

SOUČASNÉ METODY HODNOCENÍ OSEOINTEGRACE IMPLANTÁTŮ Z NANOSTRUKTURNÍHO TITANU

AMIN MOZTARZADEH^a, OMID MOZTARZADEH^{b,d},
TEREZA KUBÍKOVÁ^c, ZBYNĚK TONAR^c,
DANIEL HRUŠÁK^b, ANTONÍN ZICHA^b
a VÁCLAV BABUŠKA^a

^a Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, Karlovarská 48, 301 66 Plzeň, ^b Stomatologická klinika, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova a Fakultní nemocnice Plzeň, alej Svobody 80, 304 60 Plzeň, ^c Ústav histologie a embryologie a Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, alej Svobody 76, 323 00 Plzeň, ^d Ústav anatomie, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, Karlovarská 48, 301 66 Plzeň
vaclav.babuska@lfp.cuni.cz

Došlo 16.5.17, přijato 16.8.17.

Klíčová slova: oseointegrace, dentální implantát, nanostrukturní titan, histomorfometrie

Obsah

1. Úvod
2. Materiál a provedení dentálních implantátů
 - 2.1. Titan a nanostrukturní titan
 - 2.2. Typy orálních implantátů
 - 2.2.1. Enoseální
 - 2.2.2. Subperiostální
 - 2.2.3. Transoseální
 - 2.3. Povrchové úpravy
3. Metody implantace
 - 3.1. Zvířecí modely
 - 3.2. Kompaktní *versus* spongiózní kost
 - 3.3. Metodika implantace
4. Histologické zpracování a vyhodnocení
 - 4.1. Odběr vzorků
 - 4.2. Technika neodvápňených výbrusů
 - 4.2.1. Fixace a dehydratace
 - 4.2.2. Zalévání do polymeru
 - 4.2.3. Řezání
 - 4.2.4. Broušení a leštění
 - 4.2.5. Barvení
 - 4.3. Technika odvápňených histologických řezů
 - 4.4. Mikroskopické hodnocení
 - 4.4.1. Kvalitativní hodnocení
 - 4.4.2. Histologická kvantifikace kontaktu kost-implantát
 - 4.4.3. Kvantifikace dalších parametrů kosti
5. Závěr

1. Úvod

První pokusy o náhradu zubů se datují již do doby starého Egypta. Některé archeologické nálezy ukazují na implantáty ze zlatých drátů, slonoviny nebo mušlí. Za počátek moderní implantologie je však třeba počítat až období poloviny 60. let, kdy švédský profesor Per-Ingvar Brånemark začal se svými úspěšnými pokusy oseointegrace implantátů ve tvaru šroubu vyrobeného z čistého titanu¹. Tento objev způsobil prudký vzrůst obliby užívání dentálních implantátů. Brånemark pozoroval růst kosti v takové blízkosti implantátu, že účinně adherovala na kov. Na základě těchto pozorování později se svými spolupracovníky vytvořil koncept oseointegrace jako přímého a stabilního kotvení implantátu díky vytvoření kostní tkáně bez fibrózní mezivrstvy na rozhraní kost-implantát².

Aby mohl být oseointegrovaný implantát považován za úspěšný, musí splnit určitá kritéria, pokud jde o vlastní funkčnost a fyziologii okolních tkání. Tyto požadavky zahrnují imobilitu ve všech směrech; průměrnou ztrátu okolní kosti dle rentgenového snímku méně než 1,5 mm během prvního roku po implantaci a méně než 0,2 mm ročně poté; absenci symptomů bolesti, infekce, parestézie nebo poškození mandibulárního nervu³. V neposlední řadě jsou kritériem úspěšnosti také estetické požadavky a spokojenost pacienta i lékaře s protetikou prací nesenou implantátem. Významným faktorem pro úspěšnou oseointegraci dentálního implantátu je jeho tvar, vlastnosti použitého materiálu a vhodná úprava jeho povrchu⁴.

V tomto přehledovém článku se pokusíme zobecnit naše vlastní zkušenosti s testováním a hodnocením implantátů z nanostrukturního titanu.

2. Materiál a provedení dentálních implantátů

2.1. Titan a nanostrukturní titan

Titan a jeho slitiny se běžně používají jako biokompatibilní materiál pro dentální i ortopedické implantáty pro jeho výhodné vlastnosti zahrnující nízkou toxicitu, vysokou pevnost, odolnost vůči korozi a rychlou pasivaci povrchu tvorbou stabilní oxidové vrstvy⁵. Titan (cpTi, commercially pure titanium) vykazuje vysokou míru biokompatibility, avšak relativně nízkou pevnost, zatímco titanové slitiny mají výbornou pevnost, ale obsahují potenciálně toxické nebo alergenní přísady⁶. Dlouhodobá stabilita titanových implantátů závisí na vytvoření kontaktu kosti s implantátem (bone-implant contact, BIC) bez vmezeřené fibrózní tkáně. Debris ve formě titanových částic uvolňovaných z implantátu při jeho dlouhodobém zatěžování se může dostávat do okolních tkání a způsobovat zánět

Tabulka I

Základní materiálové charakteristiky cpTi a nTi

Materiál	Mez pevnosti [MPa]	Mez kluzu [MPa]	Modul pružnosti [GPa]	Tažnost [%]
cpTi	680	550	105	20
nTi	1230	1100	100	12

a resorpci kosti, což může vést k uvolnění nebo i selhání implantátu⁷. Zlepšování biokompatibility dentálních implantátů je proto zásadním cílem současného výzkumu, jehož jedním směrem je příprava celokovového nanostrukturovaného titanu (nTi). Jeho chemické složení je stejné jako u cpTi, avšak mechanické vlastnosti jsou výrazně odlišné. V tab. I jsou uvedeny základní materiálové charakteristiky obou materiálů.

Nanostrukturní titan je nový materiál, který byl vyvinut právě pro medicínskou implantologii. V praxi jde o cpTi slitinu se speciálním způsobem výroby, a to jednou z metod velké plastické deformace (SPD, Severe Plastic Deformation), konkrétně úhlovým protlačováním kanálem stejného průřezu (ECAP, Equal Channel Angular Pressing) s následným válcováním. Tato metoda probíhá za teplot cca 450 °C a za velmi vysokých tlaků. Úhlovým protlačováním se dosáhne výrazné deformace bez změny geometrie původního polotovaru. Nutno dodat, že jde o finančně náročnou metodu a výsledný materiál je více než desetkrát dražší než běžný cpTi. Tímto zpracováním dojde k poklesu velikosti zrn do řádu nanometrů a k výraznému zvýšení materiálových pevnostních charakteristik⁸. Rovněž dochází k poklesu hodnoty Youngova modulu pružnosti oproti standardnímu cpTi, který je určitou mírou kvality oseointegrace⁹.

2.2. Typy orálních implantátů

Dlouhý vývoj dentálních implantátů vede k neustálému zdokonalování jejich tvarů a umístění. V současnosti jsou používány implantáty tzv. otevřeného systému, do kterého můžeme zařadit enoseální, subperiostální a transoseální dentální implantáty¹⁰.

2.2.1. Enoseální

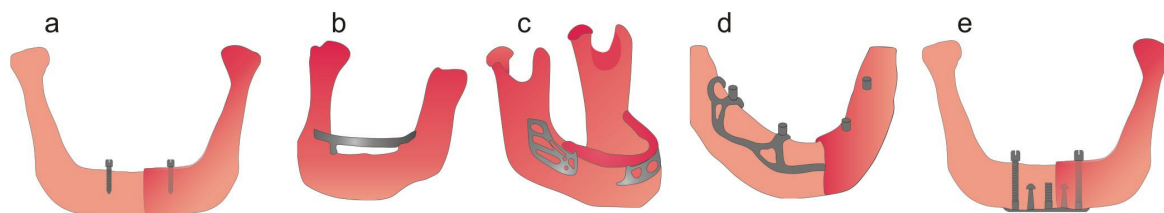
V novodobé dentální implantologii dominují implantáty enoseální, které se chirurgicky zavádějí do kosti. Pod-

le svého tvaru, funkce a umístění se rozdělují do několika dalších podkategorií.

Cylindrické implantáty jsou obecně nejrozšířenější a podobají se kořeni přirozeného zubu. Až na několik výjimek se jedná o tvar samořezného závitového šroubu. Výsledky mnoha experimentálních prací ukazují, že šroubové implantáty jsou s ohledem na svoji počáteční stabilitu lepší, než implantáty válcové¹¹. Pokud jde o délku a průměr implantátu, mohlo by se zdát, že krátké typy budou méně úspěšné v integraci do kosti. Avšak většina dlouhodobých studií ukazuje, že délka a průměr implantátu hrají mnohem menší roli v oseointegraci než vlastní stav kosti¹² a tedy jedním z hlavních kritérií pro výběr konkrétního implantátu je stav a velikost pacientovy čelisti. Nicméně, přes nesporné výhody tohoto typu, může být použit pouze v případě dostatečné šířky a výšky čelistní kosti, což někdy vyžaduje přidání kostního štěpu ještě před plánovanou implantací (obr. 1a).

Ramenné implantáty jsou navrženy výhradně pro bezzubou dolní čelist. Zavádí se do mandibuly ve třech místech, bilaterálně v distálních úsecích v přibližné poloze zubů moudrosti a frontálně v oblasti brady. Tento typ implantátu je zpravidla indikován u výrazně resorbované bezzubé dolní čelisti, která nemá dostatečnou výšku kosti ke kotvení šroubového implantátu, nebo v případě, kdy je dolní čelist tak resorbovaná, že ani subperiostální implantát nebude dostatečný. Po integraci do kosti může tento implantát sloužit jako ochrana oslabené čelisti proti fraktuře (obr. 1b).

Čepelkové implantáty jsou ploché obdélníkové struktury ve tvaru dlouhého tenkého proužku titanu zavedeného mezi čelistní kost a dásně. Po spojení s kostí mohou být oporou pro několik protetických korunek. Obvykle jsou užívány při nedostatečném množství kostní tkáně kvůli příliš úzké nebo nízké čelistní kosti nebo v případech, kdy zavedení konvenčního implantátu brání určité důležité anatomické struktury (obr. 1c).



Obr. 1. Typy orálních implantátů, a) enoseální cylindrický, b) enoseální ramenný, c) enoseální čepelkový, d) subperiostální, e) transoseální

2.2.2. Subperiostální

Subperiostální implantáty byly vytvořeny tak, aby nasedaly na kost pod sliznicí. Ke spojení tedy dochází mezi kostí čelisti a subperiostálním implantátem. Jsou možností volby v případech velmi pokročilé ztráty kosti, kdy není možné zavést implantát do kosti ani není možné použít kostní štěp (obr. 1d).

2.2.3. Transoseální

Transoseální implantáty jsou vytvořeny pro pacienty s velmi nízkou bezzubou mandibulou. Užívají se zřídka, protože jejich zavedení vyžaduje extraorální chirurgický přístup, rozsáhlou chirurgii, celkovou anestezii a hospitalizaci. Jsou užívány pouze v dolní čelisti. Při chirurgickém výkonu jsou zavedeny dvě kovové tyčinky od spodní hrany brady skrz kost až do dutiny ústní. Část tyčinek viditelná v ústech pak slouží jako opora protetické náhrady (obr. 1e).

V dnešní době dává většina klinických pracovníků přednost užívání kostních štěpů a některému typu enoseálních implantátů popsaných výše. Subperiostální a transoseální implantáty jsou víceméně obsolentní a jsou zde zmiňovány pouze pro přehlednost.

2.3. Povrchové úpravy

Odezva živé tkáně na implantovaný materiál je bezprostředně vázána na povrchové vlastnosti implantátu¹³. K charakteristikám povrchu patří jeho topografie, chemické složení, krystalická struktura a její homogenita, drsnost a biotolerance.

Dentální implantáty z nanostrukturálního titanu se vyrábí frézováním daného tvaru z titanové tyčoviny a jako takové mají po své výrobě hladký povrch daný metodou obrábění. U takového povrchu se objevuje silná závislost úspěšnosti integrace do kosti na podmínkách implantace, jako je kvalita kostní tkáně a primární stabilita implantátu. Při zhoršení těchto podmínek dochází k poměrně rychlé a výrazné fibrointegraci. Na kontaktu mezi buňkou a titanovým substrátem se podílí převážně proteiny extracelulární matrix, membránové receptory a proteiny cytoskeletu. Často se sledují tzv. fokální adheze, tedy místa, kde se buňka váže na materiál. Typickým proteinem těchto míst je vinkulin, kterého se také při pokusech využívá k imunofluorescenčnímu barvení. Zjednodušeně je možno říci, že vinkulin extracelulárně kotví buňku přes transmembránový protein integrin a intracelulárně je spojen s cytoskeletárním aktinem.

Snaha o zvýšení úspěšnosti integrace implantátu do kosti vede k vývoji mnoha různých metod měnících jeho povrch na makroskopické i mikroskopické úrovni. Z výzkumů vyplývá, že texturované povrchy vedou ke zlepšení vhojovacích schopností, lepšímu kontaktu mezi kostí a implantátem a snížení počtu rejekcí¹⁴. Drsnost povrchu také stimuluje buněčnou migraci a proliferaci¹⁵.

Metody se dají rozdělit na fyzikální (pískování, laserování), chemické (leptání), elektrochemické (anodická

oxidace), depoziční (plazmové sprejování, sol-gel) a biochemické (SBF, proteiny a jiné organické molekuly).

Pískování je metoda využívající mechanickou abrazi povrchu způsobenou tryskáním zrnitého materiálu. Jako pískovací médium se používá Al_2O_3 , TiO_2 , ZrO_2 , $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ a další materiály. Významným faktorem ovlivňujícím požadovanou výslednou drsnost je zrnitost materiálu, jeho tvar a kinetická energie částic vržených proti stěnám implantátu. Dochází k několikanásobnému zvětšení povrchu implantátu, odstranění malých třísek a trhlin vzniklých obráběním, k nárůstu únavové pevnosti, zvýšení odolnosti proti korozi. Tato metoda úpravy povrchu se používá někdy jako finální, ale častěji je základem pro další metody. Pískováním vzniká povrchová drsnost v řádu jednotek až desítek mikrometrů¹⁶. Nevýhodou takto vzniklého čtenitého povrchu je větší ulpívání a akumulace bakterií¹⁷.

Laserová úprava dentálních implantátů využívá jako zdroj záření diodový laser Nd:YAG. Laserový paprsek o přesně definované vlnové délce a energii způsobí zvýšení teploty v ohraničeném místě styku s implantátem a následné vypaření molekul titanu, což vede ke změnám v povrchové topografii. Vzniklé hemisféry mohou mít různý průměr a hloubku podle zvolených parametrů paprsku¹⁸.

Při metodě *kyselého leptání* se využívá chemického působení kyselin na kovové povrchy. Nejčastěji se používají silné kyseliny, jako HF, HNO_3 a H_2SO_4 nebo jejich kombinace. Struktura a hloubka leptaného povrchu závisí na typu a koncentraci použité kyseliny. V některých případech se pro zvýšení účinnosti používá opakované leptání, zvýšená teplota a delší čas leptání. Leptaný povrch vykazuje zlepšení v buněčné adhezi a novotvorbě kosti¹⁹. Rozšířenou variantou kyselého leptání je duální kyselé leptání, jehož podstatou je použití směsi kyselin, jako např. HCl/ H_2SO_4 nebo postupného leptání dvěma různými kyselina-mi²⁰. Leptání vytváří nerovnosti v řádu stovek nanometrů až jednotek mikrometrů. Zvláště významné je leptání pomocí HF, která zanechá na povrchu fluoridové ionty. Jejich přítomnost má příznivý vliv na proliferaci kostních buněk, na diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk do buněk kostní tkáně a na stimulaci endogenních růstových faktorů.

Metoda *alkalického leptání* využívá NaOH, díky němuž vznikne na povrchu titanových implantátů hydrogel Na_2TiO_3 , který následným vypálením při 600 °C vytvoří vrstvičku amorfního Na_2TiO_3 (cit.²¹).

Při *anodické oxidaci* se elektrochemickou metodou vytváří na povrchu implantátu oxidová vrstva různé tloušťky, morfologie a chemického složení v závislosti na iontovém složení použitého elektrolytu²².

Technika *plazmového sprejování* slouží k nanesení teplem roztavené tenké vrstvy materiálu, jako je např. $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, na povrch původního substrátu²³. Nanášený materiál je ve formě prášku vpraven do plazmového oblaku o vysoké teplotě, díky které se ohřeje a zároveň je urychlován směrem na substrát. Tato metoda výrazně zvětšuje plochu povrchu a zvyšuje jeho drsnost. Mnoho studií potvrzuje zlepšení mechanických vlastností²⁴.

Při *sol-gelové metodě* jde o nanesení kapaliny (koloidní „sol“) na povrch implantátu a její přeměnu na pevnou fázi („gel“). Následné ošetření teplem přemění gel na tvrdou keramiku. Jedná se o efektivní a jednoduchou metodu pro potahování implantátů rozličných tvarů, kdy je možno na povrchu vytvářet kompozity s několika vrstvami různých materiálů. Tloušťka takto vytvořených vrstev se pohybuje od jednoho do deseti mikrometrů²⁵.

Cílem *biochemických modifikací* povrchu je vyvolat specifickou odpověď buněk a tkání. Různé biomolekuly ovlivňující metabolismus tkání v okolí implantátu jsou spojeny s jeho povrchem buď adsorpcí, nebo kovalentní imobilizací²⁶.

3. Metody implantace

3.1. Zvířecí modely

Pro experimentální hodnocení oseointegrace jsou používána zvířata rozdílných druhů, různé tělesné velikosti a stáří. Nejčastějšími zvířecími modely používanými pro hodnocení vhojování kostních implantátů jsou prasata, králíci, psi, ovce a kozy. Žádný z těchto druhů nespĺňuje všechny vlastnosti ideálního modelu čelistí člověka tak, aby bylo možné experimentálně získané poznatky zcela automaticky přenést i do humánní medicíny, a proto je volba vhodného modelu a znalost interpretačních omezení výsledků významnou součástí vývoje a testování nových biomateriálů²⁷.

Pes je po anatomické i behaviorální stránce poměrně vhodným modelem k testování kostních implantátů, ale vzhledem ke statutu domácího mazlíčka je jeho užívání ve výzkumu eticky stále problematičtější²⁸. U prasete se setkáváme u řady kostí s významnou podobností lidským kostem, a to jak v oblasti morfologie kostí, tak u mechanismů hojení a remodelace. Zdrojem praktických potíží při experimentech s prasaty může být jejich tělesná velikost (obtížná manipulace) a paradoxně i vynikající hojivost, která zejména u mladších jedinců převyšuje regenerační

možnosti obvyklé u člověka středního a vyššího věku. Tyto obtíže lze částečně překlenout využitím miniprasete, ovšem je nutno uvážit i věk zvířete tak, aby byla implantace prováděna po ukončení tělesného růstu (v opačném případě není výjimkou zarůstání implantátů do zvětšujících se kostí)^{29–33}. Zvířecím modelem často preferovaným pro nižší ekonomickou náročnost chovu je králík, u něhož však není podobnost s lidskou kostí příliš přesvědčivá. Menší tělesná velikost králíka je omezující při potřebě testovat větší množství implantátů či implantáty větších rozměrů^{34–37}. V praxi bývá testování implantátů často prováděno v horní čelisti, stehenní či holenní kosti miniaturního prasete, popř. ve stehenní kosti králíka. Tabulka II poskytuje souhrnný přehled zvířat používaných v oseointegračních experimentech.

Podle české technické normy (ČSN EN ISO 10993-6 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 6: Zkoušky lokálních účinků po implantaci) by maximální počet zavedených implantátů neměl překračovat šest u králíka a dvanáct u prasete.

3.2. Kompaktní versus spongiózní kost

Výběr cílové kosti pro implantaci je podstatným krokem v plánování vědecké studie. Například pro implantáty určené k použití v maxile člověka (typická je zde hojná, někdy i poměrně řídká spongiózní (houbovitá, trámčitá, trabekulární) kost krytá jen tenkou kortikální laminou kompaktní kosti) je vhodným modelem maxila prasete, která má rovněž variabilní vrstvu povrchové kompaktní kosti, pod níž se nachází především kost spongiózní^{31–33}. Naproti tomu lidská i prasečí mandibula je z naprosté většiny tvořena kompaktní kostí. Podle Katranjiho a spol.³⁸ je průměrná bukalní kortikální tloušťka v bezzubé maxile 1,69 mm (oblast molárů), 1,43 mm (oblast premolárů) a 1,04 mm (frontální úsek), zatímco v bezzubé mandibule je tato tloušťka 2,06 mm (oblast molárů), 1,78 mm (oblast premolárů) a 1,36 mm (frontální úsek). Změny v relativním složení mezi spongiózní a kompaktní kostí v atrofické bezzubé mandibule jsou dány úbytkem výšky a celkové

Tabulka II

Nejčastěji užívaná pokusná zvířata, kosti vybrané pro implantaci a doba hojení

Zvířecí model	Věk/hmotnost	Místo implantace	Doba hojení	Lit.
Prase	18 měsíců	lebka	1, 2 a 4 týdny	29
Miniprase	6 roků	maxila a mandibula	4 a 6 týdnů	30
	4 roky / 70–90 kg	maxila	8 týdnů	31
	2–4 roky	maxila	1,2,4 a 8 týdnů	32
	1 rok / ca. 60 kg	maxila	4 a 8 týdnů	33
Králík	2,8–3,2 kg	nosní kost	8 týdnů	34
	1–3 měsíce/2,4–3 kg	femur	1 a 3 měsíce	35
	6–8 měsíců	femur	3 měsíce	36
	3–3,5 kg	tibie	2 a 4 týdny	37

plochy převážně na úkor spongiózní kosti, přičemž úbytek kortikální kosti nebývá významný³⁹. Kvůli různé prostorové organizaci kompaktní a spongiózní kosti může výběr umístění implantátu vést k rozdílným hodnocením oseointegrace, protože trámce spongiózní kosti mají nižší pravděpodobnost být v těsném kontaktu s povrchem implantátu, nežli souvislá kompaktní kost. Správná interpretace experimentů s oseointegrací by tedy měla být založena na znalosti poměru mezi kompaktní a spongiózní kostí v místě implantace.

3.3. Metodika implantace

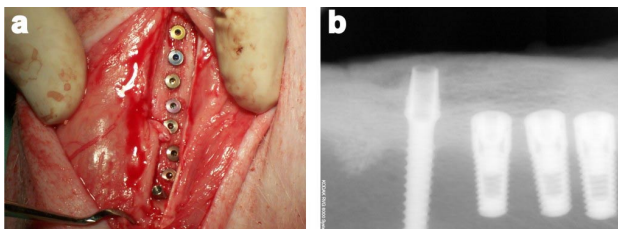
Při hodnocení *in vivo* se využívá zvířecích modelů pro zjišťování vlivu různých biologických faktorů na oseointegraci implantátů a rovněž vliv vloženého materiálu na biologický objekt.

V celkové anestezii, po standardní dezinfekci a v aseptických podmínkách je provedena incize kůže a preparace měkkých tkání. Odklopení mukoperiostálního laloku musí vést k expozici celé části kosti, kde je zamýšlena implantace. Během výkonu je nezbytně opakovaně vyplachovat sterilním fyziologickým roztokem a sledovat, zda vrtáním nedochází k přehřátí kosti nad 47 °C, což by mohlo vést k odumírání kostních buněk a následnému selhání oseointegrace. Po chirurgické preparaci kosti jsou zavedeny implantáty (obr. 2a). Technika zavedení implantátů závisí z velké části na použitém implantačním systému. Po důkladném vyčištění a irigaci je rána zašita vstřebatelným materiálem vrstvou po vrstvě z hlubokých částí k povrchovým. Během doby hojení je vhodné provést RTG, CT nebo denzitometrickou analýzu, které slouží k dokumentaci procesu oseointegrace a ukazují přesnou pozici implantátů (obr. 2b). Po naplánované době hojení je zvíře humánně utraceno a je separována kost s implantáty od měkkých tkání⁴⁰.

4. Histologické zpracování a vyhodnocení

4.1. Odběr vzorků

Při ukončení *in vivo* experimentu je rentgenovým snímkem ověřena pozice a orientace implantátu, což je nanejvýš užitečná informace pro následné řezání kosti na



Obr. 2. a) Implantáty zavedené do prasečí tibie, b) RTG snímek implantátů v době hojení

tkáňové bločky. Tkáňový bloček by měl být co nejmenší pro lepší penetraci fixačního činidla, nicméně pro potřeby spolehlivého hodnocení oseointegrace je vhodné, aby ze všech stran kolem implantátu zůstala zachována alespoň 2 mm silná vrstva kostní tkáně. Diamantovou pásovou pilou nebo speciální diamantovou kotoučovou pomaloběžnou pilou jsou nařezány tkáňové bločky o hraně přibližně 2×2×2 cm, přičemž během všech fází zpracování je stále udržována informace o orientaci vzhledem k původní anatomické pozici implantátů. Další cesta zpracování se liší podle toho, zda vzorek obsahuje kovový implantát nebo např. jen tkáňový nosič či augmentační mineralizovaný materiál. Zatímco vzorky kostí s nekovovými materiály je možno odvápnit (demineralizovat) a zpracovat pak standardní technikou parafinových řezů, vzorky s kovovými implantáty je třeba zpracovat technikou neodvápněných (nedemineralizovaných) výbrusů. Demineralizaci vynecháváme rovněž tehdy, pokud má být předmětem vyšetření právě např. míra mineralizace, popř. byla použita látka vázající se na minerální složku kostní matrix (např. dávky tetracyklinových antibiotik, která po zabudování do kostní hmoty září ve fluorescenčním mikroskopu a zviditelňují přírůstkové linie kostní hmoty).

4.2. Technika neodvápněných výbrusů

Obvyklým postupem je zalití vzorku do polymeru, po němž následuje řezání tenkých plátků, jejich postupné vybroušení a vyleštění⁴¹. Následné obarvení poskytuje informace o tvorbě a mineralizaci kostní matrix v těsném okolí implantátu. Jednou z výhod je, že můžeme mikroskopicky vyšetřit kompletní kostní tkáň bez jakéhokoli úbytku minerální fáze, která u většiny kostí tvoří několik desítek objemových procent.

4.2.1. Fixace a dehydratace

Získané tkáňové bločky s implantátem se fixují zpravidla v 10% roztoku formaldehydu. Doba jejich fixace závisí na tloušťce vzorku a při tloušťce 2–4 mm vyžadují pro penetraci asi 12 hodin. Silnější vzorky vyžadují asi 24 h, ale některé studie doporučují pro vzorky o tloušťce 16 mm až 5 dní³⁷. Důležitým faktorem pro dobu fixace je poměr spongiózní (relativně snadná fixace) a kompaktní kosti (vyžadující delší dobu fixace). Po fixaci jsou vzorky postupně odvodněny v ethanolu o stoupající koncentraci (70 %, 80 %, 96 % a bezvodý ethanol; na každý koncentrační stupeň jsou potřeba 2 dny). Po ošetření bezvodým ethanolom jsou vzorky přeneseny asi na 12 h do směsi acetonu a ethanolu (poměr 1:1) pro lepší permeabilizaci tkáně. Na závěr procedury jsou vzorky opět vráceny do bezvodého ethanolu.

4.2.2. Zalévání do polymeru

Osvědčeným médiem jsou hmoty na bázi polymethylmetakrylátu (PMMA). Dobu potřebnou pro kompletní prosycení vzorku zalévací hmotou lze zkrátit použitím přístroje s vibrační deskou a vakuovým systémem. Vzorky jsou vloženy do methylmetakrylátu bez iniciátoru polymere-



Obr. 3. **Postup zpracování vzorku**, a) bloček kosti s implantátem zalitý do bloku, b) řezání tenkých plátků na pomaloběžné pile s diamantovým kotoučem, c) broušení a leštění výbrusů na poloautomatizované brusce

race na dobu asi 4 dnů, poté je zahájena polymerace buď UV světlem, nebo peroxidem. Takto jsou vytvořeny plastové bloky (obr. 3a). V případě použití hmoty na bázi epoxidu jsou vzorky po dehydrataci vloženy do 100% propylenoxidu na dobu 15 min, následně jsou ponořeny přes noc do směsi propylenoxidu a epoxidu v poměru 1:1 a nakonec do čistého epoxidu na dva dny při teplotě 37 °C. Výsledkem je ztvrdlý blok polymeru s kostí a implantátem, přičemž všechny vnitřní dutiny kosti jsou dokonale prostoupeny polymerem. Tím snižujeme nebezpečí rozvolnění implantátu od kosti během následujících destruktivních kroků zpracování.

4.2.3. Řezání

Vzorky jsou nařezány podél dlouhé osy implantátu či kolmo na ni. Výhodou podélně orientovaných řezů je zviditelnění celého hloubkového profilu implantátu, naopak

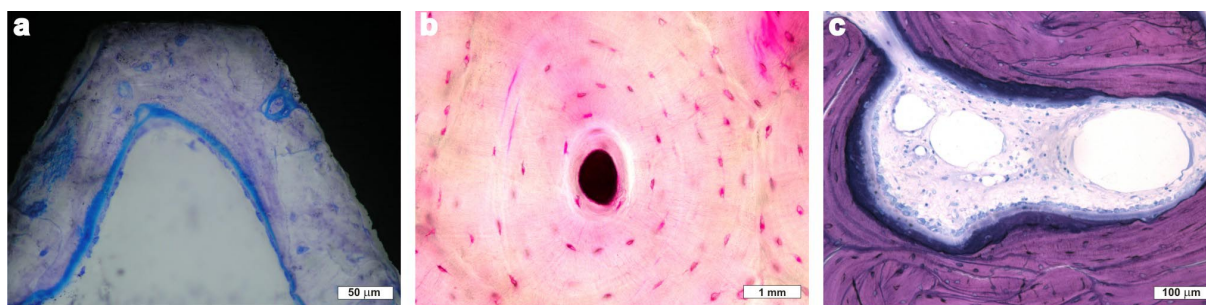
výhodou příčných řezů je pozorování rozhraní kost-implantát po obvodu implantátu. K řezání vzorku může být použita diamantová pásová pila či diamantový kotouč (obr. 3b), popřípadě i speciální řezací mikrotom, který na rozdíl od běžných histologických mikrotomů dokáže ukrojit i neodvápnné materiály včetně některých kovových součástí. Řez se brousí brusným papírem s klesající hrubostí (zrnitost P320, P1200, P2500), dokud nejsou na povrchu viditelné všechny části potřebné k pozorování. Po obroušení je první řez za mokra vyleštěn brusným papírem se zrnitostí P4000 a k takto vyleštěné ploše je přilepeno podložní sklíčko. Druhý řez je veden rovnoběžně s rovinou podložního sklíčka ve vzdálenosti přibližně 100–300 μm .

4.2.4. Broušení a leštění

I druhý takto vzniklý řez je broušení pomocí abrazivních papírů s klesající hrubostí (zrnitost P320, P1200 a P2500) a leští se pod vodou brusným papírem P4000 až do výsledné tloušťky asi 50–30 μm . Pro finální leštění povrchu se používá papír potažený jemnou látkou a diamantová pasta s hrubostí zrn 3 μm . Při použití poloautomatické brusky jsou brusné papíry pro broušení a leštění umístěny na rotující desce a vzorky jsou tlačeny směrem k ní (obr. 3c) tak, aby byl zachován rovnoměrný přítlak a tím i rovnoběžnost broušených ploch.

4.2.5. Barvení

Obvykle užívanou metodou je barvení toluidinovou modří (obr. 4a), při níž lze snadno rozeznat nemineralizovaný osteoid od plně mineralizované kostní tkáně při dostatečně zachovaných morfologických detailech. Bazický fuchsin je možné použít samostatně k barvení mikropórů kosti (obr. 4b) nebo v kombinaci s toluidinovou modří. Barvení dle Giemsky odlišuje nachově zbarvenou mineralizovanou kostní matrix a tmavomodře zbarvený osteoid (obr. 4c). Může být výhodné i u vzorků obsahujících kostní dřev mezi trámci spongiózy, neboť pro kostní dřev jde o jedno ze standardních barvení. Přehled některých dalších barvicích metod vhodných pro rozlišení pojivové tkáně je uveden v tab. III.



Obr. 4. **Histologické barvení výbrusů**, a) toluidinová modř odlišující mineralizovanou kost (odstíny fialové) od vaziva a osteoidu (modře) v závitě kostního implantátu (černý neprůsvitný materiál), b) kompaktní kost obarvená bazickým fuchsinem ukazuje zřetelně lamelární stavbu Haverské kosti a kontrastně barví osteocytární lakuny a některé jejich výběžky v tzv. kostních kanálcích (canaliculi ossium), tmavý útvar uprostřed osteonu je cévní Haversův kanál, c) barvení dle Giemsky odlišující mineralizovanou kostní matrix (fialová) a osteoid (tmavomodrá)

Tabulka III

Přehled metod barvení kostních vzorků zalitých v PMMA. Některá barviva lze mezi sebou dále vzájemně kombinovat^{42,43}

Barvivo	Jádro	Nemineralizovaný osteoid	Mineralizovaná kost	Chrupavka
Toluidinová modř	modrá	nebeská modř	světle fialová	fialová
Bazický fuchsin	červená až nachová	růžová až nachová	slabě červená	růžová až nachová dle zastoupení kyselých glykosaminoglykanů
dle Giemsy	červenofialová	tmavě modrá	nachová	modrá až fialová dle pH glykosaminoglykanů
Hematoxylin-eosin	modrá	růžová	purpurově hnědá	nachová až fialová dle pH glykosaminoglykanů
von Kossa	červená	červená	černá	tmavě hnědá
Goldnerův trichrom	modrošedá	oranžovočervená	zelená	fialová
Levai-Laczo	modrofialová	červenofialová	jasně červená	světlemodrá

4.3. Technika odvápněných histologických řezů

Vzorky kosti, které neobsahují kovový implantát, jako je např. biopsie kostní tkáně nebo kost v oblasti mezi dvěma implantáty, mohou být demineralizovány. Tato technika je výhodná rovněž pro hodnocení účinku odbouratelných (degradabilních) osteoinduktivních biomateriálů, neboť dokáže specificky zviditelnit organické komponenty kosti jako je osteokalcin (obr. 5a), osteopontin a kolagen typu I (obr. 5b). Po použití dekalciфикаčního roztoku (obvykle neutrální kyseliny ethylendiaminotetraoctové, EDTA) jsou vzorky zpracovány běžnou histologickou technikou zalitím do parafínu⁴⁴. Potřebná doba dekalciфикации se odvíjí od velikosti vzorku. Pro urychlení procesu lze použít alternativní roztoky kyselin jako je HNO₃ nebo HCl, protože demineralizace v EDTA trvá průměrně 8 až 10 týdnů. Nicméně některé agresivnější roztoky kyselin (např. HCOOH) mohou poškodit strukturu tkáně a zne-

možnit tak další hodnocení⁴⁵. Některé biomateriály jsou tvrdší než kost (např. hydroxyapatitové granule) a vyžadují delší dobu dekalciфикации, což může ovlivnit morfologii kosti, její barvitelnost a další hodnocení.

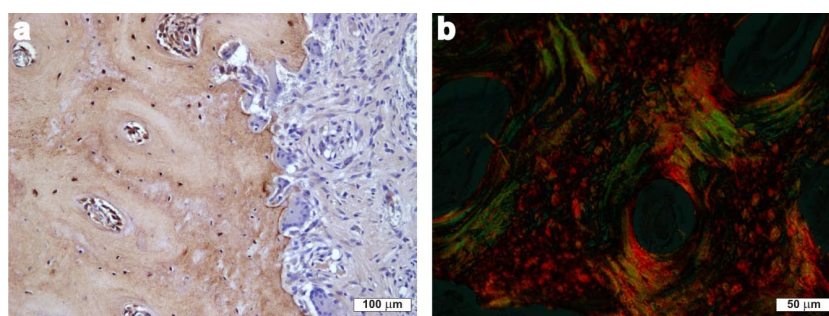
4.4. Mikroskopické hodnocení

4.4.1. Kvalitativní hodnocení

Použitím barvicích metod shrnutých v tab. III lze získat řadu informací, jako např. tvorbu nemineralizovaného osteoidu a mineralizované tkáně, tvorbu nežádoucí vazivové mezivrstvy oddělující implantát od vlastní kosti či vytvoření granulomu s bohatou vaskularizací a slabou mechanickou retencí.

4.4.2. Histologická kvantifikace kontaktu kost-implantát

K posouzení míry zabudování implantátu do plně diferencované kostní tkáně lze s výhodou využít postupů



Obr. 5. **Barvení organických komponent.** a) Imunohistochemický průkaz osteokalcinu (hnědě) znázorňuje na odvápněném řezu osteoblasty jako drobné tmavé buňky uspořádané na povrchu kostních trámčů; osteokalcin jako jeden z minoritních kostních proteinů hnědě barví i vnitřek vlastních trámčů, b) barvení kosti pikosiriovou červení, v polarizačním mikroskopu je specificky pozorovatelný kostní kolagen typu I (červené až žluté zbarvení)

kvantitativní histologie. Nejčastěji užívanou proměnnou pro hodnocení oseointegrace je kontakt kost-implantát (bone-implant contact, BIC)⁴⁶, který lze vyjádřit jako:

$$BIC = BC / IL$$

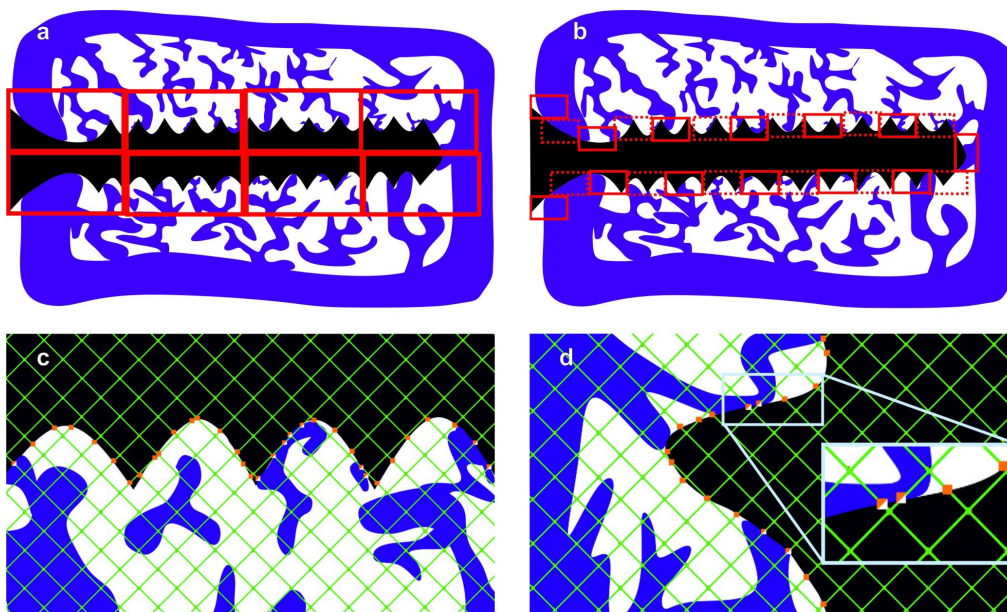
kde BC (bone contact) je délka profilu implantátu na řezu, která je v přímém kontaktu s kostní tkání, a IL (interface length) je celková délka profilu implantátu na ploše výbrusu. Trojrozměrný povrch tedy posuzujeme podle dvojrozměrného řezu. Tento nedostatek lze částečně kompenzovat zhotovením a vyšetřením několika výbrusů z téhož implantátu. Nejnovější studie překleňují tuto metodickou slabinu plnohodnotně trojrozměrným vyšetřením celého povrchu implantátu pomocí mikro-CT (cit.⁴⁷).

Poměr BIC je tedy vyjádřen jako bezrozměrné číslo v intervalu $<0;1>$, kdy $BIC = 0$ znamená, že není žádný přímý kontakt mezi kostí a implantátem a $BIC = 1$ znamená, že celý povrch implantátu je v přímém kontaktu s kostní tkání (tj. bez vazivové mezivrstvy). Alternativně může být hodnota BIC vyjádřena také v procentech.

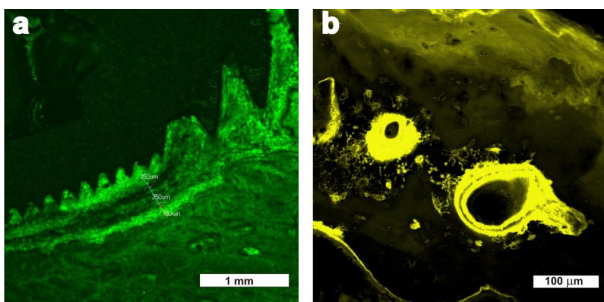
Při mikroskopické kvantifikaci oseointegrace dentálních implantátů reálné velikosti je zapotřebí celou plochu výbrusu rozdělit do několika pozorovacích polí. Všem částem vzorku je přitom zapotřebí dát stejnou šanci dostat se do pozorovacího pole a projít tak výslednou kvantifikací (zásada nestranného vzorkování). Při menším zvětšení je možno pozorovat větší zorné pole, avšak s horším rozlišením detailů na rozhraní kost-implantát. Výsledné mikroskopické zvětšení musí být přizpůsobeno zadání studie,

povrchové struktuře implantátu a nejtenčím přítomným kostním trámčům tak, aby úroveň pozorovaných detailů umožnila jednoznačnou identifikaci tkání podél celého rozhraní kost-implantát. Pokud to rozsah studie umožňuje, lze pozorovat všechna mikroskopická zorná pole (obr. 6a), pokud ne, lze systematicky nestranně vybrat jen některá z nich, např. každé druhé pole (obr. 6b).

Vymezení linií BC a IL může být provedeno buď manuálně nebo pomocí stereologické mřížky. Na mikrografii kosti s implantátem promítneme dvojrozměrný systém linií, jejichž geometrické vlastnosti (délky a rozestupy mezi nimi) jsou nám známy. Orientace linií vůči vzorku je náhodná a uspořádání linií je takové, že nevýhodňuje žádný směr (systém je izotropní). Spočítáme počet průsečíků mezi liniemi mřížky a povrchem implantátu (oranžové body, obr. 6c,d). Podle modifikované stereologické Buffonovy metody⁴⁸ je celkový počet takovýchto průsečíků přímo úměrný hodnotě IL, tedy např. implantáty více strukturované a s větším povrchem mají více průsečíků s přiloženou mřížkou. Rovněž spočítáme průsečíky v místech, kde se implantát přímo dotýká kosti (bílé body; obr. 6c,d), což je hodnota přímo úměrná hodnotě BC. Po sečtení všech hodnot IL a BC ze všech pozorovaných polí stejného vzorku je možno vypočítat průměrnou hodnotu BIC. Hustotu mřížky volíme tak, aby celkový počet průsečíků mezi ní a implantátem byl alespoň roven 150 (cit.⁴⁹). Každý ze započítaných bodů má váhu nanejvýš 1/150 celkové hodnoty. Podle našich vlastních zkušeností



Obr. 6. Příklad kvantitativní histologické analýzy oseointegrace na schématu výbrusu kostí, a) červeně je znázorněna poměrná velikost zorných polí mikroskopu při malém zvětšení (implantát černě, kostní trámce fialové, b) při potřebě vyššího rozlišení mikroskopických detailů se poměrná velikost zorných polí zmenšuje a bývá vhodné k dalšímu hodnocení vybírat např. každé druhé zorné pole (plná versus přerušovaná čára), c) v horní části (černě) profil implantátu, pod ním schéma kostních trámčů (fialové), stereologická pravoúhlá mřížka (zeleně) je náhodně orientovaná vůči snímku, průsečíky mřížky s celým zachyceným povrchem implantátu (oranžově), průsečíky identické mřížky s místy přímého kontaktu implantátu s kostními trámci (bílé), d) detail umožňující rozlišit kontakt jednotlivých kostních trámčů s povrchem implantátu



Obr. 7. Dvojitě tetracyklinové značení pozorovatelné ve fluorescenčním mikroskopu, vzdálenost obou linií je úměrná množství kosti vytvořené v období mezi podáním obou dávek, a) zelená fluorescence tetracyklinu v okolí implantátu, b) dvě fluoreskující linie v kostní tkáni

z výzkumu oseointegrace dentálních implantátů je tato stereologická metoda vysoce reprodukovatelná, dává konzistentní výsledky a je jednoduchá k provedení. Obdobnými principy s použitím stereologické bodové mřížky a pravděpodobnostního mapování kostních trámčů lze např. kvantifikovat rovnoměrnost hojení experimentálních kostních defektů⁵⁰.

4.4.3. Kvantifikace dalších parametrů kosti

Dalším možným parametrem pro hodnocení kvality kosti je míra její vaskularizace, kterou lze vyjádřit např. jako objemový podíl cévních kanálů v konkrétním vzorku kosti.

Mikroskopicky lze rovněž spočítat hustotu osteocytárních lakun, v nichž se nacházejí kostní buňky, a to s využitím výbrusů, jejichž tloušťka převyšuje běžné rozměry lakun, které jsou v rozmezí 15–20 μm (cit.⁵¹). V některých kostech, např. v mandibule člověka, jsou cévní mikroporozity statisticky nezávislé na lokální hustotě osteocytů a tedy oba parametry mohou být považovány za vzájemně komplementární mikroskopické charakteristiky kvality kosti.

Množství nově vzniklé kosti v oblastech kolem implantátu může být kvantifikováno s využitím dvojitěho tetracyklinového testu⁵², kdy se podá pokusnému zvířeti tetracyklinové antibiotikum ve dvou časových okamžicích. Díky svému poměrně krátkému biologickému poločasu, avšak vysoké afinitě ke kostní tkáni se tetracyklin usazuje v nově vytvořených buňkách kostní tkáně po dobu jednoho až dvou dnů po podání. S využitím tetracyklinové autofluorescence je možno vizualizovat pod fluorescenčním mikroskopem takto infiltrované oblasti (obr. 7a,b). Šířka kostní tkáně mezi dvěma tetracyklinem fluoreskujícími liniemi tak odpovídá nově vytvořené kosti.

5. Závěr

Vývoj implantátů je rychle se rozvíjející oblast výzkumu, při kterém vzniká množství nových materiálů

s různě modifikovanými tvary a povrchovou úpravou. Výzkumná metodika založená na přesném určení kontaktu mezi kostí a implantátem může velmi rychle a reprodukovatelně zhodnotit vliv různého designu a povrchových úprav nových implantátů na úspěšnost jejich oseointegrace.

Článek se zabývá aktuálními metodami experimentálního vyhodnocení oseointegrace implantátů z nanostrukturálního titanu. Uvedená metodika je univerzální a je ji možno využít jak pro hodnocení dentálních, tak také ortopedických implantátů. V článku jsou rovněž uvedena praktická doporučení pro vedení *in vivo* experimentu, odběr vzorků, jejich zpracování a kvantitativní vyhodnocení.

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu č. 15-25813A Agentury pro zdravotnický výzkum MZ ČR a projektu NPU LO1503 MŠMT ČR.

LITERATURA

1. Branemark P. I., Hansson B. O., Adell R., Breine U., Lindstrom J., Hallen O., Ohman A.: *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* 16, 7 (1977).
2. Branemark P. I.: *J. Prosthet. Dent.* 50, 399 (1983).
3. Esposito M., Hirsch J. M., Lekholm U., Thomsen P.: *Eur. J. Oral Sci.* 106, 527 (1998).
4. Wang W., Liao S., Zhu Y., Liu M., Zhao Q., Fu Y.: *J. Nanomater.* 2015, 408643.
5. Durmus N. G., Webster T. J.: *Nanomedicine* 7, 791 (2012).
6. Petruzela J., Dluhos L., Hrusak D., Sochova J.: *Cesk. Stomatol.* 106, 72 (2006).
7. St Pierre C. A., Chan M., Iwakura Y., Ayers D. C., Kurt-Jones E. A., Finberg R. W.: *J. Orthop. Res.* 28, 1418 (2010).
8. Valiev R. Z., Kaibyshev O. A., Kuznetsov R. I., Musalimov R. S., Tsenev N. K.: *Vestn. Akad. Med. Nauk SSSR* 301, 864 (1988).
9. Valiev R. Z., Semenova I. P., Latysh V. V., Rack H., Lowe T. C., Petruzela J., Dluhos L., Hrusak D., Sochova J.: *Adv. Eng. Mater.* 10, B15 (2008).
10. Simunek A. (ed.): *Dentalni Implantologie*. Nucleus HK, Hradec Králové 2008.
11. Lundsog J., Branemark P. I.: *Phys. Med. Biol.* 17, 744 (1972).
12. Hentschel A., Herrmann J., Glauche I., Vollmer A., Schlegel K. A., Lutz R.: *Clin. Oral Implant. Res.* 27, 591 (2016).
13. Chrcanovic B. R., Albrektsson T., Wennerberg A.: *J. Oral Rehab.* 41, 443 (2014).
14. Park J. B., Koh M., Jang Y. J., Choi B. K., Kim K. K., Ko Y.: *Gerodontology* 33, 28 (2016).
15. Babuska V., Dobra J., Kulda V., Kripnerova M., Moztarzadeh A., Bolek L., Lahoda J., Hrusak D.: *J. Nanomater.* 2015, 920893.
16. Ban S., Maruno S., Arimoto N., Harada A., Hasegawa J.: *J. Biomed. Mater. Res.* 36, 9 (1997).

17. Park J. B., Lee S. H., Kim N., Park S., Jin S. H., Choi B. K., Kim K. K., Ko Y.: *J. Oral Implant.* 41, 419 (2015).
 18. Hsiao W. T., Chang H. C., Nanci A., Durand R.: *Mater. Des.* 90, 891 (2016).
 19. Zahran R., Leal J. I. R., Rodriguez Valverde M. A., Vilchez M. A. C.: *PLoS One* 11, e0165296 (2016).
 20. Mangano F. G., Pires J. T., Shibli J. A., Mijiritsky E., Iezzi G., Piattelli A., Mangano C.: *Implant Dent.* 26, 24 (2017).
 21. Lee M. H., Yoon D. J., Won D. H., Bae T. S., Watari F.: *Met. Mater. Int.* 9, 35 (2003).
 22. Sul Y. T., Johansson C., Wennerberg A., Cho L. R., Chang B. S., Albrektsson T.: *Int. J. Oral Maxillofac Implants* 20,349 (2005).
 23. Otsuka Y., Kojima D., Mutoh Y.: *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 64, 113 (2016).
 24. Rahman Z. U., Shabib I., Haider W.: *Mater. Sci. Eng., C* 67, 675 (2016).
 25. Covarrubias C., Mattmann M., Von Marttens A., Caviedes P., Arriagada C., Valenzuela F., Rodriguez J. P., Corral C.: *Appl. Surf. Sci.* 363, 286 (2016).
 26. Sevilla P., Vining K. V., Dotor J., Rodriguez D., Gil F. J., Aparicio C.: *J. Biomed. Mater. Res., Part B* 104, 385 (2016).
 27. Plecko M., Sievert C., Andermatt D., Frigg R., Kronen P., Klein K., Stubinger S., Nuss K., Burki A., Ferguson S., Stoeckle U., von Rechenberg B. M.: *BMC Musculoskeletal Disord.* 13, 32 (2012).
 28. Im J. H., Kim S. G., Oh J. S., Lim S. C.: *Implant Dent.* 24, 586 (2015).
 29. Ramazanoglu M., Lutz R., Rusche P., Trabzon L., Kose G. T., Pechtl C., Schlege K. A.: *J. Cranio-Maxillofacial Surgery* 41, 826 (2013).
 30. Aparicio C., Padrosb A., Gil F. J.: *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 4, 1672 (2011).
 31. Botzenhart U., Kunert-Keil C., Heinemann F., Gredes T., Seiler J., Berniczei-Royko A., Gedrange T.: *Ann. Anat.-Anat. Anz.* 199, 16 (2015).
 32. Saulacic N., Erdosti R., Bosshardt D. D., Gruber R., Buser D.: *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* 16, 313 (2014).
 33. Stadlinger B., Hintze V., Bierbaum S., Moller S., Schulz M. C., Mai R., Kuhlisch E., Heinemann S., Scharnweber D., Schnabelrauch M., Eckelt U.: *J. Biomed. Mater. Res., Part B* 100, 331 (2012).
 34. Baek W. S., Yoon S. R., Lim H. C., Lee S. J., Choi S. H., Jung U. W.: *J. Periodontal Implant Sci.* 45, 238 (2015).
 35. Mushahary D., Wen C., Mahesh Kumar J., Lin J., Harishankar N., Hodgson P., Pande G., Li Y.: *Colloid Surf., B* 122, 719 (2014).
 36. Ragamouni S., Kumar J. M., Mushahary D., Nemani H., Pande G.: *Acta Histochem.* 115, 748 (2013).
 37. Soares P. B., Moura C. C., Claudino M., Carvalho V. F., Rocha F. S., Zanetta-Barbosa D.: *Braz. Dent. J.* 26, 451 (2015).
 38. Katranji A., Misch K., Wang H. L.: *J. Periodontol.* 78, 874 (2007).
 39. Bertl K., Subotic M., Heimel P., Schwarze U. Y., Tangl S., Ulm C.: *Clin. Oral Implant. Res.* 26, 780 (2015).
 40. Babuska V., Moztarzadeh O., Kubikova T., Moztarzadeh A., Hrusak D., Tonar Z.: *Biointerphases* 11, 030801 (2016).
 41. Paral V., Witter K., Tonar Z.: *Int. J. Osteoarchaeol.* 17, 627 (2007).
 42. Bancroft J. D., Gamble M. (ed.): *Theory and practice of Histological Techniques.* Churchill Livingstone/Elsevier, Philadelphia 2008.
 43. Mulisch M., Welsch U. (ed.): *Romeis Mikroskopische Technik.* Springer, Berlin 2015.
 44. Elgali I., Turri A., Xia W., Norlindh B., Johansson A., Dahlin C., Thomsen P., Omar O.: *Acta Biomater.* 29, 409 (2016).
 45. Prasad P., Donoghue M.: *Indian J. Dent. Res.* 24, 302 (2013).
 46. Shibli J. A., Grassi S., de Figueiredo L. C., Feres M., Marcantonio E., Lezzi G., Piattelli A.: *J. Biomed. Mater. Res., Part B* 80, 377 (2007).
 47. Bissinger O., Probst F. A., Wolff K. D., Jeschke A., Weitz J., Deppe H., Kolk A.: *J. Clin. Periodontol.* 44, 418 (2017).
 48. Mouton P. R.: *Principles and Practices of Unbiased Stereology. An Introduction for Bioscientists.* Johns Hopkins University, Baltimore 2002.
 49. Gundersen H. J., Jensen E. B.: *J. Microsc.* 147, 229 (1987).
 50. Prosecka E., Rampichova M., Litvinec A., Tonar Z., Kralickova M., Vojtova L., Kochova P., Plencner M., Buzgo M., Mickova A., Jancar J., Amler E.: *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 103, 671 (2015).
 51. Tonar Z., Khadang I., Fiala P., Nedorost L., Kochova P.: *Ann. Anat.-Anat. Anz.* 193, 211 (2011).
 52. Lindsay R., Cosman F., Zhou H., Bostrom M. P., Shen V. W., Cruz J. D., Nieves J. W., Dempster D. W.: *J. Bone Miner. Res.* 21, 366 (2006).
- A. Moztarzadeh^a, O. Moztarzadeh^{b,d}, T. Kubíková^c, Z. Tonar^c, D. Hrušák^b, A. Zicha^b, and V. Babuška^a**
^aDepartment of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University,
^bDepartment of Stomatology, Faculty of Medicine in Pilsen, University Hospital and Charles University,
^cDepartment of Histology and Embryology and Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University,
^dDepartment of Anatomy, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University): **Current Methods for Assessing Osseointegration of Nanostructured Titanium Implants**
- Currently, titanium endosseous implants represent the standard in dental implantology. To improve their mechanical properties, biocompatibility and osseointegration, the concept of bulk nanostructured titanium with variously textured surface is being developed. Different animal spe-

cies, mostly pigs, minipigs and rabbits, are used for the osseointegration assessment. The selection of implantation site in the target bone is also important, because various types of bones have different ratio between the compact and the trabecular bone tissue. After finishing the *in vivo* experiment, the implant position and orientation is verified by X-ray imaging. The part of the bone with the implant is surgically removed, cut into tissue blocks, and histologically processed using technique of undemineralized ground sections. This includes embedding the samples into resin followed by sawing, grinding, and polishing of trans-

parent histological sections. A subsequent staining provides information on the formation and mineralization of the bone matrix in close proximity of the implant. Osseointegration is evaluated using a bone-implant contact (BIC) expressed as the ratio of the implant length in contact with bone tissue and total length of the implant. Additional information about the newly formed bone in regions surrounding the implant may be also provided by a double tetracycline test. According to our own experiments, this methodology is simple to perform, highly reproducible, and gives consistent results.