

POSSIBILITĂȚI DE CARACTERIZARE RH A MEDIULUI TISULAR

CHARACTERIZING POSSIBILITIES OF TISSUE ENVIRONMENT RH

Ștefan ZĂNOAGĂ¹, Silvia MĂRȚU²

¹ - doctorand, disciplina de Parodontologie, Universitatea de Medicină și Farmacie "Gr. T. Popa" Iași, Facultatea de Medicină Dentară

² - profesor universitar doctor, șef disciplină Parodontologie, Facultatea de Medicină Dentară, Universitatea de Medicină și Farmacie "Gr. T. Popa" Iași, Facultatea de Medicină Dentară

Rezumat

Studiile actuale adresate evaluării răspunsului clinic al procedurilor regenerative parodontale prin ghidaj tisular demonstrează rezultate variabile, fiind acceptată influența încă insuficient cunoscută a caracteristicilor fizico-chimice membranare ca și cele ale mediului tisular implantar. Studiile existente până în prezent sunt dominate de studii experimentale in vivo, studii comparative care se limitează la analiza fizică calitativă/cantitativă a preparatelor biopsice, prelevate la intervale de timp prestabilite, care reflectă starea materialului implantar și mai puțin calitatea țesutului receptor/gazdă. Studiul de față își propune să completeze procedurile de studiu prin tehnici care fac apel la caracterizarea organismului gazdă, aspect esențial în contextul bolii parodontale, ce poate fi extinsă la caracterizarea materialului implantar și, respectiv, a dinamicii temporale a relației țesut - material implantar. Se are în vedere definirea și utilizarea altor parametri de caracterizare a relației organism-polimer, nefolosiți în domeniu dar relevanți în domenii conexe, cu referire la caracterul redox tisular, respectiv al materialului polimeric implantat. *Cuvinte-cheie:* factor rH, microelectrod, țesut

Summary

The actual studies addressing to clinical response assessment of periodontal guided regenerative procedures show variable results, being accepted the still not very well known influence of barriers' physical and chemical characteristics and of local tissue environment as well. The studies available by now are dominated by in vivo, comparative studies that are limited to qualitative/quantitative assessments of established prelevated biopsies reflecting rather the state of implanted material than the quality of host tissue. The aim of this study is to complete the studying methods by host characterising techniques, essential aspect in the context of periodontal disease, that could be extended to the implanted material characterization and material – host temporal relation dynamics respectively. It is intended to define and use other characterizing parameters for the host – polymer relation, this regarding the tissue redox feature and implanted polymeric material, respectively. *Keywords:* rH factor, microelectrode, tissue

Introducere

Obiectivele terapiei parodontale actuale sunt reprezentate de regenerarea și restaurarea structurilor parodontale afectate de boală la forma, funcția și consistența lor originală. Procedurile terapeutice disponibile pentru atingerea acestor obiective includ utilizarea barierelor membranare pentru regenerarea tisulară ghidată și aplicarea materialelor de adiție/control (substituenți de os, factori de creștere), iar datorită variabilității fizice și chimice a acestor produse se descriu grade variate de succes sau de eșec terapeutic.

În prezent, procedurile restaurative se bazează aproape în întregime pe implantarea unor substitute structurale, iar studiile existente în prezent adresate posibilităților de control clinic a procesului regenerativ local prin analiza cantitativă/calitativă a membranelor de colagen rămân contradictorii prin rezultatele obținute. Aceste studii evaluează de o manieră pur descriptivă gradul de degradabilitate a barierei membranare resorbabile (naturale sau artificiale), gradul răspunsului, de obicei inflamator, din partea organismului gazdă, precum și răspunsul regenerativ, variabil, la nivel local. Nu au fost identificate corelații cu evidență statistică între caracteristicile barierei membranare și un răspuns regenerativ optim local.

Insuficiența cunoaștere a proceselor resorbitive a barierelor membranare, influențând indirect biodisponibilitatea

potențială a acestor factori, limitează aspectele concluzive și de certitudine a studiilor de aceasta natură.

Un factor determinant al proceselor biochimice și/sau biologice îl reprezintă caracterul redox al mediului de reacție (mediu tisular), caracter ce poate fi cuantificat prin potențialul redox, o mărime determinabilă experimental, însă în același timp afectată de alți parametri, între care cel mai important este pH-ul mediului. Pentru caracterizarea experimentală a proceselor biologice, exprimarea caracterului redox prin potențialul redox la care să se indice și un pH specific reprezintă o dificultate practică mai ales dacă se urmărește o dinamică a fenomenelor. În acest sens, se poate opta pentru corecția potențialului redox prin principalul său factor de influență, pH-ul, rezultând un nou parametru, rH-ul, care prezintă semnificație fizică numai în medii apoase. Acest ultim parametru este definit prin relația lui Clark:

$$rH = \frac{E_h + 0,058 \times pH}{0,029}$$

Un fenomen biologic poate fi astfel caracterizat printr-un corolar al celor doi factori, potențialul redox și respectiv pH-ul, adică rH-ul.

În acest context ne dorim să considerăm posibilitatea de analiză/caracterizare a mediului tisular prin utilizarea unui

parametru comun, care poate fi aplicat și în cazul analizei caracteristicii de material, iar în ultimă instanță ca modalitate de analiză a dinamicii relației țesut-material implantar.

Material și metodă

Posibilitățile de determinare a caracteristicii redox au fost prezentate pe larg în studii similare în domenii conexe [2], fiind în general recomandată, din considerente practice, procedura potențiometrică [2]. Ca principiu, determinarea potențiometrică presupune măsurarea diferenței de potențial dintre un electrod de referință și unul redox un electrod confecționat dintr-un metal nobile (platină) care, imersat fiind în soluția de determinat, cedează sau primește (numai) electroni până la echilibrarea potențialului său cu cel al soluției. Rezultă astfel E_h care, după ce este corectat cu potențialul electrodului de referință față de electrodul normal de hidrogen la temperatura de lucru (astfel de valori sunt disponibile, de exemplu, în [1]), poate fi folosit ca atare sau transformat matematic (prin relația lui Clark) în rH. Dependența de temperatură a potențialului de electrod al electrodului de referință impune condiții de termostatare ale determinării.

Studiile existente în prezent, și adresate modalităților de determinare a rH-ului, au ca subiect de studiu soluții, motiv pentru care extinderea aplicabilității metodologiei de lucru asupra țesuturilor necesită o adaptare în consecință [2]. În acest context, țesuturile sunt materiale de consistență ridicată, ceea ce îngreunează omogenizarea mediului și difuzia spre electrozi, introducând o rezistență electrică inacceptabil de mare, care face imposibilă determinarea diferenței de potențial. Acest aspect se manifestă evident printr-o durată mărită de echilibrare, ceea ce poate conduce la denaturarea determinării în cazul țesuturilor vii, ca și la degradarea materialului supus determinării.

Pentru înlăturarea acestui dezavantaj, în condițiile de determinării de ordin biologic, se realizează un artificiu: prin menținerea constantă a pH-ului în domeniul valorilor proprii materialului, cu ajutorul unei soluții tampon, rH-ul devine dependent numai de E_h , iar consistența materialului scade. S-a constatat că, în domeniul rapoartelor 1...8% material de determinat în soluția tampon, pH-ul se menține constant, iar E_h variază liniar cu logaritmul zecimal al concentrației (Figura 1).

În aceste condiții, prin extrapolarea realizată din valorile E_h determinate la proporțiile de 1% (a) și 8% (b) se obține, grafic sau analitic, valoarea E_h virtuală a materialului investigat. Introducând în relația lui Clark valoarea pH a soluției tampon și valoarea E_h obținută astfel și corectată cu valoarea potențialului de electrod al electrodului de referință față de cel normal de hidrogen, se obține valoarea rH-ului materialului luat în studiu.

Probele de tesut au fost prelevate de la șobolani Wistar (de același sex, femele, cu vârsta medie de 3-4 săptămâni și cu greutatea medie de 220-300 g) destinați unor studii experimentale adiacente adresate interferențelor medicamentoase. Aceștia au fost distribuiți în două loturi experimentale, un lot martor format din animale sănătoase și un lot test, cu animale prezentând o imunosupresie indusă. Rațiunea inducerii acestei imunosupresii rezidă în dorința de a reproduce un status general tisular în condițiile în care boala parodontală este considerată drept un dezechilibru între agresivitatea organismelor rezidente în microbionta orală și capacitatea proprie de apărare a organismului.

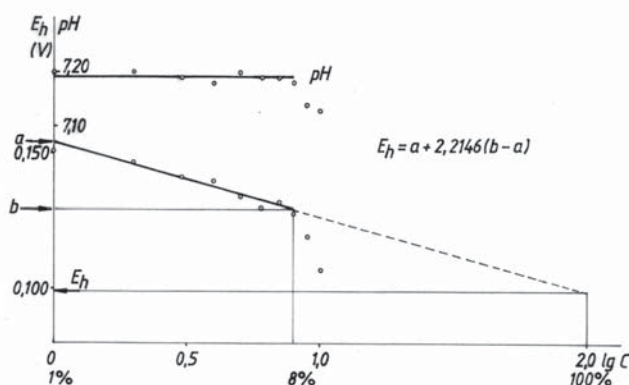


Fig. 1.

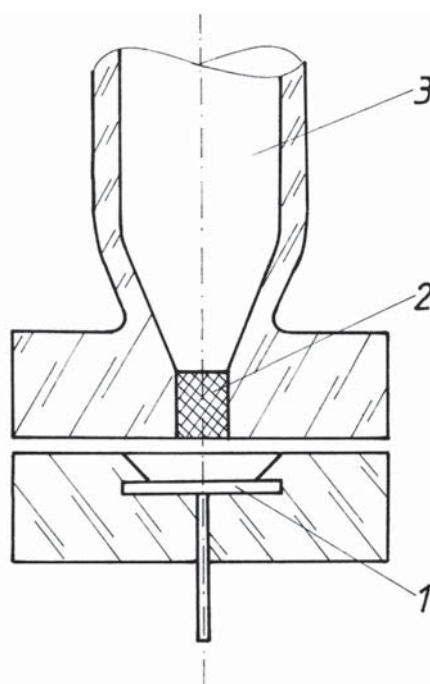


Fig. 2.

mului. În contextul acestei imunosupresii este de așteptat o modificare a caracteristicii proprii tisulare potențial identificabile prin caracterul său redox. Imunosupresia a fost indusă prin administrarea de streptozotocină, substanță responsabilă de citotoxicitate la nivelul celulelor beta pancreatice, generând diabet zaharat insulino-dependent. Este larg acceptat faptul ca starea diabetică induce o deficiență a răspunsului imunitar. Starea diabetică a fost obținută prin administrarea (pe o perioadă de 2 zile) de soluție tamponată de streptozotocină (soluție tampon pH 4,5) în doză unică de 55 mg/kgc. Confirmarea stării diabetice a fost stabilită prin existența semnelor clinice de poliurie, polidipsie, iar testele sanguine indicând valori ale glicemiei mai mari de 18 mmol/L.

Prelevarea probelor de țesut (țesut conjunctiv) s-a realizat după inducerea prealabilă a stării anestezice prin administrarea intramusculară a 0,5 mL xilocaină 2% (80-120 mg/kgc) și 0,5 mL ketamină (80-120 mg/kgc). O arie de aproximativ 3x4 cm de pe fața dorsală a fost rasă, dezinfectată cu polividone iodina (Betaisodona), s-a realizat apoi o incizie paramediană în lungul coloanei vertebrale urmată de incizii de separare de

țesut conjunctiv subcutanat.

Determinarea caracterului redox tisular urmează o procedură potențiometrică similară, dar pentru care au fost inițiate o serie de adaptări ale sistemului de electrozi aferent, în scopul folosirii unei cantități minime de probă (Figura 2). Sistemul de electrozi consistă în electrodul de lucru, un disc din platină (1) inclus într-un bloc din sticlă în așa fel încât deasupra suprafeței din platină să existe o alveolă. O a doua piesă (suprapusă), tot din sticlă, conține electrodul de referință; legătura cu soluția de caracterizat, aflată în alveolă, se face prin frită (2) și puntea electrochimică a electrodului de referință (3). Concret, o picătură de soluție se depune în alveolă, după care piesa superioară se plasează peste cea inferioară, după care urmează determinarea potențialului redox.

În procedura standard sunt necesari 25-30 mL din „soluția” (suspensia) b (de 8% țesut), care se obțin din cca. 2,5 g țesut + 2,5611,5 mL soluție tampon. Țesutul, cântărit cu o precizie de 3 zecimale în jurul a 2,5 g (X g) se triturează, într-un mojar, cu nisip de cuarț, întâi „pe uscat”, apoi în prezența celor X611,5 mL de soluție tampon, adăugați în 2-3 reprize. „Soluția” (suspensia) obținută se supune determinării potențialului redox, rezultând parametrul b. A doua determinare, pentru obținerea parametrului a, corespunzător concentrației de 2% țesut, se face asupra unui amestec de 5 mL din prima „soluție” + 35 mL tampon.

În situația folosirii unui sistem miniaturizat de electrozi, cantitatea de țesut (X) devine cea suficientă ca, prin adaosul de soluție tampon în cantitate de X611,5 mL, să se asigure umplerea alveolei dintre cele două piese ale microelectrodului. Pentru determinarea a doua, se considera, desigur, cantități diminuate corespunzător din prima „soluție” (suspensie), respectiv din tampon, dar păstrând raportul dintre acestea, respectiv 5:35; sau, altfel spus, 1:7.

Rezultate și discuții

În Tabelul 1 sunt exprimate valorile experimentale determinate pentru probele de țesut luate în studiu, lot martor și respectiv lot test, pentru care se redau valori individuale de rH.

Obiectivul studiului a fost acela de a identifica posibilitatea utilizării parametrului rH ca factor de caracterizare a răspunsului biologic.

Așa cum se observă din valorile determinate, se pot delimita valori specifice ale rH-ului tisular conforme homeostaziei generale ale organismului gazdă. Lotul martor, format din animale sănătoase, prezintă valori ale rH-ului tisular apropiate de valorile considerate normale, respectiv celor corespunzătoare rH-ului fiziologic (valoarea raportată în literatură [2] fiind

23,7), anume un interval de variație rH 1,2 unități. În cazul lotului test, format din animale cu imunosupresie indusă, valorile determinate ale rH-ului tisular variază pe un domeniu evident mai larg (interval de variație rH 3,6 unități).

Tabelul 1

Animale sănătoase		Animale imunosupresate	
Proba	rH	Proba	rH
1	23,0	1	23,9
2	23,5	2	22,5
3	24,1	3	25,1
4	24,2	4	23,2
5	23,2	5	24,8
6	23,8	6	23,6
7	23,3	7	24,5
8	24,0	8	22,8

Întrucât s-a căutat crearea unor condiții standardizate de pregătire a animalelor ca și a modalității de inducție a imunosupresiei, ar fi fost de așteptat, și la animalele imunosupresate, obținerea unor valori dacă nu similare, cel puțin apropiate, pe o marjă de variație specifică, precum cea descrisă pentru animalele sănătoase. Se poate descrie astfel o variabilitate individuală a răspunsului homeostazic față de starea de imunosupresie, care se reflectă asupra valorilor de rH determinate.

Concluzii

Analiza proceselor biologice, deși complexă, poate fi rezumată prin identificarea și utilizarea unui parametru specific, global, care, odată extins asupra altor procese similare (metabolice, resorbitive), permite analiza în dinamică a proceselor de interacție organism gazdă-material implantar. Rațiunea identificării unei astfel de posibilități de caracterizare rezidă în faptul că procesele metabolice care fac suma homeostaziei generale sunt în esență procese de natură redox. În consecință, aplicabilitatea conceptului redox în studiul acestor procese devine rațională.

În acest sens, se poate spune că modificarea homeostaziei organismului conduce la modificări de ordin metabolic ce se repercutează asupra caracterului redox tisular.

Pe baza acestui principiu și prin extinderea aplicabilității asupra analizei caracteristicii rH de material implantar se pot urmări modificările de potențial redox survenite la nivelul interfeței țesut animal-implant, atât în privința țesutului (fapt ce ar revela efecte dorite sau nedorite exercitate de material asupra organismului purtător), cât și în privința alegerii materialului optim.

Bibliografie

- BRUNO, T. J., SVORONOS, P. D. N., Handbook of Basic Table for Chemical Analysis, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., 2003.
- DUCA, G., ZĂNOAGĂ, C. V., DUCA, M., GLADCHI V. Procese redox în mediul ambiant, Editura Universității de Stat din Moldova, Chișinău, 2001.
- NANCI, A., BOSSHARDT, D. D., Structure of periodontal tissues in health and disease, Periodontology 2000, 40 (1): 11-28, 2006.
- POLIMENI, G., XIROPAIDIS, A. V., WIKESJO, U. M. E., Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration, Periodontology 2000, 41 (1): 30-47, 2006.
- RAPTIS, A. E., VIBERTI, G., Pathogenesis of diabetic nephropathy, Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes, 109 Suppl 2: 424-37, 2001.
- STRATTA, R. J., Review of immunosuppressive usage in pancreas transplantation, Clin. Transplant, 13(1): 1-12; 1999.