

CARACTERIZAREA REDOX A PROCESULUI DE RESORBȚIE A MEMBRANELOR DE COLAGEN

RESORPTIVE PROCESS RH ANALYSIS OF COLLAGEN BARRIERS

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

Scopul acestui studiu este de a compara procesul de biodegradare a diferite membrane de colagen condiționate, disponibile comercial dintr-o perspectivă particulară, respectiv de analiză a factorului rH. Probe de material membranar au fost implantat, randomizat, în țesutul conjunctiv subcutanat la șobolani Wistar. La intervale stabilite de timp (2, 7, 14 și respectiv 28 zile) probele de material au fost explantate. Au fost determinate caracteristicile rH atât tisular cât și ale probelor membranare, urmărindu-se o caracterizare a procesului de resorbție din această ultimă perspectivă. S-a putut diferenția tiparul biodegradării membranare, care este diferit funcție de caracteristica rH membranară în contextul general al rH-ului local tisular. Drept urmare, se pot defini și utiliza 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: membrană colagen, proces de resorbție, factor rH

Summary

The aim of this study is to compare from a different perspective, namely rH factor analysis, the biodegradation of commercially available different cross-linked collagen barriers. Material specimens were randomly implanted in subcutaneous connective tissue on Wistar rats. At specific periods of time (2, 7, 14 and 28 days, respectively), the material specimens were explanted. It could had been differentiated barrier biodegradation patterns that proved to be a function of membrane rH feature in the overall context of tissue local rH. Thus it can be define and used host – polymer relation characterizing parameters, unused yet in this field but in adjacent domains, regarding the tissue redox feature and implanted polymeric material respectively.

Key words: collagen membrane, resorptive process, rH factor

Introducere

Tehnica regenerării tisulare ghidate este fundamentată pe conceptul prevenirii migrării apicale a epiteliului gingival în interiorul ariei lezionale prin utilizarea barierei membranare ca și favorizarea potențialului regenerativ celular în vederea obținerii unei vindecări lezionale și regenerării tisulare predictibile.

Un astfel de material trebuie să îndeplinească criteriile specifice de biocompatibilitate, integrare tisulară, ocluzare celulară, transfer de nutrienți, menținerea spațiului [3] iar în ultima decadă a devenit dominantă utilizarea colagenului, pentru care studiile clinice umane și experimentale raportează superioritate față de alte materiale, prin rolul său activ în formarea coagulumului, efectul chemotactic pentru fibroblastele ligamentare și gingivale (componentă majoră a țesutului conjunctiv parodontal) [5].

Alte studii adresate colagenului nativ demonstrează o rată ridicată a biodegradării consecutive activității enzimactice fagocitare, determinând o rezistență scăzută, colaps și colonizarea ulterioară a situsului de interes cu celule nedorite [1; 3].

În scopul prevenirii/întârzierii duratei procesului de biodegradare au fost propuse variate tehnici de condiționare fizică a barierei membranare precum iradierea în spectru UV ori

acțiunea chimică de stabilire de punți chimice intermoleculare pe bază de glutaraldehidă, difenilfosforilazidă, hexametilen-diizocianat, riboză [6].

Din acest moment, studiile devin contradictorii. Studii pe animale de experiență demonstrează o degradabilitate redusă pentru membranele condiționate cu glutaraldehidă față de cele colagenice simple, necondiționate [8]. Cu toate acestea, studiile pe culturi tisulare indică un atașament și proliferare fibroblastică și diferențiere osteoblastică reduse în cazul membranelor condiționate, iar acest dezavantaj devine mult mai evident (efect inhibitor) în cazul membranelor condiționate cu glutaraldehidă [7].

Deși condiționarea chimică a barierei membranare colagenice reprezintă o tehnică larg folosită, rămâne încă insuficient cunoscut nivelul până la care aceasta modifică calitatea barierei membranare. Astfel, 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.

Maniera pur descriptivă de analiză a gradului 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 oferă corelații cu evidență statistică între caracteristicile barierei membranare și un raspuns regenerativ optim local.

Insuficiența cunoaștere a proceselor resorbitive a barierele membranare, influențând indirect biodisponibilitatea potențială a acestor factori, limitează aspectele concludive și de certitudine a studiilor de această natură. În acest context, studiul de față își propune analiza/caracterizarea deopotrivă a barierei membranare cât și a reactivității organismului gazdă prin introducerea unui factor particular de caracterizare.

Material și metodă

Procesul de resorbție/biodegradare a barierei membranare este un proces de degradare enzimatică mediat de metaloproteinele matriceale eliberate în cursul procesului de vindecare lezională [1]. Caracterul redox al mediului tisular, ca mediu de reacție, devine un factor determinant al derulării acestui proces, iar coroborarea acestui caracter cu analiza caracteristicii rH (ca parametru de analiză a acestui caracter) proprie barierei membranare oferă o perspectivă nouă de analiză, întrucât s-a demonstrat anterior dependența activității enzimaticice de rH-ul mediului de reacție [4].

Modalitatea de determinare a caracteristicii redox, respectiv a factorului rH a fost deja prezentată exhaustiv [4], motiv pentru care aici vom prezenta pe scurt principul de lucru al acestei modalități de analiză (4). Din considerente practice s-a optat pentru metoda potențiometrică, respectiv de măsurare a diferenței de potențial dintre un electrod de referință și unul redox (platină) care, imersat fiind în soluția de determinat, cedează sau primește electroni până la echilibrarea potențialului său cu cel al soluției. Rezultă astfel E_h (potențialul redox) care, după ce este corectat cu potențialul electrodului de referință față de electrodul normal de hidrogen la temperatura de lucru (date disponibile, de exemplu, în [2]), poate fi folosit ca atare sau transformat matematic în rH, prin relația lui Clark.

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

În studiu au fost incluse membrane ce corespund principalelor categorii structurale, respectiv o grupă de membrane bilaminare, simple de collagen (grupa 1, MC), o a doua grupă de membrane ale căror legături intermoleculare sunt mediate de glutaraldehidă (grupa 2, MCG) și o a treia grupă (grupa 3, MCR) de membrane ale căror legături intermoleculare intrastructurale sunt mediate de riboză.

Din membranele de collagen au fost tăiate discuri cu diametrul de cca. 5 mm și incubate pentru o oră în soluție salină tamponată (pH 7,2). Ulterior ele au fost prelevate, excesul de soluție eliminat (pe hârtie de filtru). Discurile au fost ulterior cântărite, fiind determinate mase medii de 21,40 mg (grupa 1, MC), 36,40 mg (grupa 2, MCG) și respectiv 13,30 mg (grupa 3, MCR). Pentru ușurința în manevrare, plasare, identificare și îndepărtare ulterioară, acestea au fost fixate într-o plasă metalică fină, pliată.

Ca animale de experiență au fost folosiți șobolani Wistar (de același sex, femele, cu vârsta medie de 3-4 luni și cu greutatea medie de 330-350 g), la fiecare fiind implantate câte 3 probe de membrană, câte una pentru fiecare grupă.

Plasarea subcutanată a probelor de membrană 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 4x8 cm de pe față dorsală a fost rasă, dezinfectată cu polividon iodină (Betaisodonă), s-au realizat apoi incizii dorsale paramedice în lungul coloanei vertebrale și incizii de separare pentru obținerea a câte trei "pungi" subcutanate individuale, în care au fost introduse probele de membrane. Animalele au fost menținute în cuști speciale, hrănite *ad libitum*, sub un ciclu lumină/întuneric de 12 ore, la temperatura ambientală de 20°C. Animalele au fost sacrificate la intervale stabilite de timp de 2, 7, 14 și respectiv 28 de zile. Discurile de material membranar implantate subcutanat au fost identificate și extrase, fiind acordată o atenție deosebită asupra îndepărtării și izolării materialului colagenic membranar de cel al organismului gazdă. Materialul colagenic a fost recântărit ulterior (tot ca masă umedă).

Rezultate și discuții

Au fost determinate masele colagenice pentru fiecare tip de membrană la intervale de 2, 7, 14 și 28 de zile relativ la masa colagenică medie determinată inițial. La 2 și 7 zile masa cea mai redusă de collagen a fost identificată pentru MCG, urmată de MC și MCR, care a demonstrat o rezistență crescută față de procesul resorbtiv. La 28 zile masa cea mai redusă de collagen a fost identificată pentru NCL, urmată de GCL și RCL, care a demonstrat din nou o rezistență crescută față de procesul resorbtiv. La 14 zile diferențele nu au fost majore, acestea devenind evidente ulterior în momentul determinării la 28 zile, când se identifică o funcție temporală a procesului de resorbție membranară.

Datele obținute, ca medie a 5 repetiții, sunt prezentate în tabelul 1. Întrucât deontologia cercetării nu permite reclama sau inversul acesteia, nu au fost prezentate simbolul sau firma producătoare a membranelor, acestea fiind incluse sub un număr convențional, fiind de interes numai clasa căreia acestea aparțin.

Tabelul 1.

Membrana	Clasa	rH	Grad de resorbție (%)
1	MCG	24,1	52,8
2	MC	25,6	71,5
3	MCR	25,0	62,5
4	MCG	25,8	52,6
5	MCR	25,5	66,6
6	MCR	24,4	60,7
7	MCG	25,9	58,7
8	MCG	24,6	57,3
9	MC	25,2	75,4
10	MCR	24,8	65,5
11	MC	25,1	67,3
12	MC	25,4	74,7

Datele cuprinse în Tabelul 1 sunt reprezentate grafic în Figura 1.

În acest studiu s-a urmărit analiza procesului de biodegradare a trei tipuri structural diferite de membrane de collagen, larg folosite în practica clinică curentă, deși rezultatele pot să nu fie extrapolabile direct la condițiile mediului oral (în special în privința modului în care aceasta ar putea evolua în cazul unei

expuneri spontane a membranei la contaminanții microbiotei orale). Pentru toate clasele de membrane degradarea/resorbția membranelor debutează la scurt timp de la implantare (7 zile sau mai devreme) iar toate tipurile de membrane de colagen experimentate demonstrează o resorbție continuă. Ceea ce le diferențiază este tiparul biodegradării membranare, care este diferit funcție de caracteristica rH membranelor în contextul general al rH-ului local tisular.

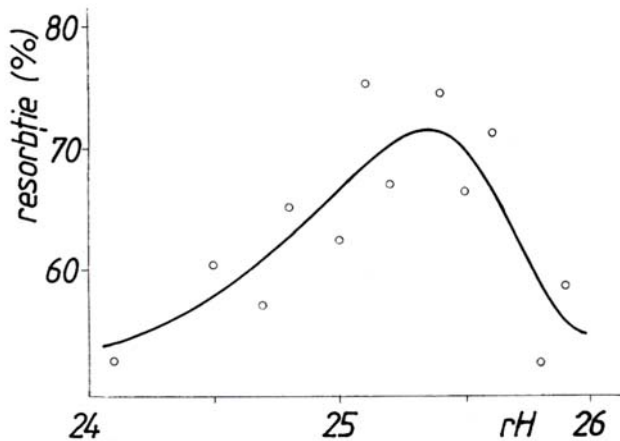


Figura 1.

În acest context, la organismul care demonstrează un rH membranelor apropiat de valorile fiziologice locale maximul de resorbție este identificat pentru membranele grupei MC (membrane simple, colagenice), în vreme ce membranele

condiționate (prin legături intermoleculare mediate de riboză ori glutaraldehidă) demonstrează alterări structurale minime. În acest sens, alterarea semnificativ redusă a membranelor grupei MCG (condiționate chimic prin glutaraldehidă) poate fi privită ca o biocompatibilitate redusă, indusă prin componenta glutaraldehidică, respectiv rH-ul orientat spre domeniul oxidativ, dar care poate fi benefică din punct de vedere clinic atunci când se dorește o prezență prelungită a membranei (corectarea defectelor parodontale profunde necesită un proces regenerativ prelungit).

Concluzii

Alura generală a dependenței gradului de resorbție membranelor funcție de rH-ul acestora respectă regula proprie proceselor cu caracter heterotrof – panta ramurii ascendente a dependenței este mai lină decât cea descendentă. Maximul procesului de resorbție a membranei este atins la valoarea rH 25,4, practic identică cu rH-ul tisular al țesutului în contact cu care a stat membrana – cu alte cuvinte, trebuie alese membrane a căror caracteristici redox sunt cât mai depărtate de această valoare. Din această perspectivă, este de preferat alegerea unei membrane cu rH inferior celui al zonei de implant, întrucât panta mai mică în acest domeniu permite o marjă mai largă de alegere, în raport cu domeniul oxidant.

Având în vedere variabilitatea – atât individuală în genere, cât și cea generată de diverse afecțiuni – țesutului în care urmează a se implanta membrana, este recomandată determinarea prealabilă a rH-ului tisular al zonei de implant, ceea ce se poate realiza cu un sistem de electrozi aferent unei forme constructive specifice, precum cel prezentat de [9] sau de [10].

Bibliografie

1. ARMSTRONG, D. G., JUDE, E. B., The role of matrix metallo-proteinases in wound healing, *J. Am. Pediatr. Med. Assoc.*, 92: 12-18, 2002.
2. 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.
3. BUNYARATAVEJ, P., WANG, H.-L., Collagen membranes: a review, *Journal of Periodontology*, 72 (2): 215-229, 2001.
4. DUCA, G., ZĂNOAGĂ, C. V., DUCA, M., GLADCHI, V. *Procese redox în mediul ambiant*, Editura Universității de Stat din Moldova, Chișinău, 2001.
5. HAMMERLE, C. H., LANG, N. P., Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials, *Clin. Oral Implants Res.*, 12: 9-18, 2001.
6. PATINO, M. G., NEIDERS, M. E., ANDREANA, S., NOBLE, B., COHEN, R. E., Collagen as an implantable material in medicine and dentistry, *J. Oral Implantol.*, 28: 220-225, 2002.
7. ROTHAMEL, D., SCHWARTZ, F., SCULEAN, A., HERTEN, M., SCHERBAUM, W., BECKER, J., Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells, *Clin. Oral Implants Res.*, 15: 443-449, 2004.
8. ROTHAMEL, D., SCHWARTZ, F., SAGER, M., HERTEN, M., SCULEAN, A., BECKER, J., Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat, *Clin. Oral Implants Res.*, 16: 369-378, 2005.
9. ZĂNOAGĂ, C. V., NEACȘU, I., ZĂNOAGĂ, M., DONCEAN, G., A redox microelectrode and its possible applications, A XVIII-a Conferință internațională de inventică "Cercetări și tehnologii inovative performante", Iași, 5-8 iul. 2006.