



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Chemii



Rozprawa doktorska
mgr Michalina Ehlert

**Wytwarzanie i charakterystyka układu:
implant metaliczny/tlenkowa warstwa pośrednia/hydroksyapatyt
oraz badanie jego interakcji
z ludzkimi, mezenchymalnymi komórkami macierzystymi**

Promotor: **dr hab. Piotr Piszczek, prof. UMK**
Wydział Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Promotor pomocniczy: **dr hab. Aleksandra Radtke**
Nano-implant Sp. z o.o.

Toruń 2023

Niniejsza rozprawa doktorska została wykonana w ramach doktoratu wdrożeniowego w oparciu o umowę trójstronną pomiędzy Michaliną Ehlert, firmą Nano-implant Sp. z o.o. a Uniwersytetem Mikołaja Kopernika w Toruniu i współfinansowana przez MNiSW (obecnie MEiN).

Składam serdeczne podziękowania

Moim promotorom:

dr. hab. Piotrowi Piszczkowi, prof. UMK

oraz dr hab. Aleksandrze Radtke,

za inspirację naukową, przekazaną wiedzę, poświęcony czas, okazaną pomoc,
jak również za życzliwość i bardzo ożywcze dyskusje naukowe.

prof. dr. hab. n.med. Waldemarowi Jędrzejczykowi,

za motywację, inspirację i dzielenie się swoimi przemyśleniami naukowymi.

dr hab. Katarzynie Roszek, prof. UMK,

dr. Tomaszowi Jędrzejewskiemu

oraz dr. inż. Michałowi Bartmańskiemu,

za możliwość współpracy,
zaangażowanie w tematykę
oraz życzliwą atmosferę sprzyjającą realizacji pracy naukowej.

Pracownikom i Koleżankom

z Katedry Chemii Nieorganicznej i Koordynacyjnej,

za stworzenie przyjaznej atmosfery podczas realizacji doktoratu.

Moim Rodzicom,

za to, kim jestem dziś,
za duchowe i materialne wsparcie na całej mojej drodze edukacji
oraz nieustanne motywowanie mnie w dążeniu do celu.

Mojemu ukochanemu Mężowi Sławkowi,

który z ogromną cierpliwością wysłuchiwał moich pomysłów, za otuchę,
bezwarunkową pomoc, wsparcie oraz wiarę w moje możliwości.

„Niczego w życiu nie należy się bać, należy to tylko zrozumieć”.

Maria Skłodowska-Curie

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń wytworzonych układów	4
Streszczenie.....	6
Abstract	8
1. Wstęp.....	10
1.1. Biomateriały	11
1.2. Oddziaływania tkanka kostna – biomateriał.....	15
1.2.1. Budowa i skład chemiczny tkanki kostnej.....	15
1.2.2. Osteointegracja biomateriałów.....	17
1.2.3. Mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs).....	20
1.3. Biomateriały metaliczne.....	22
1.3.1. Charakterystyka materiałów bazujących na tytanie i jego stopach.....	22
1.4. Modyfikacje powierzchni implantów tytanowych i stopów tytanu.....	26
1.4.1. Elektrochemiczne utlenianie (proces anodowania).....	28
1.4.2. Chemiczne utlenianie nadtleniem wodoru.....	30
1.4.3. Chemiczne utlenianie alkalicznym roztworem.....	31
1.5. Wytwarzanie powłok hydroksyapatytowych.....	32
2. Cel i zakres rozprawy doktorskiej	36
3. Układ pracy.....	37
4. Streszczenie zbioru artykułów wchodzących w skład rozprawy.....	39
P1. <i>Titania Nanofiber Scaffolds with Enhanced Biointegration Activity—Preliminary In Vitro Studies</i>	39
P2. <i>In Vitro Studies on Nanoporous, Nanotubular and Nanosponge-Like Titania Coatings, with the Use of Adipose-Derived Stem Cells</i>	45
P3. <i>Assessment of Titanate Nanolayers in Terms of Their Physicochemical and Biological Properties</i>	49
P4. <i>Evaluation of the Cathodic Electrodeposition Effectiveness of the Hydroxyapatite Layer Used in Surface Modification of Ti6Al4V-Based Biomaterials</i>	53
P5. <i>TiO₂/HA and Titanate/HA Double Layer Coatings on Ti6Al4V Surface and Their Influence on In Vitro Cell Growth and Osteogenic Potential</i>	59
5. Podsumowanie	62
6. Wdrożenie	65
7. Bibliografia	67
8. Dorobek naukowy kandydata na doktora	81
Załączniki.....	88

Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń wytworzonych układów

Skróty:

a – krawędź komórki równoległa do kierunku X

α -Ti – niskotemperaturowa odmiana alotropowa czystego tytanu

α – stop tytanu o strukturze złożonej z fazy α

$\alpha+\beta$ – stop tytanu o strukturze dwufazowej

ADSCs – komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej (ang. *adipose-derived stem/stromal cells*)

ALP – fosfataza zasadowa (ang. *alkaline phosphatase*)

b – krawędź komórki równoległa do kierunku Y

β – stop tytanu o strukturze złożonej z fazy β

β -Ti – wysokotemperaturowa odmiana alotropowa czystego tytanu

BMSCs – komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego (ang. *bone marrow stromal/stem cells*)

c – krawędź komórki równoległa do kierunku Z

CaP – fosforan wapnia (ang. *calcium phosphate*)

cpTi – handlowo czysty tytan (ang. *commercially pure titanium*)

Θ – kąt zwilżania

DRIFT – spektroskopia rozproszonego odbicia w zakresie podczerwieni z transformatą Fouriera

(ang. *diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy*)

E – moduł sprężystości - moduł Younga (ang. *elastic modulus*)

EDS/EDX – spektroskopia z dyspersją energii promieniowania rentgenowskiego (ang. *energy-dispersive X-ray spectroscopy*)

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

XRD – dyfrakcja rentgenowska (ang. *X-ray diffraction*)

H – twardość (ang. *hardness*)

I – natężenie prądu

J – gęstość prądu

MSCs – mezenchymalne komórki macierzyste (ang. *mesenchymal stem cells*)

MTT – test cytotoksyczności wykorzystujący bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenyloctetrazoliowy

PLA – polilaktyd (ang. *polylactic acid*)

PLGA – kopolimer polilaktyd-glikolid (ang. *poly(lactic-co-glycolic acid)*)

Sa – parametr chropowatości, średnie arytmetyczne odchylenie wysokości nierówności powierzchni od płaszczyzny odniesienia

SBF – symulowany płyn ustrojowy (ang. *simulated body fluid*)

SEM – skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *scanning electron microscopy*)

SEM/EDS – skaningowa mikroskopia elektronowa sprzężona z energo-dyspersyjną mikrosondą elektronową (ang. *scanning electron microscopy equipped with an energy dispersive X-ray spectrometer*)

SVF – frakcja zrębowo-naczyniowa (ang. *stromal vascular fraction*)

T – temperatura

t – czas

U – napięcie prądu

Ra – parametr chropowatości, średnie arytmetyczne odchylenie od linii średniej

Układy:

1. T – stop tytanu Ti6Al4V
2. TNT – (ang. *titania nanotubes*) – nanowarstwy TiO₂ wytworzone podczas elektrochemicznego utleniania stopu Ti6Al4V
 - a. TNT5 (zamiennie z T5) – warstwa nanoporowata, wytworzona przy $U = 5$ V
 - b. TNT15 – warstwa nanorurkowa, wytworzona przy $U = 15$ V
 - c. TNT40 – warstwa nanogąbczasta, wytworzona przy $U = 40$ V
3. TNF – (ang. *titania nanofibers*) – nanowłókniste warstwy TiO₂ wytworzone przy różnych parametrach prowadzenia chemicznego utleniania stopu Ti6Al4V
 - a) TNF4C – utlenianie $t = 4$ h, pod chłodnicą zwrotną
 - b) TNF6C – utlenianie $t = 6$ h, pod chłodnicą zwrotną
 - c) TNF10C – utlenianie $t = 10$ h, pod chłodnicą zwrotną
 - d) TNF4S – utlenianie $t = 4$ h, w inkubatorze
 - e) TNF6S – utlenianie $t = 6$ h, w inkubatorze
 - f) TNF10S – utlenianie $t = 10$ h, w inkubatorze
 - g) TNF72a – utlenianie $t = 72$ h, w inkubatorze, próba aktywowana kwasem fluorowodorowym
 - h) TNF72b – utlenianie $t = 72$ h, w inkubatorze, próba aktywowana mieszaniną rozcieńczonego kwasu azotowego (V) i fluorowodorowego
4. T-S – nanowłóknista, tytanianowa warstwa powstała w wyniku alkaliczno-sodowej obróbki stopu Ti6Al4V
5. T5-S – tytanianowa warstwa splecionych nanowłókien i nanoprętów, powstała w wyniku anodowego utleniania stopu Ti6Al4V, a następnie alkaliczno-sodowej obróbki powstałego układu
6. HA – powłoka hydroksyapatytowa (ang. *hydroxyapatite*)
 - a) HA 1.5 mA – wytworzona przy $I = 1.5$ mA
 - b) HA 2.5 mA – wytworzona przy $I = 2.5$ mA
 - c) HA 3.5 mA – wytworzona przy $I = 3.5$ mA
7. IL – warstwa pośrednia (ang. *intermediate layer*)

Streszczenie

Postęp w różnych dziedzinach naszego życia codziennego, w tym także i w medycynie, wiąże się z szerokim wykorzystaniem nowych technologii. Przykładem jest chociażby rozwijająca się w zauważalnie szybkim tempie implantologia, która wymaga stosowania coraz to bardziej złożonych i wielofunkcyjnych materiałów, które umożliwiają odtworzenie funkcji tkanek, np. kostnych. Chcąc uzyskać trwałe połączenie implant–kość poszukuje się materiałów, które obok odpowiednich właściwości fizykochemicznych, mechanicznych, jak i tribologicznych będą pobudzać i przyspieszać regenerację tkanki kostnej oraz działać stymulująco względem komórek osteogenicznych. Spośród materiałów używanych do produkcji np. implantów ortopedycznych i stomatologicznych, szczególną rolę odgrywają materiały metalowe, a zwłaszcza tytan i jego stopy. Pomimo wielu korzystnych właściwości materiałów tytanowych, takich jak niski ciężar właściwy, wysoka odporność na korozję oraz dobra biokompatybilność w środowisku tkanek i płynów ustrojowych, materiały te wykazują słabe właściwości osteoinduktywne, niezbędne do uzyskania trwałego i stabilnego połączenia implantu z tkanką kostną. Jednym z czynników ograniczających ich zastosowanie jest wysoki moduł sprężystości, który znacznie przewyższa moduł warstwy korowej, co może prowadzić do zaniku kości wokół implantu. Dobrym rozwiązaniem wydaje się być wytworzenie na powierzchni implantów metalowych powłoki hydroksyapatytu. Takie rozwiązanie powinno poprawić biogodność wszczepionego materiału z tkanką kostną, jak również znacznie wydłużyć czas użytkowania implantów. Ponadto powłoka taka powinna wpływać na poprawę odporności implantu na ścieranie, jak również pełnić funkcję dodatkowej bariery, zmniejszającej uwalnianie jonów metali z materiału podłoża. Obecnie, przeszkodą do szerszego wykorzystywania tych powłok jest ich bardzo niska adhezja do podłoża tytanowego.

Celem moich badań była modyfikacja powierzchni implantów ze stopu Ti6Al4V, które mogą być wytwarzane między innymi w technologii 3D (spiekanie laserowe proszków tytanowych przeznaczonych dla wyrobów medycznych). Założono, iż głównym rezultatem przeprowadzonych prac badawczo–rozwojowych będzie przygotowanie do wprowadzenia na rynek prototypu implantów stomatologicznych oraz ortopedycznych posiadających aktywną warstwę sprzyjającą regeneracji kości, odpowiednią do późniejszego nałożenia frakcji bogatej w komórki macierzyste. Założony cel został osiągnięty w dwóch etapach badań. W pierwszym etapie dokonano modyfikacji powierzchni próbek stopu Ti6Al4V, co doprowadziło do otrzymania tlenków tytanu o zróżnicowanej morfologii, strukturze oraz właściwościach mechanicznych i biologicznych (artykuły **P1**, **P2**, **P3**). W etapie drugim wykorzystano wysoce

biokompatybilne tlenkowe nanowarstwy (wytworzone w ramach etapu I), jako warstwy pośrednie (IL) i wytworzono układy typu Ti6Al4V/IL/HA. Warstwy pośrednie stanowiły łącznik pomiędzy powłoką hydroksyapatytową a podłożem ze stopu Ti6Al4V (artykuły **P4**, **P5**). Ich zadaniem było poprawienie siły wiązania pomiędzy metalicznym podłożem a powłoką hydroksyapatytową przy zachowaniu odpowiednich właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych układu.

Podsumowując, w ramach przeprowadzonych badań przedstawiono charakterystykę fizykochemiczną, mechaniczną oraz biologiczną trzynastu zróżnicowanych nanowarstw TiO₂/tytanianu. Scharakteryzowano dwadzieścia cztery układy z powłoką hydroksyapatytową, pod kątem ich właściwości fizykochemicznych i mechanicznych, a następnie oceniono aktywność biologiczną wybranych, trzech układów. Wynikiem przeprowadzonych badań jest opracowanie metody dwustopniowej modyfikacji (TNT5/HA) implantu ze stopu Ti6Al4V, co stanowi innowacyjne rozwiązanie gotowe do zastosowania w produkcji nowej generacji implantów stomatologicznych oraz ortopedycznych. Proponowany implant można bezpiecznie sterylizować metodą parową, co jest dodatkowym atutem z punktu widzenia łatwości zastosowania klinicznego. Implanty z bioaktywną warstwą powierzchniową wzbogaconą o frakcję bogatą w komórki macierzyste pacjenta będzie można stosować u szerszego grona odbiorców, w tym diabetyków, osób o obniżonej odporności immunologicznej, osób starszych, jak i u dzieci.

Abstract

Development in various areas of our daily life, including medicine, involves the extensive use of new technologies. An example of this is implantology, which is developing at a noticeably high pace and requires the use of more complex and multifunctional materials to allow the restoration of tissue function, e.g. bones. In order to achieve a durable implant–bone connection, materials are sought that, in addition to appropriate physicochemical, mechanical as well as tribological properties, will stimulate and accelerate bone tissue regeneration and stimulate osteogenic cells. Among the materials used in the production of, for example, orthopaedic and dental implants, metallic materials play a particular role, especially titanium and its alloys. Despite the numerous favourable properties of titanium materials, such as low specific weight, high corrosion resistance and good biocompatibility in tissue and body fluid environments, these materials exhibit poor osteoinductive properties, which are necessary to achieve a durable and stable bond between the implant and bone tissue. One of the factors limiting their use is their high elastic modulus, which significantly exceeds that of the cortical layer, which can lead to bone loss around the implant. A good solution seems to be the production of a hydroxyapatite coating on the surface of metallic implants. This solution should improve the biocompatibility of the implanted material to the bone tissue, as well as significantly prolong the service life of the implants. In addition, such coating should improve abrasion resistance of the implant, as well as function as an additional barrier by reducing the release of metal ions from the substrate material. Currently, the obstacle to the wider use of these coatings is their very low adhesion to the titanium substrate.

My research focused on modifying the surface of Ti6Al4V alloy implants that can be produced using i.a. 3D technology (laser sintering of titanium powders for medical devices). It was assumed that the main outcome of the carried out research and development would be the preparation for introducing a prototype of dental and orthopaedic implants to the market, which would have an active layer to promote bone regeneration, suitable for subsequent application of a stem cell–rich fraction. The stated purpose was achieved in two stages of the research. In the first stage, surface modifications of Ti6Al4V alloy samples were carried out, leading to titanium oxides with different morphology, structure and mechanical and biological properties (articles **P1**, **P2**, **P3**). In the second stage, highly biocompatible oxide nanolayers (produced as part of stage I) were used as intermediate layers (ILs) and fabricated Ti6Al4V/IL/HA systems. The intermediate layers were the link between the hydroxyapatite coating and the Ti6Al4V alloy substrate (articles **P4**, **P5**). Their aim was to improve the bonding strength between the

metallic substrate and the hydroxyapatite coating while maintaining the relevant physicochemical and biological properties of the system.

In conclusion, the study presents the physicochemical, mechanical and biological characterisation of thirteen diverse TiO₂/titanate nanolayers. Twenty-four hydroxyapatite-coated systems were characterised in terms of their physicochemical as well as mechanical properties, and then the biological activity of three selected systems was evaluated. The result of the research is the development of a method for the two-stage modification (TNT5/HA) of a Ti6Al4V alloy implant, which represents an innovative solution ready to be used in the production of a new generation of dental and orthopaedic implants. The proposed implant can be safely steam-sterilised, which is an additional advantage in terms of simplicity of clinical use. Implants with a bioactive surface layer enriched with the patient's stem cell-rich fraction will be suitable for a wider range of recipients, including diabetics, immunocompromised patients, the elderly, as well as children.

1. Wstęp

Demograficzne starzenie się współczesnego społeczeństwa, intensywny tryb życia człowieka i związane z tym częste urazy, a także choroby cywilizacyjne, to główne czynniki decydujące o rozwoju medycyny [1–6]. Z zagadnieniami tymi wiążą się interdyscyplinarne badania nad nowoczesnymi materiałami, a przede wszystkim poszukiwania nowych biomateriałów i działania mające na celu ich wprowadzenie do praktyki lekarskiej. Szczególnie ważne jest uzyskanie nowych, wielofunkcyjnych materiałów przeznaczonych na implanty długotrwałe (czas ich przebywania w środowisku tkankowym może przekroczyć dwadzieścia lat), które umożliwiają odtworzenie funkcji tkanek, np. kostnych [1–4,7,8]. Chcąc uzyskać trwałe połączenie implant–kość poszukuje się materiałów, które obok odpowiednich właściwości fizykochemicznych, mechanicznych, jak i tribologicznych będą pobudzać i przyspieszać regenerację tkanki kostnej oraz działać stymulująco względem komórek osteogenicznych. Spośród wielu materiałów używanych do produkcji np. implantów ortopedycznych i stomatologicznych, szczególną rolę odgrywają materiały metalowe, a zwłaszcza tytan i jego stopy. Pomimo wielu korzystnych właściwości tych materiałów, takich jak: niski ciężar właściwy, wysoka odporność na korozję oraz dobra biokompatybilność w środowisku tkanek i płynów ustrojowych, wykazują one słabe właściwości osteoinduktywne, niezbędne do uzyskania trwałego i stabilnego połączenia implantu metalowego z tkanką kostną. Kolejnym czynnikiem ograniczającym zastosowanie tytanu i jego stopów do produkcji implantów jest ich wysoki moduł sprężystości. Jego wartość znacznie przewyższa moduł warstwy korowej, co może prowadzić do zaniku kości wokół implantu [6,9–11]. Stąd też, prowadzone obecnie badania nad biomateriałami skupiają się na zbliżeniu ich funkcjonalności do naturalnej ludzkiej tkanki lub narządu.

Wpisując się w ten kierunek, zainteresowałam się możliwościami modyfikacji powierzchni implantów wykonanych ze stopu Ti6Al4V, prowadzącymi do zwiększenia bioaktywności ich powierzchni, a także poprawy właściwości mechanicznych. Zakres rozprawy doktorskiej obejmuje wytworzenie na powierzchni stopu Ti6Al4V tlenkowej nanoarchitektury, celem zwiększenia biointegracji implantu z kością, przy jednoczesnym zachowaniu odporności powierzchni na uszkodzenia mechaniczne i ścieranie. Z uwagi na fakt, iż hydroksyapatyt jest materiałem naturalnie występującym w ludzkim organizmie, wzbogacenie nim zmodyfikowanych powierzchniowo implantów tytanowych, powinno wpłynąć na zwiększenie ich bioaktywności i biogodności, zintensyfikować proces osteointegracji, zapobiec metalozie, jak i skutkować obniżeniem wartości modułu Younga. Niestety powłoki hydroksyapatytowe

charakteryzują się słabą adhezją do podłoża metalicznego. Innowacyjny charakter rozprawy doktorskiej, wynika z dążenia do uzyskania trwałych połączeń powłok hydroksyapatytowych z podłożem bazującym na stopie Ti6Al4V, poprzez zastosowanie wysoce biokompatybilnych, tlenkowych nanowarstw pośrednich. Opracowanie układu: implant metalowy/nanowarstwa pośrednia/hydroksyapatyt ma istotne znaczenie dla konstrukcji i wdrożenia na rynek medyczny implantów przeznaczonych dla ortopedii, a także stomatologii. Zakłada się, iż powstały w ten sposób implant mógłby być stosowany u szerszego grona pacjentów, w tym diabetyków, osób o obniżonej odporności immunologicznej, osób starszych, jak i u dzieci.

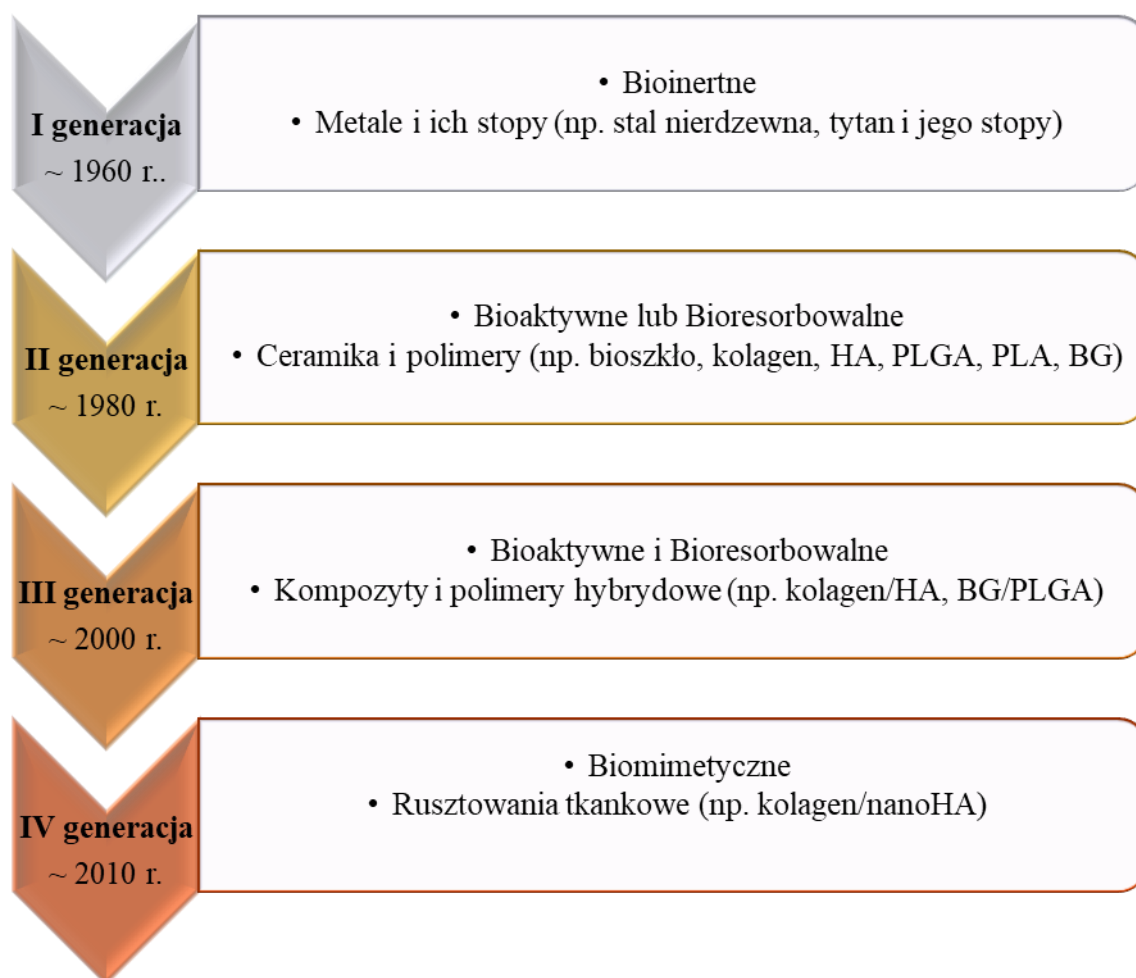
1.1. Biomateriały

Definicję biomateriału ustalono w 1982 roku, na konferencji „Biomaterials Consensus Conference at the National Institute of Health”. Zgodnie z nią **biomateriałem** nazywamy każdą substancję inną niż lek, albo kombinację naturalnych lub syntetycznych substancji, która może być użyta w dowolnym okresie, a której zadaniem jest uzupełnienie lub zastąpienie tkanek narządu, albo jego części lub spełnienie ich funkcji [12].

Słowo „biomateriał” zostało wprowadzone w połowie XX wieku, chociaż biomateriały były używane już znacznie wcześniej. Pierwsze wykorzystanie tego typu materiałów do celów medycznych datuje się na 3000 r. p.n.e., kiedy to w starożytnym Egipcie stosowano szwy lniane w zabiegach chirurgicznych. Majowie wykorzystywali muszle morskie do produkcji sztucznych zębów ok. 600 r. n.e. [7,13,14]. Okres XVIII i XIX wieku, w którym narodziła się współczesna medycyna stał się jednocześnie początkiem znaczącego postępu w dziedzinie biomateriałów. Zdano sobie sprawę, że zgodność biologiczna materiałów odgrywa główną rolę w wytwarzaniu i stosowaniu urządzeń wspomagających, np. w zrastaniu kości z wprowadzonym do organizmu ciałem obcym (implantem) [7,15]. Rozwój implantologii związany z naprawą kości długich i stawów, rozpoczął się pod koniec XIX wieku, dzięki W.A. Lane, który w latach 1893–1912 zaprojektował stalowe śruby i płytki umożliwiające zespolenie złamań kości [16]. Wraz z początkiem przemysłu tworzyw sztucznych w latach trzydziestych XX wieku, zaczęto wykorzystywać polimery w różnych zastosowaniach rekonstrukcyjnych [16]. Jednak to w trakcie II Wojny Światowej najintensywniej poszukiwano biomateriałów i projektowano implanty [16,17]. Chirurdzy często stawiali na szali życie pacjenta, byli gotowi wykonać ogromny skok technologiczny i zawodowy, aby uratować człowieka [17]. Ważnym odkryciem z czasów II wojny światowej był fakt, że piloci samolotów bojowych, którzy zostali zranieni przez fragmenty kabiny samolotu, wykonanej z polimetakrylanu metylu (PMMA), nie odczuwali negatywnych, przewlekłych reakcji na obecność odłamków tworzywa sztucznego

w organizmie. PMMA stało się po tym czasie powszechnie stosowanym materiałem do wymiany rogówki i zastępowania fragmentów uszkodzonych kości czaszki [18]. Ten okres jest określany jako era „chirurga/lekarza bohatera”, a także jako era pierwszej generacji biomateriałów [17]. Do tejże grupy biomateriałów należą materiały bioinertne, które służą do zapewnienia wsparcia i utrwalenia uszkodzonej kości [19,20]. Tlenki Al_2O_3 i ZrO_2 są najwcześniej wzmiankowanymi bioceramikami tej generacji biomateriałów, stosowanymi do zastępowania tkanki kostnej [19]. Dalsze postępy w zakresie materiałów i rozwoju technik chirurgicznych w latach 50–tych ubiegłego wieku pozwoliły na próby zastępowania naczyń krwionośnych, a w latach 60–tych stało się możliwe wszczepienie pierwszych sztucznych zastawek serca [18]. Niemniej jednak era „chirurga/lekarza bohatera” nadal zakładała raczej podejmowanie przez lekarzy i chirurgów prób „na wrywki” niż prowadzenie systematycznych badań. W latach 80–tych XX wieku podjęto prace nad projektowaniem biomateriałów do konkretnych zastosowań [21]. Silikony, teflony, hydrożele, poliuretany, glikol polietylenowy i hydroksyapatyt to tylko niektóre przykłady biomateriałów, nad którymi intensywnie pracowano w tym czasie [7,19]. Wiele z tych biomateriałów tzw. drugiej generacji (bioresorbowalnych) charakteryzuje nie tylko zdolność do regeneracji tkanek wokół siebie, ale także zdolność do indukowania biologicznych interakcji z otaczającymi je tkankami (bioaktywność) [7,19,22]. Stenty wewnątrznaczyniowe uwalniające leki, które pomagają w kontrolowaniu restenozy po balonowej angioplastyce, to jeden z przykładów biomateriałów drugiej generacji stosowanych w urządzeniach medycznych [23,24]. Coraz lepsze technologie laboratoryjne oraz lepsze zrozumienie biokompatybilności na poziomie komórkowym i molekularnym, jakie pojawiło się w XXI wieku, umożliwiły opracowanie bardziej wyrafinowanych biomateriałów, wykorzystujących markery powierzchniowe, czynniki wzrostu i inne związki biologicznie czynne niezbędne w inżynierii tkankowej [19,22]. Wraz z pojawieniem się koncepcji inżynierii tkankowej, powstają biomateriały trzeciej generacji, zaprojektowane specjalnie w celu pobudzenia reakcji na poziomie komórkowym i molekularnym. Termin inżynieria tkankowa jest szerokim pojęciem, które łączy w sobie jednocześnie zasady biomedycyny, inżynierii i nauk medycznych [25]. Dla przykładu, w celu wykonania implantów trzeciej generacji z bioceramiki, rusztowania z bioceramiki drugiej generacji są np. posiewane komórkami kościozastępczymi i czynnikami wzrostu [26]. Biomateriały te są projektowane jako trójwymiarowe struktury porowate, które są zdolne do stymulowania regeneracji tkanek, dostarczania składników odżywczych i ewentualnie inicjowania angiogenezy [27,28]. Zjawiska zachodzące na różnych poziomach organizacji

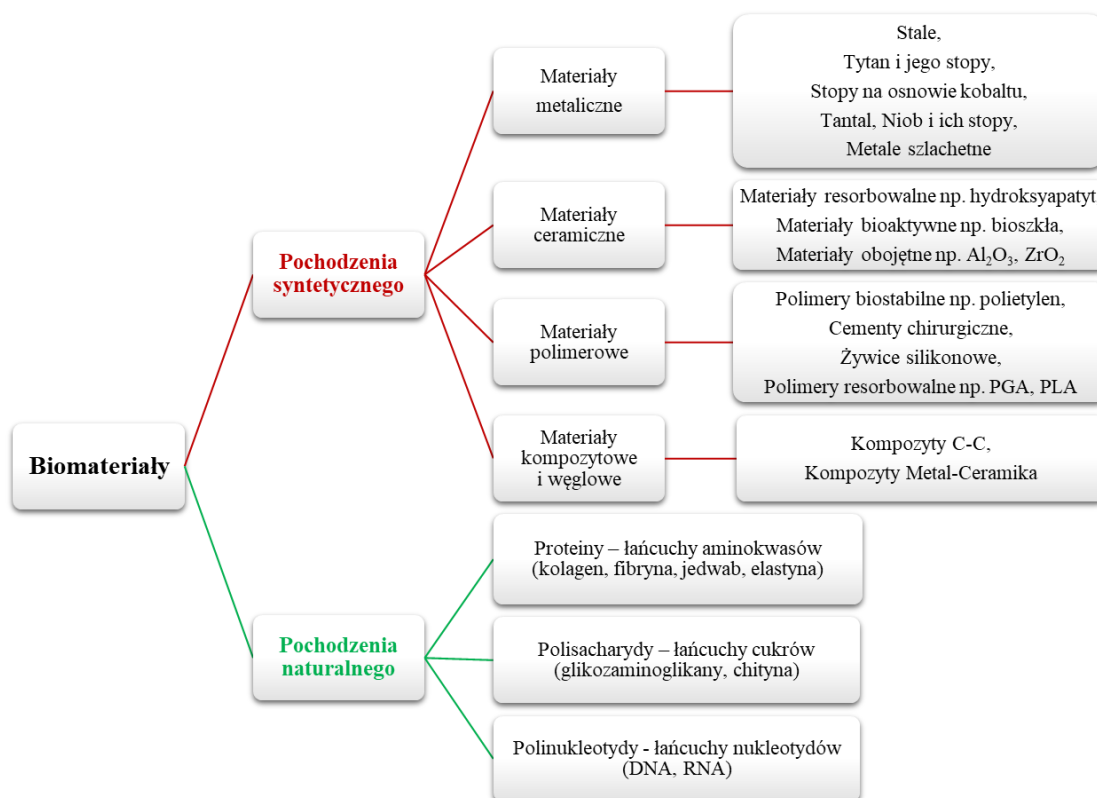
biologicznej, ze szczególnym uwzględnieniem poziomu komórkowego i molekularnego pozwalają na głębsze zrozumienie biomateriałów trzeciej generacji, co prowadzi do powstawania nowych materiałów stosowanych w inżynierii tkankowej. Czwarta generacja biomateriałów wchodzi w spersonalizowaną interakcję z procesami komórkowymi i mikrośrodowiskiem [27,29]. Biomateriały czwartej generacji, które mogą monitorować zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe procesy elektryczne, są ważne dla zrozumienia zarówno wewnątrz- jak i międzykomórkowej sygnalizacji oraz sposobu, w jaki komórki komunikują się na dużych odległościach [29,30]. Ewolucja biomateriałów stosowanych w chirurgii kostnej została schematycznie przedstawiona na Rysunku 1.



Rysunek 1. Ewolucja biomateriałów dla chirurgii kostnej (opracowanie własne na podstawie piśmiennictwa [19,30,31]).

Biomateriały mogą być naturalne lub syntetyczne. Do podstawowych materiałów stosowanych w produkcji implantów należą metale i ich stopy, polimery, ceramiki, tworzywa sztuczne, materiały kompozytowe, a także materiały bazujące na węglu. Materiały naturalne są często podobne, jeśli nie identyczne, do materiałów, które organizm może rozpoznać

i przetworzyć poprzez szlaki metaboliczne [7,32–34]. Podział obecnie stosowanych biomateriałów został przedstawiony na Rysunku 2.



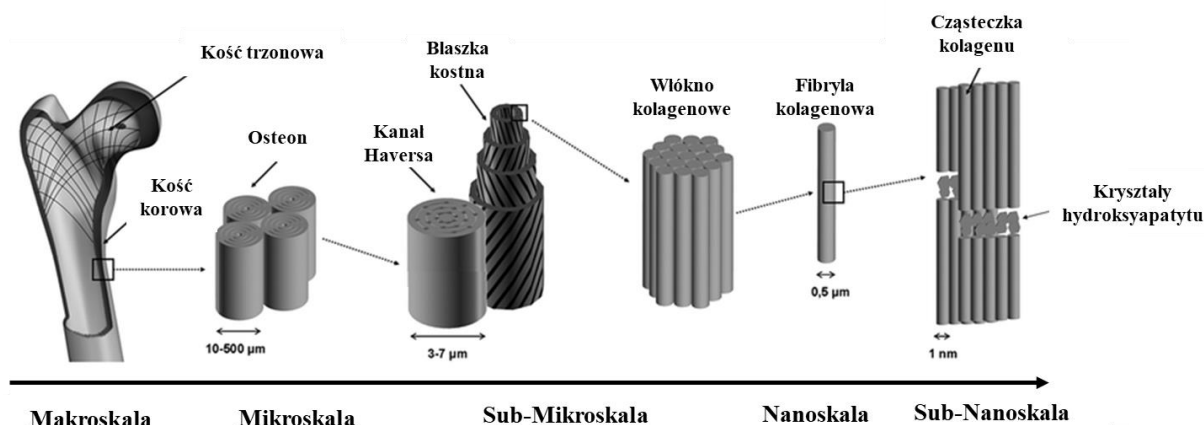
Rysunek 2. Schemat blokowy klasyfikacji biomateriałów (opracowanie własne na podstawie piśmiennictwa [7,32–34]).

Nowe koncepcje biologii molekularnej i lepsze zrozumienie reakcji „gospodarz–gość” powinny wpłynąć na poprawę działania biomateriałów. Optymalna reakcja „gospodarza” (gojenie, regeneracja) na wszczepiony materiał („gość”) jest bardzo ważna dla działania dzisiejszych biomateriałów [7]. Istnieje szereg parametrów, które należy uwzględnić przy opracowywaniu biomateriałów i związanych z nimi produktów medycznych. Wymagania te, ściśle zależą od funkcji, jaką mają spełniać w organizmie [35,36]. Obok odpowiednich właściwości fizykochemicznych i mechanicznych (tj. wytrzymałość zmęczeniowa, wytrzymałość na rozciąganie, twardość, odporność na ścieranie, sztywność, ciągliwość), biomateriały powinny charakteryzować się wysokim stopniem integracji z natywną tkanką kostną [35,37–39]. Ponadto, zaleca się aby wytworzony materiał o wymaganej jakości był łatwy w obróbce, tani w produkcji oraz ulegał efektywnej sterylizacji [36,37,40]. Niemniej jednak, to brak toksyczności i biokompatybilność głównie decydują o bezpieczeństwie wyrobu medycznego i warte są bardziej szczegółowej charakterystyki [7].

1.2. Oddziaływania tkanka kostna – biomateriał

1.2.1. Budowa i skład chemiczny tkanki kostnej

Schorzenia kości, stanowiące połowę chorób przewlekłych u osób powyżej pięćdziesiątego roku życia, nadal pozostają ważnym wyzwaniem klinicznym [35,41]. Kość jest dynamiczną i silnie unaczynioną tkanką łączną, która ulega przebudowie przez całe życie człowieka. Odgrywa ona integralną rolę w poruszaniu się, zapewnia szkieletowi odpowiednią nośność i działa jako osłona dla delikatnych narządów wewnętrznych organizmu. Oprócz tych funkcji strukturalnych, kość jest ściśle zaangażowana w homeostazę poprzez magazynowanie jonów wapnia i fosforu oraz poprzez regulację stężenia kluczowych elektrolitów we krwi [41,42]. Szkielet człowieka składa się z ponad 206 różnych kości, począwszy od kości długich znajdujących się w naszych kończynach, kości krótkich w nadgarstku i kostce, kości płaskich w mostku i czaszce, po kości nieregularne, takie jak miednica i kręgi [42]. Naturalna kość jest heterogenicznym i anizotropowym nanokompozytem, którego główne składniki są zorganizowane hierarchicznie na kilku poziomach strukturalnych (Rysunek 3) [43,44]. Kość jest podzielona na różne części w oparciu o makroskalę (kość trzonowa i korowa), mikroskalę (kanały Haversa, osteony), submikroskalę (pojedyncza warstwa blaszek z włóknami kolagenowymi), nanoskalę (fibryle kolagenowe) i subnanoskalę (minerały, cząsteczki kolagenu) [43,44]. To właśnie, nanostrukturalny poziom organizacji (twarde i elastyczne włókna kolagenowe wzmocnione kryształami hydroksyapatytu) zapewnia naturalnej kości odpowiednie właściwości mechaniczne (wytrzymałość na ściskanie, wysoką odporność na złamanie) oraz zdolność do przebudowy [44,45].



Rysunek 3. Hierarchiczna struktura kości, od makrostruktury (poziom makroskopowy) do skali nano (poziom molekularny). Opracowanie na podstawie piśmiennictwa [43,44].

W skład tkanki kostnej (*textus osseus*) wchodzi [45,46]:

- Komórki (5% masy kostnej):
 - osteoblasty, czyli komórki kościotwórcze (wielkość ok. 20–30 μm , z okrągłym jądrem i dobrze rozwiniętym szorstkim reticulum endoplazmatycznym),
 - osteocyty, czyli osteoblasty otoczone zmineralizowaną istotą międzykomórkową kości,
 - osteoklasty, czyli komórki kościogubne (wielkość ok. 100 μm , owalne, wielojądrzaste komórki),
- Macierz pozakomórkowa (ECM, ang. *extracellular matrix*), na którą składa się:
 - osteoid (20–40% masy kostnej):
 - niezmineralizowany składnik organiczny w postaci fibryli kolagenowych złożonych głównie z cząsteczek kolagenu typu I (ok. 300 nm długości i 1.5 nm średnicy),
 - organiczna substancja bezpostaciowa – głównie białka niekolagenowe (glikoproteiny, proteoglikany i sialoproteiny)
 - związki mineralne (50–70% masy kostnej), z czego połowa występuje w postaci nanokryształów hydroksyapatytu (HA , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ – płytki, igiełki, listki o grubości 1.5–4 nm) osadzonych wzdłuż fibryli kolagenowych,
 - woda (5–10% masy kostnej),
 - lipidy (3% masy kostnej).

Powierzchnia zewnętrzna kości pokryta jest bogato unaczynioną i unerwioną błoną włóknistą (okostną). Zewnętrzna geometria i wewnętrzna architektura tkanki kostnej jest ułożona w sposób zwarty (warstwa korowa, stanowiąca 80% masy kostnej) lub gąbczasty (kość o utkaniu beleczkowym, stanowiąca 20% masy kostnej) reprezentują makro– i mezoskopowe poziomy strukturalne [42,45]. Porowatość objętościowa warstwy korowej wynosi poniżej 10%, natomiast istoty gąbczastej ok. 50–90%. Oba rodzaje kości podlegają dynamicznej przebudowie, dojrzewaniu, różnicowaniu i resorpcji, które są kontrolowane przez oddziaływania pomiędzy komórkami osteocytów, osteoblastów i osteoklastów. Osteoblasty i osteocyty pochodzą z mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCs), natomiast osteoklasty z krwiotwórczych komórek macierzystych. Dziewięćdziesiąt procent populacji komórek kostnych stanowią osteocyty (dojrzałe komórki kostne), które są podstawowymi komórkami odpowiedzialnymi za tworzenie kości, mineralizację i regulację sygnalizacji

komórkowej. Położone są w tzw. jamkach kostnych gdzie poprzez kanaliki kostne i wypustki komórek, uczestniczą w procesie wymiany substancji odżywczych i metabolitów [47–49]. Kości zbite składają się z kanałów Haversa i osteonów. Osteony, czyli cylindry zawierające osteocyty, są ułożone równoległe do trzonu kostnego. Każdy osteon składa się z blaszek otaczających kanał Haversa, zawierających naczynia krwionośne i układy włókien jako jego podjednostki, zawierające zmineralizowane fibryle kolagenowe zbudowane z przylegających do siebie cząsteczek połączonych wiązaniami krzyżowymi [49]. Podczas fizjologicznego procesu przebudowy kości, osteoblasty są głównie odpowiedzialne za tworzenie nowej kości, podczas gdy osteoklasty są odpowiedzialne za resorpcję starej kości [47–49]. Taki dynamiczny proces, w którym uczestniczą osteoklasty i osteoblasty, nazywany jest remodelingiem kości i jest odpowiedzialny za utrzymanie zdrowej kości. Pomimo iż, kości mają pewną zdolność do gojenia się i/lub regeneracji, nie można jej samodzielnie osiągnąć w przypadku dużych ubytków kostnych. Duże ubytki lub urazy kostne, spowodowane podeszłym wiekiem, wypadkami komunikacyjnymi, brakiem zrostu złamań, resekcją guza nowotworowego kości itp. stanowią poważny problem w ortopedii i są przyczyną dużych szkód dla zdrowia i jakości życia pacjenta [35,41]. Dlatego też, w większości przypadków, aby przywrócić normalne funkcjonowanie uszkodzonej struktury, konieczna jest interwencja z zewnątrz. Wśród różnych opcji leczenia, takich jak autoprzeszczepy (kość pobrana z ciała tej samej osoby) i alloprzeszczepy (tkanka kostna od zmarłego dawcy), popularność zyskuje inżynieria tkankowa kości, która skupia się na metodach syntezy i/lub regeneracji kości w celu przywrócenia, utrzymania lub poprawy jej funkcji *in vivo* [47,48].

1.2.2. Osteointegracja biomateriałów

Naukowe podstawy współczesnej implantologii stworzył Per–Ingvar Brånemark, który jako pierwszy odkrył niezwykle właściwości tytanu. W 1952 roku, przeprowadził on makroskopową i mikroskopową analizę szpiku i warstwy korowej królika, wprowadzając do kości udowej mikrosoczewkę w obudowie z tytanu. Przy próbie usunięcia soczewki, Brånemark zauważył, że warstwa korowa kości i obudowa mikroskopu są ze sobą ściśle zrosnięte [50–52]. Mikroskopowo, tkanka kostna wrosła w bardzo cienkie przestrzenie w obudowie tytanowej [50]. Od 1965 roku nastąpił intensywny rozwój badań zarówno przedklinicznych, jak i klinicznych implantów jamy ustnej, z udziałem człowieka. Rozwój implantów zakotwiczonych bezpośrednio w kości oznaczał przełom w możliwościach leczenia osób z częściową lub całkowitą bezzębnością [52].

Termin **osteointegracja** został zdefiniowany przez Brånemarka w 1976 roku i odnosi się do bezpośredniego połączenia kości z implantem (bez udziału tkanki łącznej), co skutkuje strukturalną i funkcjonalną integracją pomiędzy żywą kością a powierzchnią implantu przenoszącego obciążenia [50]. W oparciu o wyniki tych badań zdefiniowano obecnie obowiązujące pojęcie **implantu**, jako urządzenia medycznego wykonywanego z jednego lub więcej biomateriałów, które mogą być umieszczone częściowo lub całkowicie pod powierzchnią nabłonka i które mogą pozostać przez dłuższy okres w organizmie [53].

Osteointegracja jest podstawą udanego wszczepienia implantu śródkostnego. Pierwotne niepowodzenie wszczepienia implantu z powodu niewystarczającej osteointegracji występowało u ok. 1–2% pacjentów. Jednak pojawienie się implantów stomatologicznych dało początek dwóm nowym chorobom jamy ustnej: *periimplant mucositis* i *periimplantitis*. *Periimplant mucositis* określa się, jako stan zapalny tkanek miękkich, natomiast *periimplantitis* jest to wyrażenie określające dodatkowo zmiany w obrębie tkanki kostnej wokół implantu. Wtórne niepowodzenie jest często spowodowane przez *periimplantitis* kilka lat po udanej osteointegracji i występuje u około 5–20% pacjentów [54–56]. U pacjentów z cukrzycą, osteoporozą, stosujących bisfosfoniany lub poddawanych radioterapii, osteointegracja nadal stanowi wyzwanie w terapii implantologicznej. Liczne badania wykazały, że wytrzymałość połączenia między kością a implantem wzrasta wkrótce po wszczepieniu implantu (0–12 tygodni). Wytrzymałość ta może być w rzeczywistości związana z ilością kości otaczającej powierzchnie implantu. Innym czynnikiem, który może mieć wpływ na wytrzymałość połączenia jest stymulacja biofizyczna i czas przeznaczony na gojenie. Badania wykazały, że wymierny wzrost interakcji między kością a implantem ma miejsce przez co najmniej 3 lata [57].

W momencie rozpoczęcia zabiegu chirurgicznego, mającego na celu wszczepienie implantu, rozpoczyna się również proces gojenia rany. Szereg uszkodzeń tkanek miękkich i twardych powstających podczas mocowania implantu, prowadzi do zainicjowania reakcji zapalnej organizmu, której celem jest naprawa lub regeneracja uszkodzonej tkanki. Podczas tego skomplikowanego procesu, interakcja sił mechanicznych i biologicznych wydaje się krytyczna dla osiągnięcia udanej osteointegracji implantu. Klinicznie osteointegracja odpowiada stabilności i ankylozie implantu w kości. Stabilność implantu, pośredni wskaźnik osteointegracji, jest miarą klinicznej nieruchliwości implantu. Wyróżnia się stabilność pierwotną i wtórną. Stabilność pierwotna (mechaniczna) implantu wynika głównie z mechanicznego jego połączenia z kością zbitą, bez oddziaływania biologicznego. Przejście

od stabilności pierwotnej do stabilności wtórnej ma miejsce podczas wczesnego gojenia się rany, po czym następuje przebudowa kości. Pierwsza z nich jest warunkiem uzyskania stabilności wtórnej. Druga natomiast dyktuje czas funkcjonalnego obciążenia [57,58].

W czasie wprowadzania implantu śródkostnego, puste przestrzenie pomiędzy beleczkami kostnymi wypełniają się krwią i powstaje skrzep krwi. Charakteryzuje się on obecnością trombocytów, erytrocytów, neutrofilów i monocytów/makrofagów w sieci fibryny, co prowadzi do powstania prymitywnej tkanki ziarninowej pochodzącej z proliferujących komórek struktur naczyniowych i niezróżnicowanych mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCs) [59–61]. Utworzona macierz fibrynowa działa jako rusztowanie (osteokondukcja) dla migracji komórek osteogennych i ostatecznego różnicowania (osteoindukcja) tych komórek w miejscu gojenia. Oddziaływanie czynników chemotaktycznych, które wydzielane są z komórek jako czynniki bioaktywne wpływa na mobilizację sąsiednich komórek i ich migrację poprzez uformowany skrzep na powierzchnię implantu [62,63]. W kolejnym etapie następuje inicjacja tworzenia kości. Przebudowa kości (naprzemienne występowanie resorpcji kości i tworzenia nowej) jest procesem trwającym przez całe życie [58].

Sam proces osteointegracji jest dynamiczny i złożony. Istnieje wiele czynników, które wpływają na tworzenie i utrzymywanie tkanki kostnej na powierzchni implantu. Topografia ich powierzchni ma istotny wpływ na zachodzące podczas osteointegracji procesy biologiczne [63]. Pokrycie powierzchni i siła przyczepności skrzepów fibryny do powierzchni implantu zależy od właściwości powierzchni implantu. Jedną z hipotez sugeruje, że zwiększenie chropowatości powierzchni wspiera powstawanie większej ilości skrzepów fibryny na powierzchni i zwiększa siłę przyczepu skrzepu. Ma to istotne znaczenie dla kurczenia się rany – komórki poruszając się po włóknach fibryny przyciągają je, promując w ten sposób skuteczniejsze gojenie się rany [64].

Aby sprostać wymaganiom związanym z osteointegracją, materiały implantacyjne powinny być indywidualnie dopasowane do ściśle określonego zastosowania i posiadać odpowiednie właściwości mechaniczne. Elastyczność implantu i długoterminowa integralność kości, związana z jej przebudową w obszarze okołointplantowym, są ze sobą silnie powiązane. W przypadku materiałów stosowanych do odbudowy zębów, należy użyć materiałów, które mają właściwości podobne do szkliwa i zębiny (Tabela 1). Wówczas, taka rekonstrukcja będzie wykazywała właściwości podobne do naturalnego zęba. Częstym zjawiskiem wynikającym z nieodpowiednich właściwości implantu jest pojawiający się efekt ekranowania naprężeń. Wysoka sztywność implantów ortopedycznych (np. trzpienia endoprotezy stawu biodrowego),

niezdolność dopasowania ich wytrzymałości do warstwy korowej i gąbczastej, powoduje że kość nie jest odpowiednio obciążana, a w konsekwencji, ze względu na zanik struktur kostnych, dochodzi do stopniowego obluzowania implantu [65–69].

Tabela 1. Właściwości mechaniczne tkanek zęba oraz ludzkiej tkanki kostnej [70–73].

Material	Moduł Younga (GPa)	Wytrzymałość na ściskanie (MPa)	Wytrzymałość na rozciąganie (MPa)
Szkliwo	84.1	384	11.5
Zębina	18.6	297	105.5
Miazga	0.002	–	–
Warstwa korowa	7–30	100–230	50–150
Istota gąbczasta	0.05–0.5	2–12	–

1.2.2. Mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs)

Komórki macierzyste (tzw. komórki pnia, ang. *stem cells* lub *stromal cells*) stanowią populację komórek, które są zdolne do samoodnowy i wykazują zdolność do różnicowania się w wielu kierunkach [74,75]. Ich główne funkcje to rozwój tkanek, homeostaza, a w przypadku uszkodzenia tkanek – ich reperacja. Komórki macierzyste występują w organizmie człowieka w niszach (wyspecjalizowanych regionach zewnątrzkomórkowych) różnych tkanek, takich jak krew, szpik kostny, pępowina, miazga zębowa, więzadło przyzębia, tkanka tłuszczowa, mięśnie szkieletowe [76–78]. Większość tkanek posiada multipotencjalne komórki macierzyste, które mogą dać początek wielu typom komórek pochodzących z jednego listka zarodkowego (endo-, mezo- i ektodermy) [79,80].

Jednymi z pierwszych komórek przybywających do miejsca implantacji są komórki układu odpornościowego – neutrofile i makrofagi, które oczyszczają miejsce rany z ewentualnych patogenów i tkanki martwiczej. Następnie, miejsce implantacji kolonizują mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs) [64,81]. Komórki te posiadają ruchliwość i aktywność enzymatyczną pozwalającą na przemieszczanie się przez gęste skrzepy fibryny w drodze do powierzchni implantu, gdzie będą narażone na działanie cytokin zapalnych i czynników wzrostu, sprzyjających gojeniu się ran i regeneracji tkanek [64,82]. MSCs mają potencjał do różnicowania się w kilka typów komórek, takich jak np. osteocyty, chondrocyty, fibroblasty, adipocyty i mioblasty, w zależności od środowiska biologicznego i właściwości powierzchni implantu. Jednakże los komórek macierzystych wokół implantów kostnych wydaje się ukierunkowany na tworzenie tkanki kostnej, z pewną ilością tkanki miękkiej powstającej na styku kości i implantu. Tak więc, zanim MSCs dotrą do powierzchni implantu, mogą już

uruchomić całą „maszynę” różnicowania niezbędną do przekształcenia się w preosteoblasty i rozpoczęcia tworzenia kości [64,75].

W inżynierii tkanek pochodzenia mezodermalnego, najlepiej poznanym i najczęściej wykorzystywanym źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych był szpik kostny (BMSCs). Jednak procedura pobrania MSCs pochodzących z szpiku kostnego (BM) jest wysoce inwazyjna, a ilość oraz zdolność do różnicowania tych komórek izolowanych z BM maleje wraz z wiekiem pacjenta. Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej (ADSCs) stanowią więc cenną alternatywę dla komórek mezenchymalnych szpiku kostnego [76,83–85]. Tkanka tłuszczowa, pochodząca z mezenchymy, występuje w szpiku kostnym, wokół narządów wewnętrznych, pod skórą i w klatce piersiowej. U człowieka jest jedną z najbardziej obfitych tkanek, metabolicznym rezerwuarem do kumulowania i uwalniania wysokoenergetycznych substratów, a także posiada wiele właściwości endokrynologicznych, ponieważ wydziela liczne polipeptydy, hormony, czynniki wzrostu i cytokiny [83,86]. Tkanka tłuszczowa składa się głównie z adipocytów oraz heterogennej mieszaniny komórek, które określa się jako frakcję zrębowo–naczyniową (SVF). W skład SVF wchodzi różne typy komórek – mezenchymalne komórki macierzyste, adipocyty, fibroblasty, komórki hematopoetyczne, leukocyty, komórki śródbłonna. Według najnowszych badań, tkanka tłuszczowa jest jednym z najbogatszych źródeł somatycznych komórek macierzystych w organizmie ludzkim, dlatego też stanowi wielką nadzieję na wykorzystanie jej w naprawie i regeneracji tkanek [83,87]. Wyizolowane z tkanki tłuszczowej, mezenchymalne komórki macierzyste (tj. ADSCs), podobnie jak inne MSCs (np. BMSCs), wykazują wrzecionowaty lub gwiaździsty kształt, zdolność przylegania do plastiku w hodowli *in vitro* i tworzenia kolonii podobnych do fibroblastów, dużą zdolność proliferacyjną oraz zdolność do różnicowania osteogenicznego, adipogenicznego i chondrogenicznego [76,77,83]. ADSCs mogą być szeroko wykorzystywane w praktyce inżynierii tkankowej zwłaszcza, jeśli biorca jest jednocześnie dawcą (przeszczep autologiczny), ponieważ są one zdolne do samoodnowy, do różnicowania w kierunku wielu linii komórkowych i łatwo je pobrać w dużych ilościach (~5000 komórek/ml tłuszczu) przy minimalnych procedurach inwazyjnych [83,88,89].

1.3. Biomateriały metaliczne

Metale i ich stopy, to jedne z najstarszych i najszerzej stosowanych materiałów w ortopedii, stomatologii, a także chirurgii szczękowo–twarzowej. Ich niewątpliwą zaletą są optymalne parametry mechaniczne, pozwalające na zastosowanie metali przy konstrukcji implantów, których zadaniem jest wzmocnienie, naprawa lub zastąpienie uszkodzonej tkanki kostnej. Dobierając odpowiednio strukturę i właściwości metalu lub jego stopu możemy wytwarzać implanty krótko– lub długoterminowe z uwagi na czas ich funkcjonowania w organizmie biorcy [7,90–92]. Postęp w badaniach materiałów ceramicznych i polimerowych powoduje, że w wielu przypadkach ich biokompatybilność i biofunkcjonalność jest lepsza niż metali [93,94]. Jednak w praktyce szacuje się, że ponad 70% wyrobów implantacyjnych jest wykonanych z metali oraz ich stopów i odsetek ten pozostaje niezmienny ze względu na ich wysoką wytrzymałość i odporność na złamanie [93]. Omawiane wszczepy nie powinny ulegać korozji oraz nie powinny wykazywać toksyczności w kontakcie z płynami ustrojowymi. Złoto, srebro i platyna oraz ich stopy, to grupa metali szlachetnych, których zastosowanie do konstrukcji implantów sięga starożytności. Obecnie, znaczniki w postaci cząsteczek złota są stosowane do obrazowania stentów, platyna jest używana w postaci drutów embolizacyjnych, a stopy złota i srebra do uzupełnień protetycznych w stomatologii [7,92,95–97]. Z metali nieszlachetnych i ich stopów najszersze zastosowanie mają austenityczne stale, stopy na bazie kobaltu, jak również tytan i jego stopy. Podstawowym wymogiem stawianym tego typu biomateriałom jest wspomniana już odporność na korozję w środowisku płynów ustrojowych, brak toksyczności uwalnianych jonów, a także odporność na zużycie, co wiąże się z ograniczeniem powstawania odłamków ściernych [7,90–93].

1.3.1. Charakterystyka materiałów bazujących na tytanie i jego stopach

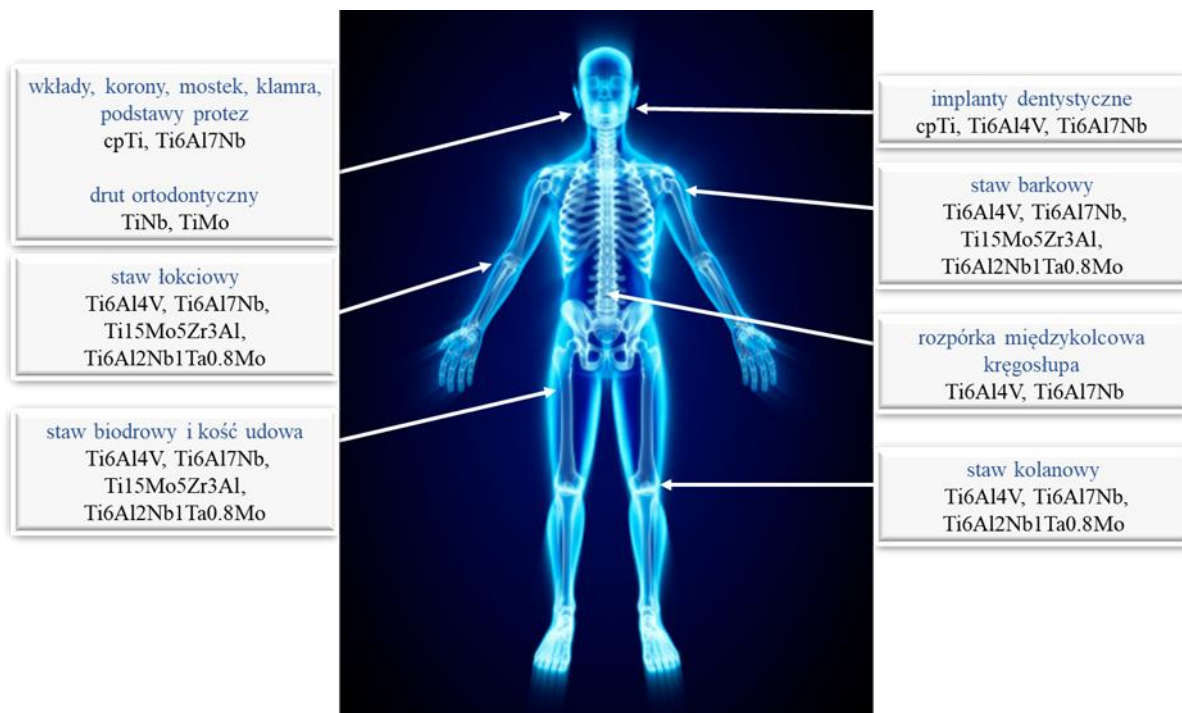
Tytan jest wykorzystywany w wielu gałęziach przemysłu np. lotniczego, motoryzacyjnego, kosmicznego, chemicznego, jubilerskiego, ale także i medycznego. Wyniki badań Brånemarka spowodowały, że wymieniony wyżej metal i jego stopy stały się najczęściej stosowanymi materiałami do konstrukcji implantów długoterminowych, które znajdują zastosowanie w stomatologii, ortopedii, chirurgii szczękowo–twarzowej, kardiologii i chirurgii kręgosłupa [98,99].

Tytan jest pierwiastkiem, o liczbie atomowej 22 i masie atomowej równej 47.90 u. Jest metalem przejściowym, o srebrzystobiałej barwie, połyskującym, bezwonnym, odpornym na korozję i stałym w temperaturze pokojowej. Gęstość tytanu (4.5 g/cm^3) w porównaniu do innych metali (np. stal nierdzewna – 7.9 g/cm^3 , stop Cr–Co–Mo – 8.3 g/cm^3) jest bardzo niska,

co powoduje, że zaliczany jest do grupy metali „lekkich”. Powyższa właściwość wpływa na jego wykorzystanie do wytwarzania lekkich konstrukcji, przy jednoczesnym zachowaniu znacznej wytrzymałości mechanicznej oraz twardości [99–103]. Tytan jest materiałem alotropowym, który występuje w dwóch odmianach: heksagonalnej zwartej sieci α -Ti ($a = b = 0.295$ nm, $c = 0.468$ nm) stabilnej do temperatury 882°C oraz sieci regularnie przestrzennie centrowanej β -Ti ($a = b = c = 0.328$ nm) – powyżej tej temperatury [100,104,105]. W stopach tytanu, jako dodatki stopowe stosuje się szereg innych pierwiastków (np. glin, mangan, molibden, cyna, wanad, cyrkon), uzyskując w ten sposób materiały o lepszej wytrzymałości mechanicznej, odporności na pełzanie, reakcji na procesy starzenia się pod wpływem ciepła i odkształcalności, w porównaniu do czystego tytanu [106,107]. Stopy tytanu w oparciu o kryterium strukturalne w stanie równowagi klasyfikuje się na jednofazowe α , jednofazowe β oraz dwufazowe $\alpha+\beta$. Występują także stopy pseudo α (struktura złożona z fazy α , zawierająca poniżej 5% pierwiastków stabilizujących fazę β) oraz pseudo β (struktura złożona z metastabilnej fazy βM , o właściwościach podobnych do stopów $\alpha+\beta$ z dużą zawartością fazy β). Właściwości tych materiałów zależą od składu, względnych proporcji faz α i β , obróbki termicznej oraz warunków obróbki cieplno–mechanicznej. Faza α charakteryzuje się dużą wytrzymałością i odpornością na pełzanie w temperaturze ok. 600°C , mniejszą skłonnością do pochłaniania gazów oraz lepszą odpornością na pełzanie aniżeli stopy β . Proces obróbki stopów typu α odbywa się na zimno. Faza β wykazuje wytrzymałość bez obróbki cieplnej, bardzo dobrą plastyczność oraz doskonałą odporność na korozję. Niemniej jednak, stopy te bardzo łatwo pochłaniają tlen w wysokich temperaturach i stają się kruche. Stosowane są dość rzadko. Stopy dwufazowe $\alpha+\beta$ wykazują wyższą wytrzymałość na rozciąganie, odporność na złamanie i zużycie od stopów jednofazowych, charakteryzują się dobrą spawalnością i w porównaniu do stopów α , formowane są głównie na gorąco, co czyni je idealnymi dla implantów stomatologicznych oraz ortopedycznych [104,106–109]. Temperatura przemiany fazy α w β czystego tytanu wzrasta lub maleje w zależności od rodzaju pierwiastków stopowych. Dodatki stopowe takie jak: Al, O, N, C, mają tendencję do stabilizowania fazy α i nazywane są α -stabilizatorami, a ich dodatek zwiększa temperaturę przemiany β . Natomiast dodatek β -stabilizatorów takich jak: V, Mo, Nb, Ta, Fe, Cr, Fe, W, Si, Co, Mn, H obniża temperaturę przemiany β . Niektóre z pierwiastków, które nie mają wyraźnego wpływu na stabilność żadnej z faz, ale tworzą z tytanem roztwory stałe, określane są jako pierwiastki neutralne (np. Zr i Sn, Th, Hf) [106–108].

Tytan i jego stopy znajdują szerokie zastosowanie w medycynie [100,104,110–113]. Tytan wykazuje doskonałą odporność na reakcje chemiczne w środowisku biologicznym organizmu ludzkiego. Bioinertność tytanu wynika z jego zdolności do naturalnego tworzenia na swojej powierzchni ochronnej warstwy tlenkowej (TiO_x , tzw. warstwy pasywnej) dzięki czemu jego odporność na korozję jest lepsza niż stali nierdzewnej i stopów Co–Cr [90,100,110]. Dytlenek tytanu jest głównym składnikiem warstwy pasywnej, w której skład wchodzi także tlenki, na niższych stopniach utlenienia (Ti_2O_3 oraz TiO). Ten amorficzny film ochronny jest nieprzepuszczalny chemicznie, wysoce przylegający, nierozpuszczalny i zapobiega reakcjom chemicznym pomiędzy tkanką ludzką a tytanem w środowisku płynów ustrojowych człowieka. Niemniej jednak, grubość tworzącej się na powierzchni pasywnej warstwy tlenkowej jest zbyt niska ($\sim 1\text{--}8$ nm), aby wykazywać właściwości bioaktywne [107,107,114–117]. Kolejną zaletą tytanu, jest brak podatności na namagnesowanie. Wynikające z tego korzyści dla pacjentów z wprowadzonym do ciała tytanowym implantem, obejmują zmniejszenie komplikacji podczas poddawania się tomografii komputerowej lub promieniowaniu rentgenowskiemu, unikanie namagnesowania tytanowej wkładki lub protezy w pobliżu źródła elektromagnetycznego (takiego jak większość nowoczesnej elektroniki), a także nie uruchamiają wykrywaczy metalu na lotniskach [118,119]. Implanty dentystyczne są zwykle wykonywane z komercyjnie czystego tytanu (cpTi) o różnym stopniu czystości (stopniowanym od 1 do 4 w zależności od tytanu i zanieczyszczeń). CpTi (klasy 4), jak i dwufazowy stop Ti6Al4V (zazwyczaj klasy 5, wg normy ISO5832/3 o zawartości 5.5% mas. glinu i 3.5% mas. wanadu) są najczęściej wykorzystywane w stomatologii. Aparaty ortodontyczne wykonane ze stopów tytanu są lżejsze, mocniejsze i charakteryzują się lepszą biokompatybilnością niż stal [90,93,100,104,112,120,121]. Tytan i jego stopy są szeroko stosowane między innymi w artroplastyce i wymianie kości, implantach czaszkowo–twarzowych, szczękowych i stomatologicznych, narzędziach chirurgicznych, wyrobach medycznych lub protezach zewnętrznych i wewnętrznych (Rysunek 4) [118].

Stop Ti6Al4V (w szczególności klasy 5) w porównaniu z cpTi wykazuje doskonałą granicę plastyczności i właściwości zmęczeniowe, jak również wysoką odporność na korozję i niższy moduł sprężystości. Dodatek aluminium zwiększa twardość Ti o 32%, wpływa także na umacnianie fazy α stopów tytanowych, zarówno w temperaturze pokojowej, jak i w podwyższonej, zmniejsza gęstość stopów oraz ulepsza ich obrabialność. Obecność wanadu wpływa na uzyskanie fazy β (podatność na odkształcenia) [9,122].



Rysunek 4. Najczęściej stosowane stopy tytanu do produkcji wyrobów medycznych przeznaczonych do ciała ludzkiego. Opracowanie na podstawie piśmiennictwa [118].

Pomimo, że stop Ti6Al4V jest szeroko stosowany, jako biomateriał do produkcji implantów, ostatnie badania wykazały, że stop ten może uwalniać w organizmie jony glinu i wanadu [100,105,110]. Uwalniane jony wanadu mogą wykazywać wysoką cytotoksyczność, natomiast jony glinu mogą przyczyniać się do powstawania zaburzeń neurologicznych [90,93,100,105]. Ponieważ implanty tytanowe, zazwyczaj umieszczone są w ciele na długi okres, problem ten nie powinien być lekceważony. Dlatego też, pożądane jest ciągle poszukiwanie nowych stopów na bazie tytanu, o jak najlepszych właściwościach mechanicznych korozyjnych oraz biointegracyjnych. Niemniej jednak, obecnie i w najbliższej przyszłości stop Ti6Al4V będzie nadal wykorzystywany, co wynika z faktu, że jest on najlepiej przebadany klinicznie oraz tańszy od pozostałych stopów tytanowych [100]. Większość stopów tytanu jest projektowana przy założeniu ich niskiej sztywności jako podstawowej właściwości dla zastosowań przy konstrukcji implantów i protez. Biorąc za przykład tkankę kostną zbitą, ważne jest, aby moduł Younga biomateriału był jak najbardziej zbliżony do modułu Younga warstwy korowej (7–30 GPa) [120,123]. Ma to istotne znaczenie, ponieważ w przypadku wyższych wartości tego parametru, może nastąpić resorpcja kości i dojść do ewentualnego niepowodzenia zabiegu implantacji. Niedopasowanie zachowania sprężystego pomiędzy implantem a sąsiadującą kością jest określane jako efekt ekranowania. Moduł Younga

w przypadku stopu Ti6Al4V (110–210 GPa) jest zazwyczaj niższy niż w przypadku stopów na bazie kobaltu (240 GPa), i stali nierdzewnej (210 GPa), ale nadal znacznie wyższy niż w przypadku warstwy korowej [100,105,120,122–124]. Chociaż sztywność tytanu i jego stopów jest ponad dwukrotnie większa niż kości, to materiał ten jest szeroko wykorzystywany w medycynie, pomimo, że jego stosowanie może prowadzić do pogorszenia stanu sąsiedniej/sąsiednich kości ze względu na ich mniejsze obciążenie [100]. Zaletą tytanu i jego stopów jest ich odporność na korozję, co czyni je biologicznie obojętymi, natomiast wadą jest brak trwałych połączeń z ludzkimi komórkami kostnymi lub tworzenie bardzo słabych tego typu połączeń [111,112]. Wprowadzanie nowych technologii do produkcji implantów tytanowych, szczególnie nanotechnologii, stwarza możliwości rozwiązania wielu powyższych problemów. Istotną rolę pełni obróbka powierzchni implantu, której celem jest zintensyfikowanie procesów osteointegracji [9,111,112].

1.4. Modyfikacje powierzchni implantów tytanowych i stopów tytanu

Tytułowe procesy są prowadzone celem uzyskania efektu przyspieszenia osteointegracji implantu z kością, a także poprawy jego właściwości tribologicznych oraz mechanicznych [57,90,110]. Dotychczasowe doniesienia wskazują, że takie czynniki jak: chropowatość powierzchni, ładunek powierzchniowy, energia powierzchniowa i skład chemiczny, mają istotne znaczenie dla procesów osteointegracji [57,125–128]. W implantach stomatologicznych czy ortopedycznych nanotopografia ma wpływ na oddziaływanie komórka–implant na poziomie komórkowym i białkowym, co pozwala na lepszą i szybszą osteointegrację, np. poprzez oddziaływanie na różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych i osteoblastów [125,126]. Gładkie powierzchnie sprzyjają higienie jamy ustnej i poprawiają adhezję fibroblastów. Natomiast chropowate powierzchnie wpływają na bardziej efektywną kolonizację i proliferację komórek osteoblastów. Właściwości powierzchni w skali makro zapewniają mechaniczną blokadę i pierwotną stabilność implantów wewnątrz kości. Powierzchniowe mikro– i nano– struktury wpływają na zachowanie komórek, promując wtórną lub biologiczną stabilność [129–132]. Obecnie uważa się, że modyfikacje powierzchni w skali mikro wywierają jedynie pośredni wpływ na aktywność komórkową, przez co ich działanie oraz sukces implantacyjny jest ograniczony. Dlatego też istnieje zapotrzebowanie na takie cechy powierzchniowe implantu, które będą wywierać bardziej bezpośredni i szybszy sposób oddziaływania z komórkami kostnymi. Zważywszy na właściwości geometryczne kolagenu, jak i hydroksyapatytu, komórki kostne powinny chętniej i szybciej reagować na zmiany otoczenia zachodzące w skali nanometrycznej. Dlatego też modyfikacja powierzchni

tytanowych implantów do skali nano, wydaje się być obiecującym sposobem na osiągnięcie silniejszej i szybszej osteointegracji implantów, a także promowania krótszego czasu gojenia [52,129,133].

Należy zauważyć, że produkcja implantów medycznych odbywa się zazwyczaj na dużą skalę, dlatego też istotny jest dobór odpowiedniej metody wytwarzania implantów oraz związanego z tym sposobu modyfikacji powierzchni. Wielkoskalowy proces wytwarzania biomateriałów, powinien uwzględniać: (a) możliwość jednoczesnego dotarcia do wszystkich powierzchni w urządzeniach o złożonej geometrii (np. trzony udowe, śruby dentystyczne i stenty sercowo–naczyniowe), (b) możliwość modyfikacji w nanoskali komercyjnie dostępnych biokompatybilnych metali i implantów, oraz (c) prostą integrację z linią przemysłową [133].

Stosowane obecnie techniki modyfikacji powierzchni tytanu i jego stopów można podzielić na trzy grupy: mechaniczne, fizyczne oraz chemiczne.

Modyfikacja mechaniczna obejmuje przede wszystkim podstawowe metody obróbki, takie jak szlifowanie, polerowanie, piaskowanie i wyżarzanie próżniowe. Metody te są stosowane w celu nadania powierzchni biomateriału odpowiedniej gładkości lub szorstkości, a tym samym modyfikacji jego właściwości, w tym biologicznej adhezji, hydrofilowości powierzchni, powinowactwa do tkanki kostnej, elektrycznej energii potencjalnej i napięcia powierzchniowego. Modyfikacja mechaniczna może być również stosowana do usuwania zanieczyszczeń powierzchniowych i zwiększania siły wiązania podłoża w celu późniejszej obróbki [108,110,112,134].

Modyfikacje fizyczne są zwykle stosowane w celu zwiększenia biokompatybilności, odporności na zużycie i korozję. Metody modyfikacji fizycznej obejmują technologię natryskiwania plazmowego (PST), fizyczne osadzanie z fazy gazowej (PVD), plazmową immersyjną implantację jonową (PIII) oraz spawanie laserowe. W metodach fizycznych powierzchnia jest wystawiona na działanie wysokoenergetycznych ładunków lub innych czynników fizycznych jak płomień, plazma itp. Powstająca na powierzchni zmodyfikowana warstwa jest produktem działania energii cieplnej, kinetycznej lub elektrycznej [90,108].

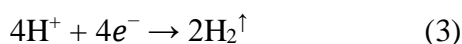
Metody modyfikacji chemicznej polegają na stosowaniu procesów chemicznych, które w przypadku podłoża tytanowego zachodzą na styku powierzchni metalu i zastosowanego medium (roztworu lub fazy gazowej). Reakjom tym często towarzyszą efekty luminescencji, nagrzewanie, reakcja redoks itp. Metody modyfikacji chemicznej, w tym piaskowanie i trawienie kwasem, utlenianie termiczne, obróbka hydrotermiczna, utlenianie

anodowe i utlenianie mikrołukowe są szeroko stosowane do przygotowania powierzchni o specjalnej strukturze mikro- i nano-topograficznej i/lub złożonym składzie. Chemiczne zabiegi modyfikujące są stosowane w celu wytworzenia bioaktywnej powierzchni i przewodnictwa kostnego [108,110,133,134].

Z uwagi na to, że w swoich badaniach skupiłam się na modyfikacji powierzchni podłoży ze stopu Ti6Al4V metodami chemicznymi: (a) anodowego utleniania, (b) bezpośredniego utleniania powierzchni podłoża nadtlaniem wodoru, oraz (c) alkalicznego trawienia, w niniejszej części skupię się na dokładniejszym omówieniu tych technik.

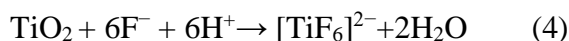
1.4.1. Elektrochemiczne utlenianie (proces anodowania)

Techniki modyfikacji elektrochemicznej są szczególnie interesujące, ze względu na swoją prostotę, niski koszt (aparatura i użyte odczynniki) oraz możliwość kontrolowania cech powierzchni w nanoskali [6,109,115,124,133,135]. W procesie anodowania, powierzchnia metalowego elementu (np. tytanowego) stanowiąca anodę, jest utleniana w odpowiednim elektrolicie, podczas gdy obojętny materiał (np. grafit, platyna), jest używany jako katoda ogniwa elektrochemicznego (Rysunek 5). Poprzez przyłożenie określonego potencjału elektrycznego, na anodzie, zachodzi reakcja utleniania (Równanie 1). Generowane są jony Ti^{4+} , które następnie pod wpływem przyłożonego napięcia migrują w kierunku elektrolitu, podczas gdy obecne w elektrolicie jony O^{2-} migrują w kierunku powierzchni tytanu. Podczas migracji ujemnie naładowanych jonów O^{2-} w kierunku anody, natrafiają one na uwalniane z powierzchni jony Ti^{4+} , tworząc zwartą warstwę tlenku tytanu (Równanie 2). Anodowemu utlenianiu towarzyszy wydzielanie wodoru na katodzie (Równanie 3). To właśnie reakcje elektrochemiczne (utlenianie i redukcja), w połączeniu z dyfuzją jonów napędzaną przez pole elektryczne, generują warstwę tlenku na powierzchni anody [109,136–138].

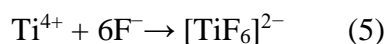


Ze względu na wyższą rezystancję elektryczną od podłoża tytanowego, przyłożone napięcie będzie się zmniejszać na warstwie tlenku tworzącej się na powierzchni. Podczas anodowania, warstwa tlenkowa będzie wzrastała tak długo, jak długo pole elektryczne będzie wystarczająco duże, aby stymulować przewodnictwo jonowe poprzez warstwę tlenku. Tworzenie się samoistnych nanostruktur jest związane z obecnością jonów fluorkowych (F^{-}) dodanych do elektrolitu. Dodatek tych jonów do roztworu wpływa na proces tworzenia się warstwy

porowatej w wyniku działania dwóch konkurencyjnych procesów chemicznych, tj. elektrochemicznego wzrostu warstwy tlenkowej oraz jej chemicznego roztwarzania. Jony fluorkowe mają zdolność do chemicznej reakcji z warstwą tlenku tytanu, tworząc rozpuszczalne w wodzie kompleksy $[\text{TiF}_6]^{2-}$ (Rysunek 5), zgodnie z równaniem reakcji (4) [109,136,138–140]:



Ponadto, jony F^- mogą migrować w głąb wytwarzanej warstwy tlenkowej, podobnie jak jony O^{2-} i powodować jej miejscowe roztwarzanie. Jednocześnie, jony te hamują osadzanie się wodorotlenków tytanu na warstwie TiO_2 poprzez kompleksowanie migrujących ku jej powierzchni jonów Ti^{4+} (Równanie 5).

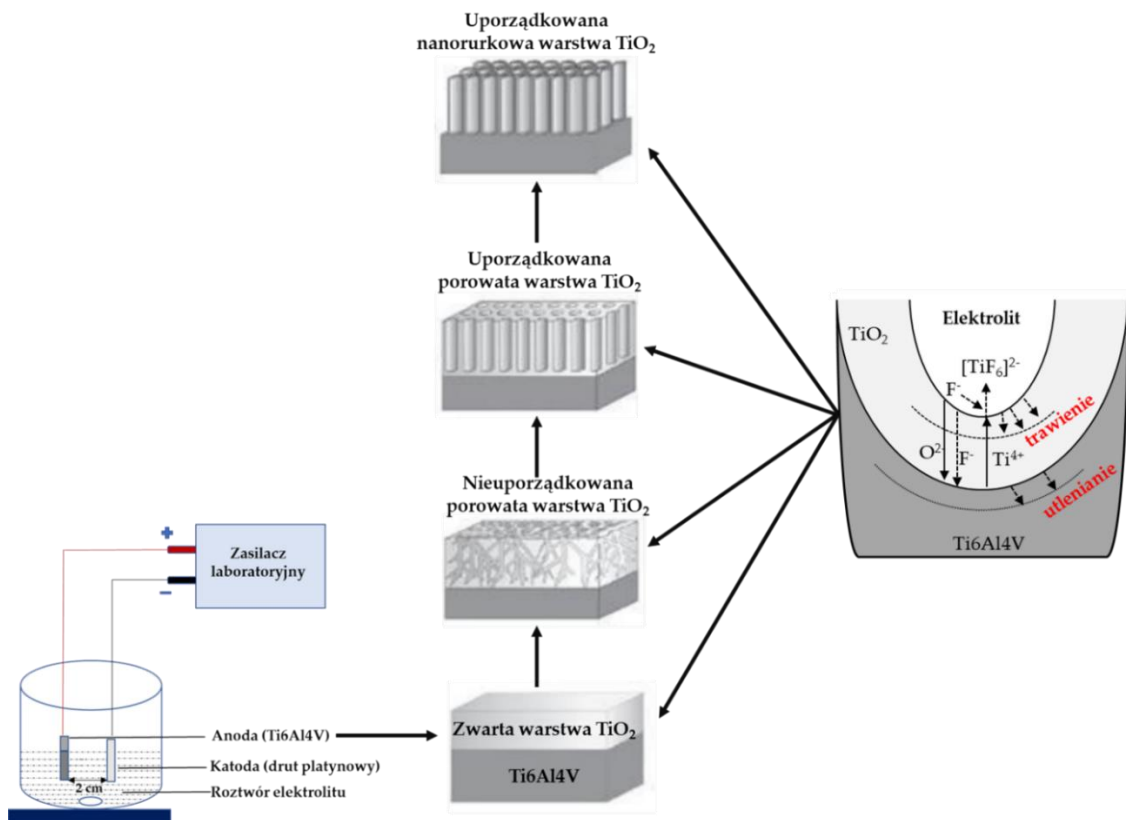


W miarę wzrostu nanorurek, po osiągnięciu krytycznej grubości warstwy, gęstość prądu w ogniwie elektrochemicznym stabilizuje się, jest to wynikiem zrównania się szybkości utleniania tytanu z szybkością rozpuszczania warstwy ditlenku tytanu. W tym momencie warstwa tlenkowa zyskuje już swoją maksymalną grubość [136,140,141]. Należy zauważyć, że w przypadku braku dodatku jonów fluorkowych do roztworu elektrolitu, otrzymuje się jednolitą i zwartą warstwę tlenkową o słabych właściwości osteointegracyjnych [136,142].

Zmiana parametrów procesu, takich jak przyłożony potencjał, czas anodowania, skład elektrolitu i temperatura, ma wpływ na właściwości wytworzonych tlenków metali, a tym samym na uzyskane wyniki modyfikacji powierzchni (Rysunek 5), w tym chropowatość, topografię, zwilżalność, odporność na korozję i inne właściwości metalowego podłoża. Rodzaj i skład elektrolit, ma istotny wpływ na powstającą generację nanorurek TiO_2 [124,135,143–145]. Każda większa zmiana w stosowanym elektrolicie jest określana jako generacja i dlatego istnieje około sześciu generacji układów nanorurek TiO_2 [146]. Nanorurki pierwszej generacji wytwarzane są przy wykorzystaniu nieorganicznych, wodnych roztworów elektrolitów (głównie roztworów kwasu fluorowodorowego lub jego mieszaniny z innymi kwasami). Do syntezy nanorurek drugiej generacji stosuje się roztwory buforowane, zawierające np. NaF lub NH_4F , zamiast HF . Podstawą wyboru składu elektrolitów trzeciej generacji są polarne związki organiczne, takie jak formamid, glikol etylenowy, etanol, gliceryna, dimetylosulfotlenek z dodatkiem jonów fluoru (np. NaF , KF lub NH_4F). Do produkcji nanorurek czwartej generacji nanorurek stosuje się elektrolity niezawierające jonów fluorkowych, są to głównie roztwory HCl i NH_4Cl , HClO_4 . Skład piątej generacji nanorurek zbliżony jest do trzeciej grupy, ale

zawiera dodatkowo czynnik kompleksujący (głównie $\text{Na}_2[\text{H}_2\text{EDTA}]$). Ostatnią, szóstą generacją określa się nanorurki powstałe w potencjostatycznym procesie tzw. szybkiego anodowania z rozpadem (RBA, ang. *rapid breakdown anodization*). W technice tej otrzymujemy nanorurki TiO_2 w postaci proszku, a skład wodnych elektrolitów oparty jest głównie na jonach chlorkowych ($\text{NaCl}/\text{NaHPO}_4$ i HClO_4) [146–149].

W swoich badaniach nad modyfikacją powierzchni implantu ze stopu Ti6Al4V , dążyłam do otrzymania nanorurek ditlenku tytanu I generacji. Wybór ten podyktowany jest możliwością bardzo dokładnej kontroli ich morfologii, jak i struktury.



Rysunek 5. Schemat wzrostu nanostrukturalnej warstwy tlenkowej na stopie Ti6Al4V podczas procesu anodowego utleniania. Opracowanie na podstawie piśmiennictwa [10,109,136,137].

1.4.2. Chemiczne utlenianie nadtlenkiem wodoru

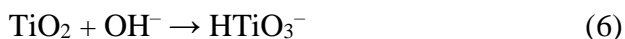
Chemiczne utlenianie powierzchni tytanowych to technika, która jest stosowana w celu usunięcia zanieczyszczeń powierzchni i zwiększenia właściwości biomechanicznych. Ten rodzaj obróbki powierzchniowej zwraca uwagę ze względu na: (a) prostotę, (b) ekonomiczność, (c) możliwość zastosowania do implantów o skomplikowanych kształtach oraz (d) zdolność do modyfikacji wszystkich zewnętrznych i wewnętrznych porów implantów o powierzchniach chropowatych. Chemiczna obróbka tytanu i jego stopu opiera się głównie na reakcjach chemicznych zachodzących na granicy metal – roztwór. Wodorotlenek sodu oraz nadtlenek

wodoru są czynnikami najczęściej stosowanymi podczas utleniania powierzchni implantów stomatologicznych [117,150–153].

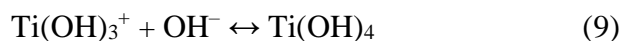
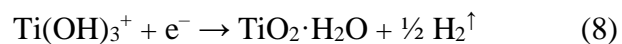
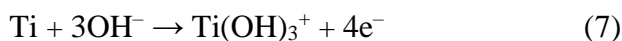
Zastosowanie nadtlenu wodoru jako utleniacza nie powoduje żadnych zewnętrznych zanieczyszczeń w układzie reakcyjnym. W wyniku reakcji pomiędzy implantem tytanowym a roztworem H_2O_2 , można spodziewać się wytworzenia na powierzchni stopu warstwy żelu tytanowego, którego grubość zależy od czasu obróbki. Stosując dłuższe czasy procesów utleniania uzyskujemy grubszą warstwę żelu o mniejszej chropowatości. Zastosowanie wyższych temperatur prowadzi do zagęszczania żelu i zmiany jego formy z amorficznej na krystaliczną, tj. anatazu (powyżej $300^\circ C$) lub rutyłu (powyżej $700^\circ C$) [151,154]. Pan i wsp. zaobserwowali, że powstająca warstwa tlenkowa może wykazywać dwuwarstwową strukturę składającą się z cienkiego (< 5 nm) i gęstego tlenku wewnętrznego oraz zewnętrznej warstwy porowatej [155]. Biswas i wsp. wykazali tworzenie się na powierzchni ciągłej warstwy tlenkowej, składającej się z Ti_2O_3 i TiO_2 (anataz). Wraz ze wzrostem stężenia roztworu H_2O_2 (0.04 M – 0.08 M) obserwowali wzrost udziału fazy objętościowej anatazu [156]. Analiza danych literaturowych wskazuje, że większość dotychczasowych prac dotyczy badań działania roztworu nadtlenu wodoru na podłoża tytanowe, natomiast brak jest dokładnej analizy bioaktywności otrzymanych warstw [154,157–159].

1.4.3. Chemiczne utlenianie alkalicznym roztworem

Kolejną prostą i skuteczną techniką modyfikacji powierzchni tytanowej jest zastosowanie jej alkalicznej obróbki [160]. Uważa się, że tytan i jego stopy poddane trawieniu w alkalicznym roztworze, są zdolne do tworzenia na swoich powierzchniach warstwy apatytowej podobnej do kości. Fakt ten powinien prowadzić do utworzenia powierzchni bioaktywnych i biokompatybilnych [161]. Podczas obróbki sodowo–alkalicznej, powierzchniowa warstwa pasywna TiO_2 częściowo ulega rozpuszczaniu w roztworze alkalicznym, na skutek korozyjnego wpływu grupy hydroksylowej (Równanie 6).



Zakłada się, że reakcja ta przebiega jednocześnie z procesami hydratacji metalu Ti (Równanie 7–9):



W wyniku dalszego działania grup hydroksylowych na uwodniony TiO_2 , na powierzchniach podłoży powstają ujemnie naładowane hydraty (Równanie 10), które następnie łączą się z dodatnio naładowanymi jonami sodu, obecnymi w roztworze wodnym.



Zwiększając stężenie roztworu NaOH, czas obróbki lub temperaturę obróbki, więcej jonów Na^+ zostaje włączonych do powierzchni metalu a szybkość tych reakcji wzrasta. W rezultacie zwiększa się także grubość powstałej hydrożelowej warstwy tytanianu sodu. Dalsza obróbka cieplna prowadzi do odwodnienia i zagęszczenia warstwy hydrożelu, co skutkuje tworzeniem się stabilnej, amorficznej lub krystalicznej warstwy tytanianu. Analiza danych literaturowych wskazuje na niewielką ilość doniesień związanych z badaniem oddziaływań tak zmodyfikowanych powierzchni implantów tytanowych z komórkami kostnymi [155,162–165].

1.5. Wytwarzanie powłok hydroksyapatytowych

Jednym ze sposobów zwiększenia aktywności biologicznej materiału implantacyjnego jest wzbogacenie jego powierzchni o związki fosforanów wapnia (CaP). Modyfikacja ta powinna prowadzić do wytworzenia biochemicznego połączenia pomiędzy implantem a tkanką kostną, co powinno wpłynąć na przyspieszenie procesów osteointegracji [166–168]. Spośród kilkunastu różnych faz CaP, syntetyczny hydroksyapatyt (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$), ze względu na duże podobieństwo strukturalne i chemiczne do naturalnej kości (HA biologicznego o stosunku molowym wapnia/fosforu $\text{Ca/P} = 1.67$), jest jednym z wiodących biomateriałów stosowanych w ortopedii i stomatologii do naprawy lub zastępowania twardych tkanek, jak i do wspomagania transportu leków [6,113,169–171]. Pomimo słabych parametrów wytrzymałościowych, wysoka biogodność zarówno w stosunku do tkanek twardych, jak i miękkich, osteokondukcyjność oraz osteoindukcyjność implantów hydroksyapatytowych pozwala na ich stosowanie do substytucji kości w miejscach niezbyt obciążonych mechanicznie [166,170–172]. HA wykazuje zdolność adsorpcji dużych ilości fibronektyny i witronektyny, co wpływa na zwiększenie przyczepności, wzrostu jak i proliferacji osteoblastów [170,173]. Spośród faz CaP, zwarty, krystaliczny HA cechuje najwolniejsze tempo biodegradacji w warunkach *in vivo*. HA w formie porowatej, jak również o niższym stopniu krystaliczności ulega szybszemu rozpuszczaniu się w płynach tkankowych, dochodzi wówczas do wymiany jonów między materiałem a tkanką [174,175].

Syntetyczny hydroksyapatyt, jak również mineralogiczny i biologiczny krystalizują w układzie heksagonalnym o symetrii opisanej grupą przestrzenną $P6_3/m$ z parametrami sieciowymi $a = b = 9.432 \text{ \AA}$, $c = 6.881 \text{ \AA}$, $\gamma = 120^\circ$ [166,170,176,177].

Historia zastosowania hydroksyapatytu w medycynie regeneracyjnej sięga lat pięćdziesiątych XX wieku, kiedy zaczęto stosować wypełniacze bioceramiczne do naprawy ubytków kostnych. Kolejnym krokiem w rozwoju materiałów kościozastępczych było wprowadzenie rusztowań do inżynierii tkankowej, które umożliwiały wbudowanie i aktywację komórek w ich obrębie. Czego niestety, ze względu na słabą odporność na pękanie, nie były w stanie osiągnąć same bioceramiki (w tym hydroksyapatyt) [178,179]. Niemniej jednak, implanty tytanowe, jak i wykonane ze stopów tytanu mają ponad 10-krotnie wyższy moduł sprężystości od istoty zbitnej w kościach długich człowieka. Wówczas, całość obciążeń przyjmuje implant i w następstwie kość jest niedociążona, co sprzyja jej resorpcji po dłuższym okresie użytkowania [180]. W tym kontekście uzasadnionym jest pokrycie implantów metalicznych powłoką HA, co powinno zapewnić lepsze ich umocowanie wewnątrz organizmu, zwiększyć biogodność, jak również znacznie wydłużyć czas ich użytkowania. Naniesiona, na powierzchnię implantów z tytanu i jego stopów, bioaktywna powłoka hydroksyapatytowa powinna wpływać na poprawę ich odporności na ścieranie, a także pełnić funkcję dodatkowej bariery zmniejszającej ilość uwalnianych jonów metali z materiału podłoża [175,180–182]. Podobieństwo hydroksyapatytu do nieorganicznego składnika macierzy kostnej przyczyniło się do opracowania wielu metod wytwarzania syntetycznych warstw HA na metalicznych podłożach, które zestawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Porównanie różnych metod osadzania powłok hydroksyapatytowych [177,183,184].

Technika	Grubość (μm)	Zalety	Wady
Napylenie jonowe	0.5–3	Jednolita grubość, gęsta powłoka.	Czasochłonna, powłoki amorficzne.
Natryskiwanie termiczne	30–200	Wysoka wydajność osadzania, niski koszt wytwarzania.	Wysoka temperatura, szybkie chłodzenie powoduje powstanie powłoki amorficznej.
Osadzanie powłok wiązką elektronów	~ 1	Jednolita grubość, gęsta powłoka.	Czasochłonna, powłoki amorficzne.
Powlekanie zanurzeniowe	50–500	Niski koszt wytwarzania, możliwość pokrywania złożonych podłoży.	Wysokie temperatury spiekania, niedopasowanie rozszerzalności cieplnej.

Elektroforetyczne osadzanie	0.1–2.0	Jednolita grubość, szybkie tempo osadzania, możliwość pokrywania złożonych podłoży.	Wysokie temperatury spiekania, trudne do wytworzenia powłoki bez pęknięć.
Prasowanie izostatyczne na gorąco	0.2–2.0	Gęste powłoki.	Wysoki koszt wytwarzania, wysoka temperatura, niedopasowanie rozszerzalności cieplnej, nie można pokryć złożonych podłoży.
Pokrycie biomimetyczne	< 30	Tworzenie apatytu podobnego do kości, możliwość pokrywania złożonych podłoży.	Czasochłonna, wymaga uzupełniania i stałych warunków.
Osadzanie laserem pulsacyjnym	~ 0.05–10	Powłoka o strukturze krystalicznej i amorficznej, powłoka gęsta i porowata, kontrola nad fazami i stosunkiem Ca/P.	Wysoki koszt wytwarzania, wysoka temperatura podłoża.
Zol – żel	< 1	Niskie temperatury obróbki, możliwość pokrywania skomplikowanych kształtów.	Proces suszenia często prowadzi do kurczenia się materiału i pęknięcia.
Osadzanie wspomagane wiązką jonów	~ 0.03–4	Jednolita grubość, gęsta powłoka bez porów, wysoka powtarzalność i możliwość kontroli mikrostruktury i składu.	Wysoki koszt wytwarzania, powłoki amorficzne.
Spiekanie impulsowo–plazmowe	~ 30–300	Wysoka szybkość osadzania, mikrochropowatość powierzchni i porowatość.	Wysoka temperatura, szybkie chłodzenie powoduje powstawanie pęknięć, słaba kontrola chemicznych i fizycznych parametrów powłoki, niejednolita grubość, słaba kontrola biodegradacji.
Natryskiwanie plazmowe zawiesiny bądź cieczy	~ 5–50	Wysoka szybkość osadzania, czysta (tylko faza HA), krystaliczna, gęsta i wysoce porowata powłoka, doskonała kontrola nad mikrostrukturą powłoki.	Wysoki koszt wytwarzania, wysoka temperatura, niejednolita grubość.
Rozpylanie magnetronowe RF	~ 0.04–3.5	Jednolita grubość, gęsta powłoka bez porów, powłoki o wysokiej czystości, kontrola nad strukturą powłoki (amorficzna lub krystaliczna) i stosunkiem Ca/P.	Wysoki koszt wytwarzania, czasochłonna, niska wydajność osadzania.
Elektrochemiczne osadzanie	< 95	Niska temperatura osadzania, wysokokrystaliczny osad, możliwość pokrywania skomplikowanych kształtów, kontrola nad grubością, składem i mikrostrukturą.	Długi czas osadzania może powodować nierównomierną grubość i tworzenie się pęknięć i dziur.

Należy zauważyć, że przy wprowadzaniu implantu do organizmu biorcy oprócz bioaktywności i biokompatybilności, bardzo ważne jest określenie wytrzymałości mechanicznej powłoki HA umiejscowionej na podłożu metalicznym. Największy problem stanowi bardzo niska adhezja powłoki hydroksyapatytu do podłoża tytanowego, co ogranicza jej szerokie zastosowanie w implantach na skalę komercyjną. Dlatego, najważniejszym zadaniem jest opracowanie sposobu poprawienia siły wiązania pomiędzy metalicznym podłożem a powłoką HA przy zachowaniu odpowiednich właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych układu [175,180,185,186].

Całokształt powyższych obserwacji związanych z nieustanną potrzebą modyfikacji powierzchni implantów tytanowych stał się bezpośrednią motywacją i inspiracją autorki rozprawy doktorskiej do współpracy z firmą Nano-implant Sp. z o.o. i podjęcia się opracowania prototypu implantu ortopedycznego/stomatologicznego o lepszych właściwościach mechanicznych i biointegracyjnych w stosunku do wykazywanych przez te stosowane obecnie. Wynikiem przeprowadzonych badań jest zbiór artykułów, stanowiący podstawę niniejszej pracy doktorskiej.

2. Cel i zakres rozprawy doktorskiej

Biorąc pod uwagę nie do końca optymalne, dla potrzeb implantologii kostnej, właściwości mechaniczne i biointegracyjne stopu Ti6Al4V, przeprowadziłam badania, których celem była modyfikacja powierzchni podłoża prowadząca do wytworzenia warstwy charakteryzującej się odpowiednią morfologią oraz właściwościami fizykochemicznymi i mechanicznymi, a także cechami sprzyjającymi osteointegracji implantu.

Realizując wyżej wymieniony cel badań prace badawcze prowadziłam dwuetapowo:

Etap I – modyfikacja powierzchni próbek stopu Ti6Al4V prowadząca do wytworzenia warstw tlenków tytanu o zróżnicowanej morfologii, strukturze oraz właściwościach mechanicznych i biologicznych.

Etap II – wykorzystanie tlenkowych nanowarstw, o najlepszych właściwościach fizykochemicznych, mechanicznych i biologicznych (wyprodukowanych w Etapie I), jako warstwy pośredniej łączącej powłokę hydroksyapatytu, wytwarzaną w procesie katodowej elektrodepozycji, z podłożem ze stopu Ti6Al4V.

Głównym celem przeprowadzonych badań było opracowanie technologii modyfikacji powierzchni implantów wytwarzanych ze stopu Ti6Al4V (w tym implantów wytwarzanych w technologii 3D (spiekanie laserowe proszków tytanowych przeznaczonych dla wyrobów medycznych) powłokami hydroksyapatytu, które przy zachowaniu dobrych właściwości fizykochemicznych i mechanicznych będą przyspieszały regenerację tkanki kostnej, działały stymulująco względem komórek zaangażowanych w osteopromocję i osteointegrację oraz tworzyły biozgodną matrycę dla nawarstwiania regenerującej się tkanki.

3. Układ pracy

Zasadniczą część niniejszej rozprawy doktorskiej stanowi zbiór pięciu artykułów, opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Ich tematyka ściśle wiąże się z projektowaniem i wytwarzaniem implantów ze stopu Ti6Al4V, bezpiecznych i charakteryzujących się wysoką biokompatybilnością z organizmem człowieka, co stanowi priorytet współczesnej medycyny. Rozprawę otwiera artykuł **P1**, w którym przedstawiono modyfikację powierzchni podłoży ze stopu Ti6Al4V, aktywowanych w różnych roztworach kwasów, a następnie utlenianych za pomocą 30% roztworu nadtlenu wodoru. W kolejnych pracach opisano modyfikację powierzchni podłoży stopu Ti6Al4V: (a) metodą elektrochemicznego utleniania tj. anodowania (**P2**) oraz (b) za pomocą obróbki alkaliczno-sodowej (**P3**). W artykułach **P1–P3** przedstawiono wyniki badań dotyczące interakcji pomiędzy komórkami macierzystymi pochodzącymi z tkanki tłuszczowej a uzyskanymi warstwami: (a) TiO₂ o morfologii nanowłóknistej (**P1**), (b) TiO₂ o architekturze nanoporów, nanorurek oraz nanogąbek, a także (c) tytaniumowymi (**P3**). Na podstawie uzyskanych wyników, wybrano warstwy o najlepszych parametrach fizykochemicznych, mechanicznych oraz biointegracyjnych. Wymienione wyżej warstwy zostały następnie wykorzystane jako układy pośrednie łączące podłoże ze stopu Ti6Al4V z powłoką hydroksyapatytu, wytworzoną w procesie katodowej elektrodpozycji (**P4–P5**). Charakterystykę fizykochemiczną oraz mechaniczną wytworzonych układów Ti6Al4V/warstwa pośrednia/HA przedstawiono w artykule **P4**, natomiast ich właściwości biologiczne opisano w artykule **P5**. W kolejnym rozdziale, każda z należących do zbioru publikacji została uzupełniona krótkim wprowadzeniem, streszczeniem najistotniejszych wyników oraz przedstawieniem najważniejszych wniosków.

Lista artykułów stanowiących zasadniczą część rozprawy:

- P1.** Ehlert, M.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Bartmański, M.; Radtke, A.; Titania Nanofiber Scaffolds with Enhanced Biointegration Activity—Preliminary In Vitro Studies. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 5642, doi: 10.3390/ijms20225642. IF₂₀₁₉= 4.556
- P2.** Ehlert, M.; Radtke, A.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Bartmański, M.; Piszczek, P. In Vitro Studies on Nanoporous, Nanotubular and Nanosponge–Like Titania Coatings, with the Use of Adipose–Derived Stem Cells. *Materials* **2020**, *13*, E1574, doi:10.3390/ma13071574. IF₂₀₂₀= 3.623

- P3.** Ehlert, M.; Radtke, A.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Piszczek, P. Assessment of Titanate Nanolayers in Terms of Their Physicochemical and Biological Properties. *Materials* **2021**, *14*, 806, doi:10.3390/ma14040806. IF₂₀₂₁= 3.748
- P4.** Ehlert*, M.; Radtke, A.; Bartmański, M.; Piszczek*, P. Evaluation of the Cathodic Electrodeposition Effectiveness of the Hydroxyapatite Layer Used in Surface Modification of Ti6Al4V–Based Biomaterials. *Materials* **2022**, *15*, 6925, doi:10.3390/ma15196925. IF₂₀₂₂= 3.748
- P5.** Ehlert*, M.; Radtke*, A.; Forbot, N.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Golińska, P.; Trykowski, G.; Piszczek, P. TiO₂/HA and Titanate/HA Double Layer Coatings on Ti6Al4V Surface and Their Influence on In Vitro Cell Growth and Osteogenic Potential. *Journal of Functional Biomaterials* **2022**, *13*, 271, doi.org/10.3390/jfb13040271. IF₂₀₂₂= 4.901

4. Streszczenie zbioru artykułów wchodzących w skład rozprawy

P1. *Titania Nanofiber Scaffolds with Enhanced Biointegration Activity—Preliminary In Vitro Studies*

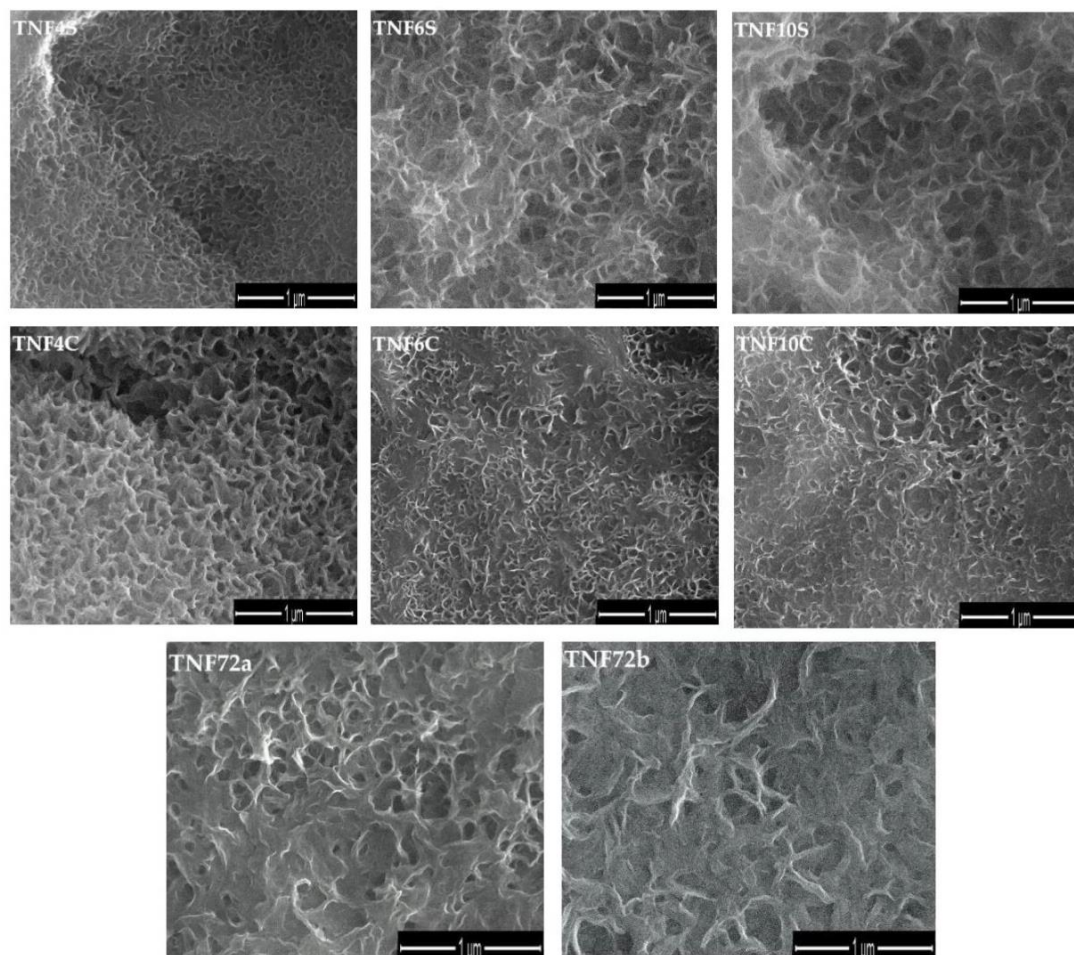
Ehlert, M.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Bartmański, M.; Radtke, A. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 5642.

Projektując implant długoterminowy, należy pamiętać, że sukces zabiegu implantacji zależy od sukcesu osteointegracji i kontaktu z otaczającymi tkankami miękkimi. Dlatego modyfikując powierzchnie implantu należy wziąć pod uwagę wszystkie takie czynniki jak: topografia powierzchni i właściwości mechaniczne, a także odpowiednią jej zdolność do tworzenia trwałego połączenia implant–kość.

W niniejszym artykule skupiono się na modyfikacji powierzchni podłoży ze stopu Ti6Al4V, poprzez wytwarzanie na niej nanowłóknistych, bioaktywnych warstw o określonej strukturze, morfologii, zwilżalności i odpowiednich właściwościach mechanicznych. Nanowłókniste warstwy ditlenku tytanu (TNF) wytworzono metodą chemicznego utleniania powierzchni stopu tytanowego Ti6Al4V. Część badanych próbek aktywowano w kwasie chlorowodorowym o stężeniu 5.8 M ($T = 80^{\circ}\text{C}$, $t = 30$ minut procesu), a następnie utlenianie prowadzono w roztworze 30% nadtlenu wodoru ($T = 85^{\circ}\text{C}$). Zastosowano dwie metody prowadzenia procesu utleniania: (1) pod chłodnicą zwrotną, a otrzymane próby oznaczono jako TNF4C, TNF6C i TNF10C, oraz (2) w inkubatorze, które oznaczono jako TNF4S, TNF6S i TNF10S. Wartość liczbowa w oznaczeniu próbki wskazuje na czas prowadzenia procesu utleniania w godzinach. Wytworzono także układy oznaczone jako TNF72a i TNF72b. Próby te aktywowano odpowiednio dla TNF72a w 2 M kwasie fluorowodorowym (w temperaturze pokojowej, $t = 10$ s), a w przypadku TNF72b w mieszaninie rozcieńczonego kwasu azotowego (V) i fluorowodorowego (w temperaturze pokojowej, $t = 30$ s). Następnie wymienione wyżej próby utleniono w inkubatorze w roztworze 30% nadtlenu wodoru ($T = 85^{\circ}\text{C}$, $t = 72$ h).

W początkowej części artykułu skupiono się głównie na analizie morfologii, struktury oraz zwilżalności otrzymanych nanowłóknistych warstw ditlenku tytanu. Analiza obrazów ze skaningowego mikroskopu elektronowego wykazała ścisły związek między zastosowanym sposobem ogrzewania, czasem procesu i morfologią utworzonych warstw. Dla wszystkich układów uzyskano jednolite warstwy bez pęknięć i szczelin (Rysunek 6). Włóknista morfologia podłoży utlenionych pod chłodnicą zwrotną jest nieco bardziej wyraźna aniżeli podłoży ogrzewanych w inkubatorze. Wydłużenie czasu utleniania doprowadziło do uzyskania warstw

o morfologii splecionych nanowłókien. Ilustrują to różnice w morfologii układów TNF4C, TNF6C i TNF10C (Rysunek 6). Morfologia warstw TNF72 zbliżona jest bardziej do gąbczastej z wyrastającymi nanowłóknami (Rysunek 6).



Rysunek 6. Obrazy SEM przedstawiające różnice w morfologii nanowłóknistych warstw (TNF) powstałych w procesie chemicznego utleniania stopu Ti6Al4V, z użyciem H₂O₂.

Wykorzystując metodę dyfrakcji rentgenowskiej (XRD) określono struktury krystaliczne wytwarzanych warstw. Analiza dyfraktogramów wykazała, że układy TNF72a–b są amorficzne z domenami rutylu. Natomiast analiza dyfraktogramów dla prób TNF4C–TNF10 oraz TNF4S–TNF10S potwierdziła obecność domen faz krystalicznych anatazu i/lub rutylu. W artykule dotyczącym badań fotokatalitycznych opisywanych warstw TNF4–10C oraz TNF72a, którego jestem współautorem, określono za pomocą równania Scherrera średni rozmiar domen krystalicznych faz anatazu (A) i rutylu (R) [187]. Rozmiary domen, oszacowano na podstawie linii dyfrakcyjnych o wskaźnikach Millera: (101) R i (004) A i wyniosły one odpowiednio 27 nm (R), 49 nm (A) dla TNF4C, 40 nm (A) dla TNF6C i 37 nm (A) dla TNF10C.

W przypadku próby TNF72a oszacowanie wielkości domen rutylu nie było możliwe ze względu na słabe intensywności linii dyfrakcyjnych [187].

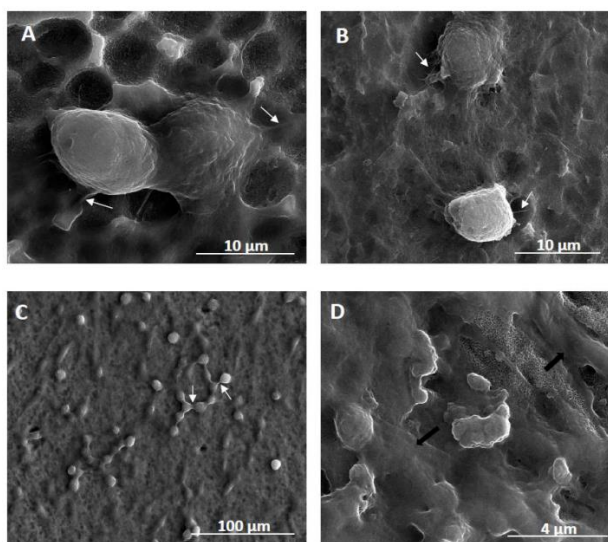
W optymalizowaniu właściwości powierzchni implantów należy uwzględnić również ich zwilżalność. Przyjmuje się, że zwiększenie hydrofilowości powierzchni implantu może prowadzić do lepszej, szybszej interakcji pomiędzy badaną powierzchnią a otaczającym ją środowiskiem płynów ustrojowych. Wytworzone powłoki nanowłókniste na powierzchni próbek wykazują wyraźny hydrofobowy charakter (kąt zwilżania dla wody, w obu przypadkach był większy niż 90°). W przypadku prób utlenianych od 4 do 10 godzin zarówno w inkubatorze, jak i pod chłodnicą zwrotną, hydrofobowość zwiększa się w szeregu od TNF4 do TNF10, tj. równoległe z wydłużeniem czasu utleniania chemicznego powierzchni Ti6Al4V. Porównując wyniki uzyskane dla TNF72a i TNF72b zaobserwowano wyższą hydrofobowość dla próbki aktywowanej mieszaniną utleniającą (tj. TNF72b).

W dalszej części artykułu przedstawiono właściwości mechaniczne wytworzonych warstw nanowłóknistych. Na podstawie wyników badań nanoindentacji, oznaczono takie parametry jak twardość (H) i moduł Younga (E). Badania siły adhezji przeprowadzono metodą nanoscratching (nanoscratch test). Wytwarzanie nanowłóknistych warstw na podłożu Ti6Al4V powodowało spadek modułu sprężystości i twardości w porównaniu z niezmodyfikowanym substratem Ti6Al4V. Obniżenie wartości twardości, a w szczególności modułu Younga spowodowane modyfikacją powierzchni podłoża ze stopu Ti6Al4V w przypadku materiałów przeznaczonych na implanty nośne jest zjawiskiem pozytywnym. Najlepsze parametry mechaniczne otrzymano dla układu Ti6Al4V/TNF6S i Ti6Al4V/TNF10C z wartością modułu Younga, odpowiednio 133.85 ± 42.12 GPa i 133.22 ± 20.80 GPa. Ponadto, wyznaczono parametr S_a , określający chropowatość modyfikowanych powierzchni układów Ti6Al4V/TNF. Proces utleniania powierzchni stopu tytanu zwiększył chropowatość wszystkich badanych układów w stosunku do próbki referencyjnej (Ti6Al4V). W przypadku próbek umieszczonych w inkubatorze oraz pod chłodnicą zwrotną wraz z wydłużeniem czasu utleniania ($t = 4\text{--}10$ h) zaobserwowano spadek parametru chropowatości. Biomateriały modyfikowane powierzchniowo, szczególnie w przypadku implantów o długim czasie działania powinny charakteryzować się odpowiednią przyczepnością do podłoża metalicznego. Wytworzone układy charakteryzuje wysoka adhezja warstwy do podłoża tytanowego. W przypadku próbek TNF4C–10C zaobserwowano wzrost przyczepności warstwy przy jednoczesnym wydłużeniu czasu trwania procesu. Wzrost adhezji warstwy TNF4C–10C do substratu Ti6Al4V można przypisać zmniejszeniu chropowatości tych warstw przy

jednoczesnym wydłużeniu czasu procesu utleniania. Niższa wartość chropowatości powierzchni zmniejsza ryzyko zainicjowania rozwarstwienia na powierzchni. Wydłużenie czasu trwania procesu dla próbek TNF4–10S spowodowało początkowo zmniejszenie adhezji, a następnie nieznaczny jej wzrost. Najwyższą adhezję warstwy do podłoża zaobserwowano (205.15 ± 48.96 GPa) dla układu o niskim parametrze chropowatości ($Sa = 0.10 \mu\text{m}$) Ti6Al4V/TNF72b.

W ostatniej części artykułu (**P1**) dokonano oceny aktywności biologicznej wytworzonych nanowłóknistych warstw ditlenku tytanu. Aby proces osteointegracji, jak i gojenia przebiegał skutecznie kluczowe jest zbadanie zdolności nanostrukturalnej powierzchni biomateriału do stymulowania wzrostu komórek i tworzenia środowiska sprzyjającego osteogenezie. Dlatego też, oceniono bezpośredni wpływ powierzchni modyfikowanego stopu tytanu na przeżywalność i proliferację mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej (ADSCs). Równolegle badano proliferację komórek tkanki kostnej – ludzkich osteoblastów linii MG–63 oraz komórek tkanki łącznej – mysich fibroblastów linii L929, a także żywotność komórek w kokulturach (osteoblasty/ADSCs i fibroblasty/ADSCs). Dotychczasowe badania koncentrowały się na funkcjonalizacji powierzchni nanowłóknistych TiO_2 za pomocą mezenchymalnych komórek macierzystych oraz na wykorzystaniu ADSCs jako wysoce bioaktywnej warstwy podtrzymującej komórki tkanki kostnej – osteoblasty MG–63 i komórki tkanki łącznej – fibroblasty L929. Wrzecionowate komórki fibroblastów są odpowiedzialne za utrzymanie integralności strukturalnej w ciele biorcy. Są niezbędne do tworzenia błony śluzowej wokół implantu. Wybór mysiej linii komórkowej fibroblastów opierał się na bardzo wysokiej powtarzalności, porównywalności i uniwersalności badań. Ich zdolność fagocytarna czyni z nich odpowiedni wskaźnik cytotoxyczności. Najszerzej stosowanym testem do analizy aktywności metabolicznej komórki na powierzchni wytwarzanych warstw jest test MTT, który zastosowano w opisywanych badaniach. Jego celem była ocena ewentualnego działania cytotoxycznego. Jest on również zalecany, jako test referencyjny przez międzynarodowe organizacje normotwórcze [188]. Oceny adhezji komórek i ich zdolności do proliferacji na powierzchni badanych nanowłóknistych powłok ditlenku tytanu dokonano w oparciu o analizy pomiarów przeprowadzonych po 24 godzinach i 72 godzinach. Uzyskane wyniki wykazały, że modyfikacja powierzchni stopu Ti6Al4V metodą chemicznego utleniania wpłynęła korzystnie na przebieg procesów adhezji i proliferacji zarówno komórek fibroblastów, jak i osteoblastów po 24 i 72 godzinach hodowli. Najwyższą żywotność fibroblastów po 24 i 72 godzinach indukowały amorficzne warstwy TNF72a oraz

TNF72b. Trzydniowy czas hodowli spowodował także wysoki poziom żywotności tych komórek w przypadku nanowarstw TNF4C, TNF6C i TNF10C. Warstwy te, wykazywały również wysoki wskaźnik przeżywalności komórek osteoblastów MG-63 i ADSCs po 24 godzinach hodowli. Ponadto, stwierdzono, że po 72 h hodowli na powierzchniach TNF72a i TNF72b poziom proliferacji wszystkich linii komórkowych znacznie wzrósł w porównaniu do stopu kontrolnego. Eksperymenty kokulturowe wykazały nieco inne wyniki niż te opisane dla pojedynczych linii komórkowych. Wszystkie, wybrane do tych badań układy spowodowały znaczny wzrost żywotności komórek fibroblastów L929 oraz osteoblastów MG-63 współhodowanych z tłuszczowymi, mezenchymalnymi komórkami macierzystymi, zarówno po 24, jak i 72 godzinach hodowli. Najwyższą żywotność komórek zaobserwowano w przypadku nanowarstw TNF6C i TNF6S po 72 godzinach hodowli. Warstwy te wykazują właściwości krystaliczne wynikające z obecności nanokryształów rutyłu i anatazu, które często uważa się za toksyczne dla komórek. ADSCs wykazały zdolność do funkcjonalizowania początkowo „nieprzyjaznej” powierzchni, co czyni ją odpowiednią dla wzrostu komórek i przygotowuje ją na bardziej wyspecjalizowane i wymagające komórki. Analiza obrazów SEM potwierdziła prawidłową morfologię komórek z filopodiami cytoplazmatycznymi, przyczepiającymi komórki do powierzchni (Rysunek 7 A–B), lub tworzenie połączeń między komórkami (Rysunek 7C) oraz produkcję ogromnej ilości macierzy pozakomórkowej (Rysunek 7D).



Rysunek 7. Obrazy SEM przedstawiające komórki rosnące na nanowłóknistych powierzchniach. (A) – ADSC "inwazyjne" na powierzchni TNF72a po 24 h; (B) – ADSC współhodowane z fibroblastami L929 na powierzchni TNF72a po 24 h; (C) – współhodowla ADSC i fibroblastów L929 po 72 h; (D) – współhodowla ADSC i osteoblastów MG-63 po 72 h. Zaadaptowano z ilustracji zawartych w artykule [P1].

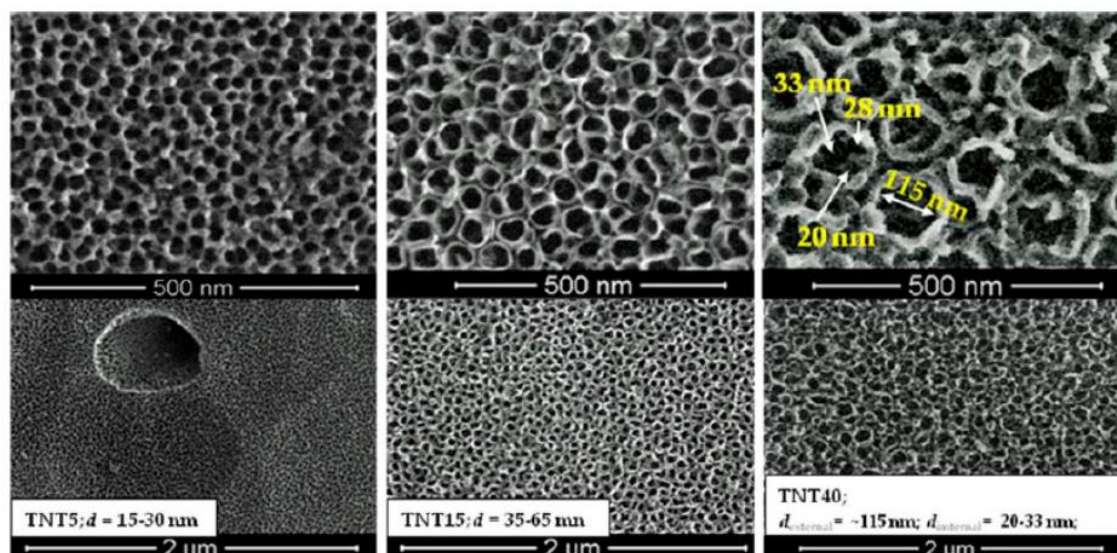
Podsumowując, zastosowanie bezpośredniej metody chemicznego utleniania podłoży ze stopu Ti6Al4V umożliwiło produkcję hydrofobowych, nanowłóknistych rusztowań TiO₂ (TNF) na ich powierzchni. Właściwości mechaniczne i aktywność biointegracyjna próbek modyfikowanych powierzchniowo okazała się ściśle związana z budową chemiczną warstw, ich zwilżalnością i nanotopografią. Uzyskane dla kokultur komórkowych wyniki dowodzą, że funkcjonalizacja za pośrednictwem ADSCs zwiększa przydatność nanowarstw dla wzrostu komórek oraz jako rusztowań głównie dla kultur fibroblastów i osteoblastów. Biorąc pod uwagę otrzymane parametry mechaniczne wytworzonych rusztowań, jak i wyniki rosnących na nich kokultur lub pojedynczych linii komórkowych, stwierdzono, że amorficzne warstwy ze śladową ilością fazy rutyli TNF72, jak i polikrystaliczne warstwy z fazą anatazu TNF6C są najbardziej optymalnymi rusztowaniami mogącymi znaleźć zastosowanie w codziennej praktyce ortopedycznej i stomatologicznej. Niemniej jednak, pomimo iż moduł sprężystości tych układów jest niższy od komercyjnie stosowanego stopu Ti6Al4V nadal nie osiągnięto takiej wartości, która byłaby zbliżona do ludzkiej warstwy korowej kości.

P2. *In Vitro* Studies on Nanoporous, Nanotubular and Nanosponge–Like Titania Coatings, with the Use of Adipose–Derived Stem Cells

Ehlert, M.; Radtke, A.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Bartmański, M.; Piszczek, P. *Materials* **2020**, *13*, E1574.

Alternatywnym sposobem poprawy właściwości biointegracyjnych, jak i mechanicznych implantów tytanowych, było zastosowanie metody elektrochemicznego utleniania tych implantów. Stosując powyższą technikę, na powierzchni podłoża ze stopu Ti6Al4V uzyskano amorficzne warstwy ditlenku tytanu o różnej architekturze, tj. nanoporowatej, nanorurkowej oraz nanogąbczastej. Zarówno procedura wytwarzania powyższych warstw, jak i procesy ich sterylizacji zostały opisane we wcześniejszym artykule, którego jestem współautorem [124]. Przedstawione w niniejszym artykule wyniki ukierunkowane były na ocenę oddziaływań pomiędzy komórkami macierzystymi pochodzącymi z tkanki tłuszczowej (ADSCs) a wytworzonymi nanowarstwami TiO₂ o wymienionej wyżej morfologii powierzchni. Procesy adhezji, proliferacji i różnicowania ADSCs na powierzchniach z tytanu i jego stopów, jak dotąd nie zostały szerzej zbadane. Dlatego w swojej pracy starałam się zwrócić uwagę na wpływ architektury warstwy powierzchniowej oraz jej właściwości fizykochemicznych na potencjał biologiczny komórek ADSC. Dodatkowo, opisane w artykule badania miały na celu ocenę zdolności do tworzenia kokultur *in vitro*: (1) fibroblastów linii L929/ADSC oraz (2) osteoblastów linii MG–63/ADSCs na powierzchni warstw TiO₂ o architekturze nanoporowatej, nanorurkowej i nanogąbczastej.

W pierwszej części artykułu dokonano analizy fizykochemicznych właściwości otrzymanych nanowarstw ditlenku tytanu. W procesie anodowego utleniania podłoża ze stopu Ti6Al4V jako elektrolit zastosowano 0.3% wodny roztwór kwasu fluorowodorowego. Proces ten zachodził w temperaturze pokojowej i trwał 20 minut. W zależności od przyłożonego napięcia (U) uzyskiwano warstwy o różnej nanoarchitekturze (Rysunek 8). Analiza obrazów ze skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) wykazała, że stosując napięcie $U = 5$ V otrzymywano nanoporowate warstwy tlenkowe (TNT5), o średnicy porów 15–30 nm. Zwiększając napięcie do $U = 15$ V otrzymano jednolite warstwy złożone z rozseparowanych nanorurek TiO₂ o średnicy 35–65 nm (TNT15). Zastosowanie napięcia $U = 40$ V umożliwiło wytworzenie warstw tlenkowych o morfologii przypominającej gąbkę, gdzie wewnątrz niejednorodnych form rurkowych o średnicach 120 ± 10 nm stanowiły uporządkowane pory, o średnicy 20–33 nm.

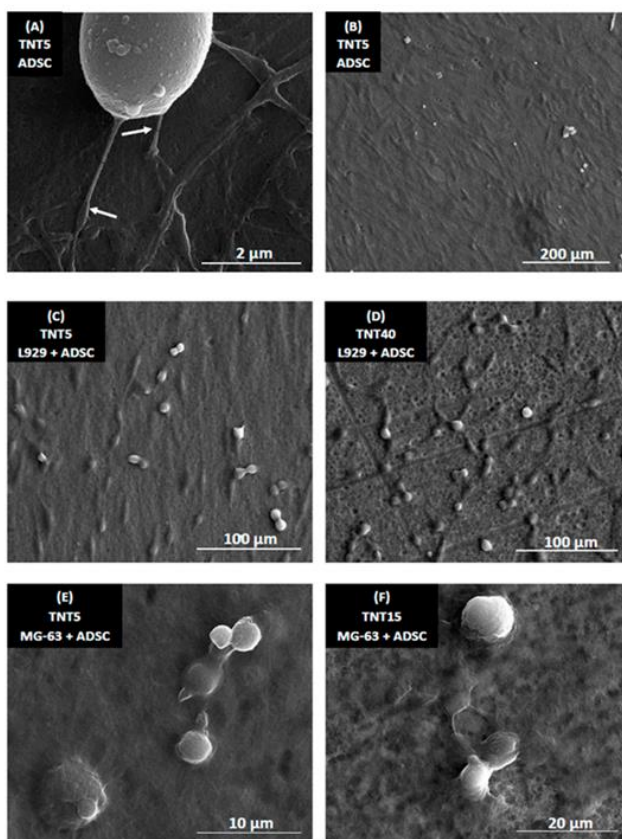


Rysunek 8. Obrazy SEM przedstawiające różnice w morfologii warstw powstałych w procesie anodowego utleniania stopu Ti6Al4V (TNTU), stosując napięcie $U = 5, 15$ i 40 V. Zaadaptowano z ilustracji zawartych w artykule [P2].

Badania strukturalne z wykorzystaniem spektroskopii Ramana oraz pomiarów z transmisyjnego mikroskopu elektronowego potwierdziły amorficzność wytworzonych warstw ditlenku tytanu. Warstwy złożone z nanoporów (TNT5), oraz nanorurek (TNT15) wykazywały właściwości hydrofobowe ($\theta = 94.4 \pm 0.4^\circ$ dla TNT5 i $\theta = 123.3 \pm 0.1^\circ$ dla TNT15). Warstwa nanogąbczasta (TNT40) wykazywała mniejszy charakter hydrofobowy, a jej zwilżalność była zbliżona do powierzchni stopu tytanowego i wynosiła $\theta = 85.3 \pm 0.9^\circ$ dla TNT40 i $\theta = 81.3 \pm 0.2^\circ$ dla Ti6Al4V.

Kolejnym etapem badań było określenie właściwości mechanicznych wyżej wymienionych warstw ditlenku tytanu. Największą wartość twardości (H) i modułu Younga (E) uzyskano dla referencyjnego czystego stopu (odpowiednio $H = 10.94 \pm 1.42$ GPa i $E = 212.48 \pm 16.69$ GPa). Pomiarów próbek stopów Ti6Al4V, których powierzchnia została zmodyfikowana warstwą TiO_2 o różnej architekturze (TNT) wykazały znaczny spadek wartości parametrów H i E . Najbardziej zbliżoną do kości wartość modułu Younga uzyskano dla warstwy TNT5 (37.88 ± 8.70 GPa). Wytworzone układy charakteryzuje także wysoka adhezja do podłoża, co może mieć istotne znaczenie podczas zabiegu implantacji oraz podczas późniejszego użytkowania implantu. Wynika to z procesów zachodzących w organizmie, które mogą prowadzić do zniszczenia słabo przylegającej warstwy do powierzchni, czego następstwem będzie tworzenie się stanów zapalnych w tkankach otaczających implant.

Z uwagi na to, iż topografia i chemia powierzchni wpływają na adhezję, różnicowanie i proliferację komórek, które to determinują osteointegrację biomateriału, w dalszym ciągu pracy dokonano oceny aktywności biologicznej wytworzonych nanowarstw ditlenku tytanu. Wszystkie badane nanowarstwy TNT, a w szczególności nanoporowate podłoże TNT5, stymulowały proliferację komórek osteoblastów MG-63, fibroblastów L929, jak i utworzonych kokultur komórkowych tj. fibroblastów lub osteoblastów współhodowanych z mezenchymalnymi komórkami macierzystymi pochodzenia tłuszczowego, zarówno po 24, jak i 72 godzinach. Ponadto, warto zauważyć, że wszystkie badane układy okazały się być korzystne dla ADSCs w hodowli krótkoterminowej (24 h). Analiza obrazów SEM potwierdziła tworzenie się filopodii mocujących wrzecionowate mezenchymalne komórki macierzyste do powierzchni rusztowania (Rysunek 9 A–B). Fibroblasty L929 współhodowane z ADSCs również przyjęły bardziej wydłużony kształt i dzieliły się (Rysunek 9 C–D), co wskazuje na ich dobrą żywotność i witalność. Obserwowano także podziały komórek osteoblastów MG-63 współhodowanych z ADSCs (Rysunek 9 E–F).



Rysunek 9. Obrazy SEM przedstawiające ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste pochodzenia tłuszczowego (ADSC; A, B), ADSC współhodowane z fibroblastami linii L929 (C, D) lub ADSC współhodowane z osteoblastami linii MG-63 (E, F) na powierzchniach TNT. Obrazy SEM prezentują komórki po 72 h hodowli. Zaadaptowano z ilustracji zawartych w artykule [P2].

Osteogeniczne różnicowanie hodowli ADSCs oceniono na podstawie pomiaru aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP) po 24 i 72 godzinach hodowli. Analiza uzyskanych wyników wykazała, że aktywność ALP kokultur komórkowych fibroblastów L929/ADSCs hodowanych na warstwach TNT, pomimo iż zmniejsza się w czasie, to nadal jest wyższa aniżeli dla hodowli komórek na referencyjnych podłożach Ti6Al4V. Warto również zauważyć, że warstwy nanoporowate (TNT5) i nanorurkowe (TNT15) indukowały wyższą aktywność ALP w komórkach osteoblastów MG-63 współhodowanych z ADSCs w czasie 72 godzin.

Podsumowując, otrzymane wyniki pozwoliły na wnioskowanie o wysokiej przydatności nanoporowatych warstw TNT5, wytworzonych na podłożu ze stopu Ti6Al4V. Wynika to z faktu, iż warstwa ta ma najbardziej zbliżoną do kości wartość modułu sprężystości oraz charakteryzuje się najwyższą proliferacją wysianych pojedynczych linii komórkowych, jak i kokultur komórek. Tłuszczowe, mezenchymalne komórki macierzyste, wytwarzają ogromne ilości macierzy pozakomórkowej, gdy są hodowane na nanoporowatym rusztowaniu (TNT5) samodzielnie lub współhodowane z komórkami osteoblastów MG-63 lub fibroblastów L929. Układ Ti6Al4V/TNT5 ma więc duży potencjał aplikacyjny do zastosowań na implanty ortopedyczne, jak i stomatologiczne.

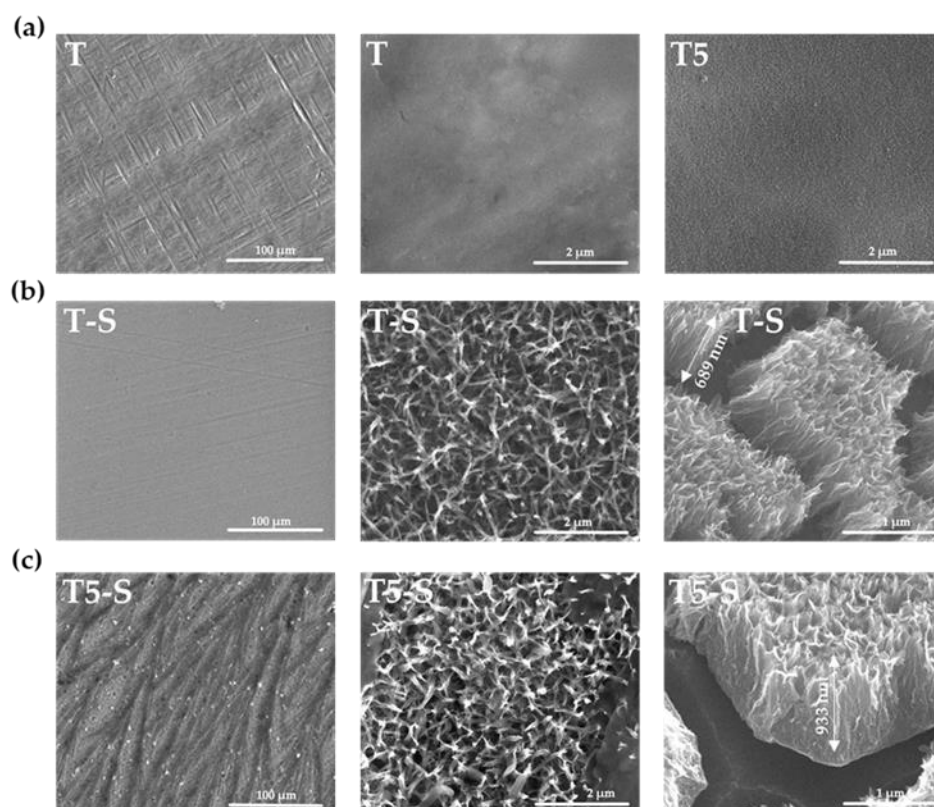
P3. Assessment of Titanate Nanolayers in Terms of Their Physicochemical and Biological Properties

Ehlert, M.; Radtke, A.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Piszczek, P. *Materials* **2021**, *14*, 806.

Modyfikując powierzchnię implantu należy wziąć pod uwagę sposób jego oddziaływania z otaczającą tkanką, który powinien zapewnić jak najlepszy kontakt implant–kość. Bioaktywność materiału w warunkach *in vitro* można ocenić na podstawie tworzenia się apatytu na jego powierzchni w symulowanym płynie ustrojowym (SBF), którego skład oraz stężenie jonów jest zbliżony do wartości występujących w osoczu krwi ludzkiej. W przypadku opisanych w artykułach **P1–P2** warstw, nie obserwowano narastania na ich powierzchni apatytu po zanurzeniu w roztworze SBF. Dlatego też, w następnym etapie moich badań zastosowałam kolejną metodę modyfikacji podłoża ze stopu Ti6Al4V, tj. obróbkę alkaliczno–sodową.

W pracy **P3** przedstawiono wyniki dotyczące modyfikacji powierzchni podłoża Ti6Al4V poprzez: (a) obróbkę alkaliczną 7 M roztworem wodorotlenku sodu ($T = 65^{\circ}\text{C}$, $t = 48\text{ h}$), oraz (b) wytworzenie powłoki nanoporowatej (utlenianie anodowe z zastosowaniem potencjału $U = 5\text{ V}$), a następnie obróbkę jej powierzchni w ww. roztworze alkalicznym. Następnie powyższe próby ogrzewano w inkubatorze w temperaturze 40°C , przez 24 godziny.

Obróbka alkaliczno–sodowa powierzchni stopu tytanowego (oznaczonego jako T) prowadzi do utworzenia jednolitej nanowarstwy (T–S) o grubości ok. 690 nm. Jednak zastosowanie tej metody do modyfikacji nanoporowatej powierzchni (T5) prowadziło do powstania warstwy trójwymiarowej sieci splątanych nanoprętów i nanowłókien o grubości ok. 933 nm (próbka oznaczona jako T5–S, Rysunek 10). Analiza danych XRD warstw T–S oraz T5–S wskazuje na tworzenie się na powierzchni podłoża kryształów tritytanianu sodu ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$), co potwierdzono również przy wykorzystaniu spektroskopii Ramana. Potwierdzeniem jest obecność w widmie Ramana charakterystycznych pasm tytanianów przy $\sim 903\text{ cm}^{-1}$ oraz $\sim 278\text{ cm}^{-1}$. Uwagę zwraca amfifilowy charakter wytwarzanych warstw, o czym świadczą pomiary kąta zwilżania powierzchni tytanianowych w kontakcie z cieczą, który wynosił 0° zarówno dla wody, jak i diiodometanu (stosowanych w pomiarach).

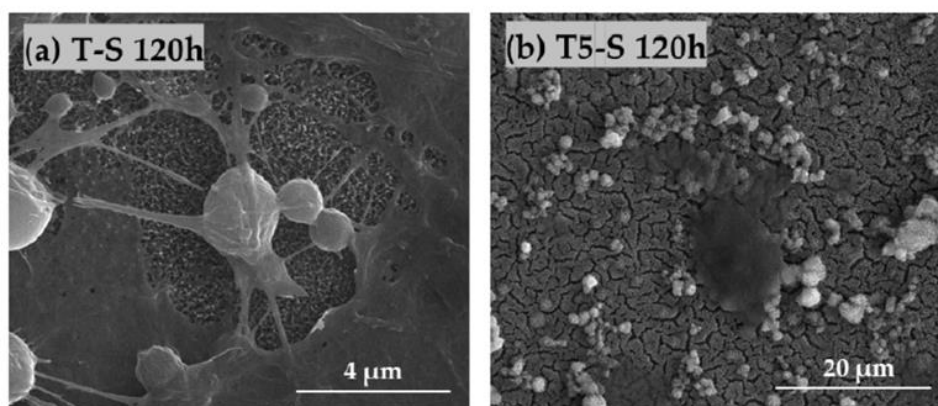


Rysunek 10. Obrazy SEM morfologii powierzchni i przekrojów poprzecznych niepoddanego obróbce alkalicznej stopu Ti6Al4V (T) i nanoporów TiO₂ (T5) (a), T-S (b) i T5-S po obróbce zasadowo-sodowej (c). Zaadaptowano z ilustracji zawartych w artykule [P3].

Ważnym czynnikiem wpływającym na biointegrację implantów metalowych jest tworzenie hydroksyapatytu (HA) na ich powierzchni w środowisku płynów ustrojowych. Dlatego też, w dalszej części tego artykułu przedstawiono wyniki badań zmian na powierzchni próbek materiałów z warstwami tytanianowymi (T-S i T5-S oraz prób kontrolnych tj. T i T5) zanurzonych w roztworze symulowanego płynu ustrojowego (SBF) przez okres 4 tygodni. Analiza obrazów ze skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) wykazała, że na powierzchniach tytanianowych T-S oraz T5-S, w przeciwieństwie do prób kontrolnych T i T5, obserwowano tworzenie się apatyty. Potwierdzeniem były wyniki badań dyfrakcji rentgenowskiej (XRD) oraz spektroskopii odbicia rozproszonego w podczerwieni (DRIFT), które udowodniły tworzenie się apatyty na powierzchniach tytanianowych już po 14 dniach zanurzenia w roztworze SBF.

W dalszym ciągu pracy, za pomocą testu MTT, określono ewentualne działanie cytotoksyczne alkaliczno-zmodyfikowanej powierzchni podłoża, na następujące linie komórkowe: fibroblastów L929, osteoblastów MG-63, mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzenia tłuszczowego (ADSCs). Wszystkie badane układy tzn.

Ti6Al4V/nanoporowata warstwa TiO₂ (T5), Ti6Al4V/tytanianowa warstwa (T-S), jak i Ti6Al4V/nanoporowaty TiO₂/tytanianowa warstwa (T5-S) promowały wyższy poziom proliferacji komórek fibroblastów L929 oraz osteoblastów MG-63 po 24, 72 i 120 godzinach hodowli. Spośród wszystkich badanych próbek, warstwy T5-S wykazały najwyższą żywotność komórek osteoblastów po 72 i 120 godzinach oraz większą żywotność komórek fibroblastów niż próbki T-S po 120 godzinach hodowli. Proliferacja ADSCs hodowanych na badanych próbkach różniła się istotnie od komórek fibroblastów i osteoblastów, a także pomiędzy warstwami modyfikowanymi alkalicznie. Próbka oznaczona jako T-S promowała wyższy o około 50% poziom proliferacji ADSCs w porównaniu do referencyjnego podłoża stopowego. Co zaskakujące, warstwy T5-S całkowicie zahamowały proliferację ADSCs, co potwierdzają nie tylko wyniki testu MTT, ale także analiza porównawcza obrazów SEM (Rysunek 11), natomiast powłoka hydroksyapatytu znacznie poprawiła właściwości powierzchniowe. Komórki ADSCs wykazywały silną adhezję na powierzchniach powierzchni próbek T-S i T5-S z powłoką hydroksyapatytu powstałą po 28 dniach inkubacji w roztworze SBF. Z uwagi na to, iż apatyt lub podobne, zmineralizowane struktury tworzą mikrośrodowisko osteogeniczne, które jest niezwykle cenne dla osteointegracji, można założyć, że ADSCs ulegają różnicowaniu, co znalazło odzwierciedlenie w obniżonym wskaźniku proliferacji tych komórek po 72 i 120 godzinach hodowli na powierzchniach układów T-S/HA i T5-S/HA.



Rysunek 11. Porównawcze obrazy SEM przedstawiające ludzkie ADSCs hodowane na powierzchni próbek T-S (a) i T5-S (b) przez 120 h. Zaadaptowano z ilustracji zawarty w artykule [P3].

Właściwości mechaniczne, takie jak twardość, moduł Younga oraz siła adhezji układów alkaliczno-sodowych przedstawiono w artykule **P4**, jako materiał dodatkowy. Jednakże, uznano, że należałoby przytoczyć je w omawianym artykule. Układ T-S w przeciwieństwie do układu T5-S wykazuje wysoką adhezję warstwy do podłoża ze stopu tytanowego (245.16 ± 188.48 mN). Moduł sprężystości, powinien być jak najbardziej zbliżony do modułu kości,

w którą dany implant jest wszczepiany – zbyt duża różnica między modułami powoduje, iż implant przenosi większe obciążenia, a kość wokół niego może ulegać resorpcji. Odnotowano znaczące zmniejszenie twardości (0.27 ± 0.07 GPa dla T–S, 0.42 ± 0.12 GPa dla T5–S) i modułu Younga (2.64 ± 0.38 GPa dla T–S, 5.86 ± 0.87 GPa dla T5–S) dla układów tytanianowych w porównaniu do próby referencyjnej, czyli stopu tytanowego. Niemniej jednak, uzyskane parametry wytrzymałościowe, a w szczególności twardość są zbyt niskie.

Podsumowując, alkaliczne trawienie podłoży ze stopu tytanowego oraz stopu pokrytego nanoporowatą powłoką TiO_2 prowadzi do tworzenia się nanowłóknistych warstw $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$. Zastosowanie wcześniejszego anodowania powierzchni Ti6Al4V jest istotne dla stymulowania tworzenia apatytu w środowisku płynów ustrojowych i ma optymalne właściwości biointegracyjne dla komórek fibroblastów L929 i osteoblastów MG–63. Zdolność do tworzenia apatytu na powierzchni T–S i T5–S znacząco poprawiła właściwości powierzchni pod względem adhezji i proliferacji mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzenia tłuszczowego. O ile otrzymane, tytanianowe warstwy wyróżniają się dobrą aktywnością biologiczną i właściwościami biointegracyjnymi, to ich właściwości mechaniczne nie są najlepsze.

P4. *Evaluation of the Cathodic Electrodeposition Effectiveness of the Hydroxyapatite Layer Used in Surface Modification of Ti6Al4V–Based Biomaterials*

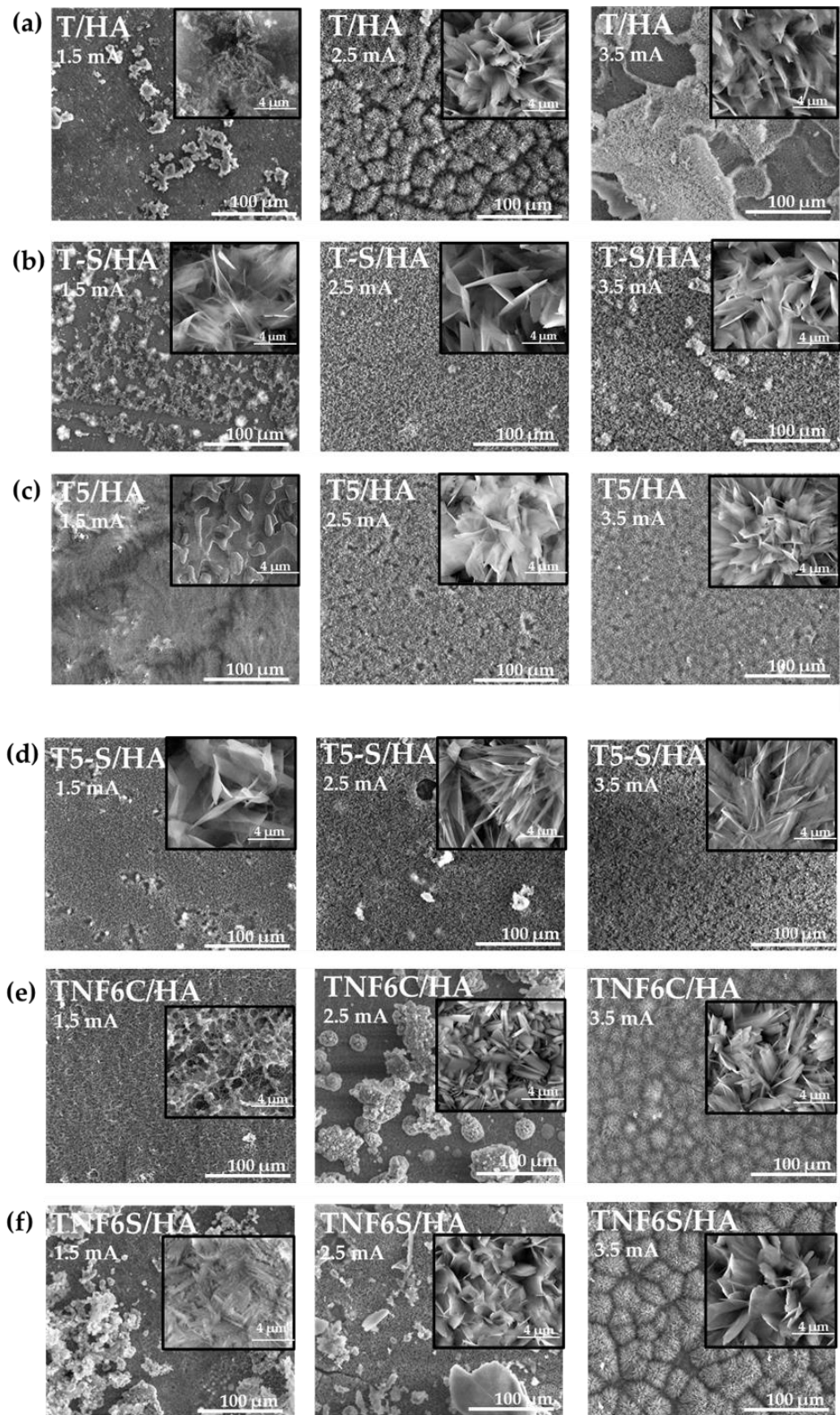
Ehlert*, M.; Radtke, A.; Bartmański, M.; Piszczek*, P. *Materials* **2022**, *15*, 6925.

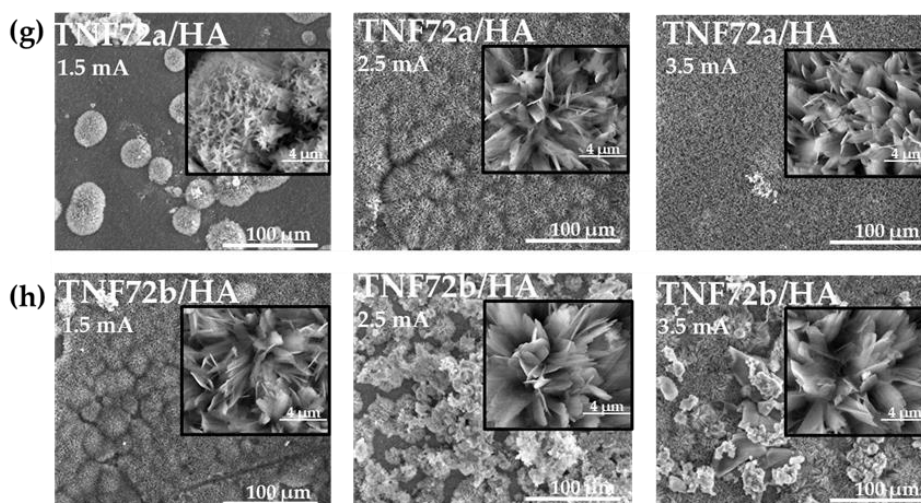
Badając właściwości fizykochemiczne, mechaniczne i biologiczne opisanych wcześniej warstw TiO_2 : nanoporowatych (TNT5, albo krócej T5), jak i nanowłóknistych (TNF) (**P1–P3**), zwrócono uwagę, że przy wszystkich swoich zaletach wymagają one dalszych korekt. Szczególnie ważna była poprawa ich zdolności do narastania apatyty na powierzchni zmodyfikowanych podłoży Ti6Al4V w środowisku płynów ustrojowych, a tym samym zwiększenia ich bioaktywności. Korekty wymaga również moduł sprężystości warstw TNF, a w przypadku nanowarstw tytanianowych (T5–S, T–S) parametry wytrzymałościowe. Analiza dotychczasowej literatury doprowadziła mnie do wniosku, że chcąc zachować bardzo dobrą aktywność biointegracyjną oraz dobre właściwości mechaniczne zmodyfikowanych podłoży Ti6Al4V w porównaniu do czystego stopu Ti6Al4V , właściwym rozwiązaniem będzie wytworzenie na powierzchni układu Ti6Al4V /titanian lub TiO_2 powłoki hydroksyapatytowej (HA). W ten sposób, w pierwszym etapie modyfikując powierzchnię implantu ze stopu Ti6Al4V wytwarzamy warstwę pośrednią, która w sposób stabilny powinna łączyć podłoże metaliczne z powłoką hydroksyapatytu. Przystępując do tych badań zakładałam, że wzbogacenie zmodyfikowanej powierzchni implantu za pomocą biokompatybilnego HA powinno poprawić jego moduł sprężystości, jak i zwiększyć jego bioaktywność, poprzez dalsze narastanie apatyty w środowisku płynów ustrojowych. Należy zauważyć, że dotychczas stosowane rozwiązania polegające na wytworzeniu powłoki HA bezpośrednio na powierzchni implantu prowadziły do utworzenia powłok o słabych właściwościach mechanicznych [189–192]. To powoduje, że ulegają one często rozwarstwieniu od podłoża metalicznego (szczególnie tytanowego), co wpływa na ich ograniczony zakres zastosowania. Dlatego też, badania opisane w niniejszym artykule ukierunkowane były na wybranie spośród grupy zbadanych dotąd warstw pośrednich (IL = TNT, TNF, T–S), układu najbardziej optymalnego, aby utworzyć bardziej stabilne powłoki HA tzn. o module Younga zbliżonym do ludzkiej warstwy korowej oraz dobrej wytrzymałości, a tym samym czyniąc wytworzone układy Ti6Al4V /IL/HA odpowiednimi do konstrukcji implantów przeznaczonych dla zastosowań w ortopedii oraz stomatologii.

W artykule **P4** przedstawiono wyniki badań dotyczące warunków prowadzenia procesu katodowego elektroosadzania hydroksyapatytu na tlenkowo zmodyfikowanych

powierzchniach podłoży ze stopu Ti6Al4V. Porównano morfologię, strukturę, zwilżalność, jak i właściwości mechaniczne wytworzonych układów Ti6Al4V/IL/HA. Jako warstwy pośrednie (IL), łączące powierzchnię stopu tytanowego z powłoką hydroksyapatytu wybrano: (a) nanoporowate warstwy TiO₂ – T5, (b) nanowłókniste warstwy TiO₂ – TNF6C, TNF6S, TNF72a, TNF72b oraz (c) warstwy tytanianowe – T–S i T5–S. W procesie katodowego elektroosadzania hydroksyapatytu na zmodyfikowanych tlenkowo lub nie, podłożach ze stopu Ti6Al4V, jako elektrolit zastosowano wodny roztwór złożony z Ca(NO₃)₂·4H₂O (0.042 M), NH₄H₂PO₄ (0.025 M) i EDTA–2Na (1.5·10³ M), o wartości pH = 4.5. Katodę stanowiły wcześniej scharakteryzowane podłoża (T (Ti6Al4V), T5, T5–S, T–S, TNF6C, TNF6S, TNF72a, i TNF72b)). Poszukując optymalnych warunków elektrochemicznego osadzania hydroksyapatytu, postanowiono zbadać wpływ gęstości zadanego prądu: $J = 7.5 \text{ mA/cm}^2$ ($I = 1.5 \text{ mA}$), $J = 12.5 \text{ mA/cm}^2$ ($I = 2.5 \text{ mA}$) oraz $J = 17.5 \text{ mA/cm}^2$ ($I = 3.5 \text{ mA}$) na właściwości fizykochemiczne i mechaniczne wytworzonych powłok. Proces trwał godzinę i odbywał się w temperaturze 65°C. Pierwotnie osadzona warstwa zawierała znaczną ilość amorficznego CaP i HA o niskim stopniu krystaliczności. Dlatego też, po zakończonym procesie katodowego osadzania, w celu uzyskania krystalicznej powłoki HA, próby zanurzone w 0.1 M roztworze wodorotlenku sodu i ogrzewano w inkubatorze przy $T = 65^\circ\text{C}$, przez 2 godziny. Następnie, aby zwiększyć krystaliczność i siłę wiązania apatytu, próby spiekano w temperaturze 250°C, przez 2 godziny.

Na podstawie analizy obrazów SEM zauważono, że morfologia i gęstość upakowania cząstek HA istotnie zależy od rodzaju podłoża oraz od gęstości prądu zastosowanego podczas katodowego osadzania (Rysunek 12). Badania morfologii wytwarzanych warstw oraz struktury wykazały, że zastosowana gęstość prądu $J = 7.5 \text{ mA/cm}^2$ była zbyt niska, aby otrzymać jednorodne powłoki hydroksyapatytowe (Rysunek 12 a,c,e,f). Zwiększenie gęstości prądu (do $J = 12.5 \text{ mA/cm}^2$ oraz do $J = 17.5 \text{ mA/cm}^2$) dla wszystkich analizowanych układów, spowodowało utworzenie powłoki hydroksyapatytu, o morfologii kwiecistej, złożonej z licznych „nanopłatków”. Ponadto, wraz ze wzrastającą gęstością prądu obserwowano zmianę struktury HA z rozproszonej na gęsto upakowaną (Rysunek 12 a–h), oraz wzrost grubości powłok.





Rysunek 12. Obrazy SEM morfologii powierzchni prób T/HA (a), T-S/HA (b), T5/HA (c), T5-S/HA (d), TNF6C/HA (e), TNF6S/HA (f), TNF72a/HA (g), oraz TNF72b/HA (h), dla których HA osadzany był przy różnych wartościach natężenia prądu (1.5 mA; 2.5 mA; 3.5 mA).

W przypadku wszystkich powłok hydroksyapatytowych osadzonych na tlenkowych nanowarstwach pośrednich zaobserwowano, że wraz ze wzrostem gęstości prądu wzrasta także chropowatość powierzchni powłok HA. W przypadku powłoki HA osadzonej na niemodyfikowanym podłożu stopu tytanowego (T/HA) zauważono, że zwiększenie gęstości prądu do $J = 17.5 \text{ mA/cm}^2$ skutkuje jej rozwarstwieniem, a także zmniejszeniem chropowatości powierzchni powłoki. Delaminacja może być spowodowana zwiększającą się wraz ze wzrostem gęstości prądu ilości ulatniającego się w reakcji katodowej wodoru, który prowadzi do powstania licznych mikropęknięć w powłoce hydroksyapatytowej. Ponadto, zjawisko rozwarstwienia może wynikać także z niskiej chropowatości powierzchni podłoża metalicznego. Przeprowadzone badania potwierdziły, że zastosowanie pośrednich nanowarstw tlenkowych, które wykazują wysokie parametry chropowatości powierzchni (S_a) w porównaniu do niemodyfikowanego stopu tytanu, wpływa na zwiększenie siły adhezji międzyfazowej pomiędzy tytanowym implantem, a powłoką HA. Na podstawie analizy widm SEM/EDS wytworzonych układów apatytowych, określono stosunek Ca/P. W przypadku czystego hydroksyapatytu wynosi on $\text{Ca/P} = 1.67$ i jest zbliżony do układu stechiometrycznego. W przypadku badanych próbek wartości zbliżone do wyżej wymienionej wartości zależały od natężenia użytego prądu. Parametr Ca/P był bliski wartości 1.67 dla: (a) prób T/HA, T5/HA, T-S, T5-S/HA, przy $I = 2.5 \text{ mA}$ oraz (b) prób TNF6/HA i TNF72/HA, przy $I = 3.5 \text{ mA}$. Potwierdzeniem obecności tworzącego się (przy $I = 2.5$ i 3.5 mA) krystalicznego hydroksyapatytu we wszystkich analizowanych powłokach były wyniki badań dyfrakcji

rentgenowskiej (XRD) oraz spektroskopii odbicia rozproszonego w podczerwieni (DRIFT). Warto zaznaczyć, że otrzymane kryształy HA tworzą się w kierunku prostopadłym do powierzchni elektrody w procesie elektrodpozycji. Należy zauważyć, że główną funkcją tlenkowych warstw pośrednich jest poprawa przyczepności ceramicznej powłoki hydroksyapatytu do podłoża tytanowego. Dlatego też, im mniejsza jest grubość powłoki HA, tym większa szansa na uniknięcie jej rozwarstwienia i wprowadzenia dodatkowych naprężeń. Grubość uzyskanych powłok wahała się od 10 μm (T/HA, $I = 2.5\text{mA}$) do 20 μm (TNF72b, $I = 3.5\text{ mA}$), w zależności od zastosowanej warstwy pośredniej i wartości natężenia prądu. W wyniku analizy pomiarów XRD, zaobserwowano dla każdego układu wyraźne linie dyfrakcyjne pochodzące od tytanu, co dodatkowo potwierdza niewielką grubość uzyskanych powłok. Badania zwilżalności układów HA wykazały superhydrofilowy charakter tych struktur, niezależnie od zastosowanego parametru prądowego, co pozwoliło na wnioskowanie o przewidywanej ich wysokiej biokompatybilności i bioaktywności.

W celu określenia, która z modyfikacji powierzchni Ti6Al4V jest najbardziej optymalna do osadzania powłok hydroksyapatytowych, kluczowe znaczenie miały badania mechaniczne oraz siły adhezji. W przypadku wszystkich układów z powłoką HA obserwowano poprawę wyników badań nanomechanicznych (twardości i modułu Younga), w porównaniu do wartości uzyskanych dla warstw pośrednich bez powłoki hydroksyapatytowej (**P1–P3**). Wykazano także że, wartość przyłożonego natężenia prądu podczas katodowego elektroosadzania wpływa na uzyskiwane parametry modułu sprężystości. Wraz ze wzrostem gęstości prądu, w przypadku prób T5–S/HA zauważono wzrost, a w przypadku prób T–S/HA, T5/HA, TNF72b/HA spadek modułu Younga. Ponadto, wraz ze wzrostem modułu sprężystości zaobserwowano wzrost wartości twardości w obrębie danego biomateriału (z wyjątkiem TNF72a). Zbliżoną do warstwy korowej kości wartością modułu Younga oraz twardości, charakteryzowały się układy z powłoką hydroksyapatytu osadzoną na warstwie tytanianowej T–S/HA ($I = 2.5\text{ mA}$, $E = 28.05 \pm 7.06\text{ GPa}$, $H = 0.28 \pm 0.11\text{ GPa}$), nanoporowatej T5/HA ($I = 3.5\text{ mA}$, $E = 20.00 \pm 7.03\text{ GPa}$, $H = 0.25 \pm 0.09\text{ GPa}$) oraz nanowłóknistej TNF6C/HA ($I = 3.5\text{ mA}$, $E = 25.96 \pm 13.96\text{ GPa}$, $H = 0.29 \pm 0.19\text{ GPa}$). Najwyższą adhezję powłoki HA do podłoża metalicznego ($169.93 \pm 35.88\text{ mN}$) zaobserwowano dla układu Ti6Al4V/TNF6C/HA ($I = 3.5\text{ mA}$).

Podsumowując, zarówno dobór warunków prowadzenia procesu katodowej elektrodpozycji hydroksyapatytu (tj. temperatury, czasu, gęstości prądu), jak również rodzaj zastosowanej do jego osadzenia warstwy pośredniej wpływają na właściwości fizykochemiczne i mechaniczne otrzymywanych układów. Przeprowadzone badania dowodzą, że możliwe jest

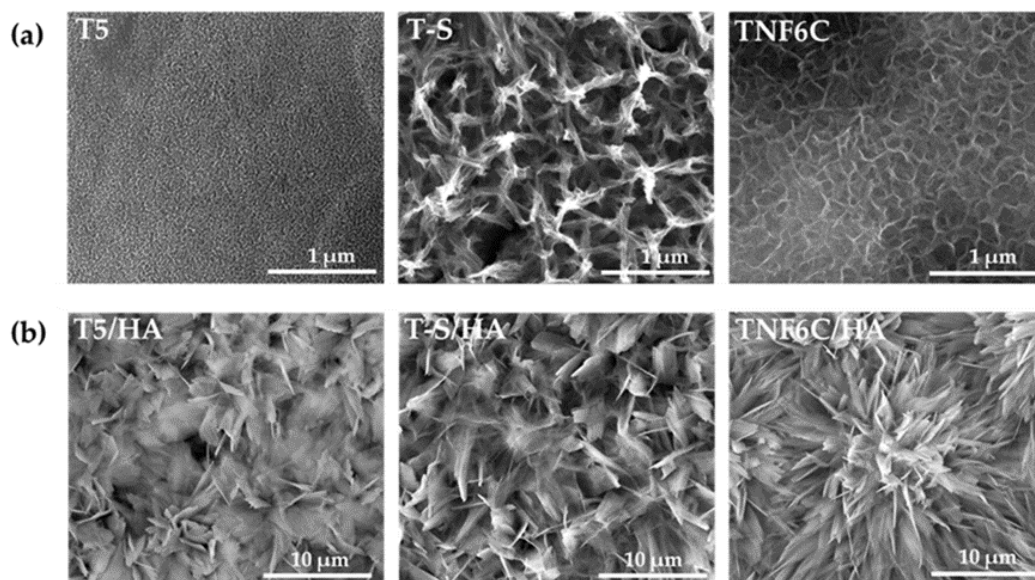
wytworzenie układu z powłoką hydroksyapatytową o korzystnych właściwościach mechanicznych, jak i wysokiej sile adhezji do podłoża metalicznego, przy zastosowaniu tlenkowych warstw pośrednich w postaci nanoporowatej lub nanowłóknistej (TNT, TNF, T-S).

P5. *TiO₂/HA and Titanate/HA Double Layer Coatings on Ti6Al4V Surface and Their Influence on In Vitro Cell Growth and Osteogenic Potential*

Ehlert*, M.; Radtke*, A.; Forbot, N.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Golińska, P.; Trykowski, G.; Piszczek, P. *Journal of Functional Biomaterials* **2022, 13, 271**

Artykuł **P5** stanowi kontynuację tematyki poruszonej w artykule **P4**. Przeprowadzone badania były ukierunkowane na ocenę aktywności biologicznej układów opisanych w artykule **P4** z powłoką hydroksyapatytową, wykazujących najbardziej optymalne właściwości fizykochemiczne oraz mechaniczne. Do badań tych wybrano układy Ti6Al4V/IL/HA, w których rolę warstwy pośredniej (IL) pełnił: nanoporowaty TiO₂ (T5), nanowłóknisty TiO₂ (TNF6C) oraz tytanian (T-S). Powłoka hydroksyapatytowa została osadzona w procesie katodowego elektroosadzania przy natężeniu prądu 2.5 mA (T5/HA, T-S/HA) lub 3.5 mA (TNF6C/HA).

W pierwszej części publikacji omówiono mechanizm osadzania się hydroksyapatytu na tlenkowo zmodyfikowanym podłożu ze stopu tytanowego oraz przedstawiono obrazy SEM wybranych warstw pośrednich, tj. T5, T-S, oraz TNF6C (Rysunek 13a) oraz morfologii powierzchni prób z powłoką hydroksyapatytową: T5/HA, TNF6C/HA, oraz T-S/HA (Rysunek 13b).



Rysunek 13. Obrazy SEM morfologii powierzchni prób T5, T-S, TNF6C (a), T5/HA, T-S/HA, oraz TNF6C/HA (b). Zaadaptowano z ilustracji zawartych w artykule [P5].

Następnie, w celu oceny bioaktywności wytworzonych materiałów z powłoką HA, przeprowadzono test w symulowanym roztworze fizjologicznym (SBF), o składzie jonowym zbliżonym do składu osocza krwi ludzkiej. Analizie poddano materiały w stanie wyjściowym oraz po pierwszym, drugim, trzecim i czwartym tygodniu ekspozycji w roztworze SBF. Na podstawie uzyskanych dyfraktogramów rentgenowskich potwierdzono, że próbki z osadzonym HA wykazują zdolność do dalszego tworzenia się apatyty w roztworze SBF. Zachodzące zmiany analizowano także, na podstawie obrazów SEM, widm SEM/EDS oraz wyliczonego, procentowego przyrostu masy apatyty. Zaobserwowano, że już od pierwszych dni inkubacji, badane biomateriały T5/HA, T-S/HA i TNF6C/HA promowały osadzanie się apatyty na ich powierzchniach. Dłuższy czas inkubacji wymienionych układów, w roztworze SBF, prowadzi do otrzymania grubszych powłok apatytowych. Na powierzchni nowopowstałych powłok apatyty odnotowano nieliczne pęknięcia, które najprawdopodobniej były spowodowane naprężeniami wewnętrznymi podczas procesu suszenia.

W kolejnym etapie, przeprowadzono badania *in vitro* układów Ti6Al4V/IL/HA (IL = T5, TNF6C, T-S), badając ich wpływ na przeżywalność i proliferację mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej, ludzkich osteoblastów linii MG-63 oraz komórek tkanki łącznej – mysich fibroblastów linii L929 hodowanych na ich powierzchni. Jako próby odniesienia wybrano układy bez powłoki HA. Otrzymane wyniki potwierdzają, że rodzaj warstwy pośredniej łączącej podłoże ze stopu Ti6Al4V z powłoką HA, wpływa nie tylko na otrzymywane parametry fizykochemiczne, jak i mechaniczne, ale także na powstające różnice w aktywności biologicznej otrzymanych układów. W celu oceny aktywności metabolicznej komórek i ewentualnej cytotoksyczności wytworzonych biomateriałów wykonano test MTT. Sprawdzone także aktywność fosfatazy alkalicznej, której wzrost może świadczyć o biokompatybilności badanej powierzchni. Enzym ten jest uznawany za wczesny marker różnicowania komórek, formowania kości i mineralizacji macierzy zewnątrzkomórkowej. Ponadto, w celu wykrycia złogów wapniowych w komórkach linii kostnej, wykonano test z użyciem czerwieni alizarynowej. Na podstawie uzyskanych w teście MTT wyników, wraz ze wzrastającym czasem hodowli, odnotowano wyższą lub porównywalną liczbę komórek fibroblastów L929, jak i osteoblastów MG-63 na materiałach z lub bez powłoki HA. W przypadku ADSCs zauważono podobną zależność (z wyjątkiem próby TNF6C/HA). Nanowarstwy z powłoką HA indukowały wyższy lub porównywalny poziom żywotności fibroblastów L929 w porównaniu z próbkami bez HA. Podobny efekt zauważono również dla osteoblastów MG-63 hodowanych na powierzchni prób T5 i T5/HA. Przeciwnie, pokrycie

nanowarstw T-S i TNF6C za pomocą powłoki hydroksyapatytowej wywołało spadek żywotności osteoblastów MG-63 w porównaniu z układami bez HA. Podobny wynik zaobserwowano w przypadku ADSCs hodowanych na powierzchni prób T5/HA i TNF6C/HA. Porównawcza analiza SEM komórek, potwierdziła uzyskane w teście MTT wyniki. Analiza spektrofotometryczna związanej przez złogi wapniowe alizaryny, wykazała odkładanie się w macierzy zewnątrzkomórkowej podobnych ilości wapnia, zarówno w przypadku komórek osteoblastów MG-63, jak i ADSCs, we wszystkich badanych próbkach. Najlichniesze rejony sedimentacji pigmentu stwierdzono na próbkach z powłoką hydroksyapatytu, co jest korzystne dla procesu mineralizacji. Na podstawie uzyskanych wyników pomiarów aktywności fosfatazy alkalicznej stwierdzono zmniejszenie się aktywności ALP w komórkach MG-63 i jej wzrost w ADSCs hodowanych na podłożu T5/HA. Biorąc pod uwagę, iż ALP jest uważana za wczesny marker różnicowania osteogennego, można stwierdzić, że jej wzrost w ADSCs wpływa na efektywną osteogenezę. Wpływ powłoki HA na aktywność ALP w komórkach MG-63 prowadzi do zwiększenia jej aktywności tylko w przypadku układu T-S/HA.

Wynikiem przeprowadzonych testów przeciwdrobnoustrojowych było stwierdzenie, że wytworzone biomateriały z powłoką hydroksyapatytową (T5/HA, T-S/HA, TNF6C/HA) nie wykazywały takiej aktywności. Należy jednak pamiętać, że istotne znaczenie ma fakt, aby biomateriał z powłoką antybakteryjną nie utrudniał jego integracji tkankowej.

Biorąc pod uwagę wyniki badań aktywności metabolicznej komórki, oceny tworzenia złogów wapniowych, aktywności fosfatazy alkalicznej oraz obserwacji mikroskopowych (SEM) udowodniono, że układ (Ti6Al4V/T5/HA) z nanoporowatą warstwą pośrednią, łączącą podłoże ze stopu tytanu z powłoką hydroksyapatytową, wykazuje największy potencjał do zastosowania w konstrukcji implantów nowej generacji. Powierzchnia z podwójną warstwą T5/HA jest nietoksyczna i wspomaga adhezję i proliferację badanych linii komórkowych. Bioceramika hydroksyapatytowa osadzona na nanoporowatej warstwie pośredniej zwiększa biointegrację, wspomaga potencjał osteogenny osteoblastów MG-63 i ADSCs, działa promocyjnie na zjawisko mineralizacji macierzy zewnątrzkomórkowej oraz wykazuje obiecującą bioaktywność. Ponadto, układ Ti6Al4V/T5/HA wyróżniają doskonałe właściwości mechaniczne (siła adhezji = 103.11 ± 10.07 mN, $H = 0.30 \pm 0.10$ GPa i $E = 35.58 \pm 7.41$ GPa) (artykuł **P4**). Opisane badania stały się podstawą do opracowania technologii wytwarzania implantu z powłoką hydroksyapatytową, zachowując pożądaną równowagę pomiędzy korzystnymi właściwościami fizykochemicznymi, mechanicznymi i biologicznymi.

5. Podsumowanie

Celem naukowym niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie wpływu wybranych sposobów modyfikacji powierzchni implantu ze stopu Ti6Al4V na jego właściwości fizykochemiczne, mechaniczne oraz biologiczne. Natomiast celem przeprowadzonych prac badawczo-rozwojowych było opracowanie metody modyfikacji powierzchniowej implantów kostnych, w tym stomatologicznych oraz ortopedycznych, aby wzbogacić ich powierzchnię bioaktywną warstwą, sprzyjającą regeneracji kości, odpowiednią do późniejszego nałożenia frakcji bogatej w komórki macierzyste.

Przeprowadzone badania podzielono na dwa etapy:

Etap I polegał na modyfikacji powierzchni próbek stopu Ti6Al4V, które doprowadziły do otrzymania nanoarchitektury tlenków tytanu o odmiennej morfologii, strukturze oraz właściwościach mechanicznych i biologicznych (**P1**, **P2**, **P3**). Stwierdzono, że chemiczne utlenianie, z użyciem nadtlenu wodoru podłoża ze stopu Ti6Al4V, prowadzi do otrzymania amorficznych (TNF72), lub polikrystalicznych (TNF4–10), nanowłóknistych warstw TiO₂ na ich powierzchni (**P1**). Elektrochemiczne utlenianie podłoża ze stopu Ti6Al4V w elektrolicie zawierającym jony fluorkowe, w zależności od zastosowanego napięcia prądu (5, 15, 40 V), prowadzi do otrzymania w kontrolowany sposób amorficznej nanoporowatej, nanorurkowej lub nanogąbczastej warstwy ditlenku tytanu na powierzchni stopu tytanowego (**P2**). Alkaliczne trawienie podłoża ze stopu tytanowego oraz stopu pokrytego nanoporowatą powłoką TiO₂ prowadzi do tworzenia się nanowłóknistych warstw tytanianowych (T–S, T5–S) (**P3**). Udowodniono, że otrzymane w wyżej wspomnianych procesach nanowarstwy nie są cytotoksyczne względem linii komórkowej MG–63, L929 oraz ADSCs, a komórki lepiej proliferują na warstwach porowatych, jak i włóknistych niż na podłożu ze stopu tytanowego. Modyfikacja powierzchni stopu Ti6Al4V doprowadziła do poprawy właściwości mechanicznych w stosunku do wyjściowych parametrów podłoża. Spośród analizowanych warstw najbardziej korzystne właściwości fizykochemiczne, mechaniczne oraz biologiczne wykazała nanoporowata warstwa ditlenku tytanu wytworzona na stopie Ti6Al4V. Warstwa ta została oznaczona w artykule **P2** akronimem TNT5, natomiast w kolejnych artykułach **P3–P5** zastosowano skrócone oznaczenie – T5. W poniższym opisie będę posługiwać się oznaczeniem TNT5. Warstwa ta charakteryzuje się najbardziej zbliżoną do ludzkiej warstwy korowej wartością modułu sprężystości, wysoką adhezją do podłoża metalicznego oraz właściwościami sprzyjającymi biointegracji. Jednak, nanoporowata warstwa nie wykazuje zdolności do

narastania apatytu w roztworze symulowanego płynu ustrojowego. Warto podkreślić, że proces anodowego utleniania jest względnie łatwą i stosunkowo tanią metodą modyfikacji powierzchni tytanowej.

W etapie II, traktując wysoce biokompatybilne tlenkowe nanowarstwy (wytworzone w ramach Etapu I), jako warstwy pośrednie (IL), wytworzono układy typu Ti6Al4V/IL/HA. W powyższych układach warstwy IL stanowiły łącznik pomiędzy powłoką hydroksyapatytową a podłożem ze stopu Ti6Al4V (**P4**, **P5**). Wzbogacenie zmodyfikowanych powierzchniowo implantów tytanowych o powłokę hydroksyapatytową miało na celu zwiększenie ich bioaktywności, biozgodności, zintensyfikowanie procesów osteointegracji, zapobieganie ewentualnej metalozie, a także obniżenie wartości modułu sprężystości do wartości modułu Younga ludzkiej kości. Warto zauważyć, że ze względu na słabą adhezję, nie byłoby możliwe skuteczne osadzenie powłok hydroksyapatytowych bezpośrednio na metalicznym podłożu. Siła adhezji powłoki HA do podłoża tytanowego uległa znaczącej poprawie, gdy zastosowano łącznik w postaci warstwy nanoporowatej lub nanowłóknistej.

Metoda katodowego osadzania prowadzi do tworzenia się powłok hydroksyapatytowych, na zmodyfikowanej powierzchni stopu Ti6Al4V, których właściwości istotnie zależą zarówno od parametrów procesu (gęstości prądu, czasu, temperatury osadzania), jak i rodzaju zastosowanej warstwy pośredniej. Zaletą zastosowania metody katodowej elektrodepozycji jest: (a) krótki czas osadzania i spiekania powłoki hydroksyapatytowej, oraz (b) stosunkowo niskie koszty produkcji, co zwiększa szanse na wykorzystanie tej metody w przemyśle. W artykule **P4** przedstawiono charakterystykę fizykochemiczną oraz mechaniczną wytworzonych układów z powłoką HA, natomiast w artykule **P5** skupiono się na opisie ich właściwości biologicznych.

Uzyskane wyniki: (a) badań aktywności metabolicznej komórek hodowanych na wytworzonych podłożach, (b) oceny tworzenia złogów wapniowych, aktywności fosfatazy alkalicznej, (c) obserwacji mikroskopowych (SEM) (**P5**), jak i (d) właściwości mechanicznych (**P4**), udowodniły, że największy potencjał do zastosowania w konstrukcji implantów przeznaczonych dla ortopedii, a także stomatologii ma układ Ti6Al4V/TNT5/HA. Stwierdzono, że powłoka hydroksyapatytowa osadzona na nanoporowatej warstwie pośredniej cechuje się dobrą cytokompatybilnością oraz promuje zdolność do adhezji, proliferacji i osteogennego różnicowania się mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej.

Zastosowanie zaproponowanej metody modyfikacji powierzchni implantu ze stopu Ti6Al4V, prowadzącej do uzyskania układu typu: implant/nanoporowata warstwa tlenkowa/hydroksyapatytu, otwiera nową ścieżkę w produkcji implantów (w tym spersonalizowanych wytwarzanych w technologiach 3D) przeznaczonych na potrzeby ortopedii, a także stomatologii.

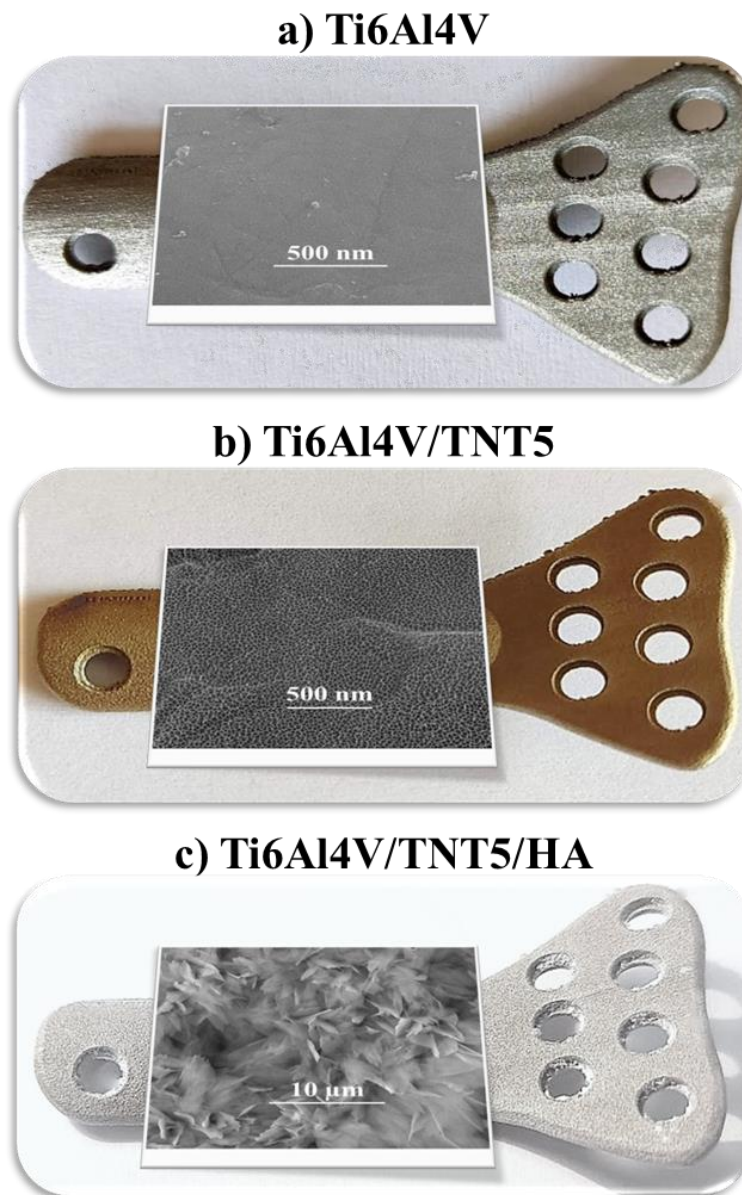
6. Wdrożenie

Założeniem wdrożeniowej pracy doktorskiej jest optymalne wykorzystanie wyników naukowych w praktyce gospodarczej. W moim przypadku partnerem gospodarczym jest firma akademicka Nano-implant Sp. z o.o., która prowadzi prace nad wytworzeniem spersonalizowanych implantów tytanowych nowej generacji dla potrzeb ortopedii, chirurgii szczękowo-twarzowej oraz stomatologii.

Wynikiem przeprowadzonych badań jest opracowanie technologii dwustopniowej modyfikacji powierzchni implantu ze stopu Ti6Al4V, co stanowi innowacyjne rozwiązanie gotowe do zastosowania w produkcji nowej generacji implantów. Proponowana metoda zakłada dwuetapową modyfikację implantu wytwarzanego, np. w technologii 3D (selektywne spiekanie laserowe proszków tytanowych (SLS)) (Rysunek 14a). W trakcie pierwszego etapu powierzchnia stopu Ti6Al4V zostaje pokryta warstwą ditlenku tytanu o morfologii nanoporowatej (TNT5), jako warstwy pośredniej (Rysunek 14b). Rozwiązanie to stanowi przedmiot zgłoszenia patentowego pt. „Sposób wytwarzania powłoki nanokompozytowej na powierzchni stopu tytanowego Ti6Al4V i powłoka wytworzona tym sposobem.” 2020-09-21; P.435368; [WIPO ST 10/C PL435368]. W kolejnym etapie na powierzchni warstwy pośredniej wytworzona zostaje powłoka hydroksyapatytowa (HA), tworząc w ten sposób układ Ti6Al4V/TNT5/HA (Rysunek 14c).

Wytworzony tą metodą implant będzie mógł być stosowany u szerszego grona pacjentów w porównaniu do implantów produkowanych obecnie, ze względu na jego wysoką biogodność, jak i korzystne właściwości mechaniczne. Podkreślić należy fakt, że ze względu na wysoką adhezję, proliferację, jak i potencjał do osteogennego różnicowania się mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej w warunkach *in vitro*, zakłada się możliwość wykorzystania frakcji bogatej w komórki macierzyste, pochodzącej z tkanki tłuszczowej pacjenta, u którego będzie dokonywany wszczep, jako dodatkowej bioaktywnej powłoki na produkowanych implantach. Po otrzymaniu pozytywnej weryfikacji uzyskanych wyników w badaniach biologicznych *in vivo*, możliwe będzie wdrożenie opracowanego prototypu implantu stomatologicznego, ortopedycznego pokrytego powłoką kompozytową (TNT5/HA) wzbogaconą o frakcję bogatą w komórki macierzyste do codziennej praktyki chirurgicznej. Proponowane rozwiązanie wskazuje, że z tego rodzaju implantu, poza dotychczas dopuszczanymi do zabiegów pacjentami, mogliby korzystać diabetycy, osoby o obniżonej odporności immunologicznej i osoby starsze.

Z punktu widzenia łatwości zastosowania klinicznego, proponowany implant może być bezpiecznie sterylizowany najczęściej używaną w praktyce medycznej – metodą parową (czynnikiem sterylizującym jest nasycona para wodna w nadciśnieniu, w temperaturze 121°C). Ponadto, warunki jego transportu, jak i przechowywania są proste, a odczynniki użyte do dwustopniowej modyfikacji (TNT5/HA) powierzchni implantu ze stopu Ti6Al4V generują niewielkie koszty.



Rysunek 14. Fotografia implantu ortopedycznego wytworzonego metodą selektywnego spiekania laserowego proszku Ti6Al4V (a–c) oraz obrazy SEM: niezmodyfikowanej powierzchni implantu (a), oraz nanoporowatej warstwy (b), nanoporowatej warstwy z powłoką hydroksyapatytową, zintegrowanej z powierzchnią implantu (c).

7. Bibliografia

1. Mirzaali, M.J.; Moosabeiki, V.; Rajaai, S.M.; Zhou, J.; Zadpoor, A.A. Additive Manufacturing of Biomaterials—Design Principles and Their Implementation. *Materials* **2022**, *15*, 5457, doi:10.3390/ma15155457.
2. Davis, R.; Singh, A.; Jackson, M.J.; Coelho, R.T.; Prakash, D.; Charalambous, C.P.; Ahmed, W.; da Silva, L.R.R.; Lawrence, A.A. A Comprehensive Review on Metallic Implant Biomaterials and Their Subtractive Manufacturing. *Int J Adv Manuf Technol* **2022**, *120*, 1473–1530, doi:10.1007/s00170-022-08770-8.
3. Chen, F.-M.; Liu, X. Advancing Biomaterials of Human Origin for Tissue Engineering. *Prog Polym Sci* **2016**, *53*, 86–168, doi:10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004.
4. Peres, I.; Rolo, P.; Soares dos Santos, M.P. Multifunctional Smart Bone Implants: Fiction or Future?—A New Perspective. *Front Bioeng Biotechnol* **2022**, *10*, 912081, doi:10.3389/fbioe.2022.912081.
5. Alghamdi, H.S. Methods to Improve Osseointegration of Dental Implants in Low Quality (Type-IV) Bone: An Overview. *Journal of Functional Biomaterials* **2018**, *9*, 7, doi:10.3390/jfb9010007.
6. Li, J.; Zhou, P.; Attarilar, S.; Shi, H. Innovative Surface Modification Procedures to Achieve Micro/Nano-Graded Ti-Based Biomedical Alloys and Implants. *Coatings* **2021**, *11*, 647, doi:10.3390/coatings11060647.
7. Kulinets, I. 1 – Biomaterials and Their Applications in Medicine. In *Regulatory Affairs for Biomaterials and Medical Devices*; Amato, S.F., Ezzell, R.M., Eds.; Woodhead Publishing Series in Biomaterials; Woodhead Publishing, 2015; pp. 1–10 ISBN 978-0-85709-542-8.
8. Yu, X.; Tang, X.; Gohil, S.V.; Laurencin, C.T. Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. *Advanced Healthcare Materials* **2015**, *4*, 1268–1285, doi:10.1002/adhm.201400760.
9. Prasad, K.; Bazaka, O.; Chua, M.; Rochford, M.; Fedrick, L.; Spoor, J.; Symes, R.; Tieppo, M.; Collins, C.; Cao, A.; et al. Metallic Biomaterials: Current Challenges and Opportunities. *Materials* **2017**, *10*, 884, doi:10.3390/ma10080884.
10. Ehlert, M.; Radtke, A.; Forbot, N.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Golińska, P.; Trykowski, G.; Piszczek, P. TiO₂/HA and Titanate/HA Double-Layer Coatings on Ti6Al4V Surface and Their Influence on In Vitro Cell Growth and Osteogenic Potential. *Journal of Functional Biomaterials* **2022**, *13*, 271, doi:10.3390/jfb13040271.
11. Dolete, G.; Ilie, C.F.; Nicoară, I.F.; Vlăsceanu, G.M.; Grumezescu, A.M. Chapter 2 – Understanding Dental Implants. In *Nanobiomaterials in Dentistry*; Grumezescu, A.M., Ed.; William Andrew Publishing, 2016; pp. 27–47 ISBN 978-0-323-42867-5.
12. Clinical Applications of Biomaterials. National Institute of Health Consensus Development Conference Statement 1982 Nov 1–3. Available online: <https://consensus.nih.gov/1982/1982Biomaterials034html.htm> (accessed on 15 November 2022),
13. Ratner, B.D.; Bryant, S.J. Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going. *Annu Rev Biomed Eng* **2004**, *6*, 41–75, doi:10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027.
14. Todros, S.; Todesco, M.; Bagno, A. Biomaterials and Their Biomedical Applications: From Replacement to Regeneration. *Processes* **2021**, *9*, 1949, doi:10.3390/pr9111949.
15. Jessney, B. Joseph Lister (1827–1912): A Pioneer of Antiseptic Surgery Remembered a Century After His Death. *J Med Biogr* **2012**, *20*, 107–110, doi:10.1258/jmb.2011.011074.

16. S. V. Bhat, *Biomaterials*, Narosa Publishing House, New Delhi, 2002; pp. 25–39 ISBN 0–7923–7058–9.
17. Ratner, B.D.; Zhang, G. 1.1.2 – A History of Biomaterials. In *Biomaterials Science (Fourth Edition)*; Wagner, W.R., Sakiyama–Elbert, S.E., Zhang, G., Yaszemski, M.J., Eds.; Academic Press, 2020; pp. 21–34 ISBN 978–0–12–816137–1.
18. Park, J.B.; Lakes, R.S. Introduction to Biomaterials. In *Biomaterials: An Introduction*; Park, J.B., Lakes, R.S., Eds.; Springer US: Boston, MA, 1992; pp. 1–6 ISBN 978–1–4757–2156–0.
19. Gautam, G.; Kumar, S.; Kumar, K. Processing of Biomaterials for Bone Tissue Engineering: State of the Art. *Materials Today: Proceedings* **2022**, *50*, 2206–2217, doi:10.1016/j.matpr.2021.09.459.
20. RameshKumar, S.; Shaiju, P.; O’Connor, K.E.; P, R.B. Bio–Based and Biodegradable Polymers – State–of–the–Art, Challenges and Emerging Trends. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **2020**, *21*, 75–81, doi:10.1016/j.cogsc.2019.12.005.
21. Ratner, B.D.; Hoffman, A.S.; Schoen, F.J.; Lemons, J.E. Introduction – Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor. In *Biomaterials Science (Third Edition)*; Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E., Eds.; Academic Press, 2013; pp. 25–34 ISBN 978–0–12–374626–9.
22. Basu, B.; Gowtham, N.H.; Xiao, Y.; Kalidindi, S.R.; Leong, K.W. Biomaterialomics: Data Science–Driven Pathways to Develop Fourth–Generation Biomaterials. *Acta Biomaterialia* **2022**, *143*, 1–25, doi:10.1016/j.actbio.2022.02.027.
23. Fenton, O.S.; Olafson, K.N.; Pillai, P.S.; Mitchell, M.J.; Langer, R. Advances in Biomaterials for Drug Delivery. *Advanced Materials* **2018**, *30*, 1705328, doi:10.1002/adma.201705328.
24. Im, G.–I. Biomaterials in Orthopaedics: The Past and Future with Immune Modulation. *Biomaterials Research* **2020**, *24*, 7, doi:10.1186/s40824–020–0185–7.
25. Jammalamadaka, U.; Tappa, K. Recent Advances in Biomaterials for 3D Printing and Tissue Engineering. *J Funct Biomater* **2018**, *9*, E22, doi:10.3390/jfb9010022.
26. Hench, L.L.; Polak, J.M. Third–Generation Biomedical Materials. *Science* **2002**, *295*, 1014–1017, doi:10.1126/science.1067404.
27. Filip, N.; Radu, I.; Veliceasa, B.; Filip, C.; Pertea, M.; Clim, A.; Pinzariu, A.C.; Drochioi, I.C.; Hilitanu, R.L.; Serban, I.L. Biomaterials in Orthopedic Devices: Current Issues and Future Perspectives. *Coatings* **2022**, *12*, 1544, doi:10.3390/coatings12101544.
28. Montoya, C.; Du, Y.; Gianforcaro, A.L.; Orrego, S.; Yang, M.; Lelkes, P.I. On the Road to Smart Biomaterials for Bone Research: Definitions, Concepts, Advances, and Outlook. *Bone Res* **2021**, *9*, 1–16, doi:10.1038/s41413–020–00131–z.
29. Ning, C.; Zhou, L.; Tan, G. Fourth–Generation Biomedical Materials. *Materials Today* **2016**, *19*, 2–3, doi:10.1016/j.mattod.2015.11.005.
30. Gritsch, L.; Perrin, E.; Chenal, J.–M.; Fredholm, Y.; Maçon, A.L.; Chevalier, J.; Boccaccini, A.R. Combining Bioresorbable Polyesters and Bioactive Glasses: Orthopedic Applications of Composite Implants and Bone Tissue Engineering Scaffolds. *Applied Materials Today* **2021**, *22*, 100923, doi:10.1016/j.apmt.2020.100923.
31. Allo, B.; Costa, D.; Dixon, S.; Mequanint, K.; Rizkalla, A. Bioactive and Biodegradable Nanocomposites and Hybrid Biomaterials for Bone Regeneration. *Journal of functional biomaterials* **2012**, *3*, 432–463, doi:10.3390/jfb3020432.

32. Biswas, J.; Datta, B. Biomaterials: An Introduction to Materials for Biomedical Applications. In *Nanostructured Materials and their Applications*; Swain, B.P., Ed.; Materials Horizons: From Nature to Nanomaterials; Springer: Singapore, 2021; pp. 43–53 ISBN 9789811583070.
33. Hodge, J.G.; Zamierowski, D.S.; Robinson, J.L.; Mellott, A.J. Evaluating Polymeric Biomaterials to Improve next Generation Wound Dressing Design. *Biomaterials Research* **2022**, *26*, 50, doi:10.1186/s40824-022-00291-5.
34. Dziuba, R.; Kucharska, M.; Madej-Kielbik, L.; Sulak, K.; Wiśniewska-Wrona, M. Biopolymers and Biomaterials for Special Applications within the Context of the Circular Economy. *Materials* **2021**, *14*, 7704, doi:10.3390/ma14247704.
35. Qu, H.; Fu, H.; Han, Z.; Sun, Y. Biomaterials for Bone Tissue Engineering Scaffolds: A Review. *RSC Advances* **2019**, *9*, 26252–26262, doi:10.1039/C9RA05214C.
36. Kapusetti, G.; More, N.; Choppadandi, M. Introduction to Ideal Characteristics and Advanced Biomedical Applications of Biomaterials. In *Biomedical Engineering and its Applications in Healthcare*; Paul, S., Ed.; Springer: Singapore, 2019; pp. 171–204 ISBN 9789811337055.
37. dos Santos, V.; Brandalise, R.N.; Savaris, M. *Engineering of Biomaterials*; Topics in Mining, Metallurgy and Materials Engineering; Springer International Publishing: Cham, 2017; pp. 61–72 ISBN 978-3-319-58606-9.
38. Olson, J.L.; Atala, A.; Yoo, J.J. Tissue Engineering: Current Strategies and Future Directions. *Chonnam Med J* **2011**, *47*, 1–13, doi:10.4068/cmj.2011.47.1.1.
39. Nayyer, L.; Patel, K.; Esmacili, A.; Rippel, R.; Birchall, M.; O’toole, G.; Butler, P.; Seifalian, A. Tissue Engineering: Revolution and Challenge in Auricular Cartilage Reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery* **2012**, *129*, 1123–1137, doi:10.1097/PRS.0b013e31824a2c1c.
40. Guvendiren, M.; Molde, J.; Soares, R.M.D.; Kohn, J. Designing Biomaterials for 3D Printing. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, *2*, 1679–1693, doi:10.1021/acsbomaterials.6b00121.
41. Florencio-Silva, R.; Sasso, G.R. da S.; Sasso-Cerri, E.; Simões, M.J.; Cerri, P.S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International* **2015**, *2015*, e421746, doi:10.1155/2015/421746.
42. Stevens, M.M. Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Materials Today* **2008**, *11*, 18–25, doi:10.1016/S1369-7021(08)70086-5.
43. Dumont, M.; Kaysser-Pyzalla, A.; Kostka, A.; Sander, P.; Borbely, A. Characterization of Sauropod Bone Structure. In *Biology of the sauropod dinosaurs: understanding the life of giants*, Klein, N., Remes, K. and Sander P.M., Eds.; Bloomington: Indiana University Press; 2011. pp. 149–170 ISBN 0253355087
44. Rho, J.-Y.; Kuhn-Spearing, L.; Zioupos, P. Mechanical Properties and the Hierarchical Structure of Bone. *Medical Engineering & Physics* **1998**, *20*, 92–102, doi:10.1016/S1350-4533(98)00007-1.
45. Liu, Y.; Luo, D.; Wang, T. Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering. *Small* **2016**, *12*, 4611–4632, doi:10.1002/sml.201600626.
46. Collins, M.N.; Ren, G.; Young, K.; Pina, S.; Reis, R.L.; Oliveira, J.M. Scaffold Fabrication Technologies and Structure/Function Properties in Bone Tissue Engineering. *Advanced Functional Materials* **2021**, *31*, 2010609, doi:10.1002/adfm.202010609.

47. Bose, S.; Vahabzadeh, S.; Bandyopadhyay, A. Bone Tissue Engineering Using 3D Printing. *Materials Today* **2013**, *16*, 496–504, doi:10.1016/j.mattod.2013.11.017.
48. Roseti, L.; Parisi, V.; Petretta, M.; Cavallo, C.; Desando, G.; Bartolotti, I.; Grigolo, B. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the Art and New Perspectives. *Materials Science and Engineering: C* **2017**, *78*, 1246–1262, doi:10.1016/j.msec.2017.05.017.
49. Fan, J.; Abedi–Dorcheh, K.; Sadat Vaziri, A.; Kazemi–Aghdam, F.; Rafieyan, S.; Sohrabinejad, M.; Ghorbani, M.; Rastegar Adib, F.; Ghasemi, Z.; Klavins, K.; et al. A Review of Recent Advances in Natural Polymer–Based Scaffolds for Musculoskeletal Tissue Engineering. *Polymers* **2022**, *14*, 2097, doi:10.3390/polym14102097.
50. Overmann, A.L.; Aparicio, C.; Richards, J.T.; Mutreja, I.; Fischer, N.G.; Wade, S.M.; Potter, B.K.; Davis, T.A.; Bechtold, J.E.; Forsberg, J.A.; et al. Orthopaedic Osseointegration: Implantology and Future Directions. *Journal of Orthopaedic Research* **2020**, *38*, 1445–1454, doi:10.1002/jor.24576.
51. Guglielmotti, M.B.; Olmedo, D.G.; Cabrini, R.L. Research on Implants and Osseointegration. *Periodontology 2000* **2019**, *79*, 178–189, doi:10.1111/prd.12254.
52. Albrektsson, T.; Wennerberg, A. On Osseointegration in Relation to Implant Surfaces. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **2019**, *21*, 4–7, doi:10.1111/cid.12742.
53. Donaruma, L.G. Definitions in Biomaterials, D. F. Williams, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1987, 72 Pp. *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters* **1988**, *26*, 414–414, doi:10.1002/pol.1988.140260910.
54. Lindhe, J.; Meyle, J.; Group D of European Workshop on Periodontology Peri–Implant Diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* **2008**, *35*, 282–285, doi:10.1111/j.1600–051X.2008.01283.x.
55. Kumar, P.S. Systemic Risk Factors for the Development of Periimplant Diseases. *Implant Dentistry* **2019**, *28*, 115–119, doi:10.1097/ID.0000000000000873.
56. Matos, G.R.M. Surface Roughness of Dental Implant and Osseointegration. *J. Maxillofac. Oral Surg.* **2021**, *20*, 1–4, doi:10.1007/s12663–020–01437–5.
57. Parithimarkalaignan, S.; Padmanabhan, T.V. Osseointegration: An Update. *J Indian Prosthodont Soc* **2013**, *13*, 2–6, doi:10.1007/s13191–013–0252–z.
58. Li, J.; Jansen, J.A.; Walboomers, X.F.; van den Beucken, J.J.P. Mechanical Aspects of Dental Implants and Osseointegration: A Narrative Review. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **2020**, *103*, 103574, doi:10.1016/j.jmbbm.2019.103574.
59. Salvi, G.E.; Bosshardt, D.D.; Lang, N.P.; Abrahamsson, I.; Berglundh, T.; Lindhe, J.; Ivanovski, S.; Donos, N. Temporal Sequence of Hard and Soft Tissue Healing around Titanium Dental Implants. *Periodontology 2000* **2015**, *68*, 135–152, doi:10.1111/prd.12054.
60. Suzuki, M.; Calasans–Maia, M.D.; Marin, C.; Granato, R.; Gil, J.N.; Granjeiro, J.M.; Coelho, P.G. Effect of Surface Modifications on Early Bone Healing Around Plateau Root Form Implants: An Experimental Study in Rabbits. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **2010**, *68*, 1631–1638, doi:10.1016/j.joms.2009.07.064.
61. Leonard, G.; Coelho, P.; Polyzois, I.; Stassen, L.; Claffey, N. A Study of the Bone Healing Kinetics of Plateau versus Screw Root Design Titanium Dental Implants. *Clinical Oral Implants Research* **2009**, *20*, 232–239, doi:10.1111/j.1600–0501.2008.01640.x.

62. Caplan, A.I.; Dennis, J.E. Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators. *J Cell Biochem* **2006**, *98*, 1076–1084, doi:10.1002/jcb.20886.
63. Mavrogenis, A.F.; Dimitriou, R.; Parvizi, J.; Babis, G.C. Biology of Implant Osseointegration. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **2009**, *9*, 61–71.
64. Gittens, R.A.; Olivares–Navarrete, R.; Schwartz, Z.; Boyan, B.D. Implant Osseointegration and the Role of Microroughness and Nanostructures: Lessons for Spine Implants. *Acta Biomaterialia* **2014**, *10*, 3363–3371, doi:10.1016/j.actbio.2014.03.037.
65. Shibata, Y.; Tanimoto, Y.; Maruyama, N.; Nagakura, M. A Review of Improved Fixation Methods for Dental Implants. Part II: Biomechanical Integrity at Bone–Implant Interface. *Journal of Prosthodontic Research* **2015**, *59*, 84–95, doi:10.1016/j.jpjor.2015.01.003.
66. Wu, S.; Liu, X.; Yeung, K.W.K.; Guo, H.; Li, P.; Hu, T.; Chung, C.Y.; Chu, P.K. Surface Nano–Architectures and Their Effects on the Mechanical Properties and Corrosion Behavior of Ti–Based Orthopedic Implants. *Surface and Coatings Technology* **2013**, *233*, 13–26, doi:10.1016/j.surfcoat.2012.10.023.
67. Kirmanidou, Y.; Sidira, M.; Drosou, M.–E.; Bennani, V.; Bakopoulou, A.; Tsouknidas, A.; Michailidis, N.; Michalakis, K. New Ti–Alloys and Surface Modifications to Improve the Mechanical Properties and the Biological Response to Orthopedic and Dental Implants: A Review. *BioMed Research International* **2016**, *2016*, e2908570, doi:10.1155/2016/2908570.
68. Dejak, B. Strength comparison of anterior teeth restored with aesthetic crowns made of various materiale. *Prosthodontics* *61*, 98–105, doi:10.1016/j.jpjor.2017.08.005.
69. Liebschner, M.; Wettergreen, M.A. Optimization of Bone Scaffold Engineering for Load Bearing Applications. In *Topics in Tissue Engineering*, Ashammakhi, N., Ferretti, P., Eds.; Finland: University of Oulu; 2003, 1–39.
70. Aykul, H.; Toparl, M. A Comparison of the Stress Analysis of an Unrestored and Restored Tooth with Amalgam and Composite Resin. *Mathematical and Computational Applications* **2005**, *10*, 89–98, doi:10.3390/mca10010089.
71. Maruo, I.T.; Maruo, H.; Saga, A.Y.; de Oliveira, D.D.; Argenta, M.A.; Tanaka, O.M. Tridimensional Finite Element Analysis of Teeth Movement Induced by Different Headgear Forces. *Prog Orthod* **2016**, *17*, 18, doi:10.1186/s40510–016–0130–4.
72. Sardarian, A.; Momeni Danaei, S.; Shahidi, S.; Boushehri, S.; Geramy, A. The Effect of Vertical Bracket Positioning on Torque and the Resultant Stress in the Periodontal Ligament—a Finite Element Study. *Progress in orthodontics* **2014**, *15*, 50, doi:10.1186/s40510–014–0050–0.
73. Kokubo, T.; Kim, H.–M.; Kawashita, M. Novel Bioactive Materials with Different Mechanical Properties. *Biomaterials* **2003**, *24*, 2161–2175, doi:10.1016/S0142–9612(03)00044–9.
74. Hall, P.A.; Watt, F.M. Stem Cells: The Generation and Maintenance of Cellular Diversity. *Development* **1989**, *106*, 619–633, doi:10.1242/dev.106.4.619.
75. Martino, S.; D’Angelo, F.; Armentano, I.; Kenny, J.M.; Orlacchio, A. Stem Cell–Biomaterial Interactions for Regenerative Medicine. *Biotechnol Adv* **2012**, *30*, 338–351, doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.015.

76. Barry, F.P.; Murphy, J.M. Mesenchymal Stem Cells: Clinical Applications and Biological Characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2004**, *36*, 568–584, doi:10.1016/j.biocel.2003.11.001.
77. Pountos, I.; Giannoudis, P.V. Biology of Mesenchymal Stem Cells. *Injury* **2005**, *36*, S8–S12, doi:10.1016/j.injury.2005.07.028.
78. Sayed, M.E.; Mugri, M.H.; Almasri, M.A.; Al-Ahmari, M.M.; Bhandi, S.; Madapusi, T.B.; Varadarajan, S.; Raj, A.T.; Reda, R.; Testarelli, L.; et al. Role of Stem Cells in Augmenting Dental Implant Osseointegration: A Systematic Review. *Coatings* **2021**, *11*, 1035, doi:10.3390/coatings11091035.
79. Alison, M.R.; Poulosom, R.; Forbes, S.; Wright, N.A. An Introduction to Stem Cells. *The Journal of Pathology* **2002**, *197*, 419–423, doi:10.1002/path.1187.
80. Berger, M.J.; Adams, S.D.; Tigges, B.M.; Sprague, S.L.; Wang, X.-J.; Collins, D.P.; McKenna, D.H. Differentiation of Umbilical Cord Blood-Derived Multilineage Progenitor Cells into Respiratory Epithelial Cells. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 480–487, doi:10.1080/14653240600941549.
81. Schindeler, A.; McDonald, M.M.; Bokko, P.; Little, D.G. Bone Remodeling during Fracture Repair: The Cellular Picture. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2008**, *19*, 459–466, doi:10.1016/j.semcd.2008.07.004.
82. Neuss, S.; Schneider, R.K.M.; Tietze, L.; Knüchel, R.; Jahnen-Dechent, W. Secretion of Fibrinolytic Enzymes Facilitates Human Mesenchymal Stem Cell Invasion into Fibrin Clots. *Cells Tissues Organs* **2010**, *191*, 36–46, doi:10.1159/000215579.
83. Ciuffi, S.; Zonefrati, R.; Brandi, M.L. Adipose Stem Cells for Bone Tissue Repair. *Clin Cases Miner Bone Metab* **2017**, *14*, 217–226, doi:10.11138/ccmbm/2017.14.1.217.
84. Friedenstein, A.J.; Petrakova, K.V.; Kurolesova, A.I.; Frolova, G.P. Heterotopic of Bone Marrow. Analysis of Precursor Cells for Osteogenic and Hematopoietic Tissues. *Transplantation* **1968**, *6*, 230–247.
85. Paul, S.R.; Yang, Y.-C.; Donahue, R.E.; Goldring, S.; Williams, D.A. Stromal Cell-Associated Hematopoiesis: Immortalization and Characterization of a Primate Bone Marrow-Derived Stromal Cell Line. *Blood* **1991**, *77*, 1723–1733, doi:10.1182/blood.V77.8.1723.1723.
86. Luo, L.; Liu, M. Adipose Tissue in Control of Metabolism. *Journal of Endocrinology* **2006**, *3*, 77–99, doi:10.1530/JOE-16-0211.
87. Gimble, J.M.; Katz, A.J.; Bunnell, B.A. Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. *Circ Res* **2007**, *100*, 1249–1260, doi:10.1161/01.RES.0000265074.83288.09.
88. Bunnell, B.A.; Flaas, M.; Gagliardi, C.; Patel, B.; Ripoll, C. Adipose-Derived Stem Cells: Isolation, Expansion and Differentiation. *Methods* **2008**, *45*, 115–120, doi:10.1016/j.ymeth.2008.03.006.
89. Zhang, H.-T.; Liu, Z.-L.; Yao, X.-Q.; Yang, Z.-J.; Xu, R.-X. Neural Differentiation Ability of Mesenchymal Stromal Cells from Bone Marrow and Adipose Tissue: A Comparative Study. *Cytotherapy* **2012**, *14*, 1203–1214, doi:10.3109/14653249.2012.711470.
90. Liu, Y.; Rath, B.; Tingart, M.; Eschweiler, J. Role of Implants Surface Modification in Osseointegration: A Systematic Review. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2020**, *108*, 470–484, doi:10.1002/jbm.a.36829.

91. Harun, W.S.W.; Manam, N.S.; Kamariah, M.S.I.N.; Sharif, S.; Zulkifly, A.H.; Ahmad, I.; Miura, H. A Review of Powdered Additive Manufacturing Techniques for Ti–6Al–4V Biomedical Applications. *Powder Technology* **2018**, *331*, 74–97, doi:10.1016/j.powtec.2018.03.010.
92. Niinomi, M. Recent Metallic Materials for Biomedical Applications. *Metall Mater Trans A* **2002**, *33*, 477–486, doi:10.1007/s11661-002-0109-2.
93. Hanawa, T. Overview of Metals and Applications. In *Metals for Biomedical Devices (Second Edition)*; Niinomi, M., Ed.; Woodhead Publishing Series in Biomaterials; Woodhead Publishing, 2019; pp. 3–29 ISBN 978-0-08-102666-3.
94. Priyadarshini, B.; Rama, M.; Chetan; Vijayalakshmi, U. Bioactive Coating as a Surface Modification Technique for Biocompatible Metallic Implants: A Review. *Journal of Asian Ceramic Societies* **2019**, *7*, 397–406, doi:10.1080/21870764.2019.1669861.
95. Basova, T.V.; Vikulova, E.S.; Dorovskikh, S.I.; Hassan, A.; Morozova, N.B. The Use of Noble Metal Coatings and Nanoparticles for the Modification of Medical Implant Materials. *Materials & Design* **2021**, *204*, 109672, doi:10.1016/j.matdes.2021.109672.
96. Festas, A.; Ramos, A.; Davim, J. Medical Devices Biomaterials – A Review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part L: Journal of Materials: Design and Applications* **2020**, *234*, 218–228, doi:10.1177/1464420719882458.
97. Al-Saadi, N.J.; Bakathir, A.; Al-Mashaikhi, A.; Al-Hashmi, A.; Al-Habsi, A.; Al-Azri, F. Maxillary Artery Pseudoaneurysm as a Complication of Maxillofacial Injuries. *Sultan Qaboos Univ Med J* **2019**, *19*, e364–e368, doi:10.18295/squmj.2019.19.04.013.
98. Ahmed, Y.M.; Sahari, K.S.M.; Ishak, M.; Khidhir, B.A. Titanium and Its Alloy. *International Journal of Science and Research* **2014**, *3*, 1351–1361.
99. Jorge, J.R.P.; Barão, V.A.; Delben, J.A.; Faverani, L.P.; Queiroz, T.P.; Assunção, W.G. Titanium in Dentistry: Historical Development, State of the Art and Future Perspectives. *J Indian Prosthodont Soc* **2013**, *13*, 71–77, doi:10.1007/s13191-012-0190-1.
100. Liu, X.; Chen, S.; Tsoi, J.K.H.; Matinlinna, J.P. Binary Titanium Alloys as Dental Implant Materials—a Review. *Regenerative Biomaterials* **2017**, *4*, 315–323, doi:10.1093/rb/rbx027.
101. Hayes, J.; Richards, R. The Use of Titanium and Stainless Steel in Fracture Fixation. *Expert Review of Medical Devices* **2010**, *7*, 843–853, doi:10.1586/erd.10.53.
102. Vasilescu, E.; Vasilescu, V.-G.; Nicolau, A.M. Dental Metals and Alloys Characterization. In *The annals of “Dunarea de jos” University of Galati*; Bordei, M., Ed.; Fascicle IX Metallurgy and Materials Science; Galati University Press, 2013, pp. 26–32 ISSN 1453-083X.
103. Jaganathan, S.K.; Supriyanto, E.; Murugesan, S.; Balaji, A.; Asokan, M.K. Biomaterials in Cardiovascular Research: Applications and Clinical Implications. *BioMed Research International* **2014**, *2014*, e459465, doi:10.1155/2014/459465.
104. Arango, S.; Peláez-Vargas, A.; García, C. Coating and Surface Treatments on Orthodontic Metallic Materials. *Coatings* **2013**, *3*, 1–15, doi:10.3390/coatings3010001.
105. Sidhu, S.S.; Singh, H.; Gepreel, M.A.-H. A Review on Alloy Design, Biological Response, and Strengthening of β -Titanium Alloys as Biomaterials. *Materials Science and Engineering: C* **2021**, *121*, 111661, doi:10.1016/j.msec.2020.111661.

106. Pilliar, R.M. Metallic Biomaterials. In *Biomedical Materials*; Narayan, R., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2021; pp. 1–47 ISBN 978–3–030–49206–9.
107. Duraccio, D.; Mussano, F.; Faga, M.G. Biomaterials for Dental Implants: Current and Future Trends. *J Mater Sci* **2015**, *50*, 4779–4812, doi:10.1007/s10853–015–9056–3.
108. Zhang, L.–C.; Chen, L.–Y.; Wang, L. Surface Modification of Titanium and Titanium Alloys: Technologies, Developments, and Future Interests. *Advanced Engineering Materials* **2020**, *22*, 1901258, doi:10.1002/adem.201901258.
109. İzmir, M.; Ercan, B. Anodization of Titanium Alloys for Orthopedic Applications. *Front. Chem. Sci. Eng.* **2019**, *13*, 28–45, doi:10.1007/s11705–018–1759–y.
110. Zhu, G.; Wang, G.; Jiao Li, J. Advances in Implant Surface Modifications to Improve Osseointegration. *Materials Advances* **2021**, *2*, 6901–6927, doi:10.1039/D1MA00675D.
111. Ren, B.; Wan, Y.; Liu, C.; Wang, H.; Yu, M.; Zhang, X.; Huang, Y. Improved Osseointegration of 3D Printed Ti–6Al–4V Implant with a Hierarchical Micro/Nano Surface Topography: An in Vitro and in Vivo Study. *Materials Science and Engineering: C* **2021**, *118*, 111505, doi:10.1016/j.msec.2020.111505.
112. Kurup, A.; Dhattrak, P.; Khasnis, N. Surface Modification Techniques of Titanium and Titanium Alloys for Biomedical Dental Applications: A Review. *Materials Today: Proceedings* **2021**, *39*, 84–90, doi:10.1016/j.matpr.2020.06.163.
113. Hanawa, T. Titanium–Tissue Interface Reaction and Its Control With Surface Treatment. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2019**, *7*, 170, doi:10.3389/fbioe.2019.00170.
114. Bocchetta, P.; Chen, L.–Y.; Tardelli, J.D.C.; Reis, A.C. dos; Almeraya–Calderón, F.; Leo, P. Passive Layers and Corrosion Resistance of Biomedical Ti–6Al–4V and β -Ti Alloys. *Coatings* **2021**, *11*, 487, doi:10.3390/coatings11050487.
115. Pisarek, M.; Roguska, A.; Marcon, L.; Andrzejczuk, M. Biomimetic and Electrodeposited Calcium–Phosphates Coatings on Ti – Formation, Surface Characterization. *Biological Response* **2012**, *1*, 1–46, doi:10.5772/48693.
116. Yan, S.; Song, G.–L.; Li, Z.; Wang, H.; Zheng, D.; Cao, F.; Horynova, M.; Dargusch, M.S.; Zhou, L. A State–of–the–Art Review on Passivation and Biofouling of Ti and Its Alloys in Marine Environments. *Journal of Materials Science & Technology* **2018**, *34*, 421–435, doi:10.1016/j.jmst.2017.11.021.
117. Mirdamadi, S.H.; Khodaei, M.; Valanezhad, A.; Watanabe, I.; Nejatidanesh, F.; Savabi, O. Effect of Post Heat Treatment on Surface Properties of Hydrogen Peroxide (H₂O₂) Treated Titanium. *Journal of Materials Research and Technology* **2022**, *18*, 584–590, doi:10.1016/j.jmrt.2022.02.095.
118. Sarraf, M.; Rezvani Ghomi, E.; Alipour, S.; Ramakrishna, S.; Liana Sukiman, N. A State–of–the–Art Review of the Fabrication and Characteristics of Titanium and Its Alloys for Biomedical Applications. *Bio–des. Manuf.* **2022**, *5*, 371–395, doi:10.1007/s42242–021–00170–3.
119. Vega, V.; Prida, V.M.; Hernández–Vélez, M.; Manova, E.; Aranda, P.; Ruiz–Hitzky, E.; Vázquez, M. Influence of Anodic Conditions on Self–Ordered Growth of Highly Aligned Titanium Oxide Nanopores. *Nanoscale Res Lett* **2007**, *2*, 355–363, doi:10.1007/s11671–007–9073–5.
120. Balazic, M.; Kopac, J.; Jackson, M.J.; Ahmed, W. Review: Titanium and Titanium Alloy Applications in Medicine. *International Journal of Nano and Biomaterials* **2007**, *1*, 3–34, doi:10.1504/IJNBM.2007.016517.

121. Eisenbarth, E.; Velten, D.; Müller, M.; Thull, R.; Breme, J. Biocompatibility of β -Stabilizing Elements of Titanium Alloys. *Biomaterials* **2004**, *25*, 5705–5713, doi:10.1016/j.biomaterials.2004.01.021.
122. Kazemi, M.; Ahangarani, S.; Esmailian, M.; Shanaghi, A. Investigation on the Corrosion Behavior and Biocompatibility of Ti–6Al–4V Implant Coated with HA/TiN Dual Layer for Medical Applications. *Surface and Coatings Technology* **2020**, *397*, 126044, doi:10.1016/j.surfcoat.2020.126044.
123. Bartolomeu, F.; Dourado, N.; Pereira, F.; Alves, N.; Miranda, G.; Silva, F.S. Additive Manufactured Porous Biomaterials Targeting Orthopedic Implants: A Suitable Combination of Mechanical, Physical and Topological Properties. *Materials Science and Engineering: C* **2020**, *107*, 110342, doi:10.1016/j.msec.2019.110342.
124. Radtke, A.; Ehlert, M.; Jędrzejewski, T.; Bartmański, M. The Morphology, Structure, Mechanical Properties and Biocompatibility of Nanotubular Titania Coatings before and after Autoclaving Process. *JCM* **2019**, *8*, 272, doi:10.3390/jcm8020272.
125. Jemat, A.; Ghazali, M.J.; Razali, M.; Otsuka, Y. Surface Modifications and Their Effects on Titanium Dental Implants. *BioMed Research International* **2015**, *2015*, e791725, doi:10.1155/2015/791725.
126. Smeets, R.; Stadlinger, B.; Schwarz, F.; Beck–Broichsitter, B.; Jung, O.; Precht, C.; Kloss, F.; Gröbe, A.; Heiland, M.; Ebker, T. Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration. *BioMed Research International* **2016**, *2016*, e6285620, doi:10.1155/2016/6285620.
127. Nicolas–Silvente, A.I.; Velasco–Ortega, E.; Ortiz–Garcia, I.; Monsalve–Guil, L.; Gil, J.; Jimenez–Guerra, A. Influence of the Titanium Implant Surface Treatment on the Surface Roughness and Chemical Composition. *Materials* **2020**, *13*, 314, doi:10.3390/ma13020314.
128. Le Guehenec, L.; Lopez–Heredia, M.–A.; Enkel, B.; Weiss, P.; Amouriq, Y.; Layrolle, P. Osteoblastic Cell Behaviour on Different Titanium Implant Surfaces. *Acta Biomaterialia* **2008**, *4*, 535–543, doi:10.1016/j.actbio.2007.12.002.
129. Oliveira, D.; Ottria, L.; Gargari, M.; Candotto, V.; Silvestre, F.–J.; Lauritano, D. Surface Modification of Titanium Alloys for Biomedical Application: From Macro to Nano Scale. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* **2017**, *31*, 221–232.
130. Salaie, R.N.; Besinis, A.; Le, H.; Tredwin, C.; Handy, R.D. The Biocompatibility of Silver and Nanohydroxyapatite Coatings on Titanium Dental Implants with Human Primary Osteoblast Cells. *Materials Science and Engineering: C* **2020**, *107*, 110210, doi:10.1016/j.msec.2019.110210.
131. Yildiz, H.; Sen, E.; Dalcik, H.; Meseli, S.E. Evaluation of Cell Morphology and Adhesion Capacity of Human Gingival Fibroblasts on Titanium Discs with Different Roughened Surfaces: An in Vitro Scanning Electron Microscope Analysis and Cell Culture Study. *Folia Morphol* **2023**, *82*, 63–71, doi:10.5603/FM.a2022.0072.
132. Cai, S.; Wu, C.; Yang, W.; Liang, W.; Yu, H.; Liu, L. Recent Advance in Surface Modification for Regulating Cell Adhesion and Behaviors. *Nanotechnology Reviews* **2020**, *9*, 971–989, doi:10.1515/ntrev-2020-0076.
133. Variola, F.; B. Brunski, J.; Orsini, G.; Oliveira, P.T. de; Wazen, R.; Nanci, A. Nanoscale Surface Modifications of Medically Relevant Metals: State-of-the Art and Perspectives. *Nanoscale* **2011**, *3*, 335–353, doi:10.1039/C0NR00485E.

134. Demirci, S.; Dikici, T.; Güllüoğlu, A.N. Micro/Nanoscale Surface Modification of Ti6Al4V Alloy for Implant Applications. *Journal of Materials Engineering and Performance* **2022**, *31*, 1503–1511, doi:10.1007/s11665-021-06232-y.
135. Ehlert, M.; Radtke, A.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Bartmański, M.; Piszczek, P. In Vitro Studies on Nanoporous, Nanotubular and Nanosponge-Like Titania Coatings, with the Use of Adipose-Derived Stem Cells. *Materials* **2020**, *13*, E1574, doi:10.3390/ma13071574.
136. Macak, J.M.; Tsuchiya, H.; Ghicov, A.; Yasuda, K.; Hahn, R.; Bauer, S.; Schmuki, P. TiO₂ Nanotubes: Self-Organized Electrochemical Formation, Properties and Applications. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **2007**, *11*, 3–18, doi:10.1016/j.cossms.2007.08.004.
137. Ghicov, A.; Schmuki, P. Self-Ordering Electrochemistry: A Review on Growth and Functionality of TiO₂ nanotubes and Other Self-Aligned MO_x Structures. *Chem. Commun.* **2009**, 2791–2808, doi:10.1039/B822726H.
138. Gao, A.; Hang, R.; Bai, L.; Tang, B.; Chu, P.K. Electrochemical Surface Engineering of Titanium-Based Alloys for Biomedical Application. *Electrochimica Acta* **2018**, *271*, 699–718, doi:10.1016/j.electacta.2018.03.180.
139. Indira, K.; Mudali, U.K.; Nishimura, T.; Rajendran, N. A Review on TiO₂ Nanotubes: Influence of Anodization Parameters, Formation Mechanism, Properties, Corrosion Behavior, and Biomedical Applications. *J Bio Tribo Corros* **2015**, *1*, 28, doi:10.1007/s40735-015-0024-x.
140. Zhang, Z.; Hossain, Md.F.; Takahashi, T. Photoelectrochemical Water Splitting on Highly Smooth and Ordered TiO₂ Nanotube Arrays for Hydrogen Generation. *International Journal of Hydrogen Energy* **2010**, *35*, 8528–8535, doi:10.1016/j.ijhydene.2010.03.032.
141. Mor, G.K.; Varghese, O.K.; Paulose, M.; Shankar, K.; Grimes, C.A. A Review on Highly Ordered, Vertically Oriented TiO₂ Nanotube Arrays: Fabrication, Material Properties, and Solar Energy Applications. *Solar Energy Materials and Solar Cells* **2006**, *90*, 2011–2075, doi:10.1016/j.solmat.2006.04.007.
142. Munirathinam, B.; Pydimukkala, H.; Ramaswamy, N.; Neelakantan, L. Influence of Crystallite Size and Surface Morphology on Electrochemical Properties of Annealed TiO₂ Nanotubes. *Applied Surface Science* **2015**, *355*, 1245–1253, doi:10.1016/j.apsusc.2015.08.017.
143. Ainouche, L.; Hamadou, L.; Kadri, A.; Benbrahim, N.; Bradai, D. Interfacial Barrier Layer Properties of Three Generations of TiO₂ Nanotube Arrays. *Electrochimica Acta* **2014**, *133*, 597–609, doi:10.1016/j.electacta.2014.04.086.
144. Tan, A.W.; Pingguan-Murphy, B.; Ahmad, R.; Akbar, S.A. Review of Titania Nanotubes: Fabrication and Cellular Response. *Ceramics International* **2012**, *38*, 4421–4435, doi:10.1016/j.ceramint.2012.03.002.
145. Piszczek, P.; Radtke, M.; Ehlert, M.; Jędrzejewski, T.; Sznarkowska, A.; Sadowska, B.; Bartmański, M.; Erdoğan, Y.K.; Ercan, B.; Jędrzejczyk, W. Comprehensive Evaluation of the Biological Properties of Surface-Modified Titanium Alloy Implants. *Journal of Clinical Medicine* **2020**, *9*, 342, doi:10.3390/jcm9020342.
146. David, T.M.; Dev, P.R.; Wilson, P.; Sagayaraj, P.; Mathews, T. A Critical Review on the Variations in Anodization Parameters toward Microstructural Formation of TiO₂ Nanotubes. *Electrochemical Science Advances* **2022**, *2*, e202100083, doi:10.1002/elsa.202100083.

147. Fahim, N.F.; Sekino, T. A Novel Method for Synthesis of Titania Nanotube Powders Using Rapid Breakdown Anodization. *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 1967–1979, doi:10.1021/cm900410x.
148. Ali, S.; Granbohm, H.; Lahtinen, J.; Hannula, S.–P. Titania Nanotubes Prepared by Rapid Breakdown Anodization for Photocatalytic Decolorization of Organic Dyes under UV and Natural Solar Light. *Nanoscale Research Letters* **2018**, *13*, 179, doi:10.1186/s11671–018–2591–5.
149. Regonini, D.; Bowen, C.R.; Jaroenworoluck, A.; Stevens, R. A Review of Growth Mechanism, Structure and Crystallinity of Anodized TiO₂ Nanotubes. *Materials Science and Engineering: R: Reports* **2013**, *74*, 377–406, doi:10.1016/j.mser.2013.10.001.
150. Saghir, M.–A.; Asatourian, A.; Garcia–Godoy, F.; Sheibani, N. The Role of Angiogenesis in Implant Dentistry Part I: Review of Titanium Alloys, Surface Characteristics and Treatments. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **2016**, *21*, e514–e525, doi:10.4317/medoral.21199.
151. Kapoor, N.; Nagpal, A.; Verma, R.; Thakur, J.; Singla, A. A Review on Surface Treatment of Titanium Implant. *IP Annals of Prosthodontics and Restorative Dentistry* **2020**, *6*, 194–200, doi:10.18231/j.aprd.2020.041.
152. Ehlert, M.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Bartmański, M.; Radtke, A. Titania Nanofiber Scaffolds with Enhanced Biointegration Activity—Preliminary In Vitro Studies. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 5642, doi:10.3390/ijms20225642.
153. Shi, G.; Ren, L.; Wang, L.; Lin, H.; Wang, S.; Tong, Y. H₂O₂/HCl and Heat–Treated Ti–6Al–4V Stimulates Pre–Osteoblast Proliferation and Differentiation. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* **2009**, *108*, 368–375, doi:10.1016/j.tripleo.2009.05.033.
154. Wang, X.–X.; Hayakawa, S.; Tsuru, K.; Osaka, A. Bioactive Titania Gel Layers Formed by Chemical Treatment of Ti Substrate with a H₂O₂/HCl Solution. *Biomaterials* **2002**, *23*, 1353–1357, doi:10.1016/S0142–9612(01)00254–X.
155. Liu, X.; Chu, P.K.; Ding, C. Surface Modification of Titanium, Titanium Alloys, and Related Materials for Biomedical Applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports* **2004**, *47*, 49–121, doi:10.1016/j.mser.2004.11.001.
156. Biswas, A.; Srikant, P.V.S.; Manna, I.; Chatterjee, U.K.; Dutta Majumdar, J. Chemical Oxidation of Ti–6Al–4V for Improved Wear and Corrosion Resistance. *Surface Engineering* **2008**, *24*, 442–446, doi:10.1179/174329408X286097.
157. Tavares, M.G.; Tambasco de Oliveira, P.; Nanci, A.; Hawthorne, A.C.; Rosa, A.L.; Xavier, S.P. Treatment of a Commercial, Machined Surface Titanium Implant with H₂SO₄/H₂O₂ Enhances Contact Osteogenesis. *Clinical Oral Implants Research* **2007**, *18*, 452–458, doi:10.1111/j.1600–0501.2007.01344.x.
158. Zhang, F.; Zhang, C.–F.; Yin, M.; Ren, L.–F.; Lin, H.; Shi, G. Effect of Heat Treatment on H₂O₂/HCl Etched Pure Titanium Dental Implant: An in Vitro Study. *Med Sci Monit* **2012**, *18*, BR265–BR272, doi:10.12659/MSM.883204.
159. Pan, J.; Liao, H.; Leygraf, C.; Thierry, D.; Li, J. Variation of Oxide Films on Titanium Induced by Osteoblast–like Cell Culture and the Influence of an H₂O₂ Pretreatment. *Journal of Biomedical Materials Research* **1998**, *40*, 244–256, doi:10.1002/(SICI)1097–4636(199805)40:2<244::AID–JBM9>3.0.CO;2–L.

160. Ban, S. Effect of Alkaline Treatment of Pure Titanium and Its Alloys on the Bonding Strength of Dental Veneering Resins. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2003**, 66A, 138–145, doi:10.1002/jbm.a.10566.
161. Kim, H.M.; Miyaji, F.; Kokubo, T.; Nakamura, T. Effect of Heat Treatment on Apatite-Forming Ability of Ti Metal Induced by Alkali Treatment. *J Mater Sci Mater Med*. **1997**, 8, 341–347, doi: 10.1023/a:1018524731409.
162. Nishiguchi, S.; Nakamura, T.; Kobayashi, M.; Kim, H.M.; Miyaji, F.; Kokubo, T. The Effect of Heat Treatment on Bone-Bonding Ability of Alkali-Treated Titanium. *Biomaterials* **1999**, 20, 491–500, doi:10.1016/s0142-9612(98)90203-4.
163. Wei, M.; Kim, H.-M.; Kokubo, T.; Evans, J.H. Optimising the Bioactivity of Alkaline-Treated Titanium Alloy. *Materials Science and Engineering: C* **2002**, 20, 125–134, doi:10.1016/S0928-4931(02)00022-X.
164. Kim, H.-M.; Miyaji, F.; Kokubo, T.; Nakamura, T. Preparation of Bioactive Ti and Its Alloys via Simple Chemical Surface Treatment. *Journal of Biomedical Materials Research* **1996**, 32, 409–417, doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199611)32:3<409::AID-JBM14>3.0.CO;2-B.
165. W. Nicholson, J. Titanium Alloys for Dental Implants: A Review. *Prosthesis* **2020**, 2, 100–116, doi:10.3390/prosthesis2020011.
166. Dorozhkin, S.V. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. *Materials* **2009**, 2, 399–498, doi:10.3390/ma2020399.
167. Anselme, K.; Ponche, A.; Bigerelle, M. Relative Influence of Surface Topography and Surface Chemistry on Cell Response to Bone Implant Materials. Part 2: Biological Aspects. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine* **2010**, 224, 1487–1507, doi:10.1243/09544119JEIM901.
168. Albrektsson, T. Hard Tissue Implant Interface. *Australian Dental Journal* **2008**, 53, S34–S38, doi:10.1111/j.1834-7819.2008.00039.x.
169. Ducheyne, P.; Qiu, Q. Bioactive Ceramics: The Effect of Surface Reactivity on Bone Formation and Bone Cell Function. *Biomaterials* **1999**, 20, 2287–2303, doi:10.1016/S0142-9612(99)00181-7.
170. Mondal, S.; Dorozhkin, S.; Pal, U. Recent Progress on Fabrication and Drug Delivery Applications of Nanostructured Hydroxyapatite. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2017**, 10, e1504, doi:10.1002/wnan.1504.
171. Pai, S.; M Kini, S.; Selvaraj, R.; Pugazhendhi, A. A Review on the Synthesis of Hydroxyapatite, Its Composites and Adsorptive Removal of Pollutants from Wastewater. *Journal of Water Process Engineering* **2020**, 38, 101574, doi:10.1016/j.jwpe.2020.101574.
172. LeGeros, R.Z. Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 4742–4753, doi:10.1021/cr800427g.
173. Zareidoost, A.; Yousefpour, M.; Ghaseme, B.; Amanzadeh, A. The Relationship of Surface Roughness and Cell Response of Chemical Surface Modification of Titanium. *J Mater Sci: Mater Med* **2012**, 23, 1479–1488, doi:10.1007/s10856-012-4611-9.
174. Ślósarczyk, A. *Bioceramika Hydroksyapatytowa*; Polskie Towarzystwo Ceramiczne: Kraków, Poland, 1997; ISBN 978-83-7108-015-9.

175. Szcześ, A.; Hołysz, L.; Chibowski, E. Synthesis of Hydroxyapatite for Biomedical Applications. *Advances in Colloid and Interface Science* **2017**, *249*, 321–330, doi:10.1016/j.cis.2017.04.007.
176. Ma, G.; Liu, X.Y. Hydroxyapatite: Hexagonal or Monoclinic? *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9*, 7, 2991–2994, doi:10.1021/cg900156w
177. Thian, E.; Choong, C. Magnetron Sputtering Deposition of Chemically Modified Hydroxyapatite. In *Hydroxyapatite Coatings for Biomedical Applications*; Zhang, S., Ed.; CRC Press, 2013; pp. 1–30 ISBN 978-0-429-11138-9.
178. Gasser, B. About Composite Materials and Their Use in Bone Surgery. *Injury* **2000**, *31*, D48–D53, doi:10.1016/S0020-1383(00)80023-6.
179. Ghiasi, B.; Sefidbakht, Y.; Mozaffari-Jovin, S.; Gharehcheloo, B.; Mehrarya, M.; Khodadadi, A.; Rezaei, M.; Ranaei Siadat, S.O.; Uskoković, V. Hydroxyapatite as a Biomaterial – a Gift That Keeps on Giving. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2020**, *46*, 1035–1062, doi:10.1080/03639045.2020.1776321.
180. Mohseni, E.; Zalnezhad, E.; Bushroa, A.R. Comparative Investigation on the Adhesion of Hydroxyapatite Coating on Ti-6Al-4V Implant: A Review Paper. *International Journal of Adhesion and Adhesives* **2014**, *48*, 238–257, doi:10.1016/j.ijadhadh.2013.09.030.
181. Stoch, A.; Długoń, E.; Jastrzębski, W.; Trybalska, B.; Wierzchoń, T. Powłoki hydroksyapatytu na azotowanym stopie tytanu Ti6Al4V. *Inżynieria Biomateriałów* **2004**, *7*, 164–167.
182. Kuroda, K.; Okido, M. Hydroxyapatite Coating of Titanium Implants Using Hydroprocessing and Evaluation of Their Osteoconductivity. *Bioinorganic Chemistry and Applications* **2012**, *2012*, e730693, doi:10.1155/2012/730693.
183. Yang, Y.; Kim, K.-H.; Ong, J.L. A Review on Calcium Phosphate Coatings Produced Using a Sputtering Process—an Alternative to Plasma Spraying. *Biomaterials* **2005**, *26*, 327–337, doi:10.1016/j.biomaterials.2004.02.029.
184. Surmenev, R.A. A Review of Plasma-Assisted Methods for Calcium Phosphate-Based Coatings Fabrication. *Surface and Coatings Technology* **2012**, *206*, 2035–2056, doi:10.1016/j.surfcoat.2011.11.002.
185. Drevet, R.; Benhayoune, H. Electrodeposition of Calcium Phosphate Coatings on Metallic Substrates for Bone Implant Applications: A Review. *Coatings* **2022**, *12*, 539, doi:10.3390/coatings12040539.
186. Sun, L.; Berndt, C.; Gross, K.; Kucuk, A. Material Fundamentals and Clinical Performance of Plasma-Sprayed Hydroxyapatite Coatings: A Review. *Journal of Biomedical Materials Research* **2001**, *58*, 570–592, doi:10.1002/jbm.1056.
187. Ehlert, M.; Radtke, A.; Topolski, A.; Śmigiel, J.; Piszczek, P. The Photocatalytic Activity of Titania Coatings Produced by Electrochemical and Chemical Oxidation of Ti6Al4V Substrate, Estimated According to ISO 10678:2010. *Materials* **2020**, *13*, 2649, doi:10.3390/ma13112649.
188. ISO 10993-5:2009(En), Biological Evaluation of Medical Devices — Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. Available online: <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:10993:-5:ed-3:v1:en> (accessed on 20 November 2022).
189. Radtke, A.; Ehlert, M.; Jędrzejewski, T.; Sadowska, B.; Więckowska-Szakiel, M.; Holopainen, J.; Ritala, M.; Leskelä, M.; Bartmański, M.; Szkodo, M.; et al. Titania Nanotubes/Hydroxyapatite Nanocomposites Produced with the Use of the Atomic Layer Deposition Technique: Estimation of Bioactivity and Nanomechanical Properties. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 123, doi:10.3390/nano9010123.

190. Ahmadi, S.; Mohammadi, I.; Sadrnezhad, S.K. Hydroxyapatite Based and Anodic Titania Nanotube Biocomposite Coatings: Fabrication, Characterization and Electrochemical Behavior. *Surface and Coatings Technology* **2016**, *287*, 67–75, doi:10.1016/j.surfcoat.2015.12.062.
191. Morks, M.F.; Kobayashi, A.; Fahim, N.F. Abrasive Wear Behavior of Sprayed Hydroxyapatite Coatings by Gas Tunnel Type Plasma Spraying. *Wear* **2007**, *262*, 204–209, doi:10.1016/j.wear.2006.05.013.
192. Metikoš–Huković, M.; Tkalčec, E.; Kwokal, A.; Piljac, J. An in Vitro Study of Ti and Ti–Alloys Coated with Sol–Gel Derived Hydroxyapatite Coatings. *Surface and Coatings Technology* **2003**, *165*, 40–50, doi:10.1016/S0257–8972(02)00732–6.

8. Dorobek naukowy kandydata na doktora

Edukacja:

- * **10/2018–03/2023** – Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Chemii, Katedra Chemii Nieorganicznej i Koordynacyjnej, Nano–implant Sp. z o.o., Studia doktoranckie, wdrożeniowe: Chemia
- * **10/2016–rezygnacja w 2018** – Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Chemii, Katedra Chemii Nieorganicznej i Koordynacyjnej, Studia doktoranckie: Chemia
- * **10/2014–06/2016** – Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Chemii, Katedra Chemii Nieorganicznej i Koordynacyjnej, Magister chemii
- * **10/2013–07/2015** – Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Zakład Mikrobiologii, Magister biologii
- * **10/2011–09/2014** – Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Chemii, Katedra Chemii Nieorganicznej i Koordynacyjnej, Licencjat chemii
- * **10/2010–07/2013** – Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Licencjat biologii z geografią

Doświadczenie zawodowe:

- * **09/2017–obecnie** – Nano–implant Sp. z o.o. w Toruniu, specjalista – chemik, Polska
- * **27.09.2018** – Awans zawodowy na stopień nauczyciela kontraktowego.
- * **10/2016–08/2018** – Franciszkańskie Liceum Ogólnokształcące w Toruniu, nauczyciel chemii, biologii, geografii, Polska
- * **09/2016–06/2018** – Technikum „TEB Edukacja Sp. z o.o.” w Toruniu, nauczyciel chemii, Polska

Praktyki naukowe:

- * **02/2017–04/2020** – Wolontariusz w projekcie „Kubus – Komercjalizacja Uniwersyteckich Badań i Usług”, realizowanego w ramach programu „Inkubator Innowacyjności+”. Akademicki Inkubator Przedsiębiorczości UMK w Toruniu, Polska
- * **04/2016–05/2016** – Fundacja Amicus Universitatis Nicolai Copernici w Toruniu, prowadzenie zajęć o profilu biotechnologicznym dla Uniwersytetu Młodych, Polska
- * **09/2015–09/2015** – Powiatowa Stacja Sanitarno – Epidemiologiczna, Oddział Laboratoryjny w Toruniu, praktyka na stanowisku: laborant biochemiczny, Polska
- * **07/2014–08/2014** – Zakład Produkcyjny MAPEI Polska Sp. z o.o., Sadłogoszcz, praktyka na stanowisku: laborant chemiczny, Polska
- * **09/2012–10/2012** – Zespół Szkół Integracyjnych im. Powstańców Wielkopolskich w Inowrocławiu, praktyka na stanowisku: nauczyciel biologii i geografii, Polska
- * **07/2012–08/2012** – Zakład Mikrobiologii Lekarskiej w Szpitalu Powiatowym im. L. Błażka w Inowrocławiu, praktyka na stanowisku: mikrobiolog, Polska

Szkolenia:

- * **21.09.2020** – Przegląd aktualnych wymagań prawnych i normatywnych dotyczących wyrobów medycznych – różnice między wymaganiami MDD 93/42/EEC a MDR 2017/745, Organizator Quality–JF, Toruń, Polska

- * **09/2017** – Training School COST Action BIONECA CA16122 1st Course „From biomaterials and tissue engineering characterization, modeling and visualization of stem cells and applications to regenerative cardiology and neurology”, Portonovo, Włochy
- * **04/2017** – Kurs na auditora wewnętrznego systemu zarządzania w laboratoriach badawczych wg normy PN–EN ISO/IEC 17025:2005, organizator isoQRS, Toruń, Polska
- * **12/2014–12/2015** – Niepubliczna Placówka Doskonalenia Nauczycieli „Vademecum.pl”, Centrum Szkolenia Kadr w Bydgoszczy, kurs kwalifikacyjny, pedagogiczny dla nauczycieli czynnych zawodowo, Polska

Publikacje w czasopismach z listy filadelfijskiej:

1. **Ehlert***, M.; Radtke*, A.; Forbot, N.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Golińska, P.; Trykowski, G.; Piszczek, P. TiO₂/HA and Titanate/HA Double Layer Coatings on Ti6Al4V Surface and Their Influence on In Vitro Cell Growth and Osteogenic Potential. *Journal of Functional Biomaterials* **2022**, *13*, 271, doi.org/10.3390/jfb13040271. IF₂₀₂₂= 4.901
2. **Ehlert***, M.; Radtke, A.; Bartmański, M.; Piszczek*, P. Evaluation of the Cathodic Electrodeposition Effectiveness of the Hydroxyapatite Layer Used in Surface Modification of Ti6Al4V–Based Biomaterials. *Materials* **2022**, *15*, 6925, doi:10.3390/ma15196925. IF₂₀₂₂= 3.748
3. **Ehlert, M.**; Radtke, A.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Piszczek, P. Assessment of Titanate Nanolayers in Terms of Their Physicochemical and Biological Properties. *Materials* **2021**, *14*, 806, doi:10.3390/ma14040806. IF₂₀₂₁= 3.748
4. **Ehlert, M.**; Radtke, A.; Topolski, A.; Śmigiel, J.; Piszczek, P. The Photocatalytic Activity of Titania Coatings Produced by Electrochemical and Chemical Oxidation of Ti6Al4V Substrate, Estimated According to ISO 10678:2010. *Materials* **2020**, *13*, 2649, doi:10.3390/ma13112649. IF₂₀₂₀= 3.623
5. **Ehlert, M.**; Radtke, A.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Bartmański, M.; Piszczek, P. In Vitro Studies on Nanoporous, Nanotubular and Nanosponge–Like Titania Coatings, with the Use of Adipose–Derived Stem Cells. *Materials* **2020**, *13*, E1574, doi:10.3390/ma13071574. IF₂₀₂₀= 3.623
6. Piszczek, P.; Radtke, A.; **Ehlert, M.**; Jędrzejewski, T.; Sznarkowska, A.; Sadowska, B.; Bartmański, M.; Erdoğan, Y.K.; Ercan, B.; Jędrzejczyk, W. Comprehensive Evaluation of the Biological Properties of Surface–Modified Titanium Alloy Implants. *Journal of Clinical Medicine* **2020**, *9*, 342, doi:10.3390/jcm9020342. IF₂₀₂₀= 4.242
7. **Ehlert, M.**; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Bartmański, M.; Radtke, A.; Titania Nanofiber Scaffolds with Enhanced Biointegration Activity—Preliminary In Vitro Studies. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 5642, doi: 10.3390/ijms20225642. IF₂₀₁₉= 4.556
8. Radtke, A.; Grodzicka, M.; **Ehlert, M.**; Jędrzejewski T.; Wypij, M.; Golińska P.; „To Be Microbiocidal and Not to Be Cytotoxic at the Same Time...”—Silver Nanoparticles and Their Main Role on the Surface of Titanium Alloy Implants. *Journal of Clinical Medicine* **2019**, *8*, 334, doi:10.3390/jcm8030334. IF₂₀₁₉= 3.303
9. Radtke, A.; **Ehlert, M.**; Jędrzejewski, T.; Bartmański, M.; The Morphology, Structure, Mechanical Properties and Biocompatibility of Nanotubular Titania Coatings Before and After Autoclaving Process. *Journal of Clinical Medicine* **2019**, *8*, 272, doi:10.3390/jcm8020272. IF₂₀₁₉= 3.303
10. Radtke, A.; **Ehlert, M.**; Jędrzejewski, T.; Sadowska, B.; Więckowska–Szakiel, M.; Holopainen, J.; Ritala, M.; Leskelä, M.; Bartmański, M.; Szkodo, M.; Piszczek, P.; Titania Nanotubes/Hydroxyapatite

Nanocomposites Produced with the Use of the Atomic Layer Deposition Technique: Estimation of Bioactivity and Nanomechanical Properties. *Nanomaterials* **2019**, 9, 123; doi:10.3390/nano9010123. IF₂₀₁₉= 4.324

11. Radtke, A.; Grodzicka, M.; **Ehlert, M.**; Muzioł, T.; Szkodo, M.; Bartmański, M.; Piszczek, P.; Studies on Silver Ions Releasing Processes and Mechanical Properties of Surface-Modified Titanium Alloy Implants. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, 19, 3962; doi:10.3390/ijms19123962. IF₂₀₁₉= 4.183

Pozostałe publikacje:

1. Piszczek, P.; **Ehlert, M.**; Radtke, A.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Bartmański, M.; Titania coatings produced by electrochemical and chemical oxidation of titanium alloys surface and their application in construction of implants. *Engineering of Biomaterials* **2020**, 158, 23.
2. **Ehlert, M.**; Radtke, A.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Piszczek, P. Comprehensive evaluation of the biological properties of surface modified titanium alloy. *Engineering of Biomaterials* **2020**, 158, 24.

Zgłoszenia patentowe:

- * **Ehlert, M.**; Piszczek, P.; Radtke, A.; pt. „Sposób wytwarzania powłoki nanokompozytowej na powierzchni stopu tytanowego Ti6Al4V i powłoka wytworzona tym sposobem”. 2020-09-21; P.435368; [WIPO ST 10/C PL435368]

Udział w konferencjach naukowych:

łączna liczba prezentacji = 31, w tym: komunikaty ustne = 13, postery = 8, inne = 10.

Prezentacje ustne

- * **Kołodziejczak M.**, Golińska P., Dahm H., **14.11.2015r.**, Polska, UAM Poznań, Poznańskie Sympozjum Młodych Naukowców. Nowe Oblicze Nauk Przyrodniczych; „Liczebność promieniowców i bakterii właściwych w glebach pustyni Atakama”, materiały zjazdowe s.66.
- * **Kołodziejczak M.**, Piszczek P., Radtke A., **15-17.04.2016r.**, Polska, UMK Toruń, VI Kopernikańskie Sympozjum Studentów Nauk Przyrodniczych; „Warstwy przeciwdrobnoustrojowe dla potrzeb biomedycznych”, materiały zjazdowe s.56.
- * **Kołodziejczak M.**, Piszczek P., Radtke A., **19.05.2016r.**, Polska, Politechnika Śląska, Katowice, Międzynarodowa Studencka Sesja Naukowa pt. Materiały i Technologie XXI wieku; „Nanowarstwy ditlenku tytanu jako materiał biomedyczny”, materiały zjazdowe s.56-57.
- * **Kołodziejczak M.**, Piszczek P., Radtke A., **5.11.2016r.**, Polska, UAM Poznań, III Poznańskie Sympozjum Młodych Naukowców. Nowe Oblicze Nauk Przyrodniczych; „Powłoki biomedyczne na bazie ditlenku tytanu z udziałem nanocząstek biosrebra”, materiały zjazdowe s.44.
- * **Kołodziejczak M.**, Piszczek P., Radtke A., Jędrzejewski T., Holopainen J., **26.05.2017r.**, Polska, Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań, Nowe Horyzonty w Naukach Przyrodniczych, BIOT; „Wpływ dodatku hydroksyapatytu na biokompatybilność i właściwości przeciwbakteryjne powłok biomedycznych na bazie TiO₂”, materiały zjazdowe s.10.
- * **Kołodziejczak M.**, Piszczek P., Radtke A., Jędrzejewski T., Holopainen J., **19-20.06.2017r.**, Polska, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Doktoranckie Sympozjum Nanotechnologii NanoMat; „Nanorurki ditlenku tytanu z dodatkiem hydroksyapatytu jako perspektywiczne biomateriały na implanty”, materiały zjazdowe s.34.

- * **Ehlert M.**, Radtke A., Piszczek P., Holopainen J., Jędrzejewski T., Bartmański M., **16.05.2019r.**, Polska, Politechnika Śląska, Katowice, Międzynarodowa Studencka Sesja Naukowa pt. Materiały i Technologie XXI wieku; „TiO₂ nanotubes as a scaffolding for hydroxyapatite nanocrystals – research on their potential application in implantology”, materiały zjazdowe s.14–15.
- * **Ehlert M.**, Radtke A., Piszczek P., Holopainen J., Jędrzejewski T., Bartmański M., **14.06.2019r.**, Polska, Uniwersytet Łódzki, Łódź, III Doktoranckie Sympozjum Nanotechnologii NanoMat; „Aktywność biologiczna i właściwości mechaniczne nanokryształicznej powłoki hydroksyapatytowej otrzymanej techniką osadzania warstw atomowych, na modyfikowanym podłożu tytanowym”, materiały zjazdowe s. 38.
- * **Ehlert M.**, Radtke A., Piszczek P., Holopainen J., Jędrzejewski T., Bartmański M., **28–29.06.2019r.**, Polska, Politechnika Gdańska, Gdańsk, II Ogólnopolska Konferencja Naukowa IMPLANTY2019; „Wytwarzanie nanostrukturalnego hydroksyapatytu metodą ALD na bioaktywnych rusztowaniach TiO₂”, materiały zjazdowe s. 10.
- * **Ehlert M.**, Radtke A., Roszek K., Jędrzejewski T., Piszczek, P., **18–20.09.2020r.**, Polska, Toruń, Kopernikańskie Sympozjum Studentów Nauk Przyrodniczych; E–komunikat „Rusztowania z nanowłókien ditlenku tytanu o zwiększonej aktywności biointegracyjnej”, materiały zjazdowe s.18.
- * **Ehlert M.**, Radtke A., Roszek K., Jędrzejewski T., Piszczek, P., **5–6.12.2020r.**, Polska, Wrocław, XVI Wrocławskie Studenckie Sympozjum Chemiczne; E–komunikat „Ocena aktywności biologicznej rusztowań z nanowłókien ditlenku tytanu”, materiały zjazdowe s.16.
- * **Ehlert M.**, Radtke A., Roszek K., Jędrzejewski T., Piszczek, P., **23–24.04.2022r.**, Gdańsk, Polska, IV Pomorskie Studenckie Sympozjum Chemiczne; E–Komunikat „Synteza, właściwości fizykochemiczne i biologiczne nanowarstw tytanianowych.”, materiały zjazdowe s. 29.
- * **Ehlert M.**, Radtke A., Roszek K., Jędrzejewski T., Bartmański M, Piszczek, P., **30.11.2022r.**, Toruń, Polska, III Sympozjum Biomateriały w medycynie i kosmetologii; „Ocena właściwości fizykochemicznych, mechanicznych oraz biologicznych nanowarstw tytanianowych”, materiały zjazdowe s. 10.

Poster

- * **Kołodziejczak M.**, Piszczek P., Radtke A., **6.05.2016r.**, Polska, Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań, Nowe Horyzonty w Naukach Przyrodniczych, BIOT 2016; „Właściwości przeciwdrobnoustrojowe powłok bazujących na ditlenku tytanu”, materiały zjazdowe s.80–81.
- * **Kołodziejczak M.**, Piszczek P., Radtke A., Jędrzejewski T., Holopainen J., **1–2.04.2017r.**, Polska, UMK Toruń, III Toruńskie Sympozjum Doktorantów Nauk Przyrodniczych; „Synteza, charakterystyka strukturalna oraz analiza bioaktywności nanokompozytu TiO₂/HA”, materiały zjazdowe s.140.
- * **Kołodziejczak M.**, Piszczek P., Radtke A., Jędrzejewski T., Holopainen J. **11–12.05.2017r.**, Polska, Uniwersytet Łódzki, Łódź III Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen 2017; „TiO₂/HA jako materiał kompozytowy dla potrzeb biomedycznych”, materiały zjazdowe s.105.
- * **Ehlert M.**, Piszczek P., Radtke A., Jędrzejewski T., Sadowska B., Holopainen J., **6–8.06.2018r.**, Polska, UMK, Toruń, III Konferencja NanoBioMateriały – teoria i praktyka; „Nanokompozyt TNT/HA wytwarzany metodą ALD jako przyszłościowy materiał stosowany w implantologii”, materiały zjazdowe s.76.
- * **Ehlert M.**, Radtke A., Piszczek P., Jędrzejewski T., Bartmański M., **6–7.06.2019r.**, Polska, UMK, Toruń, IV Interdyscyplinarna Konferencja NanoBioMateriały – teoria i praktyka; „Morfologia, struktura, właściwości

mechaniczne oraz biokompatybilność nanopowłok TiO₂ przed i po procesie autoklawowania”, materiały zjazdowe s.88.

- * **Ehlert M.**, Radtke A., Jędrzejewski T., Roszek K., Piszczek P., **18–19.05.2020r.**, 18th International Conference and Exhibition on Materials Science and Chemistry; E–poster „Nanoporous, nanotubular and nanosponge–like titania coatings enhanced with adipose–derived stem cells – Preliminary *in vitro* studies”. Grant przyznany na wyjazd konferencyjny – Grants4NCUstudents, IDUB UMK.
- * **Ehlert M.**, Radtke A., Roszek K., Jędrzejewski T., Piszczek P., **07.09.2020r.**, Polska, Kopernikańskie E–Seminarium Doktoranckie; E–poster „Ocena aktywności biointegracyjnej implantów ze stopu tytanu o zmodyfikowanej powierzchni”. Materiały Zjazdowe s.78.
- * **Ehlert M.**, Radtke A., Roszek K., Jędrzejewski T., Piszczek P., **18.06.2021r.**, III Ogólnopolska Konferencja Implanty 2021; E–poster „Ocena nanowarstw tytanianowych w odniesieniu do ich właściwości fizykochemicznych i biologicznych”, materiały zjazdowe s.59.

Współautorstwo

- * Radtke A., Piszczek P., **Kołodziejczak M.**, Jędrzejewski T., Holopainen J., Ritala M., Leskela M., **11–14.07.2017r.**, Szwecja, Linköping, Euro CVD – Baltic ALD; „Titania nanotubes enriched with nanocrystalline hydroxyapatite as composite material of potential medical applications”, materiały zjazdowe s. 131–132.
- * Radtke A., Piszczek P., **Kołodziejczak M.**, Topolski A., Jędrzejewski T., Holopainen J., **29–31.05.2017r.**, Polska, UMK, Toruń, II Konferencja NanoBioMateriały – teoria i praktyka; „TiO₂/HA jako nanobiomateriał dla potrzeb medycyny regeneracyjnej”, materiały zjazdowe s.22.
- * Radtke A., **Ehlert M.**, Grodzicka M., Grodzicki E., Piszczek P., Jędrzejewski T., Sadowska B., Bartmański M., **6–7.06.2019r.**, Polska, UMK, Toruń, IV Interdyscyplinarna Konferencja NanoBioMateriały – teoria i praktyka; „Ditlenek tytanu jako biomateriał o szerokim spektrum zastosowań”, materiały zjazdowe s.16.
- * Grodzicka M., Radtke A., **Ehlert M.**, Golińska P., Jędrzejewski T., Piszczek P., **6–7.06.2019r.**, Polska, UMK, Toruń, IV Interdyscyplinarna Konferencja NanoBioMateriały – teoria i praktyka; „Być mikrobiobójcze i jednocześnie nie być cytotoksyczne; oto jest zadanie: nanocząstki srebra w roli głównej na powierzchni implantów tytanowych”, materiały zjazdowe s.89.
- * Grodzicka M., Radtke A., **Ehlert M.**, Golińska P., Jędrzejewski T., Piszczek P., **14.06.2019r.**, Polska, Uniwersytet Łódzki, Łódź, III Doktoranckie Sympozjum Nanotechnologii NanoMat; „Wysoka mikrobiobójczość *versus* optymalna biogodność – nanocząstki srebra na implantach ze stopu Ti6Al4V”, materiały zjazdowe s.44.
- * Piszczek P., Radtke A., **Ehlert M.**, Grodzicka M., Jędrzejczyk W., **28–29.06.2019r.**, Polska, Politechnika Gdańska, Gdańsk, II Ogólnopolska Konferencja Naukowa IMPLANTY 2019; „Chemiczne aspekty wytwarzania implantów nowej generacji”, materiały zjazdowe s.30.
- * Radtke A., **Ehlert M.**, Piszczek P., Roszek K., Jędrzejewski T., **10–13.10.2019r.**, Polska, Rytro, 28th Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine; „Titania nanotubes as scaffolds of optimal nanopography, for adipose derived stem cells”, materiały zjazdowe s.49.
- * Piszczek P., **Ehlert M.**, Radtke A., Jędrzejewski T., Roszek K., Bartmański M., **15–18.10.2020r.**, Polska, 29th Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine; E–komunikat „Titania coatings produced by

electrochemical and chemical oxidation of titanium alloys surface and their application in construction of implants”, Engineering of Biomaterials s.23.

- * **Ehlert M.**, Radtke A., Jędrzejewski T., Roszek K., Piszczek P., **15–18.10.2020r.**, Polska, 29th Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine; E–poster „Comprehensive evaluation of the biological properties of surface modified titanium alloy”, Engineering of Biomaterials s.24.
- * Radtke A., **Ehlert M.**, Jędrzejewski T., Sadowska B., Bartmański M., Piszczek P., **6–8.10.2021r.**, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska, 3rd International Workshop on Functional Nanostructured Materials (FuNaM-3); „Anodic oxidation of titanium and titanium alloys what was done and what more can be done”, materiały zjazdowe s.28.

Udział w projektach badawczych:

- * **13.09.2017–30.06.2018** – Umowa zlecenie z firmą Nano–implant Sp. z o.o. Realizacja projektu pt. „Badania nad powłokami nanokompozytowymi oraz ich zastosowanie w konstrukcji prototypu spersonalizowanego implantu medycznego nowej generacji wytwarzanego w technologii 3D”.
- * **17.07.2019–30.11.2019** – Grant Młodych dla uczestników Studiów Doktoranckich oraz młodych pracowników Wydziału Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu. Realizacja projektu pt. „Zastosowanie nanopowłok TiO₂, jako rusztowań do hodowli ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej”.
- * **03.03.2020–30.11.2020** – Grant Młodych dla uczestników Studiów Doktoranckich oraz młodych pracowników Wydziału Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu. Realizacja projektu pt. „Powłoka na bazie hydroksyapatytu na zmodyfikowanej powierzchni stopu tytanu Ti6Al4V synteza, charakterystyka i wstępne badania *in vitro*”.
- * **24.04.2020–30.06.2021** – Grants4NCUStudents, Uczelnia Badawcza, Inicjatywa Doskonałości, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu. Realizacja projektu pt. „Titanium nanofibres/hydroxyapatite nanocomposites produced with the use of the cathodic deposition technique: morphology, structure and bioactivity”.
- * **02.06.2020–30.11.2020** – Grant Młodych dla uczestników Studiów Doktoranckich oraz młodych pracowników Wydziału Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu. Realizacja projektu pt. „Badania aktywności fotokatalitycznej warstw tytanianowych na podstawie degradacji błękitu metylenowego”.

Nagrody i wyróżnienia:

- * **2014/2015** – **Wyróżnienie** w konkursie na najlepszą pracę magisterską na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UMK w Toruniu, pt. „Pozyskiwanie promieniowców (*Actinomycetes*) i bakterii z gleb pustyni Atakama”, Polska.
- * **6.05.2016** – **Wyróżnienie** w konkursie na najlepszy poster (pt. „Właściwości przeciwdrobnoustrojowe powłok bazujących na ditlenku tytanu”), podczas konferencji Nowe Horyzonty w Naukach Przyrodniczych, BIOT 2016, Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań, Polska.
- * **19.05.2016** – **II miejsce** za wygłoszony komunikat (pt. „Nanowarstwy ditlenku tytanu, jako materiał biomedyczny”), podczas Międzynarodowej Studenckiej Sesji Naukowej pt. Materiały i Technologie XXI wieku, Politechnika Śląska, Katowice, Polska.

- * **16.05.2019** – **III miejsce** za wygłoszony komunikat (pt. „TiO₂ nanotubes as a scaffolding for hydroxyapatite nanocrystals – research on their potential application in implantology”), podczas Międzynarodowej Studenckiej Sesji Naukowej pt. Materiały i Technologie XXI wieku, Politechnika Śląska, Katowice, Polska.
- * **14.06.2019** – **Nagroda** za najlepszy komunikat (pt. „Aktywność biologiczna i właściwości mechaniczne nanokrystalicznej powłoki hydroksyapatytowej otrzymanej techniką osadzania warstw atomowych, na modyfikowanym podłożu tytanowym”), podczas III Doktoranckie Sympozjum Nanotechnologii NanoMat, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska.
- * **26.09.2019** – **Zespołowe Wyróżnienie** Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowo - badawczej w 2018r., Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Polska.
- * **24.06.2020** – **Zespołowe Wyróżnienie** Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowej w 2019r., Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Polska.

Stypendia naukowe:

- * **2018/2023** – Stypendium dla najlepszych doktorantów, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Wydział Chemii
- * **2022/2023** – Stypendium doktoranckie, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Wydział Chemii
- * **2018/2022** – Stypendium doktoranckie, wdrożeniowe, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Wydział Chemii
- * **2019/2020** – Stypendium projakościowe, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Wydział Chemii
- * **2017/2018** – Stypendium doktoranckie, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Wydział Chemii
- * **2016/2017** – Stypendium dziekańskie, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Wydział Chemii
- * **2014/2015** – Stypendium rektora dla najlepszych studentów, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
- * **2011–2013** – Stypendium rektora dla najlepszych studentów, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
- * **2014** – Stypendium stażowe, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ZUCH–UMK Wydział Chemii
- * **2011–2014** – Stypendium motywacyjne, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ZUCH–UMK Wydział Chemii

Dorobek organizacyjny:

- * **28.01.2021** – Współorganizacja II Sympozjum „Biomateriały w medycynie i kosmetologii”, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń
- * **30.01.2020** – Współorganizacja I Sympozjum „Biomateriały w medycynie i kosmetologii”, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń
- * **20.11.2019** – Udział w organizacji wydarzenia „Gospodarka 4.0 Wyzwania dla biznesu i nauki”. Regionalne Forum Innowacji Przedsiębiorczości Akademickiej, Hotel Bulwar w Toruniu
- * **12.03.2019** – Czynny udział w Drzwiach Otwartych Wydziału Chemii UMK w Toruniu

Załączniki

Artykuły

P1. *Titania Nanofiber Scaffolds with Enhanced Biointegration Activity—
Preliminary In Vitro Studies*



Article

Titania Nanofiber Scaffolds with Enhanced Biointegration Activity—Preliminary In Vitro Studies

Michalina Ehlert ^{1,2}, Katarzyna Roszek ³, Tomasz Jędrzejewski ³, Michał Bartmański ⁴
and Aleksandra Radtke ^{1,2,*}

¹ Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Gagarina 7, 87-100 Toruń, Poland; m.ehlert@doktorant.umk.pl

² Nano-Implant Ltd., Gagarina 5/102, 87-100 Toruń, Poland

³ Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Lwowska 1, 87-100 Toruń, Poland; kroszek@umk.pl (K.R.); tomaszj@umk.pl (T.J.)

⁴ Faculty of Mechanical Engineering, Gdańsk University of Technology, Gabriela Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Poland; michal.bartmanski@pg.edu.pl

* Correspondence: aradtke@umk.pl; Tel.: +48-600321294

Received: 7 October 2019; Accepted: 9 November 2019; Published: 11 November 2019

Abstract: The increasing need for novel bone replacement materials has been driving numerous studies on modifying their surface to stimulate osteogenic cells expansion and to accelerate bone tissue regeneration. The goal of the presented study was to optimize the production of titania-based bioactive materials with high porosity and defined nanostructure, which supports the cell viability and growth. We have chosen to our experiments TiO₂ nanofibers, produced by chemical oxidation of Ti6Al4V alloy. Fibrous nanocoatings were characterized structurally (X-ray diffraction (XRD)) and morphologically (scanning electron microscopy (SEM)). The wettability of the coatings and their mechanical properties were also evaluated. We have investigated the direct influence of the modified titanium alloy surfaces on the survival and proliferation of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (ADSCs). In parallel, proliferation of bone tissue cells—human osteoblasts MG-63 and connective tissue cells - mouse fibroblasts L929, as well as cell viability in co-cultures (osteoblasts/ADSCs and fibroblasts/ADSCs) has been studied. The results of our experiments proved that among all tested nanofibrous coatings, the amorphous titania-based ones were the most optimal scaffolds for the integration and proliferation of ADSCs, fibroblasts, and osteoblasts. Thus, we postulated these scaffolds to have the osteopromotional potential. However, from the co-culture experiments it can be concluded that ADSCs have the ability to functionalize the initially unfavorable surface, and make it suitable for more specialized and demanding cells.

Keywords: titanium alloy; nanofibers; adipose-derived mesenchymal stem cells; wettability; mechanical properties; biological activity

1. Introduction

The wide use of long-term implants in various fields of medicine is associated with an increasing demand for bone replacement materials to reconstruct the function of bone tissues and their rapid and effective healing [1–5]. Successful meeting of these requirements depends mainly on the degree of integration between the biomaterial (implant) and the native bone tissue. Hard materials (metals and their alloys) used in biomedical applications must exhibit specific properties in order to promote bone regeneration, proliferation, and osteogenic differentiation, [1–3,6,7]. The material suitable for implants should be biocompatible, should possess excellent corrosion resistance, optimal Young's modulus (similar to bone's modulus), low weight, high fatigue resistance, and adequate porosity. In

addition, it is recommended for such material to be inexpensive and easy to produce. The unique physical and chemical properties of titanium and its alloys make them most frequently used among metallic biomaterials. Titanium is a biocompatible material, but it is not bioactive [4,6,8–10]. One of the ways to improve the osseointegration of titanium/titanium alloys implants is the modification of their surface by the fabrication of oxide coatings with a specific structure, architecture, and physicochemical properties. Based on results of earlier investigations, it can be stated that cells are highly susceptible to any changes in morphology, structure, roughness, and surface energy. These factors can directly affect the rate and degree of cell adhesion, proliferation, differentiation, as well as having an impact on cell morphology [8–10]. Simultaneously, it should be noted that bone tissue contains a lot of components present at the nanoscale, therefore it is beneficial to create an implant surface, which can imitate this nanoarchitectural hierarchy [11–13]. Considering the geometrical properties of collagen and hydroxyapatite crystals, bone cells should react better and more intensively on substrates characterized by surface topography and architecture at the nanometric level [13–15]. The surface modification of the titanium/titanium alloy implant was intended to facilitate the production of coatings with a strictly defined nanotopography, e.g., nanofibers, nanorods, nanotubes, nanoteeths, nanowires, which promotes the process of its binding with the bone tissue [16–21]. One of the effective methods leading to the formation of a bioactive surface material is the use of the chemical oxidation process [22,23]. Chemical treatments of titanium and its alloys are mainly based on chemical reactions occurring on the interfacial surface between titanium and the solution. The most common chemical procedures include acid, alkaline, H_2O_2 , heat, and passivation treatments [24,25]. They are carried out in order to remove native oxides and impurities from the surface. This method may also lead to obtaining layers with increased biocompatibility, bioactivity, and bone conductivity [23,25]. In our research, among many available ways of preparing bioactive titanium surfaces, we have focused on applying of various acids and further oxidation in the presence of H_2O_2 . Acid etching usually leads to a thin oxide layer on the surface, mainly TiO_2 (<10 nm) [25]. The application of hydrogen peroxide as an oxidant does not cause any external contamination in the reaction system. Under the influence of H_2O_2 , the production of titanium peroxide gel is expected on the sample surface [18,25,26]. As a result of immersion of titanium foil in H_2O_2 solution, metallic titanium reacts with H_2O_2 molecules to form Ti-OH groups on the surface of titanium [26–28]. It can be expected that the longer the process is carried out, the rougher the layer will become [26].

The effectiveness of osteointegration and healing processes are caused by demands from the nanostructured surface of the biomaterial to stimulate, inter alia, osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) [10,12,29–31]. Stem cells become activated when an injury occurs and are recruited to the injury site to support tissue repair. When a biomaterial is implanted, the body reacts similarly and stem cells are recruited to the implant site. Therefore, stem cell interactions with biomaterials are critical for the long-term success of medical devices. The most widely used source of stem cells in scientific research and clinical practice is bone marrow [32]. However, the procedure of bone marrow collection is painful, has certain complications, and provides a limited amount of multipotent cells [33–35]. An alternative, attractive, and easily accessible source of progenitors is the stromal vascular fraction (SVF) of adipose tissue. The SVF is a heterogeneous mixture containing many types of cells, including blood cells, fibroblasts, endothelial cells, adipocytes, as well as adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) [31,36–38]. Stem cells obtained from subcutaneous adipose tissue have a multipotent differentiation capacity comparable to that of bone marrow stem cells [1,11,31,39–41]. In addition, mesenchymal stem cells of adipose tissue expand easily in the cell culture and age slowly. Therefore, they are presently considered as one of the most promising sources of cells to be applied in tissue engineering to repair, replace or regenerate tissues and organs damaged by diseases or injuries. To date, very few studies have investigated the adhesion, proliferation, and differentiation of ADSCs on titania surfaces.

Another important issue to prevent unwanted clinical complications during implantation is maintaining a permanent connection between the connective tissue and the implant [1,11,30,40–44]. For this reason, we used the co-culture system of ADSCs with osteoblasts and fibroblasts in the

present study to verify the efficacy of the engineered bone tissue integration. Rozila and colleagues, among others, used a similar research approach testing osteogenic potential of human adipose-derived stem cells co-cultured with human osteoblasts on polymeric microfiber scaffolds [45]. Mesenchymal stem cells, similarly to fibroblasts, are also suggested to support wound healing because they produce multiple growth factors and cytokines, which are of major interest in wound healing processes [46]. Therefore, in the present paper we have examined if ADSCs might stimulate fibroblast proliferation, especially since several studies have demonstrated the paracrine effects of ADSCs on fibroblasts. For example, Park et al. showed in an animal model that ADSCs and their conditioned media could stimulate collagen synthesis and promote the migration of fibroblasts to wounds [47]. Shen et al. demonstrated that ADSCs promote proliferation in young and aged fibroblasts through a paracrine mechanism [48].

The main objective of presented study was to investigate *in vitro* the ability of titanium dioxide nanofibers, produced in the process of Ti6Al4V alloy surface chemical oxidation, to support the growth, adhesion, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells of adipose origin (ADSCs). We have also determined the growth possibility of cell co-cultures (fibroblasts/ADSCs, and osteoblasts/ADSCs) on nanofibrous coatings. So far, researchers have not concentrated on functionalization of TiO₂ nanofibrous surfaces with adipose mesenchymal stem cells and on the use of ADSCs as a highly bioactive layer supporting bone tissue cells - osteoblasts MG-63 and connective tissue cells - fibroblasts L929. The results of our studies provide preliminary but valuable information about cell biology and interactions with the surface modified implants, which can be beneficial for everyday surgical practice (maxillofacial, dental, plastic, and orthopedic).

2. Results

2.1. Morphology and Structure Characterization of Titania Nanocoatings

Applying the direct oxidation method of Ti6Al4V foil surface led to the formation of titanium dioxide coatings, which consist of nanofibers (TNFs). Analysis of SEM images revealed a close relationship between the applied heating way (in an incubator (TNF4S-10S) or under a reflux condenser (TNF4C-10C)), the time of the process, and morphology of formed TNF coatings (Figure 1). Uniform coatings without cracks and gaps were obtained for all samples. It was found that the fibrous nature of the samples heated under reflux was more visible compared to those heated in the incubator. Moreover, the analysis of SEM images showed that an extension of heating time led to obtaining a more interlinked, nanofibrous morphology. Differences between morphology of the TNF4C sample and TNF6C, TNF10C ones are a good example of this (Figure 1).

In order to distinguish the systems formed on the Ti6Al4V surface heated in an incubator (TNF4S-10S) and reflux cooler (TNF4C-10C) from those formed during its oxidation with 30 wt % H₂O₂ solution at 358K for 72 h plate, the latter system was named as nanofibers 72 (TNF72a-b). After the process of chemical oxidation, the deposition of a homogeneous white layer on the surface of samples was observed. This layer was removed by ultrasonic cleaning. The morphology of nanofibers obtained (TNF72a-b) is presented in Figure 1.

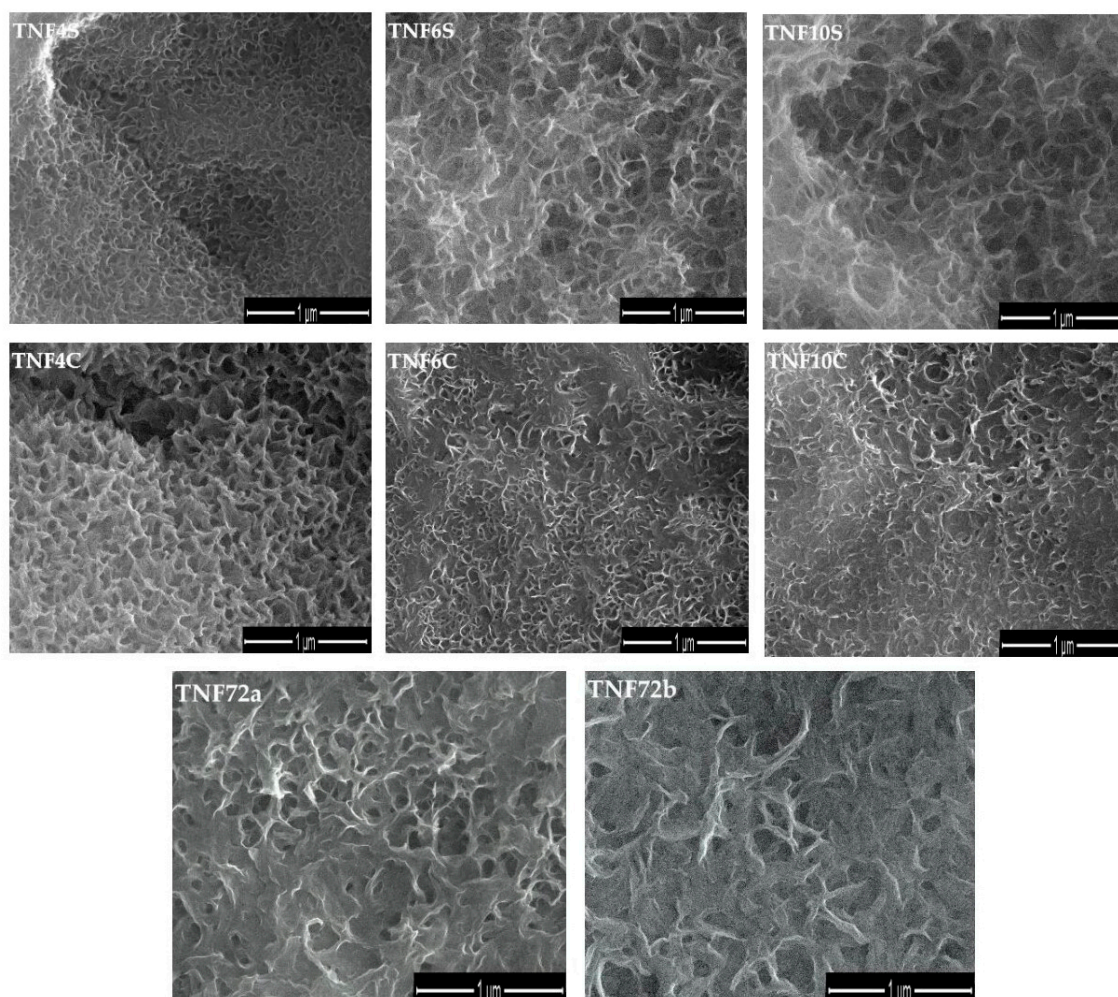


Figure 1. Scanning Electron Microscopy (SEM) images of titania nanofibers (TNF) on Ti6Al4V alloy surface.

The structure of produced coatings was determined by X-ray diffractometry (XRD) and registered spectra are presented in Figure 2. Analysis of these data shows that the TNF72 samples are amorphous (no anatase or rutile phase was observed). According to these data the TNF72 samples are amorphous, while TNF4-TNF10 ones are polycrystalline systems. The presence of the signal at 36.0° (101) and 61.3° (002) on the GIXRD spectra of TNF4C-10C and TNF4S-10S, points to the formation of rutile form of TiO_2 nanofibers. At the same time, the existence of the signal at 37.6° (004) was attributed to the anatase crystalline phase. The diffraction lines, which were found in XRD spectra of TNF4C-10C and TNF4S-10S, are in agreement with the literature data for TiO_2 rutile and anatase phases [49–53].

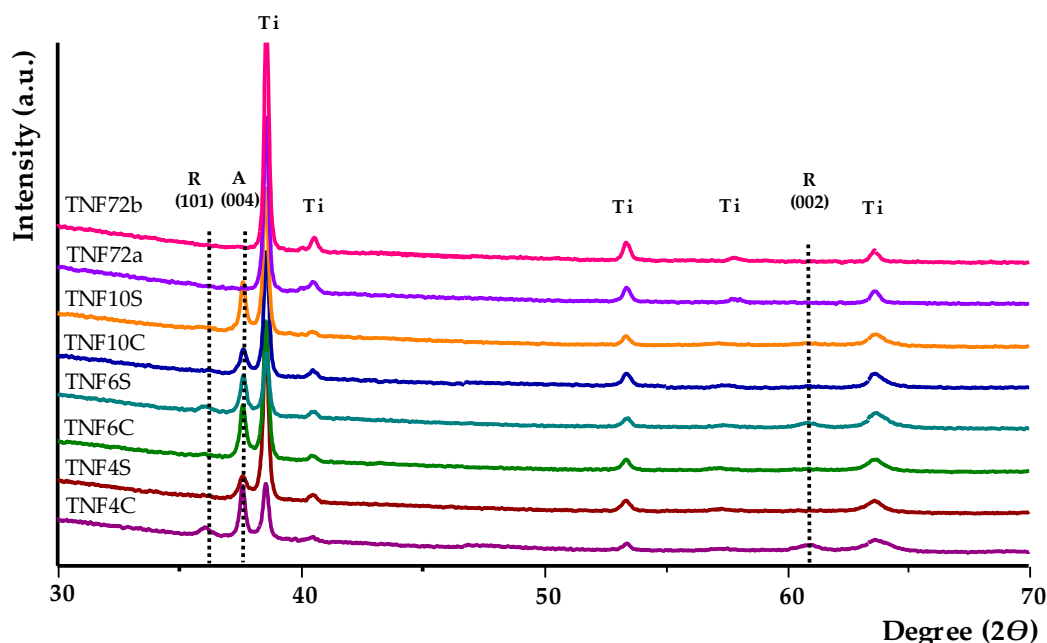


Figure 2. X-ray diffraction spectra of produced Ti6Al4V/TNF samples (lines marked as Ti are assigned to the titanium of titanium alloy substrate).

2.2. The Wettability and Surface Free Energy

The results of contact angles measurements for water and diiodomethane, and also changes of surface free energy value (SFE) of Ti6Al4V/TNF are presented in Figure 3 and in Table S1. Contact angle differences were attributed to the surface properties, in particular the surface roughness, which affect the contact angle of a water and diiodomethane droplet on each Ti6Al4V surface. According to data presented in Figure 3, it can be stated that samples surfaces indicate a clear hydrophobic character. In the case of Ti6Al4V/TNF4C-10C and Ti6Al4V/TNF4S-10S hydrophobicity increases from TNF4 to TNF10, i.e., parallel with the elongation of the chemical oxidation time of Ti6Al4V surface. When comparing the results obtained for TNF72a and TNF72b, we observed a higher hydrophobicity for the oxidation mixture activated sample (i.e., TNF72b). The free surface energy (SFE) of the produced coatings was calculated using the Owens-Wendt method. This method required the wetting angles be measured for polar liquid—water and dispersion liquid—diiodomethane (Figure 3A and Table S1). The SFE calculations for Ti6Al4V/TNF4-10 samples showed that their values change in the narrow range, i.e., from SFE = 27.6 (mJ/cm²) up to SFE = 37.4 (mJ/cm²) for Ti6Al4V/4S-10S and from SFE = 32.9 (mJ/cm²) up to SFE = 46.4 (mJ/cm²) for Ti6Al4V/TNF4C-10C (Figure 3B and Table 1). In the case of Ti6Al4V/TNF72 samples, the SFE value was 28.4 (mJ/cm²) for TNF72a and 39.3 (mJ/cm²) for TNF72b (Figure 3B and Table S1).

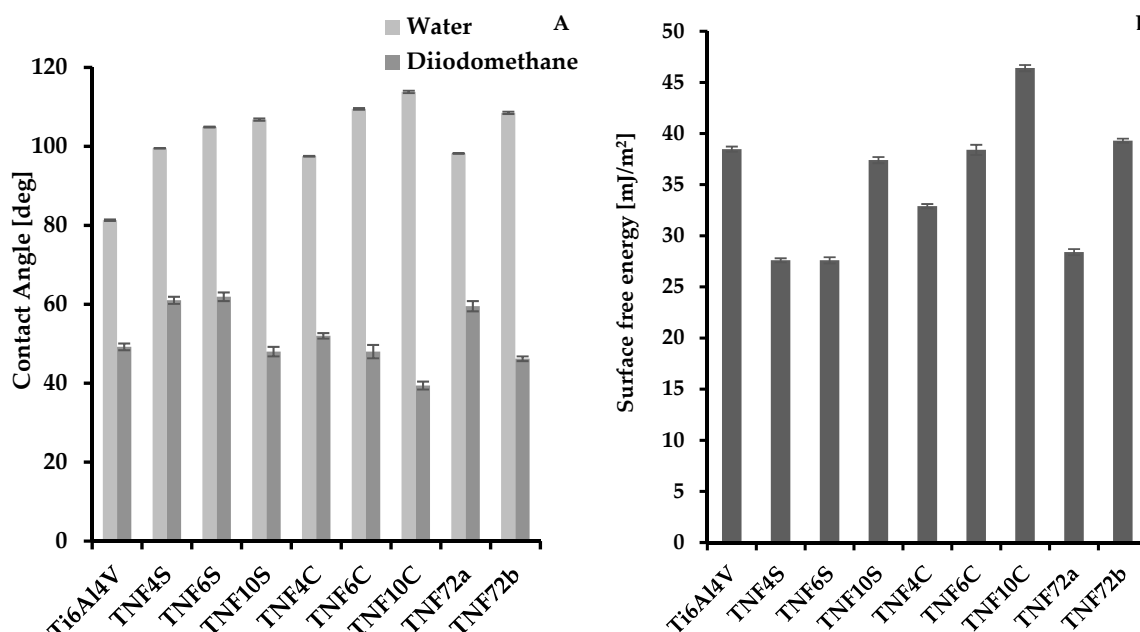


Figure 3. The values of contact angles for water and diiodomethane (A), and surface free energy of Ti6Al4V/TNF samples (B).

2.3. The Roughness of the of Titania Nanocoatings

The results of AFM topography with a value of area roughness parameter S_a of Ti6Al4V and modified specimens were presented in Figure 4. The lowest value of S_a parameter was obtained for the reference Ti6Al4V specimen. As demonstrated by the results, the oxidation process of the titanium alloy surface increased the roughness for all tested specimens. The same effect were reported in previous research [16,17]. For specimens heated in an incubator (TNF4S-10S) and under a reflux condenser (TNF4C-10C) with the increase of oxidation time (4–10 h), the roughness decrease was noticed. Significant decrease of S_a parameters with increased time of oxidation was obtained for specimens TNF4-10C from 0.35 μm (TNF4C) to 0.17 μm (TNF6C) and 0.15 μm (TNF10C). For samples from groups TNF4-10S no significant decreases in roughness were obtained, but these decreases also occurred. For specimens obtained after oxidation in 2 M HF solution for 10s (TNF72a) and in a 1:4:5 mixture of HF:HNO₃:H₂O, the increase of the roughness compared with reference (polished Ti6Al4V sample) from 0.02 μm to 0.06 μm (TNF72a) and 0.10 μm (TNF72a) was observed.

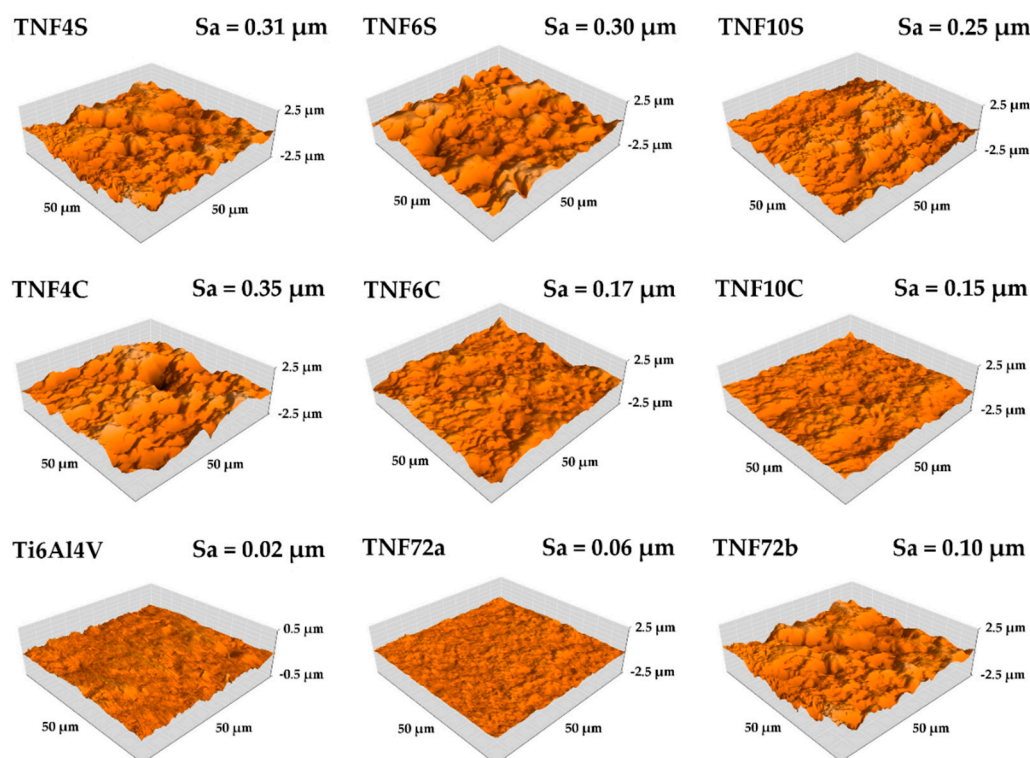


Figure 4. The Atomic Force Microscopy (AFM) topography of Ti6Al4V and TNF samples with Sa parameter values.

2.4. The Nanomechanical Properties of the Titania Nanocoatings

The relevant nanomechanical properties, such as hardness (H) and Young's Modulus (E), and nanoindentation properties (maximum depth of indentation) are presented in Table 1. To determine resistance to wear resistance and to plastic deformation, the parameters H/E and H^3/E^2 were calculated and reported in Table 1. The intimately connected H/E ratio to wear resistances have been shown by Matthews and Leyland [54]. Decreases of the hardness and Young's Modulus for all tested samples compared with reference Ti6Al4V (10.94 GPa and 212.48 respectively) were observed. Also any increase of hardness and Young's Modulus a caused decrease of the maximum depth of indentation, hence the lowest value (472 nm) was obtained for Ti6Al4V polished foil. The improvement of mechanical properties resulted in an increase of wear resistance (the H/E ratio) and resistance to plastic deformation H^3/E^2 . The highest mechanical properties were obtained for Ti6Al4V and TNF72b specimens and therefore the wear resistance values were the highest (0.0513 and 0.0421 for Ti6Al4V and TNF72b, respectively). The significant deviations of the obtained values are characteristic of accurate nanoindentation measurements and they were also noticed previously [55,56]. In case of biomaterials, the most important mechanical properties related to their suitability for cell growth is Young's Modulus. For TNF4S-10S samples, it was observed that the increase oxidation process time initially decreased the Young's Modulus by about 30% (from 170.85 to 133.85 GPa) and then their increase by about 2% (from 133.85 to 136.54 GPa). For TNF4C-10C samples initially the effect of elongation of oxidation time for Young's Modulus was insignificant but for specimens TNF6C and TNF10C E, a value decrease of about 20% was noticed (from 165.11 up to 133.22 GPa).

Table 1. Nanomechanical and nanoindentation properties of the reference Ti6Al4V and of titanium nanocoatings.

Biomaterial Sample	Hardness H (GPa)	Young's Modulus E (GPa)	Maximum Depth of Indentation (nm)	H/E (–)	H ³ /E ² (GPa)
Ti6Al4V	10.94 ± 1.42	212.48 ± 16.69	472.25 ± 26.11	0.0513 ± 0.0034	0.0294 ± 0.0078
TNF4S	6.68 ± 2.59	170.85 ± 58.26	604.76 ± 85.71	0.0388 ± 0.0039	0.0105 ± 0.0057
TNF6S	3.92 ± 1.73	133.85 ± 42.12	800.94 ± 191.73	0.0285 ± 0.0068	0.0039 ± 0.0033
TNF10S	4.59 ± 1.41	136.54 ± 27.81	718.59 ± 112.31	0.0330 ± 0.0047	0.0054 ± 0.0028
TNF4C	5.43 ± 2.15	166.34 ± 51.06	669.96 ± 127.95	0.0322 ± 0.0056	0.0063 ± 0.0044
TNF6C	6.00 ± 2.00	165.11 ± 39.18	634.01 ± 101.29	0.0356 ± 0.0046	0.0083 ± 0.0048
TNF10C	4.69 ± 1.50	133.22 ± 20.80	709.13 ± 88.34	0.0348 ± 0.0054	0.0064 ± 0.0050
TNF72a	6.27 ± 0.88	170.92 ± 15.73	601.98 ± 41.46	0.0356 ± 0.0021	0.0085 ± 0.0021
TNF72b	7.68 ± 1.78	180.18 ± 27.40	561.09 ± 80.11	0.0421 ± 0.0044	0.0143 ± 0.0053

The adhesion properties are presented in Table 2. The maximum force at which complete delamination of tested coatings occurred was determined by critical force and corresponding friction force was determined as the critical friction force. For TNF4C-10C specimens the increase of coatings adhesion with increase of time of process was observed. The increase in process time for TNF4-10S samples initially caused a decrease in adhesion by 35% (from 164.20 to 107.40 mN) and next by an insignificant increase to 116.69 mN. The obtained results of nanoscratch-test properties correlated with results obtained in nanoindentation tests (H/E and H³/E² ratios), the highest adhesion was (205.15 GPa of critical force) for TNF72b specimens, which was characterized by the highest value of H/E and H³/E² ratios.

Table 2. Adhesion properties of the titanium nanocoatings to the titanium alloy surfaces.

Biomaterial Sample	Nanoscratch-Test Properties	
	Critical Force (mN)	Critical Friction Force (mN)
TNF4S	164.20 ± 61.12	131.68 ± 52.66
TNF6S	107.40 ± 27.27	91.86 ± 22.80
TNF10S	116.69 ± 28.67	90.69 ± 21.53
TNF4C	130.95 ± 47.15	104.83 ± 47.34
TNF6C	139.03 ± 34.59	105.91 ± 32.16
TNF10C	140.91 ± 34.10	117.33 ± 42.05
TNF72a	203.91 ± 37.59	183.24 ± 61.29
TNF72b	205.15 ± 48.96	140.27 ± 46.27

2.5. Cell Proliferation Determined by the MTT Assay

The proliferation levels of L929 fibroblasts, MG-63 osteoblasts, and adipose-derived mesenchymal stem cells growing on the surface of fibrous nanocoatings were evaluated based on the results of the MTT assay and presented in Figure 5. It is worth noticing that all tested nanolayers provoked a higher proliferation level of L929 fibroblasts (Figure 5A) as well as MG-63 osteoblasts (Figure 5B). This phenomenon was observed after 24 h and 72 h of culture (except for the L929 fibroblasts cultivated on the TNF4S samples for 72 h). Analysis of these data revealed that TNF72a and TNF72b specimens induced the highest L929 cells viability after 24 h (245.2 ± 12.5% and 228.6 ± 10.3%, respectively). In contrast, a longer cultivation time provoked the greatest viability level of L929 cells not only for TNF72a and TNF72b samples (197.6 ± 8.9% and 188.8 ± 8.8%, respectively), but also for TNF4C, TNF6C, and TNF10C nanolayers (182.2 ± 6.5%, 191.1 ± 6.5%, and 174.2 ± 5.8%, respectively). These three specimens also stimulated the highest survival rate of MG-63 osteoblasts (168.6 ± 12.8%, 220.1 ± 19.3%, and 202.9 ± 15.8%, respectively) after 24 h of culture. After 72 h, the highest MG-63 cells viability was observed, especially in case of TNF72a samples (168.7 ± 8.6%). In the case of adipose-derived mesenchymal stem cells, four nanolayers: TNF4S, TNF4C, TNF6C, and TNF10C improved the cell viability during the initial 24 h. Among them, only TNF6C significantly

increased the cell viability level after 72 h of culture. On the other hand, TNF72a and TNF72b specimens turned out to be beneficial for ADSCs proliferation. The highest cell viability, $204.6 \pm 12.5\%$ of control on the TNF72a nanolayer and $178.1 \pm 15.2\%$ on the TNF72b nanolayer, was observed after 72 h (Figure 5C).

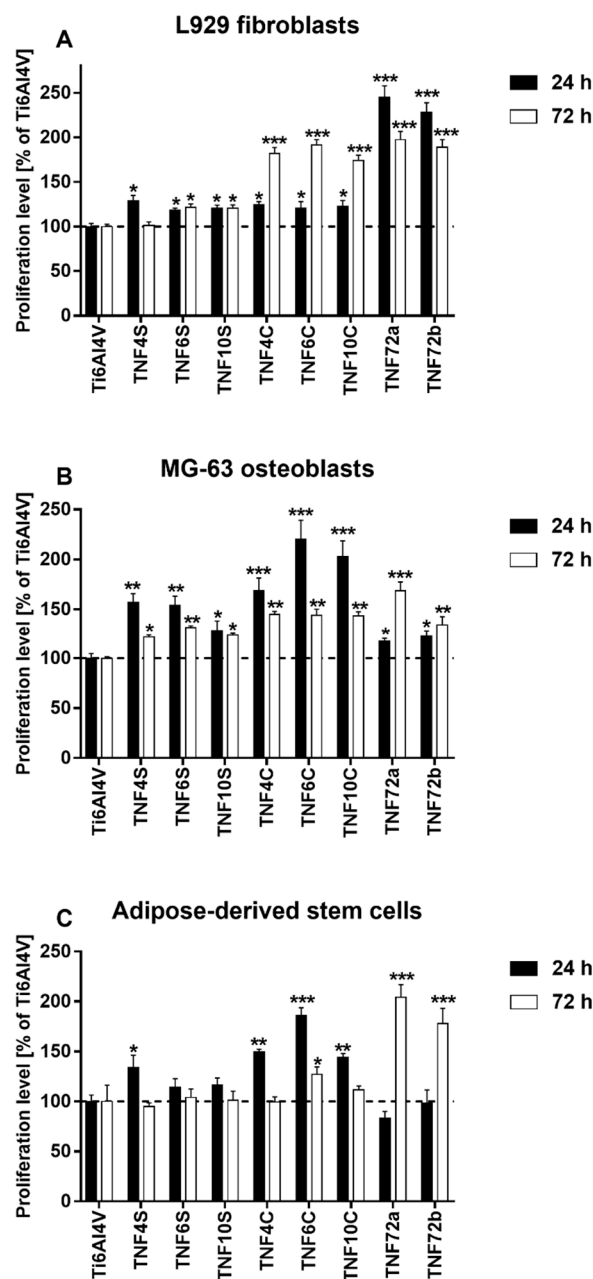


Figure 5. Proliferation level of L929 murine fibroblast cells (A), human osteoblast-like MG 63 cells (B) and human adipose-derived mesenchymal stem cells (C) growing on the surface of fibrous nanocoatings, in comparison with the reference Ti6Al4V alloy foils. Cell viability was assessed using the MTT assay after 24 and 72 h of culture. The results are expressed as percentage of the cells cultured on the reference Ti6Al4V alloy foils (served as 100%). The percentage values are expressed as means \pm SEM of four independent experiments. Asterisks indicate significant differences at the appropriate time (after 24 or 72 h) between the level of cell viability on the surface of the tested specimens compared with the reference Ti6Al4V alloy foils (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$). The horizontal lines show the proliferation level of the control cells growing on the reference Ti6Al4V alloy foils.

In the next study, we also assessed the viability of L929 fibroblasts or MG-63 osteoblasts co-cultured with ADSCs growing on the surface of the tested specimens. For this experiment, we selected the nanocoatings, which have shown the highest cell survival rate for all three tested cell lines. The results are expressed as percentage of the both co-cultured cells cultivated on the reference Ti6Al4V alloy foils (served as 100%). As can be seen in Figure 6, all tested specimens induced a significant increase in L929 fibroblasts (Figure 6A) as well as MG-63 osteoblasts (Figure 6B) viability co-cultured with ADSCs. This phenomenon was observed both after 24 and 72 h of incubation time. The highest cell viability was observed for TNF6C and TNF6S nanolayers after 72 h. The viability of L929 fibroblasts co-cultured with ADSCs then reached $194.4 \pm 1.6\%$ and $180.6 \pm 7.7\%$, whereas the proliferation level of MG-63 osteoblast co-cultivated with ADSCs was $167.4 \pm 4.1\%$ and $218.2 \pm 7.6\%$, respectively ($p < 0.001$). These results proved that ADSC-mediated functionalization of nanolayers increases their appropriateness for the cell growth and suitability as scaffolds mainly for fibroblasts and osteoblasts culture.

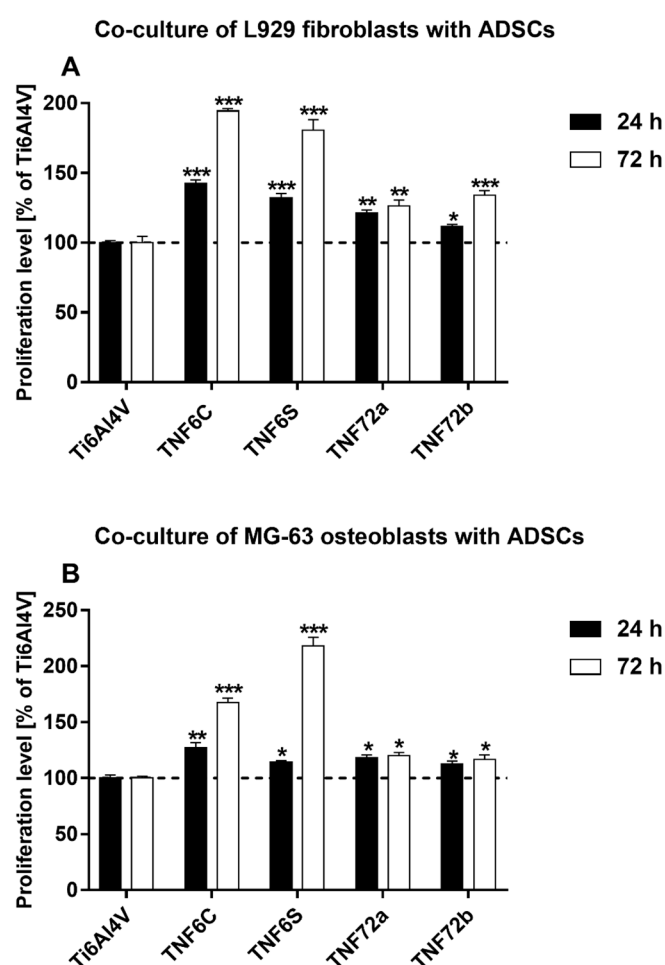


Figure 6. Proliferation level of L929 murine fibroblast cells (A) or human osteoblast-like MG 63 cells (B) co-cultured with human adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) on the surface of fibrous nanocoatings. Cell viability level was assessed using the MTT assay after 24 and 72 h of culture. The results are expressed as percentage of the both co-cultured cells cultivated on the reference Ti6Al4V alloy foils (served as 100%). The percentage values are expressed as means \pm SEM of four independent experiments. Asterisks indicate significant differences at the appropriate time (after 24 or 72 h) between the cells co-cultured on the surface of the tested specimens in comparison with the reference Ti6Al4V alloy foils (Ti6Al4V) (***) $p < 0.001$, (**) $p < 0.01$; (*) $p < 0.05$). The horizontal lines show the proliferation level of the both co-cultured cells growing on the reference Ti6Al4V alloy foils.

2.6. Cell Morphology Analyzed by Scanning Electron Microscopy

The biointegration capacity of the selected fibrous nanocoatings in reference to growing cells morphology was evaluated by analysis of SEM micrographs (Figure 7). As it can be seen, the cells are adherent and exhibit normal morphology with cytoplasmic filopodia. These actin based cell protrusions attach the cells to the surface of nanocoatings (Figure 7A,B), while connections are also generated between the cells (Figure 7C). Moreover, ADSCs co-cultured with MG-63 osteoblasts produce huge amounts of the extracellular matrix (Figure 7D).

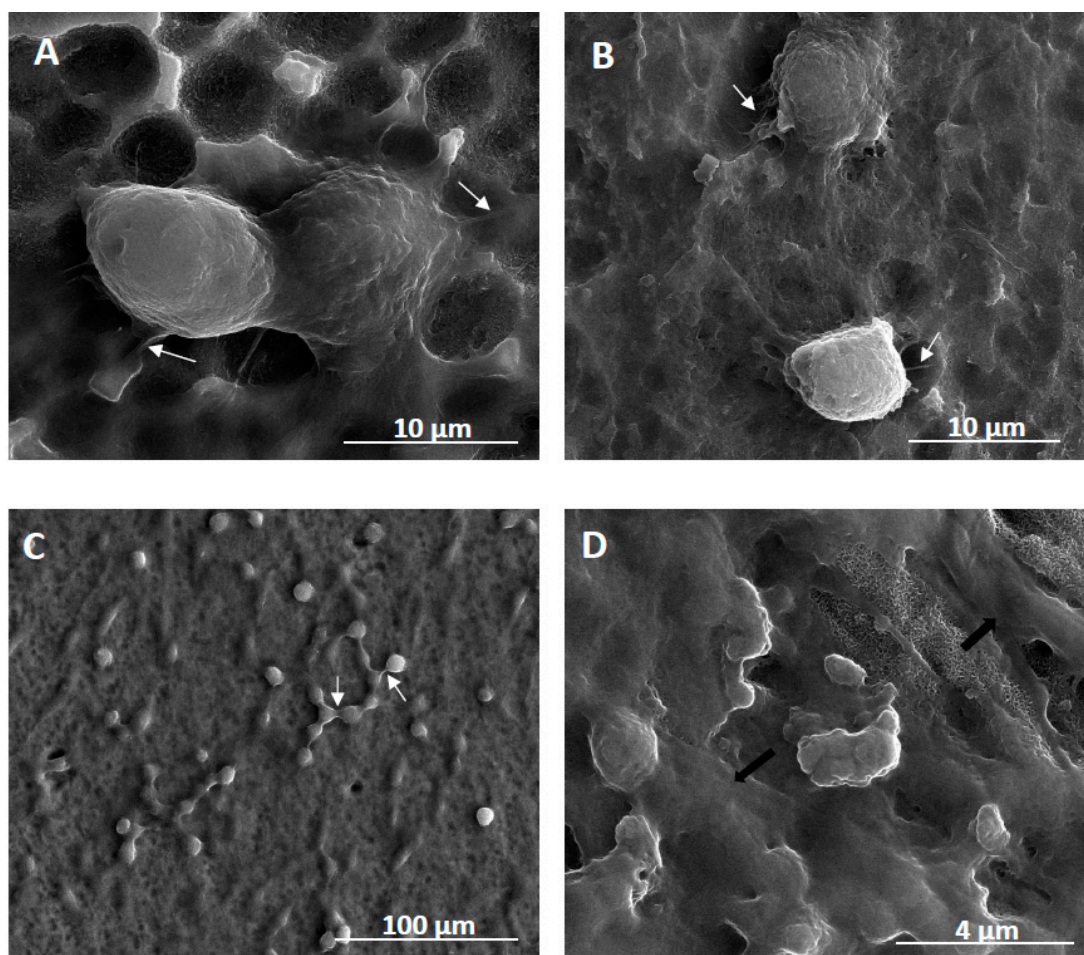


Figure 7. Scanning electron microscopy (SEM) images presenting the cells growing on the surface of fibrous nanocoatings. (A)—adipose-derived stem cells (ADSCs) “invading” the surface of TNF72a nanocoatings after 24h; (B)—ADSCs co-cultured with L929 fibroblasts on the TNF72a samples for 24 h; (C)—successful co-culture of ADSCs and L929 fibroblasts after 72h; (D)—successful co-culture of ADSCs and MG-63 osteoblasts after 72h. White arrows in the micrographs indicate filopodia that attach the cells to the surface (Figure 7A,B) or which are spreading between the cells (Figure 7C). Black arrows in Figure 7D show the extracellular matrix produced by the MG-63 osteoblasts.

3. Discussion

Surface properties of biomaterial are responsible for the first reactions of the body, resulting in its acceptance or rejection [57]. Numerous studies proved the influence of the topography on the osseointegration process [58–60]. As the roughness increases, the possibility of attaching cells, such as osteoblasts or fibroblasts, also increases, and thus the biointegration activity of the biomaterial increases [57]. Presented research confirms the positive effect of surface modification on the Sa parameter value. However, during the designing of new materials for implants, especially for long-term implants, the emphasis should be maintained on the mechanical properties of biomaterial (such as Young’s Modulus). For this purpose, the nanoindentation technique is the most suitable for testing

biomaterial surfaces [61–63]. The mechanical properties of an implant, mainly Young's Modulus, should be similar to that of the human bone (10–30 GPa) [64,65]. As the difference between implant and tissue properties increases, the risk of the "shielding" effect increases [65]. It has been confirmed that the occurrence of a shielding effect can cause tissue damage around the implant, bone loss, implant loosening, and premature failure of the implant [64–66]. According to our nanoindentation tests, the most biomechanical compatibility of tested modifications was noticed for TNF6S and TNF10C with the Young's Modulus value being the most similar to the value of Young's Modulus of human cortical bone. On the other hand, the surface of the TNF6S sample has the lowest wear resistance, which negatively affects the potential biomaterial application.

The adhesion of the modified surface to the titanium alloy was determined by another novel method indicated to measure adhesion of thin coatings and used before for biomaterials applications: the nanoscratch-test [67,68]. The biomaterials surface-modified, especially for long-term implants should be characterized by proper adhesion to the metallic substrate. The increase in coating adhesion for TNF4C-10C samples can be attributed to the decrease in the roughness of these coatings with an increase of the oxidation process time. A lower surface roughness value reduces the risk of delamination initiation on the surface, which was reported for TiO₂ layers on titanium alloy by Gonzales et al. [69]. An increase of nanomechanical properties, such as the nanohardness (H) and Young's modulus (E), can indicate better fracture toughness. The similar effect were reported by Kumar et al. [70]. In consequence, the tested surface with highest values of H and E (TNF72b, 7.68 GPa and 180.18 GPa) was characterized by highest adhesion to the titanium alloy (205.15 mN of critical force).

While designing a long-term implant, it is necessary to remember that the success of its use depends on the integrity of osseointegration and contact with surrounding soft tissue [71]. Therefore, it is important to give the coating, both an appropriate surface topography and mechanical properties, as well as an adequate ability to create a permanent implant-bone connection. For this purpose, in our works, TiO₂ nanofibers, suitable for the cell growth and produced by chemical oxidation of Ti6Al4V alloy, were evaluated using three cell lines: mouse L929 fibroblasts, human osteoblasts-like MG-63 cells, and adipose-derived human mesenchymal stem cells (ADSCs). MG-63 cell line is a standard model for a bone research, which is used to study the effect of surface nanotopography on osteoblast-like cells [72]. L929 cell line belongs to the continuous cell lines of soft tissue and it is widely used to test the cytotoxicity of dental materials when employing in vitro methods of experimentation [73]. Fibroblasts are also the most common cells in the peri-implant soft tissue, which is key to the formation of the peri-implant mucosal seal and helping to prevent epithelial ingrowth [71]. ADSCs are particularly important for regenerative medicine due to their capability of differentiating into osteoblasts, and they have been reported to accelerate bone tissue healing in combination with implants [74]. Recent studies also point to the paracrine and trophic effects of mesenchymal stem cells, which allow them to influence the neighboring microenvironment and provide a new prospective on cell-based therapy and tissue regeneration [75]. The studies with the parallel use of osteoblasts, fibroblasts, and adipose-derived stem cells seemed to be a preliminary, but also a comprehensive examination of fibrous nanocoatings biointegration in vitro.

In our study, the biointegration of the tested scaffolds was examined using MTT assay (for evaluation of cell viability) and scanning electron microscopy images analysis (for assessment of cell morphology). The level of cells proliferation was assessed for the single cell line culture as well as for L929 fibroblasts or MG-63 osteoblasts co-cultured with ADSCs. Short term culture (after 24 h) of all three studied cell lines showed that titania nanofibrous layers on Ti6Al4V alloy surface were non-toxic in general and suitable for maintaining the cell growth in vitro (Figure 5A-C). However, different surface structure (anatase, rutile and amorphous ones) and wettability of samples resulted in slight differences in promoting growth of three tested cell lines. TNF72a and TNF72b specimens induced the highest viability of murine fibroblasts L929 after 24 h, whereas human MG-63 osteoblasts and ADSCs preferred the surface of TNF4C, 6C, and 10C. These differences can be explained by the surface chemical nature. The surface chemical nature preferred by fibroblasts coatings TNF72a and TNF72b resembles a spongy structure with protruding nanofibers that initiates adhesion and

promotes modification with extracellular matrix proteins. The completely amorphous character of TNF72a and TNF72b favors higher viability of fibroblasts after 24 h. However, after 72 h of culture on TNF72a and TNF72b surfaces, the proliferation level of all cell lines increased as compared with the control alloy.

As we mentioned above, tested nanocoatings suitable for the cell growth were also evaluated using a cell co-culture system. This experimental approach is rarely described in the literature. However, some studies indicate that bone marrow-derived mesenchymal stem cells co-cultured with human umbilical vein endothelial cells showed enhanced osteogenesis [76]. Similarly, Birmingham and colleagues demonstrated that proliferation and osteogenic differentiation of murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells is significantly improved when co-cultured with osteoblasts and osteocytes [77]. Recent research on articular chondrocytes co-cultured with mesenchymal stem cells gave also promising results [78]. In reference with that, we have decided to investigate the effect of ADSCs co-culture with two cell lines: L929 fibroblasts and MG-63 osteoblasts that represent cells involved in the long-term success of the implants. The co-culture experiments showed slightly different results from those described for the single cell lines. TNF6C and 6S scaffolds turned out to be the most beneficial options for the cell survival rate after 72 h (Figure 6). These coatings show crystalline properties due to the presence of rutile/anatase nanocrystals that were often reported as being toxic for cells [79]. However, ADSCs functionalize the initially unfavorable surface, prepare it for more specialized and therefore demanding cells, and make it suitable for the cell growth. Eventually, it appears to be a beneficial surface for maintaining osteoblasts and fibroblasts growth and proliferation. As seen from SEM images, the cells are adherent, exhibit normal morphology with cytoplasmic filopodia, spread on the scaffolds, and produce huge amounts of extracellular matrix (Figure 7). Filopodia as the actin based cell protrusions are one of the most important cellular sensors, which collect information on whether the surface is suitable for cell attachment and proliferation, cell-cell interaction, and also allow cell migration toward the destination [80]. The extracellular matrix (ECM) is a complex assembly of molecules that interact with one another, creating the physical microenvironment necessary for the cell to survive and to function, for cell anchorage, and for providing a tissue scaffold for cell migration [81]. Therefore, filopodia formation and ECM production is evidence of the surface biointegration activity of the tested scaffolds. Further experiments elucidating the osteogenic potential of ADSCs and cytophysiology of osteoblasts on the fibrous nanocoatings are ongoing.

4. Materials and Methods

4.1. Synthesis of Titania Nanocoatings

4.1.1. Titania Nanofibers (TNF4-10)

The chemical oxidation method of titanium alloy ((Ti6Al4V, grade 5 foil, 99.7% purity, 0.20 mm thick, Strem Chemicals, Inc. (Bischheim, France), 6 mm × 60 mm pieces)) was used to produce the titania nanofiber coatings (TNF4-10). Ti6Al4V samples were polished and then were sonicated in acetone, ethanol and water (15 min in every liquid). The surface of the substrates were chemically etched in a 1:1 mixture of concentrated HCl and H₂O at 353 K for 30 min, cleaned with deionized water, and dried in Argon stream. After acid treatment, titanium surfaces was heated in 30% H₂O₂ solution at 358 K, for different oxidation times, i.e., $t = 4, 6,$ and 10 h. Samples were heated in two ways: (a) in an incubator (TNF4S-10S), (b) under a reflux condenser (TNF4C-10C). After chemical oxidation was completed, the samples were ultrasonically cleaned in deionized water and acetone, and then were dried in Argon stream.

4.1.2. Titania Nanofibers (TNF72)

In order to fabricate titania nanofibers layers (TNF72) on the surface of Ti6Al4V substrates, the chemical oxidation method was applied ((Ti6Al4V, grade 5 foil, 99.7% purity, 0.20 mm thick, Strem Chemicals, Inc. (Bischheim, France), 6mm × 60 mm pieces)). Substrate samples were polished and

then were sonicated in acetone, ethanol and water. Samples were etched in two ways at ambient temperature: (a) in 2 M HF solution for 10s (TNF72a), (b) in a 1:4:5 mixture of HF:HNO₃:H₂O for 30 s (TNF72b). After this, the samples were cleaned with deionized water and dried in Argon stream. Next, Ti6Al4V samples were immersed in 30 wt% H₂O₂ solution. The reactants were kept at 358 K in an oven for 72 h. After chemical oxidation was completed, the samples were ultrasonically cleaned in deionized water and acetone, and then they were dried in Argon stream.

4.2. Characterization of Titania Nanocoatings

4.2.1. Structure and Morphology Characterization

Surface morphology of all samples was studied using a Quanta scanning electron microscope with field emission (SEM, Quanta 3D FEG, Huston, TX, USA). The structure of the produced coatings was estimated using X-ray diffraction (PANalytical X'Pert Pro MPD X-ray diffractometer using Cu-Kalfa radiation, grazing incidence angle mode–GIXRD; the incidence angle was equal to 1 deg). Surface topographies were studied using Atomic Force Microscopy (AFM, NaniteAFM, Nanosurf UK, Bracknell, UK) with non-contact mode with 55 nN force and an area of 50 × 50 μm.

4.2.2. The Wettability and Surface Free Energy

The application of the goniometer (DSA 10 Krüss GmbH, Hamburg, Germany) with drop shape analysis software (ADVANCE), allowed measuring the contact angle with the use of the droplet method. Based on obtained results, the wettability of the coatings was estimated. In order to determine the free surface energy, a mathematical calculation using the Owens-Wendt method was applied. For this purpose, it was necessary to measure the contact angle using two liquids: polar distilled water and non-polar diiodomethane. The volume of the distilled water drop in the contact angle measurement was 3 μL and in the case of diiodomethane 4 μL. Each measurement was carried out three times immediately after deposition of the drop.

4.2.3. Mechanical Properties

The nanomechanical properties such as nanoindentation and adhesion determined by nanoscratch-test were performed with the nanoindenter NanoTest™ Vantage (Micro Materials Ltd., Wrexham, UK) using a Berkovich three-sided pyramidal diamond with angle 124.4°. Twenty-five independent measurements of nanoindentation were performed for each tested sample. The maximum force was 50 mN with the loading time 15 s, unloading 10 s and 5 s dwell with maximum force. The distance between each measurement was 20 μm. The surface hardness (H) and Reduced Young's modulus (Er) were determined by the Oliver and Pharr method. To calculate Young's modulus (E) from Reduced Young's modulus, we used a Poisson's ratio of 0.3. The adhesion of the layers was determined by nanoscratch-test with applied force from 0 to 200 mN at a loading rate of 1.3 mN/s on a distance of 500 μm. For all tested specimens, we performed 10 independent measurements. The adhesion of the layers was assessed based on the observation of an abrupt change in frictional force during the test.

4.3. Biological Studies

4.3.1. Cell Culture

Human osteoblast-like MG 63 cells (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK, cat. no. 86051601) were cultured at 37 °C in 5% CO₂ and 95% humidity in Eagle's Minimum Essential medium (EMEM) containing 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, MEM non-essential amino acid, heat-inactivated 10% fetal bovine serum (FBS), 100 μg/mL streptomycin, and 100 IU/mL penicillin (all compounds from Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). The cells were passaged using 0.25% trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich) when reaching 70–80% of confluency.

L929 murine fibroblast cells (American Type Culture Collection) were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Culture medium consisted of RPMI 1640 medium containing 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Germany). L929 cells were passaged when reaching 70–80% confluency using cell scraper.

Adipose-derived human mesenchymal stem cells (ADSC) were purchased from PromoCell and cultured at 37 °C in humidified atmosphere containing 5% CO₂. According to the manufacturer's protocol, the culture medium consisted of Mesenchymal Stem Cell Growth Medium® and 10% Supplement Mix® (PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany), with 100 U/mL of penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). The cells were passaged using 0.04% trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich) when reaching 70–80% of confluency.

4.3.2. Cell Proliferation Assays

The effect of the TiO₂ nanofibers, produced by chemical oxidation of Ti6Al4V alloy on the cell proliferation (measured after 24 and 72 h) was studied using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) assays. Firstly, we have studied the proliferation level of all tested cell lines growing on the surface of substrates. MG-63 osteoblasts, L929 fibroblasts and ADSCs were seeded at a density of 1×10^4 , 1×10^4 , and 3×10^4 cells/well, respectively, onto the autoclaved nanolayers placed in 24-well culture plates and then cultured for 24 and 72 h.

In the separate experimental set, we investigated the effect of fibrous nanocoatings on the proliferation level of MG-63 osteoblasts or L929 fibroblasts co-cultured with adipose-derived mesenchymal stem cells. ADSCs were seeded on the sterile nanolayers (3×10^4 cells in a 10-µL drop) and left for 4 h to adhere. Then, MG-63 osteoblasts or L929 fibroblasts at a density of 1×10^4 cells/well were seeded on the tested specimens covered with mesenchymal stem cells and incubated for 24 and 72 h. The cells in the co-culture system were cultivated in a suitable complete culture medium: EMEM for MG-63 osteoblasts and RPMI 1640 for L929 osteoblasts.

After the respective incubation time, the substrates were rinsed with phosphate buffered saline (PBS) and transferred to a new 24-well culture plate. MTT solution (5 mg/mL; Sigma-Aldrich) in a suitable culture medium without phenol red was added to each well and the plates were incubated for 3 h. Then, the MTT solution was aspirated and 500 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO; 100% *v/v*; Sigma Aldrich) was added to each well. Finally, the plates were shaken for 10 min. The absorbance was measured at the wavelength of 570 nm with the subtraction of the 630 nm background, using a microplate reader (Synergy HT; BioTek, Winooski, VT, USA). The blank groups (the plates incubated without the cells) were treated with the same procedures as the experimental groups. All measurements were done in duplicate in four independent experiments. The results were expressed as percentage of control cells, which served as 100% at the respective incubation time. For the assessment of the proliferation level of the single cell lines, MG-63 osteoblasts, L929 fibroblasts, or adipose-derived mesenchymal stem cells growing on the Ti6Al4V reference alloys were used as control cells. In the case of a co-culture system, both co-cultured cells cultivated on the Ti6Al4V reference alloys served as control samples (100%).

4.3.3. Cell Morphology Observed by Scanning Electron Microscopy

The analysis of morphological changes of MG-63 osteoblasts or L929 fibroblasts co-cultured with adipose-derived mesenchymal stem cells growing on the surface of the selected fibrous nanocoatings was performed using the scanning electron microscopy (SEM; Quanta 3D FEG; Carl Zeiss, Göttingen, Germany). The cells were incubated on the tested specimens for 24 or 72 h. Then, the specimens were rinsed with PBS to remove the non-adherent cells and fixed in 2.5% *v/v* glutaraldehyde (Sigma-Aldrich) for a minimum of 4 h (maximum 1 week). After that, the plates were washed again with PBS and dehydrated in a graded series of ethanol concentration (50%, 75%, 90%, and 100%) for 10 min. Finally, the specimens were dried in vacuum-assisted desiccators overnight and stored at room temperature until the SEM analysis was performed.

4.3.4. Statistical Analysis in the MTT Assay

All values are reported as means \pm standard error of the means (SEM) and were analyzed using the nonparametric Kruskal–Wallis one-way ANOVA test with the level of significance set at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 7.0 (La Jolla, CA, USA).

5. Conclusions

The direct oxidation method of Ti6Al4V substrates led us to produce the hydrophobic fibrous TiO₂ scaffolds (TNF) on their surface. The amorphousness of TNF72 samples and the polycrystalline structure of TNF4-10 ones have been proven by X-ray diffraction studies. Mechanical properties and the biointegration activity of surface-modified samples turned out to be closely linked with chemical structure of coatings, their wettability, and nanotopography. In comparison to TNF4-10 samples, the TNF72 scaffolds characterize better adhesion to the titanium alloy surfaces, higher values of the Young's Modulus, and lower roughness. The viability level of all cell lines (mouse L929 fibroblasts, human osteoblasts-like MG-63 cells, and adipose-derived human mesenchymal stem cells (ADSCs)) increased after 72 h of culture on completely amorphous TiO₂ nanofibers surfaces (TNF72) versus the control sample (Ti6Al4V alloy). The co-culture experiments showed slightly different results from that described for the single cell lines. ADSCs have demonstrated the ability to functionalize the initially unfavorable surface, making it appropriate for the cell growth and preparing it for more specialized and demanding cells. The presented data allow us to expect that titania nanofiber scaffolds will prove to be beneficial and can be applied as a novel alternative for bone tissue regeneration.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/1422-0067/20/22/5642/s1, Table S1: Results of contact angle and surface free energy (SFE) measurements; contact angles were measured three times using distilled water and diiodomethane; SFE values were determined using the Owens-Wendt method.

Author Contributions: Conceptualization, A.R. and M.E.; methodology, A.R., M.E., K.R., T.J., M.B.; formal analysis, A.R., M.E., K.R., T.J., M.B.; investigation, M.E., K.R., T.J., M.B.; writing—original draft preparation, A.R., M.E., K.R., T.J., M.B; writing—review and editing, A.R.; supervision, A.R.; funding acquisition, A.R.

Funding: The APC was partially funded by Nano-implant Ltd., spin-off company of Nicolaus Copernicus University in Toruń.

Acknowledgments: Authors would like to thank Piotr Piszczek for valuable discussion about the chemical structure of the studied surface-modified samples.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Cowden, K.; Dias-Netipanyj, M.F.; Popat, K.C. Effects of titania nanotube surfaces on osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2019**, *17*, 380–390.
2. Babaie, E.; Bhaduri, S.B. Fabrication Aspects of Porous Biomaterials in Orthopedic Applications: A Review. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4*, 1–39.
3. Singla, R.; Abidi, S.M.S.; Dar, A.I.; Acharya, A. Nanomaterials as potential and versatile platform for next generation tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2019**, doi:10.1002/jbm.b.34327.
4. Orapiriyakul, W.; Young, P.S.; Damiati, L.; Tsimbouri, P.M. Antibacterial surface modification of titanium implants in orthopaedics. *J. Tissue Eng.* **2018**, *9*, doi:10.1177/2041731418789838.
5. Radtke, A.; Grodzicka, M.; Ehlert, M.; Jędrzejewski, T.; Wypij, M.; Golińska, P. "To Be Microbiocidal and Not to Be Cytotoxic at the Same Time..."—Silver Nanoparticles and Their Main Role on the Surface of Titanium Alloy Implants. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 334.
6. Liu, X.Y.; Chu, P.K.; Ding, C.X. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **2004**, *47*, 49–121.

7. Ingrassia, D.; Sladkova, M.; Palmer, M.; Xia, W.; Engqvist, H.; de Peppo, G.M. Stem cell-mediated functionalization of titanium implants. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2017**, *28*, 133.
8. Malec, K.; Góralska, J.; Hubalewska-Mazgaj, M.; Głowacz, P.; Jarosz, M.; Brzewski, P.; Sulka, G.D.; Jaskuła, M.; Wybrańska, J. Effects of nanoporous anodic titanium oxide on human adipose derived stem cells. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 5349–5360.
9. Liu, H.; Webster, T. Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. *Biomaterials* **2007**, *28*, 354–369.
10. Marini, F.; Luzi, E.; Fabbri, S.; Ciuffi, S.; Sorace, S.; Tognarini, I.; Galli, G.; Zonefrati, R.; Sbaiz, F.; Brandi, M.L. Osteogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on nanostructured Ti6Al4V and Ti13Nb13Zr. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* **2015**, *12*, 224–237.
11. Dias-Netipanyj, M.F.; Cowden, K.; Sopchenski, L.; Cogo, S.C.; Elifio-Esposito, S.; Popat, K.C.; Soares, P. Effect of crystalline phases of titania nanotube arrays on adipose derived stem cell adhesion and proliferation. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *103*, 109850.
12. Bressan, E.; Sbricoli, L.; Guazzo, R.; Tocco, I.; Roman, M.; Vindigni, V.; Stellini, E.; Gardin, C.; Ferroni, L.; Sivolella, S.; et al. Nanostructured Surfaces of Dental Implants. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 1918–1931.
13. Wang, L.N.; Jin, M.; Zheng, Y.; Guan, Y.; Lu, X.; Luo, J.L. Nanotubular surface modification of metallic implants via electrochemical anodization technique. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 4421–4435.
14. Tuukkanen, J.; Nakamura, M. Hydroxyapatite as a Nanomaterial for Advanced Tissue Engineering and Drug Therapy. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23*, 3786–3793.
15. Mengfei, Y.; Lin, Y.; Liu, Y.; Zhou, Y.; Liu, C.; Dong, L.; Cheng, K.; Weng, W.; Wang, H. Enhanced Osteointegration of Hierarchical Structured 3D-Printed Titanium Implants. *ACS Appl. Bio Mater.* **2018**, *1*, 90–99.
16. Radtke, A.; Ehlert, M.; Jędrzejewski, T.; Sadowska, B.; Więckowska-Szakiel, M.; Holopainen, J.; Ritala, M.; Leskelä, M.; Bartmański, M.; Szkodo, M.; et al. Titania Nanotubes/Hydroxyapatite Nanocomposites Produced with the Use of the Atomic Layer Deposition Technique: Estimation of Bioactivity and Nanomechanical Properties. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 123.
17. Radtke, A.; Ehlert, M.; Jędrzejewski, T.; Bartmański, M. The Morphology, Structure, Mechanical Properties and Biocompatibility of Nanotubular Titania Coatings before and after Autoclaving Process. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 272.
18. Wu, J.M. Low-temperature preparation of titania nanorods through direct oxidation of titanium with hydrogen peroxide. *J. Cryst. Growth* **2004**, *269*, 347–355.
19. Radtke, A.; Bal, M.; Jędrzejewski, T. Novel Titania Nanocoatings Produced by Anodic Oxidation with the Use of Cyclically Changing Potential: Their Photocatalytic Activity and Biocompatibility. *Nanomaterials* **2018**, *8*, 712.
20. Radtke, A.; Topolski, A.; Jędrzejewski, T.; Kozak, W.; Sadowska, B.; Więckowska-Szakiel, M.; Piszczek, P. Bioactivity Studies on Titania Coatings and the Estimation of Their Usefulness in the Modification of Implant Surfaces. *Nanomaterials* **2017**, *7*, 90.
21. Gulati, K.; Maher, S.; Findlay, D.M.; Losic, D. Titania nanotubes for orchestrating osteogenesis at the bone-implant interface. *Nanomedicine* **2016**, *11*, 1847–1864.
22. Biswas, A.; Srikant, P.V.S.; Manna, I.; Chatterjee, U.K.; Majumdar, J.D. Chemical oxidation of Ti-6Al-4V for improved wear and corrosion resistance. *Surf. Eng.* **2008**, *24*, 442–446.
23. Variola, F.; Lauria, A.; Nanci, A.; Rosei, F. Influence of Treatment Conditions on the Chemical Oxidative Activity of H₂SO₄/H₂O₂ Mixtures for Modulating the Topography of Titanium. *Adv. Eng. Mater.* **2009**, *11*, doi:10.1002/adem.200900122.
24. Liu, W.; Liu, S.; Wang, L. Surface Modification of Biomedical Titanium Alloy: Micromorphology, Microstructure Evolution and Biomedical Applications. *Coatings* **2019**, *9*, 249.
25. Nanci, A.; Wuest, J.D.; Peru, L.; Brunet, P.; Sharma, V.; Zalzal, S.; McKee, M.D. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *40*, 324–335.
26. Radtke, A.; 1D Titania Nanoarchitecture as Bioactive and Photoactive Coatings for Modern Implants: A Review In: Magdalena Janus (Eds.), Application of Titanium Dioxide, July 2017, doi:10.5772/intechopen.69138.
27. Xiao, F.; Tsuru, K.; Hayakawa, S.; Osaka, A. In vitro apatite deposition on titania film derived from chemical treatment of Ti substrates with an oxysulfate solution containing hydrogen peroxide at low temperature. *Thin Solid Film.* **2003**, *441*, 271–276.

28. Walivaara, B.; Aronsson, B.O.; Rodahl, M.; Lausmaa, J.; Tengvall, P. Titanium with different oxides: In vitro studies of protein adsorption and contact activation. *Biomaterials* **1994**, *15*, 827–834.
29. Martino, S.; D'Angelo, F.; Armentano, I.; Kenny, J.M.; Orlicchio, A. Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 338–351.
30. Cowden, K.; Dias-Netipanyj, M.F.; Papat, K.C. Adhesion and Proliferation of Human Adipose-Derived Stem Cells on Titania Nanotube Surfaces. *Regen. Eng. Transl. Med.* **2019**, 1–11, doi:10.1007/s40883-019-00091-9.
31. Ciuffi, S.; Zonefrati, R.; Brandi, M.L. Adipose stem cells for bone tissue repair. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* **2017**, *14*, 217–226.
32. Vercellino, M.; Ceccarelli, G.; Cristofaro, F.; Balli, M.; Bertoglio, F.; Bruni, G.; Benedetti, L.; Avanzini, M.A.; Imbriani, M.; Visai, L. Nanostructured TiO₂ Surfaces Promote Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Differentiation to Osteoblasts. *Nanomaterials* **2016**, *6*, 124.
33. James, A.W.; Zara, J.N.; Zhang, X.; Askarinam, A.; Goyal, R.; Chiang, M.; Yuan, W.; Chang, L.; Corselli, M.; Shen, J.; et al. Perivascular stem cells: A prospectively purified mesenchymal stem cell population for bone tissue engineering. *Stem Cells Transl. Med.* **2012**, *1*, 510–519.
34. Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* **1991**, *9*, 641–650.
35. Lindroos, B.; Suuronen, R.; Miettinen, S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev. Rep.* **2011**, *7*, 269–291.
36. Mazini, L.; Rochette, L.; Amine, M.; Malka, G. Regenerative Capacity of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs), Comparison with Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2523.
37. Gimble, J.M.; Katz, A.J.; Bunnell, B.A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res.* **2007**, *100*, 1249–1260.
38. Hattori, H.; Sato, M.; Masuoka, K.; Ishihara, M.; Kikuchi, T.; Matsui, T.; Takase, B.; Ishizuka, T.; Kikuchi, M.; Fujikawa, K.; et al. Osteogenic potential of human adipose tissue derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs* **2004**, *178*, 2–12.
39. De Ugarte, D.A.; Morizono, K.; Elbarbary, A.; Alfonso, Z.; Zuk, P.A.; Zhu, M.; Drago, J.L.; Ashjian, P.; Thomas, B.; Benhaim, P.; et al. Comparison of multi-lineage cell from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* **2003**, *174*, 101–109.
40. Bunnell, B.A.; Flaata, M.; Gagliardi, C.; Patel, B.; Ripoll, C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods* **2008**, *45*, 115–120.
41. Lewallen, E.A.; Jones, D.L.; Dudakovic, A.; Thaler, R.; Paradise, C.R.; Kremers, H.M.; Abdel, M.P.; Kakar, S.; Dietz, A.B.; Cohene, R.C.; et al. Osteogenic potential of human adipose-tissue-derived mesenchymal stromal cells cultured on 3D-printed porous structured titanium. *Gene* **2016**, *581*, 95–106.
42. Safford, K.M.; Safford, S.D.; Gimble, J.M.; Shetty, A.K.; Rice, H.E. Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp. Neurol.* **2004**, *187*, 319–328.
43. Alonso-Goulart, V.; Ferreira, L.B.; Duarte, C.A.; Lemos de Lima, I.; Ferreira, E.R.; Candido de Oliveira, B.; Vargas, L.N.; Dotto de Moraes, D.; Silva, I.B.B.; de Oliveira Faria, R.; et al. Mesenchymal stem cells from human adipose tissue and bone repair: A literature review. *Biotechnol. Res. Innov.* **2018**, *2*, 74–80.
44. Gastaldi, G.; Asti, A.; Scaffino, M.F.; Visai, L.; Saino, E.; Cometa, A.M.; Benazzo, F. Human adipose-derived stem cells (hASCs) proliferate and differentiate into osteoblast-like cells on trabecular titanium scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2010**, *94*, 790–799.
45. Rozila, I.; Azari, P.; Munirah, S.; Wan Safwani, W.K.; Gan, S.N.; Nur Azurah, A.G.; Jahendran, J.; Pinguan-Murphy, B.; Chua, K.H. Differential osteogenic potential of human adipose-derived stem cells co-cultured with human osteoblasts on polymeric microfiber scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2016**, *104*, 377–387.
46. Zellner, J.; Mueller, M.; Berner, A.; Dienstknecht, T.; Kujat, R.; Nerlich, M.; Hennemann, B.; Koller, M.; Prantl, L.; Angele, M.; et al. Role of mesenchymal stem cells in tissue engineering of meniscus. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2010**, *94*, 1150–1161.
47. Park, B.S.; Jang, K.A.; Sung, J.H. Adipose-derived stem cells and their secretory factors as a promising therapy for skin aging. *Dermatol. Surg.* **2008**, *34*, 1323–1326.
48. Shen, X.; Du, Y.; Shen, W.; Xue, B.; Zhao, Y. Adipose-derived stem cells promote human dermal fibroblast function and increase senescence-associated β -galactosidase mRNA expression through paracrine effects. *Mol. Med. Rep.* **2014**, *10*, 3068–3072.
49. Thamaphat, K.; Limsuwan, P.; Ngotawornchai, B. Phase Characterization of TiO₂ Powder by XRD and TEM. *Kasetsart J. Nat. Sci.* **2008**, *42*, 357–361.

50. Park, J.Y.; Lee, I.H. Characterization and Morphology of Prepared Titanium Dioxide Nanofibers by Electrospinning. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2010**, *10*, 3402–3405.
51. Aiempnanakit, M.; Helmersson, U.; Aijaz, A.; Larsson, P.; Magnusson, R.; Jensen, J.; Kubart, T. Effect of peak power in reactive high power impulse magnetron sputtering of titanium dioxide. *Surf. Coat. Technol.* **2011**, *205*, 4828–4831.
52. Sarma, B.K.; Pal, A.R.; Bailung, H.; Chutia, J. Growth of nanocrystalline TiO₂ thin films and crystal anisotropy of anatase phase deposited by direct current reactive magnetron sputtering. *Mater. Chem. Phys.* **2013**, *139*, 979–987.
53. Jing, F.J.; Yukimura, K.; Kato, H.; Lei, Y.F.; You, T.X.; Leng, Y.X.; Huang, N. Film characterization of titanium oxide films prepared by high-power impulse magnetron sputtering. *Surf. Coat. Technol.* **2011**, *206*, 967–971.
54. Leyland, A.; Matthews, A. Design criteria for wear-resistant nanostructured and glassy-metal coatings. *Surf. Coat. Technol.* **2004**, *177*, 317–324.
55. Jemat, A.; Ghazali, M.J.; Razali, M.; Otsuka, Y.; Rajabi, A. Effects of TiO₂ on microstructural, mechanical properties and in-vitro bioactivity of plasma sprayed yttria stabilised zirconia coatings for dental application. *Ceram. Int.* **2017**, *44*, 4271–4281.
56. Beake, B.D.; Vishnyakov, V.M.; Valizadeh, R.; Colligon, J.S. Influence of mechanical properties on the nanoscratch behaviour of hard nanocomposite TiN/Si₃N₄ coatings on Si. *J. Phys. D Appl. Phys.* **2006**, *39*, 1392–1397.
57. Wu, Y.; Zitelli, J.P.; TenHuisen, K.S.; Yu, X.; Libera, M.R. Differential response of Staphylococci and osteoblasts to varying titanium surface roughness. *Biomaterials* **2011**, *32*, 951–960.
58. Zhou, W.; Zhong, X.; Wu, X.; Yuan, L.; Zhao, Z.; Wang, H.; Xia, Y.; Feng, Y.; He, J.; Chen, W. The effect of surface roughness and wettability of nanostructured TiO₂ film on TCA-8113 epithelial-like cells. *Surf. Coat. Technol.* **2006**, *200*, 6155–6160.
59. Le Guéhennec, L.; Soueidan, A.; Layrolle, P.; Amouriq, Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent. Mater.* **2007**, *23*, 844–854.
60. Boyan, B.D.; Hummert, T.W.; Dean, D.D.; Schwartz, Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* **1996**, *17*, 137–146.
61. Bartmanski, M.; Zielinski, A.; Majkowska-Marzec, B.; Strugala, G. Effects of solution composition and electrophoretic deposition voltage on various properties of nanohydroxyapatite coatings on the Ti13Zr13Nb alloy. *Ceram. Int.* **2018**, *44*, 19236–19246.
62. Sarraf, M.; Razak, B.A.; Nasiri-Tabrizi, B.; Dabbagh, A.; Kasim, N.H.A.; Basirun, W.J.; Bin Sulaiman, E. Nanomechanical properties, wear resistance and in-vitro characterization of Ta₂O₅ nanotubes coating on biomedical grade Ti–6Al–4V. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2017**, *66*, 159–171.
63. Silva, A.P.; Booth, F.; Garrido, L.; Aglietti, E.; Pena, P.; Baudín, C. Young's modulus and hardness of multiphase CaZrO₃-MgO ceramics by micro and nanoindentation. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2017**, *38*, 2194–2201.
64. Abdel-Hady Gepreel, M.; Niinomi, M. Biocompatibility of Ti-alloys for long-term implantation. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2013**, *20*, 407–415.
65. Kaabi Falahieh Asl, S.; Nemeth, S.; Tan, M.J. Electrophoretic deposition of hydroxyapatite coatings on AZ31 magnesium substrate for biodegradable implant applications. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **2014**, *60*, 74–79.
66. Matsugi, K.; Endo, T.; Choi, Y.B.; Sasaki, G. Alloy design of Ti alloys using ubiquitous alloying elements and characteristics of their levitation-melted alloys. *Mater. Trans.* **2010**, *51*, 740–748.
67. Karimzadeh, A.; Ayatollahi, M.R.; Bushroa, A.R.; Herliansyah, M.K. Effect of sintering temperature on mechanical and tribological properties of hydroxyapatite measured by nanoindentation and nanoscratch experiments. *Ceram. Int.* **2014**, *40*, 9159–9164.
68. Bartmanski, M.; Zielinski, A.; Jazdzewska, M.; Głodowska, J.; Kalka, P. Effects of electrophoretic deposition times and nanotubular oxide surfaces on properties of the nanohydroxyapatite/nanocopper coating on the Ti13Zr13Nb alloy. *Ceram. Int.* **2019**, *45*, 20002–20010.
69. Cedillo-Gonzalez, E.I.; Montorosi, M.; Mugoni, C.; Montorosi, M.; Siligardi, C. Improvement of the adhesion between TiO₂ nanofilm and glass substrate by roughness modifications. *Phys. Procedia* **2013**, *40*, 19–29.

70. Manoj Kumar, R.; Kuntal, K.K.; Singh, S.; Gupta, P.; Bhushan, B.; Gopinath, P.; Lahiri, D. Electrophoretic deposition of hydroxyapatite coating on Mg-3Zn alloy for orthopedic application. *Surf. Coat. Technol.* **2016**, *287*, 82–92.
71. Furuhashi, A.; Ayukawa, Y.; Atsuta, I.; Okawachi, H.; Koyano, K. The difference of fibroblast behavior on titanium substrata with different surface characteristics. *Odontology* **2012**, *100*, 199–205.
72. Burmester, A.; Luthringer, B.; Willumeit, R.; Feyerabend, F. Comparison of the reaction of bone-derived cells to enhanced MgCl₂-salt concentrations. *Biomater* **2014**, *4*, e967616.
73. Thrivikraman, G.; Madras, G.; Basu, B. In vitro/In vivo assessment and mechanisms of toxicity of bioceramic materials and its wear particulates. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 12763–12781.
74. Bressan, E.; Botticelli, D.; Sivoletta, S.; Bengazi, F.; Guazzo, R.; Sbricoli, L.; Ricci, S.; Ferroni, L.; Gardin, C.; Velez, J.U.; et al. Adipose-derived stem cells as a tool for dental implant osseointegration: An experimental study in the dog. *Int. J. Mol. Cell. Med.* **2015**, *4*, 197–208.
75. Vizoso, F.J.; Eiro, N.; Cid, S.; Schneider, J.; Perez-Fernandez, R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1852.
76. Gershovich, J.G.; Dahlin, R.L.; Kasper, F.K.; Mikos, A.G. Enhanced osteogenesis in cocultures with human mesenchymal stem cells and endothelial cells on polymeric microfiber scaffolds. *Tissue Eng. Part A* **2013**, *19*, 2565–2576.
77. Birmingham, E.; Niebur, G.L.; McHugh, P.E.; Shaw, G.; Barry, F.P.; McNamara, L.M. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur. Cells Mater.* **2012**, *23*, 13–27.
78. Hubka, K.M.; Dahlin, R.L.; Meretoja, V.V.; Kasper, F.K.; Mikos, A.G. Enhancing chondrogenic phenotype for cartilage tissue engineering: Monoculture and coculture of articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2014**, *20*, 641–654.
79. Sayes, C.M.; Wahi, R.; Kurian, P.A.; Liu, Y.; West, J.L.; Ausman, K.D.; Warheit, D.B.; Colvin, V.L. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: A cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol. Sci.* **2006**, *92*, 174–185.
80. Ebrahimi, M.; Pripatnanont, P.; Suttapreyasri, S.; Monmaturapoj, N. In vitro biocompatibility analysis of novel nano-biphasic calcium phosphate scaffolds in different composition ratios. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2014**, *102*, 52–61.
81. Geiger, B.; Bershadsky, A.; Pankov, R.; Yamada, K.M. Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 793–805.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).




Table S1. The results of contact angle and surface free energy (SFE) measurements; contact angles were measured three times using distilled water and diiodomethane; the SFE values were determined using the Owens-Wendt method.

Biomaterial sample	Average contact angle [°] ± standard deviation		Surface free energy ± standard deviation [mJ/m ²]
	Measuring liquid		
	Water	Diiodomethane	
Ti6Al4V	81.3 ± 0.2	49.2 ± 0.9	38.5 ± 0.3
TNF4S	99.5 ± 0.0	61.0 ± 0.9	27.6 ± 0.2
TNF6S	104.9 ± 0.1	61.9 ± 1.1	27.6 ± 0.3
TNF10S	106.8 ± 0.3	48.0 ± 1.2	37.4 ± 0.3
TNF4C	97.5 ± 0.1	52.0 ± 0.7	32.9 ± 0.2
TNF6C	109.5 ± 0.2	48.0 ± 1.7	38.4 ± 0.5
TNF10C	113,8 ± 0.3	39.4 ± 1.0	46.4 ± 0.3
TNF72a	98.2 ± 0.0	59.5 ± 1.3	28.4 ± 0.3
TNF72b	108.5 ± 0.3	46.2 ± 0.6	39.3 ± 0.2

P2. *In Vitro Studies on Nanoporous, Nanotubular and Nanosponge-Like Titania Coatings, with the Use of Adipose-Derived Stem Cells*

Article

In Vitro Studies on Nanoporous, Nanotubular and Nanosponge-Like Titania Coatings, with the Use of Adipose-Derived Stem Cells

Michalina Ehlert ^{1,2}, Aleksandra Radtke ^{1,2,*} , Tomasz Jędrzejewski ³ , Katarzyna Roszek ³, Michał Bartmański ⁴  and Piotr Piszczek ^{1,2,*}

¹ Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Gagarina 7, 87-100 Toruń, Poland; m.ehlert@doktorant.umk.pl

² Nano-implant Ltd. Gagarina 5/102, 87-100 Toruń, Poland

³ Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Lwowska 1, 87-100 Toruń, Poland; kroszek@umk.pl (K.R.); tomaszj@umk.pl (T.J.)

⁴ Faculty of Mechanical Engineering, Gdańsk University of Technology, Gabriela Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Poland; michal.bartmanski@pg.edu.pl

* Correspondence: aradtke@umk.pl (A.R.); piszczek@umk.pl (P.P.); Tel.: +48-600321294 (A.R.); Tel.: +48-607883357 (P.P.)

Received: 17 February 2020; Accepted: 26 March 2020; Published: 29 March 2020



Abstract: In vitro biological research on a group of amorphous titania coatings of different nanoarchitectures (nanoporous, nanotubular, and nanosponge-like) produced on the surface of Ti6Al4V alloy samples have been carried out, aimed at assessing their ability to interact with adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) and affect their activity. The attention has been drawn to the influence of surface coating architecture and its physicochemical properties on the ADSCs proliferation. Moreover, in vitro co-cultures: (1) fibroblasts cell line L929/ADSCs and (2) osteoblasts cell line MG-63/ADSCs on nanoporous, nanotubular and nanosponge-like TiO₂ coatings have been studied. This allowed for evaluating the impact of the surface properties, especially roughness and wettability, on the creation of the beneficial microenvironment for co-cultures and/or enhancing differentiation potential of stem cells. Obtained results showed that the nanoporous surface is favorable for ADSCs, has great biointegrative properties, and supports the growth of co-cultures with MG-63 osteoblasts and L929 fibroblasts. Additionally, the number of osteoblasts seeded and cultured with ADSCs on TNT5 surface raised after 72-h culture almost twice when compared with the unmodified scaffold and by 30% when compared with MG-63 cells growing alone. The alkaline phosphatase activity of MG-63 osteoblasts co-cultured with ADSCs increased, that indirectly confirmed our assumptions that TNT-modified scaffolds create the osteogenic niche and enhance osteogenic potential of ADSCs.

Keywords: Ti6Al4V alloy; anodic oxidation; adipose-derived mesenchymal stem cells; nanomechanical properties; wettability; biocompatibility

1. Introduction

Titanium and its alloys have been widely used in the construction of implants for complementary bone defects in patients after complicated spinal surgery or limb fractures [1–5]. Although titanium-based implants are typically expected to be longlasting, the lack of full biointegration with the bone for long-term survival often occurs and leads to implant failure. Re-surgery to address such failure involves increased risk, complications, and costs. Therefore, one of the key challenges in bone healing and regeneration is the engineering of an implant, which provides osteointegration

with enhanced bioactivity and improves implant-host interactions to reduce biological related implant failure. The success of implants is strongly dependent on the fixation of the implant biomaterial to bone and firm bonding, for optimal function and lastingness [6–11].

One of the surface modification paths in modern implantology, aiming at the enhancement of bioactivity and osteointegration, is the formation of TiO₂ based coatings of defined structure, architecture, physicochemical, and mechanical properties, on the surface of titanium-based implants [8,9,12]. The low cost and easy electrochemical production of titanium dioxide nanotubular coatings, possessing beneficial properties, i.e., high surface-area-to-volume ratio, strong oxidizing properties, chemical stability, non-toxicity, good mechanical properties, excellent corrosion resistance, and high biointegration activity, is an especially promising modification method [7,8,13–17]. Due to the similar topography to natural bone, such modified surfaces promote direct contact with bone cells and the formation of apatite, which is the main component of bone tissue [8,18,19]. Homogeneous nanotubular, but also nanoporous and nanosponge-like coatings, on the surface of a titanium/titanium alloy implant can be easily and quickly produced by controlled electrochemical anodization procedure, which has been meticulously optimized and described in our earlier reports [20–30].

The effectiveness of osteointegration and healing processes is the consequence of the nanostructured surface of the biomaterial, stimulating osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells [31–36]. This means that in order to osteointegration process be effective, biomaterials must have a promotional and osteoinductive effect on undifferentiated mesenchymal stem cells in the implant environment. They are the first cells colonizing the surface of the implanted material *in vivo* [37–39]. When an injury occurs and when a biomaterial is implanted, stem cells become activated and recruited to the injury site to support tissue repair. Therefore, biomaterial interactions with stem cells are critical for the long-term success of medical devices. In practice the most widely used source of stem cells is bone marrow and the stromal vascular fraction (SVF) of adipose tissue [40]. The collection procedure of bone marrow is painful and provides a limited amount of multipotent cells [41–43], however, the second collection procedure has gained more and more attention. SVF is the heterogeneous mixture, which contains many types of cells: fibroblasts, endothelial cells, adipocytes, blood cells, as well as adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) [36,44–46]. The latter ones expand easily in the cell culture and age slowly, having a multipotent differentiation capacity comparable to that of bone marrow stem cells [32,36,47–50]. Therefore, they are considered as one of the most promising sources of cells in tissue engineering to repair, replace, or regenerate tissues and organs damaged by diseases or injuries. The studies investigated the adhesion, proliferation, and differentiation of ADSCs on titania surfaces are relatively rare so far. Our earlier studies, which were carried out using nanofibrous titania coatings [51], as one of the few, showed that ADSC functionalizing the initially unfavorable surface prepare it for more demanding cells, and make it suitable for the cell growth. Obtained results mobilized us to look again at nanoporous, nanotubular, and nanosponge-like titania systems, which were characterized in details in terms of the structure, morphology and biointegrity with fibroblasts and osteoblasts [20–30], but this time in terms of their predisposition towards adhesion, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells of adipose origin. In our works, we have also tried to draw attention to the influence of surface coating architecture and its physicochemical properties on the effects mentioned above. Moreover, the aim of our research was to assess the possibility of *in vitro* co-cultures: (1) fibroblasts cell line L929/ADSC and (2) osteoblasts cell line MG-63/ADSCs on nanoporous, nanotubular, and nanosponge-like TiO₂ coatings. In this paper we describe conclusions concerning the interaction between the adipose-derived stem cells and produced TNT coatings, enriching the existing knowledge about the biointegrating properties of nanoporous, nanotubular, and nanosponge-like systems produced on the surface of a titanium alloy by its electrochemical oxidation.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of Titania Nanoporous, Nanotubular, and Nanosponge-Like Coatings

TNT coatings were produced based on previously optimized anodic oxidation procedure [20–22,24,25], using titanium alloy substrates (Ti6Al4V foil, grade 5, 99.7% purity, 0.20 mm thick (Strem Chemicals, Inc. (Bischheim, France), 6 mm × 60 mm pieces), 0.3% HF solution as a electrolyte, and potentials $U = 5$ V (TNT5), 15 V (TNT15), and 40 V (TNT40). The samples after 20 min of anodization were cleaned in deionized water and acetone using ultrasound, dried in an argon stream, and before biological experiments proceeding, sterilized by autoclaving, according to the previously described procedure [24].

2.2. Characterization of Titania Coatings

2.2.1. Morphological and Structural Evaluation

All samples surface morphologies were observed using a Quanta scanning electron microscope with field emission (SEM, Quanta 3D FEG, Huston, TX, USA). Additionally, the morphology and the structure of TiO₂ coatings were observed by conventional micrographs with transmission electron microscopy TEM (TEM; Tecnai F20 X-Twin, FEI Company, Portland, OR, USA). In order to check and to confirm the amorphousness of the systems, Raman spectroscopy ((Spectrometer RamanMicro 200 PerkinElmer (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) ($\lambda = 785$ nm)) has been used.

2.2.2. The Wettability and Surface Free Energy

The contact angle of studied samples was analysed with the use of the goniometer (DSA 10 Krüss GmbH, Hamburg, Germany) with drop shape analysis software (ADVANCE). To determine the free surface energy mathematical calculations using the Owens–Wendt method were applied [52]. The contact angle was measured using both polar liquid—distilled water and non-polar liquid—diiodomethane. On the surface of each sample (three samples from each series were examined) 3 μ L drops of polar liquid and 4 μ L drops of non-polar liquid were applied, then, immediately, the contact angle was measured and the average contact angle value for each series was calculated.

2.2.3. Nanomechanical Properties and Surface Roughness

The hardness, reduced Young's modulus and adhesion were performed using a nanoindenter (NanoTest Vanatage, Micro Materials, Wrexham, UK). A nanomechanical properties study was carried out using a pyramidal Berkovich diamond indenter with an apex angle equal to 124.4°. For all tested specimens (Ti6Al4V foil, TNT5–40) 25 independent measurements were performed, with maximum force 50 mN, the loading time 15 s, unloading time 10 s and dwell time with maximum force 5 s. The distance between the indentations was 20 μ m. After each measurement a thermal drift correction of 15 s was performed. The Oliver–Pharr method was used to calculate hardness (H) and reduced Young's modulus (Er). For converting reduced Young's modulus (Er) to Young's modulus (E) the Oliver–Pharr methods and a Poisson's ratio of 0.3 were used [51,53]. To determine the adhesion of surface coatings to the titanium substrate five independent nanoscratch tests on TNT5, TNT15, and TNT40 were performed. The applied force was 0–200 mN with a loading rate of 1.3 mN/s. The distance of nanoscratch-test was 500 μ m and distance between nanoscratch-tests was 200 μ m. The adhesion of the layers (Lc force) was based on suddenly, abrupt change in friction force (Lf force). Based on information from chart normal force (applied force during tests) in the function of friction forces, the critical force of delamination (Lc) and friction force during delamination (Lf) were determined.

The surface roughness was performing using atomic force microscopy (AFM, NaniteAFM, Nanosurf AG, Liestal, Switzerland) with mode without contact. For all tested specimens (Ti6Al4V foil and TNT5–40) the 512 independent lines were performed on 50×50 μ m 50 μ m × 50 μ m area with force 55 nN.

2.3. Biological Activity Studies of TNT Coatings

2.3.1. Cell Culture

Adipose-derived human mesenchymal stem cells (ADSCs) were purchased from PromoCell. The culture medium consisted of Mesenchymal Stem Cell Growth Medium® and 10% Supplement Mix® (PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany), with 100 IU/mL of penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), according to the manufacturer's protocol. The cells were passaged using 0.04% trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich) when reaching 70%–80% of confluency.

Human osteoblast-like MG 63 cells (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK, cat. no. 86051601) were cultured in Eagle's Minimum Essential Medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, MEM non-essential amino acid, 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin). All components were provided from Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany).

L929 murine fibroblast cells (American Type Culture Collection) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin). All cell lines were cultured at 37 °C in humidified atmosphere of 5% CO₂.

2.3.2. Cell Proliferation

3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assays were used to evaluate tested specimen's influence on the cell proliferation after 24 and 72 h. Firstly, we have studied the proliferation level of all three cell lines cultivated on the tested nanocoatings. ADSCs, MG-63 osteoblasts and L929 fibroblasts were seeded onto the autoclaved specimens at a density of 3×10^4 , 1×10^4 and 1×10^4 cells, respectively. The cells were cultured for 24 and 72 h. After incubation, 500 µL of MTT (5 mg/mL; Sigma-Aldrich) dissolved in PBS was added to each well, and the plates were incubated in a dark, at 37 °C, humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 3 h. Then, the scaffolds were placed in a new 24-well culture plate, 500 µL of DMSO was added to solubilize the formazan crystals, and absorbance was measured at 540 nm using a microplate reader (Synergy HT; BioTek, Winooski, VT, USA). The specimens incubated without cells was the blank groups.

In the next experiments, we examined the proliferation level of MG-63 and L929 cells co-cultured with ADSCs on the tested nanolayers. ADSCs were seeded on the specimens at a density of 3×10^4 cells/well and left for 4 h to adhere. Next, fibroblasts or osteoblasts at a density of 1×10^4 cells/well were seeded on the attached ADSCs and incubated for 24 and 72 h in a RPMI 1640 or EMEM medium, respectively. After incubation, the MTT assay was performed in the same manner as described above. In the co-culture system, the proliferation level of cells cultured on the Ti6Al4V sample was served as 100%.

2.3.3. Cell Morphology

The scanning electron microscopy (SEM; Quanta 3D FEG; Carl Zeiss, Göttingen, Germany) was used to analyse the morphology of ADSCs co-cultured with osteoblasts or fibroblasts growing on the specimens. After 24 or 72 h-lasting incubation, the scaffolds were fixed in 2.5% glutaraldehyde (Sigma Aldrich) followed by they were dehydrated in a graded series of ethanol concentration (50%, 75%, 90%, and 100%). Finally, the samples were dried and the SEM analysis was carried out.

2.3.4. Alkaline Phosphatase Activity

The activity of alkaline phosphatase (ALP) was examined for ADSCs co-cultured with osteoblasts or L929 fibroblasts on the surface of tested nanolayers. After 24 h and 72 h of co-culture under optimal conditions, the cells were lysed with pre-warmed lysis buffer containing 1% TX-100. The obtained samples were centrifuged at $3000 \times g$, 5 min, and supernatants (lysates) were collected. To aliquotes of 300 µL sample, the same volume of 4 mM p-nitrophenylphosphate in Tris-HCl buffer pH 9.0 was

added. After 60 min incubation the reaction was stopped with 1% NaOH and liberated p-nitrophenol was measured spectrophotometrically at 405 nm. The protein content in each sample was measured by Bradford assay. That allowed calculating the specific activity of ALP.

2.3.5. Statistical Analysis

The values from MTT assays are presented as mean \pm SEM. Statistically significant differences among groups were identified by one-way ANOVA with post-hoc Kruskal–Wallis test using GraphPad Prism 7.0 (La Jolla, CA, USA). A p value of less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. TNT Coatings Selected to Biological Experiments; Synthesis, Morphology, and Structure Characterization.

Three morphologically different types of TNT coatings formed on the surface of Ti6Al4V alloy substrates in conditions previously reported [20–22,24,25], have been selected to biological experiments, i.e. nanoporous (TNT5), nanotubular (TNT15) and nanosponge-like (TNT40) coatings. Scanning electron microscopy (SEM) imaging proved their morphology (Figure 1). Analysis of these data revealed that nanoporous coating (TNT5), of pore diameters 15–30 nm, uniformly covers the entire substrate surface well capturing its shape. The use of higher potentials in the anodization process ($U = 15, 40V$) led to the separation of nanotubes and simultaneously to even the surface of the substrate. The TNT15 and TNT40 coatings consist of tubes of diameter 35–65 nm and 120 ± 10 nm respectively, however, in the last case analysis of SEM images showed the formation of additional, smaller pores and tubes inside greater tubes, resembling nanosponge-like architecture (Figure 1). These three TNT coatings types showed, as expected, an amorphous character, which was confirmed by Raman spectroscopy (Figure S1) and TEM measurements (Figure S2) [54–58].

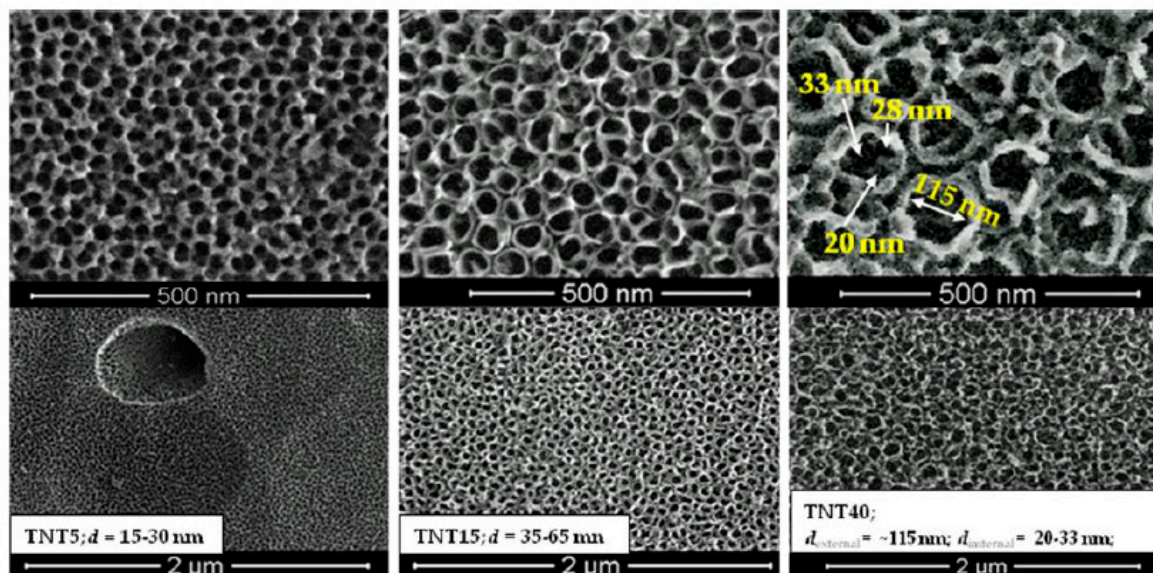


Figure 1. Differences in surface morphology of nanoporous (TNT5), nanotubular (TNT15), and nanosponge-like (TNT40) coatings produced on Ti6Al4V substrates by anodic oxidation method.

3.2. The Wettability and Surface Free Energy

Data presented in Table 1 revealed that surfaces of TNT5 and TNT15 samples indicated the clear hydrophobic character, as the contact angle (Θ) of water in both cases was greater than 90 degrees. The surface of the TNT40 coating showed less hydrophobic character and wettability close to Ti6Al4V sample (Table 1). The free surface energy (SFE) of the produced coatings was calculated using Owens–Wendt method [52]. This method required the contact angles be measured for polar liquid

(water) and dispersion liquid (diiodomethane) (Table 1). SFE calculations showed that their values change in the narrow range. As the pore diameter increases, the surface energy firstly increases from 47.8 (mJ/m²) for TNT5 up to 61.4 (mJ/m²) for TNT15 and then decreases to 47.7 (mJ/m²) for TNT40.

Table 1. Results of contact angle and surface free energy (SFE) measurements; contact angles were measured three times using distilled water and diiodomethane and the SFE was determined using the Owens–Wendt method [52].

Biomaterial Sample	Average Contact Angle (Θ) [°] ± Standard Deviation		Surface Free Energy ± Standard Deviation [mJ/m ²]
	Measuring Liquid		
	Water	Diiodomethane	
Ti6Al4V	81.3 ± 0.2	49.2 ± 0.9	38.5 ± 0.3
TNT5	94.4 ± 0.4	22.4 ± 1.0	47.8 ± 0.3
TNT15	123.3 ± 0.1	31.5 ± 0.7	61.4 ± 0.3
TNT40	85.3 ± 0.9	18.5 ± 0.8	47.6 ± 0.3

3.3. Nanomechanical Properties and Surface Topography

The changes in nanomechanical properties of studied coatings, such as hardness, Young's modulus, and H/E and H³/E² coefficients, are shown in Figure 2. The H/E ratio is associated with wear resistant of tested materials and was not tested before. The H³/E² ratio can be used to describe the resistance of the material to plastic deformation, which can be associated with resistant to cracks [59,60]. The highest value of hardness and Young's modulus were obtained for reference Ti6Al4V foil (10.94 ± 1.42 GPa and 212.48 ± 16.69 GPa, respectively). A significant decrease in both values H and E was found for all the tested modifications. The obtained measurement uncertainties testify to the correctness of the tests performed. Performing 25 measurements using a low value of force on the material with the morphology shown on Figure 1 may associate with obtaining a result with a large standard deviation. The decrease in mechanical properties due to modification of the surface of the Ti6Al4V foil in the case of materials intended for load-bearing implants is a positive phenomenon. The results obtained for the TNT5/TNT15/TNT40 group are similar to each other. The significant difference between hardness and Young's modulus value for Ti6Al4V foil is the result of low values of determined parameters (0.0513 ± 0.0034 and 0.0294 ± 0.0078 GPa). In the case of coatings TNT5/TNT15/TNT40 an increase in parameters was observed compared to the reference Ti6Al4V foil, which confirms the positive impact of used modifications.

The nanoscratch-test results were performed on Figure 3. The results correlate with values H/E and H³/E² ratios. For studied specimens the adhesion of layers was very similar and did not differ significantly, however, TNT15, for the sake of a well-organized nanotubular architecture, shows the highest adhesion of the tested systems.

The surface topography of modified TNT5/TNT15/TNT40 specimens and their surface roughness parameters (Sa) value determined by atomic force microscopy are presented on Figure 4. The surface roughness of specimens after modification (TNT5-40) increased compared with reference Ti6Al4V, for which Sa value has been estimated as 0.03 μm. The results correlate with the results presented in the SEM pictures (Figure 1), where three different morphologies of nanotubes were obtained. The largest increase in roughness relative to the reference sample was observed for the TNT5 sample. An increase in voltage during the oxidation process initially resulted in a decrease in roughness, followed by its increase.

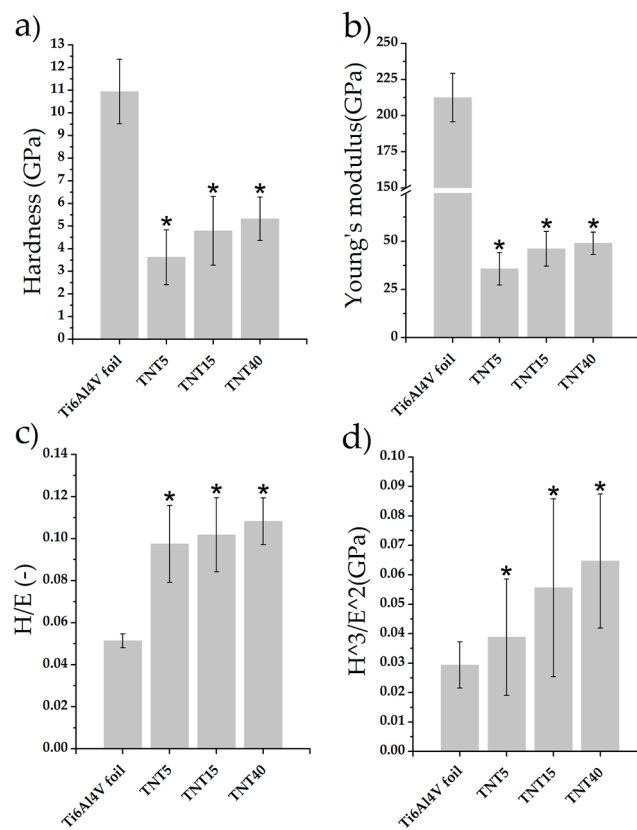


Figure 2. The nanomechanical properties: nanohardness (a), Young’s modulus (b), H/E ratio (c) and H^3/E^2 (d) of tested reference Ti6Al4V foil, TNT5, TNT15, and TNT40 specimens. Data are presented as the mean \pm SD. Asterisks indicate significant differences to the reference specimen Ti6Al4V foil ($* p < 0.05$; ANOVA with Tukey post hoc correction).

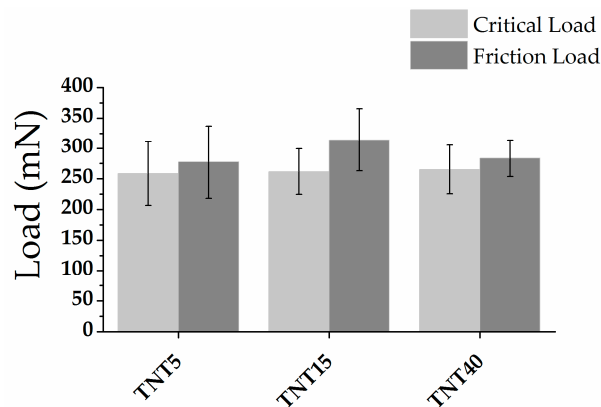


Figure 3. The nanoscratch-test results (critical load and friction load) of tested TNT5, TNT15, and TNT40 specimens.

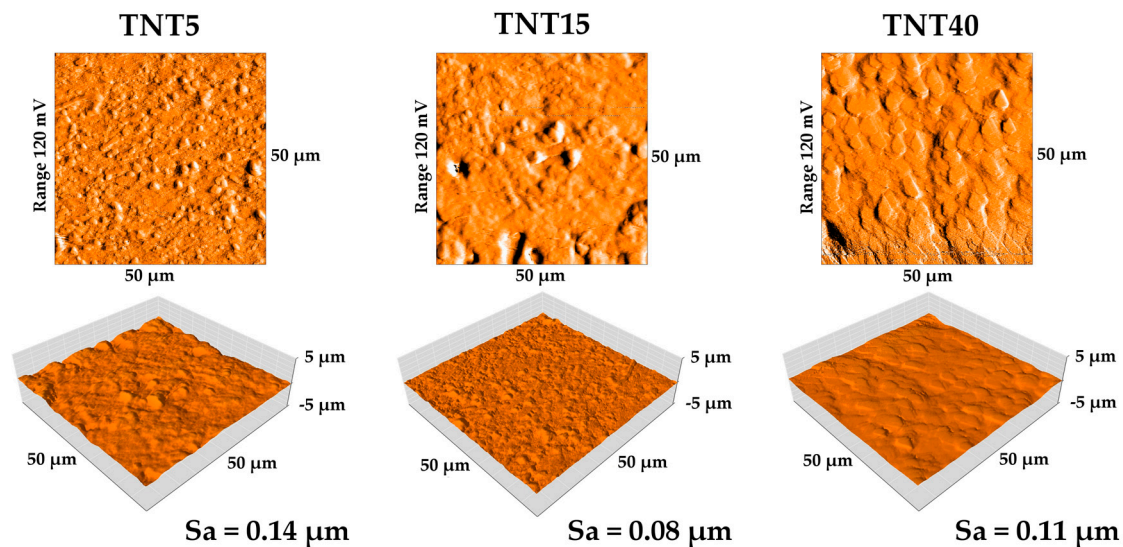


Figure 4. AFM topography of TNT5, TNT15, and TNT40 coatings with Sa parameter values.

3.4. Proliferation Level of Cells Growing on TNT Coatings

Cell proliferation level on the TNT coatings, which revealed the different nanoarchitectures, was evaluated for three cell lines: ADSCs, L929 fibroblasts, and MG-63 osteoblasts after 24 and 72 h of incubation time. All studied TNT coatings proved to be beneficial for adipose-derived stem cells' viability, in short-term culture. The proliferation level increased by over 50% after 24 h of culture can be explained with accelerated adhesion on the biocompatible surface and resulting higher proliferation level. However, three-day cultures resulted in decreased proliferation or similar to control titanium foils. This may be due to the limitation of the available scaffold surface and the formation of a confluent cell monolayer. It can be also assumed that TNT-modified scaffolds provoked differentiation of ADSCs that is always simultaneous with decreased proliferation level (Figure 5)

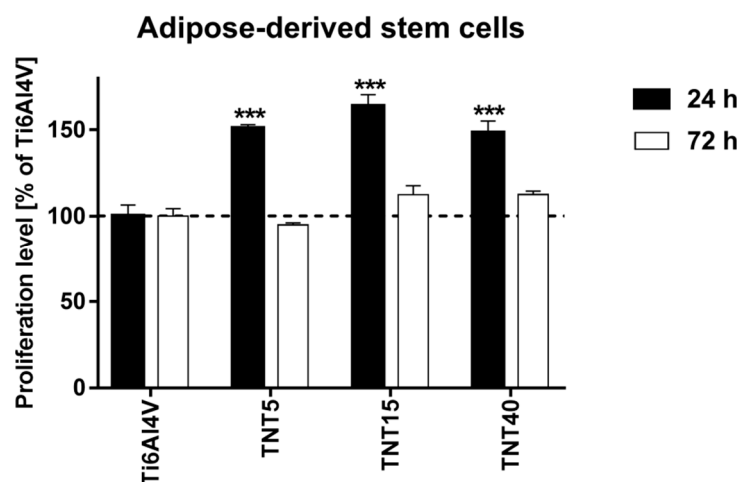


Figure 5. Proliferation level (measured after 24 and 72 h using MTT assays) of adipose-derived mesenchymal stem cells cultured on the TNT coatings compared with the reference Ti6Al4V alloy foils, which was served as 100%. Data are shown as mean \pm SEM of four independent experiments. Asterisks indicate differences between the cells growing on the tested specimens in comparison with Ti6Al4V samples. (***) $p < 0.001$. The horizontal line shows the cell proliferation level cultured on the Ti6Al4V.

All studied TNT coatings provoked also a greater proliferation of L929 fibroblasts as well as MG-63 osteoblasts both after 24 h and 72 h (Figure 6A,B). In the case of L929 fibroblasts, the values

measured for the nanolayers were in a range of 114.3%–124.5% after 24 h, and not less than 136% of the reference samples after 72 h. Analysis of MG-63 osteoblasts viability revealed that the proliferation rate of the tested samples was in a range of 125.7%–140.1% after 24 h, and 136.1%–154.6% after 72 h. In the separate study, we measured the proliferation response of fibroblasts and osteoblasts co-cultured with ADSCs on the surface of TNT coatings. As it can be seen in Figure 6C,D, all tested scaffolds induced significant increase in the proliferation rate of L929 fibroblasts (Figure 6C) as well as MG-63 osteoblasts (Figure 6D) co-cultured with ADSCs. This effect was observed both after 24 h and 72 h. The greatest cell proliferation level was noticed for TNT5 specimens. For these samples, the viability of L929 fibroblasts co-cultured with ADSCs reached values $140.6 \pm 2.9\%$ and $145.3 \pm 3.2\%$ after 24 h and 72 h, respectively, while the proliferation level of MG-63 osteoblasts co-cultivated with ADSCs was $134.6 \pm 3.5\%$ and $181.0 \pm 4.2\%$, respectively.

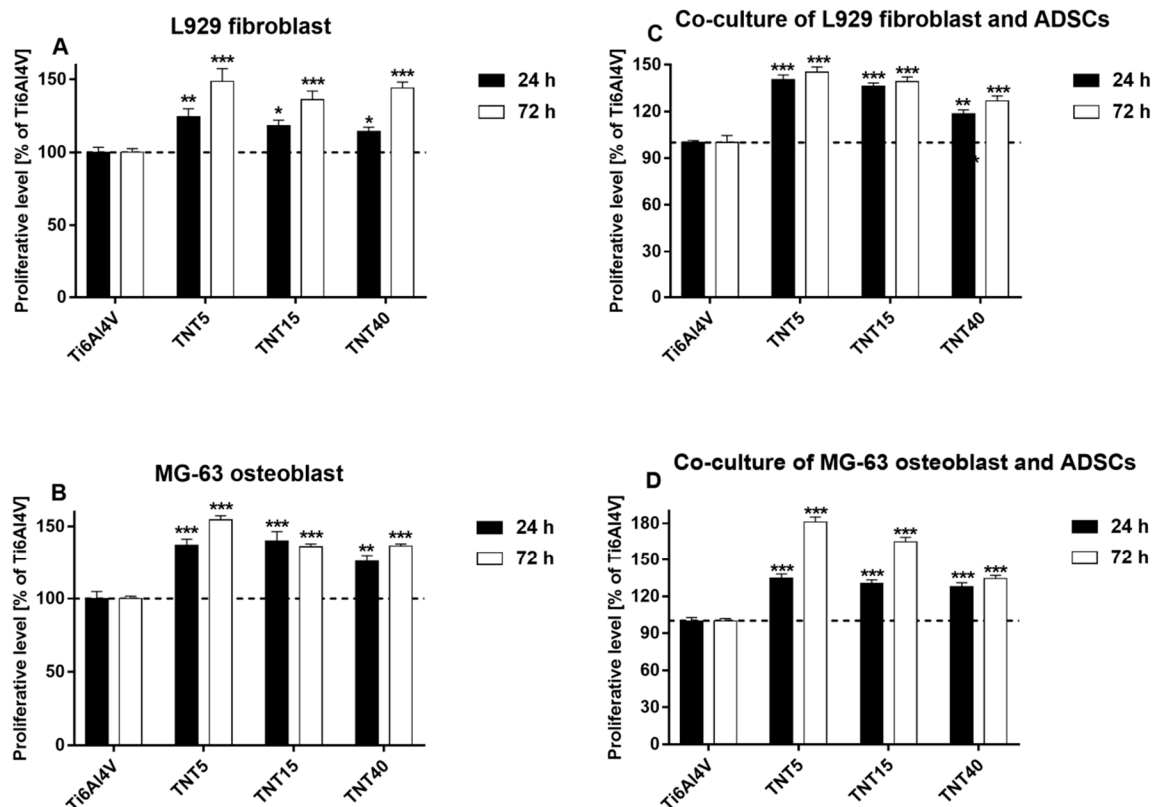


Figure 6. Proliferation level of L929 fibroblasts (A) and MG-63 osteoblasts (B) cultured on the surface of titania nanoporous (TNT5), nanotubular (TNT15) and nanosponge-like (TNT40) coatings compared with the reference Ti6Al4V samples. Figures (C,D) show proliferation level of the both cell lines co-cultured with adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs). Cells were cultivated for 24 and 72 h, and cell viability was measured using MTT assay. The results are expressed as percentage of the cells cultivated (A–B) or co-cultured with ADSCs (C–D) on the reference Ti6Al4V samples (served as 100%). Data are shown as mean \pm SEM of four independent experiments. (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, and were considered statistically significant compared to the cells growing on the Ti6Al4V samples.

3.5. Morphology of Cells Culture on TNT Coatings

Figure 7 presents SEM micrographs of human mesenchymal stem cells (ADSCs; A,B), ADSC co-cultured with L929 fibroblasts (C,D) or ADSC co-cultured with MG-63 osteoblasts (E,F) on the TNT nanocoatings. Regarding the examination by SEM, it was observed that ADSCs formed filopodia (see white arrows in Figure 7A), which effectively attached the cells to the scaffolds surface. Importantly, ADSC had a typical, spindle shape and grew evenly on the entire surface of the nanocoatings (Figure 7B).

ADSCs also produced the extracellular matrix when they were cultured on the scaffolds alone or co-cultured with MG-63 osteoblasts. L929 fibroblasts co-cultured with ADSCs also had an elongated shape and they were dividing (Figure 7C,D), indicating their good viability and vitality. The divisions of MG-63 osteoblasts co-cultivated with ADSCs were also observed (Figure 7E,F).

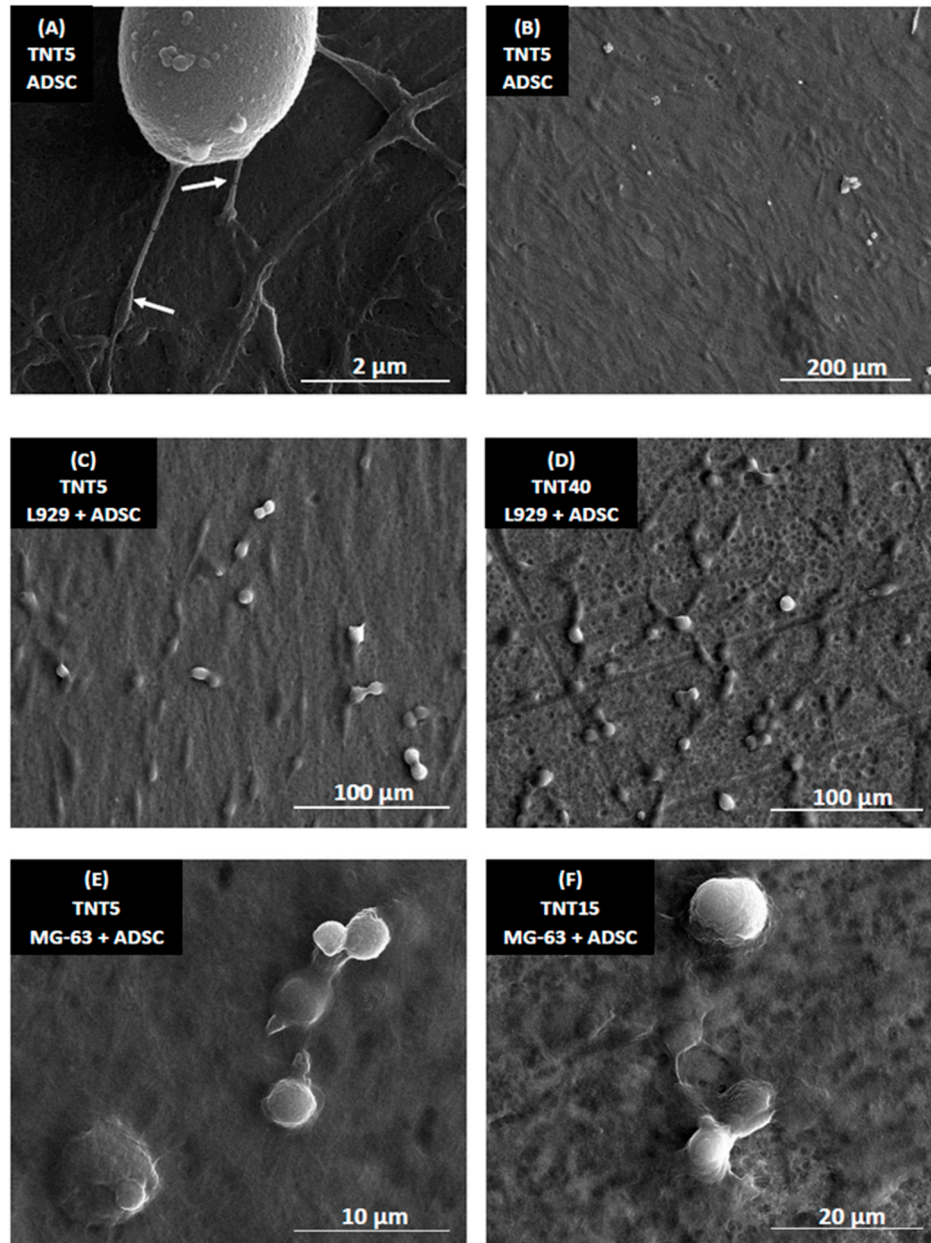


Figure 7. Scanning electron microscopy (SEM) micrographs presenting adipose-derived human mesenchymal stem cells (ADSCs; **A,B**), ADSCs co-cultured with L929 fibroblasts (**C,D**) or ADSCs co-cultured with MG-63 osteoblasts (**E,F**) on the TNT nanocoatings. SEM micrographs present the cells after 72 h of culture. Arrows in image A indicate filopodia, attaching ADSCs to the surface. Specimens' names and scales of the images were presented in the figures.

3.6. Alkaline Phosphatase Activity

The osteogenic differentiation of ADSCs co-cultures was assessed on the basis of measurement ALP activity normalized to total protein content after 24 and 72 h. Figure 8 presents the comparison of ALP activity measured for fibroblasts or osteoblasts co-cultured with ADSCs on the TNT nanocoatings

compared with Ti6Al4V references samples. The ALP activity of L929 cells co-cultured with ADSCs decreased over time (Figure 8A). However, the cells cultivated on TNT coatings still had higher ALP activity than those cultured on reference Ti6Al4V samples. What is more important is that titania nanoporous (TNT5) and nanotubular (TNT15) samples provoked a higher ALP activity over time in MG-63 osteoblasts co-cultured with ADSCs. Particularly, only TNT15 specimens induced the significantly higher ALP activity in osteoblasts co-cultured with ADSCs compared with control samples.

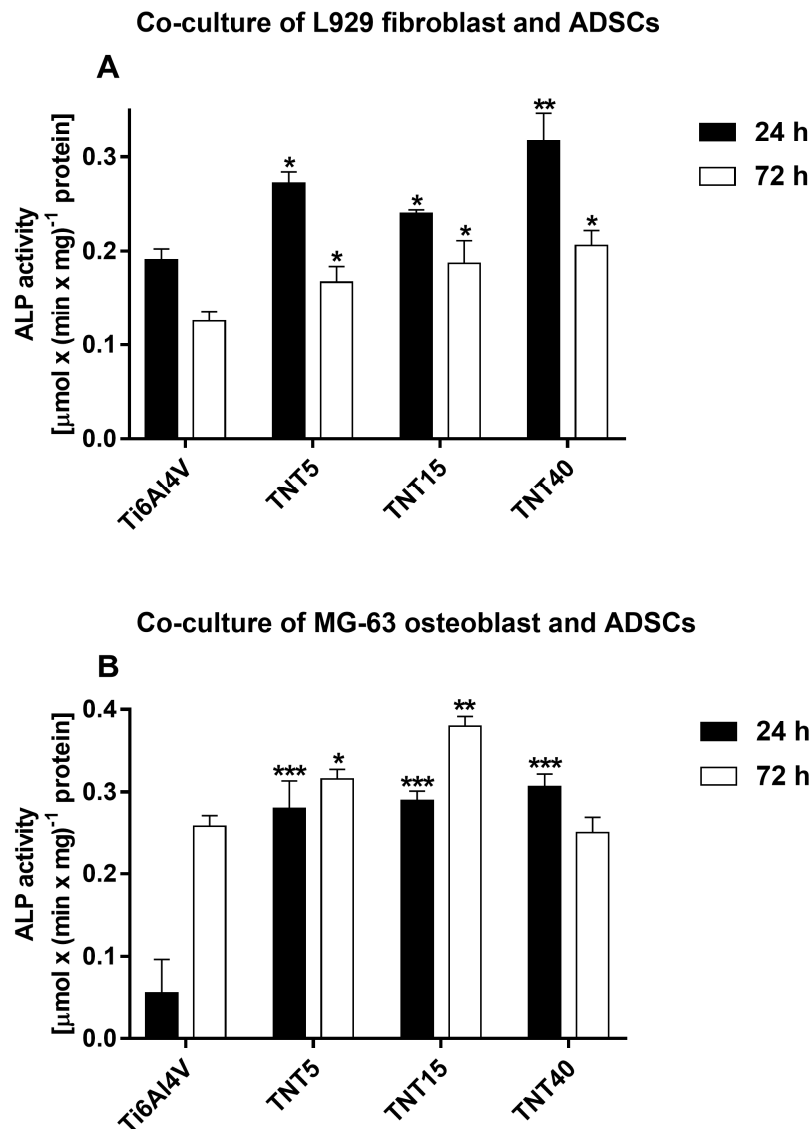


Figure 8. Alkaline Phosphatase (ALP) activity of L929 fibroblasts (A) and MG-63 osteoblasts (B) co-cultured with adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs). ALP activity [$\mu\text{mol} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}$ protein] was expressed as means \pm SEM. Asterisks indicate significant differences between the cells growing on the titania nanoporous (TNT5), nanotubular (TNT15) and nanosponge-like (TNT40) coatings compared with Ti6Al4V references sample at the appropriate incubation time (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

4. Discussion

The optimization of stem cells culture conditions and their growth on the implant surface is important issue, which must be taken into account, when titanium or its alloys are surface modified in order to increase their biocompatibility and bioactivity. The chemical surface specificity, e.g., wettability, topography (i.e., pore/tube size, arrangement), roughness, and mechanical properties,

are crucial for the characterization of the studied surface and for the estimation of the relationship between the above-mentioned properties and the biocompatibility and bioactivity of the material. According to Roach et al, the surface wettability affects the ability of adhesive proteins to bind to the surface of the substrate, which is associated with the bonding of smaller proteins that reach the surface faster, detaching them and replacing with larger ones [61]. The results of Comelles et al. studies exhibited that the hydrophobicity of the surface may promote cell adhesion in the initial stage, which can be thermodynamically confirmed [62]. According to these reports, in the aqueous environment, the polar groups of proteins are directed outside, while non-polar groups are directed inside the molecule. Near the surface with hydrophobic properties, protein molecules change their conformation by directing their non-polar groups outwards (towards the surface of the substrate). During protein adsorption to the substrate, both the material surface and the protein molecule undergo at least partial dehydration, which occurs most easily, for hydrophobic systems. However, their further proliferation is easier on more hydrophilic surfaces [62]. The data presented in Table 1 and Figure 5 confirms this. The differences in hydrophobicity of studied TNT coatings cause that stem cell adhesion (after 24 h) on TNT15 ($\Theta = 123.3 \pm 0.1^\circ$) was greater and is reduced for TNT5 ($\Theta = 94.4 \pm 0.4^\circ$) and TNT40 ($\Theta = 85.3 \pm 0.9^\circ$). Due to the fact that further division and multiplication of stem cells occurs more easily on more hydrophilic surfaces, after 72 hours we observe a reduction the number of stem cells on the surface of all tested TNT coatings.

The surface topography is another factor directly influencing the stem cell adhesion and the formation of stable bonds with the implant surface [61]. Topography of the cell influences the ability of the cells to adhere, their morphology, orientation in space, division, and their differentiation. Surface roughness, size, and shape of pores/tubes directly influence the cell adhesion and proliferation [63]. Yang et al. showed that the cells linking only to the surface have contact with a small fragment of the surface, therefore the TNT coatings composed of large diameter tubes (TNT40) are treated by cells as completely smooth similarly, when the pore diameter is very small (TNT5, Figure 1). In such case, the layer of proteins makes it virtually unrecognizable for cells [64]. Surface roughness is closely related to the surface morphology of the substrate. Cell adhesion is more difficult on smoother surfaces due to the smaller actual surface than in the case of rough substrates [65]. In experiments, in which the behavior of osteoblasts and fibroblasts on surfaces with different roughness was compared, it was shown that they prefer substrates with different roughness [66]. According to this research, osteoblasts prefer surfaces with high roughness, their division occurs much faster in such conditions than on smooth surfaces [66]. Contrary, fibroblasts multiply on smooth surfaces [67]. A common effect is a decrease in cell flattening as the surface roughness increases [66,68]. The reason for this phenomenon can be spatial restrictions on rough surfaces, as well as the fact that on smooth surfaces cells need to attach to more points on the substrate to be able to stay adhered [66].

In the case of modifications used for long-term implants, surface roughness is a significant surface parameter. The AFM technique is commonly used to assess surface roughness [60,69,70]. It was found that roughness' increase had a positive influence on cell proliferation, including osteoblasts [71,72]. It can also determine an increase to bacterial adhesion and proliferation [73], and bacterial infections are one of the main problems of modern implantology [74]. In the presented studies, the modification caused an increase in surface roughness and studies using fibroblasts and osteoblast correlate with the results of AFM causing an increase in cell proliferation with an increase in the Sa parameter. The highest proliferation was obtained for the TNT5 sample, for which the determined roughness was the highest. Antibacteria studies are not the the subject of this publication, however it is worth emphasizing here that in the case of titanium dioxide nanotubes, their natural antibacterial and antifungal properties have been proven and described in our earlier articles [21,22] and in other author's works [73,75]. Antibacterial additives such as silver were also used to increase properties of titania coatings [27–30].

Regarding the examination by SEM, it was observed that ADSC cells had a typical spindle shape and grew evenly on the entire surface of the nanocoatings. Importantly, ADSCs formed filopodia, which effectively attached the cells to the scaffolds surface despite its hydrophobic nature. It can be

concluded that the nanoporous surface is favorable for ADSCs. It should be also noted that bone tissue contains a large number of nanoscale components, therefore, it is beneficial to create an implant surface which imitate this nanoarchitectural hierarchy [76]. ADSCs cells cultured on the scaffolds alone or co-cultured with MG-63 osteoblasts also produced extracellular matrix thus functionalizing the nanocoatings.

Additionally, MG-63 osteoblasts co-culture with ADSCs indirectly confirmed our assumptions that TNT-modified scaffolds provoked osteogenic differentiation of ADSCs. The total number of osteoblasts seeded and cultured with ADSCs on TNT5 surface raised after 72-h culture almost twice when compared with unmodified scaffold and by 30% when compared with MG-63 cells growing alone. We observe the synergistic effect of improving the surface adhesive properties and creating an osteogenic niche for cultured cells. The results based on MTT assay, were partially confirmed by alkaline phosphatase (ALP) activity measurement. ALP activity is mostly used as a marker of early osteoblast differentiation and this enzyme is a byproduct of osteoblast activity, the increased level referring to active bone formation. As can be seen in Figure 8, the ALP activity of L929 cells co-cultured with ADSCs decreased, while activity of MG-63 osteoblasts co-cultured with ADSCs increased over time. Titania nanoporous (TNT5) and nanotubular (TNT15) samples provoked a higher ALP activity and particularly, TNT15 specimens induced the significantly higher ALP activity in comparison with Ti6Al4V alloy foils. More specific molecular tests are required to prove that hypothesis and the direction of differentiation process. We suppose that beside the stimulatory effect on osteoblasts activity, also the limitation of the free available surface and the formation of confluent cell monolayer occur.

The adhesion of the layer to the titanium substrate is also important factor determining the potential application of modifications on the implant. Forces occurring during the implantation procedure and during subsequent use of the implant in the body can lead to the destruction of poorly adhesive layers. It has been proven that parts of damaged surface modifications can lead to inflammation in the tissues surrounding the implant [77]. Studies on the adhesion of titanium dioxide nanotube layers do not clearly define their adhesive properties. In a study by von Wilmsowky et al. [78] the good adhesion of the nanotubular dioxide layers was confirmed. On the other hand, Kim et al. proved the poor adhesive properties of TiO₂ [79]. In the presented studies it was proved that the density of packing and porosity of the layer have not a significant influence on the adhesion. Layers with well-organized nanotubular architecture (TNT15) were characterized with the highest adhesion but the differences between the tested specimens were not significant. According the nanoindentation test and nanoscratch-test study specimens TNT15 is the most suitable modification for applications on implant surfaces.

For materials intended for long-term implants, such as titanium alloys, materials should be designed with good mechanical properties but as close as possible to those of surrounding tissues, mainly bones. Numerous studies have confirmed that too much difference between mechanical properties (mainly Young's modulus) of implant and bone can lead "shielding effect" and consequently bone lose and even loosening of such an implant [80–82]. The Young's modulus of cortical human bone is 10–30 GPa [79]. A positive effect of the modification was observed for all surfaces tested, because their properties are significantly more similar to those of bones. The most similar value of Young's modulus to bone was obtained for the TNT5 sample (37.88 ± 8.70 GPa), unfortunately this sample also characterized by the lowest nanoindentation properties, wear and cracks resistant which may precludes the use of this modification on long-term implants. The differences in the morphology of the obtained nanotube layer have an impact on nanomechanical properties. Earlier studies have confirmed the impact of nanotube length and width on nanomechanical properties [29]. The presented studies show a clear trend of the impact of voltage increase on the obtained nanomechanical properties. The increase in voltage causes an increase in nanomechanical properties, which is probably associated with a large change in the morphology of the obtained modifications. Coy et al. [59] reported that the value of the H^3/E^2 parameter for "hard" coatings should be greater than 0.1, and sometimes even just 0.05. In the present study all tested coating had a higher value.

5. Conclusions

The multiannual studies on biomaterials led to the conclusion that during the designing of modern implants, the interactions occurring on the macro-, micro-, and nanoscale on the interface between the living tissue and a biomaterial should be considered. Therefore, besides the bulk physicochemical properties of the material used, which dictate its mechanical and physical properties, the surface properties of the material, especially structure, chemistry (i.e., wettability) and topography must also be taken into account in order to direct a desired cellular response. The expected effects are not always achieved in terms of chemical, biological and mechanical properties. However, optimal properties should be sought, and our research allows us to conclude about the high usefulness of TNT5 coatings. Furthermore, it confirms our extensive previous research, indicating this coating as the most biocompatible, not causing cytotoxic and genotoxic effects and bioactive microbiocidal [20–30,83]. The fact, that TNT5 possessed the most similar value of Young's modulus to bone, and that on this coating the number of osteoblasts seeded and co-cultured with ADSCs rose after 72 h culture almost twice when compared with unmodified scaffold and by 30% when compared with MG-63 cells growing alone, together with the ability to provoke a higher ALP activity, allows to state that this system has high application potential in modern implantology.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1996-1944/13/7/1574/s1>, Figure S1: Raman spectra of nanoporous (TNT5), nanotubular (TNT15), and nanosponge-like (TNT40) titania coatings (A—anatase, R—rutile), Figure S2. TEM image (a), HRTEM image (b) and the SAED patterns of TNT15 (c).

Author Contributions: Conceptualization: A.R. and P.P.; methodology: A.R. and P.P.; formal analysis: A.R., P.P., M.E., K.R., T.J., and M.B.; investigation: M.E., K.R., T.J., and M.B.; writing—original draft preparation: A.R., P.P., M.E., K.R., T.J., and M.B.; writing—review and editing: A.R. and P.P.; supervision: A.R. and P.P.; funding acquisition: A.R. and P.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Ministry of Science and Higher Education and Nano-implant Ltd., within Implementation PhD studies of Michalina Ehlert. The APC was waived by MDPI.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Roach, P.; Eglin, D.; Rohde, K.; Perry, C.C. Modern biomaterials: A review—Bulk properties and implications of surface modifications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18*, 1263–1277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Kaur, M.; Singh, K. Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *102*, 844–862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Navarro, M.; Michiardi, A.; Castano, O.; Planell, J. Biomaterials in orthopaedics. *J. R. Soc. Interface* **2008**, *5*, 1137–1158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Rehman, M.; Madni, A.; Webster, T.J. The era of biofunctional biomaterials in orthopedics: What does the future hold? *Expert Rev. Med. Devices* **2018**, *15*, 193–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Geetha, M.; Singh, A.K.; Asokamani, R.; Gogia, A.K. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants—A review. *Prog. Mater. Sci.* **2009**, *54*, 397–425. [[CrossRef](#)]
6. Liu, X.; Chu, P.K.; Ding, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **2004**, *47*, 49–121. [[CrossRef](#)]
7. Swami, N.; Cui, Z.; Nair, L.S. Titania nanotubes: Novel nanostructures for improved osseointegration. *J. Heat Transf.* **2011**, *133*. [[CrossRef](#)]
8. Minagar, S.; Berndt, C.C.; Wang, J.; Ivanova, E.; Wen, C. A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 2875–2888. [[CrossRef](#)]
9. Kodama, A.; Bauer, S.; Komatsu, A.; Asoh, H.; Ono, S.; Schmuki, P. Bioactivation of titanium surfaces using coatings of TiO₂ nanotubes rapidly pre-loaded with synthetic hydroxyapatite. *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 2322–2330. [[CrossRef](#)]
10. Veronovski, N. TiO₂ Applications as a Function of Controlled Surface Treatment. In *Titanium Dioxide—Material for a Sustainable Environment*; Yang, D., Ed.; IntechOpen Ltd.: London, UK, 2018; Volume 21, pp. 421–443.

11. Mydin, R.B.S.M.N.; Hazan, R.; FaridWajidi, M.F.; Sreekantan, S. Titanium Dioxide Nanotube Arrays for Biomedical Implant Materials and Nanomedicine Applications. In *Titanium Dioxide—Material for a Sustainable Environment*; Yang, D., Ed.; IntechOpen Ltd.: London, UK, 2018; Volume 23, pp. 469–483.
12. Sulka, G.D.; Kapusta-Kołodziej, J.; Brzózka, A.; Jaskuła, M. Fabrication of nanoporous TiO₂ by electrochemical anodization. *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 4359–4367. [[CrossRef](#)]
13. Saharudin, K.A.; Sreekantan, S.; Aziz, S.N.Q.A.A.; Hazan, R.; Lai, C.W.; Mydin, R.B.S.M.N.; Mat, I. Surface modification and bioactivity of anodic Ti6Al4V alloy. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2013**, *13*, 1696–1705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Saharudin, K.A.; Sreekantan, S.; Mydin, R.B.S.N.M.; Basiron, N.; Krengvirat, W. Factor Affecting Geometry of TiO₂ Nanotube Arrays (TNAs) in Aqueous and Organic Electrolyte. In *Titanium Dioxide—Material for a Sustainable Environment*; Yang, D., Ed.; IntechOpen Ltd.: London, UK, 2018; Volume 6, pp. 117–130.
15. Macak, J.M.; Tsuchiya, H.; Ghicov, A.; Yasuda, K.; Hahn, R.; Bauer, S.; Schmuki, P. TiO₂ nanotubes: Self-organized electrochemical formation, properties and applications. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2007**, *11*, 3–18. [[CrossRef](#)]
16. Mor, G.K.; Varghese, O.K.; Paulose, M.; Shankar, K.; Grimes, C.A. A review on highly ordered, vertically oriented TiO₂ nanotube arrays: Fabrication, material properties, and solar energy applications. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* **2006**, *90*, 2011–2075. [[CrossRef](#)]
17. Wang, Q.; Huang, J.Y.; Li, H.Q.; Chen, Z.; Zhao, A.Z.J.; Wang, Y.; Zhang, K.Q.; Sun, H.T.; Al-Deyab, S.S.; Lai, Y.K. TiO₂ nanotube platforms for smart drug delivery: A review. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 4819–4834.
18. Jonášová, L.; Müller, F.A.; Helebrant, A.; Strnad, J.; Greil, P. Biomimetic apatite formation on chemically treated titanium. *Biomaterials* **2005**, *25*, 1187–1194. [[CrossRef](#)]
19. Hayakawa, S.; Okamoto, K.; Yoshioka, T. Accelerated induction of in vitro apatite formation by parallel alignment of hydrothermally oxidized titanium substrates separated by sub-millimeter gaps. *J. Asian Ceram. Soc.* **2019**, *7*, 90–100. [[CrossRef](#)]
20. Radtke, A.; Piszczek, P.; Topolski, A.; Lewandowska, Ż.; Talik, E.; Hald Andersen, I.; Nielsen, L.P.; Heikkilä, M.; Leskelä, M. The structure and the photocatalytic activity of titania nanotube and nanofiber coatings. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *368*, 165–172. [[CrossRef](#)]
21. Radtke, A.; Topolski, A.; Jędrzejewski, T.; Kozak, W.; Sadowska, B.; Wieckowska-Szakiel, M.; Piszczek, P. Bioactivity Studies on Titania Coatings and the Estimation of Their Usefulness in the Modification of Implant Surfaces. *Nanomaterials* **2017**, *7*, 90. [[CrossRef](#)]
22. Radtke, A.; Topolski, A.; Jędrzejewski, T.; Sadowska, B.; Więckowska-Szakiel, M.; Szubka, M.; Talik, E.; Nielsen, L.P.; Piszczek, P. Studies on the bioactivity and photocatalytic properties of titania nanotube coatings produced with the use of the low potential anodization of Ti6Al4V alloy surface. *Nanomaterials* **2017**, *7*, 197. [[CrossRef](#)]
23. Radtke, A.; Bal, M.; Jędrzejewski, T. Novel titania nanocoatings produced by the anodic anodization with the use of the cyclically changing potential; their photocatalytic activity and biocompatibility. *Nanomaterials* **2018**, *8*, 712. [[CrossRef](#)]
24. Radtke, A.; Ehlert, M.; Bartmański, M.; Jędrzejewski, T. The morphology, structure, mechanical properties and biocompatibility of nanotubular titania coatings before and after autoclaving process. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 272. [[CrossRef](#)]
25. Radtke, A. Photocatalytic activity of nanostructured titania films obtained by electrochemical, chemical, and thermal oxidation of Ti6Al4V alloy—Comparative analysis. *Catalysts* **2019**, *9*, 279. [[CrossRef](#)]
26. Radtke, A.; Ehlert, M.; Jędrzejewski, T.; Sadowska, B.; Więckowska-Szakiel, M.; Holopainen, J.; Ritala, M.; Leskela, M.; Bartmański, M.; Szkodo, M.; et al. Titania Nanotubes/Hydroxyapatite Nanocomposites Produced with the Use of the Atomic Layer Deposition Technique: Estimation of Bioactivity and Nanomechanical Properties. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Radtke, A.; Jędrzejewski, T.; Kozak, W.; Sadowska, B.; Więckowska-Szakiel, M.; Talik, E.; Mäkelä, M.; Leskelä, M.; Piszczek, P. Optimization of the silver clusters PEALD process on the surface of 1-D titania coatings. *Nanomaterials* **2017**, *7*, 193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Piszczek, P.; Lewandowska, Ż.; Radtke, A.; Jędrzejewski, T.; Kozak, W.; Sadowska, B.; Szubka, M.; Talik, E.; Fiori, F. Biocompatibility of Titania Nanotube Coatings Enriched with Silver Nanograins by Chemical Vapor Deposition. *Nanomaterials* **2017**, *7*, 274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

29. Radtke, A.; Grodzicka, M.; Ehlert, M.; Muzioł, T.; Szkodo, M.; Bartmański, M.; Piszczek, P. Studies on silver ions releasing processes and mechanical properties of surface-modified titanium alloy implants. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3962. [[CrossRef](#)]
30. Radtke, A.; Grodzicka, M.; Ehlert, M.; Jędrzejewski, T.; Wypij, M.; Golińska, P. “To be microbiocidal and not to be cytotoxic at the same time . . . ”—Silver nanoparticles in their main role on the surface of titanium alloy implants. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 334. [[CrossRef](#)]
31. Marini, F.; Luzi, E.; Fabbri, S.; Ciuffi, S.; Sorace, S.; Tognarini, I.; Galli, G.; Zonefrati, R.; Sbaiz, F.; Brandi, M.L. Osteogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on nanostructured Ti6Al4V and Ti13Nb13Zr. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* **2015**, *12*, 224–237. [[CrossRef](#)]
32. Dias-Netipanyj, M.F.; Cowden, K.; Sopchenski, L.; Cogo, S.C.; Elifio-Esposito, S.; Popat, K.C.; Soares, P. Effect of crystalline phases of titania nanotube arrays on adipose derived stem cell adhesion and proliferation. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *103*, 109850. [[CrossRef](#)]
33. Bressan, E.; Sbricoli, L.; Guazzo, R.; Tocco, I.; Roman, M.; Vindigni, V.; Stellini, E.; Gardin, C.; Ferroni, L.; Sivolella, S.; et al. Nanostructured Surfaces of Dental Implants. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 1918–1931. [[CrossRef](#)]
34. Martino, S.; D’Angelo, F.; Armentano, I.; Kenny, J.M.; Orlacchio, A. Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 338–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Cowden, K.; Dias-Netipanyj, M.F.; Popat, K.C. Adhesion and Proliferation of Human Adipose-Derived Stem Cells on Titania Nanotube Surfaces. *Regen. Eng. Transl. Med.* **2019**, *5*, 435–445. [[CrossRef](#)]
36. Ciuffi, S.; Zonefrati, R.; Brandi, M.L. Adipose stem cells for bone tissue repair. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* **2017**, *14*, 217–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Lavenus, S.; Berreur, M.; Trichet, V.; Pilet, P.; Louarn, G.; Layrolle, P. Adhesion and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on titanium nanopores. *Eur. Cells Mater.* **2011**, *22*, 84–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Caplan, A.I.; Dennis, J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell. Biochem.* **2006**, *98*, 1076–1084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Vercellino, M.; Ceccarelli, G.; Cristofaro, F.; Balli, M.; Bertoglio, F.; Bruni, G.; Benedetti, L.; Avanzini, M.A.; Imbriani, M.; Visai, L. Nanostructured TiO₂ Surfaces Promote Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Differentiation to Osteoblasts. *Nanomaterials* **2016**, *6*, 124. [[CrossRef](#)]
41. James, A.W.; Zara, J.N.; Zhang, X.; Askarinam, A.; Goyal, R.; Chiang, M.; Yuan, W.; Chang, L.; Corselli, M.; Shen, J.; et al. Perivascular stem cells: A prospectively purified mesenchymal stem cell population for bone tissue engineering. *Stem Cells Transl. Med.* **2012**, *1*, 510–519. [[CrossRef](#)]
42. Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* **1991**, *9*, 641–650. [[CrossRef](#)]
43. Lindroos, B.; Suuronen, R.; Miettinen, S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev. Rep.* **2011**, *7*, 269–291. [[CrossRef](#)]
44. Mazini, L.; Rochette, L.; Amine, M.; Malka, G. Regenerative Capacity of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs), Comparison with Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Gimble, J.M.; Katz, A.J.; Bunnell, B.A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res.* **2007**, *100*, 1249–1260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Hattori, H.; Sato, M.; Masuoka, K.; Ishihara, M.; Kikuchi, T.; Matsui, T.; Takase, B.; Ishizuka, T.; Kikuchi, M.; Fujikawa, K.; et al. Osteogenic potential of human adipose tissue derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs* **2004**, *178*, 2–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. De Ugarte, D.A.; Morizono, K.; Elbarbary, A.; Alfonso, Z.; Zuk, P.A.; Zhu, M.; Dragoo, J.L.; Ashjian, P.; Thomas, B.; Benhaim, P.; et al. Comparison of multi-lineage cell from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* **2003**, *174*, 101–109. [[CrossRef](#)]
48. Bunnell, B.A.; Flaata, M.; Gagliardi, C.; Patel, B.; Ripoll, C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods* **2008**, *45*, 115–120. [[CrossRef](#)]
49. Lewallen, E.A.; Jones, D.L.; Dudakovic, A.; Thaler, R.; Paradise, C.R.; Kremers, H.M.; Abdel, M.P.; Kakar, S.; Dietz, A.B.; Cohene, R.C.; et al. Osteogenic potential of human adipose-tissue-derived mesenchymal stromal cells cultured on 3D-printed porous structured titanium. *Gene* **2016**, *581*, 95–106. [[CrossRef](#)]

50. Cowden, K.; Dias-Netipanyj, M.F.; Popat, K.C. Effects of titania nanotube surfaces on osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2019**, *17*, 380–390. [[CrossRef](#)]
51. Ehlert, M.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Bartmański, M.; Radtke, A. Titania Nanofiber Scaffolds with Enhanced Biointegration Activity—Preliminary in vitro Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5642. [[CrossRef](#)]
52. Yuan, Y.; Lee, T.R. Chapter 1 Contact Angle and Wetting Properties. In *Surface Science Techniques, Springer Series in Surface Sciences*; Bracco, G., Holst, B., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013; pp. 3–34.
53. Oliver, W.C.; Pharr, G.M. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J. Mater. Res.* **1992**, *7*, 1564–1583. [[CrossRef](#)]
54. Zhang, W.F.; He, Y.L.; Zhang, M.S.; Yin, Z.; Chen, Q. Raman scattering study on anatase TiO₂ nanocrystals. *J. Phys. D Appl. Phys.* **2000**, *33*, 912. [[CrossRef](#)]
55. Mazza, T.; Barborini, E.; Piseri, P.; Milani, P.; Cattaneo, D.; Li Bassi, A.; Bottani, C.E.; Ducati, C. Raman spectroscopy characterization of TiO₂ rutile nanocrystals. *Phys. Rev. B* **2007**, *75*, 045416. [[CrossRef](#)]
56. Chen, X.; Mao, S.S. Titanium dioxide nanomaterials: Synthesis, properties, modifications and applications. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2891–2959. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Hardcastle, F. Raman Spectroscopy of Titania (TiO₂) Nanotubular Water-Splitting Catalysts. *J. Ark. Acad. Sci.* **2011**, *65*, 43–48.
58. Busani, T.; Devine, R.A.B. Dielectric and infrared properties of TiO₂ films containing anatase and rutile. *Semicond. Sci. Technol.* **2005**, *20*, 870. [[CrossRef](#)]
59. Coy, E.; Yate, L.; Kabacińska, Z.; Jancelewicz, M.; Jurga, S.; Iatsunskyi, I. Topographic reconstruction and mechanical analysis of atomic layer deposited Al₂O₃/TiO₂ nanolaminates by nanoindentation. *Mater. Des.* **2016**, *111*, 584–591. [[CrossRef](#)]
60. Bartmanski, M.; Zielinski, A.; Jazdzewska, M.; Głodowska, J.; Kalka, P. Effects of electrophoretic deposition times and nanotubular oxide surfaces on properties of the nanohydroxyapatite/nanocopper coating on the Ti₁₃Zr₁₃Nb alloy. *Ceram. Int.* **2019**, *45*, 20002–20010. [[CrossRef](#)]
61. Roach, P.; Eglin, D.; Ronde, K.; Perry, C.C.J. Surface Tailoring for Controlled Protein Adsorption: Effect of Topography at the Nanometer Scale and Chemistry. *Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18*, 1263–1277. [[CrossRef](#)]
62. Comelles, J.; Estévez, M.; Martínez, E.; Samitier, J. The role of surface energy of technical polymers in serum protein adsorption and MG-63 cells adhesion. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2010**, *6*, 44–51. [[CrossRef](#)]
63. Tanaka, M. Design of novel 2D and 3D biointerfaces using self-organization to control cell behaviour. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1810*, 251–258. [[CrossRef](#)]
64. Yang, Y.; Leong, K.W. Nanoscale surfacing for regenerative medicine. *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* **2010**, *2*, 478–495. [[CrossRef](#)]
65. Ricci, J.L.; Grew, J.C.; Alexander, H. Connective-tissue responses to defined biomaterial surfaces. I. Growth of rat fibroblast and bone marrow cell colonies on microgrooved substrates. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2007**, *85*, 313–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Kunzler, T.P.; Drobek, T.; Schuler, M. Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients. *Biomaterials* **2007**, *28*, 2175–2182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Łopacińska, J.M.; Gradinaru, C.; Wierzbicki, R.; Kœbler, C.; Schmidt, M.S.; Madsen, M.T.; Skolimowski, M.; Dufva, M.; Flyvbjerg, H.; Mølhave, K. Cell motility, morphology, viability and proliferation in response to nanotopography on silicon black. *Nanoscale* **2012**, *4*, 3739–3745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Takamori, E.R.; Cruz, R.; Gonçalves, F.; Zanetti, R.V.; Zanetti, A.; Granjeiro, J.M. Effect of roughness of zirconia and titanium on fibroblast adhesion. *Artif. Organs* **2008**, *32*, 305–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Huang, Y.; Hao, M.; Nian, X.; Qiao, H.; Zhang, X.; Zhang, X.; Song, G.; Guo, J.; Pang, X.; Zhang, H. Strontium and copper co-substituted hydroxyapatite-based coatings with improved antibacterial activity and cytocompatibility fabricated by electrodeposition. *Ceram. Int.* **2016**, *42*, 11876–11888. [[CrossRef](#)]
70. Mohan, L.; Durgalakshmi, D.; Geetha, M.; Sankara Narayanan, T.S.N.; Asokamani, R. Electrophoretic deposition of nanocomposite (HAp+TiO₂) on titanium alloy for biomedical applications. *Ceram. Int.* **2012**, *38*, 3435–3443. [[CrossRef](#)]
71. Rautray, T.R.; Narayanan, R.; Kim, K.H. Ion implantation of titanium based biomaterials. *Prog. Mater. Sci.* **2011**, *56*, 1137–1177. [[CrossRef](#)]
72. Gross, K.A.; Babovic, M. Influence of abrasion on the surface characteristics of thermally sprayed hydroxyapatite coatings. *Biomaterials* **2002**, *23*, 4731–4737. [[CrossRef](#)]

73. Alam, F.; Balani, K. Adhesion force of staphylococcus aureus on various biomaterial surfaces. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2017**, *65*, 872–880. [[CrossRef](#)]
74. Ribeiro, M.; Monteiro, F.J.; Ferraz, M.P. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. *BioMatter* **2012**, *2*, 176–194. [[CrossRef](#)]
75. Kubacka, A.; Diez, M.S.; Rojo, D.; Bargiela, R.; Ciordia, S.; Zapico, I.; Albar, J.P.; Barbas, C.; Martins Dos Santos, V.A.P.; Fernández-García, M.; et al. Understanding the antimicrobial mechanism of TiO₂-based nanocomposite films in a pathogenic bacterium. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Herrmann, H.; Bär, H.; Kreplak, L.; Strelkov, S.V.; Aebi, U. Intermediate filaments: From cell architecture to nanomechanics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 562–573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Corni, I.; Ryan, M.P.; Boccaccini, A.R. Electrophoretic deposition: From traditional ceramics to nanotechnology. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2008**, *28*, 1353–1367. [[CrossRef](#)]
78. Von Wilmsowsky, C.; Bauer, S.; Lutz, R.; Meisel, M.; Neukam, F.W.; Toyoshima, T.; Schmuki, P.; Nkenke, E.; Schlegel, K.A. In Vivo Evaluation of Anodic TiO₂ Nanotubes; An Experimental Study in the Pig. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2009**, *89*, 165–171. [[CrossRef](#)]
79. Kim, D.; Lee, K.; Roy, P.; Birajdar, B.I.; Spiecker, E.; Schmuki, P. Formation of a non-thickness-limited titanium dioxide mesosponge and its use in dye-sensitized solar cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9326–9329. [[CrossRef](#)]
80. Noyama, Y.; Miura, T.; Ishimoto, T.; Itaya, T.; Niinomi, M.; Nakano, T. Bone loss and reduced bone quality of the human femur after total hip arthroplasty under stress-shielding effects by titanium-based implant. *Mater. Trans.* **2012**, *53*, 565–570. [[CrossRef](#)]
81. Asgharzadeh Shirazi, H.; Ayatollahi, M.R.; Asnafi, A. To reduce the maximum stress and the stress shielding effect around a dental implant–bone interface using radial functionally graded biomaterials. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Eng.* **2017**, *20*, 750–759. [[CrossRef](#)]
82. Huiskes, R.; Weinans, H.; Van Rietbergen, B. The relationship between stress shielding and bone resorption around total hip stems and the effects of flexible materials. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1992**, *274*, 124–134. [[CrossRef](#)]
83. Piszczek, P.; Radtke, A.; Ehlert, M.; Jędrzejewski, T.; Sznarkowska, A.; Sadowska, B.; Bartmański, M.; Erdoğan, Y.K.; Ercan, B.; Jędrzejczyk, W. Comprehensive Evaluation of the Biological Properties of Surface-Modified Titanium Alloy Implants. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 342. [[CrossRef](#)]



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

1 *Supplementary*

2 **In Vitro Studies on Nanoporous, Nanotubular and**
 3 **Nanosponge-Like Titania Coatings, with the Use of**
 4 **Adipose-Derived Stem Cells**

5 **Michalina Ehlert**^{1,2}, **Aleksandra Radtke**^{1,2,*}, **Tomasz Jędrzejewski**³, **Katarzyna Roszek**³,
 6 **Michał Bartmański**⁴ and **Piotr Piszczek**^{1,2,*}

7 ¹ Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Gagarina 7, 87-100 Toruń, Poland;
 8 m.ehlert@doktorant.umk.pl

9 ² Nano-implant Ltd. Gagarina 5/102, 87-100 Toruń, Poland

10 ³ Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Lwowska 1, 87-
 11 100 Toruń, Poland; kroszek@umk.pl (K.R.); tomaszj@umk.pl (T.J.)

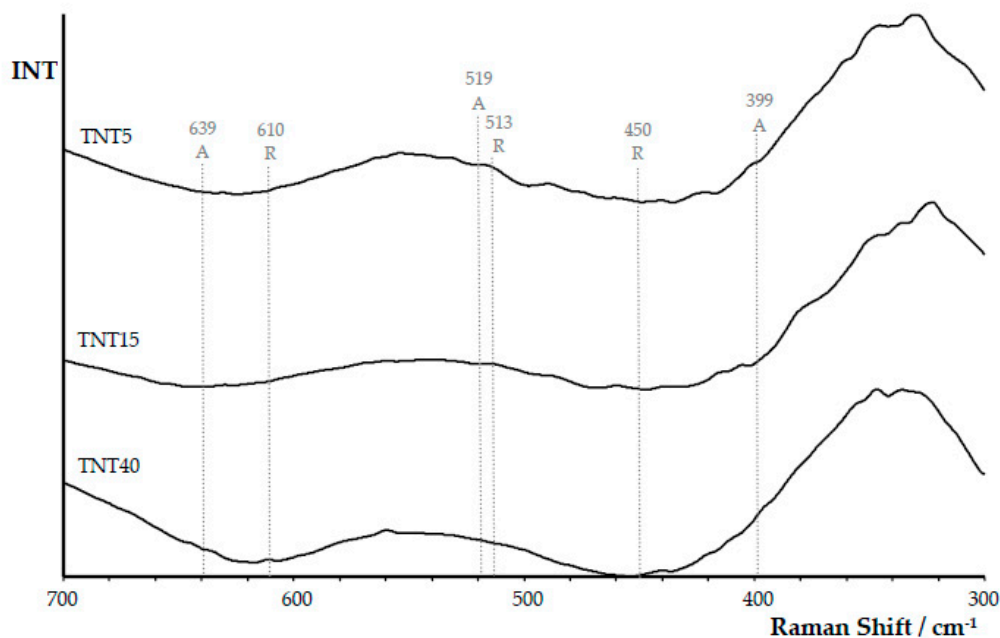
12 ⁴ Faculty of Mechanical Engineering, Gdańsk University of Technology, Gabriela Narutowicza 11/12, 80-233
 13 Gdańsk, Poland; michal.bartmanski@pg.edu.pl

14 * Correspondence: aradtke@umk.pl (A.R.); piszczek@umk.pl (P.P.); Tel.: (+48)600321294 (A.R.); Tel.:
 15 +48607883357 (P.P.)

16 Received: 17 February 2020; Accepted: 26 March 2020; Published: 29 March 2020

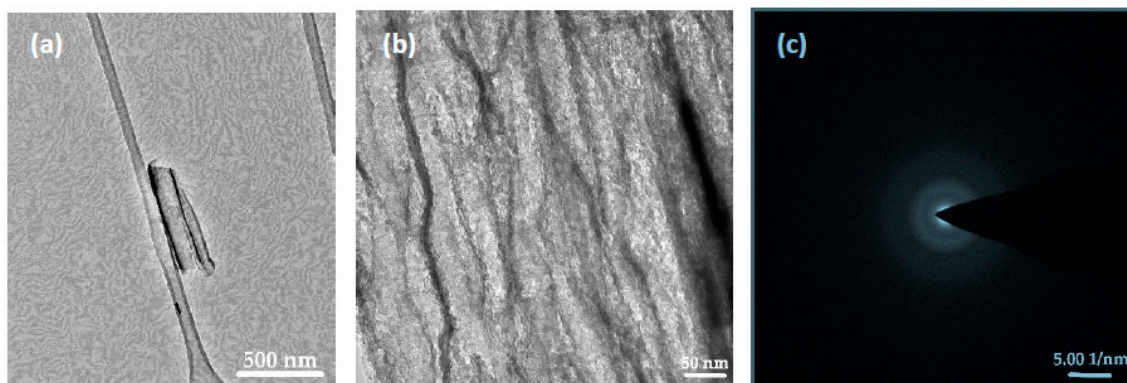
17

18



19

20 **Figure S1.** Raman spectra of nanoporous (TNT5), nanotubular (TNT15), and nanosponge-like
 21 (TNT40) titania coatings (A – anatase, R – rutile).



22

23

Figure S2. TEM image (a), HRTEM image (b) and the SAED patterns of TNT15 (c).



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

24

P3. *Assessment of Titanate Nanolayers in Terms of Their Physicochemical and Biological Properties*

Article

Assessment of Titanate Nanolayers in Terms of Their Physicochemical and Biological Properties

Michalina Ehlert^{1,2}, Aleksandra Radtke^{1,2,*}, Katarzyna Roszek³, Tomasz Jędrzejewski³
and Piotr Piszczek^{1,2,*}

¹ Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Gagarina 7, 87-100 Toruń, Poland; m.ehlert@doktorant.umk.pl

² Nano-implant Ltd., Gagarina 5/102, 87-100 Toruń, Poland

³ Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Lwowska 1, 87-100 Toruń, Poland; kroszek@umk.pl (K.R.); tomaszj@umk.pl (T.J.)

* Correspondence: aradtke@umk.pl (A.R.); piszczek@umk.pl (P.P.);
Tel.: +48-60-032-12-94 (A.R.); +48-60-788-33-57 (P.P.)

Abstract: The surface modification of titanium substrates and its alloys in order to improve their osseointegration properties is one of widely studied issues related to the design and production of modern orthopedic and dental implants. In this paper, we discuss the results concerning Ti6Al4V substrate surface modification by (a) alkaline treatment with a 7 M NaOH solution, and (b) production of a porous coating (anodic oxidation with the use of potential $U = 5$ V) and then treating its surface in the abovementioned alkaline solution. We compared the apatite-forming ability of unmodified and surface-modified titanium alloy in simulated body fluid (SBF) for 1–4 weeks. Analysis of the X-ray diffraction patterns of synthesized coatings allowed their structure characterization before and after immersing in SBF. The obtained nanolayers were studied using Raman spectroscopy, diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFT), and scanning electron microscopy (SEM) images. Elemental analysis was carried out using X-ray energy dispersion spectroscopy (SEM EDX). Wettability and biointegration activity (on the basis of the degree of integration of MG-63 osteoblast-like cells, L929 fibroblasts, and adipose-derived mesenchymal stem cells cultured in vitro on the sample surface) were also evaluated. The obtained results proved that the surfaces of Ti6Al4V and Ti6Al4V covered by TiO₂ nanoporous coatings, which were modified by titanate layers, promote apatite formation in the environment of body fluids and possess optimal biointegration properties for fibroblasts and osteoblasts.

Keywords: titanate nanolayers; structure; surface morphology; bone-like apatite; biointegration activity



Citation: Ehlert, M.; Radtke, A.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Piszczek, P. Assessment of Titanate Nanolayers in Terms of Their Physicochemical and Biological Properties. *Materials* **2021**, *14*, 806. <https://doi.org/10.3390/ma14040806>

Academic Editor: Carla

Renata Arciola

Received: 5 January 2021

Accepted: 1 February 2021

Published: 8 February 2021

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



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The wide use of metal implants in the treatment of bone injuries and other diseases requiring their surgical implantation, which can support tissue regeneration and facilitate bone differentiation and development, is one of the most important directions in the development of modern medicine. From the technological point of view, the selection of materials used in the construction of implants depends on the functions that they will perform in the human body [1–6]. In the case of metallic implants, especially important is their surface, which should exhibit biological compatibility in the interaction with tissues and body fluids in the human body [7–13]. Good mechanical properties and appropriate bioactivity of titanium and its alloys contributed to the wide use of these materials in the production of modern bone implants and bone and tissue scaffolding [10–12,14]. In this case, the processes aimed at creating a permanent connection of the implant surface with the bone (i.e., osseointegration) are also of key importance [1,15]. The results of previous investigations revealed that the osseointegration process depends on the surface

topography, the roughness, the structure, and the chemical composition [3,13,14,16,17]. The surface chemical composition of the material, which directly influences parameters such as surface energy, corrosivity, and wettability, is especially important [1–3,18–21]. Therefore, numerous surface modification techniques are currently used to achieve the desired physical, chemical, or biological properties of the material [22–24]. The surface modification of substrates made from titanium and its alloys by alkaline treatment is an increasingly commonly used technique [25–27]. It involves the dissolution in alkaline solution of the TiO_2 passive layer and the production of negatively charged hydrates ($\text{HTiO}_3^- \cdots n\text{H}_2\text{O}$) on the substrate surfaces. Sodium ions in the aqueous solution are combined with the negatively charged species, forming a sodium titanate hydrogel layer. The further heat treatment leads to dehydration and compaction of the hydrogel layer, which leads to the formation of the stable amorphous or crystalline titanate layer [28–30]. Various kinds of sodium titanates have been synthesized, which consist of negatively charged sheets made from TiO_6^{8-} octahedra, sharing corners and edges with each other [31–33]. Depending on the sodium ion content, the titanates form different structures (cage, tunnel, or layered), resulting in differences in their properties. The alkali-sodium titanates ($\text{Na}_2\text{Ti}_n\text{O}_{2n+1}$), where $n = 3$ or 8 , crystallize in a monoclinic system. Such materials for $n = 3$ or 4 consist of $(\text{Ti}_3\text{O}_7)^{2-}$ layers held together with exchangeable alkali sodium ions (Na^+). At lower sodium contents, $\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$, $\text{Na}_2\text{Ti}_7\text{O}_{15}$, or $\text{Na}_2\text{Ti}_8\text{O}_{17}$ with a tunnel structure is formed. This structure exhibits a good chemical stability and a high insulating ability [32–35]. The titanate hydrogels attract much attention due to their improved biological and mechanical properties, as well as their high corrosion resistance. As such, sodium titanate composites are widely applied in orthopedics, as well as in gas sensors as a reference electrode; they are also used as photocatalysts and electrochemical capacitors [24,34,36–40]. In addition, to intensify the biological activity of the material, it is desirable to produce a coating that is capable of forming apatite on its surface in the body fluid environment. It is important that the resulting layer does not delaminate [15,36].

It should be noted that the sodium titanate hydrogel layer formed on the surface of modified Ti6Al4V substrate could stimulate the formation of apatite coatings in appropriate conditions [41–44]. The sodium titanates in an environment of simulated body fluid (SBF) solution (as well as in body fluids) form Ti–OH groups on their surfaces as a result of Na^+ ion exchange with H_3O^+ ions present into the solution. The pH (in the surrounding fluid) increases and the negatively charged Ti–OH groups combine selectively with positively charged Ca^{2+} to form an intermediate apatite nucleation product, which is calcium titanate. Then, the Ca^{2+} cations accumulate on the surface and combine with phosphate ions, and the amorphous calcium phosphate formed in this way spontaneously transforms into apatite [28,38,43–47]. The above-described mechanism is important from the medical point of view. The bone partially consists of non-stoichiometric, inorganic calcium phosphate minerals; therefore, one of the ways to evaluate the bioactivity of a material is to study the spontaneous formation of apatite on its surface, while it is immersed in a physiological medium. The concentration of ions in simulated body fluid (SBF) is almost equal to the concentration of ions in human blood plasma; therefore, it can adequately reproduce the in vivo apatite formation [30,48–51]. On the other hand, these processes lead to the formation of an apatite layer linked with the substrate surface via a chemical bond, thereby rendering it more resistant to abrasion and delamination.

Considering the results of these investigations, we decided to carry out research on the applicability of the alkali-sodium treatment method of titania nanoporous coatings (TNT), which were produced during the anodization of Ti6Al4V, and to compare obtained results with those obtained for alkali-sodium-treated Ti6Al4V. Analysis of previous reports showed that, in the case of alkali-sodium-treated titania nanoporous coatings, their physicochemical and biological properties have not yet been analyzed and, hence, they can constitute an important new element of knowledge about surface modifications of titanium alloys.

Research on the stimulation and acceleration of bone tissue regeneration, stimulation of osteopromotional cells, and improvement of interlayer adhesion is of particular impor-

tance to us. The development of a sodium titanate layer-producing method on the surface of a (Ti6Al4V/nanoporous TiO₂) system, determination of its physicochemical properties, and estimation of its biological activity are especially significant issues. The results discussed in this paper provide a basis for designing biocompatible materials, which can be used in the construction of titanium alloy implants with high osseointegration activity.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Preparation

Commercially available titanium alloy (Ti6Al4V foil (marked as T), grade 5, 99.7% purity, 0.20 mm thick (Strem Chemicals, Inc., (Bischheim, France), 6 mm × 60 mm pieces and 10 mm × 60 mm pieces) was used as the substrate. Prior to alkali treatments, the specimens were polished and sonicated consecutively in acetone, ethyl alcohol, and deionized (DI) water, each for 10 min. Then they were air-dried at room temperature. In addition, some of the samples were anodized. The T was used as the anode and platinum foil was used as the cathode. Electrodes were placed 2 cm apart. The electrolyte consisted in an aqueous electrolyte solution—0.3% HF. The anodization potential was kept constant at 5 V for 20 min. Samples of the Ti6Al4V/nanoporous TiO₂ system (marked as T5), which were produced during the anodizing, were rinsed with deionized water and dried in an argon stream.

2.2. Alkali-Sodium Surface Treatment of Samples

The prepared T and T5 samples were immersed in a 7 M NaOH solution at 65 °C for 48 h. After alkali-sodium treatment, the obtained samples were washed with distilled water, and dried at 40 °C for 24 h in an incubator. The specimens were marked as T-S and T5-S, respectively. All samples prepared for chemical and biological analyses were autoclaved using an IS YESON YS-18L (Yeson, Ningbo, China) at 123 °C, $p = 120$ kPa, $t = 20$ min.

2.3. Apatite-Forming Ability

After the alkali-sodium treatment, the samples with the dimension of 10 mm × 10 mm × 0.20 mm (T-S, T5-S, and T as a control) were immersed in SBF at a constant temperature of 36.5 °C for 7, 14, 21, and 28 days, and each was kept in a vertical position inside polypropylene tubes. We used SBF as a standard solution to detect the apatite formation on the surfaces of the prepared samples. The SBF solution has an ionic concentration nearly equal to human blood plasma. One liter of SBF was prepared according to ISO/FDIS 23317:2007(E) and Kokubo's formulation by dissolving reagents given in the required order of dissolution (8.035 g NaCl, 0.355 g NaHCO₃, 0.225 g KCl, 0.231 g K₂HPO₄·3H₂O, 0.311 g MgCl₂·6H₂O, 0.292 g CaCl₂, and 0.072 g Na₂SO₄ in DI water and buffering at pH 7.40 with Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) and 1.0 M HCl at 36.5 °C). After immersing in the SBF, specimens were taken out from the solution, cleaned in deionized water, and dried at room temperature before characterization [52,53]. The specimens were marked as T-S/Ca and T5-S/Ca (after 7 days of immersion) and T-S/HA and T5-S/HA (after 14, 21, and 28 days of immersion).

2.4. Surface Characterization

Morphological evaluation of the T and T5 surfaces before and after the alkali-sodium treatment and the immersion in SBF was performed with a Quanta scanning electron microscope with field emission (SEM, Quanta 3D FEG, Huston, TX, USA). The chemical composition of the titanate layer after the alkali-sodium treatment and immersion in SBF was carried out using an energy-dispersive X-ray spectrometer (EDS, Quantax 200 XFlash 4010, Bruker AXS, Karlsruhe, Germany). The structure of the produced layers was estimated using Raman spectroscopy (RamanMicro 200 PerkinElmer (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) ($\lambda = 785$ nm)) and diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFT, Spectrum 2000, PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA). The crystalline

structure analysis of all produced layers was done using X-ray diffraction (XRD; PANalytical X'Pert Pro, PANalytical B.V., Almelo, The Netherlands MPD X-ray diffractometer using Cu-K alfa radiation, grazing incidence angle mode–GIXRD; the incidence angle was equal to 1°).

2.5. Contact Angle

The contact angle of water and diiodomethane on the samples was measured at room temperature using a goniometer (DSA 10 Krüss GmbH, Hamburg, Germany) with drop shape analysis software (ADVANCE, Krüss software, Krüss GmbH, Hamburg, Germany) with a drop volume of 3 µL for deionized water and 4 µL for diiodomethane onto each sample. All reported contact angles on the surface of the sample are the average of three samples from each series.

2.6. Cell Lines

L929 mouse fibroblasts were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The cells were grown in complete Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (with L-glutamine) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 IU/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin.

MG-63 human osteoblast-like cells were purchased from the European Collection of Authenticated Cell Cultures (Salisbury, UK). The MG-63 cells were cultured in Eagle's Minimum Essential medium (EMEM) supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, nonessential amino acids, and antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin).

Adipose-derived human mesenchymal stem cells (ADSCs) were purchased from PromoCell and cultured in Mesenchymal Stem Cell Growth Medium[®] supplemented with 10% Supplement Mix[®] (PromoCell GmbH, Germany), 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin.

All cell lines were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and passaged at 70–80% confluency using a 0.04% trypsin ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution (ADSC cells), 0.25% trypsin-EDTA solution (MG-63 cells), or cell scraper (L929 fibroblasts). All compounds used for cell culture were purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany).

2.7. Cell Viability

The effect of the specimens on the cell viability was determined with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The cells (density 1×10^4 cells/well) were cultured on autoclaved scaffolds placed in 24-well plates for 24, 72, and 120 h. After incubation, the specimens were washed with phosphate-buffered saline (PBS). Then, MTT solution (0.5 mg/cm³) was added and the samples were incubated for 3 h at 37 °C, and the resulting purple formazan crystals were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The optical density at 570 nm (with a reference wavelength of 630 nm) was measured using a Synergy HT Multi-Mode microplate reader (BioTek; Winooski, VT, USA). The scaffolds incubated without the cells were used as blank samples. The results derived from five independent experiments.

2.8. Cellular Morphology

Scanning electron microscopy (SEM; Quanta 3D FEG; Carl Zeiss, Göttingen, Germany) was used to assess the changes in cell morphology. After the respective incubation time of cells on the scaffolds, the samples were rinsed with PBS and fixed in 2.5% *v/v* glutaraldehyde. After that, the specimens were dehydrated in graded series of ethanol concentrations for 10 min. Lastly, the samples were dried in vacuum-assisted desiccators overnight before the SEM analysis.

2.9. Statistical Analysis

All values from the MTT assay are reported as the means \pm standard errors of the means (SEMs) and were determined by analysis of variance followed by Bonferroni multiple comparisons test, with the level of significance set at $p < 0.05$. Statistical analyses were done using GraphPad Prism 7.0 (La Jolla, CA, USA)

3. Results

3.1. Surface Characterization

The alkali-sodium treatment of the Ti6Al4V alloy (T) substrate in 7 M NaOH solution by 48 h led to the formation of the uniform coatings (T-S). The morphology changes of studied alloy samples before and after their immersion in alkali-sodium solution are presented in Figure 1a,b. The SEM cross-section images (Figure 1b) revealed that the produced coating thickness was 685 ± 5 nm. The immersion of the T5 sample (Ti6Al4V/TiO₂ nanoporous system, which was produced by anodic oxidation of the Ti6Al4V substrate according to an earlier described procedure [3,22]) in the same conditions led to the formation of a three-dimensional network of tangled nanorods and nanofibers (Figure 1c). Analysis of SEM cross-section images proved that the thickness of T5-S system was 933 ± 3 nm.

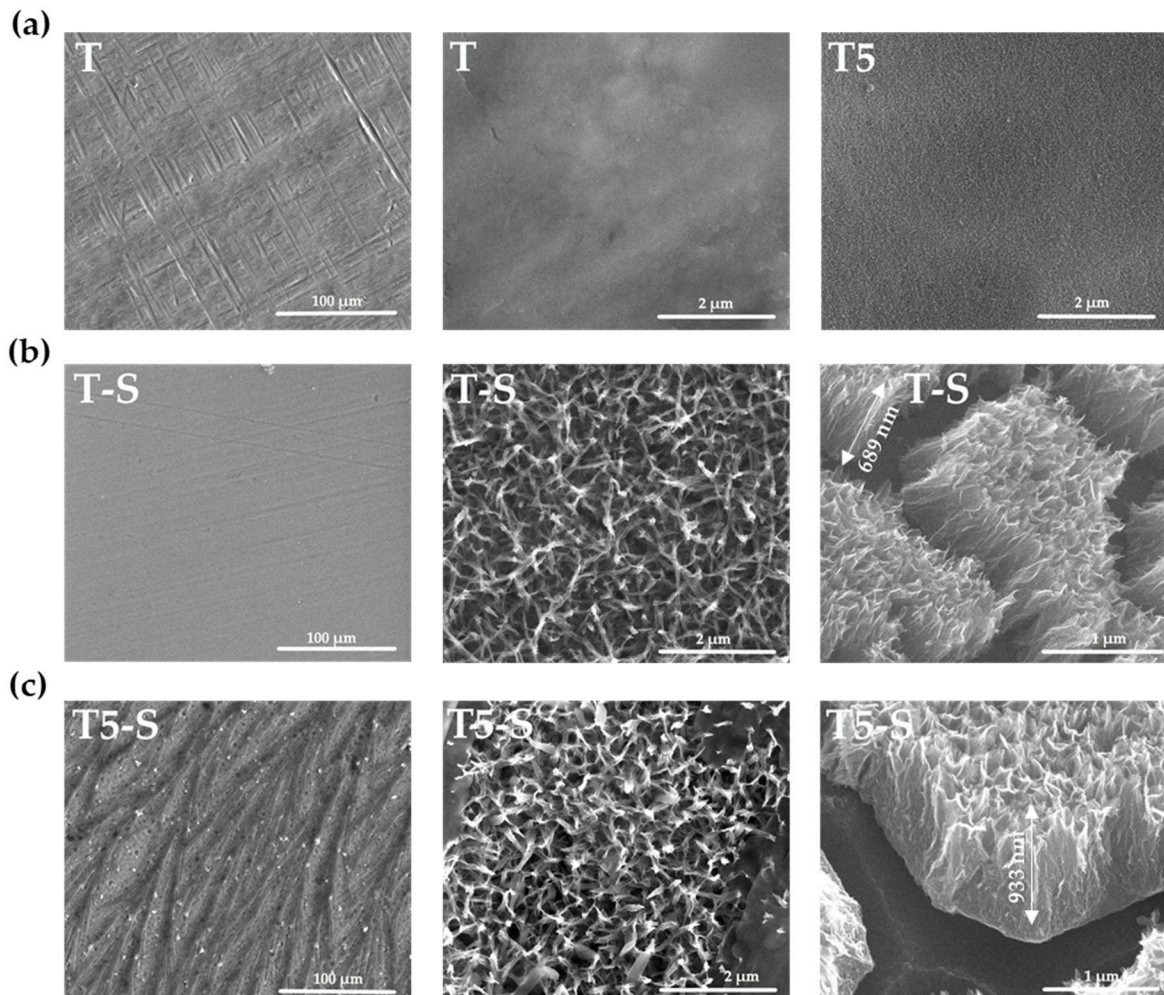


Figure 1. SEM images of the surface morphology and cross-sections of the T and T5 (a), T-S (b), and T5-S (c) samples.

The use of scanning electron microscopy with energy-dispersive spectroscopy (SEM/EDS) method allowed confirming the presence of Na⁺ on the surface of the samples after alkaline treatments (T-S and T5-S) (Figure 2c,d).

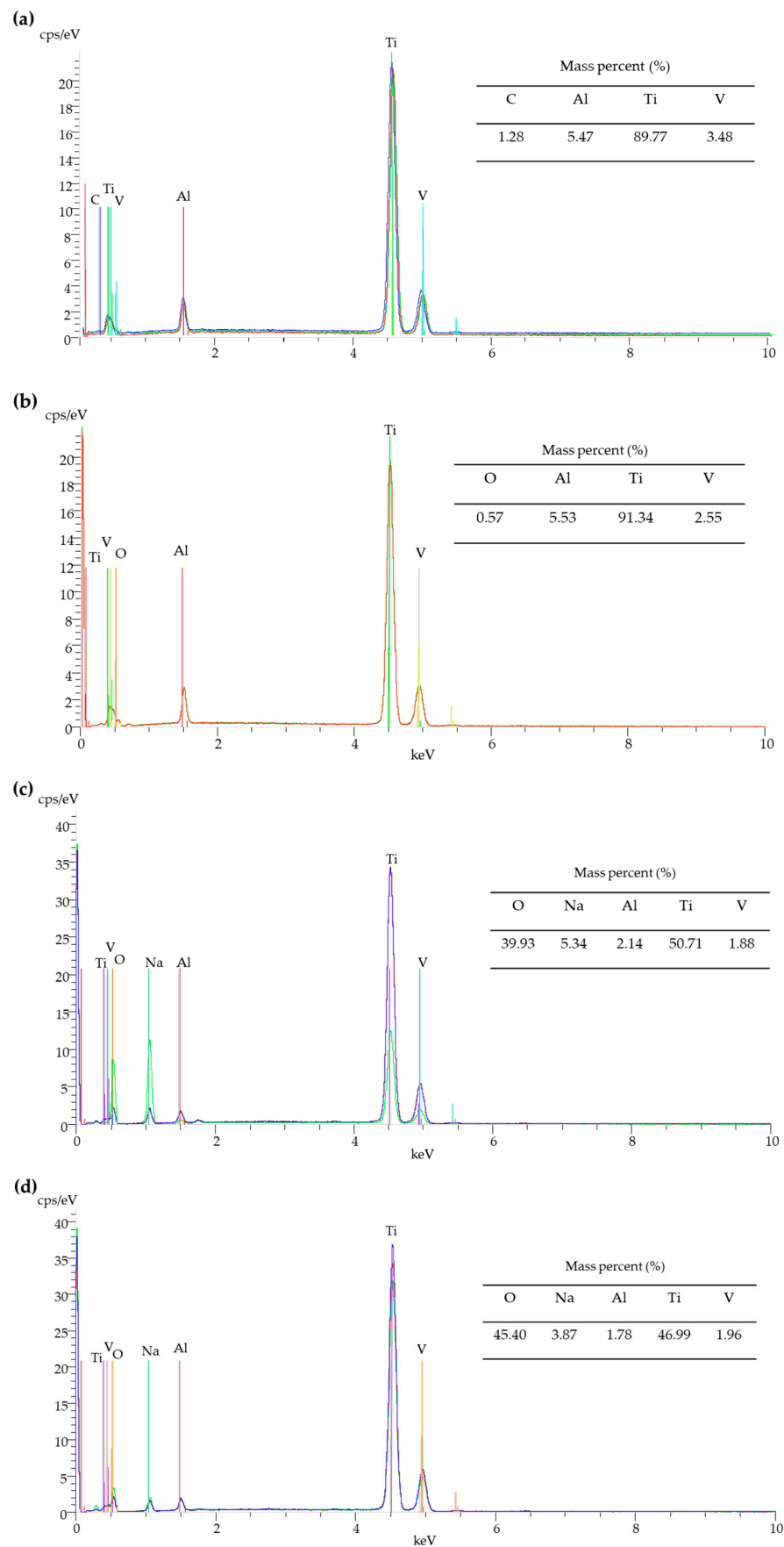


Figure 2. Energy-dispersive spectroscopy (EDS) spectra and quantitative data of the T (a), T5 (b), T-S (c), and T5-S (d) samples.

The strong signals at 24° and 48° , and weak signal at 28° (Figure 3a), which we found in XRD patterns of T-S and T5-S samples, were attributed to (011), (020), and (300) lines of sodium titanate crystals, respectively. Positions of these peaks are in good agreement with the literature data for sodium trititanate gel ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$) [25,54–60]. Moreover, the above-mentioned EDX data of oxygen and titanium mass percentage for T-S (Figure 2c) are in good agreement with the theoretical elemental mass percentage for sodium trititanate (O experimental 37%, theoretical 39.9%; Ti experimental 47%, theoretical 50.7%). The formation of sodium titanates was also confirmed by the analysis of Raman spectra (Figure 3b, Table 1).

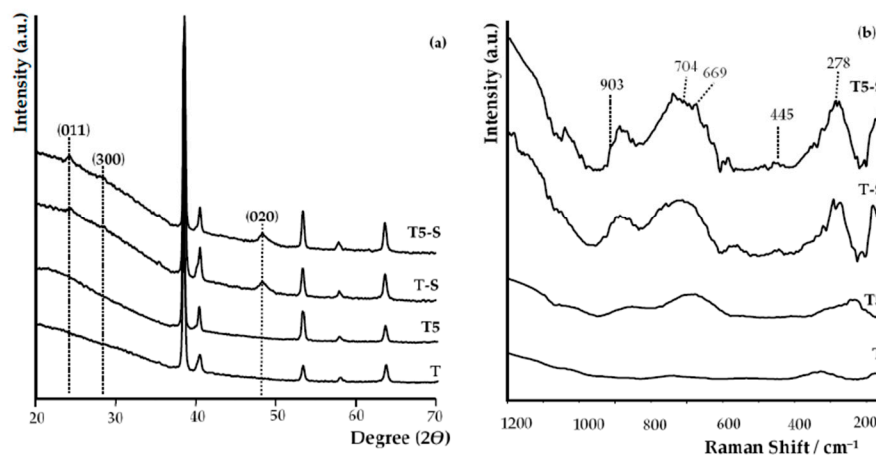


Figure 3. X-ray diffraction spectra of T, T5 samples without alkali-sodium treatment and T-S, T5-S samples with alkali-sodium treatment (a), where marked peaks are assigned to sodium titanate; Raman spectra of T, T5 samples without alkali-sodium treatment and T-S, T5-S samples with alkali-sodium treatment (b).

Table 1. Raman frequencies and assignments of functional groups in sodium titanate samples.

Functional Groups	Frequencies (Experimental) (cm^{-1})	Frequencies (Reference) (cm^{-1})	Reference
ν (Na–O–Ti)	278	280	[61–63]
δ (Ti–O)	445	440, 448	[43,63]
ν (Na–O–Ti)	669	660	[32,63]
δ (Ti–O)	704	690, 700	[43,63]
ν (Ti–O–Na)	903	905, 920	[43,61,63]

Raman spectra analysis of alkali-sodium-treated samples confirmed the sodium titanate formation, as evidenced by the appearance of five bands at c.a. 278 cm^{-1} , 445 cm^{-1} , 668 cm^{-1} , 704 cm^{-1} , and 903 cm^{-1} (Figure 3b) [25,32,43,61,62]. The bands which appeared at $\sim 903 \text{ cm}^{-1}$ and $\sim 278 \text{ cm}^{-1}$ are characteristic for sodium trititanates ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$) and they are not visible in spectra of hydrogen titanates [25,61–65]. The XRD patterns and Raman spectra were also used in order to deduce the amorphous structure of produced T5 coatings (Figure 3a).

The results of wettability studies of studied coatings are presented in Table 2. The water contact angle for the unmodified T sample was approximately $81.3 \pm 0.2^\circ$, and that for T5 was $94.4 \pm 0.4^\circ$. These samples indicated a less and more clear hydrophobic character, respectively. After alkali-sodium treatment, a drop of both water and diiodomethane spread rapidly and wetted the treated samples of T5-S and T-S. The water and diiodomethane contact angle decreased to nearly 0° ; thus, the surface of these samples can be considered completely wetted, which means that these surfaces are amphiphilic.

Table 2. The values of contact angles for water and diiodomethane of the T, T5, T-S, and T5-S samples.

Biomaterial Sample	Average Contact Angle (°) ± Standard Deviation	
	Measuring Liquid	
	Water	Diiodomethane
T	81.3 ± 0.2	49.2 ± 0.9
T5	94.4 ± 0.4	22.4 ± 1.0
T-S	<10	<10
T5-S	<10	<10

3.2. Apatite-Forming Ability

A basic assay indicating the potential bioactivity of a material is its incubation in SBF solution containing calcium and phosphorus ions and apatite precipitation on the surfaces of tested materials. Figure 4 shows the SEM top view images of T-S and T5-S after their immersion in SBF solution for 7, 14, 21, and 28 days. Figure 5 shows SEM cross-section images of T-S and T5-S with hydroxyapatite (HA) layers after immersion in SBF for 2 and 4 weeks. The aim of these studies was to monitor the development of apatite formation on their surfaces. The materials marked as T-S/Ca and T5-S/Ca represent samples containing calcium titanates (CaTiO_3) on the surface, which was formed after 7 days of sample immersion in SBF. On the other hand, the materials marked as T-S/HA and T5-S/HA represent samples containing hydroxyapatite on the surface, which was created after longer sample immersion in SBF.

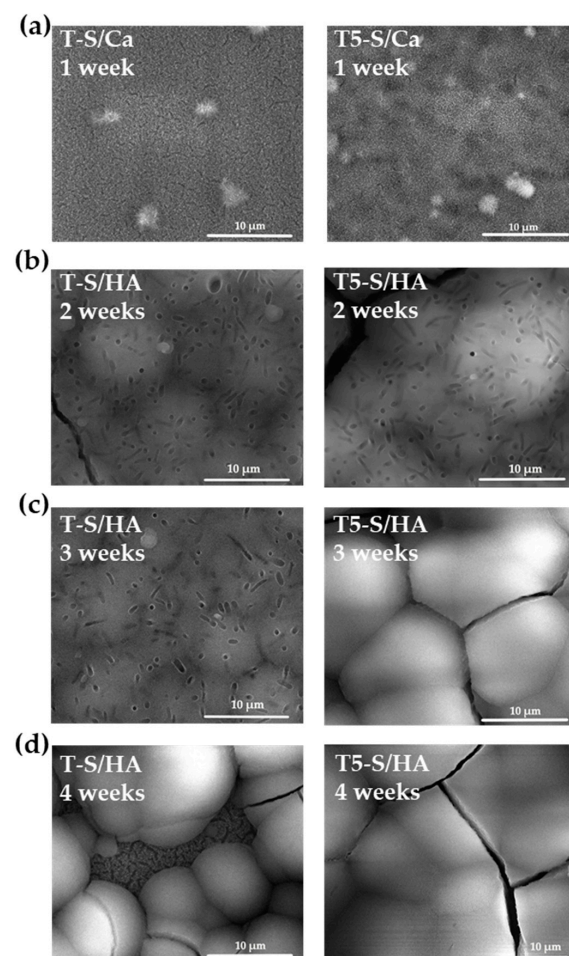


Figure 4. Scanning electron microscopy (SEM) images of substrates of T-S and T5-S with CaTiO_3 (Ca) or hydroxyapatite (HA) layers after immersion in SBF for 1 (a), 2 (b), 3 (c), and 4 (d) weeks.

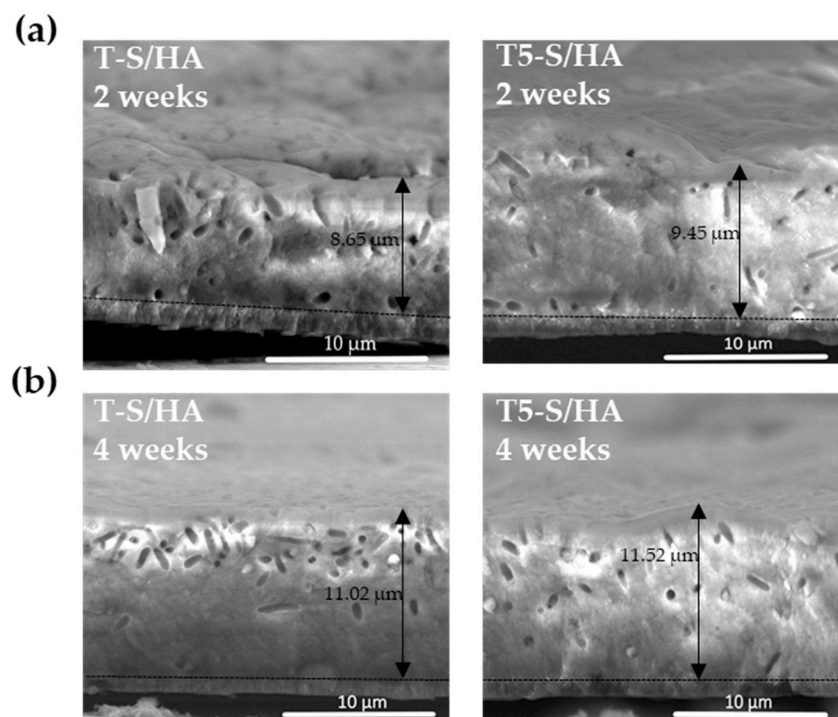


Figure 5. SEM cross-section images of T-S and T5-S with hydroxyapatite (HA) layers after immersion in SBF for 2 (a) and 4 (b) weeks. A horizontal black line separates the hydroxyapatite (HA) layer from T-S and T5-S coatings.

The percentage weight gain that was observed after removing and drying the samples from the SBF solution is presented in Figure 6. On the surface of T and T5 control samples, formation of apatite was not observed. On the other hand, the SEM images of T-S samples, immersed in SBF solution for 1 week, show mostly nanofibers and poorly observed small agglomerated globules mainly of Ca and P on the sample surfaces (Figure 4a). Analysis of these data revealed an increase in the sample weight after 14 days of sample immersion in SBF solution (Figure 4b,c). The T-S surface was partially covered with a thick hydroxyapatite layer after 28 days of immersion (Figure 4d). In the case of T5-S, the formation and growth of dispersed particles consisting of calcium and phosphorus were observed after 7 days of layer immersion in the SBF solution, which was confirmed by the EDS analysis (Figure 4a). The mass increase for the T5-S sample was ca. 1.7 times higher than that for T-S. After 14 days of immersion in SBF, hydroxyapatite was formed on the surface of T5-S specimens, with a ca. 1.31-fold increase in the sample mass observed compared to that of T-S (Figures 5 and 6). Considering the results obtained, it should be noted that the formation of sodium titanate layers on T and T5 substrates promoted apatite formation, while earlier anodization of the Ti6Al4V substrate surface (T5-S) was more favorable for the growth of apatite.

The desired effect is to obtain, on the surface of apatite, a structure as close as possible to natural hydroxyapatite (HA) with a Ca/P molar ratio of 1.67. The Ca/P molar ratio of titanate layers was investigated through EDS analysis, and the results are shown in Table 3. Phosphorus and calcium were the main elements detected in the specimens, allowing the Ca/P molar ratio to be estimated. The presence of sodium and magnesium ions was also observed in small amounts. Sodium probably remained after alkali-sodium surface modification. After 1 week in the alkali samples, the detected Ca/P molar ratio was 7.26 and 8.98 for T-S/Ca and T5-S/Ca, respectively. After the second and third weeks, this ratio decreased rapidly for T5-S/HA to 1.76 and 1.84, respectively. For T-S/HA, after the second and third week, the Ca/P ratio also decreased, although it was higher than that for T5-S/HA, with values of 1.94 and 2.00, respectively. According to the literature, it can be assumed that, since there are no stable calcium phosphate compounds known to

exhibit a molar ratio Ca/P higher than 2, these elements occurred as ions in the titanate surface. After 4 weeks of sample immersion in SBF solution, the Ca/P molar ratios of 1.84 for T5-S/HA and 1.82 for T-S/HA were detected.

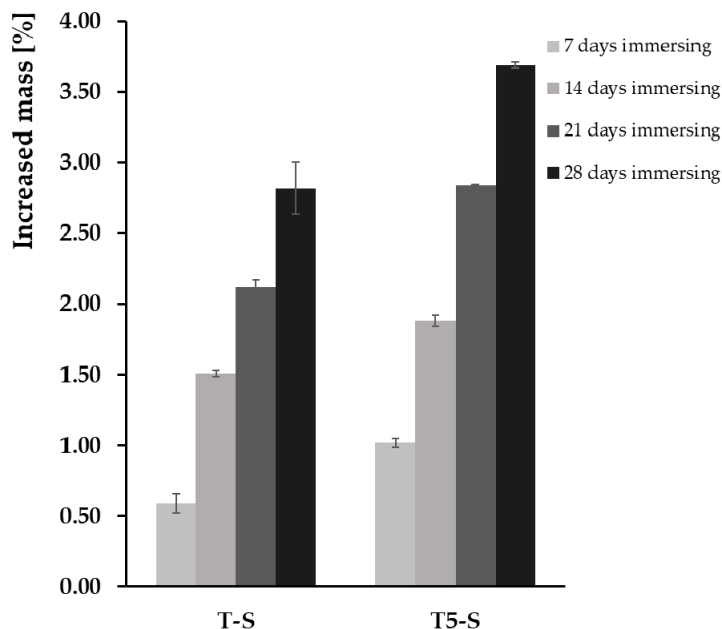


Figure 6. Weight gain of T-S and T5-S with CaTiO_3 (Ca) or hydroxyapatite (HA) layers after immersion in SBF for 7, 14, 21, and 28 days.

Table 3. Ca/P ratios obtained from EDS measurements for the T, T5, T-S, and T5-S samples after immersion in SBF for 1–4 weeks.

Biomaterial Sample	Ca/P (Molar Ratio) after 7 Days	Ca/P (Molar Ratio) after 14 Days	Ca/P (Molar Ratio) after 21 Days	Ca/P (Molar Ratio) after 28 Days
T	No growth	No growth	No growth	No growth
T5	No growth	No growth	No growth	No growth
T-S	7.26	1.94	2.00	1.82
T5-S	8.98	1.76	1.84	1.84

The DRIFT spectra of all studied samples, after immersion in SBF solution for 1–4 weeks, are shown in Figure 7. The intense bands attributed to phosphate groups of HA were found at 1150–1015 ($\nu_3(\text{PO}_4)$), 970 ($\nu_1(\text{PO}_4)$), 600 ($\nu_4(\text{PO}_4)$), 560 ($\nu_4(\text{PO}_4)$), and 523 ($\nu_4(\text{PO}_4)$) cm^{-1} for T5-S/HA and T-S/HA samples after their immersion for 14, 21, and 28 days [3,30,66–76]. The band detected at 452 cm^{-1} in the spectra of T5-S/Ca 7 and T-S/Ca 7 was attributed to the Ca–Ti–O group modes [77,78]. A weak band at ca. 1060 cm^{-1} in the studied spectra indicated the presence of P–O functional groups. The strong bands, which were registered in the spectra of T5-S/HA 21 and T5-S/HA 28 samples between 1400 and 1505 cm^{-1} (stretching mode of $\nu_1(\text{CO}_3^{2-})$ group in B-type carbonate HA and bending mode of (ν_3 or ν_4) CO_3^{2-} group in carbonate HA at 875 cm^{-1}) were assigned to surface carbonate ions, which are commonly found in both synthetic HA and natural bone [3,30,33,67,69–72,74–76]. However, the characteristic bands at 875 cm^{-1} indicated the presence of HPO_4^{2-} in the crystal lattice [67,70,76]. The band at 1310 cm^{-1} (ν_3), appearing in the spectrum of T5-S/HA 14 (i.e., after 14 days of immersion in SBF), was assigned to surface carbonate ions [71–73]. Since the samples after removal from the SBF solution were not dried at higher than room temperature, we can assume that the carbonate bands were in a non-quantity position. The band at 1640–1644 cm^{-1} can be assigned to ν_3 modes of the carbonate ion; however, on the other hand, it may be a bending mode, attributed to H_2O in the SBF-treated titanate

layer [70,74,76]. Figure S1 (Supplementary Materials) shows the stretching bands between 3000 and 3600 cm^{-1} , which can be related to intense and broad bands of O–H stretching in the HA structure and to adsorbed water molecules. These –OH bands were present in all the spectra collected from the sample surface layer. The wide bands attributed to the Ti–O vibration were observed between 640 and 780 cm^{-1} [3,30,33,66–68,70–72,76].

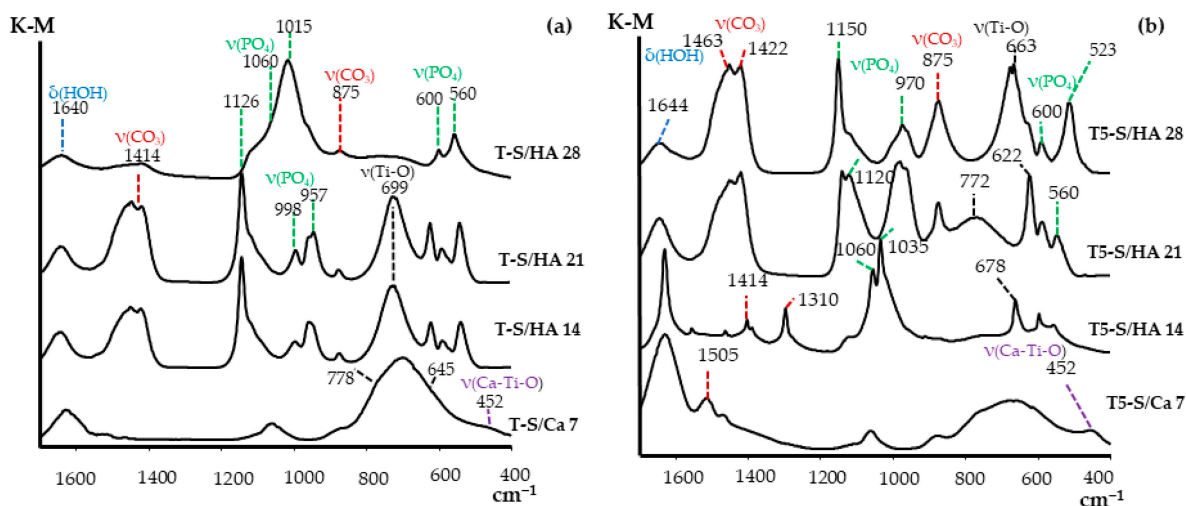


Figure 7. Diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFT) spectra of studied T-S/Ca and T-S/HA (a) and T5-S/Ca and T5-S/HA (b) after immersion in SBF for 7, 14, 21, and 28 days.

The apatite-forming ability was also confirmed by the Raman spectra (Figure 8). A strong band, attributed to symmetric stretching P–O vibrations (ν_1 ; active in Raman spectrum), was found at 959 cm^{-1} in the spectra of T5-S/HA and T-S/HA samples after 14, 21, and 28 days [3,25,79,80]. On the other hand, the weak bands at $\sim 586 \text{ cm}^{-1}$ and 605 cm^{-1} , detected in the spectra of all samples, were assigned to ν_4 P–O bending modes [3,79,80]. The bending modes (ν_2) bands of HA PO_4 groups were registered at 430 cm^{-1} and 445 cm^{-1} in the spectra of T-S/HA 14–28 and T5-S/HA 14–28 samples. However, in the spectra of T5-S/Ca 7 samples, bands attributed to O–Ti–O bending vibrations could also be found in abovementioned spectral range [3,81,82]. The bands, appearing at 1187 cm^{-1} , 1053 cm^{-1} , and 761 cm^{-1} , confirmed the presence of CO_3^{2-} ions in the T5-S/HA 14 sample [3,83]. The detection of the band at 279 cm^{-1} in the Raman spectra of studied samples confirmed bond formation among the sodium, calcium, and O–Ti–O group. The Raman spectrum of CaTiO_3 included a number of sharp bands imposed on a broad feature between 240 cm^{-1} and 370 cm^{-1} , and they were tentatively assigned to the modes associated with rotations of the oxygen cage [81,84–86]. This was clearly noticeable for the T-S/Ca 7 sample.

The apatite presence on the surface of samples immersed in SBF was confirmed by X-ray diffraction (XRD). Figure 9 shows the XRD spectra of T-S/Ca and T-S/HA (a) and T5-S/Ca and T5-S/HA (b) samples after immersion in SBF for 1–4 weeks. The XRD results were consistent with the SEM images, as well as EDS, Raman, and DRIFT analyses. It was noted that, after immersing the samples in SBF solution, on the surface of T-S and T5-S layers, hydroxyapatite was formed after 14 days. Simultaneously, with the increasing immersion time of layers in SBF, the amount of apatite grew. The presence of peaks attributed to calcium titanate confirmed that the alkali-sodium titanate layers released alkali ions into the SBF solution via exchange with the H_3O^+ ions. In effect, Ti–OH groups were formed. These hydrated titania groups induced apatite nucleation, which proceeded to calcium titanate (CaTiO_3) formation and combination with phosphate ions. The apatite nuclei were spontaneously grown on layers by consuming the Ca^{2+} and PO_4^{3-} ions from the surrounding fluid. As a result of this process, apatite was formed, which contained ions such as carbonate, sodium, and magnesium.

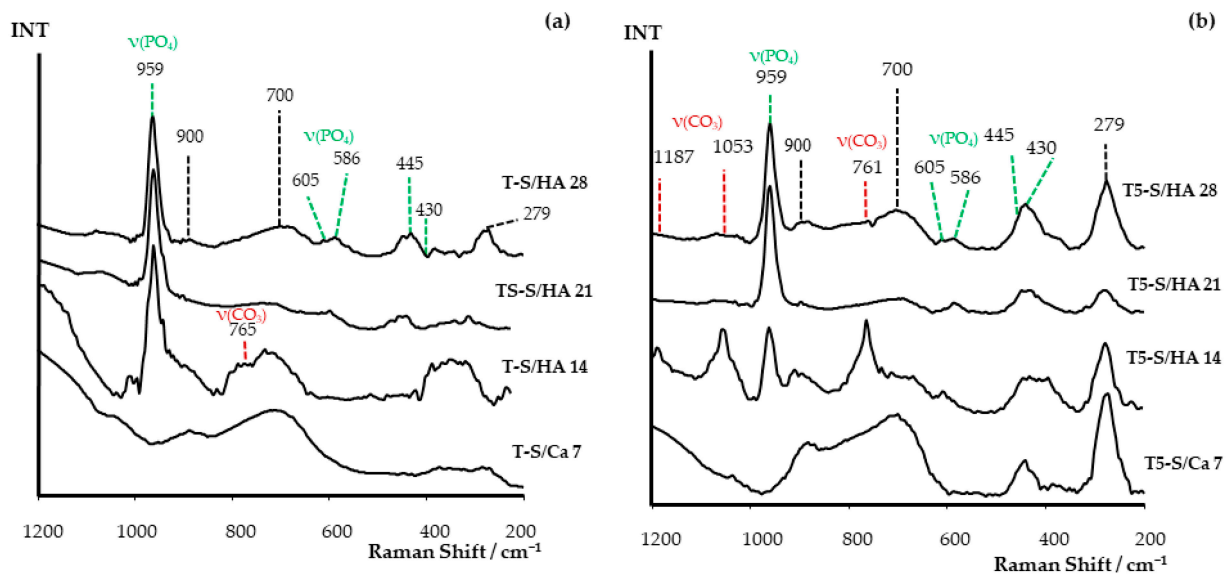


Figure 8. Raman spectra of studied (a) T-S/Ca and T-S/HA and (b) T5-S/Ca and T5-S/HA after immersion in SBF for 7, 14, 21, and 28 days. The undescribed peaks came from titanate.

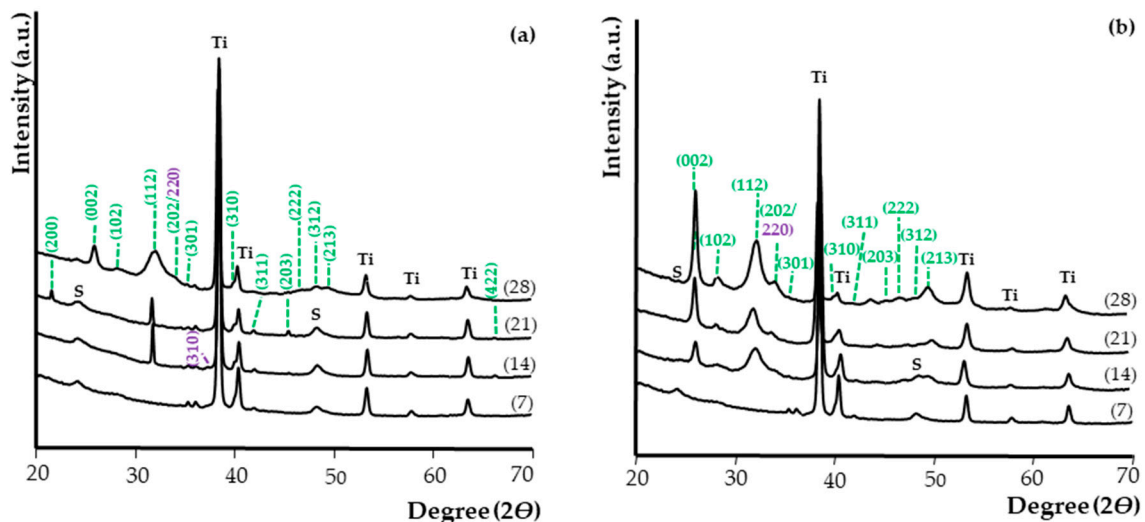


Figure 9. X-ray diffraction patterns of T-S/Ca (7) and T-S/HA (14–28) (a) and T5-S/Ca (7) and T5-S/HA (14–28) (b) samples after immersion in SBF solution for 7, 14, 21, and 28 days. (hkl) for HA are marked in green, while (hkl) for CaTiO_3 are marked in violet. Ti was assigned to the Ti6Al4V substrate; S was assigned to the sodium titanate.

3.3. Cell Viability Measured with the MTT Assay

The viability of L929 fibroblasts and MG-63 osteoblast-like cells growing on the scaffolds was assessed using the MTT assay. The results demonstrated that all tested samples induced a higher cell viability than the reference Ti6Al4V alloy foils (T), as observed after 24, 72, and 120 h of incubation time (Figure 10). Moreover, it was found that T-S and T5-S scaffolds increased the viability of L929 fibroblasts compared with not only the reference alloy, but also T5 samples. This effect was noticed especially after 72 h of incubation time (Figure 10a). Among all the tested samples, T5-S scaffolds induced the highest viability of MG-63 cells after 72 and 120 h of culture (Figure 10b). Importantly, T5-S samples also increased the viability of L929 cells in comparison with T-S specimens after 120 h of culture ($p < 0.001$).

The viability of ADSCs cultured on the tested specimens varied significantly between fibroblasts and osteoblasts, as well as between both alkali-sodium-modified scaffolds (Figure 11). The T-S sample promoted an approximately 50% higher level of ADSC proliferation in comparison with Ti6Al4V reference alloy foils (T), after 24, 72, and 120 h of incubation time. Surprisingly, it was found that T5-S scaffolds completely inhibited the proliferation of ADSCs. The cells adhered weaker to the surface, and cell viability was considerably decreased in relation to T reference alloy foils. On the contrary, the hydroxyapatite layer greatly improved the surface properties. ADSCs exhibited strong adhesion on T-S/HA 28 and T5-S/HA 28 specimens, and their number during the first 24 h of culture increased threefold in comparison to the control. After 72 and 120 h, the proliferation rate decreased; however, the cell viability compared to the reference T specimen still increased approximately twofold.

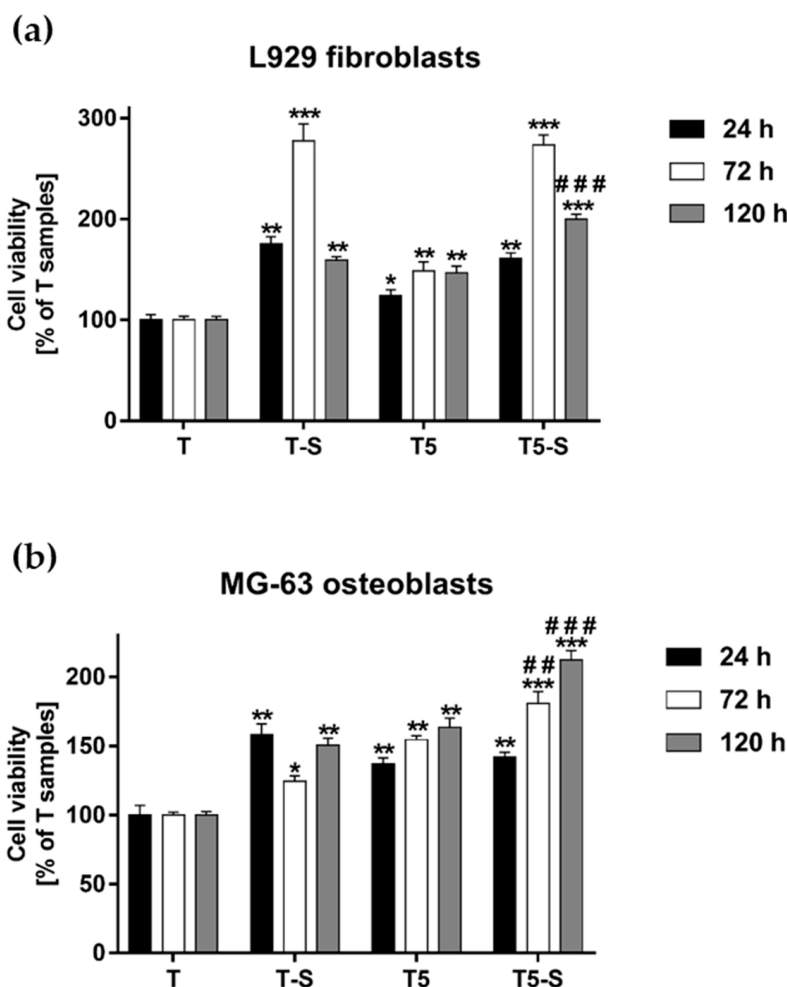


Figure 10. Cell viability of L929 fibroblasts (a) and MG-63 osteoblasts (b) cultured on the T-S, T5-S, and T5 samples for 24, 72, and 120 h. The results were compared with the reference Ti6Al4V samples (T). The cell viability is presented as a percentage of the control cells growing on the T specimens (served as 100%). Data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Asterisks denotes differences when the viability of cells growing on the tested scaffolds was higher compared with T samples (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). The pound signs indicate differences between the cells cultured on the T5-S scaffolds and T-S samples (### $p < 0.001$, ## $p < 0.01$).

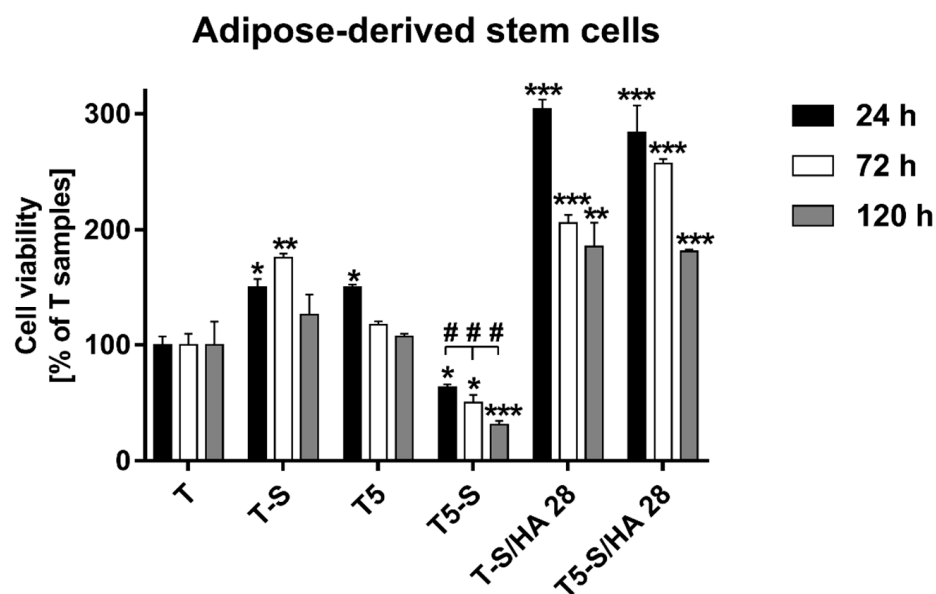


Figure 11. Viability of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) cultured on the tested samples for 24, 72, and 120 h. The results are expressed as the mean \pm SEM and presented as a percentage of the cells cultivated on the T samples (served as 100%). Asterisks indicate differences when the viability of cells growing on the tested scaffolds was higher in comparison with T samples (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). Pound signs denote differences between the cells cultured on the T5-S scaffolds and T-S samples (### $p < 0.001$).

3.4. Cell Morphology Observed by Scanning Electron Microscopy

The morphology and proliferation level of L929 fibroblasts (Figure 12) and MG-63 osteoblast-like cells (Figure 13) growing on the surface of T5-S specimens was demonstrated in the micrographs produced by scanning electron microscopy (SEM). These images confirmed the results from the MTT assay and showed the increase in cell proliferation level over time, as observed for both tested cell lines (compare micrographs (a–c) in Figures 12a–c and 13). The fibroblasts and osteoblasts had an elongated shape, and they effectively attached to the scaffolds by forming numerous filopodia (Figure 12d, and arrows in Figures 12f and 13g), which were also generated between the cells (arrows in Figures 12e and 13h). As can be seen in Figures 12c and 13c, most of the T5-S sample surface was covered with the cells. Moreover, we also noticed that it was difficult to observe MG-63 osteoblast-like cells cultured on the specimens since the surface of nanocoatings morphologically resembled the cells (Figure 13d–f). MG-63 cells also produced an extracellular matrix, as can be observed in Figure 13i. On the contrary, ADSCs grown on the T-S surface adhered properly and produced an extracellular matrix (Figure 14a), whereas the surface of T5-S did not support ADSC growth (Figure 14b). Comparative SEM images also revealed some differences in the morphology of ADSCs cultured on the T5-S surface specimens for 120 h (Figure 14b). The cells growing on T-S scaffold created filopodia that attached the cells to the substrate, whereas ADSCs cultured on T5-S samples had a rounded shape without attachments.

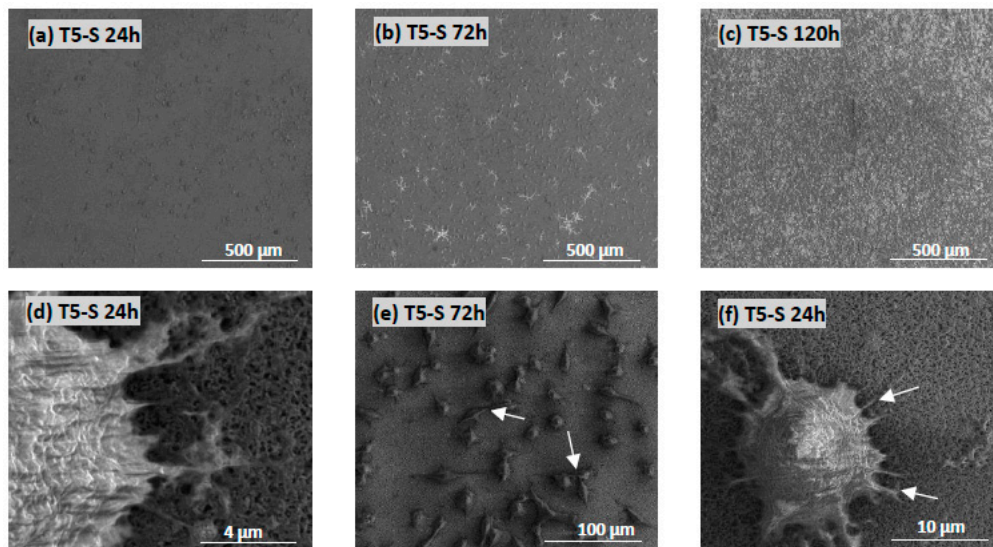


Figure 12. Images obtained by SEM showing L929 fibroblasts that were cultured on the T5-S scaffolds for 24 (a), 72 (b), and 120 h (c). Arrows present the filopodia spreading between fibroblasts (e) and the filopodia that attached the cell to the surface of scaffolds (d,f).

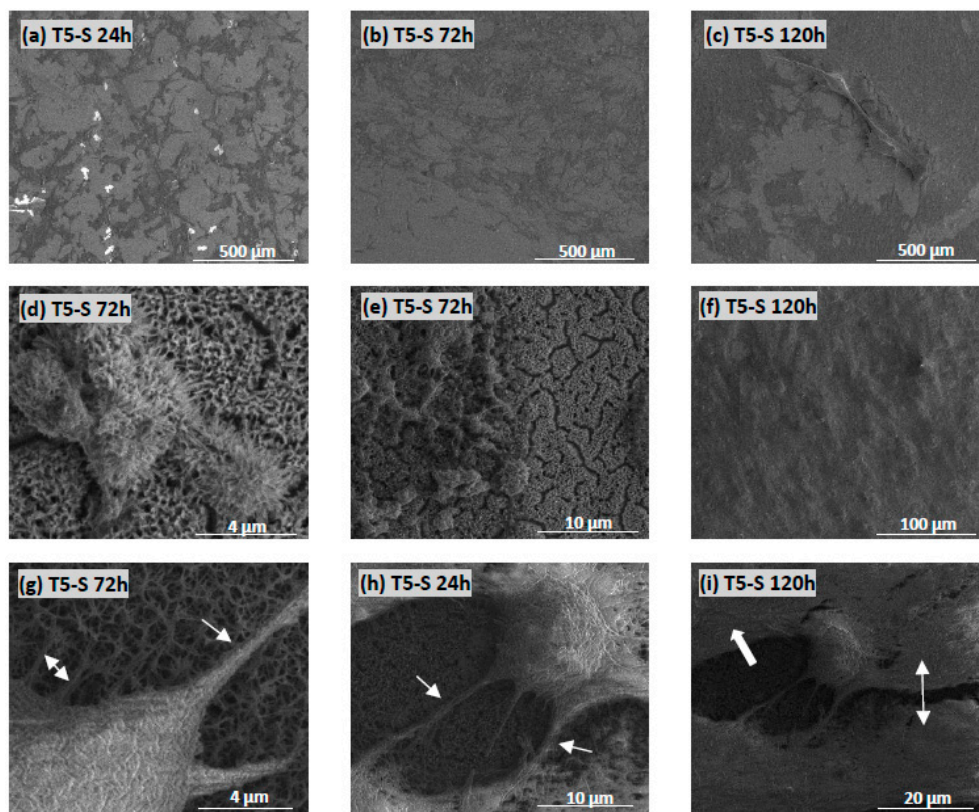


Figure 13. Micrographs obtained by SEM showing MG-63 osteoblast-like cells cultured on the T5-S specimens for 24 (a), 72 (b), and 120 h (c). Figures (d–f) indicate that the MG-63 cells are morphologically similar to the structure of T5-S samples. Arrows in the micrographs present filopodia which attached the cell to the substrate (g) or the filopodia created between the cells (h). Figure (i) indicates the extracellular matrix produced by osteoblast-like cells.

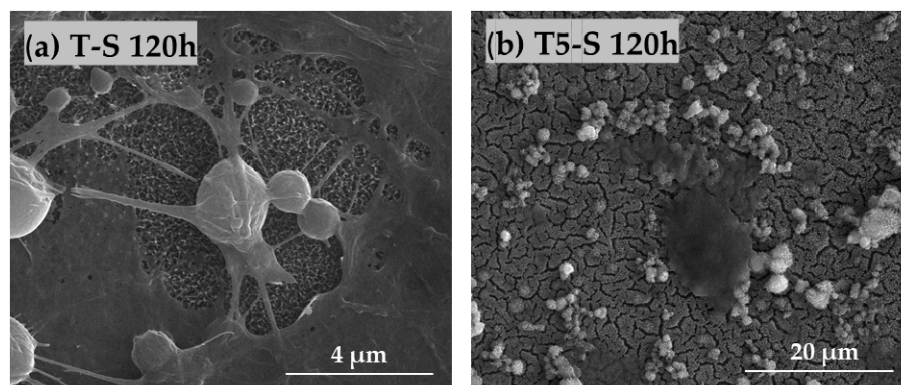


Figure 14. Comparative SEM images showing human ADSCs cultured on the surface of T-S (a) and T5-S (b) specimens for 120 h. The figures confirm evident differences in cell morphology for both samples: adherent cells with filopodia attached to the surface of T-S (a) and rounded cells without attachments on T5-S (b).

4. Discussion

A crucial stage in the design of modern implants is to modify their surfaces, ensuring the proper interaction of the implants with the tissue environment. In this study, we focused on the modification of the Ti6Al4V and Ti6Al4V/nanoporous TiO₂ substrate surface by the production of titanate layers using the alkali-sodium treatment method, which is known as an effective and simple procedure.

The starting point for the discussion of received results was the evaluation of the bioactivity of Ti6Al4V (T) substrates, whose surface was modified by an alkali-sodium treatment at 65 °C for 48 h (T-S). The MTT assays proved that adsorption of L929 fibroblast cells and MG-63 osteoblast-like cells (after 24 h) and their proliferation (after 72 and 120 h) explicitly increased for samples after their surface modification (Figure 10). The formation of the Na₂Ti₃O₇ nanofibrous layer on the T and T5 surfaces led to an increase in surface area, thereby promoting the formation of apatite in body fluids (SBF). Analysis of SEM, EDS, XRD, and Raman data (Figures 1 and 3) confirmed the sodium trititanate layer formation both on the T substrate (T-S) and on the T5 coating (T5-S) after hydrothermal treatment in a 7 M NaOH solution. These results are in good agreement with the observation of Zhang et al. [58]. Moreover, Fatehi et al. [49] showed that, with increasing concentration of NaOH solution, time, and temperature of alkaline treatment, the thickness of titanate gel layer increased. However, according to abovementioned reports, the use of an NaOH solution concentration higher than 10 M could lead to the delamination of the thick sodium titanate layer from the titanium substrate. The use of the 7 M NaOH solution (in our experiments) did not cause the delamination of the titanate layer from the surface of T-S and T5-S substrates, which was confirmed by the analysis of SEM images. Rahimpour et al. [87] carried out alkaline etching of the NiTi alloy substrate using 10 M NaOH solution. The samples were etched at $T = 60, 120, \text{ or } 180$ °C for 48 h. According to this report, with the increase in temperature, sodium and oxygen concentration increased, which indicated the growth of formed surface layers and allowed determining the surface morphology. The influence of temperature on the increase of the titanate layer was not studied in our experiments; however, on the basis of an analysis of the EDS data, we can observe that the appearance of Na and O on the surface of T-S and T5-S samples led to a significant increase in the thickness of formed titanate layers. Jiandi et al. drew attention on the clear increase in sodium titanate gel layer thickness with the immersion time of Ti6Al4V samples, which were immersed in 8 M NaOH solution at 60 °C for 12, 24, 36, 48, and 60 h [88]. A similar effect was noticed in this study for Na₂Ti₃O₇ nanofibrous layers produced on the surface both T-S and T5-S samples. It should be noted that earlier anodization of Ti6Al4V substrates induced the formation of a thicker titanate layer in comparison to the reference sample T. The nanofibrous architecture of produced layers can significantly increase the

substrate surface area and, thus, provide more nucleation sites for hydroxyapatite anchored in the substrate [88].

One of the ways to evaluate the bioactivity of a material is to study the spontaneous formation of apatite on its surface, while it is immersed in a similar physiological medium [89], which is due to fact that the bone partially consists of non-stoichiometric calcium phosphate [30]. Therefore, very important for us was to determine the relationship between the different surface characteristics of materials and the bioactivity of materials (apatite-forming ability). As stated above, *in vitro* studies in SBF solution showed faster apatite formation on the surface of T5-S than T-S. This may be the result of differences in the morphology of these samples, as well as the increased surface area. The surface of T5 after anodization was composed of titanium dioxide, and, in this form, it was treated with alkali-sodium (T5-S). On such a large surface, a number of Ti–OH groups were formed and calcium ions were incorporated into the hydrated Ti–OH layer to form calcium titanate and to stimulate the growth of apatite nucleation [28,38]. An important part of T-S and T5-S investigations was the determination of their wettability via liquid drop analysis on the surfaces. Both samples revealed amphiphilic behavior, attracting both polar and dispersive media (Table 2). Wang et al. [25] reported that a drop of water spread quickly and wetted alkaline-treated titanium samples, with a water contact angle close to 0° (superhydrophilic character). Kazek-Kęsik et al. [90] also showed that the use of the alkali surface treatment process resulted in a significant reduction in water contact angle in contact with the Ti-15Mo, Ti-13Nb-13Zr, and Ti-6Al-7Nb alloys. It is assumed that the hydrophilic surface of dental implants enhances the adhesion and orientation of selected proteins. Our research broadens this information, as we also decided to investigate the nature of T-S and T5-S sample surfaces in reaction with a drop of hydrophobic liquid. In this way, we additionally proved the amphiphilic character of the samples after alkali treatment.

Alkali-sodium treatment of Ti6Al4V (T) and Ti6Al4V/TiO₂ (T5) improved, in general, their biocompatible properties. The T-S sample promoted the cell growth and proliferation of all tested cell lines (fibroblasts, osteoblasts, and mesenchymal stem cells), whereas T5-S was beneficial only for fibroblasts and osteoblasts. The proliferation level of MG-63 osteoblast-like cells growing on the T5-S specimen was significantly higher than that on the T control sample. Conversely, the osteoblast-promoting scaffold entirely reduced the proliferation of ADSCs. It can be concluded that surface anodization followed by alkali-sodium treatment favors the growth of osteogenic lineage cells. This conclusion was additionally supported with micrographic analyses. Osteoblasts growing on the surface of alkali-sodium-modified specimens showed a significant degree of integration with the scaffold, which is of great importance for the development of implants. Considering that new implant surfaces are developed to improve biological cell responses, guiding the differentiation of mesenchymal stem cells toward osteoblasts and enhancing osseointegration, it is commonly reported in the most recent literature that cell growth is facilitated on rough substrates with diversified topography [3,91–94]. Additionally, effective osseointegration is significantly stimulated with increasing surface roughness of implants, *inter alia* titanium substrates (reviewed in [95]). Increased roughness induces beneficial morphological changes of growing cells and production of extracellular matrix components, together with positive interplay with the surrounding tissues. The limitations in preparing such surfaces include the possibility of reduced strength of the roughened material. Therefore, in the case of modifications used for long-term implants, it would be highly desirable to prepare surfaces with a roughness on the micrometer scale [94].

The ability to form apatite on the surface of T-S and T5-S also considerably improved the surface properties in terms of ADSC adhesion and proliferation. As apatite or similar mineralized structures create an osteogenic microenvironment that is extremely valuable for osseointegration, it can be assumed that ADSCs undergo differentiation, which was reflected in the lowered proliferation rate after 72 and 120 h of culture on T-S/HA and T5-S/HA. This remains in agreement with other *in vitro* studies on modified HA scaffolds, which have proven the capability of ADSCs to adhere and colonize the material and to

undergo differentiation to an osteogenic lineage with subsequent scaffold mineralization, even without the addition of osteo-inductive factors to the cell medium [96,97].

5. Conclusions

The research carried out exhibited that alkaline treatment of Ti6Al4V (T) substrates and Ti6Al4V covered by a nanoporous TiO₂ coating (T5) led to the formation of Na₂Ti₃O₇ nanofibrous layers (T-S and T5-S), whose thickness depended on the immersion time. It should be noted the clear influence of the anodization process of the Ti6Al4V substrates on the thicker sodium titanate layer formation (T5-S) in comparison to the non-anodized substrate (T-S). The anodization of the T surface was also important for increasing the ability to form apatite. Analysis of MTT assays revealed that surface anodization followed by alkali-sodium treatment could be important for implant design and production. The development of scaffolds with surface properties mimicking the bone structure and capable of inducing the right commitment of seeded cells is still a challenge. We believe that our results represent an important advancement in this context.

6. Patents

The patent application was registered at the Patent Office of the Republic of Poland; P.435368; [WIPO ST 10/PL435368]; Ehlert, M.; Piszczek, P.; Radtke, A.; A method of producing a nanocomposite coating on the surface of a Ti6Al4V titanium alloy and the coating produced by this method.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/1996-1944/14/4/806/s1>. Figure S1: DRIFT spectra (1600–4000 cm⁻¹) of studied T-S/Ca and T-S/HA (a) and T5-S/Ca and T5-S/HA (b) after immersion in SBF for 7, 14, 21, and 28 days.

Author Contributions: Conceptualization, M.E., A.R. and P.P.; methodology, M.E., K.R. and T.J.; formal analysis, M.E., A.R., K.R. and T.J.; investigation, M.E., K.R. and T.J.; data curation, M.E. and P.P.; writing—original draft preparation, M.E., K.R. and T.J.; writing—review and editing, A.R. and P.P.; supervision, P.P. and A.R.; project administration, M.E.; funding acquisition, M.E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Research Nicolaus Copernicus University in Toruń—Excellence Initiative, Grants4NCUStudents number 2403. The Ministry of Science and Higher Education and Nano-implant Ltd. also funded this research, within Implementation PhD studies of Michalina Ehlert. The APC was waived by MDPI.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data sharing is not applicable in this article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Piszczek, P.; Radtke, A.; Ehlert, M.; Jędrzejewski, T.; Sznarkowska, A.; Sadowska, B.; Bartmański, M.; Erdogan, Y.K.; Ercan, B.; Jędrzejczyk, W. Comprehensive Evaluation of the Biological Properties of Surface-Modified Titanium Alloy Implants. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 342. [CrossRef]
2. Ehlert, M.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Bartmański, M.; Radtke, A. Titania Nanofiber Scaffolds with Enhanced Biointegration Activity—Preliminary In Vitro Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5642. [CrossRef]
3. Ehlert, M.; Radtke, A.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Bartmański, M.; Piszczek, P. In Vitro Studies on Nanoporous, Nanotubular and Nanosponge-Like Titania Coatings, with the Use of Adipose-Derived Stem Cells. *Materials* **2020**, *13*, 1574. [CrossRef] [PubMed]
4. Long, M.; Rack, H.J. Titanium alloys in total joint replacement—A materials science perspective. *Biomaterials* **1998**, *19*, 1621–1639. [CrossRef]
5. Zadpoor, A.A. Biomaterials and Tissue Biomechanics: A Match Made in Heaven? *Materials* **2017**, *10*, 528. [CrossRef] [PubMed]
6. Prakasam, M.; Locs, J.; Salma-Ancane, K.; Loca, D.; Largeteau, A.; Berzina-Cimdina, L. Biodegradable Materials and Metallic Implants—A Review. *J. Funct. Biomater.* **2017**, *8*, 44. [CrossRef]

7. Wyatt, M.; Hooper, G.; Frampton, C.; Rothwell, A. Survival outcomes of cemented compared to uncemented stems in primary total hip replacement. *World J. Orthop.* **2014**, *5*, 591–596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Li, J.C.; Dunand, D.C. Mechanical properties of directionally freeze-cast titanium foams. *Acta Mater.* **2011**, *59*, 146–158. [[CrossRef](#)]
9. Tsimbouri, P.M.; Fisher, L.; Holloway, N.; Sjostrom, T.; Nobbs, A.H.; Meek, R.M.; Su, B.; Dalby, M.J. Osteogenic and bactericidal surfaces from hydrothermal titania nanowires on titanium substrates. *Sci. Rep.* **2016**, *18*, 1–12. [[CrossRef](#)]
10. Lah, N.A.C.; Hussin, M.H. Titanium and Titanium Based Alloys as Metallic Biomaterials in Medical Applications—Spine Implant Case Study. *Pertanika J. Sci. Technol.* **2019**, *27*, 459–472.
11. Soro, N.; Attar, H.; Brodie, E.; Veidt, M.; Molotnikov, A.; Dargusch, M.S. Evaluation of the mechanical compatibility of additively manufactured porous Ti–25Ta alloy for load-bearing implant applications. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2019**, *97*, 149–158. [[CrossRef](#)]
12. Verma, R.P. Titanium based biomaterial for bone implants: A mini review. *Mater. Today Proc.* **2020**, *26*, 2214–7853. [[CrossRef](#)]
13. Trujillo, C.D.; Beltran, A.M.; Garvi, D.; Salazar-Moya, A.; Lebrato-Martinez, J.; Hickey, D.J.; Rodriguez-Ortiz, J.A.; Kamm, P.H.L.; Lebrato, C.; Garcia-Moreno, F.; et al. Bacterial behavior on coated porous titanium substrates for biomedical applications. *Surf. Coat. Technol.* **2019**, *357*, 896–902. [[CrossRef](#)]
14. Shah, F.A.; Trobos, M.; Thomsen, P.; Palmquist, A. Commercially pure titanium (cp-Ti) versus titanium alloy (Ti6Al4V) materials as bone anchored implants—Is one truly better than the other? *Mater. Sci Eng. C* **2016**, *62*, 960–966. [[CrossRef](#)]
15. Shah, F.A.; Thomsen, P.; Palmquist, A. Osseointegration and current interpretations of the bone-implant interface. *Acta Biomater.* **2019**, *84*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Rosales-Leal, J.I.; Rodriguez-Valverde, M.A.; Mazzaglia, G.; Ramon-Torregrosa, P.J.; Rodriguez, L.D.; Garcia-Martinez, O.; Vallecillo-Capilla, M.; Ruiz, C.; Cabrerizo-Vilchez, M.A. Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast-like cell adhesion. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* **2010**, *365*, 222–229. [[CrossRef](#)]
17. Wang, Y.; Yu, Z.; Guo, X.; Hu, J. Surface morphology of modified titanium alloy affects proliferation stability of bone marrow mesenchymal stem cells. *Surf. Coat. Technol.* **2019**, *366*, 156–163. [[CrossRef](#)]
18. Bacakova, L.; Filova, E.; Parizek, M.; Ruml, T.; Svorcik, V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 739–767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Ponche, A.; Bigerelle, M.; Anselme, K. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 1: Physico-chemical effects. *Proc. Inst. Mech. Eng.* **2010**, *224*, 1471–1486. [[CrossRef](#)]
20. Gentleman, M.M.; Gentleman, E. The role of surface free energy in osteoblast–biomaterial interactions. *Int. Mater. Rev.* **2014**, *59*, 417–429. [[CrossRef](#)]
21. Anselme, K.; Ponche, A.; Bigerelle, M. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: Biological aspects. *Proc. Inst. Mech. Eng.* **2010**, *224*, 1487–1507. [[CrossRef](#)]
22. Radtke, A.; Ehlert, M.; Jędrzejewski, T.; Bartmański, M. The Morphology, Structure, Mechanical Properties and Biocompatibility of Nanotubular Titania Coatings before and after Autoclaving Process. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Radtke, A.; Bal, M.; Jędrzejewski, T. Novel Titania Nanocoatings Produced by Anodic Oxidation with the Use of Cyclically Changing Potential: Their Photocatalytic Activity and Biocompatibility. *Nanomaterials* **2018**, *8*, 712. [[CrossRef](#)]
24. Shi, X.; Qian, Q.; Xu, L.; Zhu, H.; Xu, L.; Wang, Q. Effects of hydrothermal sterilization on properties of biological coating fabricated by alkaline-heat treatment on titanium. *Surf. Coat. Technol.* **2018**, *342*, 69–75. [[CrossRef](#)]
25. Wang, H.; Lai, Y.; Zheng, R.; Bian, Y.; Zhang, K.; Lin, C. Tuning the surface microstructure of titanate coatings on titanium implants for enhancing bioactivity of implants. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 3887–3896. [[CrossRef](#)]
26. Arumugam, M.K.; Hussein, M.A.; Adesina, A.Y.; Al-Aqeeli, N. In Vitro Corrosion and Bioactivity Performance of Surface-Treated Ti-20Nb-13Zr Alloys for Orthopedic Applications. *Coatings* **2019**, *9*, 344. [[CrossRef](#)]
27. Lee, B.H.; Kim, Y.D.; Shin, J.H.; Lee, K.H. Surface modification by alkali and heat treatments in titanium alloys. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *61*, 466–473. [[CrossRef](#)]
28. Mohammed, M.T.; Khan, Z.A.; Siddiquee, A.N. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Procedia Mater. Sci.* **2014**, *6*, 1610–1618. [[CrossRef](#)]
29. Rakngarm, A.; Miyashita, Y.; Mutoh, Y. Formation of hydroxyapatite layer on bioactive Ti and Ti–6Al–4V by simple chemical technique. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 1953–1961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. He, D.H.; Wang, P.; Liu, P.; Liu, X.K.; Ma, F.C.; Zhao, J. HA coating fabricated by electrochemical deposition on modified Ti6Al4V alloy. *Surf. Coat. Technol.* **2016**, *301*, 6–12. [[CrossRef](#)]
31. Zhang, H.; Li, M.; Zhou, Z.; Shen, L.; Bao, N. Microstructure and Morphology Control of Potassium Magnesium Titanates and Sodium Iron Titanates by Molten Salt Synthesis. *Materials* **2019**, *12*, 1577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Papp, S.; Korosi, L.; Meynen, V.; Cool, P.; Vansant, E.F.; Dekany, I. The influence of temperature on the structural behaviour of sodium tri- and hexa-titanates and their protonated forms. *J. Solid State Chem.* **2005**, *178*, 1614–1619. [[CrossRef](#)]
33. Becker, I.; Hofmann, I.; Muller, F.A. Preparation of bioactive sodium titanate ceramics. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2007**, *27*, 4547–4553. [[CrossRef](#)]
34. Sauvet, A.L.; Baliteau, S.; Lopez, C. Synthesis and characterization of sodium titanates Na₂Ti₃O₇ and Na₂Ti₆O₁₃. *J. Solid State Chem.* **2004**, *177*, 4508–4515. [[CrossRef](#)]
35. Wadsley, A.D.; Mumme, W.G. The Crystal Structure of Na₂Ti₇O₁₅, and an ordered intergrowth of Na₂Ti₆O₁₃ and ‘Na₂Ti₈O₁₇’. *Acta Cryst.* **1968**, *B24*, 392–396. [[CrossRef](#)]

36. Wei, M.; Kim, H.M.; Kokubo, T.; Evans, J.H. Optimising the bioactivity of alkaline-treated titanium alloy. *Mater. Sci. Eng. C* **2002**, *20*, 125–134. [[CrossRef](#)]
37. Do Nascimento, R.M.; de Carvalho, V.R.; Govone, J.S.; Hernandes, A.C.; da Cruz, N.C. Effects of negatively and positively charged Ti metal surfaces on ceramic coating adhesion and cell respons. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2017**, *28*, 33. [[CrossRef](#)]
38. Kokubo, T.; Yamaguchi, S. Novel Bioactive Titanate Layers Formed on Ti Metal and Its Alloys by Chemical Treatments. *Materials* **2010**, *3*, 48–63. [[CrossRef](#)]
39. Baliteau, S.; Sauvet, A.L.; Lopez, C.; Fabry, P. Controlled synthesis and characterization of sodium titanate composites $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7/\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$. *Solid State Ionics* **2007**, *178*, 1517–1522. [[CrossRef](#)]
40. Gao, T.; Fjellvag, H.; Norby, P. Crystal Structures of Titanate Nanotubes: A Raman Scattering Study. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 1423–1432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Kawanabe, K.; Ise, K.; Goto, K.; Akiyama, H.; Nakamura, T.; Kaneuji, A.; Sugimori, T.; Matsumoto, T. A New Cementless Total Hip Arthroplasty With Bioactive Titanium Porous-Coating by Alkaline and Heat Treatment: Average 4.8-Year Results. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2009**, *90*, 476–481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Du, J.; Liu, X.; He, D.; Liu, P.; Ma, F.; Li, Q.; Feng, N. Influence of Alkali Treatment on Ti6Al4V Alloy and the HA Coating Deposited by Hydrothermal-Electrochemical Methods. *Rare Metal. Mater. Eng.* **2014**, *43*, 830–835. [[CrossRef](#)]
43. Kim, H.M.; Miyaji, F.; Kokubo, T.; Nakamura, T. Effect of heat treatment on apatite-forming ability of Ti metal induced by alkali treatment. *J. Mater. Med. Mater. Med.* **1997**, *8*, 341–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Yamaguchi, S.; Le, P.T.M.; Ito, M.; Shintani, S.A.; Takadama, H. Tri-Functional Calcium-Deficient Calcium Titanate Coating on Titanium Metal by Chemical and Heat Treatment. *Coatings* **2019**, *9*, 561. [[CrossRef](#)]
45. Takadama, H.; Kim, H.M.; Kokubo, T.; Nakamura, T. An X-ray photoelectron spectroscopy study of the process of apatite formation on bioactive titanium metal. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *55*, 185–193. [[CrossRef](#)]
46. Obata, A.; Zhai, T.; Kasuga, T. Apatite-forming ability on titanium surface modified by hydrothermal treatment and ultraviolet irradiation. *J. Mater. Res.* **2008**, *23*, 3169–3175. [[CrossRef](#)]
47. Koju, N.; Sikder, P.; Ren, Y.; Zhou, H.; Bhaduri, S.B. Biomimetic coating technology for orthopedic implants. *Curr. Opin. Chem. Eng.* **2017**, *15*, 49–55. [[CrossRef](#)]
48. Jalota, S.; Bhaduri, S.B.; Tas, A.C. Effect of carbonate content and buffer type on calcium phosphate formation in SBF solutions. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2006**, *17*, 697–707. [[CrossRef](#)]
49. Fatehi, K.; Moztaaradeh, F.; Solati-Hashjin, M.; Tahriri, M.; Rezvannia, M.; Ravarian, R. In vitro biomimetic deposition of apatite on alkaline and heat treated Ti6Al4V alloy surface. *Bull. Mater. Sci.* **2008**, *31*, 101–108. [[CrossRef](#)]
50. Jonasova, L.; Muller, F.A.; Helebrant, A.; Strnad, J.; Greil, P. Biomimetic apatite formation on chemically treated titanium. *Biomaterials* **2004**, *25*, 1187–1194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Song, W.H.; Jun, Y.K.; Han, Y.; Hong, S.H. Biomimetic Apatite Coatings on Micro-Arc Oxidized Titania. *Biomaterials* **2004**, *25*, 3341–3349. [[CrossRef](#)]
52. ISO/FDIS 23317:2007(E) Standards. Implants for Surgery—In Vitro Evaluation for Apatite-Forming Ability of Implant Materials. Available online: <https://www.iso.org/standard/41446.html> (accessed on 5 March 2019).
53. Kokubo, T.; Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* **2006**, *27*, 2907–2915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Manfroi, D.C.; dos Anjos, A.; Cavalheiro, A.A.; Perazolli, L.A.; Varela, J.A.; Zaghete, M.A. Titanate nanotubes produced from microwave-assisted hydrothermal synthesis: Photocatalytic and structural properties. *Ceram. Int.* **2014**, *40*, 14483–14491. [[CrossRef](#)]
55. Morgan, D.L.; Zhu, H.Y.; Frost, R.L.; Waclawik, E.R. Determination of a Morphological Phase Diagram of Titania/Titanate Nanostructures from Alkaline Hydrothermal Treatment of Degussa P25. *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 3800–3802. [[CrossRef](#)]
56. Zhang, Y.; Guo, L.; Yang, S. Three-dimensional spider-web architecture assembled from $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ nanotubes as a high performance anode for a sodium-ion battery. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 14029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Song, H.; Jiang, H.; Liu, T.; Liu, X.; Meng, G. Preparation and photocatalytic activity of alkali titanate nano materials $\text{A}_2\text{Ti}_n\text{O}_{2n+1}$ (A = Li, Na and K). *Mater. Res. Bull.* **2007**, *42*, 334–344. [[CrossRef](#)]
58. Zhang, Z.; Goodall, J.B.; Brown, S.; Karlsson, L.; Clark, R.J.; Hutchison, J.L.; Rehman, I.U.; Darr, J.A. Continuous hydrothermal synthesis of extensive 2D sodium titanate ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$) nano-sheets. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 711–714. [[CrossRef](#)]
59. Guo, Y.; Lee, N.H.; Oh, H.J.; Yoon, C.R.; Park, K.S.; Lee, H.G.; Lee, K.S.; Kim, S.J. Structure-tunable synthesis of titanate nanotube thin films via a simple hydrothermal process. *Nanotechnology* **2007**, *18*, 295608. [[CrossRef](#)]
60. Yan, X.; Sun, D.; Jiang, J.; Yan, W.; Jin, Y. Self-assembled twine-like $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ nanostructure as advanced anode for sodium-ion batteries. *J. Alloys Compd.* **2017**, *697*, 208–214. [[CrossRef](#)]
61. Qamar, M.; Yoon, C.R.; Oh, H.J.; Kim, D.H.; Jho, J.H.; Lee, W.J.; Lee, H.G.; Kim, S.J. Effect of post treatments on the structure and thermal stability of titanate nanotubes. *Nanotechnology* **2006**, *17*, 5922. [[CrossRef](#)]
62. Bamberger, C.E.; Begun, G.M. Sodium Titanates: Stoichiometry and Raman Spectra. *J. Am. Ceram. Soc.* **1987**, *70*, 48–51. [[CrossRef](#)]
63. Yin, J.; Qi, L.; Wang, H. Sodium Titanate Nanotubes as Negative Electrode Materials for Sodium-Ion Capacitors. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4*, 2762–2768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Tian, B.L.; Zu-Liang, D.; Yan-Mei, M.; Xue-Fei, L.; Qi-Liang, C.; Tian, C.; Bing-Bing, L.; Guang-Tian, Z. Raman Investigation of Sodium Titanate Nanotubes under Hydrostatic Pressures up to 26.9 GPa. *Chin. Phys. Lett.* **2010**, *27*, 026103.

65. Weng, L.O.; Song, S.H.; Hodgson, S.; Baker, A.; Yu, J. Synthesis and characterization of nanotubular titanates and titania. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2006**, *26*, 1405–1409. [[CrossRef](#)]
66. Ramesh, S.; Loo, Z.Z.; Tan, C.Y.; Chew, W.J.K.; Ching, Y.C.; Tarlochan, F.; Chandran, H.; Krishnasamy, S.; Bang, L.T.L.; Sarhan, A.A.D. Characterization of biogenic hydroxyapatite derived from animal bones for biomedical applications. *Ceram. Int.* **2018**, *44*, 10525–10530. [[CrossRef](#)]
67. Xiao, X.F.; Liu, R.F.; Zheng, Y.Z. Characterization of hydroxyapatite/titania composite coatings codeposited by a hydrothermal–electrochemical method on titanium. *Surf. Coat. Technol.* **2006**, *200*, 4406–4413. [[CrossRef](#)]
68. Huang, Y.; Zhang, X.; Zhang, H.; Qiao, H.; Zhang, X.; Jia, T.; Han, S.; Gao, Y.; Xiao, H.; Yang, H. Fabrication of silver- and strontium-doped hydroxyapatite/TiO₂ nanotube bilayer coatings for enhancing bactericidal effect and osteoinductivity. *Ceram. Int.* **2017**, *43*, 992–1007. [[CrossRef](#)]
69. Brangule, A.; Gross, K.A. Importance of FTIR Spectra Deconvolution for the Analysis of Amorphous Calcium Phosphates. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2015**, *77*, 012027. [[CrossRef](#)]
70. Tsuchiya, H.; Macak, J.M.; Müller, L.; Kunze, J.; Müller, F.; Greil, P.; Virtanen, S.; Schmuki, P. Hydroxyapatite growth on anodic TiO₂ nanotubes. *J. Biomed. Mater. Res. A.* **2006**, *77*, 534–541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Manso, M.; Langlet, M.; Martinez-Duart, J.M. Testing sol–gel CaTiO₃ coatings for biocompatible applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2003**, *23*, 447–450. [[CrossRef](#)]
72. Barinov, S.M.; Rau, J.V.; Cesaro, S.N.; Durisin, J.; Fadeeva, I.V.; Ferro, D.; Medvecky, L.; Trionfetti, G. Carbonate release from carbonated hydroxyapatite in the wide temperature range. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2006**, *17*, 597–604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Rehman, I.; Bonfield, W. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR Spectroscopy. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1997**, *8*, 1–4. [[CrossRef](#)]
74. Wei, D.; Zhou, Y.; Jia, D.; Wang, Y. Biomimetic apatite deposited on microarc oxidized anatase-based ceramic coating. *Ceram. Int.* **2008**, *34*, 1139–1144. [[CrossRef](#)]
75. Ramesh, S.T.; Rameshbabu, N.; Gandhimathi, R.; Nidheesh, P.V.; Kumar, M.S. Kinetics and equilibrium studies for the removal of heavy metals in both single and binary systems using hydroxyapatite. *Appl. Water Sci.* **2012**, *2*, 187–197. [[CrossRef](#)]
76. Berzina-Cimdina, L.; Borodajenko, N. Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In *Infrared Spectroscopy—Materials Science, Engineering and Technology*; Theophanides, T., Ed.; IntechOpen Ltd.: London, UK, 2012; Volume 6, pp. 123–148.
77. Tripathy, A.; Sharma, P.; Sahoo, N.; Pramanik, S.; Osman, N.A.A. Moisture sensitive inimitable Armalcolite/PDMS flexible sensor: A new entry. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *262*, 211–220. [[CrossRef](#)]
78. Bohre, A.; Avasthi, K.; Singh, B.; Shrivastava, O.P. Crystallographic Evaluation of Titanate Ceramics as a Host Structure for Immobilization of Samarium. *Radiochemistry* **2014**, *56*, 92–97. [[CrossRef](#)]
79. Rincon-Lopez, J.A.; Hermann-Munoz, J.A.; Giraldo-Betancur, A.L.; de Vizcaya-Ruiz, A.; Alvarado-Orozco, J.M.; Munoz-Saldana, J. Synthesis, Characterization and In Vitro Study of Synthetic and Bovine-Derived Hydroxyapatite Ceramics: A Comparison. *Materials* **2018**, *11*, 333. [[CrossRef](#)]
80. Dasarathy, H.; Riley, C.; Coble, H.D. Analysis of apatite deposits on substrates. *J. Biomed. Mater. Res.* **1993**, *27*, 477–482. [[CrossRef](#)]
81. Huong, D.T.M.; Nam, N.H.; Vu, L.V.; Long, N.N. Preparation and optical characterization of Eu³⁺-doped CaTiO₃ perovskite powders. *J. Alloys Compd.* **2012**, *537*, 54–59. [[CrossRef](#)]
82. Cavalcante, L.S.; Marques, V.S.; Sczancoski, J.C.; Escote, M.T.; Joya, M.R.; Varela, J.A.; Santos, M.R.M.C.; Pizani, P.S.; Longo, E. Synthesis, structural refinement and optical behavior of CaTiO₃ powders: A comparative study of processing in different furnaces. *Chem. Eng. J.* **2008**, *143*, 299–307. [[CrossRef](#)]
83. Muller, L.; Muller, F.A. Preparation of SBF with different HCO₃⁻ content and its influence on the composition of biomimetic apatites. *Acta Biomater.* **2006**, *2*, 181–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Gajović, A.; Friscić, I.; Plodinec, M.; Iveković, D. High temperature Raman spectroscopy of titanate nanotubes. *J. Mol. Struct.* **2009**, *924–926*, 183–191. [[CrossRef](#)]
85. Hernandez-Hipolito, P.; Juarez-Flores, N.; Martinez-Klimova, E.; Gomez-Cortes, A.; Bokhimi, X.; Escobar-Alarcon, L.; Klimova, T.E. Novel heterogeneous basic catalysts for biodiesel production: Sodium titanate nanotubes doped with potassium. *Catal. Today* **2015**, *250*, 187–196. [[CrossRef](#)]
86. Xu, X.; Chen, X.M.; Wu, S.Y. Preparation, properties and characterization of CaTiO₃-modified Pb(Fe_{1/2}Nb_{1/2})O₃ dielectrics. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2003**, *23*, 1919–1924.
87. Rahimpour, S.; Salahinejad, E.; Sharifi, E.; Nosrati, H.; Tayebi, L. Structure, wettability, corrosion and biocompatibility of nitinol treated by alkaline hydrothermal and hydrophobic functionalization for cardiovascular applications. *Appl. Surf. Sci.* **2020**, *506*, 144657. [[CrossRef](#)]
88. Krzakała, A.; Służalska, K.; Dercz, G.; Maciej, A.; Kazek, A.; Szade, J.; Simka, W. Characterisation of bioactive films on Ti–6Al–4V alloy. *Electrochim. Acta* **2013**, *104*, 425–438.
89. Cheng, H.; Xiong, W.; Fang, Z.; Guan, H.; Wu, W.; Li, Y.; Zhang, Y.; Alvarez, M.M.; Gao, B.; Huo, K.; et al. Strontium (Sr) and silver (Ag) loaded nanotubular structures with combined osteoinductive and antimicrobial activities. *Acta Biomater.* **2016**, *31*, 388–400. [[CrossRef](#)]

90. Kazek-Kęsik, A.; Leśniak, K.; Zhidkov, I.S.; Korotin, D.M.; Kukhareno, A.I.; Cholakh, S.O.; Kalemba-Rec, I.; Suchanek, K.; Kurmaev, E.Z.; Simka, W. Influence of Alkali Treatment on Anodized Titanium Alloys in Wollastonite Suspension. *Metals* **2017**, *7*, 322. [[CrossRef](#)]
91. Ricci, J.L.; Grew, J.C.; Alexander, H. Connective-tissue responses to defined biomaterial surfaces. I. Growth of rat fibroblast and bone marrow cell colonies on microgrooved substrates. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2007**, *85*, 313–325. [[CrossRef](#)]
92. Kunzler, T.P.; Drobek, T.; Schuler, M.; Spencer, N.D. Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients. *Biomaterials* **2007**, *28*, 2175–2182. [[CrossRef](#)]
93. Vannozzi, L.; Gouveia, P.; Pingue, P.; Canale, C.; Ricotti, L. Novel Ultrathin Films Based on a Blend of PEG-b-PCL and PLLA and Doped with ZnO Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 21398–21410. [[CrossRef](#)]
94. Strickstock, M.; Rothe, H.; Grohmann, S.; Hildebrand, G.; Zylla, I.M.; Liefeth, K. Influence of surface roughness of dental zirconia implants on their mechanical stability, cell behavior and osseointegration. *BioNanoMaterials* **2017**, *18*, 20160013. [[CrossRef](#)]
95. Wennerberg, A.; Albrektsson, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: A systematic review. *Clin. Oral Implant. Res.* **2009**, *20*, 172–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Calabrese, G.; Giuffrida, R.; Fabbi, C.; Figallo, E.; Lo Furno, D.; Gulino, R.; Colarossi, C.; Fullone, F.; Giuffrida, R.; Parenti, R.; et al. Collagen-Hydroxyapatite Scaffolds Induce Human Adipose Derived Stem Cells Osteogenic Differentiation In Vitro. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0151181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Ramaswamy, Y.; Roohani, I.; No, Y.J.; Madafiglio, G.; Chang, F.; Zhang, F.; Lu, Z.; Zreiqat, H. Nature-inspired topographies on hydroxyapatite surfaces regulate stem cells behaviour. *Bioact. Mater.* **2020**, *6*, 1107–1117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Assessment of Titanate Nanolayers in Terms of Their Physicochemical and Biological Properties

Michalina Ehlert ^{1,2}, Aleksandra Radtke ^{1,2,*}, Katarzyna Roszek ³, Tomasz Jędrzejewski ³ and Piotr Piszczek ^{1,2,*}

¹ Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Gagarina 7, 87-100 Toruń, Poland; m.ehlert@doktorant.umk.pl

² Nano-implant Ltd., Gagarina 5/102, 87-100 Toruń, Poland

³ Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Lwowska 1, 87-100 Toruń, Poland; kroszek@umk.pl (K.R.); tomaszj@umk.pl (T.J.)

* Correspondence: aradtke@umk.pl (A.R.); piszczek@umk.pl (P.P.); Tel.: +48-60-032-12-94 (A.R.); +48-60-788-33-57 (P.P.)

Citation: Ehlert, M.; Radtke, A.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Piszczek, P. Assessment of Titanate Nanolayers in Terms of Their Physicochemical and Biological Properties. *Materials* **2021**, *14*, 806. <https://doi.org/10.3390/ma14040806>

Academic Editor: Carla Renata

Arciola

Received: 5 January 2021

Accepted: 1 February 2021

Published: 8 February 2021

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



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

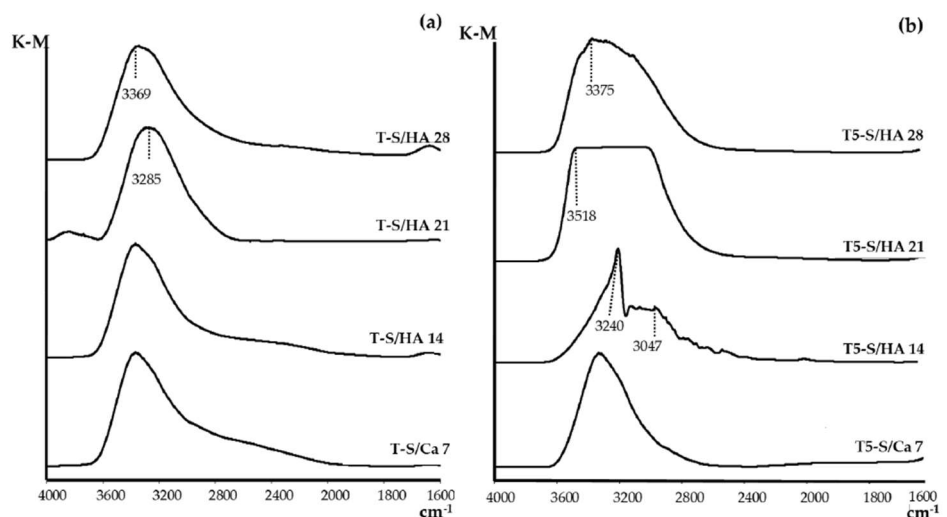


Figure S1. DRIFT spectra (1600–4000 cm^{-1}) of studied T-S/Ca and T-S/HA (a), T5-S/Ca and T5-S/HA (b) after immersing in SBF for 7, 14, 21 and 28 days.

P4. *Evaluation of the Cathodic Electrodeposition Effectiveness of the Hydroxyapatite Layer Used in Surface Modification of Ti6Al4V-Based Biomaterials*

Article

Evaluation of the Cathodic Electrodeposition Effectiveness of the Hydroxyapatite Layer Used in Surface Modification of Ti6Al4V-Based Biomaterials

Michalina Ehlert ^{1,2,*}, Aleksandra Radtke ^{1,2} , Michał Bartmański ³  and Piotr Piszczek ^{1,2,*} 

¹ Department of Inorganic and Coordination Chemistry, Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Gagarina 7, 87-100 Toruń, Poland

² Nano-Implant Ltd., Gagarina 7/47, 87-100 Toruń, Poland

³ Department of Biomaterials Technology, Faculty of Mechanical Engineering and Ship Technology, Gdańsk University of Technology, Gabriela Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Poland

* Correspondence: m.ehlert@doktorant.umk.pl (M.E.); piszczek@umk.pl (P.P.)

Abstract: The important issue associated with the design and the fabrication of the titanium and titanium alloy implants is the increase of their biointegration with bone tissue. In the presented paper, the research results concerning the conditions used in the cathodic deposition of hydroxyapatite on the surface Ti6Al4V substrates primarily modified by the production of TiO₂ nanoporous coatings, TiO₂ nanofibers, and titanate coatings, are discussed. Despite excellent biocompatibility with natural bone tissue of materials based on hydroxyapatite (HA), their poor adhesion to the substrate caused the limited use in the implants' construction. In our works, we have focused on the comparison of the structure, physicochemical, and mechanical properties of coating systems produced at different conditions. For this purpose, scanning electron microscopy images, chemical composition, X-ray diffraction patterns, infrared spectroscopy, wettability, and mechanical properties are analyzed. Our investigations proved that the intermediate titanium oxide coatings presence significantly increases the adhesion between the hydroxyapatite layer and the Ti6Al4V substrate, thus solving the temporary delamination problems of the HA layer.

Keywords: cathodic electrodeposition; hydroxyapatite; nanomechanical properties; surface modification; Ti6Al4V alloy



Citation: Ehlert, M.; Radtke, A.; Bartmański, M.; Piszczek, P. Evaluation of the Cathodic Electrodeposition Effectiveness of the Hydroxyapatite Layer Used in Surface Modification of Ti6Al4V-Based Biomaterials. *Materials* **2022**, *15*, 6925. <https://doi.org/10.3390/ma15196925>

Academic Editor: Andrei Victor Sandu

Received: 29 August 2022

Accepted: 1 October 2022

Published: 6 October 2022

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



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Titanium and its alloys are widely used as load-bearing implants [1–3]. Among them, the Ti6Al4V alloy in particular has been considered as one of the suitable candidates for bioimplants due its good biocompatibility, well-balanced strength-to-weight ratio and comparatively low elastic modulus [4–6]. Nevertheless, research is still being conducted to achieve a higher biointegrity of the Ti6Al4V alloy and closer mechanical properties to the skeletal system. It should also be noted that the studies of titanium-based materials used in the construction of modern implants revealed their susceptibility to bacteria-induced inflammations [7–9]. It can lead to the loosening of the implants and other complications and consequently, their removal or replacement may be necessary. The surface modification of implants by producing the coatings of defined architecture, which will inhibit the adhesion of bacterial cells to them, is one of the proposed solutions. Electrolytic oxidation (anodizing), allowing for the production of different surface architecture coatings, i.e., nanoporous, nanotubular, or nanosponge-like types, is a widely used method [10–12]. Another good example is the result of investigations concerning the Ti6Al4V implant surface modification using SLS technology (selective laser sintering). It was found that Ti6Al4V implant surface modification by the TiO₂ nanoporous layer covering, led to the formation of a system of more suitable physicochemical and osseointegration properties [10,11,13]. Moreover, this

layer exhibited excellent wear resistance and the ability to propagate energy at plastic deformation during loading. The increase in the antimicrobial activity of this implant was obtained by surface enrichment with metallic silver nanoparticles. A significant advantage of the modification type mentioned above was that the layer did not release substances showing mutagenic properties [14,15].

From the new generation implant construction point of view, the crucial issue is to equip their surface with a biocompatible, bioactive coating layer that adheres perfectly to the substrate (e.g., does not delaminate during use of the implant) [16,17]. The way to achieve this effect can be a production of an additional coating of a bone-like substance that is hydroxyapatite (HA), i.e., hydroxyl-containing forms of calcium phosphate, which promotes bone formation and growth [17,18]. Crystalline HA provides mechanical stability to the coating. However, in the environment of body fluid it can slowly degrade, leading to insufficient bone ingrowth [19]. On the other hand, the amorphous type has a slightly higher solubility, which promotes faster initial bone fixation due to resorption and bioactivity [20]. For biomedical applications, an important ceramic material is a hydroxyapatite with a Ca/P molar ratio of 1.67. Since it can provide the mineral scaffolding for connective tissue, which is responsible for the mechanical strength of bones [16,21]. The use of hydroxyapatite as a protective coating for various metallic implants offers many advantages. The surfaces of metal implants become more resistant to corrosion and are also protected against releasing toxic ions from their surfaces [21]. Furthermore, the production of a hydroxyapatite coating promotes the formation of apatite, the main inorganic component of bone and teeth [22–24]. However, calcium phosphate coatings often exhibit poor adhesion to metallic substrates. Implants with an HA layer may undergo fatigue failure in load-bearing applications. According to literature data, it is assumed that in order to avoid fatigue damage and dissolution, the thickness of the HA layer should be ca. 50 μm [22,25].

The plasma spraying, pulsed laser deposition, sol-gel method, PVD (sputter coating), electrophoretic deposition, electrodeposition, and gas detonation deposition are usually used for producing an HA layer on implant surfaces [16,17,21,24,26–28]. Plasma spraying is the most popular, which has the advantage of being able to produce highly repeatable coatings. Nevertheless, the plasma spraying process uses high temperatures, often linked to uncontrolled phase changes and thermomechanical mismatches [16,27,29,30]. An alternative method to produce hydroxyapatite layers is electrodeposition. This is an efficient technique for producing a calcium phosphate layer on the surface of a conductive material through a series of chemical reactions in an aqueous solution using electrical energy [16,21,24,27,31]. The electrochemical technique is attractive due to its simplicity, low cost, uniformity of the produced coatings, and ability to precisely control the properties of the layers produced (chemical composition, thickness, structure) at low temperatures. It is suitable for coating surfaces with complex geometries [16,17,21,32]. The major limitation of the electrodeposition technique is the poor adhesion of the HA layer to the implant's surface [16,21,33]. Usually, the interfacial delamination of the HA layer is initially caused by vertical cracking of the coating throughout the thickness, which occurs at the HA–Ti6Al4V and HA–human bone interface [34]. The delamination of the hydroxyapatite layer can lead to the formation of inflammation in the surrounding organs, and consequently bone loss and even loosening of such an implant [22,35]. The analysis of literature data shows that research on this issue is conducted in various directions. An example is using computational models to analyze Tresca stresses in metal bearings, as well as to assess delamination–fretting damage [34,36]. According to Ammarullah et al., it is the Ti6Al4V-on-Ti6Al4V bearings that show the superior Tresca stress reduction properties among other metal-on-metal bearings [36].

Nevertheless, so far, research using a connector has not yielded the expected results, so we aimed to produce a group of different connectors and select the most optimal one to create more stable HA layers [22,37]. For this purpose, a multistage chemical treatment of the Ti6Al4V substrate surface was used to create a stable intermediate layer connecting the alloy surface with the hydroxyapatite layer. Based on our earlier works, the following

coatings were selected: (a) nanoporous TiO₂ coatings, (b) nanofibrous TiO₂ coatings, and (c) titanate coatings. It should be noted that we tested the coatings mentioned above as independent systems but not as intermediate ones [10,38,39]. For this reason, an innovative aspect of the presented paper is the system's production: Ti6Al4V–intermediate layer (TiO₂ or titanate)–HA. Titanium oxide coatings show high biointegration properties and better mechanical properties than titanium alloy. However, their Young's modulus and hardness parameters are still higher than cortical bone's. Therefore, our research aimed to produce a coating system whose mechanical parameters are like the cortical bone and reveal the hydroxyapatite layer's high adhesion strength to the Ti6Al4V substrate. To achieve this effect, we optimized the process conditions of the cathodic electrodeposition of hydroxyapatite and the determined mechanical properties of produced systems Ti6Al4V-intermediate layer-HA.

2. Materials and Methods

2.1. The Synthesis of TiO₂ and Titanate Nanocoatings

All experiments were carried out using Ti6Al4V alloy (marked as T, grade 5, 99.7% purity) (Strem Chemicals Inc., Bischheim, France), a foil of 0.2 mm thickness, as a base substrate, which was cut into strips of 6 mm wide and 100 mm long. In the first stage, the surface of T substrates was modified by manufacturing TiO₂ nanoporous (T5) coatings and TiO₂ nanofiber (TNF6 and TNF72), and titanate (T5-S and T-S) types, according to methods previously described (all acronyms used in this article are consistent with those used to mark samples in earlier works) [10,11,38–40]. Before the next stages of the research, the samples were structurally and morphologically characterized.

Details of T surface modification:

- (a) The anodic oxidation method allowed the production of T5 coatings on the surface of Ti6Al4V substrates. This method used the 0.3% HF solution as an electrolyte, $t = 20$ min, and the 5 V potential. The produced T5 coatings were rinsed with deionized water and in acetone for 10 min.
- (b) The TNF coatings were produced due to T sample surface chemical oxidation. The surfaces of the substrates were chemically etched in c.a. 5.8 M HCl. Afterwards, materials were heated in 30% H₂O₂ solution at 358 K under a reflux condenser (TNF6C) or in an incubator (TNF6S) for $t = 6$ h. The nanofibrous samples marked TNF72 were produced in a slightly different procedure. The surface etching of the Ti6Al4V substrate was applied (a) in 2M HF solution for 10 s (TNF72a) or (b) in a 1:4:5 mixture of HF:HNO₃:H₂O (TNF72b). Then, the samples were immersed in 30% H₂O₂ solution at 358 K for 72 h in an incubator.
- (c) The alkali-sodium treatment produced the T-S and T5-S samples. The Ti6Al4V sample (T) and nonporous one (T5) were immersed in a 7 M NaOH solution at 339 K for $t = 48$ h. In the next step, these materials were washed with distilled water and dried at 314 K for 24 h in an incubator.

2.2. Synthesis of Hydroxyapatite on TiO₂ and Titanate Nanocoatings

The electrochemical cathodic deposition method was applied when depositing the hydroxyapatite (HA) coating. The experimental set-up is home-made and was made by the authors of this paper. It consists of a laboratory power supply (China, MCP lab electronics, M10-QS1005; display accuracy is $\pm 0.5\%$ Rdg + 2digits) and two digital multimeters (Germany, Beha Amprobe, AM-510-EUR; accuracy of DC current measurement is $\pm 1\%$ Rdg + 2digits; accuracy of DC voltage measurement is $\pm 1\%$ Rdg + 3digits). The deposition process was carried out at 339 K temperature using prepared substrate ((T (Ti6Al4V), TiO₂ nanoporous (T5), titanate (T5-S, T-S), and TiO₂ nanofibres (TNF6C, TNF6S, TNF72a, and TNF72b)) as cathode, platinum wire as anode (Figure 1). The electrolyte consisted of Ca(NO₃)₂ · 4 H₂O (0.042 M), NH₄H₂PO₄ (0.025 M), and EDTA-2Na (1.5×10^{-3} M) in distilled water. The initial pH value of the electrolytes was adjusted to 4.5 using Tris(hydroxymethyl)aminomethane. The deposition process time was 60 min.

The electrochemical deposition of HA on each sample was carried out at three different current values, i.e., 1.5 mA, 2.5 mA, and 3.5 mA. The voltage range during deposition was 2.24–3.00 V. After cathodic deposition, specimens were immersed in 0.1M NaOH solution for 2 h at 339 K and then sintered at 524 K for 2 h. All samples prepared for analyses were autoclaved using an IS YESON YS-18L (Yeson, Ningbo, China) at 396 K, $p = 120$ kPa, $t = 20$ min.

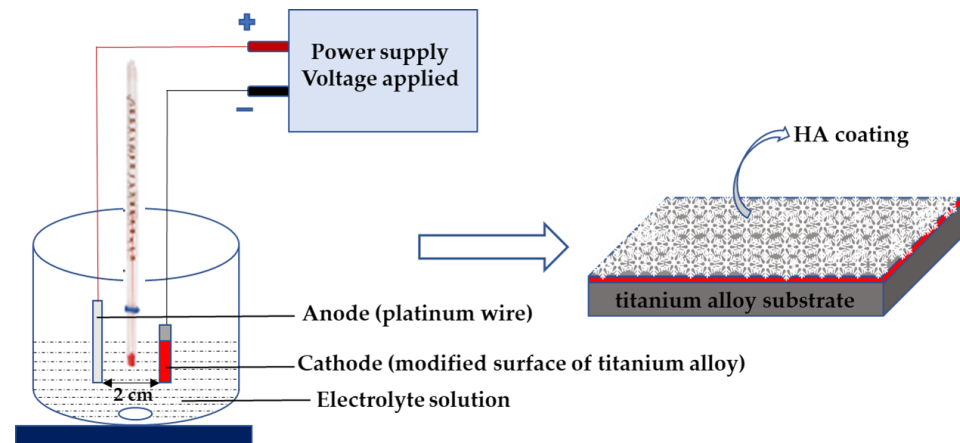


Figure 1. Scheme of hydroxyapatite coatings fabricated by electrodeposition.

2.3. Structural and Morphological Characterization

The surface morphology of all samples was studied using a Quanta scanning electron microscope with field emission (SEM, Quanta 3D FEG, Huston, TX, USA). The phase identification of all produced layers was carried out with X-ray diffraction (XRD; PANalytical X'Pert Pro, PANalytical B.V., Almelo, the Netherlands; MPD X-ray diffractometer using Cu-K alfa radiation, grazing incidence angle mode–GIXRD; the incidence angle was equal to 1 degree). Diffuse reflectance infrared Fourier transform spectra (DRIFT, Spectrum 2000, PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) were used to estimate the structure of the specimens. The chemical composition of all synthesized layers was determined using an energy-dispersive X-ray spectrometer (EDS, Quantax 200 XFlash 4010, Bruker AXS, Karlsruhe, Germany). Surface roughness were carried out using a commercial Nanoscope IIIa MultiMode AFM (Veeco Metrology Inc., Santa Barbara, CA, USA) through the technique of tapping mode, an area of $10 \times 10 \times 2.5 \mu\text{m}$. All analyses were conducted for five samples of each modification.

2.4. Contact Angle

The contact angle of water on all samples produced at different currents was measured at room temperature using a goniometer (DSA 10 Krüss GmbH, Hamburg, Germany) with drop shape analysis software (ADVANCE, Krüss software, Krüss GmbH, Hamburg, Germany). The volume of the deionized water drop in the contact angle measurement was 3 mL for onto each sample. The contact angle was measured in triplicate and the mean value was calculated.

2.5. Nanomechanical Properties and Adhesion

The nanomechanical properties, hardness, and Young's modulus were studied using the nanoindentation technique with Oliver–Pharr procedure with nanoindenter (NanoTest Vantage, Wrexham, United Kingdom) and Berkovich indenter. The 25 independent indentations were performed on all tested materials on three samples of each group ($n = 3$). The increased to maximum load was 50 mN and the time was 10 s, with 5 s dwell with maximum load and unloading to zero force equal to 10 s. After indentation, a temperature drift was performed at a load of 5 mN for 30 s. The distance between indentations was $20 \mu\text{m}$ on both axes. To convert the reduced Young's modulus for Young's modulus, accord-

ing to the Oliver–Pharr procedure, the Poisson’s modification ratio of 0.28 was used. The adhesion of modifications to titanium substrate was studied with a nanoscratch-test. The nanoscratch-test was performed using a nanoindenter (NanoTest Vantage, Wrexham, The United Kingdom) and a diamond indenter. Ten measurements on three samples of each group ($n = 3$) were made for each sample tested with a maximum force of 500 mN and over a length of 500 μm . The distance between measurements was 250 μm . The adhesion force of the modification to the titanium substrate was evaluated as a sudden and abrupt change in the plot of the normal force against the friction force recorded during the measurement.

3. Results

3.1. Structural and Morphological Characterization of TiO_2 and Titanate Nanocoatings

In order to improve the physicochemical properties of Ti6Al4V samples (T), their surface was modified by the production of TiO_2 -based coatings, which showed suitable mechanical and physicochemical parameters and high biointegration activity using the previously described methods [10,11,38–40]. The morphological differences between T, T-S, T5, T5-S, TNF6C, TNF6S, TNF72a, and TNF72b samples are presented in Figure 2.

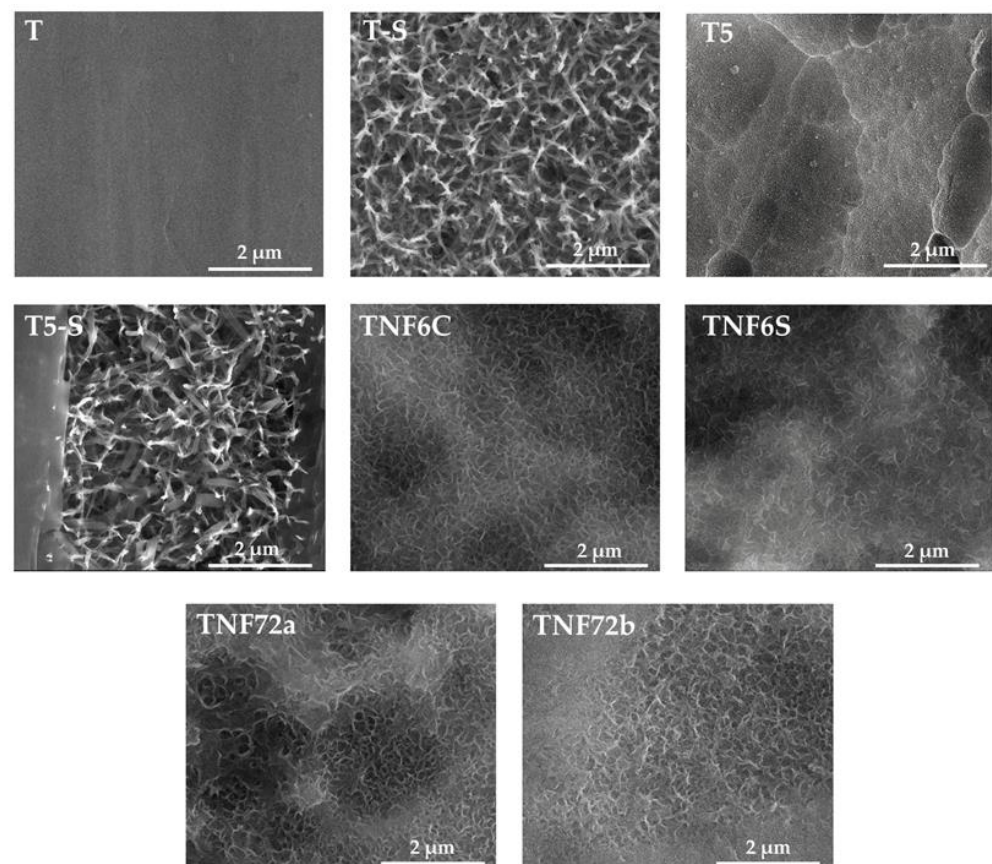


Figure 2. SEM images of T, T-S, T5, T5-S, TNF6C, TNF6S, TNF72a, and TNF72b surface sample morphologies.

Searching for the most optimal and repeatable HA synthesis procedure, which can be applied to biomaterials with different nanoarchitectures, our research started by determining such parameters of cathodic deposition as temperature (T) and process time (t) and the effect of EDTA-2Na addition to the electrolyte. In the carried out experiments, the T was changed between 339 and 364 K, $t = 25 - 60$ min and we tested the use of the electrolyte solution with and without the addition of 1.5×10^{-3} M EDTA-2Na. The results revealed that the following conditions were the best—electrolyte containing the EDTA-2Na, $T = 339$ K, and $t = 60$ min.

The differences in surface morphology of samples T/HA (a), T-S/HA (b), T5/HA (c), T5-S/HA (d), TNF6C/HA (e), TNF6S/HA (f), TNF72a/HA (g), and TNF72b/HA (h), which were produced at various currents (1.5 mA; 2.5 mA; 3.5 mA) are presented in Figure 3. The morphology and packing density of hydroxyapatite layers significantly depended on the type of substrate and on the current density applied during cathodic deposition. For T/HA, T5/HA, TNF6C/HA, and TNF6S/HA substrates, the applied current of 1.5 mA was too low, and the dispersed HA nucleations of different morphology were formed (Figure 3a,c,e,f). In the case of T-S/HA, T5-S/HA, TNF72b/HA samples, the hydroxyapatite was formed in the shape of nanoplates (Figure 3b,d,h), while for TNF72a/HA, a floral morphology composed of thin nanoplates was formed (Figure 3g). By increasing the current intensity and thus the current density for all substrates, the hydroxyapatite morphology changed to a floral morphology composed of numerous nanoplatelets. Furthermore, with increasing current density, there is a change in the hydroxyapatite structure from dispersed to densely packed (Figure 3a–h). The further enhancement of the current density up to 3.5 mA led to the delamination of the hydroxyapatite layer deposited on the surface of nonmodified Ti6Al4V substrates (T/HA, Figure 3a). According to literature reports, the intensity of hydrogen gas escaping in the cathodic reaction increases with increasing current density, which can lead to cracks in the hydroxyapatite layer [33,34]. Figures S1 and S2 show SEM cross-section images of the T/HA (a), T-S/HA (b), T5/HA (c), T5-S/HA (d), TNF6C/HA (e), TNF6S/HA (f), TNF72a/HA (g), and TNF72b/HA (h) samples at 2.5 mA current (Figure S1) or 3.5 mA current (Figure S2). By increasing the current intensity, we observe the formation of thicker hydroxyapatite layers on the surface of all the analyzed biomaterials. The most significant growth of the HA layer was noted for T-S/HA (from $\sim 12.58 \mu\text{m}$ to $\sim 17.60 \mu\text{m}$) and TNF72b (from $\sim 14.51 \mu\text{m}$ to $\sim 20.80 \mu\text{m}$) samples (Figures S1 and S2).

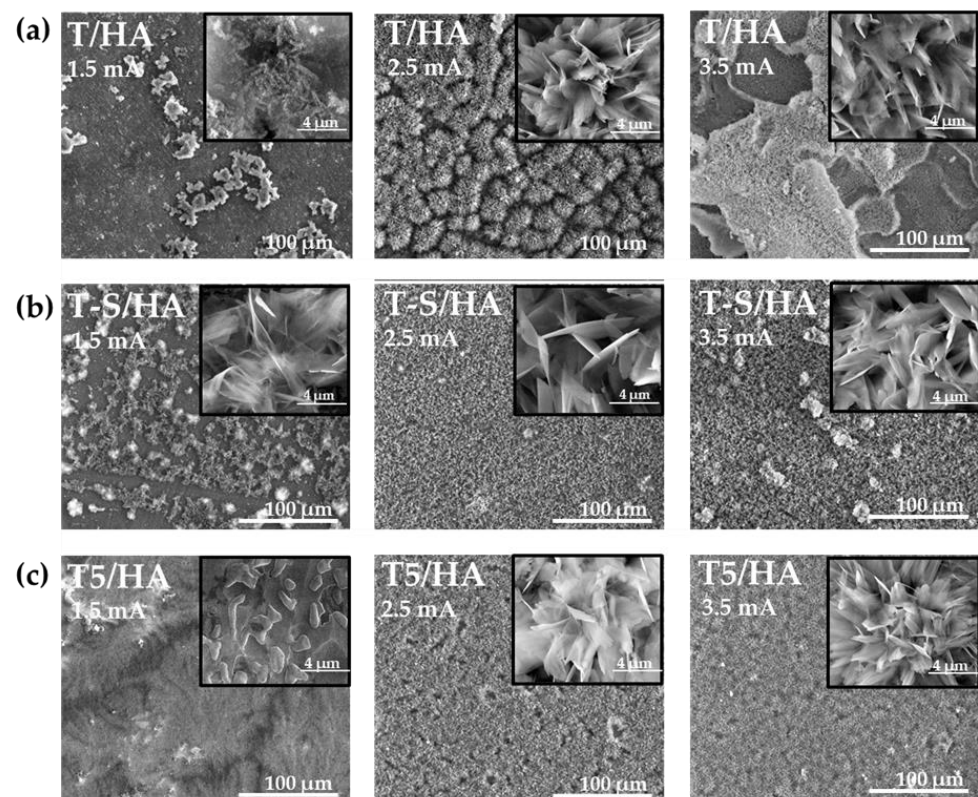


Figure 3. Cont.

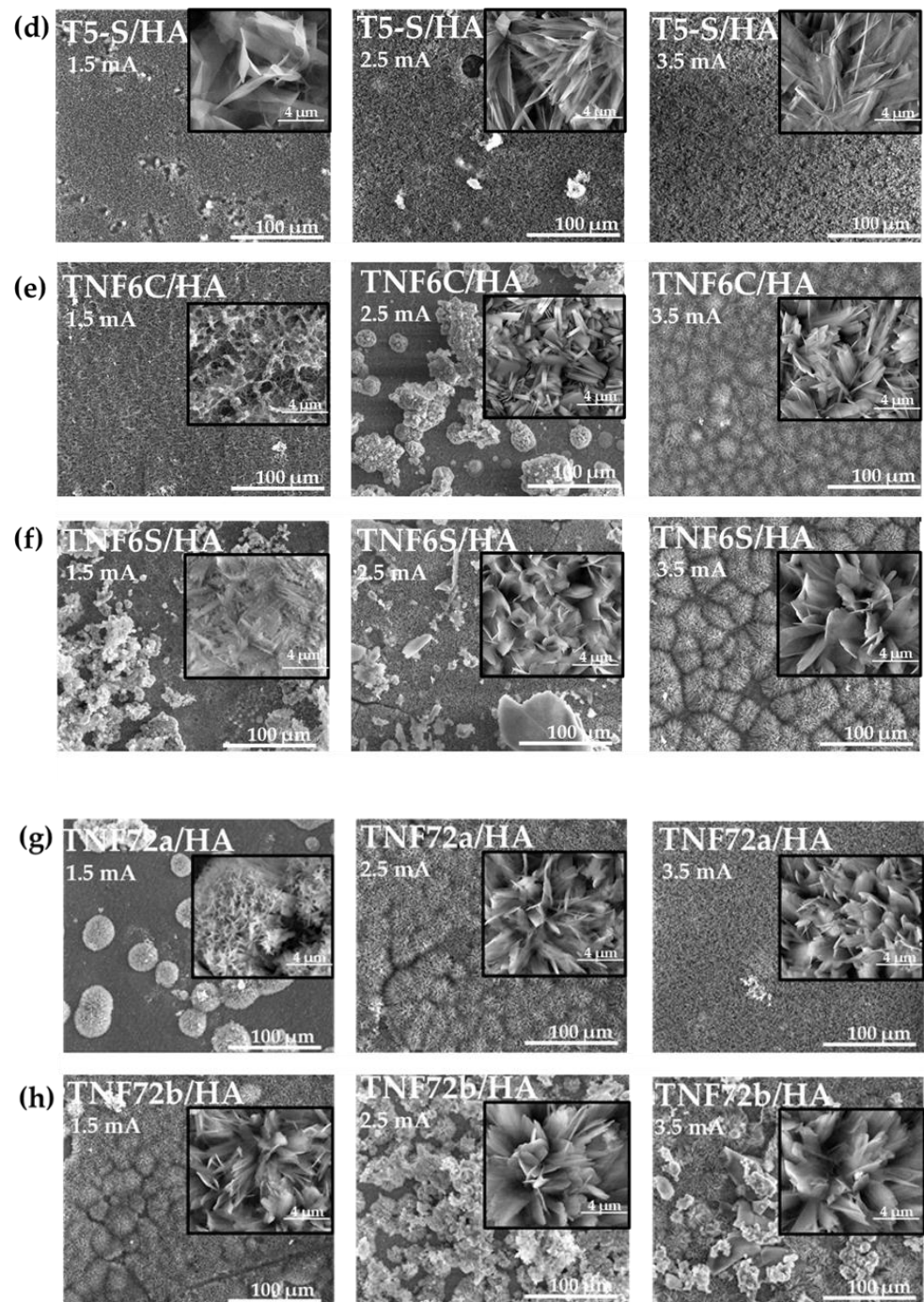


Figure 3. SEM images of the surface morphology of the T/HA (a), T-S/HA (b), T5/HA (c), T5-S/HA (d), TNF6C/HA (e), TNF6S/HA (f), TNF72a/HA (g), and TNF72b/HA (h) samples obtained at various currents (1.5, 2.5, 3.5 mA).

Scanning electron microscopy with energy-dispersive spectroscopy (SEM/EDS) analysis revealed mainly calcium, phosphorous, titanium, vanadium, aluminium, and oxygen to be present in the surface of all biomaterials. Small amounts of sodium were additionally detected on the alkali-modified surfaces (T-S/HA and T5-S/HA). The Ca/P molar ratios for the samples with hydroxyapatite layers at different currents are shown in Table 1. A smaller Ca/P ratio for samples T5/HA (0.82) and TNF6C/HA (1.13) at 1.5 mA may indicate the formation of a calcium-poor layer. On the surface of titanium alloy T, nanoporous T5, as well as after alkali-sodium treatment of T-S and T5-S, the most similar Ca/P ratio

calculated directly from the EDS results to stoichiometric hydroxyapatite Ca/P ratio (1.67) was obtained during hydroxyapatite deposition at 2.5 mA [16,21,24,26]. In contrast, for TNF6 and TNF72 nanofibrous coatings, the Ca/P ratio is relatively close to the theoretical value during HA deposition at 3.5 mA. SEM/EDS analysis confirmed the presence of hydroxyapatite on titanium oxide surfaces (Figure S3).

Table 1. Ca/P ratios obtained from EDS measurements for the samples with hydroxyapatite layers at different currents.

Ca/P (Mole Ratio) of HA Layer at Different Currents			
Sample	I = 1.5 mA	I = 2.5 mA	I = 3.5 mA
T/HA	1.83	1.60	1.54
T-S/HA	1.45	1.69	1.73
T5/HA	0.82	1.58	1.82
T5-S/HA	1.39	1.62	1.92
TNF6c/HA	1.13	1.45	1.76
TNF6s/HA	1.66	1.54	1.58
TNF72a/HA	1.70	1.96	1.75
TNF72b/HA	1.58	1.63	1.65

The hydroxyapatite (HA) presence on the surface of samples with different morphology was confirmed by X-ray diffraction (XRD). Figure 4 shows the XRD patterns of T/HA (a), T-S/HA (b), T5/HA (c), T5-S/HA (d), TNF6C/HA (e), TNF6S/HA (f), TNF72a/HA (g), and TNF72b/HA (h) samples at various currents (1.5 mA; 2.5 mA; 3.5 mA). The results demonstrate that a pure layer of hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) was deposited on all analyzed surfaces of biomaterials at 2.5 mA and 3.5 mA. At 1.5 mA a peak of very low intensity is observed, in particular for samples T/HA, T5/HA, TNF6C/HA, and TNF6S/HA. As can be seen, the XRD pattern of the peak at 2θ of $\sim 25.9^\circ$ corresponding to plane (002) is the strongest among the other peaks in the diffraction patterns. According to literature reports, this may be due to the fact that HA crystals often form in a direction perpendicular to the electrode surface in the electrodeposition method [41,42]. The positions of the HA peaks marked on the spectra are in good agreement with the data in card JCPDS no. 09-0432.

The diffuse reflectance infrared Fourier transform spectra (DRIFT), registered for HA layers produced at different currents, are shown in Figure S4. The detected frequencies and corresponding functional groups in hydroxyapatite samples are listed in Table 2.

Table 2. DRIFT frequencies and corresponding functional groups in hydroxyapatite samples.

Functional Groups	Frequencies (Experimental) (cm^{-1})	Frequencies (Reference) (cm^{-1})	Reference
$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$	1188–1006	1200–960	[43–50]
$\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$	960–956	963–960	[43,44,47–49,51]
$\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$	601–531	660–520	[19,43–48,50–53]
$\nu_1(\text{CO}_3^{2-})$	1460–1398	1500–1400	[43–49,51,52]
ν_3 or $\nu_4(\text{CO}_3^{2-})$	875–867	880–865	[43–45,49,50,54]
$\nu_3(\text{CO}_3^{2-})$	1323	1300, 1321	[47,48]
$\nu(\text{OH})$	3456–3000	3571–3420	[41–46,49–51,55]
$\sigma(\text{OH})$	1653–1594	1650–1631	[43–45,50,51,55]

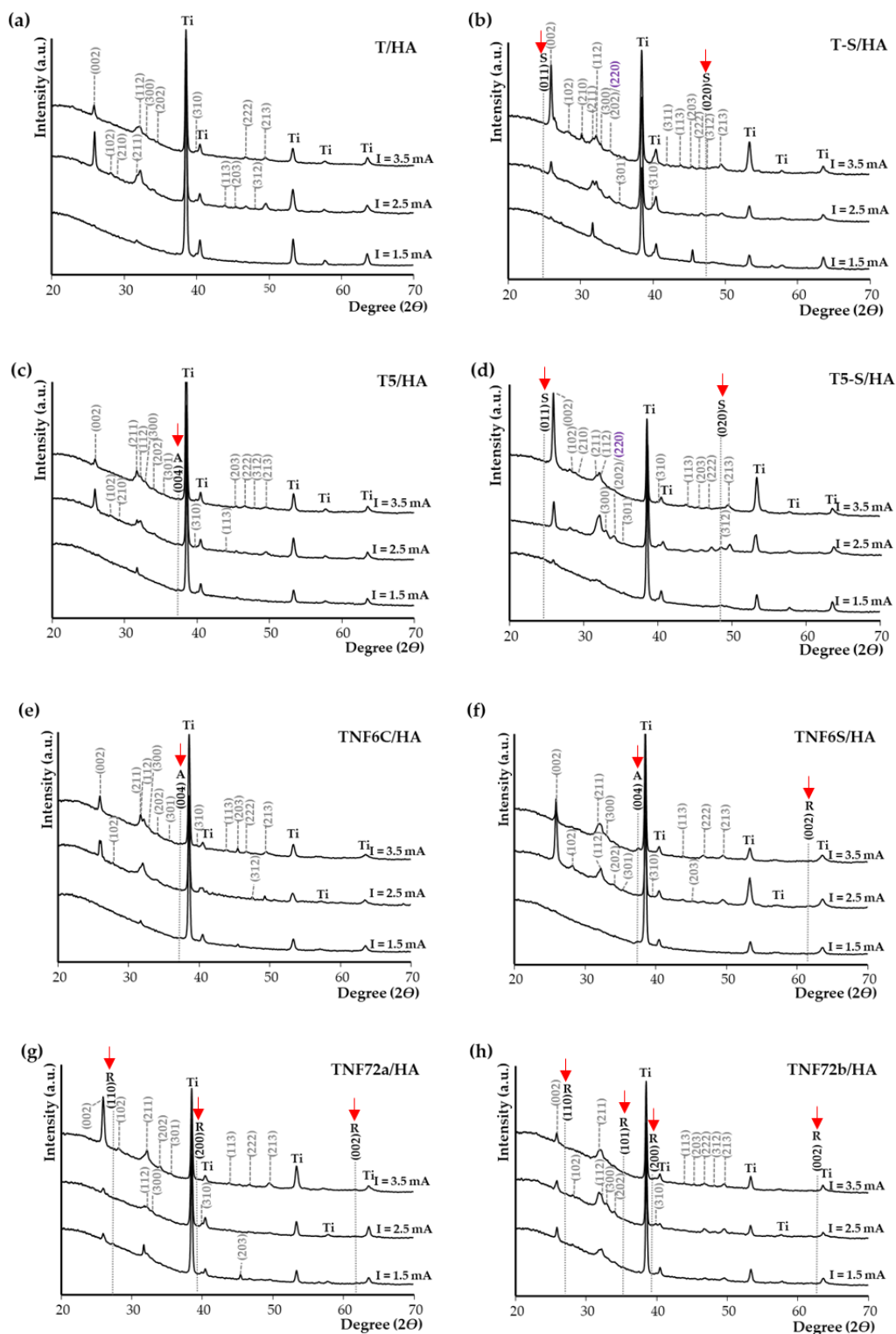


Figure 4. X-ray diffraction patterns of T/HA (a), T-S/HA (b), T5/HA (c), T5-S/HA (d), TNF6C/HA (e), TNF6S/HA (f), TNF72a/HA (g), and TNF72b/HA (h) samples at various currents (1.5 mA; 2.5 mA; 3.5 mA). (hkl) for HA are marked by grey colour. (hkl) for CaTiO₃ are marked in violet. S is assigned to the sodium titanate. Ti is assigned to the Ti6Al4V substrate (TiO₂ anatase phase (A) and rutile phase (R)).

The DRIFT results of all studied samples were consistent with the SEM images and EDS, as well as XRD data. At 1.5 mA, bands attributed to phosphate groups in

hydroxyapatite are invisible (TNF6C/HA, TNF72a/HA) or weakly intense (TNF72b/HA) on modified nanofibrous surfaces, except for the TNF6S/HA sample. For this sample, the intense bands assigned to CO_3^{2-} group in carbonate HA (stretching mode of ν_1 at 1460 cm^{-1} and 1406 cm^{-1} , as well as bending mode of ν_3 or ν_4 at 872 cm^{-1}) were found [43–49,51,52]. However, the HPO_4^{2-} group in the crystal lattice could also be responsible for the additional low-intensity band centered around $875\text{--}867\text{ cm}^{-1}$, which indicates the formation of non-stoichiometric HA [43,50,54]. In the case of the other T/HA, T-S/HA, T5/HA, and T5-S/HA samples, at 1.5 mA the appearance of intense bands attributed to PO_4^{3-} groups was noticed. The additional band at 495 cm^{-1} was detected in the spectrum of T5/HA sample was assigned to Ca-Ti-O group modes. While the bands between 699 and 800 cm^{-1} were attributed to the Ti-O vibration [38,39,45,56,57]. The bands attributed to O-Ti-O modes at 777 cm^{-1} could also be found in the spectra of the TNF6C/HA 2.5 mA samples. The characteristic bands of the hydroxyapatite (PO_4^{2-} , OH-, and sometimes CO_3^{2-}) were found in spectra of all samples produced at 2.5 and 3.5 mA. The sharp band localized at $1594\text{--}1653\text{ cm}^{-1}$ and the broad band between 3000 and 3456 cm^{-1} were attributed to the vibrations of the absorbed H_2O molecules in the HA structure (they were assigned to HOH bending and OH stretching modes, respectively) [10,19,38,39,41–46,49–51,55,56,58,59]. These bands are least noticed for the T5/HA and T5-S/HA sample's surface layer.

The surface roughness (R_a) of the hydroxyapatite layers was calculated from the AFM topographic images, and the mean values in micrometer (μm) are summarized in Table 3. The results demonstrated that, with increasing current intensity (from $I = 2.5\text{ mA}$ to $I = 3.5\text{ mA}$), the roughness increases for all tested samples with oxide intermediate. The highest surface roughness ($0.61\text{ }\mu\text{m}$) was obtained for the TNF6C/HA sample (nanofibrous intermediate layer, oxidized for 6 h in hydrogen peroxide solution) at 3.5 mA. In the case of Ti6Al4V/HA sample (without intermediate layer) at $I = 3.5\text{ mA}$, the R_a value was significantly lower ($0.33\text{ }\mu\text{m}$). However, for the HA layer deposited at $I = 2.5\text{ mA}$, the R_a value increases up to $0.57\text{ }\mu\text{m}$ (Table 3). This may be due to the delamination of the HA layer from the titanium alloy substrate at higher current densities.

Table 3. Changes of the roughness value (R_a) (μm) of the HA layer deposited at different currents and the surface of different substrates. The values are expressed as means \pm SEM of five independent experiments.

Sample	I = 2.5 mA	I = 3.5 mA
	Roughness (R_a) (μm)	
T/HA	0.57 ± 0.07	0.33 ± 0.00
T-S/HA	0.21 ± 0.03	0.29 ± 0.04
T5/HA	0.21 ± 0.00	0.31 ± 0.02
T5-S/HA	0.20 ± 0.05	0.38 ± 0.05
TNF6C/HA	0.20 ± 0.01	0.61 ± 0.03
TNF6S/HA	0.15 ± 0.00	0.43 ± 0.03
TNF72a/HA	0.13 ± 0.01	0.32 ± 0.02
TNF72b/HA	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.00

3.2. Contact Angle

The water contact angle for all samples with the HA layer, produced at different currents (1.5, 2.5 and 3.5 mA), was nearly 0° . On all the surfaces of the samples with the hydroxyapatite layer, the drop of water spread rapidly, which means that these surfaces show a clear superhydrophilic character.

3.3. Mechanical Properties and Adhesion

Figure 5 shows the results of the measurements of nanomechanical properties. The main mechanical properties are hardness and Young's modulus. Although the instrumental values of these parameters are obtained in the nanoindentation test, they provide an

overview and the opportunity to compare these properties. The occurrence of high standard deviations in nanoindentation studies of porous ceramic materials, such as hydroxyapatite coatings, are normal occurrences. In addition, when correlating the mechanical test results with SEM images of the tested specimens, it should be noted that in the case of hydroxyapatite coatings obtained at the lowest current value (1.5 mA), the coatings are characterized by unevenness. The test results presented probably concern either the coating or the substrate material. Figure S5a,b shows the nanohardness and Young's modulus T-S and T5-S specimens. In the case of T-S and T5-S samples, no effect of modification on the hardness value was observed, only in T5-S did the value of Young's modulus increased almost twice. For the rest of the tested materials, the results obtained indicate that there is no significant effect of the modification manufacturing parameters on hardness. In the case of Young's modulus, the obtained results of nanomechanical properties indicate that the influence is significant for most samples. Increasing the deposition current from 1.5 mA to 3.5 mA for all tested specimens had a significant effect on the value of reduced Young's modulus. An increase in Young's modulus with increasing deposition current was observed for the T5-S/HA samples, while a decrease in Young's modulus with increasing current was observed for T-S/HA, T5/HA, and TNF72b/HA. The optimal mechanical properties of the implants for biomechanical compatibility should be as close as possible to human cortical bone (hardness 0.3–0.7 GPa and Young's modulus ~20 GPa), but it is Young's modulus that is crucial. In the case of the tested materials, a Young's modulus close to that of bone, with appropriate hardness, was obtained for TS-HA (2.5 mA), T5/HA (3.5 mA), TNF6C/HA (3.5 mA), and TNF72a/HA (1.5 mA) samples. However, due to the previous description of the HA coating inhomogeneity for a low value of deposition current (1.5 mA), TNF72a/HA samples should not be considered. Comparing the results of the nanomechanical tests with previous studies for all the samples tested, the hardness and Young's modulus results obtained are lower on specimens with the hydroxyapatite coating than without it [10,39]. A significant decrease in these properties was observed in all tested specimens. The decrease in mechanical values obtained for the samples with hydroxyapatite (for deposition current values of 2.5 and 3.5 mA) confirms that the nanoindentation tests were for the coatings and not for the substrate.

The results of the nanoscratch-test measurements for TS and T5-S samples (Figure S5c) indicate that there is no effect of the modification parameters on its adhesion. Figure 6 shows the results of the nanoscratch-test measurements. The effect of deposition current on adhesion was observed for samples from the TNF6C/HA, TNF6S/HA, TNF72a/HA, and TNF72b/HA groups. However, strict correlations were not observed for these groups: for TNF6C/HA samples, an increase in adhesion was observed with increasing intensity; for TNF6S/HA and TNF72b/HA samples, an initial increase, then a decrease; for TNF72a/HA, an initial decrease, then an increase. Significant differences between HA coatings deposited at the same current value relative to HA coatings deposited on unmodified titanium (specimens T/HA) were obtained for TNF6S/HA (2.5 mA), T-S/HA (3.5 mA), T5-S/HA (3.5 mA), and TNF6C/HA (3.5 mA) specimens. Improved adhesion was observed in all the above. For all tested materials, the best mechanical properties (relative to human cortical bone), while maintaining the highest adhesion value, were characterized by samples from the TNF6C/HA group (3.5 mA).

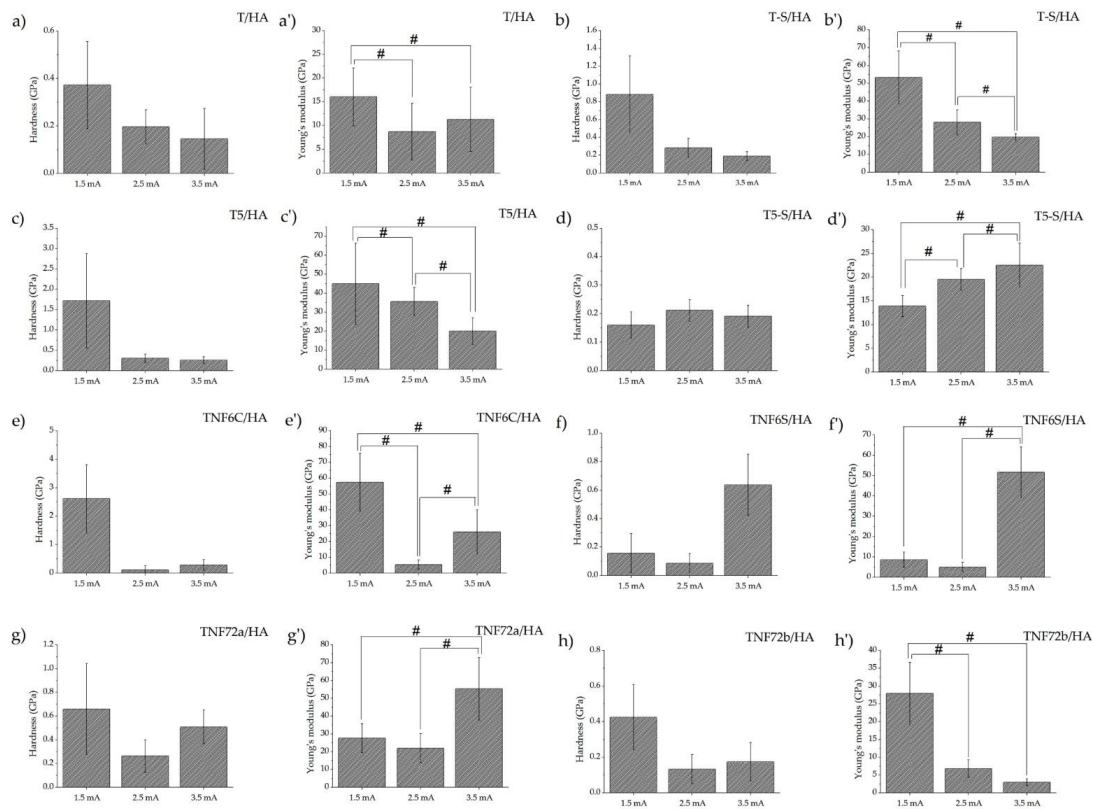


Figure 5. Nanomechanical properties of studied T/HA ((a) for hardness and (a') for Young's modulus), T-S/HA ((b,b')), T5/HA ((c,c')), T5-S/HA ((d,d')), TNF6C/HA ((e,e')), TNF6S/HA ((f,f')), TNF72a/HA ((g,g')), and TNF72b/HA ((h,h')) samples at various currents (1.5 mA; 2.5 mA; 3.5 mA); (# significantly different according to one-way ANOVA test followed by Bonferroni's multiple comparison test, $p < 0.05$).

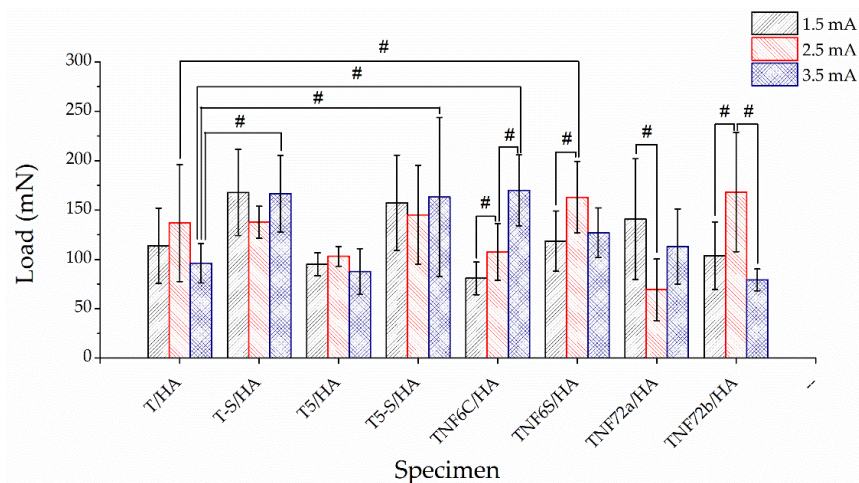


Figure 6. Nanoscratch-test results (adhesion load) of studied: T/HA, T-S/HA, T5/HA, T5-S/HA, TNF6C/HA, TNF6S/HA, TNF72a/HA, and TNF72b/HA samples at various currents (1.5, 2.5, 3.5 mA); (# significantly different according to one-way ANOVA test followed by Bonferroni's multiple comparison test, $p < 0.05$).

4. Discussion

The search for optimal conditions of the cathodic electrodeposition of HA on the surface of titanium implants/titanium alloys is one of the crucial issues that research on the design and manufacture of modern implants is focused on [16,30,51,60–62]. Electrode-

position is used in surface engineering electrochemical techniques, in which two electrodes (connected to an electrical generator) are immersed in an aqueous solution containing calcium and phosphate ions [16,17,26,63]. It should be noted that besides the deposition process conditions, the substrate's type and properties directly impact the morphology, structure, and mechanical and biological properties of the produced HA layers. Therefore, our research aimed to select the suitable, universal, and reproducible conditions for the cathodic deposition of HA on the surfaces of Ti6Al4V alloy biomaterials with different surface morphologies and appropriate mechanical properties.

The electrolyte used during the HA electrodeposition consisted of calcium nitrate tetrahydrate ((CaNO₃)₂·4H₂O) and ammonium dihydrogen phosphate (NH₄(H₂PO₄)) [17,51,52,64–67]. However, in all our experiments, the electrolyte mentioned above was enriched by adding ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA-2Na). The analysis of the literature data showed that the use of the chelating agent, which is ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), on the properties, morphology, and crystallinity of HA layers deposited on titanium implants has not been fully uncovered so far [47,64,65,68]. According to Zhao et al. [69], the addition of the EDTA-2Na ($c = 3.5 \cdot 10^{-2}$ M) to the electrolyte improved the corrosion resistance and the crystallinity of formed HA layers. It was noted that the increase in the biodegradability of these layers affects the formation of calcium phosphate particles. Morphologically, the resulting HA layers on the magnesium alloy resembled flowers [69]. He et al. [45], studying the effect of EDTA on the deposition of HA coating on Ti6Al4V alloy surface. According to this report, in the absence of a chelating agent, the HA crystals formed were not very dense and had a needle- or rod-like shape, which was consistent with our results. Moreover, no effect of EDTA on changes in the phase composition of the HA layer was found. He et al. proved that increasing EDTA concentration decreases the thickness of the hydroxyapatite layer, which is associated with a decreasing concentration of available calcium ions in the solution. The bonding force between the substrate and the HA layer achieved a maximum value of 16.8 MPa when the EDTA-2Na concentration was $7.5 \cdot 10^{-4}$ M (the bonding force in this experiments was assessed on the basis of the HA layer breaking strength) [45]. The EDTA-2Na concentration used in our investigations amounted $1.5 \cdot 10^{-3}$ M. Adhesion force between the substrate and the HA layer (measures using nanoindentation method) varied from 69 mN (TNF72a, $I = 2.5$ mA) up to 170 mN (TNF6C/HA, $I = 3.5$ mA), depending on the type of surface modification. This issue will be discussed in a later part of this paper. Court et al. [58] pointed out that the electrodeposition temperature also affects the morphology and structure of hydroxyapatite layers on titanium substrates. The HA layers revealed homogenous plate-like structures. However, deposition at 348 K led to denser coatings, covering the whole surface with a more compact layer than in deposition at 323 K. At lower temperatures, the deposition rate of the HA layer was lower, and the resulting layers were thinner. HA layers deposited at 348 K were more hydrophilic (contact angle 27.4°) than those deposited at 323 K (contact angle 76.1°) [58]. In our experiments, hydroxyapatite was deposited on modified titanium alloy surfaces of different morphology at 338 K as an optimal temperature. The analysis of the XRD patterns of studied samples revealed that the intensity of peaks assigned to HA layers was the greatest. Moreover, all produced hydroxyapatite layers showed superhydrophilic properties, which is highly desirable for biomedical applications [23,58,59,70].

It is assumed that the formation of hydrophilic coatings promotes apatite growth due to the increased ion exchange capacity from the SBF solution [42,44]. This effect is consistent with our earlier investigations on apatite growth on intermediate TiO₂ and titanate coatings. The apatite growth from SBF solution was noticed on amphiphilic titanate substrates, but it was not observed for the hydrophobic TiO₂ nanoporous surfaces [38]. Superhydrophilic surfaces exhibit increased surface tension and a high potential to form hydrated layers with surrounding water molecules through the hydrogen bonds [23,60–62,71,72]. He et al. [45], studying the issue of the substrate influence on the formation of the HA layer, used the electrodeposition method on a pre-treated alkali-sodium

Ti6Al4V substrate. They showed that by varying the current density values between 1.25 and 3.61 mA/cm², no differences in the composition and grain size of the hydroxyapatite layer are observed. However, as the current density increases, the thickness of the HA layers increases and the crystal structure changes from porous to dense (1.25–2.5 mA/cm²) and back to porous (2.5–3.61 mA/cm²) [45]. Meanwhile Gu et al. [63] obtained the most homogeneous HA layers using lower current densities, i.e., 5 mA/cm². They observed that the higher the current density, the more heterogeneous the layer. At a current density of 10 mA/cm², they obtained a non-uniform coating of seaweed-like crystals with different grain sizes [63]. In contrast, Chakraborty et al. [64] exhibited that the 10 mA/cm² as the most optimal current density. The hydroxyapatite layers on SS316 substrate obtained at this value are porous, crystallite sizes in the nano range [64]. There are also reports that an increase in current density from 10 to 20 mA/cm² leads to an increased volume fraction of microcracks, changing surface cracks to cracks formed along the deposited layer's cross-sections [41,65–68].

Searching for the optimal conditions of the cathodic electrodeposition of HA layers on Ti6Al4V substrates, we decided to study the influence of current densities (input: $J = 7.5 \text{ mA/cm}^2$ ($I = 1.5 \text{ mA}$), $J = 12.5 \text{ mA/cm}^2$ ($I = 2.5 \text{ mA}$), and $J = 17.5 \text{ mA/cm}^2$ ($I = 3.5 \text{ mA}$)) on the physicochemical and mechanical properties of the produced coatings. Our results were compatible with most earlier reports concerning the HA layer deposition on the pure titanium alloy. A current density of 17.5 mA/cm² led to numerous microcracks, delaminating the HA layer from the substrate. It can be attributed to the increased cathodic hydrogen evolution reaction (released with increasing current density), leading to the cracking and the porous structure formation of the HA layer [21,45,73,74]. However, we observe that the influence of the type of surface modification used on the Ti6Al4V alloy substrate has a significant effect on the hydroxyapatite layers formed. The applied current $I = 1.5 \text{ mA}$ ($J = 7.5 \text{ mA/cm}^2$) is too low for the formation of hydroxyapatite crystals in the case of hydroxyapatite deposition on T5 porous or TNF6 nanofibrous coating. On the surfaces of pre-treated sodium-alkali samples, i.e., T-S and T5-S HA, hydroxyapatite forms nanoplates dispersed over the coating surface. Whereas on the surface of nanofibrous TNF72 we observe the formation of HA in the form of flower-like (TNF72a) or nanoplatelets (TNF72b). We observed no visible changes in the morphology of hydroxyapatite crystals between the applied current density value of 12.5 mA/cm² ($I = 2.5 \text{ mA}$) and 17.5 mA/cm² ($I = 3.5 \text{ mA}$). For all tested substrates, the hydroxyapatite layers show a floral morphology composed of numerous nanoplatelets. When current density increases, the change of HA crystalline structure from dispersed to densely packed is visible, and the thickness of HA layers grows. The modification of the titanium substrate had no significant effect on the thickness of the HA layers obtained when the current density was 12.5 mA/cm². The obtained layer thicknesses were between 11.61 μm (TNF6C) and 12.90 μm (TNF72a). The exception at 2.5 and 3.5 mA was the TNF72b sample, for which the layer obtained was the thickest at 14.51 and 20.8 μm, respectively. This layer also exhibited the weakest mechanical properties. At a current intensity of 3.5 mA, we noted wider differences in layer thicknesses depending on the coating on which the hydroxyapatite was deposited. The obtained layer thicknesses ranged from 13.60 μm (TNF6C) to 17.60 μm (T-S).

In order to determine which of the Ti6Al4V surface modifications is most desirable for the deposition of hydroxyapatite layers, mechanical studies were crucial. Improving the mechanical strength of hydroxyapatite layers has been a challenge for many years. The interfacial adhesion of HA to the substrate is weak [21,30,43,75–77]. In our research, to increase the adhesion between the substrate and the hydroxyapatite layer, we used intermediate coatings in the form of nanotubes (T5), nanofibres (TNF), and titanates (T-S, T5-S). We had previously analyzed the chosen nanocoatings in depth for their physicochemical, mechanical, and biointegrative properties [10,11,38–40]. Integrating them into the HA layer brings many benefits related to increasing the implant's bioactivity and improving the HA layers' mechanical properties. The obtained HA layers were characterized in terms of adhesion, hardness, and Young's modulus. In order to avoid the shielding effect, which

is associated with a significant loss of bone mass, it is aimed that Young's modulus of the implants is close to the elastic modulus of cortical bone (about 20 GPa) [78,79].

The previous reports suggest that the increased interfacial adhesion strength between the titanium implant and the apatite layer is due to the roughness of the biomaterial surface [80–83]. It is thought that a larger surface area and physical blockage are generated between the nanotube coating and the apatite layer [80–83]. Our research confirmed that the substrate's surface roughness affects the hydroxyapatite layer's obtained mechanical properties. Our produced intermediate oxide coatings show high surface roughness parameters (S_a) compared to the unmodified titanium alloy [10,39]. We observed the highest value of the S_a parameter for the TNF6S intermediate nanofibrous coating (0.30 μm) and the lowest value for the TNF72a nanofibrous coating (0.06 μm) [39]. Using the cathodic HA deposition technique on intermediate coatings, we did not observe the delamination of the layer. In contrast, delamination was evident when depositing the HA layer directly onto a Ti6Al4V substrate (low value $S_a = 0.02 \mu\text{m}$) [10]. With the use of nanoporous (T5) titanate (T5-S and T5) coatings as interlayer systems, the dense HA layers with optimal mechanical properties were produced using a current of 2.5 mA. Young's modulus for the samples mentioned above was close to that of cortical bone and was 35.58 GPa for T5/HA, 28.05 GPa for T-S/HA, and 19.50 GPa for T5-S/HA, respectively. Among the materials as mentioned earlier, the adhesion of HA layers was higher for the T-S (137.62 mN) and T5-S (145.22 mN) titanate coatings in comparison to T5/HA (103.11 mN) nanoporous coatings. This may be related to the formation of a bonding layer, i.e., CaTiO_3 (chemical bonding) [43,84,85]. According to our previous studies, the $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ layer supports spontaneous apatite deposition, as it is capable of actively exchanging calcium cations in a simulated SBF body fluid solution, thus converting to calcium titanate. The T5-S layer formed by the alkali-sodium treatment of the T5 nanoporous coating shows faster apatite growth in SBF solution than the T-S layer formed by the alkali-sodium treatment of pure titanium alloy [38]. In addition, the rough surface resulting from the alkaline pretreatment increases the bonding strength [84–87]. Blackwood et al. [88] showed that the crystallinity and adhesion of HA could be improved by the sodium-alkali pretreatment of titanium. However, they suggested it is also crucial to additionally apply a heat treatment at 873 K or add H_2O_2 to the electrolyte [88]. Ahmadi et al. [25] reported that the production of a nanotube coating in the anodization process can significantly increase the adhesion strength of hydroxyapatite to the substrate. The bond strength for the HA/Ti6Al4V system was 12.8 ± 2 MPa, while for the HA/ TiO_2 nanotube nanocomposite it was 23.1 ± 4 MPa. The formation of a rough surface at the HA/ TiO_2 nanotube interface strengthens the cohesion forces. As a result of filling the voids, a compact HA/ TiO_2 layer is formed. It can also be seen that titanium dioxide nanoparticles in the HA layer are able to relax residual stresses, which are usually responsible for microcracks in the hydroxyapatite deposition process [25,89,90]. Besides the anodization process, the sodium-alkali treatment, a variety of etchants, such as HNO_3 , H_2SO_4 , HCl, and HF, are commonly used to pretreat the substrate. Using the compounds mentioned above in concentrations between 50 and 75% improved the adhesion strength at the coating/implant interface [21,91–95]. As an intermediate coating between the titanium alloy substrate and the HA coating, we also used TiO_2 nanofibres (TNF). These studies revealed that some samples were chemically etched in a mixture of concentrated HCl and H_2O and then heated in a 30% H_2O_2 solution at 358 K for 6 h. Depending on the heating procedure, the samples were designated as TNF6S (heating in an incubator) and TNF6C (heating under a reflux condenser). Another sample was etched, respectively, in (a) 2 M HF solution for 10 s (TNF72a), (b) in a 1:4:5 mixture of HF: HNO_3 : H_2O for 30 s (TNF72b), and then heated in 30 wt.% H_2O_2 solution at 358 K for 72h. The obtained TNF samples are amorphous and contain rutile (TNF72) or anatase (TNF6) phase domains [39,40]. In contrast to nanoporous and titanate samples, we noticed that the optimum mechanical properties of electrodeposition of HA layers on nanofibrous coatings are obtained at 3.5 mA (except TNF72b). Generally, the TNF72b/HA sample at both 2.5 mA and 3.5 mA exhibits the weakest hardness (0.13 and 0.17 GPa, respec-

tively) and a very low Young's modulus (6.81 GPa and 2.98 GPa, respectively) compared to other biomaterials. Surprisingly, the adhesion strength of the HA layers to the TNF72b coating is high at 2.5 mA and is 168.25 mN. As the current increases to 3.5 mA, it rapidly decreases to 79.25 mN. It possibly can be related to a too-thick deposited HA layer on the TNF72b coating. In this case, the deposition of the thickest HA layer (20.8 μm) was noticed. The TNF6C/HA sample exhibits the best mechanical properties of all analyzed samples, where the current intensity was 3.5 mA. The thickness of the resulting HA layer is 13.60 μm . The Young's modulus is close to that of cortical bone and was 25.96 GPa, while the adhesion force is 169.93 mN. So far, there are no reports on the electrodeposition of the hydroxyapatite on nanofibrous Ti6Al4V substrates.

Robertson et al. [96] presented a different approach to this issue and used a sol-gel method to deposit hydroxyapatite on a Ti6Al4V-ELI substrate, obtaining the layer with a thickness of 73.3 μm . They also tested anodized Ti6Al4V with an HA layer, for which the thickness increased to 84.97 μm . However, it should be noted that the main function of the oxide intermediate coatings is to improve the adhesion of the ceramic hydroxyapatite layer to the titanium substrate, so the smaller the thickness of the HA layer, the more chance of avoiding its delamination and introducing additional stresses. In the method we used, the thickness of the HA layers obtained varied between 9.67 μm (T/HA I = 2.5 mA) and 20.80 μm (TNF72b I = 3.5 mA), depending on the intermediate coating used and the applied current. An additional advantage of using the cathodic deposition method is that the deposition and sintering time of the hydroxyapatite layer is significantly shorter, and the ageing step (necessary in the case of the sol-gel method) is omitted, which increases the chances of using this method in industry [97,98]. Commercially, the most commonly used method for the deposition of hydroxyapatite coatings is plasma spraying. The resulting layers typically achieve thicknesses in the range of 20–50 μm [99]. However, the limitations of this method are mainly the high energy and temperature of the plasma, which can cause rapid thermal decomposition of HA and numerous residual stresses [100]. Singh et al. showed that in plasma-sprayed coatings, the hydroxyapatite particles on the Ti6Al4V alloy melt completely or partially due to the high plasma temperature. The researchers obtained a very high surface roughness value ($R_a = 5.43 \mu\text{m}$) for the Ti6Al4V/HA systems [37]. The R_a value obtained is nearly ten times higher than that achieved in our study (0.57 μm for T/HA). Plasma-sprayed HA coatings have a much rougher surface compared to HA coatings produced by cathodic deposition or sol-gel [37,96]. By applying plasma spraying with induction preheating (400–600 °C), Fomin et al. [101] revealed that the resulting HA layers on Ti implants exhibited a stoichiometric-like chemical composition, a homogeneous nanostructure, and morphologically resembled micro-sized splats with numerous nanograins. Moreover, the HA layers on Ti substrates showed high hardness in the range of 0.9–12 GPa and elastic modulus in the range of 7–16 GPa. Unfortunately, during this work, the adhesion strength between the coating and the substrate was not determined. The results of our research revealed that the morphology of the produced HA coatings was more floral, with numerous nanoplatelets. Moreover, the produced HA layers exhibited close mechanical parameters to cortical bone ($H = 0.29 \text{ GPa}$, Young's modulus = 25.96 GPa) and high adhesion force = 169.93 mN for the TNF6C/HA sample. Ritwik et al. [102] produced a thin layer (30 μm) of hydroxyapatite on a Ti6Al4V substrate using a dip-coating process. They used shellac (a natural resin) as an intermediate coating. The researchers showed that the deposition of a shellac layer between the HA and the Ti6Al4V substrate increases the adhesion force from 1.08 MPa (Ti6Al4V/HA) to 7.14 MPa (Ti6Al4V/Shellac/HA). The average surface roughness (R_a) values measured were 0.93 μm [102]. The cathodic deposition of hydroxyapatite, which we optimized, allowed us to obtain thinner hydroxyapatite layers (from 10 μm to 20 μm , depending on the type of intermediate coating used) and two to three times lower roughness.

5. Conclusions

In order to increase the adhesion strength of hydroxyapatite layers (HA) to Ti6Al4V alloy substrates, we researched the morphology, structure, and mechanical properties of HA layers deposited by the cathodic electrodeposition method. The results proved that the above coatings' parameters depend not only on temperature, time, current density, and the addition of EDTA-2Na to the electrolyte solution but also on the method of the pre-modification of the alloy surface. The fabrication of an intermediate layer between Ti6Al4V substrates surface and hydroxyapatite coating, which could be the TiO₂ nanoporous layer (T5), TiO₂ nanofiber (TNF6, TNF72), and titanate (T5-S, T-S), significantly improve the mechanical properties of the HA layers. Our investigations revealed that Ti6Al4V/TNF6C system (i.e., TiO₂ nanofibrous coatings formed by chemical oxidation in a 30% H₂O₂ solution at 358 K under a reflux condenser) is the most appropriate for the fabrication of implants covered with a mechanical permanent hydroxyapatite layer. However, the obtained physicochemical and mechanical parameters are also satisfactory for the other intermediate layers, i.e., T5, T5-S, T-S, and TNF6S with a hydroxyapatite layer. Double-layer coatings (TNF6C/HA, T5/HA, T-S/HA, T5-S/HA, and TNF6S/HA) offer very promising results (the mechanical properties like human cortical bone), which can be used in the construction of modern orthopedic or dental implants.

In the next step of our research, *in vitro* investigations of the biomaterials mentioned above will be conducted to confirm their potential medical applications. We will focus on Ti6Al4V/intermediate layer/HA systems, investigating their effects on the survival and proliferation of human MG-63 osteoblasts-like, mouse L929 fibroblast, and adipose-derived human mesenchymal stem cell (ADSC) cultures seeded on their surface *in vitro*. We will also determine the antimicrobial activity of the produced systems. Results on the apatite-forming ability of coatings immersed in simulated body fluid (SBF) will be presented.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ma15196925/s1>; Figure S1: SEM cross-section images of the T/HA (a), T-S/HA (b), T5/HA (c), T5-S/HA (d), TNF6C/HA (e), TNF6S/HA (f), TNF72a/HA (g), and TNF72b/HA (h) samples at 2.5 mA current; Figure S2: SEM cross-section images of the T/HA (a), T-S/HA (b), T5/HA (c), T5-S/HA (d), TNF6C/HA (e), TNF6S/HA (f), TNF72a/HA (g), and TNF72b/HA (h) samples at 3.5 mA current; Figure S3: Energy-dispersive spectroscopy (EDS) spectra and quantitative data of the T5-S samples with hydroxyapatite layers at various currents: 1.5 mA (a), 2.5 mA (b), and 3.5 mA (c); Figure S4: DRIFT spectra of studied T/HA (a), T-S/HA (b), T5/HA (c), T5-S/HA (d), TNF6C/HA (e), TNF6S/HA (f), TNF72a/HA (g), and TNF72b/HA (h) samples at various currents (1.5, 2.5, 3.5 mA); Figure S5: Nanomechanical properties (hardness—left and Young's modulus—right) of T-S and T5-S specimens.

Author Contributions: Conceptualization, M.E., P.P. and A.R.; methodology, M.E., P.P. and A.R.; validation, M.E. and M.B.; formal analysis, M.E., P.P. and A.R.; investigation, M.E. and M.B.; resources, M.E.; data curation, M.E.; writing—original draft preparation, M.E. and M.B.; writing—review and editing, M.E., P.P. and A.R.; supervision, P.P.; project administration, M.E.; funding acquisition, M.E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Research Nicolaus Copernicus University in Toruń—Excellence Initiative, Grants4NCUStudents number 2403. The Ministry of Science and Higher Education and Nano-implant Ltd. also funded this research through the PhD studies of Michalina Ehlert. The APC was waived by MDPI.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data sharing is not applicable in this article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Geetha, M.; Singh, A.K.; Asokamani, R.; Gogia, A.K. Ti Based Biomaterials, the Ultimate Choice for Orthopaedic Implants—A Review. *Prog. Mater. Sci.* **2009**, *54*, 397–425. [[CrossRef](#)]
2. Attar, H.; Löber, L.; Funk, A.; Calin, M.; Zhang, L.C.; Prashanth, K.G.; Scudino, S.; Zhang, Y.S.; Eckert, J. Mechanical Behavior of Porous Commercially Pure Ti and Ti–TiB Composite Materials Manufactured by Selective Laser Melting. *Mater. Sci. Eng. A* **2015**, *625*, 350–356. [[CrossRef](#)]
3. Gain, A.K.; Zhang, L.; Quadir, M.Z. Composites Matching the Properties of Human Cortical Bones: The Design of Porous Titanium-Zirconia (Ti-ZrO₂) Nanocomposites Using Polymethyl Methacrylate Powders. *Mater. Sci. Eng. A* **2016**, *662*, 258–267. [[CrossRef](#)]
4. Liu, S.; Shin, Y. Additive Manufacturing of Ti6Al4V Alloy: A Review. *Mater. Des.* **2018**, *164*, 107552. [[CrossRef](#)]
5. Gain, A.K.; Zhang, L.; Lim, S. Tribological Behavior of Ti–6Al–4V Alloy: Subsurface Structure, Damage Mechanism and Mechanical Properties. *Wear* **2021**, *464–465*, 203551. [[CrossRef](#)]
6. Sadeghi, M.; Kharaziha, M.; Salimijazi, H.R.; Tabesh, E. Role of Micro-Dimple Array Geometry on the Biological and Tribological Performance of Ti6Al4V for Biomedical Applications. *Surf. Coat. Technol.* **2019**, *362*, 282–292. [[CrossRef](#)]
7. Sarker, A.; Tran, N.; Rifai, A.; Brandt, M.; Tran, P.A.; Leary, M.; Fox, K.; Williams, R. Rational Design of Additively Manufactured Ti6Al4V Implants to Control Staphylococcus Aureus Biofilm Formation. *Materialia* **2019**, *5*, 100250. [[CrossRef](#)]
8. Chatzopoulos, G.S.; Wolff, L.F. Implant Failure and History of Failed Endodontic Treatment: A Retrospective Case-Control Study. *J. Clin. Exp. Dent.* **2017**, *9*, e1322–e1328. [[CrossRef](#)]
9. Liu, J.; Liu, J.; Attarilar, S.; Wang, C.; Tamaddon, M.; Yang, C.; Xie, K.; Yao, J.; Wang, L.; Liu, C.; et al. Nano-Modified Titanium Implant Materials: A Way Toward Improved Antibacterial Properties. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 576969. [[CrossRef](#)]
10. Ehlert, M.; Radtke, A.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Bartmański, M.; Piszczek, P. In Vitro Studies on Nanoporous, Nanotubular and Nanosponge-Like Titania Coatings, with the Use of Adipose-Derived Stem Cells. *Materials* **2020**, *13*, 1574. [[CrossRef](#)]
11. Radtke, A.; Ehlert, M.; Jędrzejewski, T.; Bartmański, M. The Morphology, Structure, Mechanical Properties and Biocompatibility of Nanotubular Titania Coatings before and after Autoclaving Process. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ribeiro, M.; Monteiro, F.; Ferraz, M. Infection of Orthopedic Implants with Emphasis on Bacterial Adhesion Process and Techniques Used in Studying Bacterial-Material Interactions. *Biomater* **2012**, *2*, 176–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Piszczek, P.; Radtke, A.; Ehlert, M.; Jędrzejewski, T.; Sznarkowska, A.; Sadowska, B.; Bartmański, M.; Erdoğan, Y.K.; Ercan, B.; Jędrzejczyk, W. Comprehensive Evaluation of the Biological Properties of Surface-Modified Titanium Alloy Implants. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Radtke, A.; Grodzicka, M.; Ehlert, M.; Muzioł, T.M.; Szkodo, M.; Bartmański, M.; Piszczek, P. Studies on Silver Ions Releasing Processes and Mechanical Properties of Surface-Modified Titanium Alloy Implants. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3962. [[CrossRef](#)]
15. Radtke, A.; Grodzicka, M.; Ehlert, M.; Jędrzejewski, T.; Wypij, M.; Golińska, P. “To Be Microbiocidal and Not to Be Cytotoxic at the Same Time . . . ”—Silver Nanoparticles and Their Main Role on the Surface of Titanium Alloy Implants. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Vranceanu, D.M.; Ungureanu, E.; Ionescu, I.C.; Parau, A.C.; Kiss, A.E.; Vladescu, A.; Cotrut, C.M. Electrochemical Surface Biofunctionalization of Titanium through Growth of TiO₂ Nanotubes and Deposition of Zn Doped Hydroxyapatite. *Coatings* **2022**, *12*, 69. [[CrossRef](#)]
17. Stocco, T.D.; Rodrigues, P.J.G.; Filho, M.A.d.A.; Lobo, A.O. Nanohydroxyapatite Electrodeposition onto Electrospun Nanofibers: Technique Overview and Tissue Engineering Applications. *Bioengineering* **2021**, *8*, 151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Surmenev, R.A.; Surmeneva, M.A.; Ivanova, A.A. Significance of Calcium Phosphate Coatings for the Enhancement of New Bone Osteogenesis—A Review. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 557–579. [[CrossRef](#)]
19. Brangule, A.; Gross, K.A. Importance of FTIR Spectra Deconvolution for the Analysis of Amorphous Calcium Phosphates. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2015**, *77*, 012027. [[CrossRef](#)]
20. Vecstaudza, J.; Gasik, M.; Locs, J. Amorphous Calcium Phosphate Materials: Formation, Structure and Thermal Behaviour. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2019**, *39*, 1642–1649. [[CrossRef](#)]
21. Safavi, M.S.; Walsh, F.C.; Surmeneva, M.A.; Surmenev, R.A.; Khalil-Allafi, J. Electrodeposited Hydroxyapatite-Based Biocoatings: Recent Progress and Future Challenges. *Coatings* **2021**, *11*, 110. [[CrossRef](#)]
22. Radtke, A.; Ehlert, M.; Jędrzejewski, T.; Sadowska, B.; Więckowska-Szakiel, M.; Holopainen, J.; Ritala, M.; Leskelä, M.; Bartmański, M.; Szkodo, M.; et al. Titania Nanotubes/Hydroxyapatite Nanocomposites Produced with the Use of the Atomic Layer Deposition Technique: Estimation of Bioactivity and Nanomechanical Properties. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Tian, M.; Cai, S.; Ling, L.; Zuo, Y.; Wang, Z.; Liu, P.; Bao, X.; Xu, G. Superhydrophilic Hydroxyapatite/Hydroxypropyltrimethyl Ammonium Chloride Chitosan Composite Coating for Enhancing the Antibacterial and Corrosion Resistance of Magnesium Alloy. *Prog. Org. Coat.* **2022**, *165*, 106745. [[CrossRef](#)]
24. Panda, S.; Biswas, C.K.; Paul, S. A Comprehensive Review on the Preparation and Application of Calcium Hydroxyapatite: A Special Focus on Atomic Doping Methods for Bone Tissue Engineering. *Ceram. Int.* **2021**, *47*, 28122–28144. [[CrossRef](#)]
25. Ahmadi, S.; Mohammadi, I.; Sadrnezhaad, S.K. Hydroxyapatite Based and Anodic Titania Nanotube Biocomposite Coatings: Fabrication, Characterization and Electrochemical Behavior. *Surf. Coat. Technol.* **2016**, *287*, 67–75. [[CrossRef](#)]
26. Drevet, R.; Benhayoune, H. Electrodeposition of Calcium Phosphate Coatings on Metallic Substrates for Bone Implant Applications: A Review. *Coatings* **2022**, *12*, 539. [[CrossRef](#)]

27. Taranu, B.-O.; Ianasi, P.; Rus, S.F.; Bucur, A.I. Simultaneous Precipitation and Electrodeposition of Hydroxyapatite Coatings at Different Temperatures on Various Metal Substrates. *Coatings* **2022**, *12*, 288. [[CrossRef](#)]
28. Catauro, M.; Barrino, F.; Blanco, I.; Piccolella, S.; Pacifico, S. Use of the Sol–Gel Method for the Preparation of Coatings of Titanium Substrates with Hydroxyapatite for Biomedical Application. *Coatings* **2020**, *10*, 203. [[CrossRef](#)]
29. Heimann, R.B. Structural Changes of Hydroxylapatite during Plasma Spraying: Raman and NMR Spectroscopy Results. *Coatings* **2021**, *11*, 987. [[CrossRef](#)]
30. Mohseni, E.; Zalnezhad, E.; Bushroa, A.R. Comparative Investigation on the Adhesion of Hydroxyapatite Coating on Ti–6Al–4V Implant: A Review Paper. *Int. J. Adhes. Adhes.* **2014**, *48*, 238–257. [[CrossRef](#)]
31. Vladescu, A.; Vranceanu, D.M.; Kulesza, S.; Ivanov, A.N.; Bramowicz, M.; Fedonnikov, A.S.; Braic, M.; Norkin, I.A.; Koptug, A.; Kurtukova, M.O.; et al. Influence of the Electrolyte’s PH on the Properties of Electrochemically Deposited Hydroxyapatite Coating on Additively Manufactured Ti64 Alloy. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 16819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Khlifi, K.; Dhiflaoui, H.; Ben Rhouma, A.; Faure, J.; Benhayoune, H.; Laarbi, A.B.C. Nanomechanical Behavior, Adhesion and Corrosion Resistance of Hydroxyapatite Coatings for Orthopedic Implant Applications. *Coatings* **2021**, *11*, 477. [[CrossRef](#)]
33. Li, T.T.; Ling, L.; Lin, M.C.; Peng, H.K.; Ren, H.T.; Lou, C.W.; Lin, J.H. Recent Advances in Multifunctional Hydroxyapatite Coating by Electrochemical Deposition. *J. Mater. Sci.* **2020**, *55*, 6352–6374. [[CrossRef](#)]
34. Nagentrau, M.; Tobi, A.L.M.; Jamian, S.; Otsuka, Y.; Hussin, R. Delamination-Fretting Wear Failure Evaluation at HAp-Ti-6Al-4V Interface of Uncemented Artificial Hip Implant. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2021**, *122*, 104657. [[CrossRef](#)]
35. Schönweger, F.; Sprecher, C.M.; Milz, S.; Dommann-Scherrer, C.; Meier, C.; Dommann, A.; Neels, A.; Wahl, P. New Insights into Osteointegration and Delamination from a Multidisciplinary Investigation of a Failed Hydroxyapatite-Coated Hip Joint Replacement. *Materials* **2020**, *13*, 4713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Ammarullah, M.I.; Afif, I.Y.; Maula, M.I.; Winarni, T.I.; Tauviqirrahman, M.; Jamari, J. Tresca Stress Evaluation of Metal-on-UHMWPE Total Hip Arthroplasty during Peak Loading from Normal Walking Activity. *Mater. Today Proc.* **2022**, *63*, S143–S146. [[CrossRef](#)]
37. Singh, G.; Singh, H.; Sidhu, B.S. Characterization and Corrosion Resistance of Plasma Sprayed HA and HA–SiO₂ Coatings on Ti–6Al–4V. *Surf. Coat. Technol.* **2013**, *228*, 242–247. [[CrossRef](#)]
38. Ehlert, M.; Radtke, A.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Piszczek, P. Assessment of Titanate Nanolayers in Terms of Their Physico-chemical and Biological Properties. *Materials* **2021**, *14*, 806. [[CrossRef](#)]
39. Ehlert, M.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Bartmański, M.; Radtke, A. Titania Nanofiber Scaffolds with Enhanced Biointegration Activity—Preliminary In Vitro Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5642. [[CrossRef](#)]
40. Ehlert, M.; Radtke, A.; Topolski, A.; Śmigiel, J.; Piszczek, P. The Photocatalytic Activity of Titania Coatings Produced by Electrochemical and Chemical Oxidation of Ti6Al4V Substrate, Estimated According to ISO 10678:2010. *Materials* **2020**, *13*, 2649. [[CrossRef](#)]
41. Lin, D.-Y.; Wang, X.-X. Electrodeposition of Hydroxyapatite Coating on CoNiCrMo Substrate in Dilute Solution. *Surf. Coat. Technol.* **2010**, *204*, 3205–3213. [[CrossRef](#)]
42. Huang, Y.; Hao, M.; Nian, X.; Qiao, H.; Zhang, X.; Zhang, X.; Song, G.; Guo, J.; Pang, X.; Zhang, H. Strontium and Copper Co-Substituted Hydroxyapatite-Based Coatings with Improved Antibacterial Activity and Cytocompatibility Fabricated by Electrodeposition. *Ceram. Int.* **2016**, *42*, 11876–11888. [[CrossRef](#)]
43. Xiao, X.F.; Liu, R.F.; Zheng, Y.Z. Characterization of Hydroxyapatite/Titania Composite Coatings Codeposited by a Hydrothermal–Electrochemical Method on Titanium. *Surf. Coat. Technol.* **2006**, *200*, 4406–4413. [[CrossRef](#)]
44. Huang, Y.; Zhang, X.; Zhang, H.; Qiao, H.; Zhang, X.; Jia, T.; Han, S.; Gao, Y.; Xiao, H.; Yang, H. Fabrication of Silver- and Strontium-Doped Hydroxyapatite/TiO₂ Nanotube Bilayer Coatings for Enhancing Bactericidal Effect and Osteoinductivity. *Ceram. Int.* **2017**, *43*, 992–1007. [[CrossRef](#)]
45. He, D.-H.; Wang, P.; Liu, P.; Liu, X.-K.; Ma, F.-C.; Zhao, J. HA Coating Fabricated by Electrochemical Deposition on Modified Ti6Al4V Alloy. *Surf. Coat. Technol.* **2016**, *301*, 6–12. [[CrossRef](#)]
46. Zeng, H.; Lacefield, W.R. XPS, EDX and FTIR Analysis of Pulsed Laser Deposited Calcium Phosphate Bioceramic Coatings: The Effects of Various Process Parameters. *Biomaterials* **2000**, *21*, 23–30. [[CrossRef](#)]
47. Rehman, I.; Bonfield, W. Characterization of Hydroxyapatite and Carbonated Apatite by Photo Acoustic FTIR Spectroscopy. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1997**, *8*, 1–4. [[CrossRef](#)]
48. Barinov, S.M.; Rau, J.V.; Cesaro, S.N.; Durisin, J.; Fadeeva, I.V.; Ferro, D.; Medvecky, L.; Trionfetti, G. Carbonate Release from Carbonated Hydroxyapatite in the Wide Temperature Range. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2006**, *17*, 597–604. [[CrossRef](#)]
49. Berzina-Cimdina, L.; Borodajenko, N. Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In *Infrared Spectroscopy—Materials Science, Engineering and Technology*; Theophanides, T., Ed.; InTech: London, UK, 2012; ISBN 978-953-51-0537-4.
50. Wei, D.; Zhou, Y.; Jia, D.; Wang, Y. Biomimetic Apatite Deposited on Microarc Oxidized Anatase-Based Ceramic Coating. *Ceram. Int.* **2008**, *34*, 1139–1144. [[CrossRef](#)]
51. Tsuchiya, H.; Macak, J.M.; Müller, L.; Kunze, J.; Müller, F.; Greil, P.; Virtanen, S.; Schmuki, P. Hydroxyapatite Growth on Anodic TiO₂ Nanotubes. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *77*, 534–541. [[CrossRef](#)]
52. Ramesh, S.T.; Rameshbabu, N.; Gandhimathi, R.; Nidheesh, P.V.; Kumar, M.S. Kinetics and Equilibrium Studies for the Removal of Heavy Metals in Both Single and Binary Systems Using Hydroxyapatite. *Appl. Water Sci.* **2012**, *2*, 187–197. [[CrossRef](#)]

53. Elliott, J.C. *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, 1st ed.; Studies in Inorganic Chemistry; Elsevier: London, UK, 1994; Volume 18, ISBN 978-1-4832-9031-7.
54. El Boujaady, H.; Mouraber, M.; El Rhilassi, A.; Bennani-Ziatni, M.; El Hamri, R.; Tajtai, A. Adsorption of a Textile Dye on Synthesized Calcium Deficient Hydroxyapatite (CDHAp): Kinetic and Thermodynamic Studies. *J. Mater. Env. Sci.* **2016**, *7*, 4049–4063.
55. Ronan, K.; Kannan, M.B. Novel Sustainable Route for Synthesis of Hydroxyapatite Biomaterial from Biowastes. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2017**, *5*, 2237–2245. [[CrossRef](#)]
56. Tripathy, A.; Sharma, P.; Sahoo, N.; Pramanik, S.; Abu Osman, N.A. Moisture Sensitive Inimitable Armalcolite/PDMS Flexible Sensor: A New Entry. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *262*, 211–220. [[CrossRef](#)]
57. Bohre, A.; Avasthi, K.; Singh, B.; Shrivastava, O.P. Crystallographic Evaluation of Titanate Ceramics as a Host Structure for Immobilization of Samarium. *Radiochemistry* **2014**, *56*, 92–97. [[CrossRef](#)]
58. Cotrut, C.M.; Vladescu, A.; Dinu, M.; Vranceanu, D.M. Influence of Deposition Temperature on the Properties of Hydroxyapatite Obtained by Electrochemical Assisted Deposition. *Ceram. Int.* **2018**, *44*, 669–677. [[CrossRef](#)]
59. Du, J.; Wang, G.; Song, D.; Jiang, J.; Jiang, H.; Gao, J. In-Vitro Degradation Behavior and Biocompatibility of Superhydrophilic Hydroxyapatite Coating on Mg–2Zn–Mn–Ca–Ce Alloy. *J. Mater. Res. Technol.* **2022**, *17*, 2742–2754. [[CrossRef](#)]
60. Yang, Y.; Ao, H.; Wang, Y.; Lin, W.; Yang, S.; Zhang, S.; Yu, Z.; Tang, T. Cytocompatibility with Osteogenic Cells and Enhanced in Vivo Anti-Infection Potential of Quaternized Chitosan-Loaded Titania Nanotubes. *Bone Res.* **2016**, *4*, 16027. [[CrossRef](#)]
61. Bai, Y.; Zhang, H.; Shao, Y.; Zhang, H.; Zhu, J. Recent Progresses of Superhydrophobic Coatings in Different Application Fields: An Overview. *Coatings* **2021**, *11*, 116. [[CrossRef](#)]
62. Li, W.; Zhan, Y.; Yu, S. Applications of Superhydrophobic Coatings in Anti-Icing: Theory, Mechanisms, Impact Factors, Challenges and Perspectives. *Prog. Org. Coat.* **2021**, *152*, 106117. [[CrossRef](#)]
63. Gu, C.G.; Fu, Q.-G.; Li, H.; Lu, J.H.; Zhang, L.L. Study on Special Morphology Hydroxyapatite Bioactive Coating by Electrochemical Deposition. *Key Eng. Mater.* **2013**, *537*, 256–260. [[CrossRef](#)]
64. Chakraborty, R.; Sengupta, S.; Saha, P.; Das, S. Synthesis of Biocompatible Calcium Hydrogen Phosphate and Hydroxyapatite Coating on SS316 Substrate through Pulsed Electrodeposition. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *69*, 875–883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Han, Y.; Fu, T.; Lu, J.; Xu, K. Characterization and Stability of Hydroxyapatite Coatings Prepared by an Electrodeposition and Alkaline-Treatment Process. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *54*, 96–101. [[CrossRef](#)]
66. Gopi, D.; Indira, J.; Kavitha, L. A Comparative Study on the Direct and Pulsed Current Electrodeposition of Hydroxyapatite Coatings on Surgical Grade Stainless Steel. *Surf. Coat. Technol.* **2012**, *206*, 2859–2869. [[CrossRef](#)]
67. Marashi-Najafi, F.; Khalil-Allafi, J.; Etmannanfar, M.R.; Faezi-Alivand, R. Corrosion Resistance and in Vitro Evaluation of the Pulsed Current Electrodeposited Hydroxyapatite Coatings on Nitinol Shape Memory Alloy. *Mater. Corros.* **2017**, *68*, 1237–1245. [[CrossRef](#)]
68. Gopi, D.; Prakash, V.C.A.; Kavitha, L.; Kannan, S.; Bhalaji, P.R.; Shinyjoy, E.; Ferreira, J.M.F. A Facile Electrodeposition of Hydroxyapatite onto Borate Passivated Surgical Grade Stainless Steel. *Corros. Sci.* **2011**, *53*, 2328–2334. [[CrossRef](#)]
69. Zhao, D.; Sun, R.; Chen, K. Influence of Different Chelating Agents on Corrosion Performance of Microstructured Hydroxyapatite Coatings on AZ91D Magnesium Alloy. *J. Wuhan Univ. Technol. Mater. Sci. Ed.* **2017**, *32*, 179–185. [[CrossRef](#)]
70. Zhang, Y.; Wu, M.; Wang, T.; Guo, S. Fabrication of Porous Micro-Nanostructured Networks on Ti6Al4V for Faster Hydroxyapatite Deposition in SBF. *Mater. Lett.* **2019**, *256*, 126571. [[CrossRef](#)]
71. Mazumder, S.; Falkinham, J.; Dietrich, A.; Puri, I. Role of Hydrophobicity in Bacterial Adherence to Carbon Nanostructures and Biofilm Formation. *Biofouling* **2010**, *26*, 333–339. [[CrossRef](#)]
72. Gittens, R.A.; Scheideler, L.; Rupp, F.; Hyzy, S.L.; Geis-Gerstorfer, J.; Schwartz, Z.; Boyan, B.D. A Review on the Wettability of Dental Implant Surfaces II: Biological and Clinical Aspects. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 2907–2918. [[CrossRef](#)]
73. Tsai, W.L.; Hsu, P.C.; Hwu, Y.; Chen, C.H.; Chang, L.W.; Je, J.H.; Lin, H.M.; Groso, A. Electrochemistry—Building on Bubbles in Metal Electrodeposition. *Nature* **2002**, *417*, 139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Dumelié, N.; Benhayoune, H.; Rousse, C.; Bouthors, S.; Perchet, A.; Wortham, L.; Douglade, J.; Laurent-Maquin, D.; Balossier, G. Characterization of Electrodeposited Calcium Phosphate Coatings by Complementary Scanning Electron Microscopy and Scanning-Transmission Electron Microscopy Associated to X-Ray Microanalysis. *Thin Solid Films* **2005**, *492*, 131–139. [[CrossRef](#)]
75. Aminzare, M.; Eskandari, A.; Baroonian, M.H.; Berenov, A.; Hesabi, Z.R.; Taheri, M.; Sadrnezhaad, S.K. Hydroxyapatite Nanocomposites: Synthesis, Sintering and Mechanical Properties. *Ceram. Int.* **2013**, *39*, 2197–2206. [[CrossRef](#)]
76. Zhang, Z.; Dunn, M.F.; Xiao, T.D.; Tomsia, A.P.; Saiz, E. Nanostructured Hydroxyapatite Coatings for Improved Adhesion and Corrosion Resistance for Medical Implants. *MRS Online Proc. Libr.* **2011**, *703*, 75. [[CrossRef](#)]
77. Zhang, E.; Zou, C.; Zeng, S. Preparation and Characterization of Silicon-Substituted Hydroxyapatite Coating by a Biomimetic Process on Titanium Substrate. *Surf. Coat. Technol.* **2009**, *203*, 1075–1080. [[CrossRef](#)]
78. Brizuela, A.; Herrero-Climent, M.; Rios-Carrasco, E.; Rios-Santos, J.; Pérez, R.; Manero, J.; Gil Mur, J. Influence of the Elastic Modulus on the Osseointegration of Dental Implants. *Materials* **2019**, *12*, 980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Shibata, Y.; Tanimoto, Y.; Maruyama, N.; Nagakura, M. A Review of Improved Fixation Methods for Dental Implants. Part II: Biomechanical Integrity at Bone–Implant Interface. *J. Prosthodont. Res.* **2015**, *59*, 84–95. [[CrossRef](#)]
80. Wang, Y.; Tao, J.; Wang, L.; He, P.; Wang, T. HA Coating on Titanium with Nanotubular Anodized TiO₂ Intermediate Layer via Electrochemical Deposition. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* **2008**, *18*, 631–635. [[CrossRef](#)]

81. Wang, H.; Chen, C.; Wang, D. Development of Hydroxyapatite Coating Prepared by Sol–Gel Technique. *Surf. Rev. Lett.* **2006**, *13*, 737–745. [[CrossRef](#)]
82. Brammer, K.S.; Frandsen, C.J.; Jin, S. TiO₂ Nanotubes for Bone Regeneration. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 315. [[CrossRef](#)]
83. Tan, A.W.; Pingguan-Murphy, B.; Ahmad, R.; Akbar, S.A. Review of Titania Nanotubes: Fabrication and Cellular Response. *Ceram. Int.* **2012**, *38*, 4421–4435. [[CrossRef](#)]
84. Rakngarm, A.; Miyashita, Y.; Mutoh, Y. Formation of Hydroxyapatite Layer on Bioactive Ti and Ti–6Al–4V by Simple Chemical Technique. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 1953–1961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Hamada, K.; Kon, M.; Hanawa, T.; Yokoyama, K.; Miyamoto, Y.; Asaoka, K. Hydrothermal Modification of Titanium Surface in Calcium Solutions. *Biomaterials* **2002**, *23*, 2265–2272. [[CrossRef](#)]
86. Zavgorodniy, A.V.; Borrero-López, O.; Hoffman, M.; LeGeros, R.Z.; Rohanzadeh, R. Mechanical Stability of Two-Step Chemically Deposited Hydroxyapatite Coating on Ti Substrate: Effects of Various Surface Pretreatments. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2011**, *99*, 58–69. [[CrossRef](#)]
87. Yılmaz, E.; Çakıroğlu, B.; Gökçe, A.; Findik, F.; Gülsoy, N.; Özacar, M. Novel Hydroxyapatite/Graphene Oxide/Collagen Bioactive Composite Coating on Ti16Nb Alloys by Electrodeposition. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *101*, 292–305. [[CrossRef](#)]
88. Blackwood, D.J.; Seah, K.H.W. Electrochemical Cathodic Deposition of Hydroxyapatite: Improvements in Adhesion and Crystallinity. *Mater. Sci. Eng. C* **2009**, *29*, 1233–1238. [[CrossRef](#)]
89. Sarraf, M.; Razak, A.; Crum, R.; Gamez, C.; Ramirez, B.; Hayaty, A.K.N.; Nasiri-Tabrizi, B.; Gupta, V.; Sukiman, N.; Basirun, W. Adhesion Measurement of Highly-Ordered TiO₂ Nanotubes on Ti-6Al-4V Alloy. *Process. Appl. Ceram.* **2017**, *11*, 311–321. [[CrossRef](#)]
90. Jaafar, A.; Hecker, C.; Árki, P.; Joseph, Y. Sol-Gel Derived Hydroxyapatite Coatings for Titanium Implants: A Review. *Bioengineering* **2020**, *7*, 127. [[CrossRef](#)]
91. Isa, N.N.C.; Mohd, Y.; Yury, N. Electrochemical Deposition and Characterization of Hydroxyapatite (HAp) on Titanium Substrate. *APCBEE Procedia* **2012**, *3*, 46–52. [[CrossRef](#)]
92. Schmidt, R.; Hoffmann, V.; Helth, A.; Gostin, P.F.; Calin, M.; Eckert, J.; Gebert, A. Electrochemical Deposition of Hydroxyapatite on Beta-Ti-40Nb. *Surf. Coat. Technol.* **2016**, *294*, 186–193. [[CrossRef](#)]
93. Hayakawa, T.; Kawashita, M.; Takaoaka, G. Coating of Hydroxyapatite Films on Titanium Substrates by Electrodeposition under Pulse Current. *J. Ceram. Soc. Jpn.* **2008**, *116*, 68–73. [[CrossRef](#)]
94. Huang, Y.; Zhang, X.; Mao, H.; Li, T.; Zhao, R.; Yan, Y.; Pang, X. Osteoblastic Cell Responses and Antibacterial Efficacy of Cu/Zn Co-Substituted Hydroxyapatite Coatings on Pure Titanium Using Electrodeposition Method. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 17076–17086. [[CrossRef](#)]
95. Eliaz, N.; Ritman-Hertz, O.; Aronov, D.; Weinberg, E.; Shenhar, Y.; Rosenman, G.; Weinreb, M.; Ron, E. The Effect of Surface Treatments on the Adhesion of Electrochemically Deposited Hydroxyapatite Coating to Titanium and on Its Interaction with Cells and Bacteria. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2011**, *22*, 1741–1752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Robertson, S.F.; Bandyopadhyay, A.; Bose, S. Titania Nanotube Interface to Increase Adhesion Strength of Hydroxyapatite Sol-Gel Coatings on Ti-6Al-4V for Orthopedic Applications. *Surf. Coat. Technol.* **2019**, *372*, 140–147. [[CrossRef](#)]
97. Mohammad, N.F.; Ahmad, R.N.; Rosli, N.L.M.; Manan, M.S.A.; Marzuki, M.; Wahi, A. Sol Gel Deposited Hydroxyapatite-Based Coating Technique on Porous Titanium Niobium for Biomedical Applications: A Mini Review. *Mater. Today Proc.* **2021**, *41*, 127–135. [[CrossRef](#)]
98. Tranquillo, E.; Bollino, F. Surface Modifications for Implants Lifetime Extension: An Overview of Sol-Gel Coatings. *Coatings* **2020**, *10*, 589. [[CrossRef](#)]
99. Heimann, R.B. Structure, Properties, and Biomedical Performance of Osteoconductive Bioceramic Coatings. *Surf. Coat. Technol.* **2013**, *233*, 27–38. [[CrossRef](#)]
100. Carradò, A.; Perrin-Schmitt, F.; Le, Q.V.; Giraudel, M.; Fischer, C.; Koenig, G.; Jacomine, L.; Behr, L.; Chalom, A.; Fiette, L.; et al. Nanoporous Hydroxyapatite/Sodium Titanate Bilayer on Titanium Implants for Improved Osteointegration. *Dent. Mater.* **2017**, *33*, 321–332. [[CrossRef](#)]
101. Fomin, A.; Fomina, M.; Koshuro, V.; Rodionov, I.; Zakharevich, A.; Skaptsov, A. Structure and Mechanical Properties of Hydroxyapatite Coatings Produced on Titanium Using Plasma Spraying with Induction Preheating. *Ceram. Int.* **2017**, *43*, 11189–11196. [[CrossRef](#)]
102. Ritwik, A.; Saju, K.K.; Vengellur, A.; Saipriya, P.P. Development of Thin-Film Hydroxyapatite Coatings with an Intermediate Shellac Layer Produced by Dip-Coating Process on Ti6Al4V Implant Materials. *J. Coat. Technol. Res.* **2022**, *19*, 597–605. [[CrossRef](#)]

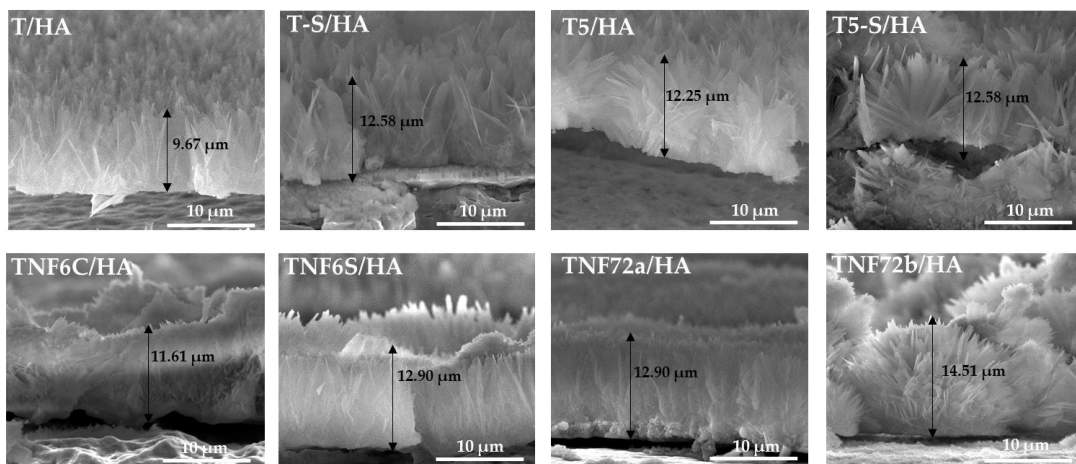


Figure S1. SEM cross-section images of the T/HA (a), T-S/HA (b), T5/HA (c), T5-S/HA (d), TNF6C/HA (e), TNF6S/HA (f), TNF72a/HA (g), and TNF72b/HA (h) samples at 2.5 mA current.

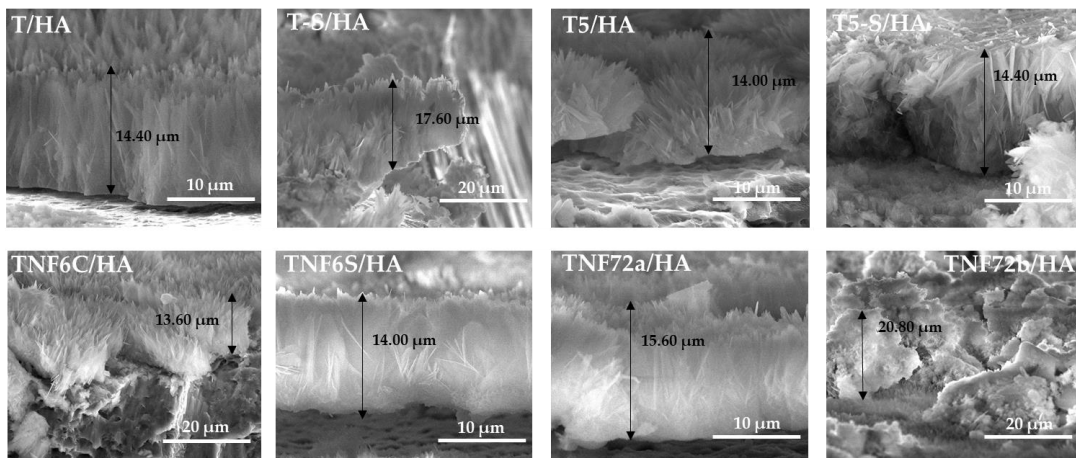


Figure S2. SEM cross-section images of the T/HA (a), T-S/HA (b), T5/HA (c), T5-S/HA (d), TNF6C/HA (e), TNF6S/HA (f), TNF72a/HA (g), and TNF72b/HA (h) samples at 3.5 mA current.

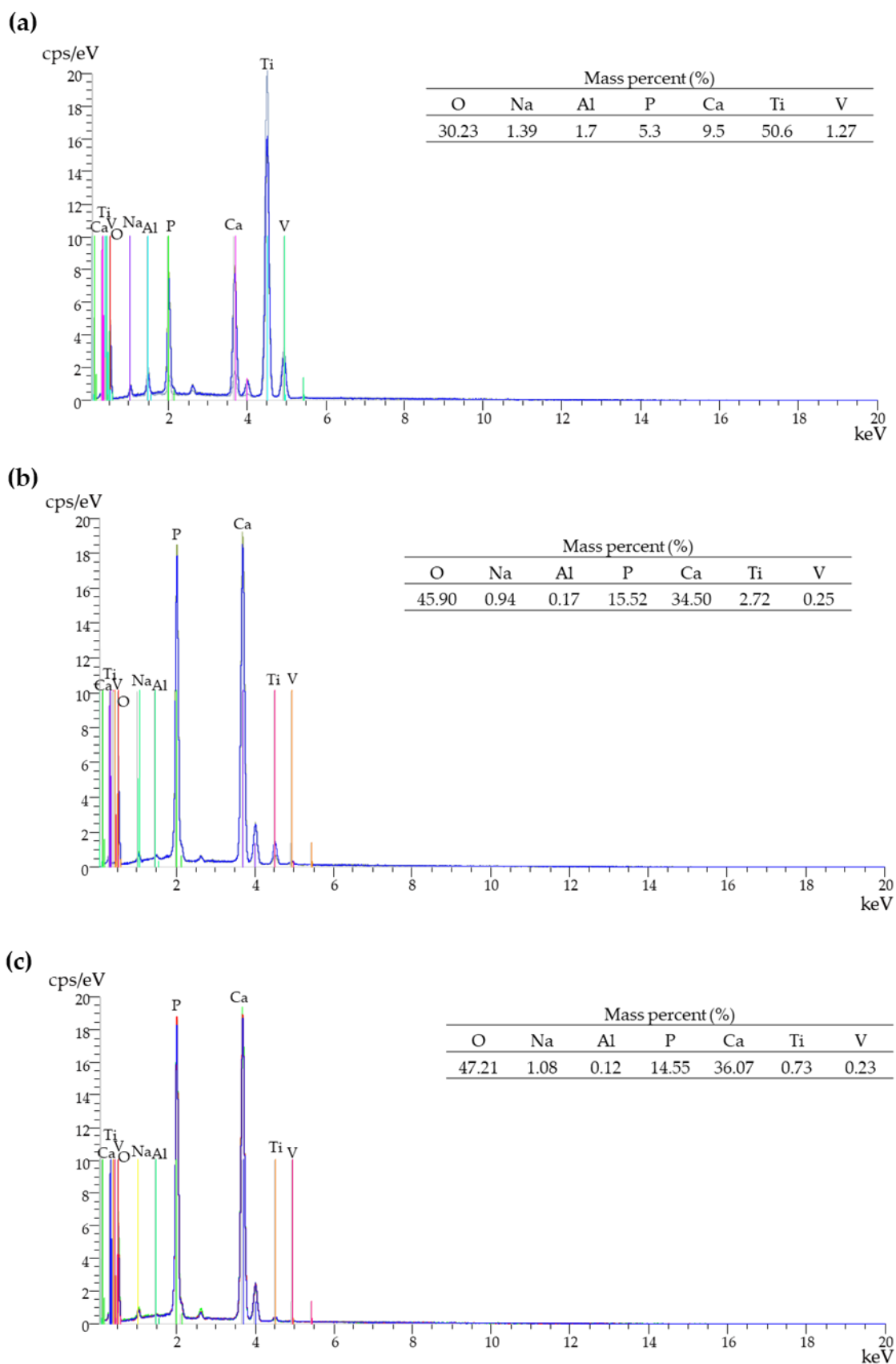


Figure S3. Energy-dispersive spectroscopy (EDS) spectra and quantitative data of the T5-S samples with hydroxyapatite layers at various currents: 1.5 mA (a), 2.5 mA (b), and 3.5 mA (c).

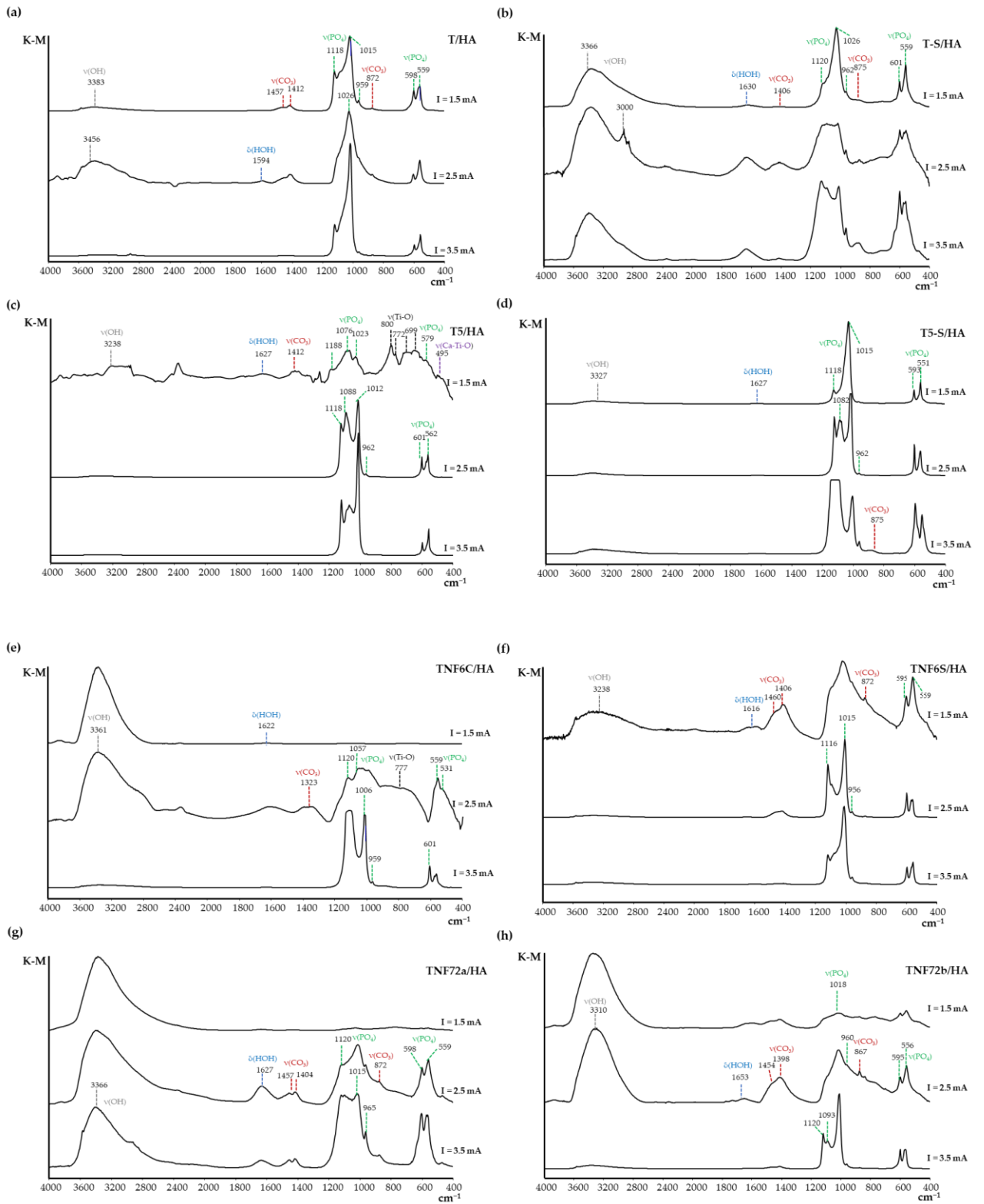


Figure S4. DRIFT spectra of studied T/HA (a), T-S/HA (b), T5/HA (c), T5-S/HA (d), TNF6C/HA (e), TNF6S/HA (f), TNF72a/HA (g), and TNF72b/HA (h) samples at various currents (1.5, 2.5, 3.5 mA).

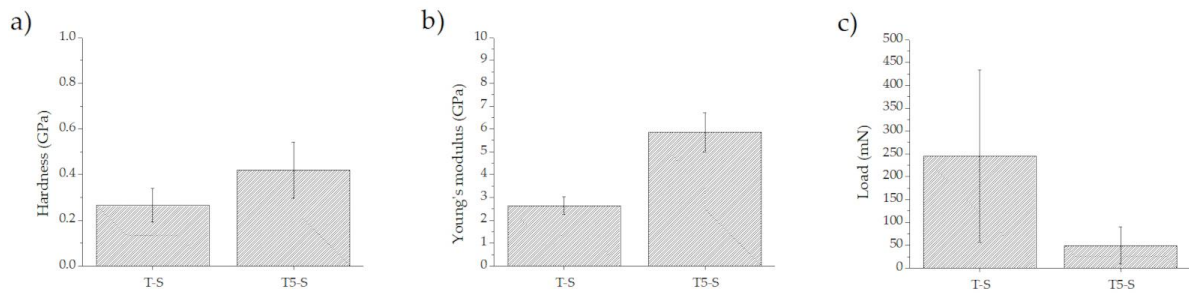


Figure S5. Nanomechanical properties (hardness—left and Young's modulus—right) of T-S and T5-S specimens.

P5. *Cell responses to TiO₂/HA and Titanate/HA Double Layer Coatings on Ti6Al4V alloy: An In Vitro Study*



Article

TiO₂/HA and Titanate/HA Double-Layer Coatings on Ti6Al4V Surface and Their Influence on In Vitro Cell Growth and Osteogenic Potential

Michalina Ehlert ^{1,2,*}, Aleksandra Radtke ^{1,2,*}, Natalia Forbot ³, Tomasz Jędrzejewski ³, Katarzyna Roszek ³, Patrycja Golińska ³, Grzegorz Trykowski ¹ and Piotr Piszczek ^{1,2}

¹ Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Gagarina 7, 87-100 Toruń, Poland

² Nano-implant Ltd., Gagarina 7/47, 87-100 Toruń, Poland

³ Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Lwowska 1, 87-100 Toruń, Poland

* Correspondence: m.ehlert@doktorant.umk.pl (M.E.); aradtke@umk.pl (A.R.)

Abstract: Hydroxyapatite (HA) layers are appropriate biomaterials for use in the modification of the surface of implants produced inter alia from a Ti6Al4V alloy. The issue that must be solved is to provide implants with appropriate biointegration properties, enabling the permanent link between them and bone tissues, which is not so easy with the HA layer. Our proposition is the use of the intermediate layer ((IL) = TiO₂, and titanate layers) to successfully link the HA coating to a metal substrate (Ti6Al4V). The morphology, structure, and chemical composition of Ti6Al4V/IL/HA systems were characterized by scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), and energy-dispersive X-ray spectrometry (EDS). We evaluated the apatite-forming ability on the surface of the layer in simulated body fluid. We investigated the effects of the obtained systems on the viability and growth of human MG-63 osteoblast-like cells, mouse L929 fibroblasts, and adipose-derived human mesenchymal stem cells (ADSCs) in vitro, as well as on their osteogenic properties. Based on the obtained results, we can conclude that both investigated systems reflect the physiological environment of bone tissue and create a biocompatible surface supporting cell growth. However, the nanoporous TiO₂ intermediate layer with osteogenesis-supportive activity seems most promising for the practical application of Ti6Al4V/TiO₂/HA as a system of bone tissue regeneration.

Keywords: hydroxyapatite; titanate nanolayers; titanium dioxide; cathodic electrodeposition; biointegration; antimicrobial activity; adipose-derived mesenchymal stem cells

Citation: Ehlert, M.; Radtke, A.; Forbot, N.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Golińska, P.; Trykowski, G.; Piszczek, P. TiO₂/HA and Titanate/HA Double-Layer Coatings on Ti6Al4V Surface and Their Influence on In Vitro Cell Growth and Osteogenic Potential. *J. Funct. Biomater.* **2022**, *13*, 271. <https://doi.org/10.3390/jfb13040271>

Academic Editor: Stefano Bellucci

Received: 3 November 2022

Accepted: 30 November 2022

Published: 1 December 2022

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



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Tissue engineering aims to replace, restore, improve or maintain the function of tissues and organs using implants containing the patient's cells embedded in a special biomaterial that acts as a cell scaffold [1–4]. The composition, architecture, and possibility of resorption are factors that determine the biomatrix's biocompatibility. Biomaterials are used for several different types of implants, such as surgical, orthopedic, dental, craniofacial, and arthroplasty applications. The implant function in the human body is a key feature for the requirements to be achieved by the materials used in their construction [4–11]. However, they must also possess the appropriate mechanical strength and porosity to allow cell adhesion [5,12–14]. The material's biocompatibility is a significant property that should be considered during their choice for implant construction, which will prevent its rejection by the body after implantation. A major risk is the loosening or fracture of the implant (shielding effect), which can cause painful inflammation and infection of the surrounding tissues [15–17]. In addition, it is important to ensure that its production process is reproducible for different batches of devices and that the material does not undergo

changes in shape or properties during its sterilization process [15–21]. For this reason, various innovative technologies (e.g., plasma treatment, low-intensity pulsed ultrasound, magnetic field stimulation, anodization, chemical treatment) [22–29], modifications (e.g., incorporation/deposition of various metal ions) [28,30–34] for the fabrication of biomaterials are being applied to prevent unwanted complications.

The most used material for orthopedic and dental implants is the titanium alloy Ti6Al4V. This is due to its superior corrosion resistance, high fracture resistance, low density, and biocompatibility. Unfortunately, the main problem is its inability to integrate with bone [23,35–39]. Moreover, titanium and titanium alloy show unsatisfactory mechanical properties. The Ti6Al4V alloy (~210 GPa) has a significantly higher elastic modulus compared to human cortical bone tissue (Young's modulus 10–30 GPa, hardness 0.3–0.7 GPa) and a higher hardness [40–42]. Therefore, numerous modifications of its surface are being carried out to make it bioactive. An analysis of previous reports revealed that the fabrication of nanoporous, nanotube, nanosponge-like, and nanofibrous TiO₂ and titanate coatings on the surface of the Ti6Al4V alloy significantly improves its biointegration properties [29,43–50]. The production of nanocoatings with different morphologies on the surface of the titanium alloy definitely improves its mechanical properties, but it still has not been developed as a biomaterial with very similar mechanical parameters to bone [38,51]. The attractive biomaterial for scaffolding in tissue engineering is hydroxyapatite (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, HA). Its composition and structure are very similar to the inorganic component of the bone matrix. The main limitation in the use of hydroxyapatite layers is their poor adhesion to metal substrates [52–55]. Over the past several years, a series of studies have been conducted in an effort to improve the evaluation of implant materials with a hydroxyapatite layer [37,52–59].

It is important to evaluate fabricated systems for their ability to promote bone repair and regeneration. The production of a porous scaffold facilitates increased cell migration and the diffusion of signaling molecules as well as nutrients [60–63]. The biomaterial should exhibit the potential to mimic the native extracellular matrix (ECM) and support many tissues' morphogenesis. In regenerative medicine and tissue engineering, there is a growing focus on using mesenchymal stem cells (MSCs) due to their ability to self-renew, proliferate and differentiate toward bone-forming cells [60,61,63–65]. Advances in stem cell knowledge have opened new possibilities for obtaining unlimited sources of cells. MSCs are generally isolated from bone marrow. However, they can also be isolated from, e.g., adipose tissue, umbilical cord, muscles, bone, synovium, blood, cartilage or tendon [63,64,66–68]. Adipose-derived human mesenchymal stem cells (ADSCs) are increasingly being used in cell therapy development, especially due to their angiogenic potential. Their undoubted advantages compared to stem cells isolated from bone marrow are their easy availability in the body and their non-invasive methods of collection [69–71]. The formation of a biocompatible scaffold, alone or in combination with stem cells, is a promising tool to improve the regeneration and repair of bone tissue [29,43,44,66,72].

In research carried out so far, we have focused on developing a manufacturing method for composite systems consisting of a Ti6Al4V alloy/intermediate layer ((IL); TiO₂ or titanate)/hydroxyapatite layer (HA). The obtained results revealed that the use of oxide intermediate layers linked the Ti6Al4V alloy substrate and the hydroxyapatite surface layer, and significantly improved the mechanical properties of the system. The mechanical parameters (i.e., hardness, Young's modulus) obtained for the hydroxyapatite layer were similar to cortical bone. Furthermore, the adhesion strength between the titanium alloy substrate and the hydroxyapatite layer was significantly increased by the use of intermediate coatings [30]. Nevertheless, the produced materials with a hydroxyapatite layer should also show high biocompatibility and biointegration properties.

For this reason, in the presented work, we focused on comparing the biological activity of the produced systems with the hydroxyapatite layer, which showed the best mechanical properties. We conducted *in vitro* studies of the biomaterials mentioned above as Ti6Al4V/IL/HA systems, investigating their effects on the survival and proliferation of

cultures of human MG-63 osteoblast-like cells, mouse L929 fibroblast and adipose-derived human mesenchymal stem cells (ADSCs) seeded on their surface. We also estimated the potential antimicrobial activity of the produced systems. These studies allowed for the development of a system with a hydroxyapatite layer, in which a balance between mechanical and biological properties was achieved.

2. Materials and Methods

2.1. Synthesis of TiO₂/HA and Titanate/HA Double-Layer Coating

Ti6Al4V/IL/HA composite materials were selected for biological studies, which exhibit physicochemical as well as mechanical properties desirable for biomedical applications. The following intermediate layers (ILs) were selected for biological tests as follows: nanoporous TiO₂ (T5), nanofibrous TiO₂ (TNF6C), and titanate (T-S), whose syntheses have been described in detail in our previous reports [29,43,44].

The overall scheme for producing the Ti6Al4V/IL/HA composites is presented in Figure 1. The intermediate layers on the surface of the Ti6Al4V substrates were synthesized in the first stage. In all our experiments, 0.20 mm-thick Ti6Al4V alloy foil was used (marked as T, grade 5, 99.7% purity; Strem Chemicals, Inc., Bismarck, ND, USA). The electrochemical method of anodic oxidation in 0.3% hydrofluoric acid solution ($t = 20$ min., $U = 5$ V) was used to produce TiO₂ nanoporous coatings (T5). As a result of etching in a ca. 5.8 M hydrochloric acid solution and chemical oxidation in 30% hydrogen peroxide solution ($t = 6$ h, $T = 85$ °C under a reflux condenser), TiO₂ nanofiber coatings (TNF6C) were obtained. Alkali-sodium treatment of the titanium alloy in 7 M sodium hydroxide solution ($t = 48$ h, $T = 65$ °C) led to titanate coatings (T-S).

The hydroxyapatite coating was deposited onto the Ti6Al4V/IL system in the next stage. The synthesis, structural and morphological characterization, as well as the physicochemical and mechanical properties of the TiO₂/HA and titanate/HA double layers have been previously reported [30]. T5, T-S, and TNF6C materials were cut into pieces 6 mm × 100 mm and 10 × 60 mm and 0.2 mm thick. A hydroxyapatite (HA) coating was deposited onto these biomaterials using cathodic electrochemical deposition ($t = 60$ min, $T = 65$ °C, $I = 2.5$ mA for T5 and T-S samples and $I = 3.5$ mA for TNF6C samples; pH of the electrolytes = 4.5). The electrolyte consisted of components dissolved in distilled water: Ca(NO₃)₂ · 4 H₂O (0.042 M), NH₄H₂PO₄ (0.025 M) and EDTA-2Na (1.5×10^{-3}). Then, the samples were immersed in 0.1 M NaOH solution ($t = 2$ h, $T = 65$ °C) and finally sintered ($t = 2$ h, $T = 250$ °C).

All specimens prepared for bioassay were sterilized ($t = 20$ min., $T = 123$ °C, $p = 120$ kPa) with an IS YESON YS-18L autoclave (Yeson, Ningbo, China).

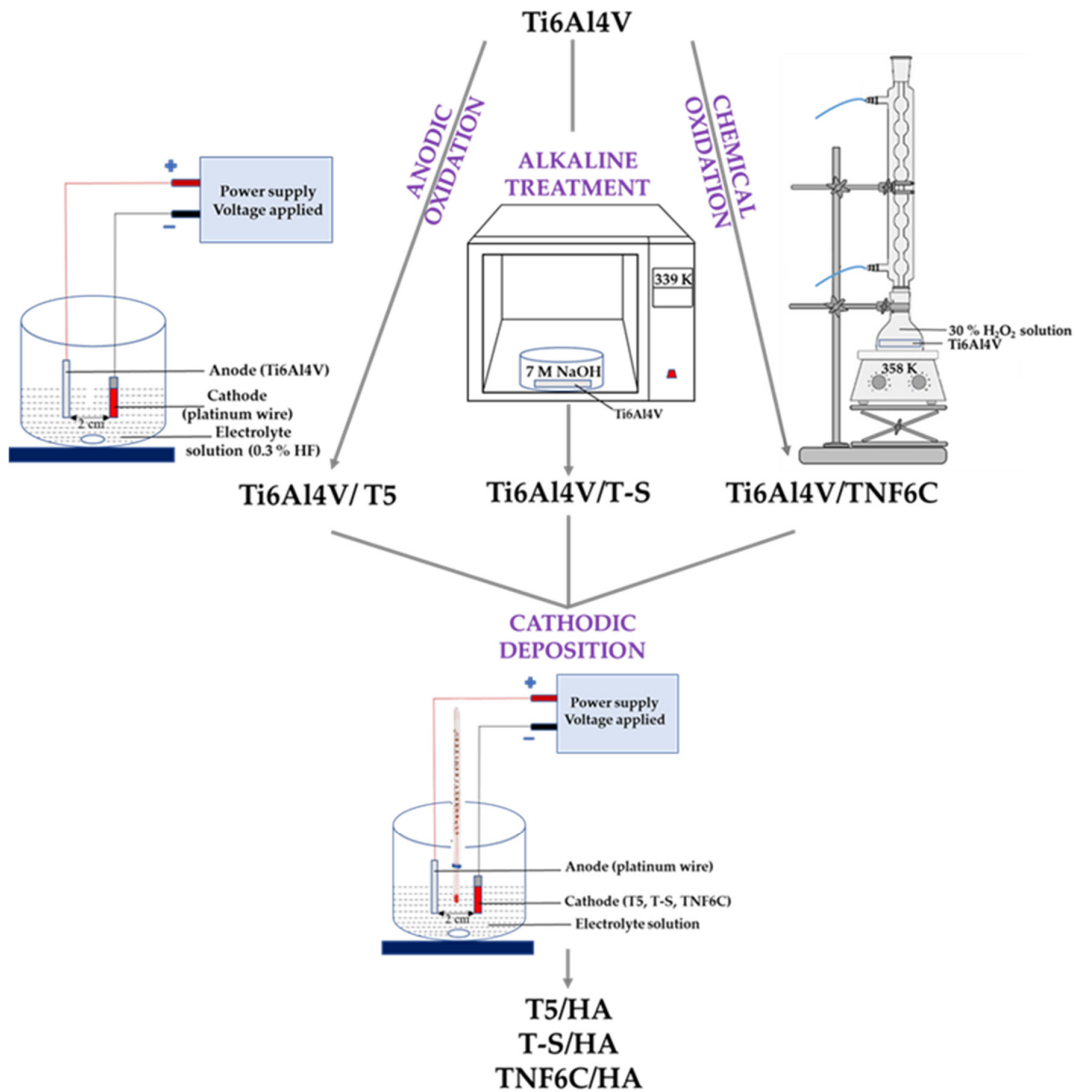


Figure 1. Scheme to produce systems with a hydroxyapatite layer.

2.2. SEM and Element Analysis

Scanning electron microscopy (SEM) studies were carried out using two microscopes: (1) high-resolution with field emission electron source (HR-SEM, Quanta 3D FEG, FEI Company, Brno, Czech Republic); (2) tungsten cathode microscope (SEM, EVO 15, Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany) coupled to energy-dispersive X-ray spectrometer (EDS, SmartEDS, Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany), which was used to analyze the elements contained in all the synthesized double layers. Measurements on both microscopes were made in the variable pressure mode (VP, with a pressure of 50 Pa in the chamber). X-ray diffraction analyses were carried out in the PANalytical X’Pert Pro model diffractometer (Malvern PANalytical B.V., Almelo, The Netherlands) with Cu-K alfa radiation and grazing incidence angle mode (GIXRD; the incidence angle was equal to 1 degree).

2.3. Apatite-Forming Ability

In accordance with ISO/FDIS 23317:2007(E) and Kokubo's formulation, we evaluated the apatite-forming ability on the surface of the layers in simulated body fluid (SBF) [73,74]. By immersing the samples in SBF solution, we wanted to (a) assess the stability of the HA layers linked through an intermediate layer (IL) to the Ti6Al4V substrate, as well as to (b) verify whether the produced HA layer promotes further apatite growth in a solution of similar composition to the human body fluids. These studies were carried out for the T5/HA, T-S/HA and TNF6C/HA systems. Immersion in SBF solution was carried out according to the procedure we described earlier at a constant temperature of 36.5 °C for 7, 14, 21, and 28 days, and each sample was kept in a vertical position inside polypropylene tubes [43]. The percentage weight gain observed after removing and drying the samples from the SBF solution was calculated.

2.4. Cell Culture

L929 mouse fibroblast cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and cultivated in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (penicillin and streptomycin). Human osteoblast-like MG-63 cells were purchased from the European Collection of Cell Cultures (Salisbury, UK) and cultured in EMEM medium supplemented with L-glutamine sodium pyruvate, non-essential amino acid, 10% FBS, and antibiotics. Adipose-derived human mesenchymal stem cells (ADSCs) were purchased from PromoCell (Heidelberg, Germany) and cultivated in Mesenchymal Stem Cell Growth Medium® containing 10% Supplement Mix® and antibiotics. All cell lines were cultured at 37 °C under a humidified atmosphere of 5% CO₂. After reaching approximately 70% cell density, the cells were trypsinized using trypsin/EDTA solution at a concentration of 0.25% for L929 and MG-63 cells or 0.04% for ADSCs, respectively. The reagents used for the L929 and MG-63 cell cultures were obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany), whereas those for ADSCs were purchased from PromoCell.

2.5. Cell Proliferation Assay

The MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) assays were used to evaluate cell proliferation. Firstly, 1×10^4 L929 fibroblasts, 1×10^4 MG-63 cells and 3×10^4 ADSCs were seeded in a 10 µL drop onto the sterile scaffolds placed in a 24-well plate and were left for 4 h to adhere. Then, 500 µL of suitable culture medium was added and the cells were cultured at 37 °C for 1, 5 and 7 days. Then, the samples were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS; Merck KGaA) and 100 µL of MTT solution at a concentration of 0.5 mg/mL was added to each well. After 3 h of incubation at 37 °C, the cells were washed again with PBS and 300 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO; 100% *v/v*) were added to each well. The formed formazan crystals were dissolved by shaking plates for 10 min. The optical density was measured at 570 nm (with reference wavelength of 630 nm) using Synergy HT Multi-detection reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). The blank samples without cells were treated identically to the experimental scaffolds.

2.6. Analysis of Cells using Scanning Electron Microscopy

The analysis of L929, MG-63, ADSC cell morphologies and the levels of proliferation over time on the selected scaffolds (T5/HA and TNF6C/HA) was conducted using scanning electron microscopy (EVO 15). The cells were seeded on the specimens at the same density as in the MTT assays and were cultured for 1 and 5 days. Then, the scaffolds were rinsed with PBS, fixed in 2.5% *v/v* glutaraldehyde and dehydrated in a graded series of ethanol concentrations (50%, 75%, 90%, and 100%) for 20 min at each ethanol concentration. Finally, the specimens were dried overnight before the SEM analysis was performed.

2.7. Alizarin Red S Staining

Before staining, cells were fixed for 15 min in 10% formalin solution, then residual formaldehyde was removed by washing the wells twice with bi-distilled water. Extracellular calcium deposits were stained through 20 min incubation with 500 μ L Alizarin Red solution. Unbound dye residues were rinsed 4 times for 5 min with bi-distilled water. For quantitative analysis, stained calcium deposits were mechanically removed from titanium substrates with a scraper and then bound dye was dissolved in 500 μ L 10% acetic acid by shaking for 30 min in 37 °C. The result was measured spectrophotometrically at a wavelength of 405 nm. To avoid a false positive result due to deposition of the dye on the titanium plates coated with hydroxyapatite, control stains were performed on the plates without seeded cells and these values were subtracted from the test samples.

2.8. Alkaline Phosphatase (ALP) Activity

The first step in determining the enzyme activity was to perform cell lysates. First, 350 μ L of lysis buffer were added to each well, incubated for 10 min at 37 °C, and cells were mechanically disintegrated with a scraper. The obtained lysates were centrifuged (3 min, 3000 g) and 300 μ L were transferred to the wells to determine the catalytic activity of the enzyme.

The substrate used for the enzymatic reaction was 1 mM p-nitrophenylphosphate (pNPP). Activity was measured by adding 0.3 mL of substrate solution to 0.3 mL of cell lysate. The blank sample—0.3 mL of lysis buffer and 0.3 mL of substrate—was also prepared. All samples were incubated for 1 h at 37 °C and then the reaction was stopped by adding 0.2 mL of 1% NaOH solution. The absorbance of the samples was measured at 405 nm by using Synergy HT Multi-detection reader. The produced p-nitrophenol concentration was calculated using the calibration curve, and ALP activity was normalized to cell number in appropriate samples.

2.9. Antimicrobial Activity

Biocidal activity of the selected scaffolds with hydroxyapatite layers were estimated against Gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538), Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 8739) bacteria and *Candida albicans* ATCC 10231. The scaffolds were placed in the 12-well plates with 1 mL of microbial inoculum ($1.0 - 3.3 \times 10^6$ C.F.U mL⁻¹) in 1 × phosphate-buffered saline (PBS) without ions (EurX) and incubated for 24 h at 37 °C. Buffer was sterilized by filtration through 0.22 μ m filters prior to use. Microbial density was prepared using a densitometer (Biosan, Latvia), diluted accordingly with PBS to the final concentration and estimated by colony counts after the spreading of 100 μ L on Tryptic Soy Agar (TSA; Becton Dickinson, USA for bacteria) or Sabouraus Dextrose Agar (SDA; Becton-Dickinson for *C. albicans*). The positive control was the inoculum without scaffolds. After incubation, the inoculum was collected from the wells, ten-fold diluted and spread (100 μ L) on the appropriate medium in Petri dishes. Plates were incubated for 24h at 37 °C. Colony-forming units were counted on the inoculated plates and compared with the appropriate control plates to estimate the reduction of bacterial or fungal growth.

The antimicrobial activity was determined based on the reduction (R) factor calculated according to the formula $R = U_t - A_t$, where U_t is the common logarithm of the number of bacteria in the untreated microbial suspension and A_t is the common logarithm of the number of bacteria in the treated microbial suspension. $R \geq 2$ determines the biocidal activity of the tested sample.

2.10. Statistical Analysis

All data are presented as mean \pm SEM and were evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc multiple comparisons test.

Significance level was set at $p < 0.05$. GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) was used to perform statistical analyses.

3. Results

3.1. Surface Morphology of TiO_2/HA and Titanate/HA Double-Layer Coating

Considering the results of our earlier investigations, for the bioassays we selected the samples that differed in the morphology of the intermediates (TiO_2 nanoporous (T5), titanate (T-S), and TiO_2 nanofibrous (TNF6C)), but that showed excellent physicochemical and mechanical parameters. The SEM images of the chosen intermediate layers, i.e., T5, T-S, and TNF6C, are presented in Figure 2a. Figure 2b shows SEM images of the surface morphology of the samples with the hydroxyapatite layer: T5/HA, TNF6C/HA, and T-S/HA. A floral morphology with numerous hydroxyapatite nanoplatelets was observed for all the double layers.

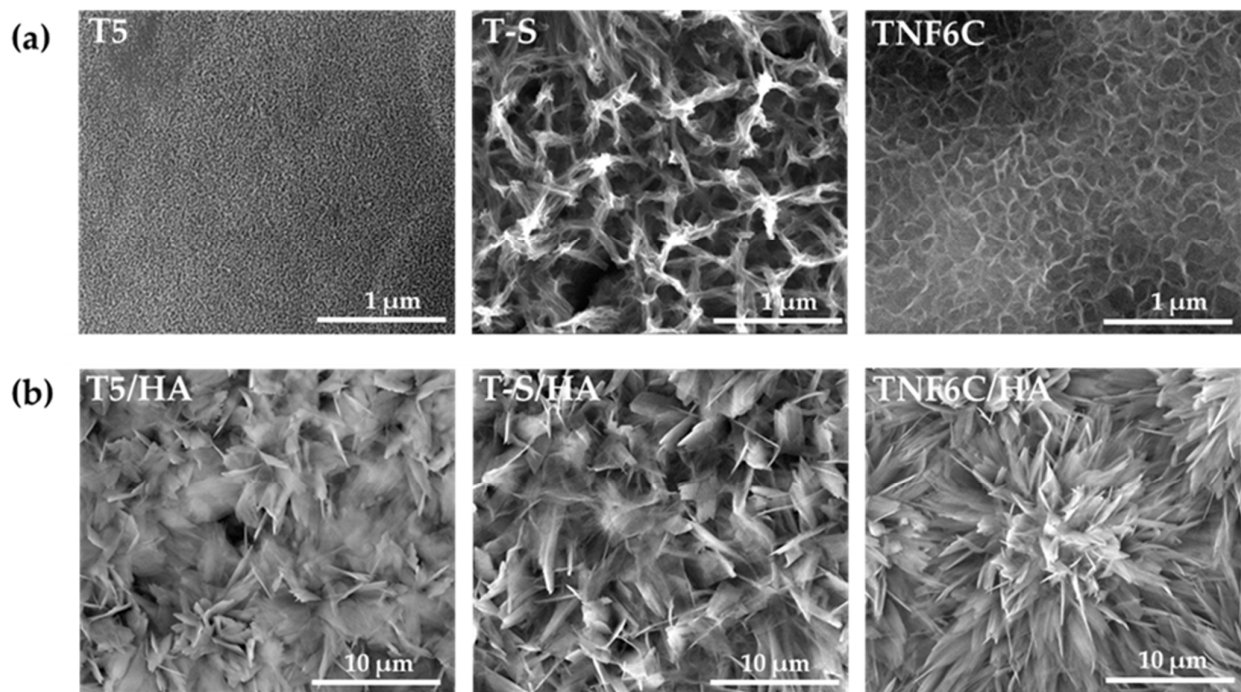


Figure 2. SEM images of the surface morphology of the T5, T-S, TNF6C (a), T5/HA, T-S/HA, and TNF6C/HA (b) samples.

EDS spectra of T5/HA, T-S/HA and TNF6C/HA systems are shown in Figures 3a–c. The energy-dispersive X-ray analysis confirmed the presence of Ca and P in the produced systems with a hydroxyapatite layer.

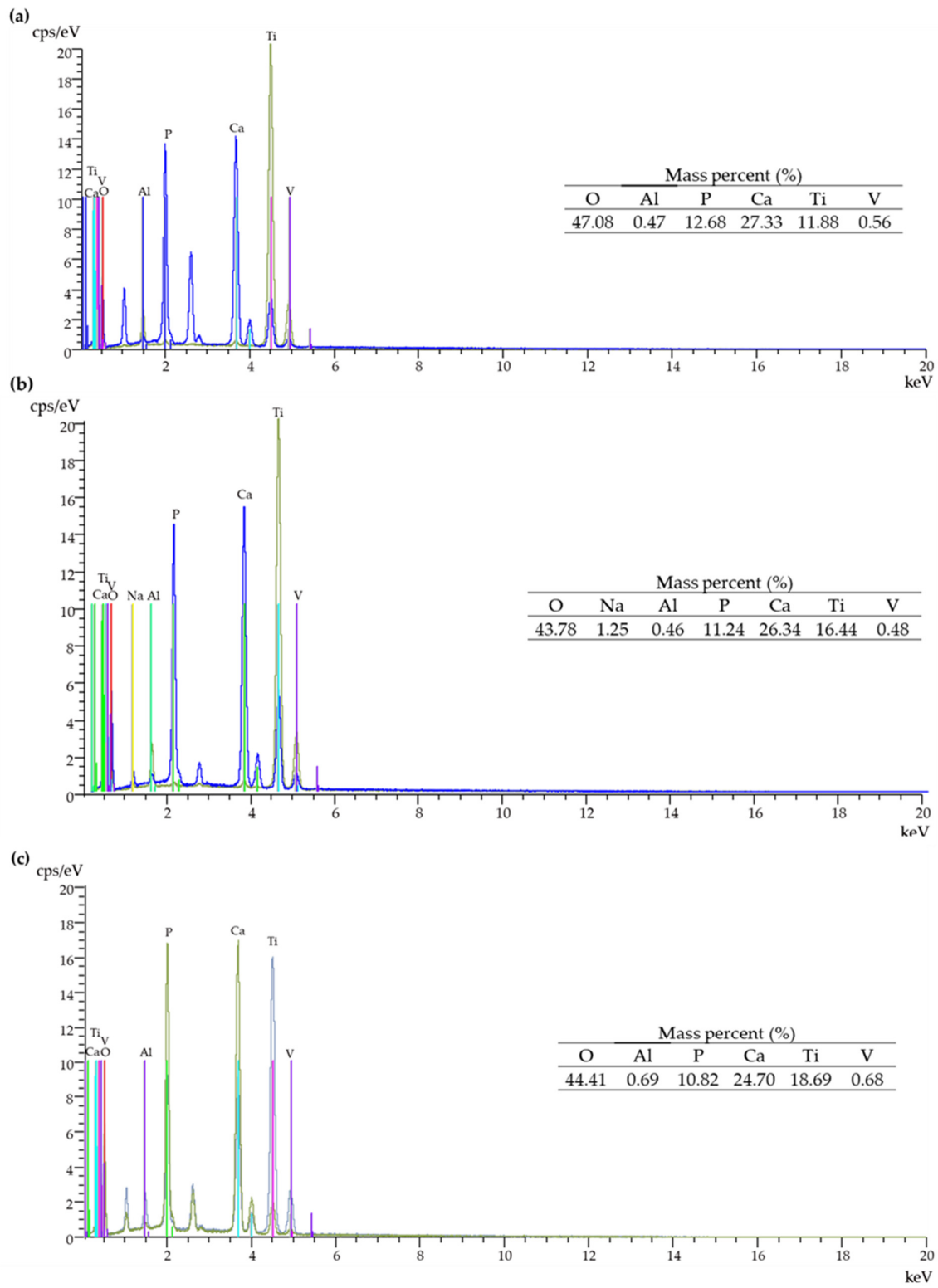


Figure 3. EDS spectra and quantitative data of the T5/HA (a), T-S/HA (b), and TNF6C/HA (c) systems.

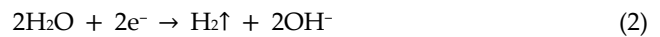
3.2. Electrochemical Cathodic Deposition of HA

The electrochemical process of cathodic electrodeposition uses two electrodes immersed in an aqueous solution containing calcium and phosphate ions (in our case: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ and $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$). The electrodes are connected to an electrical generator. The nucleation of the hydroxyapatite layer on the surface-modified Ti6Al4V alloy (cathode) can be described by a combination of several reactions (Equations (1)–(18)) [75–80].

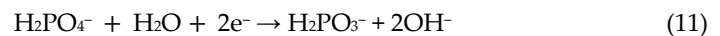
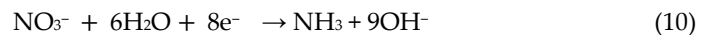
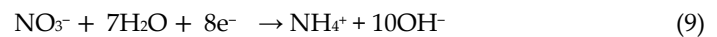
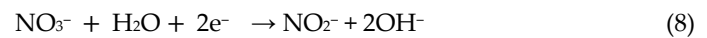
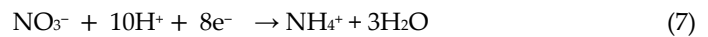
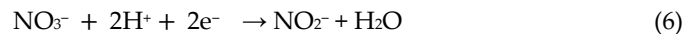
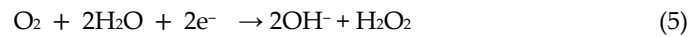
Water, a solution solvent, is involved in the main redox reactions. The anodic oxidation reaction is:



At the same time, with the use of the electric field, water at the cathode surface is reduced to hydrogen gas and hydroxide ions (Equation (2)). Proton reduction can also occur at the cathode in acidic medium (Equation (3)). The local pH within the diffusion layer is mainly increased by the following two reactions in Equations (2) and (3).



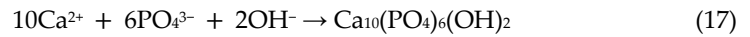
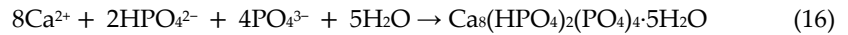
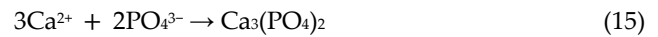
Nevertheless, there are also other cathodic reactions (Equations (4)–(11)) that affect the local increase in the pH value (due to hydroxide generation) of the solution at the cathode–electrolyte interface. Due to the small amounts of O_2 , NO_3^- and H_2PO_4^- compared to the amount of water, reactions 4–11 are not major.



Simultaneously, as the pH changes (between 7.2 and 12.3) in the cathode area, the concentration of hydrogen phosphate ions increases (dissociation of the dihydrogen phosphate ions (Equation (12)). When the pH is equal to or greater than 12.3, phosphate ions predominate (Equation (13)). Local ionic supersaturation occurs, resulting in the precipitation of a calcium phosphate layer.



Hydroxide groups on the Ti6Al4V surface promote the chemical bonding with calcium and phosphate ions to form the HA layer on the metal surface. Calcium ions may react with hydrogen phosphate ions and phosphate ions to various degrees: e.g., dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) (Equation (14)), β -tricalcium phosphate (β -TCP) when $T > 800 \text{ }^\circ\text{C}$ (Equation (15)), octacalcium phosphate (OCP) (Equation (16)), or hydroxyapatite (HA) (Equation (17)).



The application of alkaline treatment (NaOH) can cause the conversion of other forms of calcium phosphate to HA and an increase in crystallinity (e.g., Equation (18)) [75–80].



The higher adhesion of hydroxyapatite (HA) to the TiO₂ nanocoatings (IL) than to the titanium alloy may be due to the high surface area and physical locking between the HA layer and the intermediate layer [81,82].

3.3. Apatite-Forming Ability

During immersion in the SBF solution, the T5/HA, T-S/HA, and TNF6C/HA systems promoted apatite deposition within a few days. Figure 4 shows the SEM images of the surface morphology changes of specimens after different periods of immersion in SBF (1–4 weeks). Once the samples were removed from the SBF solution and dried, they were weighed and the percentage weight gain was calculated (Figure 5). On the surface of the T5 and TNF6C control specimens, no apatite formation was observed, while apatite formation was reported on the alkali-sodium-modified T-S surfaces, as described in our earlier publication [43]. It was noted that the hydroxyapatite layer produced by the cathodic electrode process, which was deposited on the surface of the intermediates coatings (T5, T-S, and TNF6C) after immersion in the SBF solution, grew at a very fast rate. The thickness of the apatite layer increased with a longer immersion time of the T5/HA, T-S/HA, and TNF6C/HA double layer in SBF solution.

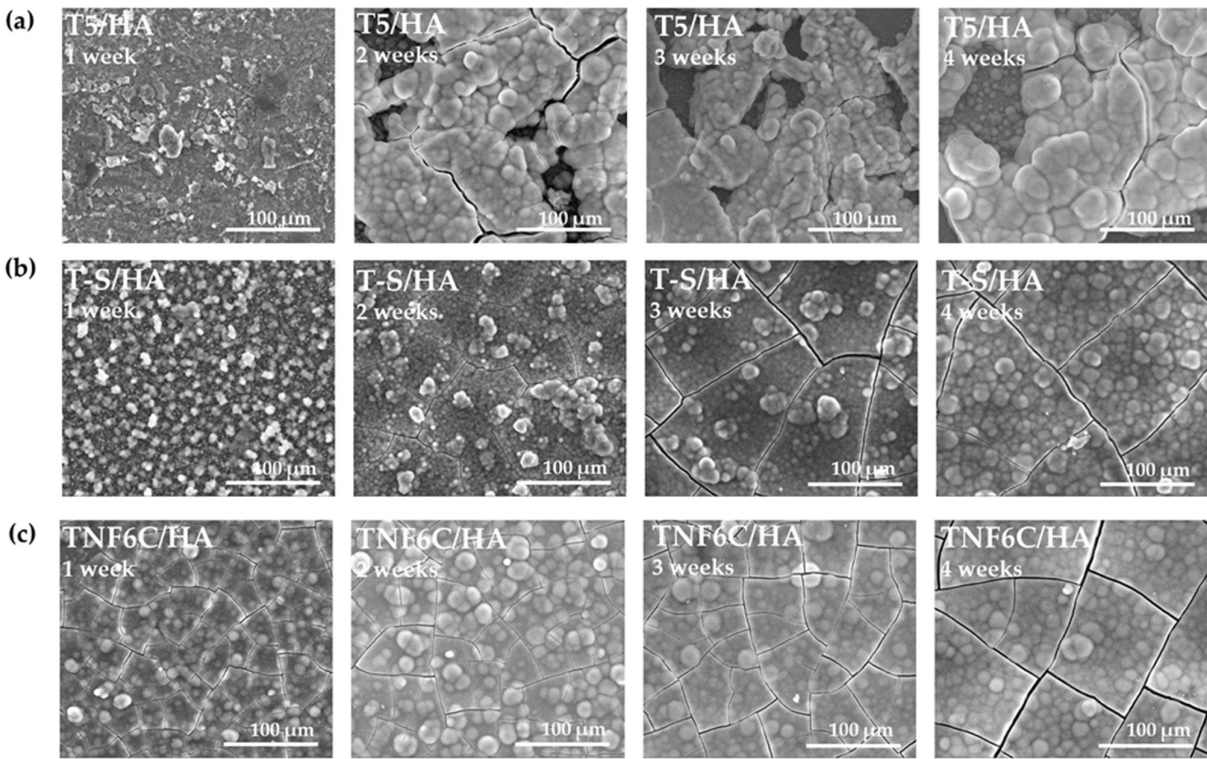


Figure 4. SEM images of the (a) T5/HA, (b) T-S/HA, and (c) TNF6C/HA samples after immersing in SBF for 1–4 weeks.

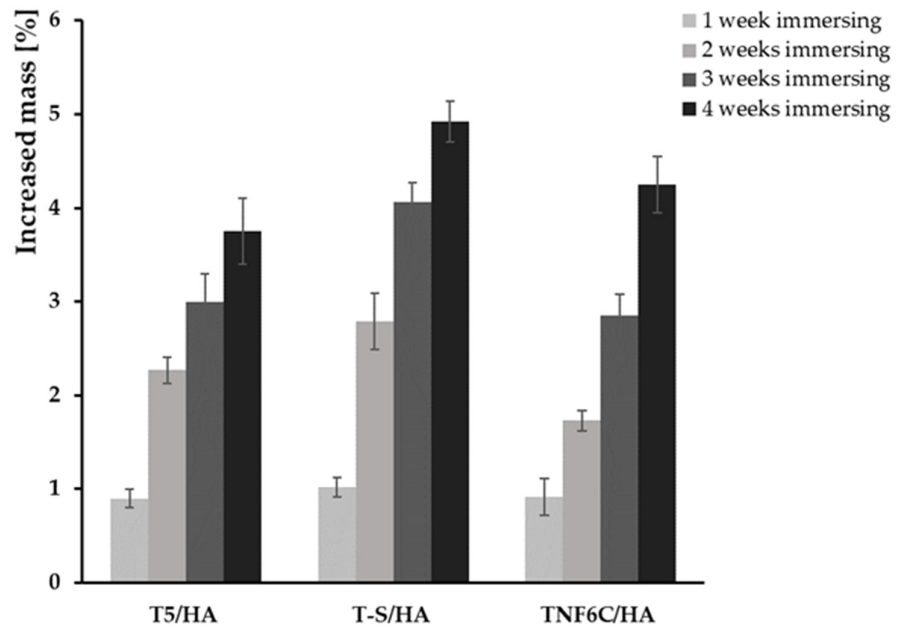


Figure 5. Weight gain for the samples with hydroxyapatite layer after immersing in SBF for 1–4 weeks.

Figure 6 shows the X-ray diffraction patterns (XRD) of the T5/HA, T-S/HA, and TNF6C/HA samples after immersion in SBF for four weeks. The analysis of these data confirmed that the HA-deposited samples exhibited apatite-forming ability in SBF

solution. The positions of the HA peaks marked on the spectra are in accordance with the specifications in JCPDS no. 285 09-0432.

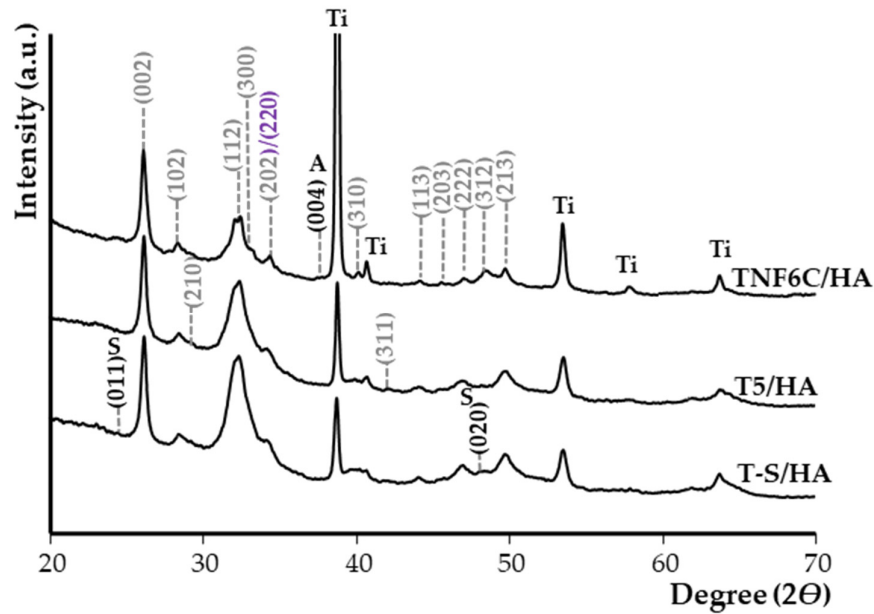


Figure 6. XRD patterns of T-S/HA, T5/HA and TNF6C/HA samples after immersing in SBF for four weeks. (hkl) for CaTiO₃ are marked in violet. S is assigned to the sodium titanate. Ti is assigned to the Ti6Al4V substrate (TiO₂ anatase phase (A)).

The evaluation of the Ca/P molar ratio of the samples was carried out by EDS analysis (Table 1). During the first week of immersion of the samples in the SBF solution, we noted slight changes in the Ca/P molar ratio compared to the ratio before immersion for the samples T5/HA, T-S/HA, and TNF6C/HA. During the second and third weeks of immersion in SBF solution, the Ca/P ratio was close (for T5/HA, and TNF6C/HA samples) or higher (T-S/HA) than stoichiometric. After four weeks of sample immersion in SBF solution, the Ca/P molar ratios of 1.83 for T-S/HA and TNF6C/HA and 1.87 for T5/HA were detected.

Table 1. Ca/P ratios obtained from EDS measurements for the samples with hydroxyapatite layer before and after immersing in SBF for 1–4 weeks.

Sample	Ca/P (Mole Ratio) of HA Layer				
	Time: 0	Time: 1 week	Time: 2 weeks	Time: 3 weeks	Time: 4 weeks
T5/HA	1.58	1.54	1.63	1.68	1.87
T-S/HA	1.69	1.56	1.61	1.80	1.83
TNF6C/HA	1.76	1.66	1.57	1.56	1.83

3.4. The Viability of Cells Cultured on the Scaffolds

The effect of the hydroxyapatite layer (HA) present on the surface of three different nanocoatings (T5/HA, T-S/HA and TNF6C/HA) on L929, MG-63 and ADSC cell viability was assessed after one, five and seven days using the MTT assay. The results were compared with the cell viability estimated for the cells cultured on the specimens without an HA layer (Figure 7). It was observed that with an increase in culture time, a higher or comparable number of both L929 and MG-63 cells grew on the scaffolds with or without HA. This increase in viable cell number was especially observed between one and five

days of culture (Figure 7A and Figure 7B, respectively). In the case of ADSCs, the increased cell proliferation rate over time was also noticed for almost all the samples, except for the TNF6C/HA scaffolds, where the number of viable cells after five and seven days was lower compared with one-day incubation. Similarly, on T-S/HA samples the measured values of absorbance did not change over time (Figure 7C). Generally, the nanocoatings with the HA layer induced a higher or comparable level of L929 fibroblast viability in comparison with the samples without HA. A similar effect was also noticed for the MG-63 osteoblasts cultured on the T5 and T5/HA scaffolds. In contrast, the covering of the T-S and TNF6C nanocoatings with HA provoked a decrease in MG-63 cell viability compared with the samples without HA, especially after five and seven days. This effect was also noticed for ADSCs cultivated on the surface of the T5/HA and TNF6C/HA scaffolds.

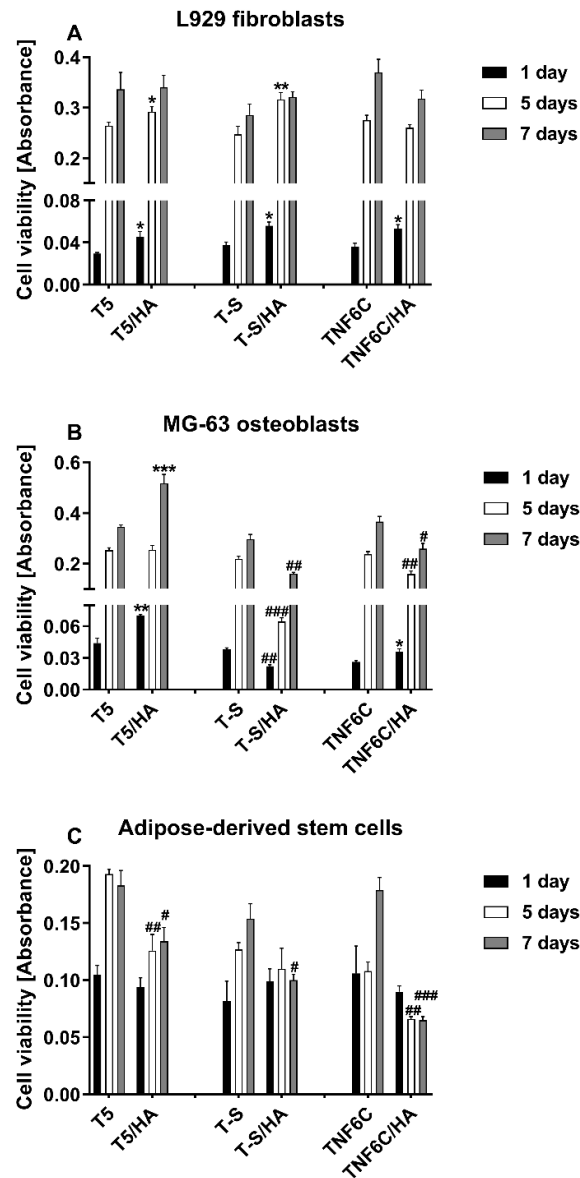


Figure 7. The viability of L929 fibroblasts (A), MG-63 osteoblasts (B) and adipose-derived stem cells (C) cultured on the scaffolds (nanoporous TiO₂ (T5), titanate (T-S) and nanofibrous TiO₂ (TNF6C)) coated or not with a hydroxyapatite layer (HA) evaluated using MTT assays after one, five and

seven days. The presented data are from four independent experiments. Asterisks and hash marks show statistical differences between the scaffolds coated with HA and the samples without HA at the appropriate time. Asterisks show differences when cell viability measured for the samples with HA was greater compared with the specimens without HA (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). Hash marks denote differences when absorbance values noticed for the scaffolds with HA was lower than the samples not covered with HA (### $p < 0.001$, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$).

3.5. Cell Proliferation Rate Observed by Scanning Electron Microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) imaging was harnessed to evaluate the cell morphology and the level of cell proliferation after one and five days. Comparative SEM micrographs of L929 fibroblasts (Figure 8), MG-63 osteoblasts (Figure 9) and ADSCs (Figure 10) were presented for the specimens coated with HA that induced the best and the worst cell viability, taking into consideration all three tested cell lines. These data supported the MTT results and indicated the increase in the cell proliferation level over time observed for L929 cells (Figures 8A,B) and MG-63 cells (Figures 9A,B) growing on the T5/HA specimens. In the case of ADSC cells, many of the cells attached to the surface of the T5/HA samples were already noticed after one day of incubation (Figure 10A). Moreover, the ADSCs grown on these specimens that were integrated with the support produced a huge amount of extracellular matrix that coated almost the entire surface of the samples after five days (Figure 10 B).

It must be mentioned that the analysis of SEM micrographs was difficult because of the surface morphology, mainly in the case of the TNF6C/HA scaffolds. Nevertheless, a number of L929 and MG-63 cells grown on these specimens increased over time (Figures 8C,D and Figures 9C,D, respectively). On the contrary, this effect was not noticed for ADSCs (Figures 10C,D).

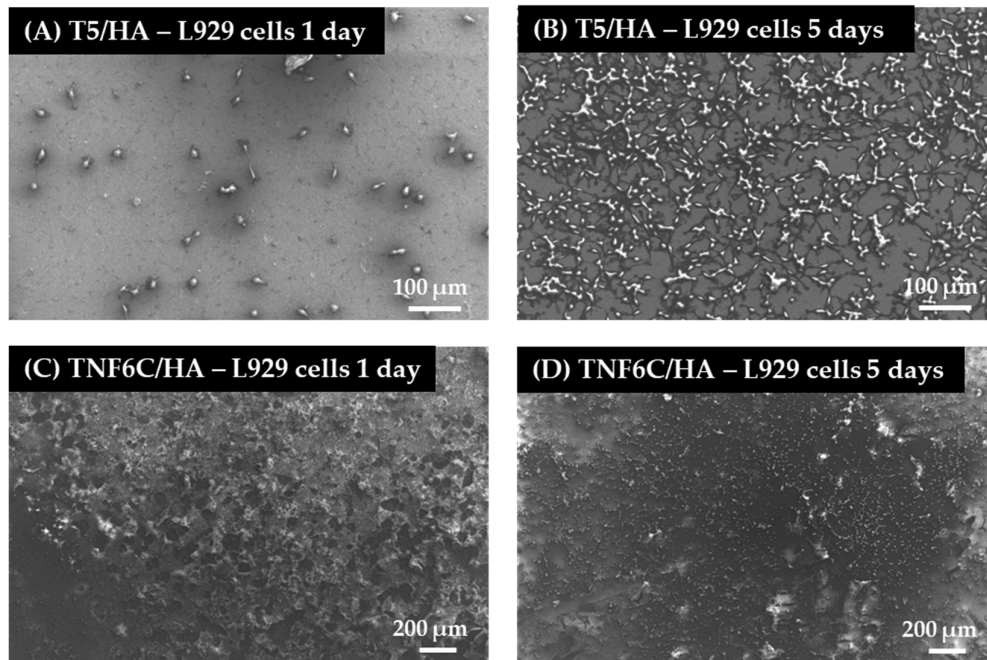


Figure 8. SEM images of L929 fibroblasts growing on the scaffolds coated with hydroxyapatite layer (HA) (nanoporous (T5/HA) and nanofibrous TiO₂ (TNF6C/HA) for one and five days. The type of specimens and culture time are indicated in the figures.

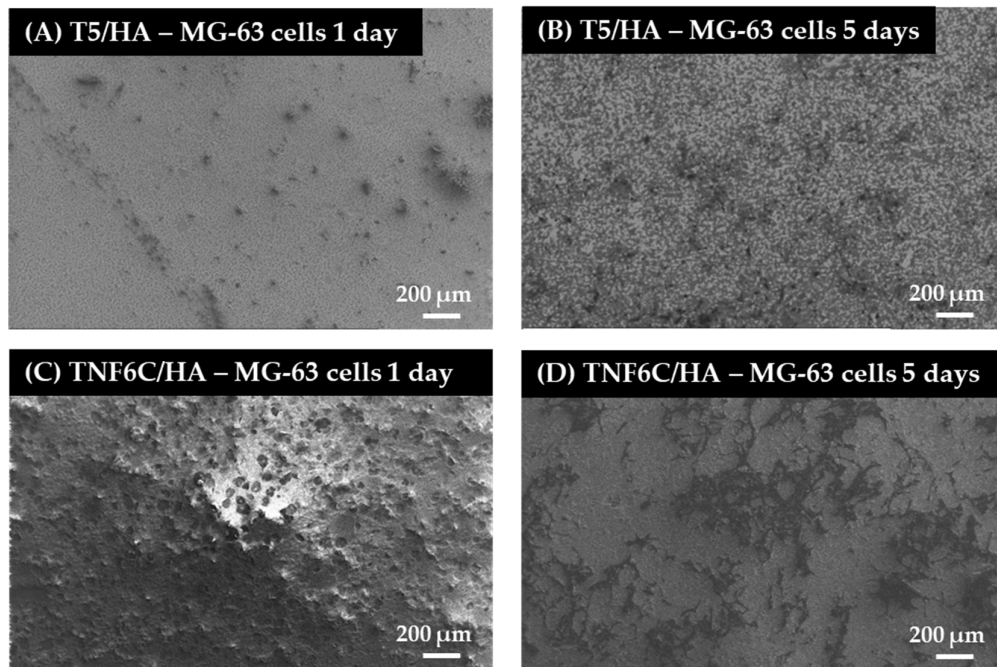


Figure 9. Micrographs from SEM presenting MG-63 osteoblasts cultured on the nanoporous and nanofibrous TiO₂ scaffolds coated with hydroxyapatite layer (T5/HA and TNF6C/HA, respectively). The type of samples and culture time are described in the figures.

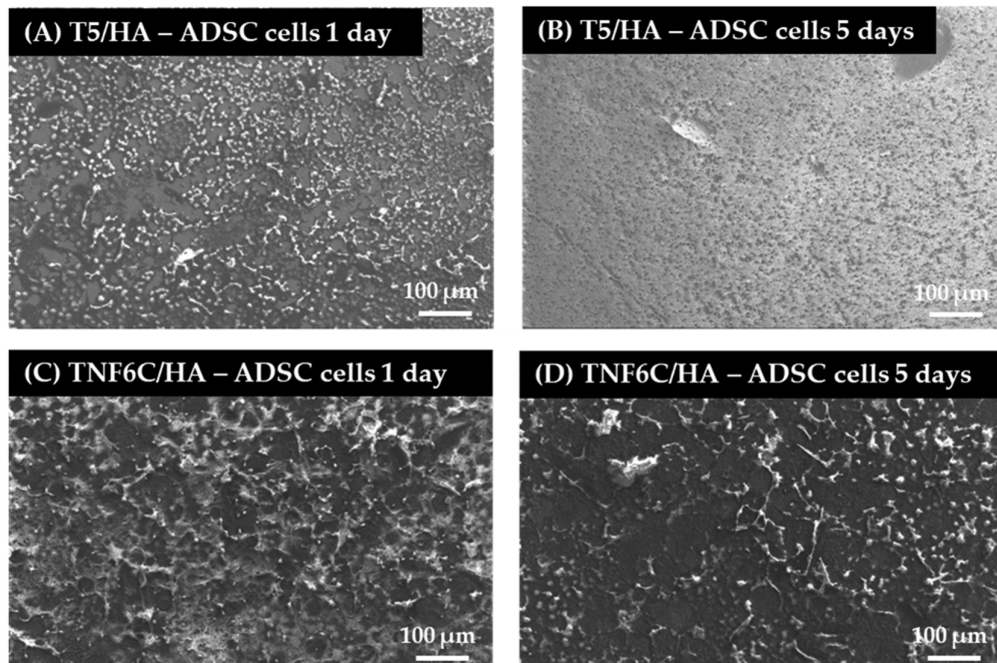


Figure 10. SEM micrographs that present adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) growing on the surface of the nanoporous and nanofibrous TiO₂ specimens coated with hydroxyapatite layer (T5/HA and TNF6C/HA, respectively). The type of specimens and culture time are indicated in the figures.

3.6. Osteogenic Potential of Cells Cultured on Different Specimens

The relatively low cell proliferation rate on the nanofibrous scaffold with a hydroxyapatite coating (TNF6C/HA) could be explained by the osteogenic-differentiation-supportive properties of this specimen. Therefore, we compared the two parameters of effective osteogenesis/calcium deposit formation (Figure 11) and alkaline phosphatase activity (Figure 12).

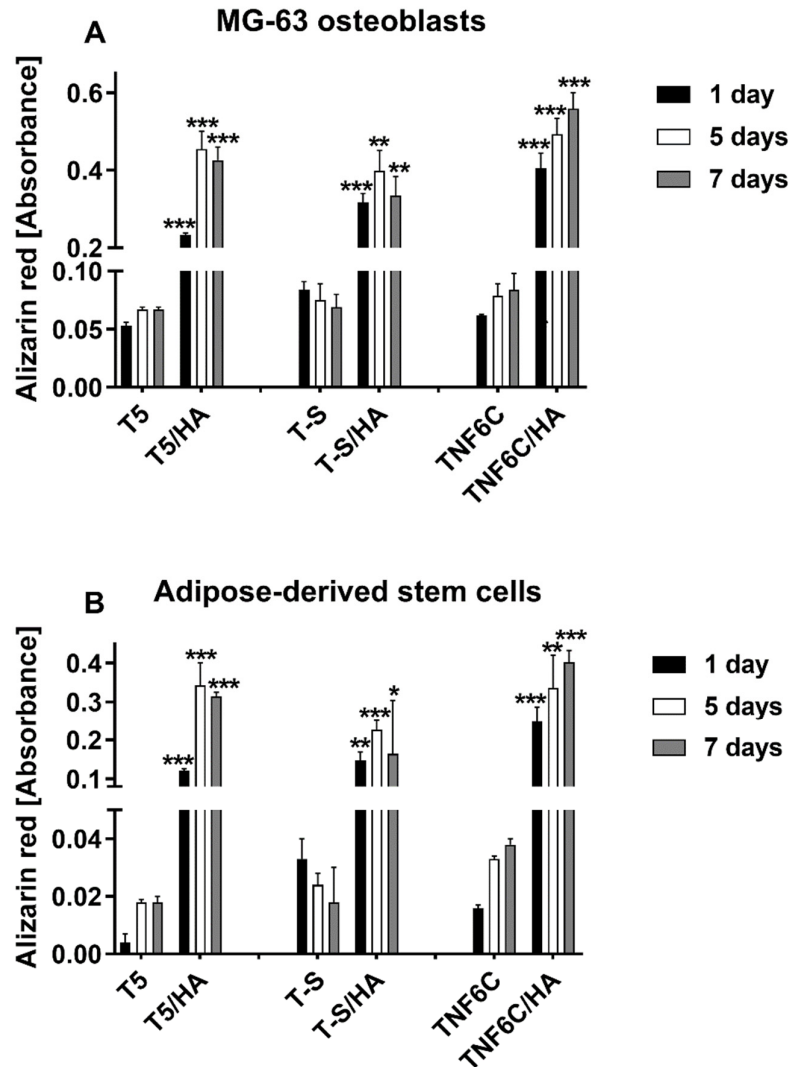


Figure 11. Determination of calcium deposit formation in the extracellular matrix of MG-63 osteoblasts (A) and human adipose-derived mesenchymal stem cells (B) evaluated after one, five and seven days using Alizarin Red S staining. Asterisks denote differences between Alizarin staining determined for the samples with HA and without HA (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

The extracellular calcium seemed to be deposited in similar quantities in the case of both MG-63 osteoblasts and ADSCs in a time-dependent manner. Additionally, not surprisingly, all the HA-coated specimens were considerably beneficial for the mineralization process.

Some differences in the osteogenic potential of cultured cells can be concluded from the alkaline phosphatase activity determination (Figure 12).

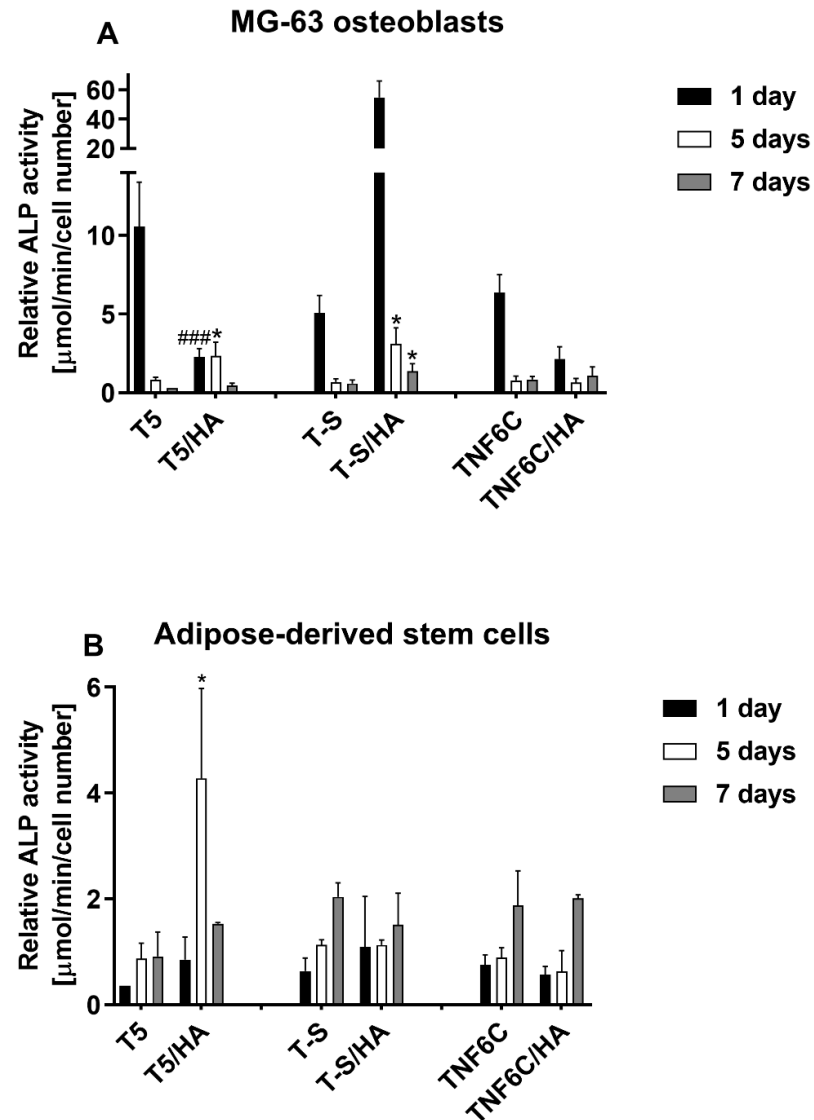


Figure 12. Determination of ALP activity in MG-63 osteoblasts (A) and adipose-derived mesenchymal stem cells (B) evaluated after one, five and seven days of culture on selected scaffolds. Asterisks and hash marks show statistical differences between the scaffolds with HA and without HA at the appropriate culture time. Asterisks present differences when ALP activity measured for the samples with HA was higher compared with the specimens without HA ($* p < 0.05$). Hash marks indicate differences when ALP activity noticed for the scaffolds with HA was lower than the samples without HA ($### p < 0.001$).

The influence of the hydroxyapatite layer (HA) on endogenous ALP activity in MG-63 cells led to increased activity only in the case of the T-S/HA surface. Nevertheless, the difference between the T-S specimens with and without HA was considerable after 24h in culture and then decreased. In contrast, human adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) exhibited increased ALP activity when grown on the surface of the nanoporous T5/HA layer. These differences indicate that both the chemical nature and nanostructural properties can influence the osteogenic differentiation process.

3.7. Antimicrobial Activity

Biocidal activity against the tested strains was not observed for analyzed specimens with HA layers when compared to the untreated microbial inocula (Table 2).

Table 2. Antimicrobial activity of selected specimens.

Material	Microorganisms				
	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
	Reduction index (R)				
T5/HA	0.34 *	0.38 *	0.04	1.73	0.08
T-S/HA	0.14 *	0.25 *	1.28	1.90	0.25
TNF6C/HA	0.43 *	0.37 *	0.06	0.18 *	0.05

Biocidal activity of specimen is observed when $R \geq 2$ (>99%). $R = U_t - A_t$, where U_t is the common logarithm of the number of bacteria in the untreated microbial suspension and A_t is the common logarithm of the number of bacteria in the treated microbial suspension. * no significant increase in microbial growth (<10%).

4. Discussion

The main direction in which our research tends is the production of a highly biocompatible system with mechanical properties like cortical bone, which can be applied to the design and fabrication of implants. In the course of previous work, we proved that the morphology and structure of interlayers (ILs) have a significant impact on the morphology and mechanical properties of the deposited hydroxyapatite (HA) layers [30]. In this paper, we show that differences in biological activity also depend on the type of Ti6Al4V/IL/HA systems.

The physicochemical properties of the biomaterial surface significantly impact the ability to spontaneously form apatite through the substrate in simulated body fluid (SBF) [43,83]. Our study successfully deposited apatite on the surface of all the Ti6Al4V/IL/HA systems after SBF incubation for 1–4 weeks. The XRD spectra clearly showed the presence of the peaks indicative of hydroxyapatite (HA) constituents. The SEM analysis showed that the HA-layered samples (T5/HA, T-S/HA, TNF6C/HA) were completely covered by the newly formed apatite layers after the first week of immersion in SBF solution. There were a few cracks on the surface of the formed apatite layers, which were most probably due to the release of internal stresses during the drying process [84].

All the chemical and structural properties of the studied materials were reflected in their ability to create a biocompatible surface supporting cell growth. The T5/HA, which is nanoporous, with the highest content of Ca and P in the HA layer, seemed to be most promising in bone tissue regeneration. It is non-toxic and supports cell adhesion and proliferation. This surface allowed for the highest proliferation rates of L929 fibroblasts, MG-63 osteoblasts and mesenchymal stem cells when compared with all the HA-modified samples. The T5/HA also induced the effective deposition of calcium in both osteoblast-like MG-63 cells and adipose-derived mesenchymal stem cells. This process suggests the initiation of osteogenic differentiation in ADSCs and continued osteogenic properties in MG-63. The issue of ALP activity is slightly different; the enzyme activity decreased in MG-63 but increased in ADSCs grown on the T5/HA substrate. These differences reflect the cell properties: MG-63 cells are differentiated cells expressing different markers of osteoblasts [85], while ADSCs are undifferentiated, multipotent cells that require specific extracellular signals to start the differentiation process [86]. As ALP activity is considered the early marker of osteogenic commitment [87], it can be concluded that its increase in ADSCs allows for efficient osteogenesis together with satisfactory cell survival and proliferative potential.

TNF6C/HA with its nanofibrous structure was also biocompatible for L929 and MG-63 cells but decreased the ADSC proliferation. On the other hand, it allowed for the

formation of calcium deposits like the other tested specimens, decreased the ALP activity in MG-63 cells, and did not influence the enzymatic activity in ADSCs cells. One can conclude that this surface supports the growth of adjacent cells and stops the proliferation of ADSCs but maintains the osteogenic differentiation efficiency at a similar level to the other HA-modified surfaces. These properties were reported to improve the osseointegration of implanted materials and promote regeneration processes [88].

Developments in the design of bioactive materials, which can provide physical and chemical signals for different cells and regulate their fate, require extensive studies on the relationship between the properties of materials and the fate of cells [89]. Improving both the osseointegration ability and mechanical properties of titanium implants continues to be a challenge in implantology. As a result, there is significant interest in developing technologies that modify the titanium surface. Nevertheless, the implant surface is also susceptible to infection. Infections can be the cause of implant removal or prolonged patient recovery. The important point is that systems with an antimicrobial coating do not impede tissue integration into the implant [90–93]. In our study, the produced systems with a hydroxyapatite layer (T5/HA, T-S/HA, TNF6C/HA) did not show antimicrobial properties. This result is in line with previously published ones [94–97] which showed that hydroxyapatite alone or as a layer on titanium specimens did not reveal antimicrobial activity. It in particular showed high biointegration properties [98–103]. However, the modifications of Ti/HA layers with antibacterial compounds, e.g., chitosan silver nanoparticles, manganese, strontium or yttrium, may significantly improve such properties [31,94,95,104–108]. Nevertheless, antibacterial coatings are still not well understood *in vivo*. It should be noted that the antibacterial ability of coatings will gradually weaken over time, and the release of metal ions from their surface may affect the osseointegration efficiency of titanium implants and have a significant impact on their cytotoxicity. So far, the problem of emerging infections is solved with appropriately selected antibiotics [92,93,109].

5. Conclusions

Among the previously tested systems, the Ti6Al4V/T5/HA shows the most significant potential for application in the construction of a new generation of implants. The fabricated system (Ti6Al4V/T5/HA) with a nanoporous interlayer, connecting the titanium alloy substrate to the hydroxyapatite layer, shows excellent mechanical properties (adhesion force = 103.11 ± 10.07 mN, hardness = 0.30 ± 0.10 GPa and Young's Modulus = 35.58 ± 7.41 GPa) [30] and promising bioactivity. It mimics the physiological environment of bone tissue, enhances biointegration, and supports the osteogenic potential of MG-63 cells and ADSCs. Thus, it deserves further investigations focused on acquiring good antimicrobial properties in such a way that the desired balance between the implant's immune capacity, biointegration, and mechanical properties is still maintained.

Author Contributions: Conceptualization, M.E., P.P. and A.R.; methodology, M.E., K.R., T.J., P.G.; formal analysis, M.E., P.P., A.R, K.R., T.J., P.G.; investigation, M.E., N.F., T.J., P.G., G.T.; resources, M.E.; data curation, M.E.; writing—original draft preparation, M.E., K.R., T.J.; writing—review and editing, M.E., P.P., A.R, K.R., T.J., P.G.; supervision, P.P.; project administration, M.E.; funding acquisition, M.E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Research Nicolaus Copernicus University in Toruń—Excellence Initiative, Grants4NCUStudents number 2403. The Ministry of Science and Higher Education and Nano-implant Ltd. also funded this research, within Implementation PhD studies of Michalina Ehlert. The APC was waived by MDPI.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Jain, P.; Kathuria, H.; Dubey, N. Advances in 3D Bioprinting of Tissues/Organs for Regenerative Medicine and in-Vitro Models. *Biomaterials* **2022**, *287*, 121639. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121639>.
2. Chan, B.P.; Leong, K.W. Scaffolding in Tissue Engineering: General Approaches and Tissue-Specific Considerations. *Eur. Spine J.* **2008**, *17*, 467–479. <https://doi.org/10.1007/s00586-008-0745-3>.
3. Olson, J.L.; Atala, A.; Yoo, J.J. Tissue Engineering: Current Strategies and Future Directions. *Chonnam Med. J.* **2011**, *47*, 1–13. <https://doi.org/10.4068/cmj.2011.47.1.1>.
4. Todros, S.; Todesco, M.; Bagnò, A. Biomaterials and Their Biomedical Applications: From Replacement to Regeneration. *Processes* **2021**, *9*, 1949. <https://doi.org/10.3390/pr9111949>.
5. Apablaza, J.A.; Días, F.J.; Sánchez, K.G.; Navarro, P.; Venegas, C.; Fuentes, R. Analysis of the Chemical Composition and Morphological Characterization of Tissue Osseointegrated to a Dental Implant after 5 Years of Function. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8882. <https://doi.org/10.3390/ijms23168882>.
6. Aminov, L.; Sindilar, E.V.; Pasca, A.S.; Antohi, C.; Decolli, Y.; Stamatin, O.; Costin, L.I.; Bulancea, B.P.; Francu, L.; Mihalas, E.; et al. In Vivo Evaluation of Biocompatibility of Three Biomaterials Used in Endodontics for Prosthetic Purposes in Complex Rehabilitation Treatment. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 6519. <https://doi.org/10.3390/app11146519>.
7. Rubežić, M.; Krstić, A.; Stanković, H.; Ljupković, R.; Randelović, M.; Zarubica, A. Different Types of Biomaterials: Structure and Application: A Short Review. *Adv. Technol.* **2020**, *9*, 69–79. <https://doi.org/10.5937/savteh2001069R>.
8. Cacopardo, L. Chapter 18-Biomaterials and Biocompatibility. In *Human Orthopaedic Biomechanics*; Innocenti, B., Galbusera, F., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2022; pp. 341–359, ISBN 978-0-12-824481-4.
9. Matusiewicz, H. Potential Release of in Vivo Trace Metals from Metallic Medical Implants in the Human Body: From Ions to Nanoparticles—A Systematic Analytical Review. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 2379–2403. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.027>.
10. Mantripragada, V.P.; Lecka-Czernik, B.; Ebraheim, N.A.; Jayasuriya, A.C. An Overview of Recent Advances in Designing Orthopedic and Craniofacial Implants. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2013**, *101*, 3349–3364. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34605>.
11. Kaur, M.; Singh, K. Review on Titanium and Titanium Based Alloys as Biomaterials for Orthopaedic Applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *102*, 844–862. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.064>.
12. Warburton, A.; Girdler, S.J.; Mikhail, C.M.; Ahn, A.; Cho, S.K. Biomaterials in Spinal Implants: A Review. *Neurospine* **2020**, *17*, 101–110. <https://doi.org/10.14245/ns.1938296.148>.
13. Bartolomeu, F.; Dourado, N.; Pereira, F.; Alves, N.; Miranda, G.; Silva, F.S. Additive Manufactured Porous Biomaterials Targeting Orthopedic Implants: A Suitable Combination of Mechanical, Physical and Topological Properties. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *107*, 110342. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110342>.
14. Chen, F.-M.; Liu, X. Advancing Biomaterials of Human Origin for Tissue Engineering. *Prog. Polym. Sci.* **2016**, *53*, 86–168. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004>.
15. Gupta, S.; Gupta, H.; Tandan, A. Technical Complications of Implant—Causes and Management: A Comprehensive Review. *Natl. J. Maxillofac. Surg.* **2015**, *6*, 3–8. <https://doi.org/10.4103/0975-5950.168233>.
16. Apostu, D.; Lucaciu, O.; Berce, C.; Lucaciu, D.; Cosma, D. Current Methods of Preventing Aseptic Loosening and Improving Osseointegration of Titanium Implants in Cementless Total Hip Arthroplasty: A Review. *J. Int. Med. Res.* **2018**, *46*, 2104–2119. <https://doi.org/10.1177/0300060517732697>.
17. Shayesteh Moghaddam, N.; Taheri Andani, M.; Amerinatanzi, A.; Haberland, C.; Huff, S.; Miller, M.; Elahinia, M.; Dean, D. Metals for Bone Implants: Safety, Design, and Efficacy. *Bio-manuf. Rev.* **2016**, *1*, 1. <https://doi.org/10.1007/s40898-016-0001-2>.
18. Radtke, A.; Ehlert, M.; Jędrzejewski, T.; Bartmański, M. The Morphology, Structure, Mechanical Properties and Biocompatibility of Nanotubular Titania Coatings before and after Autoclaving Process. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 272. <https://doi.org/10.3390/jcm8020272>.
19. Hofmann, S.; Stok, K.S.; Kohler, T.; Meinel, A.J.; Müller, R. Effect of Sterilization on Structural and Material Properties of 3-D Silk Fibroin Scaffolds. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.08.035>.
20. Serro, A.P.; Saramago, B. Influence of Sterilization on the Mineralization of Titanium Implants Induced by Incubation in Various Biological Model Fluids. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4749–4760. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00372-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00372-7).
21. Guo, T.; Oztug, N.A.K.; Han, P.; Ivanovski, S.; Gulati, K. Influence of Sterilization on the Performance of Anodized Nanoporous Titanium Implants. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *130*, 112429. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112429>.
22. Yamanoglu, R.; Bahador, A.; Kondoh, K. Fabrication Methods of Porous Titanium Implants by Powder Metallurgy. *Trans. Indian Inst. Met.* **2021**, *74*, 2555–2567. <https://doi.org/10.1007/s12666-021-02332-4>.
23. Piszczek, P.; Radtke, A.; Ehlert, M.; Jędrzejewski, T.; Sznarkowska, A.; Sadowska, B.; Bartmański, M.; Erdoğan, Y.K.; Ercan, B.; Jędrzejczyk, W. Comprehensive Evaluation of the Biological Properties of Surface-Modified Titanium Alloy Implants. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 342. <https://doi.org/10.3390/jcm9020342>.
24. Radtke, A.; Grodzicka, M.; Ehlert, M.; Muzioł, T.M.; Szkodo, M.; Bartmański, M.; Piszczek, P. Studies on Silver Ions Releasing Processes and Mechanical Properties of Surface-Modified Titanium Alloy Implants. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3962. <https://doi.org/10.3390/ijms19123962>.

25. Chandra, P.; Yoo, J.J.; Lee, S.J. Chapter 13-Biomaterials in Regenerative Medicine: Challenges in Technology Transfer from Science to Process Development. In *Translational Regenerative Medicine*; Atala, A., Allickson, J.G., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2015; pp. 151–167, ISBN 978-0-12-410396-2.
26. Nouri, A.; Rohani Shirvan, A.; Li, Y.; Wen, C. Surface Modification of Additively Manufactured Metallic Biomaterials with Active Antipathogenic Properties. *Smart Mater. Manuf.* **2023**, *1*, 100001. <https://doi.org/10.1016/j.smmf.2022.100001>.
27. Kowalski, P.S.; Bhattacharya, C.; Afewerki, S.; Langer, R. Smart Biomaterials: Recent Advances and Future Directions. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4*, 3809–3817. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.8b00889>.
28. Przekora, A. Current Trends in Fabrication of Biomaterials for Bone and Cartilage Regeneration: Materials Modifications and Biophysical Stimulations. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 435. <https://doi.org/10.3390/ijms20020435>.
29. Ehlert, M.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Bartmański, M.; Radtke, A. Titania Nanofiber Scaffolds with Enhanced Biointegration Activity—Preliminary In Vitro Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5642. <https://doi.org/10.3390/ijms20225642>.
30. Ehlert, M.; Radtke, A.; Bartmański, M.; Piszczek, P. Evaluation of the Cathodic Electrodeposition Effectiveness of the Hydroxyapatite Layer Used in Surface Modification of Ti6Al4V-Based Biomaterials. *Materials* **2022**, *15*, 6925. <https://doi.org/10.3390/ma15196925>.
31. Huang, Y.; Zhang, X.; Zhang, H.; Qiao, H.; Zhang, X.; Jia, T.; Han, S.; Gao, Y.; Xiao, H.; Yang, H. Fabrication of Silver- and Strontium-Doped Hydroxyapatite/TiO₂ Nanotube Bilayer Coatings for Enhancing Bactericidal Effect and Osteoinductivity. *Ceram. Int.* **2017**, *43*, 992–1007. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.10.031>.
32. Huang, Y.; Hao, M.; Nian, X.; Qiao, H.; Zhang, X.; Zhang, X.; Song, G.; Guo, J.; Pang, X.; Zhang, H. Strontium and Copper Co-Substituted Hydroxyapatite-Based Coatings with Improved Antibacterial Activity and Cytocompatibility Fabricated by Electrodeposition. *Ceram. Int.* **2016**, *42*, 11876–11888. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.04.110>.
33. Cheng, H.; Xiong, W.; Fang, Z.; Guan, H.; Wu, W.; Li, Y.; Zhang, Y.; Alvarez, M.M.; Gao, B.; Huo, K.; et al. Strontium (Sr) and Silver (Ag) Loaded Nanotubular Structures with Combined Osteoinductive and Antimicrobial Activities. *Acta Biomater.* **2016**, *31*, 388–400. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.11.046>.
34. Su, Y.; Cockerill, I.; Wang, Y.; Qin, Y.-X.; Chang, L.; Zheng, Y.; Zhu, D. Zinc-Based Biomaterials for Regeneration and Therapy. *Trends Biotechnol.* **2019**, *37*, 428–441. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.009>.
35. Kazemi, M.; Ahangarani, S.; Esmailian, M.; Shanaghi, A. Investigation on the Corrosion Behavior and Biocompatibility of Ti-6Al-4V Implant Coated with HA/TiN Dual Layer for Medical Applications. *Surf. Coat. Technol.* **2020**, *397*, 126044. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2020.126044>.
36. Zhu, G.; Wang, G.; Jiao Li, J. Advances in Implant Surface Modifications to Improve Osseointegration. *Mater. Adv.* **2021**, *2*, 6901–6927. <https://doi.org/10.1039/D1MA00675D>.
37. Ren, B.; Wan, Y.; Liu, C.; Wang, H.; Yu, M.; Zhang, X.; Huang, Y. Improved Osseointegration of 3D Printed Ti-6Al-4V Implant with a Hierarchical Micro/Nano Surface Topography: An in Vitro and in Vivo Study. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *118*, 111505. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111505>.
38. Radtke, A.; Ehlert, M.; Jędrzejewski, T.; Sadowska, B.; Więckowska-Szakiel, M.; Holopainen, J.; Ritala, M.; Leskelä, M.; Bartmański, M.; Szkodo, M.; et al. Titania Nanotubes/Hydroxyapatite Nanocomposites Produced with the Use of the Atomic Layer Deposition Technique: Estimation of Bioactivity and Nanomechanical Properties. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 123. <https://doi.org/10.3390/nano9010123>.
39. Koju, N.; Niraula, S.; Fotovvati, B. Additively Manufactured Porous Ti6Al4V for Bone Implants: A Review. *Metals* **2022**, *12*, 687. <https://doi.org/10.3390/met12040687>.
40. Brizuela, A.; Herrero-Climent, M.; Rios-Carrasco, E.; Rios-Santos, J.; Pérez, R.; Manero, J.; Gil Mur, J. Influence of the Elastic Modulus on the Osseointegration of Dental Implants. *Materials* **2019**, *12*, 980. <https://doi.org/10.3390/ma12060980>.
41. Bittredge, O.; Hassanin, H.; El-Sayed, M.A.; Eldessouky, H.M.; Alsaleh, N.A.; Alrasheedi, N.H.; Essa, K.; Ahmadein, M. Fabrication and Optimisation of Ti-6Al-4V Lattice-Structured Total Shoulder Implants Using Laser Additive Manufacturing. *Materials* **2022**, *15*, 3095. <https://doi.org/10.3390/ma15093095>.
42. Shibata, Y.; Tanimoto, Y.; Maruyama, N.; Nagakura, M. A Review of Improved Fixation Methods for Dental Implants. Part II: Biomechanical Integrity at Bone–Implant Interface. *J. Prosthodont. Res.* **2015**, *59*, 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.jpor.2015.01.003>.
43. Ehlert, M.; Radtke, A.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Piszczek, P. Assessment of Titanate Nanolayers in Terms of Their Physicochemical and Biological Properties. *Materials* **2021**, *14*, 806. <https://doi.org/10.3390/ma14040806>.
44. Ehlert, M.; Radtke, A.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Bartmański, M.; Piszczek, P. In Vitro Studies on Nanoporous, Nanotubular and Nanosponge-Like Titania Coatings, with the Use of Adipose-Derived Stem Cells. *Materials* **2020**, *13*, E1574. <https://doi.org/10.3390/ma13071574>.
45. Souza, J.C.M.; Sordi, M.B.; Kanazawa, M.; Ravindran, S.; Henriques, B.; Silva, F.S.; Aparicio, C.; Cooper, L.F. Nano-Scale Modification of Titanium Implant Surfaces to Enhance Osseointegration. *Acta Biomater.* **2019**, *94*, 112–131. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.045>.
46. Biswas, A.; Srikant, P.V.S.; Manna, I.; Chatterjee, U.K.; Dutta Majumdar, J. Chemical Oxidation of Ti-6Al-4V for Improved Wear and Corrosion Resistance. *Surf. Eng.* **2008**, *24*, 442–446. <https://doi.org/10.1179/174329408X286097>.
47. Carradd, A.; Perrin-Schmitt, F.; Le, Q.V.; Giraudel, M.; Fischer, C.; Koenig, G.; Jacomine, L.; Behr, L.; Chalom, A.; Fiette, L.; et al. Nanoporous Hydroxyapatite/Sodium Titanate Bilayer on Titanium Implants for Improved Osteointegration. *Dent. Mater.* **2017**, *33*, 321–332. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.12.013>.

48. Kokubo, T.; Yamaguchi, S. Novel Bioactive Titanate Layers Formed on Ti Metal and Its Alloys by Chemical Treatments. *Materials* **2009**, *3*, 48–63. <https://doi.org/10.3390/ma3010048>.
49. Gulati, K.; Maher, S.; Findlay, D.M.; Losic, D. Titania Nanotubes for Orchestrating Osteogenesis at the Bone–Implant Interface. *Nanomedicine* **2016**, *11*, 1847–1864. <https://doi.org/10.2217/nmm-2016-0169>.
50. Tan, A.W.; Pinguan-Murphy, B.; Ahmad, R.; Akbar, S.A. Review of Titania Nanotubes: Fabrication and Cellular Response. *Ceram. Int.* **2012**, *38*, 4421–4435. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.03.002>.
51. Safavi, M.S.; Walsh, F.C.; Surmeneva, M.A.; Surmenev, R.A.; Khalil-Allafi, J. Electrodeposited Hydroxyapatite-Based Biocoatings: Recent Progress and Future Challenges. *Coatings* **2021**, *11*, 110. <https://doi.org/10.3390/coatings11010110>.
52. Du, M.; Chen, J.; Liu, K.; Xing, H.; Song, C. Recent Advances in Biomedical Engineering of Nano-Hydroxyapatite Including Dentistry, Cancer Treatment and Bone Repair. *Compos. Part B Eng.* **2021**, *215*, 108790. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2021.108790>.
53. Fitzpatrick, V.; Martín-Moldes, Z.; Deck, A.; Torres-Sanchez, R.; Valat, A.; Cairns, D.; Li, C.; Kaplan, D.L. Functionalized 3D-Printed Silk-Hydroxyapatite Scaffolds for Enhanced Bone Regeneration with Innervation and Vascularization. *Biomaterials* **2021**, *276*, 120995. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120995>.
54. Farnoush, H.; Aghazadeh Mohandesi, J.; Haghshenas Fatmehsari, D.; Moztafzadeh, F. Modification of Electrophoretically Deposited Nano-Hydroxyapatite Coatings by Wire Brushing on Ti–6Al–4V Substrates. *Ceram. Int.* **2012**, *38*, 4885–4893. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.02.079>.
55. Shi, H.; Zhou, Z.; Li, W.; Fan, Y.; Li, Z.; Wei, J. Hydroxyapatite Based Materials for Bone Tissue Engineering: A Brief and Comprehensive Introduction. *Crystals* **2021**, *11*, 149. <https://doi.org/10.3390/cryst11020149>.
56. Thomas, K.A. Hydroxyapatite Coatings. *Orthopedics* **1994**, *17*, 267–278. <https://doi.org/10.3928/0147-7447-19940301-07>.
57. Wang, M.-C.; Chen, H.-T.; Shih, W.-J.; Chang, H.-F.; Hon, M.-H.; Hung, I.-M. Crystalline Size, Microstructure and Biocompatibility of Hydroxyapatite Nanopowders by Hydrolysis of Calcium Hydrogen Phosphate Dehydrate (DCPD). *Ceram. Int.* **2015**, *41*, 2999–3008. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.10.135>.
58. Vranceanu, D.M.; Ungureanu, E.; Ionescu, I.C.; Parau, A.C.; Kiss, A.E.; Vladescu, A.; Cotrut, C.M. Electrochemical Surface Biofunctionalization of Titanium through Growth of TiO₂ Nanotubes and Deposition of Zn Doped Hydroxyapatite. *Coatings* **2022**, *12*, 69. <https://doi.org/10.3390/coatings12010069>.
59. Stocco, T.D.; Rodrigues, P.J.G.; de Almeida Filho, M.A.; Lobo, A.O. Nanohydroxyapatite Electrodeposition onto Electrospun Nanofibers: Technique Overview and Tissue Engineering Applications. *Bioengineering* **2021**, *8*, 151. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8110151>.
60. Alonso-Goulart, V.; Carvalho, L.N.; Marinho, A.L.G.; de Oliveira Souza, B.L.; de Aquino Pinto Palis, G.; Lage, H.G.D.; de Lima, I.L.; Guimarães, L.D.; Peres, L.C.; Silveira, M.M.; et al. Biomaterials and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine: A Systematic Review. *Materials* **2021**, *14*, 4641. <https://doi.org/10.3390/ma14164641>.
61. Liu, T.; Xu, J.; Pan, X.; Ding, Z.; Xie, H.; Wang, X.; Xie, H. Advances of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells-Based Biomaterial Scaffolds for Oral and Maxillofacial Tissue Engineering. *Bioact. Mater.* **2021**, *6*, 2467–2478. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.01.015>.
62. Zhou, Y.; Yan, Z.; Zhang, H.; Lu, W.; Liu, S.; Huang, X.; Luo, H.; Jin, Y. Expansion and Delivery of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells on Three Microcarriers for Soft Tissue Regeneration. *Tissue Eng. Part A* **2011**, *17*, 2981–2997. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0707>.
63. Merceron, C.; Vinatier, C.; Clouet, J.; Collic-Jouault, S.; Weiss, P.; Guicheux, J. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells and Biomaterials for Cartilage Tissue Engineering. *Jt. Bone Spine* **2008**, *75*, 672–674. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2008.07.007>.
64. Li, W.-J.; Tuli, R.; Huang, X.; Laquerriere, P.; Tuan, R.S. Multilineage Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in a Three-Dimensional Nanofibrous Scaffold. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5158–5166. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.01.002>.
65. Kobolak, J.; Dinnyes, A.; Memic, A.; Khademhosseini, A.; Mobasher, A. Mesenchymal Stem Cells: Identification, Phenotypic Characterization, Biological Properties and Potential for Regenerative Medicine through Biomaterial Micro-Engineering of Their Niche. *Methods* **2016**, *99*, 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.09.016>.
66. Wang, H.; Li, Y.; Zuo, Y.; Li, J.; Ma, S.; Cheng, L. Biocompatibility and Osteogenesis of Biomimetic Nano-Hydroxyapatite/Polyamide Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **2007**, *28*, 3338–3348. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.014>.
67. Barry, F.P.; Murphy, J.M. Mesenchymal Stem Cells: Clinical Applications and Biological Characterization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 568–584. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.11.001>.
68. Pountos, I.; Giannoudis, P.V. Biology of Mesenchymal Stem Cells. *Injury* **2005**, *36*, S8–S12. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2005.07.028>.
69. Kamat, P.; Frueh, F.S.; McLuckie, M.; Sanchez-Macedo, N.; Wolint, P.; Lindenblatt, N.; Plock, J.A.; Calcagni, M.; Buschmann, J. Adipose Tissue and the Vascularization of Biomaterials: Stem Cells, Microvascular Fragments and Nanofat—A Review. *Cytotherapy* **2020**, *22*, 400–411. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.03.433>.
70. Gentile, P.; Garcovich, S. Systematic Review: Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells, Platelet-Rich Plasma and Biomaterials as New Regenerative Strategies in Chronic Skin Wounds and Soft Tissue Defects. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1538. <https://doi.org/10.3390/ijms22041538>.

71. Walker, J.; Flynn, L. Chapter 15-Biomaterial Control of Adipose-Derived Stem/Stromal Cell Differentiation. In *Scientific Principles of Adipose Stem Cells*; Kokai, L., Marra, K., Rubin, J.P., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2022; pp. 313–346, ISBN 978-0-12-819376-1.
72. Trubiani, O.; Marconi, G.D.; Pierdomenico, S.D.; Piattelli, A.; Diomedede, F.; Pizzicannella, J. Human Oral Stem Cells, Biomaterials and Extracellular Vesicles: A Promising Tool in Bone Tissue Repair. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4987. <https://doi.org/10.3390/ijms20204987>.
73. Kokubo, T.; Takadama, H. How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity? *Biomaterials* **2006**, *27*, 2907–2915. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.
74. ISO/FDIS 23317:2007(E) Standards; Implants for Surgery – In Vitro Evaluation for Apatite-Forming Ability of Implant Materials. ISO: Geneva, Switzerland, 2007. Available online: <https://www.iso.org/standard/41446.html> (accessed on 5 March 2019).
75. Yen, S.K.; Lin, C.M. Cathodic Reactions of Electrolytic Hydroxyapatite Coating on Pure Titanium. *Mater. Chem. Phys.* **2003**, *77*, 70–76. [https://doi.org/10.1016/S0254-0584\(01\)00562-4](https://doi.org/10.1016/S0254-0584(01)00562-4).
76. Zhang, Y.; Tao, J.; Pang, Y.; Wang, W.; Wang, T. Electrochemical Deposition of Hydroxyapatite Coatings on Titanium. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* **2006**, *16*, 633–637. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(06\)60112-X](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(06)60112-X).
77. Drevet, R.; Benhayoune, H. Electrodeposition of Calcium Phosphate Coatings on Metallic Substrates for Bone Implant Applications: A Review. *Coatings* **2022**, *12*, 539. <https://doi.org/10.3390/coatings12040539>.
78. Casagrande, T.; Lawson, G.; Li, H.; Wei, J.; Adronov, A.; Zhitomirsky, I. Electrodeposition of Composite Materials Containing Functionalized Carbon Nanotubes. *Mater. Chem. Phys.* **2008**, *111*, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2008.03.010>.
79. Narayanan, R.; Kwon, T.-Y.; Kim, K.-H. Direct Nanocrystalline Hydroxyapatite Formation on Titanium from Ultrasonated Electrochemical Bath at Physiological PH. *Mater. Sci. Eng. C* **2008**, *28*, 1265–1270. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.11.009>.
80. Song, Y.W.; Shan, D.Y.; Han, E.H. Electrodeposition of Hydroxyapatite Coating on AZ91D Magnesium Alloy for Biomaterial Application. *Mater. Lett.* **2008**, *62*, 3276–3279. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2008.02.048>.
81. Parcharoen, Y.; Kajitvichyanukul, P.; Sirivisoot, S.; Termsuksawad, P. Hydroxyapatite Electrodeposition on Anodized Titanium Nanotubes for Orthopedic Applications. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *311*, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.04.207>.
82. Wang, Y.; Tao, J.; Wang, L.; He, P.; Wang, T. HA Coating on Titanium with Nanotubular Anodized TiO₂ Intermediate Layer via Electrochemical Deposition. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* **2008**, *18*, 631–635. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(08\)60110-7](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(08)60110-7).
83. Wei, D.; Zhou, Y.; Yang, C. Characteristic, Cell Response and Apatite-Induction Ability of Microarc Oxidized TiO₂-Based Coating Containing P on Ti6Al4V before and after Chemical-Treatment and Dehydration. *Ceram. Int.* **2009**, *35*, 2545–2554. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2008.12.014>.
84. Cao, J.; Lian, R.; Jiang, X. Magnesium and Fluoride Doped Hydroxyapatite Coatings Grown by Pulsed Laser Deposition for Promoting Titanium Implant Cytocompatibility. *Appl. Surf. Sci.* **2020**, *515*, 146069. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.146069>.
85. Wandiyanto, J.V.; Truong, V.K.; Al Kobaisi, M.; Juodkazis, S.; Thissen, H.; Bazaka, O.; Bazaka, K.; Crawford, R.J.; Ivanova, E.P. The Fate of Osteoblast-Like MG-63 Cells on Pre-Infected Bactericidal Nanostructured Titanium Surfaces. *Materials* **2019**, *12*, 1575. <https://doi.org/10.3390/ma12101575>.
86. Thibault, R.A.; Scott Baggett, L.; Mikos, A.G.; Kasper, F.K. Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on Pregenerated Extracellular Matrix Scaffolds in the Absence of Osteogenic Cell Culture Supplements. *Tissue Eng Part A* **2010**, *16*, 431–440. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0583>.
87. Bloise, N.; Waldorff, E.I.; Montagna, G.; Bruni, G.; Fassina, L.; Fang, S.; Zhang, N.; Jiang, J.; Ryaby, J.T.; Visai, L. Early Osteogenic Marker Expression in HMSCs Cultured onto Acid Etching-Derived Micro- and Nanotopography 3D-Printed Titanium Surfaces. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7070. <https://doi.org/10.3390/ijms23137070>.
88. Huo, S.-C.; Yue, B. Approaches to Promoting Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis on Orthopedic Implant Surface. *World J. Stem Cells* **2020**, *12*, 545–561. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i7.545>.
89. Le, J.; Zhongqun, L.; Zhaoyan, W.; Yijun, S.; Yingjin, W.; Yaojie, W.; Yanan, J.; Zhanrong, J.; Chunyang, M.; Fangli, G.; et al. Development of Methods for Detecting the Fate of Mesenchymal Stem Cells Regulated by Bone Bioactive Materials. *Bioact. Mater.* **2021**, *6*, 613–626. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.08.035>.
90. Mei, S.; Wang, H.; Wang, W.; Tong, L.; Pan, H.; Ruan, C.; Ma, Q.; Liu, M.; Yang, H.; Zhang, L.; et al. Antibacterial Effects and Biocompatibility of Titanium Surfaces with Graded Silver Incorporation in Titania Nanotubes. *Biomaterials* **2014**, *35*, 4255–4265. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.005>.
91. Yoshinari, M.; Oda, Y.; Kato, T.; Okuda, K. Influence of Surface Modifications to Titanium on Antibacterial Activity in Vitro. *Biomaterials* **2001**, *22*, 2043–2048. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00392-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00392-6).
92. Sun, Y.; Yang, Y.; Jiang, W.; Bai, H.; Liu, H.; Wang, J. In Vivo Antibacterial Efficacy of Nanopatterns on Titanium Implant Surface: A Systematic Review of the Literature. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1524. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121524>.
93. Das, K.; Bose, S.; Bandyopadhyay, A.; Karandikar, B.; Gibbins, B.L. Surface Coatings for Improvement of Bone Cell Materials and Antimicrobial Activities of Ti Implants. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2008**, *87B*, 455–460. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31125>.
94. Li, B.; Xia, X.; Guo, M.; Jiang, Y.; Li, Y.; Zhang, Z.; Liu, S.; Li, H.; Liang, C.; Wang, H. Biological and Antibacterial Properties of the Micro-Nanostructured Hydroxyapatite/Chitosan Coating on Titanium. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 14052. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49941-0>.

95. Karunakaran, G.; Cho, E.-B.; Kumar, G.S.; Kolesnikov, E.; Janarthanan, G.; Pillai, M.M.; Rajendran, S.; Boobalan, S.; Sudha, K.G.; Rajeshkumar, M.P. Mesoporous Mg-Doped Hydroxyapatite Nanorods Prepared from Bio-Waste Blue Mussel Shells for Implant Applications. *Ceram. Int.* **2020**, *46*, 28514–28527. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.08.009>.
96. Bhattacharjee, A.; Bandyopadhyay, A.; Bose, S. Plasma Sprayed Fluoride and Zinc Doped Hydroxyapatite Coated Titanium for Load-Bearing Implants. *Surf. Coat. Technol.* **2022**, *440*, 128464. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2022.128464>.
97. Zhang, X.; Yin, H.; Xiao, L.; Li, Z.; Ma, C.; Xu, W.; Wang, Y. Chitosan Regulated Electrochemistry for Dense Hydroxyapatite/MgO Nanocomposite Coating with Antibiosis and Osteogenesis on Titanium Alloy. *Colloid Interface Sci. Commun.* **2022**, *48*, 100616. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2022.100616>.
98. Kumar, A.; Nune, K.C.; Misra, R.D.K. Biological Functionality of Extracellular Matrix-Ornamented Three-Dimensional Printed Hydroxyapatite Scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2016**, *104*, 1343–1351. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35664>.
99. Thein-Han, W.W.; Misra, R.D.K. Three-Dimensional Chitosan-Nanohydroxyapatite Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *JOM* **2009**, *61*, 41–44. <https://doi.org/10.1007/s11837-009-0131-6>.
100. LeGeros, R.Z. Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4742–4753. <https://doi.org/10.1021/cr800427g>.
101. Gu, Y.-X.; Du, J.; Zhao, J.-M.; Si, M.-S.; Mo, J.-J.; Lai, H.-C. Characterization and Preosteoblastic Behavior of Hydroxyapatite-Deposited Nanotube Surface of Titanium Prepared by Anodization Coupled with Alternative Immersion Method. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2012**, *100B*, 2122–2130. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32777>.
102. Yang, J.; Zhang, K.; Que, K.; Hou, S.; Chen, Z.; Li, Y.; Wang, Y.; Song, Y.; Guan, B.; Zhang, W.; et al. Surface Modification of Titanium with Hydroxyapatite Layer Induced by Phase-Transited Lysozyme Coating. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *92*, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.055>.
103. Jiang, P.; Zhang, Y.; Hu, R.; Wang, X.; Lai, Y.; Rui, G.; Lin, C. Hydroxyapatite-Modified Micro/Nanostructured Titania Surfaces with Different Crystalline Phases for Osteoblast Regulation. *Bioact. Mater.* **2021**, *6*, 1118–1129. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.10.006>.
104. Huang, Y.; Wang, W.; Zhang, X.; Liu, X.; Xu, Z.; Han, S.; Su, Z.; Liu, H.; Gao, Y.; Yang, H. A Prospective Material for Orthopedic Applications: Ti Substrates Coated with a Composite Coating of a Titania-Nanotubes Layer and a Silver-Manganese-Doped Hydroxyapatite Layer. *Ceram. Int.* **2018**, *44*, 5528–5542. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.12.197>.
105. Mo, A.; Liao, J.; Xu, W.; Xian, S.; Li, Y.; Bai, S. Preparation and Antibacterial Effect of Silver–Hydroxyapatite/Titania Nanocomposite Thin Film on Titanium. *Appl. Surf. Sci.* **2008**, *255*, 435–438. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2008.06.083>.
106. Huang, Y.; Xu, Z.; Zhang, X.; Chang, X.; Zhang, X.; Li, Y.; Ye, T.; Han, R.; Han, S.; Gao, Y.; et al. Nanotube-Formed Ti Substrates Coated with Silicate/Silver Co-Doped Hydroxyapatite as Prospective Materials for Bone Implants. *J. Alloy. Compd.* **2017**, *697*, 182–199. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2016.12.139>.
107. Trujillo, N.A.; Floreani, R.; Ma, H.; Bryers, J.D.; Williams, J.D.; Popat, K.C. Antibacterial Effects of Silver-Doped Hydroxyapatite Thin Films Sputter Deposited on Titanium. *Mater. Sci. Eng. C* **2012**, *32*, 2135–2144. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.05.012>.
108. Zhang, K.; Zhang, B.; Huang, C.; Gao, S.; Li, B.; Cao, R.; Cheng, J.; Li, R.; Yu, Z.; Xie, X. Biocompatibility and Antibacterial Properties of Pure Titanium Surfaces Coated with Yttrium-Doped Hydroxyapatite. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2019**, *100*, 103363. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.07.021>.
109. Zhao, L.; Chu, P.K.; Zhang, Y.; Wu, Z. Antibacterial Coatings on Titanium Implants. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2009**, *91B*, 470–480. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31463>.

Oświadczenia współautorskie



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Chemii



Toruń, 22.02.2023

Mgr Michalina Ehlert
Wydział Chemii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
ul. Gagarina 7
87-100 Toruń

OŚWIADCZENIE

Jako autor przedłożonej rozprawy doktorskiej oświadczam, że:

W artykule P1:

Ehlert, M.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Bartmański, M.; Radtke, A.; Titania Nanofiber Scaffolds with Enhanced Biointegration Activity—Preliminary In Vitro Studies. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 5642,

byłam odpowiedzialna za zaplanowanie i przeprowadzenie syntezy nanowłóknistych układów TiO_2 (TNF) z użyciem metody chemicznego utleniania nadtlakiem wodoru powierzchni stopu Ti6Al4V . Wykonałam pomiary zwilżalności i energii powierzchniowej oraz zinterpretowałam otrzymane wyniki. Dokonałam charakterystyki strukturalnej i morfologicznej uzyskanych układów. Wykonałam badania aktywności metabolicznej (a) mezenchymalnych komórek macierzystych (ADSCs) oraz (b) kokultur komórkowych: fibroblastów L929/ADSCs oraz osteoblastów MG-63/ADSCs hodowanych na nanowłóknistych warstwach TiO_2 . Przygotowałam materiał biologiczny do obrazowania za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego. Przeprowadziłam procedurę autoklawowania wytworzonych układów. Ponadto, brałam udział w określeniu celu i zakresu pracy oraz wniosłam przeważający wkład w treść manuskryptu (wstępu, części fizykochemicznej, dyskusji i wniosków), a także w pozyskanie środków na badania.

W artykule P2:

Ehlert, M.; Radtke, A.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Bartmański, M.; Piszczek, P. In Vitro Studies on Nanoporous, Nanotubular and Nanosponge-Like Titania Coatings, with the Use of Adipose-Derived Stem Cells. *Materials* **2020**, *13*, E1574,

byłam odpowiedzialna za przeprowadzenie syntezy nanoporowatych, nanorurkowych i nanogąbczastych układów TiO_2 (TNT) z użyciem metody elektrochemicznego utleniania powierzchni stopu Ti6Al4V . Wykonałam pomiary zwilżalności i energii powierzchniowej oraz zinterpretowałam otrzymane wyniki. Przeprowadziłam pomiary spektroskopii Ramana.

Ehlert

Dokonałam charakterystyki strukturalnej, spektroskopowej i morfologicznej uzyskanych układów. Wykonałam badania aktywności metabolicznej oraz aktywności alkalicznej fosfatazy (a) mezenchymalnych komórek macierzystych (ADSCs) oraz kokultur komórkowych: fibroblastów L929/ADSCs oraz (b) osteoblastów MG-63/ADSCs hodowanych na nanowarstwach TiO₂. Przygotowałam materiał biologiczny do obrazowania za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego. Przeprowadziłam procedurę autoklawowania wytworzonych układów. Ponadto, brałam udział w określeniu celu i zakresu pracy oraz wniosłam przeważający wkład w treść manuskryptu (wstępu, części fizykochemicznej, dyskusji i wniosków), a także w pozyskanie środków na badania.

W artykule P3:

Ehlert, M.; Radtke, A.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Piszczek, P. Assessment of Titanate Nanolayers in Terms of Their Physicochemical and Biological Properties. *Materials* **2021**, *14*, 806,

byłam odpowiedzialna za zaplanowanie i przeprowadzenie syntezy nanowarstw tytanianowych z użyciem metody chemicznego utleniania alkaliczno-sodowym roztworem powierzchni stopu Ti6Al4V. Wykonałam pomiary zwilżalności i energii powierzchniowej oraz zinterpretowałam otrzymane wyniki. Przeprowadziłam pomiary spektroskopii Ramana, jak i spektroskopii rozproszonego odbicia w zakresie podczerwieni z transformatą Fouriera. Dokonałam charakterystyki strukturalnej, spektroskopowej i morfologicznej uzyskanych układów. Wykonałam i opisałam badania bioaktywności układów zanurzonych w środowisku symulowanego płynu ustrojowego. Wykonałam badania aktywności metabolicznej mezenchymalnych komórek macierzystych (ADSCs) hodowanych na nanowarstwach tytanianowych oraz warstwach wzbogaconych apatytem. Przygotowałam materiał biologiczny do obrazowania za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego. Przeprowadziłam procedurę autoklawowania wytworzonych układów. Ponadto, brałam udział w określeniu celu i zakresu pracy oraz wniosłam przeważający wkład w treść manuskryptu (wstępu, części fizykochemicznej, dyskusji i wniosków), odpowiedzi na recenzje, a także w pozyskanie środków na badania.

W artykule P4:

Ehlert*, M.; Radtke, A.; Bartmański, M.; Piszczek*, P. Evaluation of the Cathodic Electrodeposition Effectiveness of the Hydroxyapatite Layer Used in Surface Modification of Ti6Al4V-Based Biomaterials. *Materials* **2022**, *15*, 6925,

byłam odpowiedzialna za zaplanowanie syntezy hydroksyapatytu z użyciem metody katodowego elektroosadzania na powierzchni: (a) stopu Ti6Al4V oraz (b) nanowarstw ditlenku tytanu lub tytanianu. Opracowałam zestaw aparaturowy do syntezy HA. Przeprowadziłam syntezy związane z: (a) wytworzeniem nanowarstw TiO₂ i nanowarstw tytanianowych oraz (b) osadzeniem powłoki HA na ich powierzchni. Wykonałam pomiary zwilżalności i zinterpretowałam otrzymane wyniki. Przeprowadziłam pomiary spektroskopii rozproszonego odbicia w zakresie podczerwieni z transformatą Fouriera. Dokonałam charakterystyki strukturalnej, spektroskopowej i morfologicznej uzyskanych układów. Przeprowadziłam procedurę autoklawowania wytworzonych układów. Ponadto, brałam udział w określeniu celu i zakresu pracy oraz wniosłam przeważający wkład w treść manuskryptu (wstępu, części

fizykochemicznej wraz z dyskusją, dyskusji badań mechanicznych oraz wniosków), odpowiedzi na recenzje, a także w pozyskanie środków na badania.

W artykule P5:

Ehlert*, M.; Radtke*, A.; Forbot, N.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Golińska, P.; Trykowski, G.; Piszczek, P. TiO₂/HA and Titanate/HA Double Layer Coatings on Ti6Al4V Surface and Their Influence on In Vitro Cell Growth and Osteogenic Potential. *Journal of Functional Biomaterials* **2022**, 13, 271,

byłam odpowiedzialna za zaplanowanie i przeprowadzenie syntezy hydroksyapatytu z użyciem metody katodowego elektroosadzania na powierzchni nanowarstw ditlenku tytanu lub tytanianu zintegrowanych z podłożem ze stopu Ti6Al4V. Dokonałam charakterystyki strukturalnej i morfologicznej uzyskanych układów. Wykonałam i opisałam badania bioaktywności układów zanurzonych w środowisku symulowanego płynu ustrojowego. Mój udział polegał także na współpracy podczas wykonywania: (a) badań aktywności metabolicznej mezenchymalnych komórek macierzystych (ADSCs), (b) badań aktywności alkalicznej fosfatazy komórek osteoblastów linii MG-63 oraz ADSCs, (c) testu z użyciem czerwieni alizarynowej mającego na celu wykrycie złogów wapniowych w komórkach osteoblastów linii MG-63 oraz ADSCs, hodowanych na powierzchni wytworzonych biomateriałów. Przygotowałam materiał biologiczny do obrazowania za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego. Ponadto, brałam udział w określeniu celu i zakresu pracy oraz wniosłam przeważający wkład w treść manuskryptu (wstępu, części fizykochemicznej wraz z dyskusją, dyskusji badań przeciwdrobnoustrojowych oraz wniosków), odpowiedzi na recenzje, a także w pozyskanie środków na badania.

Podpis

Michalina Ehlert



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Chemii



Toruń, 22.02.2023

Dr hab. Piotr Piszczek, prof. UMK

Wydział Chemii

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

ul. Gagarina 7

87-100 Toruń

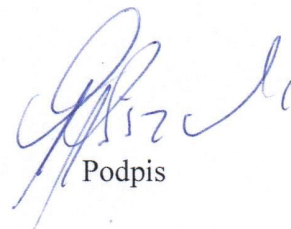
OŚWIADCZENIE

Dotyczy publikacji:

- P2. **Ehlert, M.**; Radtke, A.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Bartmański, M.; Piszczek, P. In Vitro Studies on Nanoporous, Nanotubular and Nanosponge-Like Titania Coatings, with the Use of Adipose-Derived Stem Cells. *Materials* **2020**, *13*, E1574.
- P3. **Ehlert, M.**; Radtke, A.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Piszczek, P. Assessment of Titanate Nanolayers in Terms of Their Physicochemical and Biological Properties. *Materials* **2021**, *14*, 806.
- P4. **Ehlert***, **M.**; Radtke, A.; Bartmański, M.; Piszczek*, P. Evaluation of the Cathodic Electrodeposition Effectiveness of the Hydroxyapatite Layer Used in Surface Modification of Ti6Al4V-Based Biomaterials. *Materials* **2022**, *15*, 6925.
- P5. **Ehlert***, **M.**; Radtke*, A.; Forbot, N.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Golińska, P.; Trykowski, G.; Piszczek, P. TiO₂/HA and Titanate/HA Double Layer Coatings on Ti6Al4V Surface and Their Influence on In Vitro Cell Growth and Osteogenic Potential. *Journal of Functional Biomaterials* **2022**, *13*, 271.

1. Oświadczam, że mój udział w artykule **P2** dotyczył prac związanych opracowaniem celu pracy, metodologii badań. Brałem udział w analizie otrzymanych wyników, koordynacji prac związanych z publikacją otrzymanych wyników oraz byłem odpowiedzialny za pozyskanie środków na sfinansowanie APC.
2. Oświadczam, że mój udział w artykule **P3** dotyczył prac związanych opracowaniem celu pracy, przechowywaniem danych pomiarowych, koordynacji prac związanych z publikacją otrzymanych wyników.

3. Oświadczam, że mój udział w artykule **P4** dotyczył prac związanych opracowaniem celu pracy i metodologii badań. Brałem udział w analizie otrzymanych wyników, koordynacji prac związanych z publikacją otrzymanych wyników.
4. Oświadczam, że mój udział w artykule **P5** dotyczył prac związanych opracowaniem celu pracy. Brałem udział w analizie otrzymanych wyników, koordynacji prac związanych z publikacją otrzymanych wyników.



Podpis



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Chemii



Toruń, 22.02.2023

Dr hab. Aleksandra Radtke

Prezes Zarządu Nano-implant Sp. z o.o.

ul. Gagarina 7/47

87-100 Toruń

OŚWIADCZENIE


Dotyczy publikacji:

- P1. **Ehlert, M.**; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Bartmański, M.; Radtke, A.; Titania Nanofiber Scaffolds with Enhanced Biointegration Activity—Preliminary In Vitro Studies. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 5642.
- P2. **Ehlert, M.**; Radtke, A.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Bartmański, M.; Piszczek, P. In Vitro Studies on Nanoporous, Nanotubular and Nanosponge-Like Titania Coatings, with the Use of Adipose-Derived Stem Cells. *Materials* **2020**, *13*, E1574.
- P3. **Ehlert, M.**; Radtke, A.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Piszczek, P. Assessment of Titanate Nanolayers in Terms of Their Physicochemical and Biological Properties. *Materials* **2021**, *14*, 806.
- P4. **Ehlert*, M.**; Radtke, A.; Bartmański, M.; Piszczek*, P. Evaluation of the Cathodic Electrodeposition Effectiveness of the Hydroxyapatite Layer Used in Surface Modification of Ti6Al4V-Based Biomaterials. *Materials* **2022**, *15*, 6925.
- P5. **Ehlert*, M.**; Radtke*, A.; Forbot, N.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Golińska, P.; Trykowski, G.; Piszczek, P. TiO₂/HA and Titanate/HA Double Layer Coatings on Ti6Al4V Surface and Their Influence on In Vitro Cell Growth and Osteogenic Potential. *Journal of Functional Biomaterials* **2022**, *13*, 271.

1. Oświadczam, że mój udział w artykule **P1** dotyczył prac związanych z opracowaniem celu pracy oraz metodologii badań. Brałam udział w analizie otrzymanych wyników, koordynacji prac związanych z publikacją otrzymanych wyników. oraz odpowiadałam za pozyskanie środków na sfinansowanie APC.
2. Oświadczam, że mój udział w artykule **P2** dotyczył prac związanych z opracowaniem celu pracy, metodologii badań. Brałam udział w analizie otrzymanych wyników, koordynacji prac związanych z publikacją otrzymanych wyników oraz odpowiadałam za pozyskaniem środków na sfinansowanie APC.

3. Oświadczam, że mój udział w artykule **P3** dotyczył prac związanych z opracowaniem celu pracy i metodologii badań. Brałam udział w analizie otrzymanych wyników oraz koordynacji prac związanych z publikacją otrzymanych wyników.
4. Oświadczam, że mój udział w artykule **P4** dotyczył prac związanych z opracowaniem celu pracy i metodologii badań. Brałam udział w analizie otrzymanych wyników oraz koordynacji prac związanych z publikacją otrzymanych wyników.
5. Oświadczam, że mój udział w artykule **P5** dotyczył prac związanych z opracowaniem celu pracy. Brałam udział w analizie otrzymanych wyników oraz koordynacji prac związanych z publikacją otrzymanych wyników.

**Nano-implant Sp. z o.o.**
ul. Jurija Gagarina 7/47, 87-100 Toruń
KRS: 0000590991, NIP: 9562314777
REGON: 363207843
nano implant www.nanoimplant.pl


*dr hab.
Aleksandra Radtke*
A. Radtke
Prezes Zarządu
Nano-implant Sp. z o.o.

Podpis



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Chemii



Toruń, 22.02.2023

dr Grzegorz Trykowski
Wydział Chemii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
ul. Gagarina 7
87-100 Toruń

OŚWIADCZENIE

Dotyczy publikacji:

P5. **Ehlert***, M.; **Radtke***, A.; Forbot, N.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Golińska, P.; Trykowski, G.; Piszczek, P. TiO₂/HA and Titanate/HA Double Layer Coatings on Ti6Al4V Surface and Their Influence on In Vitro Cell Growth and Osteogenic Potential. *Journal of Functional Biomaterials* **2022**, 13, 271.

1. Oświadczam, że mój udział w artykule **P5** dotyczył prac związanych z obrazowaniem materiału biologicznego naniesionego na układy typu Ti6Al4V/warstwa pośrednia/HA, za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego.


Podpis



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Chemii



Toruń, 22.02.2023

Dr hab. Katarzyna Roszek, prof. UMK

Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

ul. Lwowska 1

87-100 Toruń

OŚWIADCZENIE

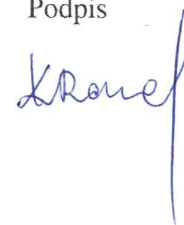
Dotyczy publikacji:

- P1. **Ehlert, M.**; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Bartmański, M.; Radtke, A.; Titania Nanofiber Scaffolds with Enhanced Biointegration Activity—Preliminary In Vitro Studies, *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 5642.
- P2. **Ehlert, M.**; Radtke, A.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Bartmański, M.; Piszczek, P. In Vitro Studies on Nanoporous, Nanotubular and Nanosponge-Like Titania Coatings, with the Use of Adipose-Derived Stem Cells. *Materials* **2020**, *13*, E1574.
- P3. **Ehlert, M.**; Radtke, A.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Piszczek, P. Assessment of Titanate Nanolayers in Terms of Their Physicochemical and Biological Properties. *Materials* **2021**, *14*, 806.
- P5. **Ehlert***, **M.**; Radtke*, A.; Forbot, N.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Golińska, P.; Trykowski, G.; Piszczek, P. TiO₂/HA and Titanate/HA Double Layer Coatings on Ti6Al4V Surface and Their Influence on In Vitro Cell Growth and Osteogenic Potential. *Journal of Functional Biomaterials* **2022**, *13*, 271.

1. Oświadczam, że mój udział w artykule **P1** dotyczył prac związanych z zaplanowaniem i nadzorem naukowym nad wykonywanymi badaniami aktywności metabolicznej (a) mezenchymalnych komórek macierzystych (ADSCs) oraz (b) kokultur komórkowych: fibroblastów L929/ADSCs oraz osteoblastów MG-63/ADSCs hodowanych na nanowłóknistych warstwach TiO₂ (TNF). Ponadto brałam udział w dyskusji wyników biologicznych oraz analizie obrazów, ze skaningowego mikroskopu elektronowego, komórek rosnących na wytworzonych nanowarstwach ditlenku tytanu. Mój wkład polegał także na współpracy przy redagowaniu części biologicznej manuskryptu.

2. Oświadczam, że mój udział w artykule **P2** dotyczył prac związanych z zaplanowaniem i nadzorem naukowym nad wykonywanymi badaniami aktywności metabolicznej (a) mezenchymalnych komórek macierzystych (ADSCs) oraz (b) kokultur komórkowych: fibroblastów L929/ADSCs oraz osteoblastów MG-63/ADSCs hodowanych na nanoporowatych, nanorurkowych i nanogąbczastych warstwach TiO_2 (TNT). Ponadto brałam udział w dyskusji wyników biologicznych oraz analizie obrazów, ze skaningowego mikroskopu elektronowego, komórek rosnących na wytworzonych nanowarstwach ditlenku tytanu. Mój wkład polegał także na współpracy przy redagowaniu części biologicznej manuskryptu.
3. Oświadczam, że mój udział w artykule **P3** dotyczył prac związanych z zaplanowaniem i nadzorem naukowym nad wykonywanymi badaniami aktywności metabolicznej mezenchymalnych komórek macierzystych (ADSCs) hodowanych na nanowarstwach tytanianowych. Ponadto brałam udział w dyskusji wyników biologicznych oraz analizie obrazów, ze skaningowego mikroskopu elektronowego, komórek rosnących na wytworzonych nanowarstwach ditlenku tytanu. Mój wkład polegał także na współpracy przy redagowaniu części biologicznej manuskryptu.
4. Oświadczam, że mój udział w artykule **P5** dotyczył prac związanych z zaplanowaniem i nadzorem naukowym nad wykonywanymi (a) badaniami aktywności metabolicznej mezenchymalnych komórek macierzystych (ADSCs), (b) badaniami aktywności alkalicznej fosfatazy komórek ADSCs, (c) oraz nad testem z użyciem czerwieni alizarynowej mającego na celu wykrycie złogów wapniowych w komórkach ADSCs, hodowanych na powierzchni wytworzonych biomateriałów typu Ti6Al4V /warstwa pośrednia/HA. Ponadto brałam udział w dyskusji wyników biologicznych oraz analizie obrazów, ze skaningowego mikroskopu elektronowego, komórek rosnących na wytworzonych nanowarstwach ditlenku tytanu. Mój wkład polegał także na współpracy przy redagowaniu części biologicznej manuskryptu.

Podpis





UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Chemii



Toruń, 22.02.2023

Dr Tomasz Jędrzejewski

Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
ul. Lwowska 1
87-100 Toruń

OŚWIADCZENIE

Dotyczy publikacji:

- P1. **Ehlert, M.**; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Bartmański, M.; Radtke, A.; Titania Nanofiber Scaffolds with Enhanced Biointegration Activity—Preliminary In Vitro Studies, *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 5642.
- P2. **Ehlert, M.**; Radtke, A.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Bartmański, M.; Piszczek, P. In Vitro Studies on Nanoporous, Nanotubular and Nanosponge-Like Titania Coatings, with the Use of Adipose-Derived Stem Cells. *Materials* **2020**, *13*, E1574.
- P3. **Ehlert, M.**; Radtke, A.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Piszczek, P. Assessment of Titanate Nanolayers in Terms of Their Physicochemical and Biological Properties. *Materials* **2021**, *14*, 806.
- P5. **Ehlert*, M.**; Radtke*, A.; Forbot, N.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Golińska, P.; Trykowski, G.; Piszczek, P. TiO₂/HA and Titanate/HA Double Layer Coatings on Ti6Al4V Surface and Their Influence on In Vitro Cell Growth and Osteogenic Potential. *Journal of Functional Biomaterials* **2022**, *13*, 271.

1. Oświadczam, że mój udział w artykule **P1** dotyczył prac związanych zaplanowaniem i wykonaniem badań aktywności metabolicznej komórek fibroblastów linii L929 oraz osteoblastów linii MG-63 hodowanych na nanowłóknistych warstwach TiO₂ (TNF). Ponadto brałem udział w dyskusji wyników biologicznych oraz analizie obrazów, ze skaningowego mikroskopu elektronowego, komórek rosnących na wytworzonych nanowarstwach ditlenku tytanu. Mój wkład polegał także na współpracy przy redagowaniu części biologicznej rękopisu.
2. Oświadczam, że mój udział w artykule **P2** dotyczył prac związanych zaplanowaniem i wykonaniem badań aktywności metabolicznej komórek fibroblastów linii L929 oraz osteoblastów linii MG-63 hodowanych na nanoporowatych, nanorurkowych

i nanogąbczastych warstwach TiO_2 (TNT). Ponadto brałem udział w dyskusji wyników biologicznych oraz analizie obrazów, ze skaningowego mikroskopu elektronowego, komórek rosnących na wytworzonych nanowarstwach ditlenku tytanu. Mój wkład polegał także na współpracy przy redagowaniu części biologicznej rękopisu.

3. Oświadczam, że mój udział w artykule **P3** dotyczył prac związanych zaplanowaniem i wykonaniem badań aktywności metabolicznej komórek fibroblastów linii L929 oraz osteoblastów linii MG-63 hodowanych na nanowarstwach tytanianowych. Ponadto brałem udział w dyskusji wyników biologicznych oraz analizie obrazów, ze skaningowego mikroskopu elektronowego, komórek rosnących na wytworzonych nanowarstwach tytanianowych. Mój wkład polegał także na współpracy przy redagowaniu części biologicznej rękopisu.
4. Oświadczam, że mój udział w artykule **P5** dotyczył prac związanych zaplanowaniem i wykonaniem badań aktywności metabolicznej komórek fibroblastów linii L929 oraz osteoblastów linii MG-63 hodowanych na powierzchni wytworzonych układów typu Ti6Al4V /warstwa pośrednia/HA. Nadzorowałem prace nad wykonywaniem (a) badania aktywności alkalicznej fosfatazy komórek osteoblastów linii MG-63 oraz, (b) testu z użyciem czerwieni alizarynowej mającego na celu wykrycie złogów wapniowych w komórkach osteoblastów linii MG-63, hodowanych na powierzchni wytworzonych biomateriałów. Ponadto brałem udział w dyskusji wyników biologicznych oraz analizie obrazów, ze skaningowego mikroskopu elektronowego, komórek rosnących na wytworzonych układach. Mój wkład polegał także na współpracy przy redagowaniu części biologicznej manuskryptu.

23.02.23 Tomasz Jedynowski

Podpis



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Chemii



Toruń, 22.02.2023

Mgr Natalia Forbot

Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

ul. Lwowska 1

87-100 Toruń

OŚWIADCZENIE

Dotyczy publikacji::

P5. **Ehlert*, M.**; Radtke*, A.; Forbot, N.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Golińska, P.; Trykowski, G.; Piszczek, P. TiO₂/HA and Titanate/HA Double Layer Coatings on Ti6Al4V Surface and Their Influence on In Vitro Cell Growth and Osteogenic Potential. *Journal of Functional Biomaterials* **2022**, 13, 271.

1. Oświadczam, że mój udział w artykule **P5** dotyczył współpracy podczas wykonywania: (a) badań aktywności metabolicznej mezenchymalnych komórek macierzystych (ADSCs), (b) badań aktywności alkalicznej fosfatazy komórek osteoblastów linii MG-63 oraz ADSCs, (c) testu z użyciem czerwieni alizarynowej mającego na celu wykrycie złogów wapniowych w komórkach osteoblastów linii MG-63 oraz ADSCs, hodowanych na powierzchni wytworzonych układów typu Ti6Al4V/warstwa pośrednia/HA.

Natalia Forbot

Podpis



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Chemii



Toruń, 22.02.2023

Dr hab. Patrycja Golińska, prof. UMK

Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

ul. Lwowska 1

87-100 Toruń

OŚWIADCZENIE

Dotyczy publikacji:

P5. Ehlert*, M.; Radtke*, A.; Forbot, N.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Golińska, P.; Trykowski, G.; Piszczek, P. TiO₂/HA and Titanate/HA Double Layer Coatings on Ti6Al4V Surface and Their Influence on In Vitro Cell Growth and Osteogenic Potential. *Journal of Functional Biomaterials* **2022**, 13, 271.

1. Oświadczam, że mój udział w artykule **P5** dotyczył prac związanych z wykonaniem badań przeciwdrobnoustrojowych układów typu Ti6Al4V/warstwa pośrednia/HA, oraz udziale w analizie otrzymanych danych.

Podpis

Toruń, 22.02.2023

Dr inż. Michał Bartmański

Wydział Inżynierii Mechanicznej i Okrętownictwa

Politechnika Gdańska

ul. Gabriela Narutowicza 11/12

80-233 Gdańsk

OŚWIADCZENIE

Dotyczy publikacji:

- P1. **Ehlert, M.**; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Bartmański, M.; Radtke, A.; Titania Nanofiber Scaffolds with Enhanced Biointegration Activity—Preliminary In Vitro Studies, *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 5642.
- P2. **Ehlert, M.**; Radtke, A.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Bartmański, M.; Piszczek, P. In Vitro Studies on Nanoporous, Nanotubular and Nanosponge-Like Titania Coatings, with the Use of Adipose-Derived Stem Cells. *Materials* **2020**, *13*, E1574.
- P4. **Ehlert*, M.**; Radtke, A.; Bartmański, M.; Piszczek*, P. Evaluation of the Cathodic Electrodeposition Effectiveness of the Hydroxyapatite Layer Used in Surface Modification of Ti6Al4V-Based. Biomaterials. *Materials* **2022**, *15*, 6925.

1. Oświadczam, że mój udział w artykule **P1** dotyczył prac związanych z zaplanowaniem i wykonaniem badań nanomechanicznych, tzn. pomiaru twardości, modułu Younga oraz maksymalnej głębokości penetracji wglębniaka podczas nanoindentacji, nanowłóknistych warstw (TNF) zintegrowanych z powierzchnią stopu Ti6Al4V. Odpowiadałem również za przeprowadzenie badań nanozarysowania (nanoscratch test) wytworzonych układów. Byłem odpowiedzialny za obrazowanie topografii powierzchni badanych prób za pomocą mikroskopu sił atomowych oraz wyznaczenie parametru chropowatości powierzchniowej Sa. Ponadto brałem udział w dyskusji danych mechanicznych.
2. Oświadczam, że mój udział w artykule **P2** dotyczył prac związanych z zaplanowaniem i wykonaniem badań nanomechanicznych, tzn. pomiaru twardości oraz modułu Younga nanoporowatych, nanorurkowych i nanogąbczastych warstw TiO₂ (TNT) zintegrowanych z powierzchnią stopu Ti6Al4V. Odpowiadałem również za przeprowadzenie badań nanozarysowania (nanoscratch test) wytworzonych układów.

Bartmański

Byłem odpowiedzialny za obrazowanie topografii powierzchni badanych prób za pomocą mikroskopu sił atomowych oraz wyznaczenie parametru chropowatości powierzchniowej Sa. Ponadto brałem udział w dyskusji danych mechanicznych.

3. Oświadczam, że mój udział w artykule **P4** dotyczył prac związanych z zaplanowaniem i wykonaniem badań nanomechanicznych, tzn. pomiaru twardości oraz modułu Younga (a) nanowarstw tytanianowych zintegrowanych z powierzchnią stopu Ti6Al4V oraz (b) układów typu: Ti6Al4V/warstwa pośrednia/HA. Odpowiadałem również za przeprowadzenie badań nanozarysowania (nanoscratch test) wytworzonych układów. Przygotowałem opisy wykonanych badań i wykresy do zamieszczenia w publikacji.

Podpis

Michał Bartmeniś