

Mastergradsoppgave

Torbjørn Knarvang

Eksperimentell dental kompositt

Effekt av tilsatt 2-[3-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4-hydroxyphenyl]ethyl methacrylate



Høgskolen i Telemark

Fakultet for allmennvitenskapelige fag

Mastergradsavhandling i Natur-, helse- og miljøvern fag
2015

Torbjørn Knarvang

Eksperimentell dental komposit

Effekt av tilsatt 2-[3-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4-
hydroxyphenyl]ethyl methacrylate

Høgskolen i Telemark
Avdeling for allmennvitenskapelige fag
Institutt for natur- helse- og miljøvern
Kjølnes ring 56
3918 Porsgrunn

<http://www.hit.no>

© 2014 Torbjørn Knarvang

Denne avhandlingen representerer 60 studiepoeng

Sammendrag

Resinbaserte restaurerings er de mest brukte materialene innen tannbehandling. Generelt sett består polymerdelen av en blanding forskjellige metakrylat-monomerer. Reaksjonen starter ved at energirikt blått lys som aktiverer et aminkompleks som frigir radikaler for siden aktivering monomerene. En polymerisasjonsreaksjon er aldri helt fullstendig og upolymeriserte monomerer vil kunne lekke ut til omgivelsene etter lysherden. Polymerblandingens innhold er en faktor som vil påvirke resultater som omsetningsgrad, materialeegenskaper og toksisk potensial.

2-[3-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4-hydroxyphenyl]ethyl methacrylate (UV090; triazol-monomer) er en monometylakrylat som er brukt i mange kommersielle produkter blant annet kontakt-linser og som UV-absorbant i polymerindustrien. Stoffet har også blitt brukt tilsatt i små mengder i dentale polymerbaserte fyllingsmaterialer. Oppgaven vil innbefatte fysikalske tester og undersøkelser av eventuell toksisk potensiale til kompositt med triazol-monomer.

EKSPERIMENTELLE METODER

Kompositt-blandingene inneholder 70% uorganisk fyllstoff, 12,5-15% bisphenol A dimethacrylate (BisGMA), 12,5-15% triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA), 0-5 % triazol-monomer og initiator komponenter. Kompositt-prøvelegemene (2mm tykke) ble herdet i 20 sekunder. Omsetningsgraden ble målt med et FTIR instrument og diamant-ATR-metode direkte etter herding og etter 3 timer. Areal-forskjellen mellom alifatisk og aromatisk dobbeltbindingers absorbans ble brukt til å måle omsetningsgraden i prøven. Bøystyrken ble bestemt ifølge ISO 4049 med en Loyds LRX test-maskin. Lekkasje av monomerer ble undersøkt etter at herdet prøve har ligget i en etanol/vann-blanding (75/25 vol/vol) i 37°C i 24 timer med gaskromatografi/massespektrometri (GC/MS).

Det toksiske potensialet for triazol-monomer ble bestemt med MTT testing etter ISO 10993-5. En L929 fibroblast cellelinje ble tilført konsentrasjoner fra 10 til 200 µM. Graden av redusert gul MTT til lilla formazan blir målt spektrofotometrisk ved 570nm og gir uttrykk for viabilitet.

Flowcytometri indikerer hvor i cellesyklus-fasene eventuell toksisitet medfører at DNA-replikasjonen ikke følger sitt vanlige mønster. Blandingen ble tilført DAPI- fluorescens middel for reaksjon med DNA.

RESULTATER OG DISKUSJON

Resultatene viser Ingen forskjeller i omsetningsgrad (78% ved 3t) ved forskjellig triazol-monomer-konsentrasjoner. Grunnen til lik omsetningsgrad kan være liten mengde av (0-5%) triazol-monomer i blandingen. Ved bøyestyrke-testing ble det observert at økt konsentrasjon av triazol-monomer medførte redusert bøyestyrke. Dette kan ha sammenheng med at det dannes ikke- fullstendig polymernettverk.

MTT-testen viste en doseavhengig respons hvor høyest konsentrasjon av triazol-monomer ga lavest viabilitet. MTT-testen gir et uttrykk for et relativt tall med hensyn til viabilitet uten å vise hva slags mekanismer som forårsaker reduksjon av aktive celler.

Flowcytometri-resultatene indikerer at antallet celler i G1-fase er større for høyere konsentrasjoner av triazol-monomer enn for DMSO-kontroll. Dette indikerer at L929-celleene eksponert for triazol-monomeren danner en G1-stopp i cellesyklusen. Hva som er årsaken til en opphopning av celler i G1 fasen er ikke klarlagt.

Kort oppsummering av resultater

- Økt mengde av triazol-monomer bidrar til nedsatt bøyestyrke
- Triazol-monomer lekker ut fra herdet kompositt
- Triazol-monomer har et toksisk potensial

KONKLUSJON

Denne oppgaven viser økende mengde triazol-monomer iblandet kompositt virker negativt inn på fysikalske og toksiske egenskaper.

Abstract

Resin-based restorative materials are widely used in dentistry. In general, the resin part of these materials consists of a mixture of methacrylate monomers that are polymerized *in situ* with a blue light initiated free-radical polymerization mechanism. The polymerization process is never complete, and unpolymerized monomer may be released after curing. The resin composition is a parameter influencing polymerization (degree of conversion), material properties and toxic potential.

2-[3-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4-hydroxyphenyl]ethyl methacrylate (UV090, triazol-monomer) is a mono-methacrylate monomer used in several commercial materials such as contact lenses and as UV-absorbant in polymer industry. It has been used in small amounts in resin-based filling material. In this study we aimed to characterize physical properties and toxic potential of resin-based dental composites containing different amounts of the triazol-monomer.

EXPERIMENTAL METHODS

Experimental dental composites containing 70 % inorganic filler, 12.5-15.0 % bisphenol A glycidyl methacrylate (BisGMA), 12.5-15.0 % triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA), 0-5 % triazol-monomer and initiator components were prepared. The composites (2 mm thick) were cured for 20 seconds with blue light irradiation before the tests.

The degree of conversion (DC) was determined using FTIR and ATR-method directly after irradiation and at 3 h. Relation between aliphatic and aromatic double bond absorbance was used as a measurement to calculate the DC. Flexural strength was determined according to ISO 4049 with a Lloyds LRX testing machine. Leakage of unreacted monomer was measured in extracts from cured specimens incubated for 24 h in ethanol/water (75/25 vol/vol) at 37 °C using gas- chromatography.

Toxic potential of triazol-monomer was determined by the MTT test (ISO 10993-5). Briefly, L929 cells (a fibroblast cell line) was exposed to triazol-monomer (0-200 µM) for 24 h. After exposure, MTT was added to the cell culture. The formation of purple colored formazan after incubation was measured as absorbance at 570 nm and used to indicate viability.

Flow cytometry indicates where in the cell cycle phases toxicity shows that DNA replication did not follow its normal pattern. The same concentrations of triazol-monomer where used in the MTT test. The mixture was fed DAPI- fluorescence agent for reaction with DNA.

RESULTS AND DISCUSSION

There were no differences in DC (78 % at 3 h) with different triazol-monomer contents in the composites. This may be due to the relatively small amounts of the triazol-monomer (0-5%) in the composites. However, a decreased MPa value in flexural strength and an increase in monomer release were observed with increasing triazol-monomer -content. This suggests the formation of a less complete polymer network using the mono-methacrylate.

The MTT test showed a dose-dependent decrease of viability in the L929 cells. The MTT test yields a relative number of living cells. Hence, both cell death and decreased cell growth may be the cause of this finding.

The Flow cytometry result indicates that for higher concentrations of triazole-monomer the number of cells in G1 phase is greater than in the DMSO-control. This indicates that in the L929 cells triazole-monomer induces a G1-stop in cell cycle. What causes an accumulation of cells in G1 phase is not clear.

Results summarized:

- Addition of triazol-monomer to the resin reduced the flexural strength of the composite
- Triazol-monomer is released from cured composites
- Triazol-monomer has a toxic potential *in vitro*

CONCLUSION

In summary, this study showed that increased amounts of the triazol-monomer negatively influenced the measured properties of the experimental composites.

Innholdsfortegnelse

Sammendrag.....	3
Abstract	5
Innholdsfortegnelse	7
Forord.....	9
1 Innledning.....	10
1.1 Biomaterialer	10
1.2 Dentale biomaterialer	11
1.3 Kompositter	11
1.3.1 Polymer-matriksen	12
1.3.2 Fra monomer til polymer.....	14
1.3.3 Uorganisk fyllstoff	15
1.3.4 Initiatorsystemet	16
1.3.5 Komposittens tilleggsstoffer	17
1.4 Parametere som påvirker utlekking fra kompositt.....	18
1.5 Toksikologi.....	18
1.6 Toksisk påvirkning fra dentale materialer	19
1.7 Cellereaksjon på fremmedstoffer.....	20
1.8 Skader på arvestoffet(DNA).....	21
1.9 Bruk av benzotriazol og miljø	22
2 Mål med oppgaven	24
3 Materialer	25
3.1 Kjemikalier	25
3.2 Teknisk utstyr og instrumenter	26
3.3 Annet utstyr og programvare	26
4 Metoder	28
4.1 Preparering av kompositt.....	28
4.2 Tre punkts nedbøying	29
4.3 Infrarød spektroskopi.....	30
4.4 Omsetningsgrad av dobbeltbindinger.....	31
4.4.1 Måling av omsetningsgrad	31
4.5 Gasskromatografi og massespektrometri (GC/MS)	32

4.6	GC/MS prøvemethode for utlekking	34
4.7	<i>In vitro</i> cellekultur for toksisk analyse	35
4.8	Celledyrking	36
4.9	MTT-test metode for bestemmelse av celleviabilitet.	36
4.9.1	Prosedyre for MTT test	38
4.10	Flowcytometri	38
4.11	Bestemmelse av cellevekstprofil.....	39
4.12	Statistikk	41
5	Resultater.....	42
5.1	Bøystyrke for komposittprøvelegeme.....	42
5.2	Måling av omsetningsgrad for metakrylat dobbelt bindinger med FTIR.....	43
5.3	Utlekk av triazol-monomer og TEGDMA fra herdet kompositt	43
5.4	Toksisitet av triazol-monomer med MTT	44
5.5	Flowcytometri og cellesyklus.....	46
6	Diskusjon.....	49
7	Konklusjon	52
8	Litteraturhenvisninger	53

Forord

Arbeidet til denne masteroppgaven er gjort ved Nordisk Institutt for Odontologiske Materialer (NIOM) i tiden fra august 2013 til juni 2015. Hovedveiledere for arbeidet har vært Dr. Hilde Kopperud sammen med Dr.Philos Jan Tore Samuelsen. Jeg takker veilederne mine for god oppfølging, gode råd og rask tilgjengelighet under hele arbeidet.

Jeg ønsker å takke NIOMs direktør Jon E. Dahl og ledelsen som har gitt meg mulighet til å utføre masteroppgaven sammen med mitt arbeide på NIOM. Fra Høgskolen i Telemark (HiT) ønsker jeg å takke Dr.Mona Sæbø for et studieopplegg som kunne gjøre det mulig å ta en masteroppgave i samordning med NIOM.

Arbeidet har blitt gjort i NIOM fine lokaler i Sognveien70 i Oslo og med en stor takk til mange gode kollegaer med innspill til løsninger på problemer som måtte ha oppstått underveis. Jeg vil spesielt takke mange fra teknisk personale som har veiledet meg på ukjente arbeidsområder på laboratoriet. Anne Wesmann, Hanne Wellendorf og Else Morisbak kan nevnes som sentrale personer.

Det har til tider vært lange arbeidsdager og mange helger som har gått med til masteroppgaven og jeg vil også takke min familie som har latt meg holde på med dette arbeidet. Uten alle de nevnte bidragsyterne ville oppgaven blitt vanskelig å gjennomføre.

Oslo, 15.mai 2015

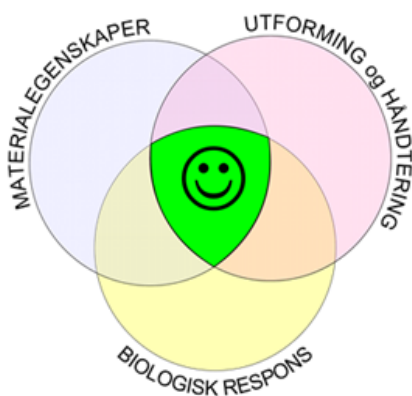
Torbjørn Knarvang

1 Innledning

1.1 Biomaterialer

Biomaterialer blir definert som et materiale som kan brukes til erstatning av en større eller mindre del av kroppen på en sikker og økonomisk måte. Hovedhensikten med et biomateriale er å kunne videreføre en funksjon som har gått tapt fra naturlige celler eller vev, men for at et biomateriale skal kunne virke tilfredsstillende må det være krav om en kvalitetsnorm for implantat, helsetilstand for pasient samt implantatet sin funksjonalitet, se illustrasjon i figur 1-1.

(1) Det er mange parametere å ta hensyn til når man skal produsere et optimalt biomateriale uansett hvilken kroppsdel-erstatning man skal ta hensyn til. Tekniske eksperter på forskjellige fagområder må samarbeide for å kunne oppnå en optimal tilpasning for nye moderne implantater. (2)



© Nils Roar Gjerdet, NIOM 2012

Figur 1-1 Materialeegenskaper, utforming og biologisk respons må kombineres og for å kunne gjøre et materiale brukervennlig. Grønt felt indikerer at alle tre områdene er optimalisert.

Mange typer biomaterialer er i dag i bruk blant befolkningen. Noen av de delområdene hvor mange erfarer at biomaterialer betyr mye er hofteproteser, hjerteklaffer, stenter og kontaktlinser. (3) Et viktig og utbredt område som betyr noe for nesten alle mennesker er erstatninger i det dentale biomaterialeområde.

1.2 Dentale biomaterialer

Dentale biomaterialer har som funksjon å erstatte tannsubstans, forebygge kariesangrep samt rehabilitere det orale miljø. Restorative dentale materialer er en utbredt biomaterialgruppe hvor nå forskjellige typer polymerbasert kompositt har størst etterspørsel. Polymerbasert kompositt er i dag mest utbredt reparasjonsmateriale for kariesskader og finnes i flere farger og konsistenser.

I begynnelsen av 1900 var det sink fosfatsement og silikatsement som var mest utbredt som restaureringsmiddel. Sementene hadde begrenset levetid og kunne ha en tendens til å sakte løse seg opp etter 3-4 år. Sementene hadde i tillegg ikke de beste egenskapene til å formes etter tannsubstans. (4) På 70-tallet kom mere moderne og sterkere versjon av sementer basert på polyakrylsyre og noe annen kjemi enn de foregående sementer. (4)

Det mest brukte fyllingsmateriale opp til våre dager var kvikksølv-amalgam. Bruken av amalgam startet på midten 1850 tallet i USA og ble gjeldene over hele den vestlige verden. Amalgamblandingen består av opptil femti prosent kvikksølv ved siden av sølv, tinn, kobber samt små mengder andre metaller og har en lang levetid i kaviteten. Amalgam hadde dårlige estetiske egenskaper, høy ekspansjon, samt var et omdiskutert helsetema som omhandlet utlekking av kvikksølvioner til munn og kropp. Moderne polymerbaserte materialer finnes i forskjellige varianter. Flere varianter med hensyn på sammensetningen gjør at det blir en glidende overgang fra vanlige kompositter på ene siden, via kompomerer, resinforsterket glassionomer og til rene glassionomersementer på andre siden. En av de raskest voksende biomaterialer innen dentalbruk er keramer. Dentale kroner er biomateriale som blir limt direkte til tannstrukturen. Nye keramer har blitt sterkere og fått bedre estetikk. Grunnen til at keramer har en økt bruk er en lang levetid. Nye teknikker som CAD/CAM-konstruksjons gir et tredimensjonalt bilde for tilpasning og vil kunne optimere biomaterialene. Det utvikles stadig nye materialtyper som forbedrer forholdet til pasienten.

1.3 Kompositter

Ordet kompositt betyr blandingsmateriale. Flere komponenter er satt sammen for å forsterke, forbedre eller optimalisere blandingen. Komposittmaterialer eller kompositter er en

samlebetegnelse for blandingsmaterialer der en utnytter de gode egenskapene til hver av bestanddelene.

Polymerbasert kompositt er i dag det mest brukte fyllingsmateriale for dentale restaureringer. Utviklingen av polymerbasert-dental kompositt startet omkring 1956. Det var amerikaneren Rafal Bowen som hadde ideen og prinsippet på hvordan den første komposittens kjemi skulle utformes og produseres. (5)

Dental-kompositt består i hovedsak av forskjellige metakrylat-monomerer, uorganisk fyllstoff og et initiatorsystem. Kompositten med alle ingrediensene vil danne viskøs blanding som benyttes på reparasjonsstedet i tannen. Kompositten herdes ved at metakrylat-monomerene blir initiert, reagerer med hverandre og danner en polymerisert hard masse. De nyeste komposittene som er på markedet i dag har mange likhetstrekk med de første komposittene som ble produsert og har mye av samme grunnleggende kjemi.

Komposittene i dag består av flere og nye typer monomerer som bidrar til optimalisering av de fysikalske egenskapene. Noen produsenter forsker på om de tradisjonelle metakrylatene kan erstattes med andre typer monomer som kan bidra med helt andre egenskaper.

Kompositter med nye monomer kan kreve en annen type initiering som blir den neste utfordring.

1.3.1 Polymer-matriksen

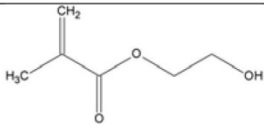
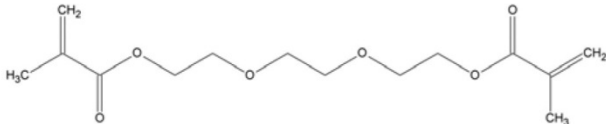
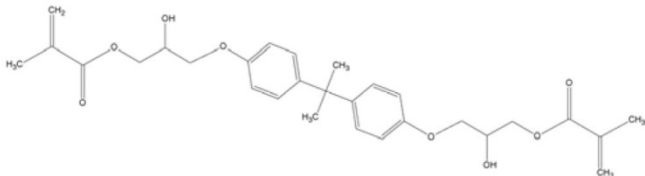
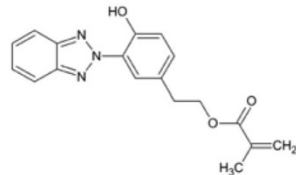
Polymer-matriksen som brukes i kompositt dannes ved at av en blanding av forskjellige eller like metakrylat-monomerer polymeriseres sammen i kjeder. Det kan også brukes andre monomerer som akrylater og epoksider, men de har ikke den samme utbredelse. (4) Største forskjellen mellom akrylater og metakrylater er reaktiviteten. Akrylatene er mere reaktive enn metakrylatene, noe som også gir kortere lagringstid for monomeren. (6) Metakrylat-forbindelsene kan være både aromatiske og alifatiske, og felles for alle er at de inneholder en eller flere metakrylat-grupper i kjeden. Betingelsen for at det skal bli et kryssbundet tredimensjonalt nettverk er at monomermolekylet har minst to metakrylat-grupper. Det brukes også monomerer som har kun en metakrylat-gruppe i molekylet. Mono og di-metakrylater opptrer i blanding med hverandre for å kunne påvirke fysikalske egenskaper og dannelsen av nettverk.

Stadig nye metakrylat-monomerer på markedet gjør at mulighetene til forbedring av fysikalske og mekaniske egenskapene øker. En av de viktige fysikalske egenskapene er bøyestyrken

hvor selve bruddstyrken av et prøvelegeme testes i en trepunkts nedbøynings oppsett. Andre fysikalske egenskaper er vannopptak, vannløselighet, fargestabilitet, herdedybde, krypning og viskositet.

De enkelte monomerer sin kjemiske struktur, viskositet og innhold av funksjonelle grupper har stor betydning for komposittens endelige egenskap. Flere funksjonelle grupper i monomer-strukturen gir sitt bidrag med sin polaritet og dermed innvirkning på hvor hydrofob eller hydrofil kompositten er i miljø. (6). Høyviskøse monomerer som Bisphenol A glycerolate dimetacrylate (Bis-GMA) inneholder aromatiske grupper i sin struktur og vil være gunstig med hensyn til å redusere krymping under herding. Det oppstår reduksjon i fri rotasjon for polymermolekylet sammenlignet med monomeren, derfor blir det dannet et mindre fritt volum. Denne reduksjonen i volumet er selve krympingen etter herding. (7)

Lavmolekylære ikke viskøse metakrylat-monomerer kan brukes til justering av viskositeten på komposittblandingen. (8) Den mest brukte lavviskøse dimetakrylaten er Triethylene glycol dimetacrylat (TEGDMA). Mange lavmolekylære metakrylat-monomerer i polymerenheten gir større volumkontraksjon enn ved polymerisasjon med høymolekylære monomerenheter. Eksempler på metakrylater i dentale materialer er vist i tabell 1-1.

Metakrylat	Mol.formel		MW
HEMA	C ₆ H ₁₀ O ₃		130.1
TEGDMA	C ₁₄ H ₂₂ O ₆		286.3
BisGMA	C ₂₉ H ₃₆ O ₈		512.6
UV090	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₃		323,4

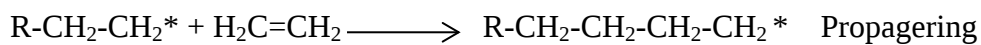
Tabell 1-1. Molekylformler, molekylvekt og strukturer til metakrylater i polymerbaserte tannfyllingsmaterialer omtalt i oppgaven

1.3.2 Fra monomer til polymer

Polymerer er stoffer som består av syntetiske eller naturlige monomer-molekyler og som har repeterende molekylenheter bundet sammen. Monomermolekylene er bundet sammen med kovalent kjemisk binding. Det finnes mange typer polymeriseringsreaksjoner avhengig av initieringsbetingelser og spaltningsprodukter, og den mest vanlige for dentale kompositter er addisjonspolymerisering. For å få en monomer til å bli reaktiv må det dannes radikaler som kan initiere eller starte en reaksjon. Radikaler dannes ved å bruke varme eller energirikt lys. Med varme betingelser vil en initiator som benzoylperoksid spaltes og elektroner i bindingsbruddet bli til radikaler. Energirikt lys har evne til å bryte spesielle lys-sensitive-molekyler homolyttisk og danne radikaler. Dobbeltbindingene i metakrylatene er sentret for radikal-dannelse av monomeren hvor enhetene koples sammen til en polymer. Initieringsradikalet forplanter seg videre fra initiatorkilden til reaktive monomer med

dobbeltbindinger. Monomerene kople sammen en etter en til en lang kjede, hvor det ytterste punktet på kjeden er der hvor radikalet befinner seg. Propageringen (kjedeveksten) forsetter inntil det reaktive senter blir deaktivert eller at det ikke er nok monomerer tilgjengelig. Når polymerkjeden ikke kan kople på flere monomer-enheter vil den terminere. (9) Forskjellige metakrylat-polymerer kan i tillegg ha sine ekstra funksjonelle grupper og med molekylvekt-variasjon danner grunnlag de fysikalske egenskapene på nettverket som dannes. Det tredimensjonale nettverket og fyllstoffet gir grunnlaget for styrken til kompositten.

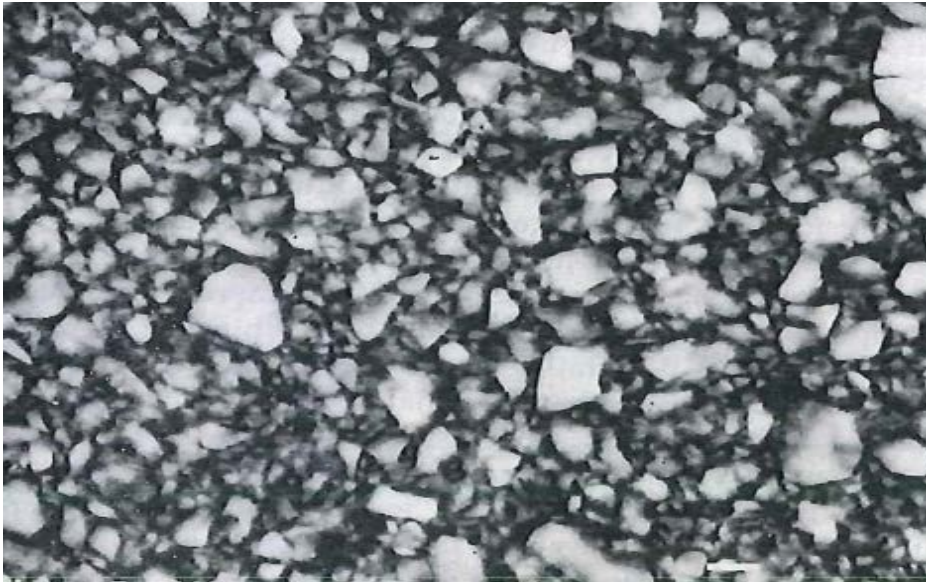
En addisjons-reaksjon : Et aktivt radikal er initiert med lys på 468nm



R*: et lys-eksitert molekyl, fri radikal

1.3.3 Uorganisk fyllstoff

Kompositt inneholder 50-80 vektprosent uorganisk fyllstoff, noe som utgjør 30-70 volumprosent. I dag finnes det stort utvalg av fyllstofftyper ferdig silanbehandlet fra produsent og som er direkte klar til innblanding. Fyllstoffets egenvekt er større enn monomerene og de andre komponentene som er innblandet, noe som gjør vektprosenten høy. Flow-kompositten inneholder mindre fyllstoff og er lavviskøs og lettflytende og har egenskaper som er gunstig i små kaviteter. Det finnes et stort spekter av metalloksider som er bruksrelevante som fyllstoff i kompositter. Fyllstoffet i komposittene kan inneholde noen tyngre røntgenopake oksider for synlig-gjøring på røntgenbilde.



Figur 1-2. Bilde av uorganisk fyllstoff i størrelse fra 0,1-3,0 mikrometer (Bildet er hentet fra Science of dental materials 2012; (4))

For at fyllstoffet skal kunne koples med monomeren må det silan-behandles. Ved silaniserings-behandling vil fyllstoffoksidene reagere med et organisk silaniserings-middel og dermed tilføre fyllstoffet en metakrylatgruppe og koplingsmulighet til monomeren. Mye fyllstoff innblandet reduserer komposittens krympeegenskaper i forhold til bare en ren metakrylat-polymer. Metakrylat-komposittene krymper normalt rundt 1-4 volumprosent under lysherdning avhengig av kompositt-type. Fyllstoffets form og størrelse har mye å si for slitestyrken av kompositten over tid. (10) Økt fyllstoffinnhold bidrar også til redusert vannopptak og demper muligheten for misfarging. (4)

1.3.4 Initiatorsystemet

Kompositter kan være kjemisk- eller lysherdende eller i noen tilfeller begge deler (dual cure). Til initieringen brukes herdelampe med bølgelengde i blått lysområdet(400-500nm). Viktige parametere for optimal herding er at herdelampens lys har riktig bølgelengde i forhold til initiatortype og at intensiteten på lyset har nok energi. Effekten fra LED eller halogenlampene kan variere fra 500-2000 mW/cm² og hvor avstand fra lampens lysledertipp til herdepunkt har stor betydning.

Det vanligste initiatorsystemet for kompositter består av et lysfølsomt diketon sammen med et tertiært amin som danner et aktivt kompleks. Initiatorkomplekset frigir et radikalaktivt amin,

mens diketonet blir deaktivert. (4) Aminet med fritt radikal initierer polymerisasjon med den reaktive dobbeltbindingen i monomeren. Det mest brukte diketonet er kamferkinon (maks absorpsjon er 468nm). Både alifatiske og aromatiske tertiære aminer kan kombineres med kamferkinon til et initiatorkompleks. Ved kjemisk herding har aromatiske aminer blitt funnet betydelige mere reaktive enn de alifatiske. Lysherdene kompositt har størst initieringsaktivitet ved de tertiære aromatiske aminene. (11) Mengden kamferkinon som tilsettes varierer fra 0,03-1,0 prosent. Kamferkinon vil kunne påvirke fargen til kompositten i en gul-brun retning. Etter polymerisering viser det seg at den noe gule fargen på kompositten dempes ned enn det man kunne forvente. (6)

Det finnes forskjellige initiatorer i kompositt utenom den mest brukte som er kamferkinon. Andre mulige initiatorer som brukes er 1-fenyl-1,2 propandion (PPD), Lucerin TPO og Irgacure 819 som alle har strukturelle likheter.

1.3.5 Komposittens tilleggsstoffer

Kompositt kan bli utsatt for uønsket lys før selve lysherdingen på reparasjonsstedet. For at herdingen ikke skal starte umiddelbart tilsettes små mengder inhibitor. Inhibitoren har stor reaktivitet til frie radikaler og vil forhindre at kompositten begynner å herde i samme sekund den kommer ut i lys.

Inhibitoren radikalnøytraliserende evne må brukes opp før initieringen starter selve polymerisasjonen. (6) Arbeidstiden til kompositten vil forlenges noe med større andel inhibitor. Mange forskningsartikler foreslår inhibitor-nivåer fra 0,01-0,5% .

Kompositt inneholder også fargestoffer som gjør fargen mest mulig lik den tannen hvor reparasjonen skal utføres. Det mest brukte oksidet til farging er jernoksid. (7) Fargenyansen på tenner og kompositt kan beskrives med en kode i en fargeguide for tannmaterialer.

Fluoriserende pigmenter tilsettes for å få kompositten til å fremstå fargeriktig utad. UV-lys som treffer tannen og kompositten absorberes og hvor fargen som reflekteres er blå-hvit. (4) Hensikten er å få kompositten til fremstå mere hvit enn gul ved optisk tilpasning.

1.4 Parametere som påvirker utlekking fra kompositt

Kompositt blir utsatt for mange påkjenninger i sitt miljø i munnhulen. For å kunne simulere munnens miljø så blir kompositt-prøver lagret i løsning som skal simulere saliva. Generelt sett er degradering av en polymer definert som en kjedespaltingsprosess som gjør at deler av polymeren blir avspaltet til en oligomer eller monomer, mens erosjon er en slitasje faktor med samme resultat. (12) Viktige faktorer som påvirker mengde og type utlekkingsstoffer fra dentale reparasjonsmaterialer vil være, kjemisk sammensetning av materiale, pH i munnhulen ved inntak av mat og drikke, tyggeprosess, temperaturforandringer og den orale mikroflora. Hydrofile polymere lar seg lettere påvirke til nedbrytning ved forandringer av surhetsgraden i omgivende væske. (13) pH-verdien på innsiden av porer i polymeren vil være påvirket av nedbrytningsprodukter som innehar noen grad av syre/base-funksjonalitet. Kjemisk nedbrytning av dentale kompositter kan være forårsaket av hydrolytiske og hygroskopiske forhold samt nedbrytningsprodukter fra enzymer fra saliva og munnens miljø. Uspesifikke esteraser og enzymer i saliva har vært medvirkende i å angripe resinmatriks i dental kompositt og frigjøre metakrylsyre. (12) Kjemiske forandringer gjennom oksidasjon fra lagring i vann på funksjonelle grupper og polymer kan forekomme. (14) Vann vil kunne diffundere inn til Interface mellom resin og filler materiale for å reagere med silaniserings-midlet og fyllstoff. Dette kan føre til dannelse av nedbrytningsprodukter som vil lekke til nærliggende miljø. (12) Små molekyler har større mobilitet fremfor store og forgrenede molekyler og er dermed forventet å lekke raskere ut. Herdegraden av kompositt er av stor betydning for hva og hvor mye som lekker ut av fremmedstoffer. Stor omsetning av dobbeltbindinger medfører mindre mengde fremmedstoffer i utlekkings-mediet. (15) Utlekkingsstoffer rett etter polymerisering vil være forbundet med initierings-kjemikalier, mens etter tid vil nedbrytningsprodukter fra selve polymeren utgjøre en større faktor. Under simulerte forhold betyr faktorer som væskeblanding og pH-grad mye for hva og hvor raskt substanser lekker ut fra kompositten. (15)

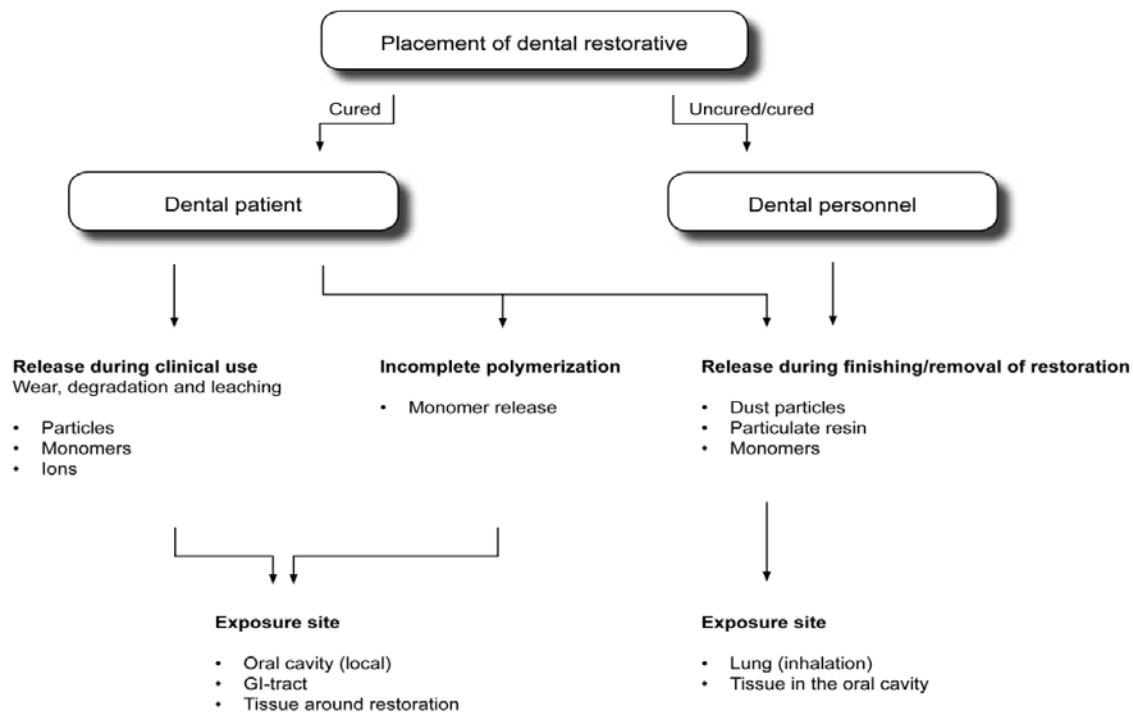
1.5 Toksikologi

Toksikologi er læren om uønskede effekter av kroppsfremmede stoffer (xenobiotika) på levende organismer. Xenobiotika kan påvirke et vidt spekter av funksjoner i en organisme og ha forskjellig alvorlighetsgrad. I hovedsak kan alle slike reaksjoner relateres til skader på cellenivå etter interaksjon mellom xenobiotikaet (eller dets metabolitter) og cellekomponenter. (16)

1.6 Toksisk påvirkning fra dentale materialer

Både tannlegepasient og tannhelsepersonell kan eksponeres for innholdsstoffer i plastbaserte dentalmaterialer (figur 1-3). Pasient eksponeres i hovedsak for utlekking av innholdsstoffer etter at materialene er herdet mens tannhelsepersonell eksponeres gjennom sitt daglige arbeid med uherdet materiale. Allergisk reaksjon ved direkte hudkontakt med metakrylater er et godt kjent problem blant tannhelsepersonell (17). Undersøkelser har vist at det hudforandringer på hender og fingre i form av rødme tørrhet og avskalling av hud er cirka tre ganger så hyppig i denne yrkesgruppen som hos resten av befolkningen. (18) Metakrylater er også rapportert å kunne gi astma-symptomer. (19) Det er lite konkret kunnskap om bivirkninger av plastbaserte dentale materialer hos pasient, men bivirkningsgruppen for odontologiske biomaterialer mottar om lag 100 rapporter om mistenkelige bivirkninger hos pasienter hvert år.

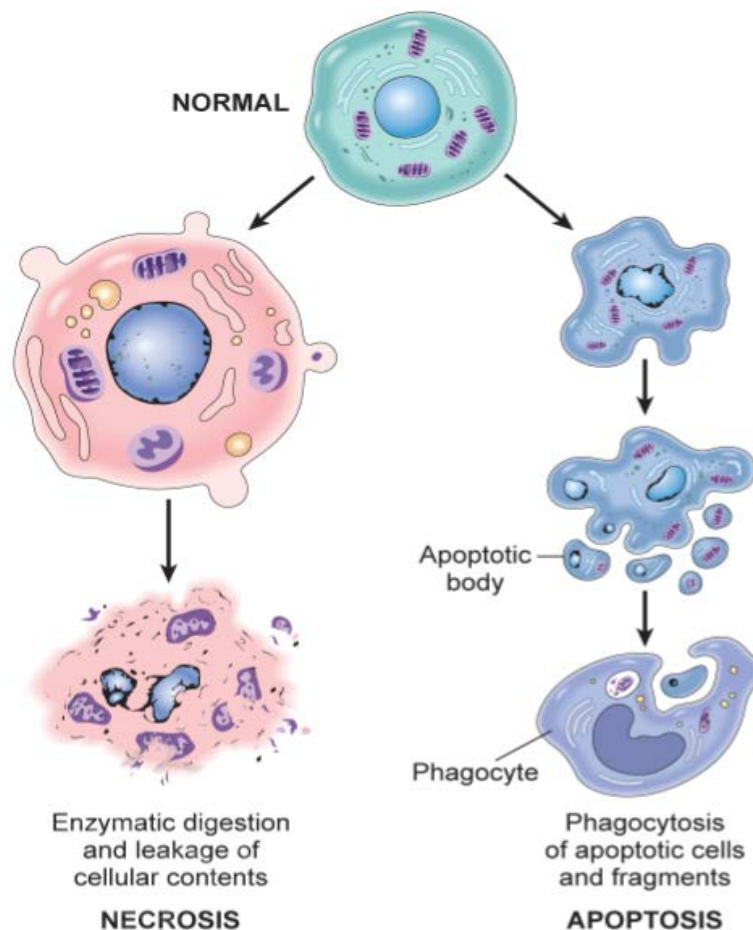
Detaljert kunnskap om hvordan plastmaterialer påvirker levende celler og derigjennom deres potensiale til å gi bivirkninger er i hovedsak basert på laboratoriestudier. I slike studier er interaksjoner mellom materialenes komponenter (hovedsakelig metakrylater) og celler i kultur beskrevet. Blant de mange studiene som foreligger er økt oksidativt stress, forstyrrelser av cellevekst og celledød ofte beskrevet. (20-22)



Figur 1-3. Distribusjon og opptak av dental- materialer for helsepersonell og pasienter etter uønsket eksponering. I tillegg til innånding og svelging kan flyktige væsker trenge gjennom huden. Figur hentet fra Vibeke Ansteinssons PhD avhandling (2013).

1.7 Cellereaksjon på fremmedstoffer

Cellen er den minste delen i en organisme som lever og formerer seg. Cellekjernen inneholder DNA som repliseres ved hver celledeling. Det dannes og går til grunne celler hele tiden, og mange går til grunne ved apoptose (programmert celledød). Celler som gjennomgår apoptotisk celledød tas opp av makrofager, nøytrofile granulocytter eller andre naboceller etter de er brutt ned. Denne celledødsformen kan skje ved skader på enkeltceller som ikke lar seg reparere. Cellemembranen er intakt under den apoptotiske prosessen, og det vil normalt ikke oppstå noen betennelse. Ved mer alvorlig skade (gjerne på grupper av celler) er ikke cellene i stand til å utføre den energikrevende apoptoseprosessen. Cellene dør da ved nekrose. Nekrotiske celler vil utvide seg, sprekke opp og celleinnholdet vil lekke ut. Nekrotisk celledød er ofte assosiert med betennelsesreaksjoner. Figur 1-4 viser de to celledødsformene.

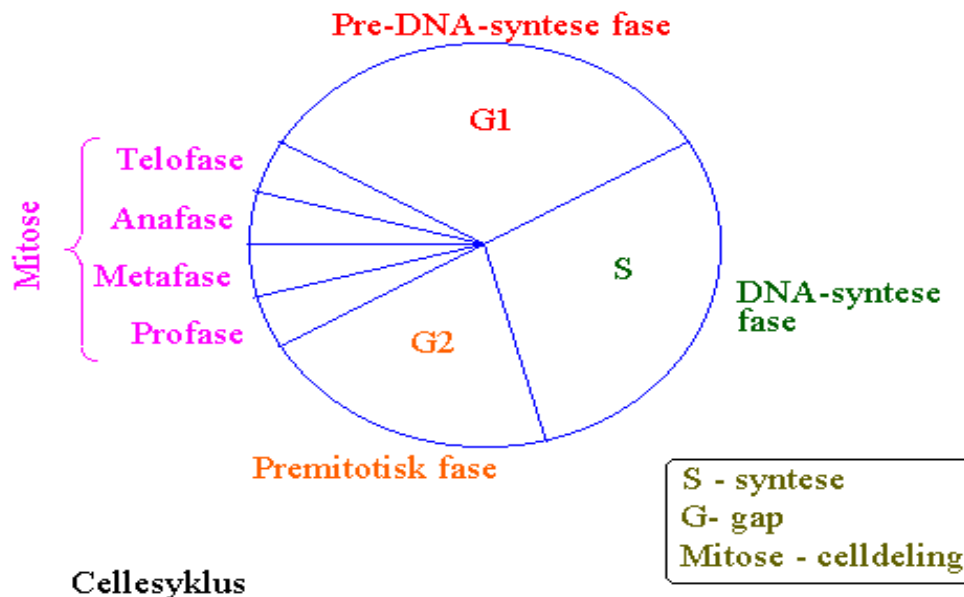


Figur 1-4. Celledød kan skje gjennom apoptose eller nekrose. Apoptose er en programmert celledød. Nekrose er en mere voldsom celledød hvor væske lekker ut og dannelse av inflammasjon (Figur Walker NI et.al Pattern of cell death)

1.8 Skader på arvestoffet(DNA)

Eksposering for metakrylater fra plastbaserte dentalmaterialer er rapportert å gi øket oksidativt stress (ROS) i celler.(21, 22) Økt ROS er foreslått å gi opphav til oksidative DNA skader. DNA-skader fører vanligvis til cellevekst forsinkelser for at cellene skal reparere skadene. (23) En DNA-skade som ikke blir reparert vil normalt aktivere apoptoseprosessen. Mer alvorlig er det om DNA skader ikke bli reparert, og cellen overlever. En slik manglende apoptose vil kunne føre til celler med gen-mutasjoner. Cellesyklus er en bestemt rekkefølge av sekvenser for som skal til slutt ende opp med deling av cellen til en helt lik kopi av den opprinnelige cellen. Celledelingen foregår over fire stadier. Første stadiet G1(gap1) er før cellen starter syntese av ny DNA. Syntetiserings-fase(S-fase) er fasen der DNA-tråden deles,

avleses og kopieres med enzymer. Ved G2(gap2) gjør cellen seg klar til å dele seg i to. Fase fire mitose(M) hvor selve delingen fullføres og to datterceller dannes. (24). Hvis celledelingen passerer kontrollpunktet ved G1, er det stor sannsynlighet for at celledelingen fortsetter hele veien. Hvis cellen ikke mottar signalet om videre fortsettelse vil cellen kunne gå inn i en G0 hvor cellene ikke deler seg, men går inn i en dvaletilstand. Celledelingen fortsetter fra G0 når det er behov for flere celler.



Figur 1-5 Celledelingen i et pattedyr er et komplekst samspill mellom mange faktorer som skal stemme for at prosessen i de fire fasene ikke skal påvirkes. Figur hentet fra: Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet Institutt for biovitenskap

1.9 Bruk av benzotriazol og miljø

Det finnes en rekke benzotriazoler i likhet med UV090 (triazol-monomer) som har den egenskapen at de virker som UV-absorbenter. Forbindelsene har grunnstruktur 2-(2-hydroksyphenyl)-benzotriazole og hvor hydroksyphenyl-ringen kan ha mange forskjellige substituerte grupper. Modifisering gjør forbindelsen interessant på mange bruksområder. Små mengder av forbindelsen brukes i dental kompositt. Som UV-absorbant har forbindelsen evne til å bremse lys-indusert nedbrytning og gulning. Benzotriazoler som UV-stabilisatorer er forbindelser som ikke lar seg bryte ned på kort tid. Mange av benzotriazol-forbindelsene er brukt i solkremer, shampo og kosmetikk. Andre bruksformål er korrosjons-inhibitorer, avisings-væske til fly samt antikondens-væske til linser. Siden benzotriazol-forbindelsene brukes i små mengder i kosmetikk av mange mennesker vil det kunne bli et større

forurensningsproblem. Svømme-bassenger, ferskvann og sjøvann vil kunne få stadig tilførsel av triazol-forbindelsene med et økende forbruk. (25) Selve prinsippet for UV-absorpsjon/lysfiltrering skjer ved at stråle-energien gjøres om til varme.

2 Mål med oppgaven

Målet med oppgaven er å kunne undersøke hvordan de biologiske og fysikalske egenskapene for en fremstilt kompositt varierer med mengden av forskjellige metakrylat-monomer. 2-(3-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4-hydroksyphenyl) ethyl-methacrylate (triazol-monomer, UV090) er komponenten som skal tilsettes for undersøkelse av de eventuelle forandringene av egenskapene. Oppgaven vil omfatte potensielle for uønskede helseeffekter. Parametrene bøyestyrke, utlekking, omsetningsgrad og celledoksisitet ble undersøkt for eksperimentelle kompositter med varierende triazol-monomer.

3 Materialer

3.1 Kjemikalier

Kjemikalitipe	Produkt nr	Kjemikalie firma/by/land
1,1,1-Trimethylolethanetrimethacrylate	2657	Polysciences, Warrington,USA
2-(3-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4-hydroksyphenyl) ethyl-methacrylate (Triazol-monomer)	413437	Sigma Aldrich, St Louis, USA
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	M2128	Sigma Aldrich, St Louis, USA
4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)	731085	NPE Systems, Florida, USA
Bisphenol A glycerolate dimetacrylate (Bis-GMA)	494356	Sigma Aldrich, St Louis, USA
Butylated hydroksytoluene (BHT)	59930	Koch Light Laboratories,Suffolk England
Kamferkinon	12.489-3	Aldrich Chemie, Steinheim, Tyskland
Dental Glass (fyllstoff)	GM27884	Schott AG,Mainz, Tyskland
Di-(2-ethylhexyl) azelate	2218	Polysciences, Warrington,USA
Dimetylsulfoksid (DMSO)	1.16743	KGaA, Merck, Damstadt, Tysk- land
Eagles Minimal Essential Medium (EMEM)	6428	Lonza, Verviers, Belgia
Etyl 4-dimetylamino benzoate (DMABEE)	E2.490-5	Aldrich Chemie, Steinheim, Tyskland
Fedale Bovine Serum (FBS)	F4135	Sigma Aldrich, St Louis, USA
Hydroksyetylmethacrylate (HEMA)	64166	Fluka, Lausanne, Sveits
L929 cellekultur	88102702	ECACC,Public Health, Salsbury, UK
Phosphate-buffered saline (PBS)	17-516	Lonza, Verviers, Belgia
Sucrose	10274	Analar, London,England
Triethylene glycol dimetacrylat (TEGDMA)	261548	Sigma Aldrich, St Louis, USA
tri-Natriumcitrat-2-hydrat	106448	KGaA, Merck, Damstadt, Tysk- land
Trypsin (0,5mg/ml)	B02-007E	Lonza, Verviers, Belgia

3.2 Teknisk utstyr og instrumenter

Analysevekt, Mettler Toledo XS 205, Greifensee, Sveits

Flowcytometer, Cell Lab Quanta SC, Beckman Coulter, Florida, USA

FTIR, Varian 670 IR FTIR Spectrometer, California, USA

Gasskromatograf (GC) Agilent Technologies 7890A GC-system, California, USA

Kolonne, HP-5MS UI, (Agilent J&W GC Columns), California, USA

Herdelampe, bluephase 16i LED CURING LIGHT, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein

Lampe-effekt måler LED Radiometer by Demeton, Kerr, USA

Massespektrometer 5975 Series Mass Selective Detector (MSD) Model nr 63170A, Agilent Technologies, California, USA

Omvendt fasekontrastmikroskop, Olympus CKX41 med Olympus C7070 kamera, Olympus Europe, Hamburg, Germany

Ristevannbad, Julabo, model SW 22, Wurttemberg, Tyskland

Sentrifuge, Rotina 35R, Hettich, Tuttlingen, Germany

Speedmixer DAC 150.1 FVZ-K, Waterkamp 1, 59075 Hamm, Tyskland

Spektrofotometrisk plateavleser, Synergy H1, BioTek Instruments Inc., Vermont, USA

Testprøvemaskin Lloyd LRX, Hampshire, United Kingdom

Lampe-effekt måler LED Radiometer by Demeton, Kerr, USA

3.3 Annet utstyr og programvare

Bürker tellekammer, Assistant, Sondheim, Tyskland

Klar polyesterfilm, TEKRA (Melinex 401,50 micron), Wisconsin, USA

MulticyclePhoenix Flow Systems, California, USA

Nexygen software-program (Ametek Lloyd Instruments Ltd), UK

Statistikk-program GraphPad Prism, GraphPad Software, California, USA

Sterile 5, 10 og 25 ml pipetter, Sarstedt, Nümbrecht, Germany

Sterile 6, 12 og 24 brønners-plater, Costar, Corning Incorporated, New York, USA

Sterile celledyrkningsflasker, 75 cm², Falcon, BD Biosciences, Massachusetts, USA

Sterile pipettespisser, Aerosol Resistant Tips (ART), Molecular BioProducts, USA

4 Metoder

4.1 Preparering av kompositt

Kompositt-blandinger ble preparert og innveid under dempet lys på grunn av lyssensitive komponenter. Tre paralleller a 20 gram for de respektive kompositter fremstilles ved lik blandingsprosedyre i speed-mixer. (Se blandingsforhold i tabell 4-1). Blandingen mikses i tre omganger. I første mikserunde fylles Bisphenol A glycerolate dimetacrylate (Bis-GMA), Triethylene glycol dimetacrylat (TEGDMA), kamferkinon, Etyl 4-dimetylaminobenzoate (DMABEE) og Butylated hydroksytoluene (BHT) som blandes sammen i 3 minutter ved 3000rpm. I andre mikserunde tilsettes halve fyllstoffmengden samt 2-(3-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4-hydroksyphenyl) ethyl-methacrylate (triazol-monomer) som mikses i ett minutt. I siste mikserunde tilsettes resterende fyllstoffmengde, hvor hele blandingen blandes i to minutter. Komposittene har seigtflytende, homogent utseende og er godt egnet for fremstilling av prøvelegemer. Triazol-monomer er i pulverform og medfører en høyere viskositet ved økt tilsetning. Homogeniteten til komposittblandingen ble undersøkt visuelt.

Triazol-monomer	Bis-GMA	TEGDMA	Fyllstoff
0	15	15	70
1	14,5	14,5	70
3	13,5	13,5	70
5	12,5	12,5	70

Tabell 4.1 Hovedkomponenter i blandingene. Hver blanding har 3 serier. Alle blandingene ble i tillegg tilsatt 0,33 % kamferkinon, 0,33% DMABEE og 0,20% BHT.

Herding av prøvelegemer utføres med bluephase 16i LED CURING LIGHT herdelampe fra Ivoclar Vivadent. Lysledertipp på herdelampen er 13mm i diameter. Herdelampen har lysområde fra 430-490nm og maksimum ved 470nm som også er kamferkinon sitt høyeste absorbanse nivå. Bluphase16i ble målt til 850mW/cm² med radiometer.

4.2 Tre punkts nedbøying

Mange materialer for dentalt bruk har fysikalske minimumskrav. En tre punkts nedbøying ble gjort etter ISO 4049:2009(E) (Dentistry-Polymer based restorative materials) for å undersøke bøyestyrken. Fremstilling av prøvelegemer fra komposittmiks gjøres i en metallform med dimensjonene høyde $2\pm 0,1$ mm, bredde $2\pm 0,1$ mm og lengde 25 ± 2 mm. Komposittmateriale presses hardt ned i metallformen. Metallformen med kompositt plasseres på hvit papir flate, samt klar polyesterfilm over og under. Ved herding brukes det en mikroskopi slides mellom metallform og herdelampe. Herdeforløpet startes på midten av prøven og alterneres til høyre/venstre gradvis utover langs prøvelegeme på sidene med en halv diameter lysledertipp i overlapp. Prøvelegeme herdes fra over og underside. Etter belysning legges prøveformen med herdet kompositt i 15 minutter i 37°C vannbad. Prøvene tas ut av formen og oppbevares ved 37°C i separate vannbeholdere til de testes etter 24 timer.

Prøvene ble testet i Lloyds test-prøvemaskin. Se figur 4-1 .Avstanden mellom kantene prøven er plassert på er 20mm. Jig-hastigheten er 0,75mm/min. Jig-stang treffer prøven på midten med økende kraft til brudd inntreffer. Bøyestyrken måles i det testlegemet frakturerer. Høyde og bredde på prøvelegeme er målt og satt inn i Nexygen software-program før testen starter. Bøyestyrken beregnes med følgende formel

$$\sigma = \frac{3Fl}{2bh^2}$$

F er maksimum registrert kraft i Newton

l er avstanden mellom spenn-kantene hvor prøven ligger(20mm)

b er bredden på prøvelegeme, mm

h er høyde på prøvelegeme, mm

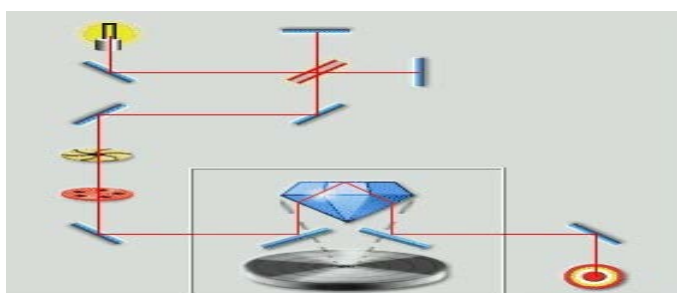
σ er bøyestyrke i MPa



Figur 4-1. Måling av bøyestyrke med Jig som treffer komposittprøve

4.3 Infrarød spektroskopi

Infrarød spektroskopi (IR) er en gammel oppdagelse som ble kjent for mere enn hundre år siden, men fikk betydning rent analytisk først etter 1940. Det infrarøde bølgeområdet strekker seg 1 til 100 mikrometer, mens et kommersielt IR-instrument operer i området 2,5 til 30 mikrometer. IR-spektret angir absorpsjon som funksjon av invers bølgelengde i centimeter (cm^{-1}). Prøven plasseres i stråle gangen i prøvekompartimentet og der hvor IR-strålen treffer prøven. Når bindinger i molekylet vibrerer med samme frekvens som IR-strålen skjer det en absorpsjon. IR-strålen splittes med et speil (beamsplitter) før prøven, en stråle sendes gjennom prøven og en går uhindret rett forbi. Forskjellen i energien i IR-strålene sammenlignes ved samme måle-tidspunkt og uttrykkes som en absorpsjon. (26) En betingelse for å registrere absorpsjon er at det oppstår et dipolmoment gjennom molekylets vibrasjonsbevegelser.



Figur 4-2. Prinsippet for ATR. IR-strålen går gjennom diamanten og noen mikrometer inn i kompositten på toppen og ut igjen til detektor. Referansestrålen går direkte til detektor. Forskjellen i absorpsjon mellom fri IR-stråle og strålen gjennom kompositt utgjør absorpsjonen i spekteret. (Figur hentet fra Paint Spectra Database)

De mest kjente metodene for FTIR er Kaliumbromid (KBr), Diffuse Reflektion (DR), Attenuated Total Reflection (ATR), væske i kyvette og gas i kyvette. Den viktigste metoden for måling av omsetningsgrad er ATR. Metoden passer for pulverprøver, plastfilmer, polymerer og viskøse substanser. Prøven plasseres på en diamant, se figur 4-2. IR-strålen går gjennom krystallen og skrår inn i mediet for å reflektere tilbake før den går videre til detektor. Hvor langt IR-strålen trenger inn i prøven avhenger av brytningsindeks, innkommende vinkel for IR-strålen og hvor stor bølgelengden er når den treffer mediet. Dybden IR-strålen penetrerer kan være på ca. 0,5 til 5 mikrometer. (27).

4.4 Omsetningsgrad av dobbeltbindinger.

Graden av omsetning er definert som prosent av antall reagerte karbon dobbeltbindinger i metakrylat-gruppene. De ureagerte metakrylat-monomerene kan forekomme som frie monomerer, eller hvor en av to metakrylat-grupper fra monomeren har inngått i polymerkjeden. (10). De frie monomerene (rest-monomerer) vil etter hvert kunne lekke ut fra kompositten etter tid. (28) TEGDMA og Bis-GMA har to metakrylat-grupper i molekylet som har mulighet til å inngå i polymerreaksjon. Triazol-monomeren har kun en metakrylatgruppe og er derfor ikke et kryssbindingsmolekyl. Bis-GMA har i tillegg tre dobbeltbindinger inne i hver av de to aromatingene som ikke inngår i selve polymerreaksjonen. Aromat-dobbeltbindingene blir derfor referanse-topper i IR-spektret i forhold til dobbeltbindingen i metakrylat-gruppen. I IR-spektra har den alifatiske metakrylat-karbon-karbon dobbeltbindingen absorpsjon ved ca. 1638cm^{-1} og de aromatiske dobbeltbindingene absorpsjon ved ca. 1608cm^{-1} . (10) Aromatdobbeltbindingen hos Bis-GMA ved ca. 1608cm^{-1} er blitt funnet som den mest stabile referansetopp for måling av omsetningsgrad (29)

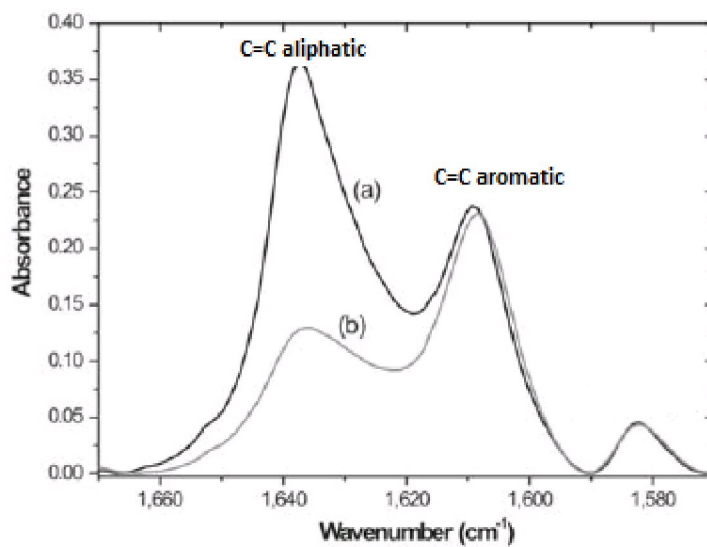
4.4.1 Måling av omsetningsgrad

Det ble kuttet ringer av polyetylenrør med diameter på 5 millimeter og med høyde på to millimeter. I plastringen ble det tilsatt kompositt direkte ned mot Attenuated Total Reflection (ATR)-diamanten. Kompositten ble hardt presset ned i en hul sylinder-form og en klar mylar polyesterfilm ble lagt på toppen av kompositt-prøven. Kompositten ble skannet fra 400 til 4000cm^{-1} . Toppene som skal sammenlignes for å bestemme omsetningsgrad har bølgetall ca. 1608cm^{-1} for aromatisk C=C referanse og ca. 1638cm^{-1} for alifatisk C=C binding, se figur 4-3.

Prøven belyses i 20 sekunder fra oversiden og skannes direkte. Prøvelegemet ble liggende på målepunktet/diamanten. Prøven ble dekket til mens den lå på diamanten, slik at den ikke ble påvirket av eksternt lys i rommet. Kompositt-prøven siste scan ble gjort etter tre timer fra lysharding. Arealet under toppene ble målt ved å trekke en rett grunnlinje mellom hver ende av bunnene av absorpsjonstoppens grunnlinje. Samme areal-forstørrelse (faktor 5) ble brukt på de aromatiske og alifatiske-spektertoppene som skulle brukes i formelen.

Omsetningsgrad ble beregnet etter følgende formel.

$$\text{Omsettningsgrad} = \left(1 - \frac{(\text{alifatisk } C = C / \text{aromatisk } C = C) \text{ polymer}}{(\text{alifatisk } C = C / \text{aromatisk } C = C) \text{ monomer}}\right) * 100$$

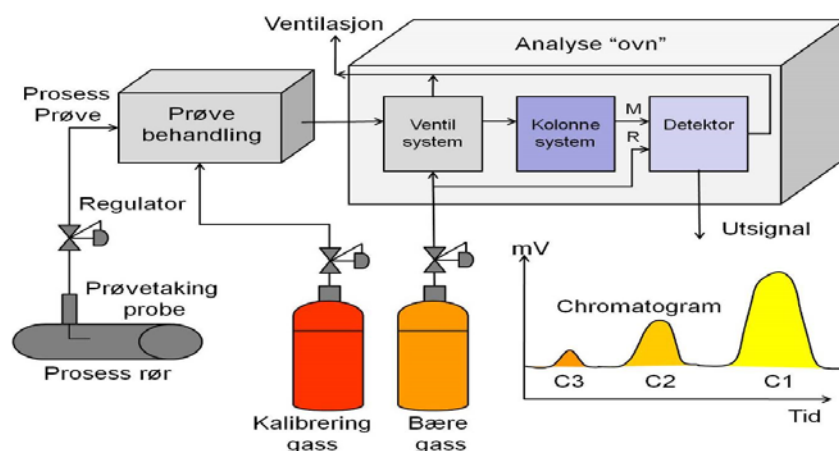


Figur 4-3. FTIR spekter av (a) uherdet kompositt og (b) herdet kompositt. Figuren viser hvordan spektrets absorbanse-topp av alifatiske dobbeltbindinger på 1638cm^{-1} reduseres etter polymerisering (Bilde: Moraes J (30))

4.5 Gasskromatografi og massespektrometri (GC/MS)

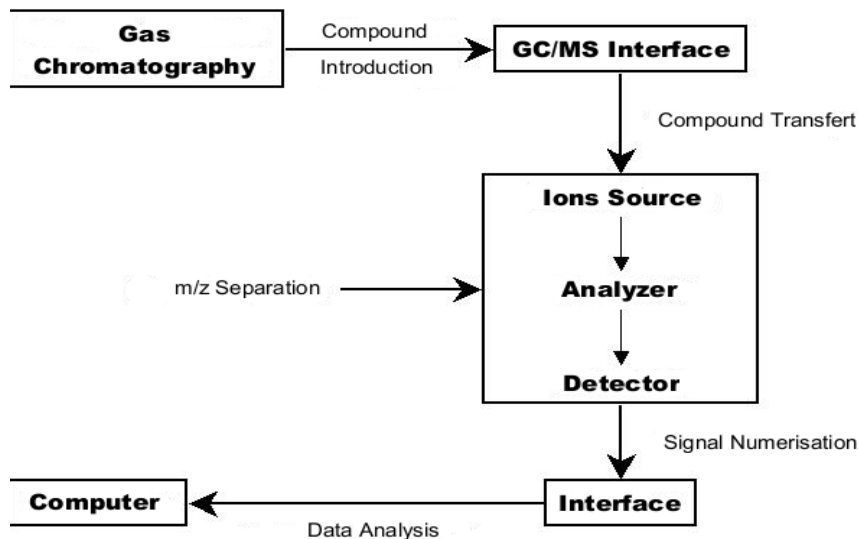
Kromatografi er en fellesbetegnelse av flere metoder for analytisk atskillelse av kjemiske forbindelser i blanding. GC er en separasjonsmetode for væsker, løste stoffer i væsker og gasser. Blandingen injiseres inn i GC og ledes til kolonnen hvor den drives videre ved hjelp av en bæregass som kan være helium, nitrogen, argon (se prinsippskisse i figur 4-4). Kravet er at bæregassen er inert mot analytten. Retensjonstiden (RT) for prøven avhenger av kokepunkt, polaritet, molekylstørrelse som viktige faktorer samt polaritet i stasjonærfasen.

Detektoren har en høyere temperatur enn kolonnen noe som medfører at analytten befinner seg i gassform i detektoren. Komponentene separeres i kolonnen før de når detektoren.



Figur 4-4. Prinsippet for en gasskromatograf (Figur hentet fra Teknisk Ukeblad)

Det finnes flere detektor-typer, hvor Masse Selektiv Detektor (MSD) er mye brukt. Signalet fra analytten blir sammenlignet med signalet til indre standard i kvantitativ analyse. En indre standard er et stoff tilført i kjent mengde. En «solvent delay» blir brukt for å oppnå et tidsrom fra GC-separering til MS -analysen starter. I MS-analysen er analytt-molekylet i gass-fase og blir derfra bombardert med elektroner som kan bryte de svakere og utsatte bindingene. Molekylets fragmenter blir delvis ionisert og detektert (figur 4-5).



Figur 4-5. Blandingen blir separert i enkelt komponenter fra gasskromatografen før stoffet kommer inn i masse-spektrometeret. Analytten bombarderes av elektroner og kation-fragmenter med bestemte molekylmasse dannes. (Figur: Swiss Laboratory ,Lausanne)

Identifisering skjer via et internt GC/MS-bibliotek (31) For å kvantifisere et bestemt ion brukes metoden Selected Ion Monitoring (SIM) som er en sensitiv metode (32). Separerte stoffer i blandingene vises som adskilte topper i et kromatogram. Areal og høyde for GC-toppene forteller noe om mengdeforholdet av komponenter i løsningen.

4.6 GC/MS prøvem metode for utlekking

Kompositt-legemer ble lysherdet i 20 sekunder på en side i en prøveform med høyde 2mm og diameter på 5mm. To prøvelegemer legges i prøveholder og settes i vannristebad ved 37°C direkte etter herding. Prøvene oppbevares i en 2ml blanding etanol/vann i forholdet 75/25 volumprosent i 24 timer. Prøvelegemene ble fjernet fra væskebeholderne av glass og væsken ble oppbevart kaldt til analysen starter.

GC/MS analyseparametere:

- Temperaturprogram: 50 °C (1min)-10 °C/min-250 °C- 30 °C/min-300 °C (10min)
- Ovnstemperatur ble satt til 250°C.
- Injeksjonsvolum:1µl med splitt forhold, 10:1,total gjennomstrømming: 14ml/min(med helium-gass)
- Start time: 3,0 min (Solvent delay).
- Scan parametre (lav til høy masse) 40-600. MS Quadropole: 150°C og MS Source: 230°C.

Retensjonstider (RT), indre standard (IS) og ioner benyttet til kvantifisering av monomere er vist i tabell 4-1

	<i>RT (min)</i>	<i>Tids vindu (min)</i>	<i>Kvantifiserings ion (m/z)</i>	<i>Kvalifiserings ion(er) (m/z)</i>
<i>TEGDMA</i>	<i>2,75</i>	<i>2,5-2,9</i>	<i>113</i>	<i>44, 69</i>
<i>IS1</i>	<i>3,1</i>	<i>2,9-6,2</i>	<i>69</i>	<i>41</i>
<i>IS2</i>	<i>6,58</i>	<i>6,2-6,8</i>	<i>171</i>	<i>70, 57</i>
<i>Triazol-monomer</i>	<i>7,0</i>	<i>6,8 - slutt</i>	<i>237</i>	<i>224, 238</i>

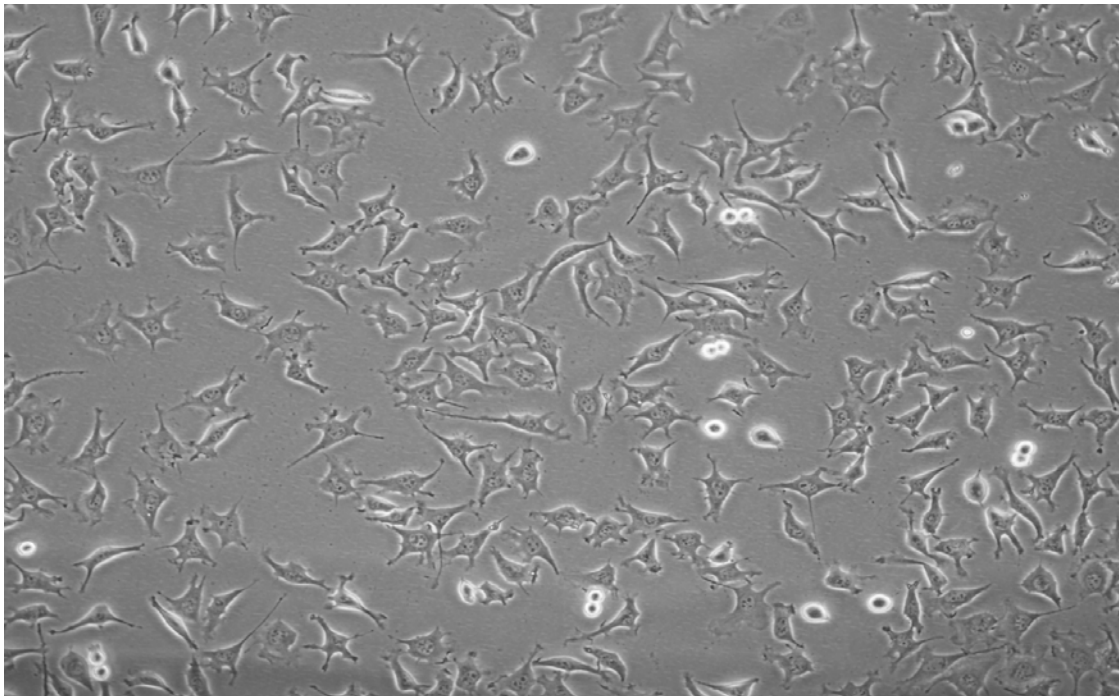
Tabell 4-1. Tabell over retensjonstid og kvantifiseringsion for TEGDMA og triazol-monomer samt indre standard.

4.7 *In vitro* cellekultur for toksisk analyse

Cellebehandling følger ISO-Standarden Biological evaluation of medical devices-part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity 10993-5:2009 (E), MTT cytotoxicitets-test som refererer til L929 musefibroblaster. Derfor er denne cellelinjen valgt som modell for eksponeringsstudier.

4.8 Celledyrking

Cellene dyrkes i celleflasker med EMEM-medium tilsatt 10 % føtalt kalveserum ved 37°C. Atmosfæren cellene dyrkes i inneholder 5% karbondioksid og har en luftfuktighet > 95%. Cellene splittes og fortynnes to ganger i uken ved trypsinering. L929-fibroblaster deler seg normalt en gang pr døgn. Ofte er subkulturen etter dag en noe mindre, først fra to til ti dager etter start vil cellene vokse eksponentielt. (33) Cellene ble kontrollert i mikroskop for å sjekke vekst og utvikling mellom trypsinerings- periodene. Cellene ble talt i et Bürker tellekammer før utsåing til cellebrønner og eksponering.



Figur 4-5. Mikroskopibilde av L929 fibroblast cellene som er brukt i oppgaven.

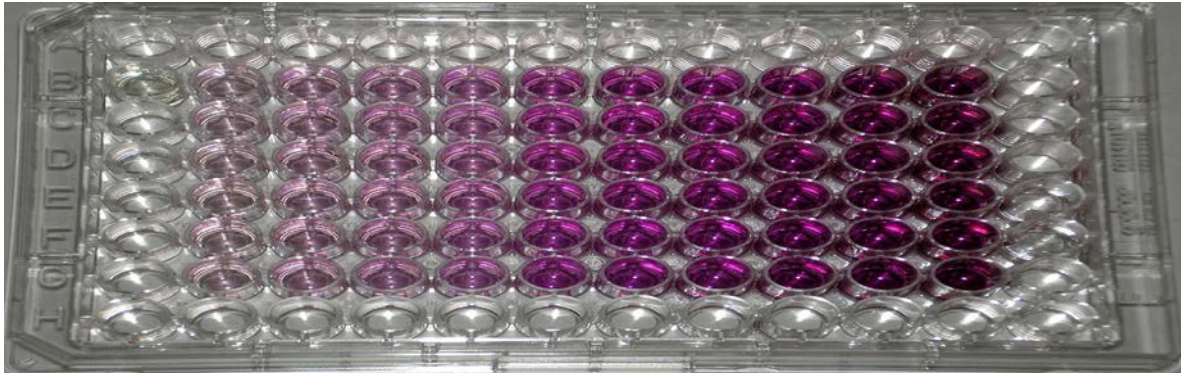
4.9 MTT-test metode for bestemmelse av celleviabilitet.

MTT er en spektrofotometrisk metode for å sammenligne antall levende celler etter de blir på tilført en mulig toksisk substans i et test-medium. (34) (35)

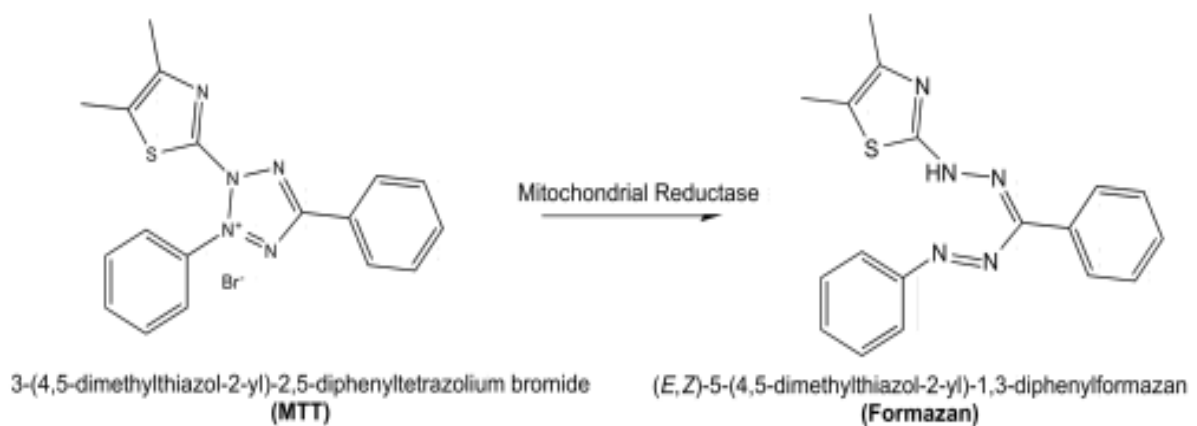
Gulfarget MTT reduseres i viable celler til en lillafarget formazan-forbindelsen (figur 4-6).

Cellene og formazan løses ved å tilsette DMSO. Antall viable celler regnes som proporsjonal

med fargeintensiteten og måles spektrofotometrisk ved 570 nanometer. Kontrollbrønnene med cellekultur-mediet defineres som 100 prosent overlevelse. Figur 4-7 viser en 96 brønners plate med prøver klar til avlesning.



Figur 4-7. Bilde av 96 brønners celleplate hvor MTT har blitt redusert til formazan.



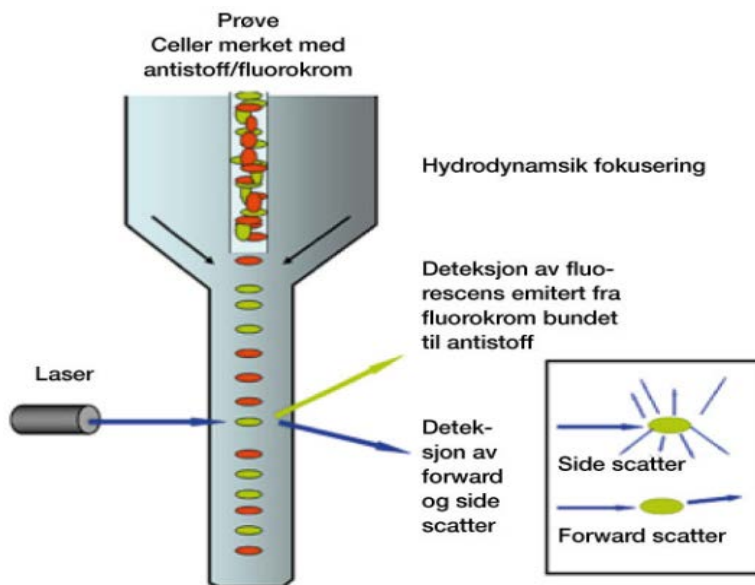
Figur 4-6 MTT reduseres med en mitokondriell reduktase og danner formazan; Mengden formazan som er dannet måles spektrofotometrisk ved 570nm.

4.9.1 Prosedyre for MTT test

- 15000 celler tilføres hver brønn (96 brønners plate)
- Triazol-monomer konsentrasjoner 200-100-50-25-10-5 μ M tilføres
- Inkubering 24 timer
- Tilsatts av 100 μ l MTT pr brønn
- Inkubering 1 time
- Avhelling av MTT fra platene
- Tilsattes av 100 μ l DMSO for å løse opp formazan
- Riste celleplatene i 20 minutter
- Avlesning av absorpsjon ved 570nm

4.10 Flowcytometri

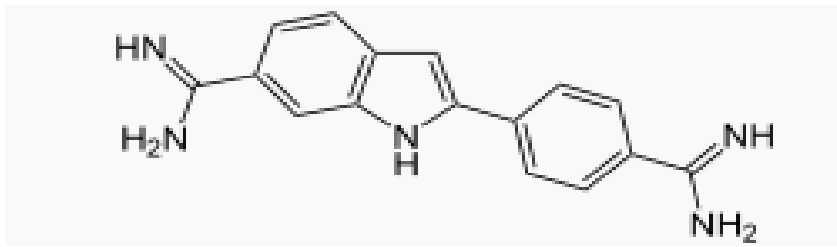
Flowcytometri er en metode som kan måle flere enkelt parametere på hver enkelt av et stort antall partikler (som for eksempel celler). Hovedkomponenter i flowcytometri er væskesystemet, optikk og elektronikk, se figur 4-8. Hovedhensikten til væsken er å frakte materiale som skal undersøkes til et analysepunkt. Bare en celle eller et analyseobjekt kan passere gjennom deteksjonskammeret av gangen. Etter bestråling kan parametere som f.eks. lysspredning og eller fluorescens registreres ved hjelp av en fotomultiplikator. Når cellen passerer lysstrålen vil fluorescens-DNA forbindelsen bli eksitert til et høyere energinivå. Fluorescens -lyset som registrertes har mistet noe energi og har derfor en lengre lengere bølgelengde. Styrken på det eksiterte lyset omgjøres til en cellevekstprofil. Eksiteringskilden kan være hvitt lys fra wolfram, kvikksølv-kilde eller laserlys. Væske-hastigheten med celler gjennom analysepunktet er avgjørende for oppløsningen av data. Binding av fluorescensforbindelse til substans vil påvirke signalstyrken til detektoren.



Figur4-8. Prinsippskisse av et flowcytometer. Celler merket med fargestoff kommer inn i prøvekammeret og eksiteres av en laserstråle. Det utsendte fluorescens-lyset registreres og omgjøres til en cellevekstprofil i øyeblikket.(Figur hentet fra Bioingeniøren,NITO)

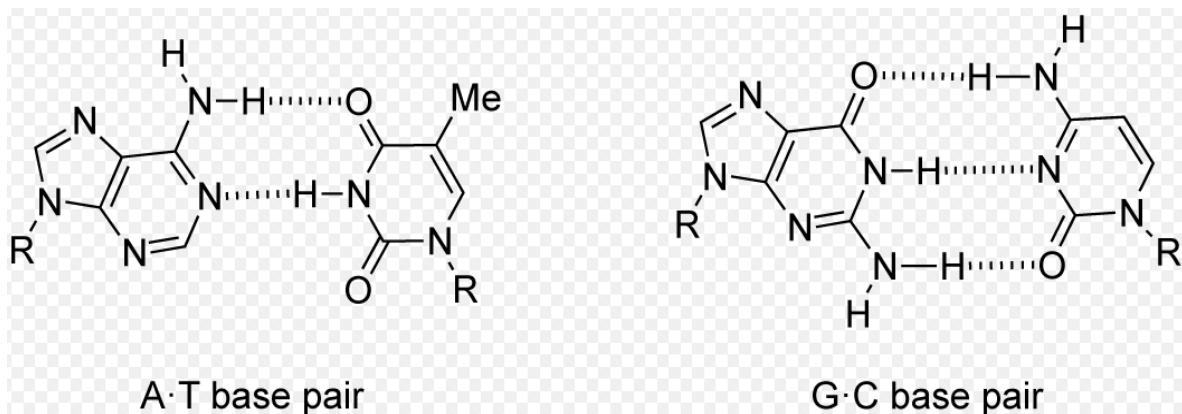
4.11 Bestemmelse av cellevekstprofil

Til flowcytometri forsøket brukes også L929 celle-linjen. Cellene er dyrket frem på samme måte som under MTT-forsøket. Det ble brukt seks brønners celleplate. Alle seks brønnene ble hver tilført ca. 160.000 celler. Celletettheten og forhold sjekkes i brønnene med mikroskop. 24 timer etter ble brønnene ble tilsatt 200-100-50-25-10 mikromolar triazol-monomer i DMSO samt, kontroll på 0,1% DMSO. Etter 24 timer i celleinkubator i ble cellemediet fjernet og cellebrønner vasket med PBS. Hver brønn ble trypsinert (200 µl) og slemmet opp med 1,0 ml PBS. Prøvene ble sentrifugert med 250 g, ved 4°C i 5 minutter. Etter sentrifugering slemmes cellepelleten opp i 100µl citratbuffer (Citratbuffer: 85,5 g sucrose, 11,8 g trinatriumcitrat og 50 ml DMSO fortynnet til 1000 ml med destillert vann). Prøvene fryses ned ved minus 20°C inntil flowcytometri-undersøkelse.



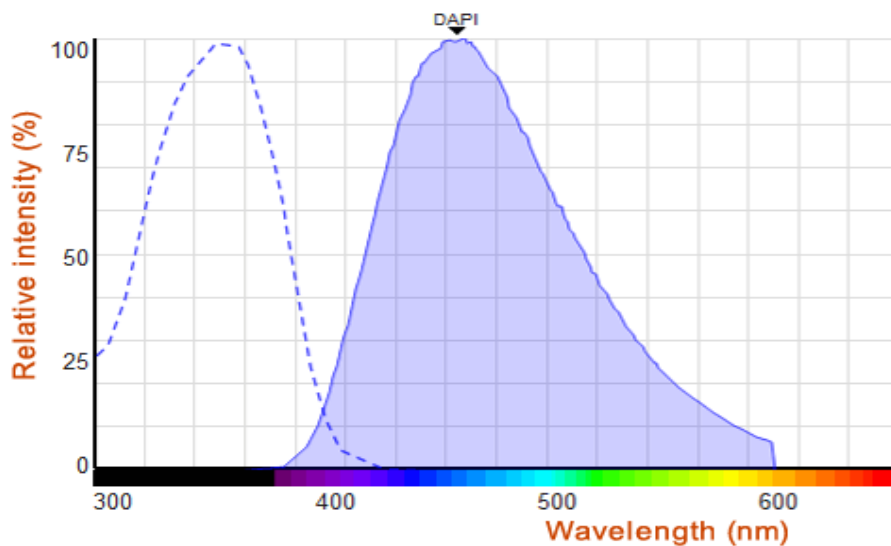
Figur 4-9 Strukturformel for fargestoffet 4,6-diamino-2-phenylindole(DAPI)

Prøvediet til flowcytometri tines opp. For å kunne registrere fluorescens-intensiteten tilføres 4,6-diamidino-2-phenylindole-dihydroklorid (DAPI; figur 4-9)) som binder seg spesielt til de A-T rike regionene i DNA-heliksen (figur 4-10).



Figur 4-10 Hydrogenbinding mellom baseparene Adenin mot Cytosin og Guanin mot Thymin. Fargestoffet DAPI binder seg spesielt til de AT-rike regionene

Flow cytometert injiseres med 100 µl prøve til analyse-kammeret. DAPI-bindingen til DNA medfører dannelse av et kompleks som har absorpsjonsmaksimum ved 358nm og at det eksiterte lyset som sendes har emisjon-maksimum ved 461nm. Se figur 4-11



Figur 4-11. DAPI-DNA komplekset absorberer ved 358nm og eksiterer lys ved 461nm. Deler av eksitasjonsenergien går ut i varme derfor øker fluorescensbølglengden.(Figur hentet fra www.ammr.org.au/myscope)

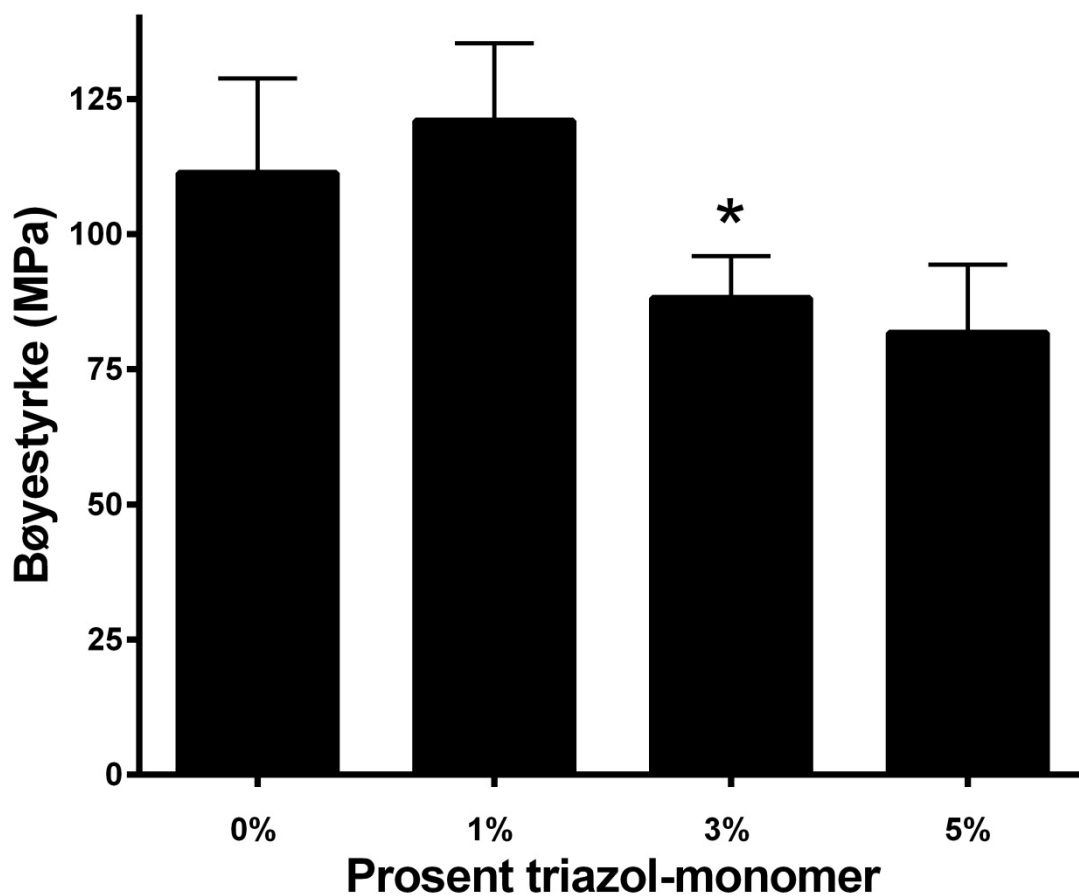
4.12 Statistikk

For analyse av resultatene og evaluering av forskjeller mellom de ulike gruppene ble student t-test benyttet, med signifikansverdi (P) mindre enn 0,05 betraktet som signifikant. Resultatene og figurene ble behandlet i dataprogrammet GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5 Resultater

5.1 Bøystyrke for komposittprøvelegeme

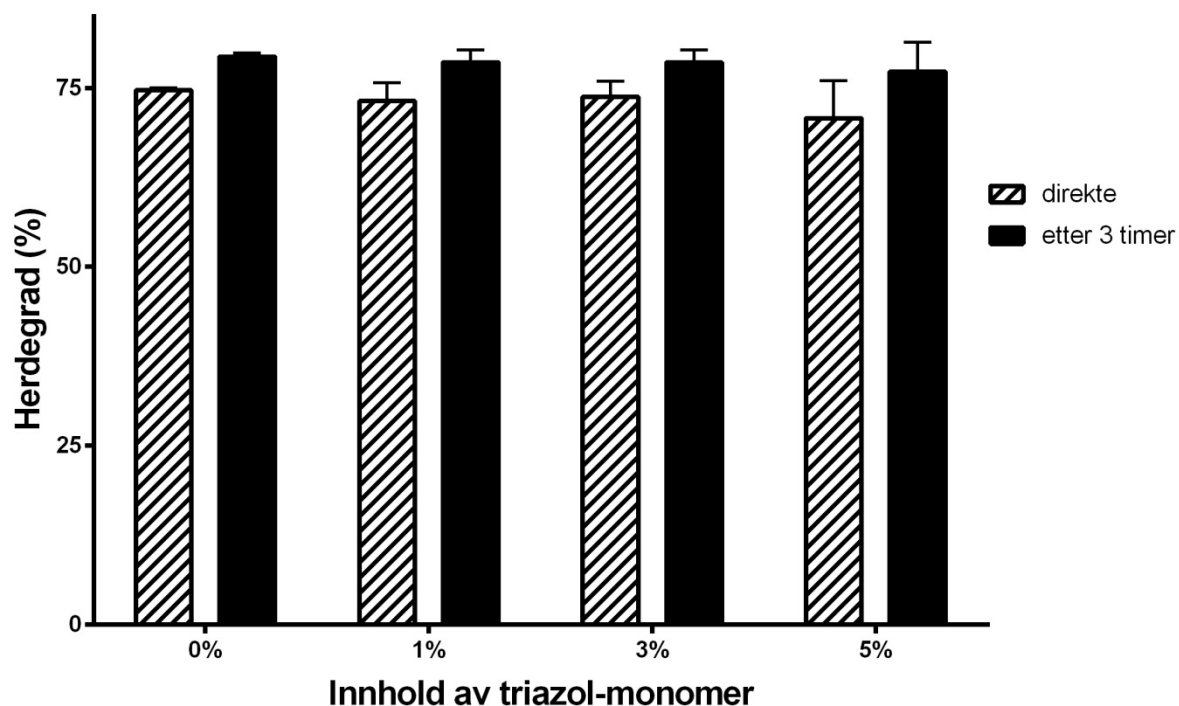
Resultater av bøystyrketest av kompositter med 0, 1, 3 og 5 prosent triazol-monomer er presentert i figur 5-1. Bøystyrken viser ingen signifikant forskjell mellomkompositt med 0 % og 1% triazol-monomer. Prøve-seriene med 3 og 5 prosent triazol-monomer viser en tendens til lavere bøystyrke selv om bare 3 % er signifikant.



Figur5-1. Målt bøystyrke i MPa for de forskjellige komposittseriene. Hvert prosentnivå inneholder gjennomsnittet av 18 paralleller (6 prøver av hver batch). Resultatene viser gjennomsnitt \pm standard avvik. Asterisk (*) indikerer signifikant forskjellig fra kontroll ($p < 0,05$).

5.2 Måling av omsetningsgrad for metakrylat dobbelt bindinger med FTIR

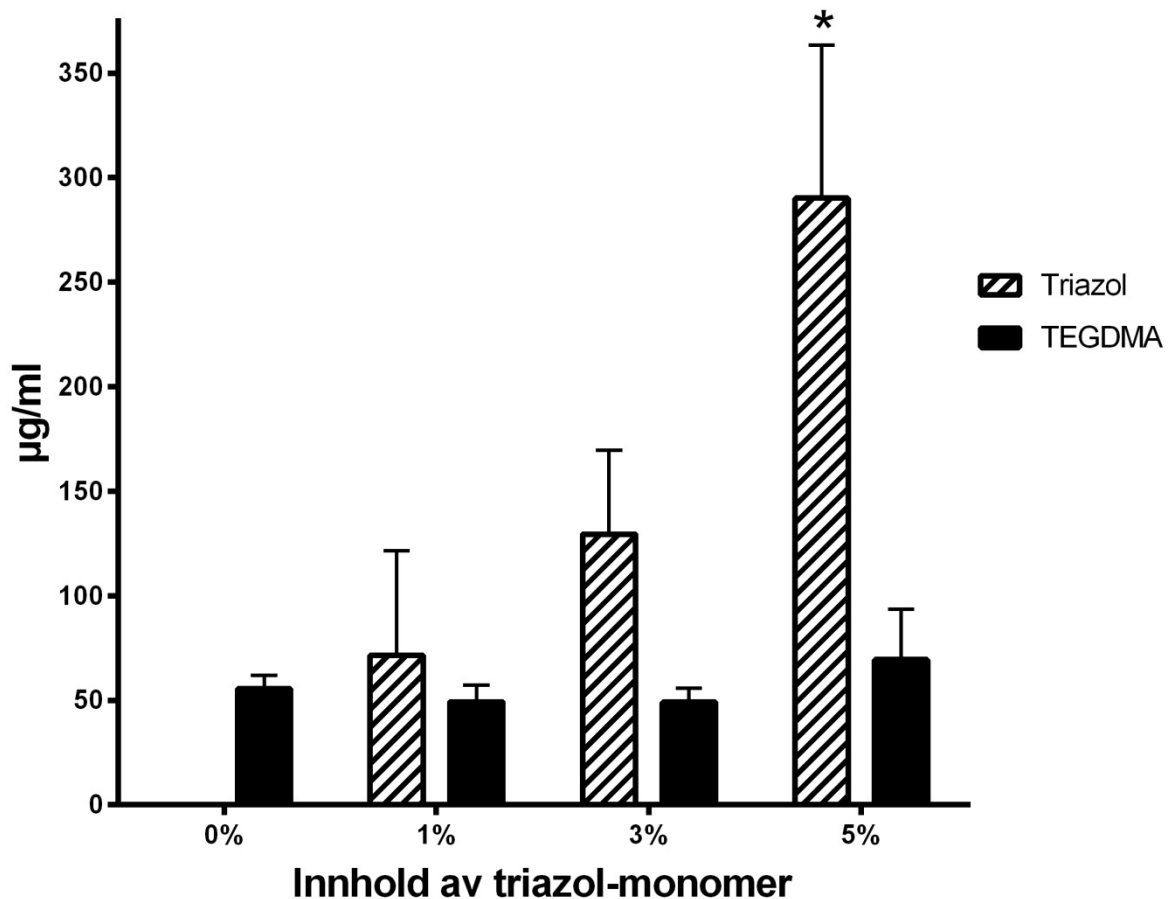
Omsetningsgrad for kompositter med 0, 1, 3 og 5 % triazol-monomer er presentert i figur 5-2. Det var ingen signifikant forskjell mellom de fire forskjellige kompositt-blandingene på de målte tidspunkt. Målingene antyder økt omsetningsgrad etter 3 timer sammenlignet med umiddelbart etter herding.



Figur 5-2. Søylediagrammet viser omsetningsgrad av dobbelt-bindinger i metakrylat-gruppene. Resultatene viser gjennomsnitt ($n=6$) \pm standard avvik.

5.3 Utlekk av triazol-monomer og TEGDMA fra herdet kompositt

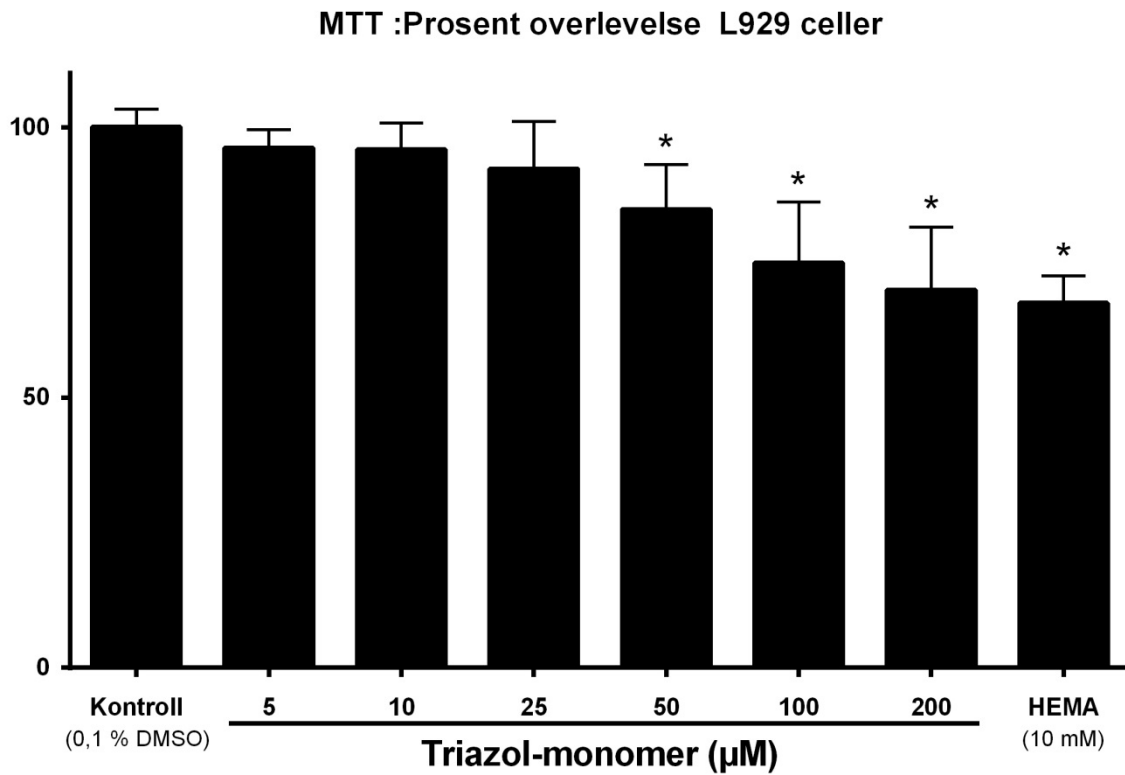
Ved hjelp av GC/MS og analyttenes spesifikke retensjonstid ble kvantumet av utlekket triazol-monomer og TEGDMA bestemt. Resultatene er presentert i figur 5-3. Mengden utlekket triazol-monomer øker med triazol-monomer mengde i kompositten. Det ble ikke målt signifikante endringer i mengde utlekket TEGDMA ved økende mengde triazol-monomer i kompositten.



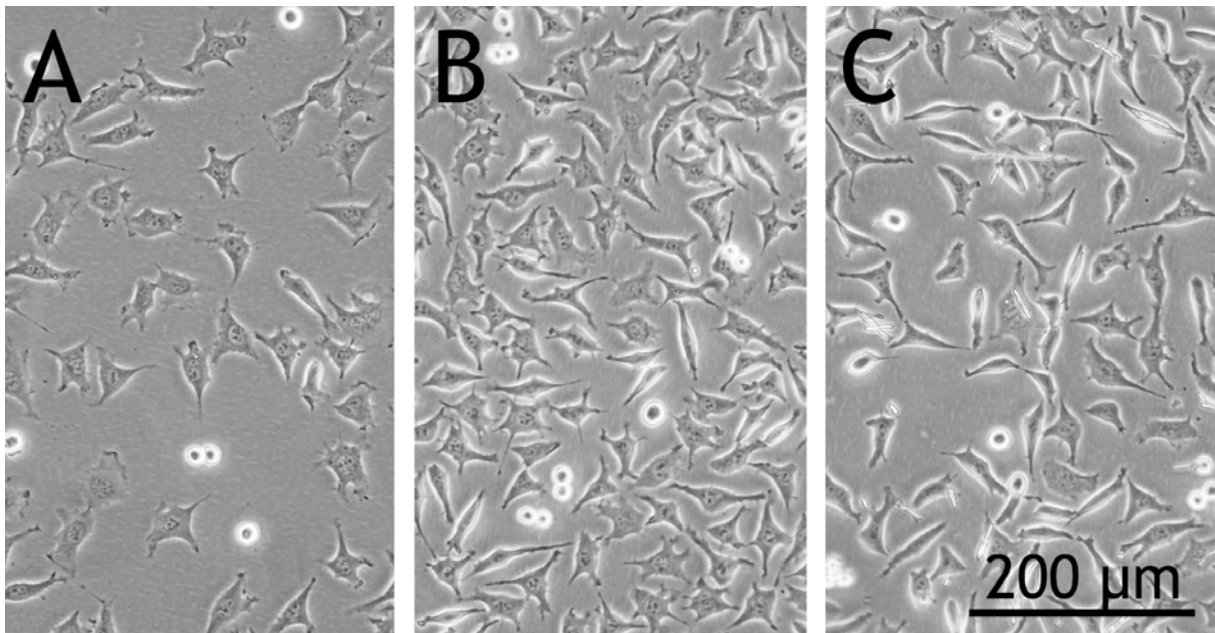
Figur 5-3. Søylediagrammet viser utlekk av triazol-monomer og TEGDMA i etanol/vannblanding. Resultatene viser gjennomsnitt ($n=12$) \pm standard avvik. Asterisk (*) indikerer signifikant forskjellig fra prøve med 1% triazol-monomer ($p<0,05$).

5.4 Toksisitet av triazol-monomer med MTT

Overlevelse av L929 celler etter eksponering for triazol-monomer er vist i figur 5-4. Resultatene viser at triazol-monomer reduserer viabiliteten med økende konsentrasjon. 2-hydroxyetylmetakrylat (HEMA) er tatt med som positiv kontroll (10 mM). Dimetylsulfoksid (DMSO) er brukt som løsningsmiddel i triazol-monomer stockløsningen. DMSO eksponering alene viser ingen endring i viabilitet. Mikroskopibilder av cellene før tilsetning av MTT er vist i figur 5-5.



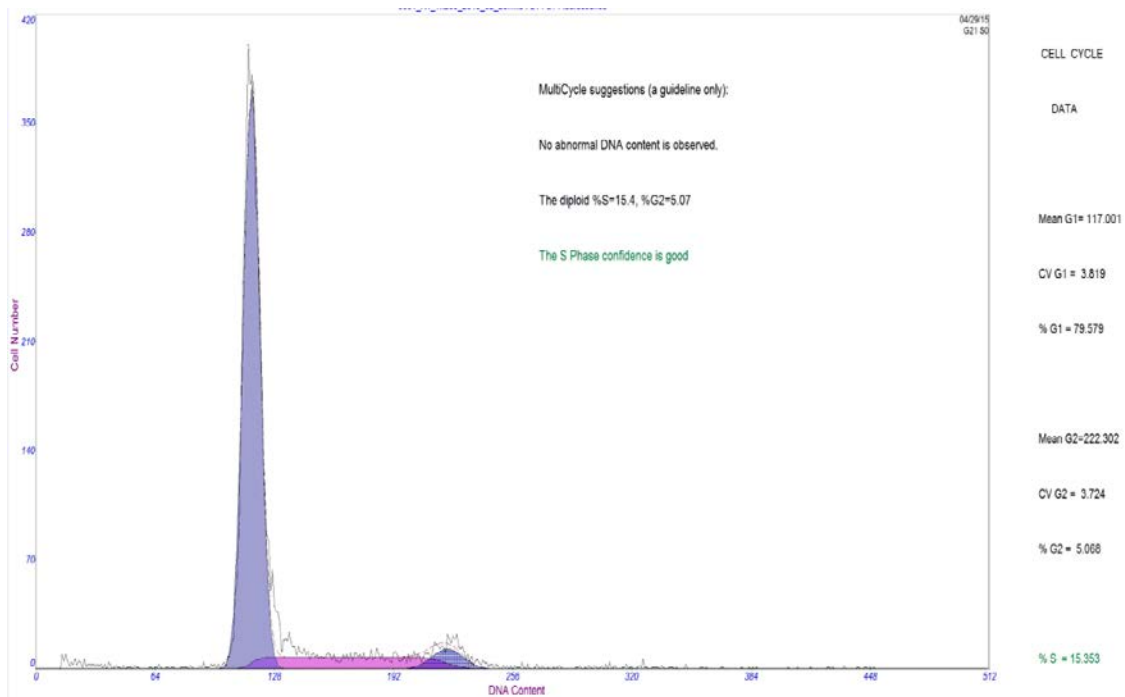
Figur 5-4. Søyle-diagrammet viser endring i viabilitet ved eksponering for triazol-monomer og 10 mM HEMA. Resultatene viser gjennomsnitt ($n=5$) \pm standard avvik. Asterisk () indikerer signifikant forskjellig fra kontroll ($p<0,05$).*



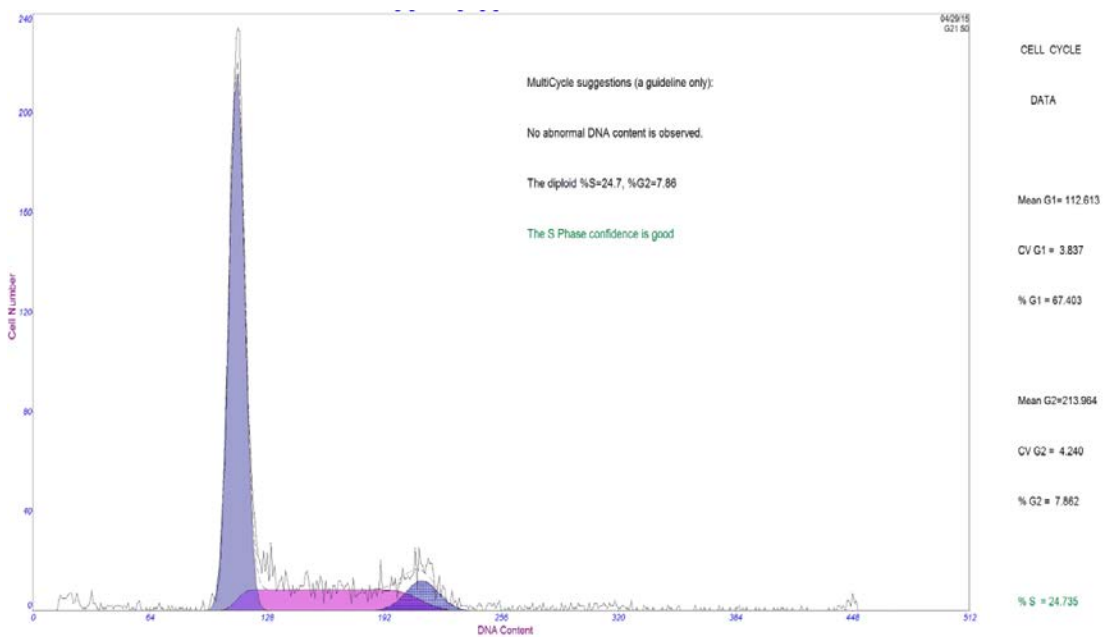
Figur 5-5. L929-celler ved forskjellige tidspunkt og behandlinger. A) kontroll ved 0t, B) kontroll ved 24t C) 200µM triazol-monomer ved 24t.

5.5 Flowcytometri og celledyklus

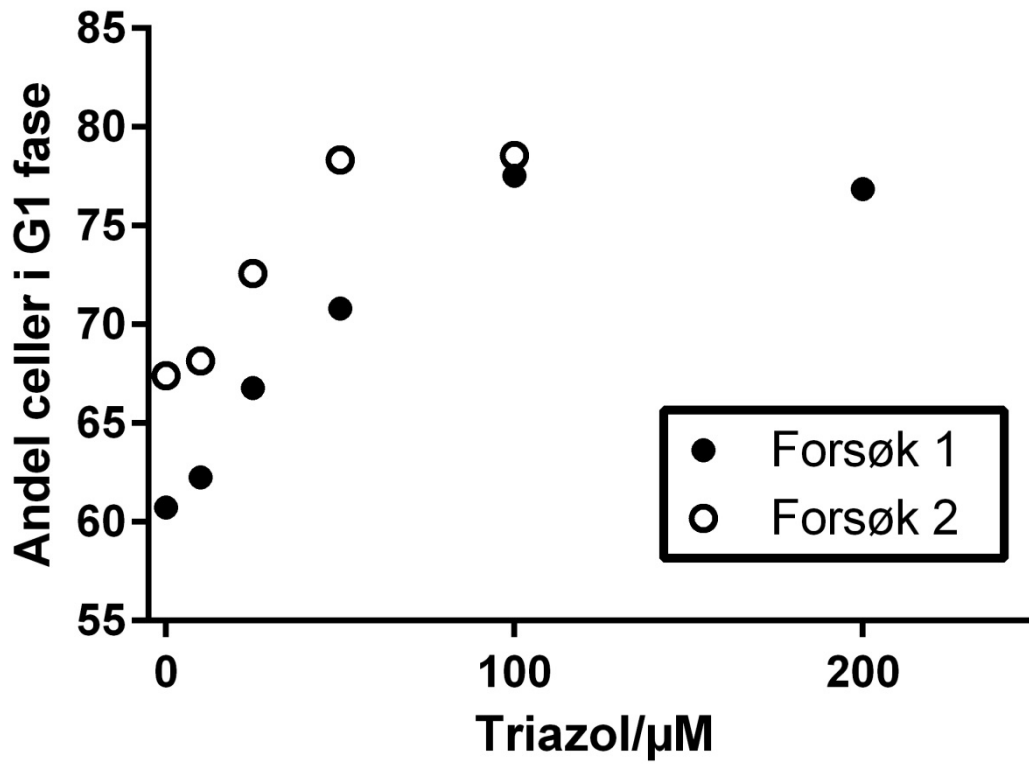
Figur 5-6 og 5-7 viser eksempler på fordeling av celler i G1, S og G2/M fase av celledelings-syklus beregnet med multicycle. Det ble ikke observert endret mengde «sub-G1» celler ved eksponering for triazol-monomer, men cellekulturer eksponert for triazol-monomer viser økt andel av celler i G1-fase (figur 5-8).



Figur 5-6 Celfasefordeling for 200 μ M triazol-monomer. Større opphopning i G1-fase enn for DMSO-kontroll. Dette indikerer en G1-sperre for videre cellesyklus



Figur 5-7 Celfasefordeling for 0,1% kontroll. Flere celler er i S-fase og mindre i G1-fase sammenlignet med 200 μ M triazol-monomer



Figur 5-8. Andel celler i G1 fase av cellesyklus. Beregninger er gjort på flowhistogrammer tilsvarende de som er vist i figur 5-6 og 5-7.

6 Diskusjon

Polymerbaserte fyllingsmaterialer er mest brukt i Norge i dag. Selv om hovedkomponentene er like for mange materialer, varierer sammensetningen noe og det blir stadig introdusert nye komponenter for å forbedre egenskapene. Triazol-monomeren (2-[3-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4-hydroxyphenyl]ethyl-methacrylate; UV090) som har vært hovedfokuset i denne oppgaven er en komponent som er introdusert i flere kommersielle materialer nylig (f.eks. Filtek Bulk Fill, 3M ESPE). Denne har kjent effekt som UV-stabilisator (36) og kan derfor være tilsatt for å motstå gulning av materialet. Det er imidlertid ikke publisert informasjon om hvordan denne monomeren påvirker materialets egenskaper og interaksjon med levende celler. Oppgavens formål har vært å fremskaffe kunnskap om slike fysikalske egenskaper og mulig toksikologiske effekter.

Kompositter er et blandingsmateriale, og homogene blandinger er viktig for at egenskapene er stabile mellom forskjellige batcher. For å oppnå homogene kompositter kreves godt blandestyrer fordi stor andel fyllstoff og høyviskøse væsker skal mikses sammen. En standardisert blandings metode for kompositter finnes ikke og derfor ble dette gjort etter en prosedyre som er utviklet hos NIOM. Kontroll av blandingens homogenitet ble gjort visuelt. Triazol-monomer konsentrasjonen i batchene ble tilsatt i høyere konsentrasjoner enn det man kjenner til fra kommersielle produkter. Det var ikke kjent om det var forekomster av uløst triazol-monomer som kan bidra til inhomogenitet i blandingen, men homogenitet støttes av de jevne resultater fra bøyestyrketestene.

Bøyestyrke er mye brukt metode etter ISO-4049 hvor det finnes tilgjengelige resultater for sammenligning. (37) ISO-metoder utarbeides gjennom internasjonalt samarbeid mellom eksperter på området, og baseres bl.a. ofte på sammenlignende laboratorieprøving. Metoden ansees derfor som godt egnet. Metoden forteller konkret om bøyestyrke, men ikke hvordan belastninger av annen karakter, f.eks. kompresjon ved tyggebelastning, påvirker kompositten i munnen. Per i dag finnes det ingen ISO-metode for kompresjonstest av polymerbaserte fyllingsmaterialer. Komposittene som ble testet viste en god bøyestyrke etter ISO-krav i forhold kommersielle test-verdier.(37) Høyere andel triazol-monomer i komposittblandingen førte til en lavere bøyestyrke. En økende mengde triazol-monomer, som er en mono-metakrylat, vil kunne redusere tverrbindingnettet i matrisen og dermed gi lavere bøyestyrke.

Omsetningsgrad i polymere kompositter bestemmes oftest etter relasjon mellom alifatiske og aromatiske absorbansetopper i spekteret. Metoden er velkjent gjennom flere forskningsartikler (38, 39) hvor omsetningsgrad har inngått som en undersøkelses parameter. Komposittens andel av fyllstoff, partikkelstørrelse og lampens herdeeffekt vil påvirke omsetningsgraden og gjøre sammenlignings grunnlag mere usikkert. Resultatene for alle batchene viste en god omsetningsgrad sammenlignet med tilsvarende målinger omtalt faglitteratur. (4) Triazolmonomer er et relativt stort molekyl og har to ringsystemer som kan virke bremsende på bevegelsesfrihet av molekylet, spesielt under polymerisasjonens-slutt når viskositeten øker sterkt. (7). Metoden kan ikke bestemme hvilke monomerer som inngår i polymeriseringen, men utlekks-tall kan gi indikasjoner om dette.

Utlekks-verdier for kompositt ble gjort med GC/MS. Denne metoden er veletablert og mye brukt(15, 40, 41). I metoden inngår etanol/vann i forholdet 75/25 som er relativt sterkt eluerings middel. Blandingen er godkjent av Food and Drug Administration(FDA) som et eluerings middel til utlekks-bestemmelse og derfor brukt i oppgaven. Miljøet i munnen er vandig, men tidsfaktoren for lagring og utlekk-undersøkelse vil bli lang med vann som uttrekks-medie for prøvene. En rekke forskjellige utlekksparametere (f.eks. medium, temperatur og tid) er benyttet i publiserte studier. (15, 40, 41) Dette gjør det vanskelig å sammenligne resultatene med andre materialer. Triethylene glycol dimetacrylat (TEGDMA) hadde en jevn mengde utlekk fra alle batcher, men for triazol-monomeren øker mengden med økende andel i blandingen. Relatert til innholdet i kompositten er triazol-monomeren sin utlekks-andel markant større enn hos TEGDMA. Siden omsetningsgraden var tilnærmet lik for alle komposittene, kan en teori være at større andel TEGDMA og Bisphenol A glycerolate dimetacrylate (Bis-GMA) omsettes ved polymeriseringen.

I denne oppgaven er mulig toksikologiske effekter av triazol-monomeren undersøkt ved å eksponere musefibroblast-cellelinjen L929. Generelt er udødelige cellelinjer et gode modell-systemer der forskjellige parametere lett kan kontrolleres og varieres, noe som gir god reproducerbarhet. Celler i en homogen cellekultur mangler imidlertid kompleksiteten som er i en organisme der det er et komplekst samspill mellom forskjellige celler og vev. Cellelinjer er som oftest også endret slik at de kan dele seg ubegrenset. Overføring av *in vitro* resultater til *in vivo* situasjoner må derfor gjøres med stor forsiktighet.

MTT-metoden er en ISO-standardisert metode for måling av en cellepopulasjons totale succinat dehydrogenase (SDH) aktivitet. Denne antas å være lik i alle levende celler, og fraværende i døde celler.(35) Reduksjon i SDH aktivitet kan dermed enten tyde på at celler er døde eller at celledelingshastigheten er redusert. SDH-aktiviteten ble redusert med økende triazol-konsentrasjon. Verken mikroskopi eller flowcytometrianalysene antydte økt celledød i eksponerte celler. Sammen med den observerte endringen i cellevekstprofil tyder dette på at celleveksten hemmes i triazol eksponerte L929 celler. Hemming av cellevekst er en respons som ofte sees i celler med DNA-skade. (42) Det kreves imidlertid bekreftende forsøk med andre metoder for å se om triazol kan ha et gen-toksisk potensiale.

Den høyeste konsentrasjon (200 μ M triazol) hadde samme effekt som den positive kontrollen (10 mM HEMA). Det toksiske potensialet til triazol er i denne modellen betydelig større enn for HEMA. Allergi er et velkjent problem hos tannhelsepersonell (17), og *in vitro* studier tyder på at HEMA kan reagere direkte med cellens proteiner og kan forårsake DNA-skader. (22, 43) HEMA eksponering er også rapportert å gi endret cellevekstmønster.

7 Konklusjon

Denne studien viser ingen forbedring av den eksperimentelle kompositten ved tilsetning av forbindelsen 2-[3-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4-hydroxyphenyl]ethyl-methacrylate (triazol-monomer). Triazol bidrar til redusert bøyestyrke ved høye konsentrasjoner. En tilsetning av triazol-monomer mellom 0 og 1% utgjør ingen forskjell for de undersøkte parameterne. Triazol monomeren i kompositten lekker ut i økende mengde med økt innhold av forbindelsen. Studien viser cytotoxicitet av triazol ved relativt lave konsentrasjoner sammenlignet med andre metakrylatmonomerer.

8 Litteraturhenvisninger

1. Park J, Lakes J. *Biomaterials: An introduction: Third edition* 2007. 1-561 p.
2. Matinlinna JP. *Handbook of oral biomaterials*. Singapore: Pan Stanford; 2014.
3. Ratner BD. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2nd ed. ed. Amsterdam: Elsevier; 2004.
4. Anusavice KJ, Phillips RW, Shen C, Rawls HR. *Phillips' Science of Dental Materials: Elsevier/Saunders*; 2012.
5. Bayne SC. Beginnings of the dental composite revolution. ('Properties of a Silica-Reinforced Polymer for Dental Restorations' by R.L. Bowen, January 1963)(JADA Landmark Series). *Journal of the American Dental Association*. 2013;144(8):880.
6. Van Landuyt K, Van Landuyt J, Snauwaert J, De Munck M, Peumans Y, Yoshida A, et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials*. 2007;28(26):3757-85.
7. Powers JM, Sakaguchi RL, Craig RG. *Craig's restorative dental materials*. St. Louis: Mosby Elsevier; 2011. XI, 400 s. : ill. p.
8. Silikas N. Rheology of urethane dimethacrylate and diluent formulations. *Dental materials*. 1999;15(4):257-61.
9. Dannhauser W. *Macromolecules. An introduction to polymer science* (Bovey, F. A.; Winslow, F. H.). *Journal of Chemical Education*. 1980;57(12):A350.
10. Turssi CP. Filler features and their effects on wear and degree of conversion of particulate dental resin composites. *Biomaterials*. 2005;26(24):4932-7.
11. Stansbury J. *Curing Dental Resins and Composites by Photopolymerization*. *Journal of esthetic and restorative dentistry*. 2000;12(6):300-8.
12. Geurtsen W. Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. *European Journal of Oral Sciences*. 1998;106(2):687-95.
13. Cilli R, Pereira JC, Prakki A. Properties of dental resins submitted to pH catalysed hydrolysis. *Journal of Dentistry*. 2012.
14. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dental Materials*. 2006;22(3):211-22.
15. Ferracane JL. Elution of leachable components from composites. *Journal of Oral Rehabilitation*. 1994;21(4):441-52.
16. Casarett LJ. *Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons*. New York: McGraw-Hill Medical; 2013.
17. Kanerva L, Lahtinen A, Toikkanen J, Forss H, Estlander T, Susitaival P, et al. Increase in occupational skin diseases of dental personnel. *Contact Dermatitis*. 1999;40(2):104-8.

18. Munksgaard EC, Hansen E, Engen T, Holm U. Self-reported occupational dermatological reactions among Danish dentists. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(4):396-402.
19. Henriks-Eckerman ML, Alanko K, Jolanki R, Kerosuo H, Kanerva L. Exposure to airborne methacrylates and natural rubber latex allergens in dental clinics. *J Environ Monit.* 2001;3(3):302-5.
20. Samuelsen JT, Dahl JE, Karlsson S, Morisbak E, Becher R. 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.* 2007;23(1):34-9.
21. Spagnuolo G, D'Anto V, Cosentino C, Schmalz G, Schweikl H, Rengo S. Effect of N-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. *Biomaterials.* 2006;27(9):1803-9.
22. Samuelsen J, Holme J, Becher R, Karlsson S, Morisbak E, Dahl J. HEMA reduces cell proliferation and induces apoptosis in vitro. *Dent Mater.* 2008;24(1):134-40.
23. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett.* 2013;332(2):237-48.
24. Encyclopaedia B. *The new Encyclopaedia Britannica.* 15th ed. ed. Chicago: Encyclopaedia Britannica; 2005.
25. Nagayoshi H, Kakimoto K, Takagi S, Konishi Y, Kajimura K, Matsuda T. Benzotriazole Ultraviolet Stabilizers Show Potent Activities as Human Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands. *Environ Sci Technol.* 2015;49(1):578-87.
26. Anderson RJ, Bendell DJ, Groundwater PW, Royal Society of C. *Organic spectroscopic analysis.* Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2004.
27. Griffiths PR, De Haseth JA. *Fourier transform infrared spectrometry.* 2nd ed. ed. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience; 2007.
28. Sideridou I. Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials.* 2002;23(8):1819-29.
29. Collares FcM, Portella FF, Leitune VCB, Samuel SMW. Discrepancies in degree of conversion measurements by FTIR. *Brazilian Oral Research.* 2014;28(1):9-15.
30. Moraes L, Rocha R, Menegazzo L, Araujo E, Yukimitu K, Moraes J. Infrared spectroscopy: A tool for determination of the degree of conversion in dental composites. *J Appl Oral Sci.* 2008;16(2):145-9.
31. Mondello L, Dugo G. *Citrus oils : composition, advanced analytical techniques, contaminants, and biological activity.* Boca Raton, FL: CRC Press; 2011.
32. Karch SB. *Postmortem toxicology of abused drugs.* Boca Raton: CRC Press; 2008.
33. Adams RLP. *Cell culture for biochemists.* Amsterdam: Elsevier/North-Holland; 1980.
34. Sylvester PW. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ).* 2011;716:157-68.

35. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
36. Paterson MJ, Robb MA, Blancafort Ls, DeBellis AD. Theoretical Study of Benzotriazole UV Photostability: Ultrafast Deactivation through Coupled Proton and Electron Transfer Triggered by a Charge-Transfer State. *Journal of the American Chemical Society*. 2004;126(9):2912-22.
37. Kopperud H. Polymerbaserte tannfyllingsmaterialer – en undersøkelse av viktige egenskaper. *Nor Tannlegeforen Tid*. 2007;117:954–60.
38. Imazato S, Imazato JF, McCabe H, Tarumi A, Ehara S. Degree of conversion of composites measured by DTA and FTIR. *Dental materials*. 2001;17(2):178-83.
39. Ruyter IE, Svendsen SA. Remaining methacrylate groups in composite restorative materials. *Acta Odontologica Scandinavica*. 1978;36(2):75-82.
40. Reichl FX, Lohle J, Seiss M, Furche S, Shehata MM, Hickel R, et al. Elution of TEGDMA and HEMA from polymerized resin-based bonding systems. *Dent Mater*. 2012;28(11):20-5.
41. Polydorou O, Hellwig E, König A, Kämmerer K. Long-term release of monomers from modern dental-composite materials. *European Journal of Oral Sciences*. 2009;117(1):68-75.
42. Helt CE, Cliby WA, Keng PC, Bambara RA, O'Reilly MA. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage. *J Biol Chem*. 2005;280(2):1186-92.
43. Nocca G, D'Anto V, Desiderio C, Rossetti DV, Valletta R, Baquala AM, et al. N-acetyl cysteine directed detoxification of 2-hydroxyethyl methacrylate by adduct formation. *Biomaterials*. 2010;31(9):2508-16.