



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**Διερεύνηση της επίδρασης της ακτινοβολίας με  
διοδικό laser χαμηλής ενέργειας στην  
κυτταροτοξικότητα του κεραμικού διπυριτικού  
λιθίου.**

**Μαλλιάρη Μαρία**



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΠΡΟΣΘΕΤΙΚΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΑΚΙΝΗΤΗ ΠΡΟΣΘΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΘΕΤΙΚΗ ΕΜΦΥΤΕΥΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

**Διερεύνηση της επίδρασης της ακτινοβόλησης με  
διοδικό laser χαμηλής ενέργειας στην  
κυτταροτοξικότητα του κεραμικού διπυριτικού  
λιθίου.**

**Μαλλιάρη Μαρία**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Επιβλέπων: Κοΐδης Πέτρος, Καθηγητής

**Τριμελής επιτροπή**

Κοΐδης Πέτρος: Καθηγητής

Θεοχαρίδου Άννα: Λέκτορας

Μπακοπούλου Αθηνά: Επ. Καθηγήτρια

**Θεσσαλονίκη, <Ιούνιος, 2017>**



*Η ολοκλήρωση της εργασίας αυτής έγινε στο πλαίσιο της υλοποίησης του μεταπτυχιακού προγράμματος το οποίο συγχρηματοδοτήθηκε μέσω της Πράξης «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ Με διαδικασία εξατομικευμένης αξιολόγησης ακαδ.έτους 2012-2013» από πόρους του Ε.Π. «Εκπαίδευση και δια Βίου Μάθηση» και του ΕΣΠΑ 2007-2013»*

«Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Τμήματος Οδοντιατρικής στη συνεδρίασή της στις 13-04-2016, με αριθμό Πρωτοκόλλου 34».



**ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI**

**FACULTY OF HEALTH SCIENCES**

**SCHOOL OF DENTISTRY**

**POSTGRAGUATE PROGRAM «DENTISTRY»**



**Department: Fixed Prosthodontics and Implant Prosthodontics**

**Investigation of the effect of irradiation with low-  
energy diode laser on the cytotoxicity lithium  
disilicate ceramic .**

**Malliari Maria**

**Postgraduate Student**

**Postgraduate Thesis**

Thessaloniki, <June, 2017>

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών μου σπουδών και την παρούσα διπλωματική εργασία θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Τον **Καθηγητή κ. Κοΐδη Πέτρο**, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα αλλά και όλα τα χρόνια της συνεργασίας μας. Οι επιστημονικές και όχι μόνο αξίες που κατάφερε να μου μεταδώσει θα αποτελούν για μένα σημαντικές αρχές στην μετέπειτα επαγγελματική και προσωπική ζωή μου.

Την **Λέκτορα κα Θεοχαρίδου Άννα** που χωρίς την υπομονή και επιμονή της, καθώς και τον πολύ από τον προσωπικό της χρόνο που αφιέρωσε δεν θα ολοκληρωνόταν με επιτυχία η παρούσα διπλωματική μελέτη. Οι επιστημονικές της γνώσεις σε συνδυασμό με τη σωστή καθοδήγησή της και την ηθική της συμπαράσταση με βοήθησαν κατανοώ καταστάσεις και να επιλύνω προβλήματα που παρουσιάζονταν.

Την **Επ.Καθηγήτρια κα Μπακοπούλου Αθηνά** για όλη την εκπαίδευση και βοήθεια που μου προσέφερε στο εργαστήριο των κυτταροκαλλιεργειών. Η επιστημονική της κατάρτιση ,η εμπειρία της και οι χρήσιμες συμβουλές της με βοήθησαν ιδιαίτερα στην ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης.

Την **Επικ. Καθηγήτρια κα Κοντονασάκη Ελεάνα** για τη αμέριστη βοήθεια και για τις χρήσιμες συμβουλές της σε όλη τη διάρκεια της πορείας μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα. Ιδιαίτερες ευχαριστίες για την παρούσα διπλωματική μελέτη που με τις επιστημονικές της γνώσεις και όχι μόνο συνέβαλε και αυτή με τον τρόπο της στην ολοκλήρωση της.

Τον **Επικ. Καθηγητή Παιδοδοντίας κο Αραποστάθη Κώστα** για την παραχώρηση της συσκευής λείζερ.

Την μεταδιδάκτορα **κα Παπαχρήστου Ελένη** για την βοήθειά της στο εργαστήριο των κυτταροκαλλιεργειών.

Την **Επίκ. Καθηγήτρια του Γεωλογικού Τμήματος κα. Παπαδοπούλου Λαμπρινή** για την πολύτιμη βοήθειά της στην προετοιμασία των δειγμάτων και στη μελέτη αυτών με την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης.

Τον **Επ.Καθηγητή του τμήματος Ηλεκτρολόγων Μηχανικών του Πολυτεχνείου κο Χριστόφιλο Δημήτρη** για την πολύτιμη βοήθεια του στον καθορισμό των παραμέτρων ακτινοβολήσης.

Τον **Καθηγητή του τμήματος Χημείας κο Ζαχαριάδη Γιώργο** για τη διεξαγωγή της φασματομετρίας ατομικής εκπομπής σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα(Inductively Coupled Plasma mass spectrometry ICP)

Τον **κο Μήττα Νικόλαο** για την διεξαγωγή της στατιστικής ανάλυσης.

Την εταιρεία **Ivoclar Vivadent** για την δωρεάν παραχώρηση των δειγμάτων e.max Press.

Τους **Οδοντοτεχνίτες κο Νικολάου Γιώργο και κο Τσιφουτάκο Διαμαντή** που βοήθησαν αφιλοκεδώς στην κατασκευή των κεραμικών δειγμάτων.

Το **Εργαστήριο της Οδοντικής Χειρουργικής**, για την παραχώρηση πρόσβασης στη συσκευή θερμοκύκλωσης των κεραμικών δοκιμίων.

Το **Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών** για τη στήριξη κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου και την οικονομική ενίσχυση που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια των ακαδημαϊκών ετών 2012-13 και 2013-14.

Τη φίλη και **φιλόλογο Καραγιαννίδου Μαρία** που διάβασε όλα αυτά τα άγνωστα σε αυτή πράγματα προκειμένου να εντοπίσει ορθογραφικά και συντακτικά λάθη.

Τον **Καθηγητή Ενδοδοντίας Μπελτέ Παναγιώτη** , παρόλο που δεν έχει άμεση εμπλοκή στην παρούσα μελέτη, του είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων για την επιμονή του όλα αυτά τα χρόνια να μου διδάξει αρχές και αξίες που θα αποτελούν για μένα οδηγό στην ζωή μου.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω, όλα τα **Μέλη ΔΕΠ** και τους **Επιστημονικούς Συνεργάτες** του τομέα της Προσθετικής που παρά τις δύσκολες συνθήκες φρόντισαν την κλινική και επιστημονική μου κατάρτιση. Τις **συμφοιτήτριες** μου που ομόρφαιναν με τον τρόπο τους τη δύσκολη καθημερινότητα των τελευταίων ετών.

Τέλος και πάνω από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω την **οικογένεια** μου και το **σύζυγο** μου που χωρίς τη συμπαράσταση και της στήριξη τους η ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών σπουδών μου δεν θα μπορούσε να γίνει πραγματικότητα.



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η χρήση του κεραμικού διπυριτικού λιθίου στην οδοντιατρική έχει αυξηθεί προκειμένου να εκπληρώσει τις πιο δύσκολες απαιτήσεις στην επανορθωτική και αισθητική οδοντιατρική. Ωστόσο, η βιοσυμβατότητα του δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Μόνο λίγες μελέτες έχουν δημοσιευθεί αποδεικνύοντας ότι το κεραμικό διπυριτικό λιθίου δεν είναι βιολογικά αδρανές. Από την άλλη πλευρά, πολλές έρευνες έχουν δείξει την βιοδιεγερτική επίδραση του λέιζερ χαμηλής ενέργειας (LLLI) στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην επούλωση και αναγέννηση των μαλακών ιστών. Σκοπός αυτής της έρευνας είναι να διερευνήσει την επίδραση της ακτινοβολίας του διοδικού λέιζερ χαμηλής ενέργειας στην κυτταροτοξικότητα του κεραμικού διπυριτικού λιθίου.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Η κυτταροτοξικότητα τριών ομάδων δειγμάτων κεραμικού διπυριτικού λιθίου (e.max Press) (δείγματα ελέγχου-Control, δείγματα που έχουν υποστεί θερμοκύκλωση-Thermo, δείγματα που έχουν υποστεί θερμοκύκλωση και έχουν ακτινοβοληθεί (Thermo+LLLI) μελετήθηκε σε άμεση επαφή με ανθρώπινους ουλικούς ινοβλάστες (HGF). Μετά από 24-ωρη επώαση με 5% CO<sub>2</sub> στους 37°C, τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με διοδικό λέιζερ (EPIC, BIOLASE, 940nm, 0,2W) και ενέργεια 8 J / cm<sup>2</sup>. Η μιτοχονδριακή δραστηριότητα εκτιμήθηκε με τη δοκιμασία MTT 24, 48 και 72 ώρες μετά την ακτινοβολήση. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να μελετηθεί η κυτταρική μορφολογία ενώ πραγματοποιήθηκε και μικροσκοπία συνεστιακής δέσμης (CONFOCAL) για την ανίχνευση ζωντανών κυττάρων. Τέλος, διεξήχθη φασματομετρία ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (Inductively Coupled Plasma mass spectrometry ICP) για την ανίχνευση πιθανών κυτταροτοξικών ιόντων.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μιτοχονδριακή δραστηριότητα των HGFs μειώθηκε σημαντικά στην ομάδα Control σε σύγκριση με την ομάδα που ήταν μόνο κύτταρα (Cell) (\*\*p≤0,001). Στατιστική σημαντική μείωση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας των HGFs παρατηρήθηκε στην ομάδα Thermo σε σύγκριση τόσο με ομάδα των κυττάρων όσο και με την ομάδα Control (\*\*p≤0,001). Το LLLI αποδείχθηκε ότι έχει βιοδιεγερτική δράση αυξάνοντας τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα των HGFs. Η

μικροφωτογραφίες SEM και Confocal έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας MTT. Από το ICP ανιχνεύθηκαν ιόντα Si, P, Ca και Mg, στοιχεία που δεν μπορούν να τεκμηριώσουν την κυτταροτοξική δράση του κεραμικού διπυριτικού λιθίου.

#### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποδεικνύουν πως το κεραμικό διπυριτικού λιθίου δεν είναι ένα βιολογικά αδρανές υλικό και πως η ακτινοβολήση με λέιζερ χαμηλής ενέργειας έχει βιοδιεγερτική επίδραση στους HGFs προάγοντας των κυτταρικό πολλαπλασιασμό τους.

#### ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ

Λέιζερ χαμηλής ενέργειας, βιοδιέγερση, κυτταροτοξικότητα, κεραμικό διπυριτικού λιθίου

## INTRODUCTION

Lithium disilicate dental ceramics (LDC) have been introduced in clinical practice in order to fulfil the most challenging requirements in restorative aesthetic dentistry. Although, its optical and mechanical properties are of main importance to achieve an aesthetic all ceramic restoration, biocompatibility of LDC has not been extensively documented. Moreover, biological complications such as gingival recession were reported at an increased rate for all ceramic restorations, indicative that these materials may not be inert for the surrounding soft tissues. On the other hand, the biostimulatory effect of Low Level Laser Irradiation (LLLI) on cell proliferation and soft tissue healing has been well documented. LLLI is widely used in medicine and in dentistry in situations like post surgical healing, in painful temporomandibular joints, in oral mucositis and dentin hypersensitivity. Aim of this study was to investigate the effect of LLLI on the biological effect of LDC on human gingival fibroblasts (HGFs).

## EXPERIMENTAL METHODS

Three experimental groups of LDC samples (IPS e.max Press, Ivoclar Vivadent) (8×1mm) were prepared according to the manufacturer instructions: A. LDC without any additional treatment (Control) B. LDC thermally treated with thermal cycling (Thermo) C. LDC thermally treated and irradiated with LLLI (Thermo+LLLI). HGFs cultured without any LDC were used as additional control (Cells). A periodic immersion device with distilled water bath was used for the thermal cycling of the samples (Temperature: 37°C-55°C-37°C-5°C, Number of cycles: 1500, Dwell time 15 sec in each temperature).

Primary cultures of HGFs were established from gingiva biopsy of a healthy donor and developed in DMEM culture medium, supplemented with 10% FBS and antibiotics/antimycotics (approval by the Ethical Committee of the Institutional Review Board). HGFs ( $3 \times 10^4$  cells/well) were seeded in 24-well plates in direct contact with LDC. Four samples were prepared for each group and the experiments performed in triplicate. After 24h incubation with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C, cells were irradiated with a diode laser (EPIC DIODE LASER, BIOLASE; 940nm; 0.2W) in a dark room at a standard position at 8 J/ cm<sup>2</sup> fluence. Cell viability proliferation was evaluated using a tetrazolium salt-based assay (MTT

assay) 24h, 48h and 72h after the LLLI. Statistical analysis of the data was performed using LME (Linear Mixed Effects), LR (Likelihood Ratio) and Tukey's post hoc test.

Morphology of HGF, cultured in contact with LDC samples, was evaluated by Scanning Electron microscopy-SEM (JEOL J.S.M. 840A, Tokyo, Japan). Moreover, quantification of live/dead cells immunofluorescent labeling was visualized by Confocal Microscopy (NikonEZ-C1). Furthermore, Inductively Coupled Plasma mass spectrometry (ICP) was performed on eluates from Control and Thermo samples.

## RESULTS AND DISCUSSION

The mitochondrial activity of HGFs decreased significantly in Control group compared with the Cells group ( $***p \leq 0.001$ ), suggesting that LDC had a negative biological effect on HGFs. Statistically significant decrease of mitochondrial activity of HGFs was recorded for the Thermo group ( $***p \leq 0.001$ ) both with Control and Cells groups, suggesting that aging led to further decrease on HGF proliferation. In contrast, LLLI was shown to have a positive effect by increasing mitochondrial activity of HGFs. In agreement with other *in vitro* studies, our results confirmed that lithium disilicate reduced HGF proliferation. The selected energy dose produced by LLLI could counteract such a negative effect by promoting HGF proliferation. Furthermore, several studies have shown that LLLI at various energy doses could increase cell numbers, mitochondrial activity, DNA synthesis and collagen production of cultured HGFs.

SEM and Confocal microphotographs corroborated the results from MTT assay. At SEM microphotographs Thermo+LLLI group cells were well spread and presented a typical morphology and an attractoid shape, while at Thermo group cells were rarely observed and presented a more flattened phenotype. The number of viable cells appears to be increased in Thermo + LLLI group compared with that of the group Thermo. Moreover, fluorescent staining at Confocal microphotographs revealed that EthD1 positive cells (dead cells) were depicted only at Thermo group, while live staining for live cells was more intense at control THERMO + LLLI group. These observations confirmed the positive effect of LLLI on HGF grown in contact with LDC. According to ICP the major elements that are found to be released are Si, P, Ca and Mg at concentrations which cannot be implicated for the observed cytotoxicity of lithium disilicate.

## CONCLUSION

Under the limitations of this in vitro study, LDC had a negative effect on HGF proliferation, while this effect was counteracted by LLLI at  $8\text{J}/\text{cm}^2$ . The biostimulatory effect of LLLI on HGFs, reported in this experimental study could trigger further studies to investigate the underlying cellular and molecular mechanisms of LLLI effect on oral cells and to establish a clinical protocol for LLLI and soft tissue healing specially when gingival biotype is indicative of an adverse reaction(recession).

## KEY WORDS

Low Level Laser Irradiation, Biostimulation, Cytotoxicity, Lithium Disilicate

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### Γενικό Μέρος

#### A.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

|   |    |
|---|----|
| A1.ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΩΝ ΚΕΡΑΜΙΚΩΝ   | 1  |
| A2. ΚΕΡΑΜΙΚΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΔΙΠΥΡΙΤΙΚΟ ΛΙΘΙΟ<br>(ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΟΥ ΟΛΟΚΕΡΑΜΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΔΙΠΥΡΙΤΙΚΟΥ<br>ΛΙΘΙΟΥ-Ε.ΜΑΧ) | 7  |
| A3.ΛΕΙΖΕΡ   | 22 |

### Ειδικό Μέρος

#### A.ΣΚΟΠΟΣ

46

#### B.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

47

|  |    |
|--|----|
| B1)Κατασκευή δοκιμών   | 47 |
| B2)Ανάπτυξη κυτταρικών καλλιιεργειών ανθρώπινων ουλικών ινοβλαστών<br>(HGF)  | 50 |
| B3)Πρωτόκολλο ακτινοβόλησης  | 51 |
| B4)Δοκιμασίες ελέγχου κυτταροτοξικότητας   | 53 |
| B5)Έλεγχος πρόσφυσης των κυττάρων στην επιφάνεια του υλικού με<br>ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης SEM                  | 54 |
| B6)Έλεγχος ζωτικότητας και επιφανειακής μορφολογίας των κυττάρων με<br>μικροσκοπία ομοεστιακής δέσμης(CONFOCAL)        | 56 |
| B7)Φασματομετρία ατομικής εκπομπής σε επαγωγικά συζευγμένο<br>πλάσμα(Inductively Coupled Plasma mass spectrometry ICP) | 59 |

#### Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

|   |    |
|---|----|
| Γ1)Δοκιμασίες ελέγχου κυτταροτοξικότητας-Δοκιμασία ΜΤΤ              | 61 |
| Γ2)Μελέτη μικροφωτογραφιών με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) | 71 |
| Γ3)Μελέτη φωτογραφιών με μικροσκοπία ομοεστιακής δέσμης(CONFOCAL)   | 76 |

|   |     |
|---|-----|
| Γ4)Μελέτη εκχυλισμάτων με φασματομετρία ατομικής εκπομπής σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (Inductively Coupled Plasma mass spectrometry ICP) | 78  |
| <u>Δ)ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>   | 81  |
| <u>Ε)ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ</u>   | 90  |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ  | 93  |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ   | 114 |

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### A) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### A1.ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΩΝ ΚΕΡΑΜΙΚΩΝ

Η χρήση της πορσελάνης από τον Alexis Duchateau το 1774 για την κατασκευή δοντιών οδοντοστοιχίας έδωσε το έναυσμα για την ανάπτυξη της οδοντιατρικής πορσελάνης. Η κατασκευή της πρώτης οδοντιατρικής πορσελάνης πραγματοποιήθηκε από τον Land το 1903 ενώ το 1962 οι Weinstein M. και συνεργάτες εισήγαγαν την οδοντιατρική πορσελάνη κατάλληλη για μεταλλοκεραμικές αποκαταστάσεις. Το 1965, οι Mc Lean και Hughes πρωτοστάτησαν στην ιδέα προσθήκης  $Al_2O_3$  σε αστριούχα πορσελάνη με σκοπό τη βελτίωση των μηχανικών και φυσικών τους ιδιοτήτων. Ωστόσο η ευθραυστότητα, η μικρή αντοχή και η ελλιπής οριακή εφαρμογή αυτών των υλικών περιόρισαν τη χρήση τους. Η εξέλιξη της τεχνολογίας για τα οδοντιατρικά κεραμικά καθώς και οι συνεχώς αυξανόμενες αισθητικές απαιτήσεις των ασθενών οδήγησαν στην ανάπτυξη νέων υλικών και συστημάτων με βελτιωμένες μηχανικές, φυσικές και οπτικές ιδιότητες (Santos και συν., 2015).

Η κατηγοριοποίηση των κεραμικών γίνεται είτε με βάση τη σύστασή τους, είτε με βάση τον τρόπο κατασκευής τους (Διάγραμμα A1).

#### ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥΣ

##### **1) Κεραμικά με βάση την πυριτία (silica- based ceramics)**

##### Αστριούχα κεραμικά (feldspathic ceramics/porcelains)

Η χημική σύσταση αυτών των κεραμικών αποτελείται κυρίως από μία άμορφη υαλώδη μάζα αστρίου (πυριτικό άλας του αργιλίου) μέσα στην οποία βρίσκονται διάσπαρτοι διάφοροι κρύσταλλοι, με βασικούς τον καλιούχο άστριο



( $K_2O \cdot Al_2O_3 \cdot 4SiO_2$ -λευκίτης) και τον νατριούχο άστριο ( $Na_2O \cdot Al_2O_3 \cdot SiO_2$ -αλβίτης)(Κοντονασάκη και συν., 2013). Τα αστριούχα κεραμικά παρουσιάζουν αντοχή που κυμαίνεται από 60 έως 120 MPa (Fischer και συν., 2008). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν αισθητικό υλικό επικάλυψης τόσο σε μεταλλοκεραμικές όσο και σε ολοκεραμικές αποκαταστάσεις αλλά και σε ολοκεραμικές αποκαταστάσεις με την τεχνική του φύλλου πλατίνας αλλά και την τεχνική του πυροχωμάτινου εκμαγείου (Raghavan, 2012).

#### Κεραμικά ενισχυμένα με λευκίτη (leucite reinforced ceramics)

Ο καλιούχος άστριος ή λευκίτης ( $K_2O \cdot Al_2O_3 \cdot 4SiO_2$ ) αποτελεί το βασικό κρύσταλλο σε αυτή τη κατηγορία κεραμικών. Οι κρύσταλλοι του βρίσκονται σε περιεκτικότητα περίπου 45% κ.ο. στην υαλώδη μάζα και παίζουν κύριο ρόλο τη ρύθμιση του συντελεστή θερμικής διαστολής (Mackert και συν., 1986). Επιπλέον, ενισχύουν την αντοχή την κάμψη καθώς ο υψηλός συντελεστής θερμικής διαστολής τους σε σχέση με την υαλώδη μάζα καταλήγει στην ανάπτυξη συμπιεστικών δυνάμεων κατά την ψύξη γύρω από τους κρυστάλλους. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι αναπτυσσόμενες αυτές δυνάμεις να λειτουργούν ανασταλτικά στη διάδοση ρωγμών αυξάνοντας την αντοχή στην κάμψη (Denry, 1996).

#### Κεραμικά με βάση το διπυριτικό λίθιο (lithium disilicate ceramics)

Η κρυσταλλική φάση αυτών των κεραμικών αποτελείται από 70% κρυστάλλους διπυριτικού λιθίου ( $Li_2Si_2O_5$ ) στην υαλώδη μάζα και ορθοφωσφορικούς κρυστάλλους ( $Li_3PO_4$ ) σε μικρότερη περιεκτικότητα. Ο τυχαίος προσανατολισμός των κρυστάλλων και το βελονοειδές τους σχήμα συμβάλλουν στην εκτροπή διάδοσης των ρωγμών αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο την αντοχή στην κάμψη που φτάνει τα 350-450 MPa (Albakry και συν., 2003, Guazzato και Swain, 2003).

## **2) Κεραμικά χωρίς πυριτία (non-silica-based ceramics)**

### Κεραμικά αλουμίνιας (Alumina-based ceramics)

Τα κεραμικά της κατηγορίας αυτής περιέχουν αλουμίνια (οξείδιο του αλουμινίου- $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) σε ποσοστό που φτάνει το 95% (McLean, 2001). Η αλουμίνια παρουσιάζει υψηλό μέτρο ελαστικότητας (350 GPa) και υψηλή αντίσταση στη θραύση ( $3,5-4 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ )(Denry ,1996). Η συμπύκνωση κόκκων αλουμίνιας υψηλής καθαρότητας ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) σε υαλώδη μάζα με παρόμοιο συντελεστή θερμικής διαστολής καταλήγει στη δημιουργία ενός κεραμικού υψηλής αντοχής που κυμαίνεται στα 352-800 MPa (Borba και συν., 2011, Guazzato και συν., 2002).

### Κεραμικά ζιρκονίας (Y-TZP Zirconia ceramics)

Η ζιρκονία συναντάται σε τρεις μορφές: την κυβική ( $>2370^\circ\text{C}$ ), την τετραγωνική ( $1170^\circ\text{C} -2370^\circ\text{C}$ ) και την μονολιθική ( $<1170^\circ\text{C}$ ) (Piconi και Maccauro,1999). Μερικώς σταθεροποιημένη ζιρκονία επιτυγχάνεται με την προσθήκη διάφορων οξειδίων όπως  $\text{CaO}$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{Y}_2\text{O}_3$ , και  $\text{CeO}$  αλλά κυρίως σταθεροποιείται με την προσθήκη 3wt % υτρίας για να προκύψει λεπτόκοκκη τετραγωνική πολυκρυσταλλική ζιρκονία (Denry ,1996). Παρουσιάζει φυσικές ιδιότητες βελτιωμένες σε σχέση με τα κεραμικά αλουμίνιας με αντοχή στην κάμψη που φτάνει τα 900-1200 MPa (Piconi και Maccauro,1999).

### ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΝ ΤΡΟΠΟ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΤΟΥΣ

#### **1) Κεραμικά πυροσυσσωμάτωσης (sintered ceramics)**

Ο όρος κεραμικά πυροσυσσωμάτωσης αναφέρεται κυρίως στα γνωστά αστριούχα κεραμικά. Βασίζονται στο τριμερές σύστημα άργιλος ή καολίνης ( $\text{Al}_2\text{O}_3\cdot 2\text{SiO}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )-άστριος ( $\text{K}_2\text{OAl}_2\text{O}_3\cdot 4\text{SiO}_2$  /  $\text{Na}_2\text{OAl}_2\text{O}_3\cdot \text{SiO}_2$  /  $\text{Li}_2\text{OAl}_2\text{O}_3\cdot \text{SiO}_2$  /  $\text{CaOAl}_2\text{O}_3\cdot \text{SiO}_2$  )-χαλαζίας ( $\text{SiO}_2$  ) (Κοντονασάκη και συν, 2013). Ο άστριος αποτελεί το βασικότερο συστατικό τους καθώς δημιουργεί την υαλώδη μάζα που βρίσκονται οι υπόλοιποι κρύσταλλοι. Τα κεραμικά πυροσυσσωμάτωσης περιέχουν πέρα από τους παραπάνω κρυστάλλους διάφορα οξείδια που

εξασφαλίζουν τη μείωση της θερμοκρασίας τήξης και του συντελεστή θερμικής διαστολής ( $\text{Li}_2\text{O}$ ,  $\text{B}_2\text{O}_3$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ), το φθορισμό ( $\text{UO}_2$ ,  $\text{CeO}_2$ ,  $\text{YO}_2$ ) και την αδιαφάνεια ( $\text{SnO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ) (Κοντονασάκη και συν., 2013). Κύρια φυσική ιδιότητα των κεραμικών πυροσυσσωμάτωσης, είναι η μεγάλη διαφάνεια, λόγω του υψηλού ποσοστού της υαλώδους φάσης. Χρησιμοποιούνται κυρίως ως αισθητικό υλικό επικάλυψης, σε μεταλλοκεραμικές αλλά και σε ολοκεραμικές αποκαταστάσεις.

## **2) Χυτευόμενα υαλοκεραμικά (cast glass ceramics)**

Τα χυτευόμενα κεραμικά παράγονται με χύτευση κέρινων προπλασμάτων ενώ η κρυσταλλοποίηση τους επιτυγχάνεται κατά την όπτηση τους σε θερμοκρασία μικρότερη των  $1100^\circ\text{C}$  (Qualtrough και Piddock, 1997). Αποτελούνται κυρίως από κρυστάλλους μαρμαρυγίας  $\text{K}(\text{MgFe})_3(\text{OH})_2\text{AlSi}_3\text{O}_{10}$  με την εμπορική ονομασία Dicot (Dentsply) ( Adair και Grossman, 1984). Το κύριο πλεονέκτημα τους είναι το πολύ καλό αισθητικό αποτέλεσμα αλλά παρουσιάζουν μικρή αντοχή στην κάμψη (περίπου 70MPa) ( Rizkalla και συν, 2004, Tinschert και συν, 2000) με αποτέλεσμα η εφαρμογή τους να περιορίζεται σε μεμονωμένες στεφάνες.

## **3) Χυτευόμενα θερμοσυμπιεζόμενα υαλοκεραμικά (hot-pressed ή heat-pressed glass ceramics )**

Στα χυτευόμενα θερμοσυμπιεζόμενα υαλοκεραμικά η κεραμική μάζα τήκεται σε θερμοκρασία  $\sim 1150^\circ\text{C}$  και πίεση 0,3-0,4 MPa (Denry, 1996) σε ένα πυροχωμάτινο εκμαγείο με την τεχνική των κέρινων προπλασμάτων. Η κρυσταλλική τους φάση αποτελείται από 35-45% λευκίτη ενώ στα κεραμικά διπυριτικού λιθίου από περίπου 65% κρυστάλλους διπυριτικού λιθίου. Η αυξημένη αντοχή των κεραμικών αυτών οφείλεται στις συμπιεστικές δυνάμεις που αναπτύσσονται κατά τη διαδικασία της ψύξης γύρω από τους κρυστάλλους, με αποτέλεσμα την εκτροπή και την αναστολή στη διάδοση των ρωγμών (Guazzato και Swain, 2003). Η ολοκλήρωση των αποκαταστάσεων με

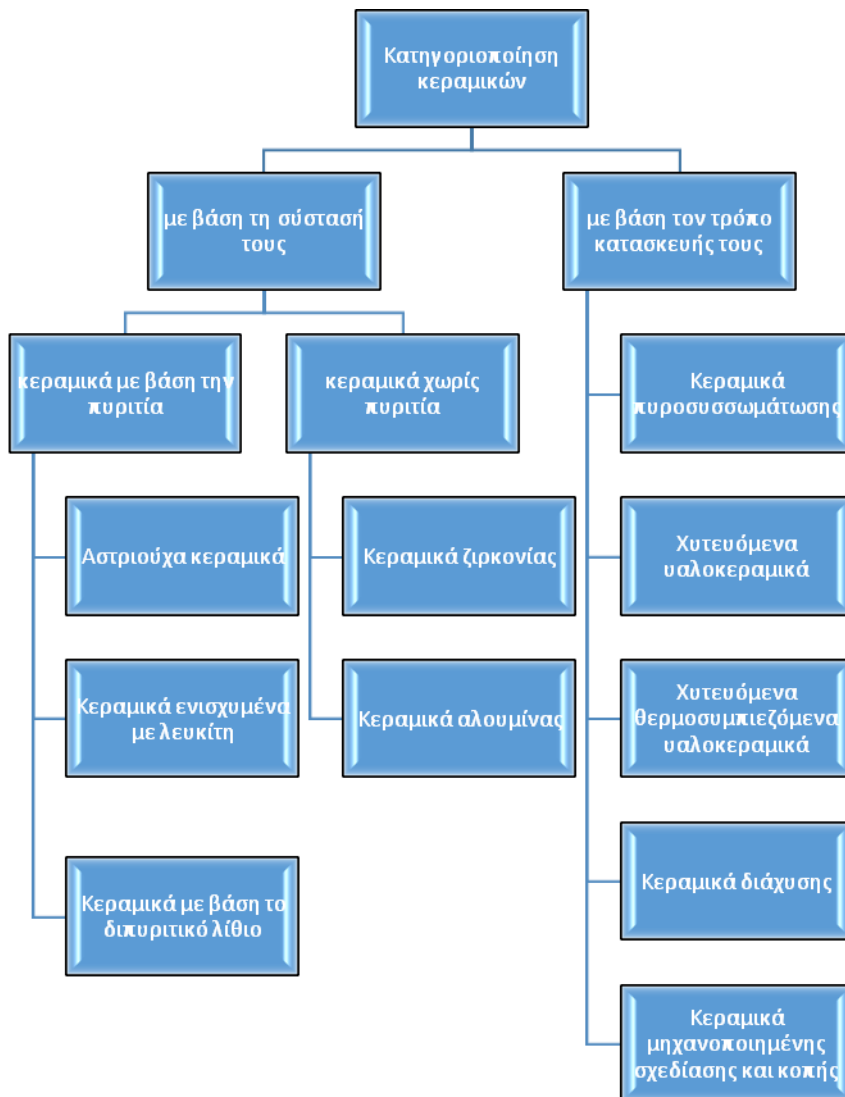
χυτευόμενα θερμοσυμπιεζόμενα υαλοκεραμικά επιτυγχάνεται είτε με εφαρμογή χρωστικών στην επιφάνεια (μακιγιάζ-shading) είτε με την εφαρμογή πορσελάνης επικάλυψης (vennening).

#### **4) Κεραμικά διάχυσης (glass infused infiltrated/slip-cast ceramics)**

Τα κεραμικά διάχυσης χρησιμοποιήθηκαν για οδοντιατρικές αποκαταστάσεις τη δεκαετία του 1990 (Denry, 2010). Η τεχνική “slipcast” περιλαμβάνει τη δημιουργία μιας πορώδους κρυσταλλικής δομής πάνω σε ένα κολόβωμα η οποία στη συνέχεια επενδύεται με ποσότητα υάλου που περιέχει λανθάνιο( La) δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο ένα σύνθετο υαλοκεραμικό αυξημένης αντοχής. Τρεις κρυσταλλικές μορφές είναι διαθέσιμες: η αλουμίνα ( $Al_2O_3$ ), το σπινέλλιο του μαγνησίου ( $MgAl_2O_4$ ) και ο συνδυασμός ζirkονίας-αλουμίνας (12 Ce-TZP- $Al_2O_3$ ). Τα κεραμικά διάχυσης χρησιμοποιούνται ως σκελετός και απαιτούν αισθητικό υλικό επικάλυψης. Παρουσιάζουν αντοχή στην κάμψη που φτάνει τα 600 MPa (Guazzato και συν.,2004)

#### **5) Κεραμικά μηχανοποιημένης σχεδίασης και κοπής (CAD/CAM ceramics)**

Τα μηχανοποιημένα κεραμικά (Computer Aided Design / Computer Aided Manufacturing-CAD / CAM) εισήχθησαν στην οδοντιατρική από τον Duret στις αρχές της δεκαετίας του '70 (Duret, 1973). Η τεχνολογία αρχικά αφορούσε την μηχανοποιημένη κοπή πλήρως πυροσυσσωματωμένων κεραμικών τεμαχίων (hard machining), ενώ πλέον έχει επεκταθεί σε μερικώς πυροσυσσωματωμένα κεραμικά (soft machining) που απαιτούν μετά θερμική κατεργασία για να παρέχουν επαρκή πυροσυσσωμάτωση. Τα κεραμικά CAD/CAM χρησιμοποιούνται για την κατασκευή όψεων, ενθέτων και επενθέτων, αλλά και ολοκεραμικών αποκαταστάσεων από διάφορες κατηγορίες κεραμικών όπως υαλοκεραμικά, κεραμικά αστρίου, κεραμικά αλουμίνας και κεραμικά ζirkονίας (Κοντονασάκη και συν., 2013).



Διάγραμμα A1:Ταξινόμηση κεραμικών συστημάτων (Ανασχεδίαση από:Κοντονασάκη και συν., 2013)

## Α2. ΚΕΡΑΜΙΚΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΔΙΠΥΡΙΤΙΚΟ ΛΙΘΙΟ

(ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΟΥ ΟΛΟΚΕΡΑΜΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΔΙΠΥΡΙΤΙΚΟΥ ΛΙΘΙΟΥ-Ε.ΜΑΧ)

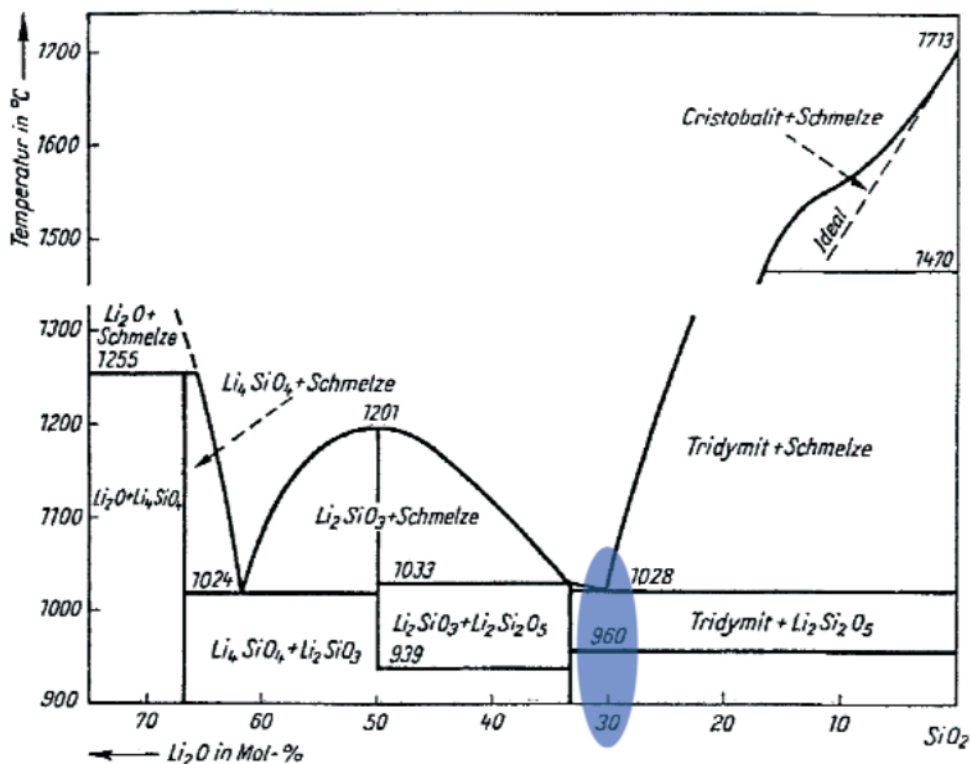
### 1) ΕΞΕΛΙΞΗ

Το ολοκεραμικό σύστημα IPS Empress (Ivoclar Vivadent) αποτελεί θερμοσυμπιεζόμενο υαλοκεραμικό ενισχυμένο με λευκίτη και παρουσιάστηκε στην οδοντιατρική στις αρχές τις δεκαετίας του 1990. Αποτελείται από κρυστάλλους  $\text{SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-K}_2\text{O}$  (Dong και συν., 1992) και προτάθηκε για ένθετα, επέθετα, όψεις και πρόσθιες στεφάνες με κύριο περιορισμό τη χρήση του σε γέφυρες λόγω της μειωμένης μηχανικής του αντοχής (Höland και συν., 2000). Εξαιτίας της ανάγκης χρήσης του υλικού σε οπίσθιες περιοχές (πχ προγόμφιοι) αλλά και των απαιτήσεων για αυξημένη μηχανική αντοχή, οδήγησαν το 1998 την Ivoclar στην παρουσίαση ενός νέου ολοκεραμικού συστήματος, του υαλοκεραμικού διπυριτικού λιθίου IPS Empress 2. Το IPS Empress 2 αποτελείται από κρυστάλλους  $\text{SiO}_2\text{-Li}_2\text{O-K}_2\text{O-ZnO-Al}_2\text{O}_3\text{-La}_2\text{O}_3\text{-P}_2\text{O}_5$  μήκους 5,2 μm και διαμέτρου 0,8 μm (Höland και συν., 2006, Höland και Beall, 2012). Εξαιτίας της αυξημένης κρυσταλλοποίησης του και της μορφολογίας των κρυστάλλων του (βελονοειδείς κρύσταλλοι) εμφανίζει καλύτερες μηχανικές ιδιότητες σε σύγκριση με το IPS Empress (Höland και συν., 2000). Οι ενδείξεις του κατασκευαστή αφορούν όψεις, ένθετα, επέθετα, στεφάνες και γέφυρες τριών τεμαχίων στην πρόσθια περιοχή (Solá-Ruiz και συν., 2013, Toksavul και Toman, 2007). Τα κλινικά δεδομένα για το IPS Empress 2 παρουσιάζουν ποσοστά επιβίωσης 100% για μονήρεις στεφάνες και 70% για γέφυρες ύστερα από κλινική παρακολούθηση 5 και 10 ετών αντίστοιχα (Marquardt και Strub, 2006, Solá-Ruiz και συν., 2013). Προκειμένου να εξασφαλιστεί βελτιωμένη μηχανική αντοχή και αισθητική, το 2005 αναπτύχθηκε από την Ivoclar ένα νέο κεραμικό σύστημα το IPS e.max. Το υλικό παρουσιάζει βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες που οφείλονται σε μια τροποποιημένη διαδικασία όπτησης (συμπιεστική

χύτευση) με αποτέλεσμα η μηχανική του αντοχή να φτάνει τα 400 MPa (Dikicier και συν 2017, Kang και συν., 2013 ) και η αντίσταση στη θραύση τα 3.0 MPa.m<sup>1/2</sup> , τιμές που είναι 10% υψηλότερες από τις αντίστοιχες του IPS Empress 2. Παρουσιάζεται είτε στη μονολιθική του μορφή για κατασκευή αποκαταστάσεων πλήρους ανατομίας είτε ως υλικό σκελετού με την ανάγκη αισθητικής επικάλυψης (IPSe.max CAD, IPS e.max Press) και οι κλινικές του ενδείξεις περιλαμβάνουν τόσο πρόσθιες όσο και οπίσθιες αποκαταστάσεις (Etman και Woolford, 2010, Eschbach και συν., 2009).

## 2) ΤΡΟΠΟΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ

Το υαλοκεραμικό σύστημα διπυριτικού λιθίου (IPS e.max) στην τυπική του σύσταση αποτελείται από χαλαζία (SiO<sub>2</sub>), οξείδιο του λιθίου (Li<sub>2</sub>O), οξείδιο του φωσφόρου (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), αλουμίνα (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), οξείδιο του καλίου (K<sub>2</sub>O) και άλλα οξείδια. Για την κατασκευή τους συστήματος χρησιμοποιείται η διαδικασία συμπιεστικής χύτευσης (τεχνολογία υάλου) κατά την οποία τα παραπάνω συστατικά αναμειγνύονται και τήκονται μέχρι την επίτευξη ενός συγκεκριμένου ιξώδους. Με το υαλικό αυτό τήγμα πληρώνονται καλούπια (ingots ή blocks) για την επίτευξη του επιθυμητού σχήματος ενώ στην συνέχεια το υλικό αφήνεται να κρυσώσει μέχρι μια ορισμένη θερμοκρασία για να αποφευχθούν οι ατέλειες στη μάζα του υλικού. Τέλος, ακολουθεί η δημιουργία κρυσταλλικού πλέγματος. Ανάλογα με το ποσοστό κρυστάλλωσης δημιουργούνται τρεις διαφορετικές δομές: Ορθοπυριτικό λίθιο (Lithiumorthosilicate), ολικά πυροσυσσωματωμένο διπυριτικό λίθιο (Lithiumdisilicate- e.max Press) και μετασταθείς κρύσταλλοι πυριτικού λιθίου (Lithium metasilicate-e.max CAD) (Bürke, 2006) (Διάγραμμα A2).



Διάγραμμα A2: Διάγραμμα φάσεων  $\text{Li}_2\text{O} - \text{SiO}_2$  (Bürke, 2006)

### 3) ΔΟΜΗ

#### Χυτευόμενο θερμοσυμπιεζόμενο κεραμικό διπυριτικού λιθίου (e.max Press)

Το χυτευόμενο θερμοσυμπιεζόμενο κεραμικό διπυριτικού λιθίου (e.max Press) αποτελεί ένα υαλοκεραμικό σύστημα διπυριτικού λιθίου με τη μορφή ράβδων (ingots) (Εικόνα Α2α) για τη χρήση του με τη θερμοσυμπιεζόμενη τεχνική (heat pressed) κατά την οποία το κέρινο πρόπλασμα της αποκατάστασης χυτεύεται (lost-wax technique). Αποτελείται από κρυστάλλους διπυριτικού λιθίου βελονοειδούς σχήματος (needle-like) σε ποσοστό 70% μέσα στην υαλώδη μάζα (Εικόνα Α2β). Το μέγεθος των κρυστάλλων υπολογίζεται στα 3-6 $\mu\text{m}$ . Η τυπική του σύσταση φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας Α2α):

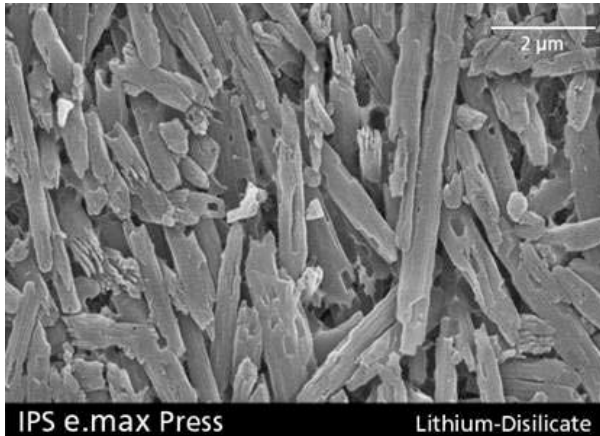


| ΟΞΕΙΔΙΑ                       | (in wt %)   |
|-------------------------------|-------------|
| SiO <sub>2</sub>              | 57.0 – 80.0 |
| Li <sub>2</sub> O             | 11.0 – 19.0 |
| K <sub>2</sub> O              | 0.0 – 13.0  |
| P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | 0.0 – 11.0  |
| ZrO <sub>2</sub>              | 0.0 – 8.0   |
| ZnO                           | 0.0 – 8.0   |
| +άλλα οξειδία                 | 0.0 – 10.0  |
| + χρωστικά οξειδία            | 0.0 – 8.0   |

Πίνακας Α2α:Σύσταση χυτευόμενο θερμοσυμπιεζόμενο κεραμικό διπυριτικού λιθίου (IPS e.max Press, Scientific documentation)



Εικόνα Α2α: Ingots χυτευόμενου θερμοσυμπιεζόμενου κεραμικού διπυριτικού λιθίου (IPS e.max Press, Scientific documentation)



Εικόνα Α2β:Κρύσταλλοι χυτευόμενου θερμοσυμπιεζόμενου κεραμικού διπυριτικού λιθίου (IPS e.max Press, Scientific documentation)

### **Κεραμικό διπυριτικού λιθίου μηχανοποιημένης κοπής(e.max CAD)**

Το κεραμικό διπυριτικού λιθίου μηχανοποιημένης κοπής (e.max CAD) αποτελεί και αυτό υαλοκεραμικό σύστημα διπυριτικού λιθίου με τη μορφή τεμαχίων (blocks)(Εικόνα Α2γ) για την χρήση του με την τεχνική της μηχανοποιημένης κοπής CAD/CAM. Τα μπλοκ κεραμικού διπυριτικού λιθίου μηχανοποιημένης κοπής βρίσκονται στη φάση της μερικής πυροσυσσωμάτωσης (κρυστάλλωσης) και αποτελούνται από μετασταθείς κρυστάλλους πυριτικού λιθίου που είναι υπεύθυνοι για τις ιδιότητες του υλικού και την ικανότητα του να κοπεί και να διαμορφωθεί με την τεχνολογία CAD/CAM. Η δομή του κεραμικού διπυριτικού λιθίου μηχανοποιημένης κοπής στη φάση της μερικής πυροσυσσωμάτωσης αποτελείται από 40% μετασταθείς κρυστάλλους πυριτικού λιθίου μέσα στην υαλώδη φάση. Το σχήμα τους είναι αποπλατυσμένο ενώ το μέγεθος τους κυμαίνεται από 0,2- 1 μm (Εικόνα Α2δ 1). Για την κατασκευή προσθετικών αποκαταστάσεων γίνεται κοπή των τεμαχίων και η όπτηση της αποκατάστασης ,σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της κρυστάλλωσης με την δημιουργία κρυστάλλων διπυριτικού λιθίου και να αποκτήσει το υλικό τις επιθυμητές μηχανικές του ιδιότητες. Μετά την όπτηση,

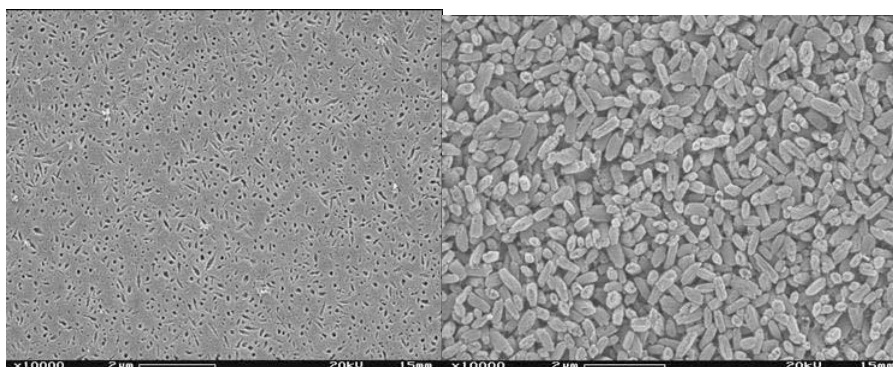
στην ολικά πυροσυσσωματωμένη φάση αποτελείται από 70% κρυστάλλους διπυρριτικού λιθίου ( $\text{Li}_2\text{Si}_2\text{O}_5$ ) μέσα στην υαλώδη φάση (Εικόνα Α2δ 2). Η τυπική του σύσταση φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας Α2β):

| ΟΞΕΙΔΙΑ                | (in wt %)   |
|------------------------|-------------|
| $\text{SiO}_2$         | 57.0 – 80.0 |
| $\text{Li}_2\text{O}$  | 11.0 – 19.0 |
| $\text{K}_2\text{O}$   | 0.0 – 13.0  |
| $\text{P}_2\text{O}_5$ | 0.0 – 11.0  |
| $\text{ZrO}_2$         | 0.0 – 8.0   |
| $\text{ZnO}$           | 0.0 – 8.0   |
| +άλλαχρωστικά οξειδία  | 0.0 – 12.0  |

Πίνακας Α2β:Σύσταση κεραμικού διπυρριτικού λιθίου μηχανοποιημένης κοπής (IPS e.max CAD, Scientific documentation)



Εικόνα Α2γ:τεμάχιο μερικώς πυροσυσσωματωμένου κεραμικού διπυρριτικού λιθίου μηχανοποιημένης κοπής (IPS e.max CAD, Scientific documentation)



Εικόνα Α2δ:1) Μερικώς πυροσυσσωματωμένο κεραμικό διπυριτικού λιθίου μηχανοποιημένης κοπής 2) Ολικά πυροσυσσωματωμένο κεραμικό διπυριτικού λιθίου μηχανοποιημένης κοπής (IPS e.max CAD, Scientific documentation)

#### 4) ΦΥΣΙΚΟΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι φυσικομηχανικές ιδιότητες του κεραμικού διπυριτικού λιθίου συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας Α2γ).

| <b>Ιδιότητα</b>                              | Ολικά<br>πυροσυσσωματωμένο<br>κεραμικό διπυριτικού<br>λιθίου μηχανοποιημένης<br>κοπής (IPS e.max CAD) | Χυτευόμενο<br>θερμοσυμπιεζόμενο<br>κεραμικό διπυριτικού<br>λιθίου (IPS e.max Press) |
|--|---|---|
| Αντοχή στην κάμψη<br>(biaxial)               | 360±60 MPa  | 400±40 MPa  |
| Χημική διαλυτότητα                           | 40±10 μg/cm <sup>2</sup>  | 40±10 μg/cm <sup>2</sup>  |
| Συντελεστής θερμικής<br>διαστολής(100-400°C) | 10.15±0.4x10 <sup>-6</sup> Κ <sup>-1</sup>  | 10.15±0.4x10 <sup>-6</sup> Κ <sup>-1</sup>  |
| Συντελεστής θερμικής<br>διαστολής(100-500°C) | 10.45±0.4x10 <sup>-6</sup> Κ <sup>-1</sup>  | 10.55±0.35x10 <sup>-6</sup> Κ <sup>-1</sup>   |
| Αντίσταση στη<br>θραύση                      | 2.0 – 2.5 MPa.m <sup>½</sup>  | 2.5 – 3.0 MPa.m <sup>½</sup>  |
| Σκληρότητα(Vickers)                          | 5800 ± 100 MPa  | 5800 ± 100 MPa  |
| Μέτρο ελαστικότητας                          | 95 ± 5 GPa  | 95 ± 5 GPa  |

|           |                              |                              |
|-----------|------------------------------|------------------------------|
| Πυκνότητα | $2.5 \pm 0.1 \text{ g/cm}^3$ | $2.5 \pm 0.1 \text{ g/cm}^3$ |
|-----------|------------------------------|------------------------------|

Πίνακας Α2γ:Φυσικομηχανικές ιδιότητες σύμφωνα με την κατασκευάστρια εταιρεία Ivoclar Vivadent

Παρατηρώντας τον πίνακα, βλέπουμε πως τόσο χυτευόμενο θερμοσυμπιεζόμενο κεραμικό διπυριτικού λιθίου όσο και το ολικά πυροσυσσωματωμένο κεραμικό διπυριτικού λιθίου μηχανοποιημένης κοπής παρουσιάζουν συγκρίσιμες φυσικομηχανικές ιδιότητες(Χημική διαλυτότητα,Συντελεστής θερμικής διαστολής,Σκληρότητα,Μέτρο ελαστικότητας,Πυκνότητα) γεγονός που δικαιολογείται από το παρόμοιο ποσοστό και μέγεθος κρυστάλλων διπυριτικού λιθίου που περιέχουν. Το χυτευόμενο θερμοσυμπιεζόμενο κεραμικό διπυριτικού λιθίου ωστόσο παρουσιάζει μεγαλύτερη αντοχή στην κάμψη ( $400 \pm 40 \text{ Mpa}$  vs  $360 \pm 60 \text{ Mpa}$ ) (Sorensen και συν., 2000, Albakry και συν., 2003) και αντίσταση στη θραύση ( $2.5 - 3.0 \text{ MPam}^{1/2}$  vs  $2.0 - 2.5 \text{ MPam}^{1/2}$ ) σε σχέση με το ολικά πυροσυσσωματωμένο κεραμικό διπυριτικού λιθίου μηχανοποιημένης κοπής (Anusavice και συν., 2001, Albakry και συν., 2003, Tysowsky, 2009). Η παραπάνω διαφορά αποδίδεται στη διαφορετική κρυσταλλική δομή του κάθε υλικού (μέγεθος, σχήμα, και προσανατολισμός των κρυστάλλων διπυριτικού λιθίου) ( Albakry και συν., 2003, Etman και Woolford, 2010) .

## 5) ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ

Το κεραμικό του διπυριτικού λιθίου αποτελεί ένα υλικό υψηλής αισθητικής και σκληρότητας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλες τις περιοχές του στόματος όταν πληρούνται συγκεκριμένες προϋποθέσεις. Η δυνατότητα κατασκευής μονολιθικών αποκαταστάσεων και η αποφυγή συνδυασμού δύο μη όμοιων υλικών ξεπερνά το κύριο μειονέκτημα των υπόλοιπων ολοκεραμικών συστημάτων που είναι η θραύση του αισθητικού υλικού επικάλυψης (chipping) (Lin και συν., 2012). Επίσης, σε περιπτώσεις που απαιτείται ελάχιστη οδοντική

αποκοπή, κατασκευάζονται αποκαταστάσεις πάχους 0,3 χιλ διατηρώντας ταυτόχρονα τη μηχανική αντοχή των 400 MPa ενώ σε περιπτώσεις που ήδη υπάρχει ο απαιτούμενος χώρος, δεν απαιτείται οδοντική Παρασκευή (Tysowsky, 2009). Κύριες ενδείξεις για τη χρήση του χυτευόμενου θερμοσυμπιεζόμενου κεραμικού διπυριτικού λιθίου αποτελούν τα ένθετα, επένθετα, όψεις, πρόσθιες και οπίσθιες στεφάνες, στεφάνες μερικής επικάλυψης, πρόσθιες γέφυρες τριών τεμαχίων, γέφυρες τριών τεμαχίων μέχρι την περιοχή του δεύτερου προγομφίου, πρωτεύουσες τηλεσκοπικές στεφάνες και επιεμφυτευματικές αποκαταστάσεις (Εικόνα Α2ε) (Gehrt και συν., 2013, Reich και συν., 2014, Tysowsky, 2009). Το κεραμικό διπυριτικού λιθίου μηχανοποιημένης κοπής ενδείκνυται για ένθετα, επένθετα, όψεις, πρόσθιες και οπίσθιες στεφάνες και στεφάνες μερικής επικάλυψης, πρωτεύουσες τηλεσκοπικές στεφάνες και επιεμφυτευματικές αποκαταστάσεις (Guess και συν., 2013, Reich και συν., 2014, Tysowsky, 2009). Για οπίσθιες στεφάνες ολικής το κεραμικό διπυριτικού λιθίου μηχανοποιημένης κοπής παρέχει μηχανική αντοχή 360 MPa στην αποκατάσταση (Tysowsky, 2009).



Εικόνα Α2ε: Αποκαταστάσεις διπυριτικού λιθίου

## 6) ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΕΩΝ ΔΙΠΥΡΙΤΙΚΟΥ ΛΙΘΙΟΥ

Αν και στη βιβλιογραφία υπάρχει μεγάλος αριθμός κλινικών στοιχείων που αφορά την επιβίωση αποκαταστάσεων διπυριτικού λιθίου (IPS Empress, IPS Empress 2), ο αριθμός των κλινικών μελετών που αφορούν την επιβίωση

αποκαταστάσεων κατασκευασμένων από κεραμικά διπυριτικού λιθίου (IPS emax) είναι σχετικά μικρός με έτη παρακολούθησης που δεν ξεπερνούν τα 5 με 10 έτη (Gehrt και συν., 2013, Wolfart και συν., 2009, Kern και συν., 2012). Στην κλινική μελέτη των Gehrt και συν. (2013) εξετάστηκε η επιβίωση πρόσθιων και οπίσθιων στεφανών κατασκευασμένων από χυτεύσιμο θερμοσυμπιεζόμενο κεραμικό διπυριτικού λιθίου με ποσοστά επιβίωσης που αγγίζουν το 97,4% ύστερα από 5 χρόνια κλινικής παρακολούθησης και 94,8% μετά από 8 χρόνια. Ενώ οι Etman και συν.(2010) βρήκαν ποσοστό επιβίωσης 96,6% ύστερα από 3 χρόνια κλινικής παρακολούθησης για οπίσθιες μονολιθικές στεφάνες. Σε αντίστοιχες κλινικές μελέτες όπου αξιολογήθηκαν στεφάνες από κεραμικό διπυριτικού λιθίου μηχανοποιημένης κοπής τα ποσοστά επιβίωσης είναι εξίσου υψηλά. Συγκεκριμένα, οι Fasbinder και συν. (2010) και οι Reich και συν. (2013) αξιολόγησαν την επιβίωση οπίσθιων στεφανών με έτη παρακολούθησης 3 και 4 αντίστοιχα. Στην πρώτη κλινική μελέτη δεν παρατηρήθηκε καμία αποτυχία ενώ στην δεύτερη παρατηρήθηκε μία θραύση καταλήγοντας σε ποσοστό επιβίωσης 96,3% ύστερα από 4 χρόνια. Παράλληλα, υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα για την επιβίωση γεφυρών τριών τεμαχίων που πάλι δεν ξεπερνούν τα 10 έτη κλινικής παρακολούθησης. Το χυτεύσιμο θερμοσυμπιεζόμενο κεραμικό διπυριτικού λιθίου χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη των Kern και συν. (2012) για την κατασκευή μονολιθικών γεφυρών τριών τεμαχίων σε πρόσθιες και οπίσθιες περιοχές. Το ποσοστό επιβίωσης των αποκαταστάσεων έφτασε το 100% μετά από 5 χρόνια κλινικής παρακολούθησης και 87,9% στα 10 χρόνια. Την κλινική επιβίωση των μονολιθικών γεφυρών τριών τεμαχίων σε πρόσθιες και οπίσθιες περιοχές αξιολόγησαν και οι Wolfart και συν. (2009) με ποσοστό επιβίωσης 93% στα 8 χρόνια. Οι Reich και συν. (2014) μελέτησαν επίσης την κλινική επιβίωση των μονολιθικών γεφυρών τριών τεμαχίων σε πρόσθιες και οπίσθιες περιοχές κατασκευασμένες όμως κεραμικό διπυριτικού λιθίου μηχανοποιημένης κοπής. Το ποσοστό επιβίωσης έφτασε και εδώ το 93% ύστερα όμως από παρακολούθηση 46 μηνών.

Το πρωτόκολλο παρασκευής των δοντιών σύμφωνα με τον κατασκευαστή για αποκαταστάσεις χυτευόμενου θερμοσυμπιεζόμενου υαλοκεραμικού πρέπει να είναι μασητικά 1,5 χιλ για τις αύλακες, 2 χιλ για τα φύματα, αξονική αποκοπή 1,5 χιλ και τελείωμα με βάθρο τοξοειδές ή ορθής γωνίας εύρους τουλάχιστον 1 χιλ. Ενώ σε περιπτώσεις γεφυρών πρέπει να τηρούνται οι διαστάσεις των συνδέσμων: 4x3 χιλ στην πρόσθια περιοχή, 4x4 χιλ στην περιοχή των προγομφίων και 4x5 χιλ στην περιοχή των γομφίων. Κύρια επιπλοκή που οδηγεί σε αποτυχία των ολοκεραμικών αποκαταστάσεων αποτελεί η θραύση της αποκατάστασης των μονήρων στεφανών αλλά και τα κατάγματα των γεφυρών στην περιοχή των συνδέσμων. Τα μειωμένα ποσοστά αυτή της επιπλοκής σε σύγκριση με τα άλλα ολοκεραμικά συστήματα αποδίδονται στη κρυσταλλική δομή του και κυρίως στο σχήμα των κρυστάλλων(βελονοειδούς σχήματος) που δρα ανασταλτικά στην εξέλιξη μιας υπάρχουσας ρωγμής. Στο περιορισμό της επιπλοκής αυτής συμβάλλει σημαντικά η τήρηση του πρωτοκόλλου παρασκευής των δοντιών σύμφωνα με τον κατασκευαστή με σκοπό την δημιουργία αποκαταστάσεων επαρκούς πάχους (Gehrt και συν., 2013, Reich και Schierz, 2013).

## 7)ΒΙΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ

Ο Wataha (2001) ορίζει ένα υλικό ως συμβατό όταν αλληλεπιδρά με τους ιστούς που έρχεται σε επαφή δίνοντας μια βιολογική απάντηση χωρίς την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών. Ο ορισμός αυτός δεν περιορίζεται στην μη εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών αλλά στην ύπαρξη ευεργετικής βιολογικής απάντησης από τον ξενιστή. Η βιολογική αυτή απάντηση εξαρτάται από τον ξενιστή, το υλικό αλλά και τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση (Wataha 2001). Για να θεωρηθεί λοιπόν ένα υλικό 'αδρανές' πρέπει να μην υφίσταται η αλληλεπίδραση μεταξύ υλικού και ξενιστή, γεγονός πρακτικά αδύνατο μέσα στο ανθρώπινο σώμα (Lemons,1990). Ένας πιο σύγχρονος ορισμός, ορίζει τη βιοσυμβατότητα ως την ικανότητα ενός υλικού να κινητοποιεί την



κατάλληλη βιολογική απάντηση του ξενιστή στην κατάλληλη κλινική εφαρμογή (Williams, 2014).

Η βιοσυμβατότητα των οδοντιατρικών κεραμικών έχει μελετηθεί και αποδειχθεί σε *in vitro* μελέτες που μελετούσαν κατά κύριο λόγο την κλασσική πορσελάνη αστρίου (Cobb και συν., 1988, Li και συν., 1993). Ωστόσο η βιοσυμβατότητα των νέων κεραμικών δεν έχει μελετηθεί στον ίδιο βαθμό με άλλα οδοντιατρικά υλικά όπως για παράδειγμα τα οδοντιατρικά κράματα και το αμάλαμα (Wataha, 2000, Wataha και συν., 1994). Οι ιδιότητες (Anusavice, 1992, 2003) που εξασφαλίζουν το χαρακτηρισμό ενός κεραμικού ως «βιοαδρανές» είναι οι εξής:

- Μη ύπαρξη τοξικών συστατικών
- Μικρή διαλυτότητα
- Σταθερότητα στο στοματικό περιβάλλον και ιδιαίτερα στις όξινες τροφές και τα διαλύματα
- Μικρή κατακράτηση μικροβιακής πλάκας
- Μη αλληλεπίδραση με άλλα οδοντιατρικά υλικά
- Χημική σταθερότητα με μη απελευθέρωση προϊόντων

### **Βιοσυμβατότητα του συστήματος διπυριτικού λιθίου**

#### Χημική σταθερότητα

Η χημική σταθερότητα αποτελεί απαραίτητη ιδιότητα για τα οδοντιατρικά κεραμικά καθώς μέσα στην στοματική κοιλότητα έρχονται σε επαφή με διαλύματα με μεγάλες διακυμάνσεις στο pH και στη θερμοκρασία (Anusavice, 1992). Σύμφωνα με τον Anusavice, τα οδοντιατρικά κεραμικά θεωρούνται από τα πιο σταθερά οδοντιατρικά υλικά ωστόσο η χημική τους σταθερότητα μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες όπως η σύνθεση και η μικροδομή του υλικού, τα χαρακτηριστικά του διαλύματος που έρχεται σε επαφή, ο χρόνος έκθεσης καθώς και η θερμοκρασία (White, 1992, Anusavice και Zhang,

1997 ). Οι Millending και συν. απέδειξαν σε in vitro μελέτη την απελευθέρωση ιόντων από υαλοκεραμικά χαρακτηρίζοντας τα μη χημικά αδρανή (Millending και συν., 2002). Η χημική διαλυτότητα του κεραμικού διπυριτικού λιθίου κυμαίνεται στα  $40 \pm 10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  αρκετά μακριά από το όριο  $<100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (σύμφωνα με το ISO 6872).

### Ραδιενέργεια

Η χρήση ραδιενεργών συστατικών στην οδοντιατρική πορσελάνη ξεκίνησε σύμφωνα με την Αμερικάνικη Οδοντιατρική Ομοσπονδία (American Dental Association-ADA) πριν το 1935 αλλά οι πρώτες ανησυχίες εκφράστηκαν στις αρχές τις δεκαετίες του 1970 (Moore και MacCulloch,1974). Πιο πρόσφατη αναφορά για τη ραδιενέργεια των οδοντιατρικών κεραμικών έγινε από τον Anusavice (1992) “The degradation of dental ceramics generally occurs because of mechanical forces or chemical attack. The possible physiological side-effects of ceramics are their tendency to abrade opposing dental structures, the emission of radiation from radioactive components,…”

Τα κύρια ραδιενεργά στοιχεία που χρησιμοποιήθηκαν στην οδοντιατρική πορσελάνη είναι το Ουρανιο ( $^{238}\text{U}$ ) και το Θόριο ( $^{232}\text{Th}$ ) για αισθητικούς κυρίως λόγους στην προσπάθεια η οδοντιατρική πορσελάνη να μιμηθεί το φυσικό δόντι. Σύμφωνα με το ISO 6872:2008 απαγορεύεται η χρήση ραδιενεργών στοιχείων στα οδοντιατρικά κεραμικά και ορίζεται το μέγιστο επιτρεπόμενο όριο ύπαρξης τους στα 1.000 Bq/g. Η ραδιενέργεια του κεραμικού διπυριτικού λιθίου που υπολογίστηκε με γ-φασματομετρία απέχει πολύ από το επιτρεπόμενο όριο και είναι  $< 0.030 \text{ Bq/g}$  τόσο για το Ουράνιο όσο και για το Θόριο.

### Ευαισθητοποίηση, ερεθισμός

Σε σύγκριση με άλλα οδοντιατρικά υλικά(π.χ. κράματα), τα κεραμικά παρουσιάζουν μικρή πιθανότητα, εάν όχι καθόλου, εμφάνισης

ευαισθητοποίησης ή ερεθισμού σε επαφή με το στοματικό βλεννογόνο (Ardlin και συν., 2005, Pistorius και Willershausen, 2002, Cavazos, 1968, Allison και Bhatia, 1958). Τη μικρή φλεγμονώδη αντίδραση και ερεθισμό εμφυτευμένων κεραμικών απέδειξαν και οι Mitchell (1959) και Podshadley & Harrison (1966) σε σύγκριση με άλλα υλικά όπως ο χρυσός και η ρητίνη. Συγκεκριμένα ο Mitchell στην πειραματική του μελέτη σε ποντίκια, εμφύτευσε IPS e.max CAD LT σε θυλάκους ποντικών χωρίς να παρατηρηθεί κανένας ερεθισμός στο βλεννογόνο.

#### Κυτταροτοξικότητα

Κυτταροτοξικότητα ενός υλικού ορίζεται η πρόκληση μια σειράς μοριακών γεγονότων που οδηγεί σε λειτουργική και δομική κυτταρική βλάβη (Williams, 2008). Η κυτταροτοξικότητα των οδοντιατρικών υλικών αξιολογείται όταν τα κύτταρα εκτίθενται είτε άμεσα στο υλικό είτε στα προϊόντα που απελευθερώνονται από αυτό. Οι δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας αποτελούν μόνο μια όψη της βιοσυμβατότητας ενός υλικού και ενώ αποτελούν εύκολο τρόπο ελέγχου των βιολογικών ιδιοτήτων του, η αξιοπιστία τους είναι περιορισμένη λόγω των διαφορετικών παραμέτρων και συνθηκών που επικρατούν στις διάφορες in vitro μελέτες.

Η κυτταροτοξικότητα του ολοκεραμικού συστήματος διπυριτικού λιθίου αξιολογήθηκε in vitro με βάση το ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for in-vitro cytotoxicity (Dahl, 2004). Σύμφωνα με το τεστ που διεξήχθη από τον κατασκευαστή, δεν ανιχνεύτηκε καμία πιθανότητα κυτταροτοξικότητας για το κεραμικό διπυριτικού λιθίου. Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των ομάδων με τα κεραμικά ενώ η ζωτικότητα των κυττάρων κυμαίνονταν από 80%-100%. Μια επιπλέον δοκιμασία διάχυσης άγαρ πραγματοποιήθηκε για το υλικό e.max CAD LT A1 και ελέγχθηκε πως επηρεάζεται η ζωτικότητα ινοβλαστών ποντικίου.

Καμία πιθανή κυτταροτοξικότητα δεν εντοπίστηκε για το e.max CAD (Grall, 2010).

Παρά την πληθώρα των μελετών που ασχολούνται με την κυτταροτοξικότητα των οδοντιατρικών υλικών όπως για παράδειγμα οι ρητίνες και τα κράματα, λίγες είναι οι εργασίες που μελέτησαν την κυτταροτοξικότητα των κεραμικών και συγκεκριμένα του διπυριτικού λιθίου. Το 2003 οι Uo και συν. μελέτησαν την κυτταροτοξικότητα του IPS Empress 2 σε ανθρώπινους ουλικούς ινοβλάστες, αποδεικνύοντας την έλλειψη κυτταροτοξικότητας του υλικού. Τη βιοσυμβατότητα του κεραμικού διπυριτικού λιθίου απέδειξαν και οι Forster και συν. (2014) όταν μελέτησαν την πρόσφυση και τον πολλαπλασιασμό επιθηλιακών κυττάρων πάνω στο υλικό χαρακτηρίζοντας το βιολογικά ιδανικό για υποουλικές αποκαταστάσεις. Παράλληλα ωστόσο υπάρχουν και μελέτες που αποδεικνύουν την ύπαρξη κυτταροτοξικότητας του διπυριτικού λιθίου χαρακτηρίζοντάς το μη βιολογικά αδρανές. Συγκεκριμένα οι Brackett και συν.(2008) μελέτησαν την κυτταροτοξικότητα κεραμικών δειγμάτων σε άμεση επαφή με ινοβλάστες ποντικών. Για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία MTT που αποτελεί μία δοκιμασία ελέγχου της ζωτικότητας των κυττάρων με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας με φασματοφωτόμετρο, μετά από το μεταβολισμό άλατος του τετραζολίου στα μιτοχόνδρια. Με αυτό τον τρόπο απέδειξαν πως τα δείγματα διπυριτικού λιθίου μείωσαν τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα κατά 50-65%. Η μιτοχονδριακή δραστηριότητα αυξήθηκε παροδικά ύστερα από διαδικασία γήρανσης αλλά επανήλθε στα ίδια ή σε ελαφρώς πιο μειωμένα επίπεδα ύστερα από στίλβωση των δειγμάτων. Την ίδια δοκιμασία κυτταροτοξικότητας χρησιμοποίησαν οι Messer και συν. (2003) για να μελετήσουν την κυτταροτοξικότητα δειγμάτων κεραμικών σε άμεση επαφή με ινοβλάστες ποντικών. Σε συμφωνία ήταν τα αποτελέσματα τους για τα δείγματα διπυριτικού λιθίου τα οποία παρουσίασαν σημαντική μείωση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας η οποία επίσης αυξήθηκε ύστερα από

διαδικασία γήρανσης αλλά επανήλθε στα ίδια μειωμένα επίπεδα ύστερα από στίλβωση των δειγμάτων. Σε διπλωματική μελέτη που διεξήχθη στο Α.Π.Θ. και συγκεκριμένα στο Εργαστήριο της Ακίνητης Προσθετικής και Προσθετικής Εμφυτευματολογίας (Μπεζάτη, 2013) μελετήθηκε επίσης η κυτταροτοξική επίδραση του κεραμικού διπυριτικού λιθίου και συγκεκριμένα του κεραμικού διπυριτικού λιθίου μηχανοποιημένης κοπής. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπινους ουλικούς ινοβλάστες με προϊόντα έκπλυσης των δειγμάτων και όχι σε άμεση επαφή με τα κύτταρα. Για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας χρησιμοποιήθηκε επίσης η δοκιμασία ΜΤΤ ενώ παράλληλα πραγματοποιήθηκε ανάλυση των εκχυλισμάτων με φασματομετρία ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (Inductively Coupled Plasma mass spectrometry ICP-MS). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το κεραμικό διπυριτικού λιθίου, περιορίζει την ικανότητα πολλαπλασιασμού των ουλικών ινοβλαστών, ιδιαίτερα όταν υφίσταται γήρανση σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Επιπλέον εντοπίστηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις ιόντων λιθίου και ψευδαργύρου στα διάφορα χρονικά διαστήματα έκπλυσης των δειγμάτων, όπως προκύπτει από την ανάλυση των αντίστοιχων διαλυμάτων (ICP), αποδεικνύοντας πως το κεραμικό διπυριτικού λιθίου, δεν παρουσιάζει χημική σταθερότητα.

### Α3.ΛΕΙΖΕΡ

#### 1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η λέξη “LASER” αποτελεί ακρωνύμιο της φράσης Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, η οποία σημαίνει ενίσχυση του φωτός με εξαναγκασμένη εκπομπή ακτινοβολίας και περιγράφει περιληπτικά την αρχή λειτουργίας του λέιζερ (Mainman, 1960).

Οι συσκευές λέιζερ αποτελούνται από μία οπτική κοιλότητα η οποία περιέχει ένα ενεργό μέσο, όπου η παραγωγή ηλεκτρικού ρεύματος συντελεί στην

εκπομπή ακτινοβολίας. Αυτή η ακτινοβολία χαρακτηρίζεται ως πολωμένη, μονοχρωματική, συνεκτική και ευθύγραμμη, ιδιότητες που την κάνουν να διαφέρει από άλλες πηγές φωτός. Τα λέιζερ διακρίνονται ως προς την φυσική κατασκευή τους (αέρια, υγρά, στερεά, ημιαγωγών), τον τύπο του ενεργού μέσου (π.χ. He-Ne, Er: YAG) αλλά και το βαθμό επικινδυνότητας σε περιπτώσεις έκθεσης σε αυτά ( Class I-IV) (Walsh, 2003). Από ιατρικής πλευράς τα λέιζερ χωρίζονται σε λέιζερ υψηλής ενέργειας (High power, warm or hard lasers), μέσης (Lasers with Moderate Powers) και χαμηλής (low energy level laser or cold lasers) (Asnaashari και Safavi, 2013).

Τα λέιζερ υψηλής ενέργειας (>0,5 W) χρησιμοποιούνται κυρίως στη χειρουργική εξαιτίας της υψηλής θερμότητας που μπορούν να παράγουν (Asnaashari και Safavi, 2013). Τα λέιζερ μέσης ενέργειας παράγουν ακτινοβολία που κυμαίνεται μεταξύ 250-500mW ενώ η θεραπευτική τους επίδραση βασίζεται στην διέγερση των ιστών χωρίς την παραγωγή υψηλής θερμότητας. Η ισχύς των λέιζερ χαμηλής ενέργειας είναι μικρότερη από 250 mW (Asnaashari και Safavi, 2013). Το σημαντικότερο πλεονέκτημα των λέιζερ χαμηλής ενέργειας είναι η επαγωγή φωτοδυναμικών αντιδράσεων χωρίς την παραγωγή θερμότητας για αυτό άλλωστε ονομάζονται «κρύα λέιζερ». Χρησιμοποιούνται κλινικά σε θεραπευτικές μεθόδους μαλακών μορίων και επιλέγονται σε in vitro μελέτες με καλλιέργειες κυττάρων όπως επιλέχθηκε και στην παρούσα διπλωματική διατριβή (Wu και συν., 2012, Soleimani και συν., 2012, Esmaeelinejad και συν., 2014).

## 2) ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΛΕΙΖΕΡ

Το 1917 πρώτος ο Albert Einstein μίλησε για εκπομπή ακτινοβολίας από φωτόνια ίδιας ενέργειας. Το 1953, σχεδόν 40 χρόνια μετά την εργασία του Einstein, ο Townes και οι μαθητές του κατάφεραν να κατασκευάσουν την πρώτη συσκευή λέιζερ η οποία λειτουργούσε με μικροκύματα για αυτό και ονομάστηκε MASER (Microwave Amplification by Stimulated Emission of

Radiation). Το 1964, οι πρωτοπόροι στην κατασκευή του λέιζερ C.H.Townes στις Η.Π.Α και N.Basov και A.M.Prokhorov στην Σοβιετική Ένωση μοιράστηκαν το Νόμπελ Φυσικής. Ωστόσο η πρώτη λειτουργική συσκευή λέιζερ ορατής ακτινοβολίας ήρθε το 1960 από τον Theodore H.Maiman. Ο Maiman χρησιμοποίησε ένα κύλινδρο ρουμπινίου για την εξαναγκασμένη εκπομπή ορατής ακτινοβολίας με μήκος κύματος στα 694 nm (Ruby Laser). Ακολούθησαν η κατασκευή του πρώτου λέιζερ αερίου (He-Ne), το διοδικό λέιζερ (Ga-As), το λέιζερ ημιαγωγών και το λέιζερ CO<sub>2</sub>. (<https://en.wikipedia.org/wiki/Laser>)

Σταθμό ωστόσο στην εξέλιξη του λέιζερ φαίνεται να αποτέλεσε το Ruby Laser του Theodore H.Maiman καθώς από το 1960 και για την επόμενη δεκαετία εμφανίστηκαν πληθώρα δημοσιεύσεων σε θέματα ανάπτυξης συστημάτων λέιζερ στον διεθνή επιστημονικό τύπο (Πίνακας Α3α).

|      |  |
|------|--|
| 1960 | Theodore H.Maiman, λέιζερ ρουβινίου, ΗΠΑ                                     |
| 1962 | William B. Bridges, λέιζερ αργού, ΗΠΑ<br>Robert N. Hall, διοδικό λέιζερ GaAs |
| 1964 | KumarPatel, λέιζερ διοξειδίου του άνθρακα, ΗΠΑ                               |
| 1968 | Leon Goldman, Nd: YAG λέιζερ, ΗΠΑ  |
| 1969 | Horace Furumoto, λέιζερ χρωστικής με λάμπα παλμικού φλας, ΗΠΑ                |

Πίνακας Α3α:Εξέλιξη του λέιζερ τη δεκαετία 1960-1970 (Marini και συν, 2008)

### 3) ΑΡΧΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ ΛΕΙΖΕΡ

Υπάρχουν πολλά είδη λέιζερ και παρά το γεγονός ότι το καθένα έχει τα δικά του κατασκευαστικά χαρακτηριστικά και τεχνικές λεπτομέρειες, οι βασικές αρχές λειτουργίας είναι κοινές για όλα τα λέιζερ παρά τα διαφορετικά χαρακτηριστικά τους.

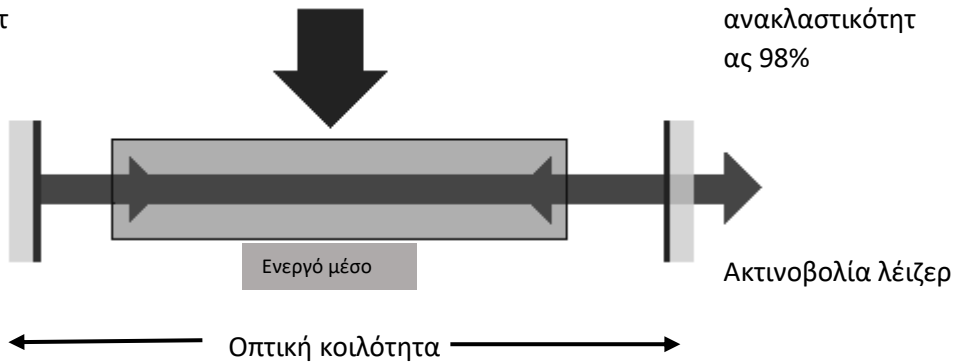
Τα λέιζερ αποτελούνται από την οπτική κοιλότητα, το ενεργό μέσο καθώς και μια πηγή άντλησης ενέργειας. Η οπτική κοιλότητα ορίζεται από ένα ζεύγος παράλληλων κατόπτρων υψηλής ανακλαστικότητας. Συγκεκριμένα το ένα κάτοπτρο ανακλαστικότητας 100% τοποθετείται στο ένα άκρο και το άλλο κάτοπτρο μερικής ανακλαστικότητας 98% στο άλλο. Μεταξύ τους παρεμβάλλεται το ενεργό μέσο το οποίο μπορεί να είναι στερεό, υγρό ή αέριο. Το ενεργό υλικό αντλεί ενέργεια από μια εξωτερική πηγή και τη μετατρέπει σε δέσμη φωτός παρέχοντας ταυτόχρονα τις ενεργειακές στάθμες για τη μετάπτωση των φωτονίων της δέσμης φωτός. Το φαινόμενο της συνεχούς διέγερσης των ατόμων του ενεργού μέσου με απορρόφηση ενέργειας από εξωτερική πηγή ονομάζεται άντληση. Τέλος, η πηγή άντλησης ενέργειας μπορεί να είναι ηλεκτρική ή φωτεινή όπως για παράδειγμα κάποια λυχνία ή κάποια άλλη πηγή λέιζερ (Εικόνα Α3α) (Σεραφετινίδης, 1980, <https://en.wikipedia.org/wiki/Laser>).



### Άντληση Ενέργειας

Κάτοπτρο 1  
ανακλαστικότητα  
ας 100%

Κάτοπτρο 2  
ανακλαστικότητα  
ας 98%

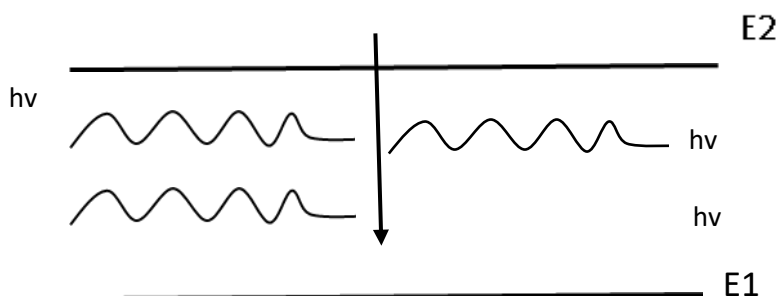


Εικόνα Α3α: Διάταξη συσκευής λέιζερ

Παρακολουθώντας την Εικόνα Α3α παρατηρούμε ότι η δέσμη ξεκινάει από το κάτοπτρο 1 διασχίζοντας όλο το ενεργό υλικό. Μέσα στο ενεργό υλικό η ακτινοβολία ενισχύεται διότι διοχετεύεται ενέργεια από τη διαδικασία άντλησης. Η ενισχυμένη ακτινοβολία εξέρχεται από το ενεργό μέσο και προσπίπτει στο κάτοπτρο 2 μερικής ανακλαστικότητας. Το μεγαλύτερο μέρος της ακτινοβολίας ανακλάται επιστρέφοντας στο ενεργό μέσο για να επαναληφθεί η διαδικασία ενώ το μέρος της ακτινοβολίας που διαπερνά το κάτοπτρο 2 αποτελεί τη χρήσιμη ακτινοβολία λέιζερ.

Τα άτομα του ενεργού μέσου απορροφούν φωτόνια μεταβαίνοντας από μια στάθμη χαμηλής ενέργειας  $E_1$  σε μια στάθμη υψηλότερης ενέργειας  $E_2$ . Το άτομο ωστόσο δεν παραμένει στην διεγερμένη κατάσταση για πολύ αλλά μεταπίπτει στην αρχική του κατάσταση  $E_1$  εκπέμποντας ένα φωτόνιο ενέργειας ίση με τη διαφορά των δύο ενεργειακών στοιβάδων (αυθόρμητη εκπομπή). Κατά την εξαναγκασμένη εκπομπή, ένα προσπίπτων φωτόνιο ενέργειας ίση με  $E_2 - E_1$  προκαλεί την αποδιέγερση του ατόμου από την  $E_2$  στην  $E_1$  παράγοντας ταυτόχρονα ένα ακόμα φωτόνιο ίσης ενέργειας. Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία

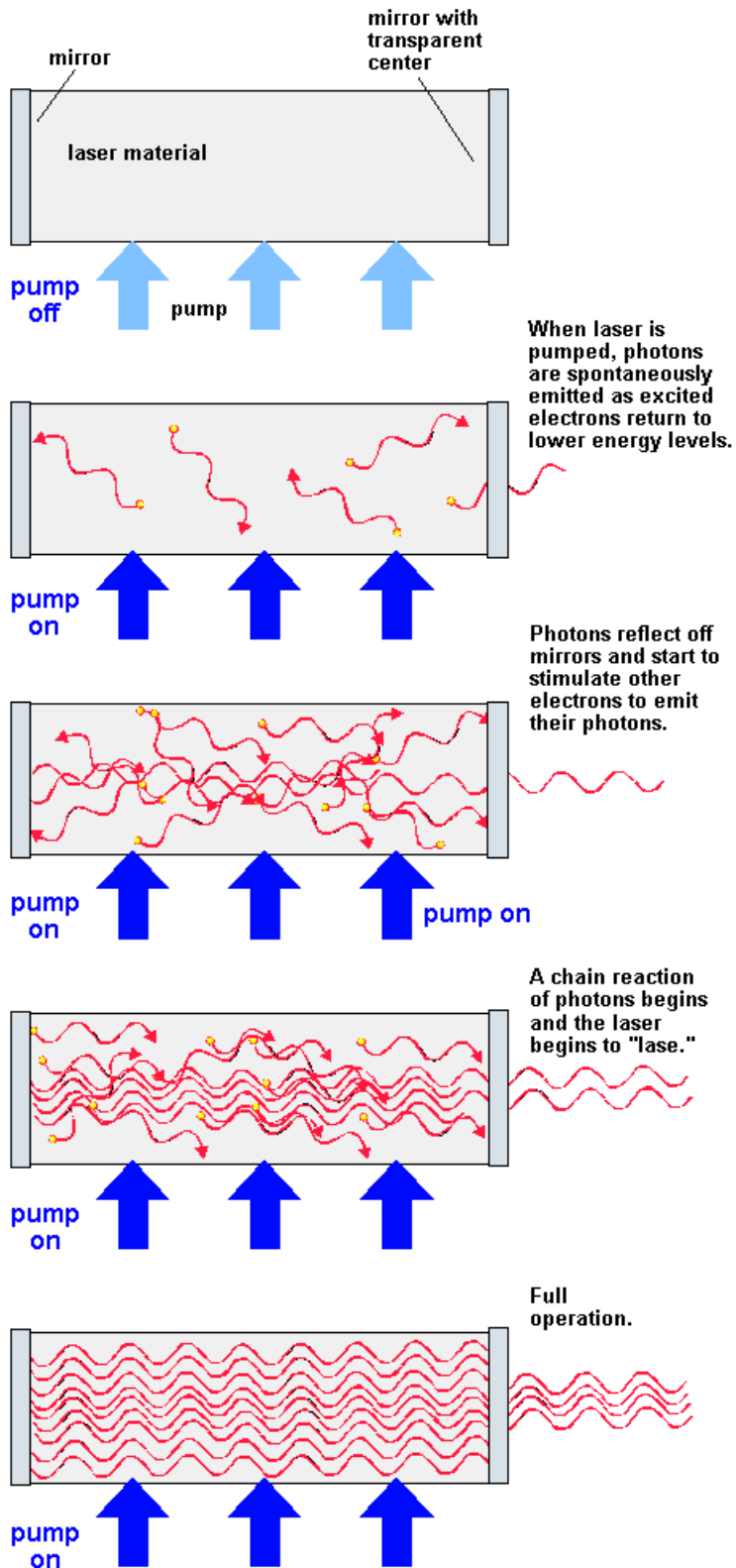
παρουσιάζει την ίδια φάση με την προσπίπτουσα, έχει την ίδια φορά διεύθυνσης καθώς και το ίδιο μήκος κύματος (Εικόνα Α3β). Τα δύο φωτόνια τώρα συγκρούονται με άλλα δύο άτομα, οπότε εκπέμπονται νέα φωτόνια κ.ο.κ.



Εικόνα Α3β: Εξαναγκασμένη εκπομπή ( παραγωγή λέιζερ)

Τα φωτόνια φτάνοντας στο κάτοπτρο 2 ανακλώνται αποδιεγείροντας στην διαδρομή τους και άλλα άτομα παράγοντας έτσι νέα φωτόνια κάνοντας τη δέσμη πιο ισχυρή. Φτάνοντας στο κάτοπτρο 1 ανακλώνται κ πάλι συνεχίζοντας την πορεία τους για το κάτοπτρο 2. Στο κάτοπτρο 2 μερικής ανακλαστικότητας ένα μέρος της ισχυρής πλέον δέσμης διαπερνά το κάτοπτρο και εξέρχεται ως ακτίνα λέιζερ ( Εικόνα Α3γ).

Για την διατήρηση των ατόμων του ενεργού μέσου του λέιζερ σε συνεχή διεγερμένη κατάσταση (E2) απαιτείται ενέργεια η οποία προσφέρεται από εξωτερική πηγή. Το φαινόμενο της συνεχούς αυτής διέγερσης με απορρόφηση εξωτερικής ενέργειας ονομάζεται άντληση.



Εικόνα Α3γ: Παραγωγή ακτίνας λέιζερ  
 ([http://common.ziffdavisinternet.com/encyclopedia\\_images/LASER.GIF](http://common.ziffdavisinternet.com/encyclopedia_images/LASER.GIF))

#### 4) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΛΕΙΖΕΡ

Η ακτινοβολία λέιζερ χαρακτηρίζεται από τέσσερις ιδιότητες που την κάνουν να διαφέρει δραστικά από ακτινοβολίες που εκπέμπουν συμβατικές πηγές φωτός και είναι η εξής: η μονοχρωματικότητα, η κατευθυντικότητα, η συμφωνία και η λαμπρότητα της ακτινοβολίας (Siegman, 1986).

##### Μονοχρωματικότητα (monochromaticity)

Το λέιζερ είναι μια αυστηρά μονοχρωματική πηγή φωτός. Το κοινό λευκό φως όταν προσπέσει σε ένα πρίσμα αναλύεται στα βασικά του χρώματα. Αν και μία πηγή φωτός δεν μπορεί να δώσει απόλυτα μονοχρωματικό φως, τα λέιζερ δίνουν την πλησιέστερη προσέγγιση προς το απόλυτο μονοχρωματικό φως.

Η ενέργεια ενός φωτονίου καθορίζει μέσω της σχέσης  $E = hc/\lambda$ , όπου  $c$  είναι η ταχύτητα του φωτός,  $h$  είναι η σταθερά του Planck και  $\lambda$  είναι το μήκος κύματος. Κατά την εκπομπή της ακτινοβολίας λέιζερ, εκπέμπονται φωτόνια ίδιας ενέργειας ( $E_2 - E_1$ ) με αποτέλεσμα και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας να παραμένει σταθερό (<http://www.worldoflasers.com/laserproperties.htm#>).

##### Κατευθυντικότητα (polarization)

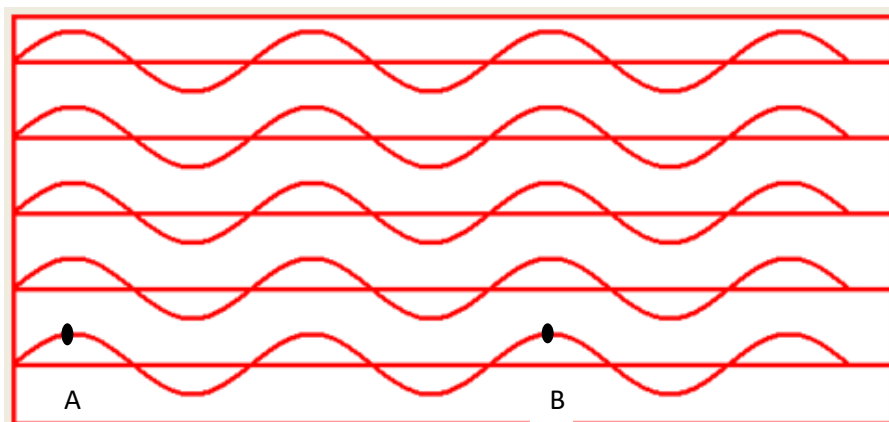
Μία από τις σημαντικές ιδιότητες του λέιζερ είναι υψηλή κατευθυντικότητα του. Τα κάτοπτρα που τοποθετούνται στα δύο άκρα της οπτικής κοιλότητας του λέιζερ επιτρέπουν στη δέσμη να ανακλάται διαπερνώντας το ενεργό μέσο πολλές φορές, προκειμένου να ενισχυθεί από την εξαναγκασμένη εκπομπή περισσότερων φωτονίων ίδιου μήκους κύματος. Οι πολλαπλές ανακλάσεις παράγουν μία καλά-ευθυγραμμισμένη δέσμη, επειδή μόνο τα φωτόνια που ταξιδεύουν παράλληλα με τα τοιχώματα της κοιλότητας μπορούν να ανακλώνται από τα δύο κάτοπτρα. Η απόκλιση από την τέλεια κατευθυντικότητα (παράλληλη δέσμη) οφείλεται στο φαινόμενο της περίθλασης.

Η κατευθυντικότητα της δέσμης χαρακτηρίζεται από το «άνοιγμα» της δέσμης δηλαδή από το διπλάσιο της γωνίας που σχηματίζει η εξωτερική ακτίνα της δέσμης με την κεντρική ακτίνα και υπολογίζεται σε mrad. Σε απόλυτα παράλληλες ακτινοβολίες η γωνία αυτή θεωρητικά παραμένει στο μηδέν.

Η ακτινοβολία λέιζερ είναι αυστηρά περιορισμένη σε μια λεπτή δέσμη εγκάρσιας διατομής σε αντίθεση με άλλες πηγές φωτός που εκπέμπουν ακτινοβολία προς διάφορες διευθύνσεις με ανώμαλη κατανομή ακτινοβολίας.

### Συμφωνία (coherence)

Όπως αναφέραμε και πιο πάνω, η ακτινοβολία λέιζερ είναι αποτέλεσμα του φαινομένου της εξαναγκασμένης εκπομπής. Ένα προσπίπτον φωτόνιο ενέργειας ίση με  $E_2 - E_1$  προκαλεί την αποδιέγερση του ατόμου από την  $E_2$  στην  $E_1$  παράγοντας ταυτόχρονα ένα ακόμα φωτόνιο ίσης ενέργειας. Τα δύο εκπεμπόμενα φωτόνια λέγεται ότι βρίσκονται σε φάση ή συμφωνία που σημαίνει ότι η κορυφή ή το κατώτατο σημείο του ηλεκτρομαγνητικού κύματος του ενός φωτονίου συμπίπτει με αυτά του άλλου φωτονίου. Διακρίνουμε δύο τύπους συμφωνίας: τη χρονική και τη χωρική συμφωνία. Η συσχέτιση ενός σημείου δύο κυμάτων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ή κατά μήκος του κύματος μια δεδομένη χρονική στιγμή ονομάζεται χρονική συμφωνία (Εικόνα Α3δ) ενώ η συσχέτιση διαφορετικών σημείων επάνω στο μέτωπο κύματος και κάθετα προς τη διεύθυνση διάδοσης της δέσμης ονομάζεται χωρική συμφωνία.



Εικόνα Α3δ: Η διαφορά φάσης μεταξύ των σημείων Α και Β στην ακτινοβολία λέιζερ είναι χρονικά σταθερή και ονομάζεται χρονική συμφωνία.

(<http://www.worldoflasers.com/laserproperties.htm#>)

### Λαμπρότητα (Brightness)

Ως λαμπρότητα μιας ακτινοβολίας ορίζουμε την ισχύ που εκπέμπεται ανά μονάδα επιφάνειας ανά μονάδα στερεάς γωνίας ( $\text{Watts/m}^2 \times \text{sterad}$ ). Μία ακτινοβολία λέιζερ έχει λαμπρότητα μεγαλύτερη από οποιαδήποτε άλλη πηγή φωτός εξαιτίας της υψηλής της κατευθυντικότητας. Για παράδειγμα ένα λέιζερ He-Ne 1mW έχει λαμπρότητα  $1,6 \times 10^9 \text{ Watts/m}^2 \times \text{sterad}$  μεγαλύτερη από αυτή του ηλίου ( $10^6 \text{ Watts/m}^2 \times \text{sterad}$ ).

(<http://www.worldoflasers.com/laserproperties.htm#>)

### 5) ΦΩΤΟΒΙΟΔΙΑΜΡΦΩΣΗ (PHOTOBIO-MODULATION-PBM) Ή ΛΕΙΖΕΡ ΧΑΜΗΛΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ (LOW LEVEL LASER IRRADIATION-LLLI)

Το 1965, μετά την ανάπτυξη του πρώτου λέιζερ από κρύσταλλο ρουμπινίου από τον Theodore H. Mainman, ο Edre Mester ξεκίνησε την έρευνα για το λέιζερ χαμηλής ενέργειας ως θεραπευτική μέθοδο. Ύστερα από την πρώτη παρατήρηση του για ταχύτερη επούλωση τραύματος του δέρματος μετά την εφαρμογή ακτινοβολίας λέιζερ πάνω του, παρατήρησε ότι ξυρίζοντας το τριχωτό του δέρματος ποντικών και εκθέτοντας το σε ακτινοβολίες λέιζερ  $1 \text{ j} / \text{cm}^2$  ανά ημέρα αυτό μεγάλωνε γρηγορότερα (Mester και συν., 1968).

Για να περιγραφεί η επίδραση της ακτινοβολίας λέιζερ σε βιολογικά φαινόμενα έχουν χρησιμοποιηθεί οι όροι βιοδιέγερση (biostimulation) ή φωτοβιοδιέγερση (photobiostimulation). Ένας πιο σύγχρονος όρος ευρύτερου φάσματος που συναντάμε στη πρόσφατη βιβλιογραφία και συχνά ταυτίζεται με το λέιζερ χαμηλής ενέργειας είναι η φωτοβιοδιαμόρφωση (photobiomodulation-PBM) (Anders και συν., 2015). Ο όρος χρησιμοποιείται για να περιγράψει την επίδραση της φωτοθεραπείας στις κυτταρικές λειτουργίες με λέιζερ, LEDs ή άλλες πηγές ακτινοβολίας που περιλαμβάνουν μήκη κύματος τόσο στην περιοχή του ορατού φάσματος (380-700nm) όσο και στην υπέρυθρη και κοντά στην υπέρυθρη περιοχή (700nm-1000nm) (Khan και Arany, 2015, Marques και

συν.,2016). Ο όρος photobiomodulation αποτελεί και τον πιο δόκιμο όρο για το λέιζερ χαμηλής ενέργειας καθώς περιλαμβάνει τόσο τις διεγερτικές όσο και τις ανασταλτικές επιδράσεις του λέιζερ χαμηλής ενέργειας στους ιστούς ανάλογα με τις παραμέτρους που θα χρησιμοποιηθούν (Anders και συν, 2015).

Το λέιζερ χαμηλής ενέργειας χαρακτηρίζεται από μια δοσοεξαρτώμενη συμπεριφορά υπακούοντας την αρχή των Arndt-Schulz σύμφωνα με την οποία μια χαμηλή δόση έχει ευεγερτικά αποτελέσματα, μια μεγαλύτερη ανασταλτικά και μία ακόμα πιο μεγάλη καταστροφικά (Khan και Arany, 2015, Huang και συν, 2009). Το φάσμα δράσης του LLLI αντιστοιχεί όπως αναφέρθηκε σε μήκη κύματος στην περιοχή του ορατού φάσματος αλλά και στην υπέρυθρη και κοντά στην υπέρυθρη περιοχή (400nm-1000μm) και αντιστοιχεί στο «οπτικό παράθυρο» του LLLI για βιολογικές αποκρίσεις λέιζερ χαμηλής ενέργειας. Ονομάζεται επίσης και «κρύο λέιζερ», λόγω της χαμηλής πυκνότητας ισχύος που παράγει η οποία είναι μη θερμική, σε σύγκριση με άλλους τύπους λέιζερ που θερμαίνουν τους ιστούς και προκαλούν καταστροφή τους( Khan και Arany, 2015, Hamblin και Demidova,2006). Ο χαρακτηρισμός του λέιζερ ως «χαμηλής ενέργειας» αναφέρεται κυρίως στην πυκνότητα ισχύος (power density) που κυμαίνεται συνήθως στα  $10^{-2}$ - $10^{-4}$  W/cm<sup>2</sup>, ανάλογα βέβαια με το μήκος κύματος και τον τύπο του ιστού για τον οποίο χρησιμοποιείται. Η πυκνότητα ισχύος αποτελεί την ισχύ ανά μονάδα επιφάνειας (W/cm<sup>2</sup>), ενώ η πυκνότητα ενέργειας (energy density) ή ροή (fluence) ή δόση (dose) του λέιζερ περιγράφεται καλύτερα ως η ποσότητα ενέργειας ανά μονάδα επιφάνειας και υπολογίζεται ως Joule ανά cm<sup>2</sup> (J / cm<sup>2</sup>) (Karu, 1988).Βιοδιεγερτικές τιμές ενέργειας ξεκινούν από 0,5 J / cm<sup>2</sup> ενώ έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι φτάνουν τα 15,8 J / cm<sup>2</sup> (Basso και συν.,2012, Gkogkos και συν., 2015, Mester και συν., 1985). Το μήκος κύματος και η πυκνότητα ενέργειας αποτελούν τις πιο κρίσιμες παραμέτρους για τη βιοδιέγερση με LLLI ακολουθούμενα από την πυκνότητα ισχύος,την ισχύ εξόδου, τη διάρκεια της ακτινοβολίας και τον τύπο της ακτινοβολίας (συνεχούς ή παλμικού κύματος) (Pandeshwar και συν., 2016,

Chung και συν., 2012). Ο τύπος της ακτινοβολίας αποτελεί επίσης σημαντική παράμετρο για την επίτευξη βιοδιέγερσης καθώς έχει βρεθεί πως διαφορετικά κλινικά αποτελέσματα δίνει ένα παλμικό από ένα συνεχές λέιζερ (Smith, 1991, Hamblin και Demidova, 2006, Hashmi και συν., 2010). Στη βιβλιογραφία παρατηρείται ανομοιογένεια ως προς τις παραπάνω παραμέτρους καθώς καμία μελέτη δεν προσπάθησε να εξετάσει την επίδραση της κάθε παραμέτρου χωριστά (Chung και συν., 2012). Οι πολλαπλοί διαφορετικοί συνδυασμοί που προτείνονται στα *in vitro* πειράματα καθιστούν αδύνατη την επικράτηση ενός συγκεκριμένου πρωτοκόλλου που θα περιλαμβάνει όλες τις επιμέρους παραμέτρους.

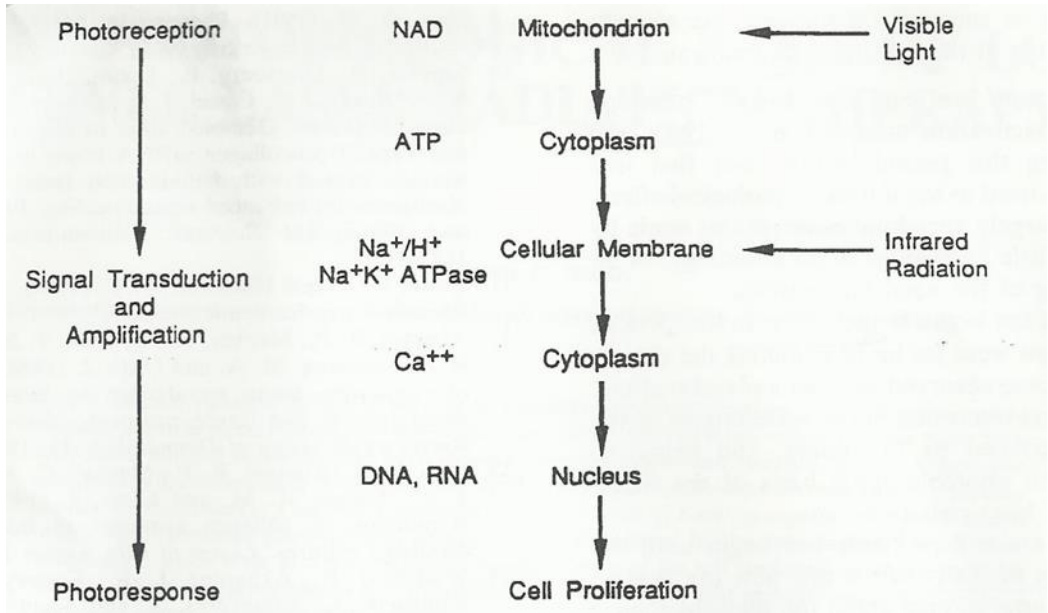
#### 6) ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΛΕΙΖΕΡ ΧΑΜΗΛΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ

Το φως αποτελείται από φωτόνια (πακέτα της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας) που απορροφώνται από μόρια των ιστών. Όταν ένα φωτόνιο απορροφάται, το μόριο διεγείρεται σε μια υψηλότερη κατάσταση ενέργειας (Sutherland, 2002). Σύμφωνα με τον πρώτο θερμοδυναμικό νόμο, η επιπλέον ενέργεια του διεγερμένου μορίου πρέπει να καταναλωθεί. Αυτό μπορεί να γίνει είτε με μετατροπή της ενέργειας διέγερσης σε θερμότητα, ή με την εκ νέου εκπομπή φωτονίου ή με την κατανάλωση της ενέργειας σε χημικές διεργασίες στο εσωτερικό του μορίου (Hamblin και Demidova, 2006).

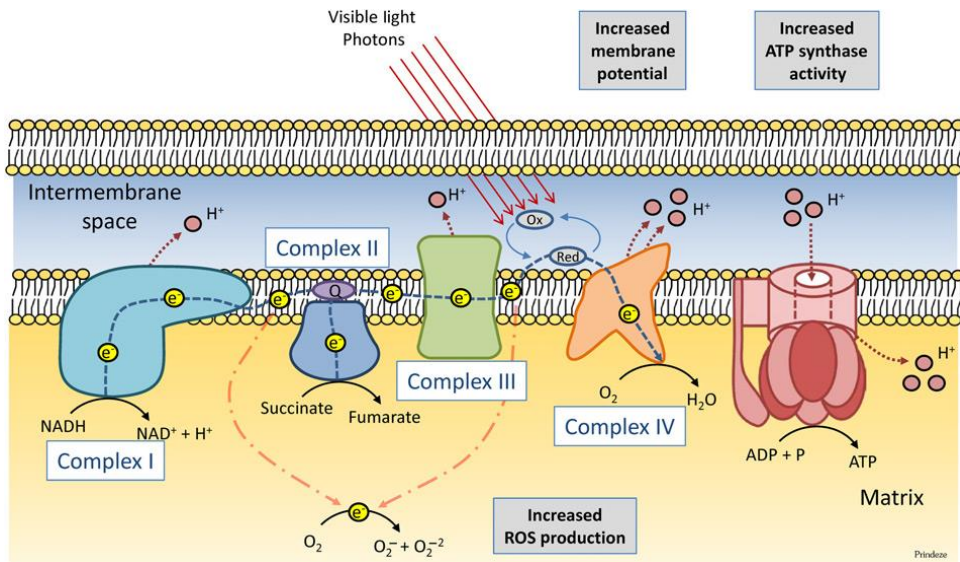
Διάφοροι μοριακοί μηχανισμοί δράσης του λέιζερ χαμηλής ενέργειας έχουν προταθεί με επικρατέστερο αυτόν της Karu. Η Karu (1988, 1989) πρότεινε το μοριακό μηχανισμό του λέιζερ χαμηλής ενέργειας βασιζόμενο στην απορρόφηση ακτινοβολίας ορατού φάσματος ή ακτινοβολίας κοντά στο υπέρυθρο φάσμα (Near Infrared Radiation-NIR) από κυτταρικούς φωτοϋποδοχείς που οδηγούν σε βιολογική απόκριση (Εικόνα Α3ε). Σύμφωνα με αυτό το μηχανισμό, η ακτινοβολία απορροφάται από συστατικά της αναπνευστικής αλυσού η οποία λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Αυτά τα συστατικά αποτελούνται από πρωτεΐνες της μεμβράνης του μιτοχονδρίου



όπως η NADH δεϋδρογονάση (Σύμπλεγμα I), Σουκινική δεϋδρογονάση (Σύμπλεγμα II), Κυτοχρωμική c αναγωγάση (Σύμπλεγμα III), Κυτοχρωμική c οξειδάση (Σύμπλεγμα IV), ATP συνθετάση (Σύμπλεγμα V), Ουβικινόνη και το Κυτόχρωμα C. Η ενεργοποίηση της αναπνευστικής αλυσού και η οξείδωση του NADH οδηγούν σε αλλαγές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των μιτοχονδρίων και του κυτταροπλάσματος του κυττάρου. Ιδιαίτερα, η ενεργοποίηση της αναπνευστικής αλυσίδας οδηγεί στην αύξηση των  $H^+$  στο διαμεμβρανικό χώρο. Τα ιόντα  $H^+$  έχουν τη δυνατότητα να ρέουν πίσω στα μιτοχόνδρια μέσω του συμπλέγματος της ATP συνθάσης, παράγοντας με αυτό τον τρόπο μόρια ATP (Εικόνα Α3στ). Από την άλλη πλευρά η αύξηση των  $H^+$  στο διαμεμβρανικό χώρο επηρεάζει τη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και ιδιαίτερα τις αντλίες  $Na^+-K^+$  και  $Ca^{+2}$ . Η ομοιόσταση των ιόντων αυτών μέσα στο κύτταρο διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο καθώς τα ιόντα αυτά αποτελούν ενδοκυτταρικούς αγγελιοφόρους που συμμετέχουν στις διάφορες κυτταρικές λειτουργίες και κυρίως στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.



Εικόνα A3ε: Μοντέλο Karu για το μοριακό μηχανισμό δράσης του λέιζερ χαμηλής ενέργειας (Karu, 1988)



Εικόνα A3στ: Μοριακός μηχανισμός δράσης λέιζερ χαμηλής ενέργειας. Ενεργοποίηση αναπνευστικής αλυσού (Prindeze και συν.,2012)

Από τις παραπάνω μεμβρανικές πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια, η κυτοχρωμική c οξειδάση (CCO) αποτελεί το πιο κρίσιμο φωτοϋποδοχέα για τις ακτινοβολίες κοντά στο υπέρυθρο φάσμα (NIR) σε κύτταρα θηλαστικών (Karu και Afanas'eva, 1995, Karu και Kolyakov, 2005). Αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι το καταγεγραμμένο φάσμα απορρόφησης για την κυτοχρωμική c οξειδάσης (σύμπλεγμα IV της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας) σε διάφορες καταστάσεις οξειδωσης είναι πολύ κοντά με το φάσμα δράσης για βιολογικές αντιδράσεις στο φως (Karu και Kolyakov, 2005). Η οξείδωση της κυτοχρωμικής c οξειδάσης οδηγεί σε αύξηση της μεταφοράς ηλεκτρονίων τα οποία στη συνέχεια μπορούν να προκαλέσουν αυξημένη παραγωγή ATP όπως εξηγήσαμε παραπάνω. Ο μοριακός αυτός μηχανισμός μπορεί να ανασταλλεί από το νιτρικό οξείδιο (NO) το οποίο καταλαμβάνει τη θέση σύνδεσης του οξυγόνου την κυτοχρωμική c οξειδάσης (Brown, 2001). Έχει προταθεί ότι το λέιζερ χαμηλής ενέργειας με φωτοδιάσπαση του NO από τις θέσεις πρόσδεσης του στη CCO μπορεί να αντιστρέψει την αναστολή της μιτοχονδριακής CCO από το NO και να οδηγήσει σε αύξηση του ρυθμού φωσφορυλίωσης της αναπνευστικής αλυσίδας και στην αυξημένη παραγωγή ATP, όπως αναφέρθηκε (Karu και συν.,2005). Με τη σειρά του το NO που αποδεσμεύεται έχει βρεθεί πως συμβάλει στις επουλωτικές διεργασίες προάγοντας την κυτταρική μετανάστευση, τη μακροφαγική δραστηριότητα, την αγγειοδιαστολή και την αγγειογένεση (Plass και συν., 2012, Mitchell και Mack,2013, Tsai και συν., 2014 ).

Επιπλέον η αύξηση των ηλεκτρονίων στο διαμεμβρανικό χώρο οδηγεί σε αλλαγές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων με την σύνδεση τους με μόρια οξυγόνου και την παραγωγή ελεύθερων ριζών που ονομάζονται δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS). Τα μόρια αυτά (ROS) αποτελούνται από ιόντα οξυγόνου όπως το υπεροξείδιο ( $O_2^-$ ), το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και ρίζες υδροξυλίου ( $OH^\cdot$ ). Είναι γνωστό πως η υπερπαραγωγή των παραπάνω ριζών οδηγεί σε οξειδωτικό στρες των

κυττάρων με αποτέλεσμα την καταστροφή πρωτεϊνών, λιπιδίων και DNA. Ωστόσο μικρότερες συγκεντρώσεις έχει αποδειχθεί ότι έχουν διεγερτικές και σηματοδοτικές ικανότητες με κύριες τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών, την ενεργοποίηση ενζύμων, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη γονιδιακή έκφραση ( Storz, 2007, Brondson και συν., 2005).

Αν και ο μοριακός μηχανισμός του λέιζερ χαμηλής ενέργειας δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός,όσα περιγράφονται παραπάνω αποτελούν μόνο ένα μέρος του πιθανού μηχανισμού δράσης που μπορεί να εξηγήσει την επίδραση του στα κύτταρα και τους ιστούς.

## 7) ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΛΕΙΖΕΡ ΧΑΜΗΛΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ

Η έλλειψη καλά σχεδιασμένων κλινικών μελετών με λέιζερ χαμηλής ενέργειας καθιστά δύσκολη την αξιολόγηση του σε διάφορες ιατρικές εφαρμογές. Παρόλα αυτά, η ύπαρξη μερικών από αυτών σε συνδυασμό με μελέτες πάνω σε μοντέλα ζώων παρέχουν μια σειρά ενδείξεων εφαρμογής του λέιζερ χαμηλής ενέργειας στην ιατρική.Κύρια ένδειξη αποτελεί η χρήση του σε επουλωτικές διεργασίες (Meyers, 1990, Kaviani και συν., 2011) καθώς και σε χρόνιες παθήσεις των αρθρώσεων (Chow και συν.,2009, Hegedus και συν., 2009). Στις ενδείξεις περιλαμβάνονται επίσης θεραπείες για σοβαρές νευρολογικές παθήσεις όπως εγκεφαλική βλάβη από τραυματισμό (Naeser και συν., 2011), εγκεφαλικό επεισόδιο(Zivini και συν., 2009), κάκωση του νωτιαίου μυελού (Medalha και συν., 2010), και εκφυλιστικές νόσους του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως η νόσος του Alzheimer ( Farfara και συν., 2015) και η νόσος Parkinson (Zhang και συν., 2008). Τέλος, η σκοπιμότητα της ενδοαγγειακής ακτινοβολίας λέιζερ για τη θεραπεία του καρδιακού κυκλοφορικού συστήματος παρουσιάστηκε για πρώτη φορά στο American Heart Journal το 1982 (Lee και συν., 1982). Έκτοτε λίγες κλινικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την εφαρμογή του λέιζερ χαμηλής ενέργειας στην καρδιολογία (Derkacz και συν., 2010, Derkacz και συν., 2013).

Εκτός από τις εφαρμογές του λέιζερ χαμηλής ενέργειας στον τομέα της ιατρικής, οι τεχνικές του έχουν χρησιμοποιηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα και στην οδοντιατρική. Η αναγεννητική, η επουλωτική, η αντιφλεγμονώδης και αναλγητική δράση του λέιζερ χαμηλής ενέργειας έχει εφαρμοστεί τόσο στις σκληρές και όσο και στις μαλακές δομές της στοματικής κοιλότητας και τους περιβάλλοντες ιστούς. Ιδιαίτερα, το λέιζερ χαμηλής ενέργειας χρησιμοποιείται ευρέως για την επούλωση των τραυμάτων (Alirpanah και συν., 2011), στην αφθώδη στοματίτιδα (Lalabonova και Daskalon, 2014), στην αρθρίτιδα (Khozeimeh και συν., 2015), στην πολυφεκτομή (Durmus και Tanboga, 2014), στην παθολογία της κροταφογοναθικής άρθρωσης (Herpich και συν., 2015), στη βλεννογονίτιδα (Oberoi και συν., 2014), στην αναγέννηση των νευρικών ιστών (Ozen και συν., 2006), στη νευραλγία τριδύμου (Falaki και συν., 2014), στο χρόνια στοματοπροσωπικό πόνο (Khalighi και συν., 2010), στο μετεξακτικό πόνο και οίδημα (Hebert και συν., 2015), στην οστική ανάπλαση (Bashardoust και συν., 2010), στην οδοντινική υπερευαισθησία (Umberto και συν., 2012), στην ορθοδοντική μετακίνηση και στον πόνο κατά την ορθοδοντική μετακίνηση (Sousa και συν., 2014).

- Αντιφλεγμονώδης δράση

Ως φλεγμονή ορίζεται η αντίδραση των αγγειακών και συνδετικών στοιχείων ενός ιστού σε ένα βλαπτικό παράγοντα και ο σχηματισμός ενός εξιδρώματος πλούσιο σε πρωτεΐνες και κύτταρα. Στα βασικά στάδια μιας φλεγμονώδους αντίδρασης περιλαμβάνονται η κυτταρική ή ιστική βλάβη, οι αγγειακές και εξιδρωματικές αλλοιώσεις, η αποδρομή και τελικά η επανόρθωση των κατεστραμμένων ιστικών στοιχείων. Η κινητοποίηση των λευκοκυττάρων και κυρίως των ουδετερόφιλων και των μακροφάγων (μονοκυττάρων) στη θέση της ιστικής βλάβης αποτελεί το σημαντικότερο γεγονός μιας φλεγμονής. Το φαινόμενο αυτό κατά το οποίο τα λευκοκύτταρα έλκονται στην περιοχή της βλάβης από ορισμένους χημικούς μεσολαβητές ονομάζεται χημειοταξία.

Ακολουθεί στη συνέχεια η διαδικασία της φαγοκυττάρωσης από τα λευκοκύτταρα της περιοχής που σκοπό έχουν την ενεργητική πρόσληψη των ξένων σωματιδίων, των μικροβίων, των κυτταρικών αποτριμμάτων και την ενδοκυττάρια πέψη και καταστροφή τους. Όπως η χημειοταξία, έτσι και η φαγοκυττάρωση ενεργοποιείται και επηρεάζεται από πολλούς χημικούς παράγοντες. Σε αυτούς περιλαμβάνονται βιολογικά δραστικές αμίνες όπως η ισταμίνη και η σεροτονίνη, πρωτεάσες και πολυπεπίδια του πλάσματος όπως κινίνες, το σύστημα πήξεως, το ινωδολυτικό σύστημα και το σύστημα του συμπληρώματος. Τέλος, υπάρχει μια ομάδα ετερογενών αλλά έντονα δραστικών ουσιών στις οποίες συμπεριλαμβάνονται οι κυτοκίνες (λεμφοκίνες, μονοκίνες, ιντερλευκίνες, χημοκίνες), ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF), παράγωγα του αραχιδονικού οξέος (προσταγλανδίνες, λευκοτριένες, λιποξίνες) και ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) (Παπαδημητρίου, 2001).

Τα τελευταία χρόνια πολλές πειραματικές μελέτες σε ανθρώπους και πειραματόζωα έχουν αποδείξει πως το λέιζερ χαμηλής ενέργειας μπορεί να παρεμβαίνει αποτελεσματικά σε φλεγμονώδεις διεργασίες (Bjordal και συν., 2006, Fukuda και συν., 2013). Συγκεκριμένα, το λέιζερ χαμηλής ενέργειας έχει ρυθμιστικά αποτελέσματα έναντι των μεσολαβητών της φλεγμονής όπως οι κυτοκίνες, ο παράγοντας νέκρωσης όγκων και η κυκλοοξυγενάση. Οι κυτοκίνες, συμπεριλαμβανομένων των ιντερλευκινών, παίζουν ένα σημαντικό ρόλο ως μεσολαβητές φλεγμονωδών αποκρίσεων ενεργοποιώντας συγκεκριμένα κύτταρα (μακροφάγα, ουδετερόφιλα) και επιταχύνοντας τις φλεγμονώδεις διεργασίες (Hrabák και συν., 2008). Το λέιζερ χαμηλής ενέργειας, φαίνεται πως μπορεί να μειώσει τα επίπεδα της ιντερλευκίνης-6 (IL-6), του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF-α) και της ιντερλευκίνης-1β (IL-1β) σε πειραματικά μοντέλα με προκλητή φλεγμονή (Pezelj-Ribaric και συν., 2013, Albertini και συν., 2008). Οι παραπάνω ιντερλευκίνες, γνωστές και ως προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας

ενώ ο παράγοντας νέκρωσης όγκων μαζί με την ιντερφερόνη-γ (INF-γ) ενεργοποιεί τα μακροφάγα και παράλληλα αυξάνει την παραγωγή των παραπάνω προφλεγμονωδών κυτοκινών. Σε άλλη πειραματική μελέτη σε ποντίκια οι Fukuda και συν. απέδειξαν τη μειωμένη έκφραση του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF-α) και της ιντερφερόνης-γ (INF-γ) όχι όμως και της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) (Fukuda και συν., 2013). Από την άλλη, οι κυκλοοξυγενάσες (COX-1, COX-2) αποτελούν ένζυμα που συμμετέχουν στη σύνθεση προσταγλανδινών (PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>), προστακυκλίνης (PGI<sub>2</sub>) και θρομβίνης (TXA<sub>2</sub>) από αραχιδονικό οξύ. Η COX-1 εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς, ενώ η COX-2 είναι μη ανιχνεύσιμη στους περισσότερους ιστούς σε φυσιολογικές συνθήκες. Η COX-2 αυξάνεται σε συνθήκες φλεγμονής, υπό την επίδραση των κυτταροκινών και άλλων μεσολαβητών της φλεγμονής όπως η ιντερλευκίνες 1 και 2 και ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων. Αντίστροφα αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως οι ιντερλευκίνες 3, 4 και 10 καθώς και τα κορτικοειδή καταστέλλουν την έκφραση της COX-2. Η COX-1 παίζει ουσιαστικό ρόλο σε αρκετές φυσιολογικές σωματικές λειτουργίες, ενώ COX-2 φαίνεται να εμπλέκεται κυρίως σε παθοφυσιολογικές διεργασίες, αλλά όχι αποκλειστικά (Almeida και συν., 2011). Ως εκ τούτου, η αντι-φλεγμονώδης δράση διάφορων θεραπειών πρέπει να σχετίζεται με αυξημένη έκφραση του γονιδίου COX-1 και μειωμένη έκφραση του γονιδίου COX-2. Οι Almeida και συν. παταρήρησαν πως το λέιζερ χαμηλής ενέργειας μπορεί να ρυθμίσει με δοσοεξαρτώμενο τρόπο την έκφραση της COX-1 και της COX-2 με αντίθετο τρόπο και συγκεκριμένα αυξάνοντας την παραγωγή της COX-1 και μειώνοντας τη COX-2 (Almeida και συν., 2011). Η ίδια ερευνητική ομάδα, μελέτησε την επίδραση τόσο της νατριούχου δικλοφαινάκης όσο και του λέιζερ χαμηλής ενέργειας σε οξεία φλεγμονή από τραύμα σε σκελετικούς μυς ποντικών. Παρατήρησαν πως η ακτινοβολία με λέιζερ χαμηλής ενέργειας μείωσε την έκφραση τόσο της COX-2 όσο και του TNF-α. Επιπλέον παρατήρησαν πως η εφαρμογή του είναι πιο αποτελεσματική από αυτή της τοπικής εφαρμογής της

νατριούχου δικλοφαινάκης στη μείωση της φλεγμονής από τραύμα σε σκελετικούς μυς (Almeida και συν., 2011).

- Αναλγητική δράση

Μία από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες εφαρμογές του λέιζερ χαμηλής ενέργειας στην κλινική πράξη είναι χρήση του εξαιτίας της σημαντικής αναλγητικής του δράσης. Η αναλγητική του δράση έχει γίνει αντικείμενο πολλών ερευνών καθώς ποικίλοι βιολογικοί μηχανισμοί φαίνεται να εμπλέκονται. Σε συστηματική ανασκόπηση από τους οι Μαΐα και συν. (2012) αποδείχτηκε πως η χρήση του λέιζερ χαμηλής ενέργειας είναι αποτελεσματική σε ασθενείς με κροταφογοναθικές διαταραχές. Ωστόσο, η ετερογένεια της τυποποίησης όσον αφορά τις παραμέτρους του λέιζερ (δόση, πυκνότητα ισχύος, μήκος κύματος) απαιτεί προσοχή για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων και τη δημιουργία πρωτοκόλλου εφαρμογής για την ανακούφιση του πόνου σε τέτοιους ασθενείς. Σε αποτελεσματική μείωση τόσο του πόνου όσο και της φλεγμονής κατέληξε και η συστηματική ανασκόπηση των Boral και συν(2006) σε καταστάσεις με οξέα συμπτώματα. Οι Falaki και συν.(2014) από την άλλη μελέτησαν στην βιβλιογραφική τους ανασκόπηση την επίδραση της ακτινοβολίας με λέιζερ χαμηλής ενέργειας σε ασθενείς που πάσχουν από νευραλγία τριδύμου καταλήγοντας στο συμπέρασμα πως το λέιζερ χαμηλής ενέργειας αποτελεί εναλλακτική θεραπεία στην νευραλγία τριδύμου καθώς είναι αποτελεσματικό τόσο στην ένταση όσο και στη συχνότητα του πόνου.

Πολλοί βιολογικοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για την εξασθένηση του οξέος και του χρόνιου πόνου από το λέιζερ χαμηλής ενέργειας. Κάποιοι από αυτοί είναι οι ακόλουθοι (Mazzetto και συν., 2010, Mazzetto και συν., 2007, Asnaashari και Safavi, 2013, Tullberg και συν., 2003, Ferreira και συν 2005):

- Παραγωγή ενδορφινών
- Αύξηση της παραγωγής ATP και αύξηση του κυτταρικού μεταβολισμού



- Μειωμένη παραγωγή PGI<sub>2</sub>
  - Ενεργοποίηση της μικροκυκλοφορίας στην περιοχή ακτινοβολήσης
  - Αύξηση στην ουδό του πόνου των νευρικών ινών
  - Μείωση της ισταμίνης, της ακετυλοχολίνης, της σεροτονίνης και της βραδυκινίνης
  - Ισορροπία στην δραστηριότητα αδρεναλίνης και η νοραδρεναλίνης
- Επούλωτική- Αναγεννητική ικανότητα λέιζερ χαμηλής ενέργειας

Η επούλωση των τραυμάτων είναι μια δυναμική διαδικασία και αποτελείται από τρεις διακριτές φάσεις: τη φλεγμονώδη φάση, τη φάση πολλαπλασιασμού και την αναπλαστική ή φάση ωρίμανσης. Η αρχική φλεγμονώδης φάση περιλαμβάνει την αιμόσταση κατά τη οποία συμβαίνει αγγειοσύσπαση, συσσώρευση αιμοπεταλίων, δημιουργία θρόμβου και στη συνέχεια τη φλεγμονή, όπου συμβαίνει αγγειοδιαστολή και φαγοκυττάρωση. Κατά τη φάση της αιμόστασης τα αιμοπετάλια συρρέουν για τον έλεγχο της αιμορραγίας και το σχηματισμό θρόμβου. Στη συνέχεια αποκοκκιώνονται απελευθερώνοντας διάφορους αυξητικούς παράγοντες όπως ο αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων (platelet-derived growth factor PDGF) και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor EGF) καθώς και αγγειοδραστικούς παράγοντες (π.χ.σεροτονίνη, ισταμίνη), φιβρονεκτίνη και ινωδογόνο (Πίνακας Α3β) (Behm και συν., 2012, Barrientos και συν.,2008). Μετά από μια βραχεία περίοδο, ακολουθεί αγγειοδιαστολή των τριχοειδών, ως αποτέλεσμα της τοπικής απελευθέρωσης ισταμίνης. Με αυτό τον τρόπο δραστικές ουσίες κατά τη φάση της φλεγμονής, όπως τα αντισώματα και τα λευκοκύτταρα του αίματος, φτάνουν στην περιοχή. Τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα είναι τα κύρια κύτταρα που διηθούν την περιοχή και ενισχύουν τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης. Ταυτόχρονα μαζί με τους ινοβλάστες της τραυματισμένης περιοχής, παράγουν βιολογικά δραστικές ουσίες όπως κυττοκίνες, αυξητικούς παράγοντες και προσταγλαδίνες που με τη σειρά τους

ενεργοποιούν τη φάση πολλαπλασιασμού (Gethin, 2012). Κατά τη διάρκεια της φάσης πολλαπλασιασμού, σχηματίζεται κοκκιώδης ιστός, ένα νέο δίκτυο αιμοφόρων αγγείων αναπτύσσεται και πραγματοποιείται εναπόθεση κολλαγόνου. Η φάση ωρίμανσης αποτελεί την τελική φάση της επούλωσης του τραύματος και περιλαμβάνει την αναδιαμόρφωση και την ωρίμανση του κολλαγόνου.

Το λέιζερ χαμηλής ενέργειας πιστεύεται ότι επηρεάζει όλες τις φάσεις της επούλωσης ενός τραύματος, αν και ο ακριβής μηχανισμός δράσης του δεν είναι πλήρως γνωστός (Hawkins και συν., 2005). Η ευεργετική επίδραση του λέιζερ χαμηλής ενέργειας μπορεί να εξηγηθεί αρχικά από την επαγωγή της έκφρασης των αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών που είναι υπεύθυνοι για την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών. Οι Poop και συν. (2005) αναφέρουν ότι το λέιζερ χαμηλής ενέργειας μπορεί να διεγείρει την παραγωγή του αναπτυξιακού αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (fibroblast-derived stem cell factor -SCF), του αυξητικού παράγοντα ηπατοκυττάρων (hepatocyte growth factor-HGF), και βασικού αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor b-FGF). Η βιοδιεγερτική του επίδραση στην επούλωση τραυμάτων αναφέρεται επίσης ότι συνδέεται με την παραγωγή του ινσουλόμορφου αυξητικού παράγοντα (insulin like growth factor-1 IGF-1) και του υποδοχέα του IGF-1 από τους ουλικούς ινοβλάστες (IGFBP3) (Saygun και συν., 2008). Εκτός από τον b-FGF, οι Usumez και συν. (2014) ανέφεραν ότι ο αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων (platelet-derived growth factor PDGF) και ο αυξητικός παράγοντας μετατροπής (transforming growth factor beta TGF-β) επηρεάστηκαν σημαντικά με την ακτινοβολία με λέιζερ χαμηλής ενέργειας. Τέλος, αυξητικοί παράγοντες υπεύθυνοι για τη δημιουργία νέων αγγείων στην περιοχή του τραύματος όπως ο αυξητικός παράγοντας αγγειακού ενδοθηλίου (vascular endothelial growth factor-VEGF) έχουν αναφερθεί ότι αυξάνονται ύστερα από επίδραση ακτινοβολίας λέιζερ χαμηλής ενέργειας (Cury και συν., 2013, Martignago και συν., 2015).

Η αυξημένη παραγωγή κολλαγόνου από ακτινοβολημένους ινοβλάστες με λέιζερ χαμηλής ενέργειας έχει επίσης παρατηρηθεί. Οι Fiorio και συν. (2014) έδειξαν βελτιωμένη παραγωγή κολλαγόνου κατά την διάρκεια της διαδικασίας επιδιόρθωσης εγκαυμάτων τρίτου βαθμού σε αρουραίους και ιδιαίτερα για τους τύπους κολλαγόνου I και III. Η βιοδιεγερτική επίδραση του λέιζερ χαμηλής ενέργειας στην έκφραση του γονιδίου COL1α1 σε καλλιέργεια ινοβλαστών ποντικών, έχει αποδειχθεί από τους Martignago και συν. (2015). Η έκφραση του γονιδίου για το κολλαγόνο τύπου I έχει αποδειχθεί ότι αυξάνεται σημαντικά ύστερα από ακτινοβολήση in vitro ανθρώπινων ουλικών ινοβλαστών με λέιζερ χαμηλής ενέργειας ( Frozanfar και συν 2013).

| Growth Factors | Cells  | Function   |
|----------------|--|--|
| EGF            | Platelets<br>Macrophages<br>Fibroblasts  | Reepithelialization  |
| FGF-2          | Keratinocytes<br>Mast Cells<br>Fibroblasts<br>Endothelial cells<br>Smooth muscle cells<br>Chondrocytes | Granulation tissue formation<br>Reepithelialization<br>Matrix formation and remodeling                 |
| TGF-b          | Platelets<br>Keratinocytes<br>Macrophages<br>Lymphocytes<br>Fibroblasts                                | Inflammation<br>Granulation tissue formation<br>Reepithelialization<br>Matrix formation and remodeling |
| PDGF           | Platelets<br>Keratinocytes   | Inflammation<br>Granulation tissue   |

|       |  |   |
|-------|--|---|
|       | Macrophages<br>Endothelial cells<br>Fibroblasts  | formation<br>Reepithelialization<br>Matrix formation and remodeling |
| VEGF  | Platelets<br>Neutrophils<br>Macrophages<br>Endothelial cells<br>Smooth muscle cells<br>Fibroblasts | Granulation tissue formation  |
| IL-1  | Neutrophils<br>Monocytes<br>Macrophages<br>Keratinocytes   | Inflammation<br>Reepithelialization                                 |
| IL-6  | Neutrophils<br>Macrophages   | Inflammation<br>Reepithelialization                                 |
| TNF-a | Neutrophils<br>Macrophages   | Inflammation<br>Reepithelialization                                 |

Πίνακας Α3β: Κύριοι αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες που συμμετέχουν στην ιστική επούλωση (Behm και συν., 2012)

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Α.ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση άρσης της πιθανής κυτταροτοξικότητας του κεραμικού διπυριτικού λιθίου σε ανθρώπινους ουλικούς ινοβλάστες μετά από ακτινοβόληση με διοδικό laser χαμηλής ενέργειας.

Μηδενικές υποθέσεις

**Υπόθεση1:**Το κεραμικό διπυριτικού λιθίου δεν έχει κυτταροτοξική επίδραση στους ανθρώπινους ουλικούς ινοβλάστες.

**Υπόθεση 2:**Το κεραμικό διπυριτικού λιθίου δεν έχει κυτταροτοξική επίδραση στους ανθρώπινους ουλικούς ινοβλάστες μετά από επαναλαμβανόμενη θερμική καταπόνηση.

**Υπόθεση 3:**Η ακτινοβόληση με διοδικό laser χαμηλής ενέργειας δεν άρει τη πιθανή κυτταροτοξικότητα του κεραμικού διπυριτικού λίθου σε ανθρώπινους ουλικούς ινοβλάστες.

## Β. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

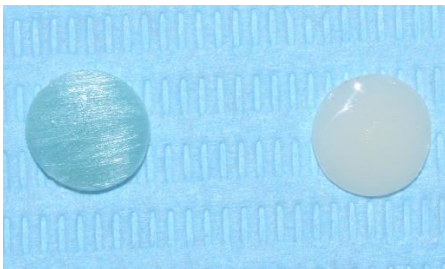
### **B1) Κατασκευή δοκιμών**

Για την κατασκευή δοκιμών και τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν ingots e.max Press Ivoclar Vivadent(HT, shade A2) ( Εικόνα B1α).



Εικόνα B1α:ingots e.max Press Ivoclar Vivadent HT A2

Αρχικά κατασκευάστηκαν κέρινα προπλάσματα (Modelling Wax Classic-Renfert) από μήτρα σιλικόνης κυκλικού σχήματος με διάμετρο 8 χιλ. και πάχους 1 χιλ. (Εικόνα B1β). Η επιβεβαίωση των διαστάσεων, τόσο των κέρινων προπλασμάτων όσο και των τελικών δοκιμών, πραγματοποιήθηκε με ηλεκτρονικό διαστημόμετρο ακριβείας 0,001mm (Εικόνα B4).



Εικόνα B1β: Κέρινο πρόπλασμα και κεραμικό δοκίμιο

Στην συνέχεια τα κέρινα προπλάσματα χυτεύτηκαν σε φούρνο πρεσαρίσματος κεραμικών ( Ivoclar Vivadent, EP 600, Combi) (Εικόνα B1γ).



Εικόνα Β1γ: Φούρνος πρεσαρίσματος κεραμικών Ivoclar Vivadent, EP 600, Combi

Τα δοκίμια χωρίστηκαν με προσοχή από τους αγωγούς χύτευσης και επιβεβαιώθηκαν και πάλι οι διαστάσεις τους με το ηλεκτρονικό διαστημόμετρο ακριβείας (Εικόνα Β1δ).



Εικόνα Β1δ:Επιβεβαίωση διαστάσεων δοκιμίων με ηλεκτρονικό διαστημόμετρο ακριβείας.

Η λείανση της επιφάνειας των δοκιμίων έγινε με αδαμαντόλιθο σύμφωνα με πρωτόκολλο που συνιστά η εταιρεία.

Αρχικά, η αποστείρωση όλων των δοκιμίων πραγματοποιήθηκε ακριβώς πριν την έναρξη του πειράματος σε αυτόκαυστο (KAVO 120°C, 2 bar, 20 min) και στη συνέχεια με ακτινοβολία UV για 20 λεπτά.

### Ομάδες δοκιμίων

1. Δοκίμια που δεν υπέστησαν καμία διεργασία (Control, 40).
2. Δοκίμια που υπέστησαν κυκλικά επαναλαμβανόμενη θερμική καταπόνηση (Thermo, 40).
3. Δοκίμια που υπέστησαν κυκλικά επαναλαμβανόμενη θερμική καταπόνηση και ακτινοβολία με λέιζερ χαμηλής ενέργειας (Thermo +LASER, 40).

### Κυκλικά επαναλαμβανόμενη θερμική καταπόνηση

Για το είδος αυτό γήρανσης των δοκιμίων (πριν την αποστείρωσή τους), χρησιμοποιήθηκε συσκευή περιοδικής εμβύθισης σε λουτρό απεσταγμένου νερού, όπου με θερμοστάτη διατηρείται ορισμένη και σταθερή θερμοκρασία για κάθε ένα από τα δοχεία αυτά (Εικόνα Β1ε).

Οι θερμοκρασίες στα τέσσερα αυτά διαδοχικά δοχεία, ήταν:

37°C → 55°C → 37°C → 5°C

Η παραμονή στο κάθε λουτρό νερού, διαρκεί 15sec, ενώ ο χρόνος για την εκπλήρωση ενός κύκλου (4 εμβυθίσεις) είναι 2min. Κατά τη μετάβαση από το ένα δοχείο στο άλλο, τα δοκίμια αιωρούνται στον αέρα, σε συνθήκες δωματίου. Ολοκληρώθηκαν 1500 κύκλοι, δηλαδή 6000 εμβυθίσεις.





Εικόνα Β1ε:Συσκευή κυκλικά επαναλαμβανόμενης θερμικής καταπόνησης

## **B2) Ανάπτυξη κυτταρικών καλλιέργειών ανθρώπινων ουλικών ινοβλαστών (HGF)**

Για τον έλεγχο της πιθανής κυτταροτοξικότητας του υπό μελέτη υλικού, αναπτύχθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων ουλικών ινοβλαστών μετά από βιοψία ιστοτεμάχιο (3x5χιλ.) από την παρυφή ούλων του μετεξακτικού φατνίου υγιούς δότη κατά τη χειρουργική εξαγωγή τρίτου γομφίου, μετά από την κατάθεση και έγκριση του σχετικού πρωτοκόλλου στην Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας και την ενυπόγραφη συγκατάθεση τους ασθενούς σχετικά για χρήση του βιολογικού υλικού για ερευνητικούς σκοπούς. Ο χειρισμός όλων των πειραμάτων που σχετίζονται με τη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά διεξήχθη στο άσηπτο περιβάλλον θαλάμου νηματικής ροής σε

ειδικά διαμορφωμένο χώρο κυτταρικών καλλιεργειών του Εργαστηρίου Ακίνητης Προσθετικής και Προσθετικής Εμφυτευματολογίας του Οδοντιατρικού Τμήματος, στον οποίο πληρούνται όλες οι προϋποθέσεις που προβλέπονται για το συγκεκριμένο επίπεδο βιολογικής ασφάλειας. Οι καλλιέργειες αυτές αναπτύχθηκαν με τη μέθοδο της μετανάστευσης των κυττάρων από τα ιστοτεμάχια (outgrowth method).

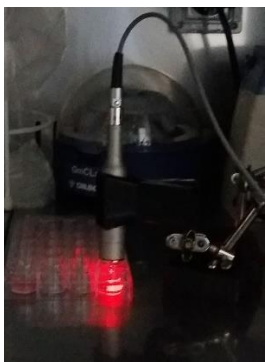
Αναλυτικότερα στη μέθοδο αυτή, ο ουλικός ιστός τεμαχίζεται σε 1-2 επιμέρους τεμάχια, που τοποθετούνται σε φλάσκες καλλιεργειών 25cm<sup>2</sup> με θρεπτικό μέσο DMEM [Dulbecco modified Eagle medium- Biochrom: 3% NuSerum glutamine (2mM), gentamycin (10μg/ml), penicillin (125U/ml), streptomycin (125μg/ml)] με 10% ορό FBS (Fetal bovine serum 10%, GibcoBRL, 10106-169) και αντιβιοτικά [πενικιλίνης/ στρεπτομυλίνης/ αμφοτερικίνης Β (100 units/ml πενικιλίνη, 100 μgr/ml στρεπτομυκίνη και 0.25 μgr/ml Αμφοτερικίνη Β (15240-062, GibcoBRL, U.S.A.)]. Η φλάσκα τοποθετείται σε αποστειρωμένο επωαστικό κλίβανο στους 37±1°C, και 5% CO<sub>2</sub>, ατμοσφαιρική πίεση 95%, 100% υγρασία.

Τα κύτταρα που αναπτύσσονται όταν είναι πλήρη στη φλάσκα, μεταφέρονται σε μεγαλύτερη, διαστάσεων 75cm<sup>2</sup> (passage 1). Στη συνέχεια τα κύτταρα με διαδοχικά περάσματα ("passages") χρησιμοποιούνται για τα πειράματα. Για την πραγματοποίηση των περασμάτων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα τρυψίνης 0,25% EDTA 1mM(GIBCO/Invitrogen).

### **B3) Πρωτόκολλο ακτινοβόλησης**

Η ακτινοβόληση πραγματοποιήθηκε με διοδικό λέιζερ InGaAsP (EPIC DIODE LASER, BIOLASE). Η δέσμη της ακτινοβολίας τοποθετήθηκε κάθετα στο στρώμα των κυττάρων σε απόσταση σταθερά ίση με το ύψος του πηγαδιού (2 cm) καθώς η κεφαλή του λέιζερ είχε συγκρατηθεί σε αυτό το ύψος με ένα κεφαλοσταστή. Το εύρος της δέσμης ακτινοβόλησης ήταν ίσο με το εμβαδό του πηγαδιού (≈2cm<sup>2</sup>). Η ακτινοβόληση πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες απόλυτου

σκότους μέσα στον απαγωγό (Εικ.Β3α). Τα πιάτα με τις ομάδες των κυττάρων που δεν ακτινοβολήθηκαν, έμειναν έξω από τον επωαστικό κλίβανο και μέσα στον απαγωγό όσο χρόνο διήρκησε η ακτινοβολήση των άλλων ομάδων ( $\approx 2,5$  min) ώστε οι συνθήκες να παραμένουν σταθερά ίδιες για όλες τις ομάδες.



Εικόνα Β3α: Ακτινοβολήση κυττάρων μέσα στον απαγωγό

Η ισχύς ήταν στα 0,2W, η ενέργεια στα 8 J και ο χρόνος ακτινοβολήσης στα 40 sec (Πίνακας Β3α).

|                       |                    |
|-----------------------|--------------------|
| Λέιζερ                | διοδικό            |
| Μήκος κύματος         | 940 nm             |
| Φάσμα                 | Κοντά στο υπέρυθρο |
| Ισχύς                 | 0,2 W              |
| Ενέργεια              | 8 J                |
| Δέσμη                 | ομοιογενής         |
| Διάρκεια              | 40 sec             |
| Απόσταση              | 2 cm               |
| Εμβαδόν ακτινοβολήσης | 2 cm <sup>2</sup>  |

Πίνακας Β3α:Χαρακτηριστικά ακτινοβολίας laser

#### **B4) Δοκιμασίες ελέγχου κυτταροτοξικότητας**

##### Δοκιμασία MTT

Για τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, τα δοκίμια τοποθετήθηκαν σε μικροπλάκες καλλιέργειας 24 οπών (Corning Incorporated, NY, USA) και στη συνέχεια προστέθηκε συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων ( $3 \times 10^4$  κύτταρα ανά οπή).

Για τη μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα οδοντικά αυτά βιοϋλικά χρησιμοποιήθηκε η βιοχημική μέθοδος υδατοδιαλυτού άλατος του τετραζολίου MTT τετραζολίου [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], “δοκιμασία MTT”. Πρόκειται για μια χρωματομετρική μέθοδο που προσδιορίζει τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων. Το άλας αυτό με κίτρινη απόχρωση, βιοαποδομείται από την ηλεκτρική δεϋδρογονάση των μιτοχονδρίων ζωντανών κυττάρων παράγοντας μπλε κρυστάλλους φορμαζάνης που είναι διαλυτοί στο θρεπτικό μέσο (Cory και συν., 2005). Απαιτείται επαναδιάλυση των σχηματισθέντων κρυστάλλων φορμαζάνης με κάποιο διαλύτη (όπως διμεθυλοσουλφοξείδιο, DMSO) και έξοδός τους από τα κύτταρα με εξωκυττάρωση. Μετράται η οπτική απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο που είναι ανάλογη με την πυκνότητα της παραχθείσας φορμαζάνης δηλαδή ανάλογη με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων. Τα στάδια της μεθόδου MTT που ακολουθήθηκαν είναι τα παρακάτω:

- Σε κάθε μια οπή ενός πιάτου 24 οπών τοποθετήθηκε ένα δοκίμιο κεραμικού διπυριτικού λιθίου.
- Ακολούθησε προσθήκη  $3 \times 10^4$  HGF κυττάρων ανά οπή και επώαση στους 37 °C και σε ατμόσφαιρα 5 % CO<sub>2</sub>.
- Έχει προηγηθεί η προσθήκη θρεπτικού μέσου (DMEM) έτσι ώστε κάθε οπή να έχει τελικό όγκο 1 ml με σκοπό να καλύπτεται πλήρως το δοκίμιο.

- Επώαση για 24h και ακτινοβόληση των κυττάρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο ακτινοβόλησης (day 0) .
- Επώαση για 24h και προσθήκη στο θρεπτικό μέσο (DMEM, 1 ml) διάλυμα MTT (100 μl) σε απαγωγό νηματικής ροής χωρίς φως (day 1).
- Επώαση για 4h στους 37 °C.
- Απομάκρυνση διαλύματος από τα τριβλία και προσθήκη διαλύματος DMSO (50μl) σε κάθε οπή, με σκοπό τη διάλυση κρυστάλλων φορμαζάνης.
- Παραμονή σε κλίβανο στους 37°C για 1 ώρα αφού το πιάτο σφραγίστηκε με μεμβράνη για να αποφευχθεί η εξάτμιση του οργανικού διαλύτη.
- Αφαίρεση των δοκιμίων από τις οπές και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας με φασματοφωτόμετρο τύπου ELISA (Erock, Biotek) σε διπλό μήκος κύματος (στα 540-630nm) σύμφωνα με το νόμο Lambert-Beer. Η μέτρηση της πυκνότητας στα 630 nm αυτόματα αφαιρούνταν από τη μέτρηση στα 540 nm, έτσι ώστε να μειωθεί η επίδραση της μη ειδικής πυκνότητας.
- Η διαδικασία επαναλήφθηκε σε διαστήματα 24h (day 1), 48h (day 2), 72 (day 3).

### **B5) Έλεγχος πρόσφυσης των κυττάρων στην επιφάνεια του υλικού με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης SEM**

Η αξιολόγηση της μορφολογίας των κυττάρων αλλά και η δυνατότητα προσκόλλησης τους πάνω στα δοκίμια πραγματοποιήθηκε με την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο μονιμοποίησης για σάρωση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (SEM) τα ζωντανά κύτταρα που προσκολλώνται στο δοκίμιο βάφονται και μονιμοποιούνται.

Ένα αποστειρωμένο δοκίμιο από κάθε ομάδα (CONTROL, THERMO, THERMO+LASER) τοποθετήθηκε σε πηγάδι σε πιάτα 24 πηγαδιών μαζί με  $3 \times 10^4$  κύτταρα και 1ml DMEM. Ύστερα από 48 ώρες επώασης μετά την ακτινοβόληση της ομάδας THERMO+LASER (day 2) ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο μονιμοποίησης για σάρωση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (SEM).

Περιγραφή πρωτοκόλλου μονιμοποίησης για σάρωση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (SEM) (Dean και συν.,1995)

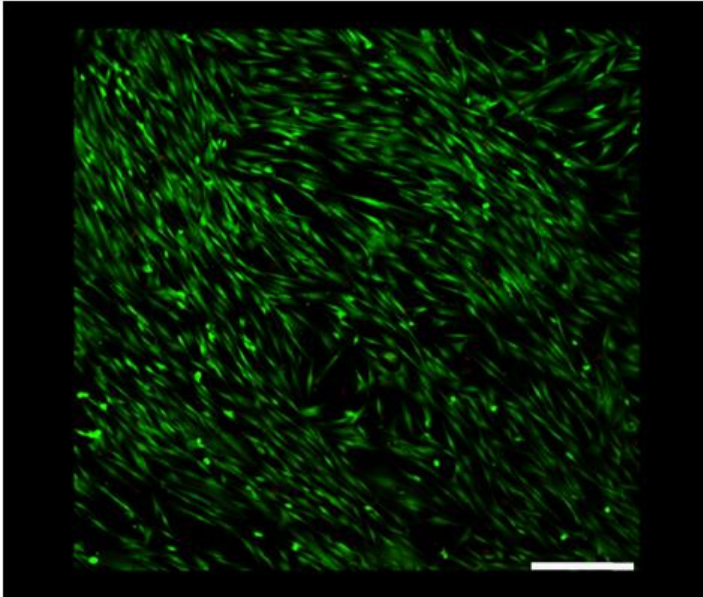
- Το θρεπτικό υλικό των κυττάρων (DMEM) αναρροφήθηκε και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα PBS τρεις φορές, με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην ακουμπήσει το ακρορύγχιο της πιπέτας στα κύτταρα και τραυματιστούν οι μεμβράνες τους.
- Το ρυθμιστικό διάλυμα PBS, αντικαταστάθηκε μέσα σε απαγωγό με παράγοντα μονιμοποίησης (3% γλουταρλεϋδη), ώστε να ρυθμιστεί ή ωσμωτική πίεση στα 300mOsm. Ο παράγοντας μονιμοποίησης παρέμεινε για 45 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά την απομάκρυνση της γλουταρλεϋδης προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού νατρίου 0,1M με PH 7,4 και 0,1M σουκρόζη (0.1M sodium cacodylate, 0.1M sucrose, pH 7.4) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την απομάκρυνση του ρυθμιστικού διαλύματος, η διαδικασία επαναλήφθηκε για άλλα 5 λεπτά.
- Ακολούθησε η αφυδάτωση των κυττάρων με ανιούσα σειρά αιθανόλης (30%, 50%, 70%, 95% και 100%) με παραμονή των δοκιμίων για δέκα λεπτά σε κάθε συγκέντρωση αιθανόλης με εξαίρεση της συγκέντρωσης 100% που εμβυθίστηκαν για δέκα λεπτά δύο φορές.
- Τέλος, η τελευταία συγκέντρωση αιθανόλης αντικαταστάθηκε με εξαμεθυλδισιλαζάνη (HMDS) μέσα σε απαγωγό ώστε να καλύπτονται πλήρως τα δοκίμια. Τα δοκίμια παρέμειναν στη εξαμεθυλδισιλαζάνη

για 10 λεπτά, και στη συνέχεια παρέμειναν σε στεγνό περιβάλλον, μέσα στον απαγωγό για 20-30 λεπτά.

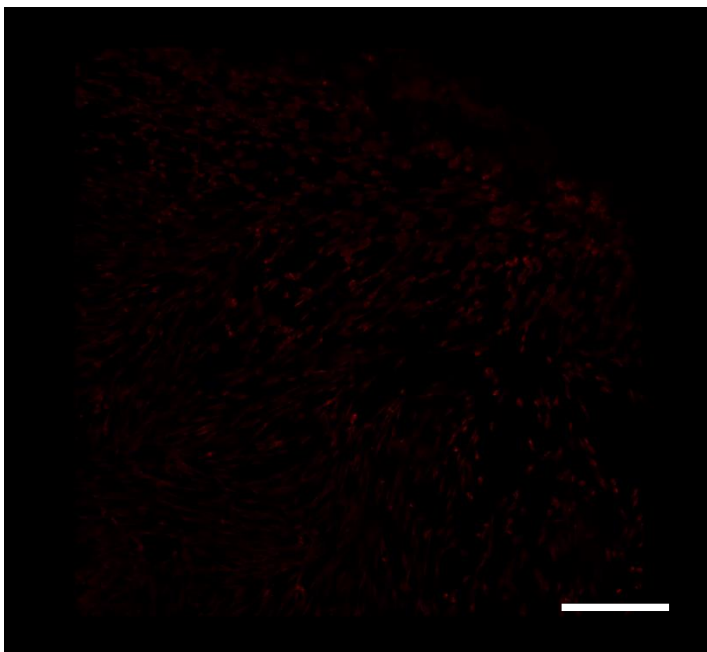
Τα δοκίμια εξετάστηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης JEOL Scanning Microscope JSM 840-A και με σύστημα μικροανάλυσης Oxford ISIS-300. Για τις ανάγκες της μικροανάλυσης τα δοκίμια επικαλύφθηκαν με άνθρακα (επανθράκωση) πάχους περίπου 200Å, για να επιτευχθεί η αγωγιμότητα του υλικού. Η επανθράκωση έγινε με JEOL-4X εξαχνωτή κενού (vacuum evaporator).

### **B6) Έλεγχος ζωτικότητας και επιφανειακής μορφολογίας των κυττάρων με μικροσκοπία συνεστιακής δέσμης(CONFOCAL)**

Για τον ταυτόχρονη απεικόνιση των ζωντανών και νεκρών κυττάρων και της επιφανειακής τους μορφολογίας χρησιμοποιήθηκε η μικροσκοπία συνεστιακής δέσμης (CONFOCAL). Ο έλεγχος αυτός επιτυγχάνεται με τη χρήση δύο ανιχνευτών φθορισμού που επιτρέπουν τον έλεγχο της ζωτικότητας των κυττάρων μέσω της ενδοκυτταρικής δραστηριότητας και της ακεραιότητας της πλασματικής μεμβράνης. Κατάλληλοι μοριακοί ανιχνευτές για αυτή τη δοκιμασία βρέθηκαν πως είναι η καλσεΐνη και το ομοδιμερές εθίδιο (Eth-1)(Hayes, 1994). Η ζωτικότητα των κυττάρων καθορίζεται από την ενδοκυτταρική δραστηριότητα ενός ενζύμου (εστεράση) που μετατρέπει τη μη φθορίζουσα καλσεΐνη στη φθορίζουσα μορφή της κάνοντας με αυτό τον τρόπο τα ζωντανά κύτταρα να απεικονίζονται κάτω από κατάλληλες συνθήκες με ένα πράσινο φθορίζον χρώμα (Εικ Β6α). Το ομοδιμερές εθίδιο εισέρχεται στις κατεστραμμένες κυτταρικές μεμβράνες και συνδεόμενο με τα νουκλειικά οξέα προσδίδει στα νεκρά κύτταρα κόκκινο φθορίζον χρώμα (Εικ Β6β) ενώ αποκλείεται από τα ζωντανά κύτταρα μέσω της ακεραιότητας της πλασματικής μεμβράνης.



Εικόνα Β6α: Φωτογραφία των ζωντανών κυττάρων με μικροσκοπία συνεστιακής δέσμης (μεγέθυνση Χ100) (μπάρα κλίμακας αντιστοιχεί σε 200μm)



Εικόνα Β6β:Φωτογραφία των νεκρών κυττάρων με μικροσκοπία συνεστιακής δέσμης (μεγέθυνση Χ100) (μπάρα κλίμακας αντιστοιχεί σε 200μm)



Περιγραφή πρωτοκόλλου χρώσης κυττάρων για απεικόνιση με μικροσκοπία  
συνεστιακής δέσμης.

- Απομάκρυνση της καλσεΐνης και του εθιδίου από την κατάψυξη για να αποκτήσουν θεοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 6μl από το εθίδιο συγκέντρωσης 2 mM σε 3ml PBS για να προκύψει διάλυμα εθιδίου συγκέντρωσης 4 μM.
- Προσθήκη 1,5μl από την καλσεΐνη συγκέντρωσης 4mM στο παραπάνω διάλυμα ώστε να προκύψει διάλυμα εθιδίου-καλσεΐνης συγκέντρωσης 4 μM-2μM αντίστοιχα.
- Αφαίρεση του θρεπτικού από τα πηγάδια με τα δείγματα και προσεκτικό ξέπλυμά τους με PBS
- Προσθήκη 200 μl διαλύματος σε κάθε πηγάδι που περιέχει δείγμα.
- Στην συνέχεια τα πιάτα παραμένουν σε θεοκρασία δωματίου για 30-45 λεπτά
- Ξέπλυμα των δειγμάτων με PBS
- Τα δείγματα είναι έτοιμα για σάρωση

Η σάρωση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με το συνεστιακό μικροσκόπιο NikonEZ-C1 του Τμήματος Κτηνιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του ΑΠΘ.

**B7) Φασματομετρία ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (Inductively Coupled Plasma mass spectrometry ICP-MS)**

Η φασματομετρία ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-MS) είναι ένας τύπος φασματομετρίας η οποία είναι ικανή να ανιχνεύει μέταλλα και διάφορα μη μεταλλικά στοιχεία σε συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο  $1/10^{15}$  ppm (part per quadrillion). Αυτό επιτυγχάνεται με τον ιονισμό του δείγματος με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα και στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας ένα φασματόμετρο, το διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση

των εν λόγω ιόντων. Το επαγωγικώς συζευγμένου πλάσμα είναι ένα ιονισμένο αέριο που ενεργοποιείται επαγωγικά με τη θέρμανση από ένα ηλεκτρομαγνητικό πηνίο, και περιέχει μία επαρκή συγκέντρωση των ιόντων και ηλεκτρονίων για να κάνουν το αέριο ηλεκτρικά αγώγιμο.

Το διάλυμα του δείγματος εισάγεται στο επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα ως ένα αερόλυμα καθώς εκνεφώνεται με μορφή ατομικού ατμού. Το πλάσμα στη συνέχεια μετατρέπει το αερόλυμα σε ένα στερεό, το στερεό εξατμίζεται σε ένα αέριο, και στη συνέχεια το πλάσμα διασπά τα μεμονωμένα μόρια σε άτομα. Η υψηλή πηγή θερμοκρασίας (πλάσμα) διεγείρει τα άτομα και τα ιόντα να εκπέμπουν φως σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, που αντιστοιχούν σε διαφορετικά στοιχεία στο διάλυμα δείγματος. Η ένταση των εκπομπών αντιστοιχεί με τη συγκέντρωση του στοιχείου που έχει εντοπιστεί (Velez, 2009).

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της μεθόδους ICP είναι ότι μπορεί να αναλύσει πολλαπλά στοιχεία σε ένα χρόνο με χαμηλό όριο ανίχνευσης που φτάνει συνήθως τα νανογραμμάρια ανά λίτρο. Στα μειονεκτήματά της μεθόδου συγκαταλέγονται η ευαισθησία της λόγω παρεμβολών κάποιων στοιχείων (Barin και συν.,2016, Velez, 2009).

Για τον έλεγχο της πιθανής κυτταροτοξικότητας, με φασματομετρία ατομικής εκπομπής σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα,έγινε έλεγχος της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου (Ca), πυριτίου (Si), φωσφόρου (P), ψευδαργύρου (Zn), μαγνησίου (Mg), χρωμίου (Cr), κοβαλτίου (Co),χαλκού (Cu), σιδήρου (Fe), νικελίου (Ni), μολυβδου (Pb) των εκχυλισμάτων στα θρεπτικά ελέγχου σε μία (DAY 1) και τρεις μέρες (DAY 3)συλλογής. Στο συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολλο, τα δοκίμια του υλικού της πειραματικής ομάδας Control και Thermo τοποθετήθηκαν μέσα σε falcon και προστέθηκε θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των κυττάρων DMEM. Το θρεπτικό συλλέχθηκε ύστερα από 24ώρες (DAY 1) και από 72ωρες (DAY 3) και πραγματοποιήθηκε αραιώση (1/20) με δις απεσταγμένο νερό. Για τον κάθε χρόνο ελέγχου (DAY 1, DAY 3)

χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας μόνο θρεπτικό υλικό χωρίς να έχει προστεθεί κάποιο δοκίμιο (πίνακας Β7).

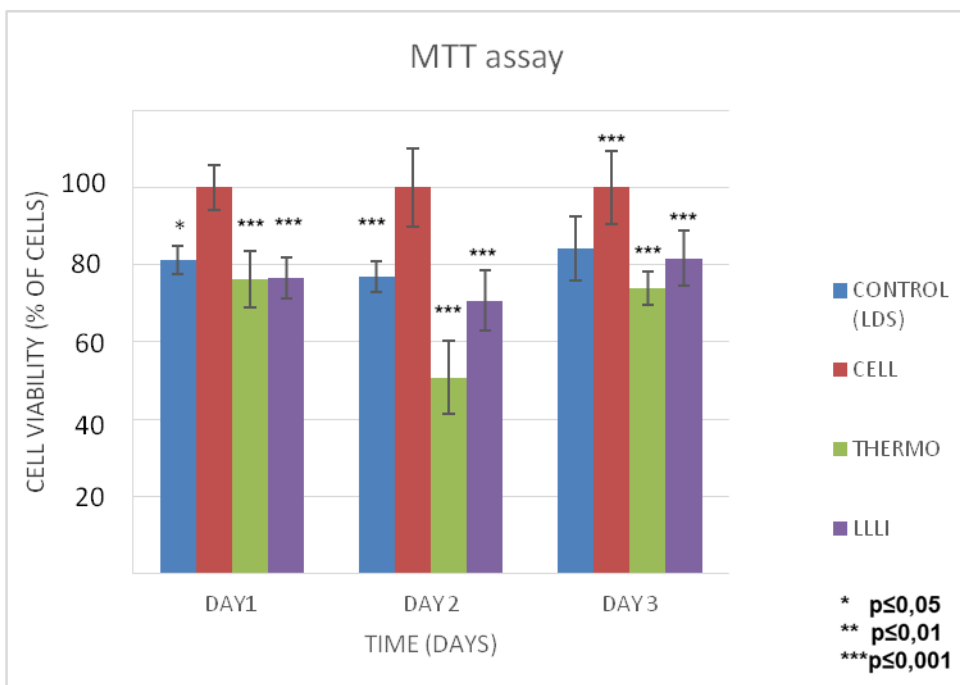
|               |                      |                 |           |
|---------------|----------------------|-----------------|-----------|
| ΔΕΙΓΜΑ 1      | THERMO               | 1/20<br>ΔΙΑΛ/ΜΑ | ΑΡΑΙΩΜΕΝΟ |
| ΔΕΙΓΜΑ 2      | THERMO               | 1/20<br>ΔΙΑΛ/ΜΑ | ΑΡΑΙΩΜΕΝΟ |
| ΔΕΙΓΜΑ 3      | CONTROL              | 1/20<br>ΔΙΑΛ/ΜΑ | ΑΡΑΙΩΜΕΝΟ |
| ΔΕΙΓΜΑ 4      | CONTROL              | 1/20<br>ΔΙΑΛ/ΜΑ | ΑΡΑΙΩΜΕΝΟ |
| ΔΙΑΛΥΤΗΣ      | DMEM                 |                 |           |
| ΜΕΣΟ ΑΡΑΙΩΣΗΣ | Δις ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΝΕΡΟ |                 |           |

Πίνακας Β7: Δείγματα για φασματομετρία ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα

## Γ) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Γ1) Δοκιμασίες ελέγχου κυτταροτοξικότητας-Δοκιμασία MTT

Τα αποτελέσματα των τριών πειραμάτων για τις τρεις κατηγορίες δοκιμών (Control, Thermo, Thermo+LLLI) και τους τρεις χρόνους ελέγχου (24 h-DAY1, 48h-DAY2, 72h-DAY3) παρατίθενται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα Γ1α) (Πίνακας τιμών αποτελεσμάτων Παράρτημα).

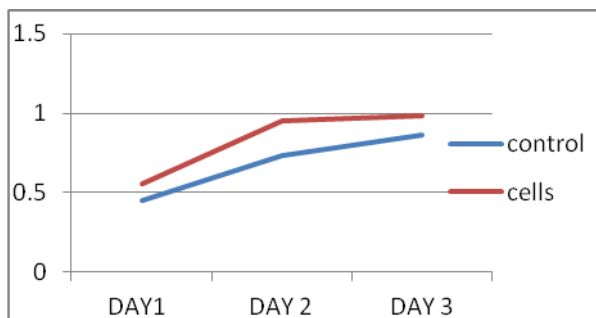


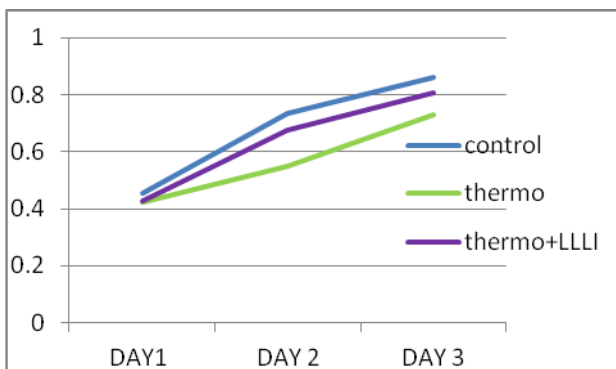
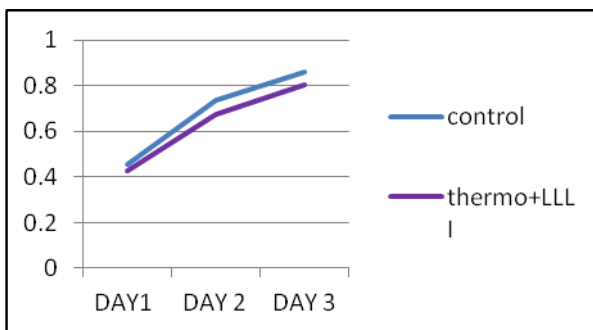
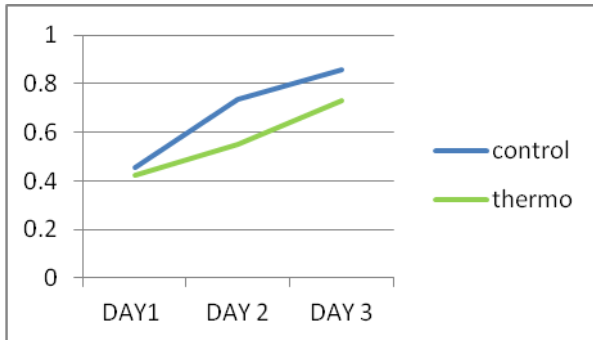
Διάγραμμα Γ 1α: Ποσοτικοποίηση αποτελεσμάτων δοκιμασίας MTT

Παρατηρείται πολλαπλασιασμός των κυττάρων και αύξηση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας σε όλες τις εξεταζόμενες ομάδες καθώς αυξάνεται ο χρόνος ελέγχου. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε πως και για τους τρεις χρόνους ελέγχου τα κύτταρα στα οποία δεν τοποθετήθηκαν δοκίμια παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη μιτοχονδριακή δραστηριότητα. Η μιτοχονδριακή δραστηριότητα των ινοβλαστών μειώνεται όταν στα κύτταρα τοποθετούνται δείγματα γεγονός

που υποδηλώνει τη πιθανή κυτταροτοξική δράση του υλικού σε αυτά. Περαιτέρω μείωση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας παρατηρείται στις ομάδες των κυττάρων που έχουν τοποθετηθεί δείγματα που υπέστησαν κυκλικά επαναλαμβανόμενη θερμική καταπόνηση η οποία είναι και η μικρότερη συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες. Η μιτοχονδριακή δραστηριότητα ενισχύεται όταν οι ομάδες των κυττάρων με δείγματα που έχουν υποστεί κυκλικά επαναλαμβανόμενη θερμική καταπόνηση ακτινοβοληθούν με λέιζερ χαμηλής ενέργειας γεγονός που αποτελεί ένδειξη της διεγερτικής επίδρασης του λέιζερ χαμηλής ενέργειας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Τα παραπάνω συμπεράσματα γίνονται επίσης εμφανή και από τα ακόλουθα γραμμικά διαγράμματα (Διαγράμματα Γ1β) όπου απεικονίζονται συγκριτικά ο αριθμός των κυττάρων από τις ομάδες Thermo και Thermo+LLLI με την ομάδα Control. Αξιοσημείωτη είναι η παράλληλη αυξητική τάση της ομάδας Thermo+LLLI σε σχέση με την ομάδα Control καθώς παρουσιάζουν τιμές αρκετά κοντά στις αρχικές τιμές της ομάδας Control.





Διαγράμματα Γ1β: Γραμμικά διαγράμματα αποτελεσμάτων MTT

#### Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Για τον έλεγχο της επίδρασης των παραγόντων Ομάδα (Group) και Ημέρα (DAY) στις μέσες τιμές της εξαρτημένης μεταβλητής (Οπτική Πυκνότητα-Optimal Density) έγινε χρήση των Γραμμικών Μοντέλων Μικτών Επιδράσεων (Pinheiro

και Bates, 2006) (Linear Mixed Effects-LME) που αποτελούν μία στατιστική μεθοδολογία για την εξέταση όσο των σταθερών (fixed) όσο και των τυχαίων (random) επιδράσεων. Η βέλτιστη δομή των σταθερών όρων ορίστηκε με βάση την προτεινόμενη μεθοδολογία των Zuur και συν. (2009). Σε κάθε μοντέλο έγινε αρχικά έλεγχος για την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής αλληλεπίδρασης (interaction) μεταξύ των δύο παραγόντων (Ομάδα×Ημέρα) αλλά και των κύριων επιδράσεων (main effects) των δύο παραγόντων (Ομάδα και Ημέρα) στην υπό μελέτη μεταβλητή συγκρίνοντας τα δύο μοντέλα (μοντέλο με τις κύριες επιδράσεις συμπεριλαμβανομένου του όρου αλληλεπίδρασης με το μοντέλο που περιλαμβάνει μόνο τις κύριες επιδράσεις) με τη βοήθεια του στατιστικού ελέγχου Likelihood Ratio (LR). Τέλος, ελέχθησαν με γραφικό τρόπο οι υποθέσεις ομοιογένειας και κανονικότητας των υπολοίπων του τελικού μοντέλου.

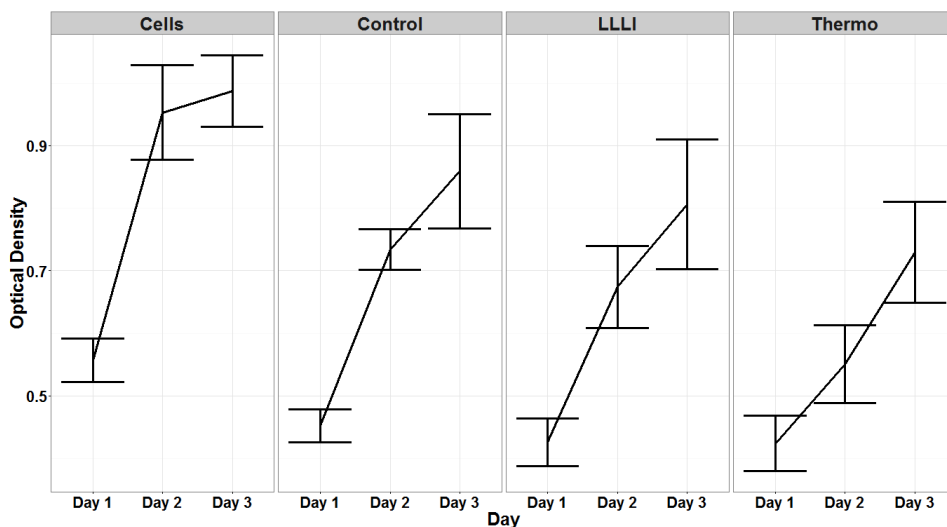
Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη γλώσσα στατιστικού προγραμματισμού R και της συνάρτησης lme του πακέτου nlme (R Core Team 2013, Pinheiro και Bates, 2006). Επιπρόσθετα, έγινε χρήση του ελέγχου Tukey's HSD για την πραγματοποίηση των post-hoc ελέγχων ώστε να διορθωθεί το σφάλμα τύπου I μέσω της συνάρτησης glht του πακέτου multcomp (Bretz και συν., 2016). Όλοι οι έλεγχοι ήταν δίπλευροι (χωρίς κατεύθυνση) ορίζοντας ως όριο αποδοχής/απόρριψης της μηδενικής υπόθεσης το επίπεδο  $\alpha = 0.05$ .

Αρχικά, παρουσιάζονται τα περιγραφικά στατιστικά για την εξαρτημένη μεταβλητή μέσω της βοήθειας της μέσης τιμής (M), της τυπικής απόκλισης (T.A.), της διαμέσου (Δ), του ελάχιστου (Ελ.) και του μέγιστου (Μεγ.) (Πίνακας Γ1α).

Για την οπτική σύγκριση, κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα μέσω των τιμών μαζί με τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (Confidence Intervals-CIs) (Διάγραμμα Γ1γ).

| Ομάδα   | Ημέρα   | <i>N</i> | <i>M</i> | <i>T.A.</i> | <i>Δ</i> | <i>Ελ.</i> | <i>Μεγ.</i> |
|---------|---------|----------|----------|-------------|----------|------------|-------------|
| Cells   | Ημέρα 1 | 12       | 0.56     | 0.05        | 0.55     | 0.47       | 0.64        |
|         | Ημέρα2  | 12       | 0.95     | 0.12        | 0.92     | 0.81       | 1.14        |
|         | Ημέρα3  | 12       | 0.99     | 0.09        | 0.96     | 0.88       | 1.11        |
|         | Σύνολο  | 36       | 0.83     | 0.22        | 0.89     | 0.47       | 1.14        |
| Control | Ημέρα 1 | 12       | 0.45     | 0.04        | 0.45     | 0.37       | 0.52        |
|         | Ημέρα 2 | 12       | 0.73     | 0.05        | 0.74     | 0.66       | 0.81        |
|         | Ημέρα 3 | 12       | 0.86     | 0.14        | 0.86     | 0.66       | 1.14        |
|         | Σύνολο  | 36       | 0.68     | 0.19        | 0.72     | 0.37       | 1.14        |
| LLLI    | Ημέρα 1 | 12       | 0.43     | 0.06        | 0.41     | 0.37       | 0.53        |
|         | Ημέρα 2 | 12       | 0.67     | 0.10        | 0.67     | 0.53       | 0.83        |
|         | Ημέρα 3 | 12       | 0.81     | 0.16        | 0.81     | 0.60       | 1.11        |
|         | Σύνολο  | 36       | 0.64     | 0.20        | 0.61     | 0.37       | 1.11        |
| Thermo  | Ημέρα 1 | 12       | 0.42     | 0.07        | 0.43     | 0.31       | 0.56        |
|         | Ημέρα 2 | 12       | 0.55     | 0.10        | 0.51     | 0.43       | 0.75        |
|         | Ημέρα 3 | 12       | 0.73     | 0.13        | 0.75     | 0.57       | 0.95        |
|         | Σύνολο  | 36       | 0.57     | 0.16        | 0.53     | 0.31       | 0.95        |

Πίνακας Γ1α :Μέτρα περιγραφικής στατιστικής Οπτικής Πυκνότητας



Διάγραμμα Γ1γ:Διάγραμμα μέσων τιμών με τα 95% ΔΕ Οπτικής Πυκνότητας



Τα αποτελέσματα του στατιστικού ελέγχου LR φανέρωσαν την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής αλληλεπίδρασης των παραγόντων Ομάδα και Ημέρα,  $\chi^2(6) = 40.299$ ,  $p \leq 0.001$  και ο όρος αλληλεπίδρασης παρέμεινε στο τελικό μοντέλο. Στον Πίνακα Γ1β παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ελέγχων Wald για τις παραμέτρους του LME μοντέλου, στο οποίο οι κατηγορίες αναφοράς για τους παράγοντες Ομάδα και Ημέρα είναι οι κατηγορίες Cells και Ημέρα 1, αντίστοιχα. Οι γραφικοί τρόποι αξιολόγησης του LME μοντέλου δεν υπέδειξαν παραβιάσεις των υποθέσεων ομοσκεδαστικότητας και κανονικότητας των υπολοίπων.

Τα αποτελέσματα (Πίνακας Γ1β) υποδεικνύουν την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής κύριας επίδρασης των παραγόντων Ομάδα  $F(3, 130) = 86.024$ ,  $***p \leq 0.001$  και Ημέρα  $F(2, 130) = 346.011$ ,  $***p \leq 0.001$  στη μεταβλητή Οπτική Πυκνότητα. Σημαντικότερο εύρημα όμως είναι ότι το μοντέλο φανέρωσε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση των παραγόντων Ομάδα και Ημέρα,  $F(6, 130) = 7.168$ ,  $***p \leq 0.001$ . Ερμηνεύοντας τον όρο αλληλεπίδρασης, το συμπέρασμα που εξάγεται είναι ότι οι διαφορές στις μέσες τιμές των μετρήσεων Οπτική Πυκνότητα για τον παράγοντα Ομάδα εξαρτάται από τα επίπεδα του παράγοντα Ημέρα.

| Παράμετρος | Σταθερές Επιδράσεις |           |                 |                | Εκτιμήσεις παραμέτρων σταθερών επιδράσεων |           |     |            |                |
|------------|---------------------|-----------|-----------------|----------------|---|-----------|-----|------------|----------------|
|            | Nu<br>md<br>f       | Den<br>df | F               | P              | Εκτίμη<br>ση                              | SE        | df  | t          | p              |
| Σταθερά    | 1                   | 130       | 20<br>3.0<br>71 | <<br>0.0<br>01 | 0.557                                     | 0.05<br>2 | 130 | 10.76<br>9 | <<br>0.00<br>1 |
| Ομάδα      | 3                   | 130       | 86.<br>02       | <<br>0.0       |   |           |     |            |                |

|                             |   |     |                 |                |        |           |     |            |           |
|-----------------------------|---|-----|-----------------|----------------|--------|-----------|-----|------------|-----------|
|                             |   |     | 4               | 01             |        |           |     |            |           |
| Ημέρα                       | 2 | 130 | 34<br>6.0<br>11 | <<br>0.0<br>01 |        |           |     |            |           |
| Ομάδα×Ημέρα                 | 6 | 130 | 7.1<br>68       | <<br>0.0<br>01 |        |           |     |            |           |
| Ομάδα:Control               |   |     |                 |                | -0.104 | 0.03<br>0 | 130 | -<br>3.526 | 0.00<br>1 |
| Ομάδα:LLLI                  |   |     |                 |                | -0.131 | 0.03<br>0 | 130 | -<br>4.415 | 0.00<br>0 |
| Ομάδα:Thermo                |   |     |                 |                | -0.133 | 0.03<br>0 | 130 | -<br>4.485 | 0.00<br>0 |
| Ημέρα:Ημέρα 2               |   |     |                 |                | 0.396  | 0.03<br>0 | 130 | 13.36<br>8 | 0.00<br>0 |
| Ημέρα:Ημέρα 3               |   |     |                 |                | 0.430  | 0.03<br>0 | 130 | 14.52<br>7 | 0.00<br>0 |
| Ομάδα:Control×Ημέρα:Ημέρα 2 |   |     |                 |                | -0.115 | 0.04<br>2 | 130 | -<br>2.740 | 0.00<br>7 |
| Ομάδα:LLLI×Ημέρα:Ημέρα 2    |   |     |                 |                | -0.148 | 0.04<br>2 | 130 | -<br>3.532 | 0.00<br>1 |
| Ομάδα:Thermo×Ημέρα:Ημέρα 2  |   |     |                 |                | -0.269 | 0.04<br>2 | 130 | -<br>6.432 | 0.00<br>0 |
| Ομάδα:Control×Ημέρα:Ημ      |   |     |                 |                | -0.024 | 0.04<br>2 | 130 | -<br>0.573 | 0.56<br>8 |

|                                    |  |  |  |  |        |           |     |            |           |
|------------------------------------|--|--|--|--|--------|-----------|-----|------------|-----------|
| έρα 3                              |  |  |  |  |        |           |     |            |           |
| Ομάδα:LLLl×<br>Ημέρα:Ημέρ<br>α 3   |  |  |  |  | -0.050 | 0.04<br>2 | 130 | -<br>1.204 | 0.23<br>1 |
| Ομάδα:Ther<br>μο×Ημέρα:H<br>μέρα 3 |  |  |  |  | -0.125 | 0.04<br>2 | 130 | -<br>2.984 | 0.00<br>3 |

Πίνακας Γ1β:Μοντέλο LME για την εξαρτημένη μεταβλητή Οπτική Πυκνότητα με τις σταθερές επιδράσεις των παραγόντων Ομάδα, Ημέρα και τον όρο αλληλεπίδρασης Ομάδα×Ημέρα

Εξαιτίας της ύπαρξης αλληλεπίδρασης των παραγόντων, διεξήχθη post-hoc ανάλυση με τη βοήθεια του στατιστικού ελέγχου Tukey HSD ώστε να διερευνηθεί η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς στους συνδυασμούς των επιπέδων των δύο παραγόντων Ομάδα και Ημέρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα Γ1γ.

Παρατηρείται αύξηση της οπτικής πυκνότητας και επομένως και της μεταβολικής δραστηριότητας στους συνδυασμούς όπου παραμένει ίδια η μεταβλητή Ομάδα και διαφοροποιείται ο παράγοντας Ημέρα. Συγκεκριμένα η αύξηση που παρατηρείται είναι στατιστικά σημαντική (\*\*\*)  $p \leq 0,001$  τόσο μεταξύ Ημέρας 1 και Ημέρας 2, όσο και μεταξύ Ημέρας 2 και Ημέρας 3 σε όλες τις ομάδες με εξαίρεση το συνδυασμό Cells.Ημέρα 3 - Cells.Ημέρα 2 όπου  $p = 0,992$ . Εξετάζοντας τους συνδυασμούς όπου παραμένει σταθερός ο παράγοντας Ημέρα και διαφοροποιείται ο παράγοντας Ομάδα έχουμε τα εξής αποτελέσματα:

- Στον συνδυασμό Control-Cells παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της οπτικής πυκνότητας από την Ομάδα Cells στην Ομάδα Control στους χρόνους παρακολούθησης DAY 2, DAY 3 (\*\*\* $p \leq 0,001$ ).
- Στον συνδυασμό Thermo- Control παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της οπτικής πυκνότητας από την Ομάδα Control στην Ομάδα Thermo στους χρόνους παρακολούθησης DAY 2, DAY 3 και στο συνδυασμό Thermo-Cells από την Ομάδα Cells στην Ομάδα Thermo για όλους τους χρόνους παρακολούθησης (\*\*\* $p \leq 0,001$ ).
- Στο συνδυασμό Thermo-LLLI παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση της οπτικής πυκνότητας από την ομάδα LLLI στην ομάδα Thermo στο χρόνο παρακολούθησης DAY 2 (\*\* $p \leq 0,01$ ).
- Τέλος μη στατιστικά σημαντική είναι η διαφορά των τιμών οπτικής πυκνότητας στο συνδυασμό LLLI-Control όπου οι τιμές της οπτικής πυκνότητας της ομάδας LLLI είναι μικρότερες των τιμών της ομάδας Control για όλες τις ημέρες ελέγχου ( $p > 0,05$ ).

| Σύγκριση                        | Εκτίμηση | p          |
|---------------------------------|----------|------------|
| Control.Ημέρα 1 - Cells.Ημέρα 1 | -0.104   | 0.022*     |
| LLLI.Ημέρα 1 - Cells.Ημέρα 1    | -0.131   | 0.001****  |
| Thermo.Ημέρα 1 - Cells.Ημέρα 1  | -0.133   | < 0.001*** |
| Cells.Ημέρα 2 - Cells.Ημέρα 1   | 0.396    | < 0.001    |
| Control.Ημέρα 2 - Cells.Ημέρα 1 | 0.177    | < 0.001    |
| LLLI.Ημέρα 2 - Cells.Ημέρα 1    | 0.117    | 0.004      |
| Thermo.Ημέρα 2 - Cells.Ημέρα 1  | -0.006   | 1.000      |
| Cells.Ημέρα 3 - Cells.Ημέρα 1   | 0.430    | < 0.001    |
| Control.Ημέρα 3 - Cells.Ημέρα 1 | 0.302    | < 0.001    |
| LLLI.Ημέρα 3 - Cells.Ημέρα 1    | 0.249    | < 0.001    |
| Thermo.Ημέρα 3 - Cells.Ημέρα 1  | 0.172    | < 0.001    |
| LLLI.Ημέρα 1 - Control.Ημέρα 1  | -0.026   | 0.999      |

|                                   |        |            |
|-----------------------------------|--------|------------|
| Thermo.Ημέρα 1 - Control.Ημέρα 1  | -0.028 | 0.998      |
| Cells.Ημέρα 2 - Control.Ημέρα 1   | 0.500  | < 0.001    |
| Control.Ημέρα 2 - Control.Ημέρα 1 | 0.281  | < 0.001    |
| LLLI.Ημέρα 2 - Control.Ημέρα 1    | 0.222  | < 0.001    |
| Thermo.Ημέρα 2 - Control.Ημέρα 1  | 0.098  | 0.044      |
| Cells.Ημέρα 3 - Control.Ημέρα 1   | 0.535  | < 0.001    |
| Control.Ημέρα 3 - Control.Ημέρα 1 | 0.406  | < 0.001    |
| LLLI.Ημέρα 3 - Control.Ημέρα 1    | 0.354  | < 0.001    |
| Thermo.Ημέρα 3 - Control.Ημέρα 1  | 0.277  | < 0.001    |
| Thermo.Ημέρα 1 - LLLI.Ημέρα 1     | -0.002 | 1.000      |
| Cells.Ημέρα 2 - LLLI.Ημέρα 1      | 0.527  | < 0.001    |
| Control.Ημέρα 2 - LLLI.Ημέρα 1    | 0.308  | < 0.001    |
| LLLI.Ημέρα 2 - LLLI.Ημέρα 1       | 0.248  | < 0.001    |
| Thermo.Ημέρα 2 - LLLI.Ημέρα 1     | 0.124  | 0.002      |
| Cells.Ημέρα 3 - LLLI.Ημέρα 1      | 0.561  | < 0.001    |
| Control.Ημέρα 3 - LLLI.Ημέρα 1    | 0.433  | < 0.001    |
| LLLI.Ημέρα 3 - LLLI.Ημέρα 1       | 0.380  | < 0.001    |
| Thermo.Ημέρα 3 - LLLI.Ημέρα 1     | 0.303  | < 0.001    |
| Cells.Ημέρα 2 - Thermo.Ημέρα 1    | 0.529  | < 0.001    |
| Control.Ημέρα 2 - Thermo.Ημέρα 1  | 0.310  | < 0.001    |
| LLLI.Ημέρα 2 - Thermo.Ημέρα 1     | 0.250  | < 0.001    |
| Thermo.Ημέρα 2 - Thermo.Ημέρα 1   | 0.126  | 0.001      |
| Cells.Ημέρα 3 - Thermo.Ημέρα 1    | 0.563  | < 0.001    |
| Control.Ημέρα 3 - Thermo.Ημέρα 1  | 0.435  | < 0.001    |
| LLLI.Ημέρα 3 - Thermo.Ημέρα 1     | 0.382  | < 0.001    |
| Thermo.Ημέρα 3 - Thermo.Ημέρα 1   | 0.305  | < 0.001    |
| Control.Ημέρα 2 - Cells.Ημέρα 2   | -0.219 | < 0.001*** |
| LLLI.Ημέρα 2 - Cells.Ημέρα 2      | -0.279 | < 0.001*** |
| Thermo.Ημέρα 2 - Cells.Ημέρα 2    | -0.402 | < 0.001*** |
| Cells.Ημέρα 3 - Cells.Ημέρα 2     | 0.034  | 0.992      |
| Control.Ημέρα 3 - Cells.Ημέρα 2   | -0.094 | 0.065      |
| LLLI.Ημέρα 3 - Cells.Ημέρα 2      | -0.147 | < 0.001    |
| Thermo.Ημέρα 3 - Cells.Ημέρα 2    | -0.223 | < 0.001    |

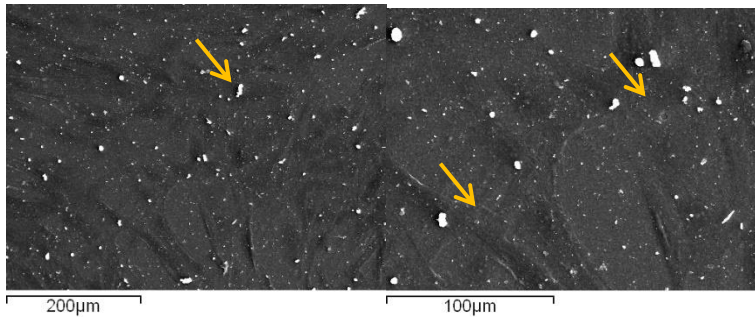
|                                   |        |            |
|-----------------------------------|--------|------------|
| LLLI.Ημέρα 2 - Control.Ημέρα 2    | -0.060 | 0.688      |
| Thermo.Ημέρα 2 - Control.Ημέρα 2  | -0.183 | 0.000      |
| Cells.Ημέρα 3 - Control.Ημέρα 2   | 0.253  | < 0.001    |
| Control.Ημέρα 3 - Control.Ημέρα 2 | 0.125  | < 0.001    |
| LLLI.Ημέρα 3 - Control.Ημέρα 2    | 0.072  | 0.377      |
| Thermo.Ημέρα 3 - Control.Ημέρα 2  | -0.004 | 1.000      |
| Thermo.Ημέρα 2 - LLLI.Ημέρα 2     | -0.124 | 0.002      |
| Cells.Ημέρα 3 - LLLI.Ημέρα 2      | 0.313  | < 0.001    |
| Control.Ημέρα 3 - LLLI.Ημέρα 2    | 0.185  | < 0.001    |
| LLLI.Ημέρα 3 - LLLI.Ημέρα 2       | 0.132  | 0.001      |
| Thermo.Ημέρα 3 - LLLI.Ημέρα 2     | 0.055  | 0.782      |
| Cells.Ημέρα 3 - Thermo.Ημέρα 2    | 0.437  | < 0.001    |
| Control.Ημέρα 3 - Thermo.Ημέρα 2  | 0.308  | < 0.001    |
| LLLI.Ημέρα 3 - Thermo.Ημέρα 2     | 0.255  | < 0.001    |
| Thermo.Ημέρα 3 - Thermo.Ημέρα 2   | 0.179  | < 0.001    |
| Control.Ημέρα 3 - Cells.Ημέρα 3   | -0.128 | 0.001***   |
| LLLI.Ημέρα 3 - Cells.Ημέρα 3      | -0.181 | < 0.001*** |
| Thermo.Ημέρα 3 - Cells.Ημέρα 3    | -0.258 | < 0.001*** |
| LLLI.Ημέρα 3 - Control.Ημέρα 3    | -0.053 | 0.829      |
| Thermo.Ημέρα 3 - Control.Ημέρα 3  | -0.129 | 0.001      |
| Thermo.Ημέρα 3 - LLLI.Ημέρα 3     | -0.077 | 0.285      |

Πίνακας Γ1γ:Post-hoc ανάλυση LME μοντέλου για την αλληλεπίδραση των παραγόντων Ομάδα×Ημέρα

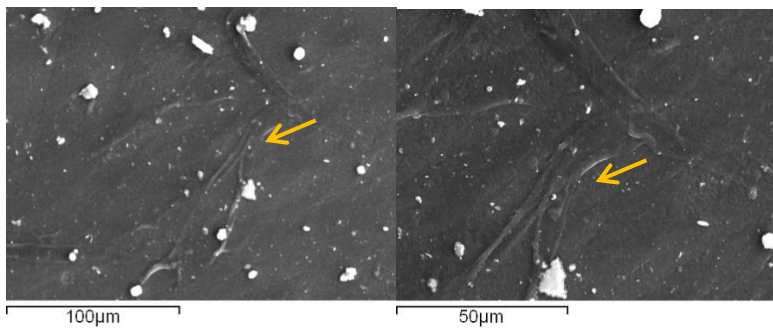
## Γ2) Μελέτη μικροφωτογραφιών με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

Εικόνες των κυττάρων που επωάστηκαν για 48 ώρες σε άμεση επαφή με τις τρεις ομάδες των δοκιμίων.

Κύτταρα σε άμεση επαφή με δείγμα που δεν έχει υποστεί καμία κατεργασία (Control)



1α,β:Μικροφωτογραφίες SEM επιφάνειας δοκιμών (Control) σε καλλιέργεια ουλικών ινοβλαστών

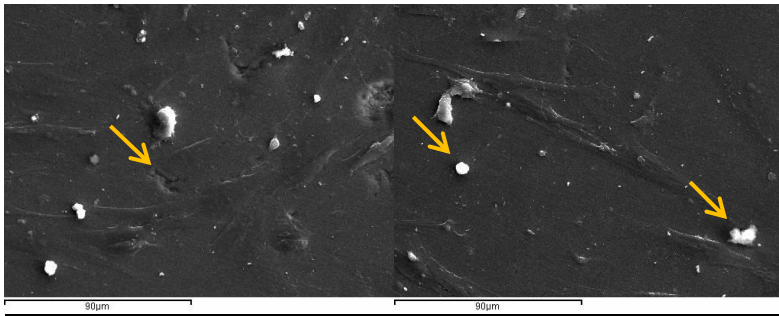


1γ,δ:Μικροφωτογραφίες SEM επιφάνειας δοκιμών (Control) σε καλλιέργεια ουλικών ινοβλαστών

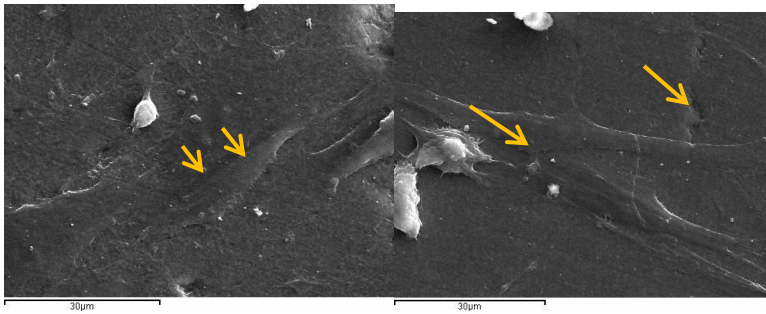
Στις μικροφωτογραφίες των δειγμάτων με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) τα δοκίμια εμφανίζουν λεία επιφάνεια ενώ τα άσπρα σωματίδια είναι κόκκοι άνθρακα που προέκυψαν κατά τη διαδικασία της απανθράκωσης (1α, 1β). Στην επιφάνεια του υλικού που δεν έχει υποστεί καμία επεξεργασία διαπιστώνεται η ύπαρξη διάσπαρτων κυττάρων. Στις μεγαλύτερες μεγεθύνσεις καταγράφεται η τυπική μορφολογία των ουλικών ινοβλαστων με το επίμηκες ή ατρακτοειδές σχήμα τους. Τα κύτταρα αυτά φαίνεται να

διαπλέκονται μεταξύ τους με τις χαρακτηριστικές κυτταροπλασματικές προσεκβολές (αποφυάδες), όπως σημειώνεται στη μικροφωτογραφία(1δ).

Κύτταρα σε άμεση επαφή με δείγμα που έχει υποστεί κυκλικά επαναλαμβανόμενη θερμική καταπόνηση (Thermo)



2α,β: Μικροφωτογραφίες SEM επιφάνειας δοκιμίων (Thermo) σε καλλιέργεια ουλικών ινοβλαστών



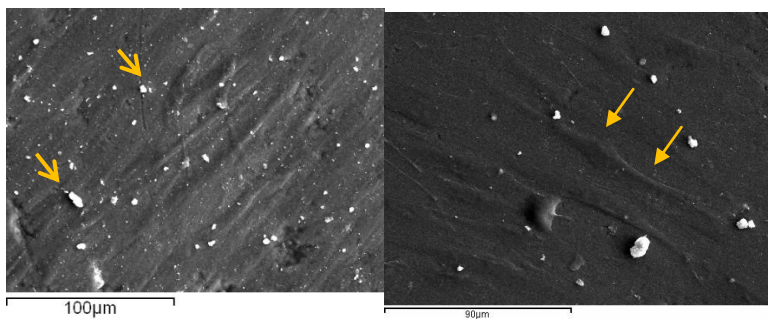
2γ,δ: Μικροφωτογραφίες SEM επιφάνειας δοκιμίων (Thermo) σε καλλιέργεια ουλικών ινοβλαστών

Στις μικροφωτογραφίες με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) των δοκιμίων που έχουν υποστεί κυκλικά επαναλαμβανόμενη θερμική καταπόνηση διαπιστώνεται η λεία επιφάνεια του υλικού ενώ κατά τόπους παρατηρούνται ρωγμές (2α, 2δ). Ασπρα σωματίδια άνθρακα, λόγω της επανθράκωσης, εντοπίζονται στις επιφάνειες τους (2β). Εντοπίζονται επίσης κύτταρα σε επιμέρους σημεία του δείγματος με μορφολογία ουλικών

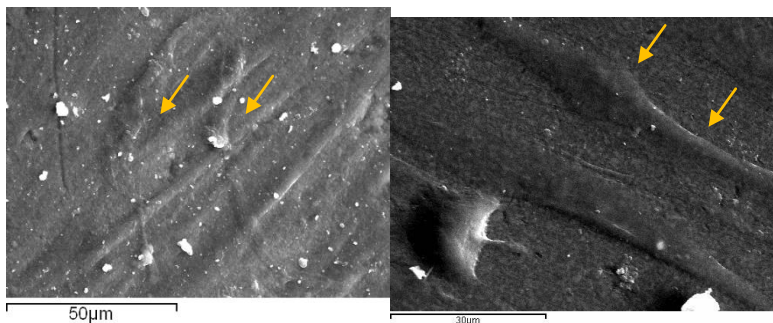


ινοβλαστών αλλά πιο αποπλατυσμένα σε σχέση με το χαρακτηριστικό επίμηκες σχήμα τους (2γ). Στις κατά τόπους περιοχές που εντοπίζονται φαίνεται να συνδέονται μεταξύ τους μέσω των κυτταρικών αποφυάδων όπως σημειώνεται στη μικροφωτογραφία (2δ).

Κύτταρα σε άμεση επαφή με δείγμα που έχει υποστεί κυκλικά επαναλαμβανόμενη θερμική καταπόνηση και έχουν ακτινοβοληθεί με λέιζερ χαμηλής ενέργειας (Thermo+LLLI)



3α,β: Μικροφωτογραφίες SEM επιφάνειας δοκιμίων (Thermo+LLLI) σε καλλιέργεια ουλικών ινοβλαστών

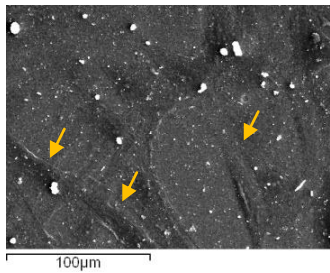


3γ,δ: Μικροφωτογραφίες SEM επιφάνειας δοκιμίων (Thermo+LLLI) σε καλλιέργεια ουλικών ινοβλαστών

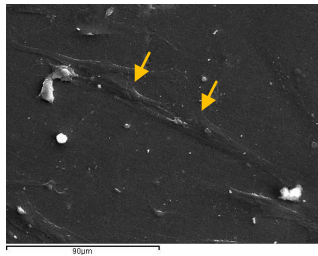
Στις μικροφωτογραφίες με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) δοκιμίων έχει υποστεί κυκλικά επαναλαμβανόμενη θερμική καταπόνηση και έχουν ακτινοβοληθεί με λέιζερ χαμηλής ενέργειας διαπιστώνεται και πάλι η λεία

επιφάνεια των δοκιμίων και άσπρα σωματίδια άνθρακα που οφείλονται στην επανθράκωση (3α). Η ύπαρξη των κυττάρων είναι εμφανής από τις μικρότερες μεγεθύνσεις, ενώ σε μεγαλύτερες μεγεθύνσεις διαπιστώνεται η σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους σχηματίζοντας δίκτυο στην επιφάνεια του υλικού (3γ). Τα κύτταρα παρουσιάζουν την τυπική μορφολογία των ουλικών ινοβλαστων με ατρακτοειδες σχήμα και προσεκβολές (3β,δ).

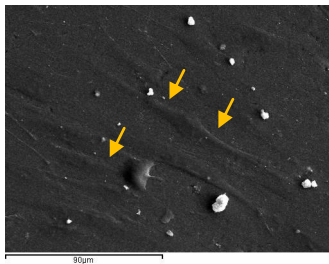
Συγκριτική μελέτη μικροφωτογραφιών με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)



A



B



Γ

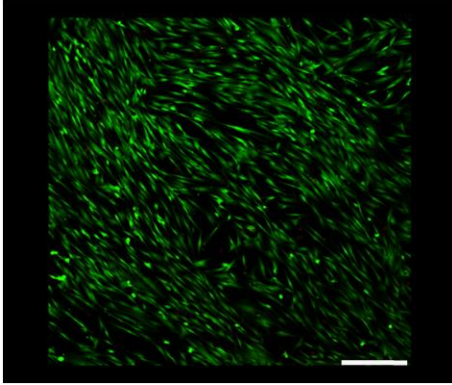
4 A,B,Γ:ηλεκτρονική μικροφωτογραφία (SEM) της επιφάνειας των δοκιμίων διυριτικού λιθίου της ομάδας Control (A), Thermo(B), Thermo+LLLI(Γ)

Παρατηρώντας μικροφωτογραφίες αντίστοιχων μεγεθύνσεων των τριών ομάδων(A,B,Γ) δειγμάτων εντοπίζονται σε όλες κύτταρα στην επιφάνεια των δοκιμίων.Στα δοκίμια που δεν έχουν υποστεί καμία εργασία (A) τα κύτταρα εντοπίζονται διάσπαρτα και διατηρούν το τυπικό επίμηκες σχήμα τους. Τα

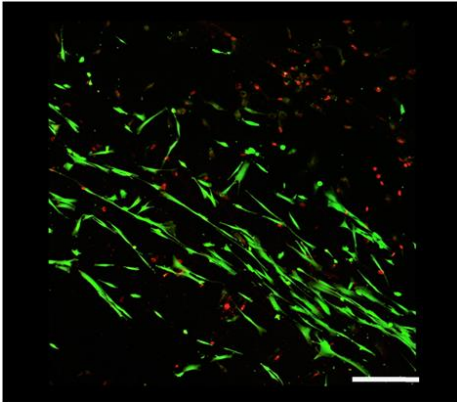
δοκίμια που έχουν υποστεί κυκλικά επαναλαμβανόμενη θερμική καταπόνηση και έχουν ακτινοβοληθεί με λέιζερ χαμηλής ενέργειας (Γ) εντοπίζονται κύτταρα που συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας δίκτυο διατηρώντας τη χαρακτηριστική τους μορφολογία. Αντίθετα τα δοκίμια που έχουν υποστεί κυκλικά επαναλαμβανόμενη θερμική καταπόνηση (Β) εντοπίζονται κύτταρα κατά τόπους που εμφανίζονται πιο αποπλατυσμένα. Κατά την ποιοτική αξιολόγηση των μικροφωτογραφιών θα μπορούσε να παρατηρηθεί η διάσπαρτη παρουσία κυττάρων με τυπική μορφολογία και ο σχηματισμός δικτύου τόσο στα δείγματα αναφοράς αλλά και σε αυτά που υπέστησαν κυκλικά επαναλαμβανόμενη θερμική καταπόνηση και ακτινοβολήση(Α,Γ). Αντίθετα στην επιφάνεια των δοκιμίων που δεν πραγματοποιήθηκε ακτινοβολήση, αλλά μόνο κυκλικά επαναλαμβανόμενη θερμική καταπόνηση η κυτταρική μορφολογία είναι διαφοροποιημένη και η εντόπιση τους πιο διάσπαρτη.

### **Γ3) Μελέτη φωτογραφιών με μικροσκοπία συνεστιακής δέσμης (CONFOCAL)**

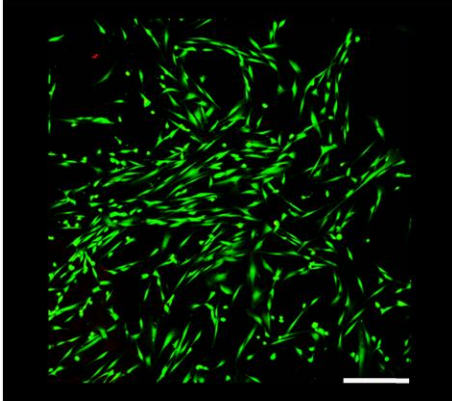
Από τη μελέτη των φωτογραφιών με μικροσκοπία συνεστιακής δέσμης (CONFOCAL) στα δείγματα της ομάδας Control παρατηρούμε πληθώρα ζωντανών κυττάρων πάνω στο δείγμα ενώ με δυσκολία ανιχνεύουμε πολύ λίγα νεκρά κύτταρα (κόκκινο φθορίζον χρώμα) (Εικόνα Γ3α). Η εικόνα αυτή διαφοροποιείται στην ομάδα Thermo όπου η ύπαρξη ζωντανών κυττάρων είναι σαφώς μικρότερη ενώ παράλληλα γίνονται εμφανή τα νεκρά κύτταρα με το κόκκινο χρώμα (Εικόνα Γ3β). Το πλήθος των ζωντανών κυττάρων φαίνεται να είναι αυξημένο στην ομάδα Thermo+LLLI σε σύγκριση με αυτή της ομάδας Thermo. Παράλληλα παρατηρούμε πως το πράσινο φθορίζον χρώμα είναι πιο έντονο στη φωτογραφία των κυττάρων που ακτινοβολήθηκαν με LLLI σε σχέση με τις φωτογραφίες των ομάδων που δεν ακτινοβολήθηκαν (Control και Thermo).



Εικόνα Γ3α:Φωτογραφία με μικροσκοπία ομοεστιακής δέσμης για την ομάδα Control (μεγέθυνση X100) (μπάρα κλίμακας αντιστοιχεί σε 200μm)



Εικόνα Γ3β:Φωτογραφία με μικροσκοπία ομοεστιακής δέσμης για την ομάδα Thermo (μεγέθυνση X100) (μπάρα κλίμακας αντιστοιχεί σε 200μm)



Εικόνα Γ3γ:Φωτογραφία με μικροσκοπία ομοεστιακής δέσμης για την ομάδα Thermo+LLLLL (μεγέθυνση Χ100) (μπάρα κλίμακας αντιστοιχεί σε 200μm)

#### **Γ4) Μελέτη εκχυλισμάτων με φασματομετρία ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (Inductively Coupled Plasma mass spectrometry ICP-MS)**

Προσδιορισμός των ιόντων ασβεστίου (Ca), πυριτίου (Si), φωσφόρου (P), ψευδαργύρου (Zn), μαγνησίου (Mg), χρωμίου(Cr), κοβαλτίου (Co),χαλκού (Cu), σιδήρου (Fe), νικελίου (Ni), μολυβδου (Pb) των εκχυλισμάτων στα θρεπτικά ελέγχου σε μία (DAY 1) και τρεις μέρες (DAY 3) συλλογής με φασματομετρία ατομικής εκπομπής σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (Πίνακας Γ4).

Από την μελέτη του πίνακα Γ4, παρατηρούμε πως τα ιόντα ασβεστίου είναι αυτά που κυρίως διαφοροποιούνται. Συγκεκριμένα τα ιόντα αυτά φαίνεται πως αυξάνονται τόσο με το χρόνο παρακολούθησης αλλά και από την ομάδα Control στην ομάδα Thermo. Μικρή αλλά αξιοσημείωτη αύξηση παρατηρείται στα ιόντα μαγνησίου που και αυτά αυξάνονται τόσο με το χρόνο παρακολούθησης αλλά και από την ομάδα Control στην ομάδα Thermo. Επιπλέον παρατηρείται μικρή απελευθέρωση ιόντων φωσφόρου. Τέλος παρατηρούμε την ύπαρξη ιόντων πυριτίου στο διάλυμα που αποτελεί και κύριο συστατικό του υλικού που μελετήθηκε. Επιπλέον παρατηρείται πως τα ιόντα

που ανιχνεύονται στα μη αραιωμένα δείγματα (control 3 not dilluted, thermo 3 not dilluted) είναι αυξημένα σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (DMEM).

|         |            |       | 1       | 2       | 5       | 6       | 9                            | 3          | 4          | 7          | 8          | 10                          | 11    | 12   |
|---------|------------|-------|---------|---------|---------|---------|------------------------------|------------|------------|------------|------------|-----------------------------|-------|------|
|         |            |       | C-day 1 | C-day 1 | C-day 3 | C-day 3 | control<br>3 not<br>dilluted | T-day<br>1 | T-day<br>1 | T-day<br>3 | T-day<br>3 | thermo 3<br>not<br>dilluted | DMEM  | DIS  |
| Element | Wavelength | Units |         |         |         |         |                              |            |            |            |            |                             |       |      |
| Si      | 251.611    | mg/L  | ND      | ND      | 0.03    | 0.02    | 0.09                         | ND         | 0.01       | 0.01       | 0.01       | 0.34                        | ND    | ND   |
| Ca      | 317.933    | mg/L  | 1.18    | 1.20    | 1.31    | 1.29    | 18.6                         | 1.26       | 1.68       | 1.37       | 1.34       | 16.9                        | 15.20 | 0.03 |
| P       | 213.617    | mg/L  | 0.24    | 0.23    | 0.27    | 0.26    | 11.24                        | 0.24       | 0.36       | 0.27       | 0.28       | 10.65                       | 10.31 | ND   |
| Zn      | 202.548    | mg/L  | ND      | ND      | ND      | ND      | ND                           | ND         | ND         | ND         | ND         | ND                          | ND    | ND   |
| Mg      | 279.077    | mg/L  | 0.36    | 0.36    | 0.37    | 0.35    | 9.96                         | 0.37       | 0.42       | 0.39       | 0.38       | 10.11                       | 9.36  | 0.09 |
| Cr      | 284.325    | mg/L  | ND      | ND      | 0.01    | 0.01    | ND                           | 0.01       | 0.01       | ND         | ND         | ND                          | ND    | ND   |
| Co      | 228.616    | mg/L  | ND      | ND      | ND      | ND      | ND                           | ND         | ND         | ND         | ND         | ND                          | ND    | ND   |
| Cu      | 324.752    | mg/L  | ND      | ND      | ND      | ND      | 0.01                         | 0.01       | 0.02       | ND         | ND         | 0.02                        | ND    | ND   |
| Fe      | 238.204    | mg/L  | ND      | ND      | ND      | ND      | ND                           | ND         | ND         | ND         | ND         | ND                          | ND    | ND   |
| Ni      | 232.003    | mg/L  | ND      | ND      | ND      | ND      | 0.02                         | 0.02       | 0.02       | 0.01       | 0.01       | 0.03                        | ND    | ND   |
| Pb      | 217.000    | mg/L  | 0.02    | 0.02    | 0.03    | 0.03    | 0.06                         | 0.03       | 0.02       | 0.02       | 0.02       | 0.03                        | 0.03  | ND   |

ND: Not detected. ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΟΝΤΑΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΜΙΚΡΟΤΕΡΕΣ 1ppm

Πίνακας Γ4: Αποτελέσματα ανάλυσης εκχυλισμάτων με φασματομετρία ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα

## Δ) ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ολοκεραμικές αποκαταστάσεις αποτελούν την πρώτη επιλογή τόσο των οδοντιάτρων όσο και των ασθενών για την πρόσθια αισθητική περιοχή. Η ελαφρώς υποουλική τοποθέτηση των ολοκεραμικών αποκαταστάσεων για αισθητικούς λόγους και η παρατεταμένη επαφή τους με το στοματικό βλεννογόνο καθιστούν τη βιοσυμβατότητα αυτών των υλικών, ζωτικής σημασίας για την ασφαλή παραμονή τους στο στοματικό περιβάλλον. Ενώ πληθώρα ερευνών έχουν ασχοληθεί με τις βιολογικές αποκρίσεις οδοντιατρικών μετάλλων και ρητινών (Wataha και συν., 2003, Craig και Hanks, 1990), την πιθανή διάβρωση τους αλλά και την επίδραση των ιόντων που ελευθερώνουν στους γύρω ιστούς, περιορισμένες είναι οι έρευνες που μελετούν τη βιοσυμβατότητα των κεραμικών και την εμφάνιση κυτταροτοξικών φαινομένων. Σκοπός της παρούσας *in vitro* μελέτης είναι η διερεύνηση της κυτταρικής απόκρισης ουλικών ινοβλαστών σε επαφή με δοκίμια διπυριτικού λιθίου και της επίδρασης ακτινοβολίας χαμηλής ενέργειας σε καλλιέργεια ουλικών ινοβλαστών με δοκίμια διπυριτικού λιθίου με ή χωρίς θερμική καταπόνηση.

Η παρούσα *in vitro* μελέτη αξιολόγησε την μεταβολική δραστηριότητα των ουλικών ινοβλαστών που ήρθαν σε επαφή με το κεραμικό διπυριτικού λιθίου που υπέστη γήρανση με επαναλαμβανόμενη θερμική καταπόνηση πριν και μετά την εφαρμογή ακτινοβολίας χαμηλής ενέργειας. Η θερμική καταπόνηση είναι μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες διαδικασίες για την προσομοίωση της φυσιολογικής γήρανσης που βιώνουν τα βιοϋλικά στην κλινική πράξη. Η πλειονότητα των ερευνών χρησιμοποιούν ένα δικό τους πρωτόκολλο δείχνοντας συνέπεια μόνο ως προς την επιλογή των ακραίων θερμοκρασιών και ορίζοντας αυθαίρετα τους χρόνους εμφύθισης και τον αριθμό των κύκλων. Η θερμοκρασιακές μεταβολές στη στοματική κοιλότητα αποτελούν μία δυναμική διαδικασία, γεγονός που καθιστούν δύσκολο τον καθορισμό του εύρους των θερμοκρασιών που είναι πλησιέστερο στην πραγματικότητα. Τα επικρατέστερα



πρωτόκολλα επαναλαμβανόμενης θερμικής καταπόνησης που εμφανίζονται στην βιβλιογραφία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα ( Πίνακας Δ1).

|                       |   |
|-----------------------|---|
| ISO TR11405(1994)     | Αριθμός Κύκλων: 500 κύκλοι<br>Θερμοκρασία:5-55οC<br>Χρόνος εμβύθισης≥20 sec   |
| Gale andDarvell(1999) | Αριθμός Κύκλων:10000 κύκλοι<br>Θερμοκρασία και χρόνος εμβύθισης:<br>35 °Cγια 28s.<br>15 °Cγια 2s.<br>35 °Cγια 28s.<br>45 °Cγια 2s |

Πίνακας Δ1:Επικρατέστερα πρωτόκολλα επαναλαμβανόμενης θερμικής καταπόνηση(Morresi καις συν., 2014)

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως ακραίες θερμοκρασίες 5-55οC σύμφωνα με το ISO TR11405(1994). Ωστόσο μεταξύ των ακραίων θερμοκρασιών μεσολαβούσε υδατόλουτρο 37°C, όπως προβλέπεται από το μηχάνημα θερμοκύκλωσης που διαθέτει η Οδοντιατρική Σχολή, προκειμένου να γίνει μία πιο ρεαλιστική προσομοίωση των θερμοκρασιακών μεταβολών που λαμβάνουν χώρα στο στοματικό περιβάλλον. Πραγματοποιήθηκαν 1500 κύκλοι στηριζόμενη σε παλαιότερη διπλωματική εργασία( Μπεζάτη, 2013), που σύμφωνα με το ISO TR11405(1994) 500 κύκλοι είναι αρκετοί για τη γήρανση των βιουλικών.Σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Gale και Darvell 1500 κύκλοι αντιστοιχούν σε περίπου δύο μήνες κλινικής λειτουργίας, χρόνος πολύ μεγαλύτερος από αυτόν που μελετώνται κυτταροτοξικά φαινόμενα ( Messer και συν., 2003, Brackett και συν., 2008).

Οι ουλικοί ινοβλάστες ακτινοβολήθηκαν με διοδικό λέιζερ μήκους κύματος 940 nm, ισχύος 0,2 W και ενέργειας 8 J/cm<sup>2</sup> ενώ η ανταπόκρισή τους στο LLLI παρατηρήθηκε για τρεις ημέρες (72 ώρες). Η επιλογή της δόσης της ακτινοβολίας παρατηρούμε στη βιβλιογραφία ότι κυμαίνεται από 0,5- 15.8 J/cm<sup>2</sup> με συχνότερη τη δόση των 3J/cm<sup>2</sup> όπου και παρατηρείται στις περισσότερες μελέτες η μέγιστη αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Στην παρούσα μελέτη έγινε η επιλογή των 8 J/cm<sup>2</sup> ύστερα από μια σειρά πιλοτικών πειραμάτων (Παράτημα) που απέδειξαν πως αποτελεί τη βέλτιστη δόση ακτινοβολίας για τις συνθήκες του συγκεκριμένου πειράματος. Οι Kreisler και συν. (2003) χρησιμοποιώντας αντίστοιχη δόση ακτινοβολίας (7.84 J/cm<sup>2</sup>) διαπίστωσαν πως έχει παρόμοιες επιδράσεις στα κύτταρα με τις υπόλοιπες δόσεις ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκαν (1.96 και 3.92 J/cm<sup>2</sup>). Ως μέγιστος χρόνος παρακολούθησης του φαινομένου επιλέχθηκαν οι 72 ώρες (DAY 3), όπως και στις περισσότερες έρευνες, καθώς τότε παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες ( Messer και συν., 2003, Brackett και συν., 2008, Kreisler και συν.,2003). Στην παρούσα in vitro μελέτη τα κύτταρα δεν αναπτύχθηκαν σε συνθήκες τροφικής αποστέρησης (10% FBS) καθώς, σε αντίθεση με άλλες μελέτες, τα κύτταρα ήταν σε άμεση επαφή με δοκίμια διυριτικού λίθου για τα οποία έχει καταγραφεί κυτταροτοξική συμπεριφορά σε προηγούμενη διπλωματική εργασία (Μπεζάτη, 2013). Επιπλέον στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μία ακτινοβολία, όπως και στις περισσότερες έρευνες στη βιβλιογραφία (Gkogkos και συν., 2015, Crisan και συν, 2013, Pourzarandian και συν., 2005, Azevedo και συν.,2006).

Για την αξιολόγησή της μεταβολικής δραστηριότητας των ουλικών ινοβλαστών μετά την εφαρμογή της ακτινοβολίας LLLI χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού MTT. Τα αποτελέσματα της έδειξαν αύξηση της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων. Συγκεκριμένα στην ομάδα Thermo+LLLI παρατηρήθηκε αύξηση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας σε σχέση με την ομάδα Thermo σε όλες τις ημέρες ελέγχου, ενώ για τον χρόνο

ελέγχου DAY 2 η αύξηση ήταν στατιστικά σημαντική (\*\* $p \leq 0,01$ ). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι δεν καταγράφεται στατιστικά σημαντική διάφορα κατά τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας MTT ανάμεσα στις ομάδες Thermo +LLLI και Control, γεγονός που επιτρέπει την υπόθεση πως η ακτινοβολία LLLI ενισχύει τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα τόσο, ώστε αυτή να προσεγγίζει αυτή των θετικών μαρτύρων (control) ( $p \geq 0,05$ ).

Τη βιοδιεγερτική ικανότητα του LLLI στους ουλικούς ινοβλάστες μελέτησαν πληθώρα ερευνητών. Οι Gkogkos και συν. (2015) μελετώντας τον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών που ακτινοβολήθηκαν με LLLI παρατήρησαν την αύξηση των κυττάρων 48 και 72 ώρες μετά την ακτινοβολία με στατιστικά σημαντική αύξηση 48 ώρες μετά, με ακτινοβολία  $15.8 \text{ J/cm}^2$ . Ωστόσο η μέθοδος ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που χρησιμοποιήθηκε ήταν η οπτική παρατήρηση και καταμέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Σημαντική αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού απέδειξαν και οι Ogita και συν. (2015) 72 ώρες μετά την ακτινοβολία με βέλτιστη ακτινοβολία τα  $2.61 \text{ J/cm}^2$ . Οι Basso και συν.(2012) μελετώντας τη μεταβολική δραστηριότητας των ινοβλαστών που ακτινοβολήθηκαν με LLLI για τρεις συνεχόμενες μέρες, απέδειξαν με την δοκιμασία έλεγχου MTT, στατιστικά σημαντική αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με δόσεις ακτινοβολίας 0,5 και  $3 \text{ J/cm}^2$  24 ώρες μετά την τελευταία ακτινοβολία. Η ίδια ερευνητική ομάδα (Pansani και συν., 2014) αργότερα επιβεβαίωσε πως αυτές οι ακτινοβολίες αυξάνουν σημαντικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών ενώ η ακτινοβολία των  $3 \text{ J/cm}^2$  αποδείχθηκε από άλλη ερευνητική ομάδα των Diamante και συν. (2009), πως αυξάνει παράλληλα την έκκριση του βασικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (bFGF). Οι Crisan και συν. (2013) ακτινοβόλησαν ουλικούς ινοβλάστες με ενέργεια  $5,5 \text{ J/cm}^2$  διαφοροποιώντας κάθε φορά το μήκος κύματος της ακτινοβολίας (830-, 980- και 2,940-nm) αποδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο την βιοδιεγερτική ικανότητα του LLLI με μήκη κύματος 830 και 980 nm αλλά και την ανασταλτική του δράση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (2,940-nm). Η βιοδιεγερτική

ικανότητα του LLLI στους ουλικούς ινοβλάστες αποδείχτηκε και από τους Azevedo και συν.(2006) χρησιμοποιώντας ενέργεια  $2\text{J}/\text{cm}^2$ . Αυτό που διαφοροποιεί την συγκεκριμένη ερευνητική μελέτη από τις υπόλοιπες είναι το γεγονός ότι τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε συνθήκες τροφικής αποστερησης (5% FBS). Η βιοδιεγερτική ικανότητα του LLLI σε στρεσογόνες για τα κύτταρα συνθήκες έχει αποδειχθεί και από προηγούμενες μελέτες (Almeida-Lopes και συν., 2001, Pereira και συν., 2002, Marques και συν., 2004). Το LLLI βρέθηκε να διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό από την ομάδα των Pourzarandian και συν. (2005) πάλι σε συνθήκες στέρησης με βέλτιστη δόση ακτινοβολίας τα  $3.37\text{ J}/\text{cm}^2$ . Τέλος, βέλτιστη δόση ακτινοβολίας για τον πολλαπλασιασμό των ουλικών ινοβλαστών σε δίσκους τιτανίου βρέθηκε να είναι 1,5 και  $3\text{ J}/\text{cm}^2$  από την ερευνητική ομάδα των Khadra και συν. (2005).

Από την παραπάνω μελέτη της βιβλιογραφίας παρατηρούμε μια ποικιλομορφία στη μεθοδολογία και στις παραμέτρους των πειραμάτων που καταλήγουν ωστόσο όλες σε ένα κοινό συμπέρασμα που επιβεβαιώνεται και από την παρούσα μελέτη: την βιοδιεγερτική επίδραση του λέιζερ χαμηλής ενέργειας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων ουλικών ινοβλαστών. Η ετερογένεια μεταξύ των ερευνών σχετικά με το είδος της συσκευής λέιζερ που χρησιμοποιήθηκε και τις παραμέτρους ακτινοβολίας (Μήκος κύματος, Ισχύς, Ενέργεια, Απόσταση, Διάρκεια) δεν επιτρέπουν την δημιουργία ενός ξεκάθαρα πρωτόκολλου ακτινοβολίας. Παρόλα αυτά η αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που καταγράφεται στη μελέτη μας, υποστηρίζεται και από άλλες *in vitro* μελέτες.

Το παραπάνω συμπέρασμα ενισχύεται στην παρούσα μελέτη και από την ποιοτική αξιολόγηση των φωτογραφιών με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) καθώς και των φωτογραφιών με μικροσκοπία ομοεστιακής δέσμης (CONFOCAL).

Η μελέτη των φωτογραφιών με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης της ομάδας των δοκιμίων που ακτινοβολήθηκαν με LLLI (Thermo+LLLI) στην παρούσα μελέτη υποδεικνύει τη παρουσία κυττάρων με φυσιολογική μορφολογία που συνδέονται μεταξύ τους με τις χαρακτηριστικές προεκβολές σχηματίζοντας δίκτυο στην επιφάνεια του υλικού. Η μορφολογία αλλά και ο αριθμός των κυττάρων της ομάδας Thermo φαίνεται να διαφοροποιείται από την ομάδα Control και Thermo+LLLI καθώς εμφανίζονται λιγότερα σε αριθμό και με τροποποιημένη μορφολογία (πιο αποπλατυσμένα), ενδεικτικό της ύπαρξης κάποιου τοξικού παράγοντα για τα κύτταρα. Τα συμπεράσματα που εξάγονται από τη μελέτη των φωτογραφιών συμβαδίζουν με αυτά ερευνών που χρησιμοποίησαν την ίδια μέθοδο για τη μορφολογική μελέτη των κυττάρων. Συγκεκριμένα, σε προηγούμενη διπλωματική εργασία (Μπεζάτη, 2013) μελετήθηκε η πιθανή κυτταροτοξική επίδραση κεραμικού διπυριτικού λιθίου σε ουλικούς ινοβλάστες μετά από κυκλική θερμική καταπόνηση και διαπίστωθηκε μετά από μελέτη φωτογραφιών SEM τόσο η έλλειψη σαφής σύνδεσης μεταξύ των ινοβλαστών όσο και η μεταβολή του σχήματος των ινοβλαστών από ατρακτοειδές σε πιο αποπλατυσμένο.

Επιπρόσθετα, στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε μικροσκοπία συνεστιακής δέσμης και για τις τρεις ομάδες δοκιμίων προκειμένου να αξιολογηθεί η μορφολογία και η παρουσία κυττάρων στην επιφάνεια των δοκιμίων. Όπως αναφέραμε και στα αποτελέσματα της μελέτης στη φωτογραφία της ομάδας Control φαίνεται πληθώρα ζωντανών κυττάρων (Εικ Γ4α). Η εικόνα διαφοροποιείται στην ομάδα Thermo όπου τα δοκίμια έχουν υποστεί επαναλαμβανόμενη θερμική καταπόνηση. Η μείωση των ζωντανών κυττάρων είναι εμφανής ενώ κάνουν την εμφάνισή τους και νεκρά κύτταρα (κόκκινο χρώμα) (Εικ Γ4β). Επιπλέον τα ζωντανά κύτταρα φαίνονται μικρότερα με μικρότερες προεκβολές και πιο αποστρογγυλεμένα. Ο αριθμός των κυττάρων αυξάνεται στην ομάδα όπου έχει εφαρμοστεί ακτινοβολία LLLI (Εικ Γ4γ) και υποδηλώνεται με το πράσινο φθορίζον χρώμα των ζωντανών κυττάρων το οποίο είναι πιο έντονο σε

σχέση με τις ομάδες που δεν έχουν ακτινοβοληθεί. Η αύξηση του φθορισμού στο σήμα τις καλσεΐνης μπορεί να αποδοθεί στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS)( Belletti και συν., 2015, Uggeri και συν., 2004) η αυξημένη παραγωγή των οποίων περιγράφεται σε έρευνες ως αποτέλεσμα εφαρμογής LLLI (Dillenburg και συν., 2014, Migliario και συν., 2014).

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν και η ερμηνεία της μείωσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού τόσο στις ομάδες όπου υπήρχε δοκίμιο αλλά και στις ομάδες που υπήρχε δοκίμιο που υπέστη επαναλαμβανόμενη θερμική καταπόνηση. Η προσπάθεια επικεντρώθηκε στη μελέτη της πιθανής κυτταροτοξικότητας του υλικού μέσω των ιόντων που απελευθερώνονται στο θρεπτικό υλικό αλλά και της περαιτέρω επίδρασης της επαναλαμβανόμενης θερμικής καταπόνησης στην απελευθέρωση των ιόντων.

Τα αποτελέσματα της φασματομετρίας ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα έδειξαν ύπαρξη των ιόντων Ca, Mg, P και Si ενώ παρατηρήθηκε μικρή αύξηση τους τόσο με την αύξηση του χρόνου παρακολούθησης όσο και με την εφαρμογή στα δείγματα επαναλαμβανόμενης θερμικής καταπόνησης. Για την αύξηση των ιόντων Si και P ευθύνεται η απελευθέρωση τους από το κεραμικό καθώς αποτελούν βασικά οξείδια της σύστασης του κεραμικού emax Press όπως φαίνεται και στον πίνακα A2α. Τα ιόντα Ca και Mg αποτελούν συστατικά του θρεπτικού μέσου με τη μορφή ανόργανων αλάτων ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4$ ) ενώ δεν αποκλείεται η ύπαρξη τους και στο κεραμικό καθώς δεν διευκρινίζεται από την εταιρεία η ταυτότητα των οξειδίων της κατηγορίας 'άλλα οξείδια' (Πίνακα A2α). Η αυξημένη παραγωγή των ανωτέρο οξειδίων αποτελεί αποτέλεσμα της διάλυσης του υλικού λόγω του φαινομένου της διάβρωσης. In vitro έρευνες έχουν ασχοληθεί με την επίδραση των συγκεκριμένων ιόντων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Συγκεκριμένα, η ερευνητική ομάδα των Wu και συν. (2005) απέδειξαν πως η αυξημένη απελευθέρωση ιόντων Ca και Si από το κεραμικό μπρεντιγκίτη

( $\text{Ca}_7\text{MgSi}_4\text{O}_{16}$ ) προάγει τον πολλαπλασιασμό οστεοβλαστών και ινοβλαστών καθώς και την παραγωγή υδροξυαπατίτη στην επιφάνεια του καθιστώντας το υλικό βιοενεργό. Η ίδια ερευνητική ομάδα (Wu και συν., 2006) μελέτησε τη βιοενεργότητα του κεραμικού ακερμανίτη ( $\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$ ) και απέδειξε πως η απελευθέρωση ιόντων Ca, Si και Mg αυξάνει τον πολλαπλασιασμό οστεοβλαστών και ινοβλαστών. Η βιοενεργότητα των δύο παραπάνω κεραμικών καθώς και του κεραμικού διοψίδη ( $\text{CaOSiO}_2\text{-MgO}$ ) αποδείχθηκε και πάλι από την ίδια ερευνητική ομάδα ένα χρόνο αργότερα. Οι Wu και συν. (2007) απέδειξαν πως μικρές συγκεντρώσεις ιόντων Ca, Si και Mg μπορούν να προάγουν τον πολλαπλασιασμό οστεοβλαστών ενώ μεγαλύτερες μπορούν να τον αναστείλλουν. Επίσης, απέδειξαν ότι το Si μπορεί να αποτελεί το βασικό στοιχείο που είναι υπεύθυνο για την αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων ενώ το Mg μπορεί να αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες για τη δημιουργία στρώματος υδροξυαπατίτη πάνω στο κεραμικό. Μια πρόσφατη ερευνητική μελέτη (Chen και συν., 2016), μελέτησε την επίδραση κονιάς Mg-Ca-Si σε ανθρώπινους περιοδοντικούς ινοβλάστες και απέδειξε πως τα ιονικά προϊόντα αυτών των κονιών μπορούν να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την οδοντινογένεση και τη αγγειογένεση. Παρατηρούμε λοιπόν πως κανένα από τα παραπάνω στοιχεία δεν μπορεί να αιτιολογήσει τη στατιστικά σημαντική μείωση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας των ινοβλαστών που παρατηρήθηκε στις ομάδες Control-Cells, Thermo-Control, Thermo-Cells. Ωστόσο η μικρή απελευθέρωση πυριτίου στην παρούσα μελέτη, που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αποτελεί το βασικό στοιχείο που είναι υπεύθυνο για την αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, μπορεί ίσως να ερμηνεύσει την απουσία βιοδιεγρτικής δράσης του κεραμικού διπυριτικού λιθίου στους ινοβλάστες. Επίσης η πιθανή απελευθέρωση άλλων ιόντων, που δεν ανιχνεύτηκαν από την παρούσα μελέτη, μπορεί να ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση κυτταροτοξικών φαινομένων. Σε παλαιότερη διπλωματική διατριβή, η Μπεζάτη (2013) προσπαθώντας να ερμηνεύσουν τη μειωμένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα των

ινοβλαστων που ήρθαν σε επαφή με προϊόντα έκπλυσης δοκιμίων διπυριτικού λιθίου που είχαν υποστεί κάποια μορφή γήρανσης, χρησιμοποιώντας ωστόσο διαφορετική μέθοδο ICP, κατέγραψε αυξημένες συγκεντρώσεις ιόντων Li και Zn στο θρεπτικό μέσο. Για τον έλεγχο της πιθανής κυτταροτοξικότητας των ιόντων λιθίου και ψευδαργύρου, διερευνήθηκε η επίδραση της προσθήκης άλατος  $\text{Li}_2\text{Cl}$  και  $\text{ZnCl}$  αντίστοιχα στα κύτταρα, για ένα εύρος συγκεντρώσεων, γύρω από τη τιμή που ανιχνεύτηκε με το ICP. Τα ιόντα λιθίου δεν παρουσίασαν κυτταροτοξικότητα στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ενώ τα ιόντα ψευδαργύρου εμφάνισαν κυτταροτοξικότητα σε συγκεντρώσεις αρκετά μεγαλύτερες από αυτές που ανιχνεύτηκαν με το ICP.

Λίγες μελέτες που ασχολήθηκαν με τη μελέτη της βιοσυμβατότητας του διπυριτικού λιθίου και απέδειξαν πως το συγκεκριμένο κεραμικό δεν είναι βιολογικά αδρανές, εμφανίζονται στη βιβλιογραφία. Οι Messer και συν. (2003) μελέτησαν τη βιολογική συμπεριφορά πέντε κεραμικών υλικών ύστερα από *in vitro* γήρανση με 3% BSA και διαδικασίες στίλβωσης των δοκιμίων. Απέδειξαν πως η βιολογική απόκριση των κεραμικών δεν είναι ίδια ακόμα και σε υλικά της ίδιας κατηγορίας. Τα περισσότερα υλικά προκάλεσαν μείωση της κυτταρικής λειτουργίας σε αποδεκτά επίπεδα με βάση τα πρότυπα για τα οδοντιατρικά κράματα και ρητίνες, με μόνη εξαίρεση το κεραμικό Empress 2 που παρουσίασε κυτταροτοξικότητα η οποία μειώθηκε με τη διαδικασία της γήρανσης αλλά επανήλθε όταν τα δοκίμια στίλβώθηκαν. Οι Brackett και συν. (2008) σε ένα παρόμοιο πρωτόκολλο γήρανσης και στίλβωσης, μελέτησαν τη βιολογική απόκριση πέντε κεραμικών διπυριτικού λιθίου και απέδειξαν τη σημαντική μείωση κατά 50-70% της μιτοχονδριακής δραστηριότητας των υπό μελέτη κυττάρων την πρώτη εβδομάδα παρακολούθησης του φαινομένου. Επίσης παρατήρησαν την μείωση της κυτταροτοξικότητας τις επόμενες εβδομάδες παρατήρησης του φαινομένου και μετά τις διαδικασίες γήρανσης, γεγονός που θεωρήθηκε ότι καθιστά ασφαλή κλινικά για μακροχρόνια παραμονή στο στόμα. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Kilic και συν. (2013) που μελέτησαν τη δυνατότητα



πέντε ολοκεραμικών συστημάτων (In-Ceram Alumina, Turkom Cera, In-Ceram Zirconia, Finesse, Zirkonzahn, IPS e.max) να επηρεάζουν τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα των κυττάρων. Συγκεκριμένα απέδειξαν πως τα ολοκεραμικά συστήματα παρουσιάζουν κυτταροτοξικότητα σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα με το ολοκεραμικό σύστημα Finesse και Zirkonzahn να μην παρουσιάζουν κυτταροτοξικότητα με τη δοκιμασία ελέγχου ΜΤΤ. Σε αντίθεση έρχονται τα αποτελέσματα των Tete και συν. (2014) για το e.max CAD οι οποίοι παρατήρησαν αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού για τις πρώτες 24 ώρες. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μειώθηκε στις 72 ώρες χωρίς ωστόσο να παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, γεγονός που αποτελεί ένδειξη πως το κεραμικό διπυριτικού λιθίου δεν είναι βιολογικά αδρανές. Οι συγγραφείς αυτής της μελέτης θέτουν ως περιορισμό της έρευνας τους, για να αιτιολογήσουν τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα σε σχέση με τις παραπάνω μελέτες, το μικρό χρόνο παρακολούθησης του φαινομένου.

## Ε) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

### Συμπεράσματα

- Το κεραμικό διπυριτικού λιθίου εμφανίζει κυτταροτοξική συμπεριφορά σε άμεση επαφή με ουλικούς ινοβλάστες καθώς παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μεταξύ των ομάδων που τοποθετήθηκαν δοκίμια (Control) και των ομάδων που υπήρχαν μόνο κύτταρα (Cells). Συνεπώς η πρώτη ερευνητική υπόθεση που τέθηκε, απορρίπτεται.
- Το κεραμικό διπυριτικού λιθίου που έχει υποστεί γήρανση με επαναλαμβανόμενη θερμική καταπόνηση εμφανίζει κυτταροτοξική συμπεριφορά σε άμεση επαφή με ουλικούς ινοβλάστες καθώς παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στις ομάδες που τοποθετήθηκαν δοκίμια που είχαν

υποστεί γήρανση (Thermo) σε σχέση με τις ομάδες που τοποθετήθηκαν δοκίμια χωρίς γήρανση (Control) και στις ομάδες που υπήρχαν μόνο κύτταρα (Cells). Συνεπώς η θερμική καταπόνηση έχει επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με αποτέλεσμα και η δεύτερη ερευνητική υπόθεση που τέθηκε να απορρίπτεται.

- Η ακτινοβολήση με λέιζερ χαμηλής ενέργειας φαίνεται να έχει ευεγερτική επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ουλικών ινοβλαστών. Συγκεκριμένα αποδείχθηκε πως αυξάνει των κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ουλικών ινοβλαστών που ήταν σε επαφή με δοκίμια που είχαν υποστεί θερμική καταπόνηση (Thermo+LLLI) με αποτέλεσμα, η τρίτη ερευνητική υπόθεση να γίνει αποδεκτή.

### **Κλινική σηματικότητα**

Συμπερασματικά καταλήγουμε πως το διοδικό λέιζερ χαμηλής ενέργειας (InGaAsP), με τις παραμέτρους και τους περιορισμούς του συγκεκριμένου πειράματος, έχει βιοδιεγερτική επίδραση στους ανθρωπινούς ουλικούς ινοβλάστες προάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ωστόσο περισσότερες in vitro μελέτες πρέπει να πραγματοποιηθούν για να ελέγξουν τις παραμέτρους ακτινοβολήσης (ενέργεια, μήκος κύματος, χρόνος, απόσταση) που καθιστούν το LLLI βιοδιεγερτικό και να εξηγήσουν το μηχανισμό δράσης του LLLI ώστε να προταθεί ένα ολοκληρωμένο πρωτόκολλο ακτινοβολήσης. Επιπλέον κλινικές μελέτες πρέπει να πραγματοποιηθούν ώστε να διερευνηθούν οι κλινικές καταστάσεις όπου η εφαρμογή του LLLI θα είχε ευεγερτική επίδραση. Μέχρι τότε οι κλινικοί δεν θα πρέπει να θεωρούν το κεραμικό διπυριτικού λιθίου ένα βιολογικά αδρανές υλικό. Η παρασκευή των δοντιών για την τοποθέτηση κατασκευών διπυριτικού λιθίου πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο ατραυματική για τα ούλα και οριοθέτηση των παρασκευών θα πρέπει να γίνεται υπερουλικά ή ισουψώς με τα ελευθέρα ούλα.

## Περιορισμοί της παρούσας πειραματικής μελέτης

- Πρόκειται για μία *in vitro* μελέτη που δεν προσομοιάζει πλήρως το βιολογικό περιβάλλον της στοματικής κοιλότητας εξαιτίας κυρίως της απουσίας των διάφορων αμυντικών μηχανισμών. Η χρήση ωστόσο ανθρώπινων ουλικών ινοβλαστών επιτρέπει την καλύτερη προσομοίωση των πραγματικών συνθηκών σε αντίθεση με άλλες μελέτες (Messer και συν., 2003, Brackett και συν., 2008) που χρησιμοποιήθηκαν ινοβλάστες διαφορετικής προέλευσης.
- Οι διαδικασίες αποστείρωσης των δοκιμών πιθανόν να προκάλεσαν αλλαγές στη δομή του κεραμικού. Ωστόσο οι διαδικασίες αυτές ήταν κοινές για τα δοκίμια όλων των ομάδων.
- Για τη γήρανση των δοκιμών πραγματοποιήθηκε επαναλαμβανόμενη θερμική καταπόνηση σε υδατόλουτρο με ακραίες θερμοκρασίες 5°C - 55°C. Για ιδανικότερη προσομοίωση των συνθηκών μέσα στη στοματική κοιλότητα, η εμβύθιση των δοκιμών θα έπρεπε να γίνει σε τεχνητό σάλιο και όχι σε απεσταγμένο νερό, όπως έγινε στην παρούσα μελέτη, καθώς έτσι προβλεπόταν από τον κατασκευαστή του μηχανήματος θερμοκύκλωσης. Επιπλέον οι θερμοκρασιακές μεταβολές και η παραμονή των δοκιμών σε αυτές δεν αντιστοιχούν πλήρως στις συνθήκες ενός τόσο πολύπλοκου συστήματος όπως η ουλοδοντική σχισμή και η στοματική κοιλότητα.
- Ένας ακόμα περιορισμός αφορά την αδυναμία ανίχνευσης κάποιων ιόντων με φασματομετρία ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (Inductively Coupled Plasma mass spectrometry ICP-MS). Επίσης τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση θα έπρεπε ιδανικά να αποτελούνται από το διαλύτη μέσα στον οποίο έγινε η γήρανση των δοκιμών, καθώς εκεί πραγματοποιείται κυρίως η απελευθέρωση των ιόντων.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Adair PJ, Grossman DG. The castable ceramic crown. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1984;4(2):32-46.
2. Albakry M, Guazzato M, Swain MV. Fracture toughness and hardness evaluation of three pressable all-ceramic dental materials. *J Dent.* 2003 ;31(3):181-8.
3. Albakry M, Guazzato M, Swain MV. Biaxial flexural strength, elastic moduli, and x-ray diffraction characterization of three pressable all-ceramic materials. *J Prosthet Dent.* 2003;89:374-380.
4. Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Bjordal J, Brugnera A, Mittmann J, Silva JA, Costa M. Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(1):19-24.
5. Alipanah Y, Asnaashari M, Anbari F. The effect of low level laser (GaAlAs) therapy on the post-surgical healing of full thickness wounds in rabbits. *Med Laser Application.* 2011; 26(3): 133-8.
6. Allison JR, Bhatia HL. Tissue changes under acrylic and porcelain pontics. *J Dent Res.* 1958;37:66-67.
7. Almeida P, Lopes-Martins RÁ, Tomazoni SS, Silva JA Jr, de Carvalho Pde T, Bjordal JM, Leal Junior EC. Low-level laser therapy improves skeletal muscle performance, decreases skeletal muscle damage and modulates mRNA expression of COX-1 and COX-2 in a dose-dependent manner. *Photochem Photobiol.* 2011;87(5):1159-63.
8. American National Standards Institute/American Dental Association Specification Council on Dental Materials and Devices. No. 52 for Uranium Content in Dental Porcelain and Porcelain Teeth. *JADA* 1979;98:755-759.

9. Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR. Low-level light/lasertherapy versus photobiomodulation therapy. *Photomed Laser Surg.* 2015;33:183–184.
10. Anusavice KJ, Della B, A., Mecholsky JJ .Fracture behavior of Leucite- and Lithia-Disilicate-based hot-pressed ceramics. *JDR.* 2001; 80:544.
11. Anusavice KJ. Degradability of dental ceramics. *Adv Dent Res* 1992;6:82-89.
12. Anusavice K. Phillips' Science of Dental Materials. Eleventh Edition. W. B. Saunders Company Philadelphia; 2003.
13. Anusavice KJ, Zhang Z-N. Chemical durability of Dicor and Lithia-based glass ceramics. *Dent Mater.* 1997;13:13-19
14. Ardlin BI, Dahl JE, Tibballs JE. Static immersion and irritation tests of dental metal-ceramic alloys. *Eur J Oral Sci.* 2005;113(1):83-9.
15. Asnaashari M, Safavi N. Application of Low level Lasers in Dentistry (Endodontic). *J Lasers Med Sci.* 2013;4(2):57-66.
16. Azevedo LH, de Paula Eduardo F, Moreira MS, de Paula Eduardo C, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth : a pilot study. *Lasers Med Sci.* 2006 ;21(2):86-9.
17. Barin JS, Mello PA, Mesko MF, Duarte FA, Flores EM. Determination of elemental impurities in pharmaceutical products and related matrices by ICP-based methods: a review. *Anal Bioanal Chem.* 2016 ;408(17):4547-66.
18. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16(5):585-601.
19. Bashardoust Tajali S, Macdermid JC, Houghton P, Grewal R. Effects of low power laser irradiation on bone healing in animals: a meta-analysis. *J Orthop Surg Res.* 2010; 4(5):1-10.
20. Basso FG, Pansani TN, Turrioni AP, Bagnato VS, Hebling J, de Souza Costa CA. In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy

- application in cultured gingival fibroblasts. *Int J Dent.* 2012;2012:719452.
21. Behm B, Babilas P, Landthaler M, Schreml S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012;26(7):812-20.
  22. Belletti S, Uggeri J, Mergoni G, Vescovi P, Merigo E, Fornaini C, Nammour S, Manfredi M, Gatti R. Effects of 915 nm GaAs diode laser on mitochondria of human dermal fibroblasts: analysis with confocal microscopy. *Lasers Med Sci.* 2015;30(1):375-81.
  23. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005;11:127-52.
  24. Bjordal JM, Lopes-Martins RA, Iversen VV. A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations. *Br J Sports Med.* 2006;40(1):76-80.
  25. Borba M, de Araújo MD, de Lima E, Yoshimura HN, Cesar PF, Griggs JA, Della Bona A. Flexural strength and failure modes of layered ceramic structures. *Dent Mater.* 2011;27(12):1259-66
  26. Brackett MG, Lockwood PE, Messer RL, Lewis JB, Bouillaguet S, Wataha JC. In vitro cytotoxic response to lithium disilicate dental ceramics. *Dental Materials* 2008;24:450–6.
  27. Bretz, F., Hothorn, T., & Westfall, P. Multiple comparisons using R. CRC Press. 2016.
  28. Brondon P, Stadler I, Lanzafame RJ. A study of the effects of phototherapy dose interval on photobiomodulation of cell cultures. *Lasers Surg Med.* 2005;36:409-13.
  29. Brown GC. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta.* 2001 ;1504(1):46-57.

30. Bürke Harald, IPS e.max Press and IPS e.max CAD. Two state-of-the-art glass ceramics. REPORT No 17, June 2006, Research and Development Ivoclar Vivadent AG
31. Chen YW1, Hsu TT, Wang K, Shie MY. Preparation of the fast setting and degrading Ca-Si-Mg cement with both odontogenesis and angiogenesis differentiation of human periodontal ligament cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;60:374-83.
32. Chow, R. T., M. I. Johnson, R. A. Lopes-Martins, and J.M. Bjordal. Efficacy of low-level laser therapy in the management of neck pain: a systematic review and metaanalysis of randomised placebo or active treatment controlled trials. *Lancet.* 2009; 374:1897–1908.
33. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng.* 2012;40(2):516-33
34. Cobb CM, White CL, Gillahan DR, Tira DE. In vitro compatibility of air-fired opaque porcelain with human gingival fibroblasts. *J Prosthet Dent* 1988;59:187-94.
35. Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 1991;3(7):207-12.
36. Craig RG, Hanks CT. Cytotoxicity of experimental casting alloys evaluated by cell culture tests. *J Dent Res.* 1990;69:1539–42.
37. Crisan B, Soritau O, Baciut M, Campian R, Crisan L, Baciut G. Influence of three laser wavelengths on human fibroblasts cell culture. *Lasers Med Sci.* 2013;28(2):457-6.
38. Cury V, Moretti AIS, Assis L, Bossini P, Crusca JS, Benatti Neto C, Fangel R, Souza HP, Hamblin MR, Parizotto NA. Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1a and MMP-2. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2013;125:164–170.

39. Dahl JE. MTT-test. NIOM Report No. 004/04. 2004.
40. Damante CA, De Micheli G, Miyagi SPH, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2009;24:885–91.
41. Dean JW 3rd, Culbertson KC, D'Angelo AM. Fibronectin and laminin enhance gingival cell attachment to dental implant surfaces in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995;10(6):721-8.
42. Denry IL. Recent advances in ceramics for dentistry. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996;7(2):134-43.
43. Denry I., Holloway J.A. Ceramics for Dental Applications: A Review. *Materials.* 2010;3: 351-368.
44. Derkacz A, Protasiewicz M, Poreba R, Szuba A, Andrzejak R: Usefulness of intravascular low-power laser illumination in preventing restenosis after percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol.* 2010; 106: 1113–1117.
45. Derkacz A, Protasiewicz M, Poręba R, Doroszko A, Andrzejak R: Effect of the intravascular low energy laser illumination during percutaneous coronary intervention on the inflammatory process in vascular wall. *Lasers Med Sci.* 2013;28: 763–768.
46. Dikicier S, Ayyildiz S, Ozen J, Sipahi C. Influence of core thickness and artificial aging on the biaxial flexural strength of different all-ceramic materials: An in-vitro study. *Dent Mater J.* 2017 Feb 11.
47. Dillenburg CS, Almeida LO, Martins MD, Squarize CH, Castilho RM. Laser phototherapy triggers the production of reactive oxygen species in oral epithelial cells without inducing DNA damage. *J Biomed Opt.* 2014 ;19(4):048002
48. Dong JK1, Luthy H, Wohlwend A, Schärer P. Heat-pressed ceramics: technology and strength. *Int J Prosthodont.* 1992;5(1):9-16.



49. Duret, F., Empreinte Optique, in Faculté d'Ondontologie. Université Claude Bernard: Lyon. 1973, p. 400.
50. Durmus B, Tanboga I. In Vivo Evaluation of the Treatment Outcome of Pulpotomy in Primary Molars Using Diode Laser, Formocresol, and Ferric Sulphate. *Photomed Laser Surg.* 2014; 32(5): 289–295.
51. Eschbach S, Scherrer S, Kern M. Clinical outcome of three-unit lithium-disilicate glass-ceramic fixed dental prostheses: up to 8 years results. *Dent Mater.* 2009 ;25(9):63-71.
52. Esmaeelinejad M, Bayat M, Darbandi H, Bayat M, Mosaffa N. The effects of low-level laser irradiation on cellular viability and proliferation of human skin fibroblasts cultured in high glucose mediums. *Lasers Med Sci.* 2014 ;29(1):121-9.
53. Etman MK, Woolford MJ. Three-year clinical evaluation of two ceramic crown systems: a preliminary study. *J Prosthet Dent.* 2010;103(2):80-90.
54. Falaki F, Nejat AH, Dalirsani Z. The Effect of Low-level Laser Therapy on Trigeminal Neuralgia: A Review of Literature. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2014;8(1):1-5.
55. Farfara, Dorit; Tuby, Hana; Trudler, Dorit; Doron-Mandel, Ella; Maltz, Lidya; Vassar, Robert J.; Frenkel, Dan; Oron, Uri .“Low-level laser therapy ameliorates disease progression in a mouse model of Alzheimer’s disease”. *Journal of molecular neuroscience:MN.*2015;55 (2): 430–436
56. Fasbinder DJ, Dennison JB, Heys D, Neiva G. A clinical evaluation of chairside lithium disilicate CAD/CAM crowns: a two-year report. *J Am Dent Assoc.* 2010;141 Suppl 2:10S-4S
57. Ferreira DM, Zângaro RA, Villaverde AB, Cury Y, Frigo L, Picolo G, Longo I, Barbosa DG. Analgesic effect of He-Ne (632.8 nm) low-level laser therapy on acute inflammatory pain. *Photomed LaserSurg.* 2005;23(2):177-81.

58. Fiório FB, Albertini R, Leal-Junior EC, de Carvalho Pde T. Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. *Lasers Med Sci.* 2014 Jan;29(1):313-9.
59. Fischer J, Stawarczyk B, Hämmerle CH. Flexural strength of veneering ceramics for zirconia. *J Dent.* 2008; 36:316-21.
60. Forster A, Ungvári K, Györgyey Á, Kukovecz Á, Turzó K, Nagy K. Human epithelial tissue culture study on restorative materials. *J Dent.* 2014 ;42(1):7-14
61. Frozanfar A, Ramezani M, Rahpeyma A, Khajehahmadi S, Arbab HR. The Effects of Low Level Laser Therapy on the Expression of Collagen Type I Gene and Proliferation of Human Gingival Fibroblasts (Hgf3-Pi 53): in vitro Study. *Iran J Basic Med Sci.* 2013;16(10):1071-4.
62. Fukuda TY, Tanji MM, Silva SR, Sato MN, Plapler H. Infrared low-level diode laser on inflammatory process modulation in mice: pro- and anti-inflammatory cytokines. *Lasers Med Sci.* 2013;28(5):1305-13.
63. Gale, M.S., Darvell, B.W. Thermal cycling procedures for laboratory testing of dental restorations. *J. Dent.* 1999;27:89–99.
64. Gehrt M, Wolfart S, Rafai N, Reich S, Edelhoff D. Clinical results of lithium-disilicate crowns after up to 9 years of service. *Clin Oral Invest.* 2013;17:275–284.
65. Gethin G. Understanding the inflammatory process in wound healing. *Br J Community Nurs.* 2012;Suppl:S17-8, S20, S22.
66. Gkogkos AS, Karoussis IK, Prevezanos ID, Marcopoulou KE, Kyriakidou K, Vrotsos IA. Effect of Nd:YAG Low Level Laser Therapy on Human Gingival Fibroblasts. *Int J Dent.* 2015;2015:258941
67. Grall, F. Toxicon Final GLP Report: 10-1251-G1. Agar Diffusion Test - ISO. April 2010.

68. Guazzato M, Swain MV. Biaxial flexural strength, elastic moduli, and x-ray diffraction characterization of three pressable all-ceramic materials. *J Prosthet Dent.* 2003; 89:374-380
69. Guazzato M, Albakry M, Swain MV, Ironside JV. The mechanical properties of In-Ceram Alumina and In-Ceram Zirconia. *Int J Prosthodont* .2002;15:339-46
70. Guazzato M, Albakry M, Ringer SP, Swain MV. Strength, fracture toughness and microstructure of a selection of all-ceramic materials. Part I. Pressable and alumina glass-infiltrated ceramics. *Dent Mater* .2004; 20: 441-8.
71. Guess PC, Selz CF, Steinhart YN, Stampf S, Strub JR, Prospective clinical split-mouth study of pressed and CAD/CAM all-ceramic partial-coverage restorations: 7-year results. *Int J Prosthodont.* 2013;26(1):21-5.
72. Hamblin M. R. , Demidova T. N. . Mechanisms of low level light therapy, *Proc. of SPIE Vol. 6140, 614001, (2006)*
73. Hashmi JT, Huang YY, Sharma SK, Kurup DB, De Taboada L, Carroll JD, Hamblin MR. Effect of pulsing in low-level light therapy. *Lasers Surg Med.*2010;42: 450–66.
74. Hawkins D, Hourel N, Abrahamse H. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1056:486-93.
75. Hayes A. W. , Principles and Methods of Toxicology, third edition, Ed., Raven Press .1994 :1231-1258 *J Immunol Methods* 177, 101(1994), *J Microbiol Methods* 17, 1(1993)
76. Hebert S. C. Fabre, Ricardo L. Navarro, Paula V.P. Oltramari-Navarro, Rodrigo F. Oliveira, Deise A. A. Pires-Oliveira, Rodrigo A. C. Andraus, Nelson Fuirini, Karen B. P. Fernandes. Anti-inflammatory and analgesic

- effects of low-level laser therapy on the postoperative healing process. *J Phys Ther Sci.* 2015 ; 27(6): 1645–1648
77. Hegedus, B., L. Viharos, M. Gervain, and M. Galfi. The effect of low-level laser in knee osteoarthritis: a double blind, randomized, placebo-controlled trial. *Photomed. Laser Surg.* 2009; 27:577–584.
78. Herpich CM, Amaral AP, Leal-Junior EC, Tosato Jde P, Gomes CA, Arruda EE, Glória IP, Garcia MB, Barbosa BR, Rodrigues MS, Silva KL, El Hage Y, Politti F, Gonzalez Tde O, Bussadori SK, Biasotto-Gonzalez DA. Analysis of laser therapy and assessment methods in the rehabilitation of temporomandibular disorder: a systematic review of the literature. *J Phys Ther Sci.* 2015 ;27(1):295-301.
79. Höland W, Schweiger M, Frank M, Rheinberger V. A Comparison of the microstructure and properties of the IPS Empress 2 and the IPS Empress glass-ceramics. *J Biomed Mater Res.* 2000;53(4):297-303.
80. Höland W, Apel E, van 't Hoen C, Rheinberger V. Studies of crystal phase formations in high-strength lithium disilicate glass-ceramics. *J Non-Crystal Solids.* 2006;352:4041–50.
81. Höland W, Beall G. *Glass-ceramic technology.* Hoboken, NJ: Wiley: American Ceramic Society; 2012.
82. Hrabák A, Bajor T, Csuka I. The effect of various inflammatory agents on the phagocytosis and cytokine profile of mouse and rat macrophages. *Inflamm Res.* 2008;57(2):75-83.
83. Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response.* 2009; 7: 358–83.
84. International Standards Organization, 1994. *Guidance on Testing of Adhesion to Tooth Structure.* ISO/TR11405 Dental Materials, 1–14.
85. Kang SH, Chang J, Son HH. Flexural strength and microstructure of two lithium disilicate glass ceramics for CAD/CAM restoration in the dental clinic. *Restor Dent Endod.* 2013;38(3):134-40.

86. Karu T.I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of Low-Intensity Laser Radiation. *Lasers in the life Sciences* .1988; 2(1): 53-74.
87. Karu T. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. *J Photochem Photobiol B*. 1989 Aug;3(4):638-40.
88. Karu TI, Afanas'eva NI. Cytochrome c oxidase as the primary photoacceptor upon laser exposure of cultured cells to visible and near IR-range light. *Dokl Akad Nauk*. 1995;342:693-5.
89. Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg*.2005; 23:355-61.
90. Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med*. 2005;36(4):307-14.
91. Kaviani, A., G. E. Djavid, L. Ataie-Fashtami, M. Fateh, M. Ghodsi, M. Salami, N. Zand, N. Kashef, and B.Larijani. A randomized clinical trial on the effect of lowlevellaser therapy on chronic diabetic foot wound healing:a preliminary report. *Photomed. Laser Surg*. 2011; 29:109–114.
92. Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Determining optimal dose of laser therapy for attachment and proliferation of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. *J Biomed Mater Res A*. 2005;73(1):55-62.
93. Khan I, Arany P. Biophysical Approaches for Oral Wound Healing: Emphasis on Photobiomodulation. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015;4(12):724-737.
94. Khalighi HR, Anbari F, Beygom Taheri J, Bakhtiari S, Namazi Z, Pournalibaba F. Effect of Low-power Laser on Treatment of Orofacial Pain. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2010;4(3):75-8.
95. Khozeimeh F, Moghareabed A, Allameh M, Baradaran S. Comparative evaluation of low-level laser and systemic steroid therapy in adjuvant-

- enhanced arthritis of rat temporomandibular joint: A histological study. *Dent Res J (Isfahan)* .2015; 12(3): 215–223
96. Kern M, Sasse M, Wolfart S. Ten-year outcome of three-unit fixed dental prostheses made from monolithic lithium disilicate ceramic. *J Am Dent Assoc.* 2012;143(3):234-40.
  97. Kerem K , Kesim B, Sumer Z, Polat Z, Kesim S. In vitro cytotoxicity of all-ceramic substructural materials after aging. *Journal of Dental Sciences.* 2013;8(3):231–238.
  98. Kreisler M, Christoffers AB, Willershausen B, d'Hoedt B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J Clin Periodontol.* 2003 ;30(4):353-8.
  99. Lalabonova H, Daskalov H. Clinical assessment of the therapeutic effect of low-level laser therapy on chronic recurrent aphthous stomatitis. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2014; 28(5): 929–933.
  100. Land CH. Porcelain dental art: No.II. *Dent Cosmos* .1903;45:615-20.
  101. Lee, G., R. M. Ikeda, R. M. Dwyer, H. Hussein, P.Dietrich, and D. T. Mason. Feasibility of intravascular laser irradiation for in vivo visualization and therapy of cardiocirculatory diseases. *Am. Heart J.* 1982;103:1076–1077.
  102. Lemons JE. Dental implant biomaterials. *J Am Dent Assoc.* 1990;121(6):716-9.
  103. Li J, Liu Y, Hermansson L, Soremark R. Evaluation of biocompatibility of various ceramic powders with human fibroblasts in vitro. *Clin Mater* 1993;12:197-201
  104. Lin WS, Ercoli C, Feng C, Morton D. The effect of core material, veneering porcelain, and fabrication technique on the biaxial flexural strength and weibull analysis of selected dental ceramics. *J Prosthodont.* 2012;21(5):353-62

105. Mackert JR Jr, Butts MB, Fairhurst CW. The effect of the leucite transformation on dental porcelain expansion. *Dent Mater*. 1986; 2:32-6.
106. Maiman TH. Stimulated optical radiation in ruby. *Nature* 1960;187(4736):493-494.
107. Maia M, Bonjardim L, Quintans Jde S, Ribeiro M, Maia L, Conti P: Effect of low-level laser therapy on pain levels in patients with temporomandibular disorders: a systematic review. *J Appl Oral Sci* 2012; 2: 594–602.
108. Marini L, Πέτσα Α, Σταματόπουλος Κ, Πολυζώης Π. 42ο σεμινάριο της ελληνικής εταιρείας δερματοχειρουργικής εφαρμογές Laser και άλλων πηγών ενέργειας στη δερματολογία. Ιστορία και εξέλιξη. *Ελληνική Δερματοχειρουργική*. 2008 ;5 (3):422-435.
109. Marquardt P, Strub JR. Survival rates of IPS empress 2 all-ceramic crowns and fixed partial dentures: results of a 5-year prospective clinical study. *Quintessence Int*. 2006;37(4):253-9.
110. Marques MM, Diniz IM, de Cara SP, Pedroni AC, Abe GL, D'Almeida-Couto RS, Lima PL, Tedesco TK, Moreira MS. Photobiomodulation of Dental Derived Mesenchymal Stem Cells: A Systematic Review. *Photomed Laser Surg*. 2016;34(11):500-508.
111. Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP .Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med* .2004;34:260–265
112. Martignago CC, Oliveira RF, Pires-Oliveira DA, Oliveira PD, Pacheco Soares C, Monzani PS, Poli-Frederico RC. Effect of low-level laser therapy on the gene expression of collagen and vascular endothelial growth factor in a culture of fibroblast cells in mice. *Lasers Med Sci*. 2015;30(1):203-8.

113. Mazzetto M.O. , T.H. Hotta, R.C.A. Pizzo, Measurements of jaw movements and TMJ pain intensity in patients treated with GaAlAs laser, *Braz. Dent. J.* 2010;21:356–360.
114. Mazzetto M.O. , T.G. Carrasco, E.F. Bidinelo, R.C.de A. Pizzo, R.G. Mazzetto. Low intensity laser application in temporomandibular disorders: a phase I doubleblind study.*Cranio.*2007;23(3): 186–192.
115. McLean JW, Hughes TH. The reinforcement of dental porcelain with ceramic oxides. *Br Dent J* .1965;119:251-67.
116. McLean JW. Evolution of dental ceramics in the twentieth century. *J Prosthet Dent.* 2001;85(1):61-6.
117. Medalha CC, Amorim BO, Ferreira JM, Oliveira P, Pereira RM, Tim C, Lirani-Galvão AP, da Silva OL, Renno AC.Comparison of the effects of electrical field stimulation and low-level laser therapy on bone loss in spinal cord-injured rats. *Photomed. Laser Surg.* 2010;28:669–674.
118. Messer RL, Lockwood PE, Wataha JC, Lewis JB, Norris S, Bouillaguet S. In vitro cytotoxicity of traditional versus contemporary dental ceramics. *J Prosthet Dent.*2003;90(5):452–8.
119. Mester E, Szende B, Gärtner P. The effect of laser beams on the growth of hair in mice. *Radiobiol Radiother (Berl).* 1968;9(5):621-6.
120. Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med.* 1985; 5: 31–9.
121. Meyers, A. D. Lasers and wound healing. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*1990; 116:1128,
122. Migliario M, Pittarella P, Fanuli M, Rizzi M, Renò F. Laser-induced osteoblast proliferation is mediated by ROS production. *Lasers Med Sci.* 2014 ;29(4):1463-7.
123. Milleding P, Haraldsson C, Karlsson S. Ion leaching from dental ceramics during static in vitro corrosion testing. *J Biomed Mater Res.* 2002 ;61(4):541-50.



124. Mitchell DF. The irritational qualities of dental materials. *J Am Dent Assoc* 1959;59:954-966.
125. Mitchell UH, Mack GL. Low-level laser treatment with near-infrared light increases venous nitric oxide levels acutely: a single-blind, randomized clinical trial of efficacy. *Am J Phys Med Rehabil* 2013;92:151–156.
126. Moore JE, MacCulloch WT. The inclusion of radioactive compounds in dental porcelains. *Br Dent J.* 1974;136:101-106.
127. Morresi AL, D'Amario M, Capogreco M, Gatto R, Marzo G, D'Arcangelo C, Monaco A. Thermal cycling for restorative materials: does a standardized protocol exist in laboratory testing? A literature review. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2014 ;29:295-308.
128. Naeser, M. A., A. Saltmarche, M. H. Kregel, M. R. Hamblin, and J. A. Knight. Improved cognitive function after transcranial, light-emitting diode treatments in chronic, traumatic brain injury: two case reports. *Photomed. Laser Surg.* 29:351–358, 2011.
129. Oberoi S, Zamperlini-Netto G, Beyene J, Treister NS, Sung L. Effect of prophylactic low level laser therapy on oral mucositis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2014 Sep 8;9(9).
130. Ogita M, Tsuchida S, Aoki A, Satoh M, Kado S, Sawabe M, Nanbara H, Kobayashi H, Takeuchi Y, Mizutani K, Sasaki Y, Nomura F, Izumi Y. Increased cell proliferation and differential protein expression induced by low-level Er:YAG laser irradiation in human gingival fibroblasts: proteomic analysis. *Lasers Med Sci.* 2015;30(7):1855-66.
131. Ozen T, Orhan K, Gorur I, Ozturk A. Efficacy of low level laser therapy on neurosensory recovery after injury to the inferior alveolar nerve. *Head Face Med.* 2006;2:3.

132. Pandeshwar P, Roa MD, Das R, Shastry SP, Kaul R, Srinivasreddy MB. Photobiomodulation in oral medicine: a review *J Investig Clin Dent*. 2016 ;7(2):114-26.
133. Pansani TN, Basso FG, Turirioni AP, Kurachi C, Hebling J1, de Souza Costa CA. Effects of low-level laser therapy on the proliferation and apoptosis of gingival fibroblasts treated with zoledronic acid. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014;43(8):1030-4.
134. Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2002;31(4):263-7.
135. Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials* 1999;20:1-25.
136. Pinheiro, J., & Bates, D. (2006). *Mixed-effects models in S and S-PLUS*. Springer Science & Business Media
137. Pistorius A, Willershausen B. Biocompatibility of dental materials in two human cell lines. *Eur J Med Res*. 2002 21;7(2):81-8.
138. Plass CA, Loew HG, Podesser BK, Prusa AM. Light-induced vasodilation of coronary arteries and its possible clinical implication. *Ann Thorac Surg*. 2012;93:1181–1186.
139. Podshadley AG, Harrison JD. Rat connective tissue response to pontic material. *J Prosthet Dent*. 1966;16:110-118.
140. Poon VK, Huang L, Burd A. Biostimulation of dermal fibroblast by sublethal Q-switched Nd:YAG 532 nm laser: collagen remodeling and pigmentation. *J Photochem Photobiol B*. 2005;81(1):1-8.
141. Pourzarandian A, Watanabe H, Ruwanpura SM, Aoki A, Ishikawa I. Effect of low-level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 2005;76(2):187-93

142. Prindeze NJ, Moffatt LT, Shupp JW. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions. *Exp Biol Med* .2012;237(11):1241-8.
143. Qualtrough AJ, Piddock V. Ceramics update. *J Dent*. 1997;25(2):91-5.
144. R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.URL <http://www.R-project.org/>.
145. R. Raghavan Narasimha (2012). Ceramics in Dentistry, Sintering of Ceramics - New Emerging Techniques, Dr. Arunachalam Lakshmanan (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/39090. Available from:<http://www.intechopen.com/books/sintering-of-ceramics-new-emerging-techniques/ceramics-in-dentistry>
146. Reich S, Endres L, Weber C, Wiedhahn K, Neumann P, Schneider O, Rafai N, Wolfart S. Three-unit CAD/CAM-generated lithium disilicate FDPs after a mean observation time of 46 months. *Clin Oral Investig*. 2014;18(9):2171-8.
147. Reich S, Schierz O. Chair-side generated posterior lithium disilicate crowns after 4 years. *Clin Oral Investig*. 2013 ;17(7):1765-72.
148. Pezelj-Ribarić S, Kqiku L, Brumini G, Urek MM, Antonić R, Kuiš D, Glažar I, Städtler P. Proinflammatory cytokine levels in saliva in patients with burning mouth syndrome before and after treatment with low-level laser therapy. *Lasers Med Sci*. 2013;28(1):297-301.
149. Rizkalla AS, Jones DW. Mechanical properties of commercial high strength ceramic core materials. *Dent Mater*. 2004 ;20(2):207-12.
150. Santos MJ, Costa MD, Rubo JH, Pegoraro LF, Santos GC Jr. Current all-ceramic systems in dentistry: a review. *Compend Contin Educ Dent*. 2015;36(1):31-7
151. Saygun I, Karacay S, Serdar M, Ural AU, Sencimen M, Kurtis B. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF),

- insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2008 ;23(2):211-5.
152. Siegman A.E., *Lasers*, University Science Books, 1986.
  153. Smith KC, The photobiological basis of low level laser radiation therapy. *Laser Therapy.*1991;3: 19-24.
  154. Solá-Ruiz MF, Lagos-Flores E, Román-Rodríguez JL, Highsmith Jdel R, Fons-Font A, Granell-Ruiz M. Survival rates of a lithium disilicate-based core ceramic for three-unit esthetic fixed partial dentures: a 10-year prospective study. *Int J Prosthodont.* 2013;26(2):175-80.
  155. Soleimani M, Abbasnia E, Fathi M, Sahraei H, Fathi Y, Kaka G. The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts--an in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2012;27(2):423-30.
  156. Sorensen JA, Berge HX, Edelhoff D (.Effect of storage media and fatigue loading on ceramic strength. *JDR .* 2000,79:217.
  157. Sousa MV, Pinzan A, Consolaro A, Henriques JF, de Freitas MR. Systematic literature review: influence of low-level laser on orthodontic movement and pain control in humans. *Photomed Laser Surg.* 2014;32(11):592-9.
  158. Storz P. Mitochondrial ROS--radical detoxification, mediated by protein kinase D. *Trends Cell Biol .* 2007; 17:13-8.
  159. Sutherland JC. Biological effects of polychromatic light. *Photochem Photobiol.* 2002 ;76(2):164-70
  160. Tetè S, Zizzari VL, Borelli B, De Colli M, Zara S, Sorrentino R, Scarano A, Gherlone E, Cataldi A, Zarone F. Proliferation and adhesion capability of human gingival fibroblasts onto zirconia, lithium disilicate and feldspathic veneering ceramic in vitro. *Dent Mater J.* 2014;33(1):7-15.

161. Tinschert J, Zwez D, Marx R, Anusavice KJ. Structural reliability of alumina-, feldspar-, leucite-, mica- and zirconia-based ceramics. *J Dent.* 2000;28(7):529-35.
162. Toksavul S, Toman M. A short-term clinical evaluation of IPS Empress 2 crowns. *Int J Prosthodont.* 2007 ;20(2):168-72.
163. Tsai WC, Cheng JW, Chen JL, et al. Low-level laser irradiation stimulates tenocyte proliferation in association with increased NO synthesis and upregulation of PCNA and cyclins. *Lasers Med Sci.* 2014;29:1377–1384.
164. Tullberg M. , P.J. Alstergren, M.M. Ernberg. Effects of low-power laser exposure on masseter muscle pain and microcirculation. *Pain.* 2003 ;105(1-2):89-96.
165. Tysowsky GW. The science behind lithium disilicate: a metal-free alternative. *Dent Today.* 2009; 28(3):112–113.
166. Uggeri J, Gatti R, Belletti S, Scandroglio R, Corradini R, Rotoli BM, Orlandini G. Calcein-AM is a detector of intracellular oxidative activity. *Histochem Cell Biol.* 2004 ;122(5):499-505.
167. Umberto R, Claudia R, Gaspare P, Gianluca T, Alessandro del V. Treatment of dentine hypersensitivity by diode laser: a clinical study. *Int J Dent.* 2012;2012
168. Uo M, Sjögren G, Sundh A, Watari F, Bergman M, Lerner U. Cytotoxicity and bonding property of dental ceramics. *Dent Mater.* 2003 ;19(6):487-92.
169. Usumez A, Cengiz B, Oztuzcu S, Demir T, Aras MH, Gutknecht N. Effects of laser irradiation at different wavelengths (660, 810, 980, and 1,064 nm) on mucositis in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci.* 2014;29(6):1807-13
170. Velez G. Inductively coupled plasma: the future of heavy metals testing. *Life Science, Technical Bulletin,* April 2009

171. Walsh LJ. The current status of laser applications in dentistry. *Aust Dent J*. 2003;48(3):146-55.
172. Wataha JC, Lockwood PE, Bouillaguet S, Noda M. In vitro biological response to core and flowable dental restorative materials. *Dent Mater*. 2003;19:25–31.
173. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent*. 2001;86(2):203-9
174. Wataha JC. Biocompatibility of dental casting alloys: a review. *J Prosthet Dent*. 2000;83:223-34.
175. Wataha JC, Nakajima H, Hanks CT, Okabe T. Correlation of cytotoxicity with elemental release from mercury- and gallium-based dental alloys in vitro. *Dent Mater*. 1994;10:298-303.
176. Weinstein M., Katz S., Weinstein AB. Permament Manufacturing Corporation, assignee. Fused Porcelain-to-Metal Teeth. 1962, US Patent 3,052,982. Sep 11.
177. White WB. Theory of corrosion of glass and ceramics. In: Clarke DE, Zito BK, editors. *Corrosion of glass, ceramics and superconductors*. Park Ridge, NJ: Noyes; 1992:2–28.
178. Williams DF. *Essential Biomaterials Science*, Cambridge University Press 2014
179. Wolfart S, Eschbach S, Scherrer S, Kern M. Clinical outcome of three-unit lithium-disilicate glass-ceramic fixed dental prostheses: up to 8 years results. *Dent Mater*. 2009;25(9):63-71.
180. Wu YH, Wang J, Gong DX, Gu HY, Hu SS, Zhang H. Effects of low-level laser irradiation on mesenchymal stem cell proliferation: a microarray analysis. *Lasers Med Sci*. 2012 Mar;27(2):509-19.
181. Wu CT, Chang J, Wang JY, Ni SY, Zhai WY. Preparation and characteristics of a calcium magnesium silicate (bredigite) bioactive ceramics. *Biomaterials*. 2005;26:2925–2931.

182. Wu CT, Chang J, Wang JY, Ni SY, Zhai WY. Preparation and characteristics of a calcium magnesium silicate (bredigite) bioactive ceramics. *Biomaterials* .2005;26:2925–2931.
183. Wu C, Chang J. Degradation, bioactivity, and cytocompatibility of diopside, akermanite, and bredigite ceramics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;83(1):153-60.
184. Zhang L, Xing D, Zhu D, Chen Q. Low-power laser irradiation inhibiting Abeta25-35-induced PC12 cell apoptosis via PKC activation. *Cell Physiol Biochem*. 2008;22(1-4):215-22.
185. Zivin, J. A., G. W. Albers, N. Bornstein, T. Chippendale, B. Dahlof, T. Devlin, M. Fisher, W. Hacke, W. Holt, S. Ilic, S. Kasner, R. Lew, M. Nash, J. Perez, M. Rymer, P. Schellinger, D. Schneider, S. Schwab, R. Veltkamp, M. Walker, and J. Streeter. Effectiveness and safety of transcranial laser therapy for acute ischemic stroke. *Stroke* .2009;40:1359–1364.
186. Zuur, A., Ieno, E. N., Walker, N., Saveliev, A. A., Smith, G. M., 2009. Mixed effects models and extensions in ecology with R. Springer Science & Business Media
187. Κοντονασάκη Ε., Σιαραμπή Ε., Τορτοπίδης Δ. Σύγχρονα ολοκεραμικά συστήματα: Ταξινόμηση, τεχνικές κατασκευής και κλινικές εφαρμογές. *ΣΤΟΜΑ*. 2013; 41 : 87 – 106.
188. Μπεζάτη Γ. Διπλωματική εργασία: "Έλεγχος της πιθανής κυτταροτοξικής επίδρασης κεραμικού διπυριτικού λιθίου σε ουλικούς ινοβλάστες πριν και μετά από *in vitro* γήρανση και κυκλική θερμική καταπόνηση. Α.Π.Θ., Εργαστήριο της Ακίνητης Προσθητικής και Προσθητικής Εμφυτευματολογίας. Νοέμβριος 2013
189. Παπαδημητρίου Κ., *Ανατομική Παθολογία-Γενικό Μέρος, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας*, 2001
190. Σεραφεινίδης Α., «Βασικές αρχές λειτουργίας των Laser», Αθήνα, 1980

191. <https://en.wikipedia.org/wiki/Laser>
192. [http://common.ziffdavisinternet.com/encyclopedia\\_images/LASER.GIF](http://common.ziffdavisinternet.com/encyclopedia_images/LASER.GIF)
193. <http://www.worldoflasers.com/laserproperties.htm#>



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΙΜΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΜΤΤ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΟΣ Γ1Α

|                  | DAY1     | DAY 2    | DAY 3    |
|------------------|----------|----------|----------|
| CONTROL<br>(LDS) | 0,812567 | 0,770024 | 0,841468 |
| CELL             | 1        | 1        | 1        |
| THERMO           | 0,761556 | 0,506995 | 0,738859 |
| LLLI             | 0,765295 | 0,70759  | 0,81651  |

### ΠΙΛΟΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

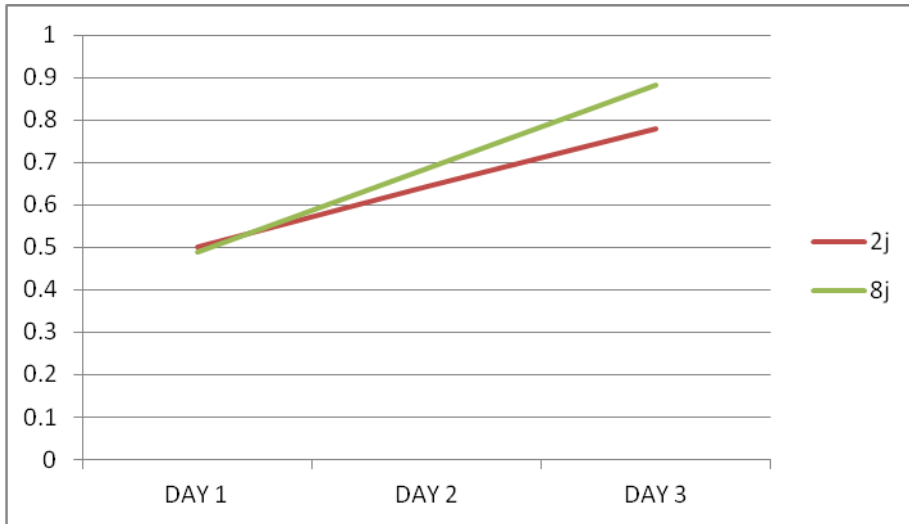
Πραγματοποιήθηκαν πιλοτικά πειράματα με σκοπό τον προσδιορισμό του μήκους κύματος ακτινοβολήσης, αλλά και της αποδιδόμενης ενέργειας ανά τετραγωνικό εκατοστό (fluence).

Χρησιμοποιήθηκε συσκευή ακτινοβολήσης λέιζερ AsGalAl , τάσης 140 mW με δυνατότητα ακτινοβολήσης μήκους κύματος 660nm.

Η αποδιδόμενη ενέργεια ανά τετραγωνικό εκατοστό επιλέχθηκε σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Kreisler και συν., 2003, Azadeno και συν, 2006, Ogita και συν., 2015). Πιο συγκεκριμένα, διερευνήθηκαν η επίδραση ακτινοβολήσης λέιζερ χαμηλής ενέργειας στα  $2\text{j}/\text{cm}^2$  και στα  $8\text{j}/\text{cm}^2$ . Η ακτινοβολήση πραγματοποιήθηκε σε σταθερές συνθήκες και τα πειράματα επανελήφθησαν τρεις φορές. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 και στο Διάγραμμα 1.

|    | DAY 1   | DAY 2   | DAY 3 |
|----|---------|---------|-------|
| 2j | 0,5005  | 0,64325 | 0,778 |
| 8j | 0,48975 | 0,68425 | 0,881 |

Πίνακας 1. Τιμές οπτικής απορρόφησης HGFs στις δύο εξεταζόμενες ομάδες



Διάγραμμα 1.

Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων βιοχημικής δοκιμασίας MTT

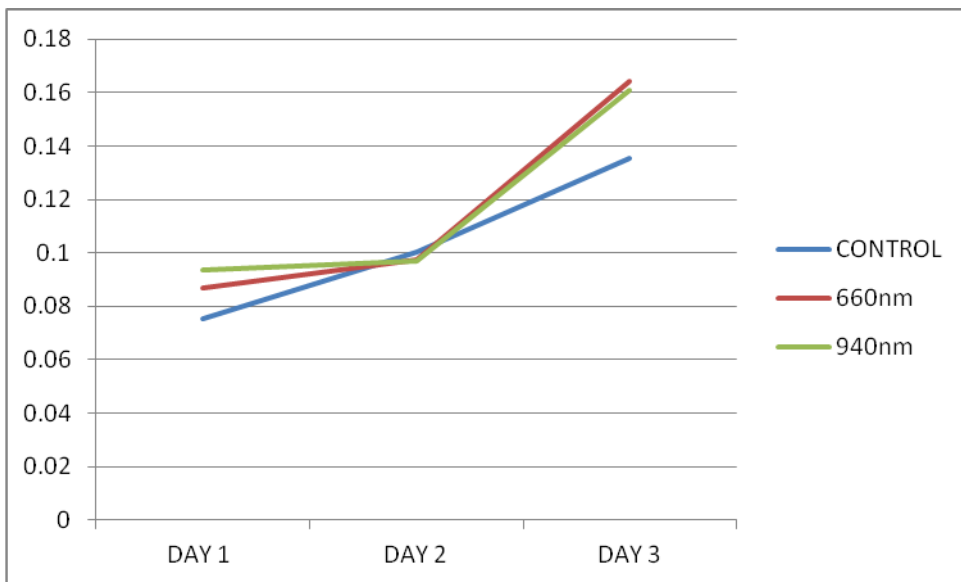
Την πρώτη ημέρα, μετά την ακτινοβόληση, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ως προς την ζωτικότητα κυττάρων (HGFs) για τις δύο ομάδες που μελετήθηκαν ( $2j/cm^2$  και  $8j/cm^2$ ). Όμως, καταγράφηκε σαφώς σημαντικότερη αύξηση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επομένως και στην ζωτικότητα HGFs στις επόμενες ημέρες που εξετάστηκαν (day 2, day 3), στην ομάδα με αποδιδόμενη ενέργεια ανά τετραγωνικό εκατοστό (fluence)  $8j/cm^2$ . Επομένως, φαίνεται ότι ανάμεσα στις δύο εξεταζόμενες ομάδες α.fluence  $2j/cm^2$  και β.fluence  $8j/cm^2$ , η επίδραση της ακτινοβολίας λέιζερ χαμηλής ενέργειας LLLI στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και άρα και στη ζωτικότητα HGFs είναι σημαντικότερη, όταν η αποδιδόμενη ενέργεια ανά τετραγωνικό εκατοστό είναι  $8j/cm^2$ . Έτσι, επιλέχθηκαν τα  $8j/cm^2$  ως η βέλτιστη δόση αποδιδόμενης ενέργεια μέσω ακτινοβόλησης με LLLI.

Περαιτέρω διερευνήθηκε η επίδραση της δόσης αυτής ενέργειας μέσω ακτινοβόλησης LLLI, με ακτινοβολίες διαφορετικού μήκους κύματος α. 660nm και β. 940nm.

Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ακτινοβόλησης λέιζερ AsGaAl, τάσης 140 mW με δυνατότητα ακτινοβόλησης μήκους κύματος 660nm και με συσκευή LLLI InGaAsP EPIC DIODE LASER, BIOLASE (940nm, 200mW). Δύο ομάδες ελέγχου εξετάστηκαν α. 660nm και β. 940nm. Οι μεταβλητές στα πειράματα ήταν τα μήκη κύματος LLLI και η τάση LLLI, ενώ οι σταθερές ήταν ο κυτταρικός πληθυσμός που χρησιμοποιήθηκε (HGFs) και οι χρόνοι ελέγχου (day 1, day 2, day

3). Η ακτινοβολήση πραγματοποιήθηκε σε σταθερές συνθήκες και τα πειράματα επανελήφθησαν τρεις φορές.

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δεν διαπιστώθηκε υπεροχή κάποιας από τις δύο εξεταζόμενες ακτινοβολίες (Πίνακας 2, Διάγραμμα 2, Πίνακας 3). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε η ίδια κυτταρική ανταπόκριση και στις δύο ομάδες ελέγχου. Παρατηρήθηκε αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αρχικά (day 1), η οποία δε συνεχίστηκε και καταγράφηκε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στο δεύτερο χρόνο ελέγχου (day 2). Η μείωση αυτή φαίνεται να αναστρέφεται στον τρίτο χρόνο ελέγχου, όπου η ακτινοβολήση LLLI διεγείρει περαιτέρω αύξηση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στη κυτταρική ζωτικότητα. Έτσι, την τρίτη μέρα ελέγχου παρατηρήθηκε αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και άρα και της ζωτικότητας HGFs και με στις δύο ομάδες ελέγχου χωρίς να καταγραφεί στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο εξεταζόμενες ομάδες.



Διάγραμμα 2. Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων βιοχημικής δοκιμασίας MTT

|              | <u>control</u> | <u>660nm</u>   | <u>940nm</u>   |
|--------------|----------------|----------------|----------------|
| <u>DAY 1</u> | <u>0.0755</u>  | <u>0.08675</u> | <u>0.0935</u>  |
| <u>DAY 2</u> | <u>0.10025</u> | <u>0.0975</u>  | <u>0.09675</u> |
| <u>DAY 3</u> | <u>0.1355</u>  | <u>0.16425</u> | <u>0.161</u>   |

Πίνακας 2. Τιμές οπτικής απορρόφησης HGFs στις εξεταζόμενες ομάδες

|              | <u>660nm</u>  | <u>940nm</u>  |
|--------------|---------------|---------------|
| <u>DAY 1</u> | <u>114,9</u>  | <u>123,84</u> |
| <u>DAY 2</u> | <u>97.25</u>  | <u>96.50</u>  |
| <u>DAY 3</u> | <u>121,21</u> | <u>118.81</u> |

Πίνακας 3. Επί της εκατό ποσοτικοποίηση αποτελεσμάτων οπτικής απορρόφησης HGFs στις δύο εξεταζόμενες ομάδες

Επειδή δεν παρατηρήθηκε υπεροχή ως προς τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην κυτταρική ζωτικότητα HGFs με κάποια από τις δύο εξεταζόμενες ακτινοβολίες LLLI, επιλέχθηκε η ακτινοβολία με LLLI μήκους κύματος 940nm, ώστε να χρησιμοποιηθεί συσκευή που έχει εφαρμογή στην κλινική πράξη και προτείνεται η χρήση της στους μαλακούς οδοντικούς ιστούς (ελεύθερα ούλα, βλεννογόνος κα).

Έτσι, οι παράμετροι που εφαρμόστηκαν στα κύρια πειράματα ήταν οι εξής:

**Μήκος κύματος** 940nm

**Τάση** 200mW

**Τύπος Λέιζερ** InGaAsP Διοδικό

**Fluence** 8 j/cm<sup>2</sup>