

# ASPECTE PRIVIND CARACTERIZAREA MEMBRANELOR DE COLAGEN CU AJUTORUL PARAMETRULUI RH

## ASPECTS OF COLLAGEN BARRIERS CHARACTERIZATION BY MEANS OF RH PARAMETER

### Rezumat

Ștefan ZĂNOAGĂ<sup>1</sup>, Silvia Mărțu<sup>2</sup>

### Summary

Membranele de colagen sunt folosite în mod obișnuit în procedurile regenerative ghidate. În prezent există o largă varietate de produse disponibile comercial, cu structuri macromoleculare, implicat caracteristici fizico-chimice diferite și, odată cu acestea, cu rate diferite de resorbție post-implantară, influențând astfel rezultatele clinice. Scopul studiului de față

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

Collagen membranes are generally used for guided regenerative procedures. There is a large variety of available products today, with macromolecular structures, that is with different physico-chemical characteristics and, implied, with different rates of post-implantation resorption, thus influencing the clinical results. The aim of the present/subsequent study is to

este evaluarea posibilității de caracterizare a barierei membranare prin utilizarea unui parametru, încă inedit pentru domeniu, care să se poată constitui într-un criteriu indicativ biologic al membranelor de colagen disponibile, în vederea alegerii variantei optime.

Au fost alese spre studiu membrane de colagen ce corespund principalelor categorii structurale disponibile în prezent, diferența dintre aceste clase fiind dictată de natura legăturilor intermoleculare (legături simple ori mediate, de riboză, respectiv glutaraldehidă). Cantități identice, dintr-un număr egal de membrane disponibile comercial pentru fiecare clasă în parte, au fost supuse determinării parametrului rH.

Au fost identificate valori diferite ale parametrului rH pentru fiecare membrană în cadrul aceleiași clase. Distribuția valorilor rH obținute, deși aliniată într-un domeniu relativ restrâns, indică un caracter de individualitate pentru fiecare mostră din produsele disponibile comercial.

Membranele testate se caracterizează prin valori rH diferite, funcție de caracteristicile lor fizico-chimice. Analiza parametrului rH se constituie într-o funcție de sine stătătoare, exprimând specificitate și individualitate. Membrana de colagen poate fi caracterizată astfel din perspectiva compatibilității biologice odată cu identificarea caracteristicii de rH tisular, facilitând alegerea unui tip de membrană funcție de indicația clinică.

*Cuvinte-cheie:* rH, caracteristică rH, membrană de colagen

assess the possibility of membrane barrier characterization by means of a parameter, new for this field yet, which could be a biological indicative criterion for the available collagen membranes, in order to choose the best/optimum alternative.

Collagen membranes have been chosen to study, that correspond to the main structural categories available today, the difference between them being dictated by the nature of intermolecular links (simple or mediated, ribose or glutaraldehyde links). Identical quantities, from an equal number of commercial available membranes for each class, have been subjected to the rH parameter determination.

Different values of the rH parameter for each membrane within the same class have been identified. The distribution of resulting rH values, though aligned in a quite narrow range, indicates an individuality character for each sample of the commercial available products.

The tested membranes are characterized by different rH values, according to their physico-chemical characteristics. The analysis of rH parameter represents a self-standing function, expressing specificity and individuality. The collagen membrane can be thus characterized from a biological compatibility perspective, at same time with the identification of tissue rH characteristic, easing the choice of a membrane type according to the clinical indication.

*Keywords:* rH, rH characteristic, collagen membrane

### Introducere

Obiectivele terapiei parodontale moderne sunt reprezentate de regenerarea și restaurarea componentelor complexului odonto-parodontal afectat de boală la forma, funcția și consistența lor originară. Procedurile terapeutice disponibile pentru atingerea acestor obiective includ utilizarea barierei membranare pentru regenerarea tisulară ghidată și aplicarea materialelor de adiție/control (substituenți de os, factori de creștere), iar datorită variabilității fizice și chimice largi a acestor produse se descriu grade variate de succes sau de eșec terapeutic [5; 6].

Gradele variate de succes terapeutic sunt o funcție de numeroși factori între care se pot menționa morfologia defectului osos, procedura chirurgicală, natura materialelor folosite. Succesul terapiei regenerative prin utilizarea barierei mem-

branare este o funcție de îndeplinirea criteriilor necesare pe durata întregului proces de vindecare, care poate varia funcție de dimensiunea defectului osos. Perioada îndelungată a procesului regenerativ (3-12 luni) necesită îndeplinirea criteriilor optime via prezenței barierei membranare, care devine o funcție a ratei de resorbție, într-o relație de directă proporționalitate [6].

Degradarea membranei de colagen este de natură enzimatică, rata de resorbție fiind o funcție multivariabilă: În primul rând, prezența metaloproteinazelor matriciale, stabilitatea structurală. Posibilitățile limitate de control enzimatic direct au determinat încercări de control prin influențarea stabilității structurale membranare [5].

Membranele de colagen prezintă o organizare structurală variabilă, funcție de procesul tehnologic, respectiv organizarea spațială diferită între macromoleculele, fibrele, fasciculele și

straturile de collagen între care se stabilesc legături intermoleculare. Organizarea structurală spațială și legăturile intermoleculare determină caracteristicile fizice (rigiditate, flexibilitate), integrarea tisulară, biodegradabilitatea [8]. În acest context, membranele cu un grad ridicat de legături intermoleculare, recomandate a fi utilizate pentru tratarea defectelor osoase profunde/largi, își păstrează integritatea pentru perioade îndelungate de timp dar vor demonstra o integritate tisulară și vascularitate reduse [9].

Până în prezent s-au raportat numeroase studii adresate procesului de resorbție membranară, unele dintre acestea fiind evaluări histologice. Deși studiile existente sunt dominant studii de evaluare calitativă, unele sunt de natură cantitativă, de analiză a tiparului resorbțiv, dar fără o corelare a datelor într-un context biologic [4; 6; 8].

Obiectivul prezentului studiu este de a completa o lipsă de informație, prin introducerea unui parametru aparte, respectiv de a caracteriza membranele de collagen de așa manieră încât compatibilitatea biologică și rezultanta acestia, rata procesului resorbțiv, să fie deductibile.

### Material și metodă

Considerând faptul că procesul de resorbție membranară este în esență un proces biologic, mediat enzimatic, iar că un factor determinant pentru derularea proceselor biochimice și biologice îl reprezintă caracterul redox al mediului (intratisular, ca mediu de reacție) putem concluda că identificarea existenței unei caracteristici redox a barierei membranare vine în completarea și înțelegerea proceselor de această natură.

Modalitatea de determinare a caracteristicii redox, respectiv a factorului rH a fost deja prezentată exhaustiv [3], motiv pentru care aici vom prezenta pe scurt principul acestei modalități de analiză.

Din considerente practice, s-a preferat modalitatea potențiometrică de analiză, care presupune măsurarea diferenței de potențial dintre un electrod de referință și unul redox confecționat dintr-un metal nobil, de exemplu 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 (valori disponibile în literatură, de exemplu [1]), poate fi folosit ca atare sau transformat matematic în rH. Aici ne permitem remarcă că în multe lucrări autorii omit această corecție (cu o valoare situată în jurul a 0,25 V), astfel încât valorile  $E_h$  raportate trebuie preluate cu multă circumstanță, iar atunci când sunt net diferite de valorile fiziologice (la animale valorile rH sunt situate în intervalul aproximativ de 20–28) să se aplice o corecție prin introducerea valorii potențialului de electrod al electrodului de lucru față de cel normal de hidrogen la temperatura ambientală.

rH-ul este definit, conform relației lui Clark, astfel:

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

Dependența de temperatură a potențialului de electrod al electrodului de referință impune ca determinarea să fie realizată în condiții de termostatare, standardizate (4°C).

Echilibrarea potențialului măsurat este rezultanta a unei echilibrări propriu-zise a potențialului, care decurge după o

lege quasilogaritmică și, respectiv, a unui fenomen exprimat printr-o lege liniară, care pare a fi difuzia apei din în puntea electrochimică a electrodului de referință, conducând la concentrarea diluarea de moment a soluției de KCl din acesta, ca unul din posibili componenți ai driftului sistemului de măsură. După un timp variabil de coexistență, se manifestă numai fenomenul liniar; prin extrapolarea lui la momentul inițial se obține o valoare a lui  $E_h$  lipsită cu un grad redus de subiectivism (Figura 1).

Prin menținerea constantă a pH-ului în domeniul valorilor proprii materialului de investigat, 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 2).

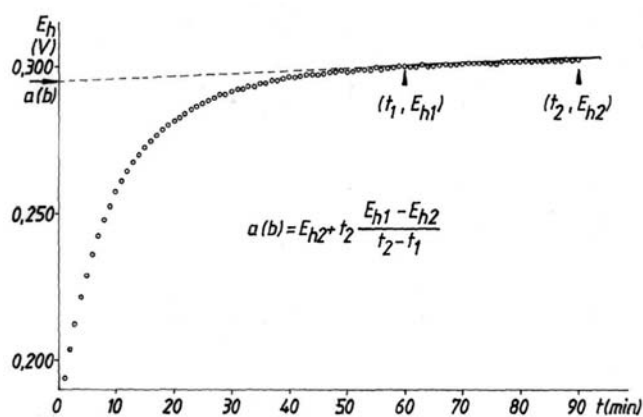


Figura 1.

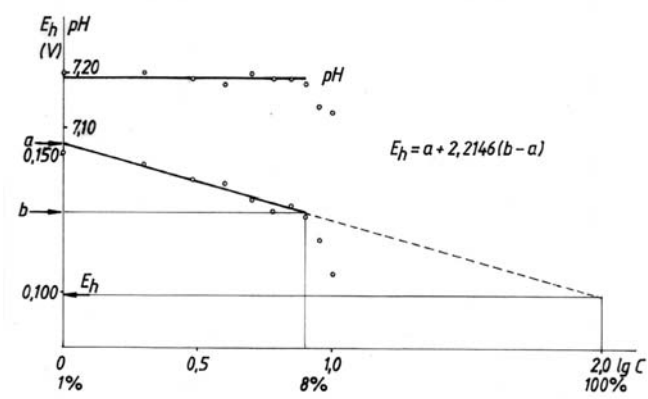


Figura 2.

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.

În studiul de față au fost alese pentru analiză membrane ce corespund principalelor categorii structurale disponibile în prezent, respectiv o grupă de membrane bilaminare, simple de collagen (a căror microstructură nu presupune existența de legături intermoleculare) (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 intra-structurale sunt mediate de riboză. Aceste modificări intermoleculare au fost realizate în scopul încercării de control a ratei de resorbție membranară. Aceste membrane sunt larg folosite în practica chirurgicală parodontală curentă, fiind disponibile sub diferite denumiri comerciale. Particularitățile structurale diferite au fost imaginate ca modalitate de control a procesului de biodegradare și resorbție intratisulară.

Circa 2,5 g probă (folosind sisteme de electrozi miniaturizate, cantitatea poate fi redusă corespunzător) se triturează (cu puțin nisip de cuarț), întâi ca atare, apoi cu adaosul unei cantități de soluție tampon cu pH în domeniul pH-ului probei. Cantitatea necesară se calculează înmulțind greutatea exactă a probei cu factorul 11,5. Cu un pH-metru programat pe determinarea de micropotențial electric (mV), dotat cu un electrod de platină și unul de referință (în acest caz s-a folosit electrod de calomel saturat) se determină potențialul redox, luând în considerare numai domeniul liniar al evoluției acestuia. Valoarea obținută astfel va reprezenta parametrul "b" (vezi Fig. 1) al formulei de calcul matematic. Ulterior, se amestecă 5 mL din soluția/suspensia amintită cu 35 mL soluție tampon și se determină din nou potențialul redox, obținându-se în acest fel parametrul "a" (v. Fig. 1) al formulei de calcul.

Instalația experimentală (sistemul de electrozi și milivoltmetrul) a fost completată cu un sistem computerizat de achiziție automată de date, având în vedere necesitatea prelevării la intervale de timp precise a valorii potențialului redox, în vederea înscrierii acestora într-o dinamică în care să se poată decela zona de variație liniară, singura în măsură să indice, prin extrapolare, valoarea demnă a fi luată mai departe în calcul a potențialului redox (vezi. Fig. 1).

## Rezultate și discuții

În Tabelul 1 sunt reprezentate valorile experimentale determinate pentru membranele de collagen luate în studiu, pentru care se redau valori individuale de rH.

**Tabelul 1**

Varianta experimentală	Tipul membranei		
	MCR	MCG	MC
1, respectiv 3, 9	24,1	25,0	25,2
6, respectiv 11, 5	24,5	25,1	25,5
8, respectiv 12, 4	24,7	25,4	25,8
10, respectiv 2, 7	24,8	25,6	25,9

Așa cum se observă, se pot delimita valori diferite pentru fiecare clasă de membrane iar în cadrul aceleiași clase se pot diferenția valori diferite, corespunzătoare unor naturi diferite, individuale. Dintre acestea, unele membrane pot prezenta un rH apropiat de valoarea rH corepondentă mediului tisular, în vreme ce alte membrane prezintă valori ce sunt distribuite între cele două extreme corespunzătoare, respectiv fie spre extrema oxidativă, fie spre cea reductivă.

Întrucât studiul de față nu și-a propus să promoveze nici un astfel de produs comercial disponibil, nu au fost menționate denumirile comerciale sub care acestea există. Obiectivul principal a fost acela de a identifica o modalitate suplimentară de caracterizare a particularităților de membrană și, în aceste

condiții, de a identifica existența potențialelor diferențe între aceste clase. Rațiunea acestui deziderat rezidă în faptul că studiile existente în prezent sunt dominate de studii descriptive, care atestă, de o manieră calitativă, existența procesului resorbtiv membranar. Studiile cantitative de o manieră similară oferă de cele mai multe ori rezultate limitate, comparative între clasele de membrane analizate. Caracteristica mediului tisular ca și a celei membranare nu sunt menționate.

Caracterul redox al mediului poate fi cuantificat prin potențialul redox, o mărime determinabilă experimental însă influențată de unii parametri, între care cel mai important este pH-ul mediului. Acest fapt devine evident atunci când se dorește o analiză în dinamică a fenomenelor biologice. În acest sens corecția potențialului redox se poate realiza prin principalul său factor de influență, rH-ul (cu semnificație fizică numai în medii apoase). Un fenomen biologic poate fi astfel ulterior caracterizat printr-un corolar al celor doi factori, potențialul redox și respectiv pH-ul, un parametru care îl condiționează, anume rH-ul. Utilizarea aceluiași parametru pentru caracterizarea materialelor implantare intratisulare de tipul membranelor de collagen oferă posibilitatea caracterizării interacției membrană-țesut, ca dinamică a unui fenomen biologic.

## Concluzii

În studiul de față a fost evaluată posibilitatea de caracterizare a membranelor de collagen utilizate în procedurile regenerative parodontală prin utilizarea unui parametru suplimentar, care să poată fi aplicat deopotrivă caracteristicii de material cât și unei analize ulterioare a mediului tisular. Prin identificarea și utilizarea unui aceluiași parametru se pot realiza analize într-un context biologic care să vină în completarea studiilor existente și pentru care rezultatele sunt, nu o dată, contradictorii.

## 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.
- BUNYARATAVEJ, P., WANG, H.-L., Collagen membranes: a review, Journal of Periodontology, 72 (2): 215-229, 2001.
- DUCA, G., ZANOAGA, C. V., DUCA, M., GLADCHI, V. Processe redox în mediul ambiant, Editura Universității de Stat din Moldova, Chișinău, 2001.
- LAURELL, L., BOSE, M., GRAZIANI, F., TONETTI, M., BERGLUNDH, T., The structure of periodontal tissues formed following guided tissue regeneration therapy of intra-bony defects in the monkey, Journal of Clinical Periodontology, 33 (8): 596-603, 2006.
- NANCI, A., BOSSHARDT, D. D., Structure of periodontal tissues in health and disease, Periodontology 2000, 40 (1): 11-28, 2006.
- 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., 2002, 28: 220-225.
- POLIMENI, G., XIROPAIDIS, A. V., WIKESJO, U. M. E., Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration, Periodontology 2000, 41 (1): 30-47, 2006.
- 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.
- VON ARX, T., BROGGINI, N., STORGARD, J. S., BORNSTEIN, M. M., SCHENK, R. K., BUSER, D., Membrane durability and tissue response to different bioresorbable barrier membranes: A histologic study in the rabbit calvarium, Int. J. Oral maxillofac. Implants, 20: 843-853, 2005.