

Der Einfluß von Methyl-Methakrylat-Monomer auf den Stoffwechsel von L-Zellen

Von G. Schmalz, Tübingen*

In einer Kultur von L-929-Mausfibroblasten wurde die Gesamteiweißsynthese, die Aminosäureaufnahme, die Zellteilungsrate und die DNS-Synthese bei verschiedenen Konzentrationen von Methyl-Methakrylat-Monomer im Medium bestimmt. Nach 12 Std. Inkubation erfolgte eine Hemmung der DNS-Synthese. Bei einer Konzentration von $3,2 \cdot 10^{-2}$ mol/l wurde der normale Zellteilungsablauf vollständig unterdrückt. Nach 24 Std. Inkubation wurde eine Verringerung der Proteinsynthese beobachtet; dies kann u. a. als eine Folge der DNS-Hemmung angesehen werden.

Einleitung

Über die Toxizität von Methakrylat-Monomeren wurde in der Literatur verschiedentlich berichtet. Neben anderen Autoren bestimmten *Deichman* [4] und *Spealman et al.* [10] die LD_{50} , *Borzelleca et al.* [2] und *Castellino et al.* [3] chronisch toxische und sensitisierende Eigenschaften. *Singh et al.* [9] beschrieben das teratogene Verhalten, *Mir et al.* untersuchten ihren Einfluß auf die Funktion des isolierten Hasenherzens [7] und auf das Meer-schweinchen-Ileum [8]. Bei der Verwendung von Methakrylat-Zement zum Befestigen künstlicher Hüftgelenke sind als intraoperative Komplikationen Herzstillstand und Lungenembolie sowie Auswirkungen auf den N. ischiadicus genannt worden [1]. Aus diesen und aus unseren Untersuchungen geht hervor, daß Methyl-Methakrylat-Monomer bei entsprechender Konzentration Gewebeschäden verursachen kann. In der vorliegenden Untersuchung sollte die Wirkung dieser Substanz auf proliferierende Zellen in vitro bestimmt werden.

Material und Methode

Methyl-Methakrylat-Monomer¹⁾ wurde handelsüblich ohne weitere Purifikation verwendet. 100 ppm Hydrochinon waren zur Polymerisationshemmung beige-mischt. Von der Testsubstanz wurde eine 6stufige Verdünnungsreihe in de-ionisiertem Wasser unter sterilen Kautelen hergestellt. Als permanent replizierende Kulturen dienten L-929-Mausfibroblasten, die in BME-Medium mit 5% Serum gezüchtet wurden. Die radioaktiven Lösungen wurden folgendermaßen hergestellt: Lösung A: 1,45 ml C^{14} markiertes Leucin (50 μ Ci/ml) Lösung B: 0,8 ml H^3 -Thymidin (100 μ Ci/ml) jeweils auf 40 ml Medium

72 Stunden alte Zellen wurden nach Trypsinisierung mittels Lösung A geerntet und auf eine Konzentration von 2 Mio Zellen pro ml eingestellt. Von dieser Suspension wurde 0,1 ml in ein Kulturgefäß zu 1,9 ml einer Mischung aus Testlösung und doppelt konzentriertem Nährmedium gegeben. Als Kontrolle dienten 15 Kulturen ohne Monomer, die wie die Versuchskulturen inkubiert wurden und 15 gleiche, bei 4°C gelagerte Kulturen (Anfangs-Kontr.). Die Inkubation erfolgte bei 37°C in 5% CO_2 -haltiger Atmosphäre und 100% rel. Luftfeuchtigkeit über 3, 12, 18, 24, 48 und 72 Stunden. Zur Bestimmung der DNS-Aktivität wurde 3 Stunden vor Ende der Inkubation 0,1 ml Lösung B in jede Kultur gegeben. Das Gesamteiweiß wurde nach der Methode von *Oyama* und *Eagle* gemessen und als Prozent der Wachstumskontrolle berechnet [5]. Zur Ermittlung der Konzentration der Radio-Isotopen wurden nach Trennung in einem „Sample Oxidizer“²⁾ die Aktivität in einem Flüssigkeits-Scintillations-zähler³⁾ bei 5% Fehlergrenze bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Mit steigender Konzentration von Methyl-Methakrylat-Monomer findet eine verstärkte Hemmung der Eiweißsynthese statt (Abb. 1). Die ID_{50} , d. h. diejenige Konzentration, welche 50% Wachstumshemmung hervorruft, liegt bei $3,9 \cdot 10^{-2}$ mol/l, die ID_5 bei $1,4 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Beim Zementieren von Hüftprothesen werden anfäng-

* Zentrum für Zahn-, Mund- u. Kieferheilkunde -*Abt. f. Zahn-erhaltung - d. Universität Tübingen, Osianderstraße 2-8, 7400 Tübingen

¹⁾ Hersteller: Rohm and Haas, Philadelphia, Pa (USA)

²⁾ Packard Tri Carb Sample Oxidizer 306

³⁾ Beckman LS-100 C Liquid Scintillation System

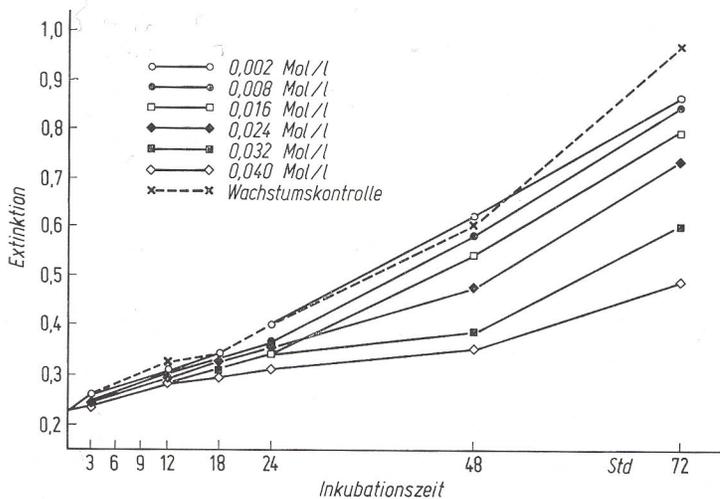


Abb. 1. Einfluß verschiedener Konzentrationen von MMA auf die Gesamt-Eiweiß-Synthese von Fibroblastenkulturen.

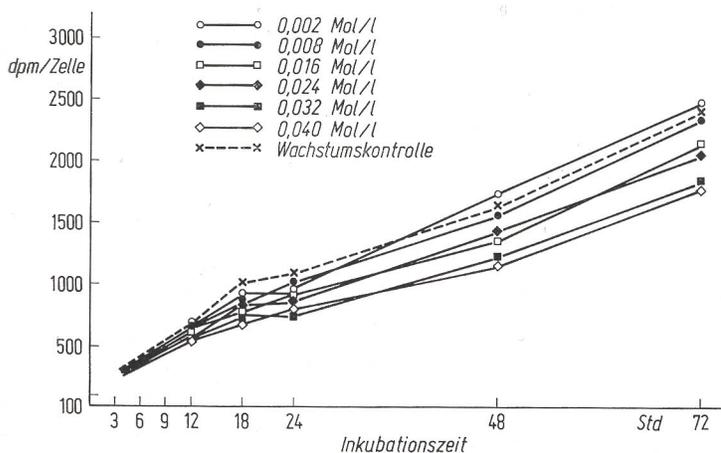


Abb. 2. Einfluß verschiedener Konzentrationen von MMA auf die RNS-Synthese von Fibroblastenkulturen.

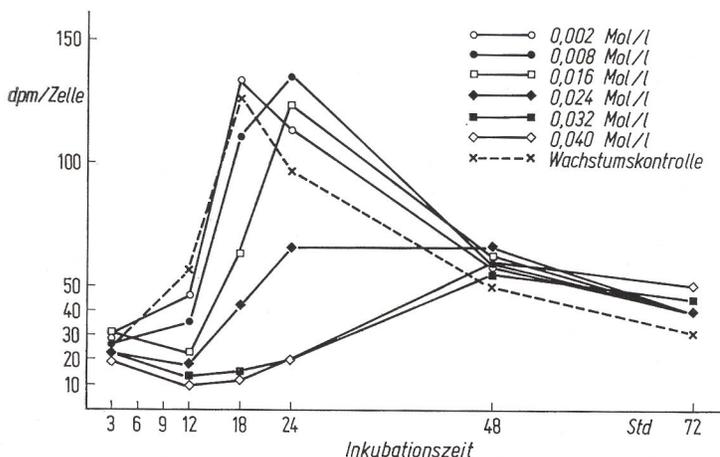


Abb. 3. Einfluß verschiedener Konzentrationen von MMA auf die DNS-Synthese.

liche Blutkonzentrationen von 10^{-4} – 10^{-6} v/v Monomer angenommen [11], was umgerechnet 10^{-3} – 10^{-5} mol/l entspricht. Eine chemisch-toxische Schädigung durch das Monomer ist nach den vorliegenden Ergebnissen durchaus möglich, vor allem, da die verwandten Mausfibroblasten wesentlich unempfindlicher reagieren als differenzierte diploide Zellen. Der hemmende Einfluß des Methyl-Methakrylat-Monomers auf die Aminosäureaufnahme wird nach 24 Stunden Inkubationszeit erkennbar (Abb. 2). Am deutlichsten wird die DNS-Aktivität pro Zelle (Abb. 3) von Methyl-Methakrylat-Monomer beeinflusst. Die durch Trypsinisierung teilweise synchronisierte Kultur durchläuft normalerweise nach 18 Stunden einen Zellteilungsvorgang [6], was an einem Peak auf der Kurve der DNS-Aktivität erkennbar ist. Bei einer Konzentration von $3,2 \cdot 10^{-2}$ mol/l wird die Zellteilung vollständig, bei $1,6 \cdot 10^{-2}$ mol/l bereits deutlich unterdrückt oder zeitlich verschoben. Dies deutet darauf hin, daß bei geringer Monomerkonzentration dieses abgebaut werden und anschließend der normale Zellteilungsvorgang vonstatten gehen kann. Die verminderte Proteinsynthese könnte u. a. als Folge der DNS-Hemmung angesehen werden.

Die Untersuchung wurde durchgeführt im Material Sci. Toxicology Lab., Memphis, Tenn. (USA), unter Leitung von Prof. Dr. J. Autian.

Summary

The total serum protein synthesis, amino acid assimilation, rate of cell division, and DNA synthesis with various concentrations of methyl methacrylate monomer in medium was determined in a culture of L 929

fibroblasts of the mouse. DNA synthesis was inhibited after 12 hours of incubation. The normal course of cell division was completely suppressed with a concentration of $3.2 \cdot 10^{-2}$ mol/l. A decrease in protein synthesis was observed after 24 hours of incubation. This decrease may be considered the result of DNA inhibition.

Schrifttum

1. Bloch, B., and Hastings, G. W.: Plastic material in surgery. – Ch. Thomas, Springfield, Ill. 1972, p. 125.
2. Borzelleca, J. F., Larson, P. S., Henningar, G. R. jr., Huf, E. G., Grawford, E. M., and Smith, R. B. jr.: Studies on the chronic and oral toxicity of monomeric ethyl acrylate and methyl methacrylate. – Toxicol. Appl. Pharmacol. 6, 29 (1964).
3. Castellino, N., and Collochio, G.: Toxicity of methyl methacrylate. – Folia Med. 52, 337 (1969).
4. Deichmann, W.: Toxicity of methyl, ethyl and N-butyl methacrylate. – J. Ind. Hyg. Toxicol. 23, 1343 (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. Mauersberger, B.: Aktuelle Probleme der Zellzüchtung. – Gustav Fischer, Stuttgart 1971, p. 132.
7. Mir, G. N., Lawrence, W. H., and Autian, J.: Toxicological and pharmacological actions of methacrylate monomers: I. Effects of isolated, perfused rabbit heart. – J. Pharm. Sci. 62, 778 (1973).
8. Mir, G. N., Lawrence, W. H., and Autian, J.: Toxicological and pharmacological actions of methacrylate monomers: II. Effects on isolated guinea pig ileum. – J. Pharm. Sci. 62, 1258 (1973).
9. Singh, A. R., Lawrence, W. H., and Autian, J.: Embryonic-fetal toxicity and teratogenic effects of a group of methacrylate esters on rats. – J. dent. Res. 51, 1632 (1972).
10. Sealman, C. R., Main, R. J., Haag, H. B., and Larson, P. S.: Mono-methyl-methacrylate-studies on toxicity. – Ind. Med. 14, 292 (1945).
11. Wong, K. C., Martin, W. E., Kennedy, W. F., Akamatsu, T. J., Convery, R. F., and Shaw, C. L.: Cardiovascular effects of total hip placement in man. With observations of the effects of methylmethacrylate on the isolated rabbit heart. – Clin. Pharmacol. Ther. 21, 709 (1977).

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