

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Preventivní medicína a epidemiologie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MDDr. Antonín Tichý, Ph.D.

Uvolňování bisfenolu A a jeho analogů z dentálních
rekonstrukčních materiálů

*Release of bisphenol A and its analogues from dental
restorative materials*

Disertační práce

Školitel: RNDr. Pavel Bradna, CSc.

Praha, 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 24.4.2023

MDDr. Antonín Tichý, Ph.D.

Identifikační záznam

Tichý, Antonín. *Uvolňování bisfenolu A a jeho analogů z dentálních rekonstrukčních materiálů. [Release of bisphenol A and its analogues from dental restorative materials]. Praha, 2023. 80 s.* Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Stomatologická klinika, Školitel: Bradna, Pavel.

Poděkování

V první řadě děkuji svému školiteli, RNDr. Pavlu Bradnovi, CSc., za odborné vedení, laskavý přístup i veškerý vynaložený čas a úsilí. Neméně si však vážím jeho pomoci s mými vědeckými začátky během pregraduálního studia a podpory v průběhu mého působení na Tokyo Medical and Dental University.

Prof. MUDr. Janě Duškové, DrSc., MBA, bych rád poděkoval nejen za podporu mé vědecké činnosti, ale také za zprostředkování spolupráce s Endokrinologickým ústavem. Za tuto spolupráci děkuji především Ing. Markétě Šimkové, Ph.D., která provedla chromatografické analýzy, ale také MUDr. Michaele Duškové, Ph.D. a dalším pracovníkům Oddělení steroidů a proteofaktorů Endokrinologického ústavu.

Mé díky patří i kolegům ze Stomatologické kliniky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, zvláště Ing. Radce Vrbové, Ph.D. a MUDr. Adéle Roubíčkové, Ph.D. za jejich pomoc s laboratorní prací. Rád bych poděkoval také Ing. Vlastě Fialové, CSc. za důslednou jazykovou kontrolu této disertační práce.

Závěrem děkuji také přátelům a rodině, zejména své manželce za podporu a trpělivost nejen v průběhu doktorského studia.

Obsah

1 Úvod	1
1.1 Bisfenol A (BPA).....	1
1.1.1 Účinky BPA na lidský organismus	2
1.1.2 Regulace použití BPA.....	4
1.1.3 Analogy BPA.....	5
1.2 Dentální materiály spojované s uvolňováním BPA.....	6
1.2.1 Kompozitní materiály	6
1.2.2 Adhezivní systémy	9
1.2.3 Skloionomerní cementy	10
1.2.4 Polykarbonáty	11
1.3 Dosavadní poznatky o uvolňování BPA z dentálních materiálů	11
1.3.1 Analytické metody.....	13
1.3.2 <i>In vivo</i> studie	14
1.3.3 <i>In vitro</i> studie	14
1.3.4 Shrnutí	20
2 Hypotézy a cíle práce	21
3 Materiály a metody	22
3.1 Vliv intenzity a doby ozáření na kvalitu polymerace	22
3.1.1 Stanovení podmínek polymerace	22
3.1.2 Hodnocení kvality polymerace pomocí měření mikrotvrdosti	24
3.2 Uvolňování bisfenolů	25
3.2.1 Výplňové materiály	25
3.2.2 Polykarbonáty	27
3.2.3 Chromatografická analýza	29
3.2.4 Statistická analýza	30
3.3 Mikroskopická analýza	31
4 Výsledky	32
4.1 Vliv intenzity a doby ozáření na kvalitu polymerace	32
4.2 Uvolňování bisfenolů	34
4.2.1 Výplňové materiály	34
4.2.2 Polykarbonáty	39
4.3 Mikroskopická analýza	43
5 Diskuse	46
5.1 Uvolňování BPA z výplňových materiálů	47
5.2 Uvolňování BPA z polykarbonátů	52
5.3 Srovnání expozice se současnými limity	54
6 Závěry	57
7 Souhrn	58
8 Summary	59
9 Seznam publikací doktoranda	60
9.1 Publikace, které jsou podkladem disertace	60
9.2 Publikace nesouvisející s tématem disertace	60
9.3 Prezentace na kongresech a sympoziích.....	61
10 Seznam použité literatury	62

Seznam obrázků:

Obr. 1: Struktura bisfenolu A (BPA).....	1
Obr. 2: Nemonotónní závislost účinku BPA na dávce.	3
Obr. 3: Strukturní analogy BPA.	5
Obr. 4: Struktura dimethakrylátů běžně používaných v dentálních kompozitech.....	6
Obr. 5: Struktura používaných fotoiniciátorů.	8
Obr. 6: Schéma syntézy Bis-GMA.	12
Obr. 7: Další monomery se strukturní jednotkou BPA.....	12
Obr. 8: Aparatura pro měření intenzity ozáření polymerační lampou.	23
Obr. 9: Postup zhotovení tělísek z výplňových materiálů.	27
Obr. 10: Schématické znázornění výroby korunek frézováním a 3D tiskem.....	28
Obr. 11: Schéma derivatizační reakce BPA dansylchloridem.	30
Obr. 12: Chromatogram kalibrační řady a reprezentativního extraktu.	34
Obr. 13: Průměrné denní uvolňování BPA z výplňových materiálů.....	35
Obr. 14: Kumulativní uvolňování BPA z výplňových materiálů.	38
Obr. 15: Průměrné denní uvolňování BPA z polykarbonátů (PC) v methanolu.	41
Obr. 16: Průměrné denní uvolňování BPA z polykarbonátů (PC) v umělé slině.....	42
Obr. 17: Morfologie vnitřního povrchu polykarbonátových korunek.	44
Obr. 18: Morfologie vnějšího povrchu polykarbonátových korunek.	45

Seznam tabulek:

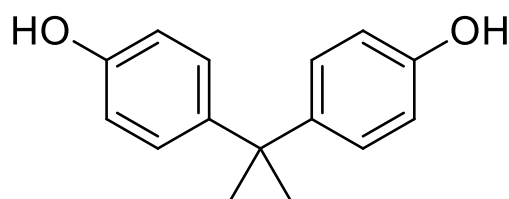
Tab. 1: Složení kompozitů pro testování vlivu polymeračních podmínek na kvalitu polymerace.	22
Tab. 2: Srovnání deklarované intenzity vyzařování lampy Valo v jednotlivých módech s naměřenou intenzitou ozáření i s rozdělením na fialovou a modrou oblast spektra.	23
Tab. 3: Polymerační režimy: intenzita ozáření, čas záření a světelná energie.	24
Tab. 4: Složení kompozitů a skloionomerů pro hodnocení uvolňování BPA.	26
Tab. 5: Mikrotvrdost kompozitního materiálu Filtek Ultimate Universal Restorative.	32
Tab. 6: Mikrotvrdost kompozitního materiálu Tetric EvoCeram.	33
Tab. 7: Mikrotvrdost kompozitního materiálu Estelite Σ Quick.	33
Tab. 8: Průměrné denní uvolňování BPA z výplňových materiálů do umělé sliny v přepočtu na gram materiálu (průměr \pm SD v ng/g).	36
Tab. 9: Průměrné denní uvolňování BPA z výplňových materiálů do methanolu v přepočtu na gram materiálu (průměr \pm SD v ng/g).	37
Tab. 10: Kumulativní uvolňování BPA z výplňových materiálů v přepočtu na gram materiálu (průměr \pm SD v ng/g).....	38
Tab. 11: Sorpce extrakčních médií testovanými kompozity (průměr \pm SD v hmotn. %).	39
Tab. 12: Ztráta hmotnosti testovaných kompozitů (průměr \pm SD v hmotn. %).	39
Tab. 13: Průměrné denní uvolňování BPA z polykarbonátů v přepočtu na gram materiálu (průměr \pm SD v μ g/g).....	40
Tab. 14: Sorpce umělé sliny a ztráta hmotnosti testovaných polykarbonátů (průměr \pm SD v μ g/mm ³).	42
Tab. 15: Uvolňování BPA z kompozitů s monomery na bázi BPA po 24 hodinách ve srovnání s literárními údaji.....	48
Tab. 16: Dlouhodobé uvolňování BPA z kompozitů s monomery na bázi BPA ve srovnání s literárními údaji.	50

1 Úvod

K rekonstrukci tvrdých zubních tkání poškozených kazem či traumatem se v zubním lékařství používají materiály, které musí splňovat řadu kritérií. Z funkčního hlediska jsou podstatné zejména jejich fyzikální a mechanické vlastnosti, které by se měly blížit vlastnostem nahrazovaných tkání, a dlouhodobá odolnost vůči náročným podmínkám v dutině ústní, která je některými autory považována za nejagresivnější prostředí v lidském těle (Sakaguchi et al., 2019). Významný je i estetický vzhled těchto materiálů (Anusavice & Phillips, 2003), ale zásadní podmínkou je jejich biokompatibilita. Minimální požadavky pro použití dentálních rekonstrukčních materiálů v lidském organismu stanovují mezinárodní normy řady ISO 10993 (Biological evaluation of medical devices) a ISO 7405 (Dentistry – Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry), které zahrnují testování cytotoxicity, systémové toxicity, genotoxicity, karcinogenity, dráždivosti, oddálené přecitlivělosti a biodegradace. Ukazuje se však, že i materiály vyhovující těmto normám mohou být pro pacienta, personál zubní ordinace nebo životní prostředí rizikové. V posledních letech se objevují publikace upozorňující na možná zdravotní rizika související s polymerními materiály používanými v zubním lékařství, zejména dentálními kompozity. V literatuře se zmiňuje uvolňování volných monomerů, iniciátorů a inhibitorů polymerace a dalších látek, které mohou mít alergenní, cytotoxické a genotoxické účinky (Van Landuyt et al., 2011). Zvláště intenzivně je v současnosti diskutována eluce bisfenolu A (BPA), který je strukturální jednotkou některých monomerů obsažených v dentálních kompozitech a dalších polymerních materiálech pro použití v zubním lékařství.

1.1 Bisfenol A (BPA)

BPA (2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan) je chemická látka tvořená dvěma fenolickými kruhy, které jsou spojeny uhlíkem s dvěma methylovými skupinami (Obr. 1). Jeho syntéza vycházející z kondenzace acetonu a fenolu byla poprvé popsána v roce 1891 A. P. Dianinem. Jedná se o krystalickou látku o molární hmotnosti 228,29 g/mol s bodem varu okolo 250 °C,



Obr. 1: Struktura bisfenolu A (BPA).

kteřá je dobře rozpustná v organických rozpouštědlech a omezeně ve vodě (0,3 g/l). BPA se široce využívá zejména v potravinářském průmyslu (Vandenberg et al., 2009). Je základním stavebním kamenem polykarbonátů, z nichž se vyrábějí plastové lahve a nádoby na potraviny, a výchozí složkou při výrobě epoxidových pryskyřic, které chrání vnitřní povrch plechových nádob před korozi. BPA může být obsažen i v polyvinylchloridových obalových fóliích. Využívá se také v syntéze zpomalovačů hoření a při výrobě termopapíru, stavebních materiálů i některých zdravotnických prostředků (Geens et al., 2012).

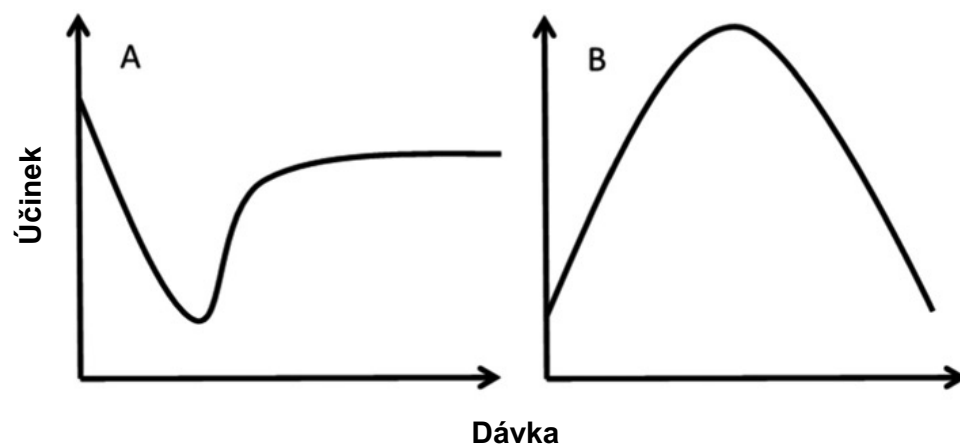
1.1.1 Účinky BPA na lidský organismus

Díky své aromatické struktuře s hydroxylovou skupinou v para-poloze a methylovým skupinám na druhém uhlíku propanu je BPA schopen vázat se na estrogenní a některé další hormonální receptory (Kitamura et al., 2005). Estrogenní účinky BPA byly popsány Doddsem již ve 30. letech 20. století, kdy se dokonce uvažovalo o využití BPA jako syntetického estrogenu. Tehdejší studie ale ukázaly, že afinita BPA k nukleárním estrogenním receptorům ER α a ER β je asi 10 000 \times nižší než u estradiolu, a proto byl zvolen účinnější diethylstilbestrol (Vogel, 2009). Pozdější *in vitro* studie ukázaly, že BPA může se srovnatelnou účinností jako estradiol aktivovat jiné typy receptorů, např. membránové estrogenní receptory (mER) a transmembránové estrogenní receptory spřažené s G-proteiny (GPR30) (Rochester, 2013). Vysoká afinita BPA byla prokázána také k estrogen-related receptoru gamma (ERR γ), jehož exprese je významná zejména v placentě a při vývoji mozku nebo plic (Okada et al., 2008). BPA by tudíž neměl být považován za slabý xenoestrogen, což potvrzují také *in vivo* studie na zvířatech, které prokázaly orgánově specifické estrogenní účinky BPA (Rochester, 2013).

Kromě estrogenního účinku se BPA může vázat i na androgenní receptory, čímž může blokovat působení přirozených androgenů. Při vazbě na receptory thyroidních hormonů se však BPA může chovat jako agonista i antagonist (Wetherill et al., 2007). Ovlivněním intracelulární aktivity aromatázy může BPA přispívat k lipogenezi a diferenciaci fibroblastů v adipocyty, proto bývá považován za obezogen (Alonso-Magdalena et al., 2006). BPA může také ovlivňovat buněčnou signalizaci a funkci centrálního nervového systému, imunitního systému, pankreatu a jiných tkání (Wetherill et al., 2007). V důsledku uvedených interakcí byla expozice BPA asociována s poruchami reprodukčního systému u mužů (např. se sníženým počtem a kvalitou spermií, karcinomem prostaty) i žen (např. s neplodností, potraty, mimoděložním těhotenstvím, syndromem polycystických ovarii). BPA je spojován

i s vývojovými vadami, metabolickými poruchami (např. inzulinovou rezistencí) a dalšími patologickými stavy (Rochester, 2013).

Hodnocení účinků BPA je komplikováno tím, že závislost jeho účinku na dávce není monotónní (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Vandenberg et al., 2012). To znamená, že účinek BPA se může s rostoucí dávkou nejprve zvyšovat a následně klesat, nebo se naopak klesající účinek BPA může od určité dávky zvyšovat (Obr. 2). To může být způsobeno např. down-regulací receptorů při vysokých dávkách nebo může jít o výsledek dvou či více protichůdných drah účinku (Vandenberg et al., 2009). Nemonotónní závislost účinku na dávce a možnost akumulace BPA v tukové tkáni (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Vandenberg et al., 2009) vede k obavám z nežádoucích účinků BPA i při nízkých dávkách (low-dose effect) (Teeguarden & Hanson-Drury, 2013). Působení BPA může být dále ovlivněno jinými endokrinními disruptory (Kortenkamp, 2007), které jsou definovány jako „exogenní látky, které zasahují do produkce, uvolňování, transportu, vazby, účinku nebo eliminace tělu vlastních hormonů zodpovědných za udržování homeostázy, regulaci vývojových procesů a/nebo chování“ (Kavlock et al., 1996). S ohledem na tyto faktory je proto sporné, zda lze určitou dávku BPA prohlásit za bezpečnou. To dokresluje i fakt, že tolerovatelné dávky látek (tolerable daily intake; TDI) jsou obvykle stanovovány na základě NOAEL (no-observed-adverse-effect level), ale u BPA musela být využita hodnota LOAEL (lowest-observable-adverse-effect level), protože nežádoucí účinky se vyskytly i při nejnižších testovaných dávkách (Rochester, 2013; Welshons et al., 2003).



Obr. 2: Nemonotónní závislost účinku BPA na dávce.

Upraveno dle Opinion on the impact of non-monotonic dose responses on EFSA's human health risk assessments (EFSA Scientific Committee, 2021).

1.1.2 Regulace použití BPA

Z důvodu možných nežádoucích účinků na lidské zdraví je použití BPA regulováno. V Evropské unii byl v roce 2011 vydán zákaz používání BPA při výrobě polykarbonátových kojeneckých lahví, který byl nařízením Evropské komise 2018/213 rozšířen na plastové lahve a obaly potravin určených pro děti. Tímto nařízením byl také pro všechny materiály, které přicházejí do kontaktu s potravinami, stanoven specifický migrační limit (specific migration limit; SML) 0,05 mg/kg, což znamená, že se z obalového materiálu nesmí do kilogramu potravin uvolnit více než 0,05 mg BPA. Jednou z nejnovějších změn je regulace používání BPA při výrobě termopapíru – podle XVII. dodatku k nařízení Evropské komise 1907/2006 nesmí od ledna 2020 termopapír obsahovat více než 0,02 hmotn. % BPA. Nad rámec těchto omezení platí v některých zemích další opatření, jejichž cílem je dále snížit expozici BPA.

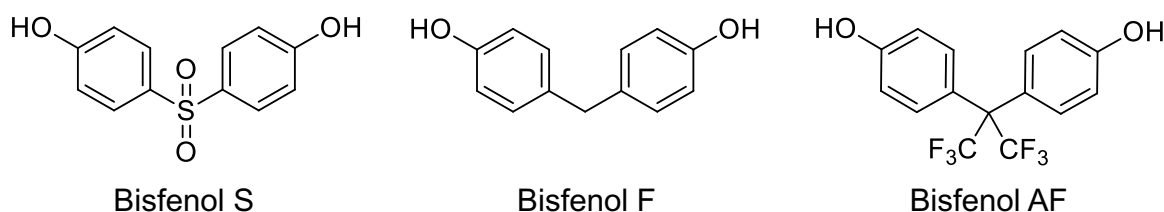
BPA byl v roce 2017 Evropskou agenturou pro chemické látky (European Chemicals Agency; ECHA) zařazen mezi látky vzbuzující mimořádné obavy (substances of very high concern). Podle směrnice REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) ECHA nyní hodnotí účinky BPA, a na základě získaných výsledků bude použití BPA autorizováno nebo naopak dále omezováno. Vliv BPA na lidský organismus posuzuje i Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority; EFSA), protože BPA se běžně vyskytuje v materiálech určených pro styk s potravinami (food contact materials). Podle odhadu EFSA je denní expozice BPA až 1,4 µg/kg tělesné hmotnosti, což je méně než současná hodnota TDI, která byla v roce 2015 tímto úřadem snížena z 50 µg/kg tělesné hmotnosti na 4 µg/kg tělesné hmotnosti (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing, Aids, 2015).

V nejbližší době se však očekává nové stanovisko EFSA k BPA, kterým by hodnota TDI mohla být snížena na 0,04 ng/kg tělesné hmotnosti, tedy až 100 000× (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids, 2021). Podkladem pro toto výrazné snížení je studie, v níž gestační a perinatální expozice BPA způsobila nárůst Th17 lymfocytů u mláďat myši (Luo et al., 2016). Hraniční denní dávkou (benchmark dose level; BMDL₂₀) bylo 0,06 µg/kg tělesné hmotnosti, což pro člověka odpovídá ekvivalentní dávce (human equivalent dose) 0,93 ng/kg tělesné hmotnosti (Luo et al., 2016). Při výpočtu navrhovaného TDI byl použit bezpečnostní faktor 25, kterým byly zohledněny mezidruhové toxikodynamické rozdíly (faktor 2,5) a inter-individuální variabilita v toxikokinetice a

toxikodynamice u lidí (faktor 10) (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids, 2021). Pokud bude tento snížený limit TDI přijat, bude o několik řádů nižší než běžná denní expozice BPA odhadnutá EFSA v roce 2015. To by znamenalo, že BPA představuje zdravotní riziko ve všech věkových kategoriích.

1.1.3 Analogy BPA

Regulace použití BPA vedla k používání jeho analogů označovaných jako alternativní bisfenoly. Tyto analogy mají dva fenolické kruhy obdobně jako BPA, ale liší se substituenty nebo částí molekuly, která oba kruhy spojuje (Rochester & Bolden, 2015). Nejčastěji se používá bisfenol S (BPS), který může být obsažen v čisticích prostředích nebo „BPA-free“ termopapíru, a bisfenol F (BPF), který se běžně používá v ochranných epoxidových lacích (Geens et al., 2012; Rochester & Bolden, 2015). Používá se i bisfenol AF (BPAF), např. v polymerech pro výrobu elektronických zařízení a optických vláknách (LaFleur & Schug, 2011). Struktury uvedených analogů BPA jsou uvedeny v Obr. 3.



Obr. 3: Strukturní analogy BPA.

Toxicita těchto látek je dosud málo prozkoumaná, ale podle některých studií mohou být jejich endokrinně disruptivní účinky stejné či výraznější než u BPA (Eladak et al., 2015; Rochester & Bolden, 2015; Yang et al., 2012). Proto se substituce BPA jeho analogy označuje jako politováníhodná (regrettable substitution) a experty je vyžadována jejich regulace, která zatím není tak přísná jako v případě BPA. ECHA na tento stav zareagovala v dubnu 2022 doporučením, aby mezi látky vzbuzující mimořádné obavy bylo zařazeno celkem 34 bisfenolů, což v rámci směrnice REACH představuje první krok pro případná omezení jejich použití. Další posun představuje německý návrh společné regulace všech bisfenolů podaný v říjnu 2022. Pokud ho ECHA schválí, bude povolená koncentrace bisfenolů ve všech produktech vyrobených či importovaných do Evropské unie omezena na 0,02 hmotn. %.

1.2 Dentální materiály spojované s uvolňováním BPA

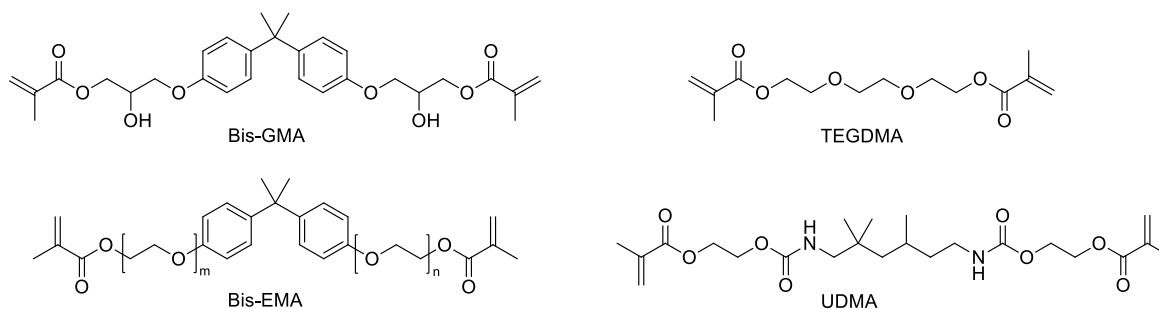
Výzkum zaměřený na problematiku uvolňování BPA z dentálních materiálů se v současné době zaměřuje především na kompozitní materiály. Ty se prosazují na úkor stříbrného amalgámu jednak z důvodu jeho legislativního omezování, ale také díky estetickému vzhledu a vazbě k tvrdým zubním tkáním, kterou zajišťují adhezivní systémy. Monomery se strukturální jednotkou BPA mohou být obsaženy také v hybridních skloionomerních cementech, které se používají jako dlouhodobě provizorní výplňové materiály v barvě zubu zejména u dětí. Na kompozitní nebo skloionomerní bázi jsou i pečtidla, která se používají k prevenci vzniku zubního kazu u čerstvě prořezaných molárů a u nichž bylo uvolňování BPA popsáno nejdříve (Olea et al., 1996). Další skupinou dentálních materiálů, u nichž bylo sledováno uvolňování BPA, jsou ortodontická adheziva a polykarbonátové ortodontické zámky (Kloukos et al., 2013). Polykarbonáty se v zubním lékařství používají i jako alternativa poly(methyl methakrylátu) (PMMA) při výrobě provizorních korunek a dlah.

1.2.1 Kompozitní materiály

Spektrum indikací kompozitních materiálů je velmi široké, zahrnuje výplně všech tříd, dostavby zubů před a po endodontickém ošetření i po úrazech a úpravy tvaru či odstínu zubů z estetických důvodů. Používány jsou také k dlahování zubů, tmelení protetických prací nebo zhotovení některých fixních náhrad v zubních laboratořích.

1.2.1.1 Složení

Kompozity jsou heterogenní materiály složené z polymerní matrice a plniva, které jsou navzájem spojeny vazebnými činidly (Anusavice & Phillips, 2003). Polymerní matrice obvykle sestává z dimethakrylátových monomerů, nejčastěji bisfenol A-glycidyl methakrylátu (Bis-GMA), urethan dimethakrylátu (UDMA), triethylenglykol dimethakrylátu (TEGDMA) nebo ethoxylovaného bisfenol A-glycidyl methakrylátu (Bis-EMA) (Obr. 4). Jako plnivo se používá buď barnato-strontnaté sklo namleté



Obr. 4: Struktura dimethakrylátů běžně používaných v dentálních kompozitech.

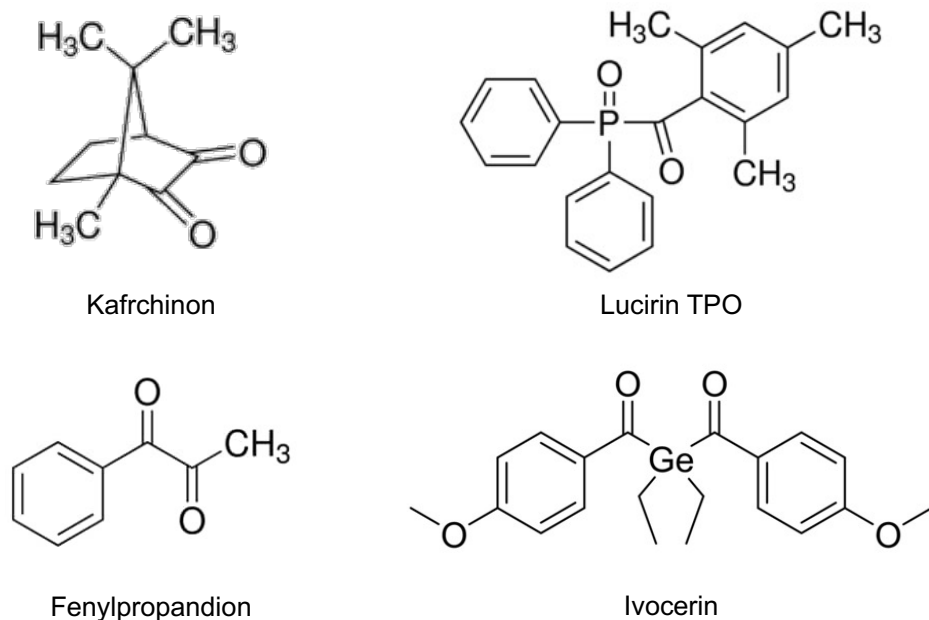
na submikrometrovou velikost, částice předpolymerovaného kompozitního plniva o velikosti 20-100 μm , nanočástice pyrogenního SiO_2 (silika částice), či směs nanočástic $\text{SiO}_2\text{-ZrO}_2$ a jejich aglomerátů (Ferracane, 2011). Propojení polymerní matrice a částic plniva je zajištěno pomocí silanů. Jedná se o bifunkční molekuly, jejichž methakrylová skupina umožňuje kopolymeraci s monomery, zatímco alkoxy skupiny po hydrolyze vytvoří silanový můstek (Si-O-Si) s povrchem částice plniva. Vzniklá chemická vazba zajišťuje dokonalý přenos zatížení kompozitu na částice plniva (Debnath et al., 2003), zvyšuje odolnost kompozitu (Yoshida et al., 2002) a snižuje jeho abrazi (Lim et al., 2002).

1.2.1.2 Polymerace

Kompozitní materiály tuhnou radikálovou polymerací. Její kvalita je podmínkou pro dosažení optimálních mechanických a estetických vlastností kompozitu, ale také k omezení množství látek uvolňovaných z jeho struktury, které mohou mít nežádoucí biologické účinky (Van Landuyt et al., 2011). I v případě optimální polymerace bývá konverze monomerů, přesněji konverze jejich dvojných vazeb stanovená infračervenou spektroskopií, 50-70 % (Anusavice & Phillips, 2003). Zbývajících 30-50 % dvojných vazeb zůstává nezreagovaných, přičemž se může jednat o dimethakryláty, které jsou jednou skupinou vázány v polymerním řetězci, nebo o nezreagované monomery.

Polymerace kompozitních materiálů může být iniciována chemicky a/nebo světlem. V současnosti převládá fotoiniciace, jejíž hlavní výhodou je tuhnutí materiálu tzv. na povel („on demand“) po ozáření světlem. Chemická iniciace se v dnešní době využívá zejména v případech, kdy dostatečná světelná aktivace není možná, a zajišťuje ji obvykle dibenzoylperoxid ve směsi s terciárními aromatickými aminy (Anusavice & Phillips, 2003). Mezi fotoiniciačními systémy je nejčastěji používána směs kafrechinonu, jehož maximum světelné absorpce je přibližně 470 nm, a terciárního aminu (Ferracane, 2011). Nevýhodou tohoto systému je intenzivní žlutá barva kafrechinonu, nízký kvantový výtěžek a přítomnost aminů, které mohou mít nežádoucí účinky na lidský organismus. Z těchto důvodů se v poslední době používají i jiné fotoiniciátory, např. 1-fenyl-1,2-propandion (PPD), acylfosfinoxydy (např. 2,4,6-trimethylbenzoyldifenylfosfinoxid neboli Lucirin TPO), a benzoylgermany (např. bis(4-methoxybenzoyl)diethylgerman neboli Ivocerin) (Moszner et al., 2008). Mezi výhody Lucirinu TPO a Ivocerinu patří, že nepotřebují aminový koiniciátor, mají vyšší kvantový výtěžek a méně výrazné zbarvení než kafrechinon. Jejich nevýhodou však je, že maximum světelné absorpce leží v oblasti kratších vlnových délek,

u Ivocerinu přibližně při 410 nm, u Lucirinu TPO dokonce pod 390 nm. V této části spektra, která odpovídá fialovému světlu, je intenzita vyzařování většiny LED polymeračních lamp omezená, proto se tyto fotoiniciátory obvykle používají v kombinaci s kafřichinonem (Price et al., 2015; Rueggeberg, 2011).



Obr. 5: Struktura používaných fotoiniciátorů.

Zavedení nových fotoiniciátorů a vývoj vysoce výkonných polymeračních lamp se širokým emisním spektrem vyvolaly diskusi, zda je možné zkrátit dobu ozáření kompozitních materiálů ze standardních 20 s až na 3-5 s. Teoretickým podkladem pro zkrácení doby ozáření je zákon reciprocity, známý jako „Bunsen-Roscoe law“ i z jiných oblastí fotochemie. Podle tohoto zákona je při dané světelné energii kvalita polymerace stejná nezávisle na tom, zda byla použita nižší intenzita světla a delší doba ozáření nebo vyšší intenzita světla a kratší doba ozáření. Některé studie platnost tohoto zákona potvrdily (AlShaafi, 2017; Bortolotto et al., 2013; Emami et al., 2003; Emami & Soderholm, 2003; Halvorson et al., 2002; Nomoto et al., 1994; Schneider et al., 2006), ale v jiných se ukázalo, že zkrácená doba ozáření může i přes proporční zvýšení intenzity světla vyústit v nižší kvalitu polymerace (Asmussen & Peutzfeldt, 2005; Giorgi et al., 2015; Hadis et al., 2011; Leprince et al., 2011; Musanje & Darvell, 2003; Palin et al., 2014; Peutzfeldt & Asmussen, 2005; Wydra et al., 2014). To může vést ke zvýšenému uvolňování látek ze struktury kompozitu a zhoršení jeho mechanických vlastností, např. pevnosti či tvrdosti. V případě tvrdosti je korelace s konverzí monomerů tak silná, že se měření mikrotvrdosti běžně používá k hodnocení kvality polymerace (Ferracane, 1985; Rueggeberg & Craig, 1988).

1.2.2 Adhezivní systémy

Adhezivní systémy jsou „tkáňová lepidla“, která zajišťují vazbu kompozitních materiálů k tvrdým zubním tkáním. Tím umožňují méně invazivní preparaci než při použití amalgámu, u něhož je pro dosažení makromechanické retence nutné preparovat podsekřiviny. Primárním mechanismem adheze je mikromechanická vazba, která na sklovině vzniká polymerací adhezivního systému v povrchových nerovnostech a na dentinu vytvořením tzv. hybridní vrstvy. U adheziv obsahujících kyselé methakryláty však může vznikat i chemická vazba s vápníkem obsaženým v hydroxyapatitu, který je základním minerálem tvrdých zubních tkání (Van Meerbeek et al., 2020).

Složení adheziv je velmi variabilní (Van Landuyt et al., 2007), ale mezi jejich základní složky obecně patří:

- leptadla, obvykle kyselina fosforečná nebo kyselé methakryláty, např. 10-methakryloxydecyl dihydrogen fosfát (10-MDP),
- hydrofilní monomery, nejčastěji 2-hydroxyethyl methakrylát (HEMA),
- rozpouštědla, např. ethanol, aceton, nebo jejich směs s vodou,
- hydrofobní monomery, obvykle TEGDMA s příměsí UDMA a/nebo Bis-GMA,
- iniciační systém – pro světelnou iniciaci nejčastěji kafrechinon-amin, případně ve směsi s Lucirinem TPO; pro chemickou iniciaci dibenzoyl peroxid a terciární aromatický amin.

V některých adhezivech jsou podobně jako v kompozitech obsaženy i částice plniva, ale jejich obsah je podstatně nižší. Ve srovnání s kompozity mají adheziva také výrazně nižší viskozitu, aby dobře zatékala do povrchových nerovností, a obvykle dosahují nižšího stupně polymerace, což je způsobeno obsahem rozpouštědel v jejich složení a též vlhkostí dentinu (Van Meerbeek et al., 2020). Adheziva však tvoří jen tenkou vrstvu na rozhraní mezi tvrdými zubními tkáněmi a kompozitem, kterým jsou téměř kompletně překryta, proto je riziko uvolňování látek z jejich struktury do dutiny ústní omezené.

Pojem adhezivum se využívá i v ortodoncii, kde je jeho pojetí širší. Jedná se o prostředky používané k fixaci ortodontických zámků ke sklovině a k vytvoření attachmentů. Ortodontická adheziva se proto svým složením podobají spíše kompozitům nebo skloionomerním cementům, které jsou předmětem následující kapitoly.

1.2.3 Skloionomerní cementy

Skloionomerní cementy jsou stejně jako kompozity výplňovými materiály v barvě zubu. Jejich hlavními výhodami jsou chemická vazba k tvrdým zubním tkáním a některým kovům bez použití adheziv, antikariogenní působení fluoridových iontů a oproti kompozitům také rychlost aplikace a vyšší tolerance k vlhkosti pracovního pole. Skloionomerní cementy jsou proto vhodné u pacientů s vysokým rizikem vzniku zubního kazu a u dětí v dočasném chrupu. Naopak mezi nevýhody skloionomerních cementů patří vysoká citlivost na sorpci či ztrátu vody a oproti kompozitům horší mechanické i estetické vlastnosti. Proto se ve stálém chrupu skloionomerní cementy používají především pro zhotovení dlouhodobě provizorních výplní, případně jako podložkové a tmelící materiály (Sidhu & Nicholson, 2016).

Hlavními složkami skloionomerních cementů jsou částice fluorohlinitokřemičitého skla s vysokým obsahem vápníku a vodný roztok polyalkenoátových kyselin, např. polyakrylové, polymaleinové a polyitakonové. Jejich smísením dochází k rozpouštění povrchu skelných částic a uvolnění iontů vápníku, hliníku a fluoru, přičemž k iniciálnímu ztuhnutí materiálu dochází vytvořením iontových vazeb mezi vápenatými ionty a karboxylovými skupinami polykyselin. Během následujících dnů až týdnů probíhá maturace cementu, kdy vznikají hlinité soli polykyselin a zlepšují se mechanické a estetické vlastnosti cementu (Nicholson, 1998).

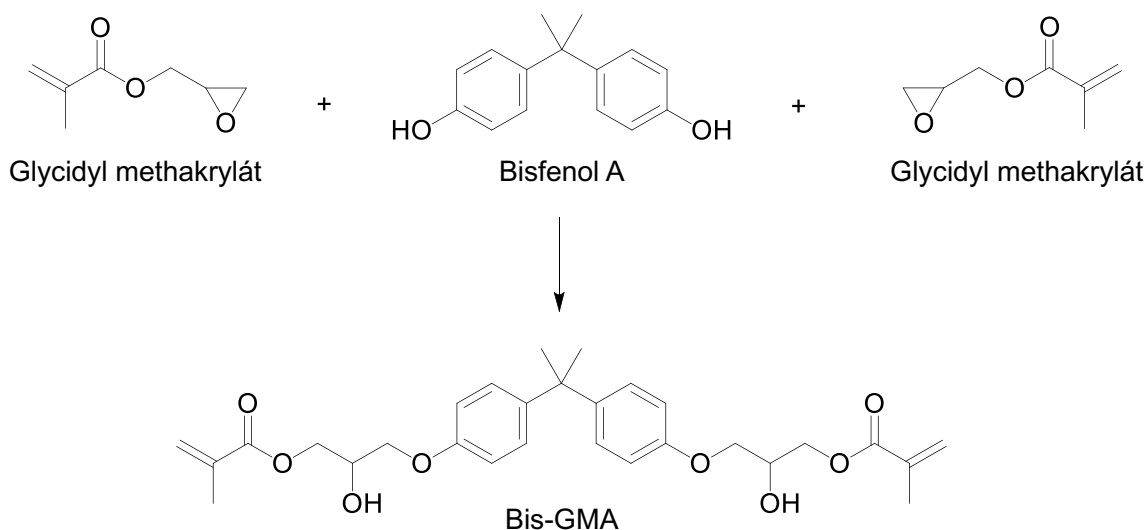
U chemicky tuhoucích skloionomerů není možné regulovat pracovní čas, což stimulovalo vývoj pryskyřici modifikovaných neboli hybridních skloionomerních cementů, jejichž ztuhnutí může být iniciováno světlem (McCabe, 1998). Kromě výše uvedených složek obsahují tyto cementy i methakrylátové monomery a iniciátory radikálové polymerace, většinou systém kafrechinon-amin, který umožňuje jejich ztuhnutí „na povel“ podobně jako v případě kompozitů. Vzhledem k obsahu vody je základním monomerem v hybridních skloionomerních cementech HEMA, který je díky hydroxylové skupině amfifilní a nemá tudíž tendenci k fázové separaci. Nevýhodou HEMA je jeho silný alergenní potenciál a hydrofilií podmíněná absorpce vody, vedoucí k bobtnání a pigmentaci hybridních skloionomerních cementů (Nicholson & Czarnecka, 2008). Kromě HEMA mohou být v malé míře zastoupeny i vícefunkční hydrofobní methakryláty jako Bis-GMA, UDMA či TEGDMA (Mazzaoui et al., 2002; Rogalewicz et al., 2006), které zvyšují síťovou hustotu polymerní matrice.

1.2.4 Polykarbonáty

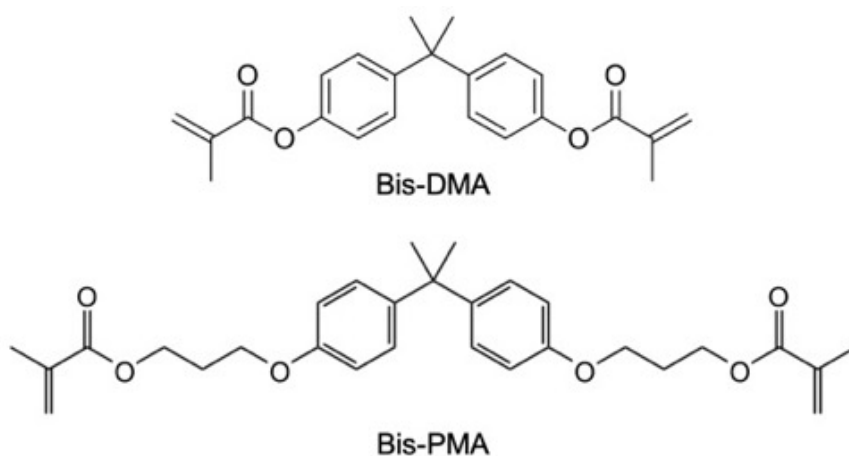
Použití polykarbonátů v zubním lékařství zdaleka není tak široké jako v případě kompozitních materiálů a skloionomerních cementů. Jedná se však o polymery obsahující v řetězci vysoký podíl jednotek BPA, a proto by polykarbonáty mohly představovat jeho nezanedbatelný zdroj. Využití polykarbonátů pro zubní lékařství zahrnuje výrobu především průhledných ortodontických zámků a provizorních korunek. Polykarbonáty se dále mohou využívat ke zhotovení bazí snímatelných zubních náhrad jako alternativa PMMA a polyamidů. Výhodou polykarbonátů je, že oproti PMMA mají vyšší pevnost a lomovou houževnatost, takže polykarbonátové náhrady mohou být ve srovnání s PMMA tenčí (Edelhoff et al., 2019). Toho se využívá při zhotovování nákusných dlah, které při zvolení vhodného odstínu polykarbonátu působí velmi přirozeně na rozdíl od dlah z PMMA, jejichž tloušťka a nevyhovující vzhled snižovaly ochotu pacientů je pravidelně používat (Edelhoff et al., 2017). Vzhledem k velkému povrchu a hmotnosti by však polykarbonátové dlahy mohly být významným zdrojem BPA, což dosud nebylo ověřeno.

1.3 Dosavadní poznatky o uvolňování BPA z dentálních materiálů

Na uvolňování BPA z dentálních polymerních materiálů má vliv mnoho faktorů, především kvalita polymerace, která ovlivňuje množství volných monomerů i propustnost materiálu pro rozpouštědla (Van Landuyt et al., 2011). Kompozitní materiály, adhezivní systémy ani skloionomerní cementy volný BPA neobsahují, může však být přítomen ve stopových množstvích jako kontaminant ze syntézy monomerů typu Bis-GMA (Obr. 6). BPA se může uvolňovat i jako degradační produkt polymerů, v jejichž struktuře se jednotka BPA vyskytuje (De Nys, Duca, et al., 2021; Fleisch et al., 2010; Kechagias et al., 2020; Löfroth et al., 2019). U kompozitů, adheziv a skloionomerních cementů se kromě zmíněných Bis-GMA a Bis-EMA může jednat také o propoxylovaný bisfenol A-dimethakrylát (Bis-PMA). V pečetidlech může být obsažen i Bis-DMA (bisfenol A-dimethakrylát), kde je BPA vázán esterovou vazbou (Obr. 7). Ta je náchylnější k hydrolytickému rozkladu než etherová vazba v monomerech Bis-GMA, Bis-EMA a Bis-PMA (Atkinson et al., 2002; Schmalz et al., 1999), a proto může být uvolňování BPA z pečetidel vyšší.



Obr. 6: Schéma syntézy Bis-GMA.



Obr. 7: Další monomery se strukturní jednotkou BPA.

V reakci na obavy z uvolňování BPA bylo vyvinuto několik „BPA-free“ materiálů, u nichž byly monomery se strukturní jednotkou BPA eliminovány. Úplné nahrazení monomerů typu Bis-GMA je však obtížné, neboť mají velmi výhodné fyzikální, chemické a mechanické vlastnosti. Alternativou je vývoj materiálů se zcela jinou strukturou monomerů, mezi které se řadí např. ormocery (**organically modified ceramic**), které byly původně vyvinuty v 90. letech ve snaze snížit polymerační kontrakci (Wolter et al., 1994). Prekurzorem ormocerů jsou alkoxyasilany, přičemž výsledný materiál je tvořen křemičitými doménami, na něž jsou navázány polymerovatelné (meth)akrylátové skupiny. Tyto materiály mají při vhodně zvoleném složení a podmínkách přípravy nižší polymerační kontrakci než konvenční kompozity a velmi dobré optické vlastnosti (Moszner & Salz, 2001).

1.3.1 Analytické metody

BPA se z dentálních materiálů obvykle uvolňuje ve stopových množstvích, proto je při jeho kvantifikaci zásadní použít citlivé analytické metody. V publikovaných studiích byly použity následující metody:

- ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay),
- plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Gas Chromatography-Mass Spectrometry; GC-MS),
- vysoce účinná kapalinová chromatografie s ultrafialovo-viditelnou spektrometrií (High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet-Visible Spectrometry; HPLC-UV/VIS),
- kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry; LC-MS),
- kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry; LC-MS/MS),
- ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry; UHPLC-MS/MS).

S výjimkou imunochemické metody ELISA jsou výše uvedené metody založeny na separaci molekul v analytu pomocí chromatografie s jejich následnou identifikací UV/VIS nebo MS. Jejich sensitivita a specifická se postupně zvyšovaly, protože separace analytů na moderních vysoce účinných kolonách s gradientovou elucí je efektivnější a identifikace molekul podle jejich hmotnosti je přesnější než podle retenčního času využívaného UV/VIS detekcí. Ještě přesnější je MS/MS, kde se využívá propojení více hmotnostních spektrometrů. Dalšího zpřesnění lze docílit použitím derivatizace BPA, která se provádí např. pomocí pyridin-3-sulfonylchloridu (De Nys et al., 2018) nebo dansylchloridu (Kolatorova Sosvorova et al., 2017; Vitku et al., 2015). Citlivost metody lze popsat pomocí limitu detekce (limit of detection, LOD) nebo spodního limitu kvantifikace (lower limit of quantification, LLOQ). LOD odpovídá nejnižší koncentraci, při níž je možné potvrdit přítomnost dané látky ve vzorku, ale není možné stanovit její množství. Kvantitativní hodnocení je možné nad LLOQ, který odpovídá nejnižší spolehlivě stanovitelné koncentraci dané látky. V případě, že jsou hodnoty nižší nebo blízké LLOQ, spolehlivost výsledků klesá, proto je vhodné hodnotu LLOQ uvádět. Ve studiích zabývajících se uvolňováním BPA z dentálních materiálů bohužel tento údaj často chybí. Nejvyšší publikovaný LLOQ byl 0,5 µg/ml (Polydorou,

König, et al., 2009), což pro stanovení stopových množství BPA nemusí být dostatečné. Současné UHPLC-MS/MS proto dosahují LLOQ okolo 0,1 ng/ml (Becher et al., 2018; De Nys, Putzeys, et al., 2021).

1.3.2 *In vivo* studie

Jednou z prvních prací popisujících uvolňování BPA z dentálních materiálů byla studie Olea a kol., v níž byl 18 dobrovolníkům na všechny moláry aplikován pečetící materiál Delton (Dentsply, Kostnice, Německo), celkem asi 50 µg. Hodinu po aplikaci byly odebrány vzorky sliny a v nich byla pomocí HPLC-MS naměřena vysoká množství BPA (90-931 µg) (Olea et al., 1996). To vyvolalo obavy, ale následující studie uvedené hodnoty nepotvrdily, což vedlo k domněnce, že Olea a kol. zaměnili signál BPA za TEGDMA, neboť za daných podmínek stanovení měly podobný retenční čas (Hamid & Hume, 1997). Pozdější *in vivo* studie prokázaly přítomnost nízkých koncentrací BPA ve slině po aplikaci dentálních kompozitů, pečetidel či ortodontických adheziv, ale jen po dobu několika hodin (Arenholt-Bindslev et al., 1999; Berge et al., 2019; Fung et al., 2000; Joskow et al., 2006; Kang et al., 2011; Lee et al., 2017; Sasaki et al., 2005; Zimmerman-Downs et al., 2010). V souvislosti s aplikací pečetidel bylo popsáno i přechodné zvýšení koncentrace BPA v moči (Berge et al., 2019; Joskow et al., 2006; Kang et al., 2011), podle výsledků průřezové studie provedené v Jižní Koreji by nicméně mohlo k uvolňování BPA docházet i v delším časovém horizontu. Tato studie totiž ukázala významně zvýšené hodnoty BPA v moči dětí s 11 a více zubními ploškami ošetřenými pečetidly nebo kompozity v porovnání s dětmi bez ošetření (Chung et al., 2012). V současné době však nelze zdravotní rizika související s uvolňováním BPA z dentálních materiálů jednoznačně posoudit, neboť vztah patologických stavů s množstvím BPA uvolněného z dentálních materiálů dosud nebyl objasněn (Löfroth et al., 2019).

1.3.3 *In vitro* studie

Uvolňováním BPA z dentálních materiálů se zabývalo mnoho *in vitro* studií, ale porovnání naměřených hodnot je z důvodu absence standardní metodiky obtížné. Hlavní rozdíly spočívají v:

- testovaných materiálech,
- tvaru, velikosti a přípravě zkušebních tělísek,
- extrakčních médiích (slina, umělé slina, voda, methanol, ethanol aj.),
- extrakčních podmínkách a délce expozice (<1 h až 1 rok),
- analytických metodách (HPLC, GC-MS, LC-MS, LC-MS/MS, UHPLC-MS/MS).

Testovaný materiál ovlivňuje naměřené hodnoty zejména svým složením, protože může obsahovat různá množství monomerů se strukturální jednotkou BPA. Záleží nicméně i na způsobu přípravy zkušebních tělísek, např. podmínkách polymerace. V některých studiích byly výluhy připraveny z nezpolymerovaného materiálu, u něhož lze očekávat vyšší uvolňování jeho složek než v případě, že byl zpolymerován (Van Landuyt et al., 2011). Množství uvolněných látek závisí také na hmotnosti, tvaru a velikosti povrchu zkušebních tělísek i délce expozice extrakčnímu médiu. U extrakčních médií obecně platí, že organická rozpouštědla pronikají do hydrofobních materiálů lépe než vodné roztoky, a proto jsou množství látek uvolněných do organických rozpouštědel obvykle vyšší než do vodných roztoků (Van Landuyt et al., 2011). Podstatným faktorem je i objem extrakčního média, který by podle norem řady ISO 10993 měl být alespoň 10 ml na 1 g testovaného materiálu, aby bylo dosaženo maxima koncentračního spádu ve směru uvolňování sledované látky. Význam analytických metod byl již naznačen v kapitole 1.3.1 a bude dále diskutován i v závěru této kapitoly.

Porovnání naměřených hodnot dále komplikuje i prezentace výsledků v různých jednotkách. Někteří autoři uvádějí naměřené koncentrace BPA ve výluhu ($\mu\text{g/l}$, $\mu\text{g/ml}$, ng/ml , mmol/l , $\mu\text{mol/l}$, $\mu\text{mol/ml}$, pmol/ml , ppm , ppb), jiní množství uvolněného BPA vztažené na plochu (ng/cm^2 , mmol/mm^2 , pmol/mm^2) či na hmotnost ($\mu\text{g/g}$, ng/g , ng/mg , pg/mg) zkušebních tělísek. Přepočet je zdánlivě snadný, ale je pro něj nutné v textu dohledat množství extrakčního média, resp. velikost a/nebo hmotnost zkušebních tělísek, které mnohdy nejsou uvedeny. Bylo by proto vhodné používané jednotky standardizovat, o což se pokusili Van Landuyt a kol. v meta-analýze uvolňování látek z dentálních polymerních materiálů (Van Landuyt et al., 2011). Vzhledem k tomu, že v této práci byla nalezena pozitivní korelace mezi množstvím uvolněných látek a velikostí povrchu zkušebních tělísek, bylo navrženo používání jednotky $\mu\text{mol/mm}^2$. Je nicméně nutné poznamenat, že u většiny studií zařazených do zmíněné meta-analýzy byl expoziční čas pouze 24 hodin a lze předpokládat, že při delších expozicích by korelace s velikostí povrchu byla slabší. Celkové množství uvolněných látek totiž závisí spíše na množství materiálu, resp. objemu zkušebního tělíska.

1.3.3.1 Pečetidla

Krátce po zveřejnění kontroverzní *in vivo* studie Olea a kol. bylo uvolňování BPA z pečetidel hodnoceno v několika *in vitro* studiích. Jednu z těchto studií provedla stejná skupina autorů, která ve vodných výluzích 50 mg pečetidla Delton po 24 hodinách pomocí HPLC-MS

naměřila $42,8 \pm 2,7$ $\mu\text{g/ml}$ (Pulgar et al., 2000). Uvolňování BPA z Delton potvrdili Mazzaoui a kol., kteří pomocí HPLC-MS detekovali BPA ve vodě, 50% ethanolu i 75% ethanolu ve všech sledovaných intervalech, tedy po 1, 7, 30 i 90 dnech vyluhování. Naměřené hodnoty se pohybovaly od $14,9 \pm 9,2$ $\mu\text{g/ml}$ ve vodě po 1 dni do $140 \pm 20,7$ $\mu\text{g/ml}$ v 75% ethanolu po 90 dnech (Mazzaoui et al., 2002). Přestože se jedná o koncentrace srovnatelné s Pulgar a kol., objem extrakčního média i množství testovaného materiálu bylo různé, proto je přesné porovnání hodnot nemožné. Z nedávných studií byla pečetidla hodnocena v práci Becher a kol. pomocí UHPLC-MS/MS s LLOQ 0,1 ng/ml, kde uvolňování BPA ze zpolymerovaného Delton ve vodě po 24 hodinách dosáhlo $9,6 \pm 2,2$ ng/ml, zatímco z neopolymerovaného materiálu se uvolnilo 87 ± 26 ng/ml (Becher et al. 2018). I přes rozdíly v metodice lze konstatovat, že tyto hodnoty jsou řádově nižší než v předchozích studiích, což ukazuje význam použití dostatečně citlivých analytických metod. Studie Becher a kol. navíc ukázala, že uvolňování BPA z dalších dvou pečetidel bylo zanedbatelné (Becher et al. 2018). Jiná komerční pečetidla než Delton byla testována i v dalších studiích. Jejich vzorky byly vyluhovány po dobu 24 hodin ve vodě (Geurtsen et al., 1999; Hamid & Hume, 1997), respektive 4 minut v ethanolu (Nathanson et al., 1997), ale v žádném z výluhů nebyl BPA detekován. Je nicméně nutné poznamenat, že v těchto studiích nebyl specifikován LOD ani LLOQ, nelze tudíž vyloučit, že uvolněná množství BPA byla nižší než limity použitých metod. Výjimkou byla práce Hamida a Huma, v níž byla použita HPLC metoda s LOD 0,07–0,09 $\mu\text{g/ml}$ (Hamid & Hume, 1997).

1.3.3.2 Kompozitní materiály

Po roce 2000 se pozornost spojená s uvolňováním BPA přesunula od pečetidel ke kompozitním materiálům, u nichž byla eluce BPA potvrzena v mnoha studiích (Becher et al., 2018; De Nys, Putzeys, et al., 2021; De Nys et al., 2018; Durner et al., 2011; Imai & Komabayashi, 2000; Manabe et al., 2000; Polydorou, Hammad, et al., 2009; Polydorou, König, et al., 2009; Pulgar et al., 2000). Podle meta-analýzy Van Landuyt a kol. z roku 2011 bylo průměrné množství BPA uvolněné za 24 hodin do vodných médií $0,0024$ nmol/mm³ ($0,55$ ng/mm³) a do organických médií $0,011$ nmol/mm³ ($2,43$ ng/mm³) (Van Landuyt et al., 2011). V nedávných pracích, kde byla použita vysoce citlivá metoda UHPLC-MS/MS, byla ve srovnání s uvedenými průměry naměřena více než $10\times$ nižší množství uvolněného BPA, což může být dáno sníženou spolehlivostí méně citlivých metod v koncentracích blízkých LLOQ. Ve studii Becher a kol. se za 24 hodin do vody nejvíce BPA uvolnilo z Tetric EvoCeram (Ivoclar Vivadent, Schaan, Lichtenštejnsko), přičemž hodnota $2,3 \pm 0,2$ ng/cm²

po přepočtu odpovídá $0,04 \pm 0,003 \text{ ng/mm}^3$ (Becher et al. 2018). Podobné maximální hodnoty byly naměřeny ve studii De Nys a kol., v níž se za 24 hodin do umělé sliny uvolnilo nejvyšší množství BPA z kompozitu Solitaire 2 (Kulzer, Hanau, Německo) – uvedená hodnota $0,101 \pm 0,016 \text{ pmol/mm}^2$ odpovídá $0,03 \pm 0,004 \text{ ng/mm}^3$ (De Nys et al., 2018). V další studii této skupiny autorů se za 48 hodin do vody uvolnilo nejvíce BPA z Filtek Supreme XTE ($21,4 \pm 2,3 \text{ pg/mg}$) a nejméně z Ceram.x Spectra ST HV (Dentsply DeTrey, Kostnice, Německo) ($6,0 \pm 0,5 \text{ pg/mg}$). Vzhledem k objemu tělísek $47,5 \text{ mm}^3$ lze jejich hmotnost odhadovat na 0,12 g, takže by tyto hodnoty odpovídaly $0,05 \pm 0,005 \text{ ng/mm}^3$ u Filtek Supreme XTE a $0,015 \pm 0,001 \text{ ng/mm}^3$ u Ceram.x Spectra ST HV (De Nys et al., 2022). Za zmínku stojí, že v této studii byla použita metoda s LLOQ $0,073 \text{ ng/ml}$, již se podařilo dosáhnout derivatizací BPA pyridin-3-sulfonyl chloridem (De Nys et al., 2022).

Použití dostatečně citlivých metod je také nezbytné ke zhodnocení dlouhodobého uvolňování nízkých koncentrací BPA, které mohou mít významný vliv na lidský organismus. Tímto problémem se zabývali Ortengren a kol. (Ortengren et al., 2001), ale pomocí HPLC-UV/VIS u žádného z šesti testovaných kompozitních materiálů po 180 dnech ve vodě BPA nedetekovali. V pozdější studii (Polydorou, König, et al., 2009) byly testovány tři materiály – nanohybridní kompozit Filtek Supreme XT (3M ESPE, Seefeld, Německo), ormocer Ceram X (Dentsply DeTrey, Kostnice, Německo) a chemicky tuhnoucí dostavbový kompozit Clearfil Core (Kuraray Europe, Düsseldorf, Německo). Jejich výluhy v 75% ethanolu odebrané po 24 hodinách, 7 dnech, 28 dnech a 1 roce byly analyzovány pomocí LC-MS/MS s LLOQ $0,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$. BPA byl detekován ve výluzích ormoceru CeramX s výjimkou měření po 1 roce, u ostatních testovaných kompozitů nebyl BPA detekován vůbec (Polydorou, König, et al., 2009). To bylo pravděpodobně způsobeno nedostatečnou citlivostí použité metody, protože De Nys a kol. využili UHPLC-MS/MS s LLOQ $0,78 \text{ pmol/ml}$ ($0,18 \text{ ng/ml}$) a BPA detekovali ve všech hodnocených intervalech (1 týden až 1 rok) (De Nys, Putzeys, et al., 2021). Testovány byly čtyři kompozitní materiály – Filtek Supreme XTE (3M ESPE, Seefeld, Německo), Ceram.x mono (Dentsply DeTrey, Kostnice, Německo), G-ænial Posterior (GC Europe, Leuven, Belgie) a Venus (Kulzer, Hanau, Německo). Z nich byla připravena zkušební tělíska, která byla ponořena do 1 ml vody nebo 100% ethanolu, a jejich výluhy byly odebírány týdně po dobu prvních čtyř týdnů a následně každé další čtyři týdny až do 1 roku. Nejvyšší koncentrace BPA ve výluzích byly naměřeny v prvním týdnu u G-ænial Posterior – $18,7 \pm 1,1 \text{ pmol/ml}$ ve vodě a $147,3 \pm 5,9 \text{ pmol/ml}$ v ethanolu, což v přepočtu na objem tělísek odpovídá $0,08 \pm 0,004 \text{ ng/mm}^3$ ve vodě

a $0,59 \pm 0,02$ ng/mm³ v ethanolu. Uvolňování BPA v malých množstvích bylo detekováno až do konce sledovaného období (De Nys, Putzeys, et al., 2021).

Testována byla i hydrolytická odolnost jednotlivých monomerů. Schmalz a kol. ve slině pomocí HPLC-UV/VIS testovali stabilitu Bis-GMA a Bis-DMA a zjistili, že k hydrolyze Bis-GMA na BPA téměř nedochází, zatímco Bis-DMA se během 24 hodin z většiny rozložil na BPA (Schmalz et al., 1999). Tyto výsledky potvrdily i pozdější studie. Atkinson a kol. zjistili, že se Bis-DMA po 24 hodinách při 37 °C ve slině z téměř 90 % rozložil na BPA (Atkinson et al., 2002), zatímco Koin a kol. testovali Bis-GMA a nezjistili žádný rozklad na BPA ani po 2 týdnech v destilované vodě (Koin et al., 2008). V nedávné studii však bylo velmi citlivou UHPLC-MS/MS metodou zjištěno, že k rozkladu Bis-GMA na BPA může dojít – míra rozkladu byla po 24 hodinách ve slině 0,0003 % a po 48 hodinách expozice *Streptococcus mutans* 0,0006 %. O něco náchylnější k rozkladu byl monomer Bis-EMA, přeměna na BPA ve slině dosáhla 0,0017 % a bakteriální degradací došlo k přeměně 0,0025 % Bis-EMA na BPA (De Nys, Duca, et al., 2021).

1.3.3.3 Adhezivní systémy

Uvolňováním BPA z adhezivních systémů se zabývalo méně prací, pravděpodobně proto, že jsou aplikovány ve velmi tenkých vrstvách (10-50 μm) a jsou překryty kompozitními materiály, takže jejich styk s dutinou ústní je minimální. Z adheziva Scotchbond MultiPurpose (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) se podle Mazzaoui a kol. za 24 hodin uvolnilo do vody $76,9 \pm 4,6$ μg/ml a do 50% ethanolu $265,3 \pm 35,6$ μg/ml, což po přepočtu na objem tělíska odpovídá $30,7 \pm 1,8$ μg/mm³ ve vodě a $105,7 \pm 14,2$ μg/mm³ v 50% ethanolu (Mazzaoui et al., 2002). V nedávné studii byl hodnocen nástupce tohoto adheziva, Scotchbond Universal (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) a Clearfil SE Bond 2 (Kuraray Noritake Dental, Tokio, Japonsko) (De Nys et al., 2022). Zpolymerovaná zkušební tělíska byla inkubována ve vodě po dobu 48 hodin při 37 °C za stálé rotace (230 otáček za minutu) a množství uvolněného BPA bylo hodnoceno UHPLC-MS/MS metodou s LLOQ 0,073 ng/ml. Množství uvolněného BPA bylo $4,1 \pm 1,8$ ng/g Scotchbond Universal a $2,8 \pm 0,5$ ng/g Clearfil SE Bond 2 (De Nys et al., 2022). Pro srovnání se studií Mazzaoui a kol. jsme odhadli hmotnost tělísek na 0,07 g, což umožnilo přepočet množství BPA na objem tělíska. V případě Scotchbond Universal to bylo $0,006 \pm 0,003$ ng/mm³, zatímco z Clearfil SE Bond 2 se uvolnilo $0,004 \pm 0,001$ ng/mm³, tedy řádově méně než z Scotchbond MultiPurpose (Mazzaoui et al., 2002). Množství BPA uvolněného ze Scotchbond Universal bylo také asi

desetkrát nižší než u kompozitů (Becher et al., 2018; De Nys, Putzeys, et al., 2021), kde je koncentrace Bis-GMA vyšší než v adhezivech.

1.3.3.4 Ortodontická adheziva

Bylo provedeno také několik studií uvolňování BPA z ortodontických adheziv. V první z nich bylo na ocelové zámky nanášeno standardizované množství chemicky tuhneoucího, resp. světlem tuhneoucího adheziva, a adhezivum bylo i se zámky ponořeno v 99% ethanolu po dobu 1 dne až 5 týdnů (Eliades et al., 2007). K analýze výluhů byla využita HPLC-UV/VIS metoda s LOD 0,1 ng/ml a BPA nebyl detekován v žádném z výluhů, pravděpodobně z důvodu malého množství adheziva (Eliades et al., 2007). Stejná metodika byla použita i v další studii, kde byl sledován vliv vzdálenosti polymerační lampy na uvolňování BPA a stupeň konverze světlem tuhneoucího adheziva (Sunitha et al., 2011). Nejméně BPA se uvolnilo, pokud bylo adhezivum polymerováno z bezprostřední vzdálenosti ($14,4 \pm 0,01$ ng/ml). Pokud byla vzdálenost polymerační lampy 5 mm, zvýšilo se uvolňování BPA na $38,3 \pm 0,004$ ng/ml a nejvyšší hodnoty byly naměřeny při polymeraci ze vzdálenosti 10 mm ($63,7 \pm 0,008$ ng/ml). Se vzdáleností klesal také stupeň konverze dvojných vazeb monomerů v adhezivu, což potvrzuje předpoklad, že při snížené kvalitě polymerace je uvolňování BPA vyšší (Sunitha et al., 2011). V poslední z publikovaných studií bylo testováno uvolňování BPA ze světlem tuhneoucího adheziva použitého k fixaci retaineru (Eliades et al., 2011). Po inkubaci ve vodě po dobu 10-30 dní byly výluhy analyzovány pomocí GC-MS a BPA byl nalezen ve všech výluzích (Eliades et al., 2011).

1.3.3.5 Polykarbonáty

Uvolňováním BPA z polykarbonátů se zabývali výhradně japonští autoři. Suzuki a kol. testovali polykarbonátové ortodontické zámky a baze snímatelných zubních náhrad (Suzuki et al., 2000). Testované materiály byly vyluhovány ve vodě či ethanolu buď rozdrcené nebo vcelku po dobu 1 hodiny. HPLC-MS metodou bylo změřeno, že se ve vodě z ortodontických zámků uvolnilo 0,01-0,4 μg BPA na 1 g polykarbonátu a v ethanolu 0,15-9,42 $\mu\text{g/g}$. Rozdrcení zámků vedlo ke zvýšení naměřených hodnot na 0,5-4,22 $\mu\text{g/g}$ ve vodě a 2,54-22,24 $\mu\text{g/g}$ v ethanolu. Z polykarbonátu k výrobě bazí snímatelných náhrad se uvolnilo 0,01-0,09 $\mu\text{g/g}$ ve vodě a 0,12-0,21 $\mu\text{g/g}$ v ethanolu, přičemž rozdrcení na prach tyto hodnoty zvýšilo na 0,14-1,08 $\mu\text{g/g}$ ve vodě a 0,42-3,24 $\mu\text{g/g}$ v ethanolu (Suzuki et al., 2000). Watanabe a kol. měřili pomocí HPLC-UV/VIS uvolňování BPA z ortodontických zámků ve vodě o teplotách 37 °C a 60 °C (Watanabe et al., 2001). Při 37 °C se za 3 měsíce do vody

uvolnilo 0,4 µg/g a uvolňování BPA se postupně zvýšilo až na 3,8 µg/g po 12 měsících. Při 60 °C bylo uvolňování BPA do vody asi 28x rychlejší než při 37 °C. V prvním týdnu se sice uvolnilo jen 0,5 µg/g a do 6. týdne se uvolňování BPA zvyšovalo jen zvolna (5,8 µg/g), ale poté došlo k výraznému nárůstu až na 35,0 µg/g po 14 týdnech (Watanabe et al., 2001). V navazující studii bylo testováno uvolňování BPA z polykarbonátového ortodontického zámku, baze snímatelné náhrady a provizorní korunky ve vodě při 37 °C (Watanabe, 2004). Množství BPA, které se za 34 měsíců inkubace uvolnilo do vody, bylo u ortodontického zámku 37,4±3,56 µg/g, u baze snímatelné náhrady 2,2±0,03 µg/g a u provizorní korunky 2,8±0,32 µg/g (Watanabe, 2004).

1.3.4 Shrnutí

Většina *in vivo* studií sice potvrdila, že dentální materiály mohou přechodně zvýšit koncentraci BPA v tělních tekutinách, ale dosud nebylo objasněno, zda a do jaké míry může toto zvýšení představovat zdravotní riziko. V *in vitro* studiích zase interpretaci výsledků komplikuje metodická nesourodost a fakt, že většina studií sledovala uvolňování BPA jen v krátkých časových intervalech. Uvolňování v dlouhodobém horizontu zatím nebylo dostatečně prostudováno, přestože BPA může mít účinky na lidský organismus i při velmi nízkých dávkách. Z tohoto důvodu je nezbytné použití analytických metod s dostatečnou citlivostí pro stopovou analýzu, aby bylo možné spolehlivě stanovit expozici BPA z dentálních materiálů a odhadnout rizika související s jejich použitím.

2 Hypotézy a cíle práce

Cílem této práce bylo prostudovat kinetiku uvolňování BPA z dentálních kompozitů s monomery na bázi BPA, „BPA-free“ kompozitů, hybridních skloionomerních cementů a polykarbonátů v časovém horizontu několika měsíců pomocí velmi citlivé UHPLC-MS/MS metody. Pro hodnocení byla zvolena dvě extrakční média, methanol k simulaci nejhoršího možného scénáře („worst-case scenario“) a umělá slina, která se více podobá prostředí dutiny ústní. Kromě BPA byly testovány i jeho strukturní analogy BPS, BPF a BPAF, jejichž přítomnost v dentálních materiálech dosud nebyla zkoumána. Hodnocen byl také vliv intenzity a doby ozáření na uvolňování bisfenolů, protože zkracování doby ozáření je jedním ze současných trendů, který však může vést k vyššímu uvolňování monomerů z dentálních kompozitů i skloionomerních cementů.

Pro splnění těchto cílů byla experimentální část disertační práce zaměřena nejprve na výběr polymeračních podmínek a studium jejich vlivu na kvalitu polymerace kompozitních materiálů. Zvolené polymerační podmínky byly aplikovány v následující části, která byla věnována kinetice uvolňování BPA a jeho analogů z kompozitních a skloionomerních materiálů. Závěrečná část této disertační práce se týkala uvolňování BPA z polykarbonátových korunkových náhrad, které byly připraveny moderními technologiemi CAD/CAM (Computer-Aided Design/Computer-Aided Manufacturing).

Nulové hypotézy testované v této práci byly následující:

- 1) není významný rozdíl v uvolňování bisfenolů mezi testovanými typy materiálů,
- 2) uvolňování bisfenolů nezávisí na době expozice testovaných materiálů,
- 3) není významný rozdíl v uvolňování bisfenolů při vyluhování v methanolu a umělé slině,
- 4) alternativní bisfenoly nejsou přítomny,
- 5) polymerační podmínky nemají významný vliv na uvolňování bisfenolů z kompozitů a skloionomerních cementů.

3 Materiály a metody

3.1 Vliv intenzity a doby ozáření na kvalitu polymerace

Pro testování vlivu intenzity a doby ozáření na kvalitu polymerace byly vybrány kompozitní materiály Filtek Ultimate Universal Restorative (FU, odstín A2 Dentin; 3M ESPE, St. Paul, MN, USA), Tetric EvoCeram (TEC, odstín A2; Ivoclar Vivadent, Schaan, Lichtenštejnsko) a Estelite Σ Quick (ESQ, odstín A2; Tokuyama Dental, Tokio, Japonsko), u nichž výrobce doporučuje dobu ozáření 10 s a méně. Testované materiály se dále lišily fotoiniciačními systémy – v případě FU se jedná o kافرchinon-amin, TEC obsahuje směs kافرchinon-amin a Lucirin TPO, zatímco u ESQ je kافرchinon doplněn systémem Radical Amplified Photopolymerization (RAP), který údajně umožňuje rychlejší a efektivnější polymeraci (Ilie et al., 2014; Tokuyama Dental, 2010). Složení těchto materiálů je uvedeno v Tab. 1.

Název materiálu (zkratka; výrobce)	Monomery	Plnivo (podíl plniva)	Iniciační systém (číslo šarže)
Filtek Ultimate Universal Restorative A2 Dentin (FU; 3M ESPE, St. Paul, MN, USA)	Bis-GMA, UDMA, Bis-EMA, TEGDMA, PEGDMA	Nanočástice SiO ₂ a ZrO ₂ a jejich aglomeráty (63 obj. %, 79 hmotn. %)	Kافرchinon-amin (N747514)
Tetric EvoCeram A2 (TEC; Ivoclar Vivadent, Schaan, Lichtenštejnsko)	UDMA, Bis-GMA, Bis-EMA	Barnaté sklo, YF ₃ , směs oxidů, předpolymerované plnivo (53-55 obj. %, 75-76 hmotn. %)	Kافرchinon-amin, Lucirin TPO (U26271)
Estelite Σ Quick A2 (ESQ; Tokuyama Dental, Tokio, Japonsko)	Bis-GMA, TEGDMA	Částice SiO ₂ and ZrO ₂ , kompozitní plnivo (71 obj. %, 82 hmotn. %)	Kافرchinon, RAP systém (E654)

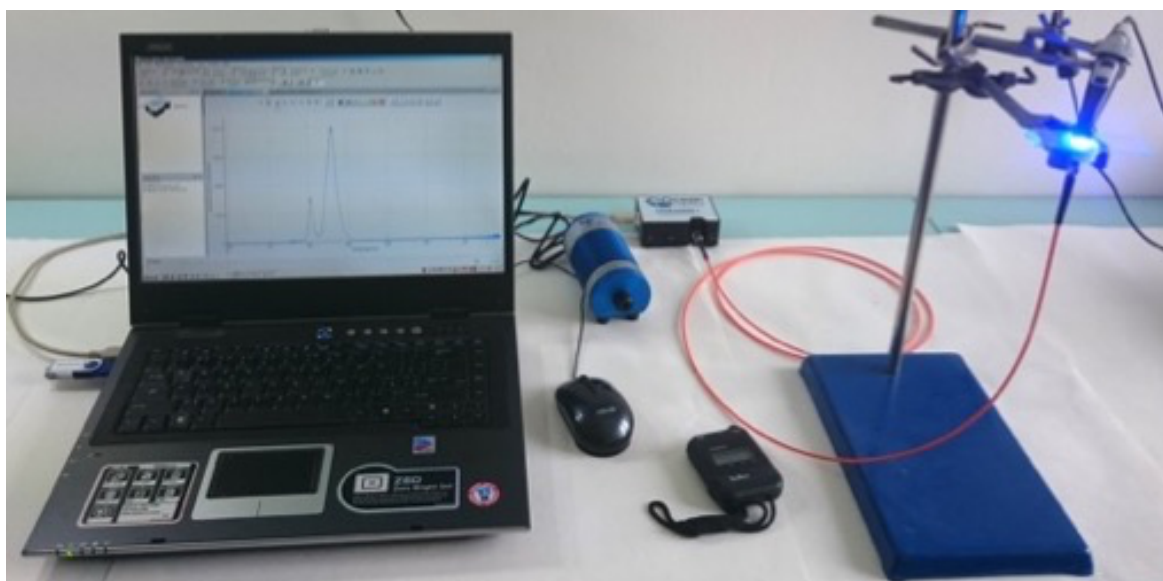
Tab. 1: Složení kompozitů pro testování vlivu polymeračních podmínek na kvalitu polymerace.

Použité zkratky: Bis-GMA: bisfenol A-glycidyl methakrylát, UDMA: urethan dimethakrylát, Bis-EMA: etoxylovaný bisfenol A-glycidyl methakrylát, TEGDMA: triethylenglykol dimethakrylát, PEGDMA: polyethylenglykol dimethakrylát, TPO: 2,4,6-trimethylbenzoyl-difenylfosfinoxid, RAP: Radical Amplified Photopolymerization.

3.1.1 Stanovení podmínek polymerace

K polymeraci byla použita LED polymerační lampa Valo (Ultradent Products, South Jordan, UT, USA) vyzařující světlo v oblastech 380-420 nm a 420-515 nm. Lampa Valo disponuje třemi módy, které se liší intenzitou vyzařování: „Standard“, „High power“ a „Plasma emulation“ s výrobcem deklarovanou intenzitou vyzařování 1000, 1400 and 3200 mW/cm² (Ultradent Products, 2011). Pro kvalitu polymerace je však rozhodující intenzita ozáření povrchu tělísek, která byla měřena pomocí kosinového korektoru CC-3, připojeného prostřednictvím optického vlákna ke spektrometru USB2000+ (vše Ocean Optics, Dunedin,

FL, USA). Průměr difuzoru kosinového korektoru 3,9 mm odpovídal průměru kompozitních tělísek. Celý systém (Obr. 8) byl před měřením kalibrován pomocí zdroje světla HL-3P-CAL (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA). Data byla zpracována pomocí softwaru SpectraSuite Ocean Optics. Měření intenzity ozáření byla provedena pětikrát pro každý mód polymerační lampy za stejných podmínek jako při polymeraci kompozitních vzorků, tj. přes mikroskopické sklo o tloušťce 1 mm a průhlednou plastovou fólii na kosinovém korektoru. Při všech měřeních byla lampa Valo pečlivě vycentrována nad kosinovým korektorem a upevněna tak, aby emitované světlo dopadalo kolmo na povrch kosinového korektoru.



Obr. 8: Aparatura pro měření intenzity ozáření polymerační lampou.

Intenzita ozáření byla nejprve měřena v plném rozsahu vlnových délek (380-515 nm) podle definice ISO 10650. Za výše uvedených experimentálních podmínek byla intenzita ozáření v módech „Standard“, „High power“ a „Plasma emulation“ 1300, 1950 a 2980 mW/cm² (Tab. 2). Měření byla provedena i v rozsahu fialového (380-420 nm) a modrého (420-515 nm) světla, které zajišťují aktivaci Lucirinu TPO, resp. kafrechinonu.

Mód polymerační lampy	Deklarovaná intenzita vyzařování [mW/cm ²]	Naměřená intenzita ozáření (průměr±SD [mW/cm ²])		
		380-515 nm	380-420 nm	420-515 nm
"Standard"	1000	1300±30	195±5 (15,0%)	1105±12 (85,0%)
"High power"	1400	1950±28	333±7 (17,1%)	1617±10 (82,9%)
"Plasma emulation"	3200	2980±30	613±16 (20,6%)	2367±15 (79,4%)

Tab. 2: Srovnání deklarované intenzity vyzařování lampy Valo v jednotlivých módech s naměřenou intenzitou ozáření i s rozdělením na fialovou a modrou oblast spektra.

Ukázalo se, že v módu „Standard“ byl podíl fialového světla 15,0 %, v módu „High power“ se zvýšil na 17,1 % a v módu „Plasma emulation“ dokonce na 20,6 % (Tab. 2). Pro přesné nastavení podmínek polymerace byly pomocí kalibrovaných stopek změřeny i přednastavené časové intervaly záření lampy Valo, desetkrát v každém módu. Na základě výsledků těchto měření (Tab. 3) byly pro polymeraci kompozitních materiálů zvoleny tyto režimy polymerace: 1300 mW/cm² po dobu 20 s (označováno dále jako 1300/20), 1950 mW/cm² po dobu 12 s, 10 s nebo 8 s (1950/12, 1950/10 a 1950/8) a 2980 mW/cm² po dobu 6 s nebo 5 s (2980/6 a 2980/5). Dodaná světelná energie odpovídající těmto polymeračním podmínkám se pohybovala od 15,8 do 26,7 J/cm² (Tab. 3).

Polymerační režim	Intenzita ozáření [mW/cm ²]	Přednastavený čas záření lampy	Skutečná doba záření [s]	Světelná energie [J/cm ²] (konfidenční interval)
2980/5	2980	5 s (3 s + 2 s)	5,3	15,8 (14,7-16,9)
1950/8	1950	8 s (2×4 s)	8,5	16,6 (15,4-17,8)
2980/6	2980	6 s (2×3 s)	6,5	19,4 (18,0-20,8)
1950/10	1950	10 s (4 s + 2×3 s)	10,6	20,7 (19,2-22,2)
1950/12	1950	12 s (3×4 s)	12,8	25,0 (23,2-26,8)
1300/20	1300	20 s	20,5	26,7 (24,7-28,7)

Tab. 3: Polymerační režimy: intenzita ozáření, čas záření a světelná energie.

Konfidenční interval odpovídá stanovené světelné energii ± rozšířená nejistota.

3.1.2 Hodnocení kvality polymerace pomocí měření mikrotvrdoti

Mikrotvrdot koreluje s konverzí monomerů (Bouschlicher et al., 2004; Ferracane, 1985), a proto se běžně využívá jako jednoduchá a rychlá metoda hodnocení kvality polymerace kompozitních materiálů. Pro každý kompozitní materiál a režim polymerace (Tab. 3) bylo v teflonových formách (průměr 4 mm, tloušťka 2 mm) připraveno pět cylindrických tělísek. Formy umístěné na mikroskopickém sklu s průhlednou plastovou fólií byly mírně přeplněny kompozitním materiálem, zakryty další průhlednou fólií a mikroskopickým sklem, které bylo přitlačeno pro zarovnání povrchu. Polymerace byla provedena pomocí lampy Valo, jejíž čočka byla umístěna koncentricky s tělískem tak, aby světlo dopadalo kolmo na jeho povrch. Přibližně 30 minut po ozáření byly horní (ozářený) i spodní (neozářený) povrch tělísek zabroušeny pomocí navlhčených brusných papírů P1000, P2500 a P4000 a vyleštěny pomocí 3μm diamantové lešticí pasty MetaDi II na nylonové lešticí tkanině a následně suspenzí 1μm částic oxidu hlinitého MicroPolish II na lešticí tkanině MicroCloth (vše Buehler, Lake Bluff, IL, USA). Vzorčky byly skladovány ve tmě při pokojové teplotě.

Mikrotvrdość dle metodiky Knoop byla měřena po 1, 24 a 168 hodinách (IndentaMet 1600-1105D, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) na 5 místech na horním i spodním povrchu tělíska při zatížení 25 g po dobu 5 s. První měření bylo provedeno ve středu povrchu, ostatní přibližně 1,5 mm od středu v polohách sever-jih-východ-západ. V případě TEC a ESQ, které obsahují částice předpolymerovaného plniva o velikosti srovnatelné s délkou vtisku (až 100 μm) bylo nutné provést dvě a více indentací mimo tyto částice, aby byly dosaženy hodnoty lišící se o méně než 10 %. Částice předpolymerovaného plniva totiž svojí mikrotvrdoostí (70-80 KHN u TEC, 80-95 KHN u ESQ) výrazně převyšují mikrotvrdość okolního kompozitu (max. 51 KHN u TEC i ESQ), což vede k vysoké variabilitě výsledků a ztrátě citlivosti této metody, jež je nezbytná pro hodnocení kvality polymerace matrice. Pokud z tohoto důvodu bylo provedeno více vtisků na jednom místě, byl vypočten jejich aritmetický průměr. Průměrné hodnoty mikrotvrdości na každém povrchu naměřené 1, 24 a 168 hodin po ozáření byly statisticky vyhodnoceny pomocí třicestné analýzy rozptylu (ANOVA, proměnné: režim polymerace, doba od ozáření, horní/spodní povrch tělíska) a Tukeyho post-hoc testů. Analýzy byly provedeny při $\alpha=0,05$ pomocí softwaru Statistica 12 (TIBCO, Palo Alto, CA, USA).

3.2 Uvolňování bisfenolů

3.2.1 Výplňové materiály

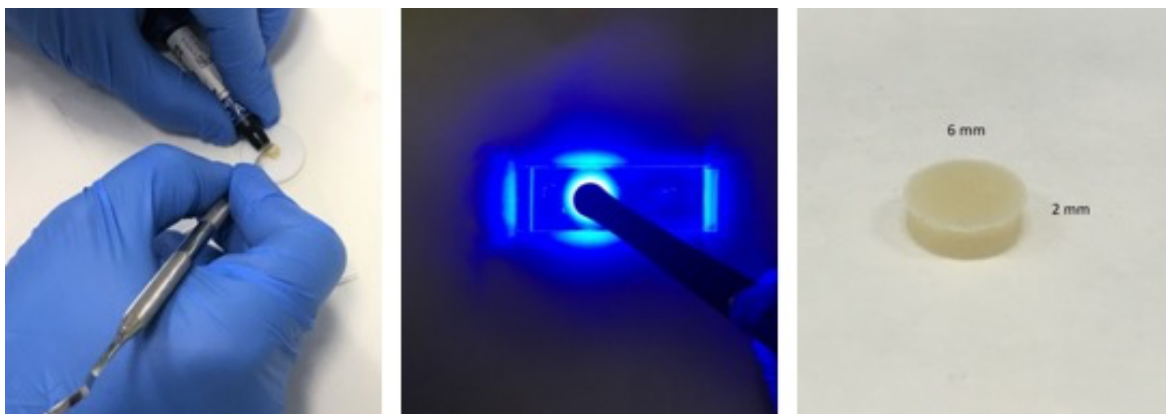
Na rozdíl od předchozí části, kde byly kompozity vybrány podle iniciačních systémů, byly materiály pro hodnocení uvolňování BPA zvoleny podle typu v nich obsažených monomerů a plniv. Jako zástupce kompozitů s monomery na bázi BPA byl vybrán v předchozí části testovaný nanokompozit FU, který obsahuje Bis-GMA i Bis-EMA, a mikrohybridní kompozit Charisma Classic (CC; Kulzer, Hanau, Německo) obsahující Bis-GMA. CC byl upřednostněn před TEC a ESQ, které obsahují předpolymerované kompozitní plnivo s nejasným složením a stupněm konverze. Z “BPA-free” materiálů byly zvoleny mikrohybridní kompozit Charisma Diamond (CD; Kulzer, Hanau, Německo) a ormocer Admira Fusion (AF; Voco, Cuxhaven, Německo). Z hybridních skloionomerních cementů byl vybrán Photac Fil Quick Aplicap (PF; 3M ESPE, St. Paul, MN, USA), v němž byl Rogalewiczem a kol. identifikován monomer Bis-EMA (Rogalewicz et al., 2006), a GC Fuji II LC (F2; GC, Tokio, Japonsko), u něhož předchozí studie zjistily obsah Bis-GMA (Mazzaoui et al., 2002; Rogalewicz et al., 2006). U všech materiálů byl zvolen stejný odstín A2, v případě FU se jednalo o A2 Dentin. Přehled složení materiálů je uveden v Tab. 4.

Název materiálu (zkratka; výrobce)	Složení (číslo šarže)
Charisma Classic A2 (CC; Kulzer, Hanau, Německo)	Bis-GMA, TEGDMA, Ba-Al-F sklo, předpolymerované plnivo, pyrogenní silika částice, iniciátor (K010733)
Filtek Ultimate Universal Restorative A2 Dentin (FU; 3M ESPE, St. Paul, MN, USA)	Bis-GMA, Bis-EMA, UDMA, TEGDMA, PEGDMA, nanočástice SiO ₂ a ZrO ₂ a jejich aglomeráty, iniciátor (N985020)
Charisma Diamond A2 (CD; Kulzer, Hanau, Německo)	TCD-DI-HEA, UDMA, TEGDMA, Ba-Al-F sklo, pyrogenní silika částice, iniciátor (K010073)
Admira Fusion A2 (AF; Voco, Cuxhaven, Německo)	“organicky modifikovaná keramika”, sklokeramické plnivo, nanoplivo, iniciátor (1919447)
Photac Fil Quick Aplicap A2 (PF; 3M ESPE, St. Paul, MN, USA)	Na-Ca-Al-La-F silikátové sklo, HEMA, difunkční monomery, aktivátor (amin), kopolymer akrylové a maleinové kyseliny, kafrechinon, stabilizátory (4587570)
GC Fuji II LC Capsule A2 (F2; GC, Tokio, Japonsko)	Al-F silikátové sklo, polyakrylová kyselina, HEMA, 2,2,4-trimethyl hexamethylen dikarbonát, TEGDMA (190219A)

Tab. 4: Složení kompozitů a skloionomerů pro hodnocení uvolňování BPA.

Použité zkratky: Bis-GMA: bisfenol A-glycidyl methakrylát; TEGDMA: triethylenglykol dimethakrylát; Bis-EMA: ethoxylovaný bisfenol A-glycidyl methakrylát; UDMA: urethan dimethakrylát; PEGDMA: polyethylenglykol dimethakrylát; TCD-DI-HEA: bis-(akryloxymethyl) tricyklohexan; HEMA: 2-hydroxyethyl methakrylát.

Před zahájením experimentu byly všechny nástroje, zkumavky a formy opakovaně opláchnuty methanolem třídy LC-MS, aby se zabránilo kontaminaci výluhů případnými nečistotami. Teflonové formy (průměr 6 mm, tloušťka 2 mm) umístěné na mikroskopickém sklu byly zaplněny kompozitem či skloionomerním cementem a jejich povrch byl zarovnan dalším mikroskopickým sklem. Tělíska (povrch 94,2 mm², objem 56,5 mm³, hmotnost 0,13-0,16 g) byla zpolymerována z jedné strany lampou Valo v režimu 1300/20 nebo 2980/5. Třicet minut po ozáření byla tělíska vytlačena z forem (Obr. 9) a zvážena pomocí kalibrované digitální analytické váhy s přesností ±0,1 mg (HR-200-EC, A&D, Tokio, Japonsko). Tělíska byla následně vložena do borosilikátových skleněných zkumavek se 2 ml umělé sliny nebo 2 ml methanolu třídy LC-MS (pro každé médium n=3). Umělá slina byla připravena laboratoří Všeobecné fakultní nemocnice v Praze rozpuštěním NaCl (0,8 g/l), KCl (1,2 g/l), CaCl₂.2H₂O (0,1 g/l), K₂HPO₄.3H₂O (0,3 g/l) a MgCl₂.6H₂O (0,1 g/l) v destilované vodě a její pH bylo pomocí 0,1N NaOH upraveno na 7,0. Zkumavky byly uzavřeny šroubovacími uzávěry s teflonovými septy a inkubovány ve tmě při 37 °C za pravidelného ručního promíchávání.



Obr. 9: Postup zhotovení tělísek z výplňových materiálů.

Extrakty byly odebrány po 1, 4, 9, 16, 35, 65, 130 a 260 dnech. Po odebrání extraktu byla tělíska opatrně vyjmuta ze zkumavek, opláchnuta, osušena, zvážena a navrácena do zkumavky se 2 ml čerstvého extrakčního média (umělé sliny či methanolu). Po odebrání posledního extraktu byla tělíska vysušena při pokojové teplotě a opakovaně vážena do konstantní hmotnosti. Sorpce extrakčního média byla vypočtena rovnicí $\frac{m_2 - m_3}{m_1} \times 100$ [%], kde m_1 je hmotnost tělíska po polymeraci, m_2 jeho nejvyšší hmotnost naměřená během experimentu a m_3 hmotnost vysušeného tělíska po ukončení sorpčního experimentu. Ztráta hmotnosti tělíska byla vypočtena rovnicí $\frac{m_1 - m_3}{m_1} \times 100$ [%]. Tyto výpočty byly provedeny pouze pro kompozity, neboť skloionomerní cementy přirozeně obsahují vodu a výsledky by proto mohly být zavádějící.

3.2.2 Polykarbonáty

K testům uvolňování BPA z polykarbonátů byly vybrány prefabrikované korunky dolního prvního premoláru (číslo šarže NC00297; 3M ESPE, St. Paul, MN, USA), korunky frézované z bloků Zirkonzahn Temp Premium Flexible (ZPF, odstín A3-B3; číslo šarže 11714; Zirkonzahn, Gais, Itálie) a Tizian Blank Polycarbonate (TBP, odstín A2; číslo šarže 2020001641; Schütz Dental, Rosbach, Německo). Korunky vyrobené 3D tiskem byly připraveny z Makrolonu 2805 (Covestro, Leverkusen, Německo). Pro srovnání byly testovány korunky frézované z PMMA Zirkonzahn Temp Basic (odstín A3-B3; číslo šarže 6795; Zirkonzahn).

Pro standardizaci rozměrů tělísek byla prefabrikovaná polykarbonátová korunka použita jako šablona pro frézování a 3D tisk. Korunka byla naskenována pomocí skeneru S900 Arti (software ZirkonzahnScan v.5051.3; Zirkonzahn) a pomocí software Geomagic Qualify (v.2012; Geomagic, Morrisville, NC, USA) byl stanoven její povrch 310,9 mm² a objem

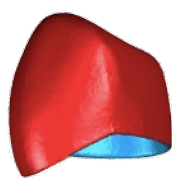
108,9 mm³. ZPF a PMMA korunky byly vyrobeny pomocí CNC (computer numerical control) frézky M1 (software Zirkonzahn.Fräsen v.04_4002_0030; Zirkonzahn) v režimu "High Quality" bez vodního chlazení. Hrubé frézování bylo provedeno frézou 2L Premium při 12 000 ot/min, přesnější frézování následně frézami 1L při 10 000 ot/min a 0,5S při 13 000 ot/min. Korunky z TBP byly frézovány pomocí CNC frézky Motion 2 (Amann Girrbach, Koblach, Rakousko) v nejvyšší kvalitě s použitím vodního chlazení. Hrubé frézování bylo provedeno frézou Roto RFID 2,5 PMMA při 15 000 ot/min, přesnější frézování následně Roto RFID 1,0 PMMA při 15 000 ot/min a Roto RFID 0,6 PMMA při 18 000 ot/min. Po frézování byly korunky odděleny od bloků pomocí frézy z karbidu wolframu (H257EF.104.023; Komet, Lemgo, Německo). 3D-tištěné korunky byly zhotoveny z Makrolonu 2805 pomocí technologie "drop-on-demand" v 3D tiskárně Freeformer 200 (Arburg, Lossburg, Německo). Všechny výše uvedené postupy (Obr. 10) byly v souladu s příslušnými doporučeními výrobce. Vnější povrch vyrobených korunek byl ohlazen pomocí silikonového kotouče (9627.900.220; Komet) a vyleštěn pomocí kartáče z kozích chlupů a leštící pasty Acrypol (Bredent, Senden, Německo). Leštění do vysokého lesku bylo provedeno pomocí leštící pasty Abraso Starglanz (Bredent). Korunky byly očištěny pomocí parní trysky Wasi-Steam 2 (Wassermann Dental-Maschinen, Hamburk, Německo) a ultrazvukového čištění (Sonorex Super; Bandelin, Berlín, Německo) v destilované vodě po dobu 5 minut. Nakonec byly vysušeny stlačeným vzduchem a ponechány k vyschnutí při pokojové teplotě po dobu nejméně 4 týdnů.

Výroba korunek

**Prefabrikovaná
polykarbonátová
korunka**



Sken korunky
(vzor pro výrobu
dalších korunek)



Frézování

Polykarbonáty:
Zirkonzahn Temp Premium Flexible
Tizian Blank Polycarbonate

Poly(methyl methakrylát):
Zirkonzahn Temp Basic

3D tisk

Polykarbonát:
Makrolon 2805



Obr. 10: Schématické znázornění výroby korunek frézováním a 3D tiskem.

Korunky byly zváženy na kalibrované digitální analytické váze s přesností $\pm 0,1$ mg (HR-200-EC, A&D, Tokio, Japonsko) a přeneseny do předem vypláchnutých a vysušených borosilikátových skleněných zkumavek obsahujících buď 2 ml methanolu třídy LC-MS nebo umělé sliny (pro každé médium $n=5$). Zkumavky uzavřené šroubovacími uzávěry s teflonovými septy byly inkubovány při 37 °C a pro stanovení kinetiky uvolňování BPA

bylo extrakční médium nahrazeno čerstvým po 1 dni, 1 týdnu, 1 měsíci (28 dnech) a 3 měsících (84 dnech). Odběry extraktů i vážení korunek byly prováděny stejně jako v případě výplňových materiálů. Po 3 měsících byly korunky vysušeny při pokojové teplotě a opakovaně váženy do konstantní hmotnosti. Sorpce umělé sliny byla vypočtena rovnicí $\frac{m_2 - m_3}{V}$, kde m_2 je hmotnost korunky na konci tříměsíční extrakce, m_3 její hmotnost po vysušení a V objem korunky. Ztráta hmotnosti korunky byla vypočtena rovnicí $\frac{m_1 - m_3}{V}$, kde m_1 je hmotnost korunky před vložením do extrakčního média.

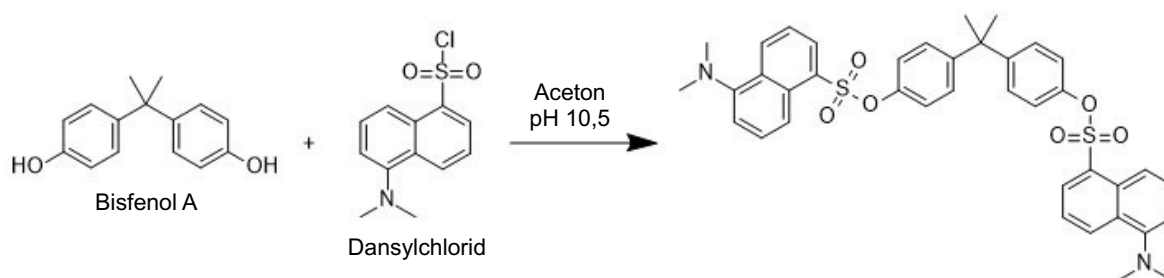
3.2.3 Chromatografická analýza

Standardy BPA, BPS, BPF, BPAF a deuterovaný standard BPA (d16BPA) byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), stejně jako aceton, hydrogenuhličitan sodný, mravenčan amonný a dansylchlorid. Diethylether, methanol třídy LC-MS a voda pro chromatografii byly zakoupeny od Merck AG (Darmstadt, Německo), methanol p.a. (třídy pro analýzu) od společnosti Lach-Ner (Neratovice, Česká republika). Kalibrační směs byla připravena zředěním methanolových zásobních roztoků BPA, BPS, BPF a BPAF v methanolu. Jako vnitřní standard byl použit d16BPA v methanolu.

Pro výplňové materiály byla sestrojena devítibodová kalibrační křivka v rozsahu 0,032-8,0 ng/ml a pro analýzu bylo použito 700 μ l extraktu. Pro polykarbonáty bylo na základě pilotní studie zvoleno širší kalibrační rozmezí 0,065-16,0 ng/ml a objem vzorků byl nastaven tak, aby naměřené hodnoty tomuto rozmezí odpovídaly, tj. bylo použito 10 μ l methanolových extraktů a 20 μ l extraktů v umělé slině. V případě PMMA bylo použito 500 μ l, nezávisle na extrakčním médiu. Extrakty tělísek v umělé slině byly extrahovány pomocí diethyletheru, methanolové extrakty byly za sníženého tlaku odpařeny do sucha. K suchým reziduím bylo poté přidáno 10 μ l vnitřního standardu a znovu bylo provedeno vakuové sušení. Stejným způsobem byly zpracovány i kontrolní vzorky se známým přídatkem BPA.

Pro zvýšení citlivosti detekce byla provedena derivatizace BPA dansylchloridem (Obr. 11) tak, že k suchým reziduím vzorků bylo přidáno 50 μ l dansylchloridu v acetonu (1 mg/ml) a 50 μ l 100 mM pufru bikarbonátu sodného (Kolatorova Sosvorova et al., 2017; Vitku et al., 2015). Po promísení a vysušení byly vzorky doplněny 300 μ l methanolu naředěného odpovídajícím množstvím 10 mM vodného roztoku mravenčanu amonného. Analyzováno bylo 50 μ l výsledného roztoku. Chromatografická analýza byla provedena UHPLC systémem Eksigent ultraLC 110 (Redwood City, CA, USA) s kolonou Kinetex C18 1,7 μ m

(150×3,0 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) při průtoku 0,4 ml/min a 50 °C. Jako mobilní fáze byla použita směs vody a methanolu s následujícím gradientem: koncentrace methanolu byla při zahájení eluce 50 % (2 minuty), poté byla lineárně zvyšována na 90 % (2-6 minut) a 95 % (6-7 minut). Koncentrace methanolu 95 % byla udržována po dobu 1,8 minuty, následně byla snížena na 50 % (8,8-9 minut) a zachována až do konce eluce po 11 minutách. Tandemová hmotnostní detekce byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru s elektrosprejovou ionizací API 3200 (Sciex, Concord, Kanada). LLOQ byly stanoveny na 0,042 ng/ml pro BPA, 0,055 ng/ml pro BPS, 0,044 ng/ml pro BPF a 0,151 ng/ml pro BPAF. Koncentrace bisfenolů naměřené v extraktech byly přepočteny na množství uvolněná z 1 g testovaného materiálu (ng/g).



Obr. 11: Schéma derivatizační reakce BPA dansylchloridem.

3.2.4 Statistická analýza

3.2.4.1 Výplňové materiály

Pro analýzu kinetiky uvolňování bylo vypočteno průměrné denní uvolňování bisfenolů tak, že množství bisfenolů v extraktu vztažené k hmotnosti materiálu bylo vyděleno počtem dnů extrakce. Pro statistickou analýzu byla použita dvoucestná ANOVA s opakováním (proměnné: polymerační podmínky a doba extrakce) pro každý materiál a extrakční médium, párová srovnání byla provedena pomocí Fisherova LSD testu. Kumulativní množství bisfenolů uvolněná z každého materiálu za celé období 260 dnů byla analyzována pomocí dvoucestné ANOVA (proměnné: extrakční médium a polymerační podmínky), porovnání materiálů bylo provedeno pomocí t-testů s Bonferroniho korekcí. Srovnání extrakčního média a hmotnostní ztráta kompozitů byly analyzovány obdobně jako kumulativní množství uvolněného BPA. Všechny analýzy byly provedeny na hladině významnosti 0,05 pomocí softwaru Statistica 12 (TIBCO, Palo Alto, CA, USA).

3.2.4.2 Polykarbonáty

U polykarbonátů bylo rovněž vypočteno průměrné denní uvolňování bisfenolů z 1 g materiálu, ale z důvodu kladné šikmosti byla provedena logaritmická transformace. Vzhledem k tomu, že z každé korunky byly připraveny čtyři extrakty, byl použit lineární smíšený model, který zohledňuje náhodný vliv jednotlivých korunek. V analýzách uvolňování bisfenolů byly testovány efekty materiálu, extrakčního média a doby extrakce; v analýzách sorpce umělé sliny a ztráty hmotnosti tělíska byl testován vliv materiálu. Párová srovnání byla provedena pomocí Tukeyho post-hoc testu. Analýzy byly provedeny v prostředí R (R Core Team, 2008) na hladině významnosti 0,05.

3.3 Mikroskopická analýza

U polykarbonátových korunek byla provedena také mikroskopická analýza jejich povrchů. Nejprve byl pomocí stereomikroskopu SZX10 (Olympus, Tokio, Japonsko) pozorován jejich vyleštěný vnější povrch, poté byly korunky rozříznuty rotačním diskem na tři části (okluzní plocha, meziální a distální stěna) a byly pozorovány jejich neleštěné vnitřní povrchy. Pro zvýšení kontrastu byly korunky pokryty tenkou vrstvou zlata přístrojem JFC-1200 Fine Coater (Jeol, Tokio, Japonsko) a detaily jejich struktury byly charakterizovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) JSM 5500-LV (Jeol) v režimu zpětně odražených elektronů („backscatter electron image“).

4 Výsledky

4.1 Vliv intenzity a doby ozáření na kvalitu polymerace

Třícestná ANOVA odhalila, že všechny proměnné (režim polymerace, doba od ozáření, horní/spodní povrch tělíska) měly signifikantní vliv na mikrotvrdot (p<0,001), Tab. 5-7. Pro všechny testované kompozity platilo, že mikrotvrdot se zvyšovala s dobou od ozáření. Mezi 1 a 24 hodinami byl tento nárůst významný na obou površích při všech režimech polymerace pro FU a TEC, zatímco pro ESQ jen při vysoké dodané světelné energii, tj. v režimech 1950/12 a 1300/20. Mikrotvrdot se dále zvyšovala i mezi 24 a 168 hodinami od ozáření, ale rozdíl nebyl významný s výjimkou několika skupin TEC a ESQ (Tab. 6 a 7). Hodnoty mikrotvrdoti po 168 hodinách tudíž lze považovat za ustálené a byly použity pro vyhodnocení vlivu povrchu tělíska a režimu polymerace.

Světelná energie (režim polymerace)	Horní povrch			Spodní povrch		
	1 h	24 h	168 h	1 h	24 h	168 h
15,8 J/cm ² (2980/5)	61,6±2,4 ^{ABa*}	69,3±1,9 ^{Ab*}	71,7±2,9 ^{Ab*}	52,0±1,1 ^{Ba*}	58,7±0,5 ^{Bb*}	61,3±1,0 ^{Bb*}
16,6 J/cm ² (1950/8)	61,2±0,8 ^{Aa*}	70,3±1,2 ^{Ab*}	72,4±1,1 ^{Ab*}	46,0±0,8 ^{Aa*}	54,4±1,3 ^{Ab*}	56,1±0,8 ^{Ab*}
19,4 J/cm ² (2980/6)	65,9±1,2 ^{Ca*}	74,5±1,0 ^{Bb*}	76,1±0,5 ^{BCb*}	59,1±1,5 ^{CDa*}	65,8±2,0 ^{Cb*}	67,6±1,6 ^{Cb*}
20,7 J/cm ² (1950/10)	65,0±1,3 ^{BCa*}	72,5±2,7 ^{ABb*}	74,5±1,1 ^{ABb*}	56,3±1,2 ^{Ca*}	63,8±3,0 ^{Cb*}	63,9±1,0 ^{BCb*}
25,0 J/cm ² (1950/12)	66,9±1,1 ^{Ca*}	75,2±1,2 ^{Bb*}	78,0±1,4 ^{BCb*}	62,2±2,2 ^{DEa*}	69,8±1,8 ^{Db*}	72,8±2,1 ^{Db*}
26,7 J/cm ² (1300/20)	64,0±0,4 ^{ABCa}	75,2±1,0 ^{Bb}	78,4±1,4 ^{Cb}	63,6±0,8 ^{Ea}	73,2±0,7 ^{Db}	75,3±1,9 ^{Db}

Tab. 5: Mikrotvrdot kompozitního materiálu Filtek Ultimate Universal Restorative.

Různá písmena v horním indexu značí signifikantní rozdíly mezi skupinami – velká písmena ve sloupcích (mezi režimy polymerace) a malá písmena v řádcích (mezi dobami od ozáření pro každý povrch). Hvězdičky značí signifikantní rozdíly mezi horním a spodním povrchem odpovídajících skupin.

Kurzívou je zvýrazněna nedostatečná polymerace, tj. pokud mikrotvrdot na spodním povrchu po 168 hodinách nepřesáhla 62,7 KHN, což odpovídá 80 % maximální mikrotvrdoti naměřené na horním povrchu (78,4 KHN).

Na horních površích byla mikrotvrdot významně vyšší než na spodních u všech skupin TEC (p<0,001) i FU (p<0,001) s výjimkou nejvyšší expozice 26,7 J/cm² (p>0,32). Naproti tomu mikrotvrdot horního a spodního povrchu ESQ se významně nelišila (p>0,30). Pro hodnocení kvality polymerace je však podstatný poměr mikrotvrdoti na spodním povrchu vůči maximální mikrotvrdoti horního povrchu (Bouschlicher et al., 2004; Ferracane, 1985). Hranice 80 % nebylo u žádného z materiálů dosaženo při nízké světelné energii (15,8 a 16,6

J/cm²), což naznačuje jejich nedostatečnou polymeraci. V případě ESQ nepřekročila mikrotvrdość hranici 80 % hranici ani na horním povrchu v režimu 2980/5 se světelnou energií 15,8 J/cm² (Tab. 7).

Světelná energie (režim polymerace)	Horní povrch			Spodní povrch		
	1 h	24 h	168 h	1 h	24 h	168 h
15,8 J/cm ² (2980/5)	40,1±0,4 ^{BCa*}	47,5±0,9 ^{Cb*}	48,2±0,8 ^{BCb*}	33,1±0,6 ^{Aa*}	37,2±1,1 ^{ABb*}	38,5±0,4 ^{Ab*}
16,6 J/cm ² (1950/8)	35,6±1,1 ^{Aa*}	40,9±1,2 ^{Ab*}	44,1±0,8 ^{Ac*}	31,8±2,1 ^{Aa*}	36,4±1,0 ^{Ab*}	39,2±0,7 ^{ABc*}
19,4 J/cm ² (2980/6)	40,5±1,3 ^{BCa*}	49,3±1,0 ^{Cb*}	50,9±0,6 ^{Db*}	36,0±1,0 ^{BCa*}	40,5±0,6 ^{CDb*}	42,1±0,2 ^{Cb*}
20,7 J/cm ² (1950/10)	38,9±0,9 ^{ABa*}	44,6±0,9 ^{Bb*}	46,7±0,2 ^{Bb*}	33,9±1,2 ^{ABa*}	39,0±0,5 ^{BCb*}	41,5±0,1 ^{BCc*}
25,0 J/cm ² (1950/12)	41,5±0,4 ^{Ca*}	48,5±0,5 ^{Cb*}	50,3±0,1 ^{CDb*}	37,6±0,7 ^{Ca*}	41,7±0,8 ^{Db*}	43,6±1,6 ^{Cb*}
26,7 J/cm ² (1300/20)	41,7±0,5 ^{Ca*}	49,4±0,8 ^{Cb*}	49,3±1,9 ^{CDb*}	36,3±0,8 ^{Ca*}	40,7±1,3 ^{CDb*}	42,2±1,8 ^{Cb*}

Tab. 6: Mikrotvrdość kompozitního materiálu Tetric EvoCeram.

Vysvětlivky jsou v popisku Tab. 5. Hranice pro nedostatečnou polymeraci odpovídající 80 % maximální mikrotvrdości naměřené na horním povrchu (50,9 KHN) byla po 168 hodinách 40,7 KHN.

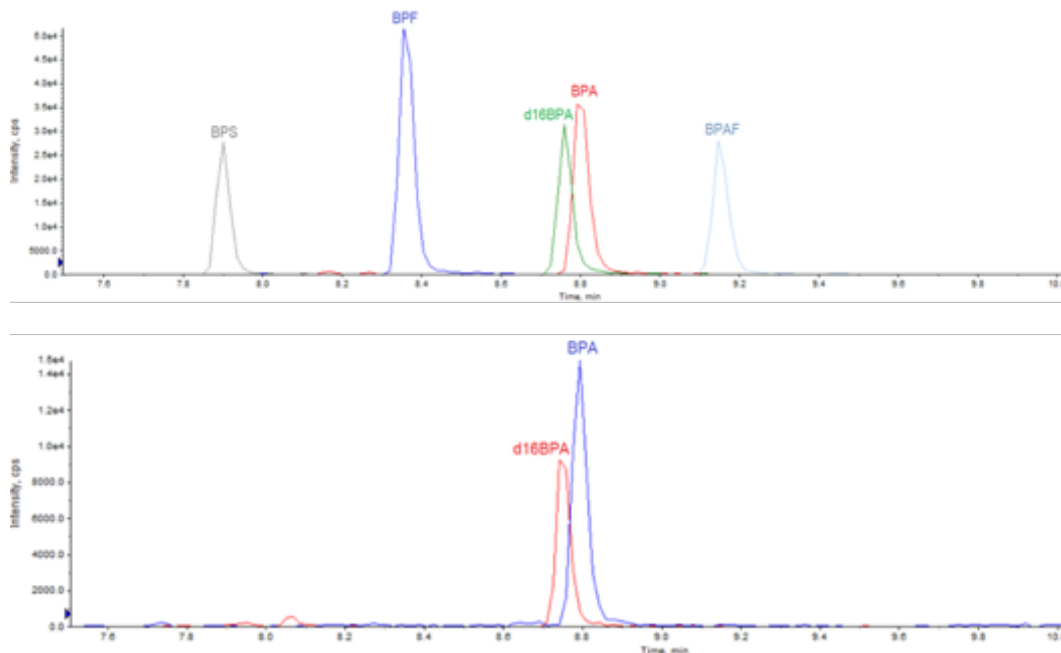
Světelná energie (režim polymerace)	Horní povrch			Spodní povrch		
	1 h	24 h	168 h	1 h	24 h	168 h
15,8 J/cm ² (2980/5)	32,7±0,7 ^{Aa}	34,6±0,8 ^{Aab}	37,9±0,7 ^{Ab}	31,8±1,0 ^{Aa}	33,7±0,4 ^{Aa}	35,9±0,9 ^{Aa}
16,6 J/cm ² (1950/8)	35,6±0,5 ^{ABa}	40,6±1,1 ^{Bb}	41,7±0,5 ^{ABb}	35,5±0,6 ^{ABa}	37,8±0,5 ^{ABa}	38,8±0,5 ^{ABa}
19,4 J/cm ² (2980/6)	40,4±1,4 ^{CDa}	44,6±1,5 ^{BCab}	45,7±0,6 ^{BCb}	37,7±0,8 ^{BCa}	41,9±0,5 ^{BCab}	43,8±0,6 ^{CDb}
20,7 J/cm ² (1950/10)	37,5±1,5 ^{BCa}	43,2±0,9 ^{BCb}	44,6±0,8 ^{BCb}	37,2±2,1 ^{Ba}	40,6±1,0 ^{Bb}	42,0±1,1 ^{BCb}
25,0 J/cm ² (1950/12)	40,6±2,0 ^{CDa}	44,6±3,0 ^{Cb}	47,0±3,1 ^{Cb}	40,4±2,1 ^{CDa}	44,0±3,7 ^{CDb}	45,8±3,8 ^{Db}
26,7 J/cm ² (1300/20)	43,2±1,4 ^{Da}	49,9±1,1 ^{Db}	50,9±1,0 ^{Db}	41,8±0,3 ^{Da}	47,0±1,6 ^{Db}	50,1±0,6 ^{Ec}

Tab. 7: Mikrotvrdość kompozitního materiálu Estelite Σ Quick.

Vysvětlivky jsou v popisku Tab. 5. Hranice pro nedostatečnou polymeraci odpovídající 80 % maximální mikrotvrdości naměřené na horním povrchu (50,9 KHN) byla po 168 hodinách 40,7 KHN.

4.2 Uvolňování bisfenolů

BPA byl detekován v extraktech všech materiálů, zatímco uvolňování alternativních bisfenolů BPS, BPF a BPAF nebylo potvrzeno u žádného z nich (Obr. 12).



Obr. 12: Chromatogram kalibrační řady a reprezentativního extraktu.

Na ose X je retenční čas, na ose Y intenzita signálu. V kalibrační řadě (nahore) jsou viditelné peaky všech standardů, zatímco v extraktu (dole) byl detekován pouze BPA a vnitřní standard d16BPA.

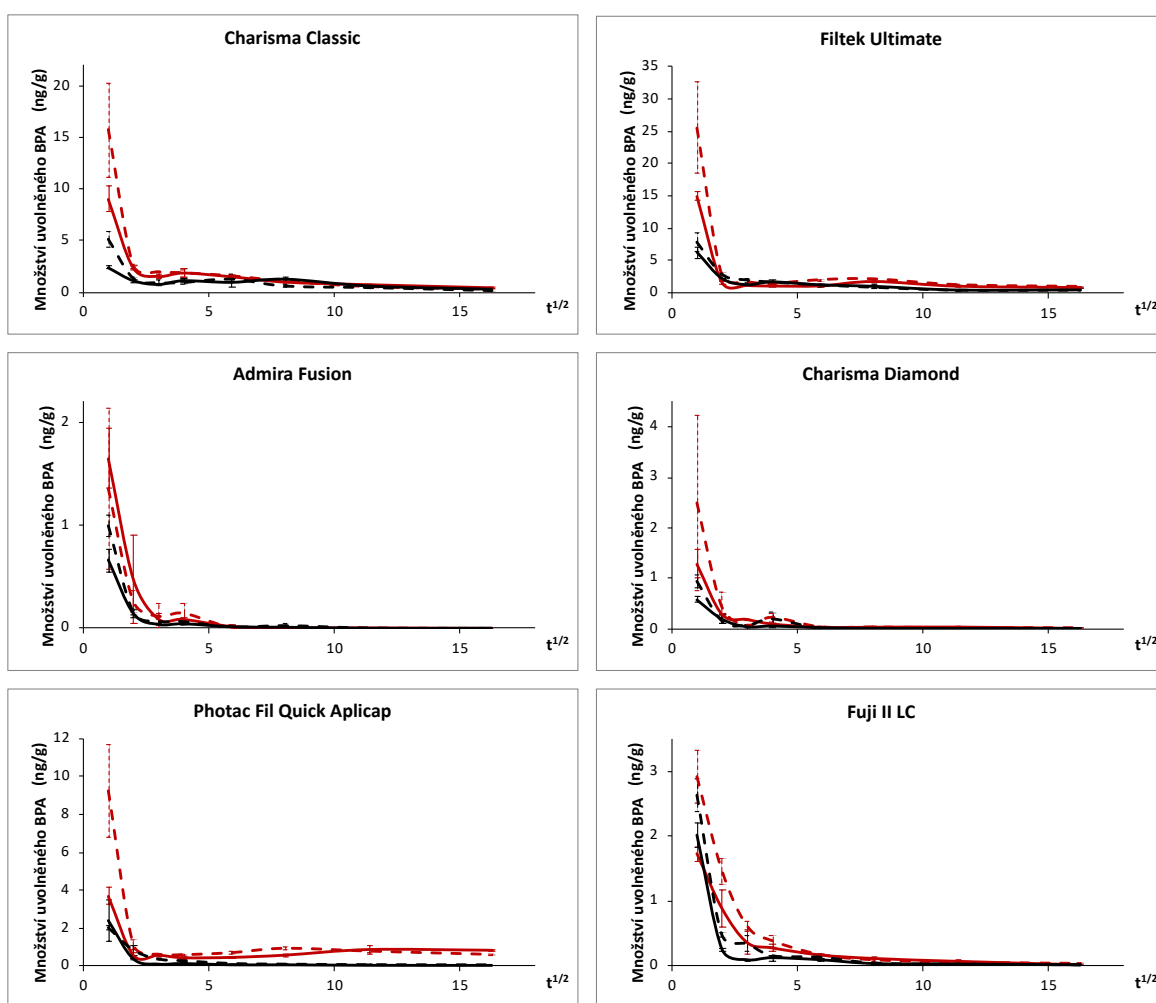
4.2.1 Výplňové materiály

Průměrné množství BPA uvolněného za den z gramu materiálu (ng/g) do umělé sliny a methanolu je uvedeno v Tab. 8 a 9 a graficky znázorněno na Obr. 13. V obou extrakčních médiích uvolňovaly všechny materiály nejvyšší množství BPA během prvního dne. Uvolňování se poté významně snížilo ($p < 0,001$), přičemž u „BPA-free“ kompozitů (AF, CD) se postupně zcela zastavilo. U kompozitů s monomery na bázi BPA (FU, CC) a skloionomerního cementu PF naopak uvolňování prokazatelně pokračovalo i po 260 dnech, Obr. 14.

Během prvního dne se z tělísek polymerovaných po dobu 5 s při 2980 mW/cm^2 uvolnilo významně více BPA než z tělísek polymerovaných po dobu 20 s při 1300 mW/cm^2 ($p < 0,05$) s výjimkou PF v umělé slině a AF v methanolu. Při delší době extrakce však vliv polymeračních podmínek na průměrné denní uvolňování BPA nebyl u většiny skupin významný ($p > 0,05$). Analýza kumulativního množství BPA uvolněného za dobu 260 dnů (Tab. 10, Obr. 14) ukázala, že ve srovnání se standardní polymerací (20 s, 1300 mW/cm^2) vedla zkrácená doba ozáření (5 s, 2980 mW/cm^2) k významně vyššímu uvolňování BPA

z obou skloionomerních cementů v umělé slině a z FU v methanolu ($p < 0,05$). Obdobná tendence byla zpočátku pozorována i u CC v methanolu, ale později se vyšší množství BPA uvolňovalo z tělísek polymerovaných po dobu 20 s při intenzitě ozáření 1300 mW/cm^2 a tento rozdíl byl ve srovnání se zkrácenou dobou ozáření signifikantní ($p < 0,05$).

Kumulativní data dále ukázala, že se v methanolu uvolnilo významně více BPA než v umělé slině ($p < 0,001$) a že vliv materiálů byl také významný ($p < 0,001$). Z kompozitů s monomery na bázi BPA (FU, CC) se uvolnilo nejvíce BPA, v methanolu byly podobné hodnoty naměřeny také u skloionomerního cementu PF. Méně BPA se uvolnilo ze skloionomerního cementu F2 a bez ohledu na extrakční médium byly nejnižší kumulativní hodnoty naměřeny u „BPA-free“ kompozitů ($p < 0,001$).



Obr. 13: Průměrné denní uvolňování BPA z výplňových materiálů.

Množství uvolněného BPA v ng/g v umělé slině (černě) a methanolu (červeně) v závislosti na druhé odmocnině doby extrakce. Plná čára reprezentuje standardní podmínky polymerace (1300 mW/cm^2 po dobu 20 s), přerušovaná čára znázorňuje zkrácenou dobu ozáření (2980 mW/cm^2 po dobu 5 s).

Materiál	Podmínky polymerace	1 den (den 1)	4 dny (dny 2-4)	9 dní (dny 5-9)	16 dní (dny 10-16)	35 dní (dny 17-35)	65 dní (dny 36-65)	130 dní (dny 66-130)	260 dní (dny 130-260)
Charisma Classic	20 s, 1300 mW/cm ²	2,43±0,19 Aa	1,11±0,12 Abc	0,73±0,02 Acd	1,11±0,20 Abc	0,95±0,38 Abcd	1,27±0,19 Bb	0,57±0,05 Ade	0,25±0,04 Ae
	5 s, 2980 mW/cm ²	5,09±0,79 Ba	1,36±0,11 Ab	0,97±0,19 Abc	0,99±0,18 Abc	1,31±0,40 Ab	0,64±0,09 Acd	0,50±0,10 Acd	0,21±0,03 Ad
Filtrek Ultimate	20 s, 1300 mW/cm ²	6,24±0,84 Aa	2,23±0,09 Ab	1,28±0,12 Acd	1,71±0,31 Abc	1,25±0,14 Acd	1,03±0,39 Acd	0,46±0,07 Ad	0,48±0,27 Ad
	5 s, 2980 mW/cm ²	7,87±1,37 Ba	2,82±0,10 Bb	1,95±0,26 Ac	1,62±0,14 Acd	1,18±0,18 Acd	0,80±0,21 Ade	0,35±0,04 Ae	0,35±0,03 Ae
Charisma Diamond	20 s, 1300 mW/cm ²	0,58±0,06 Aa	0,19±0,08 Ab	0,03±0,03 Ac	0,05±0,01 Ac	0,02±0,00 Ac	0	0	0
	5 s, 2980 mW/cm ²	0,93±0,12 Ba	0,15±0,06 Ab	0,07±0,01 Abc	0,10±0,01 Abc	0,01±0,00 Ac	0,01±0,01 Ac	0	0
Admira Fusion	20 s, 1300 mW/cm ²	0,66±0,11 Aa	0,14±0,04 Ab	0,04±0,01 Ac	0,04±0,01 Ac	0,02±0,00 Ac	0,01±0,01 Ac	0	0
	5 s, 2980 mW/cm ²	1,00±0,10 Ba	0,15±0,02 Ab	0,07±0,02 Ac	0,06±0,03 Ac	0,01±0,00 Ac	0,03±0,02 Ac	0	0
Photac Fil Quick Aplicap	20 s, 1300 mW/cm ²	2,40±1,07 Aa	0,37±0,04 Ab	0,09±0,01 Ab	0,13±0,02 Ab	0,06±0,01 Ab	0,06±0,02 Ab	0,03±0,00 Ab	0,03±0,00 Ab
	5 s, 2980 mW/cm ²	2,02±0,12 Aa	0,84±0,28 Bb	0,37±0,02 Bbc	0,28±0,01 Bbc	0,14±0,01 Bc	0,10±0,01 Ac	0,07±0,01 Bc	0,07±0,01 Bc
Fuji II LC	20 s, 1300 mW/cm ²	2,01±0,19 Aa	0,25±0,02 Ab	0,09±0,01 Abc	0,12±0,04 Abc	0,09±0,02 Abc	0,03±0,00 Ac	0,02±0,00 Ac	0,01±0,00 Ac
	5 s, 2980 mW/cm ²	2,62±0,25 Ba	0,46±0,03 Bb	0,34±0,12 Bb	0,15±0,02 Ac	0,13±0,04 Ac	0,04±0,01 Ac	0,02±0,00 Ac	0,01±0,00 Ac

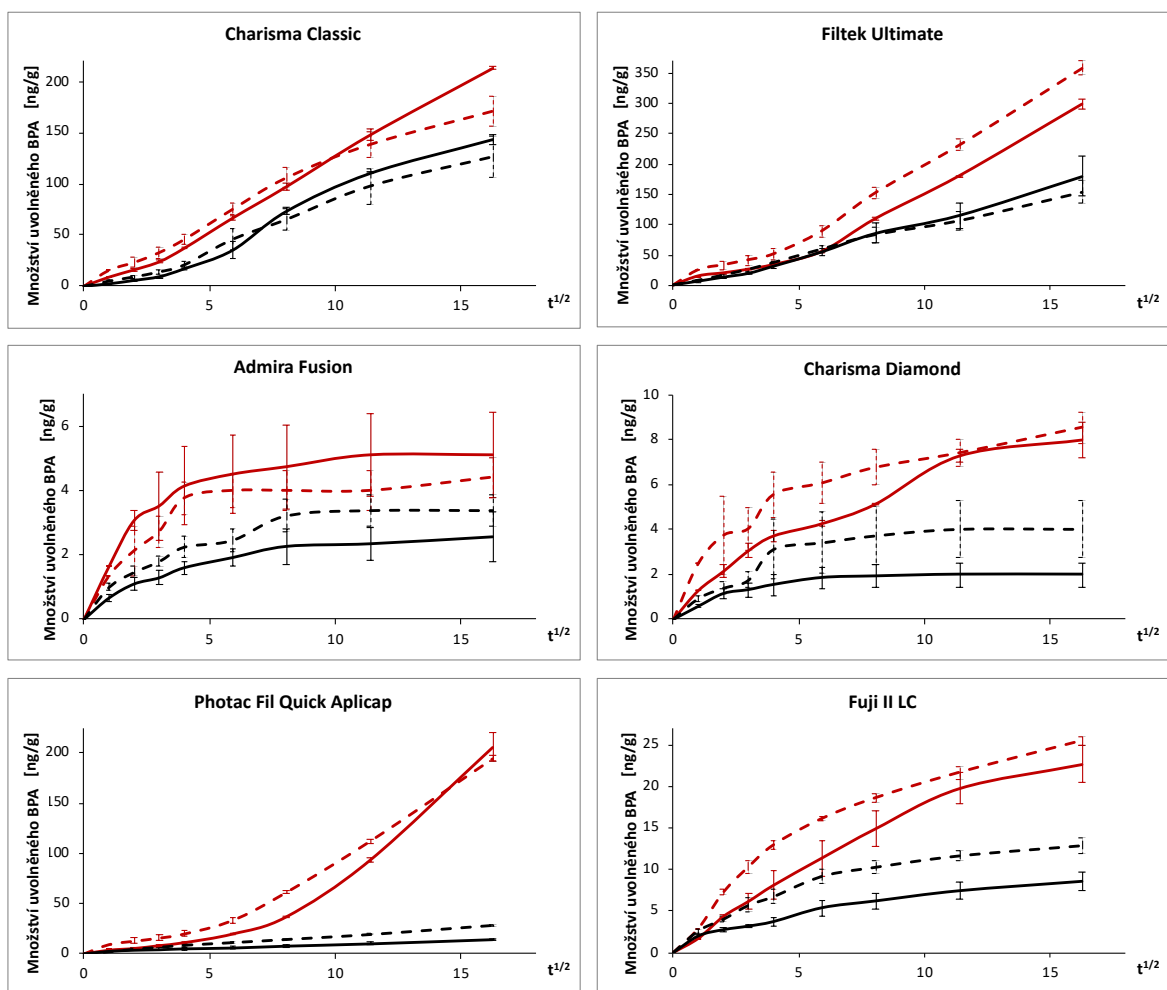
Tab. 8: Průměrné denní uvolňování BPA z výplňových materiálů do umělé sliny v přepočtu na gram materiálu (průměr±SD v ng/g).

Průměrné denní uvolňování bylo vypočteno tak, že množství BPA v extraktu bylo vyděleno dobou extrakce. Například extrakt odebraný 16 dní po přípravě tělísek obsahoval BPA uvolněný mezi 10. a 16. dnem, takže doba extrakce byla 7 dní. Nulové hodnoty znamenají buď to, že vypočtené denní uvolňování kleslo pod 0,005 ng/g/den, nebo že uvolňování BPA nebylo možné kvantifikovat, protože jeho koncentrace BPA v extraktu byla nižší než LLOQ. Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou označeny pomocí písmen ve druhém řádku každé buňky. Různá velká písmena označují významné rozdíly mezi podmínkami polymerace pro každý materiál, různá malá písmena označují významné rozdíly v řádcích (mezi dobami extrakce).

Material	Podmínky polymerace	1 den (den 1)	4 dny (dny 2-4)	9 dní (dny 5-9)	16 dní (dny 10-16)	35 dní (dny 17-35)	65 dní (dny 36-65)	130 dní (dny 66-130)	260 dní (dny 130-260)
Charisma Classic	20 s, 1300 mW/cm ²	9,01±1,23 Aa	2,36±0,19 Ab	1,57±0,17 Ac	1,90±0,44 Abc	1,54±0,07 Acd	1,03±0,07 Ad	0,78±0,06 Be	0,48±0,02 Bf
	5 s, 2980 mW/cm ²	15,7±4,56 Ba	2,51±0,24 Ab	1,93±0,07 Abc	1,84±0,34 Abc	1,54±0,25 Acd	1,03±0,17 Ad	0,50±0,03 Ae	0,24±0,02 Af
Filtek Ultimate	20 s, 1300 mW/cm ²	15,0±0,64 Aa	1,66±0,22 Ab	1,21±0,10 Abc	1,12±0,02 Ac	1,14±0,04 Ac	1,82±0,04 Ab	1,09±0,10 Ac	0,88±0,06 Ac
	5 s, 2980 mW/cm ²	25,6±7,03 Ba	2,61±0,52 Ab	1,68±0,31 Abc	1,40±0,30 Ac	1,99±0,04 Bb	2,12±0,19 Ab	1,21±0,05 Ac	0,94±0,03 Ad
Charisma Diamond	20 s, 1300 mW/cm ²	1,28±0,29 Aa	0,28±0,03 Ab	0,18±0,01 Ab	0,09±0,02 Ab	0,06±0,03 Ab	0,03±0,01 Ab	0,03±0,01 Ab	0,01±0,00 Ab
	5 s, 2980 mW/cm ²	2,50±1,74 Ba	0,41±0,31 Ab	0,06±0,02 Ab	0,22±0,08 Ab	0,03±0,02 Ab	0,02±0,01 Ab	0,01±0,01 Ab	0,01±0,00 Ab
Admira Fusion	20 s, 1300 mW/cm ²	1,65±0,29 Aa	0,48±0,43 Ab	0,09±0,06 Ab	0,09±0,02 Ab	0,02±0,01 Ab	0,01±0,00 Ab	0,01±0,00 Ab	0 Ab
	5 s, 2980 mW/cm ²	1,35±0,78 Aa	0,26±0,10 Ab	0,12±0,12 Ab	0,15±0,09 Ab	0,01±0,01 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab
Photac Fil Quick Applicap	20 s, 1300 mW/cm ²	3,71±0,47 Aa	0,56±0,12 Abc	0,57±0,03 Abc	0,43±0,07 Ac	0,45±0,02 Ac	0,57±0,06 Abc	0,87±0,21 Ab	0,83±0,01 Bb
	5 s, 2980 mW/cm ²	9,27±2,44 Ba	1,11±0,26 Ab	0,62±0,04 Ac	0,60±0,05 Ac	0,70±0,07 Bc	0,94±0,06 Bbc	0,78±0,07 Abc	0,61±0,06 Ac
Fuji II LC	20 s, 1300 mW/cm ²	1,72±0,11 Aa	0,88±0,29 Ab	0,36±0,18 Ac	0,28±0,06 Acd	0,17±0,01 Acd	0,12±0,01 Acd	0,07±0,01 Acd	0,02±0,00 Ad
	5 s, 2980 mW/cm ²	2,91±0,41 Ba	1,46±0,19 Bb	0,61±0,09 Ac	0,38±0,08 Acd	0,17±0,02 Ade	0,08±0,01 Ade	0,05±0,01 Ae	0,03±0,01 Ac

Tab. 9: Průměrné denní uvolňování BPA z výplňových materiálů do methanolu v přepočtu na gram materiálu (průmět±SD v ng/g).

Vysvětlivky jsou v popisku Tab. 8.



Obr. 14: Kumulativní uvolňování BPA z výplňových materiálů.

Vysvětlivky jsou v popisku Obr. 13.

Extrakční médium	Podmínky polymerace	Charisma Classic	Filtek Ultimate	Charisma Diamond	Admira Fusion	Photac Fil Quick Aplicap	Fuji II LC
Umělá slina	20 s, 1300 mW/cm ²	143,7±6,0 Aa	180,4±39,1 Aa	2,09±0,48 Ab	2,54±0,95 Ab	14,1±1,7 Ac	8,84±1,28 Ad
	5 s, 2980 mW/cm ²	126,4±24,7 Aa	154,1±23,1 Aa	3,34±0,42 Ab	3,39±0,59 ABb	27,6±1,1 Bc	12,9±1,2 Bd
Methanol	20 s, 1300 mW/cm ²	213,1±4,90 Ba	299,0±18,2 Bb	7,98±0,46 Bc	5,11±1,65 Bd	206,1±17,0 Ca	22,7±3,0 Ce
	5 s, 2980 mW/cm ²	170,8±19,0 Ca	358,0±16,3 Cb	8,53±0,82 Bc	4,40±1,03 ABd	194,3±7,8 Ca	25,4±2,2 Ce

Tab. 10: Kumulativní uvolňování BPA z výplňových materiálů v přepočtu na gram materiálu (průměr±SD v ng/g).

Různá písmena ve druhém řádku každé buňky značí signifikantní rozdíly mezi skupinami. Velká písmena ve sloupcích, malá písmena v řádcích (mezi testovanými materiály).

Sorpce extrakčních médií (Tab. 11) i ztráta hmotnosti kompozitů (Tab. 12), která vyjadřuje množství vyluhovatelné hmoty, byly významně vyšší v methanolu než v umělé slině ($p < 0,001$). Z testovaných kompozitů vykazoval FU nejvyšší sorpci umělé sliny ($p < 0,001$), ale naopak nejnižší sorpci methanolu ($p < 0,001$). Nejvyšší ztráta hmotnosti byla v umělé slině zaznamenána u AF, pokud byl polymerován 20 s, ale při zkrácení doby ozáření na 5 s nebyl mezi materiály významný rozdíl ($p > 0,05$). V methanolu ztráta hmotnosti klesala v pořadí $CC > CD > AF > FU$ ($p < 0,05$). Vliv podmínek polymerace na sorpci umělé sliny nebyl významný ($p > 0,05$), ale zkrácení doby ozáření na 5 s významně zvýšilo sorpci methanolu ($p < 0,05$) u všech kompozitů kromě CD. Ztráta hmotnosti kompozitů byla při zkrácené době ozáření v methanolu významně vyšší než při standardní polymeraci ($p < 0,05$) a podobná, avšak statisticky nevýznamná tendence byla zaznamenána i v umělé slině ($p > 0,05$).

Extrakční médium	Podmínky polymerace	Charisma Classic	Filtek Ultimate	Charisma Diamond	Admira Fusion
Umělá slina	20 s, 1300 mW/cm ²	0,73±0,14 Aa	1,24±0,05 Ab	0,61±0,03 Aa	0,64±0,09 Aa
	5 s, 2980 mW/cm ²	0,68±0,17 Aa	1,27±0,01 Ab	0,52±0,02 Aa	0,72±0,004 Aa
Methanol	20 s, 1300 mW/cm ²	3,39±0,15 Ba	1,37±0,05 Bb	3,37±0,11 Ba	2,29±0,11 Bc
	5 s, 2980 mW/cm ²	3,89±0,17 Ca	1,62±0,17 Cb	3,48±0,01 Bc	2,49±0,07 Cd

Tab. 11: Sorpce extrakčních médií testovanými kompozity (průměr±SD v hmotn. %).

Vysvětlivky jsou v popisku Tab. 10.

Extrakční médium	Podmínky polymerace	Charisma Classic	Filtek Ultimate	Charisma Diamond	Admira Fusion
Umělá slina	20 s, 1300 mW/cm ²	0,05±0,02 Aa	0,04±0,01 Aa	0,06±0,02 Aa	0,12±0,05 Ab
	5 s, 2980 mW/cm ²	0,12±0,07 Aa	0,12±0,03 Aa	0,11±0,03 Aa	0,12±0,01 Aa
Methanol	20 s, 1300 mW/cm ²	2,27±0,10 Ba	0,38±0,06 Bb	2,04±0,08 Bc	1,13±0,08 Bd
	5 s, 2980 mW/cm ²	3,06±0,19 Ca	0,83±0,13 Cb	2,48±0,05 Cc	1,35±0,08 Cd

Tab. 12: Ztráta hmotnosti testovaných kompozitů (průměr±SD v hmotn. %).

Vysvětlivky jsou v popisku Tab. 10.

4.2.2 Polykarbonáty

BPA byl detekován ve všech extraktech polykarbonátů, zatímco z PMMA se kvantifikovatelné množství BPA uvolnilo pouze v methanolu během prvního týdne (Tab. 13). Ve všech skupinách, kde byl BPA detekován, bylo jeho množství uvolněné v methanolu významně vyšší než v umělé slině ($p < 0,001$). Průměrné denní uvolňování BPA

bylo nejvyšší po 1 dni, poté se významně snížilo mezi 1 dnem a 1 týdnem ($p < 0,001$) i mezi 1 týdnem a 1 měsícem ($p < 0,001$), kdy dosáhlo svého minima. V porovnání s hodnotami po 1 měsíci se průměrné denní uvolňování BPA po 3 měsících zvýšilo u všech skupin, signifikantně u prefabrikovaných korunek a TBP v methanolu a u ZPF v umělé slině ($p < 0,05$).

	1 den (den 1)	1 týden (dny 2-7)	1 měsíc (dny 8-28)	3 měsíce (dny 29-84)
Methanol				
Prefabrikované polykarbonátové korunky	8,0±1,6 Ba*	1,2±0,2 Bb*	0,80±0,11 Bc*	1,2±0,1 Bb*
Frézovaný Zirkonzahn Temp Premium Flexible (ZPF)	22,8±7,7 Ca*	2,1±0,3 Cb*	1,1±0,2 BCc*	1,2±0,06 Bc*
Frézovaný Tizian Blank Polycarbonate (TBP)	32,2±3,8 Da*	4,0±0,3 Db*	1,3±0,2 Cc*	1,7±0,3 Cd*
3D-tištěné korunky	11,1±2,3 Ba*	7,2±1,6 Eb*	1,4±0,2 Cc*	1,9±0,2 Cd*
Frézovaný Zirkonzahn Temp Basic (PMMA)	0,04±0,03 Aa*	0,02±0,01 Aa*	0 Ab	0 Ab
Umělá slina				
Prefabrikované polykarbonátové korunky	0,07±0,02 Ba*	0,01±0,00 Bb*	0,02±0,00 Bbc*	0,03±0,00 Bc*
Frézovaný Zirkonzahn Temp Premium Flexible (ZPF)	0,34±0,03 Ca*	0,11±0,01 Cb*	0,11±0,01 Db*	0,18±0,01 Dc*
Frézovaný Tizian Blank Polycarbonate (TBP)	7,1±0,9 Da*	1,1±0,1 Db*	0,58±0,04 Ec*	0,59±0,05 Ec*
3D-tištěné korunky	0,12±0,13 Ba*	0,10±0,07 Ca*	0,06±0,02 Ca*	0,07±0,02 Ca*
Frézovaný Zirkonzahn Temp Basic (PMMA)	0 Aa*	0 Aa*	0 Aa	0 Aa

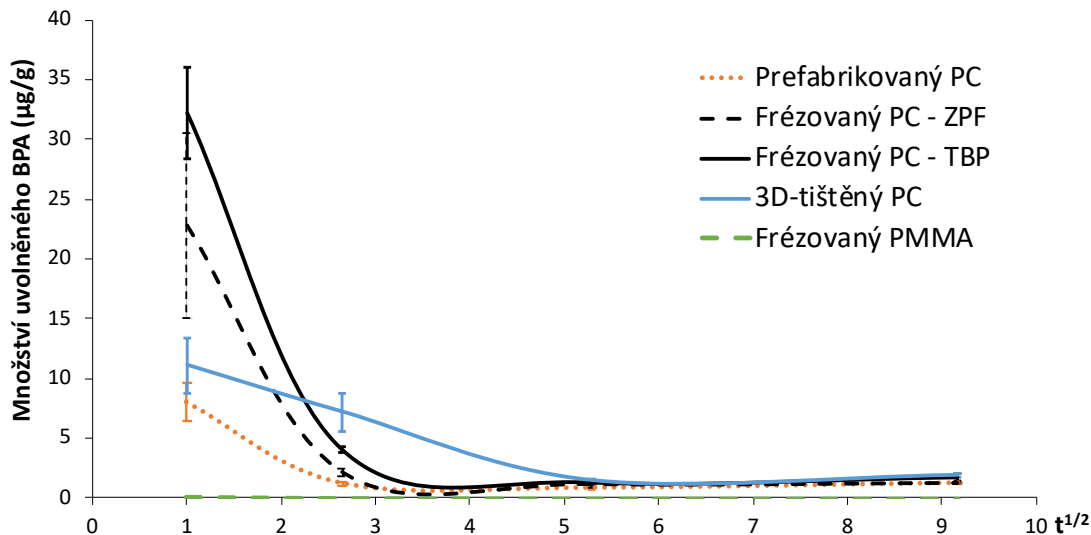
Tab. 13: Průměrné denní uvolňování BPA z polykarbonátů v přepočtu na gram materiálu (průměr±SD v µg/g).

Průměrné denní uvolňování bylo vypočteno tak, že množství BPA v extraktu bylo vyděleno dobou extrakce. Například extrakt odebraný 1 měsíc po začátku extrakce obsahoval BPA uvolněný mezi 8. a 28. dnem, takže doba extrakce byla 21 dní. Nulové hodnoty znamenají, že uvolňování BPA nebylo možné kvantifikovat, protože jeho koncentrace BPA v extraktu byla nižší než LLOQ.

Různá velká písmena značí významné rozdíly ve sloupcích (mezi materiály) zvlášť pro každé extrakční médium. Různá malá písmena značí významné rozdíly v řádcích (mezi dobami extrakce). Hvězdičkou jsou označeny významné rozdíly mezi extrakčními médii pro jednotlivé materiály.

V methanolu bylo uvolňování BPA zpočátku nejvyšší u frézovaných polykarbonátů (TBP a ZPF) ($p < 0,001$), při pozdějších odběrech se však nejvyšší množství BPA uvolňovala ze 3D-tištěných polykarbonátových korunek. Tato změna byla dána strmým poklesem průměrného denního uvolňování BPA ze všech polykarbonátů s výjimkou 3D-tištěných korunek, jejichž

uvolňování klesalo pozvolněji (Obr. 15). V porovnání s ostatními polykarbonáty se nejméně BPA uvolnilo z prefabrikovaných korunek, ačkoli množství uvolněná po 1 měsíci a 3 měsících se významně nelišila od ZPF ($p > 0,05$). V extraktech z PMMA byla zjištěna stopová množství BPA po 1 dni a 1 týdnu, která po 1 měsíci a 3 měsících klesla pod LLOQ.

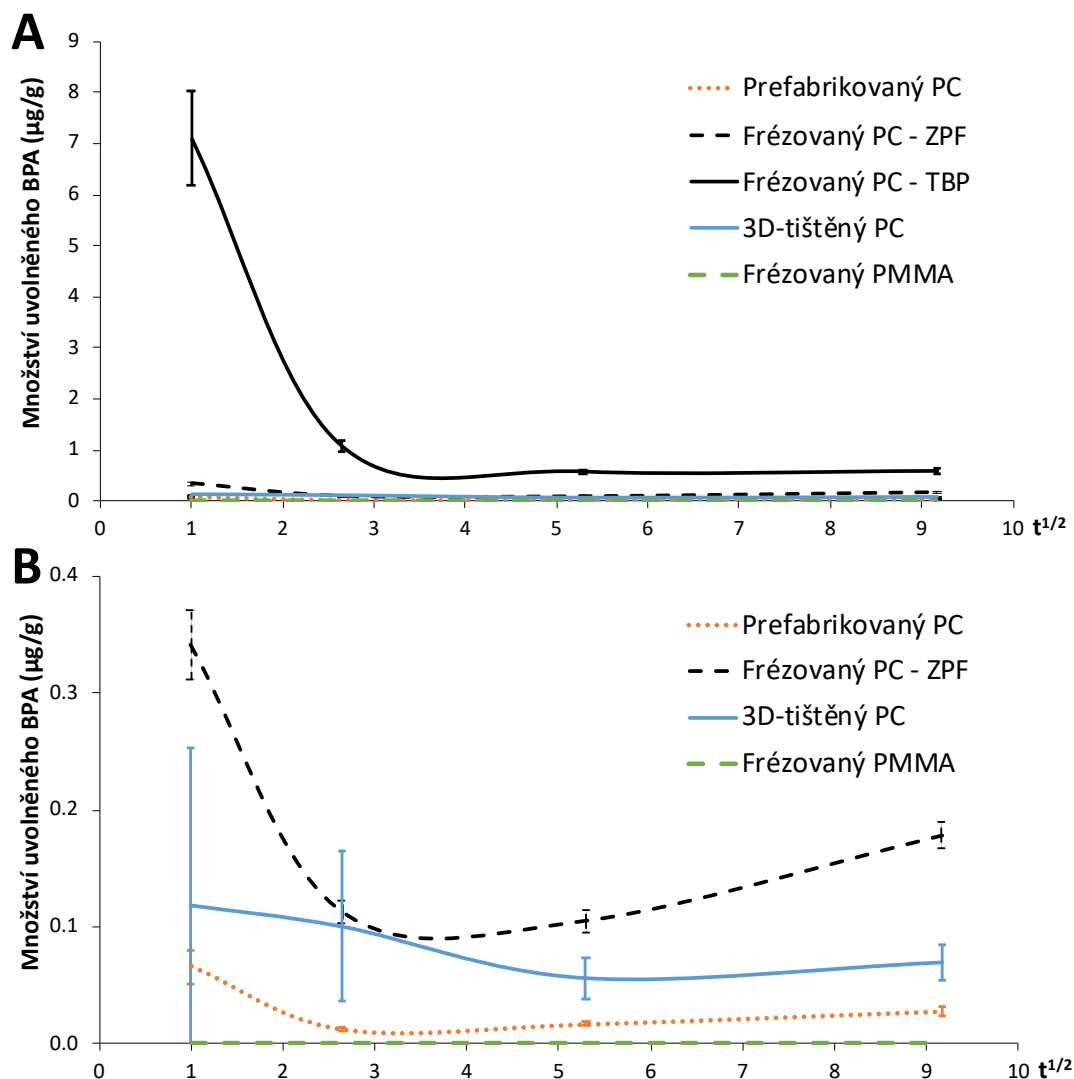


Obr. 15: Průměrné denní uvolňování BPA z polykarbonátů (PC) v methanolu.

Množství uvolněného BPA v $\mu\text{g/g}$ v závislosti na druhé odmocnině doby extrakce.

V umělé slině se nejvíce BPA uvolnilo z TBP ($p < 0,001$). Ve srovnání s druhým frézovaným polykarbonátem (ZPF) bylo uvolňování z TBP po 1 dni dvacetkrát vyšší, s prodlužující se dobou extrakce se však tento rozdíl snižoval (Obr. 16A). Kinetiku uvolňování BPA z ostatních polykarbonátů ilustruje Obr. 16B, z něhož lze odečíst, že se kromě 3D-tištěných korunek průměrné denní uvolňování BPA ze všech polykarbonátů mezi prvním dnem a prvním týdnem významně snížilo ($p < 0,001$). Stejně jako v methanolu se nejméně BPA uvolňovalo z prefabrikovaných polykarbonátových korunek ($p < 0,01$). Uvolňování BPA z PMMA nebylo detekovatelné, i přes použití většího objemu extraktu pro chromatografickou analýzu a její vysokou senzitivitu.

Sorpce umělé sliny i ztráta hmotnosti polykarbonátů vyjadřující množství extrahovatelných látek se u jednotlivých materiálů významně lišily ($p < 0,001$), Tab. 14. Nejnižší hodnoty sorpce byly naměřeny u frézovaných polykarbonátů, naopak 3D-tištěné korunky vykazovaly nejvyšší sorpci mezi polykarbonáty ($p < 0,001$) a její hodnota se významně nelišila od sorpce PMMA ($p > 0,05$). Ve ztrátě hmotnosti nebyl mezi materiály významný rozdíl s výjimkou 3D-tištěných korunek, u nichž byla naměřená hodnota významně nižší než v případě ZPF ($p = 0,02$).



Obr. 16: Průměrné denní uvolňování BPA z polykarbonátů (PC) v umělé slině.

Množství uvolněného BPA v $\mu\text{g/g}$ v závislosti na druhé odmocnině doby extrakce ze všech testovaných materiálů (A) a bez frézovaného Tizian Blank Polycarbonate (TBP) (B).

	Sorpce umělé sliny	Ztráta hmotnosti
Prefabrikované polykarbonátové korunky	$3,9 \pm 0,8$ B	$1,7 \pm 1,0$ AB
Frézovaný Zirkonzahn Temp Premium Flexible (ZPF)	$2,7 \pm 0,5$ A	$3,2 \pm 0,5$ B
Frézovaný Tizian Blank Polycarbonate (TBP)	$2,8 \pm 1,0$ AB	$2,9 \pm 1,2$ AB
3D-tištěné korunky	$15,5 \pm 1,8$ C	$1,3 \pm 1,0$ A
Frézovaný Zirkonzahn Temp Basic (PMMA)	$17,2 \pm 0,8$ C	$2,7 \pm 0,9$ AB

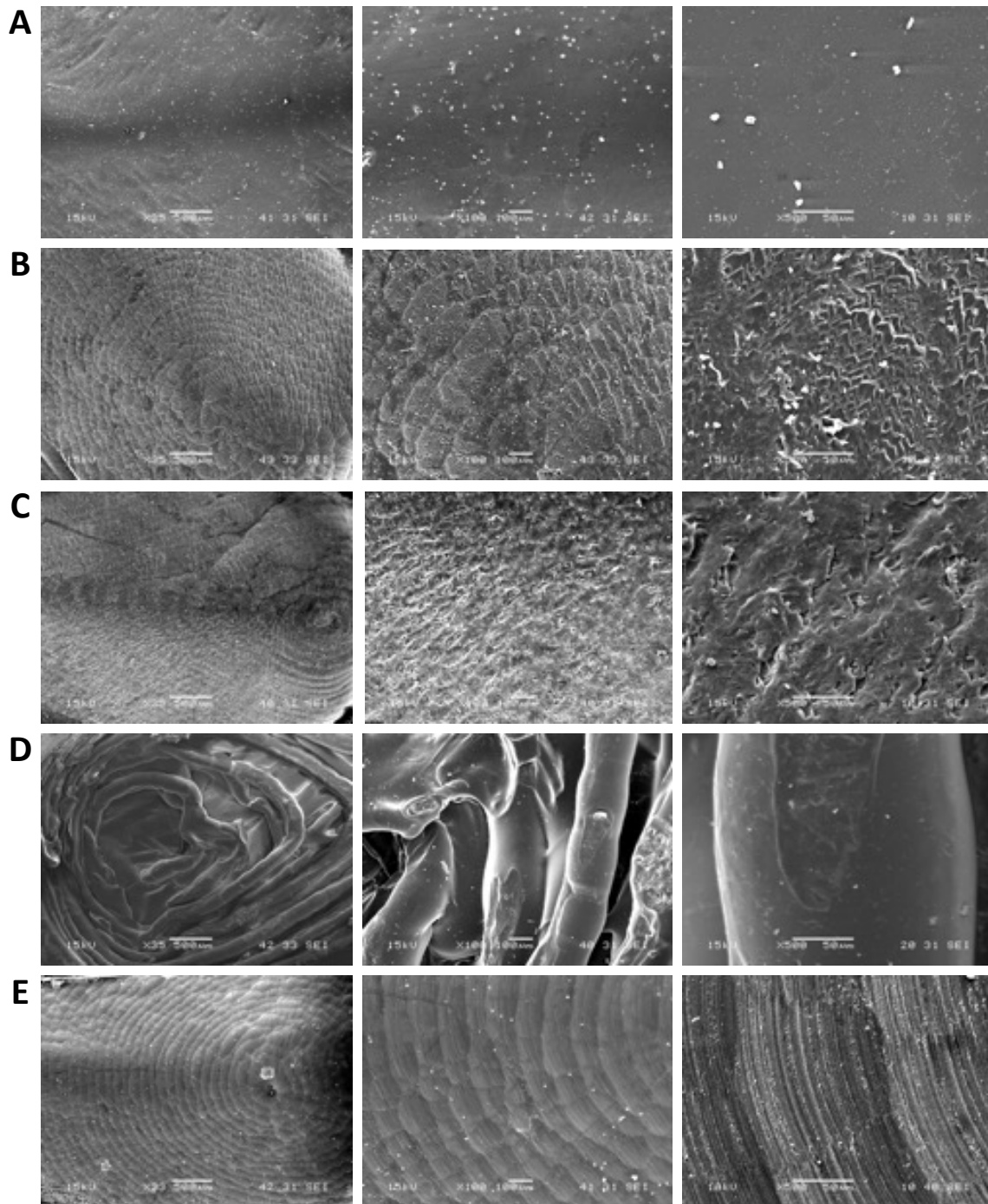
Tab. 14: Sorpce umělé sliny a ztráta hmotnosti testovaných polykarbonátů (průměr \pm SD v $\mu\text{g}/\text{mm}^3$).

Různá velká písmena značí signifikantní rozdíly ve sloupcích (mezi materiály).

4.3 Mikroskopická analýza

Prefabrikované korunky měly hladký vnitřní povrch (Obr. 17A), ale na vnějším povrchu byly přítomny drobné defekty. Na jejich meziální a distální stěně byla nalezena dělicí linie procházející vestibulárním hrbolek (Obr. 18A,B). Vnitřní povrchy frézovaných korunek byly drsnější, s paralelními vzory na stěnách a koncentrickými nerovnostmi na okluzní ploše. Tyto nerovnosti (tzv. scallop) jsou způsobeny krokovým posunem frézy se zaobleným čelem (Obr. 17B,C,E).

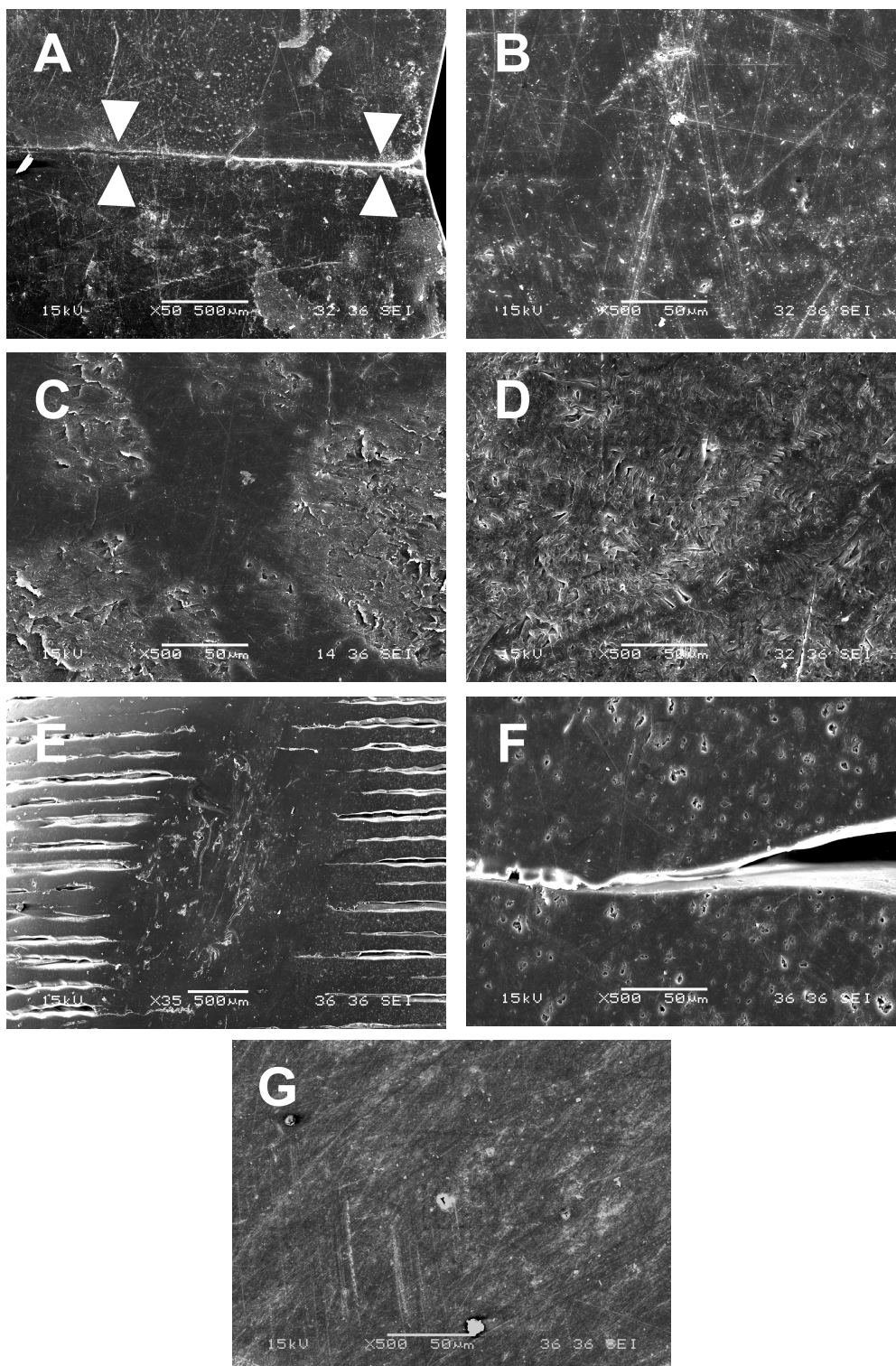
Při větším zvětšení byly u frézovaných polykarbonátů pozorovány plasticky deformované zóny a drobné trhliny, zejména na vnitřních plochách ZPF (Obr. 17B). Navzdory leštění byly defekty povrchu přítomny i na vnějších povrchích ZPF (Obr. 18C) a TBP (Obr. 18D), na vnitřních povrchích frézovaného PMMA byly nalezeny mělké paralelní drážky bez trhlín (Obr. 17E). Vnější povrchy korunek z PMMA oproti frézovaným polykarbonátům byly hladší (Obr. 18G). Pozorování 3D-tištěných korunek odhalilo vrstevnatou strukturu vzniklou postupným kladením polykarbonátového filamentu (Obr. 17D). Mezery mezi jednotlivými vrstvami byly pozorovány i na leštěných vnějších povrchích a byly nalezeny i drobné defekty uvnitř filamentů (Obr. 18E,F).



Obr. 17: Morfologie vnitřního povrchu polykarbonátových korunek.

Obrázky vlevo při zvětšení 35×, uprostřed při zvětšení 100× a vpravo při zvětšení 500×.

A: Prefabrikované polykarbonátové korunky, B: Frézovaný Zirkozahn Temp Premium Flexible (ZPF), C: Frézovaný Tizian Blank Polycarbonate (TBP), D: 3D-tištěné korunky, E: Frézovaný Zirkozahn Temp Basic (PMMA).



Obr. 18: Morfologie vnějšího povrchu polykarbonátových korunek.

Obrázky vlevo při zvětšení 35× (E), 50× (A) a 500× (B-D, F, G). Bílé trojúhelníčky v Obr. A ukazují na dělicí linii. A,B: Prefabrikované polykarbonátové korunky, C: Frézovaný Zirkozahn Temp Premium Flexible (ZPF), D: Frézovaný Tizian Blank Polycarbonate (TBP), E,F: 3D-tištěné korunky, G: Frézovaný Zirkozahn Temp Basic (PMMA).

5 Diskuse

Dentální kompozitní materiály a skloionomerní cementy splňují základní požadavky na biokompatibilitu definované v technických normách řady ISO 10993 a ISO 7405. Dlouhodobé uvolňování některých látek ze struktury těchto materiálů v nízkých koncentracích však nemusí uvedené normy postihovat. Mezi těmito látkami vzbuzuje zvláštní pozornost endokrinní disruptor BPA, který je součástí struktury některých běžně používaných monomerů. Nezanedbatelným zdrojem BPA by mohly být také polykarbonáty, jejichž použití je v zubním lékařství sice méně rozšířené, ale BPA je strukturální jednotkou jejich polymerních řetězců.

Cílem této disertační práce proto bylo kvantifikovat uvolňování BPA z uvedených typů dentálních materiálů. Tímto tématem se sice zabývalo množství studií, ale většina z nich sledovala uvolňování BPA po velmi krátkou dobu, obvykle 24 hodin (Löfroth et al., 2019), což neodpovídá klinické praxi, kde jsou dentální materiály obvykle používány po dobu měsíců až let. Největší uvolňování BPA lze sice očekávat krátce po zhotovení rekonstrukce, neboť může docházet k uvolňování nezpolymerovaných monomerů (Van Landuyt et al., 2011). Takové experimenty však nezachycují případnou degradaci materiálů ani dlouhodobou eluci nízkých množství BPA, které vzhledem k nemonotónní závislosti účinku BPA na dávce (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Vandenberg et al., 2012) a možnosti akumulace BPA v tukové tkáni (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Vandenberg et al., 2009) mohou představovat zdravotní riziko. Absence dat z dlouhodobého uvolňování může souviset i s faktem, že dříve dostupné metody stanovení BPA nebyly dostatečně citlivé a v některých případech mohla být problémem i jejich nízká specifita (Hope et al., 2016; Noda et al., 1999).

V současnosti jsou standardem metody UHPLC-MS/MS s vysokou senzitivitou i specificitou. V nedávných studiích byly popsány metody s LLOQ 0,1 ng/ml (Becher et al. 2018), respektive 0,073 ng/ml (De Nys et al., 2022), přičemž ve druhé jmenované studii byla ke zlepšení citlivosti použita derivatizace pyridin-3-sulfonyl chloridem. V této disertační práci byla použita dříve validovaná UHPLC-MS/MS metoda využívající derivatizaci dansylchloridem s LLOQ BPA 0,042 ng/ml (Kolatorova Sosvorova et al., 2017; Vitku et al., 2015), což umožnilo kvantifikaci BPA i v dlouhodobém horizontu a stopovou analýzu „BPA-free“ materiálů, kde byla předpokládána nulová množství BPA. Tato metoda

umožňuje i citlivou detekci alternativních bisfenolů BPS, BPF a BPAF, které ve stomatologii dosud zkoumány nebyly.

Výsledky provedených analýz ukázaly, že k uvolňování BPA dochází u všech testovaných materiálů. Vzhledem k tomu, že mezi jednotlivými typy testovaných materiálů byly zjištěny signifikantní rozdíly, byla první nulová hypotéza zamítnuta. Nejvyšší uvolňování bylo zaznamenáno u polykarbonátů – naměřená množství BPA v jejich extraktech byla řádově vyšší než u výplňových materiálů. Mezi nimi byly nejvyšší hodnoty naměřeny u kompozitů s monomery na bázi BPA, naopak nejmenší množství BPA byla naměřena u „BPA-free“ kompozitů. Uvolňování BPA probíhalo u všech testovaných materiálů nejintenzivněji první den a následně se snižovalo, proto byla zamítnuta i druhá nulová hypotéza, že uvolňování bisfenolů nezávisí na době expozice testovaných materiálů. Statisticky významný rozdíl byl nalezen také mezi extrakčními médii – signifikantně vyšší množství uvolněného BPA v methanolu vedla k zamítnutí třetí hypotézy. Naopak čtvrtá hypotéza byla přijata, protože alternativní bisfenoly nebyly detekovány v žádném z extraktů. Pátá hypotéza o vlivu polymeračních podmínek na uvolňování bisfenolů byla zamítnuta částečně. U většiny testovaných materiálů sice zkrácená doba ozáření i přes jeho vyšší intenzitu vedla k signifikantně vyššímu uvolňování BPA po 1 dni, ale vliv polymeračních podmínek na celkové množství uvolněného BPA u většiny testovaných materiálů významný nebyl.

5.1 Uvolňování BPA z výplňových materiálů

V této disertační práci bylo uvolňování BPA testováno ve dvou prostředích a ukázalo se, že významně vyšší množství BPA se uvolnila v methanolu než v umělé slině. Tento výsledek byl očekávaný, protože organické alkoholy jsou lepšími rozpouštědly methakrylátů než voda nebo umělá slina a jejich penetrace do hydrofobních rekonstrukčních materiálů je rychlejší (Van Landuyt et al., 2011). Z těchto důvodů se methanol, ethanol nebo jejich vodné směsi běžně používají k simulaci nejhorsího možného scénáře uvolňování BPA.

Uvolňování BPA však závisí také na použitých monomerech, jejich čistotě a dalších faktorech (De Nys, Duca, et al., 2021). Právě vyšší obsah monomerů na bázi BPA pravděpodobně vedl k tomu, že se z kompozitů Filtek Ultimate Universal Restorative (FU) a Charisma Classic (CC) uvolňovala významně vyšší množství BPA než z „BPA-free“ kompozitů a hybridních skloionomerních cementů. Podle dostupných údajů byl v obou jmenovaných kompozitech obsažen Bis-GMA, FU navíc obsahoval také hydrofilnější

Bis-EMA, což mohlo přispět k tomu, že v jeho extraktech byla naměřena nejvyšší množství BPA a že u něho byla zjištěna nejvyšší sorpce v prostředí umělé sliny. Srovnání naměřených hodnot s dostupnými literárními údaji je komplikované z důvodu rozdílných metodických přístupů a používaných jednotek. Pro tyto účely byla množství BPA vztažena k objemu zkušebního tělíska (ng/mm^3) a z porovnání vyplynulo, že hodnoty naměřené v této práci u kompozitů s monomery na bázi BPA byly srovnatelné s výsledky dalších studií využívajících UHPLC-MS/MS (Becher et al., 2018; De Nys, Putzeys, et al., 2021). Ve srovnání s výsledky měření pomocí méně citlivých metod byla množství uvolněného BPA naměřená v této práci o 1-2 řády nižší (Löfroth et al., 2019; Van Landuyt et al., 2011), viz Tab. 15.

Studie	Materiál (výrobce)	Vodná média		Organická média	
		Uvedená hodnota	Přepočtená hodnota	Uvedená hodnota	Přepočtená hodnota
Van Landuyt et al. 2011	<i>meta-analýza</i>	0,0024	0,55	0,011	2,43
		(0,0017-0,0034)	(0,39-0,78)	(0,0051-0,022)	(1,16-5,02)
		nmol/mm^3	ng/mm^3	nmol/mm^3	ng/mm^3
Becher et al. 2018	Tetric EvoCeram (Ivoclar Vivadent)	2,3±0,2	0,041±0,003	-	-
		ng/cm^2	ng/mm^3		
De Nys et al. 2018	Solitaire 2 (Kulzer)	0,101±0,016	0,028±0,005	-	-
		pmol/mm^2	ng/mm^3		
	G-aenial Posterior (GC)	0,073±0,010	0,021±0,003	-	-
		pmol/mm^2	ng/mm^3		
	Filtek Supreme XTE (3M ESPE)	0,045±0,006	0,013±0,002	-	-
		pmol/mm^2	ng/mm^3		
Tato práce (doba ozáření 20 s)	Charisma Classic (Kulzer)	2,43±0,19	0,006±0,0005	9,01±1,23 ng/g	0,023±0,003
		ng/g	ng/mm^3		ng/mm^3
	Filtek Ultimate Universal Restorative (3M ESPE)	6,24±0,84	0,015±0,002	15,0±0,64 ng/g	0,036±0,002
		ng/g	ng/mm^3		ng/mm^3

Tab. 15: Uvolňování BPA z kompozitů s monomery na bázi BPA po 24 hodinách ve srovnání s literárními údaji.

Přepočtené hodnoty (tučně) jsou vztaženy k objemu zkušebního tělíska. U meta-analýzy Van Landuyt et al. z roku 2011 je v závorce za průměrem uveden 95% konfidenční interval, u ostatních studií je uváděn průměr±SD.

V případě skloionomerních cementů a „BPA-free“ kompozitů není srovnání s jinými studiemi možné, neboť v dostupné literatuře nebyly nalezeny práce, které by se uvolňováním BPA z těchto materiálů zabývaly. To může být dáno tím, že podle informací výrobců by tyto materiály monomery na bázi BPA neměly obsahovat. Na druhou stranu byly v předchozích

studiih tyto monomery identifikovány v námi testovaných hybridních skloionomerních cementech: Bis-GMA v GC Fuji II LC (F2) (Mazzaoui et al., 2002; Rogalewicz et al., 2006) a Bis-EMA v Photac Fil Quick Aplicap (PF) (Rogalewicz et al., 2006). To vysvětluje, proč se z nich uvolnilo výrazně vyšší množství BPA než z „BPA-free“ kompozitů. K vyššímu uvolňování BPA ze skloionomerních cementů mohlo přispět také to, že po ztuhnutí mají povahu hydrogelu, v němž je rychlost difuze extrakčních médií vyšší než v matrici kompozitních materiálů.

U „BPA-free“ kompozitů byla v naší studii nalezena pouze stopová množství BPA, která mohou být i důsledkem jejich kontaminace během výrobního procesu. Lze předpokládat, že monomery typu Bis-GMA byly v „BPA-free“ kompozitech nahrazeny jinými, např. UDMA. Přestože fyzikální a chemické vlastnosti dimethakrylátů bez strukturní jednotky BPA mohou být odlišné, jejich existence je výhodou oproti jiným odvětvím průmyslu, kde BPA nelze snadno nahradit. To vede k používání jeho analogů, které dosud nejsou tak přísně regulovány, ale v naší studii nebyly tyto analogy nalezeny v žádném z testovaných materiálů.

U všech materiálů bylo množství BPA uvolněné během prvního dne významně vyšší než průměrné denní uvolňování BPA v následujících extrakčních obdobích. To odpovídá výsledkům *in vivo* studií, kde byly naměřeny zvýšené hladiny BPA ve slině během prvních hodin po aplikaci kompozitů nebo pečidel (Arenholt-Bindslev et al., 1999; Berge et al., 2019; Fung et al., 2000; Joskow et al., 2006; Kang et al., 2011; Lee et al., 2017; Sasaki et al., 2005; Zimmerman-Downs et al., 2010). Zpočátku byl BPA extrahován především z povrchových vrstev zkušebních tělísek, které mohou mít v důsledku inhibice polymerace vzdušným kyslíkem nižší stupeň konverze. V této *in vitro* studii byla inhibice kyslíkem sice omezena, protože tělíska byla polymerována přes mikroskopické sklo, ale úplně ji potlačit nelze. Vyšší uvolňování lze předpokládat zejména ze spodního (neozářeného) povrchu zkušebních tělísek, protože kvalita jeho polymerace je v důsledku zeslabení intenzity světla při průchodu materiálem nižší (Price et al., 2000; Tichy & Bradna, 2021).

Pomalejší uvolňování BPA po prvním dni odpovídá i předchozím *in vitro* studiím (De Nys, Putzeys, et al., 2021; Imai & Komabayashi, 2000; Polydorou, König, et al., 2009). Kromě toho, že došlo k vyčerpání BPA z povrchových vrstev materiálu, se na tomto poklesu může podílet i pokračující polymerace, která během prvních hodin až dní po ozáření zvyšuje stupeň konverze (Leung et al., 1983; Pilo & Cardash, 1992). Množství uvolněného BPA u

většiny materiálů postupně klesalo k nule, a přestože byla použita velmi citlivá UHPLC-MS/MS metoda, koncentrace BPA v extraktech „BPA-free“ kompozitů a hybridních skloionomerních cementů brzy dosáhly hodnot blízkých LLOQ či nižších. Jelikož při takto nízkých koncentracích se snižuje spolehlivost analýzy, byl experiment po 260 dnech ukončen, i když uvolňování BPA z kompozitů obsahujících monomery na bázi BPA (CC a FU) v obou extrakčních médiích a z hybridního skloionomeru PF v methanolu prokazatelně pokračovalo i na konci sledovaného období.

Studie	Materiál (výrobce)	Vodná média		Organická média	
		Uvedená hodnota	Přepočtená hodnota	Uvedená hodnota	Přepočtená hodnota
5 týdnů (35 dní)					
De Nys et al. 2021	G-aenial Posterior (GC)	43,1 pmol	0,17 ng/mm³	251,1 pmol	1,01 ng/mm³
	Venus (Kulzer)	9,4 pmol	0,04 ng/mm³	53,6 pmol	0,22 ng/mm³
	Ceram.x mono (Voco)	25,4 pmol	0,10 ng/mm³	36,0 pmol	0,15 ng/mm³
	Filtek Supreme XTE (3M ESPE)	18,1 pmol	0,07 ng/mm³	31,9 pmol	0,13 ng/mm³
Tato práce (doba ozáření 20 s)	Charisma Classic (Kulzer)	35,2±8,7 ng/g	0,09±0,02 ng/mm³	68,4±3,8 ng/g	0,18±0,01 ng/mm³
	Filtek Ultimate Universal	55,0±4,9	0,13±0,007	57,5±5,5	0,13±0,01
	Restorative (3M ESPE)	ng/g	ng/mm³	ng/g	ng/mm³
37 týdnů (260 dní)					
De Nys et al. 2021	G-aenial Posterior (GC)	85,7 pmol	0,35 ng/mm³	545,6 pmol	2,20 ng/mm³
	Venus (Kulzer)	61,0 pmol	0,25 ng/mm³	216,4 pmol	0,87 ng/mm³
	Ceram.x mono (Voco)	42,3 pmol	0,17 ng/mm³	189,3 pmol	0,76 ng/mm³
	Filtek Supreme XTE (3M ESPE)	195,9 pmol	0,79 ng/mm³	136,2 pmol	0,55 ng/mm³
Tato práce (doba ozáření 20 s)	Charisma Classic (Kulzer)	143,7±6,0 ng/g	0,36±0,01 ng/mm³	213,1±4,90 ng/g	0,54±0,04 ng/mm³
	Filtek Ultimate Universal	180,4±39,1	0,43±0,08	299,0±18,2	0,72±0,04
	Restorative (3M ESPE)	ng/g	ng/mm³	ng/g	ng/mm³

Tab. 16: Dlouhodobé uvolňování BPA z kompozitů s monomery na bázi BPA ve srovnání s literárními údaji.

Přepočtené hodnoty (tučně) jsou vztaženy k objemu zkušebního tělíska. U studie De Nys et al. jsou uvedena množství BPA naměřená v 1 ml extrakčního média a nejsou uvedeny směrodatné odchylky, neboť uvedené hodnoty byly získány sečtením hodnot za příslušný počet týdnů.

Z Obr. 13 je zřejmé, že postupný pokles průměrného denního uvolňování byl někdy přerušen mírným nárůstem. I když by se mohlo jednat o nepodstatnou odchylku hodnot, podobný jev

byl pozorován De Nysem a kol., kteří zkoumali dlouhodobé uvolňování BPA ze čtyř kompozitních materiálů (De Nys, Putzeys, et al., 2021). Ve vodném prostředí by tento nárůst mohl být způsoben hydrolytickou degradací polymerní matrice, ale mechanismus degradace testovaných materiálů v methanolu jasný není a vyžadoval by podrobnější zkoumání. Srovnání námi naměřených hodnot se zmíněnou studií De Nyse a kol. ve dvou časových intervalech je uvedeno v Tab. 16.

Dalším z cílů této práce bylo prozkoumat vliv zkrácené doby ozáření výplňových materiálů při vyšší intenzitě světla na uvolňování bisfenolů, neboť zkracování doby ozáření je jedním ze současných trendů. Nejprve bylo nutné zvolit vhodné polymerační režimy a zhodnotit jejich vliv na kvalitu polymerace. Pro tyto účely byly vybrány tři kompozitní materiály s různými iniciačními systémy a kvalita jejich polymerace byla hodnocena pomocí mikrotvrdomosti. Pro kompozity o tloušťce 2 mm platí, že pokud je poměr mikrotvrdomosti spodního povrchu k hornímu (bottom-to-top ratio) větší než 0,8, tj. mikrotvrdomost na spodním povrchu přesahuje 80 % maximální mikrotvrdomosti naměřené na horním povrchu, polymerace se považuje za dostatečnou (Bouschlicher et al., 2004; Ferracane, 1985). Naše měření ukázala, že uvedené kritérium nebylo dosaženo u žádného z testovaných kompozitů v režimech s nízkou světelnou energií, tj. 15,8 J/cm² (2980/5) a 16,6 J/cm² (1950/8). Těsně nad hranicí 80 % byla mikrotvrdomost spodního povrchu i v některých skupinách se střední světelnou energií, zejména 20,7 J/cm² (1950/10). Toto zjištění bylo překvapivé, protože podmínky pro polymeraci byly optimální a světelné energie zvolené v této studii byly mnohem vyšší než minimální požadavky výrobců (9 J/cm² pro ESQ, 10 J/cm² pro FU a TEC). V klinické praxi je riziko nedostatečné polymerace ještě vyšší, protože vzdálenost mezi světlovodem lampy a povrchem kompozitu je obvykle větší a jejich vzájemná orientace není kolmá ani soustředná, čímž se snižuje počet fotonů dopadajících na povrch kompozitu.

Na základě uvedených výsledků byly pro studii uvolňování BPA zvoleny režimy s co nejvyššími rozdíly v době a intenzitě ozáření: 1300/20 a 2980/5. První z nich reprezentuje obvyklé podmínky polymerace a sloužil jako referenční standard, druhý byl vybrán jako zástupce zkrácené doby ozáření s nižší dodanou světelnou energií, což může snížit konverzi monomerů. Výsledky ukázaly, že režim 2980/5 vedl k významně vyššímu uvolňování BPA z většiny materiálů během prvního dne, což mohlo být dáno nižší kvalitou polymerace zejména na spodním povrchu zkušebních tělísek. Tomu odpovídá i vyšší ztráta hmotnosti tělísek polymerovaných v režimu 2980/5, která vyjadřuje množství vyluhovatelných látek.

Na druhou stranu polymerační podmínky neměly téměř žádný vliv na kumulativní množství BPA uvolněné za celou dobu extrakce. V několika skupinách sice byly nalezeny signifikantní rozdíly, ale jejich klinická relevance je sporná, protože rozdíly v uvolněných množstvích BPA byly velmi malé.

Srovnání s jinými studii na toto téma rovněž neumožnilo vyvodit jasné závěry. Kwon a kol. pomocí HPLC-UV/VIS měřili uvolňování BPA do methanolu ze čtyř kompozitních materiálů a zjistili, že se za 24 hodin uvolnilo více BPA při prodloužené době ozáření a snížené vzdálenosti mezi světlovodem lampy a povrchem kompozitu (Kwon et al., 2015). To je v rozporu s výsledky této práce i s předpokladem, že vyšší dodaná světelná energie vede k vyšší kvalitě polymerace a tudíž nižšímu uvolňování látek ze struktury kompozitních materiálů (Van Landuyt et al., 2011). Vliv doby ozáření testovali také Polydorou a kol., ale BPA ve většině extraktů nebyl detekován (Polydorou, König, et al., 2009), což opět ukazuje význam použití dostatečně citlivých analytických metod. Polydorou a kol. totiž použili LC-MS/MS metodu s LLOQ 500 ng/ml, tedy přibližně 10 000× méně citlivou než v této práci. Vlivem podmínek polymerace na uvolňování BPA z kompozitů, pečetidel a adheziv se zabývali i Manabe a kol., kteří pro analýzu použili GC-MS. V jejich práci však byly hodnoceny jen dva extrémní případy – neopolymerované materiály rozpuštěné v methanolu byly srovnávány se zkušebními tělísky, která byla polymerována po dobu 1 minuty a vyluhována 24 hodin ve vodném prostředí. GC-MS analýzou bylo zjištěno, že uvolňování BPA z neopolymerovaných materiálů bylo významně vyšší (Manabe et al., 2000), což se však u takto odlišných podmínek dalo předpokládat.

5.2 Uvolňování BPA z polykarbonátů

Přestože polykarbonáty mají v polymerních řetězcích vysoký obsah BPA, v souvislosti se zubním lékařstvím byla uvolňování BPA z jejich struktury věnována malá pozornost, zřejmě z důvodů jejich méně častého používání. Podobně jako u výplňových materiálů bylo zjištěno, že se z polykarbonátů v methanolu uvolňovala významně vyšší množství BPA než v umělé slině. S výplňovými materiály byla srovnatelná i kinetika uvolňování BPA, které bylo nejrychlejší během prvního dne, a poté významně zpomalilo. Nicméně po 3 měsících se průměrné denní uvolňování BPA ve srovnání s 1 měsícem mírně zvýšilo. Tento nárůst naznačuje, že polykarbonáty mohou během dlouhodobého používání degradovat. Hlavním rozdílem oproti výplňovým materiálům však byla řádově vyšší množství uvolněného BPA.

Srovnání jednotlivých skupin polykarbonátů ukázalo, že během prvního dne se nejvíce BPA v methanolu i umělé slině uvolnilo z korunek frézovaných ze ZPF a TBP. To by mohlo souviset s přítomností plasticky deformovaných oblastí a trhlin, které byly skenovací elektronovou mikroskopií nalezeny zejména na vnitřních površích korunek (Obr. 17). Uvolňování mohlo být vyšší jednak proto, že tyto defekty zvyšují plochu kontaktu s extrakčním médiem (Van Landuyt et al., 2011), a také z důvodu, že polykarbonát v těchto místech může být náchylnější k hydrolytické degradaci (Bair et al., 1981; Brunelle, 2014; Golovoy & Zinbo, 1989). ZPF i TBP byly zpracovány podle pokynů výrobce, ty se však významně lišily. V případě ZPF byla použita fréza s jedním břitem, která umožňuje efektivní odstraňování detritu a zabraňuje přehřátí materiálu (Edelhoff et al., 2017). Pro TBP byla doporučena fréza se dvěma břity a vyšší rychlost otáčení, což může vést k vyšší produkci tepla, proto bylo během frézování nutné použít vodní chlazení. Domníváme se, že to mohlo vést ke zvýšené hydrolytické degradaci TBP a způsobit výrazně vyšší uvolňování BPA ve srovnání se ZPF, který byl frézován s chlazením vzduchem. Dalším možným vysvětlením by mohly být rozdíly v kvalitě samotných polykarbonátových bloků, ale výrobci neposkytli žádné podrobnosti o jejich složení ani podmínkách výroby.

Z 3D-tištěných korunek se zpočátku uvolňovalo méně BPA než z frézovaných polykarbonátů, pravděpodobně v důsledku menšího množství povrchových defektů (Obr. 17). Uvolňování BPA z 3D-tištěných korunek se však po prvním dni nesnížilo tak výrazně jako u ostatních polykarbonátů. Tento rozdíl v kinetice uvolňování BPA spolu s nejvyšší sorpcí umělé sliny mohou být způsobeny tím, že vlastnosti 3D-tištěného polykarbonátu byly nepříznivě ovlivněny zahřátím filamentu na teplotu přibližně 280-300 °C. Polykarbonáty totiž snadno absorbují vzdušnou vlhkost, která při takto vysokých teplotách může způsobit jejich hydrolytickou degradaci (Brunelle, 2014; Yoo et al., 2012). Podobné teploty se obvykle používají i při vstřikování nebo lisování roztaveného polykarbonátu, které bylo pravděpodobně použito při výrobě prefabrikovaných korunek, jak naznačil jejich hladký povrch a přítomnost dělicí linie (Obr. 18). Riziko degradace při vstřikování je obvykle omezováno důkladným vysušením polykarbonátových granulí a vstřikováním polykarbonátu za pečlivě kontrolovaných podmínek (Brunelle, 2014). V důsledku optimalizovaného procesu výroby bylo množství BPA uvolněné z prefabrikovaných korunek nejnižší ze všech testovaných polykarbonátů. Porovnání hodnot naměřených v této studii s dříve publikovanými údaji je problematické vzhledem k rozdílům v testovaných materiálech, velikosti a tvaru zkušebních tělísek, výrobních metodách, extrakčních médiích,

dobách extrakce a analytických metodách. Lze pouze konstatovat, že množství uvolněného BPA naměřená v této studii byla přibližně srovnatelná s hodnotami ve studii Suzuki a kol. (Suzuki et al., 2000), avšak vyšší než hodnoty, které naměřili Watanabe a kol. (Watanabe, 2004; Watanabe et al., 2001).

Více údajů existuje o sorpci polykarbonátů. V této studii byla nejvyšší sorpce zjištěna u 3D-tištěných korunek ($15,5 \pm 1,8 \mu\text{g}/\text{mm}^3$), což je o něco více než bylo naměřeno ve studii 3D-tištěných dlah ($2,4\text{--}11,4 \mu\text{g}/\text{mm}^3$) (Lin et al., 2019). U ostatních polykarbonátových korunek byla sorpce výrazně nižší ($2,7\text{--}3,9 \mu\text{g}/\text{mm}^3$, $0,24\text{--}0,33$ hmotn. %), nicméně i tyto hodnoty byly vyšší než Watanabem naměřená sorpce polykarbonátové dočasné korunky ($0,07$ hmotn. %) (Watanabe, 2004). Námi zjištěné hodnoty sorpce ale byly v souladu s literárními údaji o polykarbonátech, $0,23\text{--}0,35$ hmotn. % (Brunelle, 2014) a $0,34 \pm 0,04$ hmotn. % (Hamanaka et al., 2014), což platilo i pro námi naměřenou ztrátu hmotnosti, resp. množství extrahovatelných látek ($1,7\text{--}3,2 \mu\text{g}/\text{mm}^3$, $0,14\text{--}0,29$ hmotn. %). V předchozích studiích byla zjištěna ztráta hmotnosti $0,11\text{--}0,30 \mu\text{g}/\text{mm}^3$ (Lin et al., 2019), resp. $0,3$ hmotn. % (Brunelle, 2014).

Do této studie byl jako negativní kontrola zařazen i PMMA, protože polykarbonáty jsou jeho klinickou alternativou. Během prvního týdne byla v methanolu detekována stopová množství BPA, pravděpodobně v důsledku kontaminace během výroby frézovacího bloku nebo při frézování korunky. V dalších extraktech nebyl BPA nalezen, resp. jeho případné množství bylo nižší než LLOQ. Sorpce frézovaného PMMA byla přibližně pětikrát vyšší než u frézovaných polykarbonátů, ale srovnatelná s 3D-tištěnými korunkami, což potvrzuje výsledky studie, kde byla hodnocena sorpce vody u vstřikovacích termoplastických bazálních hmot (Hamanaka et al., 2014). Závěrem je nutné zmínit, že ponoření do methanolu vedlo k bobtnání a plastifikaci korunek z PMMA, které přibližně po 1 týdnu ztratily svůj původní tvar. V umělé slině nebyly takové změny PMMA pozorovány a u polykarbonátů se neobjevily v žádném z extrakčních médií.

5.3 Srovnání expozice se současnými limity

Pro odhad rizika a prevenci možných nežádoucích účinků testovaných materiálů bylo množství uvolněného BPA porovnáno se současně platnou hodnotou TDI $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ tělesné hmotnosti, kterou stanovila EFSA v roce 2015 (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids, 2015). Hodnota TDI by však podle nového

návrhu EFSA mohla být snížena až 100 000×, tedy na 0,04 ng/kg tělesné hmotnosti (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids, 2021), což by mělo zásadní vliv na interpretaci našich výsledků. Je však otázka, nakolik by to vedlo k regulaci dentálních materiálů, protože toto snížení TDI by znamenalo, že alimentární expozice BPA (až 1,4 µg/kg tělesné hmotnosti) by byla o několik řádů vyšší než nová hodnota TDI, a primárně by tudíž bylo nutné vyřešit, jak omezit významnější zdroje BPA.

Z naměřených hodnot byly pro toto porovnání zvoleny ty nejvyšší, tedy naměřené v methanolu po 1 dni. Množství BPA uvolněná z výplňových materiálů lze ve srovnání s aktuální TDI považovat za zanedbatelná – i v případě FU ozářeného po dobu 5 s by expozice z 1 g materiálu odpovídala 0,009 % TDI pro dospělého o hmotnosti 70 kg a 0,03 % TDI pro dítě o hmotnosti 20 kg. Z 1 g materiálu je přitom možné zhotovit přibližně sedm středně velkých kompozitních výplní. Ve srovnání s navrhovanou 100 000× nižší hodnotou TDI by v uvedeném nejhorším možném scénáři středně velká výplň mírně přesáhla TDI dospělého člověka, ale pouze první den po zhotovení, protože poté následoval signifikantní pokles uvolňování BPA. Navíc je pravděpodobné, že uvolňování BPA ve slině je nižší než v methanolu.

Alternativou k přepočtu na hmotnost je vztáhnout uvolňování BPA na plochu modelové rekonstrukce, jak doporučují De Nys a kol. (De Nys, Putzeys, et al., 2021). Pokud by z FU byla zhotovena korunka na jeden zub, expozice by se dle velikosti zubu pohybovala v rozsahu 0,002-0,004 % TDI u dospělého (70 kg) a 0,008-0,014 % TDI u dítěte (20 kg). V nepravděpodobném případě rekonstrukce celého horního a dolního zubního oblouku přímými kompozitními korunkami by byl dospělý o hmotnosti 70 kg vystaven 0,09 % stávající TDI. V případě snížení TDI na 0,04 ng/kg tělesné hmotnosti by uvedená kompletní rekonstrukce chrupu přesáhla TDI téměř 100×, nicméně i to je řádově méně v porovnání s běžnou alimentární expozicí BPA.

U polykarbonátů byla množství uvolněného BPA významně vyšší než u výplňových materiálů, po 1 dni se pohybovala od 8,0±1,6 µg/g do 32,2±3,8 µg/g v methanolu a od 0,07±0,02 µg/g do 7,1±0,9 µg/g v umělé slině. Vzhledem k hmotnosti testovaných korunek (0,11-0,13 g) lze říct, že jednotlivá korunka také nepředstavuje podstatnou expozici BPA – i nejvyšší hodnota naměřená pro TBP v methanolu po 1 dni by odpovídala 1,38 % stávající TDI 70 kg vážícího člověka. Naopak okluzní dlaha pokrývající celý zubní oblouk by však vzhledem ke své hmotnosti až 3 g mohla odpovídat asi 35 % TDI. I když jsou tyto výpočty

založeny na nejhorším možném scénáři, tedy na množství BPA uvolněném z TBP v methanolu během prvního dne, naznačují, že polykarbonátové okluzní dlahy by mohly být relevantním zdrojem BPA. Pro omezení expozice pacienta lze doporučit ponoření dlahy do vody alespoň na 1 den před jejich odevzdáním, aby se využilo rychlého počátečního uvolňování BPA z jejich povrchu. Ještě účinnější by mohlo být ponoření dlah do organického extrakčního média, např. alkoholu, ale předem by bylo nutné ověřit, zda by to nevyvolalo degradaci polykarbonátů a nezhoršilo jejich mechanické vlastnosti.

Studie *in vitro* je však třeba interpretovat obezřetně, protože intraorální podmínky by mohly uvolňování BPA zvýšit prostřednictvím faktorů, které je obtížné simulovat. Mezi ně patří kontinuální tok slin, přítomnost bakterií a různých enzymů, mechanické zatížení nebo změny teploty a pH, jež urychlují hydrolýzu polymerní matrice. Naopak k nižšímu uvolňování BPA by mohla vést skutečnost, že klinicky není v dutině ústní dutině exponován celý povrch materiálu, ale pouze jeho vnější část. Limitací jsou také odlišnosti v přípravě vzorků *in vitro* a skutečným použitím materiálu *in vivo*. Budoucí studie by se proto měly zaměřit na vývoj monomerů bez strukturní jednotky BPA, hodnocení uvolňování BPA *in vivo* a objasnění jeho vlivu na lidské zdraví (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Vandenberg et al., 2012).

6 Závěry

Uvolňování BPA bylo potvrzeno u všech testovaných materiálů, zatímco přítomnost jeho analogů nebyla zjištěna u žádného z nich. Ze všech materiálů se nejvíce BPA uvolnilo během prvního dne, ale uvolňování v menších množstvích pokračovalo po celou dobu sledování. Výjimkou byly „BPA-free“ materiály, u nichž se uvolňování koncem sledované doby zastavilo.

Mezi výplňovými materiály se nejvyšší množství BPA uvolnila z kompozitů s monomery na bázi BPA, které byly následovány hybridními skloionomerními cementy. Nejmenší množství BPA byla naměřena u „BPA-free“ kompozitů. Zkrácená doba ozáření u většiny výplňových materiálů významně zvýšila množství BPA uvolněného během prvního dne, ale neměla významný vliv na celkové množství uvolněného BPA.

Množství BPA zjištěná v extraktech polykarbonátů byla řádově vyšší než u testovaných výplňových materiálů. Mezi experimentálními skupinami však byly zjištěny významné rozdíly, které naznačují podstatný vliv metody použité pro zhotovení polykarbonátové náhrady.

Porovnání naměřených hodnot se současnými limity ukázalo, že množství BPA uvolněná z testovaných výplňových materiálů jsou řádově nižší než stávající TDI a zanedbatelná ve srovnání s běžnou alimentární expozicí. Významným zdrojem BPA však mohou být polykarbonáty, zvláště pokud jsou použity např. pro zhotovení okluzních dlah. Expozice by sice ani v tomto případě neměla překročit aktuální limity, ale EFSA v současné době dokončuje analýzu nových poznatků o účincích BPA a lze očekávat významné snížení hodnoty TDI. To by mohlo podstatným způsobem ovlivnit vnímání zdravotních rizik souvisejících s expozicí BPA z dentálních i jiných materiálů a vést k jejich omezování.

7 Souhrn

Úvod: Bisfenol A (BPA) je významný endokrinní disruptor, jehož použití je v posledních letech z důvodu možných nežádoucích účinků na lidské zdraví regulováno. BPA se široce používá v materiálech určených pro styk s potravinami, proto je významná část expozice alimentární, ale uvolňovat se může také ze struktury dentálních polymerních materiálů.

Cíl: Cílem této práce bylo prostudovat kinetiku dlouhodobého uvolňování BPA z několika typů dentálních materiálů v methanolu, který představuje nejhorší možný scénář eluce BPA, a v umělé slině, která lépe simuluje podmínky v dutině ústní. Sledována byla také přítomnost strukturních analogů BPA, které v dentálních materiálech dosud nebyly popsány. Hodnocen byl i vliv podmínek polymerace na uvolňování bisfenolů z výplňových materiálů.

Materiály a metodika: Z výplňových materiálů byly testovány dentální kompozity obsahující monomery na bázi BPA, „BPA-free“ kompozity a hybridní skloionomerní cementy. Zkušební tělíska byla ozářena po standardní dobu 20 s při 1300 mW/cm², nebo zkrácenou dobu 5 s při 2980 mW/cm². Dále byly testovány polykarbonátové korunky vyrobené frézováním a 3D tiskem. Extrakty v methanolu a umělé slině byly u výplňových materiálů odebrány po 1-260 dnech, u polykarbonátů po 1 dni až 3 měsících. Analýza extraktů byla provedena ultra vysoce účinnou kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní detekcí. Ke zvýšení citlivosti analýzy byla použita derivatizace dansylchloridem.

Výsledky: BPA byl detekován v extraktech všech materiálů, zatímco přítomnost jeho analogů nebyla potvrzena u žádného z nich. V methanolu se uvolnila významně vyšší množství BPA než v umělé slině. V obou extrakčních médiích uvolňovaly všechny materiály nejvyšší množství BPA během prvního dne, poté se uvolňování významně snížilo. Mezi výplňovými materiály se nejméně BPA uvolnilo z „BPA-free“ kompozitů, u nichž se uvolňování postupně zastavilo. Hodnoty naměřené u hybridních skloionomerních cementů byly vyšší, ale nejvíce BPA se uvolnilo z kompozitů s monomery na bázi BPA. U těchto materiálů uvolňování BPA prokazatelně pokračovalo i po 260 dnech. Zkrácená doba ozáření významně zvýšila množství BPA uvolněného během prvního dne, ale neměla významný vliv na celkové množství uvolněného BPA. U polykarbonátů byla ve srovnání s výplňovými materiály naměřena řádově vyšší množství uvolněného BPA.

Závěr: Dle současného tolerovatelného denního příjmu (4 µg BPA/kg tělesné hmotn./den) lze použití testovaných výplňových materiálů považovat za bezpečné, náhrady či dlahy z polykarbonátů však mohou expozici BPA významně zvýšit a představovat zdravotní riziko.

Klíčová slova: bisfenol A, kompozitní materiály, skloionomerní cementy, polykarbonáty

8 Summary

Introduction: Bisphenol A (BPA) is a major endocrine disruptor, and its use has been regulated in recent years due to potential adverse effects on human health. A significant part of the exposure to BPA is alimentary because BPA is widely used in food contact materials, but it may be also released from the structure of dental polymeric materials.

Aim: The aim of this dissertation was to examine the kinetics of the long-term release of BPA from several types of dental materials in methanol, which represents the worst-case scenario for BPA elution, and in artificial saliva (AS), which is more representative of oral cavity conditions. The analogues of BPA were also tested, as their presence in dental materials has not been monitored before. Furthermore, the effect of polymerization conditions on the release of bisphenols from restorative materials was also evaluated.

Materials and methods: Representative restorative materials – dental composites containing BPA-based monomers, “BPA-free” composites and hybrid glass ionomer cements were tested. The specimens were irradiated either for 20 s at 1300 mW/cm² or 5 s at 2980 mW/cm², and their extracts in methanol and AS were collected after 1-260 days. Additionally, polycarbonate crowns produced by milling and 3D printing were tested, and their extracts were collected after 1 day-3 months. All extracts were analyzed by ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. To increase the sensitivity of the analysis, dansyl chloride derivatization was used.

Results: BPA was detected in all tested materials, while its analogues were not found in any of them. Significantly higher amounts of BPA were released in methanol than in AS. All tested materials released the highest amounts of BPA during the first day, followed by a significant decrease. Among restorative materials, “BPA-free” composites released the least BPA and the release gradually stopped. The values measured for hybrid glass ionomer cements were higher, but the most BPA was released from composites containing BPA-based monomers. The release of BPA from these materials clearly continued even after 260 days. The 5s irradiation significantly increased the amount of BPA released during the first day, but it had no significant effect on its total amount. Compared with restorative materials, the amounts of BPA released from polycarbonates were considerably high.

Conclusion: Given the current tolerable daily intake (4 µg BPA/kg body weight/day), the use of the tested restorative materials is safe, but polycarbonate restorations or splints may significantly increase BPA exposure and pose a health risk.

Keywords: bisphenol A; resin composites; glass ionomer cements, polycarbonates

9 Seznam publikací doktoranda

9.1 Publikace, které jsou podkladem disertace

Tichý A., Bradna P.: *Applicability of exposure reciprocity law for fast polymerization of restorative composites containing various photoinitiating systems*. Operative Dentistry (2021), 46(4): 406-418; IF=2.9. <https://doi.org/10.2341/20-112-L>

Šimková M.*, **Tichý A.***, Dušková M., Bradna P. (*equal contribution): *Dental Composites – a Low-Dose Source of Bisphenol A? Physiological Research* (2020), 69 (Suppl 2): S295-S304; IF=1.8. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934518>

Tichý A., Šimková M., Vrbová R., Roubíčková A., Dušková M., Bradna P.: *Bisphenol A release from dental composites and resin-modified glass ionomers under two polymerization conditions*. Polymers (2022), 14(1): 46; IF=5.0. <https://doi.org/10.3390/polym14010046>

Tichý A., Šimková M., Schweiger J., Bradna P., Güth J.-F.: *Release of bisphenol A from milled and 3D-printed dental polycarbonate materials*. Materials (2021), 14(19): 5868; IF=3.7. <https://doi.org/10.3390/ma14195868>

9.2 Publikace nesouvisející s tématem disertace

Comba L., **Tichý A.**, Bradna P.: *The effect of censoring on the statistical evaluation of composite to composite bond strength*. Journal of Adhesive Dentistry (2020), 22(2): 183-193; IF=2.4. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a44283>

Vašáková J., **Tichý A.**, Dušková J., Bradna P., Broukal Z.: *Dental fear/anxiety in Czech preschoolers and its relationship to gender, age, location of residence, dental status and previous treatment*. European Journal of Paediatric Dentistry (2022); 23(4): 327-331; IF=2.3. <https://doi.org/10.23804/ejpd.2022.23.04.13>

Tichý A., Hosaka K., Tagami J.: *Univerzální adheziva - nový směr vývoje adhezivních systémů*. Česká stomatologie/Praktické zubní lékařství (2020), 120(1): 4-12. <https://doi.org/10.51479/cspzl.2020.004>

9.3 Prezentace na kongresech a sympoziích

Tichý A., Roubíčková A., Bradna P.: *Is fast photopolymerization a reliable concept of composite curing?* CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress, 21.-23.9.2017, Vídeň, Rakousko

Šimková M., **Tichý A.**, Kolátorová L., Vítků J., Dušková M., Bradna P.: *LC-MS/MS metoda stanovení bisfenolů a její aplikace při analýze dentálních výplňových materiálů.* Bilaterálne vedecké sympóziu Endokrinné disruptory 2019, 29.-30.5.2019, Bratislava, Slovensko

Šimková M., **Tichý A.**, Kolátorová L., Vítků J., Dušková M., Bradna P.: *Dentální výplňové materiály coby trvalý zdroj BPA v lidském orgnismu?* Imunoanalýza 2019, 17.-21.6.2019, Ľubochňa – Vyšné Krátké, Slovensko

Tichý A., Šimková M., Kolátorová L., Vítků J., Dušková M., Bradna P.: *Dental composites – a low-dose source of bisphenol A?* CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress, 19.-21.9.2019, Madrid, Španělsko

Šimková M., **Tichý A.**, Dušková M., Vítků J., Kolátorová L., Bradna P.: *Bisphenols release from dental composite materials*, European Congress of Endocrinology, 5.-9.9.2020, online

Tichý A., Šimková M., Bradna P.: *Mohou být dentální materiály rizikovým zdrojem bisfenolu A?* Studentská vědecká konference 1. LF UK, 20. 5. 2021, Praha, Česká republika

Šimková M., **Tichý A.**, Dušková M., Bradna P.: *Long-term release of bisphenols from dental composite materials.* Interdisciplinary meeting of young life scientists 2021, 17.-20.5.2021, Mílovy, Česká republika

Tichý A., Šimková M., Schweiger J., Bradna P., Güth J.-F.: *Release of bisphenol A from dental polycarbonate materials.* CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress, 16.-18.9.2021, Brusel, Belgie

Tichý A., Šimková M., Schweiger J., Bradna P., Güth J.: *Release of bisphenol A from dental polycarbonate materials*, Interdisciplinary meeting of young life scientists 2022, 16.-19. 5. 2022, Mílovy, Česká republika

Tichý A., Šimková M., Dušková M., Bradna P.: *Uvolňování bisfenolu A z dentálních materiálů*, Den výzkumných prací 2022, 3. 6. 2022, Praha, Česká republika

10 Seznam použité literatury

- Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E., & Nadal, A. (2006). The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic β -cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environmental Health Perspectives*, 114(1), 106-112. <https://doi.org/10.1289/ehp.8451>
- AlShaafi, M. M. (2017). Effects of delivering the same radiant exposures at 730, 1450, and 2920 mW/cm² to two resin-based composites. *European Journal of Dentistry*, 11(1), 22-28. https://doi.org/10.4103/ejd.ejd_270_16
- Anusavice, K. J., & Phillips, R. W. (2003). *Phillips' science of dental materials* (11th ed.). W.B. Saunders.
- Arenholt-Bindslev, D., Breinholt, V., Preiss, A., & Schmalz, G. (1999). Time-related bisphenol-A content and estrogenic activity in saliva samples collected in relation to placement of fissure sealants. *Clinical Oral Investigations*, 3(3), 120-125. <https://doi.org/10.1007/s007840050089>
- Asmussen, E., & Peutzfeldt, A. (2005). Polymerization contraction of resin composite vs. energy and power density of light-cure. *European Journal of Oral Sciences*, 113(5), 417-421. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2005.00239.x>
- Atkinson, J. C., Diamond, F., Eichmiller, F., Selwitz, R., & Jones, G. (2002). Stability of bisphenol A, triethylene-glycol dimethacrylate, and bisphenol A dimethacrylate in whole saliva. *Dental Materials*, 18(2), 128-135. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(01\)00031-8](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(01)00031-8)
- Bair, H. E., Falcone, D. R., Hellman, M. Y., Johnson, G. E., & Kelleher, P. G. (1981). Hydrolysis of polycarbonate to yield BPA. *Journal of Applied Polymer Science*, 26(6), 1777-1786. <https://doi.org/10.1002/app.1981.070260603>
- Becher, R., Wellendorf, H., Sakhi, A. K., Samuelsen, J. T., Thomsen, C., Bølling, A. K., & Kopperud, H. M. (2018). Presence and leaching of bisphenol A (BPA) from dental materials. *Acta Biomaterialia Odontologica Scandinavica*, 4(1), 56-62. <https://doi.org/10.1080/23337931.2018.1476869>
- Berge, T. L. L., Lygre, G. B., Lie, S. A., Lindh, C. H., & Bjorkman, L. (2019). Bisphenol A in human saliva and urine before and after treatment with dental polymer-based restorative materials. *European Journal of Oral Sciences*, 127(5), 435-444. <https://doi.org/10.1111/eos.12647>

- Bortolotto, T., Dagon, C., & Krejci, I. (2013). Light polymerization during cavity filling: effect of 'exposure reciprocity law' and the resulted shrinkage forces on restoration margins. *Acta Odontologica Scandinavica*, 71(5), 1296-1302.
<https://doi.org/10.3109/00016357.2012.762988>
- Bouschlicher, M. R., Rueggeberg, F. A., & Wilson, B. M. (2004). Correlation of bottom-to-top surface microhardness and conversion ratios for a variety of resin composite compositions. *Operative Dentistry*, 29(6), 698-704.
- Brunelle, D. J. (2014). Polycarbonates. In H. F. Mark (Ed.), *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. John Wiley & Sons.
<https://doi.org/10.1002/0471440264.pst255.pub2>
- De Nys, S., Duca, R. C., Vervliet, P., Covaci, A., Boonen, I., Elskens, M., Vanoirbeek, J., Godderis, L., Van Meerbeek, B., & Van Landuyt, K. L. (2021). Bisphenol A as degradation product of monomers used in resin-based dental materials. *Dental Materials*, 37(6), 1020-1029. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2021.03.005>
- De Nys, S., Duca, R. C., Vervliet, P., Covaci, A., Boonen, I., Elskens, M., Vanoirbeek, J., Godderis, L., Van Meerbeek, B., & Van Landuyt, K. L. (2022). Bisphenol A release from short-term degraded resin-based dental materials. *Journal of Dentistry*, 116, 103894. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2021.103894>
- De Nys, S., Putzeys, E., Duca, R. C., Vervliet, P., Covaci, A., Boonen, I., Elskens, M., Vanoirbeek, J., Godderis, L., Van Meerbeek, B., & Van Landuyt, K. L. (2021). Long-term elution of bisphenol A from dental composites. *Dental Materials*, 37(10), 1561-1568. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2021.08.005>
- De Nys, S., Putzeys, E., Vervliet, P., Covaci, A., Boonen, I., Elskens, M., Vanoirbeek, J., Godderis, L., Van Meerbeek, B., Van Landuyt, K. L., & Duca, R. C. (2018). A novel high sensitivity UPLC-MS/MS method for the evaluation of bisphenol A leaching from dental materials. *Scientific Reports*, 8(1), 6981.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-24815-z>
- Debnath, S., Wunder, S. L., McCool, J. I., & Baran, G. R. (2003). Silane treatment effects on glass/resin interfacial shear strengths. *Dental Materials*, 19(5), 441-448.
<https://doi.org/S0109564102000891>
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., & Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews*, 30(4), 293-342.
<https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>

- Durner, J., Stojanovic, M., Urcan, E., Spahl, W., Haertel, U., Hickel, R., & Reichl, F.-X. (2011). Effect of hydrogen peroxide on the three-dimensional polymer network in composites. *Dental Materials*, 27(6), 573-580.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.02.013>
- Edelhoff, D., Schweiger, J., Prandtner, O., Trimpl, J., Stimmelmayer, M., & Güth, J. F. (2017). CAD/CAM splints for the functional and esthetic evaluation of newly defined occlusal dimensions. *Quintessence International*, 48(3), 181-191.
<https://doi.org/10.3290/j.qi.a37641>
- Edelhoff, D., Stimmelmayer, M., Schweiger, J., Ahlers, M. O., & Güth, J.-F. (2019). Advances in materials and concepts in fixed prosthodontics: a selection of possible treatment modalities. *British Dental Journal*, 226(10), 739-748.
<https://doi.org/10.1038/s41415-019-0265-z>
- EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (2021). Re-evaluation of the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*.
- EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (2015). Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*, 13(1), 3978.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3978>
- EFSA Scientific Committee (2021). Opinion on the impact of non-monotonic dose responses on EFSA's human health risk assessments. *EFSA Journal*, 19(10), e06877.
<https://doi.org/https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6877>
- Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M. J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., & Habert, R. (2015). A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertility and Sterility*, 103(1), 11-21.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.005>
- Eliades, T., Hiskia, A., Eliades, G., & Athanasiou, A. E. (2007). Assessment of bisphenol-A release from orthodontic adhesives. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 131(1), 72-75. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2006.08.013>
- Eliades, T., Voutsas, D., Sifakakis, I., Makou, M., & Katsaros, C. (2011). Release of bisphenol-A from a light-cured adhesive bonded to lingual fixed retainers. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 139(2), 192-195.
<https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2009.12.026>

- Emami, N., Söderholm, K.-J. M., & Berglund, L. A. (2003). Effect of light power density variations on bulk curing properties of dental composites. *Journal of Dentistry*, *31*(3), 189-196. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(03\)00015-0](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(03)00015-0)
- Emami, N., & Soderholm, K. J. (2003). How light irradiance and curing time affect monomer conversion in light-cured resin composites. *European Journal of Oral Sciences*, *111*(6), 536-542.
- Ferracane, J. L. (1985). Correlation between hardness and degree of conversion during the setting reaction of unfilled dental restorative resins. *Dental Materials*, *1*(1), 11-14. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(85\)80058-0](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(85)80058-0)
- Ferracane, J. L. (2011). Resin composite—State of the art. *Dental Materials*, *27*(1), 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.020>
- Fleisch, A. F., Sheffield, P. E., Chinn, C., Edelstein, B. L., & Landrigan, P. J. (2010). Bisphenol A and related compounds in dental materials. *Pediatrics*, *126*(4), 760-768. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-2693>
- Fung, E. Y. K., Ewoldsen, N. O., St. Germain, H. A., Marx, D. B., Miaw, C.-L., Siew, C., Chou, H.-N., Gruninger, S. E., & Meyer, D. M. (2000). Pharmacokinetics of bisphenol A released from a dental sealant. *The Journal of the American Dental Association*, *131*(1), 51-58. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2000.0019>
- Geens, T., Aerts, D., Berthot, C., Bourguignon, J.-P., Goeyens, L., Lecomte, P., Maghuin-Rogister, G., Pironnet, A.-M., Pussemier, L., Scippo, M.-L., Van Loco, J., & Covaci, A. (2012). A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(10), 3725-3740. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.059>
- Geurtsen, W., Spahl, W., & Leyhausen, G. (1999). Variability of cytotoxicity and leaching of substances from four light-curing pit and fissure sealants. *Journal of Biomedical Materials Research*, *44*(1), 73-77.
- Giorgi, M. C. C., Pistor, V., Mauler, R. S., Lima, D. A. N. L., Marchi, G. M., & Aguiar, F. H. B. (2015). Influence of light-activation protocol on methacrylate resin-composite evaluated by dynamic mechanical analysis and degree of conversion. *Lasers in Medical Science*, *30*(4), 1219-1223. <https://doi.org/10.1007/s10103-014-1572-x>
- Golovoy, A., & Zinbo, M. (1989). Water sorption and hydrolytic stability of polycarbonates. *Polymer Engineering & Science*, *29*(24), 1733-1737. <https://doi.org/10.1002/pen.760292402>

- Hadis, M., Leprince, J. G., Shortall, A. C., Devaux, J., Leloup, G., & Palin, W. M. (2011). High irradiance curing and anomalies of exposure reciprocity law in resin-based materials. *Journal of Dentistry*, 39(8), 549-557.
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2011.05.007>
- Halvorson, R. H., Erickson, R. L., & Davidson, C. L. (2002). Energy dependent polymerization of resin-based composite. *Dental Materials*, 18(6), 463-469.
[https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(01\)00069-0](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(01)00069-0)
- Hamanaka, I., Iwamoto, M., Lassila, L., Vallittu, P., Shimizu, H., & Takahashi, Y. (2014). Influence of water sorption on mechanical properties of injection-molded thermoplastic denture base resins. *Acta Odontologica Scandinavica*, 72(8), 859-865.
<https://doi.org/10.3109/00016357.2014.919662>
- Hamid, A., & Hume, W. R. (1997, Mar). A study of component release from resin pit and fissure sealants in vitro. *Dental Materials*, 13(2), 98-102.
[https://doi.org/10.1016/s0109-5641\(97\)80018-8](https://doi.org/10.1016/s0109-5641(97)80018-8)
- Hope, E., Reed, D. R., & Moilanen, L. H. (2016). Potential confounders of bisphenol-A analysis in dental materials. *Dental Materials*, 32(8), 961-967.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.05.001>
- Chung, S. Y., Kwon, H., Choi, Y. H., Karmaus, W., Merchant, A. T., Song, K. B., Sakong, J., Ha, M., Hong, Y. C., & Kang, D. (2012, Apr). Dental composite fillings and bisphenol A among children: a survey in South Korea. *International Dental Journal*, 62(2), 65-69. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595X.2011.00089.x>
- Ilie, N., Kreppel, I., & Durner, J. (2014). Effect of radical amplified photopolymerization (RAP) in resin-based composites. *Clinical Oral Investigations*, 18(4), 1081-1088.
<https://doi.org/10.1007/s00784-013-1085-1>
- Imai, Y., & Komabayashi, T. (2000). Elution of bisphenol A from composite resin: a model experiment. *Dental Materials Journal*, 19(2), 133-138.
<https://doi.org/10.4012/dmj.19.133>
- Joskow, R., Barr, D. B., Barr, J. R., Calafat, A. M., Needham, L. L., & Rubin, C. (2006). Exposure to bisphenol A from bis-glycidyl dimethacrylate-based dental sealants. *The Journal of the American Dental Association*, 137(3), 353-362.
<https://doi.org/10.14219/jada.archive.2006.0185>

- Kang, Y.-G., Kim, J.-Y., Kim, J., Won, P.-J., & Nam, J.-H. (2011). Release of bisphenol A from resin composite used to bond orthodontic lingual retainers. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, *140*(6), 779-789.
<https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2011.04.022>
- Kavlock, R. J., Daston, G. P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M. J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D. M., Sinks, T., & Tilson, H. A. (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives*, *104*(Suppl 4), 715-740. <https://doi.org/doi:10.1289/ehp.96104s4715>
- Kechagias, K., Anastasaki, P., Kyriakidou, M., & Dedi, K. D. (2020). Bisphenol A in Dentistry. *European Journal of Prosthodontics and Restorative Dentistry*, *28*(1), 3-9. https://doi.org/10.1922/EJPRD_01950Kechagias07
- Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., Yoshihara, S., Fujimoto, N., Watanabe, H., & Ohta, S. (2005). Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicological Sciences*, *84*(2), 249-259. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi074>
- Kloukos, D., Pandis, N., & Eliades, T. (2013). Bisphenol-A and residual monomer leaching from orthodontic adhesive resins and polycarbonate brackets: A systematic review. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, *143*(4, Suppl), S104-S112. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2012.11.015>
- Koin, P. J., Kilislioglu, A., Zhou, M., Drummond, J. L., & Hanley, L. (2008). Analysis of the degradation of a model dental composite. *Journal of Dental Research*, *87*(7), 661-665. <https://doi.org/10.1177/154405910808700712>
- Kolatorova Sosvorova, L., Chlupacova, T., Vitku, J., Vlk, M., Heracek, J., Starka, L., Saman, D., Simkova, M., & Hampl, R. (2017). Determination of selected bisphenols, parabens and estrogens in human plasma using LC-MS/MS. *Talanta*, *174*, 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.070>
- Kortenkamp, A. (2007). Ten years of mixing cocktails: A review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives*, *115*(Suppl 1), 98-105. <https://doi.org/10.1289/ehp.9357>

- Kwon, H. J., Oh, Y. J., Jang, J. H., Park, J. E., Hwang, K. S., & Park, Y. D. (2015). The effect of polymerization conditions on the amounts of unreacted monomer and bisphenol A in dental composite resins. *Dental Materials Journal*, 34(3), 327-335. <https://doi.org/10.4012/dmj.2014-230>
- LaFleur, A. D., & Schug, K. A. (2011). A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. *Analytica Chimica Acta*, 696(1), 6-26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.03.054>
- Lee, J.-H., Yi, S.-K., Kim, S.-Y., Kim, J.-S., Son, S.-A., Jeong, S.-H., & Kim, J.-B. (2017). Salivary bisphenol A levels and their association with composite resin restoration. *Chemosphere*, 172, 46-51. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.123>
- Leprince, J. G., Hadis, M., Shortall, A. C., Ferracane, J. L., Devaux, J., Leloup, G., & Palin, W. M. (2011). Photoinitiator type and applicability of exposure reciprocity law in filled and unfilled photoactive resins. *Dental Materials*, 27(2), 157-164. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.09.011>
- Leung, R. L., Fan, P. L., & Johnston, W. M. (1983). Post-irradiation polymerization of visible light-activated composite resin. *Journal of Dental Research*, 62(3), 363-365. <https://doi.org/10.1177/00220345830620031201>
- Lim, B. S., Ferracane, J. L., Condon, J. R., & Adey, J. D. (2002). Effect of filler fraction and filler surface treatment on wear of microfilled composites. *Dental Materials*, 18(1), 1-11. <https://doi.org/S0109564100001032>
- Lin, R., Yu, C.-H., & Sun, J. (2019). Mechanical properties and cytotoxicity of three-dimensional printing polycarbonate for occlusal splints. *Shanghai kou qiang yi xue (Shanghai Journal of Stomatology)*, 28(5), 467-471. <http://europepmc.org/abstract/MED/32274475>
- Löfroth, M., Ghasemimehr, M., Falk, A., & Vult von Steyern, P. (2019). Bisphenol A in dental materials – existence, leakage and biological effects. *Heliyon*, 5(5), e01711. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01711>
- Luo, S., Li, Y., Li, Y., Zhu, Q., Jiang, J., Wu, C., & Shen, T. (2016). Gestational and lactational exposure to low-dose bisphenol A increases Th17 cells in mice offspring. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 47, 149-158. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.09.017>

- Manabe, A., Kaneko, S., Numazawa, S., Itoh, K., Inoue, M., Hisamitsu, H., Sasa, R., & Yoshida, T. (2000). Detection of bisphenol-A in dental materials by gas chromatography-mass spectrometry. *Dental Materials Journal*, *19*(1), 75-86.
<https://doi.org/10.4012/dmj.19.75>
- Mazzaoui, S. A., Burrow, M. F., Tyas, M. J., Rooney, F. R., & Capon, R. J. (2002). Long-term quantification of the release of monomers from dental resin composites and a resin-modified glass ionomer cement. *Journal of Biomedical Materials Research*, *63*(3), 299-305. <https://doi.org/10.1002/jbm.10184>
- McCabe, J. F. (1998). Resin-modified glass-ionomers. *Biomaterials*, *19*(6), 521-527.
[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00132-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00132-X)
- Moszner, N., Fischer, U. K., Ganster, B., Liska, R., & Rheinberger, V. (2008). Benzoyl germanium derivatives as novel visible light photoinitiators for dental materials. *Dental Materials*, *24*(7), 901-907. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2007.11.004>
- Moszner, N., & Salz, U. (2001). New developments of polymeric dental composites. *Progress in Polymer Science*, *26*(4), 535-576.
[https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00005-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00005-3)
- Musanje, L., & Darvell, B. W. (2003). Polymerization of resin composite restorative materials: exposure reciprocity. *Dental Materials*, *19*(6), 531-541.
[https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(02\)00101-X](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(02)00101-X)
- Nathanson, D., Lertpitayakun, P., Lamkin, M. S., Edalatpour, M., & Chou, L. L. (1997). In vitro elution of leachable components from dental sealants. *The Journal of the American Dental Association*, *128*(11), 1517-1523.
<https://doi.org/10.14219/jada.archive.1997.0091>
- Nicholson, J. W. (1998). Chemistry of glass-ionomer cements: a review. *Biomaterials*, *19*(6), 485-494. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(97\)00128-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(97)00128-2)
- Nicholson, J. W., & Czarnecka, B. (2008). The biocompatibility of resin-modified glass-ionomer cements for dentistry. *Dental Materials*, *24*(12), 1702-1708.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.04.005>
- Noda, M., Komatsu, H., & Sano, H. (1999). HPLC analysis of dental resin composites components. *Journal of Biomedical Materials Research*, *47*(3), 374-378.
- Nomoto, R., Uchida, K., & Hirasawa, T. (1994). Effect of light intensity on polymerization of light-cured composite resins. *Dental Materials Journal*, *13*(2), 198-205.
<https://doi.org/10.4012/dmj.13.198>

- Okada, H., Tokunaga, T., Liu, X., Takayanagi, S., Matsushima, A., & Shimohigashi, Y. (2008). Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor- γ . *Environmental Health Perspectives*, *116*(1), 32-38. <https://doi.org/doi:10.1289/ehp.10587>
- Olea, N., Pulgar, R., Pérez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A. M., & Sonnenschein, C. (1996). Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environmental Health Perspectives*, *104*(3), 298-305. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104298>
- Ortengren, U., Wellendorf, H., Karlsson, S., & Ruyter, I. E. (2001). Water sorption and solubility of dental composites and identification of monomers released in an aqueous environment. *Journal of Oral Rehabilitation*, *28*(12), 1106-1115. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2842.2001.00802.x>
- Palin, W. M., Hadis, M. A., Leprince, J. G., Leloup, G., Boland, L., Fleming, G. J. P., Krastl, G., & Watts, D. C. (2014). Reduced polymerization stress of MAPO-containing resin composites with increased curing speed, degree of conversion and mechanical properties. *Dental Materials*, *30*(5), 507-516. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.02.003>
- Peutzfeldt, A., & Asmussen, E. (2005). Resin composite properties and energy density of light cure. *Journal of Dental Research*, *84*(7), 659-662. <https://doi.org/10.1177/154405910508400715>
- Pilo, R., & Cardash, H. S. (1992). Post-irradiation polymerization of different anterior and posterior visible light-activated resin composites. *Dental Materials*, *8*(5), 299-304. [https://doi.org/10.1016/0109-5641\(92\)90104-K](https://doi.org/10.1016/0109-5641(92)90104-K)
- Polydorou, O., Hammad, M., König, A., Hellwig, E., & Kümmerer, K. (2009). Release of monomers from different core build-up materials. *Dental Materials*, *25*(9), 1090-1095. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.02.014>
- Polydorou, O., König, A., Hellwig, E., & Kümmerer, K. (2009). Long-term release of monomers from modern dental-composite materials. *European Journal of Oral Sciences*, *117*(1), 68-75. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2008.00594.x>
- Price, R. B., Ferracane, J. L., & Shortall, A. C. (2015). Light-curing units: A review of what we need to know. *Journal of Dental Research*, *94*(9), 1179-1186. <https://doi.org/10.1177/0022034515594786>
- Price, R. B., Murphy, D. G., & Derand, T. (2000). Light energy transmission through cured resin composite and human dentin. *Quintessence International*, *31*(9), 659-667.

- Pulgar, R., Olea-Serrano, M. F., Novillo-Fertrell, A., Rivas, A., Pazos, P., Pedraza, V., Navajas, J. M., & Olea, N. (2000). Determination of bisphenol A and related aromatic compounds released from bis-GMA-based composites and sealants by high performance liquid chromatography. *Environmental Health Perspectives*, *108*(1), 21-27. <https://doi.org/10.1289/ehp.0010821>
- R Core Team (2008). R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria*. <http://www.r-project.org/>
- Rogalewicz, R., Batko, K., & Voelkel, A. (2006). Identification of organic extractables from commercial resin-modified glass-ionomers using HPLC-MS. *Journal of Environmental Monitoring*, *8*(7), 750-758. <https://doi.org/10.1039/b604149c>
- Rochester, J. R. (2013). Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, *42*, 132-155. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.008>
- Rochester, J. R., & Bolden, A. L. (2015). Bisphenol S and F: A systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. *Environmental Health Perspectives*, *123*(7), 643-650. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408989>
- Rueggeberg, F. A. (2011, 1/). State-of-the-art: dental photocuring - a review. *Dental Materials*, *27*(1), 39-52. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.021>
- Rueggeberg, F. A., & Craig, R. G. (1988). Correlation of parameters used to estimate monomer conversion in a light-cured composite. *Journal of Dental Research*, *67*(6), 932-937. <https://doi.org/10.1177/00220345880670060801>
- Sakaguchi, R., Ferracane, J., & Powers, J. (2019). Chapter 1 - Role and significance of restorative dental materials. In *Craig's Restorative Dental Materials (14th Edition)*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47821-2.00001-9>
- Sasaki, N., Okuda, K., Kato, T., Kakishima, H., Okuma, H., Abe, K., Tachino, H., Tachida, K., & Kubono, K. (2005). Salivary bisphenol-A levels detected by ELISA after restoration with composite resin. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *16*(4), 297-300. <https://doi.org/10.1007/s10856-005-0627-8>
- Schmalz, G., Preiss, A., & Arenholt-Bindslev, D. (1999, Sep). Bisphenol-A content of resin monomers and related degradation products. *Clinical Oral Investigations*, *3*(3), 114-119. <https://doi.org/10.1007/s007840050088>

- Schneider, L. F. J., Consani, S., Ogliari, F., Correr, A. B., Sobrinho, L. C., & Sinhoreti, M. A. C. (2006). Effect of time and polymerization cycle on the degree of conversion of a resin composite. *Operative Dentistry*, *31*(4), 489-495.
<https://doi.org/10.2341/05-81>
- Sidhu, S. K., & Nicholson, J. W. (2016). A review of glass-ionomer cements for clinical dentistry. *Journal of Functional Biomaterials*, *7*(3), 16.
<https://doi.org/10.3390/jfb7030016>
- Sunitha, C., Kailasam, V., Padmanabhan, S., & Chitharanjan, A. B. (2011). Bisphenol A release from an orthodontic adhesive and its correlation with the degree of conversion on varying light-curing tip distances. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, *140*(2), 239-244.
<https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2010.02.037>
- Suzuki, K., Ishikawa, K., Sugiyama, K., Furuta, H., & Nishimura, F. (2000). Content and release of bisphenol A from polycarbonate dental products. *Dental Materials Journal*, *19*(4), 389-395. <https://doi.org/10.4012/dmj.19.389>
- Teeguarden, J. G., & Hanson-Drury, S. (2013). A systematic review of Bisphenol A "low dose" studies in the context of human exposure: a case for establishing standards for reporting "low-dose" effects of chemicals. *Food and Chemical Toxicology*, *62*, 935-948. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.007>
- Tichy, A., & Bradna, P. (2021). Applicability of exposure reciprocity law for fast polymerization of restorative composites containing various photoinitiating systems. *Operative Dentistry*, *46*(4), 406-418. <https://doi.org/10.2341/20-112-L>
- Tokuyama Dental (2010). Technical Report Estelite Sigma Quick. https://www.tokuyama-us.com/wp-content/uploads/resources/Technical-Report_ESQ-3.pdf
- Ultradent Products (2011). Valo Corded. <https://www.ultradent.com/products/categories/equipment/curing-lights/valo-corded>
- Van Landuyt, K. L., Nawrot, T., Geebelen, B., De Munck, J., Snauwaert, J., Yoshihara, K., Scheers, H., Godderis, L., Hoet, P., & Van Meerbeek, B. (2011). How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dental Materials*, *27*(8), 723-747. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.05.001>
- Van Landuyt, K. L., Snauwaert, J., De Munck, J., Peumans, M., Yoshida, Y., Poitevin, A., Coutinho, E., Suzuki, K., Lambrechts, P., & Van Meerbeek, B. (2007). Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials*, *28*(26), 3757-3785. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.044>

- Van Meerbeek, B., Yoshihara, K., Van Landuyt, K., Yoshida, Y., & Peumans, M. (2020). From Buonocore's pioneering acid-etch technique to self-adhering restoratives. A status perspective of rapidly advancing dental adhesive technology. *Journal of Adhesive Dentistry*, 22(1), 7-34. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a43994>
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Jr., Lee, D. H., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., & Myers, J. P. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine Reviews*, 33(3), 378-455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>
- Vandenberg, L. N., Maffini, M. V., Sonnenschein, C., Rubin, B. S., & Soto, A. M. (2009). Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine Reviews*, 30(1), 75-95. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0021>
- Vitku, J., Chlupacova, T., Sosvorova, L., Hampl, R., Hill, M., Heracek, J., Bicikova, M., & Starka, L. (2015). Development and validation of LC-MS/MS method for quantification of bisphenol A and estrogens in human plasma and seminal fluid. *Talanta*, 140, 62-67. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.013>
- Vogel, S. A. (2009). The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol A "safety". *American Journal of Public Health*, 99(Suppl 3), S559-S566. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2008.159228>
- Watanabe, M. (2004). Degradation and formation of bisphenol A in polycarbonate used in dentistry. *Journal of Medical and Dental Sciences*, 51(1), 1-6. <https://doi.org/10.11480/jmds.510101>
- Watanabe, M., Hase, T., & Imai, Y. (2001). Change in the bisphenol A content in a polycarbonate orthodontic bracket and its leaching characteristics in water. *Dental Materials Journal*, 20(4), 353-358. <https://doi.org/10.4012/dmj.20.353>
- Welshons, W. V., Thayer, K. A., Judy, B. M., Taylor, J. A., Curran, E. M., & Saal, F. S. v. (2003). Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environmental Health Perspectives*, 111(8), 994-1006. <https://doi.org/10.1289/ehp.5494>
- Wetherill, Y. B., Akingbemi, B. T., Kanno, J., McLachlan, J. A., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C. S., Zoeller, R. T., & Belcher, S. M. (2007). In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology*, 24(2), 178-198. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.05.010>

- Wolter, H., Storch, W., & Ott, H. (1994). New inorganic/organic copolymers (ormocers) for dental applications. *MRS Online Proceedings Library*, 346, 143–149.
<https://doi.org/10.1557/PROC-346-143>
- Wydra, J. W., Cramer, N. B., Stansbury, J. W., & Bowman, C. N. (2014). The reciprocity law concerning light dose relationships applied to BisGMA/TEGDMA photopolymers: Theoretical analysis and experimental characterization. *Dental Materials*, 30(6), 605-612. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.02.021>
- Yang, Y., Yin, J., Yang, Y., Zhou, N., Zhang, J., Shao, B., & Wu, Y. (2012). Determination of bisphenol AF (BPAF) in tissues, serum, urine and feces of orally dosed rats by ultra-high-pressure liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 901, 93-97.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.06.005>
- Yoo, Y.-E., Woo, S.-W., & Kim, S. K. (2012). Injection molding without prior drying process by the gas counter pressure. *Polymer Engineering & Science*, 52(11), 2417-2423. <https://doi.org/10.1002/pen.23196>
- Yoshida, Y., Shirai, K., Nakayama, Y., Itoh, M., Okazaki, M., Shintani, H., Inoue, S., Lambrechts, P., Vanherle, G., & Van Meerbeek, B. (2002). Improved filler-matrix coupling in resin composites. *Journal of Dental Research*, 81(4), 270-273.
<https://doi.org/10.1177/154405910208100409>
- Zimmerman-Downs, J. M., Shuman, D., Stull, S. C., & Ratzlaff, R. E. (2010). Bisphenol A blood and saliva levels prior to and after dental sealant placement in adults. *Journal of Dental Hygiene*, 84(3), 145-150.