

Citotoksičnost i genotoksičnost nekih stomatoloških legura

Cytotoxicity and Genotoxicity of Some Dental Alloys

Vlado Carek
Vjekoslav Jerolimov
Ružica Rozgaj*

Zavod za mobilnu protetiku
Stomatološkog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu
* Institut za medicinska
istraživanja i medicinu
rada, Zagreb

Sažetak

U svrhu izravne usporedbe, provedeno je ispitivanje citotoksičnosti i genotoksičnosti nekih legura koje su u učestaloj uporabi u stomatologiji. Istraživanje je obuhvatilo kobalt-kromne, zlatno-platinske legure i samarij-kobaltne magnete, čiji su pripravci bili valjkasta oblika, dimenzija 3,0 x 6,85 mm, pripremljeni po uputama proizvođača. U pokusima "in vitro" korištena je kvasnica *Saccharomyces cerevisiae* D₇, dok su "in vivo" pokusi obavljani na eksperimentalnim životinjama, albino-štakorima. Ispitivanje citotoksičnosti obuhvatilo je kinetiku diobe stanica gljivice i koloni-formnost u mediju rasta oko uloženog pripravka legure. Ispitivanje genotoksičnosti obuhvatilo je istraživanje mutagenosti legura u izravnom dodiru sa stanicama, kao i mikronukleus-test. Rezultati su testirani analizom varijance.

Istraživanje citotoksičnosti i genotoksičnosti pokazalo je male razlike među ispitivanim legurama, koje nisu statistički značajne, kako u "in vitro", tako i u "in vivo" pokusima. Rizik uporabe različitih legura u stomatologiji, te neka nesuglasja glede biokompatibilnosti i odabira eksperimentalnih modela, opravdavaju daljnja istraživanja na tome području.

Gljučne riječi: stomatološke legure, citotoksičnost, genotoksičnost

Acta Stomatol. Croat.
1994; 28: 177—183

IZVORNI
ZNANSTVENI RAD

Primljeno: 26. kolovoza 1994.
Received: August 26, 1994

Biokompatibilnost je opisni pojam koji se odnosi na biološku prihvatljivost i podnošljivost materijala korištenih u medicini i stomatologiji. Pod biokompatibilnošću podrazumijeva se izostanak značajne interakcije između materijala i okolnog tkiva. Idealno biokompatibilan materijal trebao bi biti kombiniran od niza "ne": nerazgradljiv, neiritirajući, netoksičan, nekancerogen i nealergizirajući. S obzirom na činjenicu da vrlo malo materijala doseže čak pojam "inertnosti" u

tijelu, postojeći su opis i definicija upitni. Vjerojatno nema materijala s 0% utjecaja na tkivo (1).

Postupke i kriterije za evaluaciju bioloških svojstava materijala postavili su FDI 1980. god. i ANSA/ADA 1982. god., a oni upućuju na potrebu različitih razina testiranja (2, 3, 4).

Biokompatibilnost stomatoloških materijala od najvećeg je značenja za trajnost stomatoloških nadomjestaka i ispuna. Testiranje tih materijala

složeno je i skupo, a obuhvaća inicijalne, sekundarne i testove navikavanja (5).

U stomatologiji se smije upotrebljavati samo ona legura koja odgovara kriterijima za korištenje u ustima (1, 6).

Među brojnim materijalima u stomatologiji, pogotovo stomatološkoj protetici, posebnu uporabnu vrijednost imaju kobalt-kromne legure, od kojih se često koriste kobalt-kromne, zlatno-platinaste, a u zadnje vrijeme sve više samarij-kobaltne magneti (7).

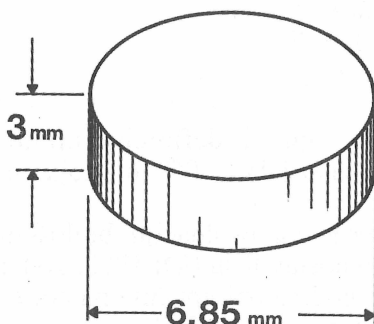
O interakciji tih legura s okolnim tkivima usta i organizma, kao i o mogućem štetnom djelovanju, pisali su već prije brojni autori (4, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14).

Rizik kojem su izloženi stomatolog, bolesnik, zubni tehničar i medicinska sestra, opravdava i potiče na daljnja istraživanja (15). Langeland (5) navodi kako je svrha nekih testova rangirati toksičnost materijala.

Budući da su podaci o izravnoj usporedbi različitih legura nedostadni, svrha je ovog istraživanja usporediti citotoksičnost i genotoksičnost nekih legura koje su u učestalijoj uporabi u stomatologiji, posebice u stomatološkoj protetici, da bi se dobile dodatne informacije o tom aspektu biokompatibilnosti legura na celularnoj razini organizma.

Materijal i postupci

Istraživanje je obuhvatilo tri vrste legura: kobalt-kromne (Co-Cr), zlatno-platinske (Au-Pt) i samarij-kobaltne magnetne (Sm-CO₅), čiji opis se nalazi u tablici 1. Eksperimentalni pripravci svih materijala imali su oblik valjka (slika 1). Načinjeni su uobičajenim laboratorijskim po-



Slika 1. Pripravak legure

Figure 1. Alloy preparation

stupkom, u skladu s uputama proizvođača. Pripravci legura bili su površinski obrađeni, ali ne i polirani, te su takvi upotrijebljeni u eksperimentu, osim magnetnih, koji su bili u izvornom, tvornički proizvedenom obliku i veličini.

Tablica 1. Opis ispitivanih legura

Table 1. Description of the alloys examined

Eksperimentalne skupine	Ekspozicija (h)	Doza ml životinji	Broj životinja	Broj stanica	MN/1000 PCE	
					\bar{X}	SD
Kontrola	24	2 ml fiziol.	8	8000	1,25	0,25
SmCo ₅	24	2 ml	8	8000	2,25	0,25
Co-Cr	24	2 ml	8	8000	1,5	0,5
Au-Pt	24	2 ml	8	8000	1,75	0,25

Pripravci, tj. valjci istraživanih legura, korišteni su u tom obliku za pokuse "in vitro" i "in vivo".

U pokusima "in vitro" upotrijebljene su kvasnice gljivice *Saccharomyces cerevisiae* D₇ (16), koja je diploidni mutant stanice kvasnice, s dva genetska markera na mjestima "trp 5" (sinteza aminokiseline triptofana) i "Ilv 1" (izoleucin), pomoću kojih se istodobno mogu pratiti genotoksični učinci kao što su genetska konverzija i reverzna mutacija (4). Ti su organizmi pogodni za ispitivanja citotoksičnosti i genotoksičnosti u neposrednom kontaktu s ispitivanom supstancom (npr. legurom), dakle za ispitivanja na celularnoj razini.

U pokusima "in vivo", za ispitivanja na razini organizma sisavaca, korištene su eksperimentalne životinje albino-štakori (mužjaci, starosti 8 tjedana, 200 g teški), vlastita uzgoja Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

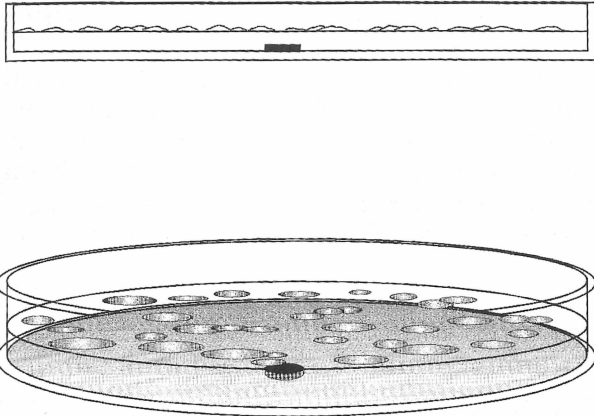
Rad je obuhvatio sljedeća ispitivanja:

A. Citotoksičnost:

1. kinetika diobe stanica tijekom 24 sata u mediju rasta oko uložene pripreme legure;
2. koloniformnost tih istih stanica nakon 24-satnog tretmana (slika 2).

B. Genotoksičnost:

1. istraživanje mutagenog učinka legura u izravnom dodiru sa stanicama, bez metaboličke aktivacije;

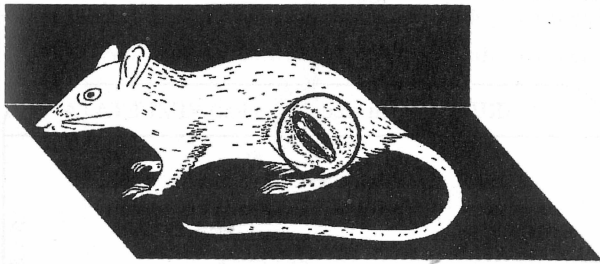


Slika 2. Kultura stanice eksperimentalne gljivice s ispitivanom legurom u mediju

Figure 2. Culture of the experimental yeast cell with the alloy-containing medium

2. istraživanje na albino-štakorima, u koštanoj srži femura, primjenom mikronukleus-testa (slika 3).

Eksperimentalni postupak citotoksičnosti (A) i genotoksičnosti (B) već je prije detaljno objašnjen (7, 14, 17), pa se ovdje navodi u sažetom obliku.



Slika 3. Mjesto aplikacije in vivo testa, femur albino-štakora

Figure 3. Site of application in the in vivo test: albino rat femur

Ispitivanje citotoksičnosti (A1 i 2)

Legure su uvodno oprane u destiliranoj vodi, isušene, te stavljene u Erlenmayerove tikvice. Zatim su sterilizirane u autoklavu pri 120°C, pod tlakom od jedne atmosfere kroz 20 minuta. Nakon hlađenja, na sterilizirane legure doliven je hranjivi medij (YEL) za rast mikroorganizama.

Medij, skupa s testiranom legurom, inkubiran je u termostatskoj tresilici na 37°C kroz 48 sati. Tada je sterilni medij preliven u posude za rast mikroorganizama (aerotore) i odvojen od ispitivane legure. U takav aseptični medij inokulirano je 10^6 stanica/ml. Uzorci su stavljeni na inkubaciju u termostatsku kupelj na 30°C, u aerobne uvjete, optimalne za rast stanica. Kinetika diobe stanica istraživana je brojenjem stanica u hemocitometru, u vremenskim intervalima od jednog sata tijekom prvih 10 sati, te nakon 24 sata inkubiranja.

Ispitivanje genotoksičnosti (B1 i 2)

Legure su inkubirane odvojeno u 5 ml 0,01 M sterilnog fosfatnog pufera na 37°C kroz 48 sati. Od svake suspenzije uzeto je 3x2 ml, te su dodane stanice kvasca, nakon što su isprane od medija rasta u 0,01 M fosfatnom puferu. Potom su svi uzorci skupa inkubirani u termostatskoj tresilici na 37°C kroz 2 sata. Kako bi se uočile eventualne mutacije, kvasci su se nakon toga tretmana inokulirali na selektivne podloge. Nakon inkubacije u termostatu na 25°C kroz 4–5 dana prebrojene su izrasle kolonije, te su matematičkom obradom izražene kao frekvencija mutacija. U ovome radu uzete su stanice kvasaca iz eksponencijalne i stacionarne faze rasta. Tim se postupkom istraživao genotoksični učinak legura u izravnom dodiru sa stanicama bez metaboličke aktivacije.

U svrhu praćenja mutagenog učinka legura na životinjama, pripravci su najprije sterilizirani i inkubirani u 40 ml sterilne fiziološke otopine na 37°C kroz 48 sati uz stalno tresenje. Po 2 ml otopine injicirano je životinjama intraperitonealno, po 8 životinja za svaki uzorak. Po 4 životinje žrtvovane su 24, odnosno 48 sati nakon injekcije. Kontrolne životinje žrtvovane su 24 sata nakon injiciranja čiste fiziološke otopine. Razmazi koštane srži bojeni su prema Schmidu (14). U svakom uzorku pregledano je po 8.000 stanica, a mutageni učinak ispitivanih legura procjenjivan je na temelju pojave mikronukleusa u nezrelim eritrocitima u koštanoj srži štakora.

Kontrolnu skupinu u ispitivanjima "in vitro" činile su dvije podskupine: K-1 (kontrola 1), kulture stanica inkubirane na 30°C, te K-2 (kontrola 2), kulture stanica inkubirane na 37°C.

Kontrolnu skupinu u ispitivanju "in vivo" činile su životinje kojima je injicirano 2 ml fiziološke otopine, umjesto suspenzije ispitivane legure.

Statistička obrada podataka iz istraživanja obavljena je pomoću univarijantnog postupka za deskripciju rezultata, a slučajnost razlika testirana je analizom varijance (18, 19).

Rezultati

Rezultati istraživanja prikazani su u tablicama 2, 3, 4, 5 i 6. Iz tablice 2 vidi se kako su ritam

Iz usporedbe frekvencije mutacija s obzirom na različitu leguru, što se vidi u tablici 5, uočavamo da praktički nema razlika u indukciji mutacija stanica u okolini s različitim legurama. Pojava mikronukleusa u nezrelim eritrocitima koštane srži štakora nešto je povišena u odnosu na kontrolnu skupinu, a i utjecaj ispitivanih legura nešto se razlikuje, no ne značajno (tablica 6).

Tablica 2. Koloniformnost stanice *Saccharomyces cerevisiae* D₇

Table 2. Colony formation by the *Saccharomyces cerevisiae* D₇ cell

		EKSPERIMENTALNE SKUPINE						S
		K1	K2	SmCo ₅ n=12	Co-Cr n=6	Au-Pt n=6		
FREKVENCIJA GENSKE KONVERZIJE	Eksponezijska faza	\bar{X}	2,0	2,5	2,80	2,77	2,48	2,0
		SD	1,12	1,93	1,44	1,28	1,60	
	Stacionarna faza	\bar{X}	1,0	2,0	1,50	1,80	1,60	
		SD	0,82	1,66	1,41	1,30	1,52	
FREKVENCIJA REVERZNE MUTACIJE	Eksponezijska faza	\bar{X}	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
		SD	0,012	0,013	0,013	0,014	0,013	
	Stacionarna faza	\bar{X}	0,02	0,03	0,03	0,02	0,03	
		SD	0,011	0,022	0,023	0,014	0,024	

K1 — kontrola/standardni materijali bez supstance/inkubirane na 30°C

K2 — kontrola/standardni materijal bez supstance/inkubirano na 37°C

dioba stanica, kao i koloniformnost, nešto povećani kod kobalt-kromne i zlatno-platinske legure, dok su kod samarij-kobaltnog magneta smanjeni u usporedbi s kontrolnim kulturama. Iako to upućuje na različitost ponašanja diobe eksperimentalne stanice *Saccharomyces cerevisiae* D₇ u nazočnosti ispitivanih legura, analizom varijance nisu pronađene statistički značajne razlike citotoksičnosti različitih legura, korištenih u ovome istraživanju (tablice 3 i 4).

Tablica 3. Varijanca rezultata (unutar ispitivanih skupina i između njih)

Table 3. Variance of results (within and between experimental groups)

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata (SS)	Stupnjevi slobode (df)	Srednji kvadrat (varijanca) (MS)	F
Unutar grupa	2,37	1,69	2,37/1,69=1,40	
Između grupa	20,22	1,35	20,22/1,35=14,98	14,98/1,40=10,70
Ukupno	22,59	3,04		

TABLICA ANALIZE VARIJANCE

Tablica 4. Analiza varijance (unutar i između skupina)

Table 4. Analysis of variance (within and between groups)

VARIJANCA (ili srednji kvadrat) REZULTATA

◆ UNUTAR GRUPA IZNOSI

$$MS_{wg} = \frac{20,22}{15} = 1,35$$

◆ IZMEĐU GRUPA IZNOSI

$$MS_{bg} = \frac{4}{2,37} = 1,69$$

Kinetika diobe stanica *Saccharomyces cerevisiae* D₇, u mediju s inkubiranim legurama, prikazana je na slici 4, čime se dopunjuju rezultati o citotoksičnosti (vidi tablicu 2).

Tablica 5. Učestalost induciranih mutacija

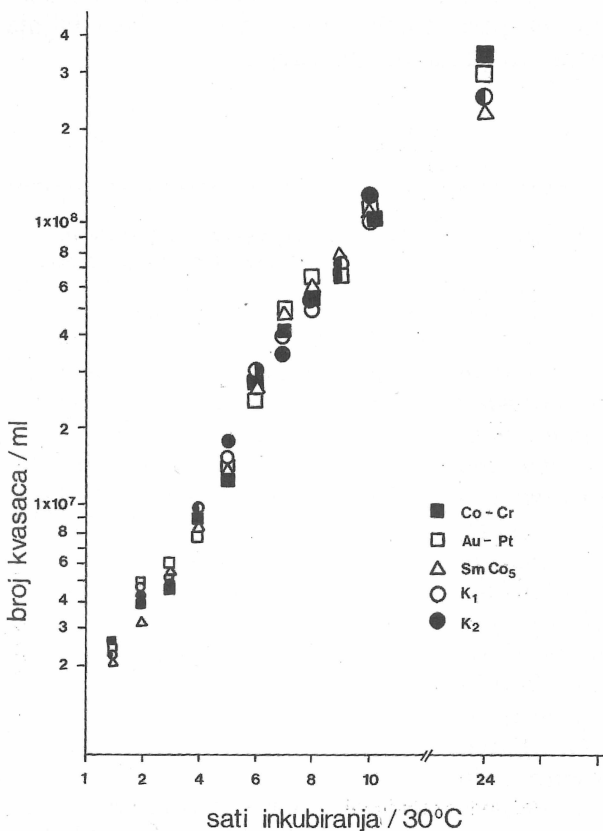
Table 5. Frequency of induced mutation

	K1	K2	SmCo ₅	Co-Cr	Au-Pt
Broj stanica	2,6x10 ⁸	2,6x10 ⁸	2,4x10 ⁸	3,5x10 ⁸	3x10 ⁸
Broj kolonija	2,2x10 ⁸	2,2x10 ⁸	2,2x10 ⁸	3x10 ⁸	2,4x10 ⁸
Efikasnost zasijavanja	85%	85%	89%	86%	80%
SD	0,33	0,33	0,41	0,39	0,43
CV	7,38	7,56	8,12	9,03	9,44

Tablica 6. Rezultati mikronukleus-testa

Table 6. Micronucleus test results

Legura	Komercijalni naziv	Sastav (%)				Proizvođač
		Co	Cr	Mo	Si, Mn, C	
Co-Cr	Wironit	64	28,5	5	2,5	Bego, Bremen, SR Njemačka
		Au	Pt	Ag	Cu	
Au-Pt	Degulor M	70	4,4	13,5	8,8	Degussa, Frankfurt, SR Njemačka
		Sm		CO ₅		
Sm-CO ₅	Krup	20		80		Krup, Köln, SR Njemačka

Slika 4. Kinetika diobe eksperimentalne gljivice *Saccharomyces cerevisiae* D₇ u mediju s leguromFigure 4. Kinetics of the *Saccharomyces cerevisiae* D₇ experimental yeast cell in the alloy-containing medium

Rasprava

Ispitivanje citotoksičnosti i genotoksičnosti legura delikatan je zadatak i zahtijeva posebni oprez pri obradi i pripremi materijala, što može utjecati na rezultat i kliničke implikacije. U tome smislu valja također biti oprezan kod pripreme izbrusaka legura kako im se osnovna svojstva ne bi promijenila. Craig i Hanks (20) smatraju da je u evaluaciji citotoksičnosti površina pripravka legure kritična. Također su uočili kod zlatnih i kobaltnih legura kako su biokompatibilnije s poliranom površinom, dok su Naji i Harmand (21) za kobaltne legure došli do obratnih rezultata.

Valja napomenuti kako i tehnika pripreme eksperimentalnih stanica, *Saccharomyces cerevisiae* D₇, može utjecati na točnost rezultata. Taj jednostanični organizam, niži eukariot, pogodan je za ovakvu vrstu ispitivanja (7).

Rezultati ispitivanja citotoksičnosti, provedenog pomoću kulture stanica eksperimentalne kvasnice, pokazuju da istraživane legure ne djeluju ni na mehanizam mitoze niti na DNK tijekom inkubacije od 24 sata. Usporedbom s rezultatima drugih autora (7, 22), može se ustvrditi da legure iz ovog eksperimenta nisu pokazale toksično djelovanje. Zlatno-platinske legure spadaju u najbolje što se biokompatibilnosti tiče, što je posljedica njihovih visokih plemenitih svojstava (22), te mogu poslužiti za razumijevanje biokompatibilnosti komparativno korištenih drugih legura u istome eksperimentu. Agar-testovi su izrađeni radi analize i rangiranja lokalne toksičnosti materijala, makar u tumačenju rezultata treba biti oprezan zbog činjenice što ovaj test ovisi o difuzibilnosti ispitivanog materijala inkubiranog unutar agar-kulture (5).

Frekvencija mutacija stanica ovisna je i o temperaturi inkubacije, što valja imati na umu pri tumačenju rezultata (7). U nešto drukčijem eksperimentu, Arvidson et al. (9) ustvrdili su da jačina reakcije stanica može ovisiti o koncentraciji i citotoksičnom potencijalu iona nastalim zbog korozije ispitivanog materijala. Stenberg (10) upozorava na razmjerno visoku koncentraciju kobalta u slini i na jeziku nakon insercije novih proteza. Toksičnost i hemolitičko djelovanje na makrofage ovisni su o veličini čestica legure (8). Ipak, o kancerogenom djelovanju kobalt-kromnih legura nema potvrdnih informacija (23). U vlastitim istraživanjima najblaža je reakcija na ovu leguru, kako u eksperimentu "in vitro", tako

i u onome "in vivo". Slična su zapažanja vezana i za zlatnu leguru. "In vivo" uočena je povišena pojava mikronukleusa u eksperimentu s magnetnom legurom, međutim ne značajno. Toto i sur. (11) nisu uočili štetno djelovanje magnetskih legura na kost i sluznicu. Takva su zapažanja u skladu s istraživanjima koje je proveo Černy (12) o toksičnosti magneta na oralna tkiva, makar Barnothy (24) navodi kako mogućnost toksičnosti tih legura ne treba isključiti. Iz rezultata ovog istraživanja, kao i prirode eksperimentalnog modela, kako je prije raspravljeno, moglo bi se ustvrditi da istraživane legure ne pokazuju ni citotoksičnost ni genotoksičnost. Doduše, rezultati upućuju na nešto veću inertnost zlatno-platinske i kobalt-kromne legure negoli samarij-kobaltne magnetske legure, što je u skladu s podacima iz literature i našim pretpostavkama.

Stanična kultura je vrijedno sredstvo u tumačenju toksičnosti dentalnih materijala i njihovog biološkog ponašanja, no valja uzeti u obzir ograničenost toga postupka u smislu interpretacije rezultata. Stoga su za to bolji eksperimenti na životinjama (25). U evaluaciji biokompatibilnosti eksperimenti sa životinjama su toliko dobri

koliko je naše razumijevanje toga fenomena, pa se u tumačenju reakcije humanih tkiva rezultati takvih ispitivanja ne bi smjeli prihvatiti bez opreza, no danas još nema alternative (26). Daljnja istraživanja trebalo bi usredotočiti na bolju simulaciju "in vivo" situacija postupcima na staničnim kulturama, kao i na redukciju eksperimenata na životinjama (25).

Zaključci

1. Ispitivanje citotoksičnosti i genotoksičnosti zlatno-platinske, kobalt-kromne legure i legure samarij-kobaltnog magneta pokazalo je male razlike među legurama koje nisu značajne.

2. Ispitivane legure nisu pokazale ni citotoksičnost ni genotoksičnost, kako na celularnoj razini jednostaničnih organizama, tako i na razini organizama sisavaca.

3. Rizik korištenja različitih legura u stomatološkoj protetici i stomatologiji uopće, kao i postojanje kontroverzi o biokompatibilnosti i odabiru eksperimentalnih modela, opravdava daljnja istraživanja na tom području.

CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF SOME DENTAL ALLOYS

Summary

Cytotoxicity and genotoxicity of some alloys widely used in dentistry were studied for direct comparison. The study included cobalt-chromium and gold-platinum alloys, and samarium-cobalt magnets. Cylindrical preparations were sized 3.0 x 6.85 mm and cast according to manufacturers' instructions. In vitro studies, a Saccharomyces cerevisiae yeast was used, whereas in vivo experiments were conducted in experimental albino rats. The study of cytotoxicity included kinetics of the fungal cell division and colony formation in the growth medium around the embedded alloy preparation. The study of genotoxicity included mutagenicity of the alloys in direct contact with the cells, and the micronucleus test. Results were tested by the analysis of variance. The study of cytotoxicity and genotoxicity showed minor differences between the alloys, which did not reach statistical significance in either in vitro or in vivo experiments. The risk of the use of various alloys in dentistry and a controversy about their biocompatibility and choice of experimental models, appear to justify further studies in the field.

Key words: dental alloys, cytotoxicity, genotoxicity

Adresa za korespondenciju:
Address for correspondence:

Doc. dr. Vlado Carek
Zavod za mobilnu protetiku
Stomatološki fakultet
Gundulićeva 6
Zagreb

Literatura

1. WILLIAMS D F. Biocompatibility: An overview. In: Williams D F (Ed). Concise encyclopedia of medical and dental materials.
2. FEDERATION DENTAIRE INTERNATIONALE. FDI Technical report 9: Recommended standards for the biological evaluation of dental materials. *Int Dent J* 1980; 30: 140—188.
3. AMERICAN NATIONAL STANDARD ASSOCIATION / AMERICAN DENTAL ASSOCIATION. ANSI/ADA Document 41. *J Am Dent Assoc* 1982; 104: 680.
4. STANLEY H R. Toxicity testing of dental materials. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1985.
5. LANGELAND K. Biocompatibility of dental materials. In: Williams D F (Ed). Concise encyclopedia of medical and dental materials. Oxford: Pergamon Press, 1990; 59—69.
6. AMES B N, McCANN J, YAMASAKY E. Methods for detecting carcinogenesis and mutagens with the Salmonella / mammalian — microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 1975; 31:347—64.
7. CAREK V, EGER M, POŽGAJ R, HORŠ N. Cito-toksično i genotoksično ispitivanje magnetnih slitina Sm CO₅. *Acta Stomatol Croat* 1992; 26: 239—44.
8. RAE T. The haemolytic action of particulate metals (Cd, Cr, Co, Fe, Mo, Ni, Ta, Ti, Zn, Co-Cr alloy). *J Pathol* 1978; 125: 81—9.
9. ARVIDSON K, COTTLER-FOX M, HAMMAR-LUND E, FRIBERG U. Cytotoxic effects of cobalt-chromium alloys on fibroblasts derived from human gingiva. *Scand J Dent Res* 1986; 95: 356—63.
10. STENBERG T. Release of cobalt from cobalt chromium alloy construction in the oral cavity of man. *Scand J Dent Res* 1982; 90: 472—9.
11. TOTO P D W, CHOUKAS N C, SANDERS D D. Reaction of bone and mucosa to implanted magnets. *J Dent Res* 1962; 41: 1438—1449.
12. CERNY R. The biological effects of implanted magnetic fields. Part II: mammalian tissues. *Aus Orthod J* 1980; 6: 114—20.
13. REPORT OF COMMITTEE OF THE EUROPEAN ENVIRONMENTAL MUTAGEN SOCIETY. Mutagenicity screening: General principles and minimal criteria. *Mutat Res* 1978; 53: 361—67.
14. SCHMID W. The micronucleus test. *Mutat Res* 1973; 3: 77—85.
15. PIERCE L H, GOODKIND R J. A status report of possible risks of base metal alloys and their components. *J Prosthet Dent* 1989; 62: 234—8.
16. BLECHMAN A M. Magnetic force systems in orthodontics. *Am J Orthodont* 1985; 30: 201—11.
17. ZIMMERMANN F K. Detection of genetically active chemicals using various yeast systems. In: Hollender I (Ed). *Chemical mutagens*, 1973.
18. PETZ B. Osnovne statističke metode. Zagreb: JAZU, 1984.
19. TUKEY I W. Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics* 1949; 5: 99—114.
20. CRAIG R G, HANKS C T. Reaction of fibroblasts to various dental casting alloys. *J Oral Pathol* 1988; 17: 341—47.
21. NAJI A, HARMAND M F. Study of the effect of the surface state on the cytocompatibility of a Co-Cr alloy using human osteoblasts and fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 1990; 24: 861—71.
22. CRAIG R G, HANKS C T. Cytotoxicity of experimental casting alloys evaluated by cell culture tests. *J Dent Res* 1990; 69: 1539—42.
23. NATIONAL INSTITUTE OF DENTAL RESEARCH. Workshop: biocompatibility of metals in dentistry. *J Am Dent Assoc* 1984; 109: 469—71.
24. BARNOTHY M F. Biological effects of magnetic fields. New York: Plenum, 1964.
25. SCHMALZ G. The use of cell cultures for toxicity screening of dental materials. Advantages and limitations. NOF/CED Symposium: Biological testing of dental materials, Kolding 1993; 5—11.
26. BROWNE R M. Animal tests for biocompatibility of dental materials — Relevance, advantages and limitations. NOF/CED Symposium: Biological testing of dental materials, Kolding 1993; 20—2.