

Otpuštanje iona iz baze Co-Cr-Mo slitine *in vitro* u fosfatni pufer pH 6,0

Nives Rinčić¹
Asja Čelebić²
Ivo Baučić²
Jasmina Stipetić²
Esad Prohić³
Slobodan Miko⁴

¹Dom zdravlja "Centar",
Zagreb

²Zavod za stomatološku
protetiku Stomatološkog
fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

³Odjel za geologiju
Prirodoslovno-matematičkog
fakulteta Sveučilišta u
Zagrebu

⁴Institut za geološka
istraživanja, Zagreb

Sažetak

Svrha rada bila je ispitati ponašanje WIRONIT[®] slitine u fosfatnom puferu pH 6,0 (kako bi se simulirala ljudska slina) kroz dulje razdoblje, te ustanoviti vrstu i količinu iona koji se otpuštaju iz slitine. Također se je željelo ustanoviti kako na otpuštanje iona utječe vrijeme izloženosti slitine djelovanju fosfatnoga pufera pH 6,0. U tu svrhu ispitano je 60 neobrađenih tvorničkih uzoraka WIRONIT[®] slitine promjera 8 mm i visine 15,8 mm. Otpuštanje iona mjereno je u deset razdoblja: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21 i 30 dana. Raščlambom otopina u kojima su bili uzorci ispitivane slitine s pomoću atomskoga emisijskog spektrofotometra s induciranom združenom plazmom (ICP-AES) utvrđeno je da su se u mjesec dana otpustili ioni kobalta (Co), kroma (Cr), željeza (Fe), cinka (Zn) i nikla (Ni). Iz uzoraka baze Co-Cr-Mo slitine najviše se otpustilo iona kobalta, a najmanje iona željeza. Rezultati su pokazali da na otpuštanje svih pronađenih iona statistički znatno utječe vrijeme ekspozicije slitine fosfatnom puferu pH 6,0 ($p < 0,01$).

Ključne riječi: otpuštanje iona, Co-Cr-Mo slitina.

Acta Stomat Croat
2003; 5-11

IZVORNI ZNANSTVENI
RAD

Primljeno: 23. rujna 2002.

Adresa za dopisivanje:

Mr. sc. Nives Rinčić
Nova cesta 134, 10000 Zagreb

Uvod

Na izbor slitine za izradbu baze zajedno s ostalim elementima djelomične skeletirane proteze, uglavnom utječu tri osnovna čimbenika: fizičko-mehanička svojstva, djelomice cijena i svakako biokompatibilnost (1).

Zubne slitine danomice su izložene promjenjivim uvjetima oralne sredine koja praktički stvara

idealne uvjete za nastanak korozije i kemijske dezintegracije većine dostupnih materijala. Materijali koji se postavljaju u usta moraju biti otporni na trošenje, kemijski neosjetljivi prema mnogobrojnim lužnatim i kiselim sastojcima hrane, a oralne tekućine ne smiju na njih utjecati ni na koji način. Ti materijali moraju biti i vrlo čvrsti kako izrađene konstrukcije ne bi djelovanjem žvačnih sila pukle ili se svinule (2).

Slitine kobalta i kroma, koje su se na tržištu pojavile godine 1970. nakon porasta cijene zlata, danas se zbog suvremene tehnologije lijevanja i poliranja široko rabe u stomatološkoj protetici za izradbu baze djelomičnih proteza i za izradbu nekih fiksno-protetskih radova. Prednosti uporabe tih slitina za lijevanje protetskih nadomjestaka jesu u tome što su lakše i imaju bolja mehanička svojstva, tj. vrlo su tvrde, čvrste, otporne na trošenje i visoke temperature, a sadržaj kroma pak čini slitinu otpornijom na koroziju.

Metalografski, to su krute otopine s oko 64% kobalta i 29% kroma. Iako su kobalt i krom osnovne sastavnice slitine za izradbu baza djelomičnih proteza i čine više od 90% njihove mase, ostale sastavnice kao što su molibden, ugljik, mangan, željezo, silicij, berilij, tungsten, bor i titan premda su u znatno manjim količinama, također uvelike utječu na mehaničko-fizička svojstva tih slitina (3).

Vlažan i topao medij ljudskih usta daje idealne uvjete za nastanak korozije, pri čemu se površina kovine nagriza i postupno otapa. Hrana i napitci koji se konzumiraju često su veoma kiseli ili lužnati, a razgradnjom ostataka hrane nastaju različite niskomolekularne organske kiseline kao što su mliječna i pirogroždana (2). Sve to uvjetuje smanjen pH, a to se može negativno odraziti na otpuštanje iona iz zubnih slitina.

Ioni kovine koji se oslobađaju korozijom nakupljaju se u tkivima usne šupljine i mogu biti uzrokom razvoja toksičnih ili alergijskih reakcija (4). Osim toga, dokazano je da se ioni kovine mogu prenijeti i do udaljenih organa te i na njima prouzročiti promjene (5).

Zbog navedenih razloga provedene su mnoge studije u kojima se ispitalo otpuštanje iona iz slitina u različitim uvjetima. Pokazalo se da alternativne slitine, koje su se na tržištu pojavile kao reakcija na visoke cijene zlata, otpuštaju znatno veće količine iona od konvencionalnih slitina s visokim udjelom zlata (6, 7). Također je dokazano da otpuštanje iona iz raznih vrsta zubnih slitina nije isključivo proporcionalno koncentraciji tih elemenata u slitini nego nastaje tzv. selektivno otapanje, tj. neki elementi pokazuju veću sklonost otapanja od drugih (8).

Svrha ovoga istraživanja bila je ispitati ponašanje Co-Cr-Mo slitine WIRONIT® u fosfatnom puferu pH 6,0 kroz duže razdoblje, te ustanoviti vrstu i

količinu iona koji se otpuštaju. Ovim istraživanjem također se je htjelo ustanoviti kako na otpuštanje iona utječe vrijeme izloženosti slitine djelovanju otopine.

Materijali i metode

U istraživanju se ispitala bazna kobalt-krom-molibden slitina pod nazivom WIRONIT®, tvorničkih oznaka BS 3366 Part I, 1988. Ispitivana slitina proizvod je tvornice BEGO (Njemačka), a u njezinu sastavu prevladava bazna elementarna kovina kobalt (Co) sa 64% udjela (Tablica 1).

Tablica 1. *Kemijski sastav WIRONIT® slitine prema podacima proizvođača*

Table 1. *Chemical composition of WIRONIT® casting alloy according to the manufacturer's declaration*

	Co %	Cr %	Mo %	Si %	Mn %	C %
WIRONIT®	64,0	28,65	5,0	1,0	1,0	0,5

Ispitivani su neprerađeni tvornički uzorci Co-Cr-Mo slitine koji na tržište dolaze u obliku valjčića. Svi uzorci bili su istih dimenzija, tako da je promjer svakog valjčića bio 8 mm, a visina 15,8 mm.

Kako bi se uklonile možebitne površinske nečistoće, uzorci su dezinficirani alkoholom, a zatim dva puta temeljito isprani sterilnom destiliranom vodom. Pošto su bili isprani, uzorci su osušeni.

Kao simulacija ljudske sline upotrijebljen je fosfatni pufer pH 6,0 sastavljen prema recepturi farmakopeje. Otpuštanje iona iz ispitivane slitine u navedenu otopinu mjereno je u deset razdoblja, i to nakon 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21 i 30 dana. U istraživanju je upotrijebljeno po 6 uzoraka (n = 6) za svako ispitivano razdoblje, što znači da je ukupno ispitano 60 uzoraka.

Pošto su uzorci temeljito očišćeni i osušeni, raspoređeni su u sterilne 15 mililitarske staklene epruvete s plastičnim čepom u kojima je već bilo po 10 mL fosfatnoga pufera. Epruvete su pomno označene i pohranjene u termostat na temperaturu od 37°C kako bi se simulirala temperatura usne šupljine.

Uzorci su vađeni iz epruveta nakon što su odležali 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21 i 30 dana u otopini. Kako bi se dobili podatci o vrsti i količini kovinskih

iona otpuštenih iz ispitivane slitine, otopine iz epruveta su analizirane s pomoću atomskog emisijskog spektrofotometra s induciranom združenom plazmom (ICP-AES; JY 50 P, Jobin Yvon, Francuska). Taj uređaj omogućuje kvalitativnu i kvantitativnu raščlambu otpuštenih elemenata u argonskoj plazmi induciranoj s pomoću energije visoke frekvencije u količini većoj od 10 µg/L. U plazmi se pobuđuju atomi pojedinih elemenata koji postoje u ispitivanim uzorku. Vraćanjem pobuđenih elektrona u početno stanje, dakle na niže energetske razine, oslobađa se energija, tj. emitiraju se svjetlosti različitih valnih duljina koje su karakteristične za pojedine elemente u uzorku pa se na osnovi toga provodi kvalitativna raščlamba uzorka. Intenzitet emitirane svjetlosti izravno je proporcionalan količini odgovarajućeg elementa u uzorku, pa je zato moguća i kvantitativna raščlamba uzorka (9).

Računalna statistička obradba rezultata istraživanja učinjena je statističkim programskim paketom SPSS for Windows. Od statističkih metoda upotrijebljene su metode deskriptivne statistike, one-way raščlamba varijance, posthoc testovi po Sheffeu, te Friedmanov neparametrijski test.

Rezultati

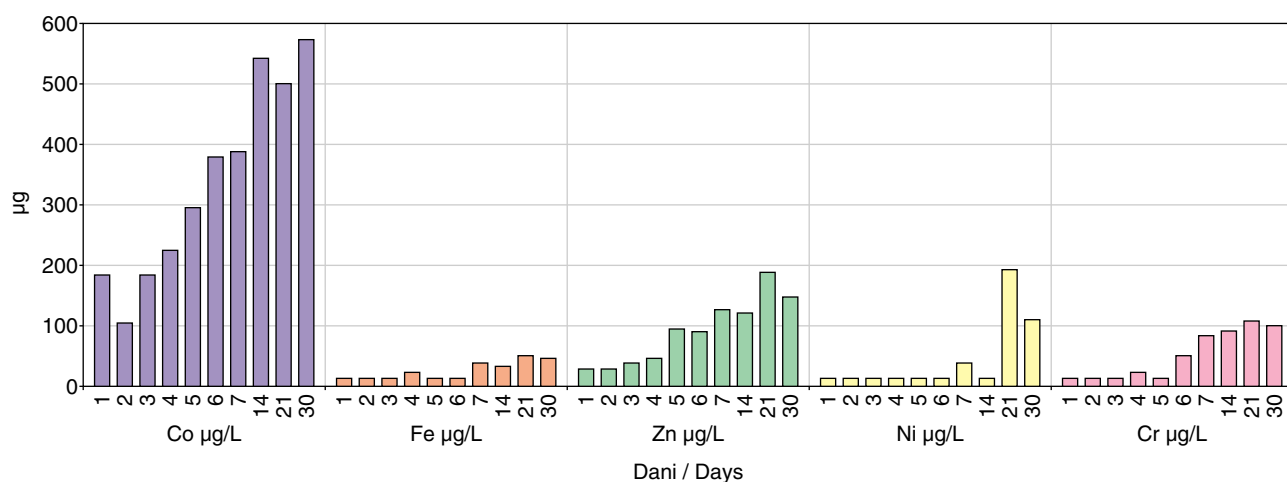
Na slici 1 i u tablici 2 prikazani su rezultati raščlambe otopina u kojima su ležali neobrađeni tvor-

nički uzorci ispitivane Co-Cr-Mo slitine WIRONIT® s pomoću ICP-AES. Utvrđeno je da se u mjesec dana u fosfatni pufer pH 6,0 otpustilo pet vrsta kovinskih iona, i to ioni kobalta (Co), kroma (Cr), željeza (Fe), cinka (Zn) i nikla (Ni).

Iz dobivenih rezultata uočava se da su se djelovanjem fosfatnoga pufera pH 6,0 ioni kobalta (Co) otpustili u najvećoj koncentraciji i to već na samom početku mjerenja, a pred kraj mjerenja koncentracija toga iona u ispitivanoj otopini dosegla je prilično visoke vrijednosti. Ostali kovinski ioni otpustili su se u znatno manjim koncentracijama u usporedbi s ionima kobalta, ali se i kod njih opaža pojačano otpuštanje pred kraj ekspozicije ispitivane slitine fosfatnom puferu pH 6,0.

U tablici 3 prikazani su rezultati raščlambe varijance. Vidi se da za sve otpuštene ione postoji statistički znatna razlika ($p < 0,01$) u otpuštanju pojedinih iona ovisno o različitu vremenu ekspozicije Co-Cr-Mo slitine fosfatnom puferu pH 6,0.

Kako je raščlamba varijance pokazala da postoji statistički znatna razlika u otpuštanju iona ovisno o različitom vremenu ekspozicije ispitivane slitine, napravljena su za svaki otpušteni ion posthoc testiranje po Sheffeu. Opaženo je da se otpuštanje iona kobalta (Co) i kroma (Cr) prvih pet dana mjerenja statistički znatno razlikovalo od 6., 7., 14., 21. i 30. dana, a otpuštanje iona željeza (Fe) prvih šest dana znatno se razlikovalo od otpuštanja toga iona 7., 21.



Slika 1. Otpuštanje iona kobalta (Co), željeza (Fe), cinka (Zn), nikla (Ni) i kroma (Cr) ovisno o danima izloženosti WIRONIT® slitine fosfatnomu puferu pH 6,0

Figure 1. The release of cobalt (Co), iron (Fe), zinc (Zn), nickel (Ni) and chromium (Cr) ions depending on days of exposure of WIRONIT® casting alloy to phosphate buffer at pH 6.0

Tablica 2. Otpuštanje iona iz Co-Cr-Mo slitine u fosfati pufer pH 6,0 (simulacija sline u usnoj šupljini)

Table 2. Ion release from Co-Cr-Mo casting alloy into the phosphate buffer at pH 6.0 (simulation of human saliva)

	Dan / Day	N	x	SD	SP	95% interval pouzdanosti / 95% interval reliability	
						Donja granica / Lower limit	Gornja granica / Upper limit
Co µg/L	1	6	181.83	50.36	20.56	128.98	234.69
	2	6	108	87.36	35.67	16.32	199.68
	3	6	182.5	11.84	4.84	170.07	194.93
	4	6	220.33	33.1	13.51	185.59	255.07
	5	6	292.67	25.56	10.44	265.84	319.49
	6	6	376.67	14.91	6.09	361.02	392.31
	7	6	385.67	33.4	13.64	350.61	420.72
	14	6	542.33	120.87	49.35	415.49	669.18
	21	6	502.33	95.94	39.17	401.65	603.02
	30	6	577.17	89.5	36.54	483.24	671.1
Ukupno / Total		60	336.95	170.17	21.97	292.99	380.91
Fe µg/L	1	6	10	0	0	10	10
	2	6	10	0	0	10	10
	3	6	10	0	0	10	10
	4	6	17.5	11.62	4.75	5.3	29.7
	5	6	10	0	0	10	10
	6	6	10	0	0	10	10
	7	6	31.67	3.78	1.54	27.7	35.63
	14	6	25.67	3.93	1.61	21.54	29.79
	21	6	48.5	12.61	5.15	35.26	61.74
	30	6	39.17	15.79	6.45	22.59	55.74
Ukupno / Total		60	21.25	15.35	1.98	17.29	25.21
Zn µg/L	1	6	22.5	3.94	1.61	18.37	26.63
	2	6	20.33	5.35	2.19	14.71	25.95
	3	6	35.33	14.87	6.07	19.73	50.94
	4	6	39.33	12.97	5.3	25.72	52.95
	5	6	91.5	30.18	12.32	59.83	123.17
	6	6	86.67	8.52	3.48	77.72	95.61
	7	6	127.5	17.68	7.22	108.94	146.06
	14	6	123	6.9	2.82	115.76	130.24
	21	6	183	23.26	9.5	158.59	207.41
	30	6	145.67	13.02	5.31	132.01	159.33
Ukupno / Total		60	87.48	56.36	7.28	72.92	102.04
Ni µg/L	1	6	10	0	0	10	10
	2	6	10	0	0	10	10
	3	6	10	0	0	10	10
	4	6	10	0	0	10	10
	5	6	10	0	0	10	10
	6	6	10	0	0	10	10
	7	6	34.33	11.38	4.65	22.39	46.27
	14	6	10	0	0	10	10
	21	6	188	120.43	49.17	61.62	314.38
	30	6	115.33	8.12	3.31	106.82	123.85
Ukupno / Total		60	40.77	68.51	8.84	23.07	58.46
Cr µg/L	1	6	10	0	0	10	10
	2	6	10	0	0	10	10
	3	6	10	0	0	10	10
	4	6	17	10.84	4.43	5.62	28.38
	5	6	10	0	0	10	10
	6	6	47.17	4.49	1.83	42.45	51.88
	7	6	84	14.78	6.03	68.49	99.51
	14	6	92	6.29	2.57	85.4	98.6
	21	6	114.67	20.8	8.49	92.84	136.5
	30	6	97.67	0.52	0.21	97.12	98.21
Ukupno / Total		60	49.25	42.25	5.45	38.33	60.17

Tablica 3. Raščlamba varijance za znatnost razlike u otpuštanju iona ovisno o različitu vremenu ekspozicije Co-Cr-Mo slitine fosfatnomu puferu pH 6,0

Table 3. Analysis of variance for significance of the difference in ion release depending on the different time of exposure of Co-Cr-Mo casting alloy to the phosphate buffer at pH 6.0

		Suma kvadrata / Sum of square	df	Srednji kvadrat / Mean square	F	Znatnost / Significant
Co µg/L	Između grupa / Between groups	1482499.7	9	164722.19	36.425	< 0.01
	Unutar grupa / Within groups	226111.17	50	4522.223		
	Ukupno / Total	1708610.9	59			
Fe µg/L	Između grupa / Between groups	11030.75	9	1225.639	21.379	< 0.01
	Unutar grupa / Within groups	2866.5	50	57.33		
	Ukupno / Total	13897.25	59			
Zn µg/L	Između grupa / Between groups	174949.82	9	19438.869	78.136	< 0.01
	Unutar grupa / Within groups	12439.167	50	248.783		
	Ukupno / Total	187388.98	59			
Ni µg/L	Između grupa / Between groups	203432.07	9	22603.563	15.378	< 0.01
	Unutar grupa / Within groups	73492.667	50	1469.853		
	Ukupno / Total	276924.73	59			
Cr µg/L	Između grupa / Between groups	101191.75	9	11243.538	135.677	< 0.01
	Unutar grupa / Within groups	4143.5	50	82.87		
	Ukupno / Total	105335.25	59			

i 30. dana. Otpuštanje iona cinka (Zn) prva četiri dana mjerenja statistički se znatno razlikovalo od 5., 6., 7., 14., 21. i 30. dana, a otpuštanje iona nikla (Ni) dvadesetprvog i tridesetog dana mjerenja znatno se je razlikovalo od otpuštanja tijekom ostalih dana.

Friedmanov neparametrijski test za više ovisnih uzoraka iskorišten je u svrhu usporedbe količine otpuštanja iona različitih kovina te je testirano postoji li razlika u otpuštanju različitih iona (Tablica 4). Ustanovljeno je da postoji razlika u otpuštanju različitih iona u svim razdobljima ($p < 0,001$). Najviše se je otpustilo iona Co, Zn, Ni i Cr, i to pred kraj mjerenja, a najmanje iona Fe.

Rasprava

Tvornički uzorci Co-Cr-Mo slitine (WIRONIT®, BEGO, Njemačka) koji su ispitivani u ovome radu otpustili su pet vrsta metalnih iona, i to ione kobalta (Co), kroma (Cr), željeza (Fe), nikla (Ni) i cinka (Zn). Iako proizvođač u deklaraciji ne navodi postojanje željeza, cinka i nikla, pronađene su znatne količine tih iona, osobito iona cinka pred kraj mjerenja.

Tablica 4. Friedmanov neparametrijski test za više ovisnih uzoraka

Table 4. Friedman's nonparametric test for several dependent variables

Friedmanov test / Friedman's test	
N	60
χ^2	214.605
Stupnjevi slobode / Level of freedom	4
Znatnost / Significance	< 0.001

Srednji rang / Mean rank	
Co µg/L	5
Fe µg/L	1.73
Zn µg/L	3.97
Ni µg/L	1.98
Cr µg/L	2.33

U nekim studijama koje su proučavale otpuštanje iona iz slitine tijekom nekoliko mjeseci opazilo se je da je količina otpuštenih iona na početku eksperimenta bila prilično visoka, a poslije se je uspostavila ravnoteža i linearno otpuštanje iona u odnosu prema vremenu (10).

U ovom istraživanju pokazalo se da je otpuštanje iona Co, Cr, Fe, Ni i Zn iz ispitivane slitine ovisilo o vremenu ekspozicije slitine fosfatnom puferu pH 6,0 jer su koncentracije svih pronađenih kovinskih iona postupno rasle u odnosu prema vremenu ležanja ispitivane slitine u otopini. Taj podatak veoma je važan kada se uzme u obzir činjenica da se Co-Cr-Mo slitina, koja se najčešće rabi kao materijal za izradbu skeleta djelomičnih proteza, u ustima pacijenta nalazi tijekom duga vremena.

Ioni Co, Cr, Fe, Ni i Zn normalno postoje u malim koncentracijama u ljudskom organizmu kao elementi u tragovima. Premda su u ovome istraživanju zabilježene prilično niske koncentracije tih iona, važno je da za neke elemente (Ni i Cr) one prelaze vrijednosti njihova dnevnog unosa u organizam (11, 12). Iako nikal spada u skupinu esencijalnih mikronutrijenata, opazilo se je da on uzrokuje depolarizaciju RNA molekule i drugih proteina unutar stanice te da negativno utječe na mišićnu kontraktibilnost i na funkciju nekih enzima (13).

Otpuštanje kovinskih iona iz zubih slitina je pojava koja se ne može izbjeći, jer teško se može naći slitina koja bi bila potpuno stabilna u organizmu i koja uopće ne bi pokazivala znakove biodegradacije. Wataha i Lockwood (10) su, proučavajući otpuštanje iona iz osam različitih zubnih slitina (plemenitih i poluplemenitih) tijekom 10 mjeseci, zaključili da različiti elementi u slitini imaju različit stupanj stabilnosti. Nelson i suradnici (1) ustanovili su da kondicioniranje zubnih slitina biološkim otopinama uzrokuje pojačano otpuštanje iona uklanjajući labilne elemente iz slitine. Autori smatraju da se postupkom kondicioniranja slitine prije kliničke uporabe može znatno smanjiti otpust nestabilnih iona u pacijentovu usnu šupljinu.

Niske koncentracije kovinskih iona mogu prouzročiti promjene na stanicama sluznice usne šupljine, koja je u neposrednom doticaju sa slatinom. Naime, ustanovljeno je da se nikal, koji se otpušta iz zubih slitina, može dugotrajno nakupljati u stanicama i kada se nagomila u većoj koncentraciji može štetno djelovati na živu stanicu (14). Jacobsen (15) je ustanovio da niske koncentracije nikla od 2,5 mg/ml djeluju toksično na humane gingivne stanice u kulturi tkiva. Ioni nikla mogu već u maloj koncentraciji izazvati i alergijske reakcije u osjetljivih pacijenata. Osim slučajeva lokaliziranih alergijskih

promjena na sluznici usne šupljine opisani su i slučajevi generaliziranih kožnih reakcija (16, 17). Patch ispitivanjima provedenim na velikome broju pacijenata opažene su pozitivne reakcije na neke sastavnice zubnih slitina, osobito na nikal i krom (18). Recentna epidemiološka istraživanja upućuju na to da su kobalt, krom i nikal podrijetlom iz zubnih slitina najčešći uzročnici alergijskih reakcija (19).

95%-tni interval pouzdanosti za otpuštanje iona iz ispitivane slitine (Tablica 2) pokazuje da je prigodom otpuštanja iona Ni i Co nastala veća varijabilnost u otpuštanju tih iona. Budući da su u ovom istraživanju uporabljeni tvornički uzorci Co-Cr-Mo slitine koji imaju jednak kemijski sastav, može se pretpostaviti da je takvo otpuštanje nekih iona nastalo zbog površinskih oštećenja pojedinih uzoraka ili je uzrok tomu bio poremećaj u kristalnoj strukturi kovine od čega je posljedica smanjena stabilnost pojedinih elemenata u slitini, a što je nastalo već u tvorničkoj izradbi slitine.

Prije negoli što se unese u pacijentova usta, zuba slitina mora proći niz tehnoloških postupaka obradbe, kao što su taljenje, lijevanje, hlađenje i poliranje, pri čemu mogu nastati neželjene promjene u kristalnoj strukturi slitine. Na osnovi rezultata ovog istraživanja može se pretpostaviti da će ti laboratorijski postupci potpomoći još veće otpuštanje iona iz Co-Cr-Mo slitine u pacijentovu slinu.

Zaključci

1. Iz neobrađenih tvorničkih uzoraka WIRONIT® slitine djelovanjem fosfatnog pufera pH 6,0 tijekom trideset dana otpustili su se ioni kobalta (Co), kroma (Cr), željeza (Fe), cinka (Zn) i nikla (Ni).
2. Ispitivani uzorci otpustili su znatne količine iona cinka, željeza i nikla premda u deklaraciji slitine proizvođač ne navodi postojanje tih elemenata.
3. Na otpuštanje iona kobalta, kroma, željeza, nikla i cinka iz ispitivane slitine utječe vrijeme ekspozicije slitine fosfatnomu puferu pH 6,0.
4. Djelovanjem fosfatnoga pufera pH 6,0 iz uzoraka ispitivane Co-Cr-Mo slitine ioni kobalta (Co) otpustili su se u najvećoj koncentraciji, a najmanje se otpustilo iona željeza (Fe).

Literatura

1. NELSON SK, WATAHA JC, LOCKWOOD PE. Accelerated toxicity testing of casting alloys and reduction of intraoral release of elements. *J Prosthet Dent* 1999; 81: 715-20.
2. PHILLIPS RW, SKINNER EW. Elements of dental materials. Philadelphia, London: W. B. Saunders Company, 1965.
3. LEINFELDER KF, LEMONS JE. Clinical restorative materials and techniques. Philadelphia: Lea & Febiger, 1988.
4. MORRIS HF. Veterans Administration Cooperative Studies Project No. 147 Part IV. Biocompatibility of base metal alloys. *J Prosthet Dent* 1987; 58: 1-5.
5. BERGMAN M, BERGMAN B, SÖREMARK R. Tissue accumulation of nickel released due to electrochemical corrosion of non-precious dental casting alloys. *J Oral Rehabil* 1980; 7: 325-30.
6. JOHANSSON BI, LEMONS JE, HAO SQ. Corrosion of dental copper, nickel, and gold alloys in artificial saliva and saline solutions. *Dent Mater* 1989; 5: 324.
7. MEZGER PR, STOLS ALH, VRIJHOEF MMA, GREENER EH. Metallurgical aspects and corrosion behavior of yellow low-gold alloys. *Dent Mater* 1989; 5: 350.
8. WATAHA JC, CRAIG RG, HANKS CT. The release of elements of dental casting alloys into cell-culture medium. *Journal of Dental Research* 1991; 70: 1014-8.
9. User Manual: The JY 50 P Simultaneous ICP Spectrometer. Jobin Yvon, Emission Spectrometry Department, 1990.
10. WATAHA JC, LOCKWOOD PE. Release of elements from dental casting alloy into cell-culture medium over 10 months. *Dent Mater* 1998; 14: 158-63.
11. SEIFERT M, ANKE M. Alimentary nickel intake of adults in Germany. *Trace Elements and Electrolytes* 1999; 16: 17-21.
12. ANKE M, GLEI M, MÜLLER R, DORN W, VORMANN J, ANKE S. Macro, trace and ultratrace element intake of adults in Europe: problems and dangers? *J Commodity Sci* 2000; 39: 119-39.
13. BEACH DJ, SUNDERMAN FW. Nickel carbonyl inhibition of RNA synthesis by a chromatin-RNA polymerase complex from hepatic nuclei. *Cancer Res* 1970; 30: 48.
14. HAMANO H. Fundamental studies on biological effects of dental metals: nickel dissolution, toxicity and distributions in cultured cells. *J Stomatological Society Japan* 1992; 59: 456-78.
15. JACOBSEN N. Epithelial-like cells in culture derived from human gingiva: response to nickel. *Scand J Dent Res* 1977; 85: 567.
16. BRENDLINGER DL, TERSITANO JJ. Generalized dermatitis due to sensitivity to a chrome cobalt removable partial denture. *J Am Dent Assoc* 1970; 81: 392-4.
17. OVRUTSKY GD, ULYANOV A. Allergy to chromium in using steel dental prosthesis. *Stomatologija (Moscow)* 1976; 55: 60-2.
18. DOOMS- GOOSSENS A, CEUTERICK A, VANMAELE N, DEGREEF H. Follow-up study of patients with contact dermatitis caused by chromates, nickel, and cobalt. *Dermatologica* 1980; 160: 249-60.
19. FRANZ G. The frequency of allergy against dental materials. Abstract 19, International Congress on Biomaterials in Stomatology, Pretoria, 1981.