

Über die Empfindlichkeit verschiedener In-vitro-Testsysteme bei der biologischen Materialprüfung

Von G. Schmalz, Tübingen*

In der vorliegenden Arbeit wurde die biologische Aktivität von Methylmethakrylat-Monomer und Dimethylparatoluidin auf stationäre, proliferierend zelluläre und bakterielle Kulturen untersucht. Die äquitoxischen Konzentrationen waren im Zellkultursystem geringer als in der stationären Zellsuspension und in der Bakterienkultur. Die biologische Reaktion scheint demnach sowohl von der effektiven Konzentration der toxischen Substanz als auch von der spezifischen Empfindlichkeit des Testsystems abzuhängen. Zwischen der Empfindlichkeit des zellulären und des bakteriellen Testsystems besteht keine Korrelation.

1. Einleitung

Eine frühere Untersuchung macht deutlich [9], daß ein Füllungsmaterial sowohl toxisch auf die Zahnpulpa als auch gleichzeitig beschleunigend auf das Bakterienwachstum wirken kann. Dieser Gegensatz läßt sich u. a. durch die Annahme erklären, daß biologische Systeme bei gleicher Konzentration der toxischen Substanz unterschiedlich reagieren. In unserer vorangegangenen Untersuchung [9] wurden zahnärztliche Materialien getestet, ohne Art oder effektive Konzentration ihrer biologisch aktiven Substanz zu kennen. In der vorliegenden Arbeit prüften wir die konzentrationsabhängige biologische Aktivität zweier toxischer Substanzen in drei verschiedenen Testsystemen.

2. Material und Methode

Methylmethakrylat-Monomer¹⁾ und Dimethylparatoluidin²⁾ wurden handelsüblich – ohne weitere Purifikation – verwendet. Methylmethakrylat-Monomer enthält 100 ppm Hydrochinon zur Polymerisationshemmung³⁾.

*) Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde – Abteilung für Zahnerhaltungskunde – der Universität Tübingen, Osianderstraße 2-8, 7400 Tübingen

¹⁾ Schuchardt, München, – Charge Nr.: 24078

²⁾ Fluka AG, Buchs, SG/Schweiz, – Charge Nr.: 22290114

³⁾ Nach Angaben des Herstellers

Als biologische Testsysteme dienten: 1. Erythrozyten vom Kaninchen, 2. Mausfibroblasten und 3. Kariogene Streptokokken.

Als stationäre Kulturen fanden Erythrozytensuspensionen (Kaninchen) nach der Methode von Autian [1] Verwendung. Die von der Testsubstanz hervorgerufene Haemolyse wurde photometrisch bestimmt. An Mausfibroblasten (L-929), als einer proliferierend zellulären Kultur, wurde die von den Testsubstanzen hervorgerufene Wachstumshemmung ermittelt. Zellhaltung und Wachstumsbestimmung sind bei *Dillingham* et al. [5] beschrieben.

Als proliferierend bakterielle Kultur diente eine Suspension von *Strept. mutans* HS-6. Doppelt konzentrierte Nährbouillon wurde zu gleichen Teilen mit einer wäßrigen Lösung der Testsubstanz gemischt. Jeder Versuch umfaßte 10 Verdünnungsstufen mit jeweils 5 Replikaten.

Die biologische Reaktion (Wachstumshemmung) wurde nach der von *Nunez* et al. [8] angegebenen und von *Schmalz* [9] modifizierten Methode ermittelt.

Für die beiden Testsubstanzen wurden Dosis-Reaktionskurven erstellt. Von diesen Kurven wurden folgende äquitoxischen Konzentrationen abgelesen:

H ₅₀	Konzentration der Testsubstanz bei 50% Hämolyse.
Z ₅₀	Konzentration der Testsubstanz bei 50% Wachstumshemmung der Mausfibroblasten.
S ₅₀	Konzentration der Testsubstanz bei 50% Wachstumshemmung der Streptokokken.
H ₀₋₁₀₀	Konzentrationsbereich der Testsubstanz bei 0 bis 100% Hämolyse.
Z ₀₋₁₀₀	Konzentrationsbereich der Testsubstanz bei 0 bis 100% der Mausfibroblasten.
S ₀₋₁₀₀	Konzentrationsbereich der Testsubstanz bei 0 bis 100% Wachstumshemmung der Streptokokken.

3. Ergebnisse und Diskussion

Die toxischen Eigenschaften von Methylmethakrylat-Monomer und Dimethylparatoluidin sind verschiedentlich untersucht worden [2, 4, 6, 7, 11]. Da beide Substanzen als Ausgangsmaterial für Kunststoffstoffe und als Katalysator in der Zahnheilkunde Verwendung finden [10], boten sich diese zur Untersuchung der unterschiedlichen Empfindlichkeit verschiedener biologischer Testsysteme an.

Tabelle 1. Äquitoxische Konzentrationen von Methylmethakrylat-Monomer und Dimethylparatoluidin in Mol/l $\times 10^4$.

Meßgröße	Methylmethakr.	Dimethylparatol.
H ₅₀	920	23
Z ₅₀	110	18
S ₅₀	205	42
H _{0–100}	730–1040	20–39
Z _{0–100}	12–400	3–35
S _{0–100}	120–510	25–65

Die Versuchsergebnisse (Tab. 1) zeigen, daß das proliferierende Zellkultursystem am empfindlichsten reagierte. Wesentlich höhere äquitoxische Konzentrationen werden im Hamolysetestsystem benötigt. Dies deckt sich mit den Angaben von *Dillingham* et al. [6], wonach alle Testmaterialien (Polymethylmethakrylate), die eine Hämolyse hervorriefen, auch in der Zellkultur toxisch waren, jedoch nicht alle, die eine zelluläre Reaktion auslösten, gleichzeitig auch hämolytisch wirkten.

Bei einer Serie von methyl- und halogensubstituierten Alkoholen kamen *Dillingham* et al. [5] zu gleichen Ergebnissen. Als Grund der geringeren Empfindlichkeit des Hämolysetestsystems wird die höhere Lipophilie der Erythrozytenmembran angenommen [5].

Die Zellkultur reagierte auch im Vergleich zur Streptokokkensuspension empfindlicher. Neben verschiedenen stoffwechselspezifischen Unterschieden beider biologischer Systeme ist der grundsätzlich andere Aufbau der Bakterienmembran von Bedeutung [3].

Die Empfindlichkeit der Bakterienkultur gegenüber dem Methylmethakrylat-Monomer liegt zwischen derjenigen der beiden anderen Prüfsysteme. Bei Dimethylparatoluidin reagierten die Streptokokken jedoch wesentlich unempfindlicher als die Erythrozyten des Kaninchens.

Von einer toxischen Reaktion in einem zellulären Testsystem kann nicht auf eine solche bei Bakterienkulturen geschlossen werden. Für die präklinische biologische Materialprüfung läßt sich

folgern, daß bei Bestimmung der unspezifischen Toxizität von Materialien neben Tierversuchen möglichst verschiedenartige In-vitro-Systeme herangezogen werden sollten. Nur ein breitgefächertes Toxizitätsprofil besitzt für die biologische Bewertung eines Materials Aussagewert.

Summary

In the present paper the biological activity of methylmethacrylate Monomer and di-methylparatoluidin on stationary, cell-proliferating and bacterial cultures is examined.

The equi-toxic concentrations were lower in cell culture systems than in stationary cell suspensions or bacterial cultures. Accordingly biological reaction appears to depend on the effective concentration of the toxic substance as well as on the specific sensitivity of the test system. There is no correlation between the sensitivity of cellular and of bacterial test systems.

Schrifttum

1. *Autian, J.*: General toxicity and screening test for dental materials – Vortrag, 61st Ann. Sess. FDI, Sidney/Australien, 1973.
2. *Bass, G. E., Lawrence, W. H., Purcell, W. P., and Autian, J.*: Further evaluation of a quantitative mathematical model for predicting acute toxicity of Acrylate- and Methacrylate-Esters. *J. dent. Res.* 53, 756 (1974).
3. *Burnett, G. W., and Scherp, H. W.*: Oral microbiology and infectious disease. Williams Baltimore, 1968, p. 64.
4. *Deichmann, W.*: Toxicity of Methyl-, Ethyl- and N-Butyl-Methacrylate. *J. Ind. Hyg. Toxicol.* 23, 1334 (1941).
5. *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).
6. *Dillingham, E. O., Webb, N., Lawrence, W. H., and Autian, J.*: Biological evaluation of polymers. – I. Poly-methyl-methacrylate. *J. Biomed. Mat. Res.* 9, 569 (1975).
7. *Lawrence, W. H., Bass, G. E., Purcell, W. P., and Autian, J.*: Use of mathematical models in the study of structure-toxicity relationship of dental compounds: I. Esters of Acrylic and Methacrylic acids. *J. dent. Res.* 51, 526 (1972).
8. *Nunez, L. J., Schmalz, G., and Hembree, J.*: Influence of amalgam, alloy and mercury on the in vitro growth of streptococcus mutans: Biological test system. *J. dent. Res.* 55, 257 (1976).
9. *Schmalz, G.*: Der Einfluß verschiedener Frontzahnfüllungsmaterialien auf das In-vitro-Wachstum von Streptococcus mutans. – *Dtsch. zahnärztl. Z.* 32, 575 (1977).
10. *Schmidt, A.*: Kaltpolymerisate. *Dental Labor* 18, H. 11, 17 (1970).
11. *Spealman, C. R., Main, R. J., Haag, H. B., and Larson, P. S.*: Monomeric methyl methacrylate – Studies on toxicity. *Ind. Med.* 14, 292 (1945).

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