

측두하악장애 환자의 교합음 지속시간에 관한 분석

경북대학교 치과대학 구강진단·구강내과학교실

권영미·최재갑

— 목 차 —

- I. 서 론
 - II. 대상 및 방법
 - III. 성 적
 - IV. 고 찰
 - V. 요 약
- 참고문헌
영문초록

I. 서 론

측두하악장애는 저작근 및 악관절 부위의 동통, 관절음, 개구장애, 하악운동의 부조화 등을 주 증상으로 하는 악구강계의 기능적 질환이다. 이 질환은 그 원인이 매우 복잡적이며 증상이 매우 다양하게 나타나기 때문에 정확한 진단이 어려울 뿐만 아니라 치료의 기준도 일정하게 정하기가 곤란한 질환중의 하나이다.

이러한 측두하악장애의 평가는 증상의 다양성 및 객관적 기준설정의 어려움 때문에 단지 환자의 주관적 진술에만 의존하는 경우가 많았다. 이러한 주관적 진단법의 결점을 보완하기 위하여 Pantograph의 이용, 근전도의 측정, 하악운동의 기록 등과 같은 방법들이 연구되어져 왔다¹⁾.

한편 Stewart가 청진기를 이용하여 교합음을 청진함으로써 외상성교합의 진단을 시도한 이래²⁾ Schwartz, Silverman등은 교합음 청진의 유용성에 관해서 언급하였으며 Watt는 교합음의 측정으로 하악의 기능적 위치를 평가할 수 있다고 주장하였다.^{3,4,6,9)}

교합음은 근본적으로 상하악 치아간의 접촉이나 활주에 의해서 발생되며 이러한 교합음의

지속시간은 상하악 치아간의 교합관계 및 하악골의 운동상태에 따라서 달라질 수 있다⁸⁾는 점을 고려하면 교합음 지속시간의 측정은 측두하악장애 환자의 평가에 있어서 상당히 객관적인 자료로 이용될 수 있을 것으로 사료되어진다.

그러나 교합음에 관한 연구로서 정상인과 측두하악장애 환자를 비교 평가한 연구가 부족한 관계로 측두하악장애 환자의 평가를 위한 교합음의 측정이 널리 이용되지 못하고 있는 실정이다.

이에 저자는 측두하악장애 환자에 있어서 교합음 지속시간을 측정하고 또한 교합음 지속시간에 영향을 줄 수 있을 것으로 사료되는 몇가지 요인들과의 상관관계를 분석함으로써 교합음 측정의 임상적 이용에 관한 다소의 지견을 얻었기에 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 대상 및 방법

1. 대상

실험군 : 측두하악장애의 제증상 즉 저작근 및 악관절 부위의 동통, 관절음, 개구장애, 하악운동의 부조화 중 한가지 이상을 주소로 하여 1989년 7월부터 1989년 10월 사이에 경북대학교 병원치과(구강진단과)에 내원한 측두하악장애 환자 30명(평균연령 24.5세)을 실험군으로 선정하였다(Table 1).

대조군 : 경북대학교 치과대학에 재학중인 남녀학생 중에서 정상 교합을 가지고 있으며 측두하악장애의 제증상 및 이에 대한 병력이 없는 남녀학생 30명(평균연령 23.4세)을 대조군으로 선정하였다.

Table 1. Distribution of TMD patients according to age

	Male	Female	Total
Under 20	4	7	11
20 - 29	3	11	13
30 - 39	0	4	4
40 - 49	0	1	1
50 - 59	0	1	1
Total	7	23	30

2. 방법

1) 교합음 지속시간의 측정

교합음의 지속시간을 측정하기 위해 일본 J. Morita사의 Super Checker(Fig.1)를 사용하였으며 먼저 피검자의 F-H plane이 수평면과 평행되도록 두부의 위치를 조절한 후 Super-Checker의 Sensor를 좌우 안하협골에 밀착시켜 정착하고(Fig.2) 중심교합위에서 tapping시켜 교합음의 파형을 채득하고 교합음의 지속시간은 Oscilloscope에 나타난 교합음의 파형에서(Fig.3) 최대 peak치의 1/20로 감소하는 점까지를 그 지속시간으로 측정하였다(Fig.4).

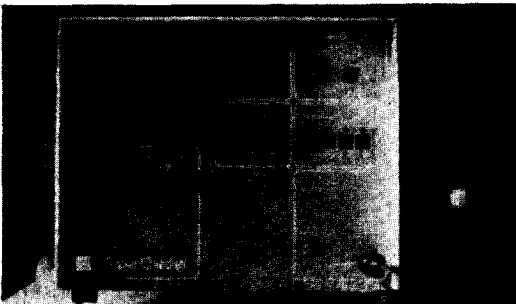


Fig. 1. Super-Checker(J. Morita Co., Japan).



Fig. 2. Placement of Sensor.

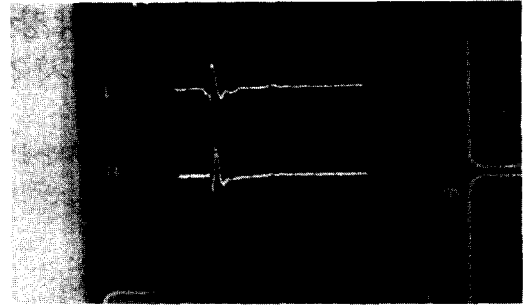


Fig. 3. Oscilloscope traces of occlusal sounds during centric occlusal tapping.

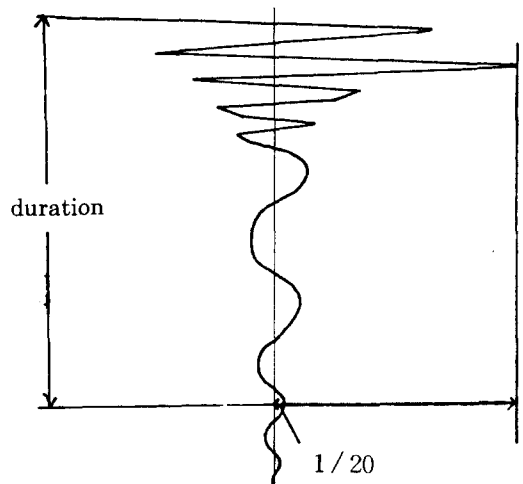


Fig. 4. Measuring point of duration of occlusal sounds.

2) 두개하악지수(CMI : Craniomandibular Index)의 측정

악구강계의 기능 및 병적 상태를 객관적으로 평가하기 위해서 Friction이 고안한 두개하악지수 측정지를 사용하여 두개하악지수를 조사하였다(Table 2, 3).

3) 하악 안정위에서의 측두근 전부 및 교근의 활성화 측정

측두근 전부 및 교근의 활성도를 측정하기 위하여 양극성 표면전극이 부착된 Bioelectric Processor EM2(Myotronic Research Inc., U.S.A.)를 사용하여(Fig. 5) 피검자 두부의 F-H plane이 수평면과 평행되도록 유지시킨 상태에서 전방을 직시하게 하고 곧바른 자세로 의자에 앉혀서 제작사의 지시에 따라 표면전극을 좌우측

4) 교합 검사

교합상태를 평가하기 위해 교합간섭, 저작습관 측, 정중선편위 및 centric slide의 량을 조사하였다. 이때 centric slide는 후방접촉위(RCP)에서 최대교합위(ICP)까지 하악치아가 미끄러지는 거리를 측정하는 것으로서 피검자를 편안히 눕힌 상태에서 8mm두께의 교합지(Arti-Fol, Bausch Dental Co., W-Germany)를 상하악 치아사이에 물리고 Dawson의 양 손을 이용한 중심위 유도방법을 사용하여 피검자로 하여금 후방접촉위에서 최대교합위로 서서히 다물게 하여 대구치 및 소구치에 접촉점을 인기하고 상악 우측 제1대구치에서 divider와 dial calipers(Mitutoyo Co., Japan)를 이용하여 0.05mm까지 측정하였다.

5) 통계 처리

실험군과 대조군에 있어서 교합음 지속시간과 측두근 전부 및 교근의 평균근전위를 서로 비교하고(t-test) 실험군에 대해 교합음 지속시간과 두개하악지수와의 상관관계를 알아보았으며 교합음 지속시간과 교합간섭, 저작습관측, 정중선편위 및 centric slide의 량에 대해 집단간의 평균의 차이를 일원변량분석(one way ANOVA)으로 검정하고 두집단간의 차이를 사후검정(multiple regression test) 방법중 LSD(Least Significant Difference) 방식으로 검정하였다.

Ⅲ. 성 적

실험군 및 대조군에 있어서 좌우측 교합음 지속시간 및 평균 교합음 지속시간에 대해 t-test를 시행한 결과 평균 교합음 지속시간은 실험군에서는 36.26±8.47msec, 대조군에서는 22.88±3.97msec로 실험군의 교합음 지속시간이 대조군에서보다 연장되어 나타났다(p<0.01)(Table 2 참조).

실험군 및 대조군에 있어서 하악안정위에서의 측두근 전부 및 교근의 평균근전위에 대한 t-test 결과 실험군에서는 측두근 전부는 2.36±0.95μV, 교근은 2.80±1.00μV였으며 대조군에서는 측두근 전부는 1.64±0.62μV, 교근은 1.79±0.62μV로 실험군의 측두근 전부 및 교근의 평균근전위가 대조군에서보다 각각 높게 나타났다(p<0.01)(Table 3 참조).

실험군에 있어서 교합음 지속시간과 두개하악

지수와의 상관관계를 알아본 결과 상관계수(r)가 0.4303로 상당한 상관관계를 보여주었다(p<0.01)(Table 4 참조).

교합음 지속시간에 대한 여러가지 교합적 요소 즉 교합간섭, 저작습관측, 정중선편위 및 centric slide의 량에 대해 일원변량분석한 결과 통계학적으로 유의성이 없는 것으로 나타났다(p>0.05)(Table 5 참조).

Table 2. Comparison of duration of occlusal sounds between the 30 patients with TMD and 30 normal subjects(msec)

Group	TMD patients(30)	Normal subjects(30)
Rt	37.29±9.72 *	23.88±4.49
Lt	35.20±9.47 *	21.88±5.41
Total mean	36.26±8.42 *	22.88±3.96

* : significant from normal(p<0.01) by t-test
OSD : duration of occlusal sounds.

Table 3. Comparison of muscle activities in the anterior part of temporalis and masseter muscle during rest position between 30 TMD patients and 30 normal subjects(μV)

	TMD patients(30)	Normal(30)
TA	2.36±0.95 *	1.64±0.62
MM	2.80±1.00 *	1.79±0.62

* : significant from normal(p<0.01) by t-test

TA : Temporalis Anterior

MM : Masseter Muscle

Table 4. Correlations between duration of occlusal sounds and CMI, DI, PI

	CMI	DI	PI
OSD	r=0.4303 (p<0.01)	r=0.3677 (p<0.05)	r=0.2905 (p>0.05)

#OSD : duration of occlusal sounds

r : correlation coefficient

CMI : Craniomandibular Index

DI : Dysfunction Index

PI : Palpation Index

Table 5. Correlations between duration of occlusal sounds and amount of centric slide, midline deviation, habitual side of mastication, and presence of occlusal interference.

	CS	MD	MS	OI
OSD	p=0.09	p=0.61	p=0.93	p=0.82

#CS : amount of centric slide
 MD : midline deviation
 MS : habitual side of mastication
 OI : presence of occlusal interference
 OSD : duration of occlusal sounds

Ⅳ. 고 찰

악구강계는 치아, 치주조직, 상하악, 악관절, 근육 및 이들 구조물을 지지하는 연조직으로 구성되며 저작, 호흡, 연하 및 발성의 제기능을 담당하고 동시에 안면표정을 조정하는 역할을 담당하게 된다.

이러한 기능은 주로 반사에 의해 이루어지는데 호흡과 연하는 선천적 반사기능에 의해 이루어지고 저작은 치열과 교합의 변화에 맞춰 항상 순응하기 때문에 후천적 반사기능에 의해 이루어지며 발성은 반사기능에 의해 이루어 지기도 하지만 주로 의지의 억제하에 있게 된다¹⁰.

이러한 악구강계의 제기능중 특히 저작기능은 치아의 교합에 의해서 수행되는데 치아의 교합상태의 평가는 악구강계의 기능 및 기능이상의 진단에 중요한 자료가 될 수 있다.

치아의 교합 상태를 평가하는 방법에는 교합지, ribbon, wax 등을 통한 교합인기법과 교합기 사용을 통한 분석이 널리 시행되어져 왔으나¹¹ 이러한 방법들은 모두 하악의 정(靜)적인 교합상태를 평가 하였을뿐 동(動)적인 교합상태에 대한 평가는 어려웠다. 이런 이유로 Anderson¹², Graf¹³, Adams¹⁴ 등은 가공치나 아말감 수복물 내에 미세한 transmitter를 매복시켜서 하악의 기능적 운동시에 나타나는 상하악 치아의 접촉상태를 평가한 바가 있다. 또한 Stewart는 상하악 치아가 접촉할 때부터 이개할 때까지 발생하는 소리 즉 교합음을 청진기를 사용하여 청취함으로써 동(動)적인 치아접촉상태의 분석을 시도

하기도 하였다².

이러한 교합음에 관한 연구는 그후 교합음의 가시적 기록법의 개발로 더욱 체계적인 학문으로 발전하게 되었는데 최근에는 전자공학의 발달과 함께 치아접촉시에 발생하는 교합음을 적절한 방법으로 유도, 증폭 및 기록하여 치아접촉상태를 구강외부에서 개관적으로 관찰할 수 있게 되었다⁴⁻⁷.

이러한 교합음의 채득방법에는 공기전도음에 의한 방법과 골전도음에 의한 방법이 있는데 永木 등은 공기전도음에는 일반잡음이 혼합될 가능성이 높기 때문에 교합음 분석에는 골전도음이 더 유용하다고 하였다^{15,16}.

교합음의 채득부위로는 전액부(前額部)의 중앙, 혈골부, 안와하부, 외이도 등이 제시된 바가 있으나 Watt의 연구에 의하면 안와상부, 안와하부, 혈부 및 악관절부에 대해 검토한 결과 안화하연에서 2cm하부가 최적부위라고 하였으며 이점에 대해 永木등과 小宮山도 의견을 일치하고 있다.

따라서 저자는 본 실험에서 Watt가 제시한 안와하연 2cm하부를 교합음 채득부위로 선정하였으며 교합음의 총체적인 기록을 위해서 양측성으로 microphone을 장착하였다.

교합음 지속시간은 상하악 치아가 접촉할 때부터 이개할 때까지의 시간을 말하는데 Oscilloscope 상에 나타난 교합음 파형을 계측함으로써 얻을 수 있다. 특히 高官¹⁵은 교합음 파형의 기시점에서 최대 peak치의 1/20로 감소하는 점까지를 교합음 지속 시간으로 간주하는 보다 객관적인 측정기준을 제시하였다.

본 실험에서 대조군의 교합음 지속시간은 중심 교합위에서 tapping시 22.88msec로 측정되었는데 이러한 수치는 Watt, 西浦, 雨宮 등에 의해서 측정된 것보다는 짧았지만 小宮山, 若林, 永木, 高官, 오 등¹⁷에 의해서 측정된 것보다는 연장되어 나타남으로서 선학들의 연구결과와 다소의 차이를 보여주었다(Table 6 참조). 이러한 차이점은 연구대상, 실험방법 등의 차이로 나타날 수 있는 결과로 사료된다.

Watt^{6,7,9}는 이러한 교합음을 그 파형에 따라 충격형, 활주형 및 혼합형으로 구분하고 안정된 치아접촉시에는 지속시간이 짧은 충격형 교합음이 나타나고 불안정한 치아접촉시에는 지속시간

이 긴 활주형 교합음이 나타난다고 하였다. 이러한 치아접촉의 안정성 여부는 근본적으로 동(動)적인 교합 운동하에서의 하악의 위치에 관해서 고려되어야 하는데 여기에는 해부학적 치아 접촉관계와 생리적 근육작용이라는 두가지 요소가 관계된다. 즉 근육의 작용상태가 치아의 접촉상태와 일치하는 경우에는 하악은 중심위로 안정된 교합관계를 이루게 되지만 근육의 작용상태와 치아의 접촉상태가 일치하지 않는 경우에는 하악은 중심위를 벗어나서 편심 교합상태로의 불안정한 치아접촉을 이룬 다음 좀 더 안정된 상태로의 활주가 일어나게 된다.

Table.6 Duration of occlusal sounds of normal subjects during centric occlusal tapping (msec)

Durations of occlusal sounds of normal subjects.		Remarks
Watt	48	microphone
西浦	36, 48	microphone
雨宮	36.2	
小宮山	9-26	stethoscope infraorbital region
永木	9	
若林	12	teeth
高宮	7.71	microphone extra auditory meatus
Oh	9.57	microphone infraorbital region
Author	22.88	microphone infraorbital region.

한편 Clayton¹⁸⁻²⁰⁾은 하악운동의 재현성을 평가하는 Pantographic Reproducibility Index(PRI)를 고안한 바 있는데 측두하악장애 환자에 있어서 PRI 수치가 높게 나타나는 것은 하악운동의 안정성이 떨어지기 때문이며 이것은 바로 저작근 운동의 부조화에 기인된다고 하였다.

따라서 교합음 지속시간이 연장되는 활주형 교합음은 하악운동의 부조화와 저작근의 경련 및 동통을 동반하는 측두하악장애 환자에 있어서 보편적인 형태로 받아들여질 수 있다고 사료되며 본 실험의 결과 측두하악장애 환자의 교합음

지속시간이 36.26msec로 측정된 바 정상인의 경우보다 현저히 증가된 양상을 나타내었을 뿐 아니라 측두하악장애증의 정도를 평가하는 두개 하악지수와도 높은 상관관계를 보여주었다.

또한 많은 선학들에 의해서 측두하악장애 환자에 대한 저작근의 근전도학적 평가가 시도되었는데 대체적으로 근경련의 존재를 암시하는 안정위에서의 근전위의 증가, 저작근 휴지기의 연장, 저작근 상호간의 불균형등을 나타낸다고 하였다²¹⁾. 따라서 이러한 근육의 이상상태를 치료해주면 하악운동의 안정성을 회복시킬 수 있다고 생각되어질 수 있으며 실제로 김 등²²⁾은 정상인을 대상으로 한 교합접촉점 측정에 관한 실험에서 EMG biofeedback therapy로 저작근을 생리적 상태로 이완시키면 집중형 교합접촉 상태가 분산형 교합접촉 상태로 바뀔 뿐 만 아니라 교합접촉점의 수도 현저히 증가되는 결과를 보고함으로써 저작근의 생리적 기능회복으로 교합상태가 안정될 수 있다고 하였다.

따라서 본 연구에서 측두하악장애 환자에서 교합음 지속시간이 연장되는 양상은 이와 같은 하악운동의 불안정성에 기인된다고 할 수 있으며 이는 결국 저작근의 부조화에 그 원인이 있다고 사료되는데 실험군에 대한 근전도 측정에서 보는 바와 같이 안정위에서의 근전위가 증가된 양상은 이와 같은 사실을 뒷받침하는 것으로 여겨진다.

한편 이러한 교합음 지속시간에 영향을 줄 수 있는 요소로서 교합에 의한 영향을 고려할 수가 있는데 이는 특히 측두하악장애의 원인을 교합적 측면에서 파악하려고하는 일부 학자들의 견해에서 보면 중요한 문제라고 여겨진다. 저자는 이와 같은 교합적 요인의 교합음 지속시간에 대한 영향을 평가하기 위해서 실험군 및 대조군에 대해 교합간섭, 저작습관측, 정중선편위, centric slide의 량 등을 측정하여 교합음 지속시간과의 상관관계를 조사해 본 결과 아무런 관련성이 없는 것으로 나타나 이러한 교합적 요인이 교합음 지속시간에 별다른 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

따라서 하악운동의 안정성이라는 측면에서 교합적 요인은 중요한 고려요소가 아니라고 짐작되며 이러한 점은 측두하악장애의 유발요인으로서는 교합적 요소의 역할을 감소시키는 Solberg²³⁾

, Friction²⁴⁾, Bush²⁵⁾ 등의 주장과도 일맥상통한다고 할 수 있다.

이상의 사실들을 종합해 볼 때 교합음 지속시간은 측두하악장애 환자의 객관적인 진단 및 치료의 평가기준으로 이용되어질 수 있을 것으로 사료되며 앞으로 측두하악장애 환자에 있어서 교합음 지속시간을 치료전, 치료중, 치료후로 측정 비교해 봄으로서 치아의 접촉상태 및 악관절 기능의 질적인 면을 평가하는데 있어서 유용한 자료로 이용되어질 수 있을 것으로 기대된다.

V. 요 약

저자는 측두하악장애의 증상을 가진 30명을 실험군으로 선정하고 정상 교합을 가지며 측두하악장애의 제증상 및 이에 대한 병력이 없는 30명을 대조군으로 선정하여 중심교합위에서 교합음 지속시간을 측정하고 교합음 지속시간과 두개하악지수, 교합간섭, 저작습관측, 정중선편위 및 centric slide의 량 간의 상관관계를 분석하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 중심교합위에서 tapping시 교합음 지속시간은 실험군에서는 평균 36.26msec, 대조군에서는 22.88msec로 실험군에서 대조군보다 교합음 지속시간이 연장되어 나타났다(p<0.01).
- 교합음 지속시간과 두개하악지수(CMI)와의 관계에서는 통계학적인 유의성이 있는 것으로 나타났다(p<0.01).
- 교합음 지속시간과 교합간섭, 저작습관측, 정중선 편위 및 centric slide의 량 등의 교합적 요소간에는 통계학적인 유의성이 없는 것으로 나타났다(p<0.05).

참 고 문 헌

1. 이승우 : 측두하악장애의 진단과 치료. 고문사, 서울, 1986.
2. Stewart, J.M : Diagnosis of traumatic occlusion. J.Fla. Dent. Soc., 24 : 4-9, 1953.
3. Watt, D.M. : Clinical application of gnathosonics. J. Pros. Dent., 16 : 83-95, 1966.

4. Watt, D.M. : Gnathosonics-A study of sounds produced by the masticatory mechanism. J. Pros. Dent., 16 : 73-82, 1966.
5. 신금백, 이승우 : 성인의 폐구운동시 발생하는 교합음에 관한 연구. 대한구강내과학회지, 8 : 43-59, 1983.
6. Watt, D.M. and Hedegard, B. : The stereostethoscope-An instrument for clinical gnathosonics. J. Pros. Dent., 18 : 458-464, 1967.
7. Watt, D.M. : Gnathosonics in occlusal evaluation. J. Pros. Dent., 19 : 133-143, 1968.
8. Watt, D.M., Sharkey, S.W., Saber, M., and Likeman, P.R. : A study of the average duration of occlusal sounds in different age groups. Brit. Dent. J., 138 : 385-388, 1975.
9. Watt, D.M. : Gnathosonic diagnosis and occlusal dynamics. Praeger, New York, 1981.
10. Okeson, J.P. : Fundamentals of occlusion and temporomandibular disorders. 1st ed., Mosby Co., St. Louis, 1985.
11. Posselt, U. and Skytting, B. : Registration of the condyle path inclination-variations using the Gysi technique. J. Pros. Dent., 10 : 243-247, 1960.
12. Anderson, D.J. and Picton, D.C.A. : Tooth contacts during chewing. J. Dent. Res., 36 : 21-26, 1957.
13. Graf, H. and Zander, H.A. : Tooth contact patterns in mastication. J. Pros. Dent., 13 : 1055-1066, 1963.
14. Adams, S.H. : Functional tooth contacts in lateral and in centric occlusion. J.A.D.A., 69 : 465-473, 1964.
15. 高官 神一郎 : 교합음의 골전도음에 관한 연구. 치과의학, 79 : 1317-1359, 1979(cited from 17).
16. 織田 篤憲 : 교합음의 분석. 치과의학, 40(2) : 239-261, 1977.
17. 오단, 최부병 : Occlusal splint의 교합접촉음에 관한 연구. 경희 치대논문집, 14 : 379-

- 385, 1982.
18. Shields, J.M., Clayton, J.A., and Sindler, L.D. : Using pantographic tracings to detect TMJ and muscle dysfunctions. *J. Pros. Dent.*, 39 : 80-87, 1980.
 19. Beard, C.C. and Clayton, J.A. : Electronic PRI consistency in diagnosing TMJ dysfunction. *J. Pros. Dent.*, 55 : 255-259, 1986.
 20. Clayton, J.A. and Beard, C.C. : An electronic, computerized pantographic reproducibility index for diagnosing temporomandibular dysfunction. *J. Pros. Dent.*, 55 : 500-505, 1986.
 21. Jankelson, R. and Pulley, M.L. : EMG in clinical dentistry. Myotronics Research Inc., Seattle & Washington, 1984.
 22. 김영주, 이승우, 김영구 : EMG biofeedback therapy에 의한 occlusal contact의 변화에 관한 연구. *대한구강내과학회지*, 10 : 33-39, 1985.
 23. Solberg, W.K., Flint, R.T., and Brantner, J.P. : TMJ pain and dysfunction - A clinical study of emotional and occlusal components. *J. Pros. Dent.*, 28 : 412-422, 1972.
 24. Friction, J.R., Kroening, R.J. and Hathaway, K.M. : TMJ and craniofacial pain - Diagnosis and management. 1st ed., Ishiyaku Euro America Inc., St. Louis, 1988.
 25. Bush, F.M. : Occlusal etiology of MPDS - The president's conference on the examination, diagnosis, and management of temporomandibular disorders. Chicago, 1982.

An Analysis of Duration of Occlusal Sounds in TMD Patients

Young Mee Kwon, D.D.S., Jae Kap Choi, D.D.S.

*Dept. of Oral Diagnosis & Oral Medicine,
School of Dentistry, Kyungpook National University*

—Abstract—

The author has measured the duration of occlusal sounds during centric occlusal tapping in 30 patients with TMD and 30 normal subjects as controls, and then correlated the duration of occlusal sounds with CMI, amount of centric slide, midline deviation, habitual side of mastication, and presence of occlusal interference.

The results were as follows :

1. The durations of occlusal sounds during centric occlusal tapping were 36.26msec in TMD patients and 22.88msec in normal subjects($p<0.01$).
2. The correlation between duration of occlusal sounds and CMI was significant($P<0.01$).
3. The correlations between duration of occlusal sounds with amount of centric slide, midline deviation, habitual side of mastication, and presence of occlusal interference were not significant ($P>0.05$).