

# REVÍZIÓS, TELJES ÍZÜLETI TÉRDPROTÉZIS IMPLANTÁTUM FELÜLETÉNEK OPTIMALIZÁLÁSA CÉLJÁBÓL ÉRDESÍTETT IMPLANTÁTUM ANYAGOK MIKROSZKÓPIAI ÉS SEJTKULTÚRÁS VIZSGÁLATA

Buzás Krisztina<sup>1</sup>, Tóth Zsolt<sup>1</sup>, Blaskovics Gábor<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Szegedi Tudományegyetem

<sup>2</sup> Metrimed Kft.



DOI: 10.17489/biohun/2024/1/593

## Absztrakt

**Bevezetés:** Jelen kutatás egy állandó orvostechikai problémára, a térdprotézisek beültetésének egyedi helyzetére kíván hatékonyabb megoldást adni. Az ízületi protézisek tartóssága és sikere kulcsfontosságú a betegek életminőségének javításában. A protézis stabilitása szorosan kapcsolódik az oszteointegrációhoz, azaz az implantátum sikeres rögzüléséhez a környező csontszövethez. A porozitás és biokompatibilitás kiemelkedő jelentőséggel bír az oszteointegráció elősegítésében, de az anyagminőség is alapvető fontosságú a sikeres implantációhoz.

**Anyagok és módszerek:** Három különböző anyagösszetételű korongot vizsgáltunk, amelyeken porfúvással porózus felületet hoztak létre. A vizsgálatokhoz optikai mikroszkópot, pásztázó elektronmikroszkópot (SEM), atomi erő mikroszkópot (AFM), in vitro sejtkultúra tesztek és valós idejű polimeráz láncreakciót (qPCR) alkalmaztunk.

**Eredmények:** A mikroszkópiai vizsgálatok a megfelelő anyagminőséget és a felületi érdességet támasztották alá. A qPCR eredmények azt igazolták, hogy a korongok indukálják a mezenchimális őssejtek (MSC) csontirányú differenciációját ezzel elősegítve az oszteointegrációt. A sebgyógyulási esszé eredményei szerint a korongok biokompatibilisek, mert nem akadályozták a sejtek migrációját vagy proliferációját.

**Megbeszélés:** Az ízületi protézisek tartósságának növelése érdekében kulcsfontosságú a megfelelő felületkialakítás és anyagminőség kiválasztása. A vizsgálati eredmények azt támasztják alá, hogy a tesztelt felületek implantátumban való alkalmazása a beültethetőség minőségét javítja, felhasználással a betegek jobb életminősége és az implantátumok hosszabb élettartama érhető el.

**Kulcsszavak:** implantátum, mikroszkópia, sejtkultúrális vizsgálat

**\*Levelező szerző elérhetősége:** Metrimed Orvosi Műszergyártó Kft. H-6800 Hódmezővásárhely, József Attila u. 3.

**E-mail:** [ugyvezeto@metrimed.hu](mailto:ugyvezeto@metrimed.hu) **Tel.:** +36 62 535-470

**Citáció:** Buzás K, Tóth ZS, Blaskovics G. Revíziós, teljes ízületi térdprotézis implantátum felületének optimalizálása céljából érdesített implantátum anyagok mikroszkópiai és sejtkultúrális vizsgálata. *Biomech Hung.* 2024;17(1):7-16.

**Beérkezés ideje:** 2023.12.11. **Elfogadás ideje:** 2024.02.07.

## FACILITATING OSSEOINTEGRATION OF JOINT PROSTHESES WITH POROUS AND BIOCOMPATIBLE IMPLANTS: MICROSCOPIC AND CELL CULTURE INVESTIGATIONS

### Abstract

**Introduction:** The present research aims to provide a more effective solution to a permanent medical technology problem, the unique situation of implanting knee prostheses. The durability and success of joint prostheses are of paramount importance in enhancing the quality of life for patients. Prosthesis stability is closely linked to osseointegration, which refers to the successful integration of the implant with the surrounding bone tissue. Porous and biocompatible surfaces play a critical role in promoting osseointegration, but material quality is also fundamentally important for successful implantation.

**Materials and Methods:** We examined three discs with different material compositions, each of which had a porous surface created through sandblasting. Our investigations involved the use of optical microscopy, scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), in vitro cell culture tests, and quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

**Results:** Microscopic examinations confirmed the appropriate material quality and surface roughness. Results of the qPCR analysis demonstrated that the discs induced bone-oriented differentiation of mesenchymal stem cells (MSC), thereby promoting osseointegration. According to the wound healing assay results, the discs were biocompatible, as they did not impede cell migration or proliferation.

**Discussion:** To enhance the longevity of joint prostheses, the selection of the appropriate surface design and material quality is crucial. The study results support the application of the tested surfaces in implants, improving the quality of implantability, and thereby achieving better patient quality of life and extended implant lifespan.

**Keywords:** implant, microscopy, cell culture investigation

### 1. BEVEZETÉS

Egy implantátum tartóssága nemcsak az anyag szilárdságában rejlik, nagymértékben függ attól, hogy a protézis milyen mértékben rögzül a környező szövetekhez.<sup>1</sup> A múltban ez a stabilitás elsősorban csavarok és csontcementek segítségével valósult meg, azonban fokozottabb rögzítés érhető el, ha a csontszövet az implantátum mátrixba növekszik, és ezzel az implantátumot stabilan az élő csonthoz köti.<sup>2</sup>

Az ízületi implantátum veszteségének két fő oka az aszeptikus meglazulás és a periprotezikus ízületi fertőzés.<sup>3</sup> Az elsődleges és a revíziós helyettesítő műtétek számának növekedésével

az ilyen hibák kiküszöbölésére irányuló megoldások egyre fontosabbá válnak. Az aszeptikus implantátumlazulásnak számos eredője lehet. Ide tartozik az implantátumnak a csonthoz viszonyított mikromotációja, a kopási részecskék képződése, amely gyulladáshoz, illetve csontfelszívódáshoz vezet, valamint az elégtelen oszteointegráció.<sup>4</sup>

Az implantátum és a csont érintkezési helyén kialakuló csontszövet beágyazódás, azaz az oszteointegráció biztosítja az implantátum sikeres beépülését és feladatának hosszútávú megőrzését.<sup>5</sup>

A porózus felületek kulcsfontosságúak az implantátumok tervezésében, mivel elősegítik az

oszteointegrációt és a csontszövet növekedését.<sup>6</sup> A felületi topográfia, azaz a felület mikro- és nanoszintű struktúrája, befolyásolhatja a sejtek tapadását, növekedését és differenciálódását.<sup>7</sup> A porozitás mértékének és eloszlásának gondos tervezése ezáltal lehetővé teszi, hogy az implantátum jobban integrálódjon a környező csontszövetbe, javítva ezzel az implantátum stabilitását és csökkenti a meglazulás kockázatát.<sup>8</sup>

A porozitás mellett a felület megfelelő anyagminősége is alapvető feltétele a sikeres implantációnak. A biokompatibilis felületek alapvetően biztosítják, hogy az implantátumokat a szervezet nem tekinti idegen anyagnak, így elkerülve a nem kívánt immunreakciókat és gyulladáshoz vezető válaszokat.<sup>9</sup> A biokompatibilitás elérése érdekében az anyagokat úgy választják meg és alakítják ki, hogy azok ne okozzanak irritációt vagy allergiás reakciót, valamint ne legyenek toxikusak a környező szövetek számára.<sup>10</sup>

Az oszteointegrációt támogató porózus, biokompatibilis felületek tehát lehetővé teszik a kívánt sejt típusok gyors, szelektív letapadásának és vándorlásának irányítását, illetve az implantátum hosszútávú problémamentes rögzülését.

Jelen tanulmány célja az oszteointegrációt leginkább elősegítő anyagösszetétel és felület kiválasztása volt. Ennek érdekében háromféle anyagösszetételű, porfúvással felületkezelt korongot vizsgáltunk többfajta mikroszkópiai módszerrel, in vitro sejt kultúrákkal és valósidejű polimeráz láncreakcióval (qPCR). A

munka alapján megbecsülhető a különböző implantátum anyagok biokompatibilitása és csontirányú differenciációt elősegítő hatása, azaz, hogy melyik anyag a legoptimálisabb a kívánt cél eléréséhez.

## 2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 2.1. Vizsgált anyagok

A vizsgálatokban háromféle anyagösszetételű korongot (implantátum anyag) hasonlítottunk össze, amelyeken porfúvással egy porózus felület lett kialakítva. A mintákat kódjelzésekkel látták el az [1. táblázatban](#) található módon.

### 2.2. Optikai mikroszkópia

Az optikai mikroszkópiai vizsgálatokhoz egy NIKON ECLIPSE általános mikroszkópot használtunk, ami képes átlátszatlan minták optikai mikroszkópia vizsgálatára reflexiós üzemmódban. A mintákat EPI megvilágítással (halogén lámpa), oldalról történő megvilágítással (hidegfényű LED lámpa) és kombinált megvilágítással vizsgáltuk. Az oldalról érkező fény a mintáról árnyékos képet eredményez, ami a minta felületi egyenetlenségeit jobban érzékelteti. A kombinált megvilágítás egy összetett képet eredményez, amellyel a minta térbeli érdessége jobban megjeleníthető. A képeket mikroszkópos kamerával rögzítettük, a fényintenzitást a mikroszkóp szűrke és napfényszűrői segítségével állítottuk be, a kamera expozíciós ideje 5 ms volt. A vizsgált felület szélessége 4x objektív esetén 3,5 mm, 10x objektívénél 1,4 mm és 20x objektívet alkalmazva 0,7 mm volt.

### 1. táblázat. A vizsgált minták

Kódjelzés	Felépítő elemek	Felületkezelés
5832-3	Titán	Alumínium-oxid
5832-9	Króm-vas-nikkel-molibdén ötvözet	Alumínium-oxid
5832-12	Króm-kobalt-molibdén ötvözet	Alumínium-oxid

### 2.3. Pásztázó elektronmikroszkópia

A pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) vizsgálatokhoz HITACHI 4700S hidegkatódos készüléket használtunk másodlagos elektron és visszaszórt elektron üzemmódban. A minták elemi összetételét energiadisziperzív röntgen mikroanalízis (EDX) vizsgálatokkal határoztuk meg. Az objektívtól a minta távolsága 12 mm, a gyorsító feszültség 25 kV volt.

### 2.4. Atomi erő mikroszkópia

A minták felületi morfológiáját PSIA XE100 atomi erő mikroszkóppal (AFM) vizsgáltuk rezgetett (Non-Contact: NC) üzemmódban. A következő jeleket detektáltuk: topográfia-, hiba-, amplitúdó- és fázis jel. A topográfia értékek hisztogramja alapján becslést adtunk az érdesség mértékéről a  $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$  vizsgált felületen.

### 2.5. Primer mezenchimális őssejtek (MSC)

A primer mezenchimális őssejteket (mesenchymal stem cells – MSC) a laborunkban optimalizált protokoll alapján izoláltuk 6-8 hetes hím C57BL/6 egerek bőr alatti és here környéki zsírszövetéből. Az őssejtek szelektív tenyésztéséhez speciális, mezenchimális őssejtekhez fejlesztett médiumot használtunk (R&D Systems, CCM004, StemXVivo Mesenchymal Stem Cell Expansion Media). A primer MSC kultúrák, hasonlóan a sejtvonalakhoz, fagyaszttva folyékony nitrogénben tárolhatók, de osztódási kapacitásuk véges. A kísérleteket a Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Állatkísérleti és Etikai Bizottsága és a Magyar Nemzeti Állatkísérleti és Etikai Bizottság engedélye alapján végeztük el. (engedélyezési számok: CSI/01/3929-4/2017 és CSI/01/3929-4/2017).

### 2.6. Oszteoszarkóma sejtvonalak

A tanulmányban humán (MG-63) és egér (K7M2) oszteoszarkóma sejteket használtunk. Sejtvonalak lévén, mindkét sejt kultúra korlátlan osztódási kapacitással rendelkezik, jól tárolható folyékony nitrogénben és standard körülmények között tartható, ezért kísérletes eredményeink összevethetők más laborokban kapott eredményekkel. Az MG-63 sejteket ATCC formulájú Eagle-féle minimális esszenciális médiumban (EMEM), a K7M2 sejteket pedig ATCC formulájú Dulbecco-féle módosított Eagle médiumban (DMEM) tenyésztettük, 10% hőinaktivált FBS hozzáadásával, standard körülmények közt ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ).

### 2.7. qPCR

A qPCR analízishez a három különböző alapanyagú (5832-3 (3), 5832-9 (9), 5832-12 (12)) korong mellett növesztett mezenchimális őssejt kultúra, egy kontroll MSC (cont), egy osteogenic differenciációs médiummal kezelt MSC (ODM) és egy egér oszteoszarkóma sejt vonal (MG-63, pozitív cont) is felhasználásra került. A csontdifferenciációs markerek expressziójának nyomon követéséhez a mintákból első lépésben teljes RNS-t izoláltunk ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System

**2. táblázat.** A csontdifferenciációs markerek expressziójának nyomon követéséhez használt primerek

Név	Primer pár szekvenciái	
Runx2	atctgagatttgtggccgg	tagctctgtgtaagtggc
Alp1	cctgggagatggtatggc	attgtccatccagccgg
Col1A1	acgcatggccaagaagacat	gggtttccacgtccacat

#Z6111 kittel, melyhez a gyártó által megadott protokollt követtük. A cDNS elkészítéséhez a reverz transzkripció elegybe 200 ng RNS-t használtunk fel. A reverz transzkripciót követően a cDNS mintákat 3-szorosra hígítottuk a qPCR reakcióhoz. Korábban az RNS izolálás során DNáz-zal kezeltük a mintákat, illetve a qPCR primereit és a reakció körülményeket is úgy állítottuk be, hogy genomi DNS-ről ne tudjon a mérést zavaró amplikon szintetizálódni. A qPCR mérésekhez QIAGEN Rotor-Gene Q MDX eszközt használtunk. A felhasznált célgének expresszió méréséhez [2. táblázatban](#) feltüntetett primereket használtuk fel.

## 2.8. Morfológiai vizsgálat fénymikroszkóppal

A sejt kultúrákon végzett kísérletek legfontosabb eszköze az inverz mikroszkóp, amely a kultúrák mindennapos monitorozását teszi lehetővé, segítségével követhetjük a sejtek morfológiai, valamint osztódási képességükben bekövetkező változásait. Jelen kísérletsorozatban a korongok jelenlétében vizsgáltuk és dokumentáltuk az MSC és MG-63 kultúrák állapotát egy Zeiss Axiovert S100 mikroszkóp és egy Nikon D5000 digitális fényképezőgép segítségével.

## 2.9. Sebgyógyulási esszé

A sebgyógyulási esszé, vagy angol nevén wound healing assay, egy standard in vitro módszer a kollektív sejtmigráció két dimenzióban történő tesztelésére. A teszt során egy konfluens sejt kultúrán „sebet” ejtünk, azaz egy sejtmentes területet alakítunk ki úgy, hogy a sejtrétegbe egy pipettaheggyel sebet karcunk. A sejtmentes terület szélén ülő sejtek vándorlása révén a seb fokozatosan záródik, a záródás folyamata alatt fényképeket készítünk és folyamatosan monitorozzuk a sebszélek távolságát. A képek szoftveres értékelésével a sebzáródás üteme számszerűsíthető, illetve

különböző minták esetén össze is hasonlítható. Mivel az in vitro sebgyógyulásban nem csupán a sejtek migrációs képessége, hanem proliferációjuk üteme és a sejtek közötti interakciók is szerepet játszanak, ezért a teszt elvégzésével egy lépésben választ kaptunk arra is, hogy a vizsgált korongok befolyásolják-e a fentiekben felsorolt sejtszintű folyamatok bármelyikét.

## 3. EREDMÉNYEK

### 3.1 Minták anyagösszetételének vizsgálata energiadiszipatív röntgen mikroanalízissel (EDX)

A minták anyagösszetételének vizsgálatát energiadiszipatív röntgen mikroanalízissel végeztük el. A röntgenmikroanalízis a minták felületközeli-tartományának (~1  $\mu\text{m}$  mélységig) összetételéről ad információt. Az egyes mintákhoz tartozó röntgenspektrumokat az [1. ábra](#) szemlélteti.

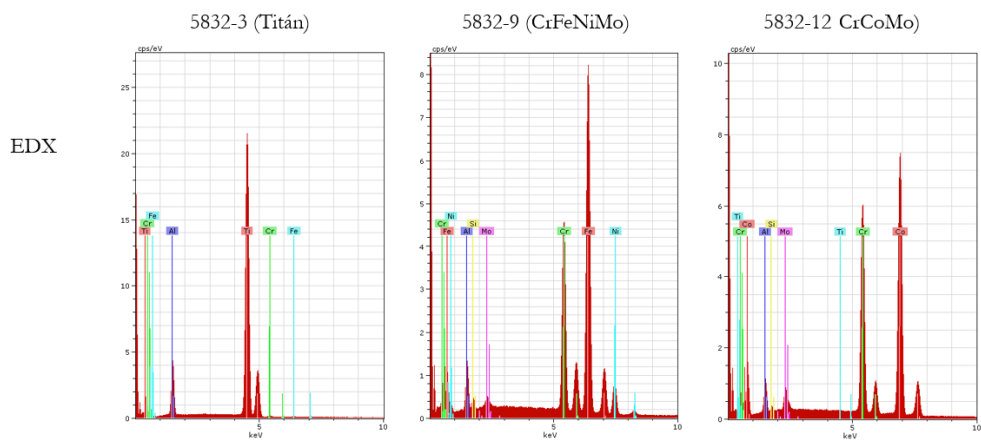
Az alumínium jelenléte minden minta esetében detektálható. Az alumínium alumínium-oxid formában, a porfúvásos felületkezelés következtében jelenik meg a felszínen.

A vizsgálatba bevont három különböző alapanyagú minta fém alkotóelemeinek százalékos összetétele a [3. táblázatban](#) látható.

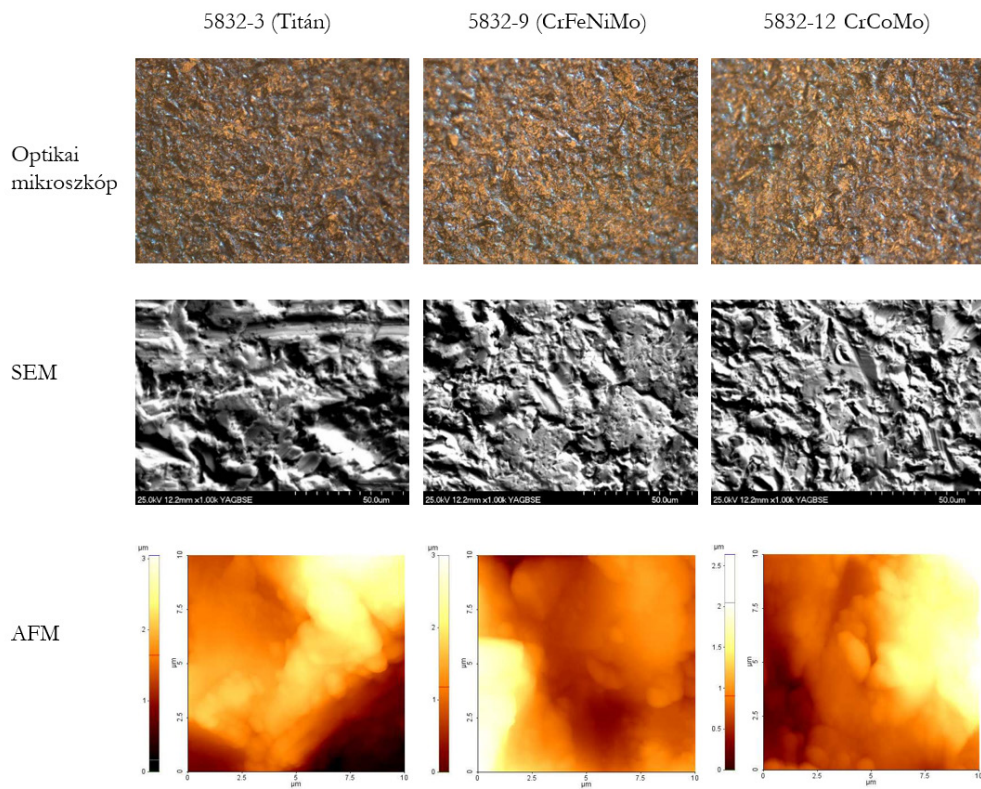
### 3.2. Minták felületének vizsgálata mikroszkópos analízissel (Optikai mikroszkóp, SEM, AFM)

A minták felületének vizsgálatát optikai, pásztázó elektron (SEM) és atomi erő mikroszkóppal (AFM) végeztük el ([2. ábra](#)).

A mikroszkópos vizsgálatok szerint a mintákon a laterális struktúrák mérete az 5-30  $\mu\text{m}$  tartományba esik, egymáshoz képest nagyon hasonlóak. A minták érdességét az atomi erő mikroszkóp topográfia képeiről készült



1. ábra. A minták röntgenspektruma



2. ábra. A minták felülete

hisztogram alapján lehet megbecsülni (4. táblázat).

Az atomi erő mikroszkóp topográfia képeiről készült hisztogram alapján becsülhető az érdesség értéke a vizsgált  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$  felületen. Az érdességek nagyságrendileg megegyeznek, a titán mintákon mért érdesség nagyobb, mint az ötvözeteken becsült érdesség értékek.

### 3.3. Zsírszövet eredetű mezenchimális őssejtek megtapadásának és esetleges csontirányú differenciációjának vizsgálata

Következő kérdésünk az volt, hogy a vizsgálatba bevont korongok képesek-e az őssejtek csontirányú differenciáját indukálni.

Ehhez egyrészt az őssejtek – korongok jelenlétében fellépő – morfológiai változásait, másrészt a 48 órás kultúrák csontirányú differenciációjának, a jellegzetes csontmarker (Runx2 (Runt-related transcription factor2), Alp (Alkaline phosphatase), Coll1A1 (type-1-

collagen)) megjelenését vizsgáltuk qPCR segítségével (3. ábra).

Eredményeink szerint a korongok nem indukáltak morfológiai változást az MSC kultúrákban, azonban a qPCR vizsgálatokból kiderült, hogy a differenciáló médiummal kezelt MSC-k (ODM) és a pozitív kontroll egér oszteoszarkóma (pozitív cont) minták egyaránt drasztikusan csökkent Alp expressziót mutattak, míg a Runx2 nem változott szignifikánsan, viszont a Coll1A1 pedig ellentétes irányú, enyhe növekedést, illetve erőteljes csökkenést mutatott a kezeletlen MSC kontrollhoz képest. A korongokon növesztett minták egyikében sem mutatkozott szignifikáns változás az Alp esetében, míg a Runx2 és Coll1A1 enyhe expressziós emelkedést mutatott. A Runx2 és Coll1A1 emelkedéséből arra lehet következtetni, hogy mindhárom anyagösszetételű korong képes az MSC sejtek csontirányú differenciációját indukálni, amely indukció az 5832-12 kódszámú koronggal növesztett MSC kultúrák esetében volt a legerőteljesebb.

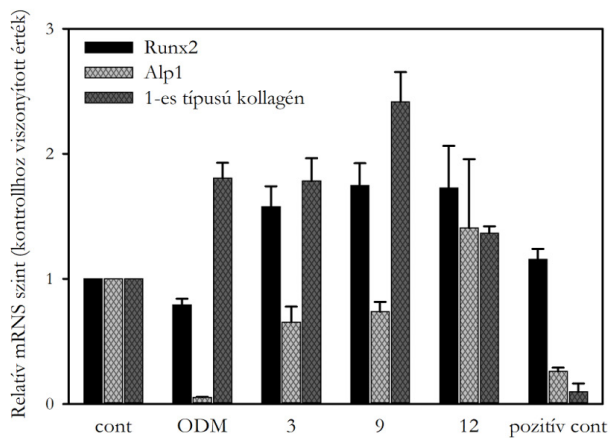
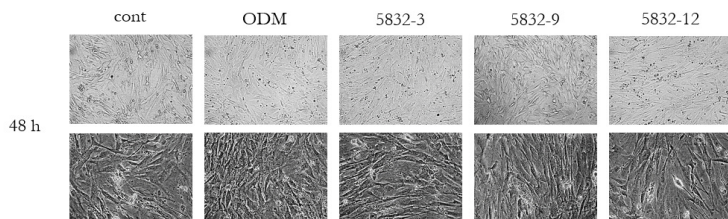
### 3. táblázat. Fémelek atomszázalékos aránya

5832-3 (Titán)		5832-9 (FeCrNiMo)		5832-12 (CoCrMo)	
Alumínium	25,53	Alumínium	13,91	Alumínium	10,88
Titán	74,07	Szilícium	2,52	Szilícium	1,41
Króm	0,27	Króm	19,5	Titán	0,12
Vas	0,13	Vas	54,53	Króm	27,74
		Nikkel	7,47	Kobalt	55,95
		Molibdén	2,07	Molibdén	3,9

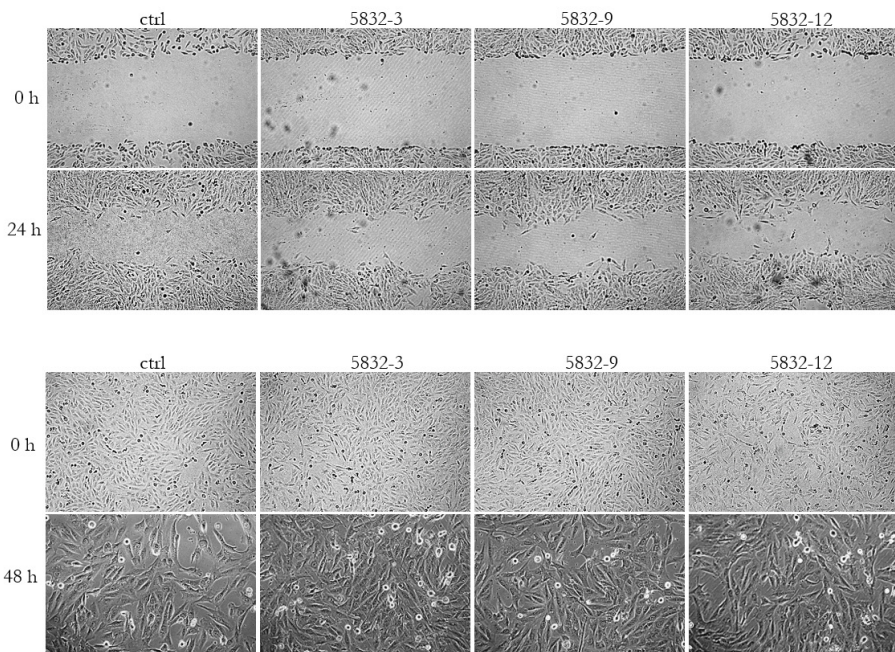
### 4. táblázat. A minták érdessége

Paraméter	5832-3	5832-9		5832-12	
Minta összetétele	Ti	FeCrNiMo	FeCrNiMo	CoCrMo	CoCrMo
Minta érdesség [ $\mu\text{m}$ ]	2	1,4	1	0,85	1





3. ábra. Relatív mRNS szint a vizsgált mintákon



4. ábra. Sejtek módosított megtapadása és proliferációja



### 3.4. Humán oszteoszarkóma sejtek módosított megtapadásának és proliferációjának vizsgálata

A humán oszteoszarkóma sejtek módosított megtapadásának és proliferációjának vizsgálatát sebgyógyulási esszével és morfológiai vizsgálattal teszteltük, melyek eredményét a 4. ábra szemlélteti.

A koronggal tesztelt sebgyógyulási esszé eredménye azt mutatja, hogy a korongok jelenléte alapvetően nem befolyásolja a sejtfunkciókat, nem akadályozza a sejtek migrációját. A kultúrákon egyéb tekintetben sem találtunk morfológiai változást, vagy szemmel látható proliferációs különbséget.

#### MEGBESZÉLÉS

Jelen kutatás egy állandó orvostechikai problémára, a térdprotézisek beültetésének egyedi helyzetére és az állandóan jelenlévő fertőzési kockázatra kíván hatékonyabb megoldást adni. A fő cél az oszteointegrációt elősegítő felület és anyag kiválasztása volt, ezen belül a leghatékonyabb protézis stabilizáló felület kialakítása az implantátum korai (primer) és hosszútávú (szekunder) lazulás elkerülése, illetve a stabilitás idejének növelésének érdekében. Az implantátum beültetést követő primer rögzülését a porfúvással az alaptestre felvitt porózus felület segíti, a szekunder rögzülést hosszú távon a porózus felület sejtbenövése, a csontszövet beágyazódása biztosítja. A kutatás specifikus célja tehát az volt, hogy megállapítsuk, hogy a vizs-

gált anyag- és technológiai kombinációk közül melyik biztosítja leginkább a biokompatibilitás mellett az implantátum stabilitását.

A fenti kérdés megválaszolása érdekében háromféle anyagösszetételű, porfúvással felületkezelt korongot vizsgáltunk többfajta mikroszkópiai módszerrel, in vitro sejt kultúrákkal (qPCR) analízissel.

A mikroszkópos analízisek segítségével az anyagösszetétel és a felület érdessége vizsgálható. A felület érdességét adó makro- vagy mikrostruktúrák rendkívül változatosak lehetnek. Az implantátum-felület kialakításánál az oszteointegráció folyamatában kulcsszerepet játszó sejtek, az oszteoblastok méreténél (10-40  $\mu\text{m}$ ) jóval kisebb érdességű felületet nem érdemes alkalmazni. Vizsgálatainkban a tesztelt korongok felülete 0,85  $\mu\text{m}$  - 2  $\mu\text{m}$  között adódott.

Az in vitro és qPCR vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy a korongok jelenléte alapvetően nem befolyásolja az MSC és oszteoszarkóma sejtek morfológiáját, illetve az alapvető sejt-funkciókat, és nem akadályozza a sejtek migrációját, másrészt mindhárom anyagösszetételű korong képes az MSC sejtek csontirányú differenciációját indukálni.

A vizsgálati eredmények azt támasztják alá, hogy a vizsgált felületek hozzájárulnak a biokompatibilitáshoz és a sikeres oszteointegrációhoz, implantátumban való alkalmazásuk a beültethetőség minőségét javítja.

**A szerzők részvétele:** B.K.: mérések, kiértékelés, T.ZS.: kéziratkészítés, koncepció, mérés, B.G.: koncepció, szervezés

**Köszönetnyilvánítás:** -

**Támogatás:** A kutatás a GINOP-2.1.7-15-2016-02182 pályázati projekt támogatásával valósult meg.

**Összeférhetlenség:** Nincs.

## IRODALOM

1. *Robertson DM, Pierre L, Chahal R.* Preliminary observations of bone ingrowth into porous materials. *J Biomed Mater Res.* 1976 May;10(3):335–44.
2. *Ryan G, Pandit A, Apatsidis DP.* Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications. *Biomaterials.* 2006 May;27(13):2651–70.
3. *Raphel J, Holodniy M, Goodman SB, Heilshorn SC.* Multifunctional coatings to simultaneously promote osseointegration and prevent infection of orthopaedic implants. *Biomaterials.* 2016 Apr;84:301–14.
4. *Sundfeldt M, Carlsson LV, Johansson CB, Thomsen P, Gretzer C.* Aseptic loosening, not only a question of wear: a review of different theories. *Acta Orthop.* 2006 Apr;77(2):177–97.
5. *Brånemark PI.* Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent.* 1983;50(3):399–410.
6. *Liu Y, Rath B, Tingart M, Eschweiler J.* Role of implants surface modification in osseointegration: A systematic review. *J Biomed Mater Res A.* 2020 Mar;108(3):470–84.
7. *Boyan BD, Cheng A, Olivares-Navarrete R, Schwartz Z.* Implant surface design regulates mesenchymal stem cell differentiation and maturation. *Adv Dent Res.* 2016 Mar;28(1):10–7.
8. *Gittens RA, Olivares-Navarrete R, Schwartz Z, Boyan BD.* Implant osseointegration and the role of micro-roughness and nanostructures: Lessons for spine implants. *Acta Biomater.* 2014 Aug;10(8):3363–71.
9. *Möller B, Terheyden H, Açil Y, Purcz NM, Hertrampf K, Tabakov A, et al.* A comparison of biocompatibility and osseointegration of ceramic and titanium implants: an in vivo and in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012 May;41(5):638–45.
10. *Plečko M, Sievert C, Andermatt D, Frigg R, Kronen P, Klein K, et al.* Osseointegration and biocompatibility of different metal implants - a comparative experimental investigation in sheep. *BMC Musculoskelet Disord.* 2012 Dec;13(1):32.