

- [1] Newbury D.E., Joy D.C., Echlin P., Fiori C.E., Goldstein J.I. Advanced Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis Plenum Press New York and London (1986).
- [2] Sokołowski J. "Czynniki wpływające na wytrzymałość połączenia metalowych elementów retencyjnych szyn i mostów AET z materiałami żywicznymi" Praca doktorska Instytut Stomatologii Akademii Medycznej w Łodzi. Łódź (1989).
- [3] Livaditis G. J., Thompson V. P. "Etched casting: and improved retentive mechanism for resin bonded retainers" J. Prosth. Dent. 47, (1982), 52.
- [4] Banaszek K. "Postępowanie endodontyczno-chirurgiczne warunkujące szczelność okolicy przywierzchołkowej korzenia zęba" Praca doktorska Akademia Medyczna Łódź (1999).
- [5] Banaszek K., Pawlicka H., Klimek L.: "Super - EBA as a retrograde filling material after apicectomy - a SEM study". International Conference Material Engineering - New materials and Technology applied in Automotive industry and Biomaterials Liberec 4th - 6th June 2001, s. 5, CD Paper 2.
- [6] Banaszek K., Pawlicka H., Klimek L.: "Evaluation of root-end filling materials" The 10th Biennial Congress European Society of Endodontology Munich Germany 4-6 October, R 36, (2001).

- [7] Suliborski St. "Wpływ obróbki strumieniowo-ścierniej na połączenia odtwórczych materiałów adhezyjnych z tkankami zęba" Protetyka Stomatologiczna XXXIV, 4 (1984), s. 215-222.
- [8] Suliborski St., Sokołowski J. "Wpływ preparatu DENTIN ADHESIT na połączenie cementu fosforanowego i polikarboksylogowego oraz żywicy MF HELIOSIT z zębina" Protetyka Stomatologiczna XXXVII, 2 (1987), s. 95-101.
- [9] Kozakiewicz M.: Charakterystyka przygotowania obrazów i ocena wyników ich subtrakcji wykonanej z zastosowaniem cyfrowego analizatora obrazu własnego projektu. Magazyn Stomatologiczny, 4 (116), (2001), 32-39.
- [10] Kozakiewicz M., Bodek K. H.: Membrana polimleczanowo-chitozanowa do sterowanej regeneracji tkanek. Magazyn Stomatologiczny, 111, 11, (2000), 10-12.
- [11] Kozakiewicz M., Bodek K. H.: New barrier membrane for GBR composed of chitosan and methylcellulose Assessment in vivo. J. Cran. Maxillofac Surg., vol. 30, suppl. 1, p. 179.

## MODYFIKACJE POWIERZCHNI IMPLANTÓW METALICZNYCH

## SURFACE MODIFICATIONS OF METALLIC IMPLANTS

IWONA PRZYBYSZEWSKA-DOROS<sup>\*,\*\*</sup>, WIESŁAWA OKRÓJ<sup>\*,\*\*</sup>  
BOGDAN WALKOWIAK<sup>\*,\*\*,\*</sup>

IWONA PRZYBYSZEWSKA-DOROS<sup>\*,\*\*</sup>, WIESŁAWA OKRÓJ<sup>\*,\*\*</sup>  
BOGDAN WALKOWIAK<sup>\*,\*\*,\*</sup>

\*CENTRUM DOSKONAŁOŚCI NANODIAM, INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ

\*CENTRE OF EXCELLENCE NANODIAM, INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING, TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ

\*\*ZAKŁAD BIOFIZYKI, INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ W ŁODZI

\*\*DIVISION BIOPHYSICS INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ

\*\*\*ZAKŁAD BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ I MEDYCZNEJ UNIwersYTETU MEDYCZNEGO W ŁODZI

\*\*\*DEPARTMENT OF MOLECULAR AND MEDICAL BIOPHYSICS, MEDICAL UNIVERSITY OF LODZ

### Streszczenie

### Abstract

Implanty medyczne powinny spełniać wiele istotnych warunków, aby mogły być bezpiecznie stosowane u osób chorych. Od wszczepów wymaga się braku toksyczności i cech alergicznych oraz braku działań mutagennych i kancerogennych. W zależności od zastosowań wymagania poszerzają się o hemo- i trombozgodność oraz biofunkcjonalność. Wszystkie implanty z czasem ulegają degradacji. W przypadku implantów metalicznych znaczącym zjawiskiem jest korozja, która może prowadzić do metalozy oraz do utraty ich właściwości mechanicznych. Metalami najszerszej stosowanymi w medycynie jest tytan i jego stopy, stopy Co-Cr-Mo oraz stal medyczna 316L. Materiały te cechują dobre właściwości mechaniczne i fizyko-chemiczne. Tolerancja przez organizm biorcy jest zróżnicowana. Poprawa biogodności i tolerancji materiału może być osiągnięta drogą modyfikacji jego powierzchni. Rodzaje zmian powierzchni wszczepów metalicznych można najogólniej podzielić na dwie grupy: fizyko-chemiczną i biochemiczną. Metody fizyko-chemiczne powodują zmiany składu chemicznego istniejącej powierzchni. Metody biochemiczne oparte są na przyłączaniu związków organicznych, które ułatwiają wiązanie białek do powierzchni "uatrakcyjniając" warstwę wierzchnią wszczepu.

Medical implants should meet several relevant conditions for safely use. Grafts have to be free from toxicity and allergenic features, and also free from mutagenic and carcinogenic effects. In dependence on the use requirements can be extended on hemo- and thrombo-compatibility, and also on bio-functionality. Every implant undergo to gradual degradation due to contact with body fluids. Corrosion is a significant phenomenon in the case of metallic implants, and it can results in metalosis and also in lose of mechanical property of an implant. The most often used metallic materials are: titanium and its alloys, Co-Cr-Mo alloys and medical steel 316L. These materials possess proper mechanical and physico-chemical properties, but their tolerance by the recipient body is diverse. An improvement in biocompatibility and tolerance of metallic materials can be reached by a surface modification. Types of surface modification methods can be divided onto two groups: physico-chemical and biochemical methods. Physico-chemical methods of modification cause changes in chemical composition of the existing surface, whereas biochemical methods rely on attachment of small organic molecules, which allow to bind to the surface of specific proteins, making the implant surface more attractive.

Słowa kluczowe: biomateriały metaliczne, modyfikacje powierzchni, biogodność  
[Inżynieria Biomateriałów, 43-44, (2005), 52-62]

## Wstęp

Historia stosowania implantów sięga wielu tysięcy lat, kiedy to w Ameryce Centralnej Majowie uzupełniali braki w uzębieniu specjalnie do tego celu wybranymi muszlami [1]. Pierwsza publikacja na temat stosowania implantów pochodzi z 1565 roku, kiedy to Petronius pisał o używaniu złotych płytek do korekcji wad podniebienia. W XVII wieku Fabritius stosował druty wykonane z żelaza, miedzi i brązu do łączenia kości [2]. W 1804 roku Bell użył igły ze złota i srebra oraz płytki z aluminium i mosiądzu [1].

W XX wieku pojawiły się nowe tworzywa metaliczne. W 1920 roku w USA, dla potrzeb medycznych opracowano stop kobaltowo-chromowo-molibdenowy o nazwie Vitallium. W czasie II wojny światowej zaczęto interesować się tytanem, ale dopiero po 1940 roku wdrożono go i jego stopy do medycyny. W latach 1972-74 w Stanach Zjednoczonych opracowano i opatentowano skład stali medycznej AISI 316L, szeroko stosowanej w implantologii [2].

Powszechnie używana definicja biomateriału to: materiał naturalny lub wytworzony przez człowieka, który umieszczony całkowicie lub częściowo w żywej strukturze lub w zastosowaniach biomedycznych spełnia, podtrzymuje lub zastępuje funkcję naturalną"[3].

Norma Unii Europejskiej definiuje implanty jako: "wyroby medyczne kontaktujące się z tkanką miękką/kością (w tym z płynami śródtkankowymi) (...) oraz z krwią [4].

Mianem wyrobu medycznego określa się: "każdy materiał, instrument, aparat, urządzenie lub inny artykuł, (...) wyłącznie lub głównie w celu diagnozowania, (...) leczenia (...) w stanie chorobowym (...) bądź w przypadku urazu, (...) a także zastępowania lub modyfikacji anatomii albo procesu fizjologicznego [4].

Ze względu na to, że implanty pozostają w kontakcie z różnego typu tkankami i płynami ustrojowymi, muszą spełniać wiele rygorystycznych warunków. Jedną z ważniejszych cech jest biogodność, określana jako zdolność materiału do właściwego funkcjonowania, z jednoczesnym brakiem negatywnego wpływu na organizm biorcy [5]. Niemniej istotną cechą jest biofunkcjonalność, polegająca na wypełnianiu zaplanowanych funkcji in vivo przez zakładany czas, a także odporność na korozję, zużycie ściernie i jednorodność. Do tej pory nie udało się wytworzyć biomateriału, który całkowicie spełniałby wszystkie wyżej wymienione funkcje. Typową, niekorzystną reakcją organizmu na źle dobrany biomateriał jest otaczanie implantu tkanką włóknistą i tworzenie swoistej "kapsuły", w celu wykluczenia biomateriału z kontaktu z tkanką [6]. Dla skutecznego stosowania implantów ortopedycznych i stomatologicznych niezbędne jest uzyskanie zespolenia powierzchni materiału z tkanką kostną [7]. Wszystkie biomateriały ulegają degradacji, przez którą rozumie się przekształcenie materiału w mniej złożone produkty przejściowe lub końcowe. Istotne jest, aby produkty degradacji nie wywoływały negatywnych skutków, takich jak efekty toksyczne, mutagenne, kancerogenne, stany zapalne, oraz by istniała możliwość szybkiego usunięcia ich z organizmu [8].

Implanty metaliczne podlegają procesom korozji zachodzącym pod wpływem płynów ustrojowych. Biokorozję mogą wywoływać również naprężenia istniejące w metalu lub powstające pod działaniem sił zewnętrznych. Produkty korozji mogą utworzyć warstwę przylegającą do powierzchni metalu i w ten sposób zabezpieczać metal przed dalszym niszczeniem [9].

Keywords: metallic implants, surface modifications, biocompatibility  
[Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 52-62]

53

## Introduction

The history of implants reaches many thousand years ago, when Central American Mayas were filling up the losses in dentition with especially chosen shells [1]. First official publication concerning the implants application is originated in 1565, when Petronius wrote about the application of golden plates in purpose of the palate defects correction. In XVII century Fabritius was using the wires made of iron, copper and bronze to connect the bones [2]. In 1804 Bell applied golden and silver needles and also aluminium and brass plates [1].

The brand new metallic materials appeared in the XX century. In 1920 in the USA a new alloy consisting of cobalt-chromium-molybdenum was designed. Its name was Vitallium. During the 2nd World War titanium was in the centre of interest, but finally titanium alloys and titanium itself were implemented to medicine after 1940. In the years of 1972-74 the widely known and applied in implantology medical steel AISI 316L was designed and implemented [2].

Commonly used definition of biomaterial is expressed as following: "material which is natural or designed by man, being placed completely or partially in living structure or biomedical application fulfils, sustains or substitutes the natural function"[3].

European Union Norm defines the implants as: "medical devices that contact with tissue / bone (including body fluids) (...) and blood [4].

The medical products is defined as: "any material, instrument, apparatus, equipment or any other article (...) solely or principally for the purpose of diagnosis (...), treatment (...) of disease (...) or in the case of injury (...), and replacement or modification the anatomy or of physiological process" [4].

Taking into consideration the fact that implants remain in contact with various kinds of tissues and body fluids they have to meet many rigorous conditions. One of the most important features is its bio-compatibility, defined as ability of given material for a proper functioning with simultaneous lack of negative influence on recipient organism [5]. The not less important feature is bio-functionality, consisting of planned functions' performance in vivo during assumed time, and finally the corrosion resistance, abrasive wear and homogeneity. So far it was impossible to create such a material that would completely fulfil all above mentioned conditions and functions. Typical undesirable organism reaction for not-properly chosen biomaterial is surrounding the implant with fibrous tissue and creating a kind of "capsule" to exclude the given biomaterial from organism and any contact with tissue [6]. To effectively use orthopedical and dental implants the materials and osseous tissues surface combination is necessary [7]. All biomaterials are subjected to degradation. It is understood that material transforms into less complex transition or final products. It is important to assure that degradation products will not cause any negative effects (like toxic effects, mutation, cancer, inflammation) and that there is a possibility of fast removing of the implant from an organism [8].

The metallic implants are subjected to corrosion processes being the consequence of body fluids influence. Bio-corrosion can be also caused by the stresses existing in the metal or forming under influence of external forces. The corrosion products can create the layer adhering to the metal surface. Such the layer can protect metal from subsequent

Metalem powszechnie akceptowanym do produkcji implantów jest tytan i jego stopy. Tytan jest wysoce odporny na korozję dzięki cienkiej i stabilnej powierzchniowej warstwie tlenkowej. Jednak warstwa ta może ulec zniszczeniu, co w konsekwencji wywołuje gwałtowne uwalnianie jonów tytanu, które dyfundują do otaczających tkanek i mogą być wraz z krwią transportowane do odległych tkanek [10].

## Modyfikacja powierzchniowa jako metoda poprawiająca właściwości implantu

Biozgodność wszczepu zależy od fizycznej struktury materiału i jego własności fizykochemicznych w obszarze wzajemnego oddziaływania z układem biologicznym [11]. W celu poprawy biotolerancji, odporności korozyjnej i odporności na zużycie ściernie, przy jednoczesnym zachowaniu korzystnych cech biomateriałów, dokonuje się zmian w obrębie warstwy wierzchniej implantu [6].

Modyfikowane powierzchnie wszczepów metalicznych powinny być:

- jednorodne,
- o odpowiedniej adhezji dającej wysoką odporność na delaminację warstwy,
- wytrzymałe i funkcjonalne,
- jak najcieńsze, aby nie zmieniały parametrów geometrycznych i mechanicznych całego implantu,
- wytrzymałe na sterylizację [5].

Wszystkie rodzaje modyfikacji powierzchni implantów metalicznych można podzielić na dwie grupy:

- fizyko-chemiczne, czyli takie które powodują zamierzoną zmianę składu chemicznego na istniejącej powierzchni oraz takie, które zmieniają właściwości fizyczne tj. mikrostrukturę, topografię powierzchni, odporność korozyjną i odporność na zużycie przez tarcie;
- biochemiczne, oparte są na wytwarzaniu lub przyłączaniu związków organicznych, które ułatwiają wiązanie biologicznie aktywnych makrocząsteczek do powierzchni [5].

Modyfikacja powierzchni implantów metalicznych może być wykonywana różnymi metodami, a każda z nich daje nieco inne właściwości powierzchni. Do zastosowań ortopedycznych i stomatologicznych modyfikuje się powierzchnię celem uzyskania odpowiedniego stopnia jej porowatości. Tkanka kostna z łatwością przerasta powłoki chropowate, co zapewnia trwałe połączenie implantu z otaczającą tkanką. Wyniki badań in vitro wskazują na pozytywne związki między chropowatością powierzchni i wiązaniem komórek, aktywacją osteoblastów, syntezą kolagenu i dojrzewaniem chondrocytów [12]. Natomiast w przypadku kontaktu implantu z krwią wymaga się jak najmniejszego stopnia chropowatości jego powierzchni. Mikrowgłębienia na powierzchni są szybko wypełniane przez komórki krwi [13].

Najprostszą modyfikacją powierzchni metalicznych jest szlifowanie materiałem ściernym o różnym stopniu ziarnistości. Pozwala ono na różnicowanie stopnia chropowatości powierzchni. Z powodu wprowadzonych przez materiał ścierny zanieczyszczeń wymagane są dalsze obróbki powierzchni.

Obróbką taką jest między innymi polerowanie elektrolityczne, które jest procesem anodowego roztrawiania metali. Przyłożone napięcie powoduje, że zasadnicza część ładunku elektrycznego gromadzi się na punktach wzniesień chropowatości powierzchni, które dzięki temu są intensywnie roztrawiane i niwelowane [6]. Polerowanie elektrolityczne pozwala uzyskać powierzchnie całkowicie wolne od deformacji bez naruszenia budowy sieci krystalicznej. Stopień wygładzenia jest tym większy, im struktura i skład chemiczny

destruction [9].

The commonly production-accepted metal is titanium and its alloys. Titanium is highly corrosion resistant due to a thin and stable layer of oxides. However such the layer can be destroyed and in consequence allows to rapid titanium ions release. Such ions can diffuse into surrounding tissues and can be transported with blood to distant tissues [10].

## Surface modification as a method improving an implant characteristics

Biocompatibility of implant depends on materials physical structure and its physical and chemical properties in the region of interactions with biological system [11].

Certain changes in the region of implant surface layer are implemented to improve the biotolerance, corrosion resistance and abrasive wear resistance with simultaneous keeping advantageous of biomaterials features [6].

Modified metallic implant surfaces should be:

- homogenous
- with appropriate adhesion, which should give high surface delamination resistance
- durable and functional
- as thinnest as possible to assure that whole implant's geometrical and mechanical parameters are unchanged
- sterilization process resistant

All kinds of metallic implant surface modifications can be divided into following groups:

- physico-chemical - these are the modifications that make intentional chemical configuration changes at the existing surface and such that change the physical properties (microstructure, surface topography, corrosion resistance and abrasive wear resistance)
- biochemical - these modifications base on organic compounds' creation or addition, that facilitate the surface binding of biologically active macromolecules.

The metallic implant surface modification can be performed with various methods. Each of these give slightly different results. In a case of orthopaedic and dental applications the surface is modified in such a way that its porosity is sufficiently high. The osseous tissue binding to a rough surface assures the fixed connection between implant and surrounding tissue. The in vitro examinations show that there are positive relations between roughness of surface and cells binding, activation of osteoblasts, collagen synthesis and cartilage growing [12]. However in the case of implant contact with blood the implant porosity has to be as small as possible. All (even the smallest) pores on the implant's surface are almost immediately filled with blood cells [13].

The easiest modification of metallic implants surface is grinding with different degree of granularity of abrasive material. It allows to diversify the grade of surface roughness. Further treatment is needed since the abrasive material introduces impurities.

The electrolytic polishing is such a treatment. This process is the anodic metal pulping. Applying the voltage causes the effect, that essential part of the electric charge gathers in the points of elevations. Such points are intensively levelled and pulped due to this process [6]. Electrolytic polishing allows to get the surfaces completely free of deformations and without breaking of the crystal structure. The grade of smoothing is the greater if the structure and chemical composition are more homogenous [2]. The sandblasting process is widely used during production of dental and orthopaedic implants [14]. The corundum grains used in this method allow to both clean of the surface and to get its

ny stopu są bardziej jednorodne [2].

Przy wytwarzaniu implantów stomatologicznych i ortopedycznych często stosuje się piaskowanie (sandblasting)[14]. Wykorzystywane w tej metodzie ziarna korundu pozwalają zarówno oczyścić, jak i uzyskać odpowiednią chropowatość powierzchni metalu, co sprzyja osadzeniu się komórek na powierzchni implantu. Uderzenie ziaren korundu o powierzchnię metalu przekazuje jej odpowiednią energię kinetyczną. Energia ta jest częściowo absorbowana przez sieć krystaliczną implantu powodując powierzchniowe topnienie materiału oraz liczne defekty sieci krystalicznej. Wielkość obszaru topnienia i liczba defektów sieci krystalicznej implantu zależy od właściwości podłoża i energii kinetycznej ziaren korundu.

Czyste ziarna korundu są również dodawane do wodnej zawiesiny dwutlenku tytanu lub hydroksyapatytu (HA). Utworzona w ten sposób mieszanka zostaje poddana suszeniu, a następnie spiekaniu. Tak przygotowanymi zianami, których rdzeniem jest korund, modyfikuje się powierzchnię implantu w procesie piaskowania. Warstwy  $TiO_2$  lub HA charakteryzują się dobrą adhezją do powierzchni metalu i nie ulegają zmianom pod wpływem sonikowania, czy też czyszczenia w roztworze alkoholu. Metoda piaskowania pozwala uzyskać powierzchnię implantu o średnim stopniu chropowatości w granicach  $Ra = 10-15 \mu m$ . Na powierzchnię metalu może być również nakładana nierozpuszczalna warstwa krzemowo-ceramiczna. Modyfikowane w ten sposób powierzchnie przyspieszają odnowę tkanki kostnej [14]. Metoda ta, w połączeniu z innymi technikami modyfikacji powierzchni, takimi jak trawienie kwasami, pozwala uzyskać poprawę integracji implantu z kością. Maksymalne wiązanie z kością obserwuje się dla implantów poddanych procesowi piaskowania cząsteczkami  $TiO_2$  o wielkości ziaren w zakresie  $180-220 \mu m$  [12].

Dość popularnym procesem modyfikacji powierzchni tytanu i jego stopów jest hydrotermiczna zmiana powierzchni tytanu poprzez zanurzenie w wodnym roztworze CaO z jednoczesnym ogrzewaniem. Wysokie wartości pH, ciśnienia i temperatury roztworu przyczyniają się do zwiększenia grubości warstwy modyfikowanej powierzchni i wzmagają syntezę tytanianu wapnia na tytanie i jego stopach. Na takiej powierzchni zachodzi zwiększone wytrącanie się apatytu. Dużą zaletą powierzchni poddanej hydrotermicznej obróbce jest jej sterylność, nieodzowna dla wszczepu przed operacją. W metodzie tej dzięki możliwości doboru różnych temperatur i ciśnień, możliwe jest tworzenie różnych mikrostruktur implantu [15].

Prostą metodą chemiczną, dzięki której można indukować bioaktywność tytanu i jego stopów, jest obróbka w wodnym roztworze 10 M NaOH, zakończona ogrzewaniem.

W procesie na powierzchni czystego tytanu i jego stopów Ti-6Al-4V, Ti-6Al-2Nb-Ta, czy Ti-15Mo-5Zr-3Al tworzy się cienka warstwa tytanianu sodu. Na tak przygotowanej powierzchni materiału, w środowisku sztucznego płynu ustrojowego SBF (simulated body fluid) tworzy się gęsta i jednorodna warstwa apatytu. Zmodyfikowana powierzchnia metalu ułatwia łączenie żywej kości z warstwą apatytu. Podczas obróbki cieplnej warstwa hydrożelu jest odwodniona i przekształcona do trwałej postaci amorficznej lub krystalicznej. Możliwość kontrolowania takiej modyfikacji powierzchni może okazać się korzystna w zahamowaniu heterogenicznego zarodkowania warstwy wierzchniej. Daje to pozytywne rokowania w obszarze badań nad zastawką serca i patologicznego zwapnienia, gdzie proces mineralizacji nie jest pożądany [16, 17]. Do modyfikacji powierzchni biomateriałów można również stosować roztwory kwasów. Zanurzając tytan lub jego stopy w kwasie można nadać obrabianej powierzchni specjalne własności elektryczne,

appropriate roughness. This favour the cells settling on the implant surface. The corundum grains that are stroking the metal surface transfers to it an adequate kinetic energy. This energy is partially absorbed by metal crystal net causing the local surface melting and numerous crystal structure defects. The area of melting and the number of crystal structure defects depends on the properties of base and the kinetic energy of corundum grains.

Clean corundum grains are also added to the water suspension of titanium dioxide or hydroxyapatite (HA). The mixture created in this way is subjected to drying and then sintering. Such the grains, which core is corundum, modify the surface of implant during sandblasting process. The layers of  $TiO_2$  and HA indicate good adhesion to the metal surface and sonication process or during cleaning in alcohol solution do not change the properties. The sandblasting method allows also to obtain implant surface with medium level of roughness within the range of  $Ra = 10-15 \mu m$ . The insoluble ceramic-silicon layer can also be applied on the implants surface. The surface modified in this way accelerates the osseous tissue renewal process [14]. This method, combined with other surface modification techniques (such as acids etching), allows to obtain considerable improvement of implant and bone integration. The maximal setting with bone are observed in the case of implants being subjected to sandblasting process with  $TiO_2$  molecules, and size of the used molecules is within a range of  $180-220 \mu m$  [12].

The modification process of titanium and its alloys surface called hydrothermal surface modification is also quite popular. It is performed by immersion in a water solution of CaO and simultaneous heating. The solution high pH, pressure and temperature values are causing the increase of modified layer thickness. It also intensify the calcium titanate synthesis on the titanium and its alloys. At such the surface increased precipitation of apatite occurs. An advantage of surface being subjected to hydrothermal treatment is its sterility which is necessary before implantation. Wide range of temperatures and pressures in this method allow to create different microstructures at implant surface [15].

A treatment in 10 M NaOH water solution finished with heating is a simple chemical method allowing to induce the bioactivity of titanium and its alloys. During this process on the surface of titanium and its alloys (Ti-6Al-4V, Ti-6Al-2Nb-Ta or Ti-15Mo-5Zr-3Al) thin layer of sodium titanate is created. At such the material surface, in the presence of simulated body fluids (SBF), the dense and homogenous apatite layer is created. Modified metals surface facilitates the connection of living bone tissue with apatite layer. During the heat treatment the layer of hydrogel is dehydrated and transformed to a stable amorphous or crystal form. A possibility of control of such the surface modification can be advantageous in an inhibition of top surface heterogeneous nucleation. It gives a positive prognosis in the scope of cardiac valve studies and pathological calcinosis, where the mineralization process is not desirable [16, 17].

Acid solutions can also be used in the biomaterials surface modification process. During the process of immersing of titanium or its alloys in the acid solutions special electric, optic or biochemical properties can be set [18]. The samples of titanium modified with fosfonian acid (eg. Metylodiphosphonic (MDP), propylo-1,1,3,3-tetrafosfononic (PTP) and etylo-1,1,2-triphosphonic (ETP) acids) allow for good proliferation of osteoblasts [19]. It has been observed, that a total number of proteins is much higher at the ETP treated surface than at non-modified versions. Functional groups of these acids improve the cellular adhesion, grow of osseous tissue and connection between implants and bones [19, 20]. The covalent bonds created be-

optyczne i/lub biochemiczne [18]. Próbkę tytanu modyfikowane kwasami fosfoniowymi, (np. kwas metylofosfoniowy (MDP), kwas propylo-1,1,3,3-tetrafosfoniowy (PTP) i kwas etylo-1,1,2-trifosfoniowy (ETP)) pozwalają na dobrą proliferację osteoblastów [19]. Stwierdzono, że całkowita ilość białek jest znacznie wyższa na tytanie modyfikowanym ETP, niż na niemodyfikowanych jego powierzchniach. Grupy funkcyjne tych kwasów poprawiają adhezję komórkową, wzrost i tworzenie się tkanki kostnej oraz połączenie między implantem i kością [19, 20]. Wiązania kowalencyjne powstałe pomiędzy cząsteczkami kwasu fosfoniowego i powierzchnią tytanu mogą w ten sposób tworzyć rusztowania (scaffolds) dla nowo tworzącej się kości, prowadząc ostatecznie do połączenia implantu z tkanką [19].

Bardzo trwałą warstwę fosforanu na tytanie można uzyskać poprzez obróbkę termiczną. Polega ona na uzyskaniu proszku hydroksyapatytowego (HA) na drodze reakcji wytrącenia z roztworu, związków  $\text{Ca}(\text{NaO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  i  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . Wyprażony w piecu próżniowym proszek HA, po uwodnieniu wodą destylowaną, tworzy pastę, w której umieszcza się tytanowe detale. Po naniesieniu pasty, detale te poddaje się suszeniu i obróbce cieplnej. Metoda ta pozwala otrzymać cienką, trwałą fizycznie porowatą warstwę HA. Przestrzeń między porami zwiększa się wraz ze wzrostem ziaren proporcjonalnie do wzrostu temperatury [20].

Warstwa fosforanu wapnia zarodkuje i wzrasta na tytanie z wodnego roztworu poprzez proces powierzchniowo indukowanej mineralizacji fosforanu wapnia (SIM - surface induced mineralization). Proces ten różni się od konwencjonalnych metod wytrącania warstw hydroksyapatytu niską temperaturą obróbki, a także tworzeniem jednorodnych warstw na powierzchniach o złożonych kształtach, jak również na mikroporowatościach powierzchni. Dzięki niskiej temperaturze, możliwe jest sterowanie przemianami fazowymi i procesem krystalizacji. Proces ten może mieć duże znaczenie dla obszaru badań w zakresie patologicznego wapnienia sztucznej zastawki, gdzie proces mineralizacji in vivo nie jest pożądanym. Wstępne wyniki badań pokazują, że tak powstałe warstwy są trwałe, a tempo tworzenia kości jest szybsze, niż na warstwach uzyskanych metodą natryskiwania plazmowego [21].

Duże nadzieje w inżynierii powierzchni wiąże się z metodą wykorzystującą zjawisko ablacji laserowej, która w nomenklaturze międzynarodowej została nazwana metodą osadzania laserem impulsowym PLD-Pulsed Laser Deposition. Polega ona na tym, że silnie zogniskowana, impulsowa wiązka laserowa pada na kolejne miejsca odparowywanego materiału (tarczy). Pochłonięta energia wiązki laserowej powoduje wzbudzenie atomów tarczy, w miejscu padania plamki laserowej, prowadząc do ablacji. Następnie zachodzi oddziaływanie pomiędzy promieniowaniem laserowym, a odparowanym materiałem, którego efektem jest wzrost energii i rozproszenie odparowanego materiału, a potem osadzenie go na modyfikowanym podłożu. Technika PLD można osadzać monowarstwy lub wielowarstwy różnego rodzaju: tlenków, azotków, węglików, borków i innych, lub ich kompozycji. Powłoki uzyskane tą metodą charakteryzują się dobrą adhezją, jednorodnością i nanokrystaliczną strukturą. Możliwe jest otrzymanie cienkich warstw fulerenowych w powłokach węglowych, powłok organicznych składających się z przewodzących polimerów, powłok diamentowych, czy też warstw hydroksyapatytowych [22]. Właściwości promieniowania laserowego pozwalają również na tworzenie i modelowanie rys o głębokości kilku mikrometrów. Hallgren i współpracownicy [23] dokonali modyfikacji powierzchni nośnej gwintu śruby tytanowej, wykorzystując wiązkę laserową o długości fali 532 nm i częstotliwości 10 Hz, emitowaną przez laser neodymowy. Światło la-

twoen phosphonic acid molecules and titanium surface can build, in this way, the scaffolds for newly growing bone, finally leading to connection of implant and tissue [19].

The thermal treatment can create highly resistant layer on the titanium surface. It bases on the gathering of the hydroxyapatite powder (HA) on the way of precipitation reaction from the solution of  $\text{Ca}(\text{NaO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  and  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . The HA powder, being roasted in the vacuum furnace after being hydrated with distilled water, create the paste which is located on the titanium details. After this process the details are subjected to drying and heat treatment. This method allows to get thin and physically resistant rough HA layer. The space among the pores is increased together with increase of grain size and temperature level [20].

The calcium phosphate nucleates and grows on the titanium from a water solution through the surface induced mineralisation (SIM). This process is different than conventional methods of hydroxyapatite layers precipitation due to low treatment temperature and creating the uniform layers on the surfaces with complex shapes and also with surface micro-porosities. Thanks to low temperature there is possibility for control of the transformation phase and crystallisation process. This process can be important for studies in the scope of artificial heart valve calcinosis, where the process of mineralisation in vivo is completely undesirable. Preliminary studies show that such the created layers are stable and the rate of bone creating is faster than in the case of layers being created in the way of plasma spraying [21].

High hopes are connected with the method using the phenomenon of laser ablation, which is named PLD-Method (Pulsed Laser Deposition). Strongly focused impulse laser beam falls on vaporised metal (the shield). The absorption of laser beam causes induction of shield atoms leading to an ablation. Then the reaction between the laser beam and a vaporised metal occurs. It results in increase of vaporized metal energy and further diffuse. Finally the matter is set on the modified surface. The monolayers or multilayers of different kinds (oxides, nitrides, carbides, borides and others and their compositions) can be embedded with PLD method. Layers get with this method are characterised with goods adhesion, homogeneity and nanocrystalline structure. It is also possible to get thin fullerene layers in the carbon coatings, organic coatings consisting of conductive polymers, diamond or hydroxyapatite layers [22]. The laser radiation properties also allow to create and modelling of scratches with depth of a few micrometers. Hallgren and co-workers [23] modified the bearing surface of titanium screw thread using the 532 nm and 10 Hz neodymium laser beam. The laser beam passed through the quartz plate is deflected and then focused on the thread surface in the form of 290 light spots. These spots are penetrating the material for a depth of 30µm and created the craters of 10µm diameter. Such pits allow to be penetrated by osseous tissues and bones creating cells. During the process of ablation the heat is transported through the layer of titanium oxide. In the consequence large tensions are formed in the proximity of craters that can cause micro-breaks among them. This method is used for micro-modelling the threads of dental and orthopaedic implants with complex shapes [23].

With sol-gel method there is possibility to produce inorganic layers, such as glasses and ceramics, on the surface of metallic implants [24]. With this method there are spread layers with one or more components. This technology allows to control the roughness of layer and presence of hydroxyl groups. To improve the properties of HA layers put on the metallic biomaterial, as first the silica layer is embedded, and then the calcium phosphate [6]. The study carried by Michalik and co-workers [25] presents that the ad-

sera przepuszczane przez płytę kwarcową zostaje ugięte, a następnie skupione na powierzchni gwintu w postaci 290 plamek świetlnych. Plamki te penetrują materiał na głębokość  $30\ \mu\text{m}$  i tworzą krater o średnicy  $10\ \mu\text{m}$ . Utworzone wgłębienia pozwalają na penetrację przez komórki kościotwórcze. Podczas procesu ablacji ciepło jest transportowane w warstwie tlenku tytanu. W rezultacie powstają duże naprężenia termiczne, które mogą powodować pęknięcia wokół kraterów. Metoda ta służy do mikromodelowania gwintów implantów stomatologicznych i ortopedycznych o złożonych kształtach [23].

Metodą zol-gel można wytwarzać warstwy nieorganiczne, takie jak szkła i ceramiki na powierzchni wszczepów metalicznych [24]. Metodą tą nanoszone są najczęściej powłoki tlenkowe jedno- i wieloskładnikowe. Technologia ta pozwala na sterowanie porowatością warstwy obecnością grup hydroksylowych. W celu poprawy właściwości warstw HA nanoszonych na biomateriał metaliczny, jako pierwszą nanosi się warstwę krzemionki, a następnie warstwę fosforanu wapnia [6]. Badania przeprowadzone przez Michalika i współpracowników [25] wykazują, że przyczepność powłok HA do podłoża tytanowego jest wyższa, niż badane porównawczo powłoki diamentopodobne. Powłoki HA na podłożu tytanowym otrzymane metodą zol-gel, są powłokami o charakterze dyfuzyjnym. Dość istotną jest możliwość uzyskania warstw HA o działaniu bakteriobójczym zawierających jony srebra, miedzi i cynku [6]. Uzyskane warstwy zapewniają ochronę przed korozją oraz są odporne na ścieranie [24].

Nanoszenie powłok na wszczepy może odbywać się również na drodze elektroforezy [26]. Dzięki odpychaniu się jednakowo naładowanych cząsteczek nie dochodzi do koagulacji i aglomeracji. Metodę elektroforetyczną stosuje się do nanoszenia warstw hydroksyapatytowych z różnego rodzaju zawiesin wodnych. Uzyskane tą metodą warstwy wykazują obniżoną przyczepność do podłoża. Poprawę adhezji można uzyskać poprzez elektroforetyczne nanoszenie powłoki hydroksyapatytowej na wcześniej naniesioną warstwę krzemionki. Zaletą tej metody jest możliwość uzyskania jednorodnej warstwy na wyprofilowanej powierzchni oraz wąski zakres temperatur procesu [6].

Duże znaczenie w modyfikacji powierzchni metalicznych mają chemiczne CVD - Chemical Vapour Deposition oraz fizyczne PVD - Physical Vapour Deposition metody nanoszenia warstw z fazy gazowej [24]. Brak jednolitego nazewnictwa oraz duża różnorodność metod PVD powodują, że często te same metody nazywane są przez autorów różnie [33]. Pomimo różnorodności metod, tylko niektóre z nich znalazły zastosowanie do powierzchniowych obróbek implantów. Wykorzystuje się je głównie do wytwarzania twardych i odpornych na ścieranie oraz korozję powłok węglików, azotków, a także tlenków metali na podłożach stopów metalicznych. Dzięki metodzie RF CVD - Radio Frequency CVD możliwe jest wytworzenie warstw diamentopodobnych DLC (Diamond Like Carbon) oraz warstw nanokrystalicznego diamentu NCD (Nanocrystalline Diamond) [27], które charakteryzują się wysoką biotolerancją [28]. Warstwa węglowa powstała w metodzie RF CVD, poprzez rozkład węglowodorów, ma grubość od kilkudziesięciu do kilkuset nanometrów, jest amorficzna lub nanokrystaliczna. Warstwa węglowa przechodzi w sposób płynny w przejściową dyfuzyjną warstwę węglików metalu, a następnie w podłoże. Taka struktura zapewnia dużą twardość, bardzo dobrą adhezję do podłoża i wysoką odporność korozyjną [29]. Czasami, w celu poprawy adhezji warstwy węglowej do podłoża nanosi się pośrednią amorficzną powłokę silikonową [30]. Warstwy mogą być wykorzystywane do pokrywania implantów stomatologicznych, ortopedycznych i narzę-

hiesion of HA layers to ground is higher than in the case of examined diamond-like layers. The HA layers got on the titanium surface with Sol-Gel method have a diffusive character. Quite important fact is the one, that there is possibility to obtain the bactericidal layers containing silver, copper and zinc ions [6]. The layers obtained are corrosion and abrasion resistant [24].

The layers spread on the implants can be also performed on the way of electrophoresis [26]. Due to electrostatic repulsion of the same charged particles there is no threat of coagulation and agglomeration. The electrophoretic method is used in the case of hydroxyapatite layers formation with different kinds of water suspensions. But layers obtained in this way are characterised with reduced base adhesion. An improvement of adhesion can be obtained by electrophoresis layer embedding on the previously obtained layer of silica. The advantage of this method is the narrow scope of temperatures and possibility of embedding the homogenous layer on the profiled surface [6].

Chemical Vapour Deposition (CVD) and Physical Vapour Deposition (PVD) methods, embedding the layers from the gas phase, have a large importance in the metallic surfaces modification [24]. A lack of unified name system and the large number of various PVD methods cause that many authors call it in the different way [33]. Apart of this variety, only some of them found its usage in the processes of surface treatment of implants. These are used mainly during the production of hard, abrasive and corrosion resistant layers of carbides, nitrides and metallic oxides on the metallic alloys base. Thanks to RF CVD (Radio Frequency CVD) method there is possibility to create diamond-like layers (DLC - Diamond Like Carbon) and layers of nanocrystalline diamond (NCD - Nanocrystalline Diamond) [27], which are characterised with high bio-tolerance [28]. The carbon layer created in the RF CVD method, by the decomposition of hydrocarbons, has the thickness of a few to tens of nanometers and is amorphous or nanocrystalline. The carbon layer transforms smoothly to transitional diffusive layer of metal carbides, and then into a base metal. Such the structure assures high toughness, very good base adhesion and also high corrosion resistance [29]. Sometimes, to improve the carbon layer adhesion to the base, the amorphous silicon layer is embedded [30]. Layers can be used to cover the dental and orthopaedic implants and surgical equipment. The layer of amorphous or crystalline carbon can be also created with the MW CVD (Micro Wave CVD) method and with the method that uses a hot filament (HF CVD) [2]. With PA CVD method (Plasma Assisted CVD) there is possibility to obtain the layer of  $\text{TiO}_2$  on the 316L steel surface. Such a surface can improve the steel corrosion resistance [31].

Plasma Spraying method is also the method of surface modification. Plasma is produced in the burner under the influence of electrical arc created between central tungsten electrode and anode - copper nozzle cooled with water. The coating material is fed in the form of powder directly to a burner by which gas is blown through. This gas transforms into a plasma form (the temperature is in the range of  $10^4\ ^\circ\text{C}$ ). With this method there is possibility to get the HA layers with the nano- and poly-crystalline structure [32]. Moreover it is possible to get the layers with  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZrO}_2$  and pure titanium with this method. [6]. The cohesion forces and the phenomenon of molecules jamming have the influence on the layer adhesion. Taking into consideration all above, it is important to adequately prepare the surface (cleaning from oxides and fats) before plasma spray treatment. The layer adhesion can be also improved by increase of base surface roughness [33].

The glowing methods are also the part of plasma meth-

dzi chirurgicznych. Warstwę krystalicznego lub amorficznego węgla można również uzyskać metodą mikrofalowego wzbudzenia plazmy niskociśnieniowej (MW CVD) oraz metodą z zastosowaniem gorącego włókna (HF CVD) [2]. Metodą PA CVD - Plasma Assisted CVD można otrzymać warstwę  $TiO_2$  na powierzchni stali 316L. Warstwa taka przyczynia się do podwyższenia odporności korozyjnej stali [31].

Technologią modyfikacji warstwy wierzchniej jest także metoda natryskiwania plazmowego (Plasma Spraying). Plazma powstaje w palniku, pod wpływem łuku elektrycznego wytwarzanego pomiędzy centralnie umieszczoną elektrodą wolframową i anodą - miedzianą dyszą chłodzoną wodą. Materiał powłoki podawany jest w postaci proszku do palnika, przez który przedmuchiwany jest gaz przechodzący w stan plazmy (temperatura rzędu 10 000°C). Metodą natryskiwania plazmowego można uzyskać warstwy HA o strukturze nano- i polikrystalicznej [32]. Ponadto tą metodą można również uzyskać warstwy z  $Al_2O_3$ ,  $ZrO_2$ , oraz z czystego tytanu [6]. Na przyczepność powłoki do podłoża mają wpływ głównie zjawiska zakleszczania się cząsteczek i siły kohezji. Z tego powodu, przed natryskiwaniem plazmowym należy odpowiednio oczyścić powierzchnię z tłuszczu oraz z tlenków. Przyczepność powłok do podłoża można zwiększyć poprzez zwiększenie chropowatości powierzchni podłoża [33].

Do grupy technik plazmowych zalicza się także metody jarzeniowe, wykorzystujące wyładowanie jarzeniowe zachodzące w mieszaninie gazowej w zakresie ciśnień  $10^{-3}$ -13 hPa. Używa się w nich zjonizowanego gazu o dużej koncentracji naładowanych cząsteczek, uzyskanego w wyniku przepływu prądu elektrycznego w gazach. Plazma wykorzystywana w technikach jarzeniowych ma charakter niskotemperaturowy, nierównowagowy i nieizotermiczny na skutek ciągłego pobierania energii z pola elektrycznego. Do wytwarzania warstw wykorzystuje się wyładowanie jarzeniowe anormalne, tzn. takie w którym bierze udział powierzchnia całej katody. Wyładowanie jarzeniowe jest źródłem energii cieplnej, które wspomaga i przyspiesza procesy chemiczne i fizyczne zachodzące na granicy faz implant-gaz reaktywny. W piecach jarzeniowych katodą jest wsad, a anodą zimne ściany pieca. W obszarze katodowego spadku potencjału zachodzi dysocjacja cząsteczek gazu i jego jonizacja. W polu elektrycznym dodatnie jony azotu zdążają ku katodzie, przy której ulegają znacznemu przyspieszeniu, zderzając się z nią i oddając jej część swej energii kinetycznej, co z kolei prowadzi do nagrzewania wsadu i częściowego rozpylenia jego powierzchni. Katoda ogrzewana dodatkowo promieniowaniem ciepłym pochodzącym z przykatodowych obszarów wyładowań, adsorbuje atomy gazu, które dyfundują w jej głąb i tworzą związki chemiczne ze składnikami wsadu [33].

Azotowanie i utlenianie jarzeniowe umożliwia wytworzenie warstw typu  $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$  oraz  $TiO_2$  na stopie tytanu OT-4-0 (0,4-1,4% Al; 0,5-1,3% Mn; 0,3% Fe; 0,12% Si; Ti-reszta). Grubości tych warstw wynoszą odpowiednio 35-40  $\mu m$  i 60 nm. Badania przeprowadzone przez Czarnowską i współpracowników pokazują, że warstwy te charakteryzują się dużą biogodnością w odniesieniu do ludzkich fibroblastów [34]. Użycie węglowodorów w technikach jarzeniowych pozwala na wytworzenie warstw węgla tytanu lub warstw węglowych [33,35]. Wierzchoń i współpracownicy, w procesie węglazotowania w warunkach wyładowania jarzeniowego, uzyskali dyfuzyjną warstwę  $Ti(CN)+Ti_2N+\alpha Ti(N)$  na stopie tytanu Ti-1Al-1Mn. Powłoki uzyskane na drodze azotowania i węglazotowania jarzeniowego stanowią barierę przed zajściem zjawiska metalozy, charakteryzują się dobrą odpornością na korozję i na zużycie przez tarcie. W przeprowadzonych badaniach in vivo zaobserwowano wy-

ods. These methods use the glow discharges occurring in the gas mixture in the pressure range 10-3-13 hPa. Ionised gas used in this method, has high concentration of charged particles obtained by current flowthrough the gas. As a consequence of constant power absorption form the electric field, the plasma used in the glowing techniques has a low-temperature character, is non-balanced and not isothermal. During production of surface layer the abnormal discharges is used (i.e. full cathode surface takes part). The glow discharge is the source of heat energy which aids and speeds up the chemical and physical processes taking place in the phases boundary: implant - reactive gas. In the glowing furnaces - the cathode is a sample and anode - cold furnace walls. In the area of cathode potential fall there is dissociation of gas particles and ionisation. In the electric field positive nitrogen ions are heading to the cathode, are rapidly accelerated at the cathode region, and then hitting the cathode. As a consequence they pass part of their kinetic energy to it, what leads to heating the sample and partial atomisation of its surface. The cathode, additionally heated with heating radiation, absorbs the gas atoms which diffuse into the cathode, and make chemical compounds with sample components [33].

Nitriding and oxidizing under glow discharge allows to create the  $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$  layers and  $TiO_2$  on the titanium alloy OT-4-0 (0,4-1,4% Al; 0,5-1,3% Mn; 0,3% Fe; 0,12% Si; Ti- the rest). The thickness of these layers is 35-40  $\mu m$  and 60  $\mu m$ , respectively. The research lead by Czarnowska and co-workers shows that the layers are characterised with big biocompatibility in relation to human fibroblasts [34]. The use of hydrocarbons in the glowing techniques allows for production of carbide layers, titanium carbide or carbon layers [33,35]. Wierzchoń and co-workers got the  $Ti(CN)+Ti_2N+\alpha Ti(N)$  diffusive layer on the Ti-1Al-1Mn base, in the process using carbonitride in the conditions of glowing discharge. The layers got in the way of nitriding and carbonitriding glowing are the barrier against the metalose phenomenon, and are characterised by good corrosion resistance and abrasive wear. In in vivo experiments following was observed: high degree of cells proliferation, smaller thickness of bags developed around the implant and not noticed presence of implant components around. All above is the evidence of layer good biocompatibility [36]. The glowing techniques are used for cleaning, activating and modifying the biomaterials and implants surfaces. The advantage of these methods is possibility of controlling the technological parameters what allows to shape the microstructure and topography of surface. Additionally it allows to control the chemical and phase composition of surfaces being produced. The glowing nitriding process allows also to create outer layer on the elements built of titanium alloys with complicated shapes [34, 35].

The ions implantation is the outer layer treatment based on built-in other atoms in solid body as a consequence of gathering adequate kinetic energy in a strong electric field (ranged from several keV to several MeV). An ion, in the first stage of its movement, causes ionisation of the base and then the exchange of electrons between ion and base atoms. In the final stage of an ion movement, the collisions are of the elastic character [33]. The energy of bombarding ions should be chosen in this way, that the implantation process should be predominant to the ion etching process [27]. The elements the most often used are carbon, nitrogen and silicon [6]. The ions implantation allows to improve the surface toughness and decrease friction coefficient on the basis of changes in the crystal net in the region being located just under the surface [4]. Additionally the ions implantation increases the surface corrosion resistance with

soką proliferację komórek, mniejszą grubość torebek wytworzonych wokół wszczepu oraz nie stwierdzono obecności składników stopu w otaczających tkankach, co świadczy o biogodności tych warstw [36]. Techniki jarzeniowe są stosowane do oczyszczania, uaktywnienia i modyfikacji biomateriałów oraz powierzchni implantów. Zaletą tych metod jest możliwość kontrolowania parametrów technologicznych co pozwala kształtować mikrostrukturę i topografię powierzchni, a także skład chemiczny i fazowy wytwarzanych powierzchni. Proces azotowania jarzeniowego pozwala na wytworzenie wierzchniej warstwy na elementach ze stopów tytanu o złożonych kształtach [34, 35].

Implantacja jonów jest obróbką warstwy wierzchniej, polegającą na wbudowywaniu obcych atomów w ciało stałe, na skutek nabycia przez nie odpowiedniej energii kinetycznej uzyskanej w silnym polu elektrycznym (od kilku keV do kilku MeV). Jon w pierwszym etapie swojego ruchu powoduje jonizację podłoża i dochodzi do wymiany elektronów między jonom a atomami podłoża. W końcowym etapie ruchu jonu w ciele stałym, zderzenia mają charakter sprężysty [33]. Energia jonów bombardujących powierzchnię powinna być tak dobrana, aby proces implantacji przebiegał nad procesem trawienia jonowego [27]. Pierwiastkami najczęściej stosowanymi w celu poprawy właściwości użytkowych implantów są: węgiel, azot i krzem [6]. Implantacja jonów pozwala na poprawę twardości powierzchni i zmniejszenie współczynnika tarcia na skutek zmian w sieci krystalicznej w obszarze położonym tuż pod powierzchnią [4]. Ponadto implantacja jonów zwiększa odporność powierzchni na korozję przy niewielkim zużyciu materiału ochronnego i stosunkowo krótkim czasie obróbki [37]. Krupa i współpracownicy, na podstawie wyników przeprowadzonych badań stwierdzają, że implantacja jonami azotu powierzchni stopu tytanu OT-4-0 poprawia jego odporność korozyjną. Najlepszą odporność na korozję obserwuje się dla warstw wytworzonych przy strumieniu  $1 \times 10^{17} \text{ N cm}^{-2}$ . Jeżeli nanokrystaliczne wtrącenia TiN utworzone podczas implantacji są koherentne (spójne) ze strukturą podłoża tytanowego i jednorodnie rozproszone po całej powierzchni, to proces implantacji jest najkorzystniejszy, a wzrost odporności korozyjnej jest największy [38]. W zastosowaniach medycznych implantacja jonów ma zastosowanie w produkcji endoprotez stawu biodrowego, gdzie obserwuje się nawet kilkudziesięciokrotny wzrost żywotności stawu, wykluczając potrzebę ponownej wymiany protezy po jej zużyciu [6].

Przylączenie związków aktywnych biologicznie jest szeroko stosowaną metodą poprawy właściwości biomateriałów, dzięki której możliwa jest kontrola odpowiedzi na kontakt komórek i tkanek. We wcześniejszych pracach częstym obiektem badań były podłoża polimerowe, ze względu na obecność na ich powierzchniach grup funkcyjnych, umożliwiające łatwe przylączenie związków organicznych. Natomiast metale lub ich stopy nie posiadają takich właściwości.

Najprostszą metodą modyfikacji powierzchni metalicznych jest ich pasywacja, skutkująca powstawaniem tlenków, które dość łatwo adsorbują cząsteczki wody, co prowadzi do powstawania grup hydroksylowych. Możliwe jest również odkładanie białek drogą prostej fizycznej adsorpcji, ale wiązania takie są stosunkowo słabe [39]. Silanizacja była dość długo rozpatrywana jako wzorcowa metoda dla przylączenia związków organicznych do powierzchni  $\text{TiO}_2$ , Ti6Al4V lub Co-Cr-Mo [40, 41], ale niestety jest to proces mało wydajny, bo ograniczony przez niewielką liczbę grup hydroksylowych. Za pomocą spektroskopii fotoelektronów stwierdzono, że tylko ok. 15% tlenu na powierzchni przylącza jon wodorowy [42]. Wiele uwagi poświęca się formowaniu na powierzchni tytanu warstw tlenkowych oraz grup hydroksylowych, które spełniają dużą rolę w tworzeniu po-

small protective material consumption and relatively short treatment time [37]. Krupa and co-workers claims (on the basis of their studies) that nitrogen ions implantation of OT-4-0 titanium surface improves its corrosion resistance. The best corrosion resistance was observed for layers created with  $1 \times 10^{17} \text{ N cm}^{-2}$ . If TiN nanocrystalline inclusions, created during implantation, are coherent with titanium base structure and homogeneously scattered over whole surface, then the implantation process is the most profitable and the increase of corrosion resistance is the biggest [38]. In medical applications, the ions implantation is used in production of endo-hip joint prosthesis, where the life time of implant is tens percent longer, eliminating the need of exchanging the prosthesis after its use [6].

The attachment of biologically active compounds is widely used method for improving of biomaterials properties which allow to control of cells and tissue response to contact with implant surface. The early works was focused on polymer materials due to presence at the polymer surface of functional groups. These groups allowed for easy attach organic compounds. The metals and their alloys do not possess such properties. The easiest way to modify the metallic surface is its passivation causing creation of oxides easily absorbing molecules molecules of water. This, in turn, leads to creation of hydroxide groups. There is also possibility to accumulate of proteins by a simple physical absorption, however these bonds are relatively weak [39]. Silanisation for a long time was considered as a model-method for attachment of organic compounds to surfaces of  $\text{TiO}_2$ , Ti6Al4V or Co-Cr-Mo [41]. Unfortunately this process was of low efficiency since it was limited by low quantity of hydroxide groups. Using the photoelectrons spectroscopy it was found that only 15% of surface oxygen atoms were connected with hydrogen ions. A plenty of attention was focused on the formation of oxides layers and hydroxyl groups, which create organo-metallic surface on titanium. Production of such surfaces is performed at high temperatures with use of oxygen and water. High content of OH groups is closely related to stabilisation of organic compounds on the implant surface, and the method allows to get maximal OH groups quantity at temperature of 550K [42].

Peptides having the Arg-Gly-Asp (RGD) sequence are the most important in modification of metallic implants. Such the sequence is placed in a large number of adhesive proteins and components of extracellular matrix [44,45]. It mediates adhesion of many kinds of cells. There are trials of control of interaction between cell and biomaterial by attaching growth factors to an implant surface. However, when RGD peptides mediate early cells adhesion, released growth factors can modulate other cells functions: proliferation, differentiation and activity on the biomaterial surface [46].

Schwartz and co-workers proposed surface modification of Ti6Al4V alloy that causes significant increase in number of hydroxyl groups. It has been observed that heating of thin layer of phosphoric acid on the alloy surface gives adhered and slightly rough layer of  $\text{Ti}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$ -(TiP). TiP has a layer structure with a large number of OH groups laying at different levels. Further stage of the modification is silanisation with use of aminopropyl(triethoxy)silan and binding of proteins having the RGD sequence. This way prepared surface causes an increase in osteoblasts activity [47].

There is possibility of binding of hydroxyl or amine groups by plasma polymerisation [56] of allylic acid or allyl amines on the surface of Ti6Al4V, respectively. The next step is immobilisation of active proteins, e.g.: morphogenic bone protein (BMP-4), which possess high osteoinductive activity [44], and is capable to induce the osteoblastic response in cells different than bone-making.

Nanci and co-workers [49] prepared a surface titanium



wierzchni organometalicznych. Wytwarzanie takich powierzchni dokonuje się w wysokich temperaturach przy użyciu tlenu i wody. Duża zawartość grup OH jest ściśle związana ze stabilizacją związków organicznych na powierzchni implantu. Metoda ta pozwala uzyskać maksymalną ilość grup OH w temperaturze 550K [42].

Na szczególną uwagę w modyfikacji implantów metalicznych zasługują peptydy zawierające sekwencję Arg-Gly-Asp (RGD) [43]. Sekwencja taka występuje w wielu białkach adhezywnych oraz składnikach macierzy pozakomórkowej [44,45]. Pośredniczą one w adhezji wielu typów komórek. Czynnione są również próby kontroli interakcji komórka-biomateriał poprzez przyłączanie do powierzchni czynników wzrostu. Jednak gdy peptydy zawierające RGD jako pierwsze pośredniczą w adhezji komórek do podłoża, a wtedy uwalniane czynniki wzrostu mogą modulować późniejsze funkcje komórek, takie jak: proliferacja, różnicowanie i aktywność na powierzchni biomateriału [46].

Schwartz i współpracownicy zaproponowali modyfikację powierzchni stopu Ti6Al4V, która pociąga za sobą znaczny wzrost liczby grup hydroksylowych. Stwierdzono, że ogrzewanie cienkiej warstwy kwasu fosforowego na powierzchni stopu daje zaadherowaną i nieco chropowatą warstwę  $Ti(H_2PO_4)_3$ -(TiP). TiP posiada budowę warstwową o dużej zawartości grup OH leżących na różnych poziomach. Kolejny etap takiej modyfikacji to silanizacja z użyciem aminopropylu (triethoxy) silanu i wiązanie białek zawierających sekwencję RGD. Tak przygotowana powierzchnia powoduje wzrost aktywności osteoblastów [47].

Istnieje możliwość wiązania grup hydroksylowych lub aminowych metodą polimerizacji plazmowej [56] odpowiednio kwasu allylowego lub amin allylowych na powierzchni stopu tytanu Ti6Al4V. Następnym etapem to immobilizacja aktywnych białek, np. białka morfogenetycznego kości (BMP-4), które posiada wysoką aktywność osteoindukcyjną [44] i jest zdolne do indukowania odpowiedzi osteoblastycznej w komórkach innych niż kościotwórcze.

Nanci i współpracownicy [49] opracowali metodę modyfikacji powierzchni tytanu umożliwiającą kowalencyjne wiązanie cząsteczek. Metal jest w pierwszym etapie traktowany mieszaniną kwasu siarkowego i nadtlenu wodoru, by spowodować wytworzenie warstwy  $TiO_2$  na jego powierzchni. Następnie do warstwy tlenków przyłącza się aminoalkilosilany pośredniczące w wiązaniu wybranych biomateriałów.

Do modyfikacji powierzchni implantów użyto również fosfolipidów [50]. Kompleksem wapń-fosfolipid-fosforan ( $Ca-PL-PO_4$ ) pokryto powierzchnię tytanu. Jednak spośród wielu badanych fosfolipidów tylko w przypadku fosfatydyloseryny zaobserwowano podwyższoną aktywność osteoblastów i indukowanie osteogenezy [50].

Inną metodą modyfikacji powierzchni tytanu jest wiązanie kolagenu. Technika ta polega na tworzeniu, techniką plazmową, cienkiej warstwy propylenu, wszczępieniu kwasu akrylowego, a następnie przyłączeniu kolagenu. W badaniach in vivo stwierdzono, że tak zmodyfikowana powierzchnia jest aktywna biologicznie i nie jest cytotoksyczna [51].

Puleo i Mikulec przeprowadzili próby skuteczności modyfikacji powierzchni stopów Co-Cr-Mo i Ti6Al4V przy użyciu różnych metod przyłączania grup funkcyjnych. Zasada reakcji polegała na łączeniu grup hydroksylowych powierzchni stopów ze związkami aktywnymi, spośród których jedynie p-NPC (p-nitrophenyl chloroformate) okazał się skuteczny. Trwałość połączenia OH-pNPC potwierdzono oceniając ilość związanej z powierzchnią trypsyny [39, 52].

Zupełnie nowe możliwości daje synteza grup funkcyjnych na powierzchni implantu pokrytego warstwą amorficznego lub nanokrystalicznego węgla. Możliwe jest kontrolo-

modification method allowing for covalent attachment of molecules. In the first step, titanium is treated with mixture of sulphuric acid and hydrogen peroxide to create of  $TiO_2$  layer. Then aminoalkilosilans, mediating of binding of chosen molecules, are attached to the layer of oxides. The phospholipides were also used to modify the implants surface [50]. The surface of titanium was covered with calcium-phospholipide-phosphate ( $Ca-PL-PO_4$ ) complex. However among many phospholipides being examined only fosfatydyloseryne caused an increase in osteoblasts activity and induction of osteogenesis was observed [50].

Binding of collagen is another method of titanium surface modification. This technique bases on creation of thin layer of propylene, implantation of acrylic acid and then collagen attachment. In vivo tests showed that the modified surface is biologically active and is not cytotoxic [51].

Puleo and Mikulec performed tests of modification efficiency of Co-Cr-Mo and Ti6Al4V alloys surface with use of different methods for functional groups attachment. The reaction based on binding of hydroxyl groups at the alloy surface with activating compounds. Only p-NPC (p-nitrophenyl chloroformate) was effective. Durability of OH-pNPC connection was confirmed by estimation of quantity of trypsin attached to the surface [39, 52].

The functional groups synthesis on the implant surface coated with layer of amorphous or nanocrystalline carbon gives completely new possibilities. The controlled introduction of carboxyl groups via chemical synthesis [53,54,55] or plasma synthesis [4,56] is possible. Such the modification combines very profitable properties of carbon coating of metallic material with desired presence of given molecules at implant surfaces.

The most common techniques of metallic implants surface modification have been presented in this thesis. These methods were divided into physico-chemical and biological techniques, but modification methods can also be divided from the point of view of expected type of implant surface. For example HA layer can be achieved with sandblasting method, NaOH treatment, thermal treatment, PLD, Sol-Gel, electrophoretic and plasma spraying methods. Consecutively, carbon layers creation is possible in the way of PLD, RF CVD, MW PCVD or glowing methods, whereas TiN or TiCN layers can be produced via glowing or ions implantation methods.

## Summary

The ideal biomaterial obtaining idea meeting all conditions of total organism tolerance with simultaneous high functionality is today very unreachable. The source of such state is not the matter of today's technology level but it is caused by strongly diversified requirements depending on the purpose of implant. The implant working with blood should be prepared in the different way than the implant dedicated to work with osseous tissue. It seems that such actions targeting on dedicated effects are purposeful. Methods presented in above mentioned review are fulfilling the purposeful metallic implants' surface modification requirements. These methods are becoming more and more wide known in the medical applications. All kinds of modifications are heading to significant improvement of implants' biocompatibility and biofunctionality. It has to be also stressed that nowadays used technologies of surface modification are not increasing the costs of production of prosthesis, thanks to using already known methods of metallic implant production.

wane wprowadzenie grup karboksylowych drogą syntezy chemicznej [53, 54, 55] lub plazmowej [4, 56]. Modyfikacja taka łączy w sobie bardzo korzystne cechy węglowego pokrycia podłoża metalicznego z pożądaną obecnością określonych cząsteczek na powierzchni implantu.

W pracy przedstawiono najczęściej stosowane techniki modyfikacji powierzchni implantów metalicznych, które podzielono na fizykochemiczne i biologiczne. Podziału metod modyfikacji powierzchni implantów metalicznych można dokonać również ze względu na oczekiwany typ warstwy wierzchniej wszczepu. Przykładowo warstwę HA można uzyskać metodą piaskowania, obróbkę w wodnym roztworze NaOH, obróbkę termiczną, metodę osadzania laserem impulsowym-PLD, metodę zol-gel, technikę elektroforetyczną oraz metodę natryskiwania plazmowego. Z kolei wytworzenie powłok węglowych możliwe jest na drodze PLD, RF CVD, MW PCVD lub metodą jarzeniową, natomiast warstwy azotowe mogą być wytwarzane metodą jarzeniową lub implantacji jonów.

## Podsumowanie

Idea uzyskania idealnego biomateriału, spełniającego wszystkie wymagania pełnej tolerancji przez organizm przy jednoczesnej wysokiej funkcjonalności, wydaje się dziś bardzo odległa. Przyczyna takiego stanu rzeczy nie wynika z obecnego poziomu technologicznego, a spowodowana jest silnie zróżnicowanymi wymaganiami w zależności od przeznaczenia implantu. Inaczej musi być przygotowany implant przeznaczony do kontaktu z krwią, a inaczej przeznaczony do integracji z tkanką kostną. Wydaje się, że celowym jest takie postępowanie, które pozwala dokonać modyfikacji powierzchni implantu w ten sposób, aby uzyskać zamierzone efekty. Przedstawione w powyższym przeglądzie metody coraz lepiej spełniają wymogi celowej modyfikacji powierzchni implantów metalicznych i znajdują coraz szersze zastosowanie w praktyce medycznej. Wszelkiego rodzaju modyfikacje zmierzają w kierunku znaczącego poprawienia biogodności i biofunkcjonalności implantu. Należy również podkreślić, że obecnie stosowane technologie modyfikacji powierzchniowej, dzięki wykorzystaniu istniejących już technologii wytwarzania implantu metalowego, nie podnoszą w zasadniczy sposób kosztu przygotowania protezy.

## Podziękowania

*Praca była finansowana przez PBZ-KBN-082/T08/2002*

## Acknowledgements

*This work was supported by PBZ - KBN - 082/T08/2002*

## Piśmiennictwo

## References

- [1] Brzeziński J.: Historia Medycyny. PZWL Poznań 1990.
- [2] Marciniak J.: Biomateriały. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2002.
- [3] Chu P.K., Chen I.Y., Wang L.P., Huang N.: Plasma surface modification of biomaterials. Mater. Sci. Eng R, 36, 2002, 143-206.
- [4] Polska Norma PN-EN ISO 10993-1: Biologiczna ocena wyrobów medycznych.
- [5] Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E.: An Introduction to Materials in Medicine. Academic Press 1996.
- [6] Łaskawiec J., Michalik R.: Zagadnienia teoretyczne i aplikacyjne w implantach. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2002.
- [7] Aselme K.: Osteoblast adhesion on biomaterials. Biomaterials 21, 2000, 667-681.
- [8] Enderle J., Blanchard S., J. Bronzino: Introduction to Biomedical Engineering. Academic Press 1999.
- [9] Jaruga Z., Nowakowska M.B: Chemia ogólna; Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 1990.
- [10] Blumenthal N.C, Cosma V.: Inhibition of apatite formation by titanium and vanadium ions. J Biomed Mater Res 23 (A1suppl.), 1989, 13-22.
- [11] Thull R.: Physicochemical principles of tissue material interactions. Biomol Eng 19, 2002, 43-50.
- [12] Ronold H.J., Ellingsen J.E.: Effect of micro-roughness produced by TiO<sub>2</sub> blasting-tensile testing of bone attachment by using coin-shaped implants. Biomaterials 23, 2002, 4211-4219.
- [13] Martini D., Fini M., Franchi M., Pasquale V.D., Bacchelli B., Gamberini M., Tinti A., Taddei P., Giavaresi G., Ottani V., Raspanti M., Guizzardi S., Ruggeri A.: Detachment of titanium and fluorohydroxyapatite particles in unloaded endosseous implants. Biomaterials 24, 2003, 1309-1316.
- [14] Gbureck U., Masten A., Probst J., Thull R.: Tribochemical structuring and coating of implant metal surface with titanium oxide and hydroxyapatite layers. Mater. Sci. Eng C 23, 2003, 461-465.
- [15] 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.
- [16] Kim H.M., Miyaji F., Kokubo T., Nakamura T.: Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. J Biomed Mater Res 32, 1996, 409-417.
- [17] Kokubo T., Kim H.M., Miyaji F., Takadama H., Miyazaki T.: Ceramic-metal and ceramic-polymer composites prepared by a biomimetic process. Composites 30 Part A 1999, 405-409.
- [18] Krasiczka-Cydzik E.: Badania impedancyjne tytanu i jego stopów implantowych. Inż. Biomat. IV, 2001, 27-31.
- [19] Viorneri C., Guenter H.L., Aronsson B.O., Pechy P., Descouts P.: Osteoblast culture on polished titanium disks modified with phosphonic acids. J Biomed Mater Res 62, 2002, 149-55.
- [20] Hwang K.E., Kim C.S.: Interface characteristics changed by heat treatment of Ti materials with hydroxyapatite. Mater. Sci. Eng C 23, 2003, 401-405.
- [21] Campbell A.A., Fryxel G.E., Linehan J.C., Graff G.L.: Surface-induced mineralization: A new method for producing calcium phosphatase coating. J Biomed Mater Res 32, 1996, 111-118.
- [22] Burakowski T., Major B.: Osadzanie laserem impulsowym PLD. Inż. Mater. XX, 1999, 339-343.
- [23] Hallgren C., Reimers H., Chakarov D., Gold J., Wennerberg A.: An in vivo study of bone response to implants topographically modified by laser micromachining. Biomaterials 24, 2003, 701-710.
- [24] Głuszek J.: Tlenkowe powłoki ochronne otrzymywane metodą zol-gel. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1998.
- [25] Michalik R., Łaskawiec J., Klisch M.: Powłoki ochronne wytwarzane metodą zol-gel na implantach. Inż. Mater. XXIII, 2002, 372-375.

- [26] Kłyszajko-Stefanowicz L.: Elektroforeza w nośnikach, w: *Ćwiczenia z biochemii*; Kłyszajko-Stefanowicz L. (red.) Wydawnictwo PWN, Warszawa 1999.
- [27] Kula P.: *Inżynieria warstwy wierzchniej*. Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź 2000.
- [28] Bąkowicz K., Mitura S.: Biokompatibility of NCD. *J Wide Band-gap Mater.* 9, 2002, 261-272.
- [29] Mitura S., Niedzielski P., Jachowicz D., Louda P., Langer M., Marciniak J., Stanishvsky A., Tochitsky E., Couvrat P., Denis M., Lourdin P.: Influence of carbon origin on the properties important for biomedical application. *Diamond Relat. Mater.* 5, 1996, 1185-1188.
- [30] Chandra L., Clyne T.W., Allen M., Rushton N., Butter R., Lettington A.H.: The effect of biological fluids on the adhesion of diamond-like carbon films to metallic substrates. *Diamond Relat. Mater.* 4, 1995, 852-856.
- [31] Furman P., Głuszek J., Masalski J.: *Struktura i własności elektrochemiczne warstwy TiO<sub>2</sub> otrzymanej metodą MOCVD*. Materiały III Ogólnopolskiej Konferencji, Obróbka powierzchniowa, Częstochowa-Kule 1996, 229-233.
- [32] Łaskawiec J., Michalik R., Klisch M.: Właściwości użytkowe powłok hydroksyapatytowych na implantach z tytanu i jego stopów oraz ze stopów kobaltu. *Inżynieria Materiałowa XXIII*, 2002, 376-379.
- [33] Burakowski T., Roliński E., Wierzchoń T., *Inżynieria powierzchni metali*. Wydawnictwa Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1992.
- [34] Czarnowska E., Wierzchoń T., Maranda-Niedbała A.: Properties of the surface layers on titanium alloy and their biocompatibility in vitro tests. *J Mater Process Technol* 92-93, 1999, 190-194.
- [35] Aronson B.O., Lausmaa J., and Kasemo B.: Glow discharge plasma treatment for surface cleaning and modification of metallic biomaterials. *J Biomed Mater Res* 35, 1997, 49-73.
- [36] Maranda-Niedbała A., Wierzchoń T., Czarnowska E.: Structure and properties of the surface layers produced on Ti-Al-1Mn titanium alloy under glow discharge conditions. *Inż. Biomater.* V, 2001, 25-26.
- [37] Przybyłowicz K.: *Metalożnawstwo*. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2003.
- [38] Krupa D., Baszkiewicz J., Mizera J., Wierzchoń T., Barcz A., Fillit R.: Effect of nitrogen-ion implantation on the corrosion resistance of OT-4-0 titanium alloy in 0.9%NaCl environment. *Surf Coat Technol* 111, 1999, 86-91.
- [39] Puleo D.A.: Biochemical surface modification of Co-Cr-Mo. *Biomaterials* 17, 1996, 217-222.
- [40] Puleo D.A.: Activity of enzyme immobilized on silanized Co-Cr-Mo. *J Biomed Mater Res* 29, 1995, 951-957.
- [41] Puleo D.A.: Retention of enzymatic activity immobilized on silanized Co-Cr-Mo and Ti-6Al-4V. *J Biomed Mater Res* 37, 1997, 222-228.
- [42] Lu G., Bernasek S.J., Schwartz J.: Oxidation of polycrystalline titanium surface by oxygen and water. *Surface Science* 458, 2000, 80-90.
- [43] Ferris D.M., Moodie G.D., Dimond P.M., Gioranni C.W.D., Ehrlich M.G., Valentini R.F.: RGD-coated titanium implants stimulate increased bone formation in vivo. *Biomaterials* 20, 1999, 2323-2331.
- [44] Pierschbacher M.D., Ruoslahti E.: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309, 1984, 30-33.
- [45] Geissler V., Wolf C., Scharnweber D., Worck H., Wenzel P.: Collagen type I-coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblast. *J Biomed Mater Res* 51, 2000, 752-60.
- [46] Puleo D. A., Kissling R.A., Sheu M.S.: A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy. *Biomaterials* 23, 2002, 2079-2087.
- [47] Schwartz J., Avaltroni M. J., Danahy M. P., Silverman B.M., Hanson E.L., Schwarzbauer J. E., Midwood K.S., Gwalt E. S.: Cell attachment and spreading on metal implant materials. *Mater. Sci. Eng. C* 23, 2003, 395-400.
- [48] Mora M., Cassinelli C.: Organic surface chemistry on titanium surface via thin film deposition. *J Biomed Mater Res* 37, 1997, 198-206.
- [49] Nanci A., Wuest J.D., Peru L., Brunet P., Sharma V., Zalzal S., McKee M.D.: Chemical modification of titanium surface for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res* 40, 1998, 324-335.
- [50] Satsangi A., Satsangi N., Glover R., Satsangi R. K., Ong J.L.: Osteoblast response to phospholipid modified titanium surface. *Biomaterials* 24, 2003, 4585-4589.
- [51] Morra M., Cassinelli C., Cascardo G., Cahalan P., Cahalan L., Fini M., Giardino R.: Surface engineering of titanium by collagen immobilization. Surface characterization and in vitro and in vivo studies. *Biomaterials* 24, 2003, 4639-4654.
- [52] Mikulec L.J., Puleo D.A.: Use of p-nitrophenyl chloroformate chemistry to immobilize protein on orthopedic biomaterials. *J Biomed Mater Res* 32, 1996, 203-208.
- [53] Ushizawa K., Sato Y., Mitsumori T., Machinami T., Ueda T., Ando T.: Covalent immobilization of DNA on diamond and its verification by diffuse reflectance infrared spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* 351, 2002, 105-108.
- [54] Ida S., Tsubota T., Hirabayashi O., Nagata M., Matsumoto Y., Fujishima A., Tsubota T., Hirabayashi O., Ida S., Nagaoka S., Nagata M., Matsumoto Y.: Chemical reaction of hydrogenated diamond surface with peroxide radical initiator. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 4, 2002, 806-811.
- [55] Pirek M., Okrój W., Przybyszewska I., Jakubowski W., Walkowiak B., *Chemiczna modyfikacja proszków diamentowych*. *Inż. Biomat.* VII, 2004, 36-39.
- [56] Castaneda S.I., Espinoza V.A.A., Fiere F.L., Franceschini D.F., Jacobsohn L.G.: Surface modifications in diamond-like carbon films submitted to low-energy nitrogen ion bombardment, *Nucl Instr and Meth B* 175-177, 2001, 699-70.