



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ



**Μελέτη της κυτταροτοξικότητας χημικομηχανικών
μέσων απώθησης ούλων σε ανθρώπινους
ουλικούς ινοβλάστες.**

Αγγελική Π. Στεργίδου

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Θεσσαλονίκη, 2018

**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗ»
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΠΡΟΣΘΕΤΙΚΗ**

**Μελέτη της κυτταροτοξικότητας χημικομηχανικών
μέσων απώθησης ούλων σε ανθρώπινους
ουλικούς ινοβλάστες**

Αγγελική Π. Στεργίδου

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Επιβλέπων: Πέτρος Κοΐδης, Καθηγητής

Τριμελή επιτροπή

Πέτρος Κοΐδης, Καθηγητής

Άννα Θεοχαρίδου, Λέκτορας

Αθηνά Μπακοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια

Θεσσαλονίκη, 2018

Η παρούσα μελέτη εγκρίθηκε από
την Επιτροπή Δεοντολογίας του Τμήματος Οδοντιατρικής
στη συνεδρίασή της στις 07-05-2018, με Αριθμό Πρωτοκόλλου 36.



**ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI
FACULTY OF HEALTH SCIENCES
SCHOOL OF DENTISTRY
POSTGRAGUATE PROGRAM «DENTISTRY»
DEISPLINARY: PROSTHODONTICS**



**Experimental study on cytotoxic effects of chemo –
mechanical gingival retraction agents on human
gingival fibroblasts.**

Angeliki P. Stergidou

Postgraduate Thesis

Thessaloniki, 2018

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου, είχα την τιμή να γνωρίσω και να συνεργαστώ με σπουδαίους επιστήμονες και ανθρώπους, οι οποίοι συνέβαλαν καθοριστικά στη διεύρυνση των γνωστικών μου πεδίων, την ανάπτυξη των δεξιοτήτων μου και τη γενικότερη εξέλιξή μου ως επιστήμονα. Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω από καρδιάς:

Τον Καθηγητή κο Κοϊδη Πέτρο, για τη συνεχή επίβλεψη και καθοδήγηση όχι μόνο στην παρούσα διπλωματική αλλά και σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου. Το ερευνητικό του ενδιαφέρον και η συνεχής παρότρυνσή του για εις βάθος μελέτη και ερμηνεία των φαινομένων αποτελούν μάθημα ζωής για μένα.

Τη Λέκτορα κα Θεοχαρίδου Άννα, η οποία με την επιστημονική της κατάρτιση, τη συνέπεια και την υπομονή της συνέβαλε τα μέγιστα στην εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής. Η συνεχής καθοδήγηση και η ακούραστη παρουσία της σε όλα τα στάδια, από το σχεδιασμό και την εκτέλεση των πειραματικών διαδικασιών έως και τη συγγραφή της παρούσας μελέτης, ήταν καθοριστικές.

Την Επίκουρη καθηγήτρια κα Μπακοπούλου Αθηνά, η οποία με το ειλικρινές της ενδιαφέρον, την εμπειρία και τις πολύτιμες γνώσεις της ήταν πάντα πρόθυμη να βοηθήσει στην επίλυση οποιουδήποτε προβλήματος και απορίας παρουσιαζόταν. Επίσης την ευχαριστώ θερμά για τη συμβολή της στην επεξεργασία και ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Τον Καθηγητή κο Ζαχαριάδη Γεώργιο, από το Τμήμα Χημείας του Α.Π.Θ. για τη μελέτη με φασματομετρία ατομικής εκπομπής σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα.

Την Επίκουρη καθηγήτρια κα Κοντονασάκη Ελεάνα, η οποία ως ακαδημαϊκή μου σύμβουλος στάθηκε πολύτιμη αρωγός με συνεχή διάθεση για βοήθεια και συμπαράσταση σε όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου πορείας.

Τον Καθηγητή κο Πισιώτη Αργύρη, για όλες τις πολύτιμες συμβουλές, την καθοδήγηση και τη μεταλαμπάδευση των γνώσεων και της εμπειρίας του. Η συμβολή του στη μεταπτυχιακή μου εκπαίδευση ήταν ανεκτίμητη.

Τον αναπληρωτή καθηγητή κο Μιχαλάκη Κωνσταντίνο, για την επίβλεψη μεγάλου μέρους της κλινικής και εργαστηριακής μου άσκησης και την προθυμία του στην επίλυση οποιουδήποτε προβληματισμού.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές του Τομέα Προσθετικής Α.Π.Θ. που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών σπουδών μου και την αποκόμιση πολύτιμων γνώσεων και εμπειριών αλλά και τους συμφοιτητές μου, χωρίς τους οποίους αυτό το ταξίδι δε θα μπορούσε να είναι το ίδιο.

Τέλος το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους δικούς μου ανθρώπους, την οικογένειά μου και το Βασίλη, για την αγάπη, τη στήριξη, και την κατανόησή τους όλο αυτό το διάστημα.

Αγγελική Στεργίδου

Θεσσαλονίκη, 2018

Στους γονείς μου:

Τον πατέρα και σπουδαιότερο δάσκαλό μου,
που μου λείπει πολύ.

Και στη μητέρα μου. Ένα ευχαριστώ είναι λίγο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η διερεύνηση της κυτταροτοξικότητας χημικομηχανικών μέσων απώθησης ούλων σε ανθρώπινους ουλικούς ινοβλάστες.

Μεθοδολογία: Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση διαφορετικών παραγόντων απώθησης ούλων (πάστα απώθησης, εμποτισμένο νήμα απώθησης, μη εμποτισμένο νήμα απώθησης και αιμοστατικό διάλυμα) σε θρεπτικό μέσο και τοποθέτησή τους σε κυτταροκαλλιέργειες ανθρώπινων ουλικών ινοβλαστών είτε για 10 είτε για 20 λεπτά, σε 3 διαφορετικές αραιώσεις (1:1, 1:2 και 1:4). Η βιοχημική δοκιμασία MTT χρησιμοποιήθηκε για τη εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής μιτοχονδριακής δραστηριότητας των κυττάρων τόσο αμέσως μετά την έκθεση όσο και 24, 48 and 72h αργότερα σε σύγκριση με αντίστοιχη ομάδα ελέγχου. Για την ποσοτική εκτίμηση της έκλυσης ιόντων αργιλίου από τα εκχυλίσματα των υλικών, πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματομετρία ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-AES).

Αποτελέσματα: Τα εκχυλίσματα του εμποτισμένου νήματος προκάλεσαν σημαντικά μεγαλύτερη μείωση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας στο χρόνο 0 ($p < 0.05$). Η έκθεση των κυττάρων στα εκχυλίσματα πάστας απώθησης συγκεκριμένης αραιώσης (1:2 και 1:4) οδήγησε σε ταχύτερη αύξηση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας ($p < 0.05$). Η έκθεση σε εκχυλίσματα μη εμποτισμένου νήματος και αιμοστατικού διαλύματος για 20 λεπτά προκάλεσε σημαντική μείωση της μεταβολικής δραστηριότητας έως τις 72h ($p < 0.05$). Τέλος από τη δοκιμασία ICP-AES προέκυψε ότι το εκχύλισμα της πάστας αραιώσης είχε εξαιρετικά μεγαλύτερη συγκέντρωση αργιλίου σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες.

Συμπεράσματα: Η κυτταρική έκθεση σε εκχυλίσματα πάστας απώθησης ούλων σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις οδήγησε σε μικρότερη μείωση της μεταβολικής δραστηριότητας, ταχύτερη ανάκαμψη και επιπρόσθετη διέγερση της μεταβολικής δραστηριότητας. Η έκθεση σε εκχύλισμα μη εμποτισμένου νήματος ή αραιωμένο αιμοστατικό διάλυμα στον μεγαλύτερο χρόνο (20 λεπτά) προκάλεσε μη αναστρέψιμη μείωση της μεταβολικής δραστηριότητας. Στις υπόλοιπες πειραματικές ομάδες παρατηρήθηκε ανάκαμψη του κυτταρικού μεταβολισμού στον τελευταίο χρόνο ελέγχου (72h). Το μοτίβο ανάκαμψης διαφέρει ανάλογα με το υλικό και το χρόνο έκθεσης.

Λέξεις – κλειδιά: απώθηση ούλων, κυτταροτοξικότητα, νήμα απώθησης, πάστα απώθησης, ουλικοί ινοβλάστες, χλωριούχο αργίλιο

ABSTRACT

Aim: The aim of this study was to evaluate cytotoxic effects of different gingival retraction agents on human gingival fibroblasts.

Materials and methods: Human gingival fibroblasts were treated with eluates of different retraction agents (paste, impregnated cord, hemostatic solution and non – impregnated cord) either for 10 or 20 minutes. The MTT assay was used to evaluate oxidoreductive mitochondrial function immediately after exposure and 24, 48 and 72h later, compared to untreated control. ICP – AES analysis was used to quantify ion release of eluates.

Results: Impregnated cord eluates caused higher initial reduction of oxidative mitochondrial function compared to control ($p<0.05$). Cell exposure to paste eluates at certain concentrations resulted in faster metabolic recovery and further stimulation of mitochondrial activity ($p<0.05$). Cell exposure at hemostatic solution and non impregnated cord eluates for 20min resulted in significant metabolic reduction ($p<0.05$) until 72h. Paste eluates contained much higher concentration of aluminium than impregnated cord and hemostatic solution eluates.

Conclusion: Cell exposure to paste eluates at certain concentrations resulted in better initial cell response, faster metabolic recovery and stimulation of mitochondrial activity. Cell exposure at hemostatic solution and non impregnated cord eluates for 20min resulted in non reversible metabolic reduction. For the rest of experimental groups normal mitochondrial function was observed at 72h. Pattern of cell recovery differs according to material and exposure time.

Key words: gingival retraction, cytotoxicity, retraction cord, retraction paste, gingival fibroblasts, aluminum chloride

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
A1. ΑΠΩΘΗΣΗ ΟΥΛΩΝ	1
A1.1. Γενικά στοιχεία	1
A1.2. Μέθοδοι απώθησης - Χημικές ουσίες.....	2
A1.3. Ανεπιθύμητες ενέργειες - Κυτταροτοξικότητα.....	10

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΣΚΟΠΟΣ	13
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	13
<u>B1. ΥΛΙΚΑ</u>	
B1.1. Υλικά απώθησης – Χημικές ουσίες.....	13
B1.2. Ανάπτυξη κυτταρικών καλλιιεργειών ανθρώπινων ουλικών ινοβλαστών (HGF).....	16
<u>B2. ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	
B.2.1. Δοκιμασίες ελέγχου κυτταροτοξικότητας	17
B.2.2 Φασματομετρία ατομικής εκπομπής σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (Inductively Coupled Plasma atomic emission spectroscopy ICP - AES).....	20

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1. Δοκιμασία ΜΤΤ.....	24
Γ.2 Φασματομετρία ατομικής εκπομπής σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (Inductively Coupled Plasma mass atomic emission spectroscopy ICP - AES).....	38
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	39
Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ	46
ΣΤ. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ	48
Ζ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49
Η. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	58

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A1. ΑΠΩΘΗΣΗ ΟΥΛΩΝ

A1.1. Γενικά στοιχεία

Η απώθηση ούλων αποτελεί μια κλινική διαδικασία με ευρεία εφαρμογή τόσο στην προσθετική όσο και στην επανορθωτική οδοντιατρική. Σκοπός της είναι η προσωρινή απομάκρυνση των ελεύθερων ούλων από τους οδοντικούς ιστούς, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται είτε η ατραυματική παρασκευή των δοντιών είτε ο έλεγχος της ροής του υγρού της ουλοδοντικής σχισμής είτε τέλος ο απαραίτητος χώρος για την πρόσβαση ικανοποιητικού πάχους αποτυπωτικού υλικού στην κρίσιμη περιοχή του αυχενικού ορίου, τόσο σε οριζόντιο επίπεδο (τουλάχιστον 0,2mm στη περιοχή του ορίου), όσο και σε κάθετο, για την έκθεση του ορίου της οδοντικής παρασκευής (The Glossary of Prosthodontic Terms, 2017). Η ακριβής αποτύπωση είναι ιδιαίτερα σημαντική και πρέπει να περιλαμβάνει το όριο του παρασκευασμένου δοντιού και ικανοποιητικό εύρος του ακρορριζικότερου – μη παρασκευασμένου τμήματος. Η διαδικασία αυτή αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την επίτευξη ακριβούς εφαρμογής στην κατασκευή μιας προσθετικής αποκατάστασης με κλινικά αποδεκτή οριοθέτηση και σωστό περίγραμμα (Benson και συν., 1986, Rosenstiel και συν., 2006).

Σύμφωνα με τους Donovan και συν. (1985), τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την απώθηση ούλων θα πρέπει να πληρούν τα εξής κριτήρια :

1. Να είναι αποτελεσματικά: Θα πρέπει να επιτυγχάνουν επαρκή απώθηση των μαλακών ιστών σε οριζόντιο και κάθετο επίπεδο.

2. Να μην προκαλούν σημαντική μη αντιστρεπτή βλάβη στους ιστούς (τόσο στην εκτεθειμένη οδοντίνη όσο και στους μαλακούς ιστούς)
3. Να μην έχουν συστηματικές επιδράσεις, καθώς είναι δυνατή η απορρόφηση τους από την ουλοδοντική σχισμή στην κυκλοφορία.

A.1.2. Μέθοδοι απώθησης – Χημικές ουσίες

Οι μέθοδοι απώθησης ούλων ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις **μη χειρουργικές**, που αποτελούν τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες και υποδιαιρούνται στις μηχανικές και τις χημικομηχανικές μεθόδους και τις **χειρουργικές**, που περιλαμβάνουν την περιφερική ουλική απόξεση και τις ηλεκτροχειρουργικές μεθόδους (La Forgia, 1964, Nemetz, 1974, Benson και συν., 1986, Shillingburg και συν., 1997, Thomas και συν., 2011).

A. Μη χειρουργικές μέθοδοι

1. Μηχανικές μέθοδοι: Είναι οι πρώτες μέθοδοι που εφαρμόστηκαν και περιλαμβάνουν μηχανική/φυσική απομάκρυνση των ιστών με τη χρήση διαφόρων υλικών όπως:

Δακτύλιοι χαλκού: Χρησιμοποιήθηκαν παλαιότερα τόσο για απώθηση των ούλων όσο και για την αποτύπωση σε συνδυασμό με θερμοπλαστικά ή ελαστομερή υλικά, με ή χωρίς ακρυλική ενίσχυση. Αποτελούσε χρήσιμη μέθοδο ιδιαίτερα σε αποτύπωση πολλαπλών παρασκευασμένων δοντιών, όπου ήταν δυνατή η επανάληψη της αποτύπωσης μεμονωμένου κολοβώματος. Ωστόσο μειονεκτήματα όπως ο χρόνος τοποθέτησης, η δυσκολία αφαίρεσης και το επακόλουθο τραύμα των ιστών οδήγησαν σταδιακά στην εγκατάλειψη της τεχνικής αυτής (Shillingburg και συν., 1997).

Ελαστικός απομονωτήρας: Χρησιμοποιείται σπάνια για απώθηση ούλων σε περιπτώσεις αποτύπωσης μικρού αριθμού κολοβωμάτων σε ένα τεταρτημόριο, όταν η υποουλική επέκταση της παρασκευής είναι περιορισμένη σε συνδυασμό με τροποποιημένα δισκάρια και εφόσον ανακουφιστούν τα περύγια και το τόξο της αρπάγης (Benson και συν., 1986). Ωστόσο, η χρήση του αντενδείκνυται σε αποτυπώματα με πολυβινυλ-σιλοξάνη, λόγω της αναστολής πολυμερισμού που προκαλούν οι θειούχες ενώσεις του ελαστικού στο υλικό (Noonan και συν., 1985).

Μη εμποτισμένο νήμα απώθησης: Κατασκευάζεται από βαμβάκι, συνθετικό υλικό ή συνδυασμό των δύο και παρέχεται σε διάφορα πάχη και διαφορετικές μορφές όπως απλό, συνεστραμμένο, πλεγμένο κτλ (Shillingburg και συν., 1997). Ωστόσο, η χρήση του χωρίς εμπότιση με κάποιο αιμοστατικό παράγοντα έχει μειωμένη εφαρμογή και αποτελεσματικότητα στην αποτύπωση, καθώς η απαραίτητα ασκούμενη πίεση για την τοποθέτησή του προκαλεί συχνά αιμορραγία στους ιστούς, γεγονός που καθιστά αναγκαία την επανάληψη της αποτύπωσης (Pelzner και συν., 1978, Weir και συν., 1984).

Ταινίες απώθησης ούλων: Είναι νεότερα συνθετικά υλικά που κατασκευάζονται από βιοσυμβατά πολυμερή (υδροξυλιωμένο οξικό πολυβινύλιο). Οι σπογγοειδείς αυτές ταινίες έχουν πάχος 2mm και παρουσιάζουν ευκολία στην τοποθέτηση, απορροφούν ενδοστοματικά υγρά (σάλιο, αίμα, υγρό ουλοδοντικής σχισμής) και δεν προκαλούν τραύμα στους ιστούς (Ferrari και συν., 1996).

Ελαστομερή υλικά: Αποτελούν εναλλακτικές μηχανικές μεθόδους απώθησης ούλων. Μία από τις μεθόδους αυτές προτάθηκε από τον Livaditis (1998) και περιλαμβάνει τη χρήση μιας εξατομικευμένης μήτρας

από πολυβινυλ-σιλοξάνη για τη μεταφορά και προώθηση του αποτυπωτικού υλικού μέσα στην ουλοδοντική σχισμή. Ακόμα, η χρήση αυτο – διαστελλόμενου υλικού πολυβινυλ-σιλοξάνης που τοποθετείται με σύριγγα στην ουλοδοντική σχισμή, απελευθερώνοντας εν συνεχεία υδρογόνο, έχει χρησιμοποιηθεί με ικανοποιητικά αποτελέσματα στη βιβλιογραφία (Beier και συν., 2009, Gurta και συν., 2013).

2. Χημικομηχανικές μέθοδοι: Είναι οι πιο συχνά εφαρμοζόμενες μέθοδοι στην κλινική πράξη. (Shillingburg και συν. 1980, Donovan και συν., 1985, Shaw και συν., 1986, Hansen και συν., 1999, Ahmed & Donovan, 2015). Βασίζονται τόσο στη μηχανική δράση του υλικού απώθησης όσο και στην αιμοστατική δράση διαφόρων χημικών ουσιών που ενσωματώνονται στο υλικό (συνήθως στυπτηρίες). Οι χημικομηχανικές μέθοδοι απώθησης περιλαμβάνουν:

Νήμα απώθησης σε συνδυασμό με αιμοστατικό παράγοντα: Το νήμα μπορεί να είναι προ – εμποτισμένο ή να εμποτίζεται από τον κλινικό σε αιμοστατικό διάλυμα πριν την εφαρμογή του. Η μέθοδος αυτή αποτελεί τη δημοφιλέστερη τεχνική απώθησης καθώς χρησιμοποιείται από την πλειοψηφία των κλινικών (Shillingburg και συν. 1980, Donovan και συν., 1985, Shaw και συν., 1986, Hansen και συν., 1999, Ahmed & Donovan, 2015).

Πάστες απώθησης ούλων με αιμοστατικό παράγοντα: Αποτελούν νεότερα υλικά, τα οποία εισάγονται στην ουλοδοντική σχισμή με τη χρήση σύριγγας, προκαλώντας μηχανική διεύρυνσή της σε συνδυασμό με χημικό έλεγχο της αιμορραγίας, ασκώντας σημαντικά χαμηλότερη πίεση (37,7 φορές) στους ιστούς σε σχέση με το νήμα (Bennani και συν., 2012). Περιέχουν συνήθως 15% $AlCl_3$, 15% νερό, 50% ενισχυτικά σωματίδια (fillers)

(συνήθως μήτρα καολίνη), και κάποιους τροποποιητές (20%) (Poss, 2002) Παράδειγμα τέτοιου προϊόντος αποτελεί μια ιξώδης υδρόφιλη πάστα σε ενέσιμη μορφή που βασίζεται στις αιμοστατικές ιδιότητες του χλωριούχου αργιλίου 15% (AlCl_3) και την υγροσκοπική διαστολή του ένυδρου πυριτικού αργιλίου (καολίνη) ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Poss, 2002, Shannon, 2002). Άλλο είδος πάστας απώθησης ούλων χρησιμοποιεί τη δύναμη πήξης του ασθενή για την προώθηση του υλικού στην ουλοδοντική σχισμή, μέσω μιας προκατασκευασμένης μήτρας για μεμονωμένο δόντι ή εξατομικευμένης για πολλαπλές οδοντικές παρασκευές (Strassler και συν., 2006).

Ανάλογα με τη φαρμακολογική τους δράση, οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στη χημικομηχανική μέθοδο απώθησης ούλων ταξινομούνται σε 2 κατηγορίες:

I. Αγγειοσυσπαστικοί - αδρενεργικοί παράγοντες

Είναι οργανικά άλατα του υδροχλωρικού οξέος που δρουν συστέλλοντας τα αγγεία μέσω διέγερσης των αδρενεργικών υποδοχέων, χωρίς να συμμετέχουν στο μηχανισμό της πήξης του αίματος (Mohan και συν., 2011) . Υποδιαιρούνται σε 2 ομάδες (Nowakowska, 2010):

- i. α και β αδρενεργικοί παράγοντες*: Η *επινεφρίνη* στη ρακεμική της μορφή (dl) αποτέλεσε τη συχνότερα χρησιμοποιούμενη χημική ουσία για την απώθηση ούλων κυρίως κατά τη δεκαετία του 1980 (Shillingburg και συν., 1980, Donovan και συν., 1985, Shaw και συν., 1986). Δρα προκαλώντας διέγερση των άλφα, βήτα - 1 και βήτα - 2 αδρενεργικών υποδοχέων. Προκαλεί σύσπαση των μικρών αγγείων του υποβλεννογόνιου ιστού (μέσω των άλφα υποδοχέων), οδηγώντας σε καθυστέρηση της απορρόφησης του τοπικού

αναισθητικού και παράταση της δράσης του καθώς και σε μείωση της αιμορραγίας των ιστών. Ωστόσο, μέσω της διέγερσης των βήτα - 1 και βήτα - 2 αδρενεργικών υποδοχέων, η απορρόφησή της στην κυκλοφορία του αίματος είναι δυνατόν να οδηγήσει σε συστηματικές εκδηλώσεις, γνωστές με τον όρο «σύνδρομο της επινεφρίνης» (ταχυκαρδία, αύξηση της αρτηριακής πίεσης, ταχεία αναπνοή, αδυναμία, τρόμος και σύγχυση) (Gogerty και συν., 1957, Phatak & Land, 1966, Forsyth και συν., 1969, Stark και συν., 1977) . Δεδομένης της υψηλής συγκέντρωσής της στο νήμα απώθησης (0.2 – 1 mg/ ίντσα νήματος), η χρήση της ως παράγοντας απώθησης είναι περιορισμένη και πλήρως αντενδεικνυόμενη σε ασθενείς με καρδιαγγειακές διαταραχές (Donovan και συν., 1985, Felpel, 1997, Glick, 1998, Bader και συν., 2002).

ii. α αδρενεργικοί παράγοντες: Είναι συμπαθομιμητικές αμίνες με αγγειοσυσπαστική δράση, χωρίς τις συστηματικές επιδράσεις της αδρεναλίνης. Χρησιμοποιούνται θεραπευτικά στην οφθαλμολογία και λαρυγγολογία και προτάθηκαν το 1991 ως εναλλακτικές ουσίες της ρακεμικής επινεφρίνης (Bowles και συν., 1991). Σε αυτές περιλαμβάνονται η υδροχλωρική τετραϋδροζολίνη 0,05%, η υδροχλωρική οξυμεταζολίνη 0,05% και η υδροχλωρική φαινυλεφρίνη 0,25%. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οι ουσίες αυτές έχουν πιο αποδεκτό pH σε σχέση με τους υπόλοιπους παράγοντες απώθησης και ηπιότερη επίδραση στους οδοντικούς και μαλακούς ιστούς (Woody και συν., 1993), ενώ in vitro μελέτες έχουν αποδείξει μικρότερη κυτταροτοξικότητα έναντι των υπόλοιπων παραγόντων απώθησης (Korac και συν., 2002, Nowakowska και συν., 2012, Nowakowska και συν., 2014) .

II. Αιμοστατικοί – στυπτικοί παράγοντες

Είναι ανόργανα άλατα μετάλλων, που μειώνουν τον όγκο των ελεύθερων ούλων μέσω του μηχανισμού της αιμόστασης και κατακρημνίζουν πρωτεΐνες του αίματος. Οι κατακρημνισμένες αυτές πρωτεΐνες αναστέλλουν τη διατριχοειδική μετακίνηση πρωτεϊνών του πλάσματος και μειώνουν την αιμορραγία των τριχοειδών (FelpeI, 1997). Δε διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη, κατά συνέπεια η δράση τους περιορίζεται στην επιφανειακή στοιβάδα του βλεννογόνου (Mohan και συν., 2011). Είναι ουσίες με υψηλή οξύτητα και pH που κυμαίνεται από 0.8 έως 3 (Woody και συν., 1993). Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες αιμοστατικές ουσίες στην απώθηση ούλων είναι οι εξής:

i. Ενώσεις θειικού αργιλίου:

- Θειικό αργίλιο – κάλιο $AlK(SO_4)_2$ (Alum): Σε 100% συγκέντρωση είναι ελάχιστα λιγότερο αποτελεσματικό σε σχέση με την επινεφρίνη ως προς τη συρρίκνωση των ιστών και προκαλεί μικρότερη μετεπεμβατική φλεγμονή των ούλων, ενώ στερείται τις συστηματικές επιδράσεις της επινεφρίνης (De Gennaro και συν., 1986, Benson και συν., 1986).

- Θειικό αργίλιο $(Al_2(SO_4)_3$: Είναι αποτελεσματικός και βιοσυμβατός αιμοστατικός παράγοντας (Weir, 1984). Ο προβληματισμός της ενδεχόμενης αναστολής/καθυστέρησης του πολυμερισμού της πολυβινυλ-σιλοξάνης εξαιτίας των θειούχων ενώσεων των χημικομηχανικών μέσων απώθησης ούλων φαίνεται να έχει απορριφθεί από σύγχρονα βιβλιογραφικά δεδομένα (de Carmargo και συν., 1993, Palhares και συν., 2011)

- ii. Χλωριούχο αργίλιο (AlCl₃): Αποτελεί το συχνότερα χρησιμοποιούμενο αιμοστατικό παράγοντα (Hansen και συν., 1999), και χρησιμοποιείται σε συγκεντρώσεις 5% - 25%. Κλινικές και εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει δυνητική τοξικότητα σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 10% (Jokstad, 1999, Korac και συν., 2002, Korac και συν., 2002).
- iii. Θειικός σίδηρος (Fe₂(SO₄)₃): Χρησιμοποιείται σε συγκεντρώσεις 13% - 20%, παρέχοντας ικανοποιητική αιμόσταση. Μειονέκτημά του αποτελεί η παροδική (διάρκειας λίγων ημερών) καφέ – κίτρινη χρώση των μαλακών ιστών. Όσον αφορά στους οδοντικούς ιστούς, ο όξινος παράγοντας μπορεί να προκαλέσει διάλυση του οδοντινικού επιχρίσματος (smear layer), με επακόλουθη οδοντινική υπερευαισθησία αλλά και δυσχρωμίες της εκτεθειμένης οδοντίνης που συνεπάγονται αισθητικά προβλήματα σε περίπτωση ολοκεραμικών αποκαταστάσεων (Land και συν., 1994, Land και συν., 1996).
- iv. Χλωριούχος ψευδάργυρος (ZnCl₂): Είναι λιγότερο συχνά χρησιμοποιούμενη χημική ουσία. Λόγω της υψηλής οξύτητας της, συγκεντρώσεις άνω του 20% προκαλούν μη αντιστρεπτές βλάβες στους μαλακούς ιστούς, ακόμη και στο οστό και δε χρησιμοποιούνται πλέον στην κλινική πράξη (Harisson, 1961, Woychesin, 1964).

B. Χειρουργικές μέθοδοι

Χρησιμοποιούνται λιγότερο από τις μη χειρουργικές μεθόδους, λόγω της αναφερόμενης καταστροφής στο ουλο – οδοντικό σύμπλεγμα ιδιαίτερα σε λεπτό βιότυπο ούλων, και προτείνονται μόνο σε συγκεκριμένες περιπτώσεις αφαίρεσης υπερπλαστικών ιστών (Azzì και συν., 1983). Η

επούλωση επιτυγχάνεται σε 10-14 μέρες, ωστόσο μετεγχειρητικά έχει παρατηρηθεί εμφάνιση υφιζήσεων που προκαλεί υποβάθμιση του αισθητικού αποτελέσματος, νεκρώσεις ιστών ακόμη και καταστροφή των εν τω βάθει ιστικών στοιβάδων (Coelho και συν., 1975). Οι κυριότερες χειρουργικές μέθοδοι είναι:

1. Περιφερική ουλική απόξεση: Περιλαμβάνει την αφαίρεση υγιούς ουλικού ιστού περιφερικά του δοντιού με ειδικά σχεδιασμένη για το σκοπό αυτό εγγλυφίδα, με 3° αξονική κωνικότητα και 45° ακτίνα στο κοπτικό άκρο (Ingraham και συν., 1981). Το ύψος των ελεύθερων ούλων διατηρείται, με σκοπό τη δημιουργία του απαραίτητου χώρου για το αποτυπωτικό υλικό (Ingraham και συν., 1981, Kamansky και συν., 1984, De Vitre και συν., 1985). Χρησιμοποιείται μόνο εφόσον υπάρχει ικανοποιητικό εύρος προσπεφυκώτων ούλων, καθώς, ένα δυνητικό τραύμα στο προσπεφυκός επιθήλιο είναι δυνατόν να προκαλέσει υφίζηση των ιστών (Brady, 1982).
2. Ηλεκτροχειρουργική μέθοδος: Περιλαμβάνει την αφαίρεση ουλικού ιστού με ταυτόχρονη επίτευξη αιμόστασης. Αποτελεί τη μέθοδο εκλογής όταν επιδιώκεται η μόνιμη τροποποίηση της αρχιτεκτονικής των ελεύθερων ούλων, όπως η μείωση του ύψους τους, η διεύθυνση της ουλοδοντικής σχισμής ή η τροποποίηση της κλινικής πρόσφυσης (Fisher 1976). Σε σύγκριση με την περιφερική ουλική απόξεση, οδηγεί σε μεγαλύτερη απώλεια ιστών, ενώ αντενδείκνυται σε ασθενείς με καρδιακούς βηματοδότες (De Vitre και συν., 1984)
3. Laser: Διάφοροι τύποι laser (διοδικά, Nd:YAG, Er:YAG, CO₂) χρησιμοποιούνται για την απώθηση ούλων με ικανοποιητική

αιμόσταση, μικρότερο τραύμα και ταχύτερη επούλωση σε σχέση με τις υπόλοιπες χειρουργικές μεθόδους (Parker, 2004, Krishna 2013).

A.1.3. Ανεπιθύμητες ενέργειες - Κυτταροτοξικότητα

Λόγω του όξινου pH τους (0.8 – 3.0) οι περισσότεροι παράγοντες απώθησης ούλων αποτελούν κίνδυνο τόσο για την εκτεθειμένη οδοντίνη όσο και για τους περιοδοντικούς ιστούς (Land και συν., 1994, Land και συν., 1996, Ayo Yusuf και συν., 2005). Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ανεπιθύμητες τοπικές αντιδράσεις που προκαλούνται από τις αιμοστατικές – συτυπτικές ουσίες που περιέχονται σε προ – εμποτισμένα νήματα απώθησης, σε αιμοστατικά διαλύματα ή σε πάστες απώθησης (Harisson, 1961, de Gennaro και συν., 1982, Shaw και συν., 1983, Korac και συν., 2002, Akca και συν., 2006, Phatale και συν., 2010). Κάποιες από αυτές είναι φλεγμονή των ούλων σε συνδυασμό με αιμορραγία, οίδημα, εξελκώσεις και πόνο. Για τις περισσότερες χημικές ουσίες παρατηρείται αποδρομή των συμπτωμάτων μετά από 1 - 14 μέρες (de Gennaro και συν., 1982, Korac και συν., 2002, Akca και συν., 2006), ενώ άλλες, που δε χρησιμοποιούνται πλέον, προκαλούσαν νεκρώσεις ιστών και μη αντιστρεπτές βλάβες στο καταδυόμενο και προσπεφυκός επιθήλιο, και στον υποκείμενο συνδετικό (Harisson, 1961, Woycheshin, 1964).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, υπάρχει άμεση συσχέτιση του χρόνου παραμονής του παράγοντα απώθησης στην ουλοδοντική σχισμή και του κινδύνου εμφάνισης επιπλοκών όπως η υφίζηση (Goodacre, 1990). Ο προτεινόμενος χρόνος παραμονής των μέσων απώθησης στην ουλοδοντική σχισμή είναι όχι λιγότερο από 3 λεπτά, για να επιτευχθεί ικανοποιητική απώθηση των ιστών και όχι παραπάνω από 10 λεπτά, καθώς αυτό μπορεί

να οδηγήσει σε μη αντιστρεπτή βλάβη στους ιστούς και τελικά σε υφίζηση αυτών (Harison 1961, Loe & Silness 1963, Nemetz και συν., 1984, Buttendorf και συν., 2015). Ωστόσο, στην κλινική πράξη συχνά η παραμονή των υλικών υπερβαίνει τους προτεινόμενους χρόνους, ιδιαίτερα κατά τη λήψη τελικών αποτυπωμάτων για εκτεταμένες προσθετικές αποκαταστάσεις, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε υφίζηση των μαλακών ιστών, υποβάθμιση του αισθητικού αποτελέσματος, υπερευαισθησία λόγω της εκτεθειμένης οδοντικής ουσίας και επακόλουθη ανάγκη για επανάληψη της αποκατάστασης με ακρορριζικότερη οριοθέτηση της κατασκευής, ιδιαίτερα σε περιοχές της πρόσθιας αισθητικής ζώνης.

Κυτταροτοξικότητα ενός υλικού ορίζεται η πρόκληση μιας σειράς μοριακών γεγονότων που οδηγούν σε λειτουργική και δομική κυτταρική βλάβη (Williams, 2014). Η κυτταροτοξικότητα των οδοντιατρικών υλικών και παραγόντων αξιολογείται όταν τα κύτταρα εκτίθενται στο υλικό είτε με άμεση επαφή είτε έμμεσα, με επαφή στα προϊόντα που απελευθερώνονται από αυτό. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ευρέως οι κυτταροκαλλιέργειες ανθρώπινων ουλικών ινοβλαστών.

Η κυτταροτοξικότητα των παραγόντων απώθησης ούλων αποτελεί σημαντική παράμετρο που εκτιμάται σε συνάρτηση με το χρόνο παραμονής τους στην ουλοδοντική σχισμή. Αν και στην περίπτωση των υλικών απώθησης, τα επιθηλιακά κύτταρα της ουλοδοντικής σχισμής είναι τα πρώτα που έρχονται σε επαφή με το νήμα ή τις χημικές ουσίες, η δυσκολία επίτευξης πρωτογενούς κυτταρικής σειράς επιθηλιακών κυττάρων οδήγησε στη χρήση ανθρώπινων ουλικών ινοβλαστών, οι οποίοι έρχονται επίσης σε επαφή με τα υλικά ύστερα από εξελκώσεις των επιθηλιακών κυττάρων, άρα

η μελέτη της βιολογικής τους συμπεριφοράς έχει ενδιαφέρουσα κλινική ερμηνεία.

Η κυτταροτοξικότητα των παραγόντων απώθησης ούλων δεν έχει μελετηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία. Όσον αφορά το νήμα απώθησης, οι Liu και συν. (2004) μελέτησαν την κυτταροτοξικότητα 3 διαφορετικών υλικών (μη εμποτισμένο, εμποτισμένο με επινεφρίνη και εμποτισμένο με θειικό αργίλιο - $Al_2(SO_4)_3$) σε ανθρώπινους ουλικούς ινοβλάστες, τόσο με άμεση επαφή όσο και με εκχυλίσματα αυτών. Χρησιμοποιώντας τη χρωματομετρική μέθοδο MTT απέδειξαν την κυτταροτοξικότητα και των 3 υλικών, με το εμποτισμένο με επινεφρίνη νήμα να εμφανίζει τη μεγαλύτερη τοξικότητα.

Όσον αφορά τα αιμοστατικά διαλύματα, οι Korac και συν. (2002), χρησιμοποίησαν 4 από αυτά (θειικό αργίλιο, χλωριούχο αργίλιο 10% και 25% και τετραϋδροζολίνη) τόσο στις αρχικές συγκεντρώσεις τους όσο και αραιωμένα με θρεπτικό μέσο σε αναλογίες 1:1 και 1:10 και χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αποκλεισμού με Trypan Blue, τον έλεγχο της ικανότητας σχηματισμού αποικιών (Colony forming ability – CFA) καθώς και τη δοκιμασία MTT απέδειξαν την κυτταροτοξικότητα των υλικών, με περισσότερο τοξικό το χλωριούχο αργίλιο 25%. Σε παρόμοιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Yalcin και συν. (2013) με συνεχή παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο (δοκιμασία xCELLingence). Οι Farzin και συν. (2016) χρησιμοποίησαν αιμοστατικά σε μορφή γέλης και απέδειξαν μέσω της δοκιμασίας MTT τη μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα του αιμοστατικού 25% χλωριούχο αργίλιο. Τέλος, οι Nowakowska και συν. (2010, 2012) μελέτησαν την κυτταροτοξικότητα αιμοστατικών και αγγειοσυσπαστικών σε μορφή διαλύματος και γέλης, και κατέληξαν μέσω της ίδιας δοκιμασίας στη μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα του θειικού σιδήρου από την ομάδα των

αιμοστατικών και στη μεγαλύτερη βιοσυμβατότητα της τετραϋδροζολίνης από την ομάδα των αγγειοσυσπαστικών ουσιών.

Όσον αφορά τα υλικά σε μορφή πάστας απώθησης, δεν υπάρχει in vitro ερευνητική εργασία σχετικά την κυτταροτοξικότητά τους.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η διερεύνηση της κυτταροτοξικότητας της πάστας απώθησης ούλων (15% χλωριούχο αργίλιο) συγκριτικά με το νήμα απώθησης εμποτισμένο με χλωριούχο αργίλιο, το μη εμποτισμένο νήμα και το αιμοστατικό διάλυμα χλωριούχου αργιλίου σε ανθρώπινους ουλικούς ινοβλάστες. Ως ανεξάρτητες μεταβλητές ορίζονται τα διαφορετικά υλικά, οι διαφορετικοί χρόνοι έκθεσης και ελέγχου των κυττάρων και ως εξαρτημένη η κυτταροτοξικότητα.

Ερευνητικές υποθέσεις

Υπόθεση 1: Δεν υπάρχει διαφορά ως προς την κυτταροτοξικότητα ανάμεσα στα διαφορετικά υλικά απώθησης.

Υπόθεση 2: Δεν υπάρχει διαφορά ως προς την κυτταροτοξικότητα ανάμεσα στις διαφορετικές αραιώσεις του ίδιου υλικού.

Υπόθεση 3: Δεν υπάρχει διαφορά ως προς την κυτταροτοξικότητα του ίδιου υλικού στους διαφορετικούς χρόνους έκθεσης.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B1. ΥΛΙΚΑ

B.1.1. Υλικά απώθησης – Χημικές ουσίες

Για τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας των χημικομηχανικών μέσων απώθησης ούλων χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικά υλικά:

1. Πάστα απώθησης – 15% χλωριούχο αργίλιο (AlCl_3) (astrinGIVAL - AHL Brand)
2. Νήμα απώθησης εμποτισμένο με χλωριούχο αργίλιο (AlCl_3) $0.50 \pm 0.1 \text{ mg}$ / ίντσα (SURE - Cord® - Knitted Retraction Cord 00)
3. Νήμα απώθησης μη εμποτισμένο (SURE - Cord® - Knitted Retraction Cord 00)
4. Αιμοστατικό διάλυμα – 25% χλωριούχο αργίλιο (AlCl_3) (Hemostal - Prevest Denpro).

Όσον αφορά στην πάστα και τα νήματα απώθησης, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα των υλικών αυτών σε θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Cat n° LM-D1102/500, Lot n° 016BS051, Biosera) με αντιβιοτικά πενικιλίνης/ στρεπτομυκίνης/ αμφοτερικίνης Β (100 U/ml πενικιλίνη, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ στρεπτομυκίνη και 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ αμφοτερικίνη Β), σε αναλογία $1\text{cm}^2 / \text{ml}$ (surface / volume ratio – ISO 10994 – 12). Το αιμοστατικό διάλυμα αραιώθηκε σε αναλογία 0,6mg / ml, σε αντιστοιχία με την ποσότητα AlCl_3 στο εμποτισμένο νήμα. Τα αρχικά διαλύματα τοποθετήθηκαν για 24h σε αποστειρωμένο επωαστικό κλίβανο στους $37 \pm 1^\circ\text{C}$ με 100% υγρασία και 5% CO_2 . Μετά από 24h εκχύλισης, έγινε αποστείρωση των διαλυμάτων με φίλτρο αποστείρωσης Corning®, μεγέθους πόρων 0,2 μm και εκ νέου αραιώσή τους με θρεπτικό μέσο DMEM.

Οι αραιώσεις που μελετήθηκαν για κάθε πειραματική ομάδα είναι 1:1 (αρχικό διάλυμα), 1:2, και 1:4. Συμπερασματικά, προέκυψαν 4 πειραματικές ομάδες με 3 αραιώσεις η καθεμία (12 ομάδες συνολικά):

1. Πειραματική ομάδα Paste: Περιλαμβάνει την αρχική συγκέντρωση (1:1) και τα 2 διαλύματα που προέκυψαν από την αραιώση του αρχικού διαλύματος με θρεπτικό:

- α. Paste 1:1
- β. Paste 1:2
- γ. Paste 1:4

2. Πειραματική ομάδα Cord - Impregnated: Περιλαμβάνει την αρχική συγκέντρωση (1:1) και τα 2 διαλύματα που προέκυψαν από την αραιώση του αρχικού διαλύματος με θρεπτικό:

- α. Cord Impregnated 1:1
- β. Cord Impregnated 1:2
- γ. Cord Impregnated 1:4

3. Πειραματική ομάδα Cord - Non Impregnated: Περιλαμβάνει την αρχική συγκέντρωση (1:1) και τα 2 διαλύματα που προέκυψαν από την αραιώση του αρχικού διαλύματος με θρεπτικό:

- α. Cord Non Impregnated 1:1
- β. Cord Non Impregnated 1:2
- γ. Cord Non Impregnated 1:4

4. Πειραματική ομάδα Hemostatic Solution: Περιλαμβάνει την αρχική συγκέντρωση (1:1) και τα 2 διαλύματα που προέκυψαν από την αραιώση του αρχικού διαλύματος με θρεπτικό:

- α. Hemostatic Solution 1:1
- β. Hemostatic Solution 1:2
- γ. Hemostatic Solution 1:4

Ως ομάδες ελέγχου ορίστηκαν οι εξής:

- 1. Ομάδα Negative Control 1:** Στην ομάδα αυτή δεν έγινε καμία παρέμβαση.
- 2. Ομάδα Negative Control 2:** Στην ομάδα αυτή κατά την εκτέλεση του πειράματος έγινε αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη μόνο του μέσου αραίωσης DMEM.

Ορίστηκαν 2 χρόνοι έκθεσης: 10min και 20min και 4 χρόνοι ελέγχου: 0h, 24h, 48h, και 72h.

B1.2. Ανάπτυξη κυτταρικών καλλιιεργειών ανθρώπινων ουλικών ινοβλαστών (HGF)

Για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας των υπό μελέτη υλικών, αναπτύχθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων ουλικών ινοβλαστών μετά από βιοψία ιστοτεμάχιου (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 (Αριθμός πρωτοκόλλου: 36/07-05-2018) 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 στη Μονάδα Ιστικής Μηχανικής του Εργαστηρίου Προσθετικής του Τμήματος Οδοντιατρικής Α.Π.Θ, στην οποία 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).

Ειδικότερα, ο ουλικός ιστός τεμαχίστηκε σε 2 επιμέρους τεμάχια, που τοποθετήθηκαν σε φλάσκες καλλιιεργειών 25cm² με θρεπτικό μέσο DMEM

[Dulbecco modified Eagle medium- Biosera - Low Glucose w/ Stable Glutamine w/ Sodium Pyruvate, με 10% ορό FBS (Fetal bovine serum 10%, GibcoBRL, 10106-169) και αντιβιοτικά [πενικιλίνης/ στρεπτομυκίνης/ αμφοτερικίνης B (100 U/ml πενικιλίνη, 100 μg/ml στρεπτομυκίνη και 0.25 μg/ml Αμφοτερικίνη B (15240-062, GibcoBRL, U.S.A.)). Η φλάσκα τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο επωαστικό κλίβανο στους $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, με 100% υγρασία και 5% CO_2 .

Τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν όταν ήταν πλήρη στη φλάσκα, μεταφέρθηκαν σε μεγαλύτερη, διαστάσεων 75cm^2 (passage 1). Στη συνέχεια τα κύτταρα με διαδοχικά περάσματα ("passages") χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα. Για την πραγματοποίηση των περασμάτων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα τρυψίνης 0,25%, 1mM EDTA (Gibco, Invitrogen). Για την εκτέλεση του πειραματικού μέρους χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από το 5^ο πέρασμα (passage 5).

B2. ΜΕΘΟΔΟΙ

B.2.1. Δοκιμασίες ελέγχου κυτταροτοξικότητας

Για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας χρησιμοποιήθηκε η βιοχημική δοκιμασία υδατοδιαλυτού άλατος του τετραζολίου MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], "δοκιμασία MTT" (Mosmann, 1983). Πρόκειται για μια χρωματομετρική μέθοδο εκτίμησης της κυτταρικής μεταβολικής δραστηριότητας, μέσω της δράσης του ενζύμου μιτοχονδριακή αφυδρογονάση. Πιο συγκεκριμένα, το ένζυμο αυτό ανάγει το κίτρινο υδατοδιαλυτό άλας του τετραζολίου παράγοντας ιώδεις κρυστάλλους φορμαζάνης. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας κατάλληλους οργανικούς διαλύτες γίνεται επαναδιάλυση των κρυστάλλων και ομογενοποίησή τους. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στο

φασματοφωτόμετρο που είναι ανάλογη με την πυκνότητα της παραχθείσας φορμαζάνης δηλαδή ανάλογη με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο υπάρχει άμεση συσχέτιση της δοκιμασίας MTT με τη μιτοχονδριακή μεταβολική δραστηριότητα και κατά συνέπεια με τη ζωτικότητα και το ρυθμό αύξησης του κυτταρικού πληθυσμού. Για την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας χρησιμοποιείται φασματοφωτόμετρο τύπου ELISA (Erock, Biotek, Biotek instruments, Inc, Vermont, USA) σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (545 nm με φίλτρο αναφοράς τα 630 nm).

Τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν ως εξής:

- Επιλέχθηκαν πιάτα 96 οπών, 4 πιάτα για κάθε χρόνο ελέγχου, (από 2 για κάθε χρόνο έκθεσης), συνολικά 16 πιάτα.
- Σε κάθε οπή (εκτός των περιφερικών) τοποθετήθηκαν 5×10^3 κύτταρα μαζί με θρεπτικό μέσο DMEM, με συνολικό όγκο 200μl σε κάθε οπή. Ακολούθησε επώαση σε αποστειρωμένο κλίβανο στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5 % CO₂ για 24h.
- Ακολούθησε αφαίρεση υπερκείμενου από κάθε οπή (εκτός των οπών που αντιστοιχούσαν στην ομάδα negative control 1) και προσθήκη 100μl από κάθε αραιώση στις πειραματικές ομάδες και 100 μl μέσου αραιώσης DMEM στην ομάδα negative control2) τα οποία παρέμειναν τον αντίστοιχο χρόνο (10min ή 20 min) στον επωαστικό κλίβανο (37°C ,5 % CO₂)

Μετά το πέρας του αντίστοιχου χρόνου έκθεσης:

A. Στα πιάτα του χρόνου ελέγχου 0 (Day0):

- Αφαίρεση του υπερκείμενου και πλύση με PBS (100 μl), τοποθέτηση 100 μl DMEM και στη συνέχεια 10 μl διαλύματος 5mg MTT / ml PBS / οπή.
- Επώαση για 4h στους 37°C, 5%CO₂

- Αφαίρεση του διαλύματος από τις οπές και προσθήκη 100μl διαλύματος DMSO σε κάθε οπή.
- Παραμονή σε (μη αποστειρωμένο) κλίβανο στους 37°C για 1h αφού το πιάτο σφραγίστηκε με μεμβράνη για να αποφευχθεί η εξάτμιση του οργανικού διαλύτη.
- 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.

B. Στα πιάτα των χρόνων ελέγχου 24, 48 και 72h (Day1, Day2 και Day3):

- Αφαίρεση του υπερκείμενου, πλύση με PBS (100 μl) τοποθέτηση 200 μl DMEM / οπή.
- Επώαση ανάλογα με το χρόνο ελέγχου (24h, 48h ή 72h) (37°C, 5% CO₂)
- Αφαίρεση υπερκείμενου, προσθήκη 100 μl DMEM και στη συνέχεια 10 μl διαλύματος 5mg MTT / ml PBS / οπή.
- Επανάληψη της διαδικασίας που ακολουθήθηκε στο χρόνο ελέγχου 0 (Day 0).

B.2.2. Φασματομετρία ατομικής εκπομπής σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (Inductively Coupled Plasma atomic emission spectroscopy ICP - AES)

Η φασματομετρία ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-AES) είναι ένας τύπος φασματομετρίας που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μετάλλων και διαφόρων μη μεταλλικών στοιχείων με όρια ανίχνευσης επιπέδου ppb και sub-ppb (parts per billion – $\mu\text{g} / \text{L}$). Η ποιοτική ανίχνευση και ο αντίστοιχος ποσοτικός προσδιορισμός των διαφόρων χημικών στοιχείων στηρίζεται στο γεγονός ότι κάθε στοιχείο παράγει, υπό κατάλληλες συνθήκες διέγερσης και αποδιέγερσης, ένα χαρακτηριστικό φάσμα ατομικής εκπομπής. Οι γραμμές του φάσματος εκπομπής των στοιχείων είναι σχετικά στενές, οπότε δεν αλληλεπικαλύπτονται, και έτσι γίνεται δυνατός ο σύγχρονος προσδιορισμός πολλαπλών χημικών στοιχείων στο δείγμα. Πρόκειται για μια τεχνική γρήγορη, με υψηλή ευαισθησία και δυνατότητα πολυστοιχειακής ανάλυσης με ελάχιστο μέγεθος δείγματος (Velez, 2009).

Το αέριο που χρησιμοποιείται συνηθέστερα στη δημιουργία πλάσματος είναι το αργό, λόγω των πλεονεκτημάτων που προσφέρει ως μονοατομικό ευγενές αέριο το οποίο είναι χημικά αδρανές και παρουσιάζει υψηλό δυναμικό ιονισμού (15,76 eV). Η χημική του αδράνεια έχει ως αποτέλεσμα να μη σχηματίζονται σταθερές ενώσεις μεταξύ του αργού και των στοιχείων που περιέχονται στα δείγματα προς ανάλυση. Επιπλέον, το υψηλό δυναμικό ιονισμού του επιτρέπει τον ιονισμό και την διέγερση των περισσότερων στοιχείων του περιοδικού πίνακα (De Silva and Gregoire, 1998). Τέλος, το αργό δεν προκαλεί φασματικές παρεμποδίσεις σε άλλα χημικά στοιχεία.

Η πηγή του πλάσματος επαγωγικής σύζευξης (ICP) αποτελείται από 3 συγκεντρικούς χαλαζιακούς κυλίνδρους μέσω των οποίων διοχετεύεται το ιονιζόμενο αέριο αργού με μεγάλη ταχύτητα, φτάνοντας σε θερμοκρασίες 6.000-10.000°K. Το προς ανάλυση δείγμα εισάγεται στο πλάσμα με μορφή αερολύματος περνώντας από τον εκνεφωτή. Το πλάσμα μετατρέπει το αερόλυμα σε στερεό, εξαχνώνει το στερεό σε αέριο και στη συνέχεια διασπά τα μεμονωμένα μόρια σε άτομα (ατομοποίηση δείγματος).

Η υψηλή θερμοκρασία του πλάσματος διεγείρει την εκπομπή φωτός από τα άτομα και τα ιόντα σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, που αντιστοιχούν στα διαφορετικά στοιχεία του δείγματος. Ένας πολυχρωμάτορας, απομονώνει στη συνέχεια τα διαφορετικά μήκη κύματος της ακτινοβολίας της οποίας η ένταση μετριέται σε ένα σύστημα ανιχνευτών. Η ένταση της εκπομπής αντιστοιχεί στη συγκέντρωση των ανιχνευμένων στοιχείων (Velez, 2009).

Η χρήση της μεθόδου φασματομετρίας ατομικής εκπομπής σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα στο συγκεκριμένο ερευνητικό πρωτόκολλο έγινε με σκοπό την ανίχνευση της συγκέντρωσης αργιλίου (Al) στις πειραματικές ομάδες τόσο πριν όσο και μετά την εφαρμογή τους στην καλλιέργεια των κυττάρων:

- Για τον έλεγχο πριν την εφαρμογή, χρησιμοποιήθηκε ποσότητα από τα αρχικά εκχυλίσματα των υλικών σε θρεπτικό μέσο (πάστα απώθησης και εμποτισμένο νήμα απώθησης - αραίωση 1:1) και από την αρχική αραίωση του αιμοστατικού διαλύματος σε θρεπτικό μέσο σε αναλογία 0,6mg / ml (σε αντιστοιχία με την ποσότητα $AlCl_3$ στο εμποτισμένο νήμα).
- Για τον έλεγχο μετά από 20' παραμονής των χημικών ουσιών στις κυτταροκαλλιέργειες, χρησιμοποιήθηκε πιάτο 6 οπών (2 οπές ανά χημική ουσία). Σε κάθε οπή τοποθετήθηκαν $1,5 \times 10^5$ κύτταρα μαζί με θρεπτικό μέσο DMEM, με συνολικό όγκο 2ml σε κάθε οπή.

Ακολούθησε επώαση σε αποστειρωμένο κλίβανο στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5 % CO₂ για 24h.

- Στη συνέχεια έγινε αφαίρεση του υπερκείμενου από κάθε οπή, προσθήκη 2ml από την αντίστοιχη χημική ουσία και τοποθέτηση για 20' στον επωαστικό κλίβανο (37°C ,5 % CO₂)
- Μετά το πέρας της επώασης έγινε συλλογή του υπερκείμενου και τοποθέτηση σε falcon.
- Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε τόσο στα αρχικά δείγματα όσο και σε αραιώσεις τους (1:10) με θρεπτικό μέσο. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας το θρεπτικό μέσο αραιώσης (Πίνακες Β.1, Β.2)

Οι μετρήσεις Al έγιναν στο τμήμα χημείας Α.Π.Θ. με ICP-AES (Perkin Elmer, model 3100XL) σε μήκος κύματος 308.215 nm με πλάσμα αργού σε ισχύ 1350 W, και ανίχνευση στο υπεριώδες με αξονική παρατήρηση πλάσματος.

Sample #	Eluates: surface / volume ratio	Number of replicates
1	Εκχύλισμα Υλικού1: 1cm ² /ml	Replicate 1
2	Εκχύλισμα Υλικού2: 1cm ² /ml	Replicate 1
3	Εκχύλισμα Υλικού3: 1cm ² /ml	Replicate 1
4	Διαλύτης (DMEM) ^{***} ΧΩΡΙΣ FBS	Replicate 1
5	Εκχύλισμα Υλικού1, ΑΡΑΙΩΣΗ 1/10	Replicate 1

6	Εκχύλισμα Υλικού 2, ΑΡΑΙΩΣΗ 1/10	Replicate 1
7	Εκχύλισμα Υλικού 3, ΑΡΑΙΩΣΗ 1/10	Replicate 1

Πίνακας Β.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ ΑΠΩΘΗΣΗΣ ΟΥΛΩΝ.

Υλικό 1: Πάστα απώθησης ούλων – 15% χλωριούχο αργίλιο (AlCl_3) Υλικό 2: Νήμα απώθησης ούλων εμποτισμένο με χλωριούχο αργίλιο (AlCl_3) $0.50 \pm 0.1 \text{ mg / ίντσα}$
Υλικό 3: Αιμοστατικό διάλυμα χλωριούχου αργιλίου (AlCl_3)

Sample #	Eluates: surface / volume ratio	Number of replicates
8	Εκχύλισμα Υλικού1: $1\text{cm}^2/\text{ml}$	Replicate 1
9	Εκχύλισμα Υλικού2: $1\text{cm}^2/\text{ml}$	Replicate 1
10	Εκχύλισμα Υλικού3: $1\text{cm}^2/\text{ml}$	Replicate 1
11	Διαλύτης (DMEM)*** ΧΩΡΙΣ FBS +cells	Replicate 1
12	Εκχύλισμα Υλικού1, ΑΡΑΙΩΣΗ 1/10	Replicate 1
13	Εκχύλισμα Υλικού 2, ΑΡΑΙΩΣΗ 1/10	Replicate 1
14	Εκχύλισμα Υλικού 3, ΑΡΑΙΩΣΗ 1/10	Replicate 1

15	Διαλύτης DMEM με FBS	Replicate 1
----	----------------------	-------------

Πίνακας Β.2. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ ΑΠΩΘΗΣΗΣ ΟΥΛΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΑΡΑΜΟΝΗ 20' ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.

Υλικό 1: Πάστα απώθησης ούλων – 15% χλωριούχο αργίλιο ($AlCl_3$) Υλικό 2: Νήμα απώθησης ούλων εμποτισμένο με χλωριούχο αργίλιο ($AlCl_3$) 0.50 ± 0.1 mg / ίντσα Υλικό 3: Αιμοστατικό διάλυμα χλωριούχου αργιλίου $AlCl_3$

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1. Δοκιμασία MTT

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας MTT παρατίθενται περιγραφικά στους ακόλουθους πίνακες ανά χρόνο ελέγχου και έκθεσης. (Πίνακες Γ.1, Γ.2, Γ.3, Γ.4, Γ.5, Γ.6, Γ.7 και Γ.8.)

0h	1:1 / 10min		1:2 / 10min		1:4 / 10 min	
Groups	Mean%	SD	Mean%	SD	Mean%	SD
C1	100	10	100	10	100	10
C2	77,3	27,3	77,3	27,3	77,3	27,4
Paste	86,5	28,8	89,7	30,7	82,2	29,2
Cord Impr	72,1	29,8	67	26,7	68,4	28,7
Solution	92,7	11,8	97,1	11,2	89,8	20,3
Cord NonIm	88,8	15,6	89,9	11,7	88,9	16,4

Πίνακας Γ.1. Περιγραφικά αποτελέσματα δοκιμασίας MTT – 0h / 10 min

0h	1:1 / 20 min		1:2 / 20 min		1:4 / 20 min	
Groups	Mean%	SD	Mean%	SD	Mean%	SD
C1	100	10	100	10	100	10
C2	74,4	25,3	74,4	25,3	74,4	25,3
Paste	82,5	21,6	95,1	27,5	87,3	21,5
Cord Impr	85,5	34,9	76,5	40,2	84,1	31,0
Solution	92,1	8,2	79,7	21,1	79,0	16,4
Cord NonIm	84,4	16,2	95,5	11,3	83,7	20,8

Πίνακας Γ.2. Περιγραφικά αποτελέσματα δοκιμασίας MTT – 0h / 20 min

24h	1:1 / 10min		1:2 / 10min		1:4 / 10 min	
Groups	Mean%	SD	Mean%	SD	Mean%	SD
C1	100	14,8	100	14,8	100	14,8
C2	79,9	27,8	79,9	27,8	79,9	27,8
Paste	93,5	22,3	120,5	15,1	104,1	14,8
Cord Impr	88,5	22,2	81,2	22,4	78,8	20,3
Solution	82,1	26,5	79,1	22,5	69,1	10,9
Cord NonIm	66,7	17,7	69,6	25,5	69,8	23,7

Πίνακας Γ.3. Περιγραφικά αποτελέσματα δοκιμασίας MTT – 24h / 10 min

24h	1:1 / 20 min		1:2 / 20 min		1:4 / 20 min	
Groups	Mean%	SD	Mean%	SD	Mean%	SD
C1	100	14,7	100	14,7	100	14,7
C2	83,6	20,5	83,6	20,5	83,6	20,5
Paste	95,1	16,9	129,9	16,8	118,2	12,0
Cord Impr	86,8	25,8	86,3	21,5	95,7	24,6
Solution	71,8	15,5	71,6	15,4	91,1	15,3
Cord NonIm	97,6	17,1	89,4	15,0	93,2	19,9

Πίνακας Γ.4. Περιγραφικά αποτελέσματα δοκιμασίας MTT – 24h / 20 min

48h	1:1 / 10min		1:2 / 10min		1:4 / 10 min	
Groups	Mean%	SD	Mean%	SD	Mean%	SD
C1	100	10,9	100	10,9	100	10,9
C2	80,2	20,6	80,2	20,6	80,2	20,6
Paste	97,3	17,1	121,5	16,8	115,3	15,5
Cord Impr	94,0	25,9	86,9	23,5	82,7	20,7
Solution	79,0	15,9	72,3	11,9	78,6	12,9
Cord NonIm	85,8	14,9	73,6	12,9	100,1	31,1

Πίνακας Γ.5. Περιγραφικά αποτελέσματα δοκιμασίας MTT – 48h / 10 min

48h	1:1 / 20 min		1:2 / 20 min		1:4 / 20 min	
Groups	Mean%	SD	Mean%	SD	Mean%	SD
C1	100	14,3	100	14,3	100	14,3
C2	82,6	16,2	82,6	16,2	82,6	16,2
Paste	85,2	13,1	103,7	14,5	107,4	18,3
Cord Impr	79,4	26,8	78,1	25,6	85,2	33,4
Solution	82,6	15,1	94,7	15,0	97,6	20,0
Cord NonIm	93,2	14,8	87,3	15,8	87,3	12,5

Πίνακας Γ.6. Περιγραφικά αποτελέσματα δοκιμασίας MTT – 48h / 20 min

72h	1:1 / 10min		1:2 / 10min		1:4 / 10 min	
Groups	Mean%	SD	Mean%	SD	Mean%	SD
C1	100	9,5	100	9,5	100	9,5
C2	98,7	11,5	98,7	11,5	98,7	11,5
Paste	104,1	15,0	126,8	22,2	120,2	24,1
Cord Impr	101,2	9,3	94,9	16,0	94,6	15,2
Solution	101,9	15,0	94,5	10,3	104,1	11,2
Cord NonIm	101,4	13,2	94,4	9,6	91,6	11,2

Πίνακας Γ.7. Περιγραφικά αποτελέσματα δοκιμασίας MTT – 72h / 10 min

72h	1:1 / 20 min		1:2 / 20 min		1:4 / 20 min	
Groups	Mean%	SD	Mean%	SD	Mean%	SD
C1	100	7,8	100	7,8	100	7,8
C2	99,5	22,0	99,5	22,0	99,5	22,0
Paste	109,1	18,8	143,1	29,8	138,0	21,7
Cord Impr	112,9	14,7	103,8	8,8	93,8	14,4
Solution	89,1	13,1	82,9	11,6	83,4	10,0
Cord NonIm	85,1	7,6	89,9	15,4	78,2	11,2

Πίνακας Γ.8. Περιγραφικά αποτελέσματα δοκιμασίας MTT – 72h / 20 min

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες (two-way-Ανοva) και οι συγκρίσεις μεταξύ των επιμέρους ομάδων με Tukey's multiple comparisons test. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής επεξεργασίας Prism 6.0 Software (GraphPad, CA, USA) και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 0.05 ($p < 0.05$).

Στο χρόνο ελέγχου 0h παρατηρείται μείωση της μεταβολικής δραστηριότητας και στους 2 χρόνους έκθεσης σε όλες τις πειραματικές ομάδες και για όλες τις αραιώσεις σε σχέση με την ομάδα ελέγχου C1. Η μείωση αυτή είναι στατιστικά σημαντική ως προς την ομάδα C1 για την ομάδα Cord Impregnated για όλες τις αραιώσεις των 10 min και για την αραιώση 1:2 / 20min ($p < 0.05$). Επίσης, σημαντική είναι η μείωση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας για την ομάδα ελέγχου C2 στα 10 και 20 min ($p < 0.01$). Όσον αφορά τις επιμέρους πειραματικές ομάδες, για την αραιώση 1:2 / 10 min παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα Cord Impregnated και Solution ($p < 0.05$). Οι υπόλοιπες διαφορές στη μιτοχονδριακή δραστηριότητα της ίδιας αραιώσης μεταξύ

των ομάδων αλλά και εντός της ίδιας ομάδας είναι στατιστικά μη σημαντικές.

Στις 24h, παρατηρείται πλήρης αποκατάσταση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας για όλες τις αραιώσεις και τους χρόνους έκθεσης της ομάδας Paste. Επιπλέον, οι υποομάδες Paste 1:2 / 10 min και 1:2 / 20min εμφανίζουν σημαντικά μεγαλύτερη μεταβολική δραστηριότητα σε σχέση με αυτή της ομάδας C1 ($p<0.05$ και $p<0.001$ αντίστοιχα). Στην ομάδα Cord – Impregnated, παρατηρείται αύξηση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας σε σχέση με το χρόνο 0h, η οποία όμως παραμένει μικρότερη από αυτή του C1, με στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την ομάδα 1:4 / 10min ($p<0.05$). Αντιθέτως, στον ίδιο χρόνο ελέγχου παρατηρείται μείωση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας στην ομάδα Solution με στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς το C1 στις υποομάδες Sol 1:2 / 10 min ($p<0.05$), 1:4 / 10 min ($p<0.01$), 1:1 / 20 min ($p<0.001$) 1:2 / 20 min ($p<0.01$). Το ίδιο παρατηρείται και στην ομάδα Cord Non – Impregnated στον χρόνο έκθεσης 10min με στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς C1 στις υποομάδες 1:1 / 10min ($p<0.0001$), 1:2 / 10min ($p<0.001$) και 1:4 / 10 min ($p<0.001$). Για τον χρόνο έκθεσης 20 min δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά. Στατιστικά μικρότερη μιτοχονδριακή δραστηριότητα παρατηρείται και στην ομάδα C2 / 10 min σε σχέση με το C1 ($p<0.01$).

Για τον ίδιο χρόνο ελέγχου (24h) και την ίδια αραιώση / χρόνο έκθεσης, παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ερευνητικών ομάδων. Για την αραιώση 1:1 / 10 min υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων Paste και Cord Non – Impregnated ($p<0.05$). Στα 1:2 / 10 min, 1:4 / 10min και 1:2 / 20min υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα Paste και καθεμία από τις υπόλοιπες πειραματικές ομάδες (Cord Impregnated, Solution και Cord Non –

Impregnated) ($p < 0.05$). Στα 1:1 / 20min παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ Paste και Solution ($p < 0.05$) ενώ στα 1:4 / 20min μεταξύ Paste και Solution ($p < 0.05$) και Paste και Cord Non – Impregnated ($p < 0.05$). Διαφορές παρατηρούνται και εντός των πειραματικών ομάδων. Στην ομάδα Paste στο χρόνο έκθεσης 10min η αραιώση 1:2 έχει σημαντικά μεγαλύτερη μιτοχονδριακή δραστηριότητα σε σχέση με την αραιώση 1:1 ($p < 0.05$). Το ίδιο συμβαίνει και για το χρόνο έκθεσης 20min ($p < 0.05$). Επίσης, στην ομάδα Cord Non – Impregnated η μεταβολική δραστηριότητα της ίδιας αραιώσης (1:1 και 1:4) είναι σημαντικά μεγαλύτερη στο χρόνο έκθεσης 20min σε σχέση με το χρόνο 10min ($p < 0.05$).

Στο χρόνο ελέγχου 48h, παρατηρείται περαιτέρω αύξηση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας για την ομάδα Paste / 10min, με στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς C1 της υποομάδας Paste 1:2 / 10min ($p < 0.01$). Αντιθέτως, η ομάδα Paste / 20min εμφανίζει μείωση της μεταβολικής δραστηριότητας σε σχέση με τον προηγούμενο χρόνο ελέγχου, σε επίπεδα ωστόσο που δε διαφέρουν σημαντικά από την ομάδα C1. Το ίδιο παρατηρείται στην ομάδα Cord Impregnated: Ανάκαμψη της μιτοχονδριακής δραστηριότητας για την ομάδα / 10min χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς C1 και μείωση αυτής για την ομάδα 20min, με στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς C1 των ομάδων 1:1 / 20min ($p < 0.05$) και 1:2 / 20min ($p < 0.01$). Στατιστικά μικρότερη μεταβολική δραστηριότητα παρατηρείται στην ομάδα Solution σε σχέση με το C1 και συγκεκριμένα στις υποομάδες 1:1 / 10min ($p < 0.05$), 1:2 / 10min ($p < 0.001$) και 1:4 / 10min ($p < 0.01$), ενώ στις υποομάδες / 20 min παρατηρείται αύξηση, που δε διαφέρει σημαντικά από τη μεταβολική δραστηριότητα της ομάδας C1. Επίσης, όσον αφορά στην ομάδα Cord Non – Impregnated παρατηρείται αύξηση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας στις υποομάδες

/ 10 min, η οποία παραμένει σημαντικά μικρότερη σε σχέση με αυτήν του C1 μόνο για την υποομάδα 1:2 / 10min ($p < 0.001$). Ελαφρά μείωση παρατηρείται για τις υποομάδες / 20min χωρίς σημαντική διαφορά σε σχέση με το C1. Επιπλέον, η μιτοχονδριακή δραστηριότητα της ομάδας C2 εξακολουθεί να διαφέρει σημαντικά σε σχέση με το C1 παρά τη μικρή της αύξηση ($p < 0.01$).

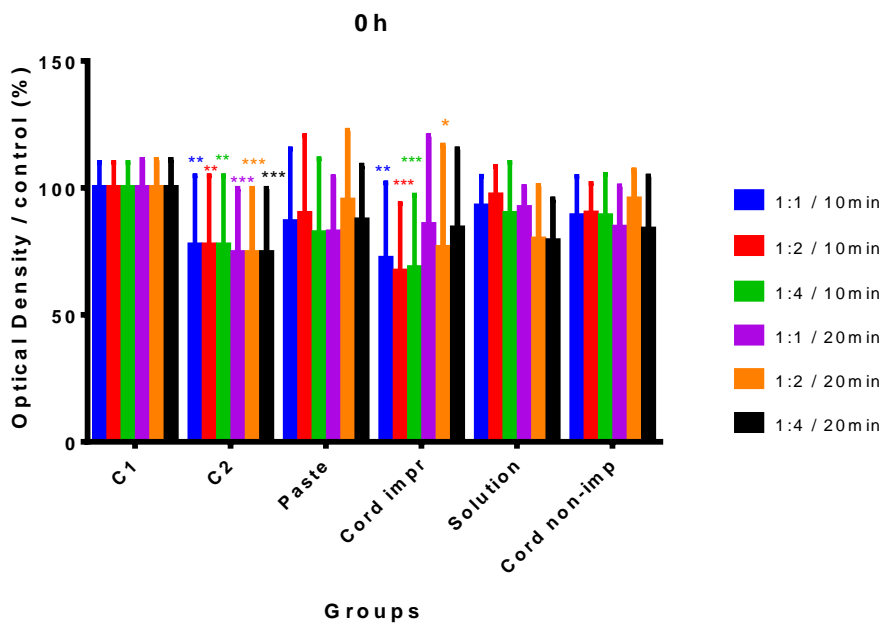
Μεταξύ των ερευνητικών ομάδων, για τον ίδιο χρόνο ελέγχου (48h) και την ίδια αραίωση / χρόνο έκθεσης, παρατηρούνται οι εξής σημαντικές διαφορές: Στην αραίωση 1:2 / 10min, η ομάδα Paste παρουσιάζει σημαντικά μεγαλύτερη μεταβολική δραστηριότητα σε σχέση με τις υπόλοιπες τρεις πειραματικές ομάδες ($p < 0.0001$), ενώ στην αραίωση 1:4 / 10min η διαφορά αυτή είναι σημαντική μεταξύ της ομάδας Paste και των Cord Impregnated ($p < 0.001$) και Solution ($p < 0.0001$). Επιπλέον, η ομάδα Paste εμφανίζει σημαντικά μεγαλύτερη μεταβολική δραστηριότητα σε σχέση με την ομάδα Cord Impregnated στις αραιώσεις 1:2 / 20min ($p < 0.01$) και 1:4 / 20min ($p < 0.05$). Τέλος, εντός της ίδιας πειραματικής ομάδας, παρατηρείται σημαντικά μεγαλύτερη μιτοχονδριακή δραστηριότητα για την ομάδα Paste και την αραίωση 1:2 / 10min σε σχέση με την αραίωση 1:1 / 10min ($p < 0.05$). Ομοίως, η υποομάδα Paste 1:4 / 20min σε σχέση με την 1:1 / 20min ($p < 0.05$). Επίσης, η αραίωση 1:2 / 10min της ομάδας Solution εμφανίζει σημαντικά μικρότερη δραστηριότητα σε σχέση με την αντίστοιχη 1:2 / 20min ($p < 0.05$) ομοίως και η αραίωση 1:2 / 10min της ομάδας Cord Non – Impregnated σε σχέση με την 1:4 / 10min ($p < 0.01$).

Στις 72h, η μεταβολική δραστηριότητα της ομάδας Paste αυξάνεται, με στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την ομάδα C1 για τις υποομάδες 1:2 και 1:4 τόσο στα 10min όσο και στα 20min ($p < 0.001$). Η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων της ομάδας Cord Impregnated δε διαφέρει

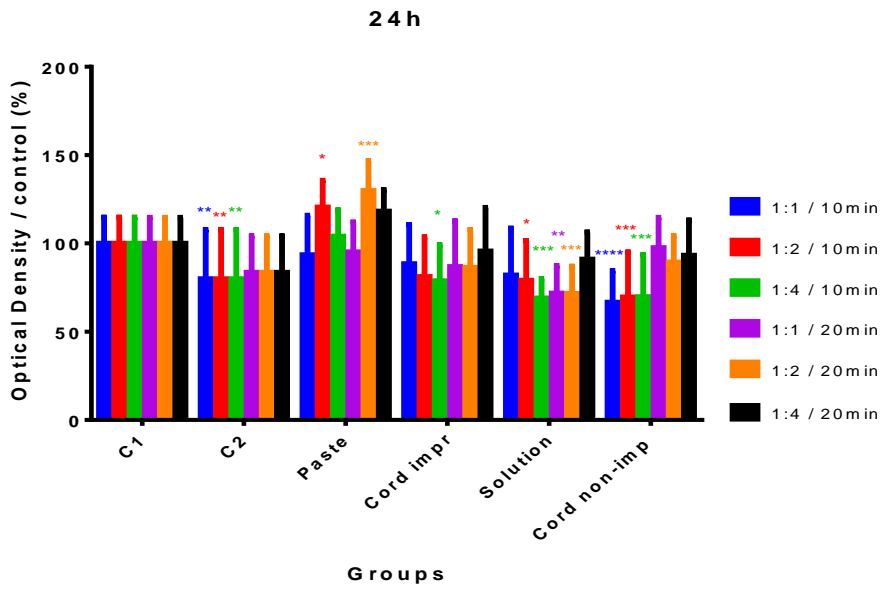
σημαντικά από αυτή του C1. Ανάκαμψη παρατηρείται και στην ομάδα Solution / 10min χωρίς σημαντική διαφορά ως προς C1, ενώ αντίθετα η δραστηριότητα των ομάδων Solution 1:2 / 20min 1:4 / 20min παρουσιάζει μείωση, σημαντική ως προς C1 ($p<0.05$). Το ίδιο ισχύει και για την ομάδα Cord Non – Impregnated, όπου στο χρόνο έκθεσης 10min η μεταβολική δραστηριότητα δε διαφέρει σημαντικά από αυτήν του C1, ενώ οι υποομάδες 1:1 / 20min 1:4 / 20min παρουσιάζουν μείωση ($p<0.05$ και $p<0.001$ αντίστοιχα). Μεταξύ των C1 και C2 δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά.

Στις 72h μεταξύ των ερευνητικών ομάδων για την ίδια αραίωση / χρόνο έκθεσης υπάρχουν κάποιες στατιστικά σημαντικές διαφορές. Η ομάδα Paste παρουσιάζει στατιστικά μεγαλύτερη μεταβολική δραστηριότητα σε σχέση με τις υπόλοιπες τρεις πειραματικές ομάδες στις αραιώσεις 1:2 / 10min ($p<0.0001$), 1:2 / 20min και 1:4 / 20min ($p<0.0001$). Στατιστικά μεγαλύτερη μεταβολική δραστηριότητα της ομάδας Paste παρατηρείται στην αραίωση 1:4 / 10min σε σχέση με την αντίστοιχη της ομάδας Cord Impregnated ($p<0.001$) και Cord Non – Impregnated ($p<0.0001$) ενώ στην αραίωση 1:1 / 20min η διαφορά αυτή εντοπίζεται ως προς Solution ($p<0.05$) και Cord Non – Impregnated ($p<0.01$). Επίσης, στατιστικά μεγαλύτερη μιτοχονδριακή δραστηριότητα σημειώνεται στην αραίωση 1:1 / 20min για την ομάδα Cord Impregnated σε σχέση με τις ομάδες Cord Non – Impregnated ($p<0.0001$) και Solution ($p<0.01$) και στην αραίωση 1:2 / 20min για την ίδια ομάδα σε σχέση με την ομάδα Solution ($p<0.01$). Εντός των πειραματικών ομάδων, στην ομάδα Paste για τον ίδιο χρόνο έκθεσης παρατηρείται μεγαλύτερη μεταβολική δραστηριότητα στις μεγαλύτερες αραιώσεις. Πιο συγκεκριμένα η μιτοχονδριακή δραστηριότητα είναι σημαντικά μεγαλύτερη στην αραίωση 1:2 / 10min σε σχέση με την 1:1 /

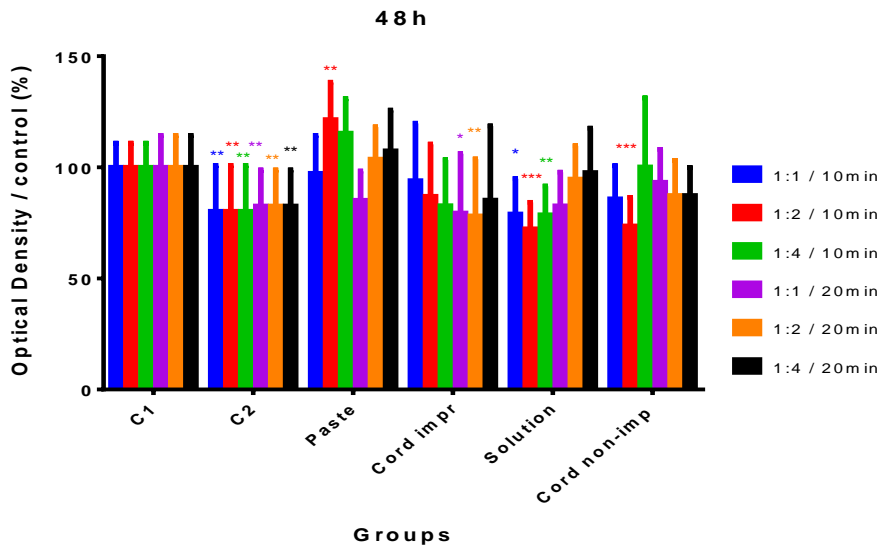
10min ($p<0.01$), στην αραιώση 1:2 / 20min σε σχέση με την 1:1 / 20min ($p<0.0001$) και στην αραιώση 1:4 / 10min σε σχέση με την 1:1 / 10min ($p<0.0001$) Επίσης η αραιώση 1:4 / 20min έχει υψηλότερη μεταβολική δραστηριότητα σε σχέση με την 1:4 / 10min ($p<0.05$). Στην ομάδα Cord Impregnated παρατηρείται στατιστικά μεγαλύτερη δραστηριότητα στην αραιώση 1:1 / 20min σε σχέση με την 1:4 / 20min ($p<0.05$). Τέλος, στην ομάδα Solution η αραιώση 1:4 / 20min έχει στατιστικά μικρότερη μιτοχονδριακή δραστηριότητα σε σχέση με την αραιώση 1:4 / 10min ($p<0.01$). Τα αποτελέσματα και οι στατιστική σημαντικότητα ως προς C1 παρουσιάζονται στα ακόλουθα διαγράμματα (Διαγράμματα Γ.1, Γ.2, Γ.3, Γ.4).



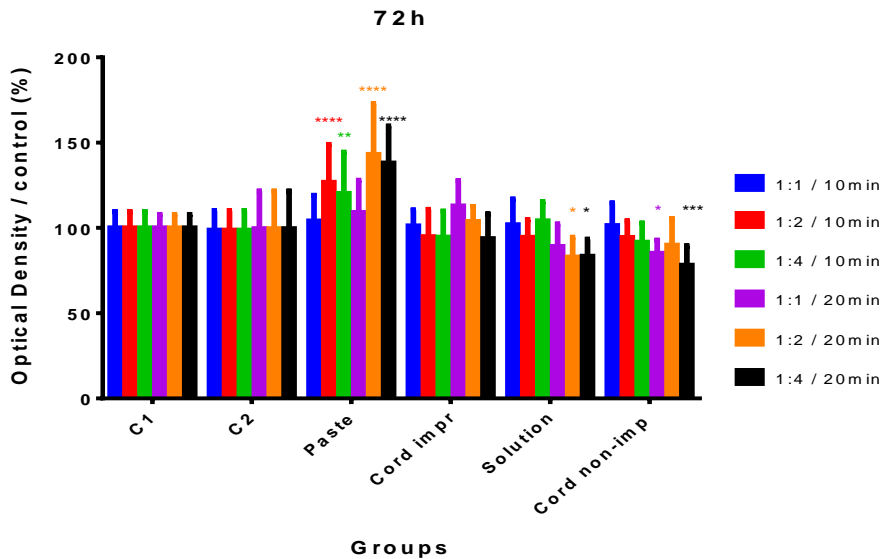
Διάγραμμα Γ.1: Αποτελέσματα δοκιμασίας MTT – 0h. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ Compared to Control1



Διάγραμμα Γ.2: Αποτελέσματα δοκιμασίας MTT – 24h. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ Compared to Control1

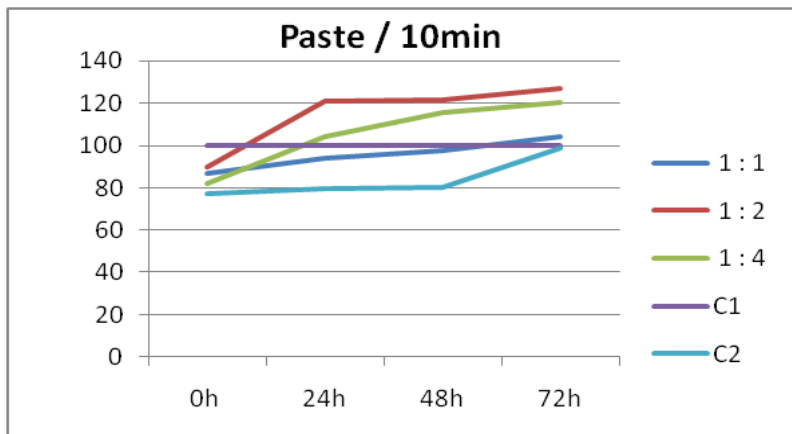


Διάγραμμα Γ.3: Αποτελέσματα δοκιμασίας MTT – 48h. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Compared to Control1

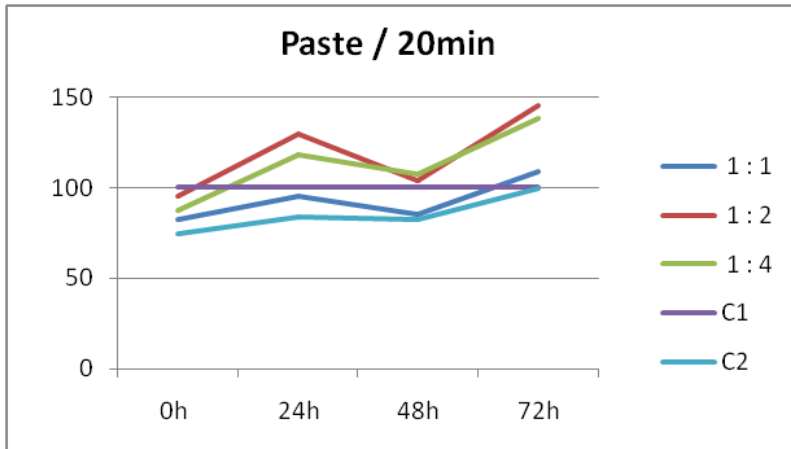


Διάγραμμα Γ.4: Αποτελέσματα δοκιμασίας MTT – 72h. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ Compared to Control1

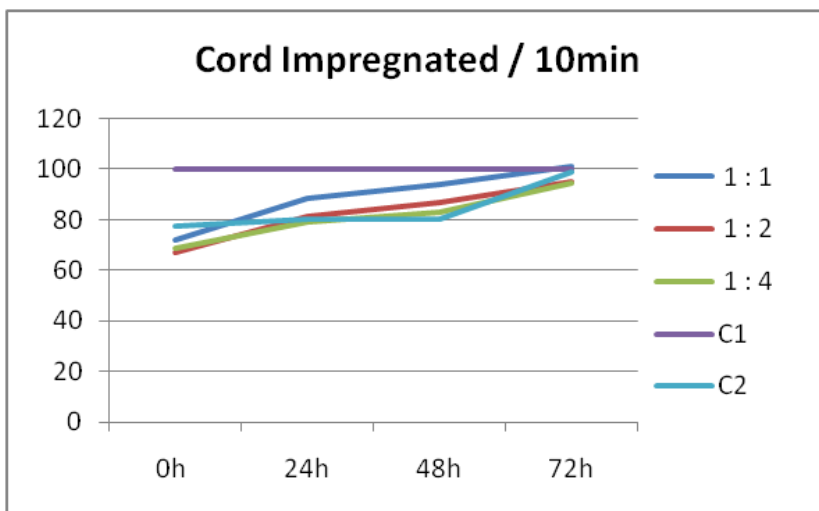
Τα παραπάνω αποτελέσματα γίνονται επίσης εμφανή και από τα ακόλουθα γραμμικά διαγράμματα, ανά υλικό / χρόνο έκθεσης (Διαγράμματα Γ.5, Γ.6, Γ.7, Γ.8, Γ.9, Γ.10, Γ.11, Γ.12).



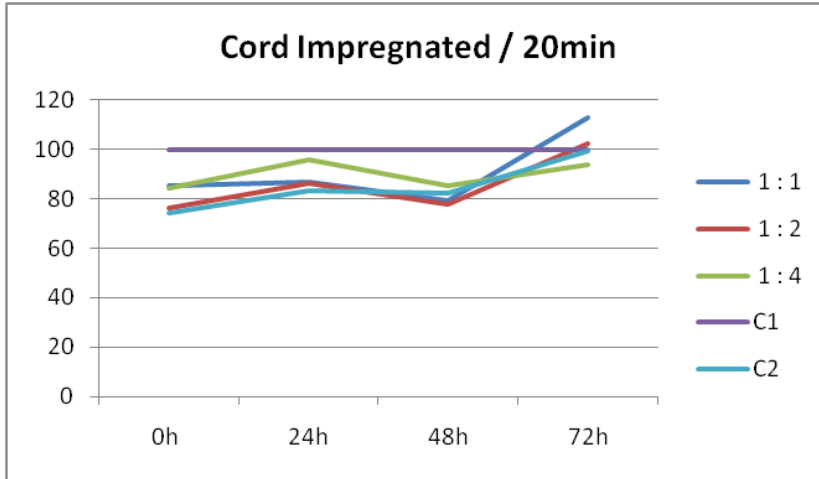
Διάγραμμα Γ.5. Γραμμικό διάγραμμα δοκιμασίας MTT – Ομάδα Paste / 10min



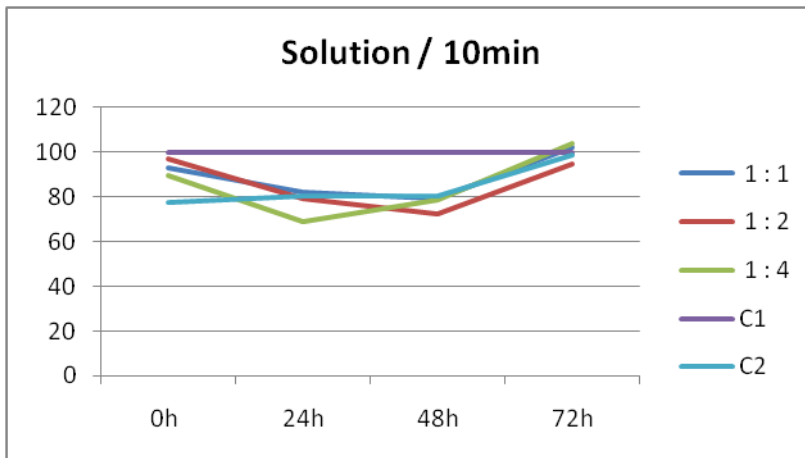
Διάγραμμα Γ.6. Γραμμικό διάγραμμα δοκιμασίας MTT – Ομάδα Paste / 20min



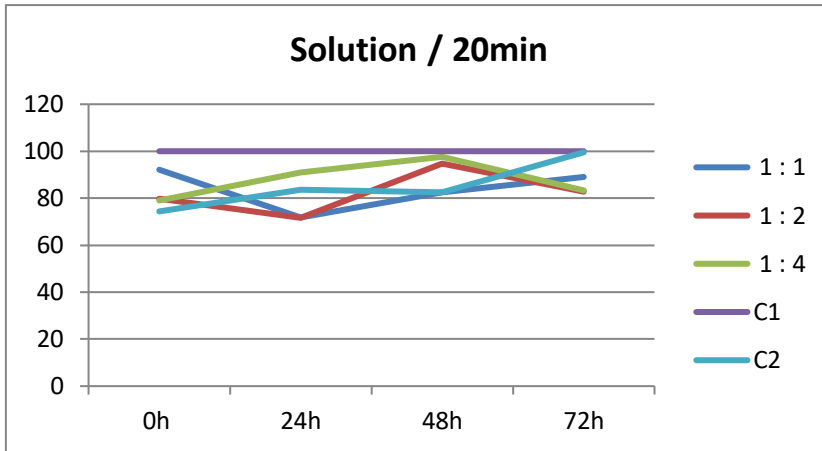
Διάγραμμα Γ.7. Γραμμικό διάγραμμα δοκιμασίας MTT – Ομάδα Cord Impregnated / 10min



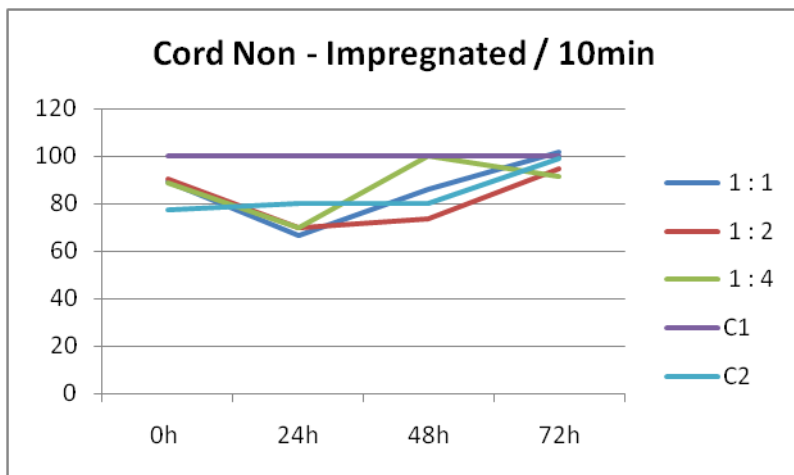
Διάγραμμα Γ.8. Γραμμικό διάγραμμα δοκιμασίας MTT – Ομάδα Cord Impregnated / 20min



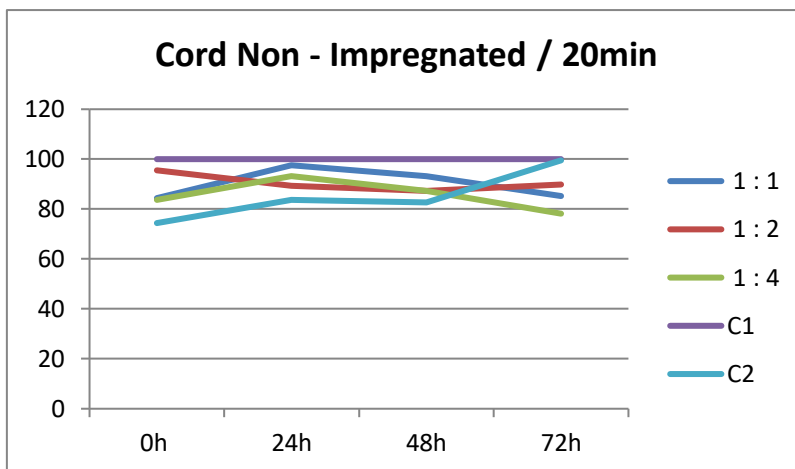
Διάγραμμα Γ.9. Γραμμικό διάγραμμα δοκιμασίας MTT – Ομάδα Solution / 10min



Διάγραμμα Γ.10. Γραμμικό διάγραμμα δοκιμασίας MTT – Ομάδα Solution / 20min



Διάγραμμα Γ.11. Γραμμικό διάγραμμα δοκιμασίας MTT – Ομάδα Cord Non - Impregnated / 10min



Εικόνα Διάγραμμα Γ.12. Γραμμικό διάγραμμα δοκιμασίας MTT – Ομάδα Cord Non - Impregnated / 20min

Γ.2. Φασματομετρία ατομικής εκπομπής σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (Inductively Coupled Plasma atomic emission spectroscopy ICP - AES)

Τα αποτελέσματα της μελέτης με φασματομετρία ατομικής εκπομπής σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP – AES) παρατίθενται στον Πίνακα Γ.9. Η ευρεθείσα στην συγκέντρωση αργιλίου (Al) στο δείγμα της πάστας απώθησης ήταν της τάξεως των 188,3 mg/L ,ενώ μετά την έκθεση τους στην κυτταροκαλλιέργεια 109,7 mg/L. Σε αντιδιαστολή, οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις για το νήμα απώθησης και το αιμοστατικό διάλυμα ήταν 1,11 mg/L και 0,35 mg/L πριν, και 0,87 mg/L και 0,15 mg/L μετά, αντίστοιχα.

A/A ΔΙΑΛΥΜΑ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ	ΑΡΑΙΩΣΗ	ΑΙ
ΟΜΑΔΑ Α	ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΑΜΕΣΑ		mg/L
1	Εκχύλισμα Paste	1 : 1	188.3
2	Εκχύλισμα Cord Impregnated	1 : 1	1.11
3	Εκχύλισμα Solution	1 : 1	0.35
4	Διαλύτης DMEM w/o FBS		0.00
5	Εκχύλισμα Paste	1 : 10	13.61
6	Εκχύλισμα Cord Impregnated	1 : 10	0.16
7	Εκχύλισμα Solution	1 : 10	0.12
ΟΜΑΔΑ Β	ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΜΕΤΑ ΠΑΡΑΜΟΝΗ 20'		
8	Εκχύλισμα Paste	1 : 1	109.7
9	Εκχύλισμα Cord Impregnated	1 : 1	0.87
10	Εκχύλισμα Solution	1 : 1	0.15
11	Διαλύτης DMEM CELLS		0.00
12	Εκχύλισμα Paste	1 : 10	4.71
13	Εκχύλισμα Cord Impregnated	1 : 10	0.33
14	Εκχύλισμα Solution	1 : 10	0.08

Πίνακας Γ.9. Αποτελέσματα ανάλυσης εκχυλισμάτων με φασματομετρία ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι πάστες απώθησης αποτελούν νεότερα υλικά, με υψηλό ιξώδες (3,6 / 5 σε οπτική αναλογική κλίμακα – VAS) (Burke and Crisp, 2014) που περιέχουν συνήθως 15% $AlCl_3$, 15% νερό, 50% ενισχυτικά σωματίδια (fillers) (συνήθως μήτρα καολίνη), και κάποιους τροποποιητές (20%) (Poss, 2002). Προσφέρουν πλεονεκτήματα όπως ευκολία χρήσης, άσκηση σημαντικά χαμηλότερης πίεσης στους ιστούς σε σχέση με το νήμα (Benpani και συν., 2012), ανοχή της διαδικασίας από τον ασθενή χωρίς την ανάγκη τοπικής

αναισθησίας και τέλος, σημαντικά μικρότερο τραύμα στο καταδυόμενο και το προσπεφυκός επιθήλιο. (Phatale και συν., 2008).

Η επίδραση της πάστας απώθησης ούλων σε σχέση με την αντίστοιχη του νήματος απώθησης στους περιοδοντικούς ιστούς έχει μελετηθεί σε αρκετές κλινικές μελέτες (Yang και συν., 2005, Al Hamad και συν., 2008, Gupta και συν., 2013, Prasanna και συν., 2013, Acar και συν., 2014, Sarmiento και συν., 2014, Gupta και συν., 2016), αλλά και σε εργαστηριακές – ιστοπαθολογικές (Phatale και συν., 2008, Sarmiento και συν., 2014).

Όσον αφορά στην κυτταροτοξικότητα, ενώ υπάρχουν αρκετές εργασίες που μελέτησαν και σύγκριναν *in vitro* αγγειοσυσπαστικές και αιμοστατικές ουσίες σε μορφή διαλύματος / γέλης, μία μόνο (Lieu και συν., 2004) μελέτησε την κυτταροτοξικότητα διαφορετικών μηχανικών και χημικομηχανικών μέσων (μη εμποτισμένο, εμποτισμένο με επινεφρίνη και εμποτισμένο με θειικό αργίλιο - $Al_2(SO_4)_3$ νήμα απώθησης) σε ανθρώπινους ουλικούς ινοβλάστες, τόσο με άμεση επαφή όσο και με εκχυλίσματα αυτών.

Δεν υπάρχει μελέτη κυτταροτοξικότητας της πάστας απώθησης ούλων στη βιβλιογραφία ούτε ποσοτική εκτίμηση της έκλυσης ιόντων στα εκχυλίσματα των μέσων απώθησης ούλων, ώστε να τεκμηριωθεί ο μηχανισμός επίδρασης του χημικού μέσου απώθησης στους ουλικούς ινοβλάστες.

Για τον έλεγχο της πιθανής κυτταροτοξικότητας στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η βιοχημική δοκιμασία MTT. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια σημαντική αρχική (για το χρόνο ελέγχου 0h) αναστολή της μεταβολικής δραστηριότητας στην ομάδα του εμποτισμένου νήματος και στους δυο χρόνους έκθεσης (10min και 20min), σε σχέση με τα κύτταρα Negative Control 1 (στα οποία δεν έγινε καμία παρέμβαση). Η παρατήρηση αυτή

έρχεται σε συμφωνία με τη μελέτη των Liu και συν., 2004, οι οποίοι μελέτησαν εκχυλίσματα νήματος εμποτισμένου με θειικό αργίλιο $Al_2(SO_4)_3$, αδρεναλίνη και μη εμποτισμένου νήματος.

Η αρχική έκθεση στα εξεταζόμενα μέσα απώθησης ούλων προκαλεί αναστολή της μεταβολικής δραστηριότητας, σημαντικά μεγαλύτερη για την ομάδα του εμποτισμένου νήματος που μπορεί να οφείλεται είτε σε αναστολή πολλαπλασιασμού των κυττάρων είτε σε κυτταρικό θάνατο. Το μοτίβο της κυτταροτοξικότητας μειώνεται σε σχέση με το χρόνο, με την αποκατάσταση να επέρχεται σταδιακά για τις περισσότερες ομάδες, γεγονός που αποδεικνύει την αναστρεψιμότητα του φαινομένου, με πιθανότερη την αναστολή έναντι του κυτταρικού θανάτου.

Όσον αφορά στους υπόλοιπους χρόνους ελέγχου της παρούσας μελέτης, η μιτοχονδριακή δραστηριότητα ακολουθεί διαφορετικό μοτίβο ανάκαμψης ανάλογα με το υλικό και τον χρόνο έκθεσης, ενώ αποκαθίσταται πλήρως για όλες τις πειραματικές ομάδες στις 72h, με εξαίρεση συγκεκριμένες ομάδες που εκτέθηκαν στα εκχυλίσματα αιμοστατικού διαλύματος (αραιώσεις 1:2 και 1:4) και μη εμποτισμένου νήματος(αραιώσεις 1:1 και 1:4) για 20min. Όσον αφορά την πάστα απώθησης και το εμποτισμένο νήμα, τα κύτταρα που εκτέθηκαν για 10min παρουσιάζουν σταδιακή αύξηση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας στις 24, 48 και 72h με πλήρη αποκατάσταση (και περαιτέρω αύξηση για την πάστα απώθησης στις αραιώσεις 1:2 και 1:4) στις 72h. Σε αντιδιαστολή, τα ίδια υλικά στον μεγαλύτερο χρόνο έκθεσης (20min), ενώ παρουσιάζουν μια αύξηση στις 24h, η μιτοχονδριακή δραστηριότητα μειώνεται στις 48h για να επανέλθει στις 72h. Το μη εμποτισμένο νήμα και το αιμοστατικό διάλυμα παρουσιάζουν πτώση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας στις 24h με σταδιακή αποκατάσταση τους, με εξαίρεση τις ομάδες των 20min έκθεσης.

Στη μελέτη του Κορασ και συν. (2002) η μιτοχονδριακή δραστηριότητα 48h μετά την αρχική έκθεση εμφανίζεται περισσότερο μειωμένη σε σχέση με την παρούσα μελέτη, ωστόσο δεν υπάρχουν ενδιάμεσοι χρόνοι ελέγχου προς σύγκριση.

Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι, εκτός από ταχύτερη ανάκαμψη, παρατηρείται και διέγερση της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων που εκτέθηκαν στην πάστα απώθησης, στις αραιώσεις 1:2 και 1:4.

Για την ερμηνεία του διαφορετικού αυτού μοτίβου και ρυθμού ανάκαμψης των κυττάρων που εκτέθηκαν στα διαφορετικά υλικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος της συγκέντρωσης αργιλίου (Al) στις πειραματικές ομάδες τόσο πριν όσο και μετά την εφαρμογή τους στην καλλιέργεια των ινοβλαστών με τη μέθοδο της φασματομετρίας ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-AES).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το εκχύλισμα της πάστας απώθησης ούλων περιείχε εξαιρετικά μεγαλύτερη συγκέντρωση αργιλίου (Al) σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα. Επίσης η συγκέντρωση του αργιλίου στα δείγματα μετά την έκθεση τους στην κυτταροκαλλιέργεια μειώθηκε, γεγονός που υποδεικνύει πιθανή προσρόφηση από τα κύτταρα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα ιόντα αργιλίου διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, προάγοντας τόσο τη σύνθεση DNA στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, όσο και την μιτωτική δραστηριότητα (Jones και συν., 1986). Η συγκέντρωση Al στα εκχυλίσματα των αραιώσεων 1:2 και 1:4 που εμφάνισαν διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, πριν την εφαρμογή στα κύτταρα ήταν της τάξεως των 3500 $\mu\text{mol/L}$ και 1750 $\mu\text{mol/L}$. Οι Wataha και συν., (1993) σε μελέτη τους σχετικά με την κυτταροτοξικότητα των μεταλλικών ιόντων παρατήρησαν, μέσω της

δοκιμασίας ΜΤΤ, ότι σε αντίθεση με άλλα ιόντα (Ag^{+1} , Co^{+2} , Cu^{+3} , Zn^{+3} κ.ά.), τα ιόντα αργιλίου δεν προκάλεσαν μείωση της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων ακόμα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις της τάξεως των 3000 $\mu\text{mol/L}$.

Η διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τα ιόντα Al^{+3} θα μπορούσε να αποτελεί μια πιθανή ερμηνεία των σημαντικά μεγαλύτερων ποσοστών μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων που εκτέθηκαν στις μεγαλύτερες αραιώσεις των εκχυλισμάτων της πάστα απώθησης σε σχέση με τις υπόλοιπες πειραματικές ομάδες και τις ομάδες ελέγχου, αλλά και τη μικρότερη ανάκαμψη του αιμοστατικού διαλύματος που περιείχε μικρότερη συγκέντρωση Al^{+3} και του μη – εμποτισμένου νήματος σε συνάρτηση με το χρόνο. Στη βιβλιογραφία, έχουν αναφερθεί πιθανοί μηχανισμοί επίδρασης των μέσων απώθησης στον κυτταρικό μεταβολισμό, όπως η ενεργοποίηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού των μιτοχονδρίων ως αντιδραστικός μηχανισμός άμυνας στο χημικό ερέθισμα (Nowakowska και συν., 2010). Ωστόσο, δεν έχει γίνει ακόμα σαφής τεκμηρίωση του φαινομένου.

Η δυσκολία στη διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού δράσης οφείλεται και στο γεγονός ότι στη βιβλιογραφία, οι μελέτες που εξέτασαν *in vitro* κυτταροτοξικότητα παραγόντων απώθησης ούλων παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια ως προς το πειραματικό πρωτόκολλο, με αποτέλεσμα τα συμπεράσματα να μην είναι συγκρίσιμα. Οι διαφορές εντοπίζονται ως προς τους χρόνους έκθεσης των κυττάρων, τους χρόνους ελέγχου, τους παράγοντες απώθησης (μορφή και χημική σύσταση), τα μέσα αραιώσης καθώς και τις μεθόδους ελέγχου της κυτταροτοξικότητας.

Αρχικά, όσον αφορά στο χρόνο έκθεσης, στην παρούσα μελέτη οι χρόνοι 10 και 20min επιλέχθηκαν με βάση τις συνήθεις συνθήκες της κλινικής πράξης και ύστερα από την εκτέλεση πιλοτικών πειραμάτων. Άλλοι ερευνητές εφάρμοσαν διαφορετικά πρωτόκολλα έκθεσης όπως 1' (Yalcin και συν., 2013), 1, 3, 5 και 10' (Korac και συν., 2002), 1, 5 και 15' (Farzin και συν., 2016), 3, 5, 10' και 24h (Nowakowska και συν., 2010, Nowakowska και συν., 2012) και 10', 30' και 72h (Liu και συν., 2004). Όσον αφορά στους χρόνους ελέγχου, επιλέχθηκαν 4 χρονικά σημεία με σκοπό την αξιολόγηση της μεταβολικής δραστηριότητας και την άρση ή μη της πιθανής κυτταροτοξικότητας. Οι χρόνοι ελέγχου επίσης ποικίλλουν στη βιβλιογραφία, από 0h (Farzin και συν., 2016, Liu και συν., 2004) Nowakowska και συν., 2010, Nowakowska και συν., 2012), 0h και 48h και 7d (Korac και συν., 2002) ακόμα και συνεχή παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο έως 72h (Yalcin και συν., 2013)

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν (εμποτισμένο νήμα απώθησης, πάστα απώθησης ούλων και αιμοστατικό διάλυμα) στην παρούσα μελέτη έχουν την ίδια δραστική ουσία, το χλωριούχο αργίλιο ($AlCl_3$). Η επιλογή της συγκεκριμένης δραστικής ουσίας έγινε διότι, αφενός, είναι το κύριο συστατικό των υλικών απώθησης με τη μορφή πάστας, αφετέρου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αποτελεί το συχνότερα χρησιμοποιούμενο (55%) αιμοστατικό παράγοντα που χρησιμοποιείται για εμπότιση του νήματος (Hansen και συν., 1999). Στην παρούσα μελέτη, ο μικρότερος χρόνος έκθεσης των κυττάρων στα εκχυλίσματα των ουσιών, σε συνδυασμό με χρήση φίλτρου αποστείρωσης, οδήγησε σε μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης των κυττάρων, σε σύγκριση με την αντίστοιχη μελέτη των Liu και συν. (2004), οι οποίοι μελέτησαν εκχυλίσματα νήματος εμπότισμένου με θειικό αργίλιο $Al_2(SO_4)_3$, αδρεναλίνη και μη εμπότισμένου νήματος. Άμεση επαφή

των υλικών δεν πραγματοποιήθηκε λόγω του αναμενόμενου κυτταρικού θανάτου (Liu και συν., 2004).

Επιπλέον σε αντιδιαστολή με τη μελέτη των Korac και συν. (2002), οι οποίοι χρησιμοποίησαν 4 αιμοστατικά διαλύματα (20% θειικό αργίλιο, 10% και 25% χλωριούχο αργίλιο και 0.05% τετραϋδροζολίνη) τόσο στις αρχικές συγκεντρώσεις τους όσο και αραιωμένα με θρεπτικό μέσο σε αναλογίες 1:1 και 1:10, αλλά και των Farzin και συν. (2016), οι οποίοι χρησιμοποίησαν 3 διαφορετικά αιμοστατικά μέσα σε μορφή γέλης χωρίς αραίωση (25% θειικό αργίλιο, 25% χλωριούχο αργίλιο και 20% θειικός σίδηρος) και την ίδια βιοχημική δοκιμασία (MTT), στην παρούσα μελέτη η επιβίωση των κυττάρων που εκτέθηκαν στο αιμοστατικό διάλυμα (θειικό αργίλιο - AlCl_3) είναι σημαντικά μεγαλύτερη λόγω της μικρότερης ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε και επιλέχθηκε κατ'αντιστοιχία με την περιεχόμενη ποσότητα / μονάδα μήκους νήματος.

Τέλος, όσον αφορά στις μεθόδους ελέγχου της κυτταροτοξικότητας, η δοκιμασία MTT επιλέχθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη λόγω των πλεονεκτημάτων που προσφέρει (χαμηλό κόστος, ακρίβεια, ταχύτητα, έλλειψη ραδιοϊσοτόπων κτλ) (Mosmann, 1983). Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και από άλλους ερευνητές (Farzin και συν., 2016, Korac και συν., 2002, Liu και συν., 2004, Nowakowska και συν., 2010, Nowakowska και συν., 2012) είτε μόνη είτε σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους όπως τη μέθοδο αποκλεισμού με Trypan Blue και τη δοκιμασία CFA (Korac και συν., 2002), καθώς και τη μέθοδο xCELLigence system για παρακολούθηση των κυττάρων σε πραγματικό χρόνο (real – time) (Yalcin και συν., 2013). Η φασματομετρία ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-AES) δε χρησιμοποιήθηκε σε καμία αντίστοιχη μελέτη της βιβλιογραφίας.

Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Συμπεράσματα

- Τα εκχυλίσματα του εμποτισμένου νήματος προκαλούν τη μεγαλύτερη αναστολή της μιτοχονδριακής δραστηριότητας σε ανθρώπινους ουλικούς ινοβλάστες.
- Η μεγαλύτερη έκθεση (20min) σε εκχύλιμα μη εμποτισμένου νήματος οδηγεί σε μη αναστρέψιμη μείωση της μεταβολικής δραστηριότητας, υποδεικνύοντας μια χρονοεξαρτωμενη σχέση.
- Σε όλες τις υπόλοιπες ομάδες παρατηρείται ανάκαμψη της μιτοχονδριακής δραστηριότητας στον τελευταίο χρόνο ελέγχου.
- Τα εκχυλίσματα της πάστας απώθησης προκαλούν τη μικρότερη αναστολή της μιτοχονδριακής δραστηριότητας σε ανθρώπινους ουλικούς ινοβλάστες.
- Τα κύτταρα που εκτέθηκαν στις αραιώσεις 1:2 και 1:4 της πάστας απώθησης παρουσιάζουν σημαντικά ταχύτερο ρυθμό ανάκαμψης και διέγερση της μεταβολικής δραστηριότητας HGFs συγκριτικά με τις υπόλοιπες πειραματικές ομάδες, γεγονός που υποδεικνύει μια δοσοεξαρτώμενη σχέση.

Περιορισμοί της παρούσας πειραματικής μελέτης

- Πρόκειται για μία *in vitro* μελέτη που δεν προσομοιάζει πλήρως το βιολογικό περιβάλλον της στοματικής κοιλότητας. Η παρουσία του προστατευτικού φραγμού του επιθηλίου, σε συνδυασμό με το

μηχανισμό άμυνας του περιοδοντίου, που περιλαμβάνει μεσολαβητές της φλεγμονής (προσταγλανδίνες), κυτοκίνες (ιντερλευκίνες, παράγοντες νέκρωσης των όγκων α και β) και μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας, ενδεχομένως να διαφοροποιεί τα αποτελέσματα στην κλινική πράξη. Επίσης, δε λαμβάνεται η διαφορετική πίεση που ασκείται κατά την τοποθέτηση των υλικών στους ιστούς και το πιθανό επακόλουθο τραύμα αυτών.

- Αναμφισβήτητα, τα πρώτα κύτταρα που έρχονται σε επαφή με τους παράγοντες απώθησης των ούλων είναι τα κύτταρα του επιθηλίου των ούλων. Ωστόσο η δυσκολία απομόνωσης και επίτευξης πρωτογενούς κυτταρικής σειράς επιθηλιακών κυττάρων οδήγησε στη χρήση ουλικών ινοβλαστών. Εντούτοις, οι ουλικοί ινοβλάστες έχουν άμεση συνάφεια με το σκοπό της παρούσας μελέτης, καθώς συχνά εκτίθενται σε μέσα απώθησης ούλων σε περίπτωση ελκώσεων του επιθηλίου κατά τη διαδικασία απώθησης (Ruel και συν., 1980).
- Λόγω της ανομοιογένειας του αρχικού εκχυλίσματος του υλικού της πάστας απώθησης στο θρεπτικό μέσο, εφαρμόστηκε φίλτρο αποστείρωσης που οδήγησε στην επίτευξη οπτικά διαυγούς και ομοιογενούς διαλύματος. Αν και η διαδικασία αποστείρωσης εφαρμόστηκε για όλες τις ερευνητικές ομάδες ενδεχομένως να επηρέασε τη βιολογική συμπεριφορά των υλικών.

ΣΤ. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

- Ποσοτικός προσδιορισμός ζωντανών / νεκρών κυττάρων με χρήση κατάλληλων ανιχνευτών φθορισμού.
- Μελέτη της κινητικής ανάπτυξης των κυττάρων στους αντίστοιχους χρόνους ελέγχου (0, 24, 48 και 72h).
- Μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και ποσοτικοποίηση των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου μέσω της δοκιμασίας πρόσληψης βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU).

Z. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Acar O, Erkut S, Ozcelik TB, Ozdemir E, Akçil M. A clinical comparison of cordless and conventional displacement systems regarding clinical performance and impression quality. *J Prosthet Dent.* 2014;111:388-394.

Akca EA, Yildirim E, Dalkiz M, Yavuzyilmaz H, Beydemir B. Effects of different retraction medicaments on gingival tissue. *Quintessence Int.* 2006;37:53-9.

Ahmed SN & Donovan TE. Gingival displacement: Survey results of dentists' practice procedures. *J Prosthet Dent.* 2015;114:81-5.e1-2.

Al Hamad KQ, Azar WZ, Alwaeli HA, Said KN. A clinical study on the effects of cordless and conventional retraction techniques on the gingival and periodontal health. *J Clin Periodontol.* 2008;35:1053-1058.

Ayo-Yusuf OA, Driessen CH, Botha AJ. SEM-EDX study of prepared human dentine surfaces exposed to gingival retraction fluids. *J Dent.* 2005;33:731-9.

Azzi R, Tsao TF, Carranza FA Jr, Kenney EB. Comparative study of gingival retraction methods. *J Prosthet Dent.* 1983;50:561-5.

Baba NZ, Goodacre CJ, Jekki R, Won J. Gingival displacement for impression making in fixed prosthodontics: Contemporary principles, materials, and techniques. *Dent Clin North Am.* 2014;58:45-68.

Bader JD, Bonito AJ, Shugars DA. A systematic review of cardiovascular effects of epinephrine on hypertensive dental patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;93:647-53.

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;408:4547-66.

Beier US, Kranewitter R, Dumfahrt H. Quality of impressions after use of the Magic Foam Cord gingival retraction system – a clinical study of 269 abutment teeth. *Int J Prosthodont.* 2009;22:143-7.

Bennani V, Aarts JM, Schumayer D. Correlation of pressure and displacement during gingival displacement: An in vitro study. *J Prosthet Dent.* 2016;115:296–300.

Bennani V, Inger M, Aarts JM. Comparison of pressure generated by cordless gingival displacement materials. *J Prosthet Dent.* 2014;112:163-7.

Benson BW, Bomberg TJ, Hatch RA, Hoffman W. Tissue displacement methods in fixed prosthodontics. *J Prosthet Dent.* 1986;55:175-81.

Bowles WH, Tardy SJ, Vahadi A. Evaluation of New Gingival Retraction Agents. *J Dent Res.* 1991;70:1447-9.

Brady WF. Periodontal and restorative considerations in rotary gingival curettage. *J Am Dent Assoc.* 1982;105:231-6.

Burke FJ and Crisp RJ. Evaluation of a novel compule - based gingival retraction system in UK general dental practices. *Dent Update.* 2014;41:432-4, 437-8.

Buttendorf AR, Ferreira CF, Bianchini MA, da Silva JE, Wicks RA. Minimal Time for Gingival Retraction Cords to Achieve Accurate Impression: An In Vivo Study. *J Dent Health Oral Disord Ther* 2015;3: 00078.

Coelho D, Cavallaro, J, Rothschild E. Gingival recession with electrosurgery for impression making. *J Prosth Dent*, 1975;33:422-6.

de Camargo LM, Chee WWL, Donovan TE. Inhibition of polymerization of polyvinyl siloxanes by medicaments used on gingival retraction cords. *J Prosthet Dent*. 1993;70:114-7.

de Gennaro GG, Landesman HM, Calhoun JE, Martinoff JT. A comparison of gingival inflammation related to retraction cords. *J Prosthet Dent*. 1982;47:384-6.

De Vitre R, Galburt RB, Maness WJ. Biometric comparison of bur and electrosurgical retraction methods. *J Prosthet Dent*. 1985;53:179-82.

De Silva N, Gregoire DC. Inductively coupled plasma optical emission and mass spectrometry in Instrumental Multi-element Chemical Analysis, Z.B. Alfassi (ed), Kluwer Academic Publishers, 1998.

Donovan TE, Gandara BK, Nemetz H. Review and survey of medicaments used with gingival retraction cords. *J Prosthet Dent*. 1985;53:525-31.

Farzin M, Barfi A, Hashemi A , Pardis S , Amir Ali Reza Khaledi A. Cytotoxic Effect of Astringent Agents on Human Gingival Fibroblasts. *J Oral Health and Dental Manag*. 2016;15:179-82.

Felpel LP. A review of pharmacotherapeutics for prosthetic dentistry: Part I. *J Prosthet Dent*. 1997;77:285-92.

Ferrari M, Cagidiaco MC, Ercoli C. Tissue management with a new gingival retraction material: A preliminary clinical report. *J Prosthet Dent*. 1996;75:242-7.

Fisher DW. Conservative management of the gingival tissue for crowns. *Dent Clin North Am.* 1976;20:273-84.

Forsyth RP, Stark MM, Nicholson RJ, Peng CT. Blood pressure responses to epinephrine treated gingival retraction strings in the rhesus monkey. *J. Am. Dent. Assoc.* 1969;78:13-19.

Glick M. New guidelines for prevention, detection, evaluation and treatment of high blood pressure. *J Am Dent Assoc.* 1998;129:1588-94.

Gogerty JH, Strand HA, Ogilvie AL, Dille JM. Vasopressor effects of topical epinephrine in certain dental procedures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1957;10:614-22.

Goodacre CJ. Gingival esthetics. *J Prosthet Dent.* 1990;64:1-12.

Gupta A, Prithviraj DR, Gupta D, Shruti DP. Clinical Evaluation of Three New Gingival Retraction Systems: A Research Report. *J Indian Prosthodont Soc* 2013;13:36-42.

Gupta R, Aggarwal R, Siddiqui Z. Comparison of Various Methods of Gingival Retraction on Gingival and Periodontal Health and Marginal Fit. *Orig Res Artic.* 2016;2:243-7.

Hansen PA, Tira DE, Barlow J. Current methods of finish-line exposure by practicing prosthodontists. *J Prosthodont.* 1999;8:163-70.

Harrison J. Effect of retraction materials on the gingival sulcus epithelium. *J Prosthet Dent.* 1961;11: 514 – 521.

Ingraham R, Sochat P, Hansing FJ. Rotary gingival curettage - A technique for tooth preparation and management of the gingival sulcus for impression taking. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1981;1:8-33.

Jokstad A. Clinical trial of gingival retraction cords. *J Prosthet Dent.* 1999;8:258-61.

Jones TR, Antonetti DL, Reid TW. Aluminum ions stimulate mitosis in murine cells in tissue culture. *J Cell Biochem.* 1986;30:31-9.

Kamansky FW, Tempel TR, Post AC. Gingival tissue response to rotary curettage. *J Prosthet Dent.* 1984;52:380-3.

Kopac I, Cvetko E, Pavlica Z, Marion L. Gingival inflammatory response induced by chemical retraction agents in beagle dogs. *Int J Prosthodont.* 2002;15:14-9.

Kopac I, Batista U, Cvetko E, Marion L. Viability of fibroblasts in cell culture after treatment with different chemical retraction agents. *J Oral Rehabil.* 2002;29:98-104.

Krishna C, Gupta N, Reddy KM, Sekhar NC, Aditya V, Reddy GV. Laser gingival retraction: a quantitative assessment. *J Clin Diagn Res.* 2013;7:1787-8.

La Forgia A. Mechanical-chemical and electrosurgical tissue retraction for fixed prosthesis. *J Prosthet Dent.* 1964;14:1107-14.

Land M, Rosenstiel S, Sandrik JL. Disturbance of the dentinal smear layer by acidic hemostatic agents. *J Prosthet Dent.* 1994;72:4-7.

Land M, Couri CC, Johnston WM. Smear layer instability caused by hemostatic agents. *J Prosthet Dent.* 1996;76:477-82.

Livaditis GJ. The matrix impression system for fixed prosthodontics. *J Prosthet Dent.* 1998;79:208-16.

Liu CM, Huang FM, Yang LC, Chou LS, Chou MY, Chang YC. Cytotoxic effects of gingival retraction cords on human gingival fibroblasts in vitro. *J Oral Rehabil.* 2004;31:368-72.

Löe H, Silness J. Tissue reactions to string packs used in fixed restorations. *J Prosthet Dent.* 1963;13:318-23.

Mohan M, Gupta A, Shenoy V, Parolia A. Pharmacological Agents in Dentistry: A Review. *Br J Pharm Res.* 2011;1:66–87.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.

Nemetz H. Tissue management in fixed prosthodontics. *J Prosthet Dent.* 1974;31:628-36.

Nemetz H, Donovan T, Landesman H. Exposing the gingival margin: a systematic approach for the control of hemorrhage. *J Prosthet Dent.* 1984;51:647-51.

Noonan JE, Goldfogel MH, Lambert RL. Inhibited set of the surface of addition silicones in contact with rubber dam. *Oper Dent.* 1985;10:46-8.

Nowakowska D, Saczko J, Kulbacka J, Choromanska A. Dynamic oxidoreductive potential of astringent retraction agents. *Folia Biol (Praha).* 2010;56:263-8.

Nowakowska D, Saczko J, Kulbacka J, Choromanska A, Raszewski Z. Cytotoxic potential of vasoconstrictor experimental gingival retraction agents: in vitro study on primary human gingival fibroblasts. *Folia Biol (Praha)*. 2012;58:37-43.

Nowakowska D, Saczko J, Kulbacka J, Wiczkiewicz W. Chemical Retraction Agents - In Vivo and in Vitro Studies Into Their Physico Chemical Properties, Biocompatibility With Gingival Margin Tissues and Compatibility With Elastomer Impression Materials. *Mini Rev Med Chem*. 2016;17: 1-10.

Parker S. The use of lasers in fixed prosthodontics. *Dent Clin North Am*. 2004;48:971-98.

Pelzner RB, Kempler D, Stark MM, Lum LB, Nicholson RJ, Soelberg KB. Human blood pressure and pulse rate response to racemic epinephrine retraction cord. *J Prosthet Dent*. 1978;39:287-92.

Phatak NM, Lang RL. Systemic hemodynamic effects of R-epinephrine gingival retraction cord in clinic patients. *J. Oral Ther Pharmacol*. 1966;2: 393-8 .

Phatale S, Marawar PP, Byakod G, Lagdive SB, Kalburge JV. Effect of retraction materials on gingival health: A histopathological study. *J Indian Soc Periodontol*. 2010;14:35-9.

Poss S. An innovative tissue-retraction material. *Compend Contin Educ Dent*. 2002;23:13-7.

Prasanna GSR, Reddy K, Kumar RKN, Shivaprakash S. Evaluation of efficacy of different gingival displacement materials on gingival sulcus width. *J Contemp Dent Pract*. 2013;14:217-221.

Rosenstiel S, Land M, Fujimoto J. Contemporary fixed prosthodontics. 4thed. St Louis, MO: Mosby – Year Book Inc. 2006;434-40.

Ruel J, Schuessler PJ, Malament K, Mori D. Effect of retraction procedures on the periodontium in humans. J Prosthet Dent. 1980;44:508-15.

Sarmiento HR, Leite FR, Dantas RV, Ogliari FA, Demarco FF, Faot F. A double-blind randomized clinical trial of two techniques for gingival displacement. J Oral Rehabil 2014;41:306-313.

Shannon A. Expanded clinical uses of a novel tissue-retraction material. Compend Contin Educ Dent. 2002;23:3-6.

Shaw DH, Krejci RF. Gingival retraction preference of dentists in general practice. Quintessence Int. 1986;17:277-80.

Shillingburg HT Jr, Hatch RA, Keenan MP, Hemphill MW. Impression materials and techniques used for cast restorations in eight states. J Am Dent Assoc. 1980;100:696-9.

Shillingburg HT, Hobo S, Whitsett L. Fundamentals of Fixed Prosthodontics. 3rd ed. Chicago, IL: Quintessence Publishing. 1997;257-79.

Stark, MM, Nicholson DJ, Soelberg KB, Kempler D, Pelzner, RB. The effects of retraction cords and electrosurgery upon blood pressure and tissue regeneration in rhesus monkeys. J Dent Res. 1977;56:881-8.

Strassler HE. Tissue Management , Gingival Retraction and Hemostasis. Self-study course. 2011;1-9.

The Glossary of Prosthodontic Terms: Ninth Edition. J Prosthet Dent. 2017;117:41.

Thomas MS, Joseph RM, Parolia A. Nonsurgical gingival displacement in restorative dentistry. *Compend Contin Educ Dent*. 2011;32:26-34.

Velez G. Inductively coupled plasma: The future of heavy metals testing. *Life Science, Technical Bulletin*. 2009;7:1-2.

Wataha JC, Hanks CT, Craig RG. The effect of cell monolayer density on the cytotoxicity metal ions which are released from dental alloys. *Dent Mater*. 1993;9:172-6.

Weir DJ, Williams BH. Clinical effectiveness of mechanical-chemical tissue displacement methods. *J Prosthet Dent*. 1984;51:326-9.

Williams DF. *Essential Biomaterials Science*, 1st ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 2014;129-30.

Woody RD, Miller A, Staffanou RS. Review of the pH of hemostatic agents used in tissue displacement. *J Prosthet Dent*. 1993;70:191-2.

Woycheshin FF. An evaluation of the drugs used for gingival retraction. *J Prosthet Dent*. 1964;14:769–76.

Yalçın M, Barutçigil C, Umar I, Bozkurt BS, Hakki SS. Cytotoxicity of hemostatic agents on the human gingival fibroblast. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;17:984-8.

Yang JC, Tsai CM, Chen MS, Wei JY. Clinical study of a newly developed injection-type gingival retraction material. *Chin Dent J* 2005;24:147-151.

Col. stats		A	B	C	D	E	F
		1:1 / 10min	1:2 / 10min	1:4 / 10min	1:1 / 20min	1:2 / 20min	1:4 / 20min
1	Number of values	6 Y	6 Y	6 Y	6 Y	6 Y	6 Y
2							
3	Minimum	72.12	67.10	68.44	74.38	74.38	74.38
4	25% Percentile	76.07	74.82	75.15	80.50	75.94	77.87
5	Median	87.72	89.88	85.58	84.93	87.39	83.90
6	75% Percentile	94.57	97.84	92.36	94.09	96.64	90.44
7	Maximum	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
8							
9	Mean	86.28	86.90	84.47	86.49	86.86	84.75
10	Std. Deviation	10.17	12.46	10.97	8.739	11.22	8.724
11	Std. Error of Mean	4.150	5.088	4.478	3.568	4.582	3.561
12							
13	Lower 95% CI of mean	75.61	73.82	72.96	77.31	75.08	75.59
14	Upper 95% CI of mean	96.95	99.97	95.98	95.66	98.64	93.90
15							
16	KS normality test						
17	KS distance	0.1768	0.2586	0.1577	0.2128	0.2676	0.2202
18	P value	0.2000	0.2000	0.2000	0.2000	0.2000	0.2000
19	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
20	P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns
21							
22	Sum	517.7	521.4	506.8	518.9	521.2	508.5

0h

Η. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΜΤΤ ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ

	Col. stats	A		B		C		D		E		F	
		1:1 / 10min	Y	1:2 / 10min	Y	1:4 / 10min	Y	1:1 / 20min	Y	1:2 / 20min	Y	1:4 / 20min	Y
1	Number of values	6	Y	6	Y	6	Y	6	Y	6	Y	6	Y
2													
3	Minimum	66.69		69.57		69.08		71.80		71.64		83.62	
4	25% Percentile	76.61		76.73		69.63		80.67		80.63		89.20	
5	Median	85.26		80.57		79.38		90.97		87.87		94.45	
6	75% Percentile	95.16		105.1		101.0		98.17		107.5		104.5	
7	Maximum	100.0		120.5		104.1		100.0		129.9		118.2	
8													
9	Mean	85.11		88.39		83.62		89.15		93.48		96.96	
10	Std. Deviation	11.66		18.60		15.01		10.59		20.05		11.74	
11	Std. Error of Mean	4.760		7.593		6.126		4.325		8.185		4.791	
12													
13	Lower 95% CI of mean	72.87		68.87		67.87		78.04		72.44		84.65	
14	Upper 95% CI of mean	97.34		107.9		99.37		100.3		114.5		109.3	
15													
16	KS normality test												
17	KS distance	0.1612		0.3166		0.2643		0.2136		0.2474		0.2312	
18	P value	0.2000		0.0605		0.2000		0.2000		0.2000		0.2000	
19	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes		Yes		Yes		Yes		Yes		Yes	
20	P value summary	ns		ns		ns		ns		ns		ns	
21													
22	Sum	510.7		530.3		501.7		534.9		560.9		581.8	

	Col. stats	A	B	C	D	E	F
		1:1 / 10min Y	1:2 / 10min Y	1:4 / 10min Y	1:1 / 20min Y	1:2 / 20min Y	1:4 / 20min Y
1	Number of values	6	6	6	6	6	6
2							
3	Minimum	79.00	72.32	78.65	79.40	78.11	82.59
4	25% Percentile	79.89	73.26	79.80	81.79	81.47	84.55
5	Median	89.89	83.57	91.34	83.88	91.01	92.46
6	75% Percentile	97.97	105.4	103.9	94.93	100.9	101.8
7	Maximum	100.0	121.5	115.3	100.0	103.7	107.4
8							
9	Mean	89.38	89.09	92.83	87.17	91.06	93.35
10	Std. Deviation	8.962	18.84	14.67	7.846	10.06	9.779
11	Std. Error of Mean	3.659	7.692	5.987	3.203	4.108	3.992
12							
13	Lower 95% CI of mean	79.97	69.31	77.44	78.93	80.50	83.08
14	Upper 95% CI of mean	98.78	108.9	108.2	95.40	101.6	103.6
15							
16	KS normality test						
17	KS distance	0.1958	0.2119	0.2555	0.2680	0.1462	0.2319
18	P value	0.2000	0.2000	0.2000	0.2000	0.2000	0.2000
19	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
20	P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns
21							
22	Sum	536.3	534.5	557.0	523.0	546.4	560.1

	Col. stats	A		B		C		D		E		F	
		1:1 / 10min	Y	1:2 / 10min	Y	1:4 / 10min	Y	1:1 / 20min	Y	1:2 / 20min	Y	1:4 / 20min	Y
1	Number of values	6	Y	6	Y	6	Y	6	Y	6	Y	6	Y
2													
3	Minimum	98.69		94.42		91.58		85.14		82.87		78.16	
4	25% Percentile	99.67		94.51		93.84		88.13		88.18		82.06	
5	Median	101.3		96.78		99.35		99.76		99.76		96.65	
6	75% Percentile	102.5		106.7		108.2		110.0		113.6		109.5	
7	Maximum	104.1		126.8		120.2		112.9		143.1		138.0	
8													
9	Mean	101.2		101.5		101.5		99.30		103.2		98.80	
10	Std. Deviation	1.824		12.58		10.14		10.82		21.01		21.11	
11	Std. Error of Mean	0.7445		5.134		4.140		4.417		8.576		8.617	
12													
13	Lower 95% CI of mean	99.31		88.35		90.90		87.94		81.16		76.65	
14	Upper 95% CI of mean	103.1		114.7		112.2		110.6		125.3		121.0	
15													
16	KS normality test												
17	KS distance	0.1864		0.3823		0.2324		0.1750		0.3224		0.3107	
18	P value	0.2000		0.0064		0.2000		0.2000		0.0507		0.0721	
19	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes		No		Yes		Yes		Yes		Yes	
20	P value summary	ns		**		ns		ns		ns		ns	
21													
22	Sum	607.3		609.3		609.2		595.8		619.2		592.8	

MTT -2way ANOVA

0h

2way ANOVA Tabular results		A	B	C	D	E
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
		Y	Y	Y	Y	Y
1	Table Analyzed	0h				
2						
3	Two-way ANOVA	Ordinary				
4	Alpha	0.05				
5						
6	Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
7	Interaction	3.597	0.5773	ns	No	
8	Row Factor	11.82	< 0.0001	****	Yes	
9	Column Factor	0.1622	0.9593	ns	No	
10						
11	ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
12	Interaction	11044	25	441.8	F (25, 540) = 0.9202	P = 0.5773
13	Row Factor	36290	5	7258	F (5, 540) = 15.12	P < 0.0001
14	Column Factor	498.1	5	99.61	F (5, 540) = 0.2075	P = 0.9593
15	Residual	259254	540	480.1		
16						
17	Number of missing values	288				

2way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D	E
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
		Y	Y	Y	Y	Y
1	Within each column, compare rows (simple effects within columns)					
2						
3	Number of families	6				
4	Number of comparisons per family	15				
5	Alpha	0.05				
6						
7	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
8						
9	1:1 / 10min					
10	C1 vs. C2	22.61	4.520 to 40.70	Yes	**	0.0051
11	C1 vs. Paste	13.46	-8.698 to 35.61	No	ns	0.5077
12	C1 vs. Cord impr	27.88	5.728 to 50.04	Yes	**	0.0047
13	C1 vs. Solution	7.241	-14.91 to 29.40	No	ns	0.9374
14	C1 vs. Cord non-imp	11.11	-11.04 to 33.27	No	ns	0.7061
15	C2 vs. Paste	-9.152	-31.31 to 13.00	No	ns	0.8457
16	C2 vs. Cord impr	5.274	-16.88 to 27.43	No	ns	0.9840
17	C2 vs. Solution	-15.37	-37.52 to 6.787	No	ns	0.3529
18	C2 vs. Cord non-imp	-11.50	-33.65 to 10.66	No	ns	0.6745
19	Paste vs. Cord impr	14.43	-11.16 to 40.01	No	ns	0.5905
20	Paste vs. Solution	-6.217	-31.80 to 19.37	No	ns	0.9825
21	Paste vs. Cord non-imp	-2.347	-27.93 to 23.24	No	ns	0.9998
22	Cord impr vs. Solution	-20.64	-46.23 to 4.941	No	ns	0.1927
23	Cord impr vs. Cord non-imp	-16.77	-42.36 to 8.810	No	ns	0.4187
24	Solution vs. Cord non-imp	3.870	-21.71 to 29.45	No	ns	0.9981

25					
26	1:2 / 10min				
27	C1 vs. C2	4.520 to 40.70	Yes	**	0.0051
28	C1 vs. Paste	-11.95 to 32.36	No	ns	0.7752
29	C1 vs. Cord impr	10.75 to 55.06	Yes	***	0.0004
30	C1 vs. Solution	-19.28 to 25.03	No	ns	0.9991
31	C1 vs. Cord non-imp	-12.12 to 32.19	No	ns	0.7879
32	C2 vs. Paste	-34.56 to 9.754	No	ns	0.5983
33	C2 vs. Cord impr	-11.86 to 32.45	No	ns	0.7689
34	C2 vs. Solution	-41.89 to 2.423	No	ns	0.1125
35	C2 vs. Cord non-imp	-34.73 to 9.577	No	ns	0.5831
36	Paste vs. Cord impr	-2.887 to 48.28	No	ns	0.1152
37	Paste vs. Solution	-32.91 to 18.25	No	ns	0.9639
38	Paste vs. Cord non-imp	-25.76 to 25.41	No	ns	> 0.9999
39	Cord impr vs. Solution	-55.61 to -4.444	Yes	*	0.0109
40	Cord impr vs. Cord non-imp	-48.46 to 2.710	No	ns	0.1099
41	Solution vs. Cord non-imp	-18.43 to 32.74	No	ns	0.9675
42					
43	1:4 / 10min				
44	C1 vs. C2	4.520 to 40.70	Yes	**	0.0051
45	C1 vs. Paste	-4.388 to 39.92	No	ns	0.1984
46	C1 vs. Cord impr	9.400 to 53.71	Yes	***	0.0008
47	C1 vs. Solution	-11.97 to 32.34	No	ns	0.7769
48	C1 vs. Cord non-imp	-11.08 to 33.23	No	ns	0.7087
49	C2 vs. Paste	-27.00 to 17.31	No	ns	0.9892
50	C2 vs. Cord impr	-13.21 to 31.10	No	ns	0.8579
51	C2 vs. Solution	-34.58 to 9.731	No	ns	0.5963
52	C2 vs. Cord non-imp	-33.69 to 10.62	No	ns	0.6717
53	Paste vs. Cord impr	-11.80 to 39.37	No	ns	0.6376
54	Paste vs. Solution	-33.17 to 18.00	No	ns	0.9583
55	Paste vs. Cord non-imp	-32.27 to 18.89	No	ns	0.9757
56	Cord impr vs. Solution	-46.95 to 4.212	No	ns	0.1618
57	Cord impr vs. Cord non-imp	-46.06 to 5.105	No	ns	0.2002
58	Solution vs. Cord non-imp	-24.69 to 26.48	No	ns	> 0.9999
59					
60	1:1 / 20min				
61	C1 vs. C2	7.527 to 43.71	Yes	***	0.0008
62	C1 vs. Paste	-4.701 to 39.61	No	ns	0.2154
63	C1 vs. Cord impr	-7.628 to 36.68	No	ns	0.4185
64	C1 vs. Solution	-14.28 to 30.03	No	ns	0.9124
65	C1 vs. Cord non-imp	-6.544 to 37.77	No	ns	0.3349
66	C2 vs. Paste	-30.32 to 13.99	No	ns	0.8993
67	C2 vs. Cord impr	-33.24 to 11.07	No	ns	0.7078
68	C2 vs. Solution	-39.90 to 4.413	No	ns	0.1997
69	C2 vs. Cord non-imp	-32.16 to 12.15	No	ns	0.7897
70	Paste vs. Cord impr	-28.51 to 22.66	No	ns	0.9995
71	Paste vs. Solution	-35.16 to 16.00	No	ns	0.8927
72	Paste vs. Cord non-imp	-27.43 to 23.74	No	ns	> 0.9999
73	Cord impr vs. Solution	-32.24 to 18.93	No	ns	0.9763
74	Cord impr vs. Cord non-imp	-24.50 to 26.67	No	ns	> 0.9999
75	Solution vs. Cord non-imp	-17.85 to 33.32	No	ns	0.9546

76					
77	1:2 / 20min				
78	C1 vs. C2	7.527 to 43.71	Yes	***	0.0008
79	C1 vs. Paste	-17.22 to 27.09	No	ns	0.9882
80	C1 vs. Cord impr	1.386 to 45.70	Yes	*	0.0298
81	C1 vs. Solution	-1.875 to 42.44	No	ns	0.0947
82	C1 vs. Cord non-imp	-17.68 to 26.63	No	ns	0.9925
83	C2 vs. Paste	-42.84 to 1.475	No	ns	0.0831
84	C2 vs. Cord impr	-24.23 to 20.08	No	ns	0.9998
85	C2 vs. Solution	-27.49 to 16.82	No	ns	0.9832
86	C2 vs. Cord non-imp	-43.30 to 1.013	No	ns	0.0712
87	Paste vs. Cord impr	-6.978 to 44.19	No	ns	0.2993
88	Paste vs. Solution	-10.24 to 40.93	No	ns	0.5222
89	Paste vs. Cord non-imp	-26.05 to 25.12	No	ns	> 0.9999
90	Cord impr vs. Solution	-28.84 to 22.32	No	ns	0.9992
91	Cord impr vs. Cord non-imp	-44.65 to 6.516	No	ns	0.2726
92	Solution vs. Cord non-imp	-41.39 to 9.777	No	ns	0.4881
93					
94	1:4 / 20min				
95	C1 vs. C2	7.527 to 43.71	Yes	***	0.0008
96	C1 vs. Paste	-9.409 to 34.90	No	ns	0.5687
97	C1 vs. Cord impr	-6.285 to 38.03	No	ns	0.3163
98	C1 vs. Solution	-1.189 to 43.12	No	ns	0.0756
99	C1 vs. Cord non-imp	-5.830 to 38.48	No	ns	0.2849
100	C2 vs. Paste	-35.03 to 9.285	No	ns	0.5581
101	C2 vs. Cord impr	-31.90 to 12.41	No	ns	0.8076
102	C2 vs. Solution	-26.81 to 17.50	No	ns	0.9910
103	C2 vs. Cord non-imp	-31.45 to 12.86	No	ns	0.8371
104	Paste vs. Cord impr	-22.46 to 28.71	No	ns	0.9993
105	Paste vs. Solution	-17.36 to 33.80	No	ns	0.9416
106	Paste vs. Cord non-imp	-22.00 to 29.16	No	ns	0.9987
107	Cord impr vs. Solution	-20.49 to 30.68	No	ns	0.9929
108	Cord impr vs. Cord non-imp	-25.13 to 26.04	No	ns	> 0.9999
109	Solution vs. Cord non-imp	-30.22 to 20.94	No	ns	0.9954
110					

2way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D	E
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
		Y	Y	Y	Y	Y
1	Within each row, compare columns (simple effects within rows)					
2						
3	Number of families	6				
4	Number of comparisons per family	15				
5	Alpha	0.05				
6						
7	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
8						
9	C1					
10	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	0.0	-18.09 to 18.09	No	ns	> 0.9999
11	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	0.0	-18.09 to 18.09	No	ns	> 0.9999
12	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	0.0	-18.09 to 18.09	No	ns	> 0.9999
13	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	0.0	-18.09 to 18.09	No	ns	> 0.9999
14	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	0.0	-18.09 to 18.09	No	ns	> 0.9999
15	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	0.0	-18.09 to 18.09	No	ns	> 0.9999
16	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	0.0	-18.09 to 18.09	No	ns	> 0.9999
17	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	0.0	-18.09 to 18.09	No	ns	> 0.9999
18	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	0.0	-18.09 to 18.09	No	ns	> 0.9999
19	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	0.0	-18.09 to 18.09	No	ns	> 0.9999
20	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	0.0	-18.09 to 18.09	No	ns	> 0.9999
21	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	0.0	-18.09 to 18.09	No	ns	> 0.9999
22	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	0.0	-18.09 to 18.09	No	ns	> 0.9999
23	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	0.0	-18.09 to 18.09	No	ns	> 0.9999
24	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	0.0	-18.09 to 18.09	No	ns	> 0.9999
25						
26	C2					
27	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	0.0	-18.09 to 18.09	No	ns	> 0.9999
28	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	0.0	-18.09 to 18.09	No	ns	> 0.9999
29	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	3.007	-15.08 to 21.10	No	ns	0.9970
30	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	3.007	-15.08 to 21.10	No	ns	0.9970
31	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	3.007	-15.08 to 21.10	No	ns	0.9970
32	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	0.0	-18.09 to 18.09	No	ns	> 0.9999
33	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	3.007	-15.08 to 21.10	No	ns	0.9970
34	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	3.007	-15.08 to 21.10	No	ns	0.9970
35	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	3.007	-15.08 to 21.10	No	ns	0.9970
36	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	3.007	-15.08 to 21.10	No	ns	0.9970
37	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	3.007	-15.08 to 21.10	No	ns	0.9970
38	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	3.007	-15.08 to 21.10	No	ns	0.9970
39	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	0.0	-18.09 to 18.09	No	ns	> 0.9999
40	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	0.0	-18.09 to 18.09	No	ns	> 0.9999
41	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	0.0	-18.09 to 18.09	No	ns	> 0.9999
42						
43	Paste					
44	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	-3.250	-28.83 to 22.33	No	ns	0.9992
45	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	4.310	-21.27 to 29.89	No	ns	0.9968
46	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	3.998	-21.59 to 29.58	No	ns	0.9978
47	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	-8.521	-34.10 to 17.06	No	ns	0.9324
48	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	-0.7108	-26.29 to 24.87	No	ns	> 0.9999
49	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	7.560	-18.02 to 33.14	No	ns	0.9588

50	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	7.247	-18.34 to 32.83	No	ns	0.9656
51	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	-5.272	-30.85 to 20.31	No	ns	0.9917
52	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	2.539	-23.04 to 28.12	No	ns	0.9998
53	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	-0.3129	-25.90 to 25.27	No	ns	> 0.9999
54	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	-12.83	-38.41 to 12.75	No	ns	0.7059
55	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	-5.021	-30.60 to 20.56	No	ns	0.9934
56	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	-12.52	-38.10 to 13.06	No	ns	0.7274
57	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	-4.708	-30.29 to 20.87	No	ns	0.9951
58	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	7.811	-17.77 to 33.39	No	ns	0.9528
59						
60	Cord impr					
61	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	5.021	-20.56 to 30.60	No	ns	0.9934
62	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	3.672	-21.91 to 29.26	No	ns	0.9985
63	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	-13.36	-38.94 to 12.23	No	ns	0.6689
64	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	-4.342	-29.92 to 21.24	No	ns	0.9967
65	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	-12.01	-37.60 to 13.57	No	ns	0.7609
66	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	-1.349	-26.93 to 24.23	No	ns	> 0.9999
67	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	-18.38	-43.96 to 7.207	No	ns	0.3132
68	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	-9.362	-34.95 to 16.22	No	ns	0.9018
69	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	-17.03	-42.62 to 8.550	No	ns	0.4006
70	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	-17.03	-42.61 to 8.555	No	ns	0.4010
71	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	-8.014	-33.60 to 17.57	No	ns	0.9474
72	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	-15.68	-41.27 to 9.898	No	ns	0.4970
73	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	9.014	-16.57 to 34.60	No	ns	0.9154
74	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	1.343	-24.24 to 26.93	No	ns	> 0.9999
75	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	-7.671	-33.25 to 17.91	No	ns	0.9562
76						
77	Solution					
78	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	-4.364	-29.95 to 21.22	No	ns	0.9966
79	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	2.944	-22.64 to 28.53	No	ns	0.9995
80	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	0.6335	-24.95 to 26.22	No	ns	> 0.9999
81	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	13.04	-12.54 to 38.62	No	ns	0.6914
82	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	13.73	-11.86 to 39.31	No	ns	0.6421
83	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	7.308	-18.28 to 32.89	No	ns	0.9644
84	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	4.997	-20.59 to 30.58	No	ns	0.9935
85	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	17.40	-8.180 to 42.99	No	ns	0.3755
86	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	18.09	-7.494 to 43.67	No	ns	0.3310
87	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	-2.310	-27.89 to 23.27	No	ns	0.9998
88	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	10.10	-15.49 to 35.68	No	ns	0.8694
89	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	10.78	-14.80 to 36.36	No	ns	0.8343
90	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	12.41	-13.18 to 37.99	No	ns	0.7350
91	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	13.09	-12.49 to 38.67	No	ns	0.6877
92	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	0.6860	-24.90 to 26.27	No	ns	> 0.9999
93						
94	Cord non-imp					
95	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	-1.080	-26.66 to 24.50	No	ns	> 0.9999
96	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	-0.03340	-25.62 to 25.55	No	ns	> 0.9999
97	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	4.501	-21.08 to 30.08	No	ns	0.9961
98	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	-6.637	-32.22 to 18.95	No	ns	0.9766
99	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	5.215	-20.37 to 30.80	No	ns	0.9921
100	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	1.046	-24.54 to 26.63	No	ns	> 0.9999
101	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	5.580	-20.00 to 31.16	No	ns	0.9893
102	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	-5.557	-31.14 to 20.03	No	ns	0.9895
103	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	6.295	-19.29 to 31.88	No	ns	0.9815
104	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	4.534	-21.05 to 30.12	No	ns	0.9959
105	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	-6.603	-32.19 to 18.98	No	ns	0.9771
106	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	5.248	-20.33 to 30.83	No	ns	0.9919
107	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	-11.14	-36.72 to 14.45	No	ns	0.8144
108	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	0.7143	-24.87 to 26.30	No	ns	> 0.9999
109	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	11.85	-13.73 to 37.43	No	ns	0.7711

MTT -2way ANOVA

24h

2way ANOVA Tabular results		A	B	C	D	E	F
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E	Title
		Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Table Analyzed	24h					
2							
3	Two-way ANOVA	Ordinary					
4	Alpha	0.05					
5							
6	Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?		
7	Interaction	8.170	< 0.0001	****	Yes		
8	Row Factor	22.10	< 0.0001	****	Yes		
9	Column Factor	3.388	< 0.0001	****	Yes		
10							
11	ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value	
12	Interaction	26407	25	1056	F (25, 540) = 2.660	P < 0.0001	
13	Row Factor	71439	5	14288	F (5, 540) = 35.98	P < 0.0001	
14	Column Factor	10950	5	2190	F (5, 540) = 5.515	P < 0.0001	
15	Residual	214433	540	397.1			
16							
17	Number of missing values	288					

2way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D	E
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
		Y	Y	Y	Y	Y
1	Within each column, compare rows (simple effects within columns)					
2						
3	Number of families	6				
4	Number of comparisons per family	15				
5	Alpha	0.05				
6						
7	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
8						
9	1:1 / 10min					
10	C1 vs. C2	20.09	3.637 to 36.54	Yes	**	0.0068
11	C1 vs. Paste	6.458	-13.69 to 26.61	No	ns	0.9422
12	C1 vs. Cord impr	11.54	-8.608 to 31.69	No	ns	0.5735
13	C1 vs. Solution	17.94	-2.206 to 38.09	No	ns	0.1126
14	C1 vs. Cord non-imp	33.31	13.16 to 53.46	Yes	****	< 0.0001
15	C2 vs. Paste	-13.63	-33.78 to 6.519	No	ns	0.3820
16	C2 vs. Cord impr	-8.547	-28.70 to 11.60	No	ns	0.8304
17	C2 vs. Solution	-2.146	-22.30 to 18.00	No	ns	0.9996
18	C2 vs. Cord non-imp	13.22	-6.930 to 33.37	No	ns	0.4179
19	Paste vs. Cord impr	5.084	-18.18 to 28.35	No	ns	0.9892
20	Paste vs. Solution	11.48	-11.78 to 34.75	No	ns	0.7200
21	Paste vs. Cord non-imp	26.85	3.584 to 50.12	Yes	*	0.0131
22	Cord impr vs. Solution	6.401	-16.87 to 29.67	No	ns	0.9697
23	Cord impr vs. Cord non-imp	21.77	-1.500 to 45.03	No	ns	0.0818
24	Solution vs. Cord non-imp	15.37	-7.901 to 38.63	No	ns	0.4101

25						
26	1:2 / 10min					
27	C1 vs. C2	20.09	3.637 to 36.54	Yes	**	0.0068
28	C1 vs. Paste	-20.51	-40.66 to -0.3560	Yes	*	0.0434
29	C1 vs. Cord impr	18.77	-1.375 to 38.92	No	ns	0.0841
30	C1 vs. Solution	20.89	0.7355 to 41.03	Yes	*	0.0371
31	C1 vs. Cord non-imp	30.43	10.28 to 50.58	Yes	***	0.0003
32	C2 vs. Paste	-40.59	-60.74 to -20.45	Yes	****	< 0.0001
33	C2 vs. Cord impr	-1.314	-21.46 to 18.84	No	ns	> 0.9999
34	C2 vs. Solution	0.7960	-19.35 to 20.95	No	ns	> 0.9999
35	C2 vs. Cord non-imp	10.34	-9.812 to 30.49	No	ns	0.6853
36	Paste vs. Cord impr	39.28	16.01 to 62.55	Yes	****	< 0.0001
37	Paste vs. Solution	41.39	18.12 to 64.66	Yes	****	< 0.0001
38	Paste vs. Cord non-imp	50.93	27.67 to 74.20	Yes	****	< 0.0001
39	Cord impr vs. Solution	2.110	-21.16 to 25.38	No	ns	0.9998
40	Cord impr vs. Cord non-imp	11.65	-11.61 to 34.92	No	ns	0.7073
41	Solution vs. Cord non-imp	9.542	-13.72 to 32.81	No	ns	0.8496
42						
43	1:4 / 10min					
44	C1 vs. C2	20.09	3.637 to 36.54	Yes	**	0.0068
45	C1 vs. Paste	-4.086	-24.24 to 16.06	No	ns	0.9923
46	C1 vs. Cord impr	21.16	1.010 to 41.31	Yes	*	0.0331
47	C1 vs. Solution	30.92	10.77 to 51.07	Yes	***	0.0002
48	C1 vs. Cord non-imp	30.19	10.04 to 50.34	Yes	***	0.0003
49	C2 vs. Paste	-24.18	-44.32 to -4.026	Yes	**	0.0084
50	C2 vs. Cord impr	1.070	-19.08 to 21.22	No	ns	> 0.9999
51	C2 vs. Solution	10.83	-9.315 to 30.96	No	ns	0.6399
52	C2 vs. Cord non-imp	10.10	-10.05 to 30.25	No	ns	0.7067
53	Paste vs. Cord impr	25.25	1.979 to 48.51	Yes	*	0.0245
54	Paste vs. Solution	35.01	11.74 to 58.28	Yes	***	0.0003
55	Paste vs. Cord non-imp	34.27	11.01 to 57.54	Yes	***	0.0004
56	Cord impr vs. Solution	9.764	-13.50 to 33.03	No	ns	0.8367
57	Cord impr vs. Cord non-imp	9.027	-14.24 to 32.29	No	ns	0.8774
58	Solution vs. Cord non-imp	-0.7370	-24.00 to 22.53	No	ns	> 0.9999
59						
60	1:1 / 20min					
61	C1 vs. C2	16.38	-0.07522 to 32.83	No	ns	0.0518
62	C1 vs. Paste	4.873	-15.28 to 25.02	No	ns	0.9828
63	C1 vs. Cord impr	13.19	-6.957 to 33.34	No	ns	0.4203
64	C1 vs. Solution	28.20	8.047 to 48.35	Yes	**	0.0010
65	C1 vs. Cord non-imp	2.444	-17.71 to 22.59	No	ns	0.9993
66	C2 vs. Paste	-11.50	-31.65 to 8.646	No	ns	0.5771
67	C2 vs. Cord impr	-3.184	-23.33 to 16.97	No	ns	0.9976
68	C2 vs. Solution	11.82	-8.330 to 31.97	No	ns	0.5472
69	C2 vs. Cord non-imp	-13.93	-34.08 to 6.217	No	ns	0.3566
70	Paste vs. Cord impr	8.320	-14.95 to 31.59	No	ns	0.9103
71	Paste vs. Solution	23.32	0.05633 to 46.59	Yes	*	0.0490
72	Paste vs. Cord non-imp	-2.430	-25.70 to 20.84	No	ns	0.9997
73	Cord impr vs. Solution	15.00	-8.263 to 38.27	No	ns	0.4382
74	Cord impr vs. Cord non-imp	-10.75	-34.02 to 12.52	No	ns	0.7732
75	Solution vs. Cord non-imp	-25.75	-49.02 to -2.486	Yes	*	0.0202

76						
77	1:2 / 20min					
78	C1 vs. C2	16.38	-0.07522 to 32.83	No	ns	0.0518
79	C1 vs. Paste	-29.89	-50.04 to -9.744	Yes	***	0.0004
80	C1 vs. Cord impr	13.66	-6.492 to 33.81	No	ns	0.3798
81	C1 vs. Solution	28.36	8.207 to 48.51	Yes	***	0.0009
82	C1 vs. Cord non-imp	10.60	-9.546 to 30.75	No	ns	0.6612
83	C2 vs. Paste	-46.27	-66.42 to -26.12	Yes	****	< 0.0001
84	C2 vs. Cord impr	-2.720	-22.87 to 17.43	No	ns	0.9989
85	C2 vs. Solution	11.98	-8.170 to 32.13	No	ns	0.5321
86	C2 vs. Cord non-imp	-5.774	-25.92 to 14.38	No	ns	0.9639
87	Paste vs. Cord impr	43.55	20.28 to 66.82	Yes	****	< 0.0001
88	Paste vs. Solution	58.25	34.98 to 81.52	Yes	****	< 0.0001
89	Paste vs. Cord non-imp	40.50	17.23 to 63.76	Yes	****	< 0.0001
90	Cord impr vs. Solution	14.70	-8.568 to 37.97	No	ns	0.4621
91	Cord impr vs. Cord non-imp	-3.054	-26.32 to 20.21	No	ns	0.9990
92	Solution vs. Cord non-imp	-17.75	-41.02 to 5.514	No	ns	0.2477
93						
94	1:4 / 20min					
95	C1 vs. C2	16.38	-0.07522 to 32.83	No	ns	0.0518
96	C1 vs. Paste	-18.20	-38.35 to 1.951	No	ns	0.1032
97	C1 vs. Cord impr	4.319	-15.83 to 24.47	No	ns	0.9901
98	C1 vs. Solution	8.938	-11.21 to 29.09	No	ns	0.8021
99	C1 vs. Cord non-imp	6.790	-13.36 to 26.94	No	ns	0.9291
100	C2 vs. Paste	-34.58	-54.72 to -14.43	Yes	****	< 0.0001
101	C2 vs. Cord impr	-12.06	-32.21 to 8.092	No	ns	0.5248
102	C2 vs. Solution	-7.439	-27.59 to 12.71	No	ns	0.8984
103	C2 vs. Cord non-imp	-9.586	-29.74 to 10.56	No	ns	0.7505
104	Paste vs. Cord impr	22.52	-0.7493 to 45.78	No	ns	0.0643
105	Paste vs. Solution	27.14	3.869 to 50.40	Yes	*	0.0117
106	Paste vs. Cord non-imp	24.99	1.722 to 48.26	Yes	*	0.0270
107	Cord impr vs. Solution	4.618	-18.65 to 27.89	No	ns	0.9930
108	Cord impr vs. Cord non-imp	2.471	-20.80 to 25.74	No	ns	0.9997
109	Solution vs. Cord non-imp	-2.147	-25.41 to 21.12	No	ns	0.9998

2way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D	E
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
		Y	Y	Y	Y	Y
1	Within each row, compare columns (simple effects within rows)					
2						
3	Number of families	6				
4	Number of comparisons per family	15				
5	Alpha	0.05				
6						
7	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
8						
9	C1					
10	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	0.0	-16.45 to 16.45	No	ns	> 0.9999
11	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	0.0	-16.45 to 16.45	No	ns	> 0.9999
12	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	0.0	-16.45 to 16.45	No	ns	> 0.9999
13	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	0.0	-16.45 to 16.45	No	ns	> 0.9999
14	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	0.0	-16.45 to 16.45	No	ns	> 0.9999
15	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	0.0	-16.45 to 16.45	No	ns	> 0.9999
16	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	0.0	-16.45 to 16.45	No	ns	> 0.9999
17	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	0.0	-16.45 to 16.45	No	ns	> 0.9999
18	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	0.0	-16.45 to 16.45	No	ns	> 0.9999
19	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	0.0	-16.45 to 16.45	No	ns	> 0.9999
20	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	0.0	-16.45 to 16.45	No	ns	> 0.9999
21	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	0.0	-16.45 to 16.45	No	ns	> 0.9999
22	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	0.0	-16.45 to 16.45	No	ns	> 0.9999
23	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	0.0	-16.45 to 16.45	No	ns	> 0.9999
24	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	0.0	-16.45 to 16.45	No	ns	> 0.9999

25						
26	C2					
27	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	0.0	-16.45 to 16.45	No	ns	> 0.9999
28	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	0.0	-16.45 to 16.45	No	ns	> 0.9999
29	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	-3.712	-20.16 to 12.74	No	ns	0.9875
30	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	-3.712	-20.16 to 12.74	No	ns	0.9875
31	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	-3.712	-20.16 to 12.74	No	ns	0.9875
32	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	0.0	-16.45 to 16.45	No	ns	> 0.9999
33	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	-3.712	-20.16 to 12.74	No	ns	0.9875
34	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	-3.712	-20.16 to 12.74	No	ns	0.9875
35	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	-3.712	-20.16 to 12.74	No	ns	0.9875
36	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	-3.712	-20.16 to 12.74	No	ns	0.9875
37	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	-3.712	-20.16 to 12.74	No	ns	0.9875
38	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	-3.712	-20.16 to 12.74	No	ns	0.9875
39	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	0.0	-16.45 to 16.45	No	ns	> 0.9999
40	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	0.0	-16.45 to 16.45	No	ns	> 0.9999
41	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	0.0	-16.45 to 16.45	No	ns	> 0.9999
42						
43	Paste					
44	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	-26.96	-50.23 to -3.697	Yes	*	0.0125
45	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	-10.54	-33.81 to 12.72	No	ns	0.7872
46	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	-1.585	-24.85 to 21.68	No	ns	> 0.9999
47	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	-36.35	-59.62 to -13.09	Yes	***	0.0001
48	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	-24.66	-47.92 to -1.390	Yes	*	0.0305
49	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	16.42	-6.847 to 39.69	No	ns	0.3332
50	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	25.38	2.112 to 48.65	Yes	*	0.0233
51	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	-9.388	-32.65 to 13.88	No	ns	0.8583
52	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	2.307	-20.96 to 25.57	No	ns	0.9998
53	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	8.960	-14.31 to 32.23	No	ns	0.8808
54	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	-25.81	-49.07 to -2.541	Yes	*	0.0198
55	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	-14.11	-37.38 to 9.155	No	ns	0.5094
56	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	-34.77	-58.03 to -11.50	Yes	***	0.0003
57	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	-23.07	-46.34 to 0.1950	No	ns	0.0534
58	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	11.70	-11.57 to 34.96	No	ns	0.7040
59						
60	Cord impr					
61	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	7.233	-16.03 to 30.50	No	ns	0.9491
62	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	9.617	-13.65 to 32.88	No	ns	0.8453
63	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	1.651	-21.62 to 24.92	No	ns	> 0.9999
64	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	2.115	-21.15 to 25.38	No	ns	0.9998
65	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	-7.223	-30.49 to 16.04	No	ns	0.9494
66	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	2.384	-20.88 to 25.65	No	ns	0.9997
67	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	-5.582	-28.85 to 17.68	No	ns	0.9835
68	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	-5.118	-28.38 to 18.15	No	ns	0.9888
69	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	-14.46	-37.72 to 8.811	No	ns	0.4816
70	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	-7.966	-31.23 to 15.30	No	ns	0.9245
71	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	-7.502	-30.77 to 15.76	No	ns	0.9408
72	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	-16.84	-40.11 to 6.427	No	ns	0.3047
73	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	0.4642	-22.80 to 23.73	No	ns	> 0.9999
74	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	-8.874	-32.14 to 14.39	No	ns	0.8850
75	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	-9.338	-32.60 to 13.93	No	ns	0.8610

76						
77	Solution					
78	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	2.942	-20.32 to 26.21	No	ns	0.9992
79	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	12.98	-10.29 to 36.25	No	ns	0.6019
80	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	10.25	-13.01 to 33.52	No	ns	0.8064
81	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	10.41	-12.85 to 33.68	No	ns	0.7959
82	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	-9.006	-32.27 to 14.26	No	ns	0.8785
83	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	10.04	-13.23 to 33.31	No	ns	0.8201
84	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	7.311	-15.96 to 30.58	No	ns	0.9467
85	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	7.471	-15.80 to 30.74	No	ns	0.9418
86	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	-11.95	-35.21 to 11.32	No	ns	0.6845
87	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	-2.727	-25.99 to 20.54	No	ns	0.9994
88	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	-2.567	-25.83 to 20.70	No	ns	0.9996
89	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	-21.99	-45.25 to 1.281	No	ns	0.0764
90	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	0.1599	-23.11 to 23.43	No	ns	> 0.9999
91	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	-19.26	-42.53 to 4.008	No	ns	0.1697
92	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	-19.42	-42.69 to 3.848	No	ns	0.1626
93						
94	Cord non-imp					
95	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	-2.882	-26.15 to 20.38	No	ns	0.9993
96	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	-3.123	-26.39 to 20.14	No	ns	0.9989
97	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	-30.87	-54.13 to -7.599	Yes	**	0.0023
98	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	-22.71	-45.97 to 0.5609	No	ns	0.0604
99	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	-26.52	-49.79 to -3.252	Yes	*	0.0150
100	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	-0.2409	-23.51 to 23.03	No	ns	> 0.9999
101	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	-27.98	-51.25 to -4.717	Yes	**	0.0082
102	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	-19.82	-43.09 to 3.443	No	ns	0.1455
103	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	-23.64	-46.90 to -0.3700	Yes	*	0.0440
104	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	-27.74	-51.01 to -4.476	Yes	**	0.0091
105	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	-19.58	-42.85 to 3.684	No	ns	0.1555
106	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	-23.40	-46.66 to -0.1290	Yes	*	0.0478
107	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	8.160	-15.11 to 31.43	No	ns	0.9169
108	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	4.347	-18.92 to 27.61	No	ns	0.9948
109	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	-3.813	-27.08 to 19.45	No	ns	0.9972

MTT -2way ANOVA

48h

2way ANOVA Tabular results		A	B	C	D	E
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
		Y	Y	Y	Y	Y
1	Table Analyzed	48h				
2						
3	Two-way ANOVA	Ordinary				
4	Alpha	0.05				
5						
6	Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
7	Interaction	10.46	< 0.0001	****	Yes	
8	Row Factor	17.07	< 0.0001	****	Yes	
9	Column Factor	1.026	0.1732	ns	No	
10						
11	ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
12	Interaction	24784	25	991.4	F (25, 539) = 3.155	P < 0.0001
13	Row Factor	40457	5	8091	F (5, 539) = 25.75	P < 0.0001
14	Column Factor	2432	5	486.4	F (5, 539) = 1.548	P = 0.1732
15	Residual	169370	539	314.2		
16						
17	Number of missing values	289				

2way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D	E
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
		Y	Y	Y	Y	Y
1	Within each column, compare rows (simple effects within columns)					
2						
3	Number of families	6				
4	Number of comparisons per family	15				
5	Alpha	0.05				
6						
7	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
8						
9	1:1 / 10min					
10	C1 vs. C2	19.81	5.179 to 34.45	Yes	**	0.0017
11	C1 vs. Paste	2.702	-15.22 to 20.63	No	ns	0.9981
12	C1 vs. Cord impr	6.031	-11.89 to 23.96	No	ns	0.9296
13	C1 vs. Solution	21.00	3.076 to 38.92	Yes	*	0.0111
14	C1 vs. Cord non-imp	14.19	-3.732 to 32.12	No	ns	0.2105
15	C2 vs. Paste	-17.11	-35.04 to 0.8121	No	ns	0.0710
16	C2 vs. Cord impr	-13.78	-31.71 to 4.141	No	ns	0.2397
17	C2 vs. Solution	1.185	-16.74 to 19.11	No	ns	> 0.9999
18	C2 vs. Cord non-imp	-5.622	-23.55 to 12.30	No	ns	0.9472
19	Paste vs. Cord impr	3.329	-17.37 to 24.03	No	ns	0.9974
20	Paste vs. Solution	18.30	-2.400 to 38.99	No	ns	0.1177
21	Paste vs. Cord non-imp	11.49	-9.207 to 32.19	No	ns	0.6070
22	Cord impr vs. Solution	14.97	-5.729 to 35.67	No	ns	0.3055
23	Cord impr vs. Cord non-imp	8.162	-12.54 to 28.86	No	ns	0.8697
24	Solution vs. Cord non-imp	-6.807	-27.50 to 13.89	No	ns	0.9358

25						
26	1:2 / 10min					
27	C1 vs. C2	19.81	5.179 to 34.45	Yes	**	0.0017
28	C1 vs. Paste	-21.49	-39.42 to -3.570	Yes	**	0.0085
29	C1 vs. Cord impr	13.05	-4.872 to 30.98	No	ns	0.2979
30	C1 vs. Solution	27.68	9.751 to 45.60	Yes	***	0.0002
31	C1 vs. Cord non-imp	26.43	8.509 to 44.36	Yes	***	0.0004
32	C2 vs. Paste	-41.31	-59.23 to -23.38	Yes	****	< 0.0001
33	C2 vs. Cord impr	-6.762	-24.69 to 11.16	No	ns	0.8897
34	C2 vs. Solution	7.861	-10.06 to 25.79	No	ns	0.8096
35	C2 vs. Cord non-imp	6.618	-11.31 to 24.54	No	ns	0.8984
36	Paste vs. Cord impr	34.55	13.85 to 55.24	Yes	****	< 0.0001
37	Paste vs. Solution	49.17	28.47 to 69.87	Yes	****	< 0.0001
38	Paste vs. Cord non-imp	47.93	27.23 to 68.62	Yes	****	< 0.0001
39	Cord impr vs. Solution	14.62	-6.074 to 35.32	No	ns	0.3319
40	Cord impr vs. Cord non-imp	13.38	-7.317 to 34.08	No	ns	0.4352
41	Solution vs. Cord non-imp	-1.243	-21.94 to 19.45	No	ns	> 0.9999
42						
43	1:4 / 10min					
44	C1 vs. C2	19.81	5.179 to 34.45	Yes	**	0.0017
45	C1 vs. Paste	-15.34	-33.26 to 2.584	No	ns	0.1420
46	C1 vs. Cord impr	17.32	-0.6091 to 35.24	No	ns	0.0652
47	C1 vs. Solution	21.35	3.430 to 39.28	Yes	**	0.0092
48	C1 vs. Cord non-imp	-0.1346	-18.06 to 17.79	No	ns	> 0.9999
49	C2 vs. Paste	-35.15	-53.08 to -17.23	Yes	****	< 0.0001
50	C2 vs. Cord impr	-2.499	-20.42 to 15.43	No	ns	0.9987

51	C2 vs. Solution	1.540	-16.38 to 19.46	No	ns	0.9999
52	C2 vs. Cord non-imp	-19.95	-37.87 to -2.025	Yes	*	0.0191
53	Paste vs. Cord impr	32.66	11.96 to 53.35	Yes	****	0.0001
54	Paste vs. Solution	36.69	16.00 to 57.39	Yes	****	< 0.0001
55	Paste vs. Cord non-imp	15.21	-5.492 to 35.90	No	ns	0.2882
56	Cord impr vs. Solution	4.039	-16.66 to 24.74	No	ns	0.9936
57	Cord impr vs. Cord non-imp	-17.45	-38.15 to 3.247	No	ns	0.1541
58	Solution vs. Cord non-imp	-21.49	-42.19 to -0.7917	Yes	*	0.0366
59						
60	1:1 / 20min					
61	C1 vs. C2	17.41	2.777 to 32.05	Yes	**	0.0093
62	C1 vs. Paste	14.85	-3.610 to 33.31	No	ns	0.1955
63	C1 vs. Cord impr	20.60	2.679 to 38.53	Yes	*	0.0137
64	C1 vs. Solution	17.38	-0.5399 to 35.31	No	ns	0.0633
65	C1 vs. Cord non-imp	6.753	-11.17 to 24.68	No	ns	0.8902
66	C2 vs. Paste	-2.563	-21.02 to 15.90	No	ns	0.9987
67	C2 vs. Cord impr	3.191	-14.73 to 21.12	No	ns	0.9958
68	C2 vs. Solution	-0.02785	-17.95 to 17.90	No	ns	> 0.9999
69	C2 vs. Cord non-imp	-10.66	-28.58 to 7.265	No	ns	0.5319
70	Paste vs. Cord impr	5.755	-15.41 to 26.92	No	ns	0.9712
71	Paste vs. Solution	2.535	-18.63 to 23.70	No	ns	0.9994
72	Paste vs. Cord non-imp	-8.096	-29.26 to 13.07	No	ns	0.8837
73	Cord impr vs. Solution	-3.219	-23.92 to 17.48	No	ns	0.9978
74	Cord impr vs. Cord non-imp	-13.85	-34.55 to 6.847	No	ns	0.3947
75	Solution vs. Cord non-imp	-10.63	-31.33 to 10.07	No	ns	0.6842
76						
77	1:2 / 20min					
78	C1 vs. C2	17.41	2.777 to 32.05	Yes	**	0.0093
79	C1 vs. Paste	-3.677	-21.60 to 14.25	No	ns	0.9919
80	C1 vs. Cord impr	21.89	3.969 to 39.82	Yes	**	0.0068
81	C1 vs. Solution	5.271	-12.65 to 23.20	No	ns	0.9597
82	C1 vs. Cord non-imp	12.71	-5.214 to 30.63	No	ns	0.3277
83	C2 vs. Paste	-21.09	-39.01 to -3.165	Yes	*	0.0106
84	C2 vs. Cord impr	4.481	-13.44 to 22.41	No	ns	0.9801
85	C2 vs. Solution	-12.14	-30.07 to 5.783	No	ns	0.3805
86	C2 vs. Cord non-imp	-4.702	-22.63 to 13.22	No	ns	0.9754
87	Paste vs. Cord impr	25.57	4.873 to 46.27	Yes	**	0.0059
88	Paste vs. Solution	8.948	-11.75 to 29.65	No	ns	0.8188
89	Paste vs. Cord non-imp	16.39	-4.310 to 37.08	No	ns	0.2106
90	Cord impr vs. Solution	-16.62	-37.32 to 4.075	No	ns	0.1970
91	Cord impr vs. Cord non-imp	-9.182	-29.88 to 11.51	No	ns	0.8019
92	Solution vs. Cord non-imp	7.440	-13.26 to 28.14	No	ns	0.9084
93						
94	1:4 / 20min					
95	C1 vs. C2	17.41	2.777 to 32.05	Yes	**	0.0093
96	C1 vs. Paste	-7.379	-25.30 to 10.55	No	ns	0.8476
97	C1 vs. Cord impr	14.80	-3.124 to 32.72	No	ns	0.1719
98	C1 vs. Solution	2.383	-15.54 to 20.31	No	ns	0.9990
99	C1 vs. Cord non-imp	12.70	-5.223 to 30.63	No	ns	0.3285
100	C2 vs. Paste	-24.79	-42.72 to -6.867	Yes	**	0.0012
101	C2 vs. Cord impr	-2.612	-20.54 to 15.31	No	ns	0.9984
102	C2 vs. Solution	-15.03	-32.95 to 2.895	No	ns	0.1587
103	C2 vs. Cord non-imp	-4.711	-22.64 to 13.21	No	ns	0.9752
104	Paste vs. Cord impr	22.18	1.482 to 42.88	Yes	*	0.0276
105	Paste vs. Solution	9.762	-10.93 to 30.46	No	ns	0.7573
106	Paste vs. Cord non-imp	20.08	-0.6169 to 40.78	No	ns	0.0631
107	Cord impr vs. Solution	-12.42	-33.11 to 8.280	No	ns	0.5219
108	Cord impr vs. Cord non-imp	-2.099	-22.80 to 18.60	No	ns	0.9997
109	Solution vs. Cord non-imp	10.32	-10.38 to 31.02	No	ns	0.7113

2way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D	E
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
		Y	Y	Y	Y	Y
1	Within each row, compare columns (simple effects within rows)					
2						
3	Number of families	6				
4	Number of comparisons per family	15				
5	Alpha	0.05				
6						
7	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
8						
9	C1					
10	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	0.0	-14.64 to 14.64	No	ns	> 0.9999
11	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	0.0	-14.64 to 14.64	No	ns	> 0.9999
12	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	0.0	-14.64 to 14.64	No	ns	> 0.9999
13	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	0.0	-14.64 to 14.64	No	ns	> 0.9999
14	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	0.0	-14.64 to 14.64	No	ns	> 0.9999
15	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	0.0	-14.64 to 14.64	No	ns	> 0.9999
16	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	0.0	-14.64 to 14.64	No	ns	> 0.9999
17	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	0.0	-14.64 to 14.64	No	ns	> 0.9999
18	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	0.0	-14.64 to 14.64	No	ns	> 0.9999
19	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	0.0	-14.64 to 14.64	No	ns	> 0.9999
20	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	0.0	-14.64 to 14.64	No	ns	> 0.9999
21	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	0.0	-14.64 to 14.64	No	ns	> 0.9999
22	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	0.0	-14.64 to 14.64	No	ns	> 0.9999
23	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	0.0	-14.64 to 14.64	No	ns	> 0.9999
24	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	0.0	-14.64 to 14.64	No	ns	> 0.9999
25						
26	C2					
27	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	0.0	-14.64 to 14.64	No	ns	> 0.9999
28	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	0.0	-14.64 to 14.64	No	ns	> 0.9999
29	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	-2.402	-17.04 to 12.23	No	ns	0.9972
30	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	-2.402	-17.04 to 12.23	No	ns	0.9972
31	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	-2.402	-17.04 to 12.23	No	ns	0.9972
32	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	0.0	-14.64 to 14.64	No	ns	> 0.9999
33	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	-2.402	-17.04 to 12.23	No	ns	0.9972
34	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	-2.402	-17.04 to 12.23	No	ns	0.9972
35	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	-2.402	-17.04 to 12.23	No	ns	0.9972
36	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	-2.402	-17.04 to 12.23	No	ns	0.9972
37	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	-2.402	-17.04 to 12.23	No	ns	0.9972
38	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	-2.402	-17.04 to 12.23	No	ns	0.9972
39	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	0.0	-14.64 to 14.64	No	ns	> 0.9999
40	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	0.0	-14.64 to 14.64	No	ns	> 0.9999
41	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	0.0	-14.64 to 14.64	No	ns	> 0.9999
42						
43	Paste					
44	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	-24.20	-44.89 to -3.499	Yes	*	0.0114
45	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	-18.04	-38.74 to 2.655	No	ns	0.1279
46	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	12.15	-9.016 to 33.31	No	ns	0.5713
47	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	-6.379	-27.08 to 14.32	No	ns	0.9509
48	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	-10.08	-30.78 to 10.62	No	ns	0.7313
49	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	6.154	-14.54 to 26.85	No	ns	0.9578
50	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	36.34	15.18 to 57.51	Yes	****	< 0.0001
51	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	17.82	-2.880 to 38.51	No	ns	0.1374

52	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	14.12	-6.582 to 34.81	No	ns	0.3726
53	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	30.19	9.027 to 51.35	Yes	***	0.0007
54	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	11.66	-9.034 to 32.36	No	ns	0.5911
55	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	7.961	-12.74 to 28.66	No	ns	0.8813
56	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	-18.53	-39.69 to 2.637	No	ns	0.1248
57	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	-22.23	-43.39 to -1.066	Yes	*	0.0331
58	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	-3.702	-24.40 to 17.00	No	ns	0.9957
59						
60	Cord impr					
61	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	7.021	-13.68 to 27.72	No	ns	0.9272
62	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	11.28	-9.413 to 31.98	No	ns	0.6258
63	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	14.57	-6.125 to 35.27	No	ns	0.3358
64	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	15.86	-4.836 to 36.56	No	ns	0.2432
65	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	8.769	-11.93 to 29.47	No	ns	0.8311
66	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	4.263	-16.43 to 24.96	No	ns	0.9917
67	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	7.551	-13.15 to 28.25	No	ns	0.9030
68	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	8.840	-11.86 to 29.54	No	ns	0.8263
69	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	1.748	-18.95 to 22.45	No	ns	0.9999
70	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	3.289	-17.41 to 23.99	No	ns	0.9976
71	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	4.578	-16.12 to 25.28	No	ns	0.9886
72	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	-2.515	-23.21 to 18.18	No	ns	0.9993
73	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	1.289	-19.41 to 21.99	No	ns	> 0.9999
74	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	-5.804	-26.50 to 14.89	No	ns	0.9671
75	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	-7.093	-27.79 to 13.60	No	ns	0.9242
76						
77	Solution					
78	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	6.676	-14.02 to 27.37	No	ns	0.9407
79	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	0.3545	-20.34 to 21.05	No	ns	> 0.9999
80	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	-3.615	-24.31 to 17.08	No	ns	0.9962
81	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	-15.73	-36.43 to 4.968	No	ns	0.2519
82	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	-18.62	-39.31 to 2.081	No	ns	0.1059
83	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	-6.321	-27.02 to 14.38	No	ns	0.9527
84	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	-10.29	-30.99 to 10.41	No	ns	0.7136
85	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	-22.40	-43.10 to -1.708	Yes	*	0.0251
86	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	-25.29	-45.99 to -4.595	Yes	**	0.0068
87	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	-3.970	-24.67 to 16.73	No	ns	0.9941
88	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	-16.08	-36.78 to 4.614	No	ns	0.2291
89	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	-18.97	-39.67 to 1.726	No	ns	0.0938
90	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	-12.11	-32.81 to 8.584	No	ns	0.5497
91	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	-15.00	-35.70 to 5.696	No	ns	0.3031
92	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	-2.888	-23.58 to 17.81	No	ns	0.9987
93						
94	Cord non-imp					
95	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	12.24	-8.457 to 32.94	No	ns	0.5381
96	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	-14.33	-35.02 to 6.370	No	ns	0.3553
97	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	-7.439	-28.14 to 13.26	No	ns	0.9085
98	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	-1.482	-22.18 to 19.21	No	ns	> 0.9999
99	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	-1.492	-22.19 to 19.21	No	ns	> 0.9999
100	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	-26.57	-47.26 to -5.870	Yes	**	0.0036
101	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	-19.68	-40.38 to 1.018	No	ns	0.0731
102	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	-13.72	-34.42 to 6.975	No	ns	0.4056
103	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	-13.73	-34.43 to 6.966	No	ns	0.4048
104	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	6.888	-13.81 to 27.59	No	ns	0.9326
105	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	12.85	-7.852 to 33.54	No	ns	0.4829
106	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	12.84	-7.861 to 33.53	No	ns	0.4837
107	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	5.957	-14.74 to 26.65	No	ns	0.9632
108	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	5.948	-14.75 to 26.65	No	ns	0.9635
109	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	-0.009171	-20.71 to 20.69	No	ns	> 0.9999

MTT -2way ANOVA

72h

2way ANOVA Tabular results		A	B	C	D	E
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
		Y	Y	Y	Y	Y
1	Table Analyzed	72h				
2						
3	Two-way ANOVA	Ordinary				
4	Alpha	0.05				
5						
6	Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
7	Interaction	14.68	< 0.0001	****	Yes	
8	Row Factor	29.01	< 0.0001	****	Yes	
9	Column Factor	0.5463	0.3828	ns	No	
10						
11	ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
12	Interaction	30675	25	1227	F (25, 540) = 5.685	P < 0.0001
13	Row Factor	60629	5	12126	F (5, 540) = 56.18	P < 0.0001
14	Column Factor	1142	5	228.4	F (5, 540) = 1.058	P = 0.3828
15	Residual	116549	540	215.8		
16						
17	Number of missing values	288				

2way ANOVA Multiple comparisons		B	C	D	E
		Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
		Y	Y	Y	Y
1	Within each column, compare rows (simple effects within columns)				
2					
3	Number of families				
4	Number of comparisons per family				
5	Alpha				
6					
7	Tukey's multiple comparisons test	% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
8					
9	1:1 / 10min				
10	C1 vs. C2	0.82 to 13.44	No	ns	0.9996
11	C1 vs. Paste	8.95 to 10.76	No	ns	0.9696
12	C1 vs. Cord impr	6.07 to 13.64	No	ns	> 0.9999
13	C1 vs. Solution	6.76 to 12.95	No	ns	0.9991
14	C1 vs. Cord non-imp	6.26 to 13.45	No	ns	0.9998
15	C2 vs. Paste	0.25 to 9.456	No	ns	0.9044
16	C2 vs. Cord impr	7.38 to 12.33	No	ns	0.9966
17	C2 vs. Solution	8.07 to 11.64	No	ns	0.9897
18	C2 vs. Cord non-imp	7.57 to 12.14	No	ns	0.9953
19	Paste vs. Cord impr	4.28 to 20.03	No	ns	0.9969
20	Paste vs. Solution	4.97 to 19.34	No	ns	0.9992
21	Paste vs. Cord non-imp	4.46 to 19.84	No	ns	0.9977
22	Cord impr vs. Solution	7.84 to 16.47	No	ns	> 0.9999
23	Cord impr vs. Cord non-imp	7.34 to 16.97	No	ns	> 0.9999
24	Solution vs. Cord non-imp	6.65 to 17.66	No	ns	> 0.9999
25					
26	1:2 / 10min				
27	C1 vs. C2	0.82 to 13.44	No	ns	0.9996
28	C1 vs. Paste	1.62 to -11.91	Yes	****	< 0.0001
29	C1 vs. Cord impr	7.29 to 19.98	No	ns	0.9220
30	C1 vs. Solution	3.95 to 20.32	No	ns	0.9002
31	C1 vs. Cord non-imp	2.71 to 20.44	No	ns	0.8912
32	C2 vs. Paste	2.92 to -13.21	Yes	****	< 0.0001
33	C2 vs. Cord impr	1.04 to 18.67	No	ns	0.9775
34	C2 vs. Solution	0.70 to 19.01	No	ns	0.9675
35	C2 vs. Cord non-imp	0.58 to 19.13	No	ns	0.9632
36	Paste vs. Cord impr	4.74 to 49.04	Yes	****	< 0.0001
37	Paste vs. Solution	5.07 to 49.38	Yes	****	< 0.0001
38	Paste vs. Cord non-imp	5.19 to 49.50	Yes	****	< 0.0001
39	Cord impr vs. Solution	6.82 to 17.49	No	ns	> 0.9999
40	Cord impr vs. Cord non-imp	6.70 to 17.61	No	ns	> 0.9999
41	Solution vs. Cord non-imp	7.03 to 17.28	No	ns	> 0.9999
42					
43	1:4 / 10min				
44	C1 vs. C2	0.82 to 13.44	No	ns	0.9996
45	C1 vs. Paste	5.09 to -5.383	Yes	**	0.0015
46	C1 vs. Cord impr	4.51 to 20.26	No	ns	0.9041
47	C1 vs. Solution	8.99 to 10.72	No	ns	0.9682
48	C1 vs. Cord non-imp	4.36 to 23.27	No	ns	0.5850
49	C2 vs. Paste	6.40 to -6.690	Yes	***	0.0006
50	C2 vs. Cord impr	0.76 to 18.95	No	ns	0.9694
51	C2 vs. Solution	0.30 to 9.414	No	ns	0.9015

52	C2 vs. Cord non-imp	.743 to 21.97	No	ns	0.7455
53	Paste vs. Cord impr	489 to 42.80	Yes	***	0.0003
54	Paste vs. Solution	.048 to 33.26	No	ns	0.0799
55	Paste vs. Cord non-imp	1.50 to 45.81	Yes	****	< 0.0001
56	Cord impr vs. Solution	6.69 to 7.616	No	ns	0.6054
57	Cord impr vs. Cord non-imp	4.14 to 20.17	No	ns	0.9961
58	Solution vs. Cord non-imp	.601 to 29.71	No	ns	0.2925
59					
60	1:1 / 20min				
61	C1 vs. C2	1.65 to 12.61	No	ns	> 0.9999
62	C1 vs. Paste	3.93 to 5.784	No	ns	0.5016
63	C1 vs. Cord impr	7.77 to 1.944	No	ns	0.1301
64	C1 vs. Solution	.987 to 25.72	No	ns	0.2928
65	C1 vs. Cord non-imp	006100 to 29.72	Yes	*	0.0498
66	C2 vs. Paste	4.40 to 5.306	No	ns	0.4419
67	C2 vs. Cord impr	8.24 to 1.466	No	ns	0.1045
68	C2 vs. Solution	.465 to 25.24	No	ns	0.3434
69	C2 vs. Cord non-imp	4719 to 29.24	No	ns	0.0641
70	Paste vs. Cord impr	0.99 to 13.31	No	ns	0.9879
71	Paste vs. Solution	786 to 37.09	Yes	*	0.0121
72	Paste vs. Cord non-imp	779 to 41.09	Yes	**	0.0011
73	Cord impr vs. Solution	626 to 40.93	Yes	**	0.0012
74	Cord impr vs. Cord non-imp	0.62 to 44.93	Yes	****	< 0.0001
75	Solution vs. Cord non-imp	3.16 to 21.15	No	ns	0.9856
76					
77	1:2 / 20min				
78	C1 vs. C2	1.65 to 12.61	No	ns	> 0.9999
79	C1 vs. Paste	7.97 to -28.26	Yes	****	< 0.0001
80	C1 vs. Cord impr	8.64 to 11.07	No	ns	0.9785
81	C1 vs. Solution	271 to 31.98	Yes	*	0.0132
82	C1 vs. Cord non-imp	.798 to 24.91	No	ns	0.3811
83	C2 vs. Paste	8.45 to -28.74	Yes	****	< 0.0001
84	C2 vs. Cord impr	9.11 to 10.60	No	ns	0.9638
85	C2 vs. Solution	793 to 31.50	Yes	*	0.0178
86	C2 vs. Cord non-imp	.276 to 24.43	No	ns	0.4382
87	Paste vs. Cord impr	2.18 to 56.49	Yes	****	< 0.0001
88	Paste vs. Solution	3.09 to 77.39	Yes	****	< 0.0001
89	Paste vs. Cord non-imp	3.02 to 70.33	Yes	****	< 0.0001
90	Cord impr vs. Solution	754 to 38.06	Yes	**	0.0070
91	Cord impr vs. Cord non-imp	.316 to 30.99	No	ns	0.1929
92	Solution vs. Cord non-imp	4.22 to 10.08	No	ns	0.8470
93					
94	1:4 / 20min				
95	C1 vs. C2	1.65 to 12.61	No	ns	> 0.9999
96	C1 vs. Paste	2.85 to -23.14	Yes	****	< 0.0001
97	C1 vs. Cord impr	.625 to 21.09	No	ns	0.8371
98	C1 vs. Solution	781 to 31.49	Yes	*	0.0180
99	C1 vs. Cord non-imp	982 to 36.69	Yes	***	0.0004
100	C2 vs. Paste	3.33 to -23.62	Yes	****	< 0.0001
101	C2 vs. Cord impr	.103 to 20.61	No	ns	0.8783
102	C2 vs. Solution	303 to 31.01	Yes	*	0.0240
103	C2 vs. Cord non-imp	504 to 36.21	Yes	***	0.0006
104	Paste vs. Cord impr	7.07 to 61.38	Yes	****	< 0.0001
105	Paste vs. Solution	7.48 to 71.78	Yes	****	< 0.0001
106	Paste vs. Cord non-imp	2.68 to 76.98	Yes	****	< 0.0001
107	Cord impr vs. Solution	.747 to 27.56	No	ns	0.5091
108	Cord impr vs. Cord non-imp	.546 to 32.76	No	ns	0.0984
109	Solution vs. Cord non-imp	1.95 to 22.35	No	ns	0.9541

2way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D	E
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
		Y	Y	Y	Y	Y
1	Within each row, compare columns (simple effects within rows)					
2						
3	Number of families	6				
4	Number of comparisons per family	15				
5	Alpha	0.05				
6						
7	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
8						
9	C1					
10	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	0.0	-12.13 to 12.13	No	ns	> 0.9999
11	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	0.0	-12.13 to 12.13	No	ns	> 0.9999
12	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	0.0	-12.13 to 12.13	No	ns	> 0.9999
13	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	0.0	-12.13 to 12.13	No	ns	> 0.9999
14	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	0.0	-12.13 to 12.13	No	ns	> 0.9999
15	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	0.0	-12.13 to 12.13	No	ns	> 0.9999
16	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	0.0	-12.13 to 12.13	No	ns	> 0.9999
17	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	0.0	-12.13 to 12.13	No	ns	> 0.9999
18	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	0.0	-12.13 to 12.13	No	ns	> 0.9999
19	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	0.0	-12.13 to 12.13	No	ns	> 0.9999
20	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	0.0	-12.13 to 12.13	No	ns	> 0.9999
21	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	0.0	-12.13 to 12.13	No	ns	> 0.9999
22	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	0.0	-12.13 to 12.13	No	ns	> 0.9999
23	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	0.0	-12.13 to 12.13	No	ns	> 0.9999
24	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	0.0	-12.13 to 12.13	No	ns	> 0.9999
25						
26	C2					
27	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	0.0	-12.13 to 12.13	No	ns	> 0.9999
28	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	0.0	-12.13 to 12.13	No	ns	> 0.9999
29	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	-0.8294	-12.96 to 11.30	No	ns	> 0.9999
30	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	-0.8294	-12.96 to 11.30	No	ns	> 0.9999
31	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	-0.8294	-12.96 to 11.30	No	ns	> 0.9999
32	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	0.0	-12.13 to 12.13	No	ns	> 0.9999
33	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	-0.8294	-12.96 to 11.30	No	ns	> 0.9999
34	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	-0.8294	-12.96 to 11.30	No	ns	> 0.9999
35	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	-0.8294	-12.96 to 11.30	No	ns	> 0.9999
36	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	-0.8294	-12.96 to 11.30	No	ns	> 0.9999
37	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	-0.8294	-12.96 to 11.30	No	ns	> 0.9999
38	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	-0.8294	-12.96 to 11.30	No	ns	> 0.9999
39	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	0.0	-12.13 to 12.13	No	ns	> 0.9999
40	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	0.0	-12.13 to 12.13	No	ns	> 0.9999
41	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	0.0	-12.13 to 12.13	No	ns	> 0.9999
42						
43	Paste					
44	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	-22.67	-39.82 to -5.517	Yes	**	0.0024
45	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	-16.15	-33.30 to 1.007	No	ns	0.0784
46	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	-4.980	-22.13 to 12.17	No	ns	0.9618
47	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	-39.02	-56.18 to -21.87	Yes	****	< 0.0001
48	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	-33.90	-51.05 to -16.75	Yes	****	< 0.0001
49	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	6.524	-10.63 to 23.68	No	ns	0.8862
50	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	17.69	0.5378 to 34.84	Yes	*	0.0388
51	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	-16.35	-33.51 to 0.8000	No	ns	0.0717

52	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	-11.23	-28.38 to 5.923	No	ns	0.4204
53	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	11.17	-5.986 to 28.32	No	ns	0.4270
54	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	-22.88	-40.03 to -5.724	Yes	**	0.0021
55	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	-17.75	-34.91 to -0.6010	Yes	*	0.0376
56	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	-34.04	-51.20 to -16.89	Yes	****	< 0.0001
57	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	-28.92	-46.07 to -11.77	Yes	****	< 0.0001
58	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	5.123	-12.03 to 22.28	No	ns	0.9570
59						
60	Cord impr					
61	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	6.345	-10.81 to 23.50	No	ns	0.8977
62	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	6.622	-10.53 to 23.78	No	ns	0.8796
63	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	-11.69	-28.85 to 5.460	No	ns	0.3731
64	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	-2.562	-19.72 to 14.59	No	ns	0.9982
65	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	7.448	-9.705 to 24.60	No	ns	0.8160
66	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	0.2776	-16.88 to 17.43	No	ns	> 0.9999
67	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	-18.04	-35.19 to -0.8844	Yes	*	0.0327
68	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	-8.907	-26.06 to 8.246	No	ns	0.6740
69	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	1.104	-16.05 to 18.26	No	ns	> 0.9999
70	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	-18.32	-35.47 to -1.162	Yes	*	0.0285
71	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	-9.185	-26.34 to 7.969	No	ns	0.6441
72	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	0.8260	-16.33 to 17.98	No	ns	> 0.9999
73	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	9.131	-8.023 to 26.28	No	ns	0.6500
74	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	19.14	1.988 to 36.29	Yes	*	0.0186
75	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	10.01	-7.142 to 27.16	No	ns	0.5529
76						
77	Solution					
78	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	7.366	-9.787 to 24.52	No	ns	0.8230
79	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	-2.227	-19.38 to 14.93	No	ns	0.9991
80	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	12.77	-4.379 to 29.93	No	ns	0.2734
81	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	19.03	1.879 to 36.19	Yes	*	0.0197
82	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	18.54	1.389 to 35.70	Yes	*	0.0254
83	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	-9.593	-26.75 to 7.560	No	ns	0.5992
84	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	5.408	-11.75 to 22.56	No	ns	0.9460
85	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	11.67	-5.487 to 28.82	No	ns	0.3758
86	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	11.18	-5.977 to 28.33	No	ns	0.4260
87	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	15.00	-2.152 to 32.15	No	ns	0.1255
88	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	21.26	4.106 to 38.41	Yes	**	0.0057
89	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	20.77	3.616 to 37.92	Yes	**	0.0076
90	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	6.258	-10.89 to 23.41	No	ns	0.9030
91	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	5.768	-11.38 to 22.92	No	ns	0.9297
92	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	-0.4901	-17.64 to 16.66	No	ns	> 0.9999
93						
94	Cord non-imp					
95	1:1 / 10min vs. 1:2 / 10min	6.987	-10.17 to 24.14	No	ns	0.8533
96	1:1 / 10min vs. 1:4 / 10min	9.822	-7.331 to 26.98	No	ns	0.5738
97	1:1 / 10min vs. 1:1 / 20min	16.26	-0.8886 to 33.42	No	ns	0.0745
98	1:1 / 10min vs. 1:2 / 20min	11.46	-5.693 to 28.61	No	ns	0.3966
99	1:1 / 10min vs. 1:4 / 20min	23.24	6.087 to 40.39	Yes	**	0.0017
100	1:2 / 10min vs. 1:4 / 10min	2.835	-14.32 to 19.99	No	ns	0.9971
101	1:2 / 10min vs. 1:1 / 20min	9.277	-7.876 to 26.43	No	ns	0.6340
102	1:2 / 10min vs. 1:2 / 20min	4.473	-12.68 to 21.63	No	ns	0.9760
103	1:2 / 10min vs. 1:4 / 20min	16.25	-0.9001 to 33.41	No	ns	0.0749
104	1:4 / 10min vs. 1:1 / 20min	6.442	-10.71 to 23.60	No	ns	0.8916
105	1:4 / 10min vs. 1:2 / 20min	1.638	-15.52 to 18.79	No	ns	0.9998
106	1:4 / 10min vs. 1:4 / 20min	13.42	-3.735 to 30.57	No	ns	0.2225
107	1:1 / 20min vs. 1:2 / 20min	-4.804	-21.96 to 12.35	No	ns	0.9673
108	1:1 / 20min vs. 1:4 / 20min	6.976	-10.18 to 24.13	No	ns	0.8542
109	1:2 / 20min vs. 1:4 / 20min	11.78	-5.373 to 28.93	No	ns	0.3645

Πρωτόκολλο Επιτροπής Δεοντολογίας



ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ Α.Π.Θ.
ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΔΕΟΝΤΟΛΟΓΙΑΣ

έντυπο ΕΔΕΑ

Ημερομηνία 21/05/2018

Τίτλος Ερευνητικής Μελέτης: Μελέτη της κυτταροτοξικότητας χημικών μέσων απόθησης ούλων σε ανθρώπινους ουλικούς ινοβλάστες.

Συμμετέχοντες στην μελέτη: Στεργίδου Αγγελική, Κοϊδής Πέτρος,
Θεοχαρίδου Άννα, Μπακοπούλου Αθηνά

Αρ.πρωτ./ημερομηνία αίτησης:..

36/07-05-2018.....

Η Επιτροπή Δεοντολογίας του Τμήματος Οδοντιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης βεβαιώνει ότι όλες οι διαδικασίες που περιγράφονται στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές του κανονισμού Δεοντολογίας της Επιτροπής Ερευνών του Α.Π.Θ., σχετικά με τις προβλεπόμενες τυποποιημένες πρακτικές για Βιολογικές Έρευνες σε ανθρώπους / πειραματόζωα / με χρήση μικροοργανισμών/με χρήση ραδιενεργών ουσιών /με χρήση τοξικών ουσιών/ με χρήση ανθρώπινου υλικού (κυττάρων ή ιστών).

Για την Επιτροπή Δεοντολογίας
Η Συντογίστρια

Καθηγήτρια Βασιλική Αναστασιάδου
Τμήμα Οδοντιατρικής
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
54124 Θεσσαλονίκη, Ελλάδα
Τηλ. 2310999551
e-mail: vanasta@dent.auth.gr