

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MDDr. Antonín Tichý, Ph.D.

Uvolňování bisfenolu A a jeho analogů
z dentálních rekonstrukčních materiálů

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

2023

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Preventivní medicína a epidemiologie

Předseda oborové rady: doc. MUDr. Jan Polák, Ph.D., MBA

Školící pracoviště: Stomatologická klinika 1. LF UK a VFN

Školitel: RNDr. Pavel Bradna, CSc.

Konzultant (byl-li): RNDr. Štěpán Podzimek, Ph.D.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah:

Abstrakt	II
Abstract	III
1. Úvod	1
1.1. Bisfenol A (BPA) a jeho účinky na lidský organismus	1
1.2. Expozice BPA a regulace jeho použití	3
1.3. BPA v dentálních materiálech	4
2. Hypotézy a cíle práce	7
3. Materiál a metodika	8
3.1. Výplňové materiály	8
3.2. Polykarbonáty	9
3.3. Chromatografická analýza	10
3.4. Statistická analýza	11
4. Výsledky	12
4.1. Uvolňování BPA z výplňových materiálů	12
4.1. Uvolňování BPA z polykarbonátů	15
5. Diskuze	16
5.1. Srovnání naměřených hodnot se současnými limity	17
6. Závěry	19
7. Použitá literatura	20
8. Seznam publikací doktoranda	26
8.1. Publikace, které jsou podkladem disertace	26
8.2. Publikace bez vztahu k tématu disertace	27

Abstrakt

Bisfenol A (BPA) je endokrinní disruptor, který se může uvolňovat z dentálních polymerních materiálů. Cílem této práce bylo prostudovat kinetiku dlouhodobého uvolňování BPA a jeho analogů z výplňových materiálů (kompozitů, hybridních skloionomerních cementů) a polykarbonátů používaných v zubním lékařství. Extrakty výplňových materiálů v methanolu a umělé slině byly odebrány po 1-260 dnech, u polykarbonátů po 1-84 dnech. Analýza extraktů byla provedena ultra vysoce účinnou kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní detekcí. BPA byl detekován v extraktech všech testovaných materiálů, zatímco přítomnost jeho analogů nebyla potvrzena. Nejvíce BPA se ze všech materiálů uvolnilo během prvního dne, poté uvolňování významně kleslo a u „BPA-free“ kompozitů se zcela zastavilo. Uvolňování BPA z výplňových materiálů bylo nejvyšší u kompozitů s monomery na bázi BPA, následovány byly hybridními skloionomerními cementy a nejméně BPA se uvolnilo z „BPA-free“ kompozitů. Zkrácená doba ozáření neměla významný vliv na celkové množství BPA uvolněného z výplňových materiálů, ale významně zvýšila jeho uvolňování během prvního dne. Z polykarbonátů bylo uvolňování BPA o několik řádů vyšší než z výplňových materiálů. Dle současného tolerovatelného denního příjmu (4 µg BPA/kg tělesné hmotnosti/den) lze použití výplňových materiálů považovat za bezpečné, náhrady či dlahy z polykarbonátů však mohou expozici BPA významně zvýšit a představovat zdravotní riziko.

Abstract

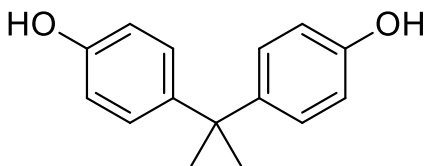
Bisphenol A (BPA) is an endocrine disruptor that may be released from dental polymeric materials. The aim of this study was to examine the kinetics of the long-term release of BPA and its analogues from restorative materials (composites, hybrid glass ionomer cements) and polycarbonates used in dentistry. Extracts in ethanol and artificial saliva were collected after 1-260 days for restorative materials and after 1-84 days for polycarbonates. All extracts were analyzed by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. BPA was detected in all tested materials, while its analogues were not found. The release of BPA from all tested materials was highest during the first day, followed by a significant decrease for all materials and a complete stop for the “BPA-free” composites. Among restorative materials, the highest amounts of BPA were released from composites with BPA-based monomers, followed by hybrid glass ionomer cements. The least BPA was released from "BPA-free" composites. Shorter irradiation time did not significantly affect the total amount of BPA released from restorative materials, but it significantly increased the release of BPA during the first day. The release of BPA from polycarbonates was significantly higher than from restorative materials. Given the current tolerable daily intake (4 μg BPA/kg body weight/day), the use of the tested restorative materials is safe, but polycarbonate restorations or splints may significantly increase BPA exposure and pose a health risk.

1. Úvod

K rekonstrukci tvrdých zubních tkání poškozených kazem či traumatem se v zubním lékařství používají materiály, které musí splňovat řadu kritérií včetně jejich biokompatibility. Minimální požadavky pro použití dentálních rekonstrukčních materiálů v lidském organismu stanovují mezinárodní normy řady ISO 10993 a ISO 7405, avšak ukazuje se, že i materiály vyhovující těmto normám mohou být pro pacienta, personál zubní ordinace nebo životní prostředí rizikové. V posledních letech se objevují publikace upozorňující na možná zdravotní rizika související s dentálními polymerními materiály. Zvláště intenzivně je v současnosti diskutována eluce bisfenolu A (BPA), který je strukturální jednotkou některých monomerů obsažených v dentálních kompozitech a dalších polymerních materiálech pro použití v zubním lékařství.

1.1. Bisfenol A (BPA) a jeho účinky na lidský organismus

BPA (2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan) je chemická látka tvořená dvěma fenolickými kruhy, které jsou spojeny uhlíkem s dvěma methylovými skupinami, Obr. 1. Díky své aromatické struktuře s hydroxylovou skupinou v para-poloze a



Obr. 1: Struktura bisfenolu A (BPA).

methylovým skupinám na druhém uhlíku propanu je BPA schopen se vázat na některé hormonální receptory (1), proto je označován jako endokrinní disruptor (2). Afinita BPA k nukleárním estrogenním receptorům ER α a ER β je sice asi 10 000 \times nižší než u estradiolu, ale BPA by neměl být považován za slabý xenoestrogen, protože aktivuje jiné typy estrogenních receptorů se srovnatelnou účinností jako estradiol (3, 4). BPA je dále schopen se vázat i na androgenní receptory, čímž může blokovat působení přirozených androgenů. Při vazbě na receptory thyroïdních hormonů se však BPA chová jako agonista i antagonist (5). Ovlivněním intracelulární aktivity aromatázy může BPA přispívat k lipogenezi a diferenciaci fibroblastů v adipocyty, proto bývá považován za obezogen (6). BPA může také ovlivňovat buněčnou signalizaci a funkci centrálního nervového systému, imunitního systému, pankreatu a jiných tkání (5).

V důsledku uvedených interakcí byla expozice BPA asociována s poruchami reprodukčního systému u mužů (např. se sníženým počtem a kvalitou spermií, karcinomem prostaty) i žen (např. s neplodností, potraty, mimoděložním těhotenstvím, syndromem polycystických ovarií). BPA je spojován i s vývojovými vadami, metabolickými poruchami (např. inzulinovou rezistencí) a dalšími patologickými stavy (3). Hodnocení účinků BPA je však komplikováno interakcemi s dalšími endokrinními disruptory (7) a nemonotónní závislostí jeho účinku na dávce (8, 9). I s ohledem na možnost akumulace

BPA v tukové tkáni (8, 10) tudíž existují obavy z nežádoucích účinků BPA při nízkých dávkách (low-dose effect) (11).

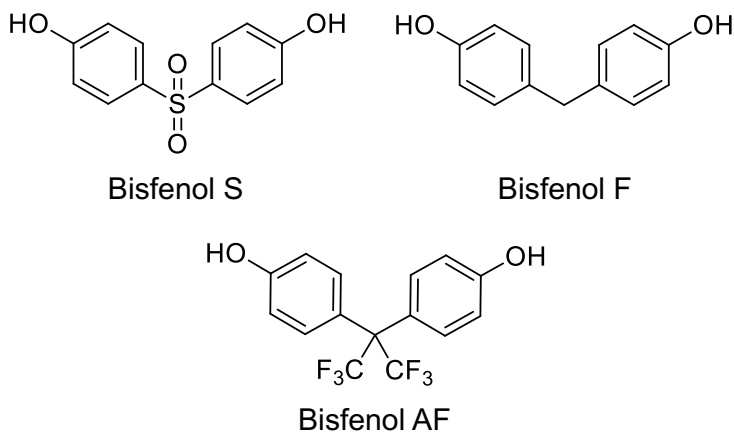
1.2. Expozice BPA a regulace jeho použití

BPA je základním stavebním kamenem polykarbonátů, z nichž se vyrábějí plastové lahve a nádoby na potraviny, a výchozí složkou při výrobě epoxidových pryskyřic, které chrání vnitřní povrch plechových nádob před korozí. BPA se využívá také při výrobě polyvinylchloridových fólií, termopapíru a některých zdravotnických prostředků (12).

Z důvodu možných nežádoucích účinků BPA na lidské zdraví je jeho použití regulováno. V Evropské unii se BPA nesmí používat při výrobě plastových lahví a obalů potravin určených pro děti, omezen je i obsah BPA v termopapíru. Evropskou agenturou pro chemické látky (European Chemicals Agency; ECHA) byl BPA v roce 2017 zařazen mezi látky vzbuzující mimořádné obavy (substances of very high concern). Vliv BPA na lidský organismus posuzuje i Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority; EFSA), protože BPA se běžně vyskytuje v materiálech určených pro styk s potravinami (food contact materials). Podle odhadu EFSA je denní expozice BPA až 1,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tělesné hmotnosti, což je méně než současná hodnota TDI, která byla v roce 2015 tímto úřadem snížena z 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tělesné hmotnosti na 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tělesné hmotnosti (13). V nejbližší době se však očekává nové stanovisko EFSA k BPA, kterým by hodnota TDI mohla být snížena až 100 000 \times , tedy na 0,04 ng/kg tělesné hmotnosti (14).

Pokud bude tento snížený limit TDI přijat, bude o několik řádů nižší než běžná denní expozice BPA.

Regulace používání BPA vedla k jeho nahrazování strukturními analogy neboli alternativními bisfenoly, např. bisfenolem S (BPS), bisfenolem F (BPF) nebo bisfenolem AF (BPAF), Obr. 2. Podle některých studií však mohou být jejich endokrinně disruptivní účinky stejné či výraznější než u BPA (15-17), proto je experty vyžadována jejich regulace, která zatím není tak přísná jako v případě BPA.



Obr. 2: Strukturní analogy BPA (alternativní bisfenoly).

1.3. BPA v dentálních materiálech

Výzkum uvolňování BPA z dentálních materiálů se v současné době zaměřuje především na kompozitní materiály. Ty se prosazují na úkor stříbrného amalgámu jednak z důvodu jeho legislativního omezování, ale také díky svému estetickému vzhledu a vazbě k tvrdým zubním tkáním, kterou zajišťují

adhezivní systémy. Monomery se strukturální jednotkou BPA mohou být obsaženy i v hybridních skloionomerních cementech, které se používají jako dlouhodobě provizorní výplňové materiály zejména u dětí. Na kompozitní nebo skloionomerní bázi jsou i pečetidla, která se používají k prevenci vzniku zubního kazu u čerstvě prořezaných molárů a u nichž bylo uvolňování BPA popsáno nejdříve (18). Další skupinou dentálních materiálů, u nichž bylo sledováno uvolňování BPA, jsou ortodontická adheziva a polykarbonátové ortodontické zámky (19). Polykarbonáty se v zubním lékařství používají i jako alternativa poly(methyl methakrylátu) (PMMA) při výrobě provizorních korunek a dlah.

Na uvolňování BPA z dentálních materiálů má vliv mnoho faktorů, především kvalita polymerace, která ovlivňuje množství volných monomerů i propustnost pro rozpouštědla (20). S výjimkou polykarbonátů dentální materiály volný BPA neobsahují, může však být přítomen ve stopových množstvích jako kontaminant ze syntézy monomerů na bázi BPA nebo jako degradační produkt jejich polymerů (21-24). Mezi běžně používané monomery na bázi BPA patří bisfenol A-glycidyl methakrylát (Bis-GMA), jeho ethoxylovaný analog Bis-EMA, nebo bisfenol A-dimethakrylát (Bis-DMA). Obavy z uvolňování BPA však výrobce vedly k vývoji „BPA-free“ materiálů, které tyto monomery neobsahují.

Uvolňováním BPA z dentálních materiálů se zabývalo mnoho *in vivo* i *in vitro* studií. *In vivo* studie ukázaly, že dentální materiály mohou přechodně zvýšit koncentraci BPA v tělních tekutinách (25-32), ale dosud nebylo objasněno, zda a do jaké míry může toto zvýšení představovat zdravotní riziko (23). U *in vitro* studií je zase vyvození závěrů komplikováno absencí standardní metodiky pro hodnocení uvolňování BPA. Hlavní rozdíly spočívají v testovaných materiálech, tvaru a velikosti zkušebních tělísek, jejich přípravě, extrakčních médiích, podmínkách extrakce, délce expozice, použitých analytických metodách identifikaci a kvantifikaci množství uvolněného BPA a používání různých jednotek.

Podle meta-analýzy Van Landuyt a kol. z roku 2011 bylo průměrné množství BPA uvolněné za 24 hodin do vodných médií $0,0024 \text{ nmol/mm}^3$ a do organických médií $0,011 \text{ nmol/mm}^3$ (20), ale v nedávných pracích, kde byla použita ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (UHPLC-MS/MS), byla naměřena i více než $10\times$ nižší množství uvolněného BPA (33, 34). To naznačuje, že citlivost metod použitých ve starších studiích nemusela být dostatečná. Dalším úskalím dosavadních studií je, že obvykle sledovaly uvolňování BPA jen v krátkých časových intervalech. S ohledem na možné nežádoucí účinky BPA i při velmi nízkých dávkách je však nutné prostudovat jeho uvolňování z dentálních materiálů i v dlouhodobém horizontu.

2. Hypotézy a cíle práce

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

Pro splnění těchto cílů byla experimentální část disertační práce zaměřena nejprve na výběr polymeračních podmínek a studium jejich vlivu na kvalitu polymerace kompozitních materiálů. Zvolené polymerační podmínky byly aplikovány v následující části, která byla věnována kinetice uvolňování BPA a jeho analogů z kompozitních a skloionomerních materiálů. Závěrečná část této disertační práce se týkala uvolňování BPA z polykarbonátových korunkových náhrad, které byly připraveny moderními CAD/CAM technologiemi, frézováním a 3D tiskem. Testovány byly následující nulové hypotézy:

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

3. Materiál a metodika

3.1. Výplňové materiály

Jako zástupce kompozitů s monomery na bázi BPA byly vybrány Filtek Ultimate Universal Restorative (FU; 3M ESPE, St. Paul, MN, USA), který obsahuje Bis-GMA i Bis-EMA, a Charisma Classic (CC; Kulzer, Hanau, Německo) obsahující Bis-GMA. Z “BPA-free” materiálů byly zvoleny Charisma Diamond (CD; Kulzer, Hanau, Německo) a Admira Fusion (AF; Voco, Cuxhaven, Německo). Z hybridních skloionomerních cementů byl vybrán Photac Fil Quick Aplicap (PF; 3M ESPE, St. Paul, MN, USA), v němž byl Rogalewiczem a kol. identifikován monomer Bis-EMA (35), a GC Fuji II LC (F2; GC, Tokio, Japonsko), u něhož předchozí studie zjistily obsah Bis-GMA (35, 36).

Cylindrická tělíska (průměr 6 mm, tloušťka 2 mm, hmotnost 0,13-0,16 g) byla připravena v teflonových (PTFE) formách a polymerována světlem z jedné strany buď 20 s při intenzitě ozáření 1300 mW/cm^2 , nebo 5 s při intenzitě ozáření 3000 mW/cm^2 . K polymeraci byla použita LED lampa Valo (Ultradent Products, South Jordan, UT, USA) a intenzita ozáření byla změřena pomocí kosinového korektoru CC-3 připojeného ke spektrometru USB2000+ (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA). Třicet minut po ozáření byla tělíska vytlačena z forem, zvážena pomocí kalibrované digitální analytické váhy s přesností $\pm 0,1 \text{ mg}$ a jednotlivě vložena do borosilikátových skleněných zkumavek s 2 ml methanolu pro LC-MS (Merck AG, Darmstadt, Německo) nebo umělé sliny (destilovaná voda, 0,8 g/l NaCl, 1,2 g/l KCl, 0,1 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g/l $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) z lékárny VFN v Praze. Zkumavky byly uzavřeny víčky s PTFE septy a inkubovány ve tmě při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ za pravidelného ručního promíchávání. Extrakty byly odebrány po 1, 4, 9, 16, 35, 65, 130 a 260 dnech. Po odebrání extraktu byla tělíska opatrně vyjmuta ze zkumavek, opláchnuta, osušena, zvážena a navracena do zkumavky se 2 ml čerstvého extrakčního média (methanolu či umělé sliny).

3.2. Polykarbonáty

Prefabrikované polykarbonátové korunky dolního prvního premoláru (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) sloužily

jako vzor pro výrobu korunek z dalších materiálů. V případě Zirkonzahn Temp Premium Flexible (ZPF; Zirkonzahn, Gais, Itálie) a Tizian Blank Polycarbonate (TBP; Schütz Dental, Rosbach, Německo) bylo využito frézování, Makrolon 2805 (Covestro, Leverkusen, Německo) byl zpracován 3D tiskem. Pro srovnání byly testovány korunky z PMMA vyrobené frézováním Zirkonzahn Temp Basic (Zirkonzahn, Gais, Itálie).

Podobně jako tělíška výplňových materiálů byly korunky zváženy na kalibrované digitální analytické váze s přesností $\pm 0,1$ mg a přeneseny do borosilikátových skleněných zkumavek obsahujících buď 2 ml methanolu třídy LC-MS nebo umělé sliny. Zkumavky uzavřené šroubovacími uzávěry s PTFE septy byly inkubovány při 37 °C a extrakty byly odebrány po 1, 7, 28 a 84 dnech. Odběry extraktů i vážení korunek byly prováděny stejně jako v případě výplňových materiálů.

3.3. Chromatografická analýza

Pro výplňové materiály byla sestrojena devítibodová kalibrační křivka v rozsahu 0,032-8,0 ng/ml a pro analýzu bylo použito 700 μ l extraktu. Pro polykarbonáty bylo na základě pilotní studie zvoleno širší kalibrační rozmezí 0,065-16,0 ng/ml a objem vzorků byl nastaven tak, aby naměřené hodnoty tomuto rozmezí odpovídaly, tj. bylo použito 10 μ l methanolvých extraktů a 20 μ l extraktů v umělé slině. V případě PMMA bylo použito 500 μ l, nezávisle na extrakčním médiu. Extrakty tělísek

v umělé slině byly extrahovány pomocí diethyletheru, methanolové extrakty byly za sníženého tlaku odpařeny do sucha. K suchým reziduím bylo poté přidáno 10 µl vnitřního standardu a znovu bylo provedeno vakuové sušení. Stejným způsobem byly zpracovány i kontrolní vzorky se známým přídatkem BPA. Pro zvýšení citlivosti detekce byla provedena derivatizace BPA dansylchloridem (37, 38).

Chromatografická analýza byla provedena UHPLC systémem Eksigent ultraLC 110 (Redwood City, CA, USA) s kolonou Kinetex C18 1,7 µm (150×3,0 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) při průtoku 0,4 ml/min a 50 °C. Jako mobilní fáze byla použita směs vody a methanolu. Tandemová hmotnostní detekce byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru s elektrosprejovou ionizací API 3200 (Sciex, Concord, Kanada). Spodní limity kvantifikace (LLOQ) byly stanoveny na 0,042 ng/ml pro BPA, 0,055 ng/ml pro BPS, 0,044 ng/ml pro BPF a 0,151 ng/ml pro BPAF. Koncentrace bisfenolů naměřené v extraktech byly přepočteny na množství uvolněná z 1 g testovaného materiálu (ng/g).

3.4. Statistická analýza

Pro analýzu kinetiky uvolňování bylo vypočteno průměrné denní uvolňování bisfenolů tak, že množství bisfenolů v extraktu vztažené k hmotnosti materiálu bylo vyděleno počtem dnů extrakce. Pro statistickou analýzu výplňových materiálů byla použita dvoucestná ANOVA

s opakováním (proměnné: polymerační podmínky a doba extrakce) pro každý materiál a extrakční médium, párová srovnání byla provedena pomocí Fisherova LSD testu. Kumulativní množství bisfenolů uvolněná z každého materiálu za celé období 260 dnů byla analyzována pomocí dvoucestné ANOVA (proměnné: extrakční médium a polymerační podmínky), párová srovnání materiálů byla provedena pomocí t-testů s Bonferroniho korekcí. Tyto analýzy byly provedeny na hladině významnosti 0,05 pomocí softwaru Statistica 12 (TIBCO, Palo Alto, CA, USA).

U polykarbonátů byla z důvodu kladné šikmosti provedena logaritmická transformace. Vzhledem k tomu, že z každé korunky byly připraveny čtyři extrakty, byl použit lineární smíšený model, který zohledňuje náhodný vliv jednotlivých korunek. Testován byl vliv materiálu, extrakčního média a doby extrakce, párová srovnání byla provedena pomocí Tukeyho post-hoc testu. Analýzy byly provedeny v prostředí R (R Core Team, Vídeň, Rakousko) na hladině významnosti 0,05.

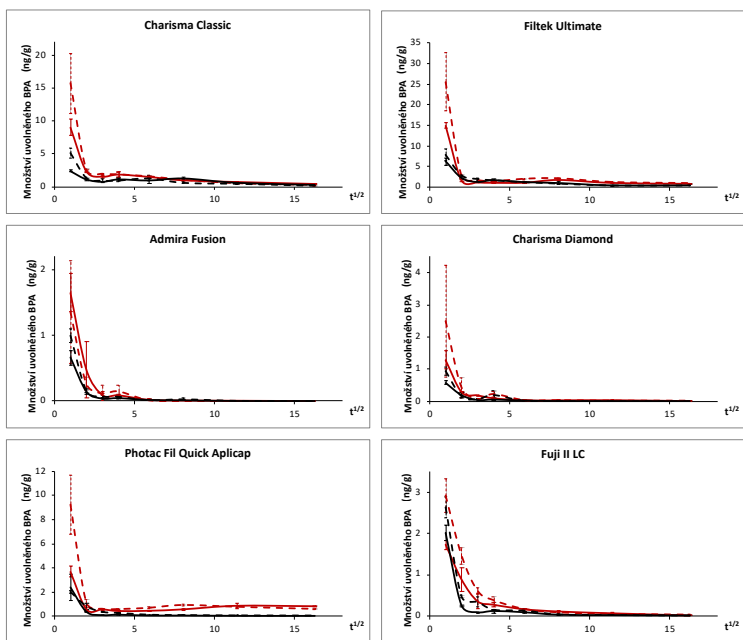
4. Výsledky

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

4.1. Uvolňování BPA z výplňových materiálů

V obou extrakčních médiích se ze všech materiálů uvolňovalo nejvyšší množství BPA během prvního dne.

Uvolňování se poté se významně snížilo ($p < 0,001$), přičemž u „BPA-free“ kompozitů (AF, CD) se postupně zcela zastavilo, Obr. 3. U kompozitů s monomery na bázi BPA (FU, CC) a skloionomerního cementu PF naopak uvolňování prokazatelně pokračovalo i po 260 dnech.



Obr. 3: Průměrné denní uvolňování BPA.

Množství BPA uvolněného z výplňových materiálů v ng/g v umělé slině (černě) a methanolu (červeně) v závislosti na druhé odmocnině doby extrakce. Plná čára reprezentuje standardní dobu ozáření (20 s při 1300 mW/cm²), přerušovaná zkrácenou dobu ozáření (5 s při 2980 mW/cm²).

Během prvního dne se z tělísek ozářených po dobu 5 s při 2980 mW/cm² uvolnilo významně více BPA než z tělísek ozářených po dobu 20 s při 1300 mW/cm² ($p < 0,05$) s výjimkou

PF v umělé slině a AF v methanolu. Analýza kumulativního množství BPA uvolněného za dobu 260 dnů (Tab. 1) však ukázala, že vliv polymeračních podmínek na průměrné denní uvolňování BPA nebyl u většiny skupin významný ($p > 0,05$).

Extrakční médium	Polym. podmínky	CC	FU	CD	AF	PF	F2
Umělá slina	1300/20	144±6 Aa	180±39 Aa	2,1±0,5 Ab	2,5±1,0 Ab	14,1±1,7 Ac	8,8±1,3 Ad
	2980/5	126±25 Aa	154±23 Aa	3,3±0,4 Ab	3,4±0,6 ABb	27,6±1,1 Bc	12,9±1,2 Bd
Methanol	1300/20	213±5 Ba	299±18 Bb	8,0±0,5 Bc	5,1±1,7 Bd	206±17 Ca	22,7±3,0 Ce
	2980/5	171±19 Ca	358±16 Cb	8,5±0,8 Bc	4,4±1,0 ABd	194±8 Ca	25,4±2,2 Ce

Tab. 1: Kumulativní uvolňování BPA z výplňových materiálů (průměr±SD v ng/g). Různá písmena značí signifikantní rozdíly mezi skupinami – velká písmena ve sloupcích, malá v řádcích.

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

4.1. Uvolňování BPA z polykarbonátů

BPA byl detekován ve všech extraktech polykarbonátů, zatímco z PMMA se kvantifikovatelné množství BPA uvolnilo pouze v methanolu během prvního týdne (Tab. 2).

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

Tab. 2: Průměrné denní uvolňování BPA z polykarbonátů (průměr±SD v µg/g). Různá písmena značí významné rozdíly mezi skupinami – velká ve sloupcích (zvlášť pro každé extrakční médium), malá v řádcích. Hvězdičkou jsou označeny významné rozdíly mezi extrakčními médii pro jednotlivé materiály.

Ve všech skupinách, kde byl BPA detekován, bylo jeho množství uvolněné v methanolu významně vyšší než v umělé slině ($p < 0,001$). Průměrné denní uvolňování BPA bylo nejvyšší

během prvního dne, poté se významně snížilo ($p < 0,001$). Po třech měsících se však průměrné denní uvolňování BPA u všech skupin zvýšilo, signifikantně u prefabrikovaných korunek a TBP v methanolu a u ZPF v umělé slině ($p < 0,05$). V methanolu bylo uvolňování BPA zpočátku nejvyšší u frézovaných polykarbonátů (TBP a ZPF) ($p < 0,001$), při pozdějších odběrech se však nejvyšší množství BPA uvolňovala ze 3D-tištěných polykarbonátových korunek. V porovnání s ostatními polykarbonáty se nejméně BPA uvolnilo z prefabrikovaných korunek. V extraktech z PMMA korunek byla zjištěna pouze stopová množství BPA.

5. Diskuze

Výsledky ukázaly, že k uvolňování BPA dochází u všech testovaných materiálů. Vzhledem k tomu, že mezi jednotlivými typy testovaných materiálů byly zjištěny signifikantní rozdíly, byla první nulová hypotéza zamítnuta. Nejvyšší uvolňování bylo zaznamenáno u polykarbonátů – naměřená množství BPA v jejich extraktech byla mnohonásobně vyšší než u výplňových materiálů. Mezi nimi byly nejvyšší hodnoty naměřeny u kompozitů s monomery na bázi BPA, naopak nejnižší množství BPA byla naměřena u „BPA-free“ kompozitů. Uvolňování BPA probíhalo u všech testovaných materiálů nejintenzivněji první den a následně se snižovalo, proto byla zamítnuta i druhá nulová hypotéza předpokládající, že uvolňování bisfenolů nezávisí na době expozice testovaných materiálů. Statisticky významný rozdíl

byl nalezen také mezi extrakčními médii – signifikantně vyšší množství uvolněného BPA v methanolu vedla k zamítnutí třetí hypotézy. Naopak čtvrtá hypotéza byla přijata, protože alternativní bisfenoly nebyly detekovány v žádném z extraktů. Pátá hypotéza o vlivu polymeračních podmínek na uvolňování bisfenolů byla zamítnuta částečně. U většiny testovaných materiálů sice zkrácená doba ozáření i přes jeho vyšší intenzitu vedla k signifikantně vyššímu uvolňování BPA během prvního dne, ale vliv polymeračních podmínek na celkové množství uvolněného BPA nebyl u většiny testovaných materiálů významný.

5.1. Srovnání naměřených hodnot se současnými limity

Pro odhad rizika a prevenci možných nežádoucích účinků testovaných materiálů bylo množství uvolněného BPA porovnáno se současně platnou hodnotou TDI 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tělesné hmotnosti, kterou stanovila EFSA v roce 2015 (13). Hodnota TDI by však podle nového návrhu EFSA mohla být snížena až 100 000 \times , tedy na 0,04 ng/kg tělesné hmotnosti (14), což by mělo zásadní vliv na interpretaci našich výsledků. Je však otázka, nakolik by se tato změna projevila u dentálních materiálů, protože uvedené snížení TDI by znamenalo, že alimentární expozice BPA (až 1,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tělesné hmotnosti) by byla o několik řádů vyšší než nová hodnota TDI, a primárně by tudíž bylo nutné vyřešit, jak omezit významnější zdroje BPA.

Z naměřených hodnot byly pro srovnání se současným TDI zvoleny ty nejvyšší, tedy naměřené v methanolu po 1 dni.

Ze srovnání vyplynulo, že množství BPA uvolněná z výplňových materiálů lze považovat za zanedbatelná – i v případě FU ozářeného po dobu 5 s by expozice z 1 g materiálu odpovídala 0,009 % TDI pro dospělého o hmotnosti 70 kg a 0,03 % TDI pro dítě o hmotnosti 20 kg. Z 1 g materiálu je přitom možné zhotovit přibližně sedm středně velkých kompozitních výplní. Ve srovnání s navrhovanou 100 000× nižší hodnotou TDI by v uvedeném případě středně velká výplň mírně přesáhla TDI dospělého člověka, ale pouze první den po zhotovení, protože poté se uvolňování BPA signifikantně snížilo. Navíc je pravděpodobné, že uvolňování v podmínkách *in vivo* je nižší než v methanolu.

U polykarbonátů byla množství uvolněného BPA výrazně vyšší než u výplňových materiálů. Vzhledem k hmotnosti testovaných korunek (0,11-0,13 g) lze nicméně předpokládat, že jedna polykarbonátová korunka nepředstavuje podstatnou expozici BPA – i nejvyšší hodnota naměřená pro TBP v methanolu po 1 dni by odpovídala 1,38 % stávající TDI 70 kg vážícího člověka. Okluzní dlahy pokrývající celý zubní oblouk by však vzhledem ke své hmotnosti až 3 g mohla v nejhorsím případě odpovídat asi 35 % TDI. I když jsou tyto výpočty založeny na nejhorsím možném scénáři, tedy na množství BPA uvolněném z TBP v methanolu během prvního dne, naznačují, že polykarbonátové okluzní dlahy by mohly být relevantním zdrojem BPA.

Studie *in vitro* je však třeba interpretovat obezřetně, protože intraorální podmínky by mohly uvolňování BPA zvýšit prostřednictvím faktorů, které je obtížné simulovat. Mezi ně patří kontinuální tok slin, přítomnost bakterií a různých enzymů, mechanické zatížení nebo změny teploty a pH, jež urychlují hydrolyzu polymerní matrice. Naopak k nižšímu uvolňování BPA by mohla vést skutečnost, že klinicky není v dutině ústní dutině exponován celý povrch materiálu, ale pouze jeho vnější část. Limitací jsou také odlišnosti v přípravě vzorků *in vitro* a skutečným použitím materiálu *in vivo*. Budoucí studie by se proto měly zaměřit na vývoj monomerů bez strukturní jednotky BPA, hodnocení uvolňování BPA *in vivo* a objasnění jeho vlivu na lidské zdraví (8, 9).

6. Závěry

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

Mezi výplňovými materiály se nejvyšší množství BPA uvolnila z kompozitů s monomery na bázi BPA, které byly následovány hybridními skloionomerními cementy. Nejmenší množství BPA byla naměřena u „BPA-free“ kompozitů. Zkrácená doba ozáření u většiny výplňových materiálů

významně zvýšila množství BPA uvolněného během prvního dne, ale neměla významný vliv na celkové množství uvolněného BPA.

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

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

7. Použitá literatura

1. Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., Yoshihara, S., Fujimoto, N., Watanabe, H., & Ohta, S. (2005). Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicological Sciences*, 84(2), 249-259.
2. Kavlock, R. J., Daston, G. P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M. J.,

- Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D. M., Sinks, T., & Tilson, H. A. (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives*, *104*(Suppl 4), 715-740.
3. Rochester, J. R. (2013). Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, *42*, 132-155.
 4. Okada, H., Tokunaga, T., Liu, X., Takayanagi, S., Matsushima, A., & Shimohigashi, Y. (2008). Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor- γ . *Environmental Health Perspectives*, *116*(1), 32-38.
 5. Wetherill, Y. B., Akingbemi, B. T., Kanno, J., McLachlan, J. A., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C. S., Zoeller, R. T., & Belcher, S. M. (2007). In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology*, *24*(2), 178-198.
 6. Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E., & Nadal, A. (2006). The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic β -cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environmental Health Perspectives*, *114*(1), 106-112.
 7. Kortenkamp, A. (2007). Ten years of mixing cocktails: A review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives*, *115*(Suppl 1), 98-105.
 8. Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., & Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews*, *30*(4), 293-342.
 9. Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Jr., Lee, D. H., Shioda, T., Soto, A. M., vom

Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., & Myers, J. P. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine Reviews*, 33(3), 378-455.

10. Vandenberg, L. N., Maffini, M. V., Sonnenschein, C., Rubin, B. S., & Soto, A. M. (2009). Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine Reviews*, 30(1), 75-95.

11. Teeguarden, J. G., & Hanson-Drury, S. (2013). A systematic review of Bisphenol A "low dose" studies in the context of human exposure: a case for establishing standards for reporting "low-dose" effects of chemicals. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 935-948.

12. Geens, T., Aerts, D., Berthot, C., Bourguignon, J.-P., Goeyens, L., Lecomte, P., Maghuin-Rogister, G., Pironnet, A.-M., Pussemier, L., Scippo, M.-L., Van Loco, J., & Covaci, A. (2012). A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and Chemical Toxicology*, 50(10), 3725-3740.

13. EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (2015). Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*, 13(1), 3978.

14. EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (2021). Re-evaluation of the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*.

15. Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M. J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., & Habert, R. (2015). A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertility and Sterility*, 103(1), 11-21.

16. Rochester, J. R., & Bolden, A. L. (2015). Bisphenol S and F: A systematic review and comparison of the hormonal

activity of bisphenol A substitutes. *Environmental Health Perspectives*, 123(7), 643-650.

17. Yang, Y., Yin, J., Yang, Y., Zhou, N., Zhang, J., Shao, B., & Wu, Y. (2012). Determination of bisphenol AF (BPAF) in tissues, serum, urine and feces of orally dosed rats by ultra-high-pressure liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 901, 93-97.

18. Olea, N., Pulgar, R., Pérez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A. M., & Sonnenschein, C. (1996). Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environmental Health Perspectives*, 104(3), 298-305.

19. Kloukos, D., Pandis, N., & Eliades, T. (2013). Bisphenol-A and residual monomer leaching from orthodontic adhesive resins and polycarbonate brackets: A systematic review. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 143(4, Suppl), S104-S112.

20. Van Landuyt, K. L., Snauwaert, J., De Munck, J., Peumans, M., Yoshida, Y., Poitevin, A., Coutinho, E., Suzuki, K., Lambrechts, P., & Van Meerbeek, B. (2007). Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials*, 28(26), 3757-3785.

21. Fleisch, A. F., Sheffield, P. E., Chinn, C., Edelstein, B. L., & Landrigan, P. J. (2010). Bisphenol A and related compounds in dental materials. *Pediatrics*, 126(4), 760-768.

22. Kechagias, K., Anastasaki, P., Kyriakidou, M., & Dedi, K. D. (2020). Bisphenol A in Dentistry. *European Journal of Prosthodontics and Restorative Dentistry*, 28(1), 3-9.

23. Löfroth, M., Ghasemimehr, M., Falk, A., & Vult von Steyern, P. (2019). Bisphenol A in dental materials – existence, leakage and biological effects. *Heliyon*, 5(5), e01711.

24. De Nys, S., Duca, R. C., Vervliet, P., Covaci, A., Boonen, I., Elskens, M., Vanoirbeek, J., Godderis, L., Van Meerbeek, B., & Van Landuyt, K. L. (2021). Bisphenol A as

degradation product of monomers used in resin-based dental materials. *Dental Materials*, 37(6), 1020-1029.

25. Arenholt-Bindslev, D., Breinholt, V., Preiss, A., & Schmalz, G. (1999). Time-related bisphenol-A content and estrogenic activity in saliva samples collected in relation to placement of fissure sealants. *Clinical Oral Investigations*, 3(3), 120-125.

26. Fung, E. Y. K., Ewoldsen, N. O., St. Germain, H. A., Marx, D. B., Miaw, C.-L., Siew, C., Chou, H.-N., Gruninger, S. E., & Meyer, D. M. (2000). Pharmacokinetics of bisphenol A released from a dental sealant. *The Journal of the American Dental Association*, 131(1), 51-58.

27. Lee, J.-H., Yi, S.-K., Kim, S.-Y., Kim, J.-S., Son, S.-A., Jeong, S.-H., & Kim, J.-B. (2017). Salivary bisphenol A levels and their association with composite resin restoration. *Chemosphere*, 172, 46-51.

28. Zimmerman-Downs, J. M., Shuman, D., Stull, S. C., & Ratzlaff, R. E. (2010). Bisphenol A blood and saliva levels prior to and after dental sealant placement in adults. *Journal of Dental Hygiene*, 84(3), 145-150.

29. Sasaki, N., Okuda, K., Kato, T., Kakishima, H., Okuma, H., Abe, K., Tachino, H., Tuchida, K., & Kubono, K. (2005). Salivary bisphenol-A levels detected by ELISA after restoration with composite resin. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16(4), 297-300.

30. Joskow, R., Barr, D. B., Barr, J. R., Calafat, A. M., Needham, L. L., & Rubin, C. (2006). Exposure to bisphenol A from bis-glycidyl dimethacrylate-based dental sealants. *The Journal of the American Dental Association*, 137(3), 353-362.

31. Berge, T. L. L., Lygre, G. B., Lie, S. A., Lindh, C. H., & Bjorkman, L. (2019). Bisphenol A in human saliva and urine before and after treatment with dental polymer-based restorative materials. *European Journal of Oral Sciences*, 127(5), 435-444.

32. Kang, Y.-G., Kim, J.-Y., Kim, J., Won, P.-J., & Nam, J.-H. (2011). Release of bisphenol A from resin composite used to bond orthodontic lingual retainers. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 140(6), 779-789.
33. De Nys, S., Putzeys, E., Vervliet, P., Covaci, A., Boonen, I., Elskens, M., Vanoirbeek, J., Godderis, L., Van Meerbeek, B., Van Landuyt, K. L., & Duca, R. C. (2018). A novel high sensitivity UPLC-MS/MS method for the evaluation of bisphenol A leaching from dental materials. *Scientific Reports*, 8(1), 6981.
34. Becher, R., Wellendorf, H., Sakhi, A. K., Samuelsen, J. T., Thomsen, C., Bølling, A. K., & Kopperud, H. M. (2018). Presence and leaching of bisphenol A (BPA) from dental materials. *Acta Biomaterialia Odontologica Scandinavica*, 4(1), 56-62.
35. Rogalewicz, R., Batko, K., & Voelkel, A. (2006). Identification of organic extractables from commercial resin-modified glass-ionomers using HPLC-MS. *Journal of Environmental Monitoring*, 8(7), 750-758.
36. Mazzaoui, S. A., Burrow, M. F., Tyas, M. J., Rooney, F. R., & Capon, R. J. (2002). Long-term quantification of the release of monomers from dental resin composites and a resin-modified glass ionomer cement. *Journal of Biomedical Materials Research*, 63(3), 299-305.
37. Vitku, J., Chlupacova, T., Sosvorova, L., Hampl, R., Hill, M., Heracek, J., Bicikova, M., & Starka, L. (2015). Development and validation of LC-MS/MS method for quantification of bisphenol A and estrogens in human plasma and seminal fluid. *Talanta*, 140, 62-67.
38. Kolatorova Sosvorova, L., Chlupacova, T., Vitku, J., Vlk, M., Heracek, J., Starka, L., Saman, D., Simkova, M., & Hampl, R. (2017). Determination of selected bisphenols, parabens and estrogens in human plasma using LC-MS/MS. *Talanta*, 174, 21-28.

8. Seznam publikací doktoranda

8.1. Publikace, které jsou podkladem disertace

Tichý A., Bradna P.: *Applicability of exposure reciprocity law for fast polymerization of restorative composites containing various photoinitiating systems*. Operative Dentistry (2021), 46(4): 406-418; IF=2.9.

<https://doi.org/10.2341/20-112-L>

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

<https://doi.org/10.33549/physiolres.934518>

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

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

8.2. Publikace bez vztahu k tématu disertace

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

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

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