

WPLYW PRZYGOTOWANIA PODŁOŻA NA JEDNORODNOŚĆ WARSTWY HYDROKSYAPATYTU OSADZANEJ NA TYTANIE METODĄ HYDROTHERMALNĄ

ALICJA STRZAŁA*, MARTA MARSZAŁEK

INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ IM. HENRYKA NIEWODNICZAŃSKIEGO
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
UL. RADZIKOWSKIEGO 152, 31-342 KRAKÓW, POLSKA
* E-MAIL: ALICJA.STRZALA@IFJ.EDU.PL

Streszczenie

W celu otrzymania biogodnej i bioaktywnej warstwy na podłożach z czystego tytanu formowano przy użyciu metody hydrotermalnej hydroksyapatyt $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA). Sporządzenie takiego rodzaju pokrycia np. na metalicznej protezie stawu biodrowego poprawi integrację implantu z kością. Aby przyspieszyć osadzanie się HA na powierzchni metalu oraz zwiększyć jednorodność otrzymywanych warstw stosowano różne metody przygotowania powierzchni: wytrawianie w kwasach (HF), zasadach (NaOH), zanurzenie w roztworze o składzie soli podobnym do składu osocza krwi ludzkiej (roztworze Hanka). Budowę cząsteczkową tak otrzymanych warstw określono przy użyciu mikrospektroskopii ramanowskiej, a ich jednorodność oceniano na podstawie obrazu z mikroskopu optycznego sprzężonego z mikrospektrometrem ramanowskim.

W artykule dyskutowany jest wpływ modyfikacji powierzchni metalu na jednorodność powstałej w procesie hydrotermalnym warstwy HA.

Słowa kluczowe: hydroksyapatyt, synteza hydrotermalna, mikrospektrometria Ramana, przygotowanie podłoża)

[Inżynieria Biomateriałów, 96-98, (2010), 16-20]

Wprowadzenie

Hydroksyapatyt $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA) jest mineralnym składnikiem kości i zębów. Cechuje się doskonałą biogodnością oraz wysoką bioaktywnością – może tworzyć trwałe wiązanie chemiczne bezpośrednio z otaczającą go kością. Hydroksyapatyt jest związkiem słabo rozpuszczalnym w wodzie, praktycznie nie rozpuszcza się w zasadach, natomiast dobrze rozpuszcza się w kwasach [1].

Syntetyczny HA posiada liczne zastosowania biomedyczne, zarówno w ortopedii jak i stomatologii. Jednakże z powodu słabej wytrzymałości mechanicznej jako implant może być stosowany jedynie w miejscach nienarażonych na znaczne obciążenia mechaniczne, natomiast często jest stosowany jako powłoki na protezach metalicznych w celu poprawy ich biogodności i integracji z tkanką kostną biorcy.

Powłoki HA najczęściej otrzymuje się metodami napylania plazmowego [2-7], jako materiału wyjściowego używając proszków HA. Mankamentem tej metody jest konieczność zastosowania komercyjnych proszków HA oraz wytworzenie wysokiej temperatury koniecznej do przeprowadzenia procesu. Do pokrywania powierzchni metalicznych hydroksy-

THE INFLUENCE OF SUBSTRATE PREPARATION ON THE HYDROXYAPATITE COATING HOMOGENEITY FORMED ON TITANIUM USING HYDROTHERMAL METHOD

ALICJA STRZAŁA*, MARTA MARSZAŁEK

THE HENRYK NIEWODNICZANSKI INSTITUTE OF NUCLEAR PHYSICS
POLISH ACADEMY OF SCIENCES
152 RADZIKOWSKIEGO STR., 31-342 CRACOW, POLAND
* E-MAIL: ALICJA.STRZALA@IFJ.EDU.PL

Abstract

In order to obtain biocompatible and bioactive coating hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA) film was formed using hydrothermal method on pure titanium substrates. Preparation of such type of coating on metallic hip prosthesis should enhance implant's osseointegration. To accelerate HA precipitation on metal surface and to increase the homogeneity of the coating different methods of surface preparation were used: acid etching (HF), alkali treatment (NaOH), immersion in solution of composition close to the salt composition of human blood plasma (Hank's solution). The molecular composition of as-deposited coatings was investigated by means of Raman microscopy, and their homogeneity was assessed by means of optical microscopy associated with the Raman spectrometer.

In this paper the influence of Ti metal surface modification on the homogeneity of the HA coating obtained in hydrothermal process is discussed.

Keywords: hydroxyapatite, hydrothermal synthesis, Raman microscopy, substrate preparation

[Engineering of Biomaterials, 96-98, (2010), 16-20]

Introduction

Hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA) is the mineral bone component. It is highly biocompatible and bioactive – it can form stable chemical bond directly with surrounding bone. Hydroxyapatite water solubility is poor, and it is practically alkali-insoluble but it is acid-soluble [1].

Synthetic HA has numerous biomedical applications, both orthopaedic and dental. Due to its poor mechanical properties it can be used as an implant only in places not exposed to high mechanical stress, but it is often used as coatings on metallic prostheses in order to enhance their biocompatibility and integration with recipient osseous tissue.

HA coatings are most frequently obtained by plasma spraying methods [2-7], using HA powders as starting material. The drawback of the method is the necessity to use commercially available HA powders and to carry on the process at high temperature. To cover metallic surface with hydroxyapatite other methods are used such as ion methods [8-10] (IBAD, ion sputtering, ion mixing), laser methods [3,11] (PLD, laser ablation), chemical methods [3] (e.g. sol-gel) and hydrothermal methods [12-15]. In all methods mentioned above commercially available HA is used as starting material. Hydrothermal method is rarely used to synthesize

TABELA 1. Wykaz sposobów przygotowania próbek Ti.
TABLE 1. Specification of Ti samples preparation methods.

| Sposób przygotowania próbek / Sample preparation method | | | | | | |
|---|---|--|--------------|--|--|--|
| Grupa A / Group A | Brak dalszej modyfikacji (A) / Without further modifications (A) | | | | | |
| Grupa B / Group B | 7 dni w temperaturze pokojowej (B1) / 7 days at room temperature (B1) | | | | | |
| | <table border="1"> <tr> <td>Trawienie w 1M NaOH / Etching in 1M NaOH</td> <td>1h, t = 90°C</td> <td>Wygrzanie w piecu w 600°C przez 1h (B2) / Heating at 600°C for 1h (B2)</td> </tr> <tr> <td colspan="2"></td> <td>Zanurzenie w HBSS na 24h (B3) / Immersion in HBSS for 24h (B3)</td> </tr> </table> | Trawienie w 1M NaOH / Etching in 1M NaOH | 1h, t = 90°C | Wygrzanie w piecu w 600°C przez 1h (B2) / Heating at 600°C for 1h (B2) | | |
| Trawienie w 1M NaOH / Etching in 1M NaOH | 1h, t = 90°C | Wygrzanie w piecu w 600°C przez 1h (B2) / Heating at 600°C for 1h (B2) | | | | |
| | | Zanurzenie w HBSS na 24h (B3) / Immersion in HBSS for 24h (B3) | | | | |
| Grupa C / Group C | Trawienie w mieszaninie 4% HF i 4% H ₂ O ₂ [20] przez 40s (C1) / Etching in mixture of 4% HF and 4% H ₂ O ₂ [20] for 40s (C1) | | | | | |
| | Trawienie w 20% HF przez 20s (C2) / Etching in 20% HF for 20s (C2) | | | | | |
| Grupa D / Group D | Zanurzenie w HBSS na 96h (D) / Immersion in HBSS for 96h (D) | | | | | |

apatytem stosuje się również metody jonowe [8-10] (IBAD, napylenie jonowe, mieszanie jonowe), laserowe [3,11] (PLD, ablacja laserowa), metody chemiczne [3] (np. zol-żel) i metody hydrotermalne [12-15]. Wszystkie wymienione metody wymagają zastosowania komercyjnego HA jako materiału wyjściowego. Bardzo rzadko stosuje się metodę hydrotermalną jako sposób na jednoczesną syntezę i osadzenie hydroksyapatytu na podłożu metalicznym [8,16-18].

Tytan jest jednym z najczęściej stosowanych materiałów do produkcji endoprotez. Sam tytan jest materiałem biogodnym [8], ale jego osteointegracja jest stosunkowo słaba w porównaniu do materiałów zawierających fosforan wapnia. Użycie powłok HA na implantach Ti może zredukować ryzyko przedwczesnej degradacji protezy.

Aby poprawić szybkość i jednorodność osadzania się warstwy hydroksyapatytu na powierzchni metalu stosuje się różne techniki przygotowania powierzchni Ti. Po uprzednim polerowaniu i odtłuszczeniu próbek powierzchnię metalu można poddać dalszej obróbce poprzez zanurzenie metalu w roztworach kwasowych lub zasadowych i późniejszym wygrzaniu w wysokiej temperaturze [8,14,18].

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu sposobu przygotowania powierzchni Ti i dalszej jej obróbki na jednorodność nanoszonej metodą hydrotermalną na jego powierzchni w roztworze Hanka warstwy hydroksyapatytu.

Materiały i metody

Poniżej opisano metody przygotowania powierzchni Ti jako podłoża do osadzenia HA metodą hydrotermalną.

Dostępny na rynku czysty tytan (99,9%, Koch-Light Laboratory Ltd, Colnbrook) pocięto na kawałki o wymiarach 10x20x1,25mm i odtłuszczone w kąpeli ultradźwiękowej przez 10 minut w każdym z następujących rozpuszczalników: heksan, aceton i etanol [19]. Po każdym etapie kąpeli ultradźwiękowej próbki płukano wodą dejonizowaną i suszono na powietrzu.

Następnie próbki podzielono na cztery grupy: grupa (A) kontrolna poza odtłuszczeniem nie podlegała dalszej modyfikacji; grupa (B) była trawiona w 1M NaOH w różnych warunkach i przez różny okres czasu; grupa (C) była trawiona w HF o różnych stężeniach; grupa (D) została zanurzona w roztworze Hanka (HBSS) i pozostawiona w nim przez określony czas. Szczegóły przygotowania próbek przedstawiono w TABELI 1. Skład roztworu Hanka został przedstawiony w TABELI 2.

and precipitate hydroxyapatite on metallic substrate in one process [8,16-18].

Titanium is one of the most frequently used materials for endoprostheses production. Titanium is biocompatible material [8] but its osseointegration is relatively pure, comparing to the materials containing calcium phosphates. The use of HA coatings on Ti implants may reduce the risk of premature prosthesis degradation.

In order to enhance precipitation rate and coating homogeneity of the hydroxyapatite on Ti metal different surface preparation techniques are used. After sample preliminary polishing and degreasing, the metallic surface can be the subject of further modification by immersing the substrate in acid or alkali solutions and posterior heating at high temperature [8,14,18].

The aim of the study was to determine the influence of Ti surface preparation and its further modification on the homogeneity of the hydroxyapatite layer deposited on Ti in Hank's solution using hydrothermal method.

Materials and methods

Preparation methods of Ti surface as substrate for HA precipitation using hydrothermal method are described below.

Commercially available pure titanium (99.9%, Koch-Light Laboratory Ltd, Colnbrook) was cut into pieces of dimensions 10x20x1.25 mm, and degreased in ultrasonic bath for 10 minutes in each of the following solvents: hexane, acetone and ethanol [19]. After each solvent use the samples were rinsed with deionised water and dried in ambient air.

TABELA 2. Skład roztworu Hanka.
TABLE 2. Composition of the Hank's solution.

| Składnik Component | Ilość [g] Amount [g] |
|---|-------------------------|
| NaCl | 8.00 |
| NaHCO ₃ | 0.35 |
| KCl | 0.40 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.06 |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 0.10 |
| CaCl ₂ | 0.14 |
| Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O | 0.06 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.06 |
| Woda / Water | 1000 |

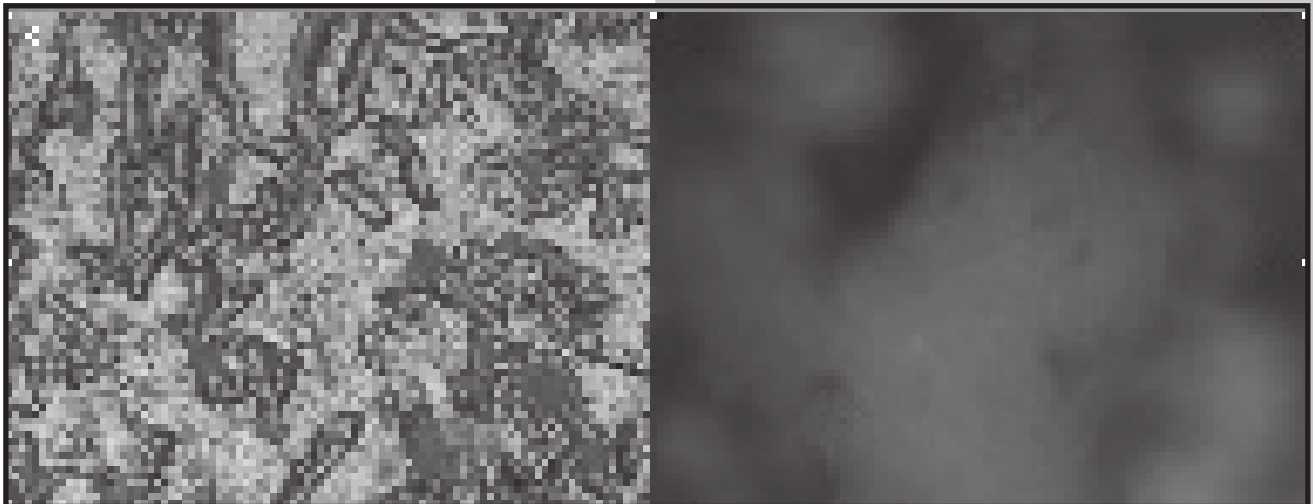
Syntezy hydrotermalną przeprowadzano w autoklawach laboratoryjnych umożliwiających przeprowadzenie reakcji w temperaturze do 300°C i pod ciśnieniami do 20 MPa, bez zastosowania dużych objętości używanych roztworów (Autoklaw Laboratoryjny Model II, Roth, Niemcy). Syntezę prowadzono w 100 cm³ roztworu Hanka w temperaturze od 120°C do 200°C, a czas reakcji zmieniał się od 6 h do 10 h 20 min.

HA używany jako próbka odniesienia został zakupiony od firmy Merck, Niemcy. Wszystkie pozostałe reagenty posiadały odpowiednią czystość (do analizy, czda, POCh, Polska) i zostały użyte bez dalszego oczyszczania.

Tak otrzymane próbki były analizowane przy użyciu konfokalnej mikrospektroskopii Ramana o wysokiej rozdzielczości na spektrometrze Nicolet Almega XR wyposażonym w laser o długości fali 532 nm, w zakresie spektralnym od 400 do 4000 cm⁻¹. Wykonano również zdjęcia otrzymanych warstw używając mikroskopu optycznego wchodzącego w skład spektrometru Nicolet Almega XR.

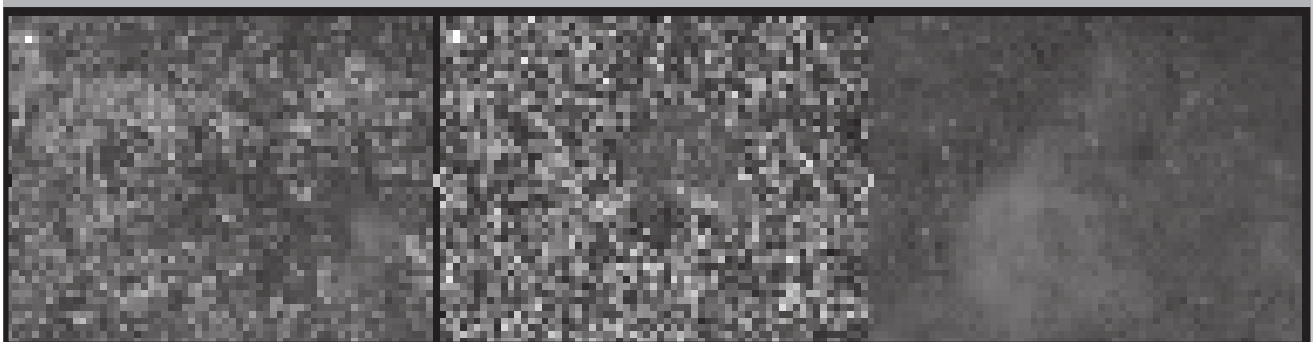
Wyniki i dyskusja

Na RYS. 1 przedstawiono obraz z mikroskopu optycznego warstw HA otrzymanych w wyniku syntezy hydrotermalnej na tytanie tylko odtłuszczone (RYS. 1a) oraz na tytanie zanurzone w roztworze Hanka przez 96 h w temperaturze pokojowej (RYS. 1b). Łatwo zauważyć, że na tytanie poddanym jedynie odtłuszczeniu hydroksyapatyt osadził się w postaci nielicznych wysepek, natomiast na podłożu zanurzone w roztworze o składzie zbliżonym do osocza krwi ludzkiej – wyspy HA uległy powiększeniu i zagęszczeniu.



RYS. 1. Obraz z mikroskopu optycznego warstw HA otrzymanych na Ti: a) A b) D.

FIG. 1. Optical microscope picture of HA coating obtained on Ti: a) A b) D.



RYS. 2. Obraz z mikroskopu optycznego warstw HA otrzymanych na Ti po trawieniu w 1M NaOH a) B1, b) B2, c) B3.

FIG. 2. Optical microscope picture of HA coating obtained on Ti after etching in 1M NaOH: a) B1, b) B2, c) B3.

Then the samples were divided into four groups: control group (A) after degreasing was not exposed to further modification; group (B) was etched in 1M NaOH in different conditions and for different times; group (C) etched in HF of different concentrations; group (D) immersed in Hank's solution (HBSS) and left in it for definite time. The details of sample preparation are shown in TABLE 1. The composition of Hank's solution is shown in TABLE 2.

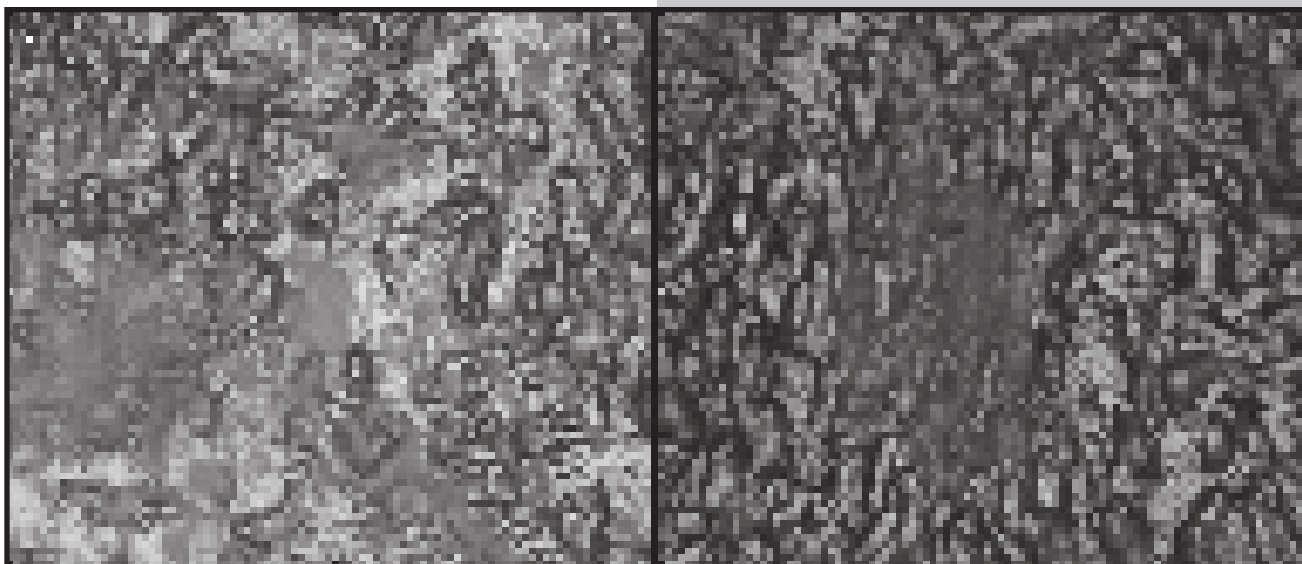
Hydrothermal synthesis was performed in laboratory autoclaves that enable reactions at temperature up to 300°C and under pressure up to 20 MPa, without using large volume of solutions (Laboratory Autoclave Model II, Roth, GE). The synthesis was carried on in 100 cm³ of Hank's solution at the temperature from 120°C to 200°C and the reaction time varied from 6 h to 10 h 20 min.

HA used as reference sample was purchased from Merck, DE. All other reagents of analytical grade were used without further purification (POCh, PL).

As-deposited samples were analyzed using high resolution confocal Raman microspectrometry Nicolet Almega XR equipped with laser of wavelength of 532 nm in spectral range from 400 to 4000 cm⁻¹. Pictures of the precipitated coatings were made with optical microscope attached to Nicolet Almega XR spectrometer.

Results and discussion

FIG. 1 shows picture of HA coatings obtained in hydrothermal synthesis on titanium without any modifications (FIG. 1a) and on titanium immersed in Hank's solution for 96h at room temperature (FIG. 1b). It is easy to notice that on titanium which was only degreased hydroxyapatite



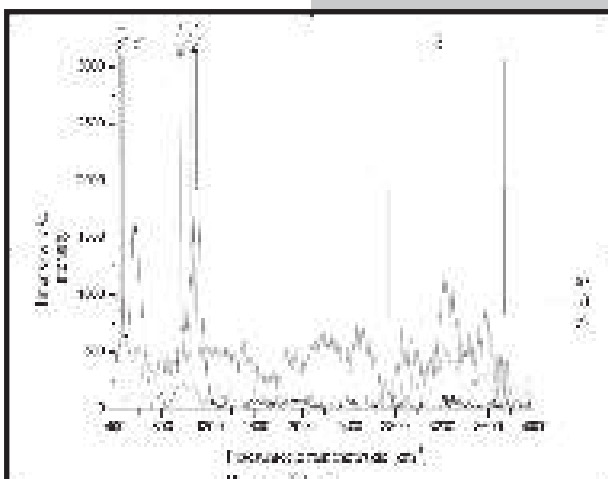
RYS. 3. Obraz z mikroskopu optycznego warstw HA otrzymanych na Ti po wytrawianiu w roztworach kwasowych: a) C1, b) C2.

FIG. 3. Optical microscope picture of HA coating obtained on Ti after etching in acid solutions: a) C1, b) C2.

Na RYS. 2 przedstawiono wyspy HA powstałe na Ti poddanych działaniu 1M NaOH przez 24 h w temperaturze pokojowej oraz na tytanie gotowanym w roztworze NaOH w temperaturze 90°C przez 1 h, a następnie wygrzonym przez godzinę w temperaturze 600°C w atmosferze powietrza. Na RYS. 2c przedstawiono obraz hydroksyapatytu osadzonego na tytanie po grzaniu podłoża w 1M NaOH w temperaturze 90°C przez 1 h, a następnie jego zanurzeniu w roztworze Hanka na 24 h. Największe zagęszczenie wysp HA widoczne jest w przypadku modyfikacji kolejno w 1M NaOH i w roztworze Hanka. Wiadomo [21-23], że działanie na tytan wodnym roztworem zasady sodowej zwiększa bioaktywność tytanu, ułatwiając tym samym osadzanie się hydroksyapatytu na powierzchni metalu.

Na RYS. 3 przedstawiono obrazy z mikroskopu optycznego hydroksyapatytu osadzonego na tytanie po wytrawianiu w kwasie fluorowodorowym. Większą jednorodność osadzenia można zaobserwować w przypadku Ti trawionego w mieszaninie 4% HF i 4% H₂O₂ niż w przypadku Ti trawionego w 20% HF.

Na RYS. 4 porównano skład molekularny otrzymanego hydroksyapatytu na powierzchni tytanu bez dodatkowej obróbki (RYS. 4a), tytanu poddanego działaniu 1M NaOH (RYS. 4b) oraz tytanu trawionego w HF (RYS. 4c). Na wszystkich widmach widoczne są pasma wibracyjne pochodzące od wiązań wchodzących w skład grup PO₄³⁻ (432-462 cm⁻¹ → v₂; 566-590 cm⁻¹ → v₄; 949-981 cm⁻¹ → v₁; 1083-1101 cm⁻¹ → v₃), jak również pasma pochodzące od wiązań OH⁻ (>3000 cm⁻¹).



RYS. 4. Widma ramanowskie warstw HA otrzymanych na Ti: a) bez dodatkowej obróbki, b) po trawieniu w NaOH, c) po trawieniu w HF.

FIG. 4. Raman spectra of HA coatings obtained on Ti: a) without additional modification, b) after etching in NaOH, c) after etching in HF.

precipitated in form of sparse islands, but on the substrate immersed in the Hank's solution the HA islands were larger and closer to each other.

In FIG. 2 HA islands that were formed on Ti after alkali treatment in 1M NaOH for 24h at room temperature (FIG. 2a) and on titanium boiled in NaOH solution at the temperature of 90°C for 1 h and posterior heated for 1 h at the temperature of 600°C in ambient air (FIG. 2b) are shown. In FIG. 2c hydroxyapatite precipitated on titanium after substrate heating in 1M NaOH at the temperature of 90°C for 1 h and with posterior immersion in Hank's solution for 24 h is demonstrated. The highest concentration of HA islands was observed for modification in 1M NaOH followed by immersion in Hank's solution. It is known [21-23] that alkali treatment of metallic titanium

in sodium hydroxide enhances its bioactivity, facilitating hydroxyapatite precipitation on the metal's surface.

In FIG. 3 optical microscope pictures of HA precipitated on titanium after etching in hydrofluoric acid are shown. More uniformity of the coating can be seen in the case of Ti etched in mixture of 4% HF and 4% H₂O₂ than in the case of Ti etched in 20% HF.

The molecular composition of hydroxyapatite obtained on titanium surface without additional modification (FIG. 4a), titanium after alkali treatment in 1M NaOH (FIG. 4b) and titanium etched in HF (FIG. 4c) was studied with Raman spectroscopy. In all spectra vibrational peaks coming from bonds in PO₄³⁻ group (432-462 cm⁻¹ → v₂; 566-590 cm⁻¹ → v₄; 949-981 cm⁻¹ → v₁; 1083-1101 cm⁻¹ → v₃), as well as peaks from OH⁻ bonds (>3000 cm⁻¹) can be observed.

Na podstawie przeprowadzonych badań można wnioskować, że jednorodność osadzania się hydroksyapatytu na tytanie w procesie hydrotermalnym zależy od sposobu przygotowania podłoża.

Warstwa HA na Ti tylko po odtłuszczeniu była niejednorodna. Po dodatkowym zanurzeniu Ti w roztworze Hanka jednorodność osadzania uległa znacznej poprawie.

Po poddaniu Ti działaniu 1M NaOH zauważono zwiększenie jednorodności warstwy, najlepsze rezultaty zaobserwowano dla próbki podgrzewanej w NaOH przez 1 h, a następnie zanurzonej w roztworze Hanka przez 24 h.

Dla próbek trawionych w roztworach kwasowych najskuteczniejsze okazało się trawienie w mieszaninie zawierającej 4% HF i 4% H₂O₂.

Generalnie najbardziej jednorodną warstwę spośród otrzymanych próbek zaobserwowano dla próbki poddanej działaniu 1M NaOH w temperaturze 90°C, a następnie zanurzonej w roztworze Hanka przez 24 h.

On the base of the performed research it can be concluded that the homogeneity of hydroxyapatite precipitation obtained on titanium in hydrothermal process depends on the substrate preparation method.

HA coating on titanium that was only degreased was highly incoherent. After additional immersion of the Ti in Hank's solution the homogeneity of the precipitation increased.

After Ti alkali treatment in 1M NaOH increase of the coating homogeneity was observed. The best results were observed for the sample boiled in NaOH for 1 h and then immersed in Hank's solution for 24 h.

For samples etched in acid solutions the most efficient was etching in the mixture containing 4% HF and 4% H₂O₂.

In general, the most homogenous coating was observed for Ti substrate modified by alkali treatment in 1M NaOH at the temperature of 90°C and then immersed in Hank's solution for 24 h.

Piśmiennictwo

- [1] Park J., Bioceramics, Springer Science+Business Media, LCC 2008, p. 183-225.
- [2] Chang C., Huang J., Xia J., Ding C.: Study on crystallization kinetics of plasma sprayed hydroxyapatite coating. *Ceramics International* 25 (1999) 479-483.
- [3] Sato M., Slamovich E., Webster T.: Enhanced osteoblast adhesion on hydrothermally treated hydroxyapatite/titania/poly(lactide-co-glycolide) sol-gel titanium coatings. *Biomaterials* 26 (2005) 1349-1357.
- [4] Greenspan D.C.: Bioactive ceramic implant materials. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 4 (1999) 389-393.
- [5] Ducheyne P., Qiu Q.: Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 20 (1999) 2287-2303.
- [6] Ozeki K., Aoki H., Fukui Y.: Effect of pH crystallization of sputtered hydroxyapatite film under hydrothermal conditions at low temperature. *Journal of Material Science* 40 (2005) 2837-2842.
- [7] Choi J.-M., Kim H.-E., Lee I.-S.: Ion-beam-assisted deposition (IBAD) of hydroxyapatite coating layer on Ti based metal substrate. *Biomaterials* 21 (2000) 469-473.
- [8] Hamada K., Kon M., Hanawa T., Yokoyama K., Miyamoto Y., Asaoka K.: Hydrothermal modification of titanium surface in calcium solutions. *Biomaterials* 23 (2002) 2265-2272.
- [9] Cui F.Z., Luo Z.S., Feng Q.L.: Highly adhesive hydroxyapatite coatings on titanium alloy formed by ion beam assisted deposition. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 8 (1997) 403-405.
- [10] Yoshinari M., Ohtsuka Y., Derand T.: Thin hydroxyapatite coating produced by the ion beam dynamic mixing method. *Biomaterials* 15 (1994) 529-535.
- [11] Cleries L., Fernandez-Pradas J.M., Sardin G., Morenza J.L.: Application of dissolution experiments to characterize the structure of pulsed laser-deposited calcium phosphate coatings. *Biomaterials* 20 (1999) 1401-1405.
- [12] Zhang Y., Fu T., Han Y., Wang Q., Zhao Y., Xu K.: In vitro and in vivo tests of hydrothermally synthesised hydroxyapatite coating. *Biomolecular Engineering* 19 (2002) 57-61.

References

- [13] Ioku K., Kawachi G., Sasaki S., Fujimori H., Goto S.: Hydrothermal preparation of tailored hydroxyapatite. *Journal of Materials Science* 41 (2006) 1341-1344.
- [14] Liu F., Wang F., Shimizu T., Igarashi K., Zhao L.: Hydroxyapatite formation on oxide films containing Ca and P by hydrothermal treatment. *Ceramics International* 32 (2006) 527-531.
- [15] Huang P., Xu K., Han Y.: Hybrid process of microarc oxidation and hydrothermal treatment of titanium implant. *Journal of Porous Materials* 11 (2004) 41-45.
- [16] Fujishiro Y., Fujimoto A., Sato T., Okuwaki A.: Coating of hydroxyapatite on titanium plates using thermal dissociation of calcium-EDTA chelate complex in phosphate solutions under hydrothermal conditions. *Journal of Colloid and Interface Science* 173 (1995) 119-127.
- [17] Fujishiro Y., Nishino M., Sugimori A., Okuwaki A., Sato T.: Coating of hydroxyapatite on various substrates via hydrothermal reactions of Ca(edta)²⁻ and phosphate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 12 (2001) 333-337.
- [18] Calixto de Andrade M., Tavares Filgueiras M., Ogasawara T.: Hydrothermal nucleation of hydroxyapatite on titanium surface. *Journal of the European Ceramic Society* 22 (2002) 505-510.
- [19] Raikar G., Geregory J., Ong J., Lucas L., Lemons J., Kawakara D., Nakamura M.: Surface characterization of titanium implants. *Journal of Vacuum Science and Technology A13* (1995) 2633-2637.
- [20] Smithells C.J., *Metals Reference Book*, vol. 1, Butterworths, London, 1967.
- [21] Janasova L., Mueller F.A., Helebrant A., Strnad J., Greil P.: Biomimetic apatite formation on chemically treated titanium. *Biomaterials* 25 (2004) 1187-1194.
- [22] Yousefpour M., Abdollahe A., Chen J., Xingdong Z.: Bioactive layer formation on alkaline-acid treated titanium in simulated body fluid. *Materials and Design* 28 (2007) 2154-2159.
- [23] Kokubo T., Matsushita T., Takadama H.: Titania-based bioactive materials. *Journal of the European Ceramic Society* 27 (2007) 1553-1558.