

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik
(Klinikdirektor Prof. Dr. med. dent. R. Bürgers)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Eine vergleichende In-Vitro-Studie zur
Monomerfreisetzung aus Bisphenol-A-
freien und konventionellen
provisorischen Kronen- und
Brückenmaterialien**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Tristan Hampe

aus

Langenhagen

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: Prof. Dr. med. dent. R. Bürgers

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake

Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. med. dent. R. Bürgers

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake

Drittreferent/in: Prof. Dr. med. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 20.12.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Eine vergleichende In-Vitro-Studie zur Monomerfreisetzung aus Bisphenol-A-freien und konventionellen provisorischen Kronen- und Brückenmaterialien" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Hampe T, Wiessner A, Frauendorf H, Alhussein M, Karlovsky P, Bürgers R, Krohn S. (2021): A comparative in vitro study on monomer release from bisphenol A-free and conventional temporary crown and bridge materials. *Eur. J. Oral Sci.* 6, 1–14.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Temporäre Kronen und Brücken.....	2
1.1.1 Aufgaben und Anforderungen an temporäre Kronen und Brücken	2
1.1.2 Techniken zur Herstellung von temporären Kronen und Brücken.....	3
1.2 Werkstoffkundliche Grundlagen von temporären Kronen- und Brückenmaterialien	4
1.2.1 Allgemein.....	4
1.2.2 Temporäre Kronen- und Brückenmaterialien auf Kompositbasis.....	5
1.2.3 Einflussfaktoren auf den Restmonomergehalt und dessen Freisetzung.....	6
1.3 Biologische Verträglichkeit dentaler Monomere.....	7
1.3.1 Allgemein.....	7
1.3.2 Lokale Gewebereaktion.....	8
1.3.3 Östrogene Wirkung	14
1.3.4 Mutagene Wirkung.....	16
1.3.5 Allergenes Potential	17
1.4 Grundlagen der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	18
1.4.1 Allgemein.....	18
1.4.2 Trennmechanismen	19
1.4.3 Aufbau einer HPLC-Apparatur.....	20
1.4.4 Kopplung von Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), UV/VIS und Massenspektrometrie (MS).....	21
1.5 Grundlagen der Massenspektrometrie (MS).....	22
1.5.1 Allgemein.....	22
1.5.2 Prinzipien der Massenspektrometrie	23
1.6 Ziel und Fragestellung.....	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Versuchsüberblick.....	27
2.2 Probekörperherstellung.....	27
2.3 Inkubation	28
2.4 HPLC-UV/Vis-MS-Analyse	29
2.4.1 Kalibrierung.....	29
2.4.2 Bestimmung der Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen	30
2.4.3 Herstellung der Messlösungen.....	30
2.4.4 Analyse.....	31
2.4.5 Qualitative und Quantitative Auswertung.....	32

2.5	Kontrolluntersuchung mittels HPLC-MS/MS	33
2.5.1	Referenzsubstanzen und Kalibrierung.....	34
2.5.2	BPA-Derivatisierung und Herstellung der Kalibrier- und Messlösungen	34
2.5.3	Bestimmung der Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen	35
2.5.4	Analyse.....	35
2.6	Statistische Auswertung.....	36
3	Ergebnisse	38
3.1	Methodische Ergebnisse	38
3.1.1	Qualitativer Nachweis und Nachweisgrenzen.....	38
3.1.2	Quantitative Analyse und Quantifizierungsgrenzen	44
3.2	Auswertung der Proben	47
3.2.1	Identifikation probeninterner Monomer- <i>Peaks</i>	47
3.2.2	Kontrolluntersuchungen zur BPA-Validierung	49
3.2.3	Quantifizierung der freigesetzten Substanzen.....	49
3.3	Ergebnisse der statistischen Auswertung.....	50
3.3.1	Shapiro-Wilk-Test.....	51
3.3.2	Levene-Test	51
3.3.3	Einfaktorielle ANOVA	51
3.3.4	Post-Hoc-Test nach Tukey	52
4	Diskussion	54
4.1	Diskussion der Methodik	54
4.1.1	Konzept	54
4.1.2	Probekörper.....	54
4.1.3	Inkubationsparameter.....	56
4.1.4	Analyse	59
4.2	Diskussion der methodischen Ergebnisse.....	64
4.2.1	Nachweisgrenzen	64
4.2.2	Ergebnisse der Kalibrierung	65
4.2.3	Quantifizierungsgrenzen	65
4.3	Diskussion der Ergebnisse.....	66
4.3.1	Gemessene Monomerkonzentrationen.....	66
4.3.2	Ergebnisse der statistischen Auswertung.....	69
4.3.3	Klinische Bewertung der Ergebnisse	70
4.4	Schlussfolgerung	75
5	Zusammenfassung.....	77
6	Literaturverzeichnis	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zelluläre Abläufe bei Monomereexposition am Beispiel von HEMA	10
Abbildung 2: Modell zur proinflammatorischen Wirkung von dentalen Monomeren.....	14
Abbildung 3: Schematischer Aufbau einer HPLC-Apparatur.....	20
Abbildung 4: Kopplungstechniken in der analytischen Chemie	21
Abbildung 5: Aufbau einer Orbitrap	24
Abbildung 6: Reaktionsschema der Derivatisierung von BPA mit Pyridin-3-sulfonylchlorid.	35
Abbildung 7: Berechnung der Nachweis- und Quantifizierungsgrenze.....	35
Abbildung 8: Flussdiagramm zum statistischen Auswertungsalgorithmus.....	37
Abbildung 9: HPLC-MS-Messung einer TEGDMA/DEP-Kalibrierlösung (10 µg/ml).....	39
Abbildung 10: HPLC-MS-Messung einer UDMA/DEP-Kalibrierlösung (10 µg/ml).....	40
Abbildung 11: HPLC-MS-Messung einer BisGMA/DEP-Standardlösung (0,5 µg/ml)	41
Abbildung 12: HPLC-UV-MS-Messung der BPA-Standardlösung (10 µg/ml).....	41
Abbildung 13: HPLC-MS/MS-Chromatogramm einer BPA-Standardlösung (0,0003 µg/ml).	42
Abbildung 14: Experimentelle Bestimmung des LOD für TEGDMA (0,05 µg/ml).....	43
Abbildung 15: Experimentelle Bestimmung des LOD für UDMA (0,05 µg/ml)	44
Abbildung 16: TEGDMA/DEP-Kalibrierkurve vom 03.07.2019	45
Abbildung 17: TEGDMA/DEP-Kalibrierkurve vom 04.12.2019	45
Abbildung 18: UDMA/DEP-Kalibrierkurve vom 03.07.2019	46
Abbildung 19: UDMA/DEP-Kalibrierkurve vom 04.12.2019	46
Abbildung 20: BPA-Kalibrierkurve vom 28.04.2020	47
Abbildung 21: Kalibrierkurve von derivatisiertem BPA.....	47
Abbildung 22: Massenspektrum einer Visalys-Temp-Probe.....	48
Abbildung 23: HPLC-UV-MS-Messung einer Visalys-Temp-Probe.....	49
Abbildung 24: Box-Plot zur Freisetzung von UDMA.....	52
Abbildung 25: HPLC-MS-Messung einer ExperTemp-Probe.....	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anforderungen an provisorische Kronen und Brücken und die zugehörigen Materialien	3
Tabelle 2: <i>In-vitro</i> -Zytotoxizität relevanter dentaler Monomere auf Fibroblasten der Maus	8
Tabelle 3: Klassifikation allergischer Reaktionsformen nach Coombs und Gell	17
Tabelle 4: Studiendesign	27
Tabelle 5: Polymerisationszeiten der untersuchten Materialien	28
Tabelle 6: Referenzsubstanzen	29
Tabelle 7: HPLC-Parameter	31
Tabelle 8: PDA-Einstellungen im positiven ESI-Modus	31
Tabelle 9: MS-Einstellungen im positiven ESI-Modus	32
Tabelle 10: PDA-Einstellungen im negativen ESI-Modus.....	32
Tabelle 11: MS-Einstellungen im negativen ESI-Modus.....	32
Tabelle 12: Substanzen zur Derivatisierung und Kalibrierung der HPLC-MS/MS.....	34
Tabelle 13: HPLC-Parameter der Nachuntersuchung.....	36
Tabelle 14: Einstellungen der Tandemmassenspektrometrie.....	36
Tabelle 15: Erfassungsparameter und Massenübergänge von BPA und seinen Derivaten.....	36
Tabelle 16: Freigesetzte mittelwertige Monomerkonzentrationen mit den zugehörigen Standardabweichungen.....	50
Tabelle 17: Ergebnisse des Shapiro-Wilk-Tests sowie zugehörige Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD)	51
Tabelle 18: Ergebnisse des Levene-Tests.....	51
Tabelle 19: Ergebnisse des Post-Hoc-Tests nach Tukey hinsichtlich der UDMA-Freisetzung	53
Tabelle 20: Empfohlene Extraktionsverhältnisse laut ISO Norm 10993-12.....	55
Tabelle 21: Durchschnittliche Kronenoberflächen nach Van Landuyt <i>et al.</i>	70
Tabelle 22: Monomerkonzentrationen nach 24-stündiger Inkubation in Relation zu gängigen Versorgungsformen.	71
Tabelle 23: TC ₅₀ -Konzentrationen humaner Gingivafibroblasten (HGF), humaner Pulpafibroblasten (HPF), humaner Fibroblasten des parodontalen Ligaments (HPLF) bei 48-stündiger Inkubation (Geurtsen <i>et al.</i> 1998a)	71
Tabelle 24: Übersicht der TC ₅₀ -Konzentrationen humaner Gingivafibroblasten (HGF), (Issa <i>et al.</i> 2004; Reichl <i>et al.</i> 2006a; Reichl <i>et al.</i> 2006b; Urcan <i>et al.</i> 2010a).....	72

Abkürzungsverzeichnis

BisGMA	Bisphenol-A-diglycidyl-methacrylat
BPA	Bisphenol A
CAS	Chemical-Abstracts-Service
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DEP	Diethylphthalat
ESI	Elektrospray-Ionisation
GC	Gaschromatographie
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ISO	International Organization for Standardization, Internationale Organisation für Normung
LOD	<i>limit of detection</i> (Nachweisgrenze)
LOQ	<i>limit of quantification</i> (Quantifizierungsgrenze)
MS	Massenspektrometrie
PDA	<i>photodiode array detector</i> , Photodiodenzeile
PSC	Pyridin-3-sulfonylchlorid
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
TEGDMA	Triäthylen-glycol-dimethacrylat
UDMA	Urethandimethacrylat
UV/Vis	<i>ultraviolet-visible spectroscopy</i>

1 Einleitung

In der Zahnmedizin werden Zähne für indirekten Zahnersatz zur Wiederherstellung ausgedehnter Zahnhartsubstanzdefekte, zum Beispiel durch Karies oder Traumata sowie zur Verankerung von festsitzendem oder herausnehmbarem Zahnersatz präpariert. Nach der Präparation dienen temporäre Kronen- und Brückenrestorationen, bis zur Eingliederung des definitiven Zahnersatzes, dem ästhetischen Funktionserhalt, der Stabilisierung und dem Schutz des präparierten Zahnes vor äußeren Noxen. Die Herstellung dieser Provisorien erfolgt entweder direkt am Behandlungsstuhl (*chairside*) durch den Zahnarzt, indirekt im zahntechnischen Labor oder in kombinierten Verfahren. Von den genannten Techniken werden direkte und kombinierte Methoden mit Hilfe von dentalen Kunststoffen besonders häufig angewendet. Die Eigenschaften dieser dentalen Kunststoffe werden zum einen durch anorganische Füllkörper (Quarze, Gläser, Keramik) und zum anderen durch die organische Matrix (u. a. Monomere, Initiatoren, Akzeleratoren, Stabilisatoren) beeinflusst. Die Zusammensetzung der in der Regel chemisch oder kombiniert chemisch-lichthärtenden (dualhärtenden) Provisorienkunststoffe ähnelt der von dentalen Kompositen, die im Rahmen zahnerhaltender Maßnahmen für definitive Füllungen eingesetzt werden. Das Monomergrundgerüst von Kompositen und Provisorienkunststoffen wird zumeist durch Bisphenol-A-Derivate, wie das Bowen-Monomer Bisphenol-A-diglycidyl-methacrylat (BisGMA) gebildet. Deswegen wird die intraorale Freisetzung des endokrinen Disruptors Bisphenol A (BPA) durch dentale Kunststoffe in der Wissenschaft umfangreich diskutiert. Jedoch stehen neben BPA auch andere dentale Monomere, die ebenfalls in die Mundhöhle eluiert werden, im Verdacht eine gesundheitsschädliche Wirkung zu haben. Bisherige Studien zu Kompositen konnten zeigen, dass die Monomerfreisetzung bereits 24 Stunden nach Eingliederung weitestgehend abgeschlossen ist. Auf Grund dieser Untersuchungen sowie der medialen Aufmerksamkeit bezüglich der endokrin-disruptiven Wirkung von BPA, bewerben bereits einige Hersteller ihre Provisorienkunststoffe als BPA-frei. In Anbetracht dieser Erkenntnis, ist die Monomerfreisetzung aus Provisorienkunststoffen von besonderer klinischer Relevanz, da diese zwar nur kurzfristig, jedoch im Vergleich zu Füllungen, in größeren Mengen in die Mundhöhle eingebracht werden. Dennoch wurden diese Kunststoffe erstaunlicherweise in der aktuellen Literatur noch nicht hinsichtlich ihrer Monomerfreisetzung untersucht. Die vorliegende Arbeit soll die Freisetzung von BPA und

anderen relevanten dentalen Monomeren durch konventionelle und BPA-freie Provisorienkunststoffe im wässrigen Milieu untersuchen und vergleichen.

1.1 Temporäre Kronen und Brücken

1.1.1 Aufgaben und Anforderungen an temporäre Kronen und Brücken

In der Zahnärztlichen Prothetik werden temporäre Restaurationen im Anschluss an die Präparation zur Wiederherstellung der Zahnmorphologie eingesetzt (Patras et al. 2012). Temporäre Kronen und Brücken haben zum einen protektive Aufgaben zum Schutz der Zahnhartsubstanz und der Pulpa vor Hypersensibilitäten, thermischen, mechanischen sowie mikrobiellen Noxen (Balkenhol et al. 2008; Behrend 1967) und dienen zum anderen dem Erhalt der vertikalen und horizontalen Kieferrelation (Burke et al. 2005; Hanks et al. 1991). Daneben haben temporäre Kronen und Brücken eine diagnostische und therapeutische Funktion zur Abschätzung der Einzelzahnprognose während der Vorbehandlung (Boeckler und Senke 2006; Wassell et al. 2002), zur Steuerung der Weichgewebsheilung nach parodontal-chirurgischen Eingriffen (Nugala et al. 2012), zur Visualisierung der Ästhetik des Behandlungszieles (Derbabian et al. 2000) und zur Erprobung einer veränderten Vertikaldimension (Rammelsberg 2014). Zusammenfassend benennt die Deutsche Gesellschaft für Prothetische Zahnmedizin und Biomaterialien e.V. (DGPro) folgende Aufgaben für temporäre, festsitzende Restaurationen (Balkenhol et al. 2009):

- Schutz der beschliffenen Zahnhartsubstanz und der Pulpa
- Erhalt/Wiederherstellung der Kaufunktion, Phonetik und des ästhetischen Erscheinungsbildes
- Stabilisation der Zahnposition
- Steuerung der Weichgewebsheilung / Schutz der Parodontien
- Exspektative Diagnostik/Austesten geplanter Veränderungen

Die grundlegenden Anforderungen an temporären Restaurationen und die zugehörigen Materialien modifiziert nach Federick (1975), Krug (1975) und Balkenhol (2008) sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Anforderungen an provisorische Kronen und Brücken und die zugehörigen Materialien.
 Modifiziert nach Federick (1975), Krug (1975) und Balkenhol (2008)

Anforderungen	Erläuterungen
Guter Randschluss	Schutz des marginalen Parodonts und der beschliffenen Zahnhartsubstanz im Bereich der Präparationsgrenze
Gute mechanische Eigenschaften	Gute Haltewirkung, Stabilität und Dimensionsstabilität bei normaler Kaufunktion
Geringe Plaqueanlagerung	Geringe Porosität und Oberflächenrauheit der provisorischen Kronen und Brücken
Geringe Polymerisationskontraktion	Reduktion erforderlicher <i>chairside</i> -Anpassungen
Geringe Polymerisationstemperatur	Schutz der Pulpa vor der exothermen Polymerisationsreaktion
Geringe thermische Leitfähigkeit	Erhöhung des Tragekomforts sowie Vermeidung von Hypersensibilitäten
Hoher Tragekomfort	Geruchs- und geschmacksneutral
Kompatibilität mit temporären Befestigungszementen	Keine Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften oder der Haltewirkung durch den Befestigungszement
Gute Fließfähigkeit	Ausfließen dünnwandiger Bereiche
Hohe Ästhetik	Verschiedene Zahnfarben, hohe Farbstabilität, transluzente-zahnähnliche Ästhetik
Hohe Biokompatibilität	Keine Abgabe toxischer Substanzen, geringes allergenes Potential, hohe lokale Gewebeerträglichkeit
Einfache Anwendbarkeit	Klinikgerechte Verarbeitungs- und Abbindezeiten, gute Bearbeitbarkeit und eine gummielastische Phase
Röntgenopazität	Radiologischer Nachweis bei akzidentiellem Verschlucken oder Aspiration
Wirtschaftlichkeit	Kosten-Nutzen müssen ausgewogen sein

1.1.2 Techniken zur Herstellung von temporären Kronen und Brücken

Techniken zur Herstellung temporärer Kronen und Brücken werden in direkte (*chairside*), indirekte (*labsite*) und kombinierte Techniken unterteilt (Mizrahi 2019). Bei *chairside*-Methoden wird die Ausgangssituation mittels Silikonabformungen konserviert und anschließend als Matrix zur Herstellung des Provisoriums genutzt (Regish et al. 2011). Dieses Vorgehen wird bei kombinierten Methoden durch die *labsite*-Herstellung der Matrize (Joda et al. 2009) oder ganze Schalenprovisorien, die intraoral mit einem Kunststoff unterfüttert werden (Dumbrigue 2003), modifiziert. Indirekte Provisorien werden vollständig im Labor

(*labsite*), auf Grundlage bereits präparierter Zähne, hergestellt und im Rahmen der Langzeitanwendung bei kompromittierter Einzelzahnprognose, aktiven Heilungsprozessen, zur Weichgewebskonditionierung (z. B. im Bereich des Pontics) oder bei geplanten Veränderungen des Okklusionskonzepts eingesetzt (Joda et al. 2009). Im klinischen Alltag hat sich die direkte Anfertigung von Provisorien auf Grundlage von Alginat- oder Silikonabdrücken durchgesetzt (Burns et al. 2003).

1.2 Werkstoffkundliche Grundlagen von temporären Kronen- und Brückenmaterialien

1.2.1 Allgemein

Unter Berücksichtigung technischer Fortschritte und verschiedener Fertigungstechniken werden in der Regel Kunststoffsysteme auf Basis von Bisphenol-A-dimethacrylat (BisGMA), Polymethylmethacrylat (PMMA), Polyethylmethacrylat (PEMA), Mikrofüller-Kompositen oder Urethandimethacrylat (UDMA) eingesetzt (Christensen 2003; Rakhshan 2015).

PMMA wurde lange Zeit zur Herstellung temporärer Kronen und Brücken trotz der hohen Polymerisationstemperatur und -schrumpfung, der schlechten klinischen Verarbeitbarkeit sowie des strengen Kunststoffgeruchs auf Grund der relativ guten Ästhetik und geringen Kosten verwendet (Burns et al. 2003; Young et al. 2001). Jedoch besteht insbesondere bei der direkten, intraoralen Anwendung durch die exotherme Polymerisationsreaktion die Gefahr einer Pulpaschädigung und die Reizung der umliegenden Gingiva durch einen unzureichenden Randschluss (Donaldson 1973; Grajower et al. 1979; Langeland und Langeland 1965; Palomo und Peden 1976; Wolcott et al. 1951). Zeitweise wurden alternativ zur Kurzzeitanwendung kostengünstige PEMA-Kunststoffe mit geringerer Polymerisationstemperatur und -schrumpfung sowie besserer klinischer Anwendbarkeit, andererseits mit schlechteren mechanischen Eigenschaften und schlechterer Farbstabilität, eingesetzt (Christensen 2004; Vaidyanathan et al. 2016). Heutzutage werden vermehrt autopolymerisierende und dualpolymerisierende Kunststoffe auf Kompositbasis verwendet, da diese im Gegensatz zu Polymethylmethacrylaten eine geringere Polymerisationstemperatur und -schrumpfung, einen besseren Randschluss sowie eine bessere Farbstabilität aufweisen (Burns et al. 2003; Young et al. 2001). In einem aktuellen, systematischen Review konnte gezeigt werden, dass auch die mechanischen Eigenschaften aktueller Provisorienmaterialien auf Kompositbasis gegenüber früheren Monomethacrylaten (PMMA, PEMA), überlegen sind (Astudillo-Rubio et al. 2018). Dementsprechend werden diese

Kunststoffe von deutschen Zahnärzten bevorzugt verwendet (Boeckler und Senke 2006; Vollert 2011). Im Rahmen der vorliegenden Studie werden daher Provisorienmaterialien auf Kompositbasis untersucht und im Folgenden näher beschrieben.

1.2.2 Temporäre Kronen- und Brückenmaterialien auf Kompositbasis

Die Zusammensetzung moderner Provisorienkunststoffe entspricht weitestgehend der von Kompositen zur definitiven Füllungstherapie (Darvell 2018). Die Eigenschaften von Kompositen werden durch die organische Polymermatrix, anorganische Füllmaterialien (Quarze, Gläser, Keramiken) und die Verbundphase zwischen beiden Komponenten als Haftvermittler beeinflusst (Nihei et al. 2008; Zimmerli et al. 2010).

Die organische Polymermatrix wird von Monomeren und Additiven, wie Initiatoren, Inhibitoren und Stabilisatoren, gebildet (Polydorou et al. 2007). Als Basismonomere der Polymermatrix kommen UDMA und/oder BisGMA zusammen mit Triäthylen-glycol-dimethacrylat (TEGDMA) und/oder 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) als Co-Monomer zum Einsatz (Comisi 2015; Ferracane 2011; Peutzfeldt 1997). BisGMA ist, seit seiner ersten Anwendung 1962 durch Rafael Bowen, das am meisten verwendete Basismonomer in Kompositen (Bowen 1962; Moszner et al. 2008). Dieses bifunktionelle Monomer ist wegen seiner geringen Polymerisationsschrumpfung ($\approx 6\%$), schnellen radikalischen Polymerisation, geringen Flüchtigkeit und seinen guten mechanischen Eigenschaften Grundlage der meisten modernen Komposite (Moszner und Salz 2001). Die hohe Viskosität, der geringe Grad an Doppelbindungsumwandlungen und die hohe Empfindlichkeit gegenüber Wasser erfordert die Kombination mit anderen Monomeren (Podea et al. 2013). Grundsätzlich werden 20 – 50 % Co-Monomere, meist TEGDMA, als Verdüner hinzugefügt, um die Viskosität herabzusetzen, die Konversionsrate zu erhöhen und die klinische Anwendbarkeit zu verbessern (Barszczewska-Rybarek 2009; Ilie et al. 2005; Stansbury und Dickens 2001). Neben dem BPA-Derivat, BisGMA, wurde 1974 mit UDMA von Foster und Walker ein weiteres Basismonomer eingeführt, das in der organischen Matrix zusammen oder statt BisGMA verwendet werden kann (Asmussen und Peutzfeldt 1998; Kerby et al. 2009). Die Urethanbindungen von UDMA weisen, im Vergleich zu den Phenolringen von BPA-Derivaten, eine niedrigere Viskosität und höhere Flexibilität bei guter Abrasionsfestigkeit auf (Beatty et al. 1993; Peutzfeldt 1997). Basierend auf den beschriebenen unterschiedlichen Eigenschaften wird die Gewichtung der jeweiligen Monomere an das Anwendungsgebiet angepasst (Asmussen und Peutzfeldt 1998). Mit zunehmender Kenntnis über die potentiell schädliche Wirkung von BPA wird zur Vermeidung einer BPA-Exposition

vermehrt auf BisGMA verzichtet und Komposite auf UDMA-Basis eingeführt (Luo et al. 2016; Mourouzis et al. 2020; Pulgar et al. 2000).

Modifikationen an der Füllkörperzusammensetzung der anorganischen Phase erlauben direkte Veränderungen mechanischer und ästhetischer Eigenschaften von Kompositen (Ilie und Hickel 2011). In der anorganischen Phase liegen kompakte, anorganische Partikel (Gläser, Glaskeramiken, Silikate oder Metalloxide) neben porösen Füllkörpern (Nanocluster, Nanopartikel und Präpolymerisate) dispergiert vor (Ilie 2017). In modernen Kompositen werden vermehrt Füllkörper kleiner Partikelgröße (Mikro- und Nanofüller) zur Verbesserung ästhetischer und mechanischer Eigenschaften eingesetzt (Schmidt und Ilie 2012). Als Haftvermittler zwischen der anorganischen und der organischen Phase werden Silane - in der Regel 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan (γ -MPS) - verwendet (Karmaker et al. 2007). Die mechanisch-chemische Verbindung zwischen der anorganischen und der organischen Phase beeinflusst maßgeblich die mechanischen Eigenschaften wie Härte, Abrasions- sowie Biege- und Druckfestigkeit (Ikejima et al. 2003; Manhart et al. 2000). Da dieser Haftverbund der intraoralen, sauren Hydrolyse unterliegt, gilt er als Hauptursache für den Materialverschleiß von Kompositen (Nihei et al. 2008).

1.2.3 Einflussfaktoren auf den Restmonomergehalt und dessen Freisetzung

Die Biokompatibilität dentaler Komposite hängt überwiegend vom Anteil eluierbarer Substanzen ab, die sich insbesondere in der organischen Matrix befinden (Hanks et al. 1991; Rathbun et al. 1991). Daher wird im Folgenden primär die Monomerfreisetzung erläutert, um die biologische Wirkung zu beschreiben.

Die ideale Polymerisationsreaktion ist durch die vollständige Umsetzung aller Monomere der organischen Phase gekennzeichnet (Silikas et al. 2000). Da die Polymerisationsreaktion meist unvollständig abläuft, wird der Anteil der umgewandelten, aliphatischen C=C-Doppelbindungen im ausgehärteten Komposit in der Literatur als Konversionsrate bezeichnet (Moraes et al. 2008). Diese ist der maßgebliche Faktor, der den freisetzbaren Restmonomergehalt beeinflusst (Ferracane 1994; Goldberg 2008). Zahlreiche Autoren beschreiben durchschnittliche Konversionsraten zwischen 55 % und 77 % und somit einen potentiell-eluierbaren Restmonomeranteil von 23 % bis 45 % (Eliades et al. 1987; Ferracane und Greener 1986; Ikemura und Endo 2010; Ozturk et al. 2013; Yu et al. 2017). Spezifische Monomere und deren prozentuale Gewichtung in der Zusammensetzung beeinflussen den Restmonomergehalt, so sind hohe BisGMA- und geringe TEGDMA-Anteile mit reduzierten Konversionsraten vergesellschaftet (Peutzfeldt 1997). Weiterhin wirkt sich das verwendete

Initiatorensystem auf die Reaktion aus, sodass der Grad der Polymerisation von Lichthärtenden über dual-härtende zu chemisch-härtenden Kompositen abnimmt (Arrais et al. 2008; Asmussen und Peutzfeldt 1998; Polydorou et al. 2009b; Rueggeberg und Caughman 1993). Neben Bestandteilen der organischen Matrix beeinflussen die Größe, Form und speziell die Absorption der verwendeten Füllkörper die Konversionsrate (Turssi et al. 2005). Abgesehen von materialspezifischen Eigenschaften spielen auch klinische Faktoren bei der Polymerisationsreaktion eine Rolle. In der klinischen Anwendung wird die Konversionsrate von Kompositen, im speziellen mit Photo-Initiatorensystem, durch die Farbe, Inkrementdicke, Temperatur, Art der Lichtquelle und deren Abstand beeinflusst (Hervas-Garcia et al. 2006). Weiterhin enthält die Sauerstoffinhibitionsschicht Monomere, die nicht an der Polymerisationsreaktion teilgenommen haben (Kim et al. 2006; Ruyter 1981) und somit in der Mundhöhle freigesetzt werden könnten (Pelka et al. 1999). Dementsprechend wird die möglichst vollständige Entfernung der Sauerstoffinhibitionsschicht zur Reduktion der Zytotoxizität von Kompositen im klinischen *workflow* empfohlen (Komurcuoglu et al. 2005; Rueggeberg et al. 1999; Tang et al. 1999).

Abgesehen von der Konversionsrate und der unvollständigen Entfernung der Sauerstoffinhibitionsschicht wird die Freisetzung von monomerspezifischen Eigenschaften, wie der Molekülgröße und anderen chemischen Charakteristika, maßgeblich modifiziert (Polydorou et al. 2007). Im wässrigen Milieu der Mundhöhle eluieren vorwiegend hydrophile Moleküle geringer Größe, wie TEGDMA, wohingegen langkettige, hydrophobe Moleküle, wie BisGMA, kaum freigesetzt werden (Floyd und Dickens 2006; Tanaka et al. 1991).

1.3 Biologische Verträglichkeit dentaler Monomere

1.3.1 Allgemein

Unerwünschte Reaktionen auf die Anwendung von Biomaterialien werden in systemische Toxizität, lokale Gewebereaktionen, allergische Reaktionen und weitere Reaktionen unterteilt (Schmalz und Arenholt-Bindslev 2005a). Systemische Toxizität zeichnet sich durch eine Wirkung jenseits der Anwendungsregion mittels oraler Aufnahme, Transport und Metabolisierung aus (Schmalz 1998a). Da die freigesetzten Monomermengen weit unter den erforderlichen Konzentrationen für systemische Nebenwirkungen liegen (Seiss et al. 2009), werden diese im Folgenden nicht erörtert. Lokale Gewebereaktionen (Entzündungen oder Nekrosen) beschränken sich auf anliegende Gewebe, wie die orale Mukosa oder die Pulpa (Stanley 1992). Allergische Reaktionen sind überschießende, immunologische

Abwehrreaktionen auf ansonsten unschädliche Substanzen, sogenannte Allergene (Galli et al. 2008). Die Gruppe der weiteren Reaktionen beinhaltet mutagene, kanzerogene und teratogene Wirkungen (Schmalz und Arenholt-Bindslev 2005a).

1.3.2 Lokale Gewebereaktion

Lokale Reaktionen auf Komposite beschränken sich auf das umliegende Gewebe des Anwendungsgebiets, wie die Pulpa, die umliegende Mukosa und Anteile des Alveolarfortsatzes (Mousavinasab 2011). Direkte Wirkungen auf angrenzende Zellen führen zum apoptotischen oder nekrotischen Zelltod und/oder lokalen Entzündungen als Folge von Effekten auf den Zellmetabolismus mit Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren (Schmalz und Arenholt-Bindslev 2005a). Weiterhin sind indirekt lokale Gewebereaktionen durch die Beeinflussung des Biofilms möglich (Hansel et al. 1998).

1.3.2.1 Zytotoxizität

Das Maß der monomer-spezifischen Zytotoxizität ist die TC_{50} -Konzentration, die mit der Reduktion des Zellmetabolismus um 50 % oder dem Zelltod verbunden ist (Hanks et al. 1996; Thonemann et al. 2002). Bifunktionelle Monomere (z. B. Monomere mit zwei Methacrylat-Gruppen), die heutzutage häufig verwendet werden, weisen meist eine größere Toxizität als monofunktionelle Monomere auf (Schweickl et al. 2001). Dabei hängt die Gesamtzytotoxizität eines Komposits maßgeblich von der Art und Menge eluierender Substanzen ab (Geurtsen et al. 1998a; Rathbun et al. 1991). Diese hängt wiederum von der Materialzusammensetzung (H Müller et al. 1997), der Konversionsrate (Ferracane 1994), der intraoralen Degradation (Bettencourt et al. 2010) und der Entfernung der Sauerstoffinhibitionsschicht (Rueggeberg et al. 1999) ab. Die TC_{50} -Werte relevanter dentaler Monomere bezogen auf Fibroblasten der Maus sind in Tabelle 2 aufgeführt. Im Rahmen von Zytotoxizitätstests gelten Mäusefibroblasten als erste Orientierung und humane Fibroblasten als sensitivere Kontrolle (Moharamzadeh et al. 2009).

Tabelle 2: *In-vitro*-Zytotoxizität relevanter dentaler Monomere auf Fibroblasten der Maus (Hanks et al. 1991; Ratanasathien et al. 1995).

Substanz	TC_{50} [μ M/L]
BisGMA	9,35
UDMA	17,4
BPA	28,0
TEGDMA	124,5

Die beschriebenen Effekte wurden allerdings an zahlreichen weiteren Zelllinien, unter anderem auch an humanen Fibroblasten, bestätigt (Geurtsen et al. 1998a; Stanislawski et al. 2003; Styllou et al. 2015; Urcan et al. 2010a; Volk et al. 2006; Wisniewska-Jarosinska et al. 2011; Yoshii 1997). Zusammenfassend wurde das zytotoxische Potential in folgender absteigender Reihenfolge bewertet: BisGMA > UDMA > TEGDMA > HEMA (Ratanasathien et al. 1995; Reichl et al. 2006a). Die zytotoxischen Effekte dentaler Monomere können sich sowohl synergistisch wie auch additiv beeinflussen, sodass relevante zytotoxische Effekte womöglich bereits unter den in der Literatur beschriebenen freiwerdenden Konzentrationen auftreten (Durner et al. 2012; Ratanasathien et al. 1995).

Der Zelluntergang wird in den programmierten Zelltod (Apoptose) und die pathogene, Entzündungs-assoziierte Nekrose unterteilt (Majno und Joris 1995; Zhivotovsky 2004). Wie von Reichl und Mitarbeitern beschrieben, lösen dentale Monomere dosisabhängig eine Apoptose oder Nekrose aus, allerdings sind zytotoxische Effekte *in vivo* auf Grund der zu erwartenden Monomerkonzentrationen vermutlich Apoptose-assoziiert (Reichl et al. 2006a). Durch oxidative DNA-Schäden löst die Exposition zu dentalen Monomeren den programmierten Zelltod über den intrinsischen Apoptoseweg aus (Huang et al. 2016; Jiao et al. 2016; Poplawski et al. 2010; Schweikl et al. 2014; Yeh et al. 2015). Ursächlich ist oxidativer Stress durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) über die Kapazitäten des zellulären antioxidativen Systems hinaus (Krifka et al. 2013). Monomer-induzierter oxidativer Stress wird nicht durch eine spezifische ROS ausgelöst, sondern folgt einer komplexen Kinetik verschiedener ROS und anderer aggressiver Oxidantien, wie reaktiven Stickstoffspezies (RNS), wobei nach längerer Beobachtungsdauer H₂O₂ die dominierende ROS ist (Gallorini et al. 2015; Schweikl et al. 2017; Schweikl et al. 2016).

Der sensible Redox-Status der Zelle wird durch enzymatische und nicht-enzymatische antioxidative Systeme kontrolliert, indem Glutathion (GSH) sowohl als wichtigstes nicht-enzymatisches antioxidatives Thiol, aber auch als Co-Faktor verschiedener antioxidativer Enzyme, eine entscheidende Rolle spielt (Mirończuk-Chodakowska et al. 2018; Patlevič et al. 2016; Trachootham et al. 2008). Katalysiert von der Glutathionperoxidase kann GSH mit Hilfe seiner Thiolgruppe (-SH) freie Radikale reduzieren und wird dabei selbst zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert (Forman et al. 2009; Lu 2009). Die von der Glutathion-Reduktase katalysierte Rückreaktion stabilisiert in gesunden Zellen das gewebespezifische GSH zu GSSG Verhältnis (Leber etwa 100:1) (Circu und Aw 2010; Han et al. 2006). Oxidativer Stress führt zur Verschiebung dieses Verhältnisses hin zu höheren GSSG-Konzentrationen und damit zu Veränderungen des Zellmetabolismus bis hin zur Apoptose

(Borghei und Hosseinkhani 2020; Jones 2006). Dentale Monomere bewirken eine vermehrte ROS-Produktion mit anschließendem GSH-Verbrauch (Engelmann et al. 2004; Engelmann et al. 2002; Stanislawski et al. 2003; Volk et al. 2006), allerdings wird bei Exposition zu TEGDMA oder HEMA nicht der zu erwartende GSSG-Anstieg beobachtet (Noda et al. 2005; Walther et al. 2004). Dieses Phänomen liegt vermutlich an der Bildung von HEMA- und TEGDMA-Konjugaten mit GSH (Ansteinsson et al. 2013; Samuelsen et al. 2011). Denn neben der beschriebenen antioxidativen Funktion konjugiert GSH, katalysiert durch die Glutathion-S-Transferase, schädliche Stoffe und übernimmt so eine wichtige Aufgabe im Rahmen der Detoxifikation der Zelle (Hayes et al. 2004). Einige Studien zeigen, dass die beobachtete Konjugatbildung mit dentalen Monomeren vermutlich die entsprechende Glutathion-S-Transferase katalysierte Reaktion ist (Lefevre et al. 2004; Nocca et al. 2011).

Neben der Induktion von oxidativem Stress konnten Krifka *et al.* (2012b) zeigen, dass HEMA zusätzlich regulative, antioxidative Mechanismen, wie die Glutathionperoxidase und die Superoxid-Dismutase (SOD), die freie Sauerstoffradikale abbauen, inhibiert. Da bei BisGMA-Exposition keine Konjugatbildung zu beobachten ist, müssen andere Mechanismen für die Zytotoxizität verantwortlich sein (Ansteinsson et al. 2013). Dies könnte in der Beeinflussung der Cytochrom P450-Aktivität (Cannon et al. 2000), die mit einem intrazellulären ROS-Anstieg assoziiert ist (Sapone et al. 2003), begründet sein. In Abbildung 1 sind die intrazellulären-zytotoxischen Mechanismen bei Monomereexposition am Beispiel von HEMA schematisch dargestellt.

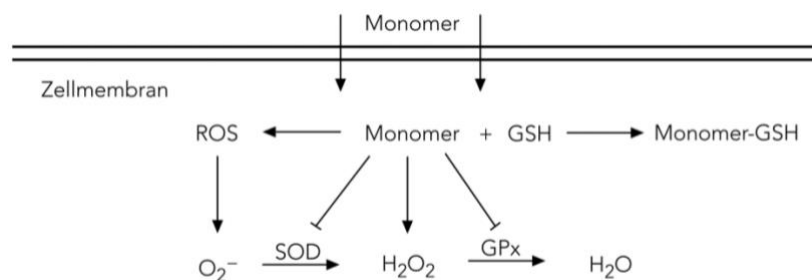


Abbildung 1: Zelluläre Abläufe bei Monomereexposition am Beispiel von HEMA. ROS: Reaktive Sauerstoffspezies GSH: Glutathion GPx: Glutathionperoxidase SOD: Superoxid-Dismutase; Modifiziert nach Krifka *et al.* (2013)

Zusammenfassend geht man in der aktuellen Literatur davon aus, dass der GSH-Verbrauch in starkem Zusammenhang mit der monomer-induzierten Apoptose steht, wobei die genauen Signaltransduktionswege noch nicht abschließend geklärt sind (Krifka et al. 2013).

Dennoch ist bekannt, dass ein ROS-Anstieg zu der Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege, wie dem MAP-Kinase-Signalweg, führt (Torres und Forman 2003). MAP-Kinase-Signalwege koordinieren die Gentranskription, Proteinbiosynthese, den Zellzyklus, Zelltod und -differenzierung (Kyriakis und Avruch 2001). Die Familie der MAP-Kinasen wird in vier Gruppen unterteilt: ERK, p38, JNK/SAPK und ERK5 (Tanoue und Nishida 2003). Die Aktivierung der jeweiligen MAP-Kinase erfolgt auf spezifische Reize, wobei besonders p38 und JNK/SAPK durch zellulären Stress aktiviert werden (English et al. 1999).

Im Rahmen von *In-vitro*-Studien konnte die Phosphorylierung/Aktivierung von ERK und p38 durch TEGDMA und HEMA ebenso wie von JNK/SAPK durch HEMA gezeigt werden (Eckhardt et al. 2009a; Samuelsen et al. 2007; Schweikl et al. 2008). Neben den bereits gut untersuchten Monomeren TEGDMA und HEMA wurde ein ähnlicher Mechanismus mittels ERK-Aktivierung auch für BisGMA nachgewiesen (MC Chang et al. 2009). Zwar scheinen Monomere, wie TEGDMA, direkt die Regulation intrazellulärer Signalwege zu beeinflussen (Krifka et al. 2011), jedoch ist die Hauptursache für die Aktivierung der MAP-Kinase-Wege oxidativer Stress (MC Chang et al. 2009; Krifka et al. 2012a).

Abgesehen von dem MAP-Kinase-Signalweg können apoptotische Stimuli über mehrere Zwischenschritte die Proteinkinase B/Akt (PKB/Akt) aktivieren (Leevers et al. 1999). Mittlerweile ist bekannt, dass PKB/Akt einer der wichtigsten Regulatoren apoptotischer Prozesse ist und vor allem Faktoren des Zellüberlebens positiv beeinflusst und die Expression von Zelltod-assoziierten Genen inhibiert (Downward 2004; West et al. 2002). Da TEGDMA die PKB/AKT hemmt, geht man davon aus, dass dieser Mechanismus zur Zytotoxizität von TEGDMA beitragen könnte (Spagnuolo et al. 2004). Dies ist womöglich der Grund dafür, dass die Zytotoxizität von TEGDMA nicht durch eine Glutathionsubstituierung signifikant reduziert wird (Martins et al. 2012).

Die zytotoxische Wirkung von BPA ist über Östrogenrezeptoren vermittelt (Aghajanpour-Mir et al. 2016) und führt über die Bildung von ROS zur Veränderung des intrazellulären Redox-Status (Mobley und Brueggemeier 2004). BPA beeinflusst das Zellüberleben signifikant, induziert die Apoptose und ist mit einem Anstieg an Markern für DNA-Schäden vergesellschaftet (Son et al. 2018). Weiterhin wurde beschrieben, dass BPA die ATP-Synthese in den Mitochondrien inhibiert, wodurch der Energiestoffwechsel der Zelle gestört wird (Nakagawa und Tayama 2000).

Die Einflussnahme dentaler Monomere auf den Zellmetabolismus sowie die Signalkaskaden sind komplex und bedürfen weiterer Forschung. Insbesondere die ubiquitär verwendeten Monomere BisGMA und UDMA sollten weiter untersucht werden.

1.3.2.2 Entzündungsreaktionen

Ursächlich für Entzündungen im Bereich von Kompositrestaurationen sind die Akkumulation eines bakteriellen Biofilms, akzidentielle Implantation und die proinflammatorische Wirkung von dentalen Monomeren (Schmalz und Arenholt-Bindslev 2005b). Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass an Komposit angrenzende Gingiva im Vergleich zu gesundem Schmelz, Amalgam und Gold vermehrt zu Entzündungsreaktionen neigt und dieser Effekt durch subgingivale Füllungsrän­der, sowie eine generalisierte Gingivitis verstärkt wird (Hammer und Hotz 1979; van Dijken et al. 1987; Willershausen et al. 2001). Weiterhin zeigen intraoral entnommene Plaqueproben von Komposit-, Amalgam- und Glasionomerzementfüllungen eine erhöhte Anzahl des kariogenen *Streptococcus mutans* an Kompositfüllungen (Svanberg et al. 1990). Weitere Studien bestätigen dieses Ergebnis und lassen die Vermutung zu, dass der Grund für die lokale Entzündung des Weichgewebes an Kompositen an einer verstärkten Plaqueakkumulation liegt (Derchi et al. 2017; Kawai und Urano 2001; Konishi et al. 2003; BS Lim et al. 2008; Rosentritt et al. 2008). Während BisGMA und UDMA das Wachstum von *Streptococcus sobrinus*- und *Lactobacillus acidophilus*-Kulturen in sehr geringem Ausmaß hemmen, verstärkt TEGDMA sogar die Proliferation dieser Kulturen (Hansel et al. 1998). Neben der direkten Wirkung von Monomeren, wird die Biofilmformation auch durch Abbauprodukte der Biodegradation von Kompositen beeinflusst (Khalichi et al. 2009).

Durch die intraorale Bearbeitung von Kompositen können Kompositpartikel akzidentuell in das umliegende Weichgewebe verschleppt werden und dort eine persistierende, granulomatöse Entzündung auslösen (Hansasuta et al. 1993). Fallbeschreibungen zur akzidentiellen Implantation von Kompositen in die oralen Weichgewebe bestehen für Füllungsfrakturen (Goodman 1984), nach Entfernung von Zahnhalsfüllungen (Moore und Barker 1986) und submuköser Verlagerung von Material für provisorische Kronen (Goodman 1984; Schmalz und Arenholt-Bindslev 2005b).

Die initiale Entzündungsreaktion auf chemisch-physikalische Noxen, wie Komposite, wird auf zellulärer Ebene durch bioaktive Peptide vermittelt, die wiederum ortsständige Mastzellen und Makrophagen rekrutieren (Nathan 2002). Dieser Mechanismus spielt auch bei oralen, entzündlichen Erkrankungen wie Parodontitis, Gingivitis oder Pulpitiden auf

zellulärer Ebene eine Rolle (Bruno et al. 2010; Hasturk et al. 2012). Auf inflammatorische Stimuli setzen Makrophagen Cytokine, wie den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), frei und rekrutieren auf diesem Weg Neutrophile Granulozyten und Lymphozyten, wodurch die Entzündungsreaktion verstärkt wird (Kopf et al. 2010; Nathan 2002). Aktivierte Mastzellen setzen ebenfalls Cytokine, unter anderem auch TNF- α , Prostaglandine sowie Proteasen frei und rekrutieren somit weitere Neutrophile Granulozyten, erhöhen die vaskuläre Permeabilität und führen zur Proliferation sowie zum Umbau des Bindegewebes (Benoist und Mathis 2002). Der TNF- α spielt eine zentrale Rolle bei der Expression apoptotischer und inflammatorischer Gensequenzen und stimuliert die Bildung von Caspasen und der Cyclooxygenase-2 (COX-2) (Rahman und McFadden 2006; Vane et al. 1998). Es existieren zwei Cyclooxygenase (COX)-Isoformen, nämlich COX-1 und COX-2, wobei COX-1 ubiquitär im Gewebe vorkommt und die Entzündungs-assoziierte COX-2 mit einer gesteigerten Prostaglandinfreisetzung verbunden ist (Gilroy und Colville-Nash 2000). Da Cyclooxygenasen in den meisten Zellen vorkommen, werden auf inflammatorische Reize Prostaglandine nicht nur von Immunzellen, sondern auch von ortständigen Fibroblasten, zum Beispiel in der Pulpa, gebildet (Nakanishi et al. 2001). Prostaglandine gelten als entscheidende Mediatoren der akuten Gewebeentzündung, wobei mittlerweile bekannt ist, dass diese auch bei der Entwicklung und Unterhaltung chronischer Entzündungen von Bedeutung sind (Aoki und Narumiya 2012; Prisk und Huard 2003). Aktivierte Makrophagen leiten durch Antigenpräsentation mittels Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) und der Bildung co-stimulatorischer Oberflächenproteine, wie CD40 und CD80, die immunologische T-Zellantwort ein (Guermontez et al. 2002). Dieser Mechanismus ist im Rahmen der Parodontitis mit dem krankheitstypischen Knochenabbau assoziiert (Kajiji et al. 2010).

Monomereexposition führt in verschiedenen Zellreihen zur vermehrten mRNA-Expression der COX-2 (HH Chang et al. 2012; HH Chang et al. 2014; MC Chang et al. 2009; Kuan et al. 2013; Lee et al. 2009) und damit meist auch zur verstärkten Prostaglandin E₂ (PGE₂)-Ausschüttung (HH Chang et al. 2014; Kuan et al. 2013; Lee et al. 2009). Die Signalkaskade, die zur verstärkten COX-2-Expression führt, ist für BisGMA bereits gut beschrieben. Die Aktivierung der MAP-Kinasen p38, ERK1/2 und JNK führt über die Phospholipase A2 zur COX-2 Expression mit anschließender PGE₂-Ausschüttung (Kuan et al. 2013). Der Aktivierungsmechanismus ist vermutlich, wie bei der Auslösung apoptotischer Vorgänge, oxidativer Stress (MC Chang et al. 2009). Inflammatorische Prozesse durch TEGDMA scheinen mit der Expression von Cytokinen, wie Interleukin 6 und 8 sowie dem Transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β), einherzugehen (Martins et al. 2012). TGF-

β aktiviert über MEK/ERK-Signalwege die COX-2-Expression und PGE₂-Ausschüttung (PS Lin et al. 2017). Die proinflammatorischen Wirkungsmechanismen dentaler Monomere sind in Abbildung 2 dargestellt.

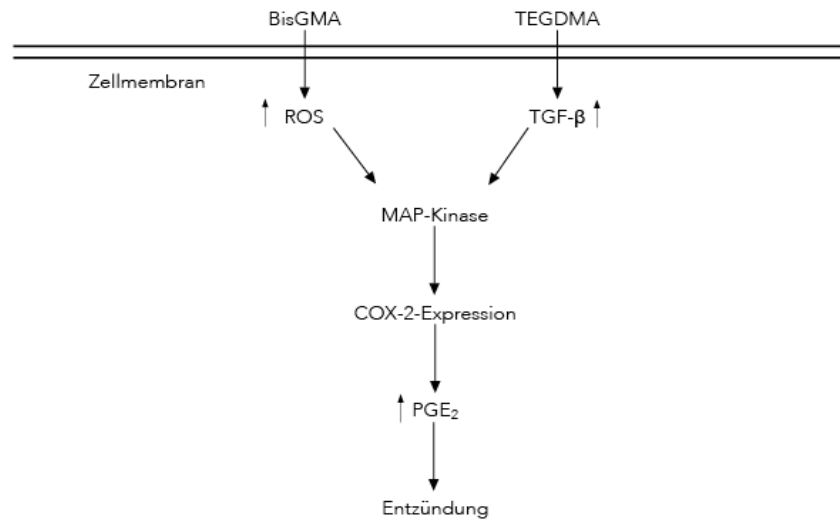


Abbildung 2: Modell zur proinflammatorischen Wirkung von dentalen Monomeren

Neben der akut-inflammatorischen Wirkung stimuliert BisGMA die CD40, CD80-Expression und MHC-II-Antigenpräsentation und damit die T-Zell-Aktivierung, die chronische Entzündungen auslösen kann (Kuan et al. 2012). Neben der proinflammatorischen Wirkung dentaler Monomere, inhibieren diese zusätzlich die immunologische Antwort auf die Bakterientoxine gram-negativer Mikroorganismen, wie Lipopolysaccharide (Eckhardt et al. 2009b; Schweikl et al. 2018). Dieser Effekt verstärkt sich vermutlich additiv durch die verschiedenen Bestandteile in Kompositen und führt zu einer reduzierten Immunantwort (Mathisen et al. 2015).

1.3.3 Östrogene Wirkung

Exogene Substanzen, die durch Einwirkungen auf die endokrinen Funktionen, gesundheitsschädliche Wirkungen auf den gesunden Organismus oder das ungeborene Leben haben, werden endokrine Disruptoren bezeichnet (Bergman et al. 1997). Dieser Begriff schließt alle endokrinen Hormone ein (Elobeid und Allison 2008), wurde jedoch zunächst für potentiell östrogene Chemikalien verwendet (Newbold et al. 2007). Die Wirkung endokriner Disruptoren mit östrogenen Wirkung wird im Vergleich zu den wichtigsten körpereigenen Östrogenen – Estron (E₁), Estradiol (E₂) und Estriol (E₃) – bewertet (Kiyama und Wada-Kiyama 2015). Bisphenol A, welches in einer Vielzahl alltäglicher Kunststoffprodukte eingesetzt wird und daher in geringen Mengen im Urin der

Allgemeinbevölkerung nachgewiesen werden kann, ist der relevanteste endokrine Disruptor in der Zahnmedizin (Calafat et al. 2005; Kechagias et al. 2020; Ouchi und Watanabe 2002; M Yang et al. 2003). Allerdings werden statt reinem BPA, BPA-Derivate als dentale Monomere eingesetzt, sodass lediglich geringste Mengen BPA als Verunreinigungen des Herstellungsprozesses in Kompositen enthalten sind (Fleisch et al. 2010; Söderholm und Mariotti 1999). BPA interagiert mit Kernrezeptoren, wie zum Beispiel Östrogenrezeptoren (ER), Östrogen-ähnlichen Rezeptoren (ERR) und Androgenrezeptoren (AR) (Acconcia et al. 2015; L Li et al. 2015). Diese Interaktionen stabilisieren die Rezeptoren bereits bei niedrigen BPA-Konzentrationen in ihrer aktiven Konformation (Gould et al. 1998; L Li et al. 2015; Takayanagi et al. 2006). Auswirkungen sind unter anderem die Beeinflussung des Sexualverhaltens und Störungen der Fortpflanzung sowie der Entwicklung der Geschlechtsorgane (D Li et al. 2010; Smith und Taylor 2007). Auf Grund dessen wurden die jeweiligen Derivate und weitere Substanzen aus dentalen Kompositen hinsichtlich ihrer Östrogenität in Zellkulturen untersucht (Hashimoto und Nakamura 2000; Lewis et al. 1999; Mariotti et al. 1998; Tarumi et al. 2000). Diese Studien konnten zeigen, dass freigesetztes BPA, BisGMA und Bisphenol-A-Dimethacrylat (BisDMA) eine Estradiol (E_2) ähnliche Wirkung haben (Hashimoto und Nakamura 2000; Lewis et al. 1999; Mariotti et al. 1998; Tarumi et al. 2000). Zudem kann aus BisDMA durch enzymatische oder hydrolytische Degradation BPA freigesetzt werden (Atkinson et al. 2002; Schmalz et al. 1999). Dies liegt vermutlich an den leicht spaltbaren Esterbindungen (-O-CO-) zwischen dem BPA-Gerüst und dem Acrylatanteil von BisDMA im Vergleich zur Etherbindung (-O-) in BisGMA-Molekülen (L Chen und Suh 2013; Kadoma und Tanaka 2000). Das enzymatische und bakterielle Biodegradationsprodukt von BisGMA ist 2,2-bis[4-(2,3-hydroxypropoxy)phenyl]propan (bisHPPP) (Finer et al. 2004; Marashdeh et al. 2018; Santerre et al. 2001). In einer älteren *In-vivo*-Studie an Mäusen konnte BisGMA das Uteruswachstum ähnlich wie Estradiol stimulieren. Auf Grund der molekularen Ähnlichkeit von BisGMA zum phenolischen A-Ring von 17- β -Estradiol schlossen die Autoren daraus, dass BisGMA eine östrogene Wirkung aufweist (Mariotti et al. 1998). Eine aktuellere *In-vitro*-Studie konnte jedoch an estradiol-sensitiven MCF-7-Zellen nachweisen, dass BisGMA und sein Abbauprodukt bisHPPP keine östrogene Wirkung aufweisen (Kostoryz et al. 2003). Daher geht man in der aktuellen Literatur davon aus, dass die östrogene Wirkung von Kompositen auf BPA-Reste und die enzymatische BPA-Freisetzung aus BisDMA zurückzuführen ist (Arenholt-Bindslev et al. 1999; Fleisch et al. 2010). Die freigesetzten Mengen scheinen unter den klinisch relevanten Konzentrationen zu liegen (Eramo et al. 2010; Schmalz 1998a). Im aktuellen Gutachten der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) wurde

die tägliche maximale Aufnahmemenge (*tolerable daily intake* = TDI) für BPA allerdings von 50 µg/kg auf 4 µg/kg Körpergewicht reduziert (EFSA Panel on Food Contact Materials Enzymes Flavourings and Processing Aids (CEF) 2015). Weiterhin konnten neue Studien bereits bei 0,5 µg/kg Körpergewicht BPA-Aufnahme östrogene Wirkungen zeigen (Lejonklou et al. 2017; Lind et al. 2017). Daher sind zur abschließenden Bewertung der östrogenen Wirkung von dentalen Kunststoffen, insbesondere bei der Anwendung am Kind, weitere Untersuchungen mit standardisiertem Aufbau notwendig (Kloukos et al. 2013; Mulligan et al. 2018; Van Landuyt et al. 2011).

1.3.4 Mutagene Wirkung

Genotoxizität ist die Eigenschaft einer Chemikalie DNA-Schäden hervorzurufen (Schins und Knaapen 2007). Bei non-reparablen Schäden, die im Rahmen der Zellreplikation zu einer permanenten Läsion führen, spricht man von Mutagenität (Ribeiro et al. 2017). DNA-Schäden durch genotoxische Substanzen stehen in enger Verbindung zur allgemeinen und oralen Karzinogenese (Fukushima et al. 2005; Ribeiro et al. 2008). Studien zur Genotoxizität dentaler Monomere sind in der Regel *In-vitro*-Studien, die entweder prokaryotische oder eukaryotische Zellreihen verwenden, und seltener *In-vivo*-Studien (Moharamzadeh et al. 2009; Schmalz 1994). Die wichtigsten prokaryotischen Testreihen sind der Ames-Test und der neuere umu-Test anhand von *Salmonella typhimurium*-Kulturen (Geurtsen 2000). Zur Bewertung der Genotoxizität dentaler Materialien mit Hilfe von eukaryotischen Zellen wurden V79-Hamsterlungenzellen (B Müller et al. 2003; Schweikl et al. 2005; Schweikl und Schmalz 1999; Tai et al. 2002), humane Gingivafibroblasten (Huang et al. 2003), L929-Mäusefibroblasten (Atay et al. 2019; Kostoryz et al. 2004), humane Lymphozyten (Brzovic Rajic et al. 2018; Ginzkey et al. 2015; Kleinsasser et al. 2004) und Parotisdrüsenzellen (Kleinsasser et al. 2006) verwendet.

Im Ames-Test zeigt TEGDMA keine mutagene Wirkung, jedoch konnte an Hamsterlungenzellen eine direkte mutagene Wirkung mit Deletion großer DNA-Abschnitte und Induktion von Mikronuklei gefunden werden (Schweikl et al. 2001; Schweikl und Schmalz 1999; Schweikl et al. 1998). Mikronuklei gelten als Anzeichen von Chromosomenaberrationen (klastogene Wirkung) und werden daher im Rahmen von Genotoxizitätstests analysiert (L Chen et al. 2021; Heddle et al. 1991). Auch Studien an humanen Lymphozyten- und Parotisdrüsenzellen haben gezeigt, dass UDMA, BisGMA, TEGDMA und HEMA in höheren Dosen eine genotoxische Wirkung aufweisen (Kleinsasser et al. 2006; Kleinsasser et al. 2004). Allerdings zeigen TEGDMA und HEMA

bereits unterhalb der zytotoxischen Konzentration eine klastogene Wirkung und könnten somit durch eine chronische, intraorale Freisetzung ein möglicher Risikofaktor in der Tumorentstehung humaner Speicheldrüsen sein (Ginzkey et al. 2015). BisGMA verursacht im Vergleich zu anderen dentalen Monomeren die meisten DNA-Doppelstrangbrüche, wobei die erforderliche Konzentration etwa doppelt so hoch ist, wie in der Literatur beschriebene freigesetzte Mengen (Styllou et al. 2015). Das Degradationsprodukt von BisGMA, bisHPPP, weist ebenso genotoxisches Potential auf und induziert Mikronuclei in peripheren Blutlymphozyten (Suárez et al. 2000). Genotoxische Effekte bei UDMA-Exposition wurden an zahlreichen verschiedenen Zelltypen beobachtet (Kleinsasser et al. 2006; Kurt et al. 2018; Urcan et al. 2010b). Diese Effekte werden durch mitotische Rekombinationen, Punktmutationen und chromosomale Alterationen erklärt (Arossi et al. 2010a). Daher kommen Kleinsasser *et al.* (2006) zu dem Schluss, dass UDMA ein potentieller Risikofaktor der Tumorentstehung in Speicheldrüsenzellen sein könnte. *In vivo* wurden genotoxische Effekte, wie mitotische Rekombinationen, Punktmutationen sowie chromosomale Veränderungen nur für TEGDMA und UDMA nachgewiesen, wobei die Wirkung von UDMA um den Faktor 1,6 stärker war (Arossi et al. 2010b). In einer zweiten *In-vivo*-Studie konnten die Autoren diese Wirkung selbst an wässrigen Eluaten von niedrig-viskosen Kompositen bestätigen (Arossi et al. 2010a). Da die Ableitung von *In-vitro*-Ergebnissen auf die klinische Relevanz schwierig ist, sind zur abschließenden Bewertung des mutagenen Potentials weitere *In-vivo*-Studien erforderlich (Kirkland et al. 2007; Pettini et al. 2015).

1.3.5 Allergenes Potential

Die am weitesten verbreitete Klassifikation allergischer Reaktionen ist die Klassifikation nach Coombs und Gell (siehe Tabelle 3) (Descotes und Choquet-Kastylevsky 2001).

Tabelle 3: Klassifikation allergischer Reaktionsformen nach Coombs und Gell (Coombs und Gell 1963).

Beschreibung	
Typ I	Reaktion vom Soforttyp, i. d. R. Mastzell- und IgE-vermittelt
Typ II	Zytotoxische Immunreaktion
Typ III	Immunkomplexvermittelte Immunreaktion
Typ IV	Reaktion vom Spättyp, zellulär (T-Zell-) vermittelt

Reaktionen auf dentale Materialien sind entweder vom Soforttyp (Typ I, IgE-vermittelt) oder vom Spättyp (Typ IV, Zell-vermittelt) (Gawkrödger 2005). Zu anaphylaktischen Typ-I-Reaktionen bestehen in der Literatur lediglich Fallbeschreibungen (Fan und Meyer 2007;

Hallstrom 1993; Mahendran et al. 2016; Niinimäki et al. 1983). Häufiger verursachen Komposite Kontaktstomatitiden (Typ IV), die sich klinisch als Erythem, Ödem, Stomatitis, Erosionen, Aphten, lichenoiden Läsionen oder auch als perorale Ekzeme präsentieren (Brasch 2004; Hickel 2007). Neben den typischen Anzeichen einer Stomatitis präsentieren sich Kontaktstomatitiden auch durch subjektive Symptome wie Mundtrockenheit, Symptome eines *Burning-Mouth-Syndromes* oder diffuse Schmerzen im Kieferbereich (Raap et al. 2012). Reaktionen vom Spättyp erfolgen nach vorheriger Sensibilisierung durch Exposition zu dem jeweiligen Antigen und führen in Folge der Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen zur Cytokinfreisetzung (Bakula et al. 2011). Allerdings ist bekannt, dass auf Grund von Kreuzsensibilisierungen durch andere Methacrylate, allergische Reaktionen ohne vorherige Exposition auf dentale Monomere möglich sind (Geurtsen 2000). Es bestehen wenige epidemiologische Studien zur Prävalenz von Allergien auf dentale Materialien, vermutlich liegen überwiegend Reaktionen auf Legierungsbestandteile und seltener gegen Kompositbestandteile vor (Mittermüller et al. 2018; Olms et al. 2019; Syed et al. 2015). Am weitesten sind Allergien auf TEGDMA, HEMA und BisGMA verbreitet, wobei vor allem HEMA und TEGDMA ein hohes allergenes Potential aufweisen (Aalto-Korte et al. 2007; Goon et al. 2006). Weiterhin scheint HEMA zusätzlich Reaktionen einer bestehenden Nickelallergie zu intensivieren (Bando et al. 2014). Um Differentialdiagnosen, wie Lichen planus, Erythroplakien, Erythroleukoplakien, Burning-Mouth-Syndrome oder ein Pemphigoid, auszuschließen ist ein Patch-Test erforderlich (Feller et al. 2017). Hierbei ist es ausreichend diesen Test epikutan und nicht epimukös durchzuführen, da klinisch relevante Kontaktallergien auch epikutan nachweisbar sind (Schwarz et al. 2016).

1.4 Grundlagen der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

1.4.1 Allgemein

Durch chromatographische Trennverfahren werden Analyten in einer mobilen Phase (flüssig oder gasförmig) durch eine stationäre Phase transportiert und durch chemische/mechanische Interaktionen der stoffspezifischen Retentionszeit folgend aufgetrennt (Kazakevich und LoBrutto 2006). Die Flüssigkeitschromatographie, die als Grundlage der *high performance liquid chromatography* (HPLC) zu verstehen ist, kann in eine Flüssig-Flüssigchromatographie und eine Flüssig-Festchromatographie unterschieden werden, wobei der Unterschied in der jeweiligen stationären Phase (fest/flüssig) liegt

(Kaltenböck 2008; Kazakevich und LoBrutto 2006). Als Weiterentwicklung der klassischen Flüssigkeitschromatographie ermöglicht die HPLC durch geringste Teilchengrößen der stationären Phase (1 – 10 μm) und hohe Drücke eine höhere Untersuchungsgeschwindigkeit, Auflösung und Sensitivität (Kaltenböck 2008; Kazakevich und LoBrutto 2006; Meyer 2008a).

1.4.2 Trennmechanismen

Im Folgenden werden die gängigsten Trennmechanismen der Flüssigkeitschromatographie, die *Normal-Phase-Chromatographie*, *Reversed-Phase-Chromatographie*, Ionenaustausch-Chromatographie und die Ausschluss-Chromatographie kurz beschrieben (Ca et al. 2009).

1.4.2.1 *Normal-Phase-Chromatographie* (NP-HPLC)

Grundlage der NP-HPLC ist eine polare stationäre Phase, meist Silikagel (Kieselgel), und eine weniger polare mobile Phase auf Grundlage apolarer Lösungsmittel, wie Hexan (D Wu et al. 2014). Durch Adsorption der Analyt-Moleküle an die polare stationäre Phase wird die Probe in Abhängigkeit molekularer Interaktionen aufgetrennt (Hemström und Irgum 2006). Die Trennung der Moleküle erfolgt hierbei von hydrophoben zu hydrophilen Molekülen (Žuvela et al. 2019).

1.4.2.2 *Reversed-Phase-Chromatographie* (RP-HPLC)

Im Gegensatz zur NP-HPLC wird bei der RP-HPLC eine polare, meist wässrige mobile Phase und eine apolare stationäre Phase eingesetzt (Przybyciel und Majors 2002). Daher sind vorwiegend polare Wechselwirkungen der Analyten mit der polaren mobilen Phase und hydrophobe Interaktionen mit der stationären Phase Grundlage dieses chromatographischen Trennverfahrens (Rafferty et al. 2007). Etwa 90 % aller HPLC-Analysen werden in diesem Modus durchgeführt, da die RP-HPLC trotz ihrer einfachen Anwendbarkeit ein breites Massen- und Polaritätspektrum an potentiell trennbaren Analyten abdeckt (He et al. 2014; Majors 2007).

1.4.2.3 Ionenaustausch-Chromatographie/*Ion-Exchange Chromatography* (IEX)

Bei der Ionenaustausch-Chromatographie werden elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Analyten und der stationären Phase zur Auftrennung der Probe genutzt (Roper und Lightfoot 1995). In der Regel wird als stationäre Phase ein Styrol-Divinylbenzol-Harz verwendet, an dessen Phenylringe Ionen-Austausch-Gruppen gebunden sind (Kazakevich und LoBrutto 2006). Diese Ionen-Austausch-Gruppen werden in Kation- und Anion-Austauscher unterteilt (Walton 1980). Das Anwendungsgebiet dieser Chromatographie ist

die Trennung von Aminosäuren, Stoffwechselprodukten sowie anorganischer und organischer Ionen (Meyer 2008a).

1.4.2.4 Ausschluss-Chromatographie/*Size-Exclusion Chromatography* (SEC)

In diesem Chromatographie-Modus erfolgt die Trennung entsprechend der Molekülgröße bzw. in Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius in der mobilen Phase (McIntee et al. 2015; Teraoka 2004). Für aussagekräftige Ergebnisse mittels SEC müssen nicht-größenspezifische Interaktionen zwischen den Analyten und der stationären Phase vermieden werden und die Molekülmassen der Stoffe im Analyten um wenigsten 10 % differieren (Kazakevich und LoBrutto 2006; Meyer 2008b).

1.4.3 Aufbau einer HPLC-Apparatur

Im Wesentlichen bestehen HPLC-Apparaturen aus einem Lösungsmittelreservoir, einer HPLC-Pumpe, einem Probeneinlasssystem, einer HPLC-Säule, einem Detektor und einem Datenverarbeitungs- und Kontrollsystem (Kazakevich und LoBrutto 2006). Der Aufbau einer HPLC-Apparatur ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

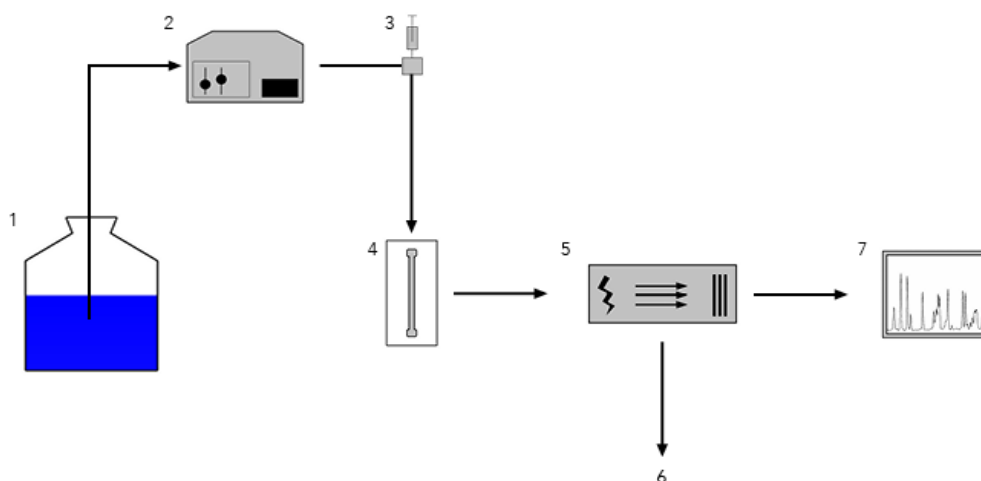


Abbildung 3: Schematischer Aufbau einer HPLC-Apparatur: 1) Lösungsmittelreservoir mit der mobilen Phase 2) Pumpe 3) Probeneinlasssystem 4) HPLC-Säule im Thermostaten 5) Detektor 6) Abfall 7) Datenerfassung und -verarbeitung; Modifiziert nach Meyer (Meyer 2008b)

Die Zusammensetzung dieser Bauteile erfolgt entweder modular unter Verwendung verschiedener Geräte und Hersteller oder platzsparender als Kompaktanlage (Meyer 2008b). Zentraler Bestandteil der Anlage ist die HPLC-Säule, da in dieser die chromatographische Trennung der Analyten stattfindet (Kazakevich und LoBrutto 2006). Um

temperaturkontrollierte, gut reproduzierbare Trennungen zu ermöglichen, wird die HPLC-Säule innerhalb eines Thermostaten platziert (Meyer 2008b).

1.4.4 Kopplung von Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), UV/VIS und Massenspektrometrie (MS)

In der analytischen Chemie werden Separationstechniken, wie Flüssig (LC)- oder Gaschromatographie (GC), mit spektroskopischen Detektoren gekoppelt, um strukturelle Informationen über den Analyten zu erhalten (Exarchou et al. 2006). Heutzutage ist die Massenspektrometrie (MS) die bevorzugte Detektionstechnik, weshalb GC-MS und LC-MS die beliebtesten und leistungsfähigsten gekoppelten Techniken sind (Wilson und Brinkman 2003). Multiple Kopplungstechniken (siehe Abbildung 4), also die Kombination mehrerer Trennungs- und/oder Detektionstechniken, bieten mehr strukturelle Informationen sowie eine höhere Sensitivität und Selektivität (Patel et al. 2010).

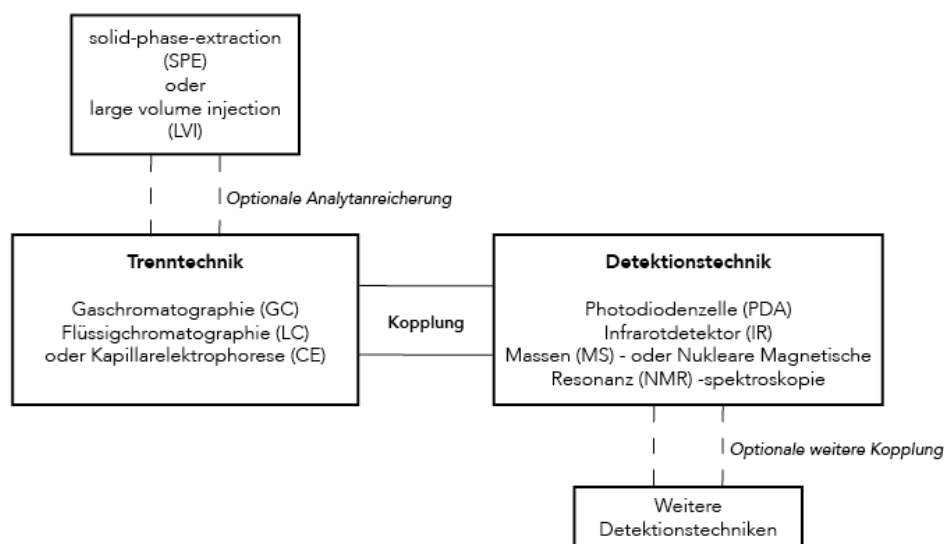


Abbildung 4: Kopplungstechniken in der analytischen Chemie. Modifiziert nach Sarker und Nahar (Sarker und Nahar 2012)

Die Kopplung einer HPLC mit einem in Serie geschalteten UV/Vis- und einem MS-Detektor (HPLC-UV/Vis-MS) ist ein bereits etabliertes System zum Nachweis geringster Stoffmengen in den verschiedensten Anwendungsgebieten (Schweikart und Hulthe 2019). Die Verbindung von HPLC und Massenspektrometrie erscheint grundsätzlich inkompatibel, da HPLC-Apparaturen bei atmosphärischem Druck sowie relativ hohen Volumenströmen und Massenspektrometer unter Vakuum betrieben werden (Higton und Oxford 1995). Erst die Einführung von Ionisationstechniken bei atmosphärischem Druck (Atmospheric Pressure Ionization, API) ermöglichte den Durchbruch von LC-MS-Techniken (Kamel und

Prakash 2006; Zöllner und Mayer-Helm 2006). Eine genaue Beschreibung der Massenspektrometrie und der Ionisierungsprozesse erfolgt in Abschnitt 1.5. Die massenspektrometrische Detektion erlaubt die Erhebung sehr genauer Daten bezüglich vorliegender Massen, jedoch nur begrenzte Aussagen zur chemischen Struktur des Analyten (Cirlini et al. 2012; Holt et al. 1997). Der ergänzende Einsatz der UV/Vis-Detektion zur HPLC-MS-Methodik kann durch zusätzliche Informationen über den Analyten die Selektivität verbessern (Passos und Saraiva 2019). UV/Vis-Detektoren messen die Absorption von UV-Licht oder sichtbarem Licht bei Auftreten der Analyten in der mobilen Phase (Dong 2006; Kazakevich und LoBrutto 2006). Heutzutage ermöglicht die Anordnung zahlreicher spezifischer Photodiodenzellen (*photodiodes*) auf einem einzelnen Computerchip (*photodiode array detector*, PDA) die simultane Erfassung des gesamten UV-Spektrums und die digitale Speicherung (Miller 2009). Die Voraussetzungen zur UV-Detektion des Analyten sind funktionelle Gruppen mit chromophoren Eigenschaften sowie eine mobile Phase, deren Eigenabsorption nicht im Bereich des Analyten liegt (Schulte et al. 2013; Vervoort et al. 2008). Die kombinierte Anwendung von HPLC, UV/Vis- und MS-Detektion (HPLC-UV/Vis-MS) ermöglicht somit die Identifikation unbekannter Substanzen, selbst bei eingeschränkter chromatographischer Trennung und innerhalb komplexer Stoffgemische (Lech und Jarosz 2011; Pan et al. 2006). Neben diesem Verfahren hat sich die Kopplung der HPLC mit zwei Massenspektrometern, die sogenannte Tandem-Massenspektrometrie, (HPLC-MS/MS) etabliert (Peters 2011). Hierbei ist es möglich mit dem zweiten Massenanalysator Ionen, die im ersten Massenanalysator vorselektiert wurden, zu fragmentieren und zu analysieren (Picó et al. 2004). In der Regel dienen mehrere Fragmentationen, sogenannte Massenübergänge, der eindeutigen Identifikation des Analyten (Honour 2011). Durch dieses Verfahren kann die Sensitivität und Selektivität gegenüber der herkömmlichen MS deutlich verbessert werden (Díaz-Cruz et al. 2003). Zusammenfassend erlauben beide Techniken durch den Einsatz mehrerer Massenanalysatoren die sichere Identifikation von Analyten (Holcapek et al. 2008).

1.5 Grundlagen der Massenspektrometrie (MS)

1.5.1 Allgemein

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine analytische Technik zur Erhebung qualitativer (Molekulare Massen, Struktur) und quantitativer (Konzentrationen) Informationen über Analyten (Ho et al. 2003). Grundlage der MS ist die Bildung negativer oder positiver Ionen,

die basierend auf ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) getrennt und analysiert werden (El-Aneel et al. 2009). Unabhängig vom dem verwendeten Massenspektrometer müssen Analyten aus einer flüssigen oder festen Phase in die Gasphase überführt werden (Awad et al. 2015). Zur Ionisation mit nachfolgender Trennung und Detektion in der Gasphase bestehen Massenspektrometer aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor (Zhou et al. 2012).

1.5.2 Prinzipien der Massenspektrometrie

In diesem Abschnitt werden die Prinzipien der Ionisation, Massenanalyse und Detektion erläutert, wobei der Fokus auf den Bauformen und Funktionsprinzipien, die im Rahmen der Kopplung an eine HPLC-Apparatur angewendet werden, liegt. Die unbestritten wichtigste Reaktion in einem Massenspektrometer ist die Ionisierung des Analyten und Überführung in die Gasphase (Glish und Vachet 2003). Das älteste Ionisationsverfahren, die Elektronenstoßionisation (EI), gilt als hartes Ionisationsverfahren, welches sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit sowie die Erfassung umfangreicher struktureller Informationen auszeichnet und daher auch heute noch angewendet wird (Belas und Blair 2001). EI produziert Ionen nach Verdampfung der Verbindungen in einem Hoch-Vakuum durch Kollisionen des Analyten mit hochenergetischen Elektronen (70 eV), bei denen es durch Entfernung eines Elektrons zur Bildung eines positiv-geladenen Radikalions des Moleküls und nachfolgender Fragmentierung kommt (Palma et al. 2011). Wie unter 2.4.4. beschrieben, eignen sich diese klassischen, harten Ionisierungsmethoden nur eingeschränkt zur Kopplung mit einer HPLC (Bianchi et al. 2018). Erst durch Ionisationstechniken bei atmosphärischem Druck (API), wie der Elektrospray-Ionisation (ESI), gelang die Überführung labiler Analyten aus nicht-volatilen Lösungen zu Ionen in der Gasphase (Whitehouse et al. 1985). Auch heutzutage ist ESI die präferierte Methodik zur Kopplung mit einer HPLC zum Nachweis thermoinstabiler und nicht-volatiler Analyten (Gowda und Djukovic 2014). Im Gegensatz zu EI ist ESI eine weiche Ionisationstechnik, deren Kennzeichen keine oder eine geringe Fragmentierung bei der Ionisation ist (Domon und Aebersold 2006; Fenn et al. 1989). Hierzu wird die Analytlösung durch eine Kapillare, an deren Spitze eine negative oder positive Spannung (2 – 5 kV) angelegt ist, geführt, wodurch ein hohes elektrisches Potential zwischen Kapillare und Gegenelektrode entsteht (Cech und Enke 2001; CK Lim und Lord 2002; Pozniak und Cole 2007). Dieses elektrische Feld führt zur Dispersion der Analytflüssigkeit und der Bildung eines Aerosols, das unterstützt von einem Spraygas (i. d. R. Stickstoff), zum Massenanalysator transportiert wird (Banerjee und Mazumdar 2012). Massenanalysatoren trennen die Ionen, sodass diese entsprechend des m/z -Verhältnisses auf den Detektor

treffen (Yates 2000). In der HPLC-MS werden Quadrupol-, Ionenfallen-, Flugzeit- oder Hybrid-Massenspektrometer als Analysatoren verwendet (Pitt 2009). Hybrid-Massenspektrometer ermöglichen durch die Kombination verschiedener Techniken eine hohe Auflösung, verbesserte Sensitivität und/oder Messgenauigkeit für die gemessenen Massen (Beccaria und Cabooter 2020). Im Folgenden werden die Bestandteile des verwendeten Hybrid-Massenspektrometers (LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), das eine lineare Ionenfalle mit einer Orbitrap kombiniert, erörtert (L Lin et al. 2015). Ionenfallen speichern Ionen und können diese durch Veränderung der Elektrodenspannung nach dem Masse-zu-Ladungsverhältnis geordnet freisetzen, sodass der Detektor ein Massenspektrum aufnehmen kann (Stafford 2002). Bei linearen Ionenfallen werden die Ionen radial durch ein Radiofrequenzfeld und axial mittels elektrischer Potentiale in einem 2D-Quadrupolfeld gehalten (Kolch et al. 2005). Lineare Ionenfallen zeichnen sich durch größere Ionenspeicherkapazitäten und –effizienz, verglichen zu den früheren 3D-Ionenfallen, aus (Peng und Austin 2011). Im Gegensatz zu diesen konventionellen Ionenfallen verwenden Orbitraps kein Radiofrequenz- oder Magnetfeld sondern ein elektrostatisches Feld zwischen einer axialen, zentralen Elektrode und einer coaxialen, äußeren Elektrode (siehe Abbildung 5) (Hardman und Makarov 2003; Makarov 2000).

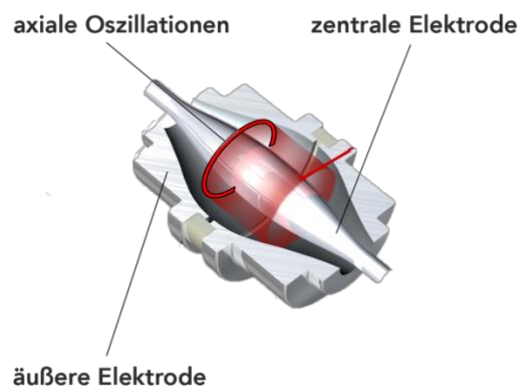


Abbildung 5: Aufbau einer Orbitrap. Modifiziert nach Eliuk und Makarov (Eliuk und Makarov 2015)

Als Detektoren kommen heutzutage bei klassischen Ionenfallen Sekundärelektronenvervielfacher (*secondary electron multiplier*, SEM) und bei Orbitraps Induktionsstrom-Detektoren zum Einsatz (Gross 2013). Bei SEM-Detektoren treffen energiereiche Elektronen auf die Oberfläche eines Metalls/Halbleiters, der Sekundärelektronen emittiert (Koppelaar et al. 2005). Die Sekundärelektronen werden über mehrere Dynodenstufen verstärkt und in einen Strom konvertiert, dessen Spannung proportional zur Ionenanzahl ist

und somit die Masse in ein elektrisches Signal überführt (Benedikt et al. 2012). Bei Orbitraps entstehen durch das axiale elektrische Feld und die konische Form der Elektroden axiale Oszillationen der Ionen, die von den äußeren Elektroden detektierten Frequenzen werden mittels Fourier-Transformation in ein Massenspektrum konvertiert (Zubarev und Makarov 2013). In dem verwendeten Hybrid-Massenspektrometer werden die Ionen, nachdem sie die lineare Ionenfalle passiert haben, in einer C-Falle gesammelt und in die Orbitrap weitergeleitet (Scigelova und Makarov 2006). Durch die Verknüpfung von zwei Massenanalytoren mit gezielter Fragmentierung von Ionen in der C-Falle können strukturelle Informationen reliabel und schnell in komplexen Stoffgemischen erfasst werden (Makarov et al. 2006; Olsen et al. 2007).

1.6 Ziel und Fragestellung

Bestandteile der Polymermatrix von Kompositen weisen potentiell proinflammatorische, zytotoxische, genotoxische und mutagene Wirkungen auf und sind daher von gesundheitlicher Relevanz für den Patienten. Insbesondere der endokrine Disruptor BPA und dessen Derivate stehen im Verdacht freigesetzt zu werden. Auf Grund dieser potentiell gesundheitsschädlichen Wirkung bieten Hersteller BPA-freie Materialien an. Bei diesen Materialien wird das klassische Hauptmonomer BisGMA meist durch UDMA ausgetauscht. Allerdings eluieren BPA und seine Derivate im Gegensatz zu hydrophileren Molekülen mit einer flexibleren Struktur, wie UDMA, kaum ins wässrige Milieu der Mundhöhle. Bisherige Untersuchungen zu diesem Thema wurden nur an Kunststoffen durchgeführt, die in geringen Mengen in die Mundhöhle eingebracht werden und es erfolgte kein Vergleich zwischen konventionellen und neueren BPA-freien Materialien. Zielsetzung der vorliegenden *In-vitro*-Studie war es daher, Provisorienkunststoffe auf die Freisetzung relevanter, dentaler Monomere im wässrigen Milieu zu untersuchen und konventionelle sowie BPA-freie-Kunststoffe miteinander zu vergleichen.

Hierzu wurden Probekörper von vier verschiedenen Kunststoffen hergestellt und inkubiert. Im Anschluss wurden die Eluate des Elutionsmaximums (24-stündige Inkubation) mittels HPLC-UV/Vis-MS hinsichtlich der Freisetzung von BisGMA, BPA, TEGDMA und UDMA untersucht. Bei einem positiven Nachweis wurden weitere Inkubationsperioden (eine Stunde, 12 Stunden und 7 Tage) untersucht. Überprüft wurde die Hypothese, dass hauptsächlich hydrophile Moleküle, wie UDMA und TEGDMA, freigesetzt werden und BPA und BisGMA nur in geringen oder nicht nachweisbaren Konzentrationen eluieren. Durch statistische Tests sollte der Einfluss der Anpassungen an der Polymermatrix BPA-freier Materialien analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsüberblick

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine *In-vitro*-Studie zur Monomerfreisetzung aus dentalen Provisorienkunststoffen. Der Aufbau der vorliegenden Studie unterteilt sich in die Probekörperherstellung, Inkubation, HPLC-UV/Vis-MS-Analyse und die statistische Auswertung. Bei erfolgreichem BPA-Nachweis erfolgte vor der Auswertung eine Kontrolluntersuchung. Hierzu wurde das probeninterne BPA derivatisiert und mittels hochsensitiver HPLC-MS/MS analysiert. Einen Überblick über das Studiendesign gibt Tabelle 4.

Tabelle 4: Studiendesign

1.	Probekörperherstellung
2.	Inkubation der Probekörper für eine Stunde, 12 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage
3.	<p>Analyse:</p> <ul style="list-style-type: none"> a) Kalibrierung mit einem internen Standard b) Bestimmung der Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen c) Herstellung der Messlösungen d) Analyse der Eluate des Elutionsmaximums (24-stündige Inkubation) hinsichtlich von BisGMA, BPA, TEGDMA und UDMA. Bei einem positiven Nachweis erfolgte die Analyse weiterer Inkubationsperioden (eine Stunde, 12 Stunden und 7 Tage) e) Kontrolluntersuchung der Proben mit positivem BPA-Nachweis: HPLC-MS/MS-Analyse mit Derivatisierung des probeninternen BPA
4.	Statistische Auswertung

2.2 Probekörperherstellung

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden ExperTemp (Ultradent Products Inc., South Jordan, USA), Luxatemp Automix Plus (DMG Chemisch-Pharmazeutische Fabrik GmbH, Hamburg, Deutschland), Protemp 4 (3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland) und Visalys Temp (Kettenbach GmbH & Co. KG, Eschenburg, Deutschland) untersucht. ExperTemp und Visalys Temp werden als BPA-freie Materialien von den Herstellern deklariert. Luxatemp Automix Plus und Protemp 4 sind konventionelle Komposite, die nach Herstellerangaben BPA-Derivate innerhalb des Monomersystems aufweisen.

Es wurden je Inkubationsperiode, nachzuweisendem Monomer und Material fünf Probekörper (n = 5) hergestellt. Hierzu wurden die Provisorienkunststoffe mittels Automix-

Dispenser (DMG Chemisch-Pharmazeutische Fabrik GmbH, Hamburg, Deutschland) in individualisierte, zylindrische PTFE-Matrizen mit einer Höhe von 10 mm und einem Innendurchmesser von 10 mm auf einer PTFE-Arbeitsplatte eingebracht. Die Polymerisation erfolgte nach Herstellerangaben. Die Polymerisationszeiten können der Tabelle 5 entnommen werden.

Tabelle 5: Polymerisationszeiten der untersuchten Materialien

Material	Polymerisationszeit
ExperTemp	4:00 min
Luxatemp Automix Plus	7:00 min
Protemp 4	5:00 min
Visalys Temp	4:00 min

Durch dieses Vorgehen wurden zylindrische Probekörper mit einer Oberfläche von 4,712 cm² hergestellt. Im Anschluss an die Polymerisation wurden die Probekörper aus der Matrize entnommen und den Herstellerangaben entsprechend mit Alkohol, zur Entfernung der Sauerstoffinhibitionsschicht, gereinigt. Dies erfolgte einheitlich für 20 Sekunden.

2.3 Inkubation

Die Probekörper wurden zusammen mit HPLC-grade Wasser (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) in UV-geschützten Borosilikat-Probenbehältnissen mit PTFE-beschichtetem Verschluss (Glastechnik Gräfenroda GmbH, Gräfenroda, Deutschland) inkubiert. Vor der Verwendung wurden die Behältnisse mit HPLC-grade Methanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) und HPLC-grade Wasser gereinigt. Anschließend wurde je ein Probekörper zusammen mit 1,74 ml HPLC-grade Wasser in ein Probenbehältnis gegeben. Dieses Extraktionsverhältnis entspricht den Vorgaben der ISO-Norm 10993-12 zur Testung von Medizinprodukten. Die Inkubation erfolgte in einem Inkubationsschüttler (Excella E24, New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey, Vereinigte Staaten) für jeweils eine Stunde, 12 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage bei 37 °C und 112 U/min. Im Anschluss an den Inkubationszeitraum wurden die Probekörper entnommen und das Eluat zur Vermeidung sekundärer chemischer Reaktionen bei -18 °C eingefroren. Dieses Vorgehen wurde für jedes Material durchgeführt.

2.4 HPLC-UV/Vis-MS-Analyse

Die HPLC-UV/VIS-MS-Analysen wurden an dem Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Universität Göttingen durchgeführt. Die Messungen und die Auswertungen der Chromatogramme erfolgten unter Anleitung und Betreuung des Leiters der Zentralen Analytik Herrn Dr. Holm Frauendorf.

2.4.1 Kalibrierung

Zur Kalibrierung wurden Standardlösungen unterschiedlicher Konzentrationen des internen Standards Diethylphthalat (DEP) sowie der Referenzsubstanzen hergestellt. Die verwendeten Substanzen mit den jeweiligen molaren Massen und den zugehörigen Chemical-Abstracts-Service (CAS)-Nummern sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Referenzsubstanzen

Name	Abkürzung	Hersteller	Molare Masse [g/mol]	CAS-Nr.	Reinheit
Urethandimethacrylat	UDMA	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	470,56	72869-86-4	>97 %
Triethylen-glycol-dimethacrylat	TEGDMA	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	286,32	109-16-0	99 %
Bisphenol A	BPA	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	228,29	80-05-7	≥99 %
Bisphenol-A-Glycidyl-di-methacrylat	BisGMA	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	512,59	1565-94-2	Nicht angegeben
Diethylphthalat	DEP	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	222,24	84-66-2	99,5 %

Zunächst wurden 20 ml Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml der jeweiligen Verbindung in wässriger Lösung angesetzt. Hierzu wurden je Standard 20 mg mit einer Feinwaage (AT20, Mettler-Toledo International Inc., Columbus, USA) eingewogen, mit 4 ml HPLC-grade Methanol in Lösung gebracht und mit HPLC-grade Wasser verdünnt. Durch serielle Verdünnung mit HPLC-grade Wasser wurden für TEGDMA und UDMA Standardlösungen mit den Konzentrationen 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 5,0 µg/ml, 10,0 µg/ml und 20,0 µg/ml hergestellt. Auf Grund der niedrigen freigesetzten BPA-Konzentrationen erfolgte die Herstellung von vier Standardlösungen mit Konzentrationen von 0,5 µg/ml,

1,0 µg/ml, 5,0 µg/ml und 10,0 µg/ml. Da BisGMA in den Voruntersuchungen nicht nachweisbar war, wurden nur Lösungen zur Ermittlung der Nachweisgrenze hergestellt. Die Standardlösung des internen Standards (DEP-Standardlösung) hatte eine Konzentration von 10,0 µg/ml.

Für eine Fünfpunkt-Kalibrierung, zur Quantifizierung von UDMA und TEGDMA, wurden Kalibrierlösungen aus den Referenzstandards und der DEP-Standardlösung hergestellt. Hierzu wurden jeweils 0,5 ml des Referenzstandards und 0,5 ml der DEP-Standardlösung in eine HPLC-Gewindeflasche mit PTFE-beschichtetem Verschluss (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) pipettiert. Für eine externe Vierpunkt-Kalibrierung, zum BPA-Nachweis, wurden HPLC-Gewindeflasche mit je 1 ml der reinen Standardlösung befüllt. Diese Kalibrierlösungen wurden gemeinsam mit den Proben unter Versuchsbedingungen untersucht (siehe 2.4.4). Um die Messpunkte in die Kalibrierfunktion zu überführen wurde lineare Regression verwendet. Zur Überprüfung der Linearität der Kalibrierung wurde der Residuenplot ausgewertet und der Determinationskoeffizient r^2 bestimmt. Ein gleichmäßiger Residuenplot mit einem Determinationskoeffizienten $\geq 0,95$ galt als Beweis für eine lineare Kalibrierung.

2.4.2 Bestimmung der Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen

Durch serielle Verdünnung der vorhandenen Kalibrierlösungen mit HPLC-grade Wasser wurden Standards zur experimentellen Bestimmung der Nachweisgrenze (*limit of detection* / LOD) mit Konzentrationen von 0,05 µg/ml und 0,01 µg/ml hergestellt. Von BisGMA wurden Lösungen mit Konzentrationen von 0,5 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0,05 µg/ml hergestellt. Die Analyse erfolgte unter Versuchsbedingungen (siehe 2.4.4). Als untere Quantifizierungsgrenze (*limit of quantification* / LOQ) wurde die geringste Konzentration der eingesetzten Kalibrierlösungen angenommen.

2.4.3 Herstellung der Messlösungen

Die Eluate wurden bei Zimmertemperatur (21 °C) aufgetaut. HPLC-Gewindeflaschen wurden mit je 0,5 ml des Eluats und 0,5 ml der DEP-Standardlösung mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) befüllt. Zum Nachweis von BPA wurde nur das reine Eluat ohne internen Standard verwendet.

2.4.4 Analyse

Kalibrier- und Messlösungen wurden gemeinsam mittels HPLC-UV/Vis-MS analysiert. Jede Messung erfolgte doppelt.

2.4.4.1 Chromatographische Einstellungen

Die Probenaufgabe der Mess- und Kalibrierlösungen zur HPLC-UV/Vis-MS-Analyse erfolgte automatisiert mittels Autosampler (Accela Autosampler, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Einstellungen der HPLC können Tabelle 7 entnommen werden.

Tabelle 7: HPLC-Parameter

Parameter	Einstellungen	
Trennsäule	Phenomenex Kinetex 100A 150 x 2.1 mm, 5 µm particle size	
Flussrate	200 µl/min	
Injektionsvolumen	10 µl	
Säulentemperatur	25 °C	
Gradientenelution	A H ₂ O + 0,05 % HCOOH	
	B Methanol + 0,05 % HCOOH	
	0:00 min	60 % A / 40 % B
	0:00 – 15:00 min	zu 0 % A / 100 % B
	15:00 – 22:00 min	0 % A / 100 % B

2.4.4.2 Detektoreinstellungen für Messungen im positiven ESI-Modus

Die UV/Vis-Detektion wurde mit einem Surveyor PDA Plus Detector (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Die Einstellungen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: PDA-Einstellungen im positiven ESI-Modus

Parameter	Einstellungen
Laufzeit	22 min
Scan-Bereich	200 – 600 nm (BisGMA, TEGDMA, UDMA); 270 – 280 nm (BPA)
Scanrate	1 nm
Bandbreite	5 Hz

Zur massenspektrometrischen Untersuchung wurde ein Ionenfallen-Massenspektrometer mit zentraler, spindelförmiger Elektrode (LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) verwendet. Die Analyse erfolgte im *Fullscan*-Modus. Die massenspektrometrischen Einstellungen können Tabelle 9 entnommen werden.

Tabelle 9: MS-Einstellungen im positiven ESI-Modus

Parameter	Einstellungen
Ion Source	Elektrospray-Ionisation (ESI)
Auflösung	60000
Scanbereich	100 - 1000 m/z
Quellenspannung	4.00 kV
Kapillartemperatur	275 °C
Kapillarspannung	42 kV
Fokuslinsenspannung	125 V
Spraygasflussrate	50 arb
Hilfsgasflussrate	0 arb
Laufzeit	22 min

2.4.4.3 Detektoreinstellungen für Messungen im negativen ESI-Modus

Messungen zum BPA-Nachweis wurden ergänzend im negativen ESI-Modus und mit angepassten PDA- und MS-Einstellungen durchgeführt. Die Einstellungen sind in Tabelle 10 und 11 aufgeführt.

Tabelle 10: PDA-Einstellungen im negativen ESI-Modus

Parameter	Einstellungen
Laufzeit	22 min
Scan-Bereich	200 – 400 nm
Scanrate	1 nm
Bandbreite	5 Hz

Tabelle 11: MS-Einstellungen im negativen ESI-Modus

Parameter	Einstellungen
Ion Source	Elektrospray-Ionisation (ESI)
Auflösung	60000
Scanbereich	225 – 500 m/z
Quellenspannung	5.00 kV
Kapillartemperatur	275 °C
Kapillarspannung	-46 V
Fokuslinsenspannung	-178 V
Spraygasflussrate	50 arb
Hilfsgasflussrate	0 arb
Laufzeit	22 min

2.4.5 Qualitative und Quantitative Auswertung

Die Analyten wurden in den Messlösungen anhand der spezifischen Retentionszeit, des Absorptionsverhalten und der exakten molaren Masse identifiziert. Hierzu wurden Referenzpeaks durch die Analyse von Kalibrierlösungen zusammen mit dem internen Standard DEP erhoben. Die Referenzpeaks von BPA wurden ohne internen Standard erstellt. Die Zuordnung von probeninternen *Peaks* zu den Referenzpeaks erlaubte die Identifikation der Analyten.

Bei quantitativen Untersuchungen unter Verwendung eines internen Standards wurde zunächst der Kalibrierfaktor bestimmt. Dieser entspricht dem Quotienten des Standard-Konzentrationsverhältnisses und des Standard-Signalverhältnisses. Im Anschluss wurde für jede Messlösung die Fläche unterhalb des *Peaks* (Analyt und interner Standard) berechnet und das Verhältnis zueinander als Proben-Signalverhältnis definiert. Aus dem Produkt des Proben-Signalverhältnisses und des Kalibrierfaktors erfolgte die Berechnung des Proben-Konzentrationsverhältnisses. Es wurden je Messlösung, auf Grund der Doppelmessungen, zwei Proben-Konzentrationsverhältnisse ermittelt. Aus beiden Konzentrationsverhältnissen wurde der Mittelwert bestimmt und für die nachfolgenden Berechnungen verwendet. Die absolute Konzentration wurde aus dem Produkt des mittelwertigen Proben-Konzentrationsverhältnisses und der bekannten Konzentration des internen Standards berechnet.

Die Kalibrierung zum Nachweis von BPA erfolgte mittels externer Standards. Der Kalibrierfaktor entsprach hierbei dem Quotienten der bekannten Konzentrationen der externen Standards sowie der zugehörigen Peakflächen. Die probeninterne BPA-Konzentration wurde durch Multiplikation des Kalibrierfaktors und der probeninternen Peakfläche ermittelt.

Der qualitative und quantitative Nachweis erfolgte zunächst anhand der Proben des Elutionsmaximums. Dies entsprach den Eluaten nach 24-stündiger Inkubation. Bei einem positiven Nachweis wurden die Eluate weiterer Inkubationsperioden hinsichtlich der jeweiligen Substanz untersucht.

Zum Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse erfolgte eine Kontrolluntersuchung der Proben mit positivem BPA-Nachweis. Hierzu wurde das probeninterne BPA derivatisiert und die Eluate unter Einsatz einer hoch-sensitiven HPLC-MS/MS analysiert. Als interner Standard wurde Isotopen-markiertes BPA (d16BPA) verwendet.

2.5 Kontrolluntersuchung mittels HPLC-MS/MS

Die Kontrolluntersuchung wurde in der Abteilung Molekulare Phytopathologie und Mykotoxinforschung des Departments für Nutzpflanzenwissenschaften für Organische und Biomolekulare Chemie der Universität Göttingen unter der Leitung und Betreuung von Herrn Prof. Petr Karlovsky und Dr. Mohammad Alhussein durchgeführt. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte ebenfalls unter der Anleitung und Betreuung von Herrn Prof. Petr Karlovsky und Dr. Mohammad Alhussein.

2.5.1 Referenzsubstanzen und Kalibrierung

Eine Übersicht der verwendeten Substanzen zur Kalibrierung und Derivatisierung ist in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Substanzen zur Derivatisierung und Kalibrierung der HPLC-MS/MS

Name	Abkürzung	Hersteller	Molare Masse [g/mol]	CAS-Nr.	Reinheit
Bisphenol A	BPA	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	228,29	80-05-7	≥99 %
Bisphenol A-d16	d16BPA	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	244,38	96210-87-6	98 atom % D
Pyridin-3-sulfonylchlorid	PSC	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	177,61	16133-25-8	≥98.0%
Natriumcarbonat	-	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	105,99	497-19-8	≥99,5 %
Ameisensäure	-	Carlo Erba Reagents, Val-de-Reuil, Frankreich	46,03	64-18-6	99%

Die Kalibrierung wurde für reines BPA und für derivatisiertes BPA sowie für die Isotopenmarkierten Varianten durchgeführt. Die Herstellung der Kalibrierlösungen wurde analog zu dem Vorgehen der Hauptuntersuchung durchgeführt (siehe 2.4.1). Die Kalibrierkurve für BPA bestand aus 10 Konzentrationen von 39 bis 20000 ng/ml, während die Kalibrierkurve für derivatisiertes BPA 16 Konzentrationen von 0,005 bis 156 ng/ml umfasste. Die Analyse der Kalibrierstandards erfolgte unter Versuchsbedingungen zusammen mit den Messlösungen (siehe 2.5.4).

2.5.2 BPA-Derivatisierung und Herstellung der Kalibrier- und Messlösungen

Die BPA-Derivatisierung wurde, wie von Regueiro *et al.* (2015) beschrieben, mit Pyridin-3-Sulfonylchlorid durchgeführt. Abbildung 6 bildet die Reaktionsgleichung ab. Jeweils 1,5 ml einer Lösung (Kalibrierlösungen bzw. Eluat) wurden in ein HPLC-Glasgefäß pipettiert. Die Proben wurden mit einem Speed-Vakuum-Konzentrator RVC 2-25 CD plus (Christ, Osterode am Harz, Deutschland) bei 37°C getrocknet. Die getrockneten Proben wurden mit 200 µl Natriumcarbonatpuffer (50 mmol/L, pH 9,8) in Lösung gebracht. Nach Zugabe von 200 µl einer Pyridin-3-Sulfonylchloridhydrochlorid Lösung in Acetonitril (1 mg/L) erfolgte die Durchmischung im Laborschüttler für 10 Sekunden. Die Proben wurden für 15 Minuten in einem Blockthermostat bei 70 °C platziert. Durch das Hinzufügen von 100 µl

Ameisensäure (1 mol/L) und der Kühlung auf Eis wurde die Reaktion gestoppt. Vor der Analyse wurde das Reaktionsgemisch mit einem 20 µm Zellstoff-Spritzen-Filter filtriert.

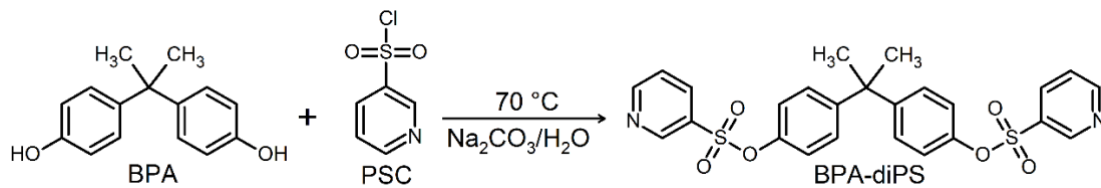


Abbildung 6: Reaktionsschema der Derivatisierung von BPA mit Pyridin-3-sulfonylchlorid (PSC)

2.5.3 Bestimmung der Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen

Das LOD und LOQ wurden für BPA und derivatisiertes BPA auf Basis der Standardabweichung der Leerproben berechnet. Die Berechnungsgrundlage ist in Abbildung 7 dargestellt.

$$LOD = 3,9 * \frac{\text{Standardabweichung der Leerprobensignalstärke}}{\text{Steigung der Kalibrierkurve}}$$

$$LOQ = 3,3 * LOD$$

Abbildung 7: Berechnung der Nachweis- und Quantifizierungsgrenze nach Wenzl et al. (2016)

2.5.4 Analyse

Nicht derivatisiertes BPA bzw. d16BPA wurde im negativen ESI-Modus nachgewiesen. Die Analyse der derivatisierten Varianten erfolgte im positiven ESI-Modus.

2.5.4.1 Chromatographische Einstellungen

Die chromatographische Trennung erfolgte mit einem Agilent 1290 Infinity II HPLC System (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Die Einstellungen der HPLC können Tabelle 13 entnommen werden.

Tabelle 13: HPLC-Parameter der Nachuntersuchung

Parameter	Einstellungen	
Trennsäule	Zorbax Eclipse Plus C18 column, 50 x 2.1 mm, 1.8 µm particle size	
Flussrate	200 µl/min	
Injektionsvolumen	10 µl	
Säulentemperatur	40 °C	
Gradientenelution	A H ₂ O + 0,1 % HCOOH	
	B Methanol + 0,1 % HCOOH	
	0:00 – 6:00 min	70 % A / 30 % B
	6:00 – 10:00 min	2 % A / 98 % B
	10:30 – 14:00	70 % A / 30 % B

2.5.4.2 Massenspektrometrische Detektion

Als massenspektrometrischer Detektor wurde ein Agilent 6460 triple quadrupole (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) eingesetzt. Tabelle 14 führt die gewählten Einstellungen auf. Die Quantifizierung erfolgte im MRM-Modus (*Multiple reaction monitoring*). Die Erfassungsparameter samt der Massenübergänge sind in Tabelle 15 beschrieben.

Tabelle 14: Einstellungen der Tandemmassenspektrometrie

Parameter	Einstellungen
Ionenquelle	Elektrospray-Ionisation (ESI)
Nebulizer-Gas-Druck	60 psi
Kapillarspannung	4 V
Inertes Gas	Stickstoff, Temperatur: 350 °C, Flussrate 13 L/min
Beschleunigerspannung	4 V
Massenanalysator	Quadrupol

Tabelle 15: Erfassungsparameter und Massenübergänge von BPA und seinen Derivaten

Substanz	ESI-Modus	Vorläuferion [m/z]	Produktion [m/z]	Kollisionsenergie [V]	Fragmentorspannung [V]
BPA	Negativ	227	212	28	110
			133	28	
d16BPA	Negativ	241	223	15	115
			141	30	
BPA-diPS	Positiv	511	354	35	163
			290	35	
			276	30	
d16BPA-diPS	Positiv	525	365	35	170
			301	40	
			286	30	

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung, einschließlich der grafischen Aufbereitung, erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel für den Mac in der Version 16.39 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und R in der Version 3.6.1 (R Development Core Team, The R Foundation for Statistical Computing, GNU, General Public License 2019, Wien, Österreich). Mit Hilfe

statistischer Tests sollten signifikante Unterschiede zwischen den Kunststoffen zum Zeitpunkt des Elutionsmaximums ermittelt werden. Die untersuchten Gruppen sind unverbunden. Zur Anwendung des korrekten Testverfahrens wurde einer etablierten Auswertungsmethodik gefolgt. Die Verfahrensweise ist in Abbildung 8 dargestellt. Zunächst erfolgte ein Shapiro-Wilk-Test zur Überprüfung der Normalverteilung und ein Levene-Test zur Prüfung auf Varianzhomogenität. Bei bestehender Normalverteilung sowie Varianzhomogenität wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (einfaktorielle ANOVA, von *analysis of variance*) durchgeführt. Bei signifikanten Unterschieden wurden gruppenspezifische Unterschiede mittels Post-Hoc-Analyse im Testverfahren nach Tukey ermittelt. Bei Abweichungen von der Normalverteilung oder der Varianzhomogenität wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Im Falle von signifikanten Unterschieden erfolgte ein paarweiser Gruppenvergleich mit Hilfe des Post-Hoc-Tests nach Dunn-Bonferroni. Das allgemeine Signifikanzniveau wurde auf 5 % ($\alpha = 0,05$) festgelegt.

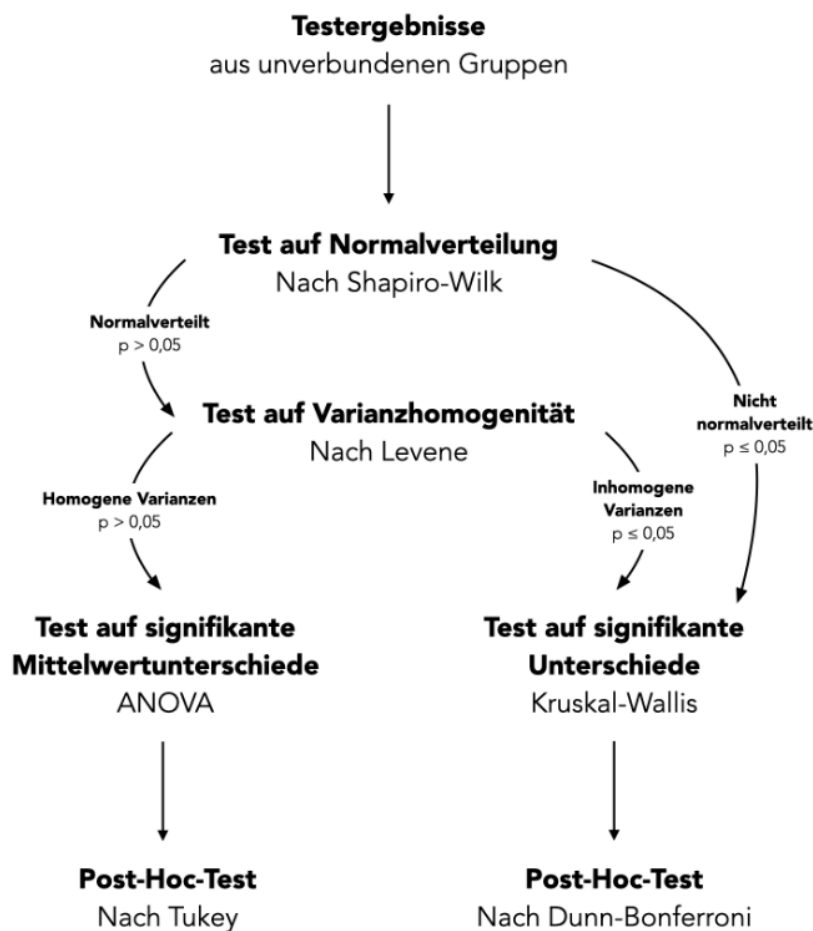


Abbildung 8: Flussdiagramm zum statistischen Auswertungsalgorithmus

3 Ergebnisse

3.1 Methodische Ergebnisse

3.1.1 Qualitativer Nachweis und Nachweisgrenzen

3.1.1.1 Referenzpeaks

Der qualitative Nachweis erfolgte anhand der Retentionszeit und der exakten Quasimolekülionennmassen von Referenzpeaks. Diese wurden für BisGMA, TEGDMA und UDMA erfolgreich zusammen mit dem internen Standard DEP erhoben. Die Referenzpeaks sind in den Abbildungen 9 – 11 aufgeführt. Abbildung 9 stellt die Überlagerung des TEGDMA und des DEP-*Peaks* im Chromatogramm, jedoch mit klarer Auftrennung in der relativen Häufigkeit (*relative abundance*) der m/z -Verhältnisse, dar. Abbildung 10 zeigt bereits eine Auftrennung von UDMA und DEP nach Retentionszeit, wodurch eine sichere Peakidentifikation möglich ist. Im Chromatogramm der Eichmessung von BisGMA ist ein eindeutiger *Peak* in der relativen Häufigkeit sichtbar (Abbildung 11). Abbildung 12 präsentiert exemplarisch das Massen- und UV-Spektrum des externen BPA-Standards mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die Abbildung verdeutlicht, dass die empfindliche Detektion nur im UV-Spektrum und nicht im Massenspektrum möglich war. Deswegen erfolgte der BPA-Nachweis mittels UV/Vis-Detektion. Eluate, in denen BPA mit dieser Methode nachweisbar war, wurden mit Hilfe einer hochauflösenden Tandem-Massenspektrometrie und der Derivatisierung des probeninternen BPA im Sinne einer Validierung nachuntersucht. Abbildung 13 zeigt die eindeutige Peakidentifikation des derivatisierten BPA einschließlich der Massenübergänge.

E:\Data\...190703\TEGDMA_100_DEP_p2
 TEGDMA 10.0ug/mL DEP 10ug/mL 1/1
 RT: 6.00 - 10.00 SM: 7B

7/3/2019 3:19:51 PM

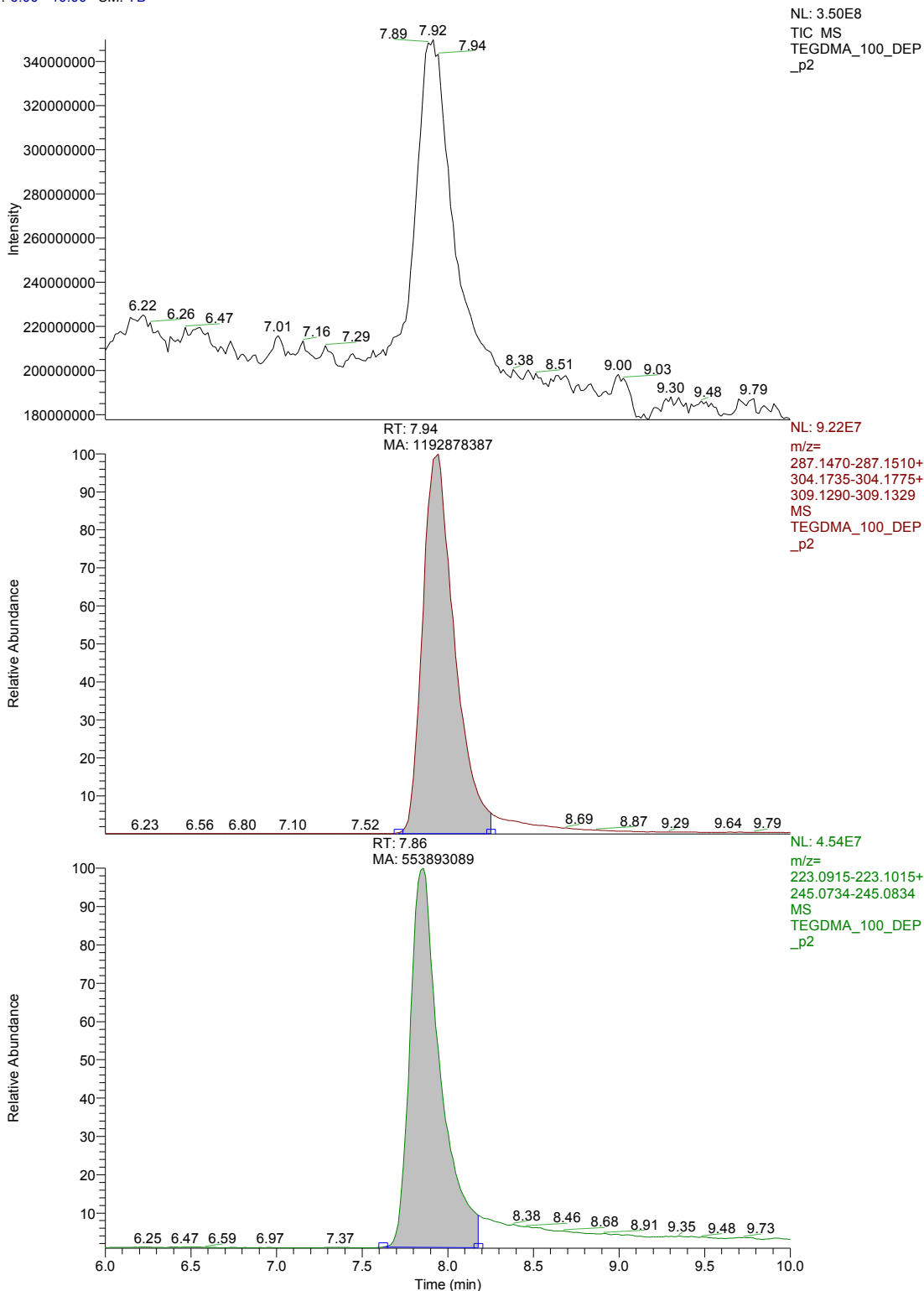


Abbildung 9: HPLC-MS-Messung einer TEGDMA/DEP-Kalibrierlösung (10 µg/ml). Im Chromatogramm (oben) sind die Peaks von TEGDMA und dem internen Standard überlagert. In *Extracted-Ion-Chromatogrammen* der spezifischen Massen ist eine eindeutige Peakidentifikation von TEGDMA (mittig) und dem internen Standards DEP (unten) möglich.

E:\Data\...\190703\UDMA_100_DEP_p1
UDMA 10.0ug/mL DEP 10ug/mL 1/1
RT: 6.03 - 13.46 SM: 7B

7/3/2019 8:47:15 PM

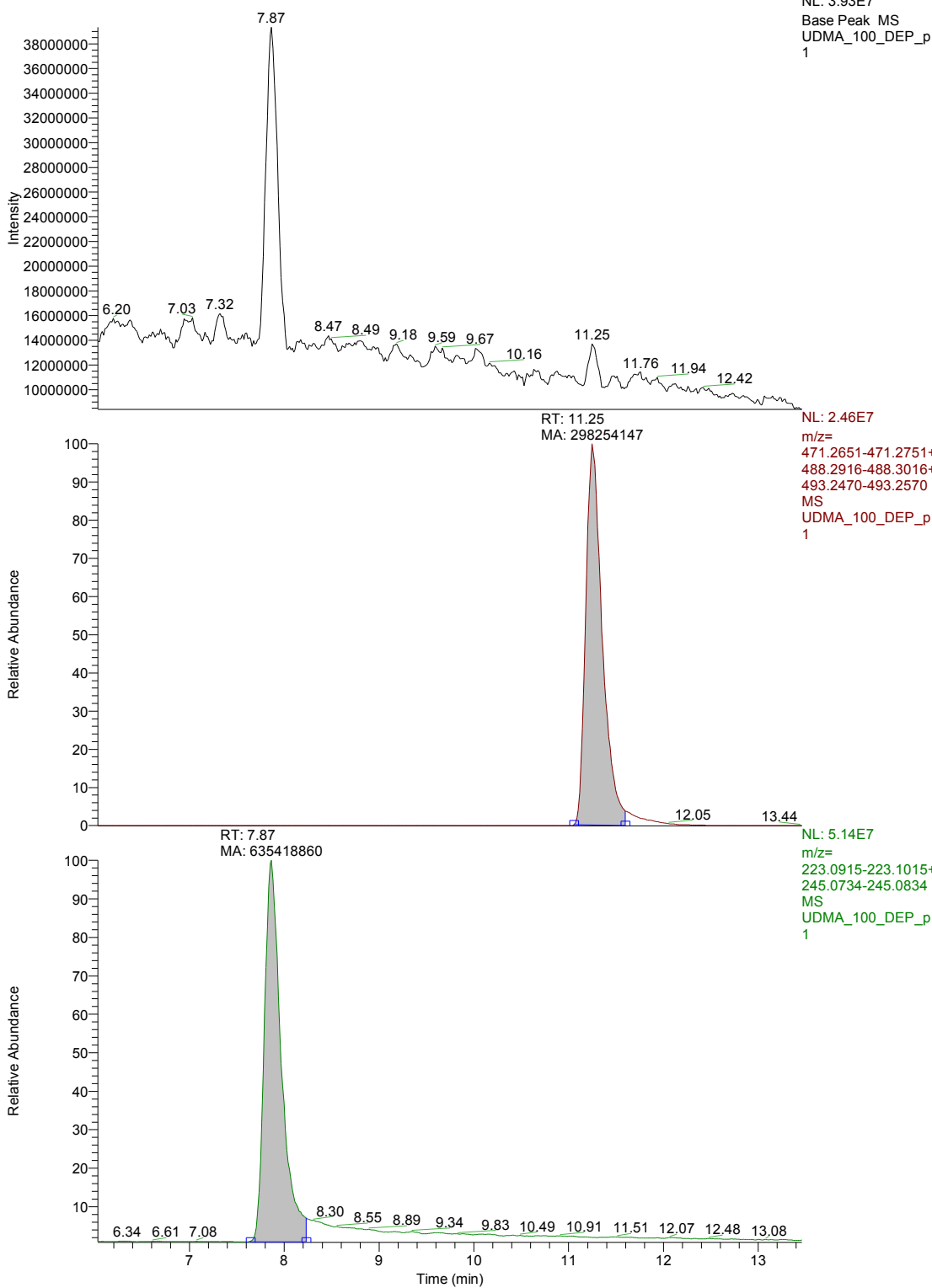


Abbildung 10: HPLC-MS-Messung einer UDMA/DEP-Kalibrierlösung (10 µg/ml). Sowohl im Chromatogramm (oben) sowie in den *Extracted-Ion-Chromatogrammen* der spezifischen Massen (mittig: UDMA; unten: DEP) ist eine eindeutige Peakidentifikation möglich.

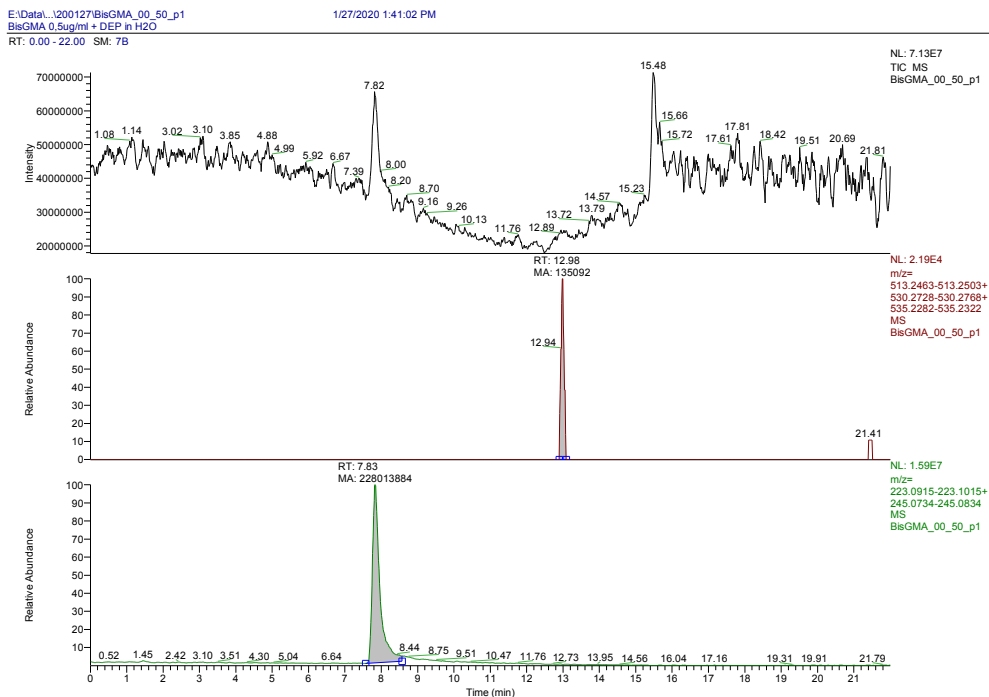


Abbildung 11: HPLC-MS-Messung einer BisGMA/DEP-Standardlösung (0,5 µg/ml). Das Chromatogramm ist oben, das *Extrated-Ion-Chromatogramm* von BisGMA mittig und das des internen Standards DEP unten aufgeführt, eine eindeutige Peakauftrennung ist dargestellt.

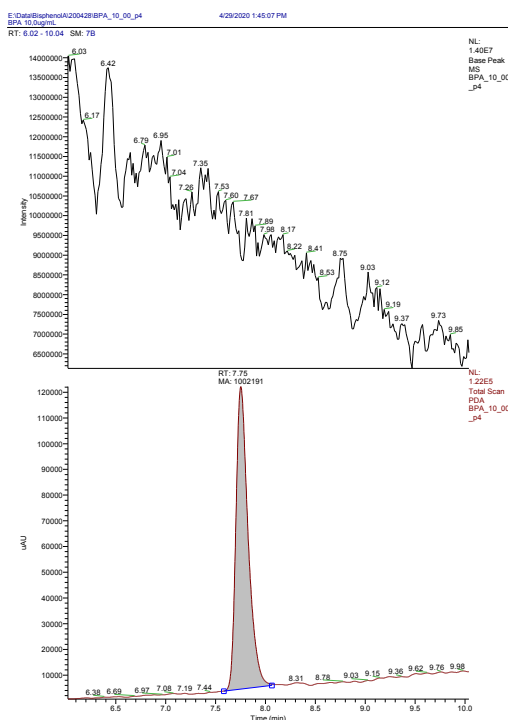


Abbildung 12: HPLC-UV-MS-Messung der BPA-Standardlösung (10 µg/ml). Das HPLC-MS-Chromatogramm ist oben und das HPLC-UV-Chromatogramm unten aufgeführt. Im *Base-Peak*-Chromatogramm war keine Detektion möglich. Daher erfolgte die Identifikation mittels UV-Chromatogramm.

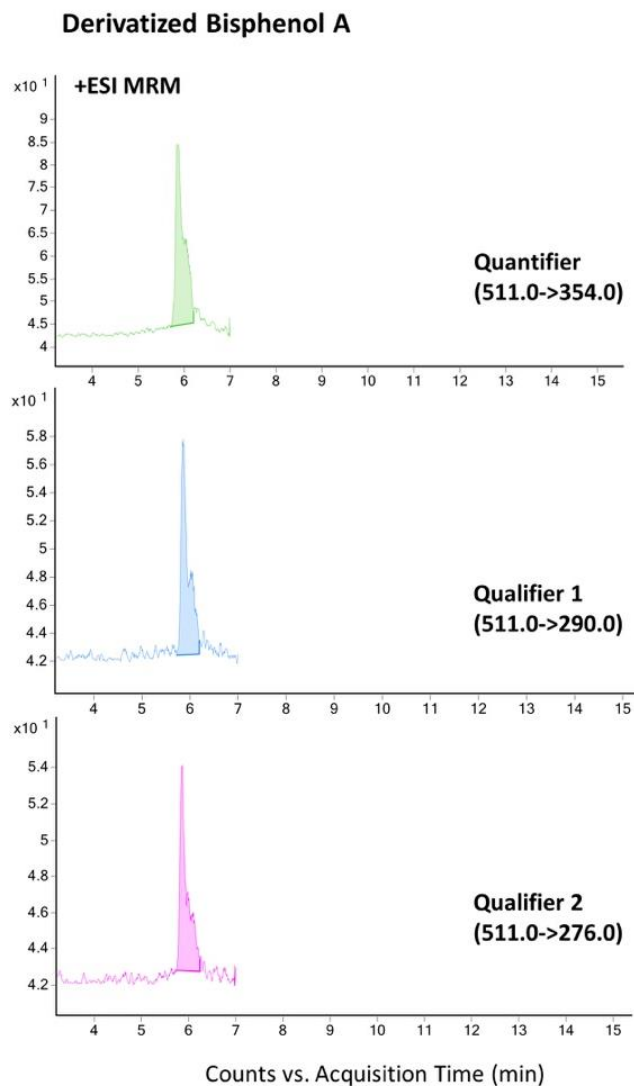


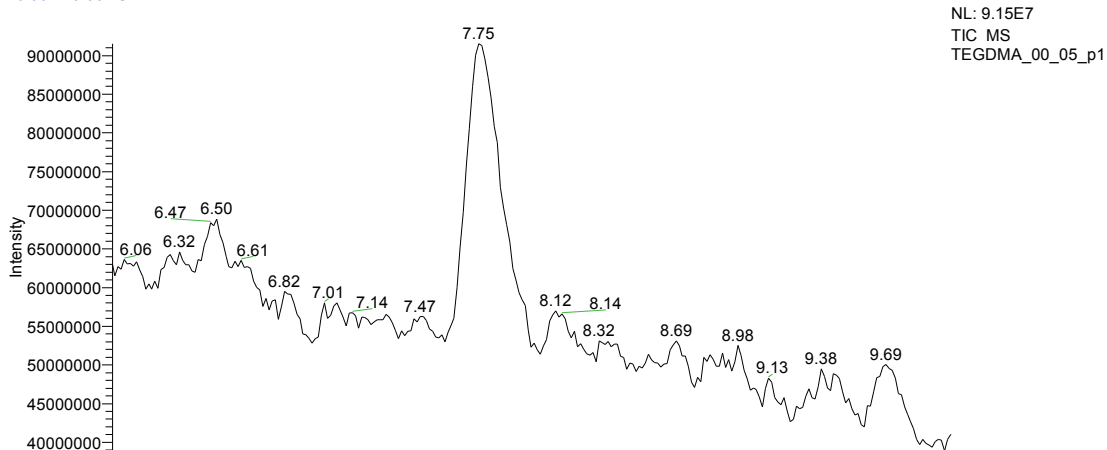
Abbildung 13: HPLC-MS/MS-Chromatogramm einer BPA-Standardlösung (0,0003 µg/ml). Die untersuchten Massenübergänge sind von oben nach unten abgebildet.

3.1.1.2 Ermittlung der Nachweisgrenzen

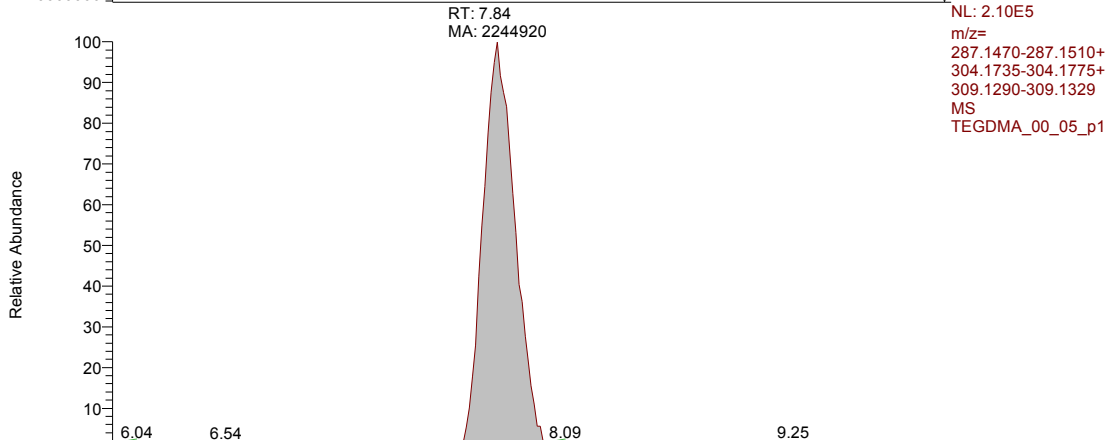
Die Nachweisgrenze für TEGDMA und UDMA lag bei einer Konzentration von 0,05 µg/ml. Abbildung 14 und 15 zeigen die zugehörigen Referenzpeaks. Die niedrigste nachweisbare BisGMA-Konzentration lag bei 0,5 µg/ml. In geringeren Konzentrationen war kein Nachweis möglich. Abbildung 11 präsentiert den zugehörigen BisGMA-Referenzpeak. Die niedrigste gemessene BPA-Konzentration und somit die Nachweisgrenze lag bei 0,5 µg/ml. Zum Ausschluss falsch-positiver BPA-Messungen erfolgte eine HPLC-MS/MS-Analyse mit vorheriger Derivatisierung des probeninternen BPA. Das LOD für derivatisiertes BPA lag bei 0,009 ng/ml.

E:\Data\...191204\TEGDMA_00_05_p1
TEGDMA 0,05ug/mL + DEP in H2O
RT: 6.00 - 10.00 SM: 7B

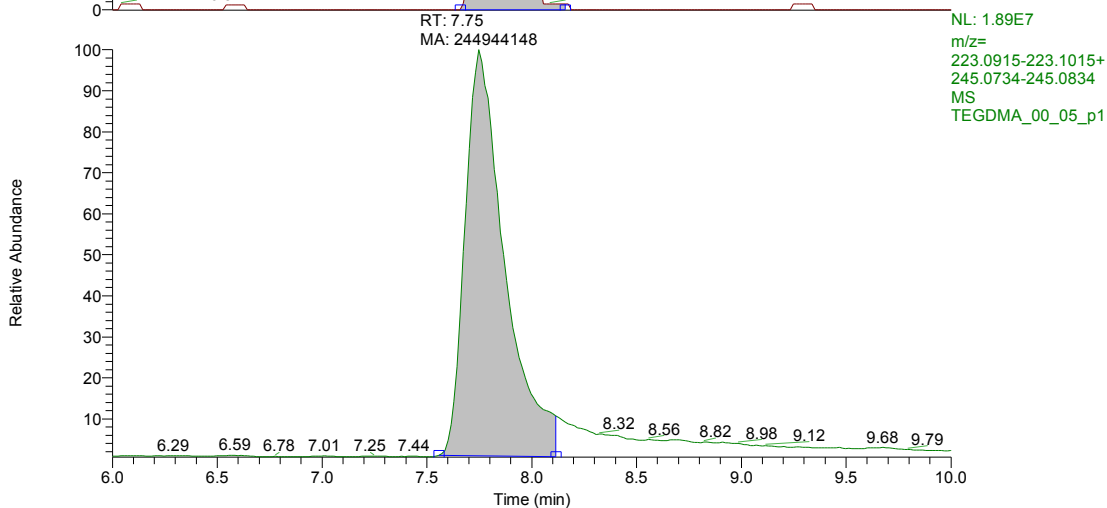
12/20/2019 3:34:01 PM



NL: 9.15E7
TIC MS
TEGDMA_00_05_p1



NL: 2.10E5
m/z=
287.1470-287.1510+
304.1735-304.1775+
309.1290-309.1329
MS
TEGDMA_00_05_p1



NL: 1.89E7
m/z=
223.0915-223.1015+
245.0734-245.0834
MS
TEGDMA_00_05_p1

Abbildung 14: Experimentelle Bestimmung des LOD für TEGDMA (0,05 µg/ml). Das Chromatogramm (oben) zeigt keinen eindeutig aufgelösten TEGDMA-Peak. In den *Extracted-Ion*-Chromatogrammen (mittig: TEGDMA; unten: DEP) war eine eindeutige Identifikation möglich.

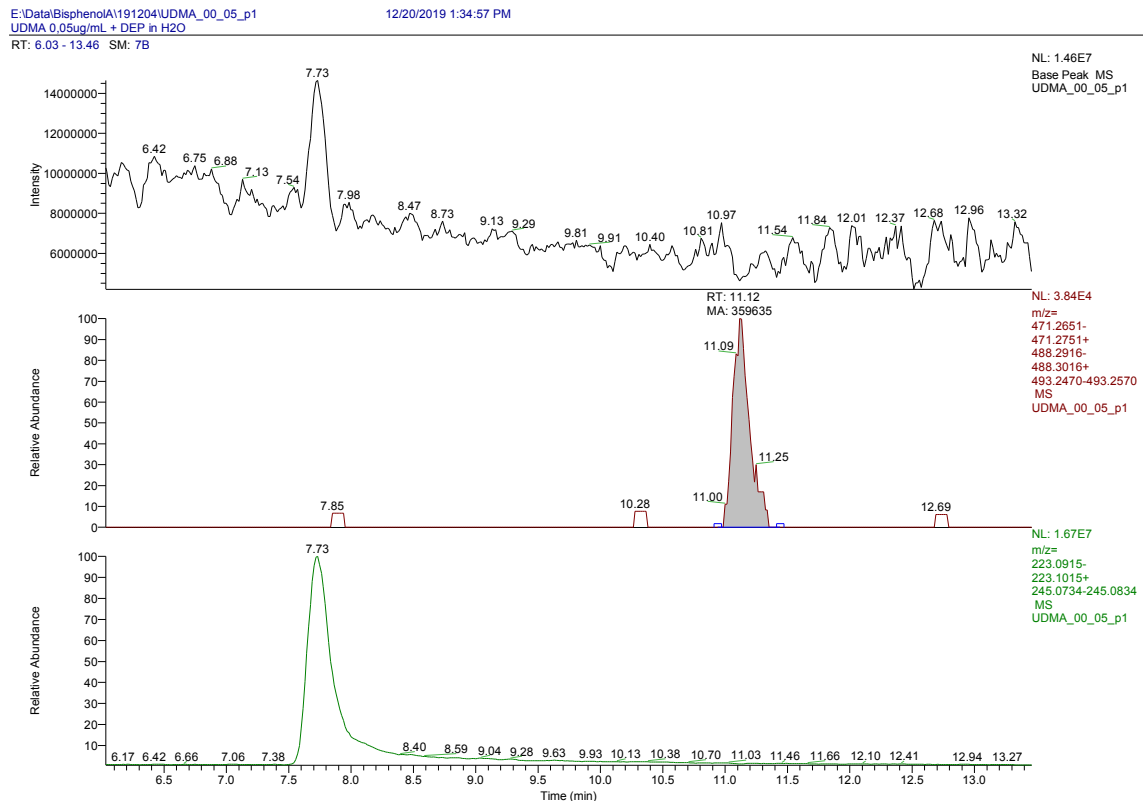


Abbildung 15: Experimentelle Bestimmung des LOD für UDMA (0,05 µg/ml). Das Chromatogramm (oben) zeigt keinen eindeutigen UDMA-Peak. In den *Extracted-Ion-Chromatogrammen* der entsprechenden Massen (mittig: UDMA; unten: DEP) ist eine eindeutige Identifikation möglich.

3.1.2 Quantitative Analyse und Quantifizierungsgrenzen

Zum Nachweis von TEGDMA und UDMA wurde eine Fünfpunkt-Kalibrierung mit DEP als internem Standard und zum Nachweis von BPA eine externe Vierpunkt-Kalibrierung durchgeführt. Auf Grund der hohen Anzahl an Proben, die auf TEGDMA und UDMA untersucht wurden, erfolgte die Analyse zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten (03.07.2019 und 04.12.2019). Zur Gewährleistung reliabler Messungen wurde vor beiden Analysen eine Kalibrierung durchgeführt. Die Kalibriergeraden samt Kalibrierfunktion, Residuenplot und Determinationskoeffizienten (r^2) sind in den Abbildungen 16 – 20 aufgeführt. Keiner der Residuenplots zeigt Anzeichen non-linearer Effekte und die zugehörigen Determinationskoeffizienten (r^2) lagen oberhalb von 0,95. Damit wurden alle Kriterien für eine lineare Kalibrierung erfüllt. Als Quantifizierungsgrenze wurde jeweils die niedrigste Konzentration der Kalibrierstandards angenommen. Daher lag das LOQ aller quantifizierbaren Substanzen bei 0,5 µg/ml. Das LOQ für BPA in der Kontrolluntersuchung lag für derivatisiertes BPA bei 0,03 ng/ml. Die zugehörige Kalibrierkurve ist in Abbildung 21 dargestellt.

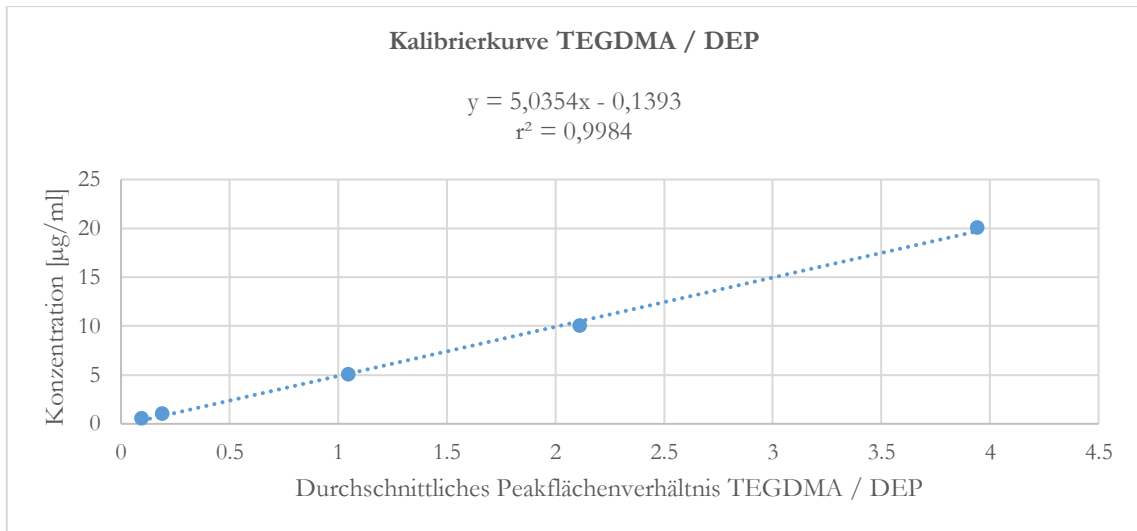


Abbildung 16: TEGDMA/DEP-Kalibrierkurve vom 03.07.2019

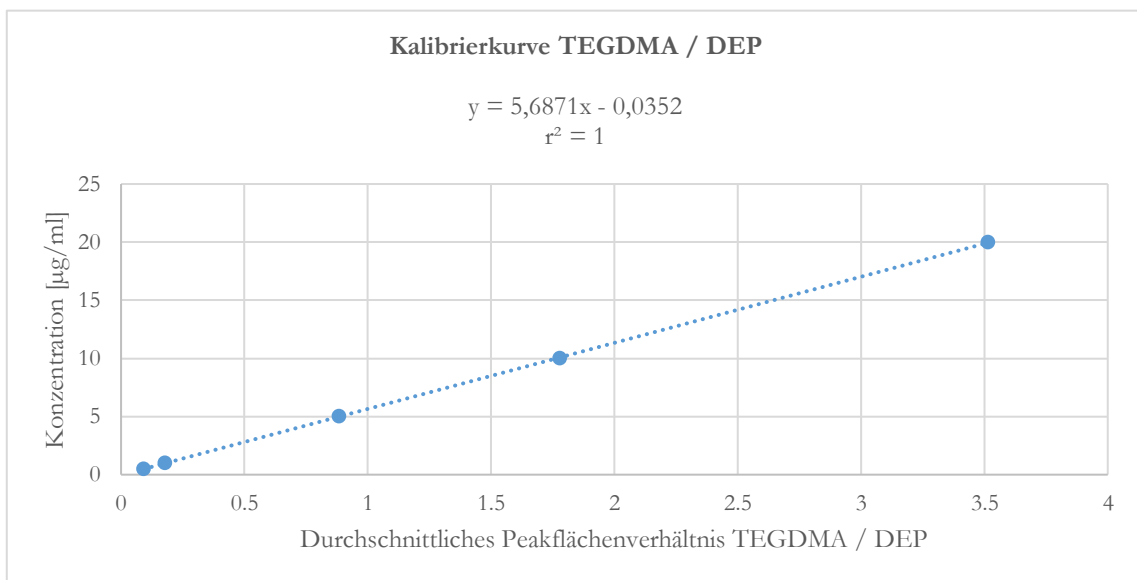


Abbildung 17: TEGDMA/DEP-Kalibrierkurve vom 04.12.2019

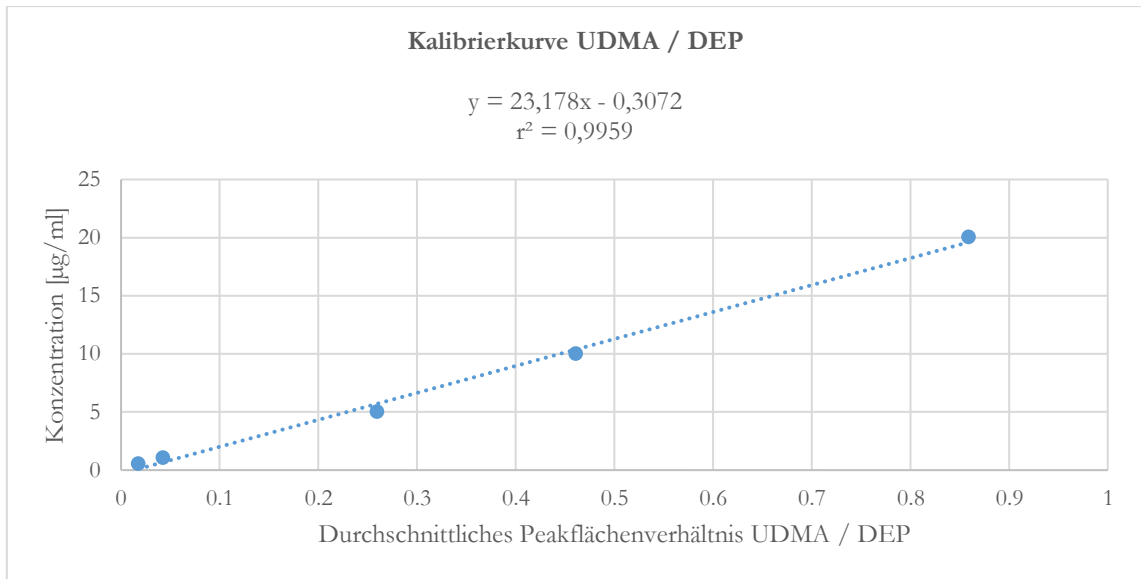


Abbildung 18: UDMA/DEP-Kalibrierkurve vom 03.07.2019

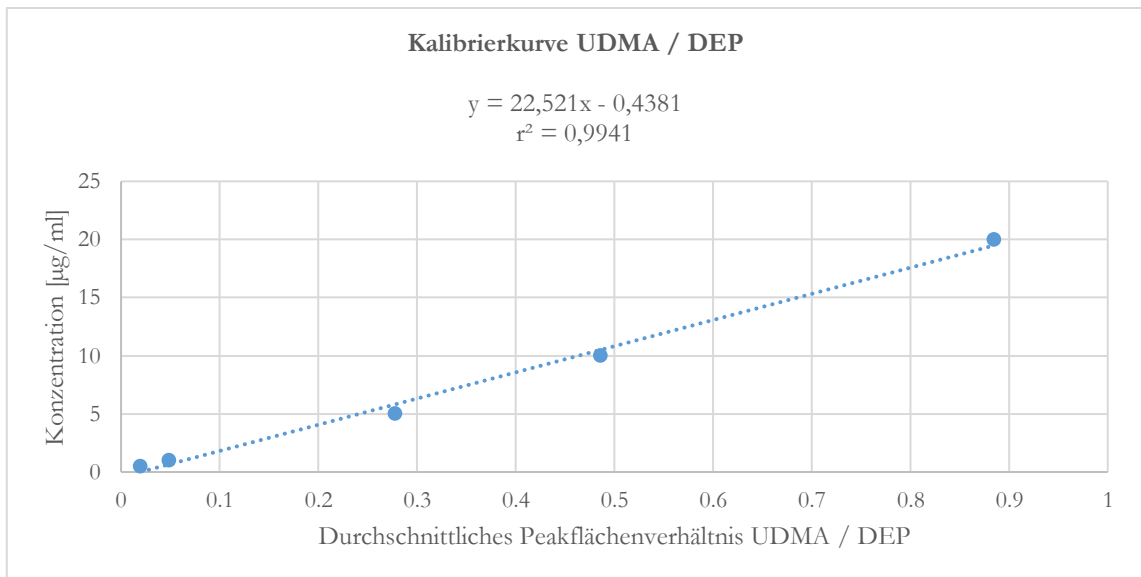


Abbildung 19: UDMA/DEP-Kalibrierkurve vom 04.12.2019

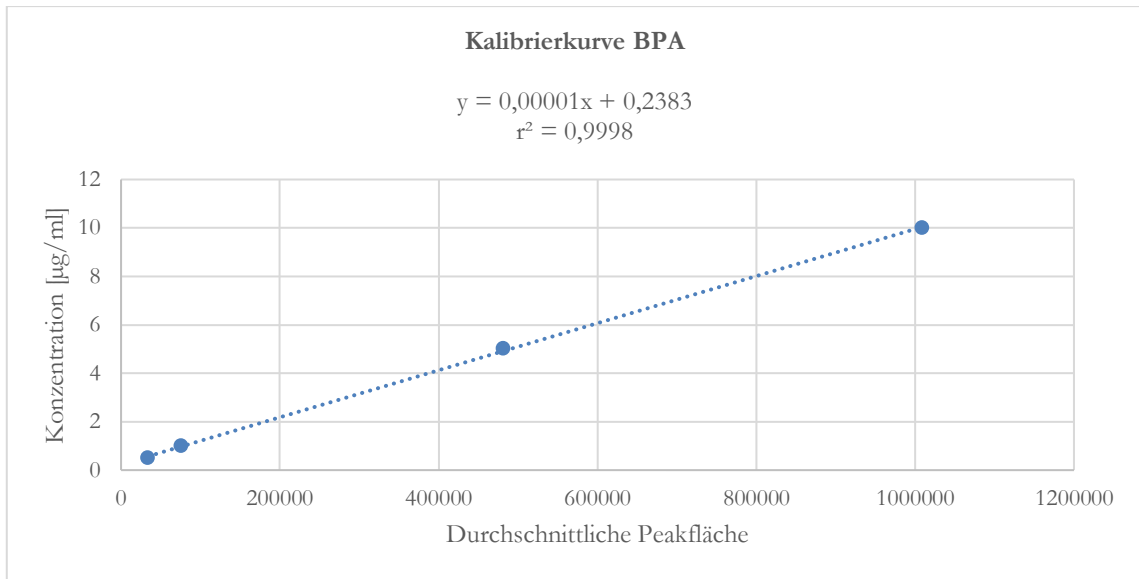


Abbildung 20: BPA-Kalibrierkurve vom 28.04.2020

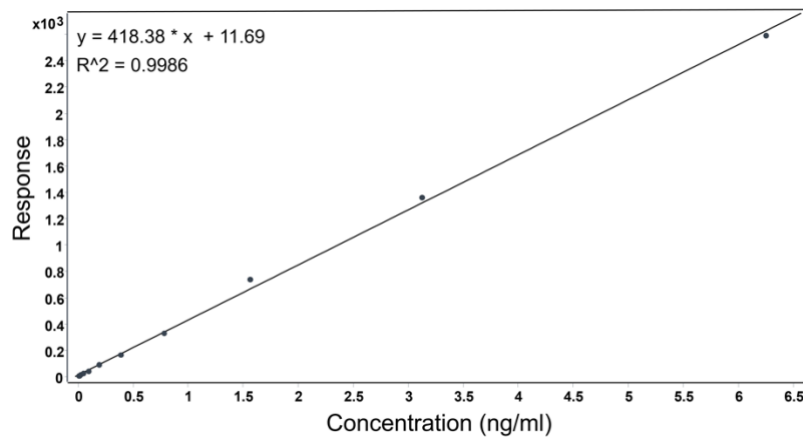


Abbildung 21: Kalibrierkurve von derivatisiertem BPA nach HPLC-MS/MS-Messung

3.2 Auswertung der Proben

3.2.1 Identifikation probeninterner Monomer-*Peaks*

Die massenspektrometrische Detektion von BisGMA, TEGDMA und UDMA war zusammen mit dem internen Standard möglich. Der BPA-Nachweis war nur mittels UV-Detektion ohne DEP als internen Standard möglich. Abbildung 22 und 23 zeigen exemplarisch die Identifikation probeninterner *Peaks*. In den Eluaten aller Materialien konnte mindestens zu einem Inkubationszeitpunkt ein positiver UDMA- und/oder TEGDMA-Nachweis erbracht werden. Zum Zeitpunkt des Elutionsmaximums (24h) lag bei allen

Materialien die Menge an freigesetztem BisGMA unterhalb des LOD und war somit nicht nachweisbar. In den Eluaten der BPA-freien Materialien Visalys Temp und ExperTemp wurde nach 24-stündiger Inkubation mittels UV/Vis-Detektion BPA nachgewiesen. Die Ergebnisse dieser Proben wurden durch erneute Analyse mittels HPLC-MS/MS dem Validierungsprozess zugeführt und konnten nicht bestätigt werden (siehe 3.2.2). In den Eluaten der beiden konventionellen Materialien war kein Nachweis möglich. Die Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Auswertung sind in Tabelle 16 aufgeführt.

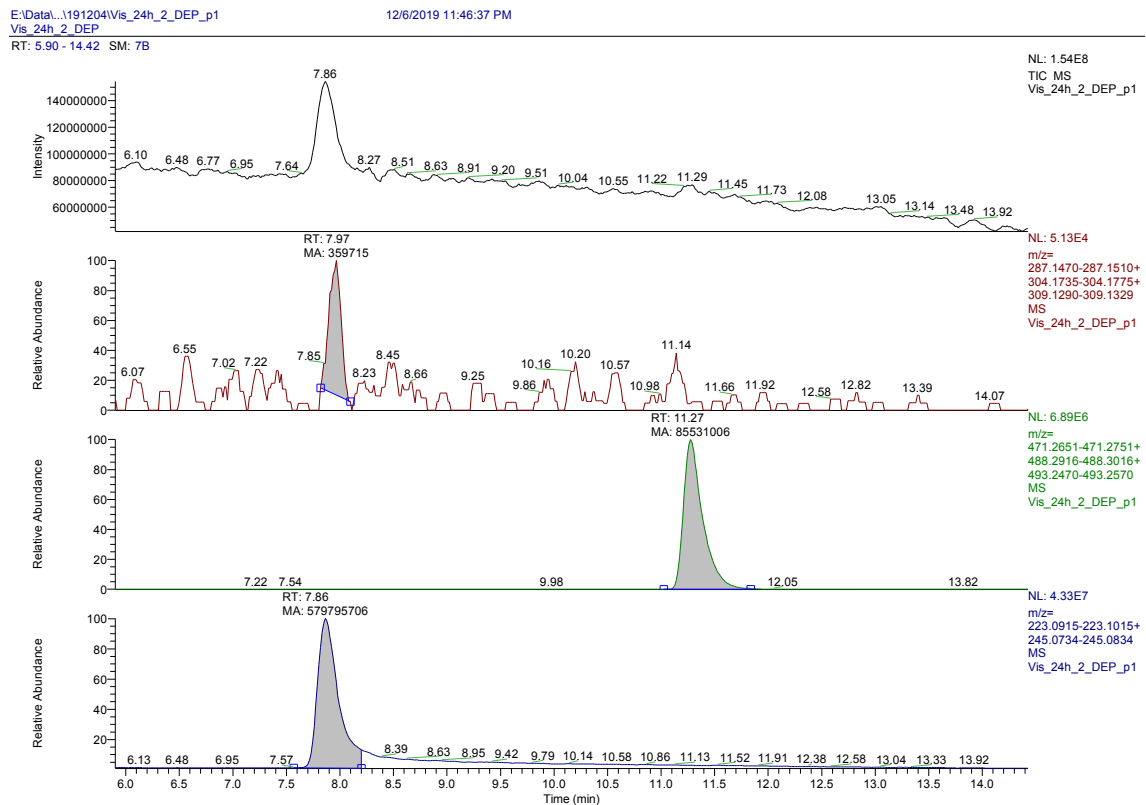


Abbildung 22: Massenspektrum einer Visalys-Temp-Probe nach 24-stündiger Inkubation. Oben das Chromatogramm und anschließend von oben nach unten jeweils die *Extracted-Ion-Chromatogramme* von TEGDMA, UDMA und dem internen Standard DEP.

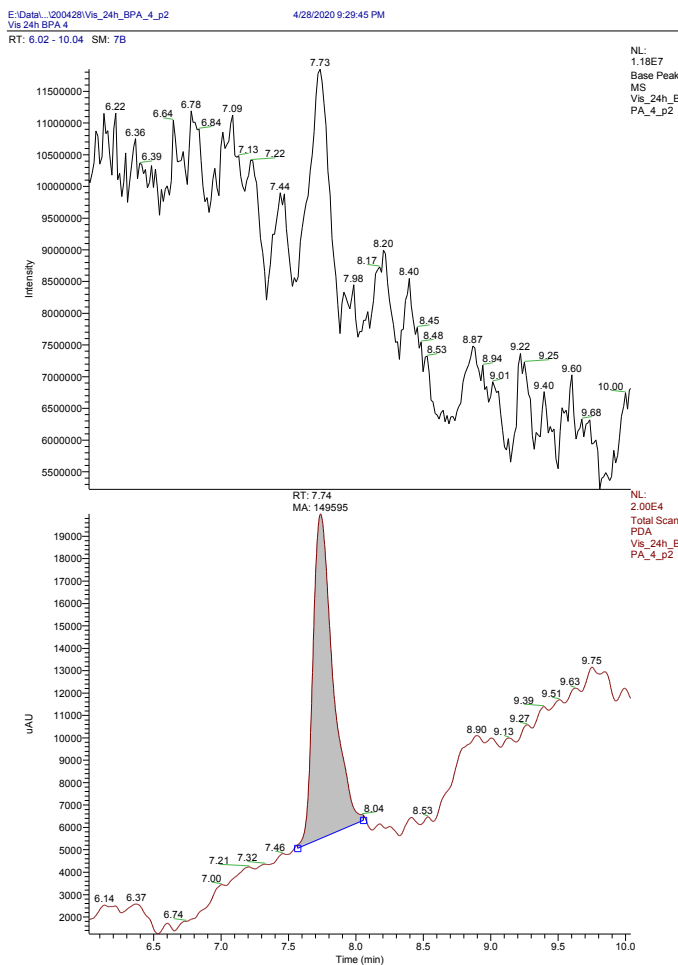


Abbildung 23: HPLC-UV-MS-Messung einer Visalys-Temp-Probe nach 24-stündiger Inkubation (oben HPLC-MS-Chromatogramm [*Base Peak*], unten HPLC-UV-Chromatogramm).

3.2.2 Kontrolluntersuchungen zur BPA-Validierung

In der Kontrolluntersuchung mittels HPLC-MS/MS und der Derivatisierung von probeninternem BPA unter Einsatz von d16BPA als internem Standard waren die gemessenen BPA-Konzentrationen in den Proben von ExperTemp und Visalys Temp nicht reproduzierbar und lagen unterhalb des LOQ, jedoch oberhalb des LOD. Das Signal war material- und probenübergreifend von gleicher Intensität.

3.2.3 Quantifizierung der freigesetzten Substanzen

Eine Übersicht der freigesetzten Monomere aus den untersuchten Materialien ist in Tabelle 16 aufgeführt. Substanzen, die in Konzentrationen unterhalb des LOD vorlagen, waren nicht nachweisbar und wurden dementsprechend gekennzeichnet. Die Konzentrationen nachweisbarer, jedoch nicht quantifizierbarer Substanzen, wurden entsprechend als geringer als das LOQ gekennzeichnet. Mittels UV/Vis wurden in den Eluaten von ExperTemp

3,1 ± 0,18 µg/ml und in den Eluaten von Visalys Temp 1,6 ± 0,22 µg/ml BPA nachgewiesen. Diese Ergebnisse waren mit Hilfe einer Tandem-Massenspektrometrie weder reproduzierbar noch quantifizierbar. Daher wurden die hohen BPA-Konzentrationen der HPLC-UV-Analyse als falsch-positiv bewertet.

Tabelle 16: Freigesetzte mittelwertige Monomerkonzentrationen mit den zugehörigen Standardabweichungen; LOD UDMA und TEGDMA: 0,05 µg/ml; LOD BisGMA, LOD^{UV/Vis} BPA: 0,5 µg/ml; LOQ^{UV/Vis-MS}: 0,5 µg/ml; LOQ^{MS/MS}: 0,00003 µg/ml

Material	Inkubationszeit	BisGMA [µg/ml]	BPA [µg/ml]	TEGDMA [µg/ml]	UDMA [µg/ml]
ExperTemp	1 Stunde	-	-	<LOD	6,23 ± 0,75
	12 Stunden	-	-	<LOD	6,74 ± 1,43
	24 Stunden	<LOD	<LOQ ^{MS/MS}	<LOQ ^{UV/VIS-MS}	8,31 ± 1,64
	7 Tage	-	-	<LOD	5,46 ± 0,71
Luxatemp Automix Plus	1 Stunde	-	-	<LOQ ^{UV/VIS-MS}	<LOD
	12 Stunden	-	-	1,34 ± 0,38	1,24 ± 0,36
	24 Stunden	<LOD	<LOD ^{UV/VIS}	1,03 ± 0,06	0,95 ± 0,08
	7 Tage	-	-	0,94 ± 0,15	1,08 ± 0,26
Protemp 4	1 Stunde	-	-	<LOD	<LOD
	12 Stunden	-	-	<LOD	<LOD
	24 Stunden	<LOD	<LOD ^{UV/VIS}	<LOQ ^{UV/VIS-MS}	<LOD
	7 Tage	-	-	<LOD	<LOD
Visalys Temp	1 Stunde	-	-	<LOD	1,18 ± 0,38
	12 Stunden	-	-	<LOD	3,35 ± 1,15
	24 Stunden	<LOD	<LOQ ^{MS/MS}	<LOD	3,45 ± 1,08
	7 Tage	-	-	<LOD	4,11 ± 0,47

3.3 Ergebnisse der statistischen Auswertung

Mit Hilfe der statistischen Auswertung wurde überprüft, ob signifikante Unterschiede hinsichtlich der Monomerefreisetzung zwischen den untersuchten Materialien bestehen. Hierzu wurden die Eluate aller Proben zum Zeitpunkt des Elutionsmaximums (24-stündige Inkubation) verglichen. Da TEGDMA nur in den Eluaten von Luxatemp Automix Plus quantifizierbar war und BisGMA sowie BPA nicht nachweisbar bzw. quantifizierbar waren, erfolgte der statistische Gruppenvergleich lediglich hinsichtlich der UDMA-Freisetzung. Hierzu wurden aufeinander aufbauende Prüfmethode durchgeführt (siehe Abbildung 8).

3.3.1 Shapiro-Wilk-Test

Es wurde die Nullhypothese (H_0), dass in allen Gruppen eine Normalverteilung vorliegt, angenommen, da in keiner der untersuchten Gruppen signifikante Ergebnisse vorlagen. In Tabelle 17 sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte des Shapiro-Wilk-Tests aufgeführt.

Tabelle 17: Ergebnisse des Shapiro-Wilk-Tests sowie zugehörige Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD); n = 5

Substanz	Gruppe	MW [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	SD	p-Wert
UDMA	ExperTemp, 24h Inkubation	8,31	1,63	0,313
	Luxatemp Automix Plus, 24h Inkubation	0,95	0,08	0,06321
	Visalys Temp, 24h Inkubation	3,45	1,08	0,163

3.3.2 Levene-Test

Zur Überprüfung der Varianzhomogenität erfolgte ein Levene-Test. Da der F-Wert des Levene-Tests größer als eins war, lagen Unterschiede der Stichprobenvarianzen vor. Dieser Unterschied war nicht signifikant. Daher wurde die Nullhypothese (H_0), dass homogene Varianzen vorliegen, angenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Ergebnisse des Levene-Tests

Gruppe	Zähler-Freiheitsgrade	Nenner-Freiheitsgrade	F-Wert	p-Wert
UDMA	2	12	1,7295	0,22

3.3.3 Einfaktorielle ANOVA

Auf Grundlage der Ergebnisse der vorherigen statistischen Tests wurde eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt. Die Daten wurden mit Hilfe eines Box-Plots visualisiert (Abbildung 24). Die einfaktorielle ANOVA ergab statistisch hochsignifikante Unterschiede zwischen den Materialien hinsichtlich der UDMA-Freisetzung ($p < 0,001$).

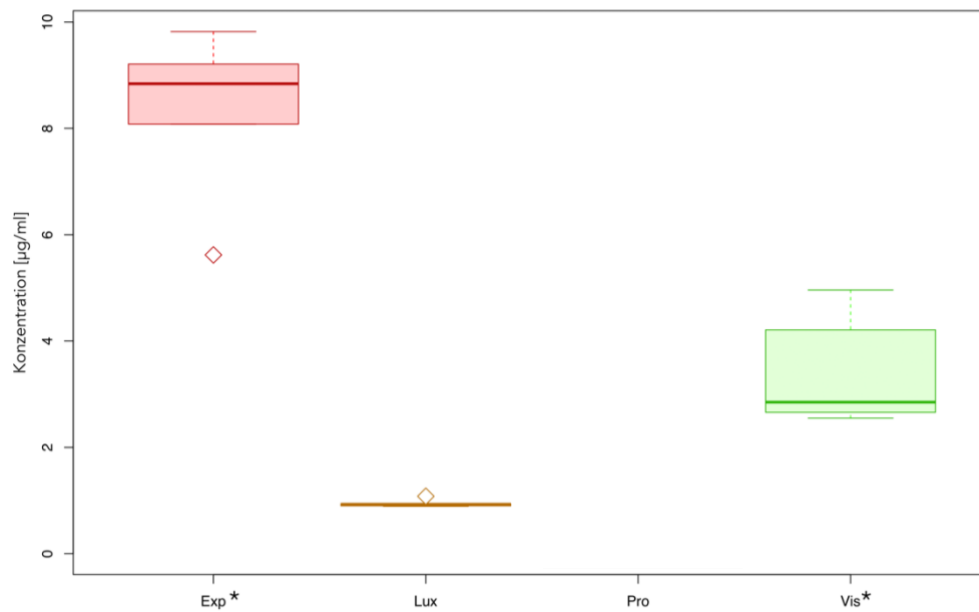


Abbildung 24: Box-Plot zur Freisetzung von UDMA aus den untersuchten Provisorienkunststoffen nach 24-stündiger Inkubation. Exp: ExperTemp, Lux: Luxatemp Automix Plus, Pro: Protemp 4; Vis: Visalys Temp; *BPA-frei, UDMA-Konzentrationen in den Eluaten von Protemp 4 lagen unterhalb des LOD und sind deswegen nicht aufgeführt.

3.3.4 Post-Hoc-Test nach Tukey

Mit Hilfe des Post-hoc-Test nach Tukey wurden signifikante Gruppenunterschiede im paarweisen Vergleich ermittelt. Da die UDMA-Konzentrationen in den Protemp-4-Eluaten unterhalb des LOD ($0,05 \mu\text{g/ml}$) lagen und somit kein Nachweis möglich war, wurde für die weitere Statistik angenommen, dass kein UDMA freigesetzt wurde. Die Ergebnisse des Tukey-Tests sind in Tabelle 19 aufgeführt. Die UDMA-Freisetzung in der ExperTemp-Gruppe war im Vergleich zu allen anderen Materialien signifikant erhöht. Visalys Temp eluierte signifikant mehr UDMA als Protemp 4 und Luxatemp Automix Plus, wobei der Unterschied zwischen diesen nicht signifikant war. Zusammenfassend war die UDMA-Freisetzung der BPA-freien Materialien gegenüber den konventionellen Provisorienkunststoffen signifikant erhöht.

Tabelle 19: Ergebnisse des Post-Hoc-Tests nach Tukey hinsichtlich der UDMA-Freisetzung; Signifikante p-Werte (<0,05) wurden markiert.

Gruppenvergleich	Differenz zwischen den Mittelwerten	p-Wert
Luxatemp Automix Plus - ExperTemp	-7,366	<0,001
Protemp - Expertemp	-8,314	<0,001
Visalys Temp - Expertemp	-4,868	<0,001
Protemp – Luxatemp Automix Plus	-0,948	0,44
Visalys Temp – Luxatemp Automix Plus	2,498	0,005
Visalys Temp – Protemp	3,446	<0,001

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Konzept

In der vorliegenden Arbeit wurde die Monomer- und BPA-Freisetzung aus konventionellen und BPA-freien Provisorienkunststoffen gemessen und die untersuchten Materialien untereinander verglichen. Das Ziel war die Erhebung studienübergreifend vergleichbarer Daten, die in Bezug zur klinischen Situation gesetzt werden können. In der Literatur wurden bereits zahlreiche Studiendesigns zur Untersuchung der BPA- und Monomerfreisetzung beschrieben, wobei *In-vitro*-Untersuchungen die Mehrzahl darstellen (Kloukos et al. 2013; Van Landuyt et al. 2011). Das Ziel von *In-vitro*-Untersuchungen ist die möglichst exakte Simulation der intraoralen Situation (Schmalz 1998b). Daher sollten die gemessenen Monomerkonzentrationen den zu erwartenden *In-vivo*-Konzentrationen entsprechen. Die wesentlichen Schwierigkeiten bei der Durchführung sind hierbei die Berücksichtigung aller relevanten biologischen Reaktionen und eine studienübergreifende Standardisierung, sodass vergleichbare Daten an unterschiedlichen Standorten erhoben werden können (Hanks et al. 1996). Andererseits können bei *In-vivo*-Studien zahlreiche Faktoren, wie die Restauraionsgröße, das Extraktionsverhältnis oder Behandlerunterschiede nicht standardisiert werden, sodass diese Studien durch große Streubreiten der Messdaten limitiert werden (Michelsen et al. 2012). Daher werden im Rahmen von Biokompatibilitätstests zunächst standardisierte *In-vitro*-Studien durchgeführt und deren Ergebnisse mit Hilfe von *In-vivo*-Folgestudien validiert (Anderson 2016). Aktuelle *In-vitro*-Studien zur Freisetzung von Kompositbestandteilen weisen jedoch ein sehr heterogenes Studiendesign auf, wodurch die metaanalytische Auswertung der freigesetzten Konzentrationen und der Bezug zur klinischen Situation erschwert wird (Van Landuyt et al. 2011). Deswegen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Versuchsaufbau etabliert werden, der standardisierte, metaanalytisch-auswertbare Ergebnisse und den Bezug zu gewöhnlichen Restauraionsgrößen ermöglicht. Im Folgenden werden die einzelnen Abschnitte des Studiendesigns diskutiert.

4.1.2 Probekörper

In den meisten Studien werden zylindrische Probekörper unterschiedlicher Größe verwendet (Malkiewicz et al. 2014; Manojlovic et al. 2011; Moharamzadeh et al. 2007; Sideridou und

Achillas 2005). Allerdings beeinflusst das Extraktionsverhältnis, das dem Verhältnis der Probekörperoberfläche zur Menge des Extraktionsmediums entspricht, die Menge freigesetzter Substanzen aus der Polymermatrix maßgeblich (Pelka et al. 1999; Polydorou et al. 2012; Van Landuyt et al. 2011). Häufig wird dieses Extraktionsverhältnis in Studien nicht klar beschrieben, sodass die Interpretation der Studienergebnisse erschwert wird (Van Landuyt et al. 2011). Zur Standardisierung des Extraktionsverhältnisses empfehlen zahlreiche Autoren und die ISO Norm 4049 (Zahnheilkunde – Polymerbasierende Restaurationswerkstoffe) die Anwendung der ISO Norm 10993-12 (Alshali et al. 2015; Becher et al. 2018; Hope et al. 2016; ISO 2019; B Müller et al. 2003; Schmalz 1998b). Die ISO Norm 10993-12 formuliert die Anforderungen an die Probekörperherstellung und Referenzmaterialien zur Biokompatibilitätstestung medizinischer Produkte. Diese gibt exakte Extraktionsverhältnisse vor und empfiehlt die Verwendung gleichmäßig geformter Probekörper (ISO 2012). Eine Übersicht der empfohlenen Extraktionsverhältnisse ist in Tabelle 20 aufgeführt. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden die Vorgaben der ISO Norm 10993-12 berücksichtigt. Dies ermöglicht den Vergleich mit anderen Studien und den Bezug zu gewöhnlichen Restaurationsgrößen.

Tabelle 20: Empfohlene Extraktionsverhältnisse laut ISO Norm 10993-12 (ISO 2012)

Probekörperdicke [mm]	Extraktionsverhältnis $\pm 10\%$
≤ 0.5	6 cm ² /ml
> 0.5	3 cm ² /ml
Unregelmäßig-geformte Probekörper	0.1 – 0.2 g/ml, 6 cm ² /ml

Wie bereits unter 1.2.3 beschrieben, führt die Entfernung der Sauerstoffinhibitionsschicht zur reduzierten Monomerfreisetzung und sollte im klinischen Alltag durchgeführt werden. Dieses Vorgehen sollte auch bei *In-vitro*-Studien berücksichtigt werden. Dennoch wird in vielen Studien die Sauerstoffinhibitionsschicht nicht oder nur ineffektiv entfernt (Becher et al. 2018; Deviot et al. 2018; Ferracane 1994; Malkiewicz et al. 2014; Malkiewicz et al. 2015). Die Hersteller der untersuchten Materialien empfehlen hierzu eine nicht weiter präzierte Reinigung in Alkohol. Zur Standardisierung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine 20-sekündige Reinigung in Alkohol mit anschließender Entfernung der Überreste mit Wasser durchgeführt. Die vorgenommene zeitliche Standardisierung ist nicht unüblich und wurde bereits in anderen Studien durchgeführt (Bijelic-Donova et al. 2015; Finger et al. 1996; Frese et al. 2014; Wolff et al. 2016). Jedoch ist mittlerweile bekannt, dass die Entfernung der Sauerstoffinhibitionsschicht mit Hilfe von Alkohol häufig unvollständig ist und stark von der Dauer und einer zusätzlichen mechanischer Reinigung abhängig ist (Bijelic-Donova et al.

2015; Rueggeberg et al. 1999). In den Gebrauchsanweisungen der untersuchten Materialien ist weder eine mechanische Reinigung gefordert noch ist die Dauer der chemischen Reinigung angegeben. Daher dürfte das behandlerspezifische Vorgehen im klinischen Alltag sehr heterogen sein.

In der vorliegenden Studie wurden die internationalen Vorgaben zur Probekörperherstellung sowie die Vorgaben der Hersteller eingehalten. Im Kontrast zu anderen Studien erlaubt dieses Vorgehen eine spätere metaanalytische Auswertung und den Vergleich zu gewöhnlichen Restaurationsgrößen.

4.1.3 Inkubationsparameter

4.1.3.1 Allgemeine Inkubationsbedingungen

Die Menge freigesetzter Kompositbestandteile hängt stark von den gewählten Inkubationsparametern wie Inkubationszeit, Puffersystem, Extraktionsmedium, Sättigungsgrad und pH-Wert der Lösung ab (Gregson et al. 2008; Michelsen et al. 2007; Pelka et al. 1999). Extreme Temperaturen und/oder pH-Verhältnisse begünstigen die Monomerfreisetzung und Degradation von Kompositen (Olea et al. 1996; Örtengren et al. 2004; Pulgar et al. 2000). Zur Erhebung klinisch-relevanter Daten sollten daher *In-vivo*-Bedingungen, wie eine Inkubationstemperatur von 37°C, berücksichtigt werden (Van Landuyt et al. 2011). Selbst in aktuellen Studien werden *In-vivo*-Bedingungen, wie die Inkubationstemperatur oder die Bewegung des Speichelflusses, nur unzureichend simuliert (Cebe et al. 2015; Gul et al. 2019; Mourouzis et al. 2020; Tuna et al. 2010). Die Ergebnisse dieser Studien sind somit nicht vollständig auf den klinischen Alltag übertragbar. Weiterhin wurden in einigen Studien die Probekörper erst nach einem sogenannten *post-irradiation cure*, einem Intervall von 24 Stunden im Dunkeln, inkubiert (Al-Hiyasat et al. 2005; Hofmann et al. 2002; Hope et al. 2016; Malkiewicz et al. 2014; Yap et al. 2004). Dieses Vorgehen führt zur Verringerung der Monomerfreisetzung (Tanaka et al. 1991), entspricht jedoch nicht dem klinischen *workflow* und wird nicht für *In-vitro*-Untersuchungen empfohlen (Ferracane und Condon 1990; Hofmann et al. 2002). Aus diesen Gründen erfolgte in der vorliegenden Studie die direkte Inkubation unter *In-vivo*-Konditionen. Da für zukünftige metaanalytische Auswertungen eine 24-stündige Inkubationsperiode als Vergleichsintervall empfohlen wird (Van Landuyt et al. 2011), wurden alle Monomere nach dieser Dauer analysiert.

4.1.3.2 Extraktionsmedium

Abgesehen von den allgemeinen Inkubationsparametern wird die Monomerfreisetzung bei *In-vitro*-Untersuchungen durch das verwendete Extraktionsmedium beeinflusst (Polydorou et al. 2012). In der Literatur wurden verschiedene Extraktionsmedia, wie Wasser, Ethanol-Wasser-Gemische, Acetonitril, Tetrahydrofuran, Zellkulturmedien, künstlicher Speichel oder gespendeter Speichel eingesetzt (Deviot et al. 2018; Inoue und Hayashi 1982; Malkiewicz et al. 2014; Moharamzadeh et al. 2007; Sideridou et al. 2007; SH Yang et al. 2011). Bisher ging man davon aus, dass die intraoralen Bedingungen zwischen dem wenig aggressiven Lösungsmittel Wasser und dem potenteren Lösungsmittel Ethanol liegen (Ferracane 1994). Dementsprechend empfiehlt die Food and Drug Administration (FDA) ein 75 Vol.-% Ethanol-Wasser-Gemisch für *In-vitro*-Studien zur Simulation intraoraler Bedingungen (Sideridou et al. 2007). Allerdings sind die Löslichkeitsparameter von BisGMA und Ethanol nahezu identisch, wodurch ethanolhaltige Lösungen zur maximalen Erweichung von Kompositen führen (McKinney und Wu 1985; W Wu und McKinney 1982). Durch die Penetration der Polymermatrix wird diese irreversibel geschädigt und es entstehen lösliche Einheiten (Polydorou et al. 2007). Deswegen ist es zweifelhaft, ob mit diesem Extraktionsmedium klinisch relevante Daten erhoben werden können (Pelka et al. 1999). Aktuelle Studien zeigen, dass die Monomerkonzentrationen von TEGDMA, UDMA und BisGMA bei Untersuchungen mit Ethanolgemischen im Vergleich zu Wasser und künstlichem Speichel signifikant erhöht waren und BPA sogar nur in Ethanolgemischen nachweisbar war (Polydorou et al. 2012; Tsitrou et al. 2014; Zhang und Xu 2008). Weiterhin ist die Monomerfreisetzung in Ethanolgemischen im Vergleich zu Wasser und künstlichem Speichel deutlich prolongiert (Putzeys et al. 2019). Dahingegen sind die freigesetzten Monomermengen in Wasser und künstlichem Speichel nahezu identisch (Moharamzadeh et al. 2007; Zhang und Xu 2008). In beiden Extraktionsmedia sind jedoch im Vergleich zu gespendetem Speichel durch dessen Proteinbindung leicht erhöhte Monomerkonzentrationen messbar (Rothmund et al. 2015). Allerdings geht man davon aus, dass nur die nicht-gebundene Monomer-Fraktion, ähnlich wie in der Pharmakokinetik von Medikamenten, eine systemische und lokale Wirkung hat (Bohnert und Gan 2013; Levy 1976; Rothmund et al. 2015). Daher ist die in speichel-nachweisbare, nicht-gebundene Monomer-Fraktion für die Evaluation der Biokompatibilität von besonderem Interesse. Der Nachweis in gespendetem Speichel erfordert allerdings auf Grund der vielen Speichelbestandteile ein sehr robustes und erprobtes analytisches Verfahren mit einer hohen Auflösung und bietet sich daher nicht immer an (Michelsen et al. 2008; SH Yang et al. 2011). Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit HPLC-grade Wasser als Lösungsmittel

verwendet, wodurch entgegen früherer Annahmen vermutlich sogar leicht erhöhte Konzentrationen an freigesetzten Monomeren gemessen wurden, da die Proteinbindung des Speichels nicht berücksichtigt wurde.

4.1.3.3 Zusätze zur Verhinderung der mikrobiellen Besiedlung

Der orale Biofilm und kariogene Bakterien, wie *Streptococcus mutans*, können die Biodegradation von Kompositen beschleunigen (Bourbia et al. 2013; Y Li et al. 2014). Insbesondere ein dichter Biofilm kann zur fortschreitenden Destruktion der Polymermatrix führen (Delaviz et al. 2014). Der Einfluss einer potentiellen mikrobiellen Besiedelung wurde in dieser und den meisten anderen Studien jedoch vernachlässigt (De Nys et al. 2018; Deviot et al. 2018; Mourouzis et al. 2020; Polydorou et al. 2012; Putzeys et al. 2019; Rothmund et al. 2015). Zur Vermeidung der Ausbildung eines atypischen bakteriellen Biofilms wurde in zwei *In-vitro*-Studien neben dem Extraktionsmedium zusätzlich ein Gemisch aus einem Antimykotikum mit zwei Antibiotika eingesetzt (Malkiewicz et al. 2014; Malkiewicz et al. 2015). In Voruntersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden Proben mit 0,1 ml Gibco Antibiotic-Antimycotic 100x (Gibco™; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) versetzt. Hierbei handelt es sich um eine Lösung aus Amphotericin B, Streptomycin und Penicillin, die auch in den genannten Studien zum Einsatz kam. Die Chromatogramme dieser Proben haben jedoch gezeigt, dass die Bestandteile der Lösung die *Peaks* relevanter Monomere, wie TEGDMA oder UDMA, deutlich überlagern. Abbildung 25 verdeutlicht dies exemplarisch an einer ExperTemp-Probe.

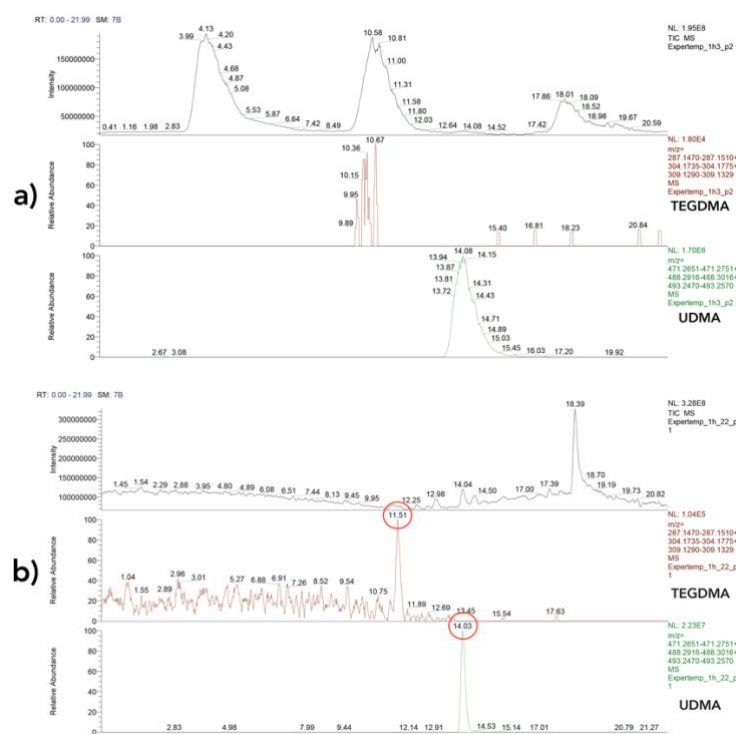


Abbildung 25: HPLC-MS-Messung einer ExperTemp-Probe (a) zusammen mit Gibco Antibiotic-Antimycotic 100x und (b) in reinem HPLC-grade Wasser. Die TEGDMA- und UDMA-Peaks sind in b) klar aufgetrennt und wurden gekennzeichnet. Es wurden Eluate nach einstündiger Inkubation verwendet.

Die Auftrennung überlappender *Peaks* erschwert den Nachweis von Substanzen, die in geringen Konzentrationen vorliegen, und führt somit zu schlechteren Nachweisgrenzen (Statham 2002). Weiterhin können überlappende *Peaks* zu Matrixeffekten und falsch-positiv erhöhten Konzentrationen führen (Hajslova und Zrostlikova 2003). Andererseits weisen Alkohole, mit denen die Probekörper und die Probengefäße behandelt wurden, eine signifikante antibakterielle Wirkung auf (Dhayanithi et al. 2010; Valle et al. 2016). Zudem wird in der Literatur ein Zeitintervall von vier bis sieben Tagen bis zur Etablierung eines intraoralen Biofilms beschrieben (Song et al. 2017). Wegen der analytischen Interferenzen und der kurzen Inkubationszeiten hat man sich im Rahmen der vorliegenden Studie daher gegen den Einsatz von Antibiotika und Antimykotika entschieden.

4.1.4 Analyse

4.1.4.1 Trennverfahren

In der aktuellen Literatur sowie von der FDA werden die HPLC oder GC als Separationstechnik empfohlen (Hope et al. 2016; Shelby 2008; Van Landuyt et al. 2011). In der vorliegenden Studie hat man sich für die Separation mittels HPLC entschieden, da die

Anwendung einer GC verschiedene Nachteile bei der Auftrennung dentaler Monomere aufweist. Die meisten dentalen Monomere sind thermolabil und werden zwischen 178 – 297°C thermolysiert (Bannach et al. 2015). Während der gaschromatographischen Auftrennung treten jedoch Temperaturen zwischen 280 – 400°C auf (Durner et al. 2010; Manabe et al. 2000; Michelsen et al. 2007). Daher ist bei zahlreichen Monomeren nur der Nachweis thermischer Zerfallsprodukte möglich (Geurtsen et al. 1998b, 1999; Michelsen et al. 2012; Rogalewicz et al. 2006; Spahl und Budzikiewicz 1994). Zudem kann die Degradation von BisGMA die BPA-Freisetzung und der Zerfall von UDMA die HEMA-Freisetzung zur Folge haben und somit zu falsch-positiven Messungen führen (Deviot et al. 2018; Michelsen et al. 2007; Spahl et al. 1998). Daher sollte die Auftrennung des Eluats mittels GC trotz der breiten Anwendung in der Literatur zum Nachweis dentaler Monomere vermieden werden (Gul et al. 2016; Spahl und Budzikiewicz 1994).

4.1.4.2 Detektion

Ein zuverlässiges Studiendesign zur Detektion dentaler Monomere in Eluaten von Kompositen zeichnet sich durch die klare Definition nachgewiesener Substanzen, niedrige Nachweisgrenzen und den Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse aus.

4.1.4.2.1 Referenzmaterialien

Einige Studien verwenden kommerziell erhältliche Referenzmassenspektren aus Datenbanken zur Identifizierung unbekannter Stoffe (Lygre et al. 1999; Michelsen et al. 2012; Michelsen et al. 2003; Rivier 2003). Allerdings bilden Massenspektren aus Datenbanken nicht die experimentellen Bedingungen ab, wodurch die Detektion von Substanzen, die in niedrigen Konzentrationen vorliegen, kompromittiert wird (Hernández et al. 2012). Dementsprechend fordert die Verordnung 2002/657/EC der Europäischen Kommission die Verwendung von Kalibrierlösungen und einem internen Standard, um die qualitative Analyse zu validieren (Europäische Kommission 2002). In der vorliegenden Studie wurden Kalibrierlösungen von BisGMA, TEGDMA und UDMA zusammen mit dem internen Standard DEP analysiert. DEP war als interner Standard zum BPA-Nachweis nicht geeignet. Daher wurde in der Hauptuntersuchung zum BPA-Nachweis eine externe Kalibrierung angewandt. Im Rahmen der Kontrolluntersuchung wurde d16BPA als interner Standard eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden keine Massenspektren aus Datenbanken verwendet und alle quantitativen Untersuchungen wurden mit einem internen Standard abgesichert. Lediglich der qualitative Nachweis von BPA in der Hauptuntersuchung konnte nicht mit einem internen Standard durchgeführt werden. Der Einsatz sowie die Auswahl des

internen Standards werden im Abschnitt 4.1.4.3 genauer diskutiert, da dieser bei der Quantifizierung von besonderer Bedeutung ist.

Im Rahmen der zahnmedizinischen Forschung ist die präzise Definition der Referenzsubstanzen und somit der nachgewiesenen Verbindungen besonders relevant. Zwei aktuelle Arbeiten zeigen, dass der Name UDMA für sehr unterschiedliche Moleküle und BisEMA für Moleküle mit einem unterschiedlichen Grad der Ethoxylierung verwendet wird (Durner et al. 2015; Polydorou et al. 2009d). Deswegen ist die genaue Beschreibung der verwendeten Referenzsubstanzen mit Hilfe der molaren Massen und der CAS-Nummern erforderlich (Van Landuyt et al. 2011). Oft werden diese Angaben selbst in aktuellen Studien nicht, fehlerhaft oder unvollständig gemacht (Kurt et al. 2018; Malkiewicz et al. 2014; Malkiewicz et al. 2015; Manojlovic et al. 2011; Omurlu et al. 2016; Putzeys et al. 2019; Tabatabaei et al. 2013). Dahingegen ist in der vorliegenden Studie eine eindeutige Zuordnung möglich, da die korrekten CAS-Nummern und die molaren Massen der Referenzsubstanzen angegeben wurden. Es wurde jedoch nur eines der bekannten UDMA-Moleküle nachgewiesen, obwohl unterschiedliche Moleküle unter dieser Abkürzung bekannt sind (Polydorou et al. 2009d). In anderen Studien erfolgte bereits die Analyse hinsichtlich zweier unterschiedlicher Moleküle (Polydorou et al. 2009a; Polydorou et al. 2009b; Schulz et al. 2015). Allerdings konnten die Autoren der Studien immer nur eine Variante erfolgreich nachweisen. Dabei handelte es sich um das UDMA-Molekül mit einer molaren Masse von 470,56 g/mol. Dieses Molekül wurde in der vorliegenden Arbeit und den meisten anderen aktuellen Studien als einzige Referenzsubstanz verwendet (Gul et al. 2019; Mourouzis et al. 2020; Sideridou und Achilias 2005; Tokay et al. 2015). Weiterhin wurden Zytotoxizitätsstudien, sofern es präzise angegeben wurde, vornehmlich mit diesem UDMA-Molekül durchgeführt (Arossi et al. 2010b; HH Chang et al. 2010; Kraus et al. 2017; Urcan et al. 2010b). Da in bisherigen Studien zur UDMA-Freisetzung nur der erfolgreiche Nachweis dieses UDMA-Moleküls gelungen ist, scheint dies am meisten verwendet zu werden. Dieses Molekül wurde im Rahmen der vorliegenden Studie in den Eluaten von drei der vier Materialien nachgewiesen. Es lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass der Hersteller von Protemp 4 ein anderes UDMA-Molekül verwendet.

4.1.4.2.2 Falsch-Positive Ergebnisse

Falsch-positive Ergebnisse können durch den Einsatz unterschiedlicher Detektoren vermieden werden, da hierbei die Charakterisierung des Analyten durch mehrere chemische Eigenschaften erfolgt (Kyranos et al. 2004). Hierzu erfolgte in der vorliegenden Untersuchung die Analyse mittels HPLC-UV/Vis-MS. Es wurde eine moderne

hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS = *high resolution mass spectrometry*) eingesetzt mit der nicht nur die nominale, sondern auch die exakte Masse bestimmt werden kann (Kaufmann et al. 2010). Zum Teil weisen sehr unterschiedliche Moleküle die gleiche nominale, aber nicht exakte Masse auf und selbst in der zahnmedizinischen Literatur sind beispielsweise derartige UDMA-Varianten bekannt (Polydorou et al. 2009d; Sleno 2012). Zusammenfassend dienten die Retentionszeiten, die UV-Absorptionsmaxima und die exakten Massen der Identifikation von BisGMA, TEGDMA und UDMA. Dies erlaubte die sichere Identifikation der Substanzen mit der verwendeten Methodik. Der Nachweis von BPA war massenspektrometrisch mit dieser Methodik nicht möglich. Aus anderen Forschungsfeldern ist bereits bekannt, dass eine reine Identifikation via UV/Vis zur Falschidentifikation coeluerender Substanzen und somit zu falsch-positiv erhöhten Konzentrationen führen kann (Babic et al. 2006; Barba et al. 2006; Mariappan et al. 2004). Dieses Phänomen wurde auch in der zahnmedizinischen Forschung beobachtet. Eine vergleichende Studie hat gezeigt, dass coeluerende Kompositbestandteile mit ähnlicher UV-Absorption, zu fälschlich erhöhten BPA-Konzentration führen können (Hope et al. 2016). Aus diesem Grund kommen Hope *et al.* (2016) zu dem Schluss, dass ein BPA-Nachweis mittels reiner UV-Detektion nicht zu belastbaren Ergebnissen führt und die Autoren fordern daher einen massenspektrometrischen Nachweis. Um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, wurden in der vorliegenden Studie Proben, in denen BPA nachgewiesen wurde, erneut untersucht. Hierzu wurde zunächst das probeninterne BPA derivatisiert und anschließend mit einer HPLC-MS/MS untersucht. Unter Verwendung dieser deutlich sensitiveren Methodik konnten die positiven BPA-Nachweise nicht bestätigt werden. Hierfür ist wahrscheinlich, wie von Hope *et al.* (2016) beschrieben, ein coeluerender Kompositbestandteil verantwortlich. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstützten somit die Annahme von Hope *et al.* (2016), dass die ausschließliche UV/Vis-Detektion nicht zum quantitativen Nachweis von BPA in den Eluaten von Kompositen geeignet ist. Die gewählte Untersuchungsmethode ist somit als orientierende Erstuntersuchung sinnvoll, sollte jedoch hinsichtlich der BPA-Detektion mittels Massenspektrometrie validiert werden. Die Nachuntersuchung wäre durch den Einsatz der Tandem-Massenspektrometrie statt der HPLC-UV/Vis-MS nicht nötig gewesen. Diese Technik ist jedoch bedeutend aufwendiger und kostenintensiver und stand daher zunächst nicht zur Verfügung.

4.1.4.3 Quantifizierung

Grundlage einer belastbaren, quantitativen Auswertung ist die zuverlässige Kalibrierung der analytischen Methode. Kalibrierungstechniken stellen den Zusammenhang zwischen der

Signalstärke und bekannten Konzentrationen von externen/internen Standards her und erlauben so Rückschlüsse auf die Analytkonzentration in der Probe (Cuadros-Rodríguez et al. 2001; Kościelniak und Kozak 2006). Am häufigsten erfolgt die externe Kalibrierung bei der die Vorbereitung und Analyse der Proben separat von den Kalibrierstandards durchgeführt wird (Cuadros-Rodríguez et al. 2007). Diese Technik ist einfach durchzuführen, aber sehr anfällig für Matrixeffekte und berücksichtigt keine Verluste bei der Probenvorbereitung oder -analyse (Cuadros-Rodríguez et al. 2007; Oliveira et al. 2010). Daher empfiehlt die Internationale Organisation für Normung (ISO) eine externe Kalibrierung nur bei matrixfreien Proben (ISO 2015). Matrixfreie Proben enthalten den Analyten in einer matrixfreien Lösung - einem reinen Lösungsmittel (Poole 2007). Jedoch ist dies beim Nachweis in Kompositelutaten auf Grund der Freisetzung zahlreicher, unterschiedlicher Substanzen nicht oder nur bedingt gegeben. Dennoch wird diese Methodik in fast allen Studien zur Monomerfreisetzung verwendet (Michelsen et al. 2008). Dahingegen können durch den Einsatz von Standards innerhalb der Proben Fehlerquellen, wie Matrixeffekte, reduziert oder vollständig vermieden werden (Hajslova und Zrostlikova 2003). Diese Verfahren sind als das Standard-Additionsverfahren und die Kalibrierung mittels internem Standard bekannt (Cuadros-Rodríguez et al. 2007). Bei dem Standard-Additionsverfahren handelt es sich um eine sehr aufwendige Methodik, bei der jede Probe einzeln kalibriert werden muss (Bader 1980; Kościelniak und Kozak 2006). Dementsprechend wird diese Technik nur für sehr komplexe Matrizes empfohlen (Cuadros-Rodríguez et al. 2007). Dagegen erfolgt die Kalibrierung mit einem internen Standard analog zur externen Kalibrierung, wobei die Proben und die Kalibrierlösungen zusätzlich mit einem internen Standard versetzt werden (Cuadros-Rodríguez et al. 2007; Oliveira et al. 2010). Daher wird die Kalibrierung mit einem internen Standard zum quantitativen Nachweis von Kompositbestandteilen in der Literatur empfohlen (Hu et al. 2016). Hierbei gelten Isotope oder deuterierte Standards des Analyten als ideal, da diese auf Grund nahezu identischer physikalisch-chemischer Eigenschaften ähnlich auf Matrixeffekte reagieren und dennoch massenspektrometrisch gut zu unterscheiden sind (Jiang et al. 2020). Zur Quantifizierung von BisGMA, TEGDMA und UDMA wurde in der vorliegenden Arbeit DEP als interner Standard verwendet. DEP wurde bereits erfolgreich in anderen Studien eingesetzt (Lygre et al. 1999; Michelsen et al. 2007; Nilsen et al. 2019; Pongprueksa et al. 2015). Isotope von BisGMA, TEGDMA und UDMA sind nicht kommerziell verfügbar und müssten aufwendig und kostenintensiv im Labor hergestellt werden (Michelsen et al. 2008). Aus diesem Grund hat man sich dazu entschlossen, DEP als bereits erprobten internen Standard zu verwenden. Voruntersuchungen zu der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass dieser Standard auf

Grund der Coelution nicht zum qualitativen oder quantitativen Nachweis von BPA geeignet ist. Dementsprechend wurde der BPA-Nachweis zunächst ohne internen Standard durchgeführt. In der Kontrolluntersuchung wurde Isotopen-markierten BPA (d16BPA) verwendet. Isotopen-markiertes BPA wurde bereits in anderen Untersuchungen erfolgreich eingesetzt und gilt als Goldstandard (Becher et al. 2018; Berge et al. 2019; Hope et al. 2016; Putzeys et al. 2020). Zusammenfassend erfolgten alle quantitativen Untersuchungen auf Grundlage einer Kalibrierung mit einem internen Standard.

4.2 Diskussion der methodischen Ergebnisse

4.2.1 Nachweisgrenzen

Die Angabe der Nachweisgrenzen ist für die Interpretation der Studienergebnisse essentiell, da eine Freisetzung unterhalb des LOD nicht ausgeschlossen werden kann (Wataha et al. 1999). Auf Grund der fehlenden Angabe von Nachweisgrenzen sind die Ergebnisse vieler Studien nur begrenzt interpretierbar (Malkiewicz et al. 2015; Moreira et al. 2017; Omurlu et al. 2016; Polydorou et al. 2012; Tabatabaei et al. 2013). In der Hauptuntersuchung wurden die Nachweisgrenzen für jede Substanz experimentell bestimmt. Das LOD für BPA wurde in der Kontrolluntersuchung nicht experimentell bestimmt, sondern durch die Standardabweichung der Signalstärke der Leerproben berechnet. Dies erlaubt die genaue Bestimmung des LOD ohne eine Vielzahl an Kalibrierstandards untersuchen zu müssen. Dieses Verfahren wird von der Gemeinsamen Forschungsstelle der Europäischen Union empfohlen (Wenzl et al. 2016).

Die Nachweisgrenzen für BisGMA und BPA lagen bei 0,5 µg/ml und für UDMA und TEGDMA bei 0,05 µg/ml. Nach der Derivatisierung lag das LOD für BPA in der Kontrolluntersuchung bei 0,009 ng/ml. In der aktuellen Literatur werden Nachweisgrenzen zwischen 0,003 µg/ml und 1,2 µg/ml beschrieben (Bationo et al. 2016; Hope et al. 2016; Manojlovic et al. 2011; Phan et al. 2014; Seiss et al. 2009). Die Nachweisgrenzen der Hauptuntersuchung liegen somit im Erwartungsbereich und in der Kontrolluntersuchung sogar unterhalb davon. Diese sehr geringe Nachweisgrenze konnte durch die Derivatisierung von BPA erreicht werden. Dies erlaubt das schlecht ionisierbare BPA im empfindlicheren positiven ESI-Modus nachzuweisen. Diese neuartige Nachweismethodik wurde in der Literatur nur einmal von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben (De Nys et al. 2018).

4.2.2 Ergebnisse der Kalibrierung

Die Autoren der meisten Studien zur Monomerfreisetzung aus dentalen Materialien beschreiben nicht die Kalibrierkurve mit den zugehörigen Validationsparametern (Engler et al. 2020; Hope et al. 2016; Kurt et al. 2018; Lempel et al. 2016). Jedoch ist der lineare Arbeitsbereich analytischer Instrumente begrenzt und somit muss die Linearität der Kalibrierung im Nachweisbereich zwingend überprüft werden (Van Loco et al. 2002). Hierzu werden die Messpunkte der analysierten Kalibrierlösungen in eine Kalibrierfunktion samt Kalibrierkurve überführt und anschließend auf das Vorliegen einer Normalverteilung überprüft (Zhao et al. 2014). Für eine belastbare Auswertung sollte eine Mehrpunkt-Kalibrierung mit drei oder mehr Standards durchgeführt werden (Cuadros-Rodríguez et al. 2001). Hierzu werden mehrere Konzentrationen je Standard im Bereich von 0 – 150% der erwarteten Konzentration doppelt oder öfter gemessen (Bisphenol A Analytical Research Task Group 2002; ISO 1996; Thompson et al. 2002). In der vorliegenden Studie erfolgte eine Vier- bzw. Fünfpunkt-Kalibrierung mit Konzentrationen zwischen 0 – 235% der gemessenen Konzentrationen. Alle Messungen wurden doppelt durchgeführt und die Mittelwerte wurden zur Berechnung der Kalibrierfunktion verwendet. Die Kalibrierfunktionen zusammen mit den Residuenplots sind in den Abbildungen 16 – 20 aufgeführt. Die Überprüfung der Linearität erfolgt anhand des Korrelationskoeffizienten r oder des Determinationskoeffizienten r^2 (Food and Drug Administration 2015). Das Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) definiert einen Korrelationskoeffizienten $r \geq 0,975$ oder einen Determinationskoeffizienten $r^2 \geq 0,95$ als ausreichenden Beweis für die Linearität der Kalibrierung (Clinical and Laboratory Standards Institute 2013). Jedoch sind selbst bei sehr hohen Korrelationskoeffizienten Abweichungen von der Normalverteilung möglich, sodass ergänzend der Residuenplot auf Abweichungen überprüft werden sollte und bei Auffälligkeiten ein Anpassungstest durchgeführt werden sollte (Brüggemann et al. 2006; González und Herrador 2007; Thompson et al. 2002; Van Loco et al. 2002). Die Determinationskoeffizienten aller, im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Kalibrierungen sind deutlich größer als 0,95 und die Residuenplots weisen keine non-linearen Effekte auf. Daher werden alle Anforderungen an eine lineare, reliable Kalibrierung erfüllt.

4.2.3 Quantifizierungsgrenzen

Ein weiteres zentrales Bewertungskriterium der quantitativen Analyse ist die substanzspezifische Quantifizierungsgrenze (Ribani et al. 2007). Den aktuellen Vorgaben der Europäischen Arzneimittel-Agentur entsprechend, wurde in der vorliegenden Studie die

niedrigste Konzentration der eingesetzten Kalibrierstandards als LOQ angenommen (Europäische Arzneimittel-Agentur 2011). Nach dieser Definition lagen die Quantifizierungsgrenzen in der Hauptuntersuchung somit für alle nachweisbaren Substanzen bei 0,5 µg/ml. In der aktuellen Literatur werden Quantifizierungsgrenzen zwischen 0,005 µg/ml und 1,0 µg/ml beschrieben (Deviot et al. 2018; Hu et al. 2016; Polydorou et al. 2012; Putzeys et al. 2018; Tsitrou et al. 2014). Die erreichten Quantifizierungsgrenzen liegen dementsprechend im oberen Bereich. Mit einem geringeren LOQ wäre die Quantifizierung von Substanzen, die in Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze, aber unterhalb von 0,5 µg/ml vorlagen, möglich gewesen. In der Kontrolluntersuchung lag das LOQ für nicht-derivatisiertes BPA bei 0,147 µg/ml und nach der Derivatisierung bei 0,03 ng/ml. Grundlage war hierbei nicht die geringste Konzentration der Kalibrierstandards, sondern die Standardabweichung der Signalstärke von Leerproben. Dieses angepasste Verfahren basiert auf einem technischen Bericht der Gemeinsamen Forschungsstelle der Europäischen Union (Wenzl et al. 2016). Die Methodik der Kontrolluntersuchung ist deutlich sensitiver und sollte für nachfolgende Studien eingesetzt werden.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Gemessene Monomerkonzentrationen

In der vorliegenden Studie wurde die TEGDMA- und UDMA-Freisetzung nach einer, 12 und 24 Stunden sowie 7 Tagen untersucht. Da in den Eluaten nach 24-stündiger Inkubation (Elutionsmaximum) kein BisGMA oder BPA detektiert wurde, erfolgte keine Untersuchung weiterer Inkubationsperioden. Nach kürzeren und längeren Inkubationsperioden ist keine Freisetzung zu erwarten, da nach 24 Stunden nahezu alle Monomere eluiert sind (Ferracane und Condon 1990; Putzeys et al. 2019). In der Hauptuntersuchung war BisGMA in keinem der Eluate und BPA keinem der Eluate von konventionellen Materialien nachweisbar. In der Kontrolluntersuchung konnte der positive BPA-Nachweis in den Elutaten von ExperTemp und Visalys Temp nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zu deutlich messbaren Konzentrationen im Mikrogrammbereich, lagen die Konzentrationen unterhalb des LOQ (0,03 ng/ml). Das geringe vorhandene Signal war proben- und materialunabhängig. Es ist aus der analytischen Chemie bekannt, dass der Nachweis geringster BPA-Konzentrationen im unteren Nanogrammbereich sehr anfällig für Verunreinigungen durch Lösungsmittel, das Laborequipment, die Laborumgebung oder selbst durch den Durchführenden ist (Ye et al.

2013). Bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit wurde darauf geachtet kein BPA-haltiges Labormaterial zu verwenden. Es wurden Probengefäße und HPLC-Gewindeflaschen aus Borosilikatglas eingesetzt. Zur Herstellung der Probekörper wurden PTFE-Matrizen verwendet und alle Kunststoffverschlüsse waren PTFE-beschichtet. Zum Pipettieren kamen durchsichtige Polypropylen-Eppendorf-Pipettenspitzen zum Einsatz. Grundsätzlich gelten diese Materialien alle als BPA-frei und werden zur Vermeidung von Verunreinigungen empfohlen (Cerkvenik-Flajs 2020; Guart et al. 2011; Howdeshell et al. 2003; Tan et al. 2019). Auf Grund seiner hohen Reinheit wurde HPLC-grade Wasser als Extraktionsmedium verwendet. Zahlreiche Studien haben jedoch BPA-Konzentrationen zwischen 0,007 und 0,06 ng/ml in Leerproben mit HPLC-grade Wasser nachgewiesen (Fox et al. 2011; Honeycutt et al. 2017; Le et al. 2008). Eine aktuelle Untersuchung ging diesen Zufallsfunden nach und wies bei HPLC-grade Wasser unterschiedlicher Hersteller eine BPA-Kontamination von 0,008 bis 0,027 ng/ml nach (Migliaccio et al. 2015). Weiterhin enthält Staub, selbst aus Laborumgebungen, BPA im Nano- und teilweise auch im Mikrogrammbereich und stellt somit eine mögliche Kontaminationsquelle dar (Geens et al. 2009; Liao et al. 2012; Loganathan und Kannan 2011). Wegen der proben- und materialübergreifend ähnlichen Signalintensität unterhalb des LOQ handelt es sich bei dem nachgewiesenen BPA vermutlich um Verunreinigungen. Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass keines der Materialien BisGMA oder BPA im wässrigen Milieu eluiert. Ältere Studien haben bereits gezeigt, dass BisGMA und BPA in schwache Extraktionsmedia, wie Wasser, nicht oder kaum eluieren (Imazato et al. 2009; Moharamzadeh et al. 2007; Polydorou et al. 2012; Schulz et al. 2015; Tsitrou et al. 2014). In dieser Untersuchung wurden nachweisbare Mengen an TEGDMA und/oder UDMA in den Eluatzen aller Materialien gefunden. Dies liegt daran, dass in Wasser vorwiegend kleine, hydrophile Moleküle, wie TEGDMA, und weniger langkettige, hydrophobe Moleküle, wie BisGMA, eluieren (Floyd und Dickens 2006; Tanaka et al. 1991). Wie unter 4.1.2 beschrieben, ist der Vergleich, der absoluten gemessenen Konzentrationen zu anderen Studien auf Grund uneinheitlicher Extraktionsverhältnisse und unterschiedlicher Extraktionsmedia nur eingeschränkt möglich. Im Vergleich zu einer Untersuchung an Füllungskompositen mit dem gleichen Extraktionsverhältnis und -medium scheinen die gemessenen TEGDMA- und UDMA-Konzentrationen im materialabhängigen Schwankungsbereich zu liegen (Alshali et al. 2015). Die Freisetzung nur sehr geringer TEGDMA-Konzentrationen wurde bereits bei anderen Kompositen, selbst bei längerer Inkubation, beobachtet (Polydorou et al. 2009c; Schulz et al. 2015; Seiss et al. 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit entsprechen weitestgehend den Daten aus der Literatur zu Füllungsmaterialien. Zur Monomerefreisetzung aus

provisorischen Kompositmaterialien ist nur eine weitere Studie bekannt. Ein Vergleich ist jedoch nur begrenzt möglich, da die Autoren der Studie nur zwei moderne Provisorienkunststoffe für Kronen oder Brücken untersucht haben und kein BPA-Nachweis erfolgt ist (Schulz et al. 2015). Weiterhin entsprach das Extraktionsprotokoll nicht den Vorgaben der ISO-Norm 10993-12 und die analytische Methode wurde nicht durch einen internen Standard abgesichert. Die Autoren der genannten Studie konnten mit ihrem Studiendesign unter Verwendung von Wasser als Extraktionsmedium in keinem der Eluate Monomere nachweisen. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie. Aus anderen Studien ist jedoch bekannt, dass die Freisetzung aus Kompositen stark material- und verarbeitungsabhängig ist (Engler et al. 2020; Ilie et al. 2014; Malacarne et al. 2006). Unterschiede in der Materialauswahl und dem Studiendesign sind vermutlich für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich.

Beim Vergleich der absoluten, gemessenen Monomerkonzentrationen zwischen aufeinanderfolgenden Inkubationsperioden fallen teilweise abnehmende TEGDMA- und UDMA-Konzentrationen auf. Diese Beobachtung wurde bereits in anderen Studien für BisGMA, TEGDMA und UDMA beschrieben (Malkiewicz et al. 2014; Moharamzadeh et al. 2007; Tabatabaei et al. 2013; Zhang und Xu 2008). Vermutlich führen passive Hydrolysereaktionen zur Degradation von Monomeren in Wasser (Ferracane 2006). In anderen Extraktionsmedia, wie Ethanol/Wasser-Gemische oder Milchsäure, wurde diese Beobachtung nicht oder in reduziertem Umfang gemacht (Tabatabaei et al. 2013; Zhang und Xu 2008). Durch die passive und/oder enzym-katalysierte Hydrolyse, wie z. B. in gespendetem Speichel, werden die Esterbindungen der Methacrylatgruppen von BisGMA, TEGDMA und UDMA gespalten (de Brito et al. 2019; Emmmler et al. 2008; Koin et al. 2008; Sanglar et al. 2005). Die Hydrolyse dentaler Monomere findet oft unvollständig statt, sodass gleichzeitig Moleküle mit einer unterschiedlichen Anzahl an abgespalteten Methacrylatgruppen vorliegen können (Koin et al. 2008; Vervliet et al. 2019). Diese Hydrolyseprodukte weisen jeweils unterschiedliche chemische Eigenschaften und molare Massen auf, sodass der Nachweis eine Anpassung der analytischen Methode erfordert (Hsu et al. 2012; Vervliet et al. 2019). In Studien, in denen stattdessen eine logistische Zunahme der Monomerfreisetzung gezeigt wurde, wurde in der Regel das Extraktionsmedium ausgetauscht und die Konzentration kumulativ ermittelt (Alshali et al. 2015; Putzeys et al. 2019; Tsitrou et al. 2014). Erste Konzentrationsabnahmen wurden bereits nach sechsständiger Inkubation beobachtet (Zhang und Xu 2008). Daher könnte die kumulative Berechnung auf Grund früher Konzentrationsabnahmen zur Unterrepräsentation tatsächlicher Monomerkonzentrationen führen. Stattdessen sollten zusätzlich freie

Methacrylatgruppen und Degradationsprodukte, wie BisHPPP, gemessen werden (Finer und Santerre 2004). Die Annahme der Autoren einer aktuellen Studie, dass die Monomerkonzentrationen in gespendetem Speichel lediglich wegen der Proteinbindung geringer als in Wasser oder künstlichem Speichel sind (Rothmund et al. 2015), muss vor dem Hintergrund der Esteraseaktivität in gespendetem Speichel (María et al. 2020) überdacht werden. Zusammenfassend sollten zukünftige Studien Degradationsprodukte bei Untersuchungen im wässrigen Milieu berücksichtigen. Zudem ist die biologische Wirkung dieser Degradationsprodukte noch nicht abschließend geklärt (Hagio et al. 2006). Die Biokompatibilität und die Metabolisierung der Degradationsprodukte dentaler Monomere sollte weiter untersucht werden.

4.3.2 Ergebnisse der statistischen Auswertung

Die statistische Auswertung zeigte, dass ExperTemp in der vorliegenden Studie signifikant mehr UDMA als alle anderen Provisorienkunststoffe freisetzt. Signifikante Materialunterschiede hinsichtlich der Monomerfreisetzung sind bereits aus anderen Studien bekannt (Malkiewicz et al. 2015; Polydorou et al. 2009b; Putzeys et al. 2019; Schulz et al. 2015). Ursächlich ist die herstellerabhängige Zusammensetzung der Polymermatrix (Peutzfeldt 1997; Turssi et al. 2005). In der vorliegenden Studie wurden zwei BPA-freie Provisorienkunststoffe und zwei konventionelle Materialien untersucht. In BPA-freien Materialien werden BPA-Derivate, wie BisGMA, oft durch UDMA ersetzt (Luo et al. 2016; Mourouzis et al. 2020; Pulgar et al. 2000). Diese Anpassung an der Polymermatrix spiegelt sich in den ermittelten Monomerkonzentrationen wider. In den Eluaten der BPA-freien Provisorienmaterialien (ExperTemp und Visalys Temp) wurden signifikant erhöhte UDMA-Konzentrationen gemessen. Bereits andere Studien konnten zeigen, dass UDMA neben TEGDMA, das am meisten freigesetzte Monomer ist (Van Landuyt et al. 2011). Ursächlich sind im Wesentlichen vermutlich die höhere Polarität, flexiblere molekulare Struktur und Kettenübertragungsreaktionen an der Stickstoffgruppe (Barszczewska-Rybarek 2014; Lempel et al. 2016; Mourouzis et al. 2020). Andererseits konnte kein BPA oder BisGMA in den Eluaten konventioneller Materialien nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist bei Untersuchungen im wässrigen Milieu nicht untypisch (Moharamzadeh et al. 2007; Polydorou et al. 2012; Zhang und Xu 2008). Daher scheint der Austausch von BisGMA gegen UDMA als Basismonomer mit einer erhöhten Monomerfreisetzung vergesellschaftet zu sein. Da dieser Austausch häufig aus gesundheitlichen Bedenken getroffen wird, gilt es vor dem Hintergrund der vorliegenden Ergebnisse diese Annahme zu reevaluieren.

4.3.3 Klinische Bewertung der Ergebnisse

4.3.3.1 Allgemein

Die untersuchten Materialien werden zur Herstellung von provisorischen Kronen und Brücken verwendet. Zur Beurteilung der Ergebnisse im klinischen Kontext müssen die Ergebnisse der Studie zunächst in Relation zu gewöhnlichen Versorgungsgrößen gesetzt werden. Tabelle 21 führt die durchschnittlichen Oberflächen menschlicher Zahnkronen auf.

Tabelle 21: Durchschnittliche Kronenoberflächen nach Van Landuyt *et al.* (Van Landuyt *et al.* 2011)

Zahn	Durchschnittliche Kronenoberfläche [cm ²]
Mittlere Inzisiven	2,23
Laterale Schneidezähne	1,78
Eckzähne	2,1
Erster Prämolare	2,03
Zweiter Prämolare	1,91
Erster Molare	3,15
Zweiter Molare	2,76

Neben Einzelzahnkronen werden die untersuchten Materialien für temporäre Brückenversorgungen verwendet. Eine Brücke zum Ersatz eines ersten Molaren hat etwa eine Oberfläche von 7,32 cm². Bei dieser Berechnung wurden zur Vereinfachung die Oberflächen der Zahnkronen addiert und die Konnektoren vernachlässigt. Die tatsächliche Oberfläche ist wahrscheinlich etwas geringer, da die Konnektoren die approximale Oberfläche reduzieren. Die Monomerfreisetzung wurde in der vorliegenden Untersuchung anhand von Probekörpern mit einer Oberfläche von 4,712 cm² gemessen. Um die gemessenen Konzentrationen in Relation zu einer Einzelzahnkrone eines ersten Molaren zu setzen, müssen diese mit dem Faktor 0,67 verrechnet werden. Analog hierzu ist die Multiplikation mit dem Faktor 1,55 für eine Endpfeilerbrücke zum Ersatz des ersten Molaren erforderlich. Eine Übersicht der materialabhängigen Monomerfreisetzung nach 24 Stunden in Relation zu den beschriebenen Versorgungsformen ist in Tabelle 22 aufgeführt. Die gemessenen BPA-Konzentrationen sind nicht aufgeführt, da die Mengen nicht quantifizierbar waren und auf Verunreinigungen zurückzuführen sind (siehe 4.3.1).

Tabelle 22: Monomerkonzentrationen nach 24-stündiger Inkubation in Relation zu gängigen Versorgungsformen.

Material	Versorgung	TEGDMA [µg/ml]	UDMA [µg/ml]
ExperTemp	Einzelzahnkrone (1. Molar)	<LOQ	5,56
	Brücke (2. Prämolare – 2. Molar)	<LOQ	12,91
Luxatemp Automix Plus	Einzelzahnkrone (1. Molar)	0,69	0,64
	Brücke (2. Prämolare – 2. Molar)	1,60	1,48
Protemp 4	Einzelzahnkrone (1. Molar)	<LOQ	<LOD
	Brücke (2. Prämolare – 2. Molar)	<LOQ	<LOD
Visalys Temp	Einzelzahnkrone (1. Molar)	<LOD	2,31
	Brücke (2. Prämolare – 2. Molar)	<LOD	5,36

4.3.3.2 Zytotoxizität und Entzündungsreaktionen

Wie unter 1.3.2.1 beschrieben, wird die zytotoxisch wirksame Konzentration dentaler Monomere als TC_{50} -Konzentration angegeben. In der Regel wird diese nach 24- oder 48-stündiger Monomerexposition ermittelt (Caldas et al. 2019; Putzeys et al. 2018). In einer umfassenden Studie hat Geurtsen *et al.* (1998a) die TC_{50} -Konzentration relevanter Kompositbestandteile an den relevantesten oralen Fibroblastenzellreihen nach 48-stündiger Exposition ermittelt. Die entsprechenden TC_{50} -Konzentrationen sind in Tabelle 23 aufgeführt. Bei der Untersuchung dentaler Provisorienkunststoffe ist die Reaktion der umliegenden Mukosa von besonderer klinischer Relevanz. Daher werden in Tabelle 24 die TC_{50} -Konzentrationen von Gingivafibroblasten aus weiteren Studien aufgeführt. In der Literatur werden die TC_{50} -Konzentrationen in unterschiedlichen Einheiten angegeben. Diese wurden zur besseren Vergleichbarkeit mit den vorliegenden Ergebnissen in µg/ml umgerechnet. Die große Streubreite der Werte aus der Literatur lässt sich durch die unterschiedliche Sensitivität der verwendeten Testsysteme, unterschiedlichen Zelllinien und Zelldichten erklären (Ciapetti et al. 1996).

Tabelle 23: TC_{50} -Konzentrationen humaner Gingivafibroblasten (HGF), humaner Pulpafibroblasten (HPF), humaner Fibroblasten des parodontalen Ligaments (HPLF) bei 48-stündiger Inkubation (Geurtsen et al. 1998a). Zur besseren Vergleichbarkeit mit den vorliegenden Studienergebnissen erfolgte die Umrechnung in µg/ml.

Substanz	TC_{50} HGF [µg/ml]	TC_{50} HPF [µg/ml]	TC_{50} HPLF [µg/ml]
UDMA	61,17 ± 23,53	221,16 ± 65,88	28,23 ± 9,41
TEGDMA	65,85 ± 17,18	74,44 ± 5,73	34,36 ± 17,18

Tabelle 24: Übersicht der TC₅₀-Konzentrationen humaner Gingivafibroblasten (HGF), (Issa et al. 2004; Reichl et al. 2006a; Reichl et al. 2006b; Urcan et al. 2010a) Zur besseren Vergleichbarkeit mit den vorliegenden Studienergebnissen erfolgte die Umrechnung in µg/ml.

	TC ₅₀ UDMA [µg/ml]	TC ₅₀ TEGDMA [µg/ml]
Urcan et al. (2010a), 24h Inkubation	94,11 ± 47,06	1033,61 ± 57,26
Reichl et al. (2006a), 24h Inkubation	49,88 ± 2,35	990,67 ± 57,26
Reichl et al. (2006b), 24h /48h Inkubation	56,47 ± 4,71	518,24 ± 37,22
	65,88 ± 4,71	349,32 ± 37,22
Issa et al. (2004), 24h Inkubation	-	509,65 ± 37,22

Der Vergleich der gemessenen Monomerkonzentrationen mit den TC₅₀-Konzentrationen aus der Literatur zeigt, dass unabhängig vom Material selbst bei größeren, temporären Versorgungen keine zytotoxischen Konzentrationen erreicht werden. Jedoch dürfte die *In-vivo*-Freisetzung höher sein, da der Speichelfluss sowie die intraorale Degradation durch Abrasion, Demastikation und Enzyme des Speichels nicht berücksichtigt wurden (Alshali et al. 2015). Zudem kann sich die Zytotoxizität unterschiedlicher Monomere synergistisch oder additiv beeinflussen (Durner et al. 2012; Ratanasathien et al. 1995). Zur kombinierten Wirkung von UDMA und TEGDMA besteht jedoch Unklarheit. Wisniewska-Jarosinska et al. hat an *Chinese-Hamster-Ovary*-(CHO)-Zellen eine leicht antagonistische Wirkung beobachtet (Wisniewska-Jarosinska et al. 2011), wohingegen Durner et al. (2012) an Gingivafibroblasten eine additive Wirkung mit einer kombinierten TC₅₀-Konzentration von 18,82 µg/ml UDMA und 458,11 µg/ml TEGDMA festgestellt hat. Eine Studie an Mäusefibroblasten konnte zeigen, dass bei kurzen Expositionszeiten antagonistische und bei längeren Expositionszeiten additive Effekte überwiegen (Ratanasathien et al. 1995). Weitere Studien zur abschließenden Beurteilung dieser Effekte sind erforderlich. Dennoch liegen selbst die höchsten gemessenen Monomerkonzentrationen unter der kombinierten TC₅₀-Konzentration von Durner et al. (2012) und somit scheinen zytotoxische Effekte unwahrscheinlich. Es gilt zu berücksichtigen, dass die vollständige Simulation von *In-vivo*-Bedingungen bei Zytotoxizitätstests nur schwer möglich ist (Hanks et al. 1996). Oftmals wird die Dynamik des oralen Mileus nicht berücksichtigt (de Gomes et al. 2011). Hierbei wird der ständige Speichelfluss nicht beachtet, sodass sich die jeweiligen Expositionszeiten auf ein stehendes, nicht erneuerndes Zellkulturmedium beziehen (Caldas et al. 2019; F Chen et al. 2014). *In vivo* werden freigesetzte Monomere jedoch frühzeitig abtransportiert. Daher treten die gemessenen Konzentrationen höchstens in begrenzten Räumen, wie tiefen Kavitäten,

dauerhaft auf (HH Chang et al. 2010). Die untersuchten Materialien scheinen somit selbst bei der Erstellung von Brückenprovisorien weder die jeweiligen TC_{50} -Konzentrationen noch die erforderlichen Expositionszeiten zu erreichen.

4.3.3.3 Östrogene Wirkung

In der aktuellen Literatur geht man davon aus, dass die östrogene Wirkung von Kompositen auf BPA-Reste und die enzymatische BPA-Freisetzung aus BisDMA zurückzuführen ist (Arenholt-Bindslev et al. 1999; Fleisch et al. 2010). In der vorliegenden Studie war BPA in keiner Probe quantifizierbar und in Luxatemp Automix Plus und Protemp 4 Proben mit einem LOD von 0,5 µg/ml nicht nachweisbar. Auf Grund bekannter falsch-positiver Messergebnisse bei der BPA-Analyse mittels UV-Detektion erfolgte eine hochsensitive, massenspektrometrische Kontrolluntersuchung der ExperTemp und Visalys Temp Proben. In der Nachuntersuchung waren BPA-Konzentrationen nicht quantifizierbar (<0,03 ng/ml) und die Signalstärke war materialübergreifend identisch. Dies ist bereits aus anderen Studien bekannt und vermutlich sind, wie unter 4.3.1 beschrieben, geringste Verunreinigungen ursächlich. Bei Annahme eines Wertes direkt unterhalb des LOQ wären die Konzentrationen immer noch mindestens um den Faktor 16666,66 geringer als die geringsten, genannten Konzentrationen mit östrogenen Wirkung aus der aktuellen Literatur (Lejonklou et al. 2017; Lind et al. 2017). Weiterhin war das BPA-Derivat BisGMA mit einem LOD von 0,5 µg/ml nicht nachweisbar. In der vorliegenden Studie erfolgte kein Nachweis der jeweiligen Degradationsprodukte. Jedoch weisen auch die Degradationsprodukte von BisGMA keine östrogene Wirkung auf (Fic et al. 2014; Kostoryz et al. 2003). Daher ist davon auszugehen, dass die untersuchten Provisorienkunststoffe keine östrogenen Effekte auf den menschlichen Organismus haben. Für die abschließende Bewertung ist eine Studie an estradiol-sensitiven Zellreihen mit den Eluaten der untersuchten Materialien erforderlich.

4.3.3.4 Mutagene Wirkung

Für TEGDMA und UDMA wurden an verschiedenen Zelllinien mutagene Effekte nachgewiesen (Kleinsasser et al. 2006; Kleinsasser et al. 2004; Kurt et al. 2018; Schweikl und Schmalz 1999). Die Wirkung eines Mutagens ist substanzspezifisch und konzentrationsabhängig (Schweikl et al. 2001). Die Konzentrationen bei denen mutagene Effekte, wie Doppelstrangbrüche, Deletionen von DNA-Abschnitten oder die Induktion von Mikronuklei, auftreten, sind von dem jeweiligen Monomer und der exponierten Zellreihe abhängig (Krifka et al. 2013; Sohaebuddin et al. 2010). Verschiedene Studien haben für dentale Monomere mutagene Effekte, bereits unterhalb der jeweiligen TC_{50} -Konzentration,

gezeigt (Demirci et al. 2008; Eldeniz et al. 2016; Manojlovic et al. 2017). Bei humanen Gingivafibroblasten wurden bei einer UDMA-Konzentration von 14,12 µg/ml bzw. einer TEGDMA-Konzentration von 103,08 µg/ml Doppelstrangbrüche nach 24-stündiger Expositionszeit beobachtet (Urcan et al. 2010b). Bei gleicher Inkubationszeit wurden an V79-Hamsterzellen bei TEGDMA-Konzentrationen von 71,58 µg/ml klastogene Effekte nachgewiesen (Lee et al. 2006). An humanen Lymphozyten treten DNA-Schäden schon bei einer TEGDMA-Konzentration von 2,86 µg/ml und 60-minütiger Exposition auf (Kleinsasser et al. 2006). Diese in der Literatur beschriebenen mutagen-wirksamen TEGDMA-Konzentrationen wurden in der vorliegenden Studie von den untersuchten Materialien nicht freigesetzt. Selbst bei größeren Brückenprovisorien sind diese Konzentrationen nicht zu erwarten.

Dahingegen weist UDMA eine um den Faktor 1,6 potentere mutagene Wirkung auf (Arossi et al. 2010a; Arossi et al. 2010b). Im Comet-Assay wurden erste DNA-Schäden bereits nach 60-minütiger Exposition und einer Konzentration von 0,047 µg/ml an humanen Parotisdrüsenzellen und Lymphozyten beobachtet (Kleinsasser et al. 2006; Kleinsasser et al. 2004). An humanen Gingivafibroblasten wurde eine relevante Anzahl an Doppelstrangbrüchen bei einer Konzentration von 14,12 µg/ml und sechsstündiger Exposition nachgewiesen (Urcan et al. 2010b). Eine ältere Studie von Schweikl *et al.* (2001) hingegen hat nur eine geringfügig erhöhte Anzahl an Mikronuklei im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden. Allerdings wurde die genotoxische Wirkung der Eluate von Kompositen auf UDMA- und/oder TEGDMA-Basis bereits *in vivo* gezeigt (Arossi et al. 2010a). In der vorliegenden Studie wurden quantifizierbare UDMA-Konzentrationen in den Proben von Luxatemp Automix Plus, ExperTemp und Visalys Temp nachgewiesen. Je nach Restaurationsgröße und verwendetem Material ist nach 24 Stunden eine Freisetzung zwischen 0,64 bis 12,91 µg/ml zu erwarten (siehe Tabelle 22). Da mutagene Effekte durch UDMA bereits bei kurzen Expositionszeiten und geringen Konzentrationen beobachtet wurden, sind mutagene Effekte auf ortsständige Zellen durch die untersuchten Materialien nicht auszuschließen. Zur weiteren Abklärung sind *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien mit den Eluaten der untersuchten Materialien erforderlich.

4.3.3.5 Allergenes Potential

In Bezug auf dentale Monomere sind Allergien auf TEGDMA, HEMA, UDMA und BisGMA bekannt, wobei vor allem HEMA und TEGDMA ein hohes allergenes Potential aufweisen (Aalto-Korte et al. 2007; Goon et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde die Freisetzung von HEMA nicht untersucht und somit sind hinsichtlich HEMA keine Aussagen

möglich. Wie unter 1.3.5 beschrieben sind Allergien auf dentale Materialien entweder vom Soforttyp (Typ I, IgE-vermittelt) oder vom Spättyp (Typ IV, Zell-vermittelt), wobei zu Reaktionen vom Soforttyp lediglich Fallbeschreibungen bestehen. Die Ausbildung einer allergischen Kontaktstomatitis ist von der Expositionszeit, Allergenkonzentration sowie der Immunantwort abhängig (Feller et al. 2017). Dennoch wurden diese Reaktionen bereits bei sehr geringen Allergenkonzentrationen beobachtet (Kotsailidi et al. 2020). Diese niedrigen Konzentrationen sind nicht nur lokal nachweisbar, sondern auch in der Luft des Behandlungszimmer und stehen daher im Verdacht potentieller Auslöser eines allergischen Asthmas, insbesondere beim zahnmedizinischen Personal, zu sein (Marquardt et al. 2009). Da bei jedem der untersuchten Kunststoffen TEGDMA und/oder UDMA nachweisbar und/oder quantifizierbar war, und allergische Reaktionen bereits bei niedrigen Konzentrationen möglich sind, sollten diese Materialien bei einer bekannten Allergie nicht eingesetzt werden.

4.4 Schlussfolgerung

Das Studiendesign der vorliegenden Arbeit wurde erstmals an der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik angewendet. Die vorgestellte *In-vitro*-Methodik ist grundsätzlich gut geeignet, um die Monomerefreisetzung aus dentalen Materialien zu untersuchen. In zukünftigen Studien sollte die analytische Methodik der Kontrolluntersuchung für alle untersuchten Substanzen angewendet werden und gegebenenfalls auch Hydrolyse- bzw. Degradationsprodukte untersucht werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Versuchsaufbau, der eine metaanalytische Auswertung sowie den Vergleich zu gewöhnlichen Restaurationen erlaubt, etabliert. Nach aktuellem Kenntnisstand ist dies die erste Untersuchung, die allen diskutierten, experimentellen Vorgaben entspricht und mit einer neuartigen hochsensitiven Nachweismethode kombiniert. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten darauf hin, dass eine reine UV-Detektion zum Nachweis von BPA in Kompositeluaten anfällig für falsch-positive Ergebnisse ist. Es wurden signifikante Unterschiede hinsichtlich der Monomerefreisetzung zwischen den untersuchten Materialien festgestellt. In der aktuellen Literatur bestehen die größten gesundheitlichen Bedenken wegen einer potentiellen BPA- und BisGMA-Freisetzung. Jedoch war BisGMA in den Eluaten von keinem Material nachweisbar. In den Eluaten der konventionellen Materialien war BPA nicht nachweisbar und in den Eluaten der BPA-freien Materialien wurden materialunabhängig BPA-Spuren gleicher Intensität unterhalb der Quantifizierungsgrenze vermutlich auf Grund von Kontaminationen detektiert. In BPA-freien Kompositen wird

BisGMA in der Regel durch UDMA ersetzt. Diese Anpassungen an der Polymermatrix führten zu einer signifikant erhöhten UDMA-Elution. Es wurden in der vorliegenden Studie zwar keine zytotoxisch-wirksamen Monomerkonzentrationen gemessen, aber potentiell-mutagene Effekte auf lokale Zellen können bei größeren Provisorien nicht ausgeschlossen werden. Der Austausch von BisGMA gegen UDMA aus Biokompatibilitätserwägungen sollte daher überdacht werden.

5 Zusammenfassung

Nach der Präparation dienen temporäre Kronen- und Brückenrestorationen der ästhetischen und funktionellen Wiederherstellung sowie dem Schutz des Zahnes. Die Herstellung dieser Restaurationen erfolgt meist mit Hilfe von chemisch- oder dual-härtenden Kompositen. Einige Bestandteile von Kompositen, insbesondere BPA und dessen Derivate, stehen im Verdacht eine gesundheitsschädliche Wirkung zu haben. Daher bieten einige Hersteller bereits BPA-freie Materialien, in denen BPA-Derivate oftmals durch UDMA ausgetauscht werden, an. Die vorliegende Arbeit sollte die Freisetzung von BPA und anderen relevanten dentalen Monomeren durch konventionelle und BPA-freie Provisorienkunststoffe im wässrigen Milieu untersuchen und vergleichen.

Hierzu wurden zwei konventionelle Materialien (Luxatemp Automix Plus, Protemp 4) und zwei BPA-freie Materialien (ExperTemp, Visalys Temp) untersucht. Es wurden je Inkubationsperiode, Monomer und Material fünf zylindrische Probekörper (Oberfläche: 4,712 cm²) hergestellt. Die Inkubation erfolgte mit HPLC-grade Wasser bei 37 °C und 112 U/min. Das Extraktionsverhältnis entsprach der ISO Norm 10993-12. Freigesetzte Monomere wurden mittels HPLC-UV/Vis-MS und interner Kalibrierung (interner Standard: Diethylphthalat) analysiert. Die BPA-Analyse erfolgte mittels HPLC-UV und positive Ergebnisse wurden nach der Derivatisierung des probeninternen BPA mittels HPLC-MS/MS und interner Kalibrierung (interner Standard: d16BPA) validiert. Bei einem positiven Analytnachweis in den Eluaten nach 24-stündiger Inkubation (Elutionsmaximum) wurden weitere Inkubationsperioden (eine Stunde, 12 Stunden und 7 Tage) analysiert. Es wurden die Nachweisgrenzen (TEGDMA, UDMA: 0,05 µg/ml; BisGMA, BPA: 0,5 µg/ml; derivatisiertes BPA: 0,009 ng/ml) und Quantifizierungsgrenzen (BPA, TEGDMA, UDMA: 0,5 µg/ml; derivatisiertes BPA: 0,03 ng/ml) aller Substanzen bestimmt. Alle Kriterien einer linearen Kalibrierung wurden erfüllt ($r^2 > 0,95$; gleichmäßiger Residuenplot).

In den Eluaten aller Materialien war nach mindestens einem Inkubationsintervall TEGDMA und/oder UDMA nachweisbar. Dahingegen waren BisGMA oder BPA in keiner der Proben quantifizierbar. Die statistische Auswertung zeigte, dass die BPA-freien Materialien signifikant mehr UDMA eluieren als konventionelle Materialien. Alle gemessenen Konzentrationen lagen unter den berichteten effektiven zytotoxischen Konzentrationen. Aber für einige Materialien, insbesondere BPA-freie Materialien, lagen sie über den berichteten potenziell genotoxischen Konzentrationen auf lokale Zellen. Da BPA-freie Materialien auf Grund von Biokompatibilitätserwägungen eingeführt wurden, sollte der Austausch von BisGMA durch UDMA reevaluiert werden.

6 Literaturverzeichnis

- Aalto-Korte K, Alanko K, Kuuliala O, Jolanki R (2007): Methacrylate and acrylate allergy in dental personnel. *Contact Derm* 57, 324-330
- Acconcia F, Pallottini V, Marino M (2015): Molecular mechanisms of action of BPA. *Dose-Response* 13, 1-9
- Aghajanpour-Mir SM, Zabihi E, Akhavan-Niaki H, Keyhani E, Bagherizadeh I, Biglari S, Behjati F (2016): The genotoxic and cytotoxic Effects of Bisphenol-A (BPA) in MCF-7 cell line and amniocytes. *Int J Mol Cell Med* 5, 19-29
- Al-Hiyasat AS, Darmani H, Milhem MM (2005): Cytotoxicity evaluation of dental resin composites and their flowable derivatives. *Clin Oral Investig* 9, 21-25
- Alshali RZ, Salim NA, Sung R, Satterthwaite JD, Silikas N (2015): Analysis of long-term monomer elution from bulk-fill and conventional resin-composites using high performance liquid chromatography. *Dent Mater* 31, 1587-1598
- Anderson JM (2016): Future challenges in the in vitro and in vivo evaluation of biomaterial biocompatibility. *Regen Biomater* 3, 73-77
- Ansteinsson V, Kopperud HB, Morisbak E, Samuelsen JT (2013): Cell toxicity of methacrylate monomers-the role of glutathione adduct formation. *J Biomed Mater Res A* 101, 3504-3510
- Aoki T, Narumiya S (2012): Prostaglandins and chronic inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 33, 304-311
- 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. *Clin Oral Investig* 3, 120-125
- Arossi GA, Dihl RR, Lehmann M, Reguly ML, de Andrade HH (2010a): Genetic toxicology of dental composite resin extracts in somatic cells in vivo. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 107, 625-629
- Arossi GA, Lehmann M, Dihl RR, Reguly ML, De Andrade HHR (2010b): Induced DNA damage by dental resin monomers in somatic cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106, 124-129
- Arrais CAG, Rueggeberg FA, Waller JL, de Goes MF, Giannini M (2008): Effect of curing mode on the polymerization characteristics of dual-cured resin cement systems. *J Dent* 36, 418-426
- Asmussen E, Peutzfeldt A (1998): Influence of UEDMA, BisGMA and TEGDMA on selected mechanical properties of experimental resin composites. *Dent Mater* 14, 51-56

- Astudillo-Rubio D, Delgado-Gaete A, Bellot-Arcis C, Montiel-Company JM, Pascual-Moscardo A, Almerich-Silla JM (2018): Mechanical properties of provisional dental materials: a systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE* **13**, e0193162
- Atay A, Gurdal I, Bozok Cetintas V, Usumez A, Cal E (2019): Effects of new generation all-ceramic and provisional materials on fibroblast cells. *J Prosthodont* **28**, 383-394
- Atkinson JC, Diamond F, Eichmiller F, Selwitz R, Jones G (2002): Stability of bisphenol A, triethylene-glycol dimethacrylate, and bisphenol A dimethacrylate in whole saliva. *Dent Mater* **18**, 128-135
- Awad H, Khamis MM, El-Aneed A (2015): Mass spectrometry, review of the basics: ionization. *Appl Spectrosc Rev* **50**, 158-175
- Babic N, Larson TS, Grebe SK, Turner ST, Kumar R, Singh RJ (2006): Application of liquid chromatography-mass spectrometry technology for early detection of microalbuminuria in patients with kidney disease. *Clin Chem* **52**, 2155-2157
- Bader M (1980): A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis. *J Chem Educ* **57**, 703-706
- Bakula A, Lugovic-Mihic L, Situm M, Turcin J, Sinkovic A (2011): Contact allergy in the mouth: diversity of clinical presentations and diagnosis of common allergens relevant to dental practice. *Acta Clin Croat* **50**, 553-561
- Balkenhol M: Temporäre Kronen- und Brückenwerkstoffe in der Zahnheilkunde: Eine Standortbestimmung. Med. Habil.-Schr. Gießen 2008
- Balkenhol M, Behr M, Handel G (2009): Wissenschaftliche Mitteilung der Deutschen Gesellschaft für zahnärztliche Prothetik und Werkstoffkunde (DGPZW) Temporäre Versorgung für festsitzenden Zahnersatz.
https://secure.owidi.de/documents/10165/2216105/20090827_Temporaere_Versorgung_2009-06.pdf/d69a600e-53c0-4898-aa48-b83a4ac8c492; abgerufen am 04.01.2022
- Balkenhol M, Meyer M, Michel K, Ferger P, Wostmann B (2008): Effect of surface condition and storage time on the reparability of temporary crown and fixed partial denture materials. *J Dent* **36**, 861-872
- Bando K, Takahashi H, Kinbara M, Tanaka Y, Kuroishi T, Sasaki K, Takano-Yamamoto T, Sugawara S, Endo Y (2014): Resin monomers act as adjuvants in ni-induced allergic dermatitis in vivo. *J Dent Res* **93**, 1101-1107
- Banerjee S, Mazumdar S (2012): Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *Int J Anal Chem* **2012**, 282574-282574

- Bannach G, Cavalheiro CC, Calixto L, Cavalheiro ÉTG (2015): Thermoanalytical study of monomers: BisGMA, BisEMA, TEGDMA, UDMA and their mixture. *Braz J Therm Anal* 4, 28-34
- Barba AIO, Hurtado MC, Mata MCS, Ruiz VF, Tejada MLSd (2006): Application of a UV–vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables. *Food Chem* 95, 328-336
- Barszczewska-Rybarek IM (2009): Structure-property relationships in dimethacrylate networks based on Bis-GMA, UDMA and TEGDMA. *Dent Mater* 25, 1082-1089
- Barszczewska-Rybarek IM (2014): Characterization of urethane-dimethacrylate derivatives as alternative monomers for the restorative composite matrix. *Dent Mater* 30, 1336-1344
- Bationo R, Jordana F, Boileau MJ, Colat-Parros J (2016): Release of monomers from orthodontic adhesives. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 150, 491-498
- Beatty MW, Swartz ML, Moore BK, Phillips RW, Roberts TA (1993): Effect of crosslinking agent content, monomer functionality, and repeat unit chemistry on properties of unfilled resins. *J Biomed Mater Res* 27, 403-413
- Beccaria M, Cabooter D (2020): Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. *Analyst* 145, 1129-1157
- Becher R, Wellendorf H, Sakhi AK, Samuelsen JT, Thomsen C, Bølling AK, Kopperud HM (2018): Presence and leaching of bisphenol a (BPA) from dental materials. *Acta Biomater Odontol Scand* 4, 56-62
- Behrend DA (1967): Temporary protective restorations in crown and bridge work. *Aust Dent J* 12, 411-416
- Belas FJ, Blair IA (2001): Mass spectrometry in pharmaceutical analysis. *J Liposome Res* 11, 309-342
- Benedikt J, Hecimovic A, Ellerweg D, von Keudell A (2012): Quadrupole mass spectrometry of reactive plasmas. *J Phys D Appl Phys* 45, 403001
- Benoist C, Mathis D (2002): Mast cells in autoimmune disease. *Nature* 420, 875-878
- Berge TLL, Lygre GB, Lie SA, Lindh CH, Björkman L (2019): Bisphenol A in human saliva and urine before and after treatment with dental polymer-based restorative materials. *Eur J Oral Sci* 127, 435-444
- Bergman A, Brandt I, Brouwer A, Harrison P, Holmes P, Humfrey C, Keiding N, Randall G, Sharpe R, Skakkebaek N: European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife: 2-4 December 1996, Weybridge UK, Report of Proceedings. Environment and Climate Research Programme of DG XII, European Commission 1997

- Bettencourt AF, Neves CB, de Almeida MS, Pinheiro LM, Oliveira SA, Lopes LP, Castro MF (2010): Biodegradation of acrylic based resins: A review. *Dent Mater* 26, 171-180
- Bianchi F, Riboni N, Termopoli V, Mendez L, Medina I, Ilag L, Cappiello A, Careri M (2018): MS-based analytical techniques: advances in spray-based methods and EI-LC-MS applications. *J Anal Methods Chem* 2018, 1308167-1308167
- Bijelic-Donova J, Garoushi S, Lassila LVJ, Vallittu PK (2015): Oxygen inhibition layer of composite resins: effects of layer thickness and surface layer treatment on the interlayer bond strength. *Eur J Oral Sci* 123, 53-60
- Bisphenol A Analytical Research Task Group (2002): Analytical method criteria for the determination of bisphenol A in various matrices. <http://www.bisphenol-a.org/pdf/criteria102002.pdf>; abgerufen am 02.01.2018
- Boeckler AF, Senke A (2006): Die erfolgreiche Herstellung direkt gefertigter provisorischer Restaurationen. *ZWR* 115, 569-573
- Bohnert T, Gan LS (2013): Plasma protein binding: from discovery to development. *J Pharm Sci* 102, 2953-2994
- Borghei YS, Hosseinkhani S (2020): Colorimetric assay of apoptosis through in-situ biosynthesized gold nanoparticles inside living breast cancer cells. *Talanta* 208, 120463
- Bourbia M, Ma D, Cvitkovitch DG, Santerre JP, Finer Y (2013): Cariogenic bacteria degrade dental resin composites and adhesives. *J Dent Res* 92, 989-994
- Bowen RL. (1962). Dental filling material comprising vinyl silane-treated fused silica and a binder consisting of a reaction product of bisphenol and glycidylmethacrylate. USA Patentnummer: 3066112. United States Patent and Trademark Office.
- Brasch J (2004): Mundschleimhaut und Kontaktallergie. *Allergo J* 13, 191-197
- Brüggemann L, Quapp W, Wennrich R (2006): Test for non-linearity concerning linear calibrated chemical measurements. *Accredit Qual Assur* 11, 625-631
- Bruno KF, Silva JA, Silva TA, Batista AC, Alencar AHG, Estrela C (2010): Characterization of inflammatory cell infiltrate in human dental pulpitis. *Int Endod J* 43, 1013-1021
- Brzovic Rajic V, Zeljezic D, Malcic Ivanisevic A, Verzak Z, Baraba A, Miletic I (2018): Cytotoxicity and genotoxicity of resin based dental materials in human lymphocytes in vitro. *Acta Clin Croat* 57, 278-285
- Burke FJ, Murray MC, Shortall AC (2005): Trends in indirect dentistry: 6. Provisional restorations, more than just a temporary. *Dent Update* 32, 443-452

- Burns DR, Beck DA, Nelson SK (2003): A review of selected dental literature on contemporary provisional fixed prosthodontic treatment: report of the Committee on Research in Fixed Prosthodontics of the Academy of Fixed Prosthodontics. *J Prosthet Dent* 90, 474-497
- Ca D, O'Donnell ME, Musial BA, Bretz SL, Danielson ND (2009): Investigating the retention mechanisms of liquid chromatography using solid-phase extraction cartridges. *J Chem Educ* 86, 60
- Calafat AM, Kuklennyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL (2005): Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect* 113, 391-395
- Caldas IP, Alves GG, Barbosa IB, Scelza P, de Noronha F, Scelza MZ (2019): In vitro cytotoxicity of dental adhesives: a systematic review. *Dent Mater* 35, 195-205
- Cannon JM, Kostoryz E, Russo KA, Smith RE, Yourtee DM (2000): Bisphenol A and its biomaterial monomer derivatives alteration of in vitro cytochrome P450 metabolism in rat, minipig, and human. *Biomacromolecules* 1, 656-664
- Cebe MA, Cebes F, Cengiz MF, Cetin AR, Arpag OF, Ozturk B (2015): Elution of monomer from different bulk fill dental composite resins. *Dent Mater* 31, 141-149
- Cech NB, Enke CG (2001): Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom Rev* 20, 362-387
- Cerkvenik-Flajs V (2020): Bisphenol A background contamination encountered during advanced blood sampling and laboratory analysis. *Int J Environ Anal Chem*, 1-11
- Chang HH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, Chan CP, Wang TM, Lin PS, Jeng JH (2012): Effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cytotoxicity, cyclooxygenase-2 expression and prostanooids production in human dental pulp cells. *Int Endod J* 45, 848-858
- Chang HH, Chang MC, Lin LD, Lee JJ, Wang TM, Huang CH, Yang TT, Lin HJ, Jeng JH (2010): The mechanisms of cytotoxicity of urethane dimethacrylate to Chinese hamster ovary cells. *Biomaterials* 31, 6917-6925
- Chang HH, Chang MC, Wang HH, Huang GF, Lee YL, Wang YL, Chan CP, Yeung SY, Tseng SK, Jeng JH (2014): Urethane dimethacrylate induces cytotoxicity and regulates cyclooxygenase-2, hemeoxygenase and carboxylesterase expression in human dental pulp cells. *Acta Biomater* 10, 722-731
- Chang MC, Lin LD, Chan CP, Chang HH, Chen LI, Lin HJ, Yeh HW, Tseng WY, Lin PS, Lin CC, et al. (2009): The effect of BisGMA on cyclooxygenase-2 expression, PGE2 production and cytotoxicity via reactive oxygen species- and MEK/ERK-dependent and -independent pathways. *Biomaterials* 30, 4070-4077

- Chen F, Wu T, Cheng X (2014): Cytotoxic effects of denture adhesives on primary human oral keratinocytes, fibroblasts and permanent L929 cell lines. *Gerodontology* 31, 4-10
- Chen L, Li N, Liu Y, Faquet B, Alépée N, Ding C, Eilstein J, Zhong L, Peng Z, Ma J, et al. (2021): A new 3D model for genotoxicity assessment: EpiSkin™ Micronucleus Assay. *Mutagenesis* 36, 51-61
- Chen L, Suh BI (2013): Bisphenol A in dental materials: a review. *JSM Dent* 1, 1004
- Christensen GJ (2003): The fastest and best provisional restorations. *J Am Dent Assoc* 134, 637-639
- Christensen GJ (2004): Making provisional restorations easy, predictable and economical. *J Am Dent Assoc* 135, 625-627
- Ciapetti G, Granchi D, Verri E, Savarino L, Cavedagna D, Pizzoferrato A (1996): Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. *Biomaterials* 17, 1259-1264
- Circu ML, Aw TY (2010): Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48, 749-762
- Cirlini M, Dall'Asta C, Galaverna G (2012): Hyphenated chromatographic techniques for structural characterization and determination of masked mycotoxins. *J Chromatogr A* 1255, 145-152
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2013): Measurement procedure comparison and bias estimation using patient samples; approved Guideline—Third Edition. https://clsi.org/media/1435/ep09a3_sample.pdf; abgerufen am 03.05.2020
- Comisi JC (2015): Provisional materials: advances lead to extensive options for clinicians. *Compend Contin Educ Dent* 36, 56-59
- Coombs RRA, Gell PGH: The classification of allergic reactions underlying disease. In: Coombs RRA, Gell PGH (Hrsg.): *Clinical aspects of immunology*. F.A. Davis, Philadelphia 1963, 317-337
- Cuadros-Rodríguez L, Bagur-González MG, Sánchez-Vinas M, González-Casado A, Gómez-Sáez AM (2007): Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences. *J Chrom A* 1158, 33-46
- Cuadros-Rodríguez L, Gámiz-Gracia L, Almansa-López EM, Bosque-Sendra JM (2001): Calibration in chemical measurement processes. II. A methodological approach. *Trends Anal Chem* 20, 620-636
- Darvell BW: Resin restorative materials. In: Darvell BW (Hrsg.): *Materials Science for Dentistry*. Woodhead Publishing, Cambridge 2018, 143-191

- de Brito O, de Oliveira I, Monteiro G (2019): Hydrolytic and biological degradation of bulk-fill and self-adhering resin composites. *Oper Dent* 44, 223-233
- de Gomes PS, Figueiral MH, Fernandes MH, Scully C (2011): Cytotoxicity of denture adhesives. *Clin Oral Investig* 15, 885-893
- De Nys S, Putzeys E, Vervliet P, Covaci A, Boonen I, Elskens M, Vanoirbeek J, Godderis L, Van Meerbeek B, Van Landuyt KL, et al. (2018): A novel high sensitivity UPLC-MS/MS method for the evaluation of bisphenol A leaching from dental materials. *Sci Rep* 8, 6981
- Delaviz Y, Finer Y, Santerre JP (2014): Biodegradation of resin composites and adhesives by oral bacteria and saliva: a rationale for new material designs that consider the clinical environment and treatment challenges. *Dent Mater* 30, 16-32
- Demirci M, Hiller KA, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H (2008): The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. *Dent Mater* 24, 362-371
- Derbabian K, Marzola R, Donovan TE, Cho GC, Arcidiacono A (2000): The science of communicating the art of esthetic dentistry. Part II: diagnostic provisional restorations. *J Esthet Restor Dent* 12, 238-247
- Derchi G, Vano M, Barone A, Covani U, Diaspro A, Salerno M (2017): Bacterial adhesion on direct and indirect dental restorative composite resins: an in vitro study on a natural biofilm. *J Prosthet Dent* 117, 669-676
- Descotes J, Choquet-Kastylevsky G (2001): Gell and Coombs's classification: is it still valid? *Toxicology* 158, 43-49
- Deviot M, Lachaise I, Högg C, Durner J, Reichl FX, Attal JP, Dursun E (2018): Bisphenol A release from an orthodontic resin composite: a GC/MS and LC/MS study. *Dent Mater* 34, 341-354
- Dhayanithi NB, Kumar TT, Kathiresan K (2010): Effect of neem extract against the bacteria isolated from marine fish. *J Environ Biol* 31, 409-412
- Díaz-Cruz MS, López de Alda MJ, López R, Barceló D (2003): Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS). *J Mass Spectrom* 38, 917-923
- Domon B, Aebersold R (2006): Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 312, 212-217
- Donaldson D (1973): Gingival recession associated with temporary crowns. *J Periodontol* 44, 691-696
- Dong MW: HPLC instrumentation and trends. In: Dong MW (Hrsg.): *Modern HPLC for Practicing Scientists*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey 2006, 77-124

- Downward J (2004): PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol* 15, 177-182
- Dumbrigue HB (2003): Composite indirect-direct method for fabricating multiple-unit provisional restorations. *J Prosthet Dent* 89, 86-88
- Durner J, Schrickel K, Watts DC, Ilie N (2015): Determination of homologous distributions of bisEMA dimethacrylates in bulk-fill resin-composites by GC-MS. *Dent Mater* 31, 473-480
- Durner J, Spahl W, Zaspel J, Schweikl H, Hickel R, Reichl FX (2010): Eluted substances from unpolymerized and polymerized dental restorative materials and their Nernst partition coefficient. *Dent Mater* 26, 91-99
- Durner J, Wellner P, Hickel R, Reichl FX (2012): Synergistic interaction caused to human gingival fibroblasts from dental monomers. *Dent Mater* 28, 818-823
- Eckhardt A, Gerstmayr N, Hiller KA, Bolay C, Waha C, Spagnuolo G, Camargo C, Schmalz G, Schweikl H (2009a): TEGDMA-induced oxidative DNA damage and activation of ATM and MAP kinases. *Biomaterials* 30, 2006-2014
- Eckhardt A, Harorli T, Limtanyakul J, Hiller KA, Bosl C, Bolay C, Reichl FX, Schmalz G, Schweikl H (2009b): Inhibition of cytokine and surface antigen expression in LPS-stimulated murine macrophages by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials* 30, 1665-1674
- EFSA Panel on Food Contact Materials Enzymes Flavourings and Processing Aids (CEF) (2015): Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA J* 13, 3978-4001
- El-Aneed A, Cohen A, Banoub J (2009): Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Appl Spectrosc Rev* 44, 210-230
- Eldeniz AU, Shehata M, Högg C, Reichl FX (2016): DNA double-strand breaks caused by new and contemporary endodontic sealers. *Int Endod J* 49, 1141-1151
- Eliades GC, Vougiouklakis GJ, Caputo AA (1987): Degree of double bond conversion in light-cured composites. *Dent Mater* 3, 19-25
- Eliuk S, Makarov A (2015): Evolution of orbitrap mass spectrometry instrumentation. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* 8, 61-80
- Elobeid MA, Allison DB (2008): Putative environmental-endocrine disruptors and obesity: a review. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 15, 403-408
- Emmler J, Seiss M, Kreppel H, Reichl FX, Hickel R, Kehe K (2008): Cytotoxicity of the dental composite component TEGDMA and selected metabolic by-products in human pulmonary cells. *Dent Mater* 24, 1670-1675

- Engelmann J, Janke V, Volk J, Leyhausen G, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Geurtsen W (2004): Effects of BisGMA on glutathione metabolism and apoptosis in human gingival fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 25, 4573-4580
- Engelmann J, Leyhausen G, Leibfritz D, Geurtsen W (2002): Effect of TEGDMA on the intracellular glutathione concentration of human gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 63, 746-751
- Engler MLPD, Güth JF, Keul C, Erdelt K, Edelhoff D, Liebermann A (2020): Residual monomer elution from different conventional and CAD/CAM dental polymers during artificial aging. *Clin Oral Investig* 24, 277-284
- English J, Pearson G, Wilsbacher J, Swantek J, Karandikar M, Xu S, Cobb MH (1999): New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res* 253, 255-270
- Eramo S, Urbani G, Sfasciotti GL, Brugnoletti O, Bossù M, Polimeni A (2010): Estrogenicity of bisphenol A released from sealants and composites: a review of the literature. *Ann Stomatol (Roma)* 1, 14-21
- Europäische Arzneimittel-Agentur (2011): Guideline on bioanalytical method validation. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf; abgerufen am 04.01.2022
- Europäische Kommission (2002): 2002/657/EC: Commission decision of 12 August 2002 implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (Text with EEA relevance) (notified under document number C(2002) 3044). <https://op.europa.eu/de/publication-detail/-/publication/ed928116-a955-4a84-b10a-cf7a82bad858/language-en>; abgerufen am 04.08.2021
- Exarchou V, Fiamegos YC, van Beek TA, Nanos C, Vervoort J (2006): Hyphenated chromatographic techniques for the rapid screening and identification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants. *J Chromatogr A* 1112, 293-302
- Fan PL, Meyer DM (2007): FDI report on adverse reactions to resin-based materials. *Int Dent J* 57, 9-12
- Federick DR (1975): The provisional fixed partial denture. *J Prosthet Dent* 34, 520-526
- Feller L, Wood NH, Khammissa RA, Lemmer J (2017): Review: allergic contact stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 123, 559-565
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64-71
- Ferracane JL (1994): Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil* 21, 441-452

- Ferracane JL (2006): Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater* 22, 211-222
- Ferracane JL (2011): Resin composite—state of the art. *Dent Mater* 27, 29-38
- Ferracane JL, Condon JR (1990): Rate of elution of leachable components from composite. *Dent Mater* 6, 282-287
- Ferracane JL, Greener EH (1986): The effect of resin formulation on the degree of conversion and mechanical properties of dental restorative resins. *J Biomed Mater Res* 20, 121-131
- Fic A, Žegura B, Gramec D, Mašič LP (2014): Estrogenic and androgenic activities of TBBA and TBMEPH, metabolites of novel brominated flame retardants, and selected bisphenols, using the XenoScreen XL YES/YAS assay. *Chemosphere* 112, 362-369
- Finer Y, Jaffer F, Santerre JP (2004): Mutual influence of cholesterol esterase and pseudocholinesterase on the biodegradation of dental composites. *Biomaterials* 25, 1787-1793
- Finer Y, Santerre JP (2004): Salivary esterase activity and its association with the biodegradation of dental composites. *J Dent Res* 83, 22-26
- Finger WJ, Lee KS, Podszun W (1996): Monomers with low oxygen inhibition as enamel/dentin adhesives. *Dent Mater* 12, 256-261
- Fleisch AF, Sheffield PE, Chinn C, Edelstein BL, Landrigan PJ (2010): Bisphenol A and related compounds in dental materials. *Pediatrics* 126, 760-768
- Floyd CJ, Dickens SH (2006): Network structure of Bis-GMA- and UDMA-based resin systems. *Dent Mater* 22, 1143-1149
- Food and Drug Administration (2015): Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf>; abgerufen am 05.12.2019
- Forman HJ, Zhang H, Rinna A (2009): Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Asp Med* 30, 1-12
- Fox SD, Falk RT, Veenstra TD, Issaq HJ (2011): Quantitation of free and total bisphenol A in human urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Sep Sci* 34, 1268-1274
- Frese C, Decker C, Rebholz J, Stucke K, Staehle HJ, Wolff D (2014): Original and repair bond strength of fiber-reinforced composites in vitro. *Dent Mater* 30, 456-462
- Fukushima S, Kinoshita A, Puatanachokchai R, Kushida M, Wanibuchi H, Morimura K (2005): Hormesis and dose-response-mediated mechanisms in carcinogenesis: evidence for a threshold in carcinogenicity of non-genotoxic carcinogens. *Carcinogenesis* 26, 1835-1845

- Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM (2008): The development of allergic inflammation. *Nature* 454, 445-454
- Gallorini M, Petzel C, Bolay C, Hiller KA, Cataldi A, Buchalla W, Krifka S, Schweikl H (2015): Activation of the Nrf2-regulated antioxidant cell response inhibits HEMA-induced oxidative stress and supports cell viability. *Biomaterials* 56, 114-128
- Gawkrodger DJ (2005): Investigation of reactions to dental materials. *Br J Dermatol* 153, 479-485
- Geens T, Roosens L, Neels H, Covaci A (2009): Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium. *Chemosphere* 76, 755-760
- Geurtsen W (2000): Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med* 11, 333-355
- Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G (1998a): Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res* 41, 474-480
- Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G (1998b): Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. *J Dent Res* 77, 2012-2019
- Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G (1999): Variability of cytotoxicity and leaching of substances from four light-curing pit and fissure sealants. *J Biomed Mater Res* 44, 73-77
- Gilroy DW, Colville-Nash PR (2000): New insights into the role of COX 2 in inflammation. *J Mol Med* 78, 121-129
- Ginzkey C, Zinnitsch S, Steussloff G, Koehler C, Hackenberg S, Hagen R, Kleinsasser NH, Froelich K (2015): Assessment of HEMA and TEGDMA induced DNA damage by multiple genotoxicological endpoints in human lymphocytes. *Dent Mater* 31, 865-876
- Glish GL, Vachet RW (2003): The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov* 2, 140-150
- Goldberg M (2008): In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investig* 12, 1-8
- González AG, Herrador MÁ (2007): A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends Anal Chem* 26, 227-238
- Goodman JR (1984): Fractured composite restoration embedded in the lip. *Br Dent J* 156, 293-294
- Goon ATJ, Isaksson M, Zimerson E, Goh CL, Bruze M (2006): Contact allergy to (meth)acrylates in the dental series in southern Sweden: simultaneous positive patch test reaction patterns and possible screening allergens. *Contact Derm.* 55, 219-226

- Gould JC, Leonard LS, Maness SC, Wagner BL, Conner K, Zacharewski T, Safe S, McDonnell DP, Gaido KW (1998): Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 142, 203-214
- Gowda GAN, Djukovic D (2014): Overview of mass spectrometry-based metabolomics: opportunities and challenges. *Methods Mol Biol* 1198, 3-12
- Grajower R, Shaharbani S, Kaufman E (1979): Temperature rise in pulp chamber during fabrication of temporary self-curing resin crowns. *J Prosthet Dent* 41, 535-540
- Gregson K, Beiswanger A, Platt J (2008): The impact of sorption, buffering, and proteins on leaching of organic and inorganic substances from dental resin core material. *J Biomed Mater Res A* 84, 256-264
- Gross JH: Massenspektrometer. In: Gross JH (Hrsg.): *Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch*. Springer Spektrum, Heidelberg 2013, 129-233
- Guart A, Bono-Blay F, Borrell A, Lacorte S (2011): Migration of plasticizers phthalates, bisphenol A and alkylphenols from plastic containers and evaluation of risk. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 28, 676-685
- Guermontprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S (2002): Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20, 621-667
- Gul P, Karatas O, Alp HH, Cam IB, Ozakar-Ilday N (2019): Monomer release from nanohybrid composites after bleaching. *J Oral Sci* 61, 351-357
- Gul P, Senol O, Yaman ME, Kadioglu Y (2016): Quantification and identification of components released from dental composites using different chromatographic techniques. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 39, 581-586
- Hagio M, Kawaguchi M, Motokawa W, Miyazaki K (2006): Degradation of methacrylate monomers in human saliva. *Dent Mater J* 25, 241-246
- Hajslova J, Zrostlikova J (2003): Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. *J Chromatogr A* 1000, 181-197
- Hallstrom U (1993): Adverse reaction to a fissure sealant: report of case. *ASDC J Dent Child* 60, 143-146
- Hammer B, Hotz P (1979): Inspection of 1 to 5-year-old amalgam, composite, and cast gold fillings. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* 89, 301-314
- Han D, Hanawa N, Saberi B, Kaplowitz N (2006): Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291, G1-7

- Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG (1991): Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res* 70, 1450-1455
- Hanks CT, Wataha JC, Sun Z (1996): In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater* 12, 186-193
- Hansasuta C, Neiders ME, Aguirre A, Cohen RE (1993): Cellular inflammatory responses to direct restorative composite resins. *J Prosthet Dent* 69, 611-616
- Hansel C, Leyhausen G, Mai UE, Geurtsen W (1998): Effects of various resin composite (co)monomers and extracts on two caries-associated micro-organisms in vitro. *J Dent Res* 77, 60-67
- Hardman M, Makarov AA (2003): Interfacing the orbitrap mass analyzer to an electrospray ion source. *Anal Chem* 75, 1699-1705
- Hashimoto Y, Nakamura M (2000): Estrogenic activity of dental materials and bisphenol-A related chemicals in vitro. *Dent Mater J* 19, 245-262
- Hasturk H, Kantarci A, Van Dyke TE (2012): Oral inflammatory diseases and systemic inflammation: role of the macrophage. *Front Immunol* 3, 118-118
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2004): Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 51-88
- He Y, Hou W, Thompson M, Holovics H, Hobson T, Jones MT (2014): Size exclusion chromatography of polysaccharides with reverse phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1323, 97-103
- Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, Vanparys P, MacGregor JT (1991): Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ Mol Mutagen* 18, 277-291
- Hemström P, Irgum K (2006): Hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci* 29, 1784-1821
- Hernández F, Sancho JV, Ibáñez M, Abad E, Portolés T, Mattioli L (2012): Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Anal Bioanal Chem* 403, 1251-1264
- Hervas-Garcia A, Martinez-Lozano MA, Cabanes-Vila J, Barjau-Escribano A, Fos-Galve P (2006): Composite resins. A review of the materials and clinical indications. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11, 215-220
- Hickel R: Spezielle Toxikologie - Allergie durch Zahnfüllungsmaterialien. In: Reichl FX, Mohr K, Hein L, Hickel R (Hrsg.): Taschenatlas der Pharmakologie und Toxikologie für Zahnmediziner. Thieme, Stuttgart 2007, 256-257

- Higton DM, Oxford JM (1995): Mass spectrometry: pharmaceutical sciences. *Appl Spectrosc Rev* 30, 81-118
- Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW, Ng KF, Suen MWM, Tai HL (2003): Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev* 24, 3-12
- Hofmann N, Renner J, Hugo B, Klaiber B (2002): Elution of leachable components from resin composites after plasma arc vs standard or soft-start halogen light irradiation. *J Dent* 30, 223-232
- Holcapek M, Kolárová L, Nobilis M (2008): High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Anal Bioanal Chem* 391, 59-78
- Holt RM, Newman MJ, Pullen FS, Richards DS, Swanson AG (1997): High-performance liquid chromatography/NMR spectrometry/mass spectrometry: further advances in hyphenated technology. *J Mass Spectrom* 32, 64-70
- Honeycutt JA, Nguyen JQT, Kentner AC, Brenhouse HC (2017): Effects of Water Bottle Materials and Filtration on Bisphenol A Content in Laboratory Animal Drinking Water. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 56, 269-272
- Honour JW (2011): Development and validation of a quantitative assay based on tandem mass spectrometry. *Ann Clin Biochem* 48, 97-111
- Hope E, Reed DR, Moilanen LH (2016): Potential confounders of bisphenol-a analysis in dental materials. *Dent Mater* 32, 961-967
- Howdeshell KL, Peterman PH, Judy BM, Taylor JA, Orazio CE, Ruhlen RL, Vom Saal FS, Welshons WV (2003): Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environ Health Perspect* 111, 1180-1187
- Hsu WY, Wang VS, Lai CC, Tsai FJ (2012): Simultaneous determination of components released from dental composite resins in human saliva by liquid chromatography/multiple-stage ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis* 33, 719-725
- Hu YL, Chen ZP, Chen Y, Shi CX, Yu RQ (2016): Generalized multiple internal standard method for quantitative liquid chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1445, 112-117
- Huang FM, Chang YC, Lee SS, Yeh CH, Lee KG, Huang YC, Chen CJ, Chen WY, Pan PH, Kuan YH (2016): BisGMA-induced cytotoxicity and genotoxicity in macrophages are attenuated by wogonin via reduction of intrinsic caspase pathway activation. *Environ Toxicol* 31, 176-184
- Huang FM, Chou MY, Chang YC (2003): Dentin bonding agents induce c-fos and c-jun protooncogenes expression in human gingival fibroblasts. *Biomaterials* 24, 157-163

- Ikejima I, Nomoto R, McCabe JF (2003): Shear punch strength and flexural strength of model composites with varying filler volume fraction, particle size and silanation. *Dent Mater* 19, 206-211
- Ikemura K, Endo T (2010): A review of the development of radical photopolymerization initiators used for designing light-curing dental adhesives and resin composites. *Dent Mater J* 29, 481-501
- Ilie N (2017): Neue Komposite–werkstoffkundliche und klinische Bewertung. *Zahnmedizin up2date* 11, 247-263
- Ilie N, Hickel R (2011): Resin composite restorative materials. *Aust Dent J* 56, 59-66
- Ilie N, Kunzelmann KH, Hickel R (2005): Werkstoffkundliche Untersuchungen zu Kompositen. *Dtsch Zahnärztl Z* 60
- Ilie N, Obermaier J, Durner J (2014): Effect of modulated irradiation time on the degree of conversion and the amount of elutable substances from nano-hybrid resin-based composites. *Clin Oral Investig* 18, 97-106
- Imazato S, Horikawa D, Nishida M, Ebisu S (2009): Effects of monomers eluted from dental resin restoratives on osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 88, 378-386
- Inoue K, Hayashi I (1982): Residual monomer (Bis-GMA) of composite resins. *J Oral Rehabil* 9, 493-497
- ISO (1996): ISO 11095:1996 Linear calibration using reference materials. <https://www.iso.org/standard/1060.html>; abgerufen am 05.06.2020
- ISO (2012): ISO 10993-12:2012 - Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials. <https://www.iso.org/standard/75769.html>; abgerufen am 05.06.2020
- ISO (2015): ISO Guide 33: 2015 Reference materials - Good practice in using reference materials. <https://www.iso.org/standard/46212.html>; abgerufen am 05.06.2020
- ISO (2019): ISO 4049:2019: Dentistry — Polymer-based restorative materials. <https://www.iso.org/standard/67596.html>; abgerufen am 05.06.2020
- Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ (2004): Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dent Mater* 20, 12-20
- Jiang F, Liu Q, Li Q, Zhang S, Qu X, Zhu J, Zhong G, Huang M (2020): Signal drift in liquid chromatography tandem mass spectrometry and its internal standard calibration strategy for quantitative analysis. *Anal Chem* 92, 7690-7698

- Jiao Y, Ma S, Wang Y, Li J, Shan L, Liu Q, Liu Y, Song Q, Yu F, Yu H, et al. (2016): N-acetyl cysteine depletes reactive oxygen species and prevents dental monomer-induced intrinsic mitochondrial apoptosis in vitro in human dental pulp cells. *PLOS ONE* 11, e0147858
- Joda T, Pieger S, Heydecke G (2009): Kronen-und Brückenprovisorien. *Zahnmedizin up2date* 3, 515-536
- Jones DP (2006): Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8, 1865-1879
- Kadoma Y, Tanaka M (2000): Acid and base-catalyzed hydrolysis of bisphenol A-related compounds. *Dent Mater* 19, 139-152
- Kajiya M, Giro G, Taubman MA, Han X, Mayer MPA, Kawai T (2010): Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. *J Oral Microbiol* 2, 5532
- Kaltenböck K: Grundlagen der Chromatographie. In: Kaltenböck K (Hrsg.): *Chromatographie für Einsteiger*. Wiley-VCH, Weinheim 2008, 1-9
- Kamel A, Prakash C (2006): High performance liquid chromatography/atmospheric pressure ionization/tandem mass spectrometry (HPLC/API/MS/MS) in drug metabolism and toxicology. *Curr Drug Metab* 7, 837-852
- Karmaker A, Prasad A, Sarkar NK (2007): Characterization of adsorbed silane on fillers used in dental composite restoratives and its effect on composite properties. *J Mater Sci Mater Med* 18, 1157-1162
- Kaufmann A, Butcher P, Maden K, Walker S, Widmer M (2010): Comprehensive comparison of liquid chromatography selectivity as provided by two types of liquid chromatography detectors (high resolution mass spectrometry and tandem mass spectrometry): "where is the crossover point?". *Anal Chim Acta* 673, 60-72
- Kawai K, Urano M (2001): Adherence of plaque components to different restorative materials. *Oper Dent* 26, 396-400
- Kazakevich Y, LoBrutto R: Introduction. In: Kazakevich Y, LoBrutto R (Hrsg.): *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey 2006, 3-24
- Kechagias K, Anastasaki P, Kyriakidou M, Dedi KD (2020): Bisphenol A in dentistry. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 28, 3-9
- Kerby RE, Knobloch LA, Schricker S, Gregg B (2009): Synthesis and evaluation of modified urethane dimethacrylate resins with reduced water sorption and solubility. *Dent Mater* 25, 302-313

- Khalichi P, Singh J, Cvitkovitch DG, Santerre JP (2009): The influence of triethylene glycol derived from dental composite resins on the regulation of *Streptococcus mutans* gene expression. *Biomaterials* 30, 452-459
- Kim JS, Choi YH, Cho BH, Son HH, Lee IB, Um CM, Kim CK (2006): Effect of light-cure time of adhesive resin on the thickness of the oxygen-inhibited layer and the microtensile bond strength to dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 78, 115-123
- Kirkland D, Pfuhrer S, Tweats D, Aardema M, Corvi R, Darroudi F, Elhajouji A, Glatt H, Hastwell P, Hayashi M, et al. (2007): How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. *Mutat Res* 628, 31-55
- Kiyama R, Wada-Kiyama Y (2015): Estrogenic endocrine disruptors: molecular mechanisms of action. *Environ Int* 83, 11-40
- Kleinsasser NH, Schmid K, Sassen AW, Harréus UA, Staudenmaier R, Folwaczny M, Glas J, Reichl FX (2006): Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay. *Biomaterials* 27, 1762-1770
- Kleinsasser NH, Wallner BC, Harréus UA, Kleinjung T, Folwaczny M, Hickel R, Kehe K, Reichl FX (2004): Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *J Dent* 32, 229-234
- Kloukos D, Pandis N, Eliades T (2013): Bisphenol-A and residual monomer leaching from orthodontic adhesive resins and polycarbonate brackets: a systematic review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 143, 104-112
- Koin PJ, Kilislioglu A, Zhou M, Drummond JL, Hanley L (2008): Analysis of the degradation of a model dental composite. *J Dent Res* 87, 661-665
- Kolch W, Neususs C, Pelzing M, Mischak H (2005): Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a powerful tool in clinical diagnosis and biomarker discovery. *Mass Spectrom Rev* 24, 959-977
- Komurcuoglu E, Olmez S, Vural N (2005): Evaluation of residual monomer elimination methods in three different fissure sealants in vitro. *J Oral Rehabil* 32, 116-121
- Konishi N, Torii Y, Kurosaki A, Takatsuka T, Itota T, Yoshiyama M (2003): Confocal laser scanning microscopic analysis of early plaque formed on resin composite and human enamel. *J Oral Rehabil* 30, 790-795
- Kopf M, Bachmann MF, Marsland BJ (2010): Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nat Rev Drug Discov* 9, 703-718

- Koppelaar DW, Barinaga CJ, Denton MB, Sperline RP, Hieftje GM, Schilling GD, Andrade FJ, Barnes JH, Iv IV (2005): MS detectors. *Anal Chem* 77, 418-427
- Kościelniak P, Kozak J (2006): Review of univariate standard addition calibration procedures in flow analysis. *Crit Rev Anal Chem* 36, 27-40
- Kostoryz EL, Eick JD, Glaros AG, Judy BM, Welshons WV, Burmaster S, Yourtee DM (2003): Biocompatibility of hydroxylated metabolites of BISGMA and BFDGE. *J Dent Res* 82, 367-371
- Kostoryz EL, Wetmore LA, Brockmann WG, Yourtee DM, Eick JD (2004): Genotoxicity assessment of oxirane-based dental monomers in mammalian cells. *J Biomed Mater Res A* 68, 660-667
- Kotsailidi EA, Kalogirou EM, Michelogiannakis D, Vlachodimitropoulos D, Tosios KI (2020): Hypersensitivity reaction of the gingiva to chlorhexidine: case report and literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 130, 156-160
- Kraus D, Wolfgarten M, Enkling N, Helfgen E-H, Frentzen M, Probstmeier R, Winter J, Stark H (2017): In-vitro cytocompatibility of dental resin monomers on osteoblast-like cells. *J Dent* 65, 76-82
- Krifka S, Hiller KA, Bolay C, Petzel C, Spagnuolo G, Reichl FX, Schmalz G, Schweikl H (2012a): Function of MAPK and downstream transcription factors in monomer-induced apoptosis. *Biomaterials* 33, 740-750
- Krifka S, Hiller KA, Spagnuolo G, Jewett A, Schmalz G, Schweikl H (2012b): The influence of glutathione on redox regulation by antioxidant proteins and apoptosis in macrophages exposed to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). *Biomaterials* 33, 5177-5186
- Krifka S, Petzel C, Bolay C, Hiller KA, Spagnuolo G, Schmalz G, Schweikl H (2011): Activation of stress-regulated transcription factors by triethylene glycol dimethacrylate monomer. *Biomaterials* 32, 1787-1795
- Krifka S, Spagnuolo G, Schmalz G, Schweikl H (2013): A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials* 34, 4555-4563
- Krug RS (1975): Temporary resin crowns and bridges. *Dent Clin N Am* 19, 313-320
- Kuan YH, Huang FM, Lee SS, Li YC, Chang YC (2013): Bisgma stimulates prostaglandin E2 production in macrophages via cyclooxygenase-2, cytosolic phospholipase A2, and mitogen-activated protein kinases family. *PLOS One* 8, e82942

- Kuan YH, Li YC, Huang FM, Chang YC (2012): The upregulation of tumour necrosis factor- α and surface antigens expression on macrophages by bisphenol A-glycidyl-methacrylate. *Int Endod J* 45, 619-626
- Kurt A, Altintas SH, Kiziltas MV, Tekkeli SE, Guler EM, Kocyigit A, Usumez A (2018): Evaluation of residual monomer release and toxicity of self-adhesive resin cements. *Dent Mater J* 37, 40-48
- Kyranos JN, Lee H, Goetzinger WK, Li LY (2004): One-minute full-gradient HPLC/UV/ELSD/MS analysis to support high-throughput parallel synthesis. *J Comb Chem* 6, 796-804
- Kyriakis JM, Avruch J (2001): Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81, 807-869
- Langeland K, Langeland LK (1965): Pulp reactions to crown preparation, impression, temporary crown fixation, and permanent cementation. *J Prosthet Dent* 15, 129-143
- Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM (2008): Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol Lett* 176, 149-156
- Lech K, Jarosz M (2011): Novel methodology for the extraction and identification of natural dyestuffs in historical textiles by HPLC-UV-Vis-ESI MS. Case study: chasubles from the Wawel Cathedral collection. *Anal Bioanal Chem* 399, 3241-3251
- Lee DH, Kim NR, Lim BS, Lee YK, Yang HC (2009): Effects of TEGDMA and HEMA on the expression of COX-2 and iNOS in cultured murine macrophage cells. *Dent Mater* 25, 240-246
- Lee DH, Lim BS, Lee YK, Ahn SJ, Yang HC (2006): Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. *Dent Mater* 22, 1086-1092
- Leevers SJ, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD (1999): Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol* 11, 219-225
- Lefevre M, Bourd K, Lorient MA, Goldberg M, Beaune P, Périanin A, Stanislawski L (2004): TEGDMA modulates glutathione transferase P1 activity in gingival fibroblasts. *J Dent Res* 83, 914-919
- Lejonklou MH, Dunder L, Bladin E, Pettersson V, Rönn M, Lind L, Waldén TB, Lind PM (2017): Effects of low-dose developmental bisphenol a exposure on metabolic parameters and gene expression in male and female Fischer 344 rat offspring. *Environ Health Perspect* 125, 1-13

- Lempel E, Czibulya Z, Kovács B, Szalma J, Tóth Á, Kunsági-Máté S, Varga Z, Böddi K (2016): Degree of conversion and BisGMA, TEGDMA, UDMA elution from flowable bulk fill composites. *Int J Mol Sci* 17, 732
- Levy G (1976): Effects of plasma protein binding of drugs on duration and intensity of pharmacological activity. *J Pharm Sci* 65, 1264-1265
- Lewis JB, Rueggeberg FA, Lapp CA, Ergle JW, Schuster GS (1999): Identification and characterization of estrogen-like components in commercial resin-based dental restorative materials. *Clin Oral Investig* 3, 107-113
- Li D, Zhou Z, Qing D, He Y, Wu T, Miao M, Wang J, Weng X, Ferber JR, Herrinton LJ, et al. (2010): Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction. *Hum Reprod* 25, 519-527
- Li L, Wang Q, Zhang Y, Niu Y, Yao X, Liu H (2015): The molecular mechanism of bisphenol A (BPA) as an endocrine disruptor by interacting with nuclear receptors: insights from molecular dynamics (MD) simulations. *PLOS ONE* 10, e012033
- Li Y, Carrera C, Chen R, Li J, Lenton P, Rudney JD, Jones RS, Aparicio C, Fok A (2014): Degradation in the dentin-composite interface subjected to multi-species biofilm challenges. *Acta Biomater* 10, 375-383
- Liao C, Liu F, Guo Y, Moon HB, Nakata H, Wu Q, Kannan K (2012): Occurrence of eight bisphenol analogues in indoor dust from the United States and several Asian countries: implications for human exposure. *Environ Sci Technol* 46, 9138-9145
- Lim BS, Lee SJ, Lee JW, Ahn SJ (2008): Quantitative analysis of adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic raw materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 133, 882-888
- Lim CK, Lord G (2002): Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. *Biol Pharm Bull* 25, 547-557
- Lin L, Lin H, Zhang M, Dong X, Yin X, Qu C, Ni J (2015): Types, principle, and characteristics of tandem high-resolution mass spectrometry and its applications. *RSC Advances* 5, 107623-107636
- Lin PS, Cheng RH, Chang MC, Lee JJ, Chang HH, Huang WL, Yeung SY, Chang YY, Jeng JH (2017): TGF- β 1 stimulates cyclooxygenase-2 expression and PGE2 production of human dental pulp cells: role of ALK5/Smad2 and MEK/ERK signal transduction pathways. *J Formos Med Assoc* 116, 748-754
- Lind T, Lejonklou MH, Dunder L, Rasmusson A, Larsson S, Melhus H, Lind PM (2017): Low-dose developmental exposure to bisphenol A induces sex-specific effects in bone of Fischer 344 rat offspring. *Environ Res* 159, 61-68

- Loganathan SN, Kannan K (2011): Occurrence of bisphenol A in indoor dust from two locations in the eastern United States and implications for human exposures. *Arch Environ Contam Toxicol* 61, 68-73
- Lu SC (2009): Regulation of glutathione synthesis. *Mol Asp Med* 30, 42-59
- Luo S, Zhu W, Liu F, He J (2016): Preparation of a Bis-GMA-free dental resin system with synthesized fluorinated dimethacrylate monomers. *Int J Mol Sci* 17, 2014
- Lygre H, Høl PJ, Solheim E, Moe G (1999): Organic leachables from polymer-based dental filling materials. *Eur J Oral Sci* 107, 378-383
- Mahendran K, Padmini G, Murugesan R, Srikumar A (2016): Acute allergic angioedema of upper lip. *J Conserv Dent* 19, 285-288
- Majno G, Joris I (1995): Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146, 3-15
- Majors RE (2007): Current trends in HPLC column usage. *LCGC North Am* 25, 532-545
- Makarov A (2000): Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem* 72, 1156-1162
- Makarov A, Denisov E, Kholomeev A, Balschun W, Lange O, Strupat K, Horning S (2006): Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem* 78, 2113-2120
- Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, Yiu CK, Carrilho MR (2006): Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater* 22, 973-980
- Malkiewicz K, Owoc A, Kluska M, Grzech-Leśniak K, Turło J (2014): HPLC analysis of potentially harmful substances released from dental filing materials available on the EU market. *Ann Agr Env Med* 21, 86-90
- Malkiewicz K, Turło J, Marciniuk-Kluska A, Grzech-Leśniak K, Gašior M, Kluska M (2015): Release of bisphenol A and its derivatives from orthodontic adhesive systems available on the European market as a potential health risk factor. *Ann Agr Env Med* 22, 172-177
- 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. *Dent Mater* 19, 75-86
- Manhart J, Kunzelmann KH, Chen HY, Hickel R (2000): Mechanical properties of new composite restorative materials. *J Biomed Mater Res* 53, 353-361
- Manojlovic D, Dramićanin MD, Miletić V, Mitić-Ćulafić D, Jovanović B, Nikolić B (2017): Cytotoxicity and genotoxicity of a low-shrinkage monomer and monoacylphosphine oxide

- photoinitiator: comparative analyses of individual toxicity and combination effects in mixtures. *Dent Mater* 33, 454-466
- Manojlovic D, Radisic M, Vasiljevic T, Zivkovic S, Lausevic M, Miletic V (2011): Monomer elution from nanohybrid and ormocer-based composites cured with different light sources. *Dent Mater* 27, 371-378
- Marashdeh MQ, Gitalis R, Levesque C, Finer Y (2018): Enterococcus faecalis hydrolyzes dental resin composites and adhesives. *J Endod* 44, 609-613
- María PJ, Carolina MG, María Ángeles PB (2020): Understanding human salivary esterase activity and its variation under wine consumption conditions. *RSC Adv* 10, 24352 - 24361
- Mariappan TT, Jindal KC, Singh S (2004): Overestimation of rifampicin during colorimetric analysis of anti-tuberculosis products containing isoniazid due to formation of isonicotinyl hydrazone. *J Pharm Biomed Anal* 36, 905-908
- Mariotti A, Söderholm KJ, Johnson S (1998): The in vivo effects of bisGMA on murine uterine weight, nucleic acids and collagen. *Eur J Oral Sci* 106, 1022-1027
- Marquardt W, Seiss M, Hickel R, Reichl FX (2009): Volatile methacrylates in dental practices. *J Adhes Dent* 11, 101-107
- Martins CA, Leyhausen G, Geurtsen W, Volk J (2012): Intracellular glutathione: A main factor in TEGDMA-induced cytotoxicity? *Dent Mater* 28, 442-448
- Mathisen GH, Ansteinsson V, Samuelsen JT, Becher R, Dahl JE, Bølling AK (2015): TEGDMA and filler particles from dental composites additively attenuate LPS-induced cytokine release from the macrophage cell line RAW 264.7. *Clin Oral Investig* 19, 61-69
- McIntee EJ, Graham KJ, Colosky EC, Jakubowski HV (2015): A size exclusion chromatography laboratory with unknowns for introductory students. *J Chem Educ* 92, 2126-2129
- McKinney JE, Wu W (1985): Chemical softening and wear of dental composites. *J Dent Res* 64, 1326-1331
- Meyer VR: Detektoren. In: Meyer VR (Hrsg.): *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. Wiley-VCH, Weinheim 2008a, 84-108
- Meyer VR: Einleitung. In: Meyer VR (Hrsg.): *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. Wiley-VCH, Weinheim 2008b, 4-14
- Michelsen VB, Kopperud HBM, Lygre GB, Björkman L, Jensen E, Kleven IS, Svahn J, Lygre H (2012): Detection and quantification of monomers in unstimulated whole saliva after treatment with resin-based composite fillings in vivo. *Eur J Oral Sci* 120, 89-95

- Michelsen VB, Lygre H, Skålevik R, Tveit AB, Solheim E (2003): Identification of organic eluates from four polymer-based dental filling materials. *Eur J Clin Invest* 111, 263-271
- Michelsen VB, Moe G, Skålevik R, Jensen E, Lygre H (2007): Quantification of organic eluates from polymerized resin-based dental restorative materials by use of GC/MS. *J Chromatogr B* 850, 83-91
- Michelsen VB, Moe G, Strøm MB, Jensen E, Lygre H (2008): Quantitative analysis of TEGDMA and HEMA eluted into saliva from two dental composites by use of GC/MS and tailor-made internal standards. *Dent Mater* 24, 724-731
- Migliaccio M, Errico S, Diano N, Nicolucci C (2015): BPA Free Waters Essential to Perform Laboratory Studies. *J Chromatogr Sep Tech* 6, 1-3
- Miller JM: Liquid Chromatography in Columns. In: Miller JM (Hrsg.): *Chromatography: Concepts and Contrasts*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey 2009, 183-276
- Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME (2018): Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci* 63, 68-78
- Mittermuller P, Hiller KA, Schmalz G, Buchalla W (2018): Five hundred patients reporting on adverse effects from dental materials: frequencies, complaints, symptoms, allergies. *Dent Mater* 34, 1756-1768
- Mizrahi B (2019): Temporary restorations: the key to success. *Br Dent J* 226, 761-768
- Mobley JA, Brueggemeier RW (2004): Estrogen receptor-mediated regulation of oxidative stress and DNA damage in breast cancer. *Carcinogenesis* 25, 3-9
- Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R (2009): Biocompatibility of resin-based dental materials. *Materials* 2, 514-548
- Moharamzadeh K, Van Noort R, Brook IM, Scutt AM (2007): HPLC analysis of components released from dental composites with different resin compositions using different extraction media. *J Mater Sci Mater Med* 18, 133-137
- Moore DL, Barker BF (1986): A foreign body lesion of the gingiva subsequent to the placement of a composite resin restoration. *Quintessence Int* 17, 785-787
- Moraes LG, Rocha RS, Menegazzo LM, de Araújo EB, Yukimito K, Moraes JC (2008): Infrared spectroscopy: a tool for determination of the degree of conversion in dental composites. *J Appl Oral Sci* 16, 145-149
- Moreira MR, Matos LG, de Souza ID, Brigante TA, Queiroz ME, Romano FL, Nelson-Filho P, Matsumoto MA (2017): Bisphenol A release from orthodontic adhesives measured in vitro and in vivo with gas chromatography. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 151, 477-483

- Moszner N, Fischer UK, Angermann J, Rheinberger V (2008): A partially aromatic urethane dimethacrylate as a new substitute for Bis-GMA in restorative composites. *Dent Mater* 24, 694-699
- Moszner N, Salz U (2001): New developments of polymeric dental composites. *Prog Polym Sci* 26, 535-576
- Mourouzis P, Andreasidou E, Samanidou V, Tolidis K (2020): Short-term and long-term release of monomers from newly developed resin-modified ceramics and composite resin CAD-CAM blocks. *J Prosthet Dent* 123, 339-348
- Mousavinasab SM (2011): Biocompatibility of composite resins. *Dent Res J* 8, 21-29
- Müller B, Eisenträger A, Jahn-Dechent W, Dott W, Hollender J (2003): Effect of sample preparation on the in vitro genotoxicity of a light curable glass ionomer cement. *Biomaterials* 24, 611-617
- Müller H, Olsson S, Söderholm KJ (1997): The effect of comonomer composition, silane heating, and filler type on aqueous TEGDMA leachability in model resin composites. *Eur J Oral Sci* 105, 362-368
- Mulligan S, Kakonyi G, Moharamzadeh K, Thornton SF, Martin N (2018): The environmental impact of dental amalgam and resin-based composite materials. *Br Dent J* 224, 542-548
- Nakagawa Y, Tayama S (2000): Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol* 74, 99-105
- Nakanishi T, Shimizu H, Hosokawa Y, Matsuo T (2001): An immunohistological study on cyclooxygenase-2 in human dental pulp. *J Endod* 27, 385-388
- Nathan C (2002): Points of control in inflammation. *Nature* 420, 846-852
- Newbold RR, Padilla-Banks E, Snyder RJ, Phillips TM, Jefferson WN (2007): Developmental exposure to endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Reprod Toxicol* 23, 290-296
- Nihei T, Dabanoglu A, Teranaka T, Kurata S, Ohashi K, Kondo Y, Yoshino N, Hickel R, Kunzelmann KH (2008): Three-body-wear resistance of the experimental composites containing filler treated with hydrophobic silane coupling agents. *Dent Mater* 24, 760-764
- Niinimäki A, Rosberg J, Saari S (1983): Allergic stomatitis from acrylic compounds. *Contact Derm* 9, 148
- Nilsen BW, Jensen E, Örtengren U, Bang B, Michelsen VB (2019): Airborne exposure to gaseous and particle-associated organic substances in resin-based dental materials during restorative procedures. *Eur J Oral Sci* 127, 425-434

- Nocca G, Ragno R, Carbone V, Martorana GE, Rossetti DV, Gambarini G, Giardina B, Lupi A (2011): Identification of glutathione-methacrylates adducts in gingival fibroblasts and erythrocytes by HPLC-MS and capillary electrophoresis. *Dent Mater* 27, 87-98
- Noda M, Wataha JC, Lewis JB, Kaga M, Lockwood PE, Messer RL, Sano H (2005): Dental adhesive compounds alter glutathione levels but not glutathione redox balance in human THP-1 monocytic cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 73, 308-314
- Nugala B, Santosh K. B, Sahitya S, Krishna P (2012): Biologic width and its importance in periodontal and restorative dentistry. *J Conserv Dent* 15, 12-17
- Olea N, Pulgar R, Pérez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C (1996): Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 104, 298-305
- Oliveira EDC, Muller EI, Abad F, Dallarosa J, Adriano C (2010): Internal standard versus external standard calibration: an uncertainty case study of a liquid chromatography analysis. *Quim Nova* 33, 984-987
- Olms C, Yahiaoui-Doktor M, Remmerbach TW (2019): Contact allergies to dental materials. *Swiss Dent J* 129, 571-579
- Olsen JV, Macek B, Lange O, Makarov A, Horning S, Mann M (2007): Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat Methods* 4, 709-712
- Omurlu H, Arisu HD, Dalkilic EE, Tamer U, Torul H (2016): Investigation of eluted monomers from resin-based root canal sealer by high-performance liquid chromatography analysis. *Eur J Dent* 10, 92-96
- Örtengren U, Langer S, Göransson A, Lundgren T (2004): Influence of pH and time on organic substance release from a model dental composite: a fluorescence spectrophotometry and gas chromatography/mass spectrometry analysis. *Eur J Oral Sci* 112, 530-537
- Ouchi K, Watanabe S (2002): Measurement of bisphenol A in human urine using liquid chromatography with multi-channel coulometric electrochemical detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 780, 365-370
- Ozturk B, Cobanoglu N, Cetin AR, Gunduz B (2013): Conversion degrees of resin composites using different light sources. *Eur J Dent* 7, 102-109
- Palma P, Famiglini G, Trufelli H, Pierini E, Termopoli V, Cappiello A (2011): Electron ionization in LC-MS: recent developments and applications of the direct-EI LC-MS interface. *Anal Bioanal Chem* 399, 2683-2693
- Palomo F, Peden J (1976): Periodontal considerations of restorative procedures. *J Prosthet Dent* 36, 387-394

- Pan C, Liu F, Ji Q, Wang W, Drinkwater D, Vivilecchia R (2006): The use of LC/MS, GC/MS, and LC/NMR hyphenated techniques to identify a drug degradation product in pharmaceutical development. *J Pharm Biomed Anal* 40, 581-590
- Passos MLC, Saraiva MLMFS (2019): Detection in UV-visible spectrophotometry: detectors, detection systems, and detection strategies. *Measurement* 135, 896-904
- Patel KN, Patel JK, Patel MP, Rajput GC, Patel HA (2010): Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy. *Pharm. Methods* 1, 2-13
- Patlevič P, Vaškova J, Švorc PJ, Vaško L, Švorc P (2016): Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases. *Integr Med Res* 5, 250-258
- Patras M, Naka O, Doukoudakis S, Pissiotis A (2012): Management of provisional restorations' deficiencies: a literature review. *J Esthet Restor Dent* 24, 26-38
- Pelka M, Distler W, Petschelt A (1999): Elution parameters and HPLC-detection of single components from resin composite. *Clin Oral Investig* 3, 194-200
- Peng Y, Austin DE (2011): New approaches to miniaturizing ion trap mass analyzers. *Trends Anal Chem* 30, 1560-1567
- Peters FT (2011): Recent advances of liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Clin Biochem* 44, 54-65
- Pettini F, Savino M, Corsalini M, Cantore S, Ballini A (2015): Cytogenetic genotoxic investigation in peripheral blood lymphocytes of subjects with dental composite restorative filling materials. *J Biol Regul Homeost Agents* 29, 229-233
- Peutzfeldt A (1997): Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur J Oral Sci* 105, 97-116
- Phan AC, Tang ML, Nguyen JF, Ruse ND, Sadoun M (2014): High-temperature high-pressure polymerized urethane dimethacrylate-mechanical properties and monomer release. *Dent Mater* 30, 350-356
- Picó Y, Blasco C, Font G (2004): Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview. *Mass Spectrom Rev* 23, 45-85
- Pitt JJ (2009): Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev* 30, 19-34
- Podea P, Prejmerean C, Surducan M, Silaghi-Dumitrescu R (2013): Computational analysis of dental material monomer Bisphenolglycidyl dimethacrylate (BisGMA). *J Optoelectron Adv M* 15, 1095-1100

- Polydorou O, Beiter J, König A, Hellwig E, Kümmerer K (2009a): Effect of bleaching on the elution of monomers from modern dental composite materials. *Dent Mater* 25, 254-260
- Polydorou O, Hammad M, König A, Hellwig E, Kümmerer K (2009b): Release of monomers from different core build-up materials. *Dent Mater* 25, 1090-1095
- Polydorou O, Huberty C, Wolkewitz M, Bolek R, Hellwig E, Kümmerer K (2012): The effect of storage medium on the elution of monomers from composite materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 100, 68-74
- Polydorou O, König A, Hellwig E, Kümmerer K (2009c): Long-term release of monomers from modern dental-composite materials. *Eur J Oral Sci* 117, 68-75
- Polydorou O, König A, Hellwig E, Kümmerer K (2009d): Urethane dimethacrylate: a molecule that may cause confusion in dental research. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 91, 1-4
- Polydorou O, Trittler R, Hellwig E, Kümmerer K (2007): Elution of monomers from two conventional dental composite materials. *Dent Mater* 23, 1535-1541
- Pongprueksa P, De Munck J, Duca RC, Poels K, Covaci A, Hoet P, Godderis L, Van Meerbeek B, Van Landuyt KL (2015): Monomer elution in relation to degree of conversion for different types of composite. *J Dent* 43, 1448-1455
- Poole CF (2007): Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *J Chromatogr A* 1158, 241-250
- Poplawski T, Loba K, Pawlowska E, Szczepanska J, Blasiak J (2010): Genotoxicity of urethane dimethacrylate, a tooth restoration component. *Toxicol Vitro* 24, 854-862
- Pozniak BP, Cole RB (2007): Current measurements within the electrospray emitter. *J Am Soc Mass Spectrom* 18, 737-748
- Prisk V, Huard J (2003): Muscle injuries and repair: the role of prostaglandins and inflammation. *Histol Histopathol* 18, 1243-1256
- Przybyciel M, Majors RE (2002): Phase collapse in reversed-phase liquid chromatography. *LCGC North Am* 20, 516-523
- Pulgar R, Olea-Serrano MF, Novillo-Fertrell A, Rivas A, Pazos P, Pedraza V, Navajas JM, Olea N (2000): Determination of bisphenol A and related aromatic compounds released from bis-GMA-based composites and sealants by high performance liquid chromatography. *Environ Health Perspect* 108, 21-27
- Putzeys E, Duca RC, Coppens L, Vanoirbeek J, Godderis L, Van Meerbeek B, Van Landuyt KL (2018): In-vitro transdentinal diffusion of monomers from adhesives. *J Dent* 75, 91-97

- Putzeys E, Nys SD, Cokic SM, Duca RC, Vanoirbeek J, Godderis L, Meerbeek BV, Van Landuyt KL (2019): Long-term elution of monomers from resin-based dental composites. *Dent Mater* 35, 477-485
- Putzeys E, Vercruyssen C, Duca RC, Saha PS, Godderis L, Vanoirbeek J, Peumans M, Van Meerbeek B, Van Landuyt KL (2020): Monomer release from direct and indirect adhesive restorations: a comparative in vitro study. *Dent Mater* 36, 1275-1281
- Raap U, Stiesch M, Kapp A (2012): Contact allergy to dental materials. *J Dtsch Dermatol Ges* 10, 391-397
- Rafferty JL, Zhang L, Siepmann JI, Schure MR (2007): Retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography: a molecular perspective. *Anal Chem* 79, 6551-6558
- Rahman MM, McFadden G (2006): Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLOS Pathog* 2, 4
- Rakhshan V (2015): Marginal integrity of provisional resin restoration materials: a review of the literature. *Saudi J Dent Res* 6, 33-40
- Rammelsberg P (2014): Bisshebung – Möglichkeiten und Grenzen. *Zahnmedizin up2date* 8, 227-242
- Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB (1995): Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res* 74, 1602-1606
- Rathbun MA, Craig RG, Hanks CT, Filisko FE (1991): Cytotoxicity of a BIS-GMA dental composite before and after leaching in organic solvents. *J Biomed Mater Res* 25, 443-457
- Regish KM, Sharma D, Prithviraj DR (2011): Techniques of fabrication of provisional restoration: an overview. *Int J Dent* 2011, 134659
- Regueiro J, Breidbach A, Wenzl T (2015): Derivatization of bisphenol A and its analogues with pyridine-3-sulfonyl chloride: multivariate optimization and fragmentation patterns by liquid chromatography/Orbitrap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 29, 1473-1484
- Reichl FX, Esters M, Simon S, Seiss M, Kehe K, Kleinsasser N, Folwaczny M, Glas J, Hickel R (2006a): Cell death effects of resin-based dental material compounds and mercurials in human gingival fibroblasts. *Arch Toxicol* 80, 370-377
- Reichl FX, Simon S, Esters M, Seiss M, Kehe K, Kleinsasser N, Hickel R (2006b): Cytotoxicity of dental composite (co)monomers and the amalgam component Hg(2+) in human gingival fibroblasts. *Arch Toxicol* 80, 465-472
- Ribani M, Collins CH, Bottoli CB (2007): Validation of chromatographic methods: evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. *J Chromatogr A* 1156, 201-205

- Ribeiro DA, Grilli DG, Salvadori DM (2008): Genomic instability in blood cells is able to predict the oral cancer risk: an experimental study in rats. *J Mol Histol* 39, 481-486
- Ribeiro DA, Yujra VQ, D. E. Moura CFG, Handan BA, D. E. Barros Viana M, Yamauchi LY, Castelo PM, Aguiar OJ (2017): Genotoxicity induced by dental materials: a comprehensive review. *Anticancer Res* 37, 4017-4024
- Rivier L (2003): Criteria for the identification of compounds by liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–multiple mass spectrometry in forensic toxicology and doping analysis. *Anal Chim Acta* 492, 69-82
- Rogalewicz R, Batko K, Voelkel A (2006): Identification of organic extractables from commercial resin-modified glass-ionomers using HPLC-MS. *J Environ Monit* 8, 750-758
- Roper DK, Lightfoot EN (1995): Separation of biomolecules using adsorptive membranes. *J Chrom A* 702, 3-26
- Rosentritt M, Hahnel S, Gröger G, Mühlfriedel B, Bürgers R, Handel G (2008): Adhesion of *Streptococcus mutans* to various dental materials in a laminar flow chamber system. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 86, 36-44
- Rothmund L, Shehata M, Van Landuyt KL, Schweikl H, Carell T, Geurtsen W, Hellwig E, Hickel R, Reichl FX, Högg C (2015): Release and protein binding of components from resin based composites in native saliva and other extraction media. *Dent Mater* 31, 496-504
- Rueggeberg FA, Caughman WF (1993): The influence of light exposure on polymerization of dual-cure resin cements. *Oper Dent* 18, 48-55
- Rueggeberg FA, Dlugokinski M, Ergle J (1999): Minimizing patients' exposure to uncured components in a dental sealant. *J Am Dent Assoc* 130, 1751-1757
- Ruyter IE (1981): Unpolymerized surface layers on sealants. *Acta Odontol Scand* 39, 27-32
- Samuelsen JT, Dahl JE, Karlsson S, Morisbak E, Becher R (2007): Apoptosis induced by the monomers HEMA and TEGDMA involves formation of ROS and differential activation of the MAP-kinases p38, JNK and ERK. *Dent Mater* 23, 34-39
- Samuelsen JT, Kopperud HM, Holme JA, Dragland IS, Christensen T, Dahl JE (2011): Role of thiol-complex formation in 2-hydroxyethyl- methacrylate-induced toxicity in vitro. *J Biomed Mater Res A* 96, 395-401
- Sanglar C, Defay M, Waton H, Bonhomme A, Alamerçery S, Baudot R, Pâisse O, Grenier-Loustalot MF (2005): Commercial dental composite: determination of reaction advancement and study of the migration of organic compounds. *Polym Polym Compos* 13, 223-234

- Santerre JP, Shajii L, Leung BW (2001): Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit Rev Oral Biol Med* 12, 136-151
- Sapone A, Affatato A, Canistro D, Broccoli M, Trespidi S, Pozzetti L, Biagi GL, Cantelli-Forti G, Paolini M (2003): Induction and suppression of cytochrome P450 isoenzymes and generation of oxygen radicals by procymidone in liver, kidney and lung of CD1 mice. *Mutat Res* 527, 67-80
- Sarker SD, Nahar L (2012): Hyphenated techniques and their applications in natural products analysis. *Methods Mol Biol* 864, 301-340
- Schins RP, Knaapen AM (2007): Genotoxicity of poorly soluble particles. *Inhal Toxicol* 19, 189-198
- Schmalz G (1994): Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials—advantages and limitations. *J Dent* 22, 6-11
- Schmalz G (1998a): The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci* 106, 696-706
- Schmalz G (1998b): Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Investig* 1, 154-162
- Schmalz G, Arenholt-Bindslev D: 1. Einführung. In: Schmalz G, Arenholt-Bindslev D (Hrsg.): *Biokompatibilität zahnärztlicher Werkstoffe*. Elsevier, München 2005a, 1-11
- Schmalz G, Arenholt-Bindslev D: 5. Komposit-Kunststoffe. In: Schmalz G, Arenholt-Bindslev D (Hrsg.): *Biokompatibilität zahnärztlicher Werkstoffe*. Elsevier, München 2005b, 99-132
- Schmalz G, Preiss A, Arenholt-Bindslev D (1999): Bisphenol-A content of resin monomers and related degradation products. *Clin Oral Investig* 3, 114-119
- Schmidt C, Ilie N (2012): The mechanical stability of nano-hybrid composites with new methacrylate monomers for matrix compositions. *Dent Mater* 28, 152-159
- Schulte M, Jöhnck M, Skudas R, Unger KK, du Fresne von Hohenesche C, Wewers W, Dingenen J, Kinkel K: Stationary phases and chromatographic systems. In: Schmidt-Traub HS, M.; Seidel-Morgenstern, A. (Hrsg.): *Preparative Chromatography*. Wiley-VCH, Weinheim 2013, 74-225
- Schulz SD, Laquai T, Kümmerer K, Bolek R, Mersch-Sundermann V, Polydorou O (2015): Elution of monomers from provisional composite materials. *Int J Polym Sci* 2015, 617407
- Schwarz I, Bokanovic D, Aberer W (2016): Schleimhautrekrankungen aus allergologischer Sicht. *Der Hautarzt* 67, 780-785

- Schweikart F, Hulthe G (2019): HPLC-UV-MS analysis: a source for severe oxidation artifacts. *Anal Chem* 91, 1748-1751
- Schweikl H, Altmannberger I, Hanser N, Hiller KA, Bolay C, Brockhoff G, Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G (2005): The effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cell cycle of mammalian cells. *Biomaterials* 26, 4111-4118
- Schweikl H, G S, Spruss T (2001): The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res* 80, 1615-1620
- Schweikl H, Gallorini M, Forstner M, Petzel C, Bolay C, Hiller KA, Cataldi A, Krifka S, Buchalla W (2017): Flavin-containing enzymes as a source of reactive oxygen species in HEMA-induced apoptosis. *Dent Mater* 33, 255-271
- Schweikl H, Gallorini M, Pöschl G, Urmann V, Petzel C, Bolay C, Hiller KA, Cataldi A, Buchalla W (2018): Functions of transcription factors NF- κ B and Nrf2 in the inhibition of LPS-stimulated cytokine release by the resin monomer HEMA. *Dent Mater* 34, 1661-1678
- Schweikl H, Hiller KA, Eckhardt A, Bolay C, Spagnuolo G, Stempf T, Schmalz G (2008): Differential gene expression involved in oxidative stress response caused by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials* 29, 1377-1387
- Schweikl H, Petzel C, Bolay C, Hiller KA, Buchalla W, Krifka S (2014): 2-Hydroxyethyl methacrylate-induced apoptosis through the ATM- and p53-dependent intrinsic mitochondrial pathway. *Biomaterials* 35, 2890-2904
- Schweikl H, Schmalz G (1999): Triethylene glycol dimethacrylate induces large deletions in the hprt gene of V79 cells. *Mutat Res* 438, 71-78
- Schweikl H, Schmalz G, Rackebrandt K (1998): The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella typhimurium* and V79 cells. *Mutat Res* 415, 119-130
- Schweikl H, Widbiller M, Krifka S, Klement J, Petzel C, Bolay C, Hiller KA, Buchalla W (2016): Interaction between LPS and a dental resin monomer on cell viability in mouse macrophages. *Dent Mater* 32, 1492-1503
- Scigelova M, Makarov A (2006): Orbitrap mass analyzer – overview and applications in proteomics. *Proteomics* 6 Suppl 2, 16-21
- Seiss M, Langer C, Hickel R, Reichl FX (2009): Quantitative determination of TEGDMA, BHT, and DMABEE in eluates from polymerized resin-based dental restorative materials by use of GC/MS. *Arch Toxicol* 83, 1109-1115
- Shelby MD (2008): NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A. NTP CERHR MON 22, v, vii-ix, 1-64 passim

- Sideridou ID, Achilias DS (2005): Elution study of unreacted Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, and Bis-EMA from light-cured dental resins and resin composites using HPLC. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 74, 617-626
- Sideridou ID, Achilias DS, Karabela MM (2007): Sorption kinetics of ethanol/water solution by dimethacrylate-based dental resins and resin composites. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 81, 207-218
- Silikas N, Eliades G, Watts DC (2000): Light intensity effects on resin-composite degree of conversion and shrinkage strain. *Dent Mater* 16, 292-296
- Sleno L (2012): The use of mass defect in modern mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 47, 226-236
- Smith CC, Taylor HS (2007): Xenoestrogen exposure imprints expression of genes (Hoxa10) required for normal uterine development. *FASEB J* 21, 239-246
- Söderholm KJ, Mariotti A (1999): BIS-GMA – based resins in dentistry: are they safe? *J Am Dent Assoc* 130, 201-209
- Sohaebuddin SK, Thevenot PT, Baker D, Eaton JW, Tang L (2010): Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Part Fibre Toxicol* 7, 22
- Son S, Nam K, Kim H, Gye MC, Shin I (2018): Cytotoxicity measurement of Bisphenol A (BPA) and its substitutes using human keratinocytes. *Environ Res* 164, 655-659
- Song WS, Lee JK, Park SH, Um HS, Lee SY, Chang BS (2017): Comparison of periodontitis-associated oral biofilm formation under dynamic and static conditions. *J Periodontal Implant Sci* 47, 219-230
- Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G, Cosentino C, Rengo S, Schweikl H (2004): Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase amplifies TEGDMA-induced apoptosis in primary human pulp cells. *J Dent Res* 83, 703-707
- Spahl W, Budzikiewicz H (1994): Qualitative analysis of dental resin composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. *Fresenius J Anal Chem* 350, 684-691
- Spahl W, Budzikiewicz H, Geurtsen W (1998): Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Dentistry* 26, 137-145
- Stafford GJ (2002): Ion trap mass spectrometry: a personal perspective. *J Am Soc Mass Spectrom* 13, 589-596
- Stanislawski L, Lefeuvre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Périanin A (2003): TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res A* 66, 476-482

- Stanley HR (1992): Local and systemic responses to dental composites and glass ionomers. *Adv Dent Res* 6, 55-64
- Stansbury JW, Dickens SH (2001): Network formation and compositional drift during photo-initiated copolymerization of dimethacrylate monomers. *Polymer* 42, 6363-6369
- Statham PJ (2002): Limitations to accuracy in extracting characteristic line intensities from X-ray spectra. *J Res Natl Inst Stand Technol* 107, 531-546
- Styllou M, Reichl FX, Styllou P, Urcan E, Rothmund L, Hickel R, Högg C, Scherthan H (2015): Dental composite components induce DNA-damage and altered nuclear morphology in gingiva fibroblasts. *Dent Mater* 31, 1335-1344
- Suárez S, Sueiro RA, Garrido J (2000): Genotoxicity of the coating lacquer on food cans, bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), its hydrolysis products and a chlorohydrin of BADGE. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 470, 221-228
- Svanberg M, Mjor IA, Orstavik D (1990): Mutans streptococci in plaque from margins of amalgam, composite, and glass-ionomer restorations. *J Dent Res* 69, 861-864
- Syed M, Chopra R, Sachdev V (2015): Allergic reactions to dental materials-a systematic review. *J Clin Diagn Res* 9, 4-9
- Tabatabaei MH, Sadrai S, Bassir SH, Veisy N, Dehghan S (2013): Effect of food stimulated liquids and thermocycling on the monomer elution from a nanofilled composite. *Open Dent J* 7, 62-67
- Tai KW, Huang FM, Huang MS, Chang YC (2002): Assessment of the genotoxicity of resin and zinc-oxide eugenol-based root canal sealers using an in vitro mammalian test system. *J Biomed Mater Res* 59, 73-77
- Takayanagi S, Tokunaga T, Liu X, Okada H, Matsushima A, Shimohigashi Y (2006): Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) with high constitutive activity. *Toxicol Lett* 167, 95-105
- Tan D, Jin J, Wang L, He X, Guo C, D, Lu X, Chen J (2019): Quantification of bisphenol A and its selected analogs in serum using pre-column derivatization with high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Sep Sci* 42, 991-998
- Tanaka K, Taira M, Shintani H, Wakasa K, Yamaki M (1991): Residual monomers (TEGDMA and Bis-GMA) of a set visible-light-cured dental composite resin when immersed in water. *J Oral Rehabil* 18, 353-362
- Tang ATH, Li J, Ekstrand J, Liu Y (1999): Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. *J Biomed Mater Res* 45, 214-222

- Tanoue T, Nishida E (2003): Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal* 15, 455-462
- Tarumi H, Imazato S, Narimatsu M, Matsuo M, Ebisu S (2000): Estrogenicity of fissure sealants and adhesive resins determined by reporter gene assay. *J Dent Res* 79, 1838-1843
- Teraoka I (2004): Calibration of retention volume in size exclusion chromatography by hydrodynamic radius. *Macromolecules* 37, 6632-6639
- Thompson M, Ellison Stephen LR, Wood R (2002): Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* 74, 835-855
- Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H (2002): Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater* 18, 318-323
- Tokay U, Koyuturk AE, Aksoy A, Ozmen B (2015): Do the monomers release from the composite resins after artificial aging? *Microscopy Research and Technique* 78, 255-259
- Torres M, Forman HJ (2003): Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors* 17, 287-296
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa R-DV, Huang P (2008): Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* 10, 1343-1374
- Tsitrou E, Kelogrigoris S, Koulaouzidou E, Antoniadis-Halvatjoglou M, Koliniotou-Koumpia E, van Noort R (2014): Effect of extraction media and storage time on the elution of monomers from four contemporary resin composite materials. *Toxicol Int* 21, 89-95
- Tuna EB, Aktoren O, Oshida Y, Gencay K (2010): Elution of residual monomers from dental composite materials. *Eur J Paediatr Dent* 11, 110-114
- Turssi CP, Ferracane JL, Vogel K (2005): Filler features and their effects on wear and degree of conversion of particulate dental resin composites. *Biomaterials* 26, 4932-4937
- Urcan E, Haertel U, Styllou M, Hickel R, Scherthan H, Reichl FX (2010a): Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dent Mater* 26, 51-58
- Urcan E, Scherthan H, Styllou M, Haertel U, Hickel R, Reichl FX (2010b): Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. *Biomaterials* 31, 2010-2014
- Vaidyanathan TK, Vaidyanathan J, Arghavani D (2016): Elastic, viscoelastic and viscoplastic contributions to compliance during deformation under stress in prosthodontic temporization materials. *Acta Biomater Odontol Scand* 2, 108-117

- Valle DL, Jr., Cabrera EC, Puzon JJ, Rivera WL (2016): Antimicrobial activities of methanol, ethanol and supercritical CO₂ extracts of Philippine Piper betle L. on clinical isolates of gram positive and Gram Negative Bacteria with transferable multiple drug resistance. *PLOS ONE* 11, e0146349
- van Dijken JW, Sjostrom S, Wing K (1987): Development of gingivitis around different types of composite resin. *J Clin Periodontol* 14, 257-260
- Van Landuyt KL, 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. *Dent Mater* 27, 723-747
- Van Loco J, Elskens M, Croux C, Beernaert H (2002): Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient. *Accredit Qual Assur* 7, 281-285
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM (1998): Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol* 38, 97-120
- Vervliet P, Den Plas JV, De Nys S, Duca RC, Boonen I, Elskens M, Van Landuyt KL, Covaci A (2019): Investigating the in vitro metabolism of the dental resin monomers BisGMA, BisPMA, TCD-DI-HEA and UDMA using human liver microsomes and quadrupole time of flight mass spectrometry. *Toxicology* 420, 1-10
- Vervoort N, Daemen D, Torok G (2008): Performance evaluation of evaporative light scattering detection and charged aerosol detection in reversed phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1189, 92-100
- Volk J, Engelmann J, Leyhausen G, Geurtsen W (2006): Effects of three resin monomers on the cellular glutathione concentration of cultured human gingival fibroblasts. *Dent Mater* 22, 499-505
- Vollert MP: Herstellungsmethoden provisorischer Kronen und Brücken: eine repräsentative Umfrage unter deutschen Zahnärztinnen und Zahnärzten. Med. Diss. Marburg 2011
- Walther UI, Siagian II, Walther SC, Reichl FX, Hickel R (2004): Antioxidative vitamins decrease cytotoxicity of HEMA and TEGDMA in cultured cell lines. *Arch Oral Biol* 49, 125-131
- Walton HF (1980): Ion exchange and liquid column chromatography. *Anal Chem* 52, 15-27
- Wassell RW, St. George G, Ingledeew RP, Steele JG (2002): Crowns and other extra-coronal restorations: provisional restorations. *Br Dent J* 192, 619
- Wataha J, Rueggeberg F, Lapp C, Lewis J, Lockwood P, Ergle J, Mettenburg DJ (1999): In vitro cytotoxicity of resin-containing restorative materials after aging in artificial saliva. *Clin Oral Investig* 3, 144-149

- Wenzl T, Haedrich J, Schaechtele A, Robouch P, Stroka J: Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Food and Feed. Publications Office of the European Union, Luxembourg 2016
- West KA, Castillo SS, Dennis PA (2002): Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Update* 5, 234-248
- Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB (1985): Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal Chem* 57, 675-679
- Willershausen B, Kottgen C, Ernst CP (2001): The influence of restorative materials on marginal gingiva. *Eur J Med Res* 6, 433-439
- Wilson ID, Brinkman UAT (2003): Hyphenation and hypernation the practice and prospects of multiple hyphenation. *J Chromatogr A* 1000, 325-356
- Wisniewska-Jarosinska M, Poplawski T, Chojnacki CJ, Pawlowska E, Krupa R, Szczepanska J, Blasiak J (2011): Independent and combined cytotoxicity and genotoxicity of triethylene glycol dimethacrylate and urethane dimethacrylate. *Mol Biol Rep* 38, 4603-4611
- Wolcott RB, Paffenbarger GC, Schoonover IC (1951): Direct resinous filling materials: temperature rise during polymerization. *J Am Dent Assoc* 42, 253-263
- Wolff D, Coupek M, Erber R, Krueger T, Krisam J, Staehle HJ, Frese C (2016): Effect of aqueous storage on original and repair bond strength and residual monomer release of fiberreinforced composites. *J Adhes Dent* 18, 535-543
- Wu D, Nedev GK, Lucy CA (2014): Retention mechanism of hypercrosslinked polystyrene silica hybrid phase in normal phase chromatography. *J Chromatogr A* 1370, 50-55
- Wu W, McKinney JE (1982): Influence of chemicals on wear of dental composites. *J Dent Res* 61, 1180-1183
- Yang M, Kim SY, Lee SM, Chang SS, Kawamoto T, Jang JY, Ahn YO (2003): Biological monitoring of bisphenol a in a Korean population. *Arch Environ Contam Toxicol* 44, 546-551
- Yang SH, Morgan AA, Nguyen HP, Moore H, Figard BJ, Schug KA (2011): Quantitative determination of Bisphenol A from human saliva using bulk derivatization and trap-and-elute liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Environ Toxicol Chem* 30, 1243-1251
- Yap A, Han V, Soh M, Siow K (2004): Elution of leachable components from composites after LED and halogen light irradiation. *Oper Dent* 29, 448-453
- Yates JR (2000): Mass spectrometry. From genomics to proteomics. *Trends Genet* 16, 5-8

- Ye X, Zhou X, Hennings R, Kramer J, Calafat AM (2013): Potential external contamination with bisphenol A and other ubiquitous organic environmental chemicals during biomonitoring analysis: an elusive laboratory challenge. *Environ Health Perspect* 121, 283-286
- Yeh CC, Chang JZ, Yang WH, Chang HH, Lai EH, Kuo MY (2015): NADPH oxidase 4 is involved in the triethylene glycol dimethacrylate-induced reactive oxygen species and apoptosis in human embryonic palatal mesenchymal and dental pulp cells. *Clin Oral Investig* 19, 1463-1471
- Yoshii E (1997): Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res* 37, 517-524
- Young HM, Smith CT, Morton D (2001): Comparative in vitro evaluation of two provisional restorative materials. *J Prosthet Dent* 85, 129-132
- Yu P, Yap AUJ, Wang XY (2017): Degree of conversion and polymerization shrinkage of bulk-fill resin-based composites. *Oper Dent* 42, 82-89
- Zhang Y, Xu J (2008): Effect of immersion in various media on the sorption, solubility, elution of unreacted monomers, and flexural properties of two model dental composite compositions. *J Mater Sci Mater Med* 19, 2477-2483
- Zhao Y, Liu G, Shen JX, Aubry AF (2014): Reasons for calibration standard curve slope variation in LC-MS assays and how to address it. *Bioanalysis* 6, 1439-1443
- Zhivotovsky B (2004): Apoptosis, necrosis and between. *Cell Cycle* 3, 64-66
- Zhou B, Xiao JF, Tuli L, Ransom HW (2012): LC-MS-based metabolomics. *Mol Biosyst* 8, 470-481
- Zimmerli B, Strub M, Jeger F, Stadler O, Lussi A (2010): Kompositmaterialien: Zusammensetzung, Eigenschaften und klinische Anwendung. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 120, 980-986
- Zöllner P, Mayer-Helm B (2006): Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1136, 123-169
- Zubarev RA, Makarov A (2013): Orbitrap mass spectrometry. *Anal Chem* 85, 5288-5296
- Žuvela P, Skoczylas M, Jay Liu J, Bączek T, Kaliszan R, Wong MW, Buszewski B (2019): Column characterization and selection systems in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Chem Rev* 119, 3674-3729

Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. R. Bürgers für die freundliche Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung meinen Dank ausdrücken. Ohne seine konstruktive Kritik und große Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Weiterer Dank geht an Herrn Oberarzt Dr. S. Krohn für die Unterstützung bei der Planung und Organisation des experimentellen Teils dieser Arbeit sowie die kritische, aber stets aufbauende Korrektur dieser Arbeit.

Einen nicht minderen Dank möchte ich Herrn Dr. H. Frauendorf für die Bereitstellung der HPLC-UV/Vis-MS-Anlage und seine Betreuung und fachkundige Kompetenz während der zahlreichen Voruntersuchungen sowie der Hauptuntersuchung aussprechen. Insbesondere bei den zahlreichen und komplexen Problemen bei der Etablierung der analytischen Methode stand er immer mit Rat und Tat beiseite.

Ferner bedanke ich mich bei Herrn Prof. P. Karlovsky und Herrn Dr. M. Alhussein für Ihre Expertise sowie die Bereitstellung der HPLC-MS/MS-Anlage für die Kontrollmessungen.

Den Mitarbeitern der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik danke ich für die kollegiale und freundschaftliche Unterstützung.

Frau cand. med. dent. P. Amini und Herrn Dr. A. Wiessner möchte ich abschließend für das konstruktive Lektorat dieser Arbeit danken.

Lebenslauf

Am 27. März 1993 wurde ich, Tristan Hampe, als erstes Kind von Clarissa Jarzyk und Dr. Wolf-Christian Hampe in Langenhagen geboren.

Von 1999 bis 2003 besuchte ich die Domschule in Minden, von 2003 bis 2005 das Ratsgymnasium in Minden, von 2005 bis 2007 das Gymnasium Julianum in Helmstedt und von 2007 bis 2011 das Gymnasium Ernestinum in Celle. Hier erwarb ich im Sommer 2011 die allgemeine Hochschulreife.

Von 2011 bis 2012 absolvierte ich für 12 Monate ein Freiwilliges Soziales Jahr im Bereich der Jugendarbeit bei den Johannitern in Ravensburg.

Zum Wintersemester 2012/13 immatrikulierte ich mich an der Georg-August-Universität für das Studienfach Zahnmedizin. Das Studium schloss ich 2017 mit dem Staatsexamen erfolgreich ab.

Vom 01.01.2018 bis zum 31.07.2020 war ich als Zahnarzt in der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik der Universitätsmedizin Göttingen angestellt. In dieser Zeit konnte ich den experimentellen Teil sowie die statistische Auswertung meiner Dissertation abschließen. Vom 01.11.2020 bis zum 31.06.2021 war ich als Zahnarzt in der Zahnarztpraxis Dr. Hampe & Kollegen in Minden angestellt. Seit dem 01.07.2021 bin ich als Weiterbildungsassistent zum Fachzahnarzt für Oralchirurgie an der Privatzahnklinik Schloss Schellenstein in Olsberg tätig.