

Ein Vergleich zweier Eluationsverfahren zur biologischen Materialprüfung

Von G. Schmalz, Tübingen*

Die Möglichkeit einer Trennung von Eluation und eigentlichem biologischem Test bei der Prüfung der Gewebeerträglichkeit wird anhand von zwei kupferhaltigen und zwei kupferfreien Zementen untersucht. Dabei wurden die Materialien direkt sowie zwei nach verschiedenen Verfahren erhaltene Eluate getestet: Einmal wurde das Material 1 Std. in destilliertem Wasser autoklaviert, zum anderen wurde es bei 37°C 24 Std. lang in Nährlösung ausgelaugt. Bei kupferfreien Materialien stimmten die Ergebnisse in allen Fällen überein. Eine Diskrepanz dagegen trat bei den kupferhaltigen Werkstoffen auf, wobei eine Eluation durch einstündiges Autoklavieren zu anderen Ergebnissen führte als eine 24stündige Eluation in Nährlösung und als die direkte Materialtestung. Zwischen den beiden letzten Verfahren war ein Unterschied im Testergebnis nicht zu erkennen. Beim Vergleich der beiden angewandten Eluationsmethoden erscheint uns deshalb die Extraktion in physiologischer Nährlösung geeigneter als das Autoklavieren in destilliertem Wasser.

Einleitung

Die in einem biologischen System durch einen Werkstoff verursachte akut-toxische Reaktion ist in erster Linie abhängig von Art und Menge der aus diesem Material ausgelaugten Substanzen [1, 4, 7, 8, 10, 12]. Demgegenüber spielen physikalische Eigenschaften der Materialoberfläche eine untergeordnete Rolle [4]. Man kann somit die Material-Gewebe-Interaktion unterteilen in den Eluationsvorgang, d.h. den Einfluß des biologischen Milieus auf das Material und in die eigentliche biologische Reaktion, d.h. den Einfluß des Eluats auf den biologischen Rezeptor [3, 12]. Da

In-vitro-Testverfahren Gleichgewichtssysteme im Sinne von *Higuchi* und *Davis* darstellen [6], wird die toxische Reaktion die effektive Konzentration der wirksamen Substanzen nur unwesentlich beeinflussen. Man kann daher annehmen, daß bei der biologischen Materialprüfung eine Trennung von Eluation und eigentlichem Test möglich ist. Da durch dieses Vorgehen Probleme, die bei der direkten In-vitro-Materialprüfung auftreten, umgangen werden können, sind in der Literatur mehrere verschiedene Eluationsverfahren publiziert worden [1, 2, 7, 8, 11, 12, 16, 17].

In der vorliegenden Untersuchung soll die biologische Reaktion auf ein direkt getestetes Material mit derjenigen auf zwei verschiedene Extrakte dieses Werkstoffes verglichen werden, um festzustellen, inwieweit sie zuverlässige Ergebnisse zeigen, und dadurch an Stelle der Materialien selbst zu Testzwecken herangezogen werden können.

Material und Methode

Untersucht wurden zylinderförmige Prüfkörper eines kupferhaltigen und eines kupferfreien Zinkoxyphosphatzementes (F₁, F₂), sowie entsprechende Silikophosphatzemente (F₃, F₄). Die Liegezeit der Materialproben betrug 1 bzw. 24 Std.

Nach *Autian* [1] wurden in Anlehnung an die US-Pharmacopöe XIX [17] 4 g Testmaterial in 20 ml destilliertem Wasser in einem hitzebeständigen, fest verschlossenen Reagenzglas (F₅) 1 Std. bei 121°C autoklaviert. Das Eluat wurde filtriert, bis eine klare Flüssigkeit entstand (F₆). Eine sechsstufige Verdünnungsreihe des so entstandenen Extraktes wurde mit doppelt konzentriertem Medium gemischt und inokuliert (im folgenden als „Extrakt 1“ bezeichnet).

Als zweites Eluationsverfahren ist in Anlehnung an *Leirskar* [11] 4 g Testmaterial in 20 ml Nährmedium

F¹ Kupfer-Zement, De Trey GmbH; – Charge Nr.: TE 5/TEM

F² Havard-Zement, Havard-Dental-Ges.; Charge Nr.: 943

F³ Cupro-Dur, Merz; Charge Nr.: 5017 (60902)

F⁴ Drala-Steinzement, Drala-Dental KG; Charge Nr.: 67392/67115

F⁵ Schott, GL 18

F⁶ Millex, Millipore; SL GS 025 OS

* Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde – Abteilung für Zahnerhaltung – des Universitätsklinikums Tübingen, Osianderstraße 2–8, 7400 Tübingen

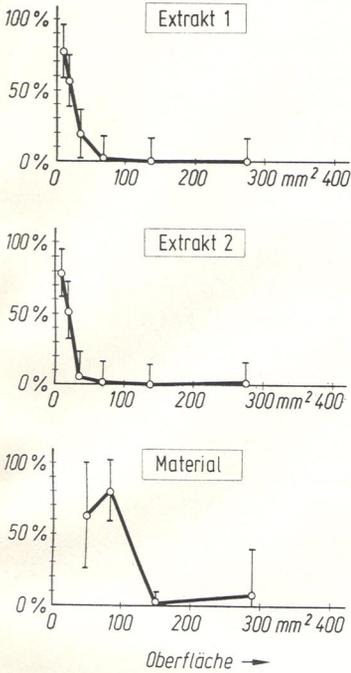


Abb. 1. Relatives Bakterienwachstum bei Zinkoxyphosphatzement ohne Cu; 1 Std. Liegezeit.

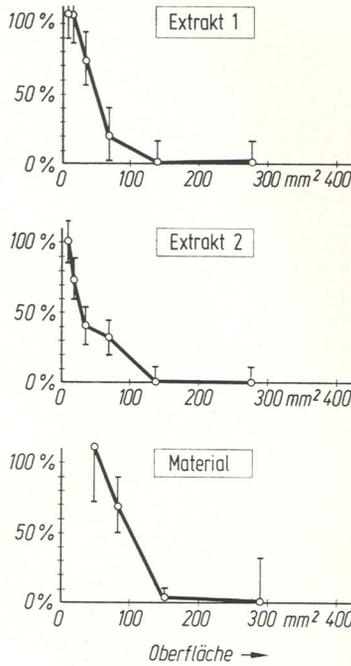


Abb. 2. Relatives Bakterienwachstum bei Zinkoxyphosphatzement ohne Cu; 24 Std. Liegezeit.

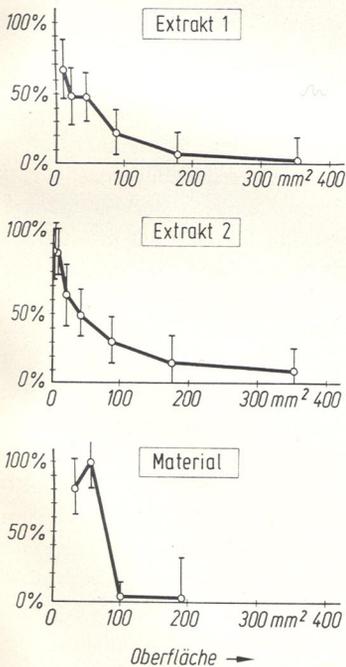


Abb. 3. Relatives Bakterienwachstum bei Silikophosphatzement ohne Cu; 1 Std. Liegezeit.

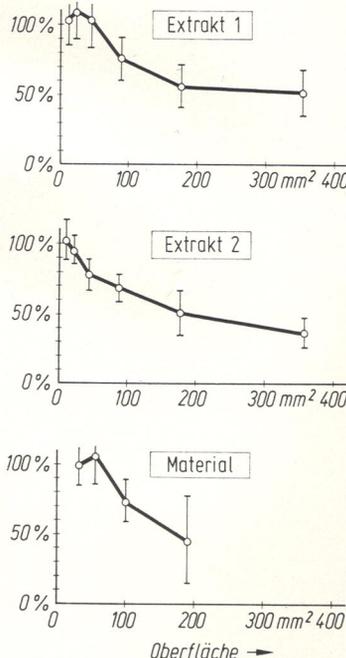


Abb. 4. Relatives Bakterienwachstum bei Silikophosphatzement ohne Cu; 24 Std. Liegezeit.

über 24 Std. bei 37°C gelagert und anschließend wie oben filtriert worden (im folgenden als „Extrakt 2“ bezeichnet). Die pH-Werte der Eluate wurden bestimmt (F₇). Über die Ergebnisse der direkten Materialprüfung wurde in einer früheren Untersuchung berichtet [15].

Die Bestimmung des Kupfergehaltes der Extrakte kupferhaltiger Zemente erfolgte in einem Atom-Absorptions-Spektrophotometer (F₈). Als biologisches Testsystem diente das von Nunez et al. [13] beschriebene Verfahren einer bakteriellen Suspension von Strep. mutans HS-6.

Um die Versuchsergebnisse der Eluate mit denjenigen der direkten Materialprüfung vergleichen zu können, wurde die Oberfläche der zur Eluation gelangten Prüfkörper sowie Bruchteile dieses Wertes entsprechend der Verdünnung berechnet.

Für alle Meßpunkte wurde die Fehlerfortpflanzung nach DIN 1319 bestimmt [5]. Durch die Multiplikation mit t/\sqrt{n} ergab sich ein Schätzwert für den 95%-Vertrauensbereich der einzelnen Meßpunkte.

Die Mittelwerte aller Dosisreaktionskurven wurden einer Regression nach dem Modell $y = e^{-ax}$ unterworfen. Die Steigungen (a) dieser Kurven wurden durch Varianzanalyse und anschließendem Fisher-Test (F₉) miteinander verglichen. Ebenso wurden die drei Testmethoden analysiert.

Um einen möglichen Einfluß des pH-Wertes der Eluate auf das Wachstum der Bakterien zu ermitteln, wurde dieses zusätzlich bei verschiedenen Anfangs-pH-Werten des Mediums untersucht.

F₇: Präzisions-pH-Meter, Typ 34, Knick, Berlin
 F₈: Atomic Absorption Spectrophotometer, Perkin Elmer 400
 F₉: Vgl. Miller, R. G.: „Simultaneous statistical interference“. Mc Grawhill, New York 1966

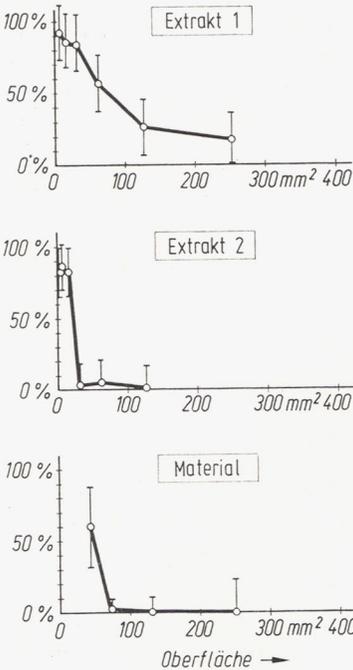


Abb. 5. Relatives Bakterienwachstum bei Zinkoxyphosphatzement mit Cu; 1 Std. Liegezeit.

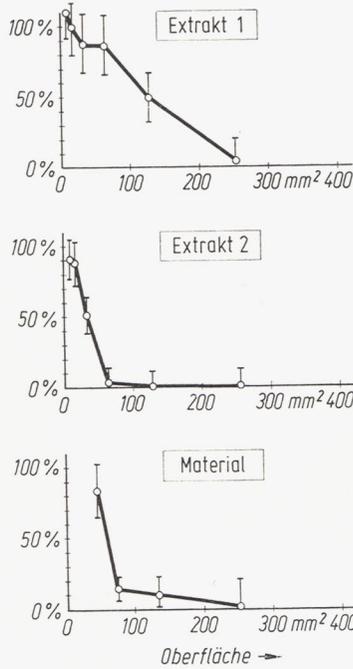


Abb. 6. Relatives Bakterienwachstum bei Zinkoxyphosphatzement mit Cu; 24 Std. Liegezeit.

Ergebnisse

Bei allen kupferfreien Zementen verliefen die Dosisreaktionskurven (Abb. 1 bis 4) der beiden Eluate nach der direkten Materialtestung nahezu identisch. Bei den kupferhaltigen Zementen hatten die Dosisreaktionskurven (Abb. 5 bis 8) des Extraktes 1 einen deutlich flacheren Verlauf als diejenigen des Extraktes 2. Bei durchschnittlich zwei Meßpunkten ergab sich keine Übereinstimmung der Vertrauensbereiche. Die autoklavierten Extrakte reagieren signifikant weniger bakterizid. Beim Vergleich der biologischen Reaktion der Extrakte mit der Materialreaktion ergibt sich beim Zinkoxyphosphatzement und 1 Std. Liegezeit bei vier Meßpunkten eine Diskrepanz in einem und bei 24 Std. Liegezeit in zwei Fällen. Beim kupferhaltigen Silikophosphatzement sind – wegen der überdurchschnittlich großen Streubreite der Ergebnisse der direkten Materialtestung – keine Unterschiede feststellbar. Beim Vergleich der Meßpunkte zwischen den entsprechenden kupferhaltigen und kupferfreien Materialien und 1 Std. Liegezeit konnte beim Zinkoxyphosphatzement nach der direkten Testung eine bakterizide Wirkung in einem Meßpunkt festgestellt werden. Bei Extrakt 2 traten keine Unterschiede zwischen kupferhaltigem und kupferfreiem Zement auf. Bei Extrakt 1 ergeben sich an zwei Meßpunkten Unterschiede, jedoch dergestalt, daß das kupferhaltige Material geringere bakterizide Eigenschaften aufweist als das entsprechende kupferfreie. Beim gleichen Material

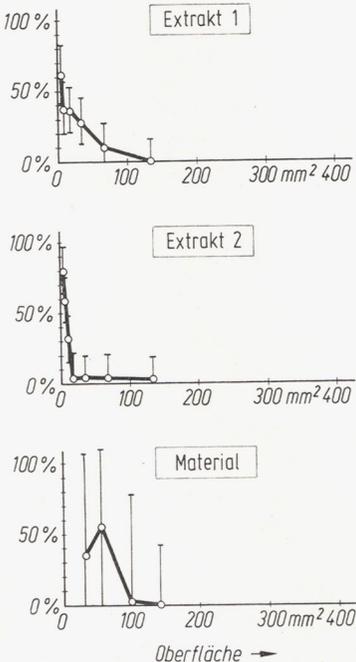


Abb. 7. Relatives Bakterienwachstum bei Silikophosphatzement mit Cu; 1 Std. Liegezeit.

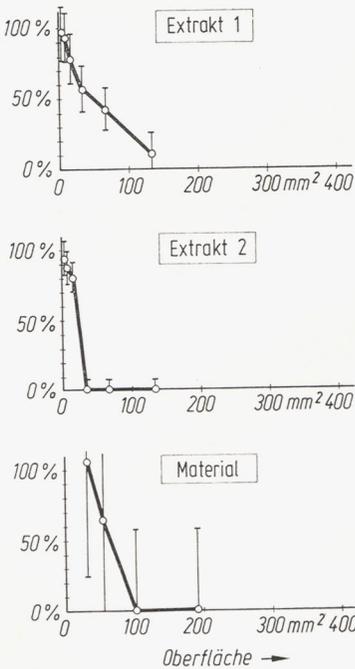


Abb. 8. Relatives Bakterienwachstum bei Silikophosphatzement mit Cu; 24 Std. Liegezeit.

und 24 Std. Liegezeit zeigen Materialtest und Extrakt 2 in einem Meßpunkt eine deutlich stärkere bakterizide Wirkung des kupferhaltigen Materials, bei Extrakt 1 liegen dagegen an zwei Meßpunkten wieder umgekehrte Verhältnisse vor. Beim Silikophosphatzement und 1 Std. Liegezeit ergibt sich zwischen kupferhaltigem und kupferfreiem Material nur bei Extrakt 2 in einem Meßpunkt ein Unterschied. Bei 24 Std. Liegezeit zeigen alle drei Testmethoden Unterschiede im Sinne einer stärkeren bakteriziden Wirkung des kupferhaltigen Silikophosphatzementes.

Die pH-Werte der Eluate (Tab. 5) zeigen beim Extrakt 1 einen generell niedrigeren Wert. Bei den Test-Stock-Lösungen (Eluat + Nährmedium) lagen die pH-Werte jedoch generell über 6,5.

Ein möglicher Einfluß eines solch niedrigen Ausgangs-pH-Wertes auf das Wachstum der Bakterien konnte statistisch nicht gesichert werden (Tab. 7). Die Ergebnisse der Kupfer-Analysen (Tab. 6) zeigen beim Extrakt 2 einen wesentlich höheren Cu-Gehalt. Ein Trend, mit zunehmender Liegezeit weniger Cu abzugeben, ist beim Silikophosphatzement zu beobachten.

Statistische Analyse

Beim Vergleich der Breite der 95%igen Vertrauensbereiche der drei Testmethoden (Tab. 1) ist zwischen Extrakt 1 und Extrakt 2 kein signifikanter Unterschied (*Scheffe-Test*) erkennbar. Demgegenüber zeigte sich bei der direkten Materialtestung ein weitaus größerer durchschnittlicher Vertrauensbereich. Das Testgut der drei zu vergleichenden Gruppen war allerdings sehr inhomogen, was die Aussagekraft des *Scheffe-Testes* einschränkt, jedoch Rückschlüsse auf Schwierigkeiten bei der direkten Materialprüfung zuläßt.

Bei der Varianzanalyse der nach dem angegebenen Modell errechneten Steigungen der Regressionskurven (Tab. 2) konnte ein Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von < 0,001% gesichert werden. Die Ergebnisse des *Fisher-Testes* für den paarweisen Vergleich kupferhaltiger Materialien (Tab. 3) weisen bei den Zinkoxyphosphatzementen nach 1 Std. und nach 24 Std. Liegezeit sowie beim Silikophosphatze-

Tabelle 1. Breite der 95%-Vertrauensbereiche der drei Testmethoden.

| | Extrakt 1 | Extrakt 2 | Materialreakt. |
|--------------------|-----------|-----------|----------------|
| Mittelwert | 35,62 | 28,28 | 66,44 |
| Standardabweichung | 7,75 | 4,34 | 49,88 |

Tabelle 2. Steigungen der Regressions-Kurven.

| Material | Liegezeit | Extrakt 1 | Extrakt 2 | Materialreakt. |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|----------------|
| Zinkoxyphosphatzement mit Cu | 1 Std. | -0,0076 | -0,0189 | -0,0238 |
| | 24 Std. | -0,0108 | -0,0238 | -0,0249 |
| Silikophosphatzement mit Cu | 1 Std. | -0,0353 | -0,0364 | -0,0265 |
| | 24 Std. | -0,0153 | -0,0460 | -0,0404 |
| Zinkoxyphosphatzement | 1 Std. | -0,0241 | -0,0231 | -0,0199 |
| | 24 Std. | -0,0200 | -0,0200 | -0,0164 |
| Silikophosphatzement | 1 Std. | -0,0123 | -0,0080 | -0,0197 |
| | 24 Std. | -0,0021 | -0,0031 | -0,0035 |

Tabelle 3. Ergebnisse des *Fisher-Testes* für den paarweisen Vergleich kupferhaltiger Zemente: Unterschiede der Ergebnisse zwischen den einzelnen Testverfahren.

| Material | Liegezeit | Verfahren | Extrakt 2 | Materialreakt. |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|----------------|
| Zinkoxyphosphatzement mit Cu | 1 Std. | Extrakt 1 | × × | × × |
| | | Extrakt 2 | — | 0 |
| | 24 Std. | Extrakt 1 | × × | × × |
| | | Extrakt 2 | — | 0 |
| Silikophosphatzement mit Cu | 1 Std. | Extrakt 1 | 0 | 0 |
| | | Extrakt 2 | — | 0 |
| | 24 Std. | Extrakt 1 | × × | × × |
| | | Extrakt 2 | — | 0 |

× × = signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1%
 × = signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%
 0 = keine Signifikanz

Tabelle 4. Ergebnisse des *Fisher-Testes* für den paarweisen Vergleich: Unterschiede der Ergebnisse zwischen kupferhaltigen und kupferhaltigen Zementen.

| | Zinkoxyphosphatzement | | Silikophosphatzement | |
|------------------|-----------------------|---------|----------------------|---------|
| | 1 Std. | 24 Std. | 1 Std. | 24 Std. |
| Extrakt 1 | × | × | × × | × |
| Extrakt 2 | 0 | 0 | × × | × × |
| Materialreaktion | 0 | × | 0 | × × |

× × = signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1%
 × = signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%
 0 = keine Signifikanz

ment einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Extrakt 1 und Extrakt 2, weiterhin zwischen Extrakt 1 und direkter Materialtestung auf. Extrakt 2 und Materialtestung sind dagegen statistisch nicht voneinander zu unterscheiden. Nur beim kupferhaltigen Silikophosphatzement und einer Std. Liegezeit bestand zwischen allen drei Testverfahren kein Unterschied. Bei der Gruppe der kupferfreien Zemente kann bis auf eine Ausnahme (Silikophosphatzement, 1 Std. Liegezeit) in keinem Fall ein signifikanter Unterschied

Tabelle 5. pH-Werte der Extrakte, sowie der Test-Stock-Lösung, d. h. der mit Nährlösung gemischten Extrakte, vor Inokulation.

| Material | Liegezeit | Eluationsverfahren | pH-Wert Extrakt | pH-We Test-Lösung |
|-------------------------------|-----------|--------------------|-----------------|-------------------|
| Zinkoxyphosphatzement ohne Cu | 1 Std. | 1 (Autoklav.) | 4,4 | 6,8 |
| | 1 Std. | 2 (Bouillon) | 6,2 | 6,8 |
| | 24 Std. | 1 (Autoklav.) | 4,7 | 6,9 |
| | 24 Std. | 2 (Bouillon) | 6,3 | 6,8 |
| Silikophosphatzement ohne Cu | 1 Std. | 1 (Autoklav.) | 5,3 | 7,1 |
| | 1 Std. | 2 (Bouillon) | 6,2 | 6,8 |
| | 24 Std. | 1 (Autoklav.) | 4,6 | 7,0 |
| | 24 Std. | 2 (Bouillon) | 5,9 | 6,5 |
| Zinkoxyphosphatzement mit Cu | 1 Std. | 1 (Autoklav.) | 4,7 | 7,0 |
| | 1 Std. | 2 (Bouillon) | 6,3 | 6,7 |
| | 24 Std. | 1 (Autoklav.) | 5,4 | 7,2 |
| | 24 Std. | 2 (Bouillon) | 6,5 | 6,9 |
| Silikophosphatzement mit Cu | 1 Std. | 1 (Autoklav.) | 5,6 | 6,6 |
| | 1 Std. | 2 (Bouillon) | 5,7 | 6,5 |
| | 24 Std. | 1 (Autoklav.) | 5,2 | 6,8 |
| | 24 Std. | 2 (Bouillon) | 5,9 | 6,6 |
| Bouillon | | | | 7,3 |

Tabelle 6. Kupferanalyse.

| Material | Liegezeit | Extraktionsverfahren | Cu-Gehalt (Mol/l) |
|------------------------------|-----------|----------------------|------------------------|
| Zinkoxyphosphatzement mit Cu | 1 Std. | 1 | $26,0 \times 10^{-7}$ |
| | 1 Std. | 2 | $134,0 \times 10^{-7}$ |
| | 24 Std. | 1 | $26,0 \times 10^{-7}$ |
| | 24 Std. | 2 | $134,0 \times 10^{-7}$ |
| Silikophosphatzement mit Cu | 1 Std. | 1 | $23,0 \times 10^{-7}$ |
| | 1 Std. | 2 | $283,0 \times 10^{-7}$ |
| | 24 Std. | 1 | $7,7 \times 10^{-7}$ |
| | 24 Std. | 2 | $134,0 \times 10^{-7}$ |
| Medium | | | $8,8 \times 10^{-7}$ |

Tabelle 7. Bakterienwachstum bei verschiedenen pH-Werten der Nährbouillon.

| pH-Wert | % Wachstum | 95% Vertrauensbereich |
|---------|------------|-----------------------|
| 7,3 | 100 | - |
| 6,5 | 88 | 103-73 |
| 6,0 | 75 | 92-59 |
| 5,5 | 67 | 81-53 |
| 5,0 | 6 | 19-(-8) |

zwischen den Eluaten und der direkten Materialtestung gesichert werden. Die statistische Analyse beim Vergleich der bakteriziden Eigenschaften kupferhaltiger Zemente gegenüber kupferfreien (Tab. 3) bestätigt die für einzelne Meßpunkte erhaltenen Ergebnisse.

Diskussion

Die aus der Literatur bekannte Abhängigkeit der biologischen Reaktion von Art und Menge der eluierten Substanzen [1, 4, 7, 8, 10, 12] kann durch

unsere Versuche insoweit bestätigt werden, als die biologische Reaktion bei allen drei Verfahren etwa in der gleichen Größenordnung liegt. Die von *Autian* [1] beschriebene bessere Möglichkeit zur Quantifizierung biologischer Ergebnisse bei Extrakten gegenüber der direkten Materialprüfung können wir ebenfalls bestätigen, da die Schwankungsbreite der Ergebnisse bei den Eluationsverfahren deutlich geringer ist.

Die statistische Auswertung der Steigungen der Regressionskurven erlaubt es, alle Meßpunkte in den Vergleich einzubeziehen. Bei den kupferfreien Materialien läßt sich zwischen den Extraktionsverfahren und der direkten Materialtestung bis auf eine Ausnahme, die nicht erklärt werden kann, ein Unterschied statistisch nicht sichern. Alle drei Methoden liefern somit gleiche Ergebnisse.

Anders verhält es sich dagegen bei den kupferhaltigen Materialien. Die Dosisreaktionskurven der Extrakte 1 verlaufen gegenüber denjenigen der Extrakte 2 und der direkten Materialtestung signifikant flacher. Diese Unterschiede konnten bis auf eine Ausnahme (Silikophosphatzement) statistisch gesichert werden.

Der in einer früheren Publikation durch Vergleich einzelner Meßpunkte beschriebene Unterschied zwischen kupferhaltigen und kupferfreien Materialien bei 24stündiger Liegezeit [15] konnte auch mit dem in dieser Untersuchung angewandten Modell einer Regression für die Gesamtkurve bei der direkten Materialprüfung bestätigt werden.

Das Extrakt 1 zeigte beim Zinkoxyphosphatzement jedoch ein umgekehrtes Verhältnis, d. h. solcherart hergestellte Eluate des kupferfreien Zinkoxyphosphatzementes reagieren signifikant bakterizider als das entsprechende kupferhaltige Material.

Bei den kupferhaltigen und kupferfreien Silikophosphatzementen kann bei beiden Eluationsverfahren ein Unterschied zwischen kupferhaltigem und kupferfreiem Material gesichert werden. Daß dies bei der direkten Materialtestung der Silikophosphatzemente nicht beobachtet werden konnte [15], mag an der sehr großen Streubreite der damaligen Ergebnisse liegen.

Das angewandte Regressionsmodell hat sich zur quantitativen Beschreibung der erhaltenen Dosisreaktionskurven als geeignet erwiesen. Proble-

matisch erscheint lediglich die vergleichsweise große Beeinflussung der Steigung (a) durch kleine Wachstumswerte am Ende der Kurve.

Wie *Royhouse* [14] für Silikat-zement nachweisen konnte, ist es von Bedeutung, mit welchem Verfahren eluiert wird. Dies konnte auch bei der Analyse des Kupfergehaltes der verschiedenen Extrakte festgestellt werden. *Kawahara* beschreibt eine starke chelatbildende Tendenz von Kupfer in Körperflüssigkeit [9]. Die unterschiedliche biologische Reaktion zwischen kupferhaltigem und kupferfreiem Material beruht aller Wahrscheinlichkeit nach nicht auf verschiedenen pH-Werten, sondern auf der unterschiedlichen Cu-Ionen-Konzentration, wie diese Untersuchungen zeigen. Man kann annehmen, daß proteinhaltiges Medium mehr Kupfer aus dem Material herauslösen kann, als destilliertes Wasser, selbst wenn es 1 Stunde lang autoklaviert wird. Beim Vergleich der von uns getesteten Eluationsverfahren erscheint uns deshalb eine 24stündige Lagerung im Nährmedium zuverlässigere Ergebnisse zu liefern als ein einstündiges Autoklavieren in destilliertem Wasser. Weitere Untersuchungen mit einem breitem Spektrum von Testmaterialien müssen dies noch bestätigen.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung bin ich Herrn Prof. Dr. *Dietz*, Institut für Biometrie der Universität Tübingen, sowie Herrn Dipl.-Phys. *D. Lukas*, Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Univers. Tübingen, sehr dankbar.

Summary

The possibility of separating the eluate and the actual biologic test for determining tissue tolerance was studied using two cements containing copper and two cements without copper. Both the materials and the two eluates obtained according to the different procedures were tested immediately. Distilled water was added to one sample of the material, and the mixture was placed in an autoclave for one hour. A second sample was leached in nutrient solution for 24 hours at 37 C. Uniform results were obtained with the copper-free material. Results with the material containing

copper however varied; the results of the eluate obtained after one hour in the autoclave were different from the results obtained after 24 hours in the nutrient solution or after direct testing. The test results for the last two procedures were similar. Comparison of the two elution methods indicates that extraction in physiologic nutrient solution is better than the autoclave method using distilled water.

Schrifttum

1. *Autian, J.*: The new field of plastics – Toxicology – Methods and results. CPR-Press, June 1973, p. 1–40.
2. *DeHaan, R. L.*: Toxicity of tissue culture media exposed to polyvinyl chloride plastic. *Nature* 231, 85 (1971).
3. *Dillingham, E. O., Mast, R. W., Bass, G. E., and Autian, J.*: Toxicity of methyl- and halogen substituted alcohols in tissue culture relative to structure activity models and acute toxicity in mice. *J. Pharm. Sci.* 62, 22 (1973).
4. *Dillingham, E. O., Webb, N., Lawrence, W. H., and Autian, J.*: Biological evaluation of polymers. I. Polymethylmethacrylate. *J. Biomed. Mater. Res.* 9, 569 (1975).
5. DIN-Taschenbuch 22, Beuth-Vertriebs GmbH, Berlin-Köln-Frankfurt, 1972, p. 93.
6. *Higuchi, R., and Davis, S. S.*: Thermodynamic analysis of structure activity relationship of drugs: Prediction of optimal structure. *J. Pharm. Sci.* 59, 1376 (1970).
7. *Homsy, C. A.*: Bio-Compatibility in selection of materials for implantation. *J. Biomed. Mater.* 4, 341 (1970).
8. *Homsy, C. A., Kent, J. N., and Hinds, E. C.*: Materials for oral implantation – biological and functional criteria. *J. Amer. dent. Ass.* 86, 817 (1973).
9. *Kawahara, H.*: Biological problem of implant material. Vortrag: Japan Society of Implant Dentistry, 15. August 1975, Osaka (Jap.).
10. *Laing, P. G., Ferguson, A. B. jr., and Hodge, E. S.*: Tissue reaction in rabbit muscle exposed to metallic implants. *J. Biomed. Mater. Res.* 1, 135 (1967).
11. *Leirskar, J.*: On the mechanism of cytotoxicity of silver and copper amalgams in a cell culture system. *Scand. J. dent. Res.* 82, 74 (1974).
12. *Neupert, G., und Welker, D.*: Bestimmung der Gewebetragfähigkeit stomatologischer Werkstoffe an Zellkulturen. *Zahn-, Mund- u. Kieferheilk.* 63, 134 (1975).
13. *Nunez, L. J., Schmalz, G., and Hembree, J.*: Influence of amalgam, alloy and mercury in the in vitro growth of *Streptococcus mutans*: I. Biological test system. *J. dent. Res.* 55, 257 (1976).
14. *Royhouse, R. H.*: Silicate cements and acid production. *J. dent. Res.* 40, 258 (1961).
15. *Schmalz, G., und Rotgans, J.*: Antimikrobielle Eigenschaften kupferhaltiger und nicht kupferhaltiger Zemente. *Dtsch. zahnärztl. Z.* 32, 760 (1977).
16. *Spangberg, L.*: Biological effects of root canal filling materials. 3. Effect of Tween 80 on human cells in vitro. *Odont. Revy.* 20, 283 (1969).
17. The UNITED STATES PHARMACOPEIA No XIX: Biological Tests – Plastic Containers – Mack Publ., Easton, Pa (USA), 1975, p. 644.

Anschrift des Verfassers: OA Dr. G. Schmalz, Osianderstraße 2–8, 7400 Tübingen