.

Tab. 8: Analiza linii C 1s

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

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 HfO₂ bez modyfikacji termicznej.



Rys. 37: Analiza linii spektralnej XPS, C 1s warstw HfO₂ 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 HfO₂ 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 ₂ ALD-woda 240°C SBF 2 tygodnie		HfO ₂ ALD-woda 240° RTP 400°C SBF 2 tygodnie		HfO ₂ ALD-woda 240°C RTP 500°C SBF 2 tygodnie		HfO ₂ ALD-woda 240°C RTP 600°C SBF 2 tygodnie	
	FWHM [eV]	obszar [%]	FWHM [eV]	obszar [%]	FWHM [eV]	obszar c	FWHM [eV]	obszar [%]
eV O ₂ Hf	1.8	67.2	1.8	80.4	1.8	65.5	1.3	59.6
O _n Hf	1.7	10.6	2	8.5	2.6	19.9	2.5	21.3
-OH	2.1	17.3	1.8	11.1	2.1	14.7	2.5	19
O w CaO	2	5	-	-	-	-	-	-

Szerokość połówkowa głównego komponentu linii tlenu, czyli związanego z HfO₂ pozostaje stabilna, zatem termiczne przygotowanie próbek nie ma wpływu na uprządkowanie atomowe wokół stechiometrycznego HfO₂. Zmienia się to w przypadku

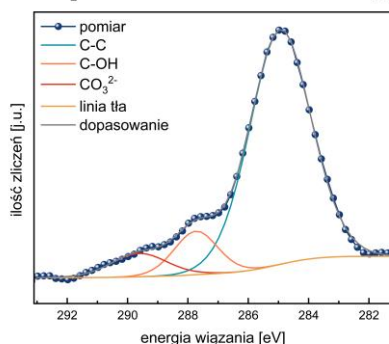
komponentu HfO_x . Zważywszy, że po inkubacji powłok w płynie SBF procentowy udział tej składowej wzrasta, co może mieć związek z udziałem tlenu z powłoki w tworzeniu się struktur a-CaP, można spodziewać się różnych mechanizmów, zależnych od temperatury procesu RTP, który z kolei miał wpływ na stosunek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

Tab. 10: Analiza linii C1s materiałów po procesie RTP

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

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 HfO₂ 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 HfO₂.

C 1s: HfO₂ ALD 240°C RTP 500°C tlen SBF 2 tygodnie



Rys. 38: Analiza linii spektralnej XPS C 1s powłoki ALD HfO₂ 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

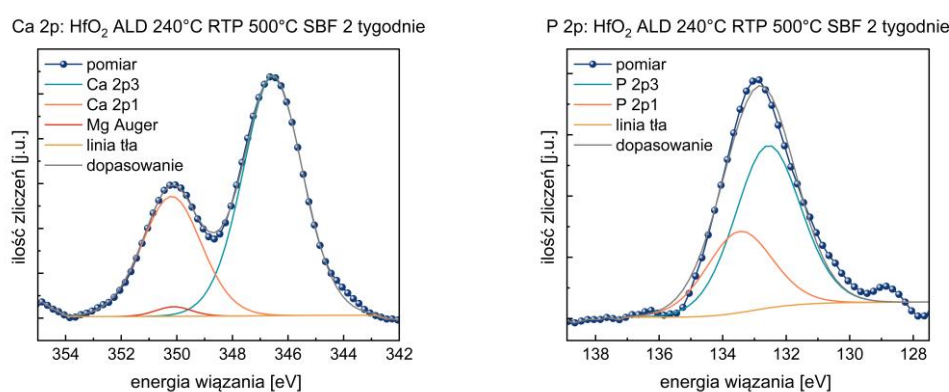
	HfO ₂ ALD-woda 240°C SBF 2 tygodnie		HfO ₂ ALD-woda 240°C RTP 400°C SBF 2 tygodnie		HfO ₂ ALD-woda 240°C RTP 500°C SBF 2 tygodnie		HfO ₂ ALD-woda 240°C RTP 600°C SBF 2 tygodnie	
	FWHM [eV]	obszar [%]	FWHM [eV]	obszar [%]	FWHM [eV]	obszar [%]	FWHM [eV]	obszar [%]
346.5 eV Ca=CO ₃	3.1	27.1	2	84	2.5	98.5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

* - energia wiązania bliska 350.1 eV

Tab. 12: Analiza linii spektralnej P 2p

	HfO ₂ ALD-woda 240°C SBF 2 tygodnie		HfO ₂ ALD-woda 240°C RTP 400°C SBF 2 tygodnie		HfO ₂ ALD-woda 240°C RTP 500°C SBF 2 tygodnie		HfO ₂ 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	1.9	92.3	2.3	80.1	2.4	100	2.1	100
347 eV /	1.2	7.7	2.5	19.9	-	-	-	-

Zebrane wyniki dopasowania teoretycznego do otrzymanych danych eksperymentalnych linii pierwiastków budujących struktury α -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 α -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 (PO_4^{3-}) co pokazano poniżej na Rys. 39, po prawej.



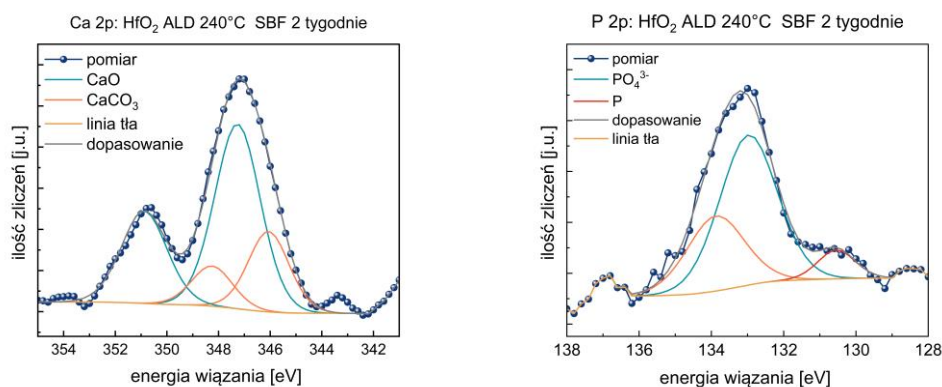
Rys. 39: Analiza linii spektralnych XPS powłoki HfO₂ wygrzewanej w procesie RTP, po inkubacji w SBF: Ca 2p (po lewej), P 2p (po prawej).

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 Mg²⁰. Jeżeli obserwowalibyśmy wbudowywanie jonów Mg w struktury α -CaP w charakterze domieszki byłby to niezwykle ciekawy a zarazem obiecujący wynik. Naturalnie

²⁰ 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 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 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 HfO₂

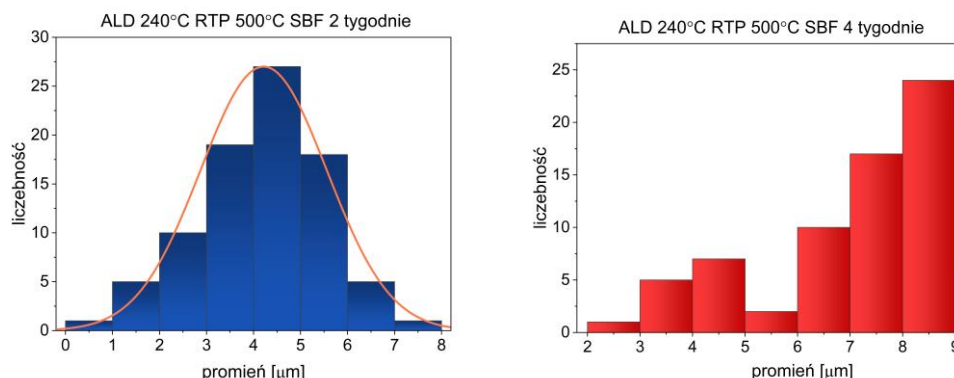
Zdjęcia SEM struktur a-CaP wskazują na istniejące zależności pomiędzy sposobem przygotowania powłoki, zarówno od temperatury osadzania HfO₂ metodą ALD, jak i od późniejszego wygrzewania w procesie RTP w tlenie w temperaturach 400°C, 500°C i 600°C. Żeby zweryfikować jak duży jest wpływ tych parametrów 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. Pomiary 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_{sr} -promień średni struktur a-CaP, δ -odchylenie standardowe pomiaru średniego promienia, S_{CaP} - całkowite pokrycie powierzchni przez struktury a-CaP

Tab. 13: Średni promień i pokrycie powierzchni powłoki HfO₂ strukturami a-CaP.

	HfO ₂ ALD- woda 180°C RTP 500°C	HfO ₂ ALD- woda 240°C RTP 400°C	HfO ₂ ALD- woda 240°C RTP 500°C	HfO ₂ ALD- woda 240°C RTP 600°C	HfO ₂ ALD- woda 240°C RTP 500°C
okres inkubacji w SBF	2 tygodnie				4 tygodnie
r_{sr} [μm]	5.1	4.1	5.2	2.9	6.6
δ [μm]	1.2	0.7	0.1	0.4	1
S_{CaP} [%]	1.9	9.8	12	1.9	9.9

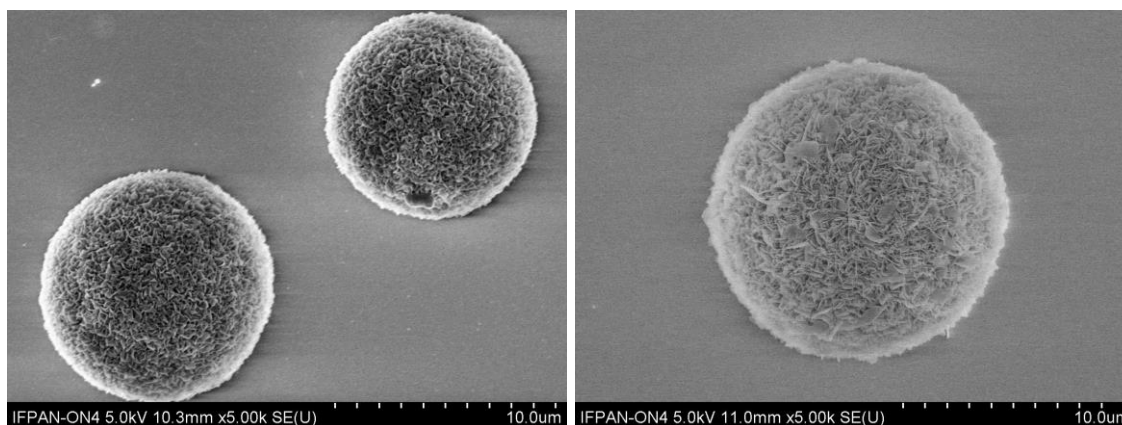
Ponieważ w trakcie badań i analizy wyników okazało się, że optymalne warunki wykonania powłoki o właściwościach pro-apatyto twórczych to wzrost ALD w temperaturze 240°C, a następnie wygrzewanie w RTP w tlenie przez 30 minut w temperaturze 500°C, postanowiono wydłużyć okres inkubacji próbki do 4 tygodni.

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 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 HfO₂ 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 (HfO₂, O₃)

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 HfO₂. Na podstawie wyników eksperymentalnych stwierdzono, że zmienne korelują ze sobą. Dobór odpowiedniej kombinacji parametrów pozwolił na otrzymanie warstwy HfO₂ 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 HfO₂ 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 HfO₂ 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 HfO_2 modyfikowanym termicznie wytworzył się stechiometryczny α -CaP. Natomiast powierzchnia warstwy nie wygrzewanej, w warunkach fizjologicznych indukuje preferencyjne wiązanie jonów fosforanowych w stosunku do wapnia. Proces RTP warstw HfO_2 powoduje rekrytalizację powłok. Jakość krystalograficzna nie zależy od temperatury wzrostu warstwy w metodzie ALD. Ma jednak kluczowy wpływ na jakość struktur α -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] α -CaP w formie MCP jest formą prekursorową dla BA w środowisku fizjologicznym. Kuliste MCP w obecności jonów 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 ~ 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 α -CaP nukleowały w charakterystyczny, jednorodny sposób tylko na powłokach HfO_2 po procesie RTP pojawiło się pytanie jaka właściwość wygrzewanej powłoki jest kluczowa do sterowania powinowactwem jonów Ca i P do warstwy 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 węgiel 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.

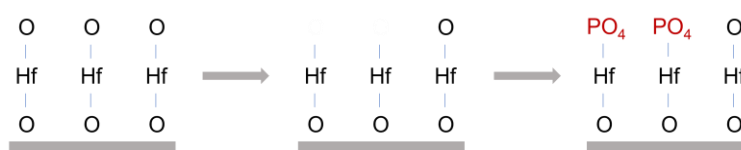
Zaobserwowano również, że termiczna modyfikacja warstwy osadzonej metodą ALD-woda powoduje pojawienie się komponentu niestechiometrycznego, z niedoborem tlenu. Generowane są luki tlenowe, które mogą być zgodnie z modelem krystalizacji HfO_2 [136], inicjatorami krystalizacji warstwy, co pokazano na Rys. 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.

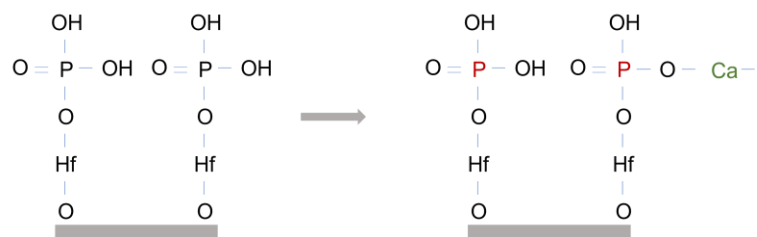
Proces biomineralizacji zachodzący w środowisku wodnym, jak zdefiniowano w pracy [199] może być indukowany materiałem pochodzenia organicznego lub nieorganicznego. Pochodzenie organiczne wynika z biomineralizacji zachodzącej na biomolekułach (komórkach, organellach komórkowych w tym pęcherzykach zewnątrzkomórkowych, 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 Ca^{2+} inicjuje mineralizację w warunkach symulowanych [199]. W pracy [88] pokazano natomiast, że do powierzchni TiO_2 zoptymalizowanej do wartości zeta potencjału $+2 \pm 2.7 \text{ mV}$ w pierwszej kolejności adsorbują negatywnie naładowane jony fosforanowe, a na powierzchni 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 umieszczanej 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 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 PO_4^{3-} . To przypuszczenie poparte jest też faktem zwiększenia się FWHM składowej tlenu przypisanej 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 HfO₂ 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 HfO₂.

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 HfO₂ 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 α -CaP, które nukleują na powierzchni HfO_2 mają w warunkach symulowanych średnicę rzędu kilku μm . 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 α -CaP.

- planowana jest szczegółowa analiza termodynamiczna procesu samoorganizacji struktur α -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 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 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 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 α -CaP charakteryzuje podobieństwo do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez osteoblasty w procesach naturalnej i pourazowej remodulacji kości. Wskazany został przypuszczalny mechanizm lokalnego wiązania jonów Ca^{2+} do powierzchni powłoki HfO_2 a w konsekwencji wzrostu sferycznej, amorficznej struktury α -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 α -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 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 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 Szafraniec-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 filtru

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 TiO₂ 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-TiO₂ 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, “TiO₂ 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
- [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) TiO₂ 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 TiO₂ and ZrO₂ 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 TiO₂,” *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 TiO₂, ZrO₂ and HfO₂ 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 TiO₂ 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 TiO₂ Coatings by ALD Enhance the Cell Growth on TiO₂ 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 TiO₂ 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. Gierałowska, 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 TiO₂ 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 TiO₂ 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.*, “TiO₂ 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 TiO₂, ZrO₂ and TiO₂/ZrO₂ 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 ZrO₂ 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 ZrO₂ 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 ZrO₂-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 TiO₂, ZrO₂ and TiO₂/ZrO₂ 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 (Li^+) and nanohydroxyapatite (nHAp) doped with Li^+ enhance expression of late osteogenic markers in adipose-derived stem cells. Potential theranostic application of nHAp doped with 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 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 (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 HfO₂-Ta₂O₅ 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 HfO₂ 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 HfO₂, Al₂O₃, and HfAlO_x using O₃ 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 Al₂O₃ and HfO₂ 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 HfO₂ films grown by atomic layer deposition using HfCl₄ and H₂O or O₃ 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 HfO₂ by combinations of H₂O and O₃ 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 O₃ and H₂O as oxygen sources on the atomic layer deposition of HfO₂ 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 HfO₂ films using O₃ or H₂O oxidant and Hf [N(CH₃)₂]₄ 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 HfO₂ thin films grown at an extremely low temperature (≤ 100 C) using O₃ 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 Al₂O₃ 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 HfO₂ 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 HfO₂ and ZrO₂,” *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 HfO₂ and Al₂O₃ 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 HfO₂ by combinations of H₂O and O₃ 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 HfO₂ 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 (Ta₂O₅, HfO₂) 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
- [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

Dostępny do artykułów:

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 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>.