

VALUTAZIONE DEL RAPPORTO TRA COSTO E QUALITA' DELLA PULIZIA
SUPERFICIALE DI ALCUNI SISTEMI IMPLANTARI IN COMMERCIO

Marco Morra, Clara Cassinelli, Giovanna Cascardo, Daniele Bollati

Nobil Bio Ricerche srl

Via Valcastellana 26, 14037, Portacomaro (AT)

Marco Bellanda

Via Galileo Galilei 66, 15121, Alessandria

Abstract: Lo stato di pulizia della superficie di alcuni impianti esistenti in commercio e' stato analizzato e valutato in funzione del prezzo di acquisto. In particolare, sono state valutate sia la pulizia "chimica", in termini di composizione superficiale, sia la pulizia "biologica", misurando le endotossine adese. I dati ottenuti indicano ottime caratteristiche per un impianto di fascia di costo alta e per uno di fascia bassa, mentre permangono margini di miglioramento sugli altri impianti analizzati. I risultati confermano la difficolta' di scelta per il professionista ed indicano che possono esistere sul mercato prodotti con ottime caratteristiche, anche a costi ragionevoli, e che esistono oggi nuovi mezzi sofisticati e affidabili per valutare la correttezza dei processi produttivi.

Parole chiave: Superfici implantari, pulizia superficiale, osteoimmunologia, endotossine

An evaluation of the relationship between cost and surface cleanliness of several clinically available dental implants

Abstract: Surface cleanliness of several commercially available dental implants was evaluated on the light of implant cost. In particular, both "chemical" and "biological" cleanliness, in terms respectively of surface chemistry and adherent endotoxin, were evaluated. Data show excellent results for one "high cost" and one "low cost" tested implant, while the remaining samples show ample room for improvement. Results confirm that it is not easy, for the clinician, to define criteria for proper choice of an implant system Moreover, they show that excellent products exist on the market even at a reasonable cost, and that it is possible to evaluate the correctness of production processes through sophisticated and reliable techniques.

Key words: Implant surfaces, surface cleanliness, osteoimmunology, endotoxin

Introduzione

La crescita e maturazione dell'implantologia orale hanno portato alla moltiplicazione dell'offerta di sistemi implantari ai professionisti. E' oggi sotto gli occhi di tutti gli addetti del settore come, per il medico, esista un'ampia possibilita' di scelta del dispositivo da utilizzare e come a questa corrisponda un'ampia varieta' di prezzi. In un momento storico come il presente, in cui la spinta della crisi economica porta alla ricerca della diminuzione dei costi, sia da parte del medico che da parte del paziente, e' fondamentale affrontare, anche in termini scientifici, le problematiche relative al rapporto qualita'-prezzo dell'offerta del mercato implantare.

In questo lavoro abbiamo voluto dare un contributo a questa indagine affrontando un tema particolarmente importante, perche' legato in modo indissolubile al successo della riabilitazione funzionale: la qualita' della pulizia dei sistemi implantari in commercio. Gli autori avevano svolto un'indagine su questo tema diversi anni fa [1], rivelando come la superficie di diversi sistemi sul mercato, anche se formalmente tutti realizzati in titanio puro, portasse come un'impronta digitale dell'accuratezza dei processi di irruvidimento, lavaggio, confezionamento eseguiti dal produttore. Il tema e' stato ampiamente trattato nella letteratura scientifica del settore [2-4] e riveste oggi una fondamentale importanza, sia per la diffusione di diverse metodiche di trattamento superficiale, sia per la grande varieta'di offerta di prodotti da realta'produttive in costante aumento, sia per la crescente litigiosita' e le relative implicazioni legali del campo medico in generale, da cui non e' esente l'odontoiatria. Aggiungendo a queste tematiche la lotta spasmodica alla riduzione dei costi di produzione, imposta dalla congiuntura attuale, e' chiaro come esista per il professionista una grande necessita' di informazione oggettiva da cui comprendere se, effettivamente, a maggior investimento iniziale corrisponde una maggiore sicurezza di qualita' e se, viceversa, a minore investimento corrisponde necessariamente una qualita' inferiore. Abbiamo pertanto voluto ripetere quel tipo di indagine, ponendo come asse principale il prezzo di acquisto di alcuni sistemi implantari in commercio e riportandone la dipendenza funzionale delle variabili analizzate. In particolare, abbiamo valutato la pulizia "chimica", analizzando la composizione superficiale di sistemi

implantari “come venduti”. Abbiamo poi voluto valutare la pulizia “biologica” dei medesimi sistemi, effettuando misure di espressione genica di cellule infiammatorie per valutare la presenza di endotossine adese. Questa misura, per la quale non esistono ancora valutazioni di letteratura su sistemi implantari, e’ oggi molto importante alla luce dei crescenti progressi dell’osteimmunologia [5-7]. Le sue implicazioni per la problematica in esame verranno discusse diffusamente nella sezione relativa ai risultati.

Le analisi sono state eseguite su sei sistemi implantari presenti in commercio, che coprono una fascia di prezzo che va dal basso (indicativamente, attorno a 100 €/impianto) al medio (indicativamente tra 120 e 200 €) all’alto (indicativamente oltre 200 €/impianto). Tutti i campioni, come riportato nella sezione relativa ai materiali e metodi, sono giunti al nostro laboratorio perfettamente sigillati e completamente rappresentativi della condizione “come venduto”. Per motivi di disponibilita’, la misura e’ stata eseguita su un campione (pulizia chimica) o su due repliche del medesimo campione (pulizia biologica), l’interpretazione dei dati deve dunque tenere adeguato conto della mancanza di supporto statistico.

Materiali e metodi

I campioni erano costituiti da tre esemplari per tipo di sistemi implantari commercializzati da sei diverse case produttrici. Le confezioni giunte al nostro laboratorio erano perfettamente sigillate e in corso di validita’ relativamente alla data di scadenza. Nella tabella 1 vengono indicati i codici mediante i quali i campioni saranno identificati nel prosieguo di questo articolo e le loro caratteristiche di finitura e costo.

Tabella 1
Classificazione dei campioni analizzati

Codice campione	Finitura superficiale	Fascia di costo
A	Sabbiatura	Bassa
B	Sabbiatura	Bassa
C	Trattamento con acidi	Bassa
D	Trattamento con acidi	Media
E	Trattamento con acidi	Alta
F	Trattamento elettrochimico	Alta

La composizione chimica della superficie e' stata valutata mediante la tecnica XPS. L'analisi XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy) o ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis, entrambi i nomi, che indicano la stessa tecnica, sono usati nella letteratura scientifica a riguardo), consente di ottenere la composizione qualitativa e quantitativa degli strati piu' esterni dei materiali. La profondita' analizzata e' di circa 5 nanometri (nm).

L'analisi XPS e' stata eseguita con uno strumento Perkin Elmer PHI 5400 ESCA System. Esso e' dotato di una sorgente di raggi X con anodo di Mg, mantenuto a 10 kV con potenza di 200 W. Le confezioni sono state aperte immediatamente prima dell'analisi il campione e' stato subito introdotto nella camera dello strumento.

Le valutazioni delle endotossine adese e' stata eseguita valutando l'espressione da parte di macrofagi murini J774A-1 di tre geni-chiave nella risposta infiammatoria ad endotossine batteriche: Interleuchina 1 (IL-1), interleuchina 6 (IL-6) e Tumor Necrosi Factor alfa (TNFa). Le misure sono state eseguite dopo 4 ore di contatto tra le cellule J774A1 e i campioni in esame. Questo metodo e' stato da noi in precedenza validato [8], anche con riferimento ad articoli di letteratura [9], seguendo l'andamento nel tempo dell'espressione genica di questa linea cellulare su superfici artificialmente contaminate con endotossina (LPS). Questo tipo di analisi indica che l'espressione misurata a breve tempo di contatto (4h) e' sostanzialmente funzione della presenza di endotossina e largamente indipendente dalla natura chimica (composizione) e fisica (rugosita') del materiale.

La misura e' stata eseguita come segue: Le cellule J774A1 sono state coltivate sui differenti campioni, estratti in condizioni di sterilita' dalle loro confezioni, in terreno DMEM con L-

glutamina (Gibco, INVITROGEN S.r.l), addizionato del 20% di Fetal Bovine Serum (FBS Gibco, INVITROGEN S.r.l) e di penicillina –streptomicina , nelle normali condizioni di coltura cellulare. L'RNA totale è stato estratto dopo 4h, utilizzando il MagMax Total RNA Isolation Kit (Applied Biosystems). La qualità dell'RNA è stata valutata controllando che il rapporto di assorbanza A_{260}/A_{280} fosse compreso tra 1.6 e 2.0. L'RNA estratto è stato successivamente retrotrascritto a cDNA utilizzando il kit High Capacity cDNA RT da Applied Biosystems.

La quantificazione relativa dei geni è stata ottenuta attraverso l'utilizzo di sonde Taq Man specifiche per ogni gene preso in esame, comparando i livelli di espressione del gene housekeeping GAPDH. Le reazioni di amplificazione sono state condotte nel termociclatore Step-One (Applied Biosystems) in duplicato seguendo le istruzioni del produttore.

Per ottenere i grafici di espressione genica, i dati sono stati normalizzati utilizzando il software Step-One secondo il metodo standard del ΔCt .

Risultati

L'analisi della composizione chimica superficiale mediante la tecnica XPS mette come al solito in evidenza numerose differenze a livello di pulizia tra i vari campioni analizzati. La Figura 1 rappresenta un tipico esempio del dato analitico ottenuto, in particolare viene riportata la porzione di interesse dello spettro XPS registrato sul campione C in esame. Come ricordato nella sezione su Materiali e Metodi, in questo tipo di analisi lo spettro evidenzia gli elementi presenti nei primi 5 nanometri circa di materiale, cioè negli strati più direttamente a contatto con il mondo esterno.

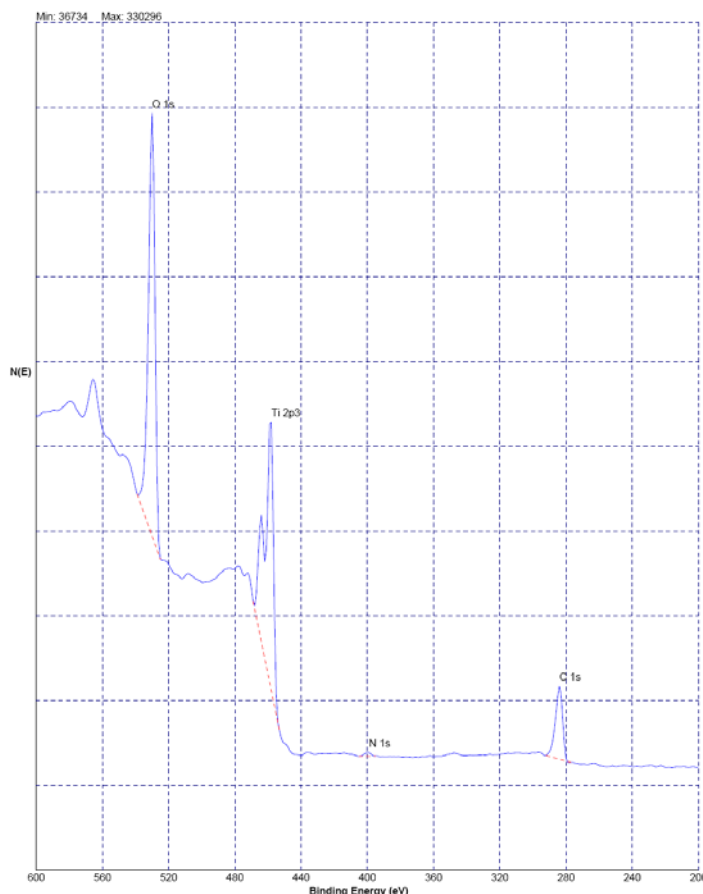


Fig.1 Esempio di spettro XPS nella zona analitica di interesse. Lo spettro e' relativo al campione C, si osservano i segnali di titanio, azoto, ossigeno e carbonio

Su una superficie di titanio ci si attenderebbe normalmente di vedere il 33.3% di questo elemento ed il rimanente ossigeno, essendo notoriamente gli strati piu' esterni ossidati dal contatto con l'atmosfera [10]. Inoltre, ogni superficie "cattura" molecole dall'atmosfera (e' il fenomeno sfruttato normalmente nei catalizzatori industriali), per cui una certa quantita' di carbonio e' sempre fisiologicamente presente sulle superfici di tutti i materiali. La percentuale fisiologica di questo elemento puo' ovviamente essere aumentata da contributi estranei, quali oli o residui di lavorazione, contatto con altri materiali o guanti, contributi del materiale di confezionamento. Per questo motivo, il rapporto tra concentrazione di titanio e concentrazione di carbonio misurati su una superficie e' un buon indice del grado di pulizia, come discusso nella letteratura in materia. Per i campioni in esame, la quantita' di carbonio misurata e' inferiore al 40% per i soggetti migliori (valori che, come riportato in letteratura, possono essere considerati fisiologici e sono indice di buona pulizia) mentre in altri casi e' superiore al 50%. E' bene ricordare che non esiste nessuno

studio che dimostri una correlazione tra questi parametri ed il successo clinico, se non altro per la difficoltà di organizzare uno studio di questo tipo e che non esistono chiari limiti di normativa a questo proposito. E' però ovvio che, trattandosi di un dispositivo medico da impianto, e' obbligo del produttore curare gli aspetti di pulizia al massimo grado possibile e limitare la presenza di elementi estranei in superficie al minimo livello realisticamente raggiungibile.

Per valutare la correlazione tra costo d'acquisto e livello di pulizia superficiale abbiamo riportato il rapporto Ti/C misurato sui campioni in esame in funzione della classe di costo. I risultati sono riportati nella Figura 2, più alta e' la barra più pulita e' la superficie dell'impianto. Un campione della fascia bassa ed uno della fascia alta sono risultati ottimi, i risultati peggiori sono stati ottenuti sul campione della fascia media e su uno dei campioni della fascia bassa. In generale, quindi, non si osserva una correlazione tra fascia di costo e caratteristica chimica analizzata.

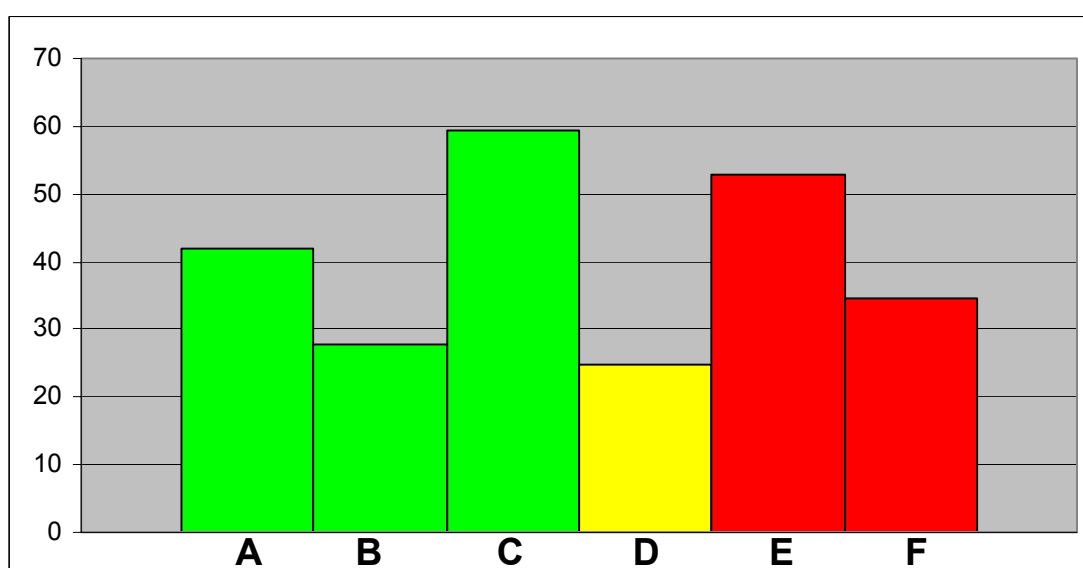


Fig. 2 Valore del rapporto Ti/C x 100 relativamente ai campioni analizzati, in funzione della categoria di costo. Gli impianti sono identificati con riferimento alla tabella 1, quelli di fascia bassa sono indicati con barre verdi, quello di fascia media con barra gialla, quelli di fascia alta con barre rosse. Più alta e' la barra più pulita e' la superficie dell'impianto.

Relativamente alla valutazione della pulizia "biologica", come discusso nell'introduzione e' stata misurata la presenza di endotossine adese mediante tecnica RT-PCR. Le endotossine sono molecole di origine batterica, il cui tipico rappresentante e' LPS (Lipopolisaccaride) prodotto da batteri Gram-negativi. Molecole che esercitano attività simile a LPS, come peptidoglicani, acido

lipoteicoico e tecoico, sono comunque prodotte sia da batteri Gram-negativi che batteri Gram-positivi [11, 12]. La presenza di queste molecole sulla superficie dei dispositivi da impianto evoca la risposta del sistema immunitario, che si manifesta con la produzione di citochine proinfiammatorie. La risposta avviene anche ovviamente nelle condizioni di sterilità dei dispositivi da impianto, in quanto il meccanismo è molecolare e indipendente dal fatto che i batteri produttori siano morti o vivi. Come ricordato nell'introduzione, la valutazione delle endotossine adese è particolarmente rilevante alla luce delle conoscenze sviluppate nel settore dell'osteimmunologia. Questa inter-disciplina, che si occupa delle interazioni tra cellule del sistema infiammatorio e cellule del sistema scheletrico [4-7], ha messo in luce come molte delle patologie che comportano riassorbimento osseo siano in realtà causate dall'effetto stimolatorio dell'attività osteoclastica promosso da molecole-segnaie (citochine) di origine infiammatoria [13]. Rientrano in questo ambito sia patologie quali l'artrite reumatoide e l'osteoporosi [14,15], che patologie legate alla presenza di protesi come "l'aseptic loosening" delle protesi d'anca [16,17], la periimplantite o la perdita d'integrazione a seguito di riassorbimento osseo. In particolare, le endotossine adese, che su materiali protesici sono dovute sostanzialmente a contaminazione in fase produttiva, sono state indicate come possibile reale motivo della perdita di integrazione delle protesi d'anca. Questa patologia di grandi implicazioni sociali ed economiche fino ad ora veniva per lo più inquadrata come frutto di processo infiammatorio dovuto a particelle rilasciate in seguito all'attrito dei materiali componenti la protesi.

La presenza di endotossine batteriche residue su impianti dentali, come su ogni dispositivo da impianto, è regolamentata per legge e i produttori devono eseguire test periodici. Il metodo di analisi, però, prevede che la misura venga eseguita su "estratti" dagli impianti, cioè esso misura la quantità di endotossina presente in liquido posto a contatto con il dispositivo (assumendo, quindi, che la fase liquida rimuova in modo completo o comunque rappresentativo le endotossine dalla superficie implantare) [18]. Inoltre, il limite normativo è legato ad effetti di pirogenicità, mentre le implicazioni relative alla stimolazione dell'attività osteoclastica sono in grande misura ignoti,

essendo acquisizione piu' recente: in un articolo del 2005, Greenfield e collaboratori indicavano che dovrebbero essere messe a punto nuove metodologie per ridurre l'attivita' di endotossine adese su impianti ortopedici [19].

Come descritto nella sezione su materiali e metodi, nelle nostre misure abbiamo valutato come il contatto tra cellule infiammatorie (macrofagi) e superficie implantare influenzi l'espressione di geni che codificano per tre delle citochine-chiave coinvolte nel processo di attivazione osteoclastica: IL-1, IL-6 e TNFa. Esse agiscono sinergicamente, sia in modo diretto che in modo indiretto, per stimolare la maturazione di osteoclasti precursori in osteoclasti maturi, in grado di riassorbire osso con efficacia. Poiche' l'incremento della differenziazione osteoclastica e' il principale responsabile dell'osteolisi periprostetica, questo tipo di valutazione e' estremamente importante. Il vantaggio del nostro metodo e' che non ricorre a misure su "estratti", ma valuta direttamente cio' che e' presente sull'impianto, a seguito dell'interazione diretta tra un sistema cellulare-modello e la superficie.

L'esecuzione di questa analisi rivela differenze significative tra i campioni. La Figura 3 e' un tipico esempio di curva di amplificazione del gene che codifica per IL-6, misurato sui campioni A e F. Le curve piu' sulla sinistra sono i riferimenti, identici nei due casi, mentre sulla destra si vede che la curva relativa al campione A (verde), sale molto prima che quella relativa al campione F (rossa). Questo indica in modo inequivocabile che il contatto con la superficie dell'impianto A ha comportato da parte delle cellule utilizzate nel test una maggiore espressione del gene relativo alla citochina proinfiammatoria IL-6 rispetto a quanto fatto sul campione F.

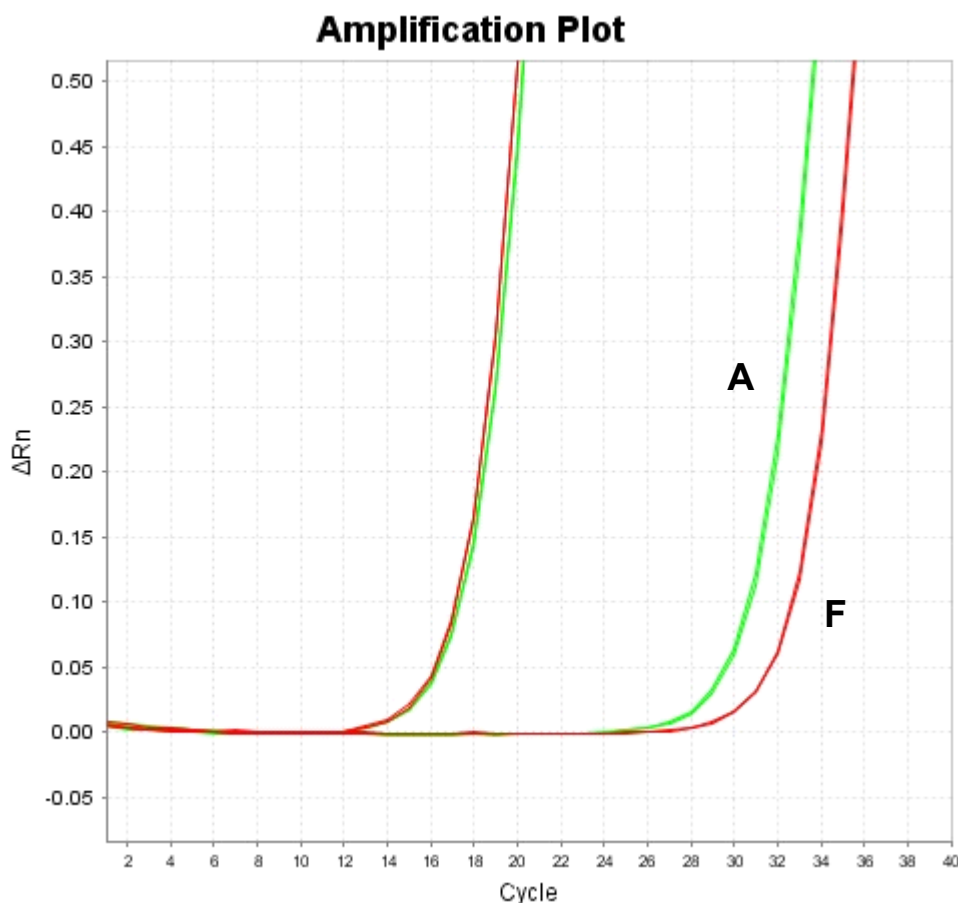


Fig. 3 Tipica curva di amplificazione misurata mediante RT-PCR. Le curve piu' sulla sinistra sono i riferimenti, identici nei due casi, mentre sulla destra la curva relativa al campione A sale molto prima che quella relativa al campione F. Il contatto tra macrofagi e la superficie dell'impianto A comporta quindi una maggiore espressione del gene relativo alla citochina proinfiammatoria IL-6 rispetto a quanto accade sul campione F

I risultati globali ottenuti sono riportati nella Figura 4 di pagina seguente. Come riferimento e' stato preso un impianto trattato e sottoposto ad un ciclo completo di rimozione di endotossine adese all'interno della nostra camera bianca. Le barre indicano di quante volte l'espressione di un dato gene sui campioni in esame e' incrementata rispetto al riferimento. In pratica, esse indicano come il confezionamento o la mancata rimozione iniziale di endotossine possano rendere piu' pro-infiammatoria (e quindi potenzialmente piu' "pro-osteoclastogenica") una data superficie implantare rispetto ad una superficie ottimale.

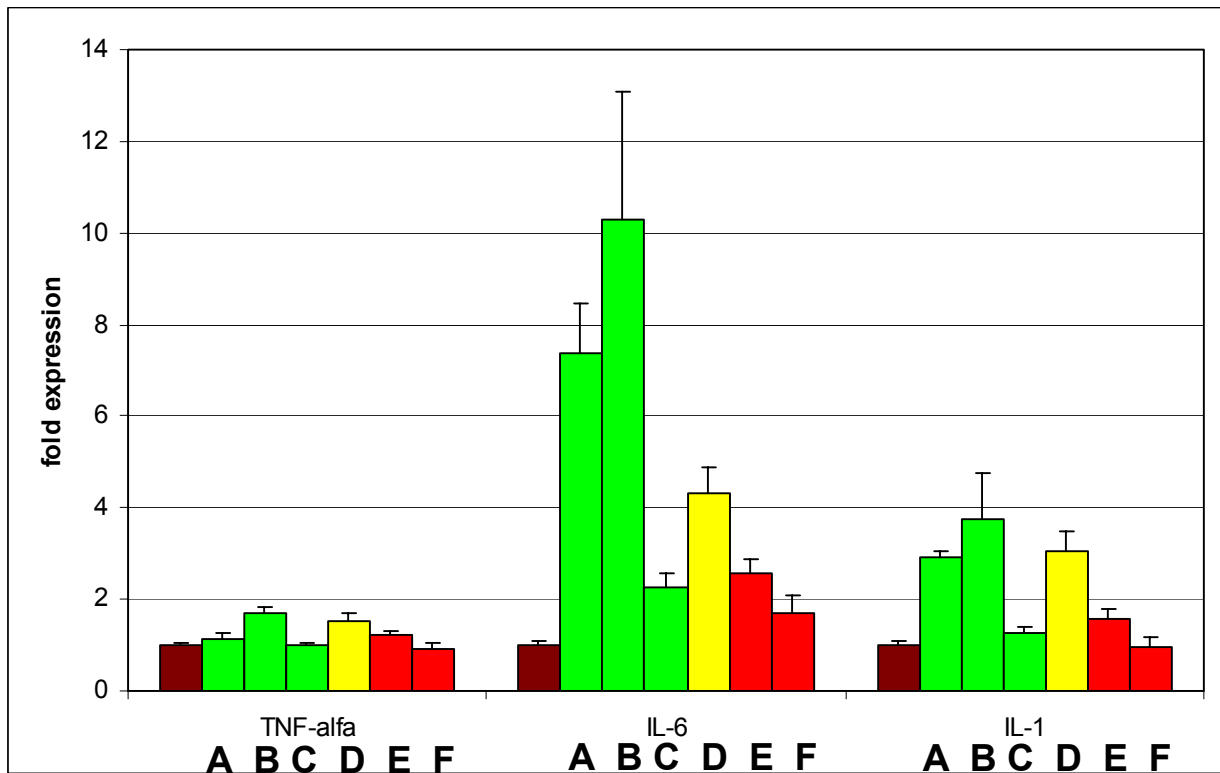


Fig. 4 Misure di espressione genica da parte di cellule J774A.1 dopo 4 ore di contatto con i campioni in esame. Gli impianti sono identificati con riferimento alla tabella 1, quelli di fascia bassa sono indicati con barre verdi, quello di fascia media con barra gialla, quelli di fascia alta con barre rosse. La barra marrone indica il campione di riferimento. Due campioni di fascia bassa ed il campione di fascia media si dimostrano notevolmente piu' pro-infiammatori degli altri (descrizione completa nel testo)

I dati mostrano, confrontando l'espressione dei tre diversi geni, un andamento coerente: i due impianti della fascia alta ed un impianto della fascia bassa (C) forniscono dati non significativamente diversi tra loro. Inoltre, questi impianti non presentano sovraespressione di geni proinfiammatori rispetto al controllo, a parte un lieve incremento, ai limiti della significativita', per IL-6, che e' il gene piu' sensibile. Questi dati indicano che per queste tipologie di campioni le endotossine adese sono efficacemente rimosse in fase di produzione e non vengono reintrodotti in confezionamento. I rimanenti tre impianti, due della fascia bassa e quello della fascia media presentano invece una sovraespressione di geni proinfiammatori, IL-6 e' espressa fino a 10 volte di piu' sul campione B. Il medesimo campione esprime circa il doppio di TNF α e quattro volte di piu' IL-1 rispetto al riferimento.

L'interpretazione di questi dati richiede ovviamente cautela: tutti gli impianti analizzati sono in commercio e quindi anche quelli maggiormente pro-infiammatori posseggono i requisiti essenziali che ne consentono la commercializzazione secondo la normativa sui dispositivi medici. Tra di essi e' inclusa la valutazione delle endotossine e il loro contenimento entro i limiti di legge (pur con i limiti della metodologia di indagine adottata, come discusso in precedenza). Non e' noto se l'entita' delle sovraespressioni registrate siano in effetti tali da generare risposte immunitarie in grado di stimolare l'attivazione osteoclastica in condizioni cliniche. In ogni caso, i dati dimostrano che anche relativamente a questa variabile esiste una eterogeneita' di offerta, ovviamente all'insaputa del professionista e del paziente. Inoltre, e' estremamente interessante notare come misure di questo tipo, apparentemente lontane dalla realta' produttiva, possano fornire indicazioni molto rilevanti sull'accuratezza dei processi di produzione e confezionamento.

Conclusioni

I dati ottenuti indicano che, nell'ambito dei campioni analizzati, un impianto di fascia bassa ed un impianto di fascia alta superano le valutazioni eseguite a pieni voti: sia nel caso della pulizia "chimica" che di quella "biologica", i campioni C ed E si pongono ai migliori livelli possibili e si dimostrano a pieno titolo dispositivi medici moderni, progettati e realizzati nel rispetto delle specificita' del settore. L'impianto F di fascia alta e' privo di effetti da endotossine adese, ma migliorabile dal punto di vista della pulizia. I rimanenti impianti analizzati, due di fascia bassa ed uno di fascia media, pur rispondendo pienamente ai requisiti normativi, presentano aspetti migliorabili. Negli impianti A, B e, in misura lievemente inferiore, C, le fasi di pulizia e confezionamento non sono completamente in linea con le possibilita' attuali della tecnologia del settore.

Alla luce di questi risultati, la fondatezza della tesi alla base di questo lavoro, cioe' l'esistenza di una correlazione tra qualita' e prezzo di acquisto, non viene del tutto chiarita. Il fatto che il costo

indicativo di C sia meno della meta' di quello di E, con una qualita' comparabile e sicuramente ottima, puo' essere lo spunto di molte riflessioni.

In conclusione, piu' che dare risposte, i risultati confermano la difficolta' di scelta per il professionista, che non ha linee guida sicure per la selezione del prodotto. Le note positive vengono comunque dalla constatazione che esistono sul mercato prodotti con ottime caratteristiche, anche a costi ragionevoli, e che esistono oggi nuovi mezzi sofisticati e affidabili per valutare la correttezza dei processi produttivi.

Bibliografia

- [1] Bellanda M, Morra M, Cassinelli C., Viti da impianto: composizione superficiale, Dental Cadmos, 18, 42-45, 1996
- [2] Davies JE, Ed Bone Engineering, Toronto, Em squared, 2000
- [3] Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P, Eds Titanium in Medicine, Springer, Berlin, 2001
- [4] Wieland M, Sittig C, Brunette DM., Textor M, Spencer ND, Measurement and evaluation of the chemical composition and topography of titanium implant surfaces, in: , Davies J. E. editor. Bone Engineering, Toronto, em squared, 2000; 163-181
- [5] J. Lorenzo, Y Choi, Osteoimmunology, Immunological Reviews, 2005, 208: 5–6
- [6] M. Rauner, W Sipos, P Pietschmann, Osteoimmunology, Int Arch Allergy Immunol 2007;143:31–48
- [7] T Nakashima, Y Takayanagi, Osteoclasts and the immune system, J Bone Miner Metab (2009) 27:519–529
- [8] M. Morra, C Cassinelli, D.G. Cascardo, D. Bollati. M. Bellanda, articolo in preparazione
- [9] S.S. Jakobsen, A. Larsen, M. Stoltenberg, J.M. Bruun, K. Soballe, Effects of as-cast and wrought cobalt-chrome-molybdenum and Ti-Al-V alloys on cytokine gene expression and protein secretion in J774A.1 macrophages, Cells and Materials Journal, 14, 45-55, 2007
- [10] B. Kasemo, J. Lausmaa, 1986, Surface science aspects on inorganic biomaterials, Critical Reviews in Biocompatibility, 2, 335-380, 1986
- [11] Hauschildt S, Brabetz W, Schromm AB, Hamann L, Zabel P, Rietschel ET, Muller-Loennies S. Structure and activity of endotoxins. In: Aktories K, Just I, editors. Handbook of experimental pharmacology. Berlin: Springer; 2000. p 619–659.

- [12] Wang ZM, Liu C, Dziarski R. Chemokines are the main proinflammatory mediators in human monocytes activated by *Staphylococcus aureus*, peptidoglycan, and endotoxin. *J Biol Chem* 2000;275:20260–20267.
- [13] Aaron J, Choi Y: Bone versus immune system. *Nature* 2000; 408: 535–536
- [14] Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM: Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999; 402: 304–309
- [15] Kotake S, Udagawa N, Hakoda M, Mogi M, Yano K, Tsuda E, Takahashi K, Furuya T, Ishiyama S, Kim KJ, Saito S, Nishikawa T, Takahashi N, Togari A, Tomatsu T, Suda T, Kamatani N: Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1003–1012.
- [16] Ragab AA, Lavish SA, Van De Motter RR, Goldberg VM, Greenfield EM. Stimulation of cytokine production by titanium wear particles is due to adherent endotoxin. *Trans Orthop Res Soc* 1998;23:355.
- [17] Nalepka JL, Dennis JE, Greenfield EM. Adherent endotoxin on titanium alloy substrates inhibits growth and osteoblastic differentiation of mesenchymal precursor cells. *Trans Orthop Res Soc* 2003;28:1373.
- [18] Bacterial Endotoxin Testing: A Report on the Methods, Background, Data, and Regulatory History of Extraction Recovery Efficiency, T. D. Bryans; C. Braithwaite; J. Broad; J. F. Cooper; K. R. Darnell; V. M. Hitchins; A. J. Karren, P. S. Lee, *Biomedical Instrumentation & Technology* 2004; 37:73–78
- [19] Does Endotoxin Contribute to Aseptic Loosening of Orthopedic Implants? E. M. Greenfield, Y. Bi, A. A. Ragab, V. M. Goldberg, J. L. Nalepka, J. M. Seabold, *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 72B: 179–185, 2005