

Korrelationsanalysen zwischen Zellkulturen und Tierversuch

Von G. Schmalz, Tübingen*

Voraussetzung für einen möglichen Ersatz von Tierversuchen durch Zellkulturen ist die Gleichwertigkeit der in beiden Versuchsanordnungen erhaltenen Resultate. Um dies zu überprüfen, wurden von einer Reihe zahnärztlicher Materialien die Ergebnisse des Implantationstests am Kaninchen und des Agar-Diffusionstests korreliert. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen beiden Variablen statistisch gesichert werden. Die Korrelations-Koeffizienten waren jedoch so niedrig bzw. die Toleranzgrenze für die Regressionsgeraden derart weit, daß nur bei Materialien, die in vitro nicht oder aber äußerst toxisch wirkten, auch auf eine entsprechende Toxizität in vivo geschlossen werden kann. Somit können Implantationstests durch Zellkulturen zahlenmäßig reduziert, jedoch nicht ersetzt werden.

Einleitung

Da bei der gesetzlich geforderten präklinischen biologischen Prüfung zahnärztlicher Materialien eine Vielzahl von Tierversuchen ansteht, wird ein zumindest teilweiser Ersatz dieser Prüfverfahren durch Zellkulturen diskutiert. Letztere sind gegenüber Tierversuchen mit geringerem finanziellem und technischem Aufwand verbunden, und es bestehen keine Probleme mit dem Tierschutz [6].

Die Voraussetzung für eine alternative Verwendung, von Zellkulturen ist jedoch die Gleichwertigkeit der Ergebnisse aus beiden Versuchsanordnungen.

Anwendungstests an Großtieren (Affen, Schweine, Hunde) bleiben bei dieser Untersuchung unberücksichtigt, da hier beobachtete Reaktionen des Gewebes auf ein Material neben toxischen auch andere Ursachen haben kann [6]. Hingegen werden in der Zellkultur allein die

toxisch bedingten Zellschäden erfaßt [2]. Bei anderen In-vivo-Prüfverfahren, wie z. B. den Implantationstests an Kaninchen, Ratten, Meer-schweinchen, etc. steht ebenfalls die Toxizität als Ursache einer Gewebeerirritation im Vordergrund. In vorliegender Untersuchung wurden daher Ergebnisse, die mit einer als Standardverfahren vorgeschlagenen Zellkulturmethode und einem Implantationstest erhalten wurden, statistisch miteinander verglichen.

Material und Methoden

Die 11 Füllungsmaterialien, 3 Amalgame¹⁻³, 3 Komposit-Kunststoffe⁴⁻⁶ sowie 5 Zemente⁷⁻¹¹ wurden nach Angaben der Hersteller praxisüblich angemischt und nach 3 Alterungszeiten (Zeit vom Anmischen bis zum Versuchsbeginn) getestet: 10 min, 1 Std. und 1 Tag. Das negative Kontrollmaterial war glasiertes Porzellan¹², das positive ein toxischer PVC-Kunststoff [6]. Als In-vitro-Prüfverfahren diente der Agar-Diffusionstest [1, 6], als In-vivo-Methode der Kaninchen-Implantationstest [1, 7]. Für die Zellkultur wurde die Reaktionssumme [6], für den Implantationstest das Resultat der makroskopischen und der mikroskopischen Auswertung [7] verwandt. Die beiden Testergebnisse sind linear auf eine einheitliche Skala von 0–100% übertragen worden, wobei 0% keine, 100% maximale Toxizität bedeuten.

Die statistische Auswertung umfaßte die Berechnung des linearen Korrelationskoeffizienten [4], der entspre-

- 1 Amalcap, Vivadent, Schaan, Charge Nr. 12 0977 F 237 321.
- 2 Amalcap non-γ-2, Vivadent, Schaan, Charge Nr. 090 277 412.
- 3 Sher-a-cap, Kerr, Charge Nr. 050 476 3070.
- 4 Compocap, Vivadent, Schaan, Charge Nr. 010 277 425.
- 5 Isopast, Vivadent, Schaan, Charge Nr. 030577/060577.
- 6 Microfil, Kulzer, Charge Nr. 031/024.
- 7 Cupro-Dur, Merz, Charge Nr. 5017 (60902).
- 8 Steinzement, Drala, Charge Nr. 67115.
- 9 Havard-Zement, Richter & Hoffmann, Charge Nr. 943.
- 10 Nobetec, Bofors Nobel-Pharma, Charge Nr. CC 1204/CD 976.
- 11 Durelon, Espe, Charge Nr. 75 126/A 303.
- 12 Vitadur-Profill, Vita-Zahnfabrik, Säckingen.

* Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde – Abteilung für Zahnerhaltung – der Universität Tübingen (Osianderstr. 2–8, 7400 Tübingen).

Tabelle 1. Ergebnisse der linearen Korrelationsrechnung für den Zusammenhang zwischen Zellkulturen und makroskopischer Auswertung in vivo (1) sowie Zellkulturen und mikroskopischer Auswertung in vivo (2). Signifikanzniveau gegenüber $r = 0$: * $2\alpha = 0,05$; ** $2\alpha = 0,01$; * $2\alpha = 0,001$.**

Testmaterialien	linearer Korrelationskoeffizient (1)	(2)
alle Materialien	0,60***	0,57***
Zemente	0,80***	0,85***
Amalgame	0,78**	0,71*
Komposit-K.	0,76**	0,72*

chenden Regressionsgeraden mit Vertrauens- und Toleranzbereich [4], des Rang-Korrelations-Koeffizienten [4] und des Korrelations-Koeffizienten (τ) nach Goodman-Kruskal [3]. Es wurde außerdem eine Vierfelder-Tafel [5] erstellt.

Ergebnisse und Diskussion

Die linearen Korrelationskoeffizienten (vgl. Tab. 1) sind gegenüber 0 bei $2\alpha = 0,05 - 2\alpha = 0,001$ statistisch signifikant verschieden, was auf einen Zusammenhang zwischen beiden Variablen schließen läßt.

Setzt man die Ergebnisse der Zellkultur als Standard voraus, so ergibt die Analyse der Vierfelder-Tafel (vgl. Tab. 3) eine 100%ige Spezifität, d. h. das Fehlen einer positiv falschen Reaktion im Tierversuch, was ähnlichen Beobachtungen von Autian [1] entspricht.

Werden die In-vivo-Daten auf der Abszissenachse, die In-vitro-Daten auf der Ordinatenachse dargestellt, ergibt die Berechnung der Regressionsgeraden mit zugehörigem Vertrauens- und Toleranzbereich für 0% In-vivo-Toxizität eine signifikant ($\alpha = 0,05$) oberhalb des Nullpunktes liegende In-vitro-Toxizität (vgl. Tab. 2). Auch daraus folgt, daß die Zellkultur empfindlicher reagiert als der Implantationstest.

Aufgrund der geringen Steigung der Geraden mit Regressions-Koeffizienten von 0,21-0,63 liegen bei in vivo zu 100% toxischen Materialien die entsprechenden In-vitro-Werte z. T. weit unter dem 100%-Niveau (vgl. Tab. 2). Demnach ist bei sehr toxischen Materialien die verwandte Zellkulturmethode weniger empfindlich als der Implantationstest. Analoge Ergebnisse werden erhalten, wenn Abszissen- und Ordinatenachse vertauscht werden.

Tabelle 2. Ergebnisse der Regressionsrechnung: prozentuale Toxizität im Zellkulturtest bei a) in vivo 0% Toxizität; b) in vivo 100% Toxizität sowie in vivo makroskopischer Auswertung (1) und mikroskopischer Auswertung (2); Darstellung der Mittelwerte mit 95% Vertrauens- und Toleranzbereich (i. Klammer).

Testmaterialien	prozentuale Toxizität in der Zellkultur	
	(1)	(2)
alle Materialien	a) $29,6 \pm 1,8 (\pm 10,5)$ b) $51,8 \pm 4,5 (\pm 11,8)$	$28,1 \pm 1,8 (\pm 10,7)$ $48,2 \pm 4,6 (\pm 11,8)$
Zemente	a) $24,2 \pm 2,8 (\pm 11,7)$ b) $71,1 \pm 8,8 (\pm 14,3)$	$17,0 \pm 2,4 (\pm 10,3)$ $76,5 \pm 7,3 (\pm 12,4)$
Amalgame	a) $14,8 \pm 5,3 (\pm 18,4)$ b) $55,6 \pm 9,5 (\pm 20,0)$	$17,7 \pm 6,0 (\pm 20,7)$ $49,9 \pm 9,9 (\pm 22,3)$
Komposit-K.	a) $30,2 \pm 5,2 (\pm 18,0)$ b) $78,9 \pm 17,3 (\pm 24,4)$	$26,9 \pm 5,7 (\pm 19,9)$ $67,8 \pm 15,5 (\pm 24,6)$

Tabelle 3. Vierfeldertafel. Die Spezifität beträgt 1, die Sensitivität 0,71 bzw. 0,85. * Vergleich mit makroskopischer Auswertung in vivo; ** Vergleich mit mikroskopischer Auswertung in vivo; * Werte für beide Vergleiche identisch.**

		Zellkultur	
		toxisch	nicht toxisch
Tierversuch	toxisch	24* / 29**	0***
	nicht toxisch	10* / 5**	1***

Tabelle 4. Ergebnisse der Rangkorrelationsrechnung für den Zusammenhang zwischen Zellkultur und makroskopischer Auswertung in vivo (1) sowie Zellkultur und mikroskopischer Auswertung in vivo (2). Signifikanzniveau gegenüber $R = 0$: * $2\alpha = 0,02$; ** $2\alpha = 0,01$; * $2\alpha = 0,001$.**

Testmaterialien	Rangkorrelationskoeffizient	
	(1)	(2)
alle Materialien	0,56**	0,54**
Zemente	0,69**	0,61*
Amalgame	0,85**	0,86***
Komposit-K.	0,45	0,57

Tabelle 5. Ergebnisse des Goodman-Kruskal-Tests für den Zusammenhang zwischen Zellkultur und makroskopischer Auswertung in vivo (1) sowie zwischen Zellkultur und mikroskopischer Auswertung in vivo (2). Signifikanzniveau gegenüber $R = 0$: * $\alpha = 0,05$; ** $\alpha = 0,001$.

Testmaterialien	tau nach Goodman und Kruskal	
	(1)	(2)
alle Materialien	0,18*	0,27**
Zemente	0,40*	0,26**
Amalgame	0,37**	0,49**
Komposit-K.	0,28**	0,48**

Auch die Rang-Korrelationskoeffizienten (vgl. Tab. 4) sind mit Ausnahme der Komposit-Kunststoffe signifikant von 0 verschieden. Bei letzteren scheint die im Implantationstest niedrige Toxizität für die fehlende Signifikanz verantwortlich zu sein, da in diesem Fall schon geringste Abweichungen die Rangfolge ändern können. Eine Verbesserung des Korrelationskoeffizienten bei Verwendung der Rangfolgen anstelle der Originaldaten ist nicht offensichtlich.

Der verteilungsunabhängige *Goodmann-Kruskal-Test* (vgl. Tab. 5) ergibt erwartungsgemäß niedrigere Korrelationskoeffizienten, jedoch sind auch diese signifikant von 0 verschieden.

Inwieweit die zum Teil niedrigen Korrelationskoeffizienten sowie die großen Toleranzbereiche für die Regressionsgeraden auf eine unterschiedliche spezifische Empfindlichkeit der verwandten Gewebe bzw. Zellen oder auf jeweils unterschiedliche Konzentrationen der biologisch wirksamen Substanz am Rezeptor zurückzuführen sind, kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden. Unsere Ergebnisse erlauben keinen wertenden Vergleich zwischen den beiden Testmethoden.

Die vorliegenden Resultate lassen folgende Schlußfolgerungen zu:

1. Zwischen den verwandten In-vitro- und In-vivo-Methoden besteht ein statistisch nachweisbarer Zusammenhang.
2. Die Zellkulturmethode ist bei geringfügig toxischen Materialien empfindlicher als der Implantationstest am Kaninchen. Äußerst toxische Materialien rufen dagegen in vivo eine stärkere Reaktion hervor.
3. Die Toxizitätsangabe für einen Werkstoff muß in jedem Fall im Zusammenhang mit dem verwandten Testsystem gesehen werden.
4. Auf die biologische Reaktion im Kaninchen kann bei Materialien, die in der Zellkultur nicht oder sehr stark toxisch wirken, geschlossen werden. Da die Regressionsgeraden der einzelnen Materialgruppen unterschiedlich verlaufen, sind solche Voraussagen nur im Vergleich mit ähnlichen bekannten und getesteten Werkstoffen zulässig.
5. Ein genereller Ersatz des Implantationstests durch Zellkulturen muß zurückhaltend bewert

tet werden, eine Reduktion von Tierversuchen ist jedoch durch den gezielten Einsatz von In-vitro-Verfahren möglich.

6. Weitere experimentelle Daten und statistische Analysen sind erforderlich, um diese Folgerungen zu untermauern.

Summary

If animal experiments are to be replaced by cell cultures, the results obtained in both experimental setups must be equivalent. To check the equivalency, therefore, the results of the implantation test in rabbits and of the agar diffusion test were correlated for several dental materials. A statistical relationship was established between both variables. The correlation coefficients, however, were so low or the limits of tolerance for the regression vectors were so broad that a conclusion about the in vivo toxicity could be drawn only for those materials which had either a nontoxic or a highly toxic effect in vitro. The number of implantation tests therefore can be reduced by cell cultures, but these tests cannot be completely replaced.

Schrifttum

1. *Autian, J.*: The use of rabbit implants and tissue culture test for the evaluation of dental materials. *Int. dent. J.* 20, 481 (1970).
2. *Autian, J. and Dillingham, E. O.*: Overview of general toxicity testing with emphasis on special tissue culture tests. In: *Berky, J. and Sherrod, C.*: In vitro toxicity testing 1975–1976. The Franklin Institute Press, Philadelphia/USA, 1978, p. 21.
3. *Berry, K. J. and Mielke, P. W.*: Large sample confidence limits for Goodman and Kruskal's proportional prediction measure tau. – *Educ. and psych. Measurement* 36, 747 (1976).
4. *Diem, K. und Lentner, C.*: Wissenschaftliche Tabellen. Ciba-Geigy, Basel, 1971, p. 173–184.
5. *Michaelis, J.*: Medizinische Statistik und Informationsverarbeitung. – Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1980, p. 79.
6. *Schmalz, G.*: Die Gewebeverträglichkeit zahnärztlicher Materialien – Möglichkeiten einer standardisierten Prüfung in der Zellkultur. – Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1981, p. 11, 24, 32.
7. *Schmalz, G. und Schmalz, Ch.*: Toxicity testing on dental filling materials. – *Int. dent. J.* 31, 185 (1981).

Anschrift des Verfassers: Priv.-Doz. Dr. G. Schmalz, Osianderstr. 2–8, 7400 Tübingen.