

Osteoblastenkulturen zur Charakterisierung der Biokompatibilität moderner Implantatoberflächen

Implantateinheilung

Von Marcus O. Klein¹, Bilal Al-Nawas¹, Ana Bijelic¹, Nora Wörsdörfer¹, Hermann Götz², Wilfried Wagner¹, Heinz Duschner², Mainz

Im folgenden Übersichtsreferat geben die Autoren einen Überblick über die unterschiedlichen Phasen der Implantateinheilung – von der mechanischen Primärstabilität bis hin zur funktionellen Osseointegration. Im Anschluss daran werden exemplarisch unterschiedliche zellexperimentelle Versuchsansätze vorgestellt, welche den Stellenwert von Osteoblastenkulturen als Biokompatibilitätstests unterstreichen. Die Zusammenführung der einzelnen Ergebnisse liefert einen guten Überblick über die Qualität der Implantatoberfläche und unterstreicht den Stellenwert dieses präklinischen Forschungszweiges.

Indizes:
Implantateinheilung
Implantatoberflächen
Biokompatibilitätstests
Osteoblastenkultur

Eine erfolgreiche Osseointegration ist ein wichtiger Parameter des Langzeiterfolges dentaler enossaler Implantate und hängt direkt mit deren Oberflächenbeschaffenheit zusammen. Zahlreiche Modifikationen der Implantatoberfläche haben somit eine Verbesserung der Biokompatibilität im Sinne der primären Zellantwort zum Ziel. Die Durchführung gezielter Zellexperimente in vitro erlaubt uns heute, schon präklinisch wichtige Informationen über die unterschiedlichen Implantatoberflächen zu gewinnen und gewährleistet somit erste Abschätzungen bezüglich des zu erwartenden Einheilverhaltens im menschlichen Kiefer.

Anforderungen an moderne Implantatsysteme

Die Insertion enossaler Titanimplantate ist heute eine weit verbreitete und wissenschaftlich fundierte Therapieoption bei der kaufunktionellen Rehabilitation teilweise bzw. vollständig zahnloser Kiefer und dient zur Fixierung kieferorthopädischer Apparaturen und Epithesen. Viele Langzeitstudien belegen eine hohe Erfolgsrate insbesondere für Insertionen dentaler Implantate in Kieferregionen mit guter mechanischer Knochenqualität, wie zum Beispiel die interforaminale Region des Unterkiefers [13]. Dies führte zu stetiger Erweiterung der Implantat-Indikation auf Re-

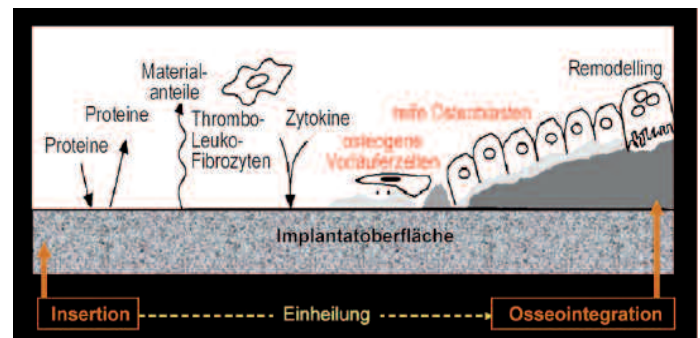


Abb. 1 Schematische Darstellung der zeitlichen und zellulären Vorgänge am Implantat-Knochen-Interface (modifiziert nach [24])

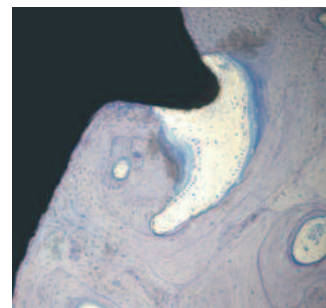


Abb. 2 Ausschnitt der Knochenkontakfläche eines funktionell im Unterkiefer eingeeilten SLA-Implantates (Straumann GmbH, Freiburg). Humane Histologie, das Implantat musste im Rahmen einer Tumoresektion entfernt werden.

gionen mit ungünstigerer mechanischer Knochenqualität (z. B. Oberkiefer-Seitenzahngelände, Knochenaugmentationen) sowie zur Etablierung immer offensiverer Implantations-, Einheil- und Belastungsstrategien wie Sofortimplantation, Sofortversorgung oder Sofortbelastung. Diese erweiterten Anwendungsspektren gehen naturgemäß

mit einem erhöhten Implantat-Verlustrisiko einher [12, 28] und stellen somit maximale Anforderungen an Implantat(makro-)design und (Mikro-) Oberflächenstrukturierung der verwendeten Implantate.

Phasen der Implantateinheilung

Die direkt nach erfolgter Implantatinsertion objektivierbare Primärstabilität ist eine Funktion aus mechanischer Knochenqualität, Implantat (schrauben-)geometrie und Eindrehmoment [19, 20]. Eine ausreichend hohe Primärstabilität ist zwingende Voraussetzung für Versorgungsstrategien im Sinne von Sofort- oder Frühbelastung und bedeutsam für das langfristige Ziel einer jeden Implantation, nämlich einer schnell eintretenden und anhaltenden Sekundärstabilität bzw. Osseointegration, unter welcher der funktionelle Verbund zwischen Implantatkörper und umgebenden Kno-

Zentrum für zahnärztliche Verbundforschung

¹ Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

² Angewandte Struktur- und Mikroanalytik Johannes Gutenberg-Universität Mainz

■ Implantat-einheilung

chengewebe verstanden wird. Ein erfolgreiches Implantat-einheilen setzt jedoch eine hohe Biokompatibilität der Implantatoberfläche voraus, welche Schauplatz der im Folgenden beschriebenen biologischen Prozesse ist:

Direkt nach erfolgter Implantatinsertion besteht die initiale, transiente organische Matrix um und auf der Implantatoberfläche aus Blutbestandteilen wie roten Blutkörperchen, Fibrin, Albumin und Thrombozyten, ähnlich der Situation in einem Bruchspalt. Untersuchungen belegen, dass unterschiedlich modifizierte Implantatoberflächen sowohl Fibrinadsorption als auch Thrombozytenaktivierung und -aggregation unterschiedlich stark fördern [11, 15, 18, 22]. So findet sich auf rauen (z.B. geätzt oder gestrahlt) Implantatoberflächen nach zirka 30 Minuten in deutlich höhere Thrombozytenaktivierung als

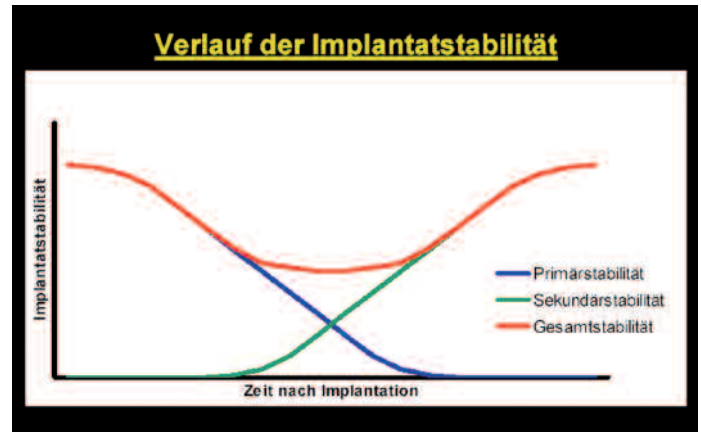


Abb. 3 Der resorptionsbedingte Rückgang der Primärstabilität wird erst nach einiger Zeit durch die zunehmende Sekundärstabilität ausgeglichen, was sich in einem vorübergehenden Rückgang der Gesamtstabilität äußert (modifiziert nach [10])

auf relativ glatten Oberflächen [23]. In der nun folgenden, sogenannten Inflammationsphase erfolgt die Einwanderung von Entzündungszellen wie Monozyten. Auch diese Vorgänge werden durch raue Implantatoberflächen begünstigt [26]. Die bei den oben ge-

nannten Vorgängen freigesetzten Zytokine führen zur Chemoattraktion und zur Einwanderung von potenten osteoblastären Vorläuferzellen durch dieses periimplantäre „Gerinnsel“. Dieser Prozess dauert Tage. Nach einer erfolgreichen Adhäsion osteoblastärer (Vorläufer-) Zellen auf der Implantatoberfläche, gefolgt von Ausdifferenzierung in reife Osteoblasten, kommt es schlussendlich zur Bildung von Knochenmatrix und zum erwünschten festen Verbund zwischen Implantat und umgebenden Knochen [9]. Es folgt nun ein lebenslanges Knochenremodelling als Antwort auf die funktionelle (Kau-)Belastung des Implantates und den physiologischen Knochenumbau [27] (Abb. 1 und 2).

Abb. 3a Ankylos plus-Oberfläche: korundgestrahlt, thermisches Ätzverfahren (1500-fach vergrößert, Friadent GmbH, Mannheim).

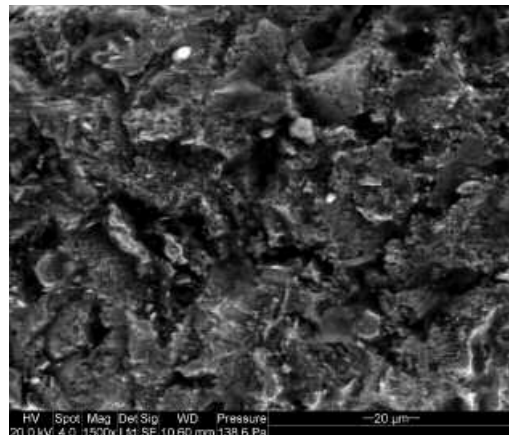
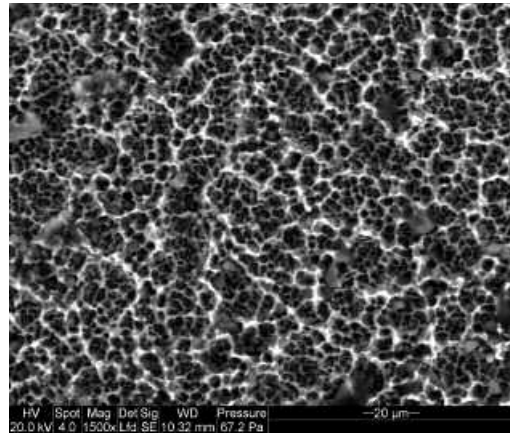


Abb. 3b OsseoSpeed-Oberfläche: gestrahlt mit Titandioxid-Partikeln, fluorid-modifiziert (1500-fach vergrößert, Astra Tech GmbH, Elz).

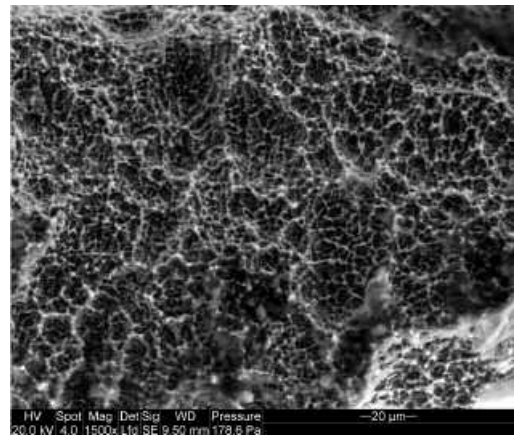


Abb. 3c SLActive-Oberfläche: sandgestrahlt, geätzt; hydroxylierte Oberfläche, konditioniert unter Stickstoffatmosphäre (1500-fach vergrößert, Straumann GmbH, Freiburg).

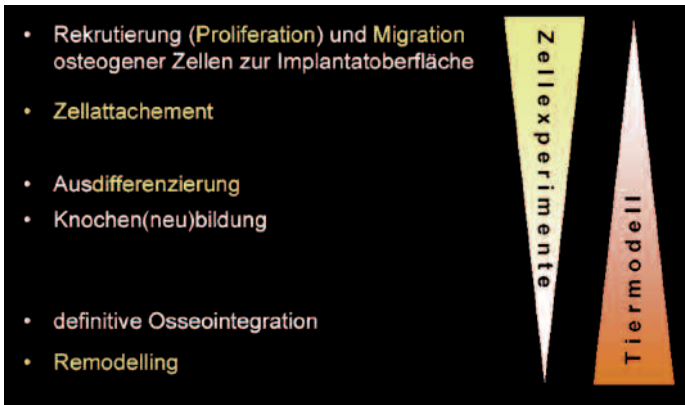


Abb. 5 Untersuchungen zur osteoblastären Proliferation, Migration, Adhäsion und Differenzierung sind klassische Domänen des Zellexperimentes, während Osseointegration und Remodelling im Tiermodell analysiert werden

Modifikationen der Implantatoberflächen

Diesen Ausführungen lässt sich entnehmen, dass Implantateinheilung nicht erst mit dem Erscheinen von osteoblastären Zellen auf der Implantatoberfläche beginnt, sondern schon durch die erste Interaktion mit den oben erwähnten Komponenten und Substraten maßgeblich beeinflusst wird. Die Weichen für eine erfolgreiche Implantateinheilung werden demnach schon vor der Adhäsion der ersten osteoblastären Zelle gestellt. Modifikationen der Implantatoberflächen verfolgen somit das Ziel der Be-

schleunigung dieser initialen biologischen Kaskaden, um die „vulnerable Phase“ zwischen initialer Primärstabilität und definitiver Osseointegration (Sekundärstabilität) möglichst kurz zu halten (Abb. 3). Eine ideale, die Osseointegration fördernde Implantatoberfläche sollte demnach die Adsorption von Blutkomponenten (Fibrin) und weiteren Liganden wie zum Beispiel Proteine der extrazellulären Matrix (Fibronektin, Kollagen) vermitteln und somit Voraussetzungen für eine suffiziente Adhäsion und Ausdifferenzierung osteogener Zellen schaffen [6, 9, 14]. Zahlreiche experimentelle Ansätze befassen sich



Abb. 6 Vom Implantat zur Scheibe

mit einer Steigerung der Implantatbiokompatibilität, sei es durch Modifikationen der Titanmikrostruktur [5, 16, 30], durch chemische Modifizierungen (Fluoridapplikation) [8] oder durch Beschichten mit funktionellen Proteinliganden bzw. Zytokinen wie Kollagen oder bone morphogenetic protein [17, 25]. Ein weiterer Ansatz besteht in der Steigerung der Oberflächenenergie bzw. Hydrophilität der Implantatoberfläche, was

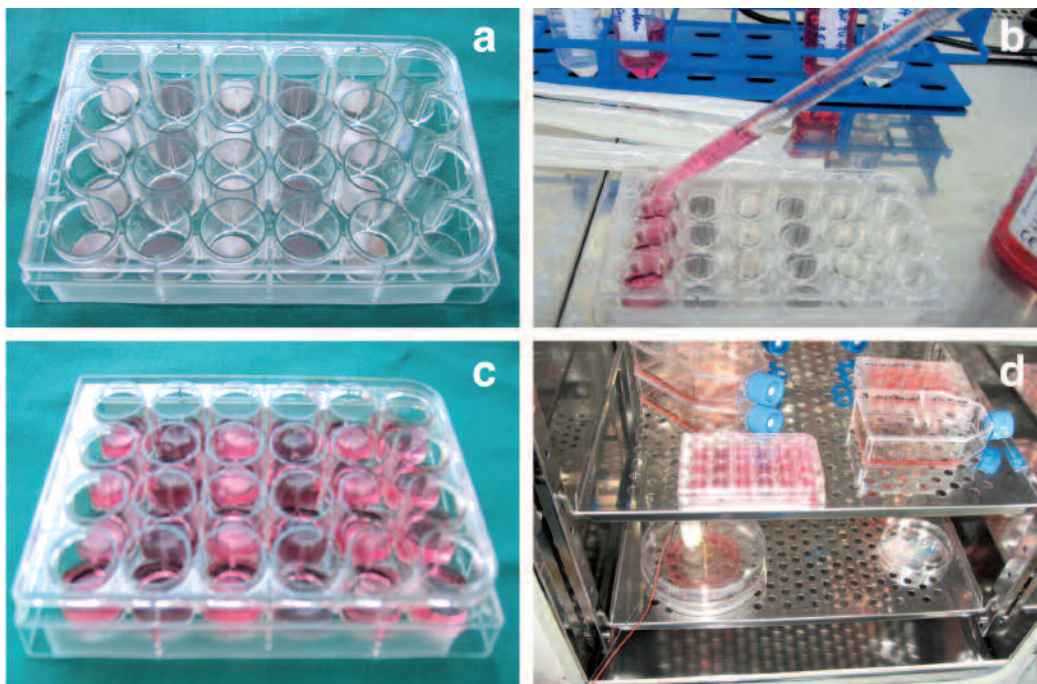


Abb. 7 Nach Überführung der Implantatscheiben in geeignete Kultivierungsplatten (a) erfolgt die Zugabe von Nährmedium (b, c) und die Kultivierung im Brutschrank (d)

■ Implantat-einheilung

wiederm in einer gesteigerten Proteinadsorption resultiert [7, 29]. Die Abbildungen 4a bis 4c zeigen exemplarisch unterschiedliche Modifikationen der Titanoberflächen kommerzieller, dentaler Implantate (rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen, 1500-fache Vergrößerung). Etablierte und von unserem Zentrum routinemäßig durchgeführte Untersuchungsmethoden zur Charakterisierung von Implantatoberflächen sind neben Bestimmungen der Implantatoberflächentopographie mit Erhebung von Rauigkeitsparametern [2, 3] insbesondere auch die Ermittlung der chemischen Oberflächenzusammensetzung als Anhalt für die zu erwartende Biokompatibilität und Proteinadsorptionsfähigkeit.

Es wird hiermit deutlich, dass moderne Implantat(grundlagen)forschung nicht mit dem Erheben klinischer Parameter wie Implantatfestigkeit (RFA-Messungen, Periotest) und Implantatüberleben oder der Auswertung tierexperimenteller Daten beginnt, sondern zu einem beträchtlichen Teil durch präklinische Forschung abgedeckt werden kann und

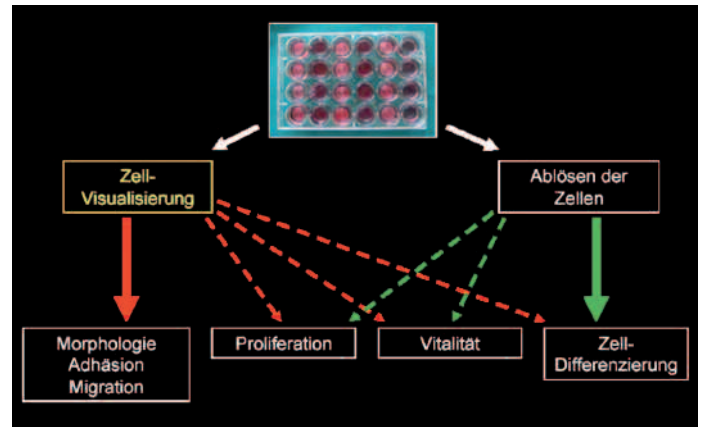


Abb. 8 Zellvisualisierung bzw. laborchemische Untersuchungsmethoden gewährleisten unterschiedliche Informationen über den Zellzustand auf der Implantatoberfläche

bildet hierbei nach erfolgter Oberflächencharakterisierung einen heute nicht mehr wegzudenkenden Bestandteil dieser Grundlagenforschung.

Biokompatibilitätstests mit Osteoblastenkulturen

Möglichkeiten und Grenzen der Zellexperimente

Wie aus den bereits erfolgten Ausführungen ersichtlich, sind die Einheilvorgänge direkt an der Implantatoberfläche vielfältiger und komplexer Natur und im natürlichen,

definierten Parameter (z.B. Implantatoberflächen-Eigenschaften) und ermöglicht genaue Untersuchungen bestimmter osteoblastärer Zellparameter wie Proliferation, Migration oder Differenzierung (siehe unten). Ein weiterer Vorteil gegenüber Tierexperimenten und klinischen Studien liegt in der Möglichkeit einer kontinuierlichen Beobachtung individueller Zellen (z.B. Videomikroskopie), so dass dynamische Zellattribute wie Migration und Proliferation viel besser dokumentiert werden können. Es leuchtet jedoch ein, dass sich die im Labor gewonnenen Erkenntnisse nur bedingt auf die in vivo Situation übertragen lassen. Dennoch gewährleisten geeignete Zellexperimente heute unverzichtbare Einblicke in die frühen Interaktionen zwischen osteoblastärer Zelle und Implantatoberfläche, während sich spätere Vorgänge im Rahmen des Knochenremodelling eher im Tiermodell beurteilen lassen (Abb. 5). Zusammenfassend kann man sagen, dass sowohl in vivo- als auch in vitro-Modelle charakteristische Vor- und Nachteile aufweisen, die es bei der Zielsetzung, Auswertung und Diskussion der Untersuchung zu berücksichtigen gilt.

Titanscheiben als Modell

Es hat sich durchgesetzt, anstelle der Originalimplantate

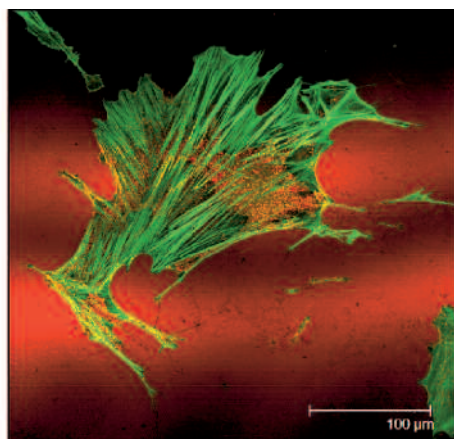
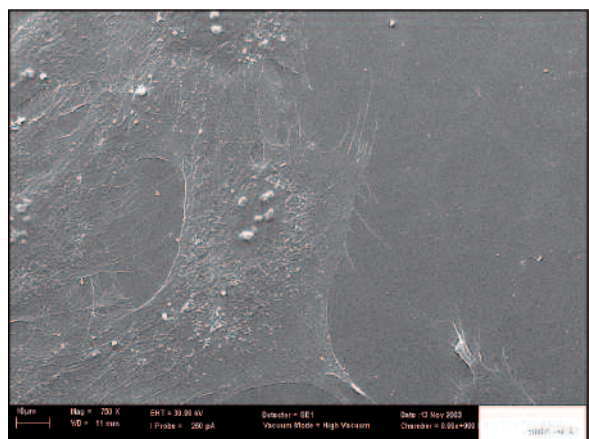


Abb. 9 und 10 Elektronenmikroskopische und immunhistochemische (Aktin-Zytoskelett) Darstellungen osteoblastärer Zellen

sollte. Letztendlich könnten dann ethisch und klinisch anspruchsvolle Tiermodelle der zielgerichteten Bestätigung präklinisch optimierter Eigenschaften vorbehalten bleiben. Die gezielte Durchführung von Zellexperimenten

dreidimensionalen Milieu extrem schwierig, wenn nicht gar unmöglich nachzuvollziehen. Die Reduzierung auf vereinfachte und reproduzierbare Versuchsbedingungen in vitro erlaubt uns hierbei die gezielte Veränderung einzel-

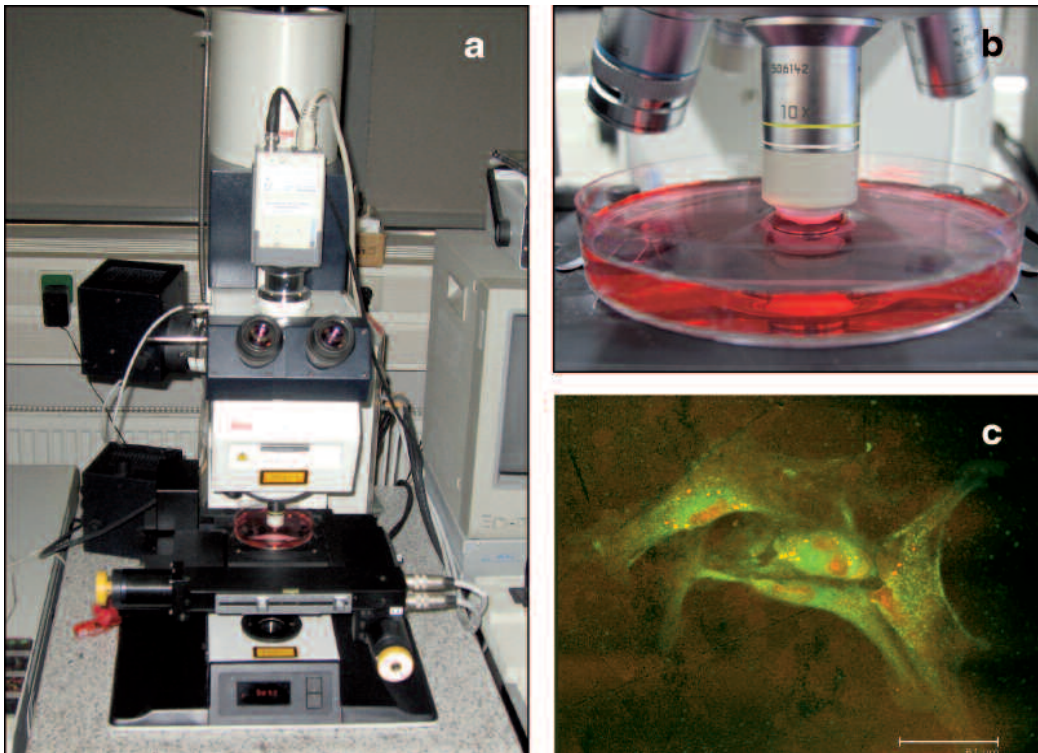
Implantat-
einheilung

Abb. 11
Das Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM, a) erlaubt durch die Verwendung geeigneter Eintauchobjektive (b) die Beobachtung lebender vitalgefärbter Zellen mit synchroner Darstellung der Implantatoberfläche (c)

auf flache Scheiben als Modelloberflächen zurückzugreifen. Dies bietet den Vorteil der Reduktion der komplexen Schraubengeometrie auf eine (mehr oder weniger) zweidimensionale Fläche, natürlich unter Erhalt der wichtigen Oberflächenmerkmale wie Beschichtung, Rauigkeit oder auch so genannter „Microgrooves“ (Abb. 6). Dieser Ansatz gewährleistet neben einer besseren Reproduzierbarkeit und Vereinfachung der Versuchsbedingungen vor allem auch Kostenersparnis. Neben der Untersuchung kommerzieller Implantatoberflächen – hierbei werden die Scheiben in der Regel von der jeweiligen Implantatfirma zur Verfügung gestellt – bietet sich zudem die Möglichkeit, eigene Modelloberflächen zu designen und zu testen.

Kultivierung der Modelloberflächen

Nach erfolgreicher Oberflächencharakterisierung werden die Implantatscheiben mit einer definierten Anzahl osteoblastärer Zellen besiedelt. Die Verwendung geeigneter Nährmedien sowie konstante Brutschrankbedingungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, pCO_2) gewährleisten optimale Wach-

tumsbedingungen für die Zellen (Abb. 7).

Die folgenden Ausführungen geben nun einen Überblick über gängige zellexperimentelle Versuchsansätze. Allen gemeinsam ist, dass man osteoblastäre Zellen unterschiedlichen Ursprunges auf die zu untersuchenden Oberflächen kultiviert und nach definierten Zeitintervallen (z.B. nach 24h, 48h, 72h, 7d, 14d, 21d) spezielle Zelleigenschaften gezielt qualitativ und quantitativ bestimmt. Hierbei stehen die zellulären Parameter der Zellmigration und -adhäsion, der Zellproliferation sowie der Zelldifferenzierung und -produktion im Mittelpunkt des Interesses. Bei der Erfassung dieser Zelleigen-

schaften kommen neben unterschiedlichen Visualisierungsmethoden vor allem laborchemische Untersuchungsmethoden zur Anwendung (Abb. 8). Die Visualisierung der Zellen erfolgt hierbei auf dem jeweiligen Untergrund, laborchemischen Untersuchungsmethoden (z.B. PCR, ELISA) setzen in der Regel ein Ablösen der Zellen bzw. ein Abpipettieren des Mediums voraus.

Methoden zur Zellvisualisierung

Betrachtungen der Zellmorphologie auf unterschiedlichen Implantatoberflächen geben wertvolle Rückschlüsse über die Zell-Implantat-Interaktionen. Klassische Beob-

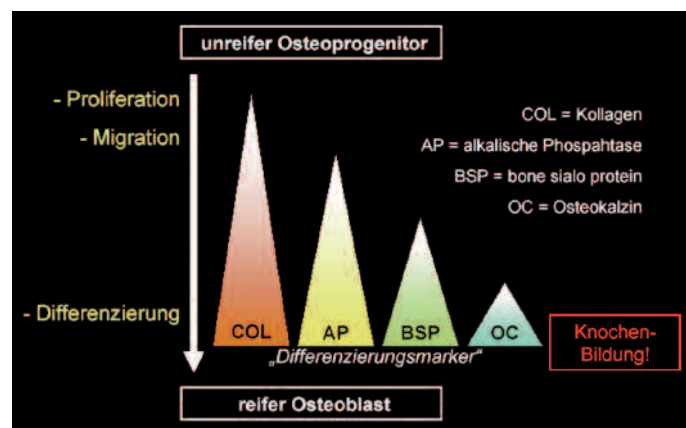


Abb. 12
Die quantitative Bestimmung klassischer osteoblastärer Differenzierungsmarker wie Kollagen oder Osteokalzin gibt Rückschlüsse über den Reifegrad der Zelle und somit über die Fähigkeit zur Knochenneubildung auf der Implantatoberfläche (modifiziert nach [4])

■ Implantat-einheilung

achtungsmethoden auf der Basis der Durchlichtmikroskopie sind aufgrund der soliden, lichtundurchlässigen Implantatscheiben nicht anwendbar, so dass gängige Visualisierungsmethoden auf der Elektronenmikroskopie (Abb. 9) oder Immunfluoreszenz (Abb. 10) basieren. Immunohistochemische Färbemethoden erlauben hierbei die gezielte Anfärbung interessanter zellulärer Strukturen wie z.B. das Aktin-Zytoskelett (Abb. 8) oder fokale Adhäsionen. Mögliche Nachteile dieser Verfahren sind mehr oder weniger komplexe Fixierungs- und Färbeschritte mit der Gefahr von Veränderungen der Oberflächenultrastruktur bzw. der Zellmorphologie. Die Zellen sind fixiert und devital und entziehen sich somit dem Monitoring dynamischer Zellattribute wie Adhäsion und Migration. Eine Methode zur kontinuierlichen Darstellung vitaler Zellen auf soliden Oberflächen ohne den Nachteil aufbereitungsbedingter Artefakte ist die Verwendung von so genannten Vitalfarbstoffen. Experimentelle Ansätze im Rahmen der Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) bieten die Möglichkeit von Lebendbeobachtungen osteoblastärer Zellen mit synchroner Darstellung des jeweiligen Untergrundes (Abb. 11a-c). Zellkompatible Implantatoberflächen resultieren in spindelförmigen, zellfortsatzreichen osteoblastären Zellmorphologien, während weniger biokompatible Untergründe eher rundliche Zellformationen hervorrufen [16, 21, 31].

Laborchemische Untersuchungsmethoden

Während unreife, osteoblastäre Vorläuferzellen insbesondere zur Zellproliferation und Zellmigration befähigt sind, liegt die Hauptaufgabe reifer, ausdifferenzierter Osteoblasten in der Bildung neuer Knochenmatrix. Die quantitative Bestimmung klassischer Markerproteine wie zum Beispiel Kollagen, alkalische Phosphatase oder Os-

teokalzin sowie von Zytokinen wie zum Beispiel Prostaglandin E2 oder transforming growth factor beta 1 erlaubt konkrete Aussagen über den Reifegrad der Zellpopulation und somit über die Fähigkeit der jeweiligen Oberfläche, Knochenneubildung zu fördern. Die Expression des Proteins Osteokalzin korreliert hierbei mit der Osteoid-Neusynthese (Abb. 12). Die Differenzierungsmarker und Zytokine lassen sich auf unterschiedlichen intra- und extrazellulären Niveaus bestimmen. So messen Methoden, die auf der polymerase chain reaction (PCR) basieren, die RNA (Vorläufer)-Level der jeweiligen Proteine und können zudem Aufschluss über wichtige intrazelluläre Signalkaskaden geben, während zum Beispiel die quantitative Immunhistochemie intrazelluläre oder membranständige Proteine bestimmen kann. Die Durchführung eines enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) des Überstandes bietet wiederum die Möglichkeit, von der Zelle freigesetzte Marker und Zytokine zu ermitteln. Die Durchsicht der aktuellen Fachliteratur bietet im Gegensatz zu dem einheitlich berichteten in vitro -Einfluss von Oberflächenrauigkeit auf die Interaktion mit Blutbestandteilen (s.o.) zur Interaktion mit osteoblastären Zellen auffallend divergente Ergebnisse. In einigen Untersuchungen zeigen raue Implantatoberflächen eine deutliche Förderung der Zelldifferenzierung, während bei anderen Autoren glatte Oberflächen die besten Resultate aufzeigen. Kritisch ist hierbei zu bemerken, dass sich das Verhalten osteoblastärer Zellen unterschiedlicher Herkunft (human, Ratte), Entnahmestellen (Calvaria, Becken) und Reifegrade auf Titan deutlich unterscheidet. Abgesehen davon können Unterschiede in den Kultivierungsmodalitäten und in den Messzeitpunkten eine Erklärung für diese Divergenzen bieten, was den Stellenwert der Kenntnis des Versuchsprotokolls bei der kritischen Ergebnisinterpre-

tation unterstreicht. Tendenziell wurde jedoch eine „mittlere Rauigkeit“ für eine erfolgreiche Interaktion zwischen Osteoblast und Implantatoberfläche hervorgehoben [1].

Schlussfolgerungen

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass erfolgreiches Implantateinheilen ein multifaktorielles Geschehen ist, welches neben patientenimmanenten Faktoren (Knochenqualität) und unterschiedlichen Behandlungsoptionen (Einheil-, Belastungsregime) vor allem auch optimale Implantateigenschaften voraussetzt. Hierbei nimmt die Biokompatibilität bzw. Zellkompatibilität diverser Oberflächenmodifikationen eine ganz herausragende Position ein. Die in diesem Beitrag vorgestellten zellexperimentellen Untersuchungsmethoden zur präklinischen Charakterisierung und Testung der Implantatoberflächen ergänzen sich hierbei sinnvoll und bieten somit eine solide und unentbehrliche Basis für Tierexperimente bzw. schlussendlich auch für den klinischen Langzeiterfolg des Implantates. ■

Korrespondenzadresse:

Dr. med. Marcus O. Klein¹,
PD Dr. med. Dr. med. dent.
Bilal Al-Nawas¹, Ana Bijelic¹,
Nora Wörsdörfer¹,
Dipl. Phys. Hermann Götze²,
Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med.
dent. Wilfried Wagner¹,
Univ.-Prof. Dr. rer. nat. et med.
dent. habil. Heinz Duschner²

Zentrum für zahnärztliche
Verbundforschung
¹ Klinik für Mund-, Kiefer- und
Gesichtschirurgie
² Angewandte Struktur- und
Mikroanalytik
Johannes Gutenberg-
Universität Mainz
Fachbereich Medizin
Augustusplatz 2
55131 Mainz
E-Mail:
klein@mkg.klinik.uni-mainz.de

Literatur:

- [1] Al-Nawas, B. Der Einfluss funktioneller Oberflächencharakteristika auf die klinische Prognose enossaler Implantate. Habilitationsschrift. Fachbereich der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz; 2004.
- [2] Al-Nawas, B., and Gotz, H. Three-dimensional topographic and metrologic evaluation of dental implants by confocal laser scanning microscopy. *Clin Implant Dent Relat Res* 5:176-83; 2003.
- [3] Al-Nawas, B., Grotz, K. A., Gotz, H., Heinrich, G., Rippin, T. G., Stender, T. E., Duschner, H., and Wagner, W. Validation of three-dimensional surface characterising methods: scanning electron microscopy and confocal laser scanning microscopy. *Scanning* 23:227-31; 2001.
- [4] Aubin, J. E. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol* 76:899-910; 1998.
- [5] Boyan, B. D., Bonewald, L. F., Paschalis, E. P., Lohmann, C. H., Rosser, J., Cochran, D. L., Dean, D. D., Schwartz, Z., and Boskey, A. L. Osteoblast-mediated mineral deposition in culture is dependent on surface microtopography. *Calcif Tissue Int* 71:519-29; 2002.
- [6] Boyan, B. D., Dean, D. D., Lohmann, C., Cochran, D. L., Sylvia, Z., and Schwartz, Z. The titanium-bone cell interface in vitro: the role of the surface in promoting osteointegration. In: D. M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor, and P. Thomsen (eds.), *Titanium in medicine*, pp. 561-585. Berlin/Heidelberg, Germany: Springer Verlag; 2001.
- [7] Buser, D., Broggin, N., Wieland, M., Schenk, R. K., Denzer, A. J., Cochran, D. L., Hoffmann, B., Lussi, A., and Steinemann, S. G. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 83:529-33; 2004.
- [8] Cooper, L. F., Zhou, Y., Takebe, J., Guo, J., Abron, A., Holmen, A., and Ellingsen, J. E. Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO₂ grit-blasted c.p. titanium endosseous implants. *Biomaterials* 27:926-36; 2006.
- [9] Davies, J. E. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 67:932-49; 2003.
- [10] Glauser, R. persönliche Mitteilung.
- [11] Hong, J., Andersson, J., Ek Dahl, K. N., Elgue, G., Axen, N., Larsson, R., and Nilsson, B. Titanium is a highly thrombogenic biomaterial: possible implications for osteogenesis. *Thromb Haemost* 82:58-64; 1999.
- [12] Jaffin, R. A., and Berman, C. L. The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis. *J Periodontol* 62:2-4; 1991.
- [13] Jemt, T., Chai, J., Harnett, J., Heath, M. R., Hutton, J. E., Johns, R. B., McKenna, S., McNamara, D. C., van Steenberghe, D., Taylor, R., Watson, R. M., and Herrmann, I. A 5-year prospective multicenter follow-up report on overdentures supported by osseointegrated implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 11:291-8; 1996.
- [14] Keselowsky, B. G., Collard, D. M., and Garcia, A. J. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *J Biomed Mater Res A* 66:247-59; 2003.
- [15] Kikuchi, L., Park, J. Y., Victor, C., and Davies, J. E. Platelet interactions with calcium-phosphate-coated surfaces. *Biomaterials* 26, pp. 5285-95; 2005.
- [16] Kim, H. J., Kim, S. H., Kim, M. S., Lee, E. J., Oh, H. G., Oh, W. M., Park, S. W., Kim, W. J., Lee, G. J., Choi, N. G., Koh, J. T., Dinh, D. B., Hardin, R. R., Johnson, K., Sylvia, V. L., Schmitz, J. P., and Dean, D. D. Varying Ti-6Al-4V surface roughness induces different early morphologic and molecular responses in MG63 osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res A*; 2005.
- [17] Liu, Y., de Groot, K., and Hunziker, E. B. BMP-2 liberated from biomimetic implant coatings induces and sustains direct ossification in an ectopic rat model. *Bone* 36:745-57; 2005.
- [18] Nygren, H., Tengvall, P., and Lundstrom, I. The initial reactions of TiO₂ with blood. *J Biomed Mater Res* 34:487-92; 1997.
- [19] Ostman, P. O., Hellman, M., and Sennerby, L. Direct implant loading in the edentulous maxilla using a bone density-adapted surgical protocol and primary implant stability criteria for inclusion. *Clin Implant Dent Relat Res* 7 Suppl 1:S60-9; 2005.
- [20] Ottoni, J. M., Oliveira, Z. F., Mansini, R., and Cabral, A. M. Correlation between placement torque and survival of single-tooth implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 20:769-76; 2005.
- [21] Park, B. S., Heo, S. J., Kim, C. S., Oh, J. E., Kim, J. M., Lee, G., Park, W. H., Chung, C. P., and Min, B. M. Effects of adhesion molecules on the behavior of osteoblast-like cells and normal human fibroblasts on different titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A*; 2005.
- [22] Park, J. Y., and Davies, J. E. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 11:530-9; 2000.
- [23] Park, J. Y., Gemmell, C. H., and Davies, J. E. Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. *Biomaterials* 22:2671-82; 2001.
- [24] Puleo, D. A., and Nanci, A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 20:2311-21; 1999.
- [25] Schliephake, H., Scharnweber, D., Dard, M., Sewing, A., Aref, A., and Roessler, S. Functionalization of dental implant surfaces using adhesion molecules. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 73:88-96; 2005.
- [26] Soskolne, W. A., Cohen, S., Sennerby, L., Wennerberg, A., and Shapira, L. The effect of titanium surface roughness on the adhesion of monocytes and their secretion of TNF-alpha and PGE2. *Clin Oral Implants Res* 13:86-93; 2002.
- [27] Stanford, C. M., and Schneider, G. B. Functional behaviour of bone around dental implants. *Gerodontology* 21:71-7; 2004.
- [28] Wagner, W., Kunkel, M., and Wahlmann, U. W. Klasse D4 Knochen: Diagnostik, Probleme und Lösungsmöglichkeiten für Implantate in einem sehr spongiösen Knochenlager. *Implantologie* 2:121-127; 1999.
- [29] Zhao, G., Schwartz, Z., Wieland, M., Rupp, F., Geis-Gerstorfer, J., Cochran, D. L., and Boyan, B. D. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A* 74:49-58; 2005.
- [30] Zinger, O., Zhao, G., Schwartz, Z., Simpson, J., Wieland, M., Landolt, D., and Boyan, B. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomaterials* 26:1837-47; 2005.
- [31] Klein MO, Tapety F, Sandhöfer F, Götz H., Schäfer B., Wagner W., et al.: Visualisierung vitaler osteoblastärer Zellen auf unterschiedlich behandelten Titanoberflächen mittels Confokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) – eine Pilotstudie. *Zeitschrift für Zahnärztliche Implantologie* 2006; 145-153