

## Исследование ранних стадий заживления костной ткани вокруг имплантатов с пескоструйной обработкой поверхности резорбируемыми частицами

Ryan Jeong <sup>1</sup>, Charles Marin <sup>2</sup>, Rodrigo Granato <sup>3</sup>, Marcelo Suzuki <sup>4</sup>, Jose N Gil <sup>5</sup>, Jose M. Granjeiro <sup>6</sup>, Paulo G. Coelho <sup>7</sup>

<sup>1</sup> Исследователь-ассистент отделения биоматериалов и биомиметики, Университет Нью-Йорка, США

<sup>2</sup> Инструктор Департамента оральной и челюстно-лицевой хирургии университета Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Порто-Аллегре, Бразилия

<sup>3</sup> Ученый-исследователь, Отделение стоматологии, оральной и челюстно-лицевой хирургии университета Universidade Federal de Santa Catarina, Флорианополис, Бразилия

<sup>4</sup> Доцент школы стоматологии Университета Tufts, Бостон, США

<sup>5</sup> Доцент отделения стоматологии, оральной и челюстно-лицевой хирургии университета Universidade Federal de Santa Catarina, Флорианополис, Бразилия

<sup>6</sup> Профессор отделения клеточной и молекулярной биологии университета Universidade Federal Fluminense, Нитерой, Бразилия

<sup>7</sup> Доцент отделения биоматериалов и биомиметики, Университет Нью-Йорка, США

### Correspondence:

345 24th street room 813a  
New York, NY 10010  
pgcoelho@nyu.edu

Jeong R, Marin C, Granato R, Suzuki M, Gil JN, Granjeiro JM, Coelho PG. Early bone healing around implant surfaces treated with variations in the resorbable blasting media method. A study in rabbits. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2010 Jan 1;15 (1):e119-25.

<http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v15i1/medoralv15i1p119.pdf>

Получено: 13/07/2009  
Одобрено: 02/08/2009

Article Number: 3026 <http://www.medicinaoral.com/>  
© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - pISSN 1698-4447 - eISSN: 1698-6946  
eMail: [medicina@medicinaoral.com](mailto:medicina@medicinaoral.com)  
**Indexed in:**  
-SCI EXPANDED  
-JOURNAL CITATION REPORTS  
-Index Medicus / MEDLINE / PubMed  
-EMBASE, Excerpta Medica  
-SCOPUS  
-Indice Médico Español

### Краткое описание исследования

Цель исследования: Гистоморфологически и гистоморфометрически оценить отклик *in vivo* на три варианта обработки поверхности имплантатов на модели имплантации в бедренную кость кроликов.

Описание метода: Корневидные винтовые имплантаты диаметром 3,75 мм и длиной 8 мм, имеющие 4 варианта обработки поверхности (по 8 шт. для каждого варианта):

- с пескоструйной обработкой корундом (оксидом алюминия) и травлением в кислоте (сокращенно AB/AE [англ.]);
- с пескоструйной обработкой биорезорбируемой керамикой (TCP);
- с TCP и травлением в кислоте;
- с AB/AE + TCP

были исследованы с помощью растрового электронного микроскопа (SEM) и сканирующего атомно-силового микроскопа (AFM), а затем были установлены в дистальных отделах бедренной кости восьми новозеландских кроликов и оставлены на 2 недели *in vivo*. После эвтаназии кроликов, из имплантатов и костной ткани вокруг них были приготовлены препараты для гистоморфологического исследования и определения степени контакта поверхности имплантатов с костной тканью (BIC):

30 мкм толщиной, без декальцификации. Статистический анализ производился методом одномерного дисперсионного анализа (ANOVA) с уровнем значимости 5% и с принятием типа поверхности имплантатов в качестве независимой переменной и BIC - в качестве зависимой переменной.

Итоги исследования: Данные SEM и AFM показали, что все рассматриваемые поверхности имеют шероховатость, а поверхность с обработкой TCP имеет следы фосфата кальция. Гистологическое исследование показало тесное взаимодействие между образовавшейся с момента имплантации ретикулофиброзной костной тканью и всеми типами поверхностей имплантатов, что позволяет сделать вывод о их биосовместимости и остеокондуктивности.

Значительные различия в степени BIC наблюдались между имплантатами с AB/AE и AB/AE + TCP, а результаты для имплантатов с TCP и TCP + травление в кислоте имели промежуточные значения BIC.

Выводы: Вне зависимости от метода обработки, все поверхности оказались остеокондуктивными и биосовместимыми. Различия в степени BIC между исследуемыми образцами являются отправной точкой для дальнейшего изучения биомеханических свойств на границе имплантат-кость.

## Введение

Поскольку при имплантации именно поверхность имплантата взаимодействует с тканями организма, методы повышения её биосовместимости и остеокондуктивности представляют особый интерес для изучения (1). Способы модификации поверхности хирургических имплантатов оказались успешными в плане улучшения отклика организма, увеличения площади контакта имплантата с костью (BIC) и его биомеханической фиксации на ранних стадиях заживления (2). Модификация текстуры поверхности и её химических свойств, в частности увеличение шероховатости, нанесение биосовместимых керамических покрытий на основе кальция и фосфора - наиболее популярные методы улучшения отклика организма на установку хирургических имплантатов (1, 2).

Если говорить о текстуре, то увеличение площади поверхности за счёт получения её заданной шероховатости дает положительные результаты в *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* исследованиях (1, 2). Хотя большая клеточная адгезия наблюдалась для более шероховатых поверхностей, по сравнению с поверхностями с машинной обработкой или просто гладкими, поверхности с умеренной шероховатостью ( $Ra=0,5-2$  мкм) (1, 2) имеют лучшие показатели остеоинтеграции – BIC и данные биомеханического тестирования. Текстуризация поверхности достигается несколькими последовательными процессами, включающими травление кислотой, анодирование и пескоструйную обработку нерезорбируемыми (корунд, оксид кремния, оксид титана) или резорбируемыми (RBM) частицами, такими как гидроксилпатит, трикальций-фосфаты или комбинации фаз кальция и фосфора (1). Следует заметить, что большинство доступных на рынке технологий RBM-обработки включает травление в кислоте или пассивирование, в результате которых на поверхности изделия практически не остается следов кальция и фосфора (1, 4).

С точки зрения изменения химического состава поверхности имплантатов, клинические и базовые исследования показывают, что биокерамические покрытия, такие как плазменное напыление слоя гидроксилпатита (PSHA) значительной толщины обеспечивают более выраженный отклик организма, имеющий следствием лучшую фиксацию имплантатов на ранних стадиях заживления, по сравнению с имплантатами с заданной шероховатостью средней степени без покрытия (5).

Эффективность PSHA-покрытий зависит, однако, от прочности их связи с поверхностью имплантата - отпескоструенной или протравленной в кислоте (5). Данные, что имплантаты с PSHA-покрытием хуже приживаются, чем имплантаты без покрытия, нет, однако физическое взаимодействие между материалом имплантата в массе, оксидной плёнкой и биокерамическим покрытием считается слабым звеном, являющимся возможной причиной несостоявшейся клеточной адгезии при различных конфигурациях имплантатов (5, 7). Недавно было испытано покрытие из биоактивной керамики, но в гораздо меньшем количестве, чем обычно. Оно показало обнадеживающие результаты по сравнению с непокрытой поверхностью (5-7). Однако в доступных отчётах об исследованиях нет однозначного мнения насчет того, какое количество и фазовый состав кальция и фосфора приводит к оптимальному отклику организма на внедрение имплантата (4-12).

Поскольку текстура поверхности с RBM-обработкой и её химический состав (в особенности содержание кальция и фосфора) зависит от нескольких факторов, например от состава частиц для пескоструйной обработки, их размера, давления их струи и расстояния от сопла пескоструйного аппарата до обрабатываемого изделия, а также условий

последующего травления кислотой (1), в результате данных процессов может быть получен широкий спектр поверхностей с разными параметрами, как физическими, так и химическими, которые можно использовать для улучшения отклика организма на имплантацию. Однако на сегодняшний день в специальной литературе нет четкого описания базовых параметров RBM-обработки и соответствующего им отклика *in vivo*. Таким образом, целью данного исследования была гистоморфологическая и гистоморфометрическая оценка отклика *in vivo* на три варианта поверхности с RBM-обработкой на модели имплантации в бедренную кость кролика.

## Материалы и методы

В данном исследовании использовались корневидные винтовые эндооссальные имплантаты из сплава титана Ti-6-Al-4V 3,75x8 мм (Seven, MIS, Израиль) (общее количество использованных имплантатов - 32). АВ/АЕ-поверхность была получена пескоструйной обработкой большими частицами (300-400 мкм) корунда ( $Al_2O_3$ ) с последующим травлением соляной и серной кислотой. ТСП-поверхности были получены пескоструйной обработкой гидроксилпатит/ТСП-частицами (в соотношении 20/80) размером 200-400 мкм без последующей обработки кислотой. Поверхности АВ/АЕ + ТСП были получены совмещением упомянутых выше методов обработки. Поверхности "ТСП + кислота" получены очисткой азотной кислотой после ТСП-обработки. Все имплантаты были стерилизованы гамма-облучением.

Текстуризация поверхности была изучена методами растровой электронной микроскопии (микроскопом Philips XL 30 с разными степенями увеличения, при ускоряющем напряжении 15 кэВ) и сканирующей атомно-силовой микроскопии: трехмерные изображения поверхностей были получены с помощью АФМ-микроскопа (Nanoscope IIIa Multimode system, Digital Instruments, США) в контактном режиме. Параметры сканера АФМ: макс. амплитуда кантилевера – 125 мкм по горизонтали и 5 мкм по вертикали; размер кантилевера – 200 мкм; материал острия кантилевера -  $Si_3N_4$ ; постоянное усилие на кантилевере – 0,12 Нм. Участки 10x10 мкм, подвергшиеся анализу, располагались на плоской поверхности резьбы имплантатов. На каждом имплантате было выбрано три таких участка. После одобрения комитета по биоэтике в экспериментах с участием животных при университете Universidade Federal Fluminense (#10/08), Бразилия, восемь новозеландских белых кроликов, весом 2,5-3 кг каждый, без проблем со здоровьем, были приобретены для проведения исследования и содержались перед ним в течение 4х недель.

Местом проведения операции была дистальная область бедренной кости - было последовательно установлено по два имплантата в каждой конечности. Имплантаты с разной обработкой поверхности устанавливались в 2 см друг от друга в центральной области кости, проксимально и дистально. Таким образом, в каждой группе было по два имплантата для сравнения. Предварительно была сделана внутримышечная анестезия кетаминном (20 мг/кг) и ксилазином (1 мг/кг). Наркоз производился ингаляцией 1% изофлурана.

После удаления шерсти на месте будущей операции и антисептической обработки кожи спиртовым раствором йода, были произведены 5 см разрезы кожи с последующим разрезом мышечных слоев. После отслаивания кожно-мышечного лоскута, был получен доступ к бедренной кости.

На каждой конечности было сделано по две остеотомии, на расстоянии, по крайней мере, 2 см друг от друга, дистально и проксимально. Первым был сделан проход пилотным сверлом 2 мм, с частотой вращения 1200 об./мин., с ирига-

цией соляным раствором. Затем было произведено последовательное сверление сверлами 2,5 и 3,5 мм с частотой вращения 800 об./мин., с ирригацией соляным раствором. Имплантаты устанавливались динамометрическим ключом. Примечание: поскольку диаметр остеотомии был 3,5 мм, а диаметр тела имплантатов - 3,25 мм (при внешнем диаметре резьбы 3,75 мм), после их установки, между огибающей тела имплантата и костью остались зазоры (камеры), которым предстояло зарости костной тканью.

Во избежание повреждения новообразующегося клеточного окружения имплантатов при удалении костной мозоли после предстоящего отделения конечностей, на каждом имплантате был установлен винт-заглушка.

При наложении швов была использована стандартная послойная техника (4-0 викрил для внутренних слоев; 4-0 нейлон для кожи). В течение 48 часов после операции животным давался антибиотик (пенициллин, 20 000 UI/кг) и анальгетик (кетопрофен, 1 мл/5 кг). Эвтаназия была проведена передозировкой анестетика. После чего конечности были отделены, кости освобождены от мягких тканей, и проверена стабильность имплантатов.

Фрагменты бедренной кости с имплантатами хранились в 10% буферном растворе формалина в течение 24 часов, после чего ещё 24 часа промывались проточной водой, затем были частично обезвожены серией погружений в этанол 70-100%. После обезвоживания, образцы были размещены в полимере на основе метакрилата (Technovit 9100, Heraeus Kulzer GmbH, Германия), согласно инструкции производителя. Полученные блоки были распилены на пластины ок. 300 мкм толщиной, вдоль продольной оси имплантата, у его центра, с помощью прецизионной алмазной пилы Isomet 2000 (Buehler Ltd., США). Эти пластины были наклеены на акриловые основы с помощью акрилатного цемента. После его отверждения в течение 24 часов, было произведено шлифование и полирование пластин абразивным инструментом на основе карбида кремния с последовательной зернистостью 400, 600, 800, 1200 и 2400 grit (Buehler Ltd., США) на шлифовально-полировальном станке Metaserv 3000 (Buehler Ltd., США) с водяным охлаждением (13). Полученные препараты были окрашены красителем толуидиновый синий. На этом подготовка к микроскопическому исследованию была завершена.

Взаимодействие новообразовавшейся костной ткани с имплантатами (BIC) оценивалось с помощью растрового электронного микроскопа Leica DM2500M при увеличении 50x-200x и программного обеспечения Leica Application Suite (Leica Microsystems GmbH, Германия). Статистический анализ проводился методом одномерного дисперсионного анализа (ANOVA) с принятием типа поверхности имплантатов в качестве независимой переменной и BIC - в качестве зависимой переменной. Множественные сравнения величин производилось с использованием апостериорной процедуры Тьюки. Уровень статистической значимости был установлен в 5%.

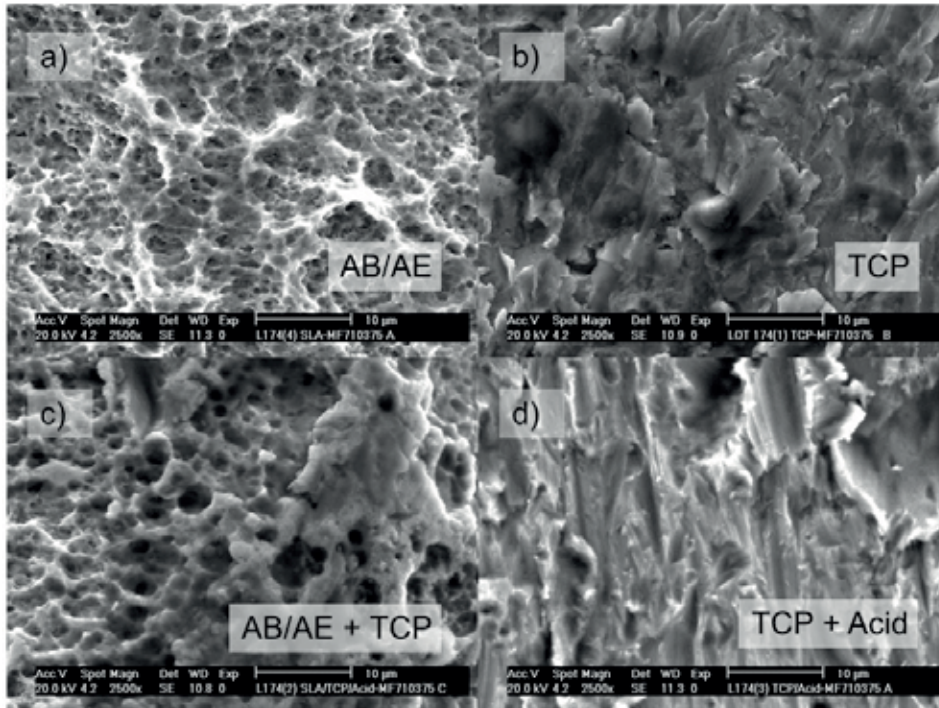
## Результаты исследования

Изображения, полученные электронным микроскопом, показали, что все поверхности имеют морфологически разные текстуры (рис. 1). TCP-поверхности и поверхности с TCP и кислотной обработкой были качественно менее шероховатые, чем поверхности остальных двух типов. TCP-поверхности несли на себе остатки частиц, использовавшихся при пескоструйной обработке, в то время как поверхности с TCP и кислотной обработкой таких включений не имели (рис. 1 b и d). Сканирование AFM показало, что на субмикронной шкале все поверхности очень похожи (рис. 2).

Хирургические этапы и последующее заживление прошли без осложнений, в плане условий проведения процедур, инфицирования места вмешательства и проч. Ни один из установленных имплантатов не был исключен из исследования по причине недостаточной клинической стабильности непосредственно после эвтаназии животных и препарирования мест имплантаций.

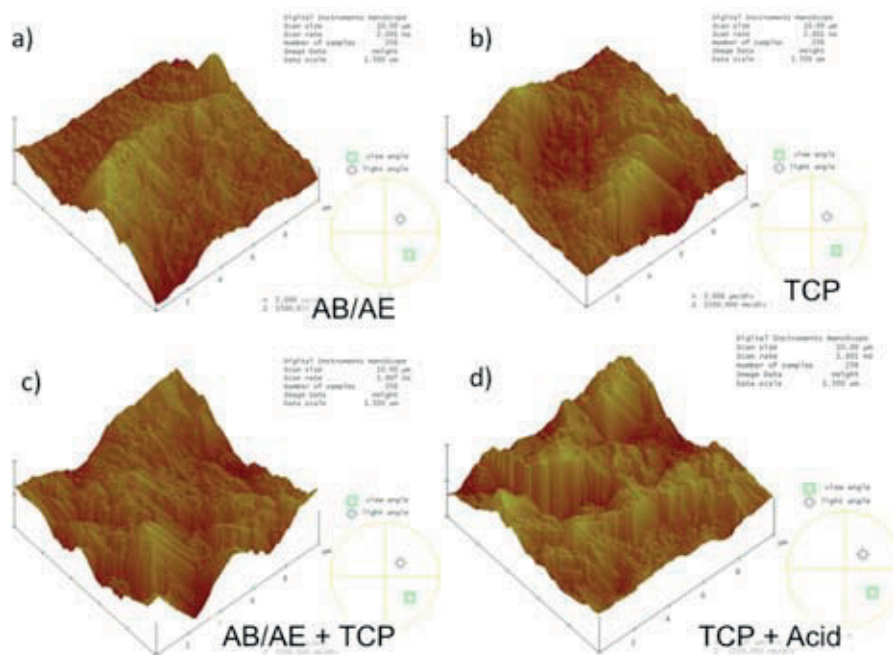
Исследование недекальцифицированных микроскопических препаратов выявило тесный контакт костной ткани с поверхностями всех имплантатов, как со стороны кортикальной кости, так и со стороны губчатой. Для наблюдения и классификации данного контакта было достаточно увеличения в 100x (рис. 3). Во всех случаях контакты образовались за счёт формирования ретикулофиброзной костной ткани. Не было обнаружено значительных различий между группами образцов, представляющих одну поверхность (рис. 4). Пространственное распределение новообразованной костной ткани было следующим: формирование ретикулофиброзной костной ткани наблюдалось в центральных областях и в зонах, непосредственно прилегающих к поверхности имплантатов (во всех группах образцов); значительное заполнение костной тканью пространств между витками резьбы наблюдалось в областях над кортикальной пластинкой и под ней (рис. 4).

Дисперсионный анализ показал, что на степень контакта имплантатов с новообразованной костной тканью (BIC) значительно повлиял способ обработки их поверхности. Значения BIC (выраженные как средние  $\pm$  стандартное отклонение) для поверхности AB/AE были значительно выше, чем для поверхности AB/AE + TCP:  $33,38 \pm 8,45\%$  и  $19,37 \pm 7,51\%$  соответственно. Поверхности TCP и TCP+кислота показали значения BIC  $30,28 \pm 9,60\%$  и  $25,14 \pm 8,07\%$  (рис. 5).



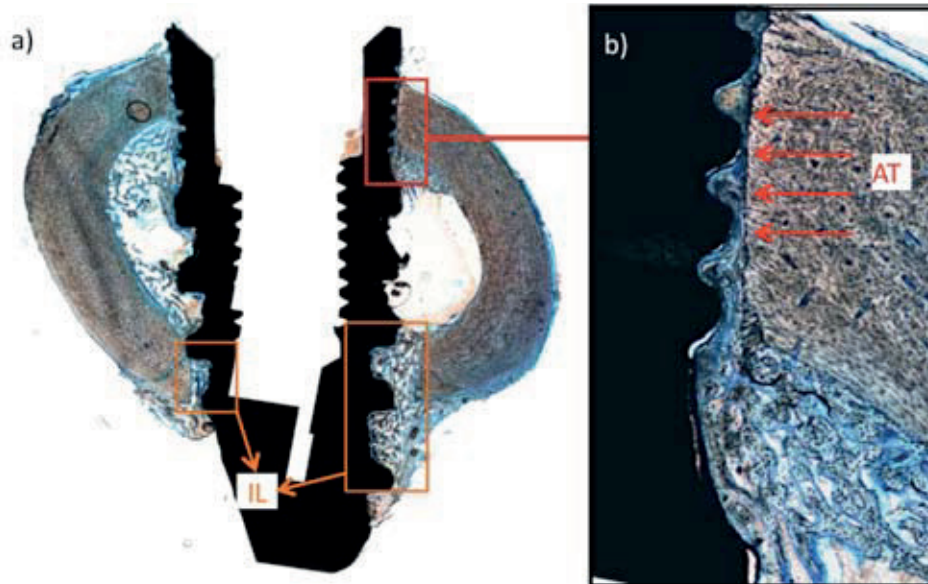
**Рис. 1:** Снимки поверхности имплантатов, использованных в данном исследовании, сделанные растровым электронным микроскопом:

- a) пескоструйная обработка частицами корунда с последующим травлением кислотой (AB/AE)
- b) TCP-обработка
- c) AB/AE + TCP
- d) TCP + травление в кислоте

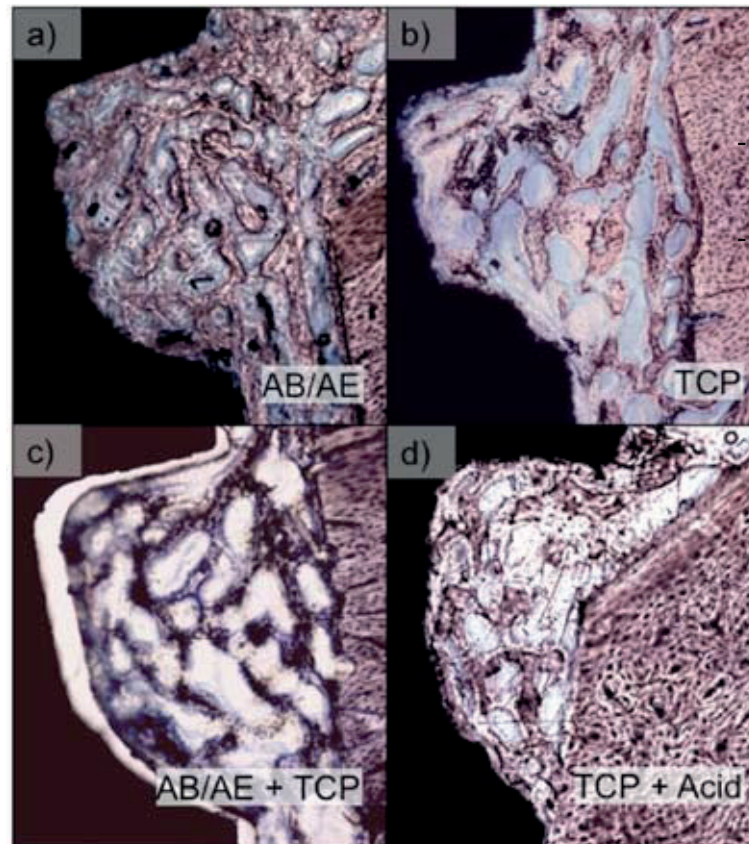


**Рис. 2:** Трехмерная реконструкция шероховатости поверхностей с различной обработкой, полученная методом АТФ: сканирование произвольных участков 10x10 мкм выявило схожесть нанотопографии всех поверхностей.

- a) AB/AE
- b) TCP
- c) AB/AE + TCP
- d) TCP + кислота



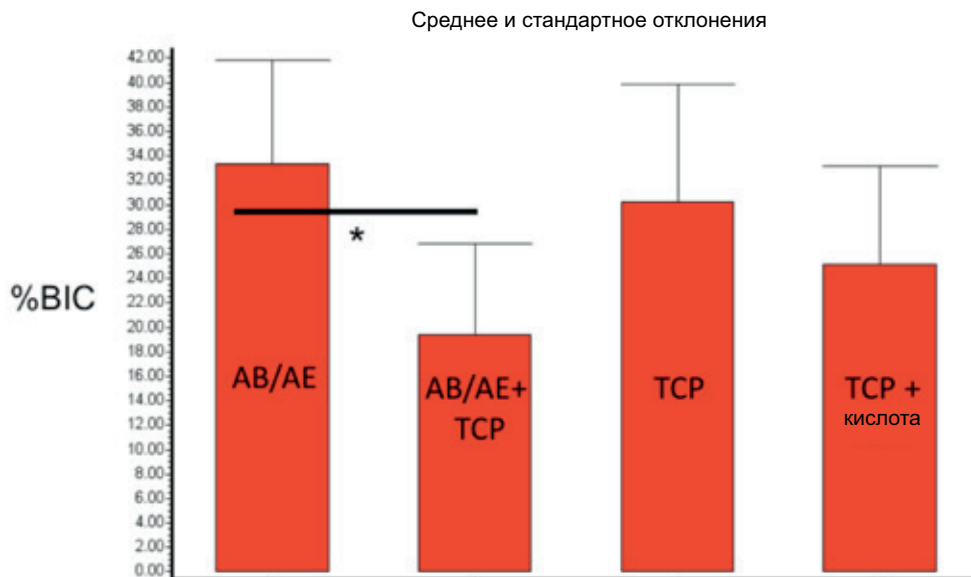
**Рис. 3:** Области контакта имплантатов с костной тканью были визуализированы, с последующим определением свойств этого контакта: (а) В основном, в данных областях происходило формирование ретикулофиброзной костной ткани. Оппозиционный тип заживления костной ткани наблюдался в зонах, где тесный контакт имплантата с костью произошёл в момент его внедрения (фрагмент b), а на тех участках, где из-за взаимодействия геометрий остеотомии и имплантата образовались пустоты (камеры) вдоль его тела, наблюдался интрамембранный ретикулофиброзный остеогенез.



**Рис. 4:** В камерах, упомянутых выше, происходил интрамембранный ретикулофиброзный остеогенез, и между четырьмя группами имплантатов не было обнаружено качественных морфологических различий костной ткани:

- a) AB/AE b) TCP
- c) AB/AE + TCP d) TCP + кислота

Примечание: Зазор между поверхностью имплантата и костью, который можно наблюдать на рис. (с) появился в процессе изготовления препаратов для микроскопии.



**Рис. 5:** Средние и стандартные отклонения степени контакта имплантатов с костью (BIC). Дисперсионный анализ выявил существенные различия между группами ( $p < 0,04$ ). Жирная черта с астериском показывает на значительное отличие данных в группах AB/AE и AB/AE + TCP.

## Обсуждение

На сегодняшний день, модификация поверхности является наиболее изучаемым параметром зубных имплантатов в попытках улучшить отклик организма на их установку, в кратко- и долгосрочной перспективе (1, 2, 14). В результате этих исследований появилось значительное количество таких модификаций, за каждой из которых стоит свое обоснование. В основном, это варианты шероховатости и химического состава поверхности имплантатов (1, 2, 14). Большинство представленных на рынке имплантатов имеют поверхности с умеренной шероховатостью ( $R_a$  от 0,5 до 2 мкм) (1, 2, 14), полученной обычно разными способами пескоструйной обработки и/или травления в кислоте (1, 2, 14).

В качестве средства для пескоструйной обработки обычно использовались частицы корунда (оксида алюминия  $Al_2O_3$ ), однако опасения насчет их возможных включений в поверхность имплантатов, что может потребовать ее очистки перед стерилизацией и клиническим применением, привели производителей к использованию альтернативных биосовместимых материалов, таких как оксиды титана и биоактивная резорбируемая керамика (1, 15).

В то время, как лучшая биосовместимость с большей вероятностью достигается использованием биосовместимых пескоструйных частиц, особенно биоактивной керамики, мало известно о том, какие последствия имеют разные методы очистки поверхности после их применения (в основном, это травление в кислоте) - то есть, по сути, различное количество оставшихся на ней фосфатов кальция. Данное исследование было призвано оценить, гистоморфологически и гистоморфометрически, ранний отклик *in vivo* на три модификации поверхности, обработанной биорезорбируемыми частицами, на модели имплантации в бедренной кости кроликов.

Исследование морфологии четырех исследованных поверхностей выявило текстурирование на микро- и нануровне,

которая обычно наблюдается у имплантатов, имеющих в продаже, и которые имеют умеренную шероховатость (1, 15).

В то время, как все исследованные поверхности могут рассматриваться как умеренно шероховатые, различия в их морфологии на микроуровне, выявленные электронной микроскопией, могут быть отнесены на счет их различной обработки.

Например, поскольку для получения поверхностей TCP и TCP + кислота были использованы резорбируемые частицы, твердость которых ниже, чем у корунда, шероховатость была меньше, несмотря на присутствие частиц фосфата кальция на первой и их отсутствия на второй поверхности. На нануровне, зарегистрированном AFM, качественных различий между поверхностями обнаружено не было. Таким образом, в данном исследовании оценивались поверхности с различной шероховатостью и химическим составом в аспекте их остеокондуктивности на ранних стадиях заживления.

Главные гистологические особенности исследованных образцов - что все они являются биосовместимыми и остеокондуктивными, и все участки, подвергшиеся гистологическому анализу, показали естественный характер заживления, свойственный тканям в месте имплантации (16-18), независимо от способа обработки поверхности. В тех местах, где костная ткань имела тесный контакт с имплантатами в момент их установки, наблюдался классический оппозиционный тип ее заживления. Там, где этого контакта не было, и после внедрения имплантатов, между их поверхностью и костью образовались камеры (из-за особенностей геометрии данных имплантатов - см. выше), наблюдался интрамембранный ретикулофиброзный остеогенез (16-18). Наибольшим рост костной ткани был в камерах между витками резьбы в областях, приходящихся на кортикальную пластинку - из-за большей эндостальной и периостальной концентрации в ней остеогенных клеток.

В итоге наблюдалось значительное заполнение камер ретикулофиброзной костной тканью, причем она подходила вплотную к поверхностям имплантатов всех исследованных типов. Несмотря на то, что все поверхности являлись биосовместимыми и остеокондуктивными, были выявлены значительные различия в ВИС между АВ/АЕ-поверхностями и АВ/АЕ + ТСП поверхностями, а для поверхностей ТСП и ТСП + кислота наблюдались промежуточные значения ВИС. Данные различия, безусловно, должны быть подвергнуты контролируемому физико-химическому исследованию, поскольку обработка ТСП и кислотой могла существенно изменить химический состав поверхности имплантатов, по сравнению с АВ/АЕ-обработкой, однако наши результаты подтверждают, что сами по себе текстура поверхности или её химический состав не могут рассматриваться в качестве единственных характеристик поверхности, отвечающих за её биосовместимость на ранних стадиях заживления. Данное наблюдение в дальнейшем подтвердилось фактом, что, хотя поверхности ТСП и ТСП + кислота имеют схожие параметры шероховатости, но различаются по химическому составу. Следует заметить, что хотя ВИС - часто используемый измеряемый показатель остеоинтеграции, несущая способность имплантатов может быть заметно разной при схожих значениях их ВИС, поскольку она зависит от механических свойств образующейся вокруг имплантата костной ткани, а краткосрочная и долгосрочная микроструктура этой ткани могут значительно различаться (1), что требует уточнения её биомеханических свойств (16-18).

#### Уточнение:

Средства на данное исследование были частично выделены отделением оральной и челюстно-лицевой хирургии университета Universidade Federal de Santa Catarina, Университетом Нью-Йорка и компанией MIS (Израиль).

## Список литературы

1. Coelho PG, Granjeiro JM, Romanos GE, Suzuki M, Silva NR, Cardaropoli G, et al. Basic research methods and current trends of dental implant surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;88:579-96.
2. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont.* 2004;17:536-43.
3. Grizon F, Aguado E, Huré G, Baslé MF, Chappard D. Enhanced bone integration of implants with increased surface roughness: a long term study in the sheep. *J Dent.* 2002;30:195-203.
4. Marin C, Granato R, Suzuki M, Gil JN, Piattelli A, Coelho PG. Removal torque and histomorphometric evaluation of bioceramic grit-blasted/acid-etched and dual acid-etched implant surfaces: an experimental study in dogs. *J Periodontol.* 2008;79:1942-9.
5. Coelho PG, Lemons JE. Physico/chemical characterization and in vivo evaluation of nanothickness bioceramic depositions on alumina-blasted/acid-etched Ti-6Al-4V implant surfaces. *J Biomed Mater Res A.* 2009;90:351-61.
6. Coelho PG, Cardaropoli G, Suzuki M, Lemons JE. Histomorphometric evaluation of a nanothickness bioceramic deposition on endosseous implants: a study in dogs. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2009;11:292-302.
7. Coelho PG, Cardaropoli G, Suzuki M, Lemons JE. Early healing of nanothickness bioceramic coatings on dental implants. An experimental study in dogs. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;88:387-93.
8. Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. *Biomaterials.* 2007;28:4748-55.
9. Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. Discrete calcium phosphate nanocrystalline deposition enhances osteoconduction on titanium-based implant surfaces. *J Biomed Mater Res A.* 2009;90:577-85.
10. Orsini G, Piattelli M, Scarano A, Petrone G, Kenealy J, Piattelli A, et al. Randomized, controlled histologic and histomorphometric evaluation of implants with nanometer-scale calcium phosphate added to the dual acid-etched surface in the human posterior maxilla. *J Periodontol.* 2007;78:209-18.
11. Wolke JG, Van der Waerden JP, Schaecken HG, Jansen JA. In vivo dissolution behavior of various RF magnetron-sputtered Ca-P coatings on roughened titanium implants. *Biomaterials.* 2003;24:2623-9.
12. Yang Y, Kim KH, Ong JL. A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process--an alternative to plasma spraying. *Biomaterials.* 2005;26:327-37.
13. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol.* 1982;11:318-26.
14. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 2--review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont.* 2004;17:544-64.
15. Lemons JE. Biomaterials, biomechanics, tissue healing, and immediate-function dental implants. *J Oral Implantol.* 2004;30:318-24.
16. Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14:251-62.
17. Leonard G, Coelho P, Polyzois I, Stassen L, Claffey N. A study of the bone healing kinetics of plateau versus screw root design titanium dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20:232-9.
18. Vignoletti F, Johansson C, Albrektsson T, De Sanctis M, San Roman F, Sanz M. Early healing of implants placed into fresh extraction sockets: an experimental study in the beagle dog. De novo bone formation. *J Clin Periodontol.* 2009;36:265-77.