

Primärkulturen von Ratten-Hepatozyten auf Microcarriern als metabolisierendes System in Toxizitätsprüfungen an Zellkulturen

Jens-Uwe Voß und Hasso Seibert
Institut für Toxikologie der Universität Kiel
Brunswiker Str. 10, D-2300 Kiel, Deutschland

Zusammenfassung

Die Toxizität vieler Chemikalien wird durch den Fremdstoffmetabolismus in der Leber verändert. Um Einflüsse der Metabolisierung von Substanzen auf ihre Zytotoxizität in vitro zu untersuchen, wurde ein System entwickelt, in dem auf kollagenbeschichteten Microcarriern angeheftete Ratten-Hepatozyten mit "monolayern" von BALB/c 3T3-Zellen kokultiviert werden. Mit diesem Kokultursystem wurden toxische Wirkungen dreier Modellsubstanzen - Cyclophosphamid, Allylalkohol und Ethylenglykol - untersucht. Die Zytotoxizität dieser Substanzen für 3T3-Zellen wird durch Kokultur mit Leberzellen erhöht. Die parallele Erfassung schädigender Wirkungen auf beide Zellarten in Kokulturen sowie auf Kulturen von 3T3-Zellen läßt dabei sowohl qualitative als auch quantitative Unterschiede in der Wirksamkeit der drei Modellsubstanzen erkennen. Die Ergebnisse zeigen, daß Kokulturen von Hepatozyten auf Microcarriern mit Zielzellen geeignet sein könnten, Einflüsse der Biotransformation auf die Toxizität von Fremdstoffen in vitro zu erfassen.

Summary: Primary cultures of rat hepatocytes on microcarriers as a metabolizing system in toxicity testing in cell cultures

The toxicity of many chemicals is modified by biotransformation reactions in the liver. To detect metabolism-mediated alterations of the cytotoxicity of chemicals in vitro, a coculture system consisting of rat hepatocytes on collagen-coated microcarriers and "monolayers" of BALB/c 3T3 cells was developed. This cocultivation system was used to study toxic effects of three model compounds, i.e. cyclophosphamide, allyl alcohol and ethylene glycol, respectively. Cytotoxicity to 3T3 cells for each compound increased in cocultures with hepatocytes. The parallel assessment of toxicity to both cell types in coculture and to cultures of 3T3 cells revealed qualitatively as well as quantitatively different toxic effects of these substances. The results indicate that cocultivation of microcarrier-attached hepatocytes with target cells could represent a valuable tool to study effects of biotransformation on the toxicity of xenobiotics in vitro.

Einleitung

Für die Prüfung der Zytotoxizität von Substanzen sind in den letzten Jahren zahlreiche in vitro-Testsysteme entwickelt worden. In vielen dieser Systeme werden Zelllinien eingesetzt, da sie in der Kultur über ein rasches und unbegrenztes Wachstums- und Teilungsvermögen verfügen. Toxische Wirkungen

können anhand einfach zu bestimmender Endpunkte wie z.B. Hemmung des Wachstums erfaßt werden. Ein wesentlicher Nachteil dieser Testsysteme besteht in der nur geringen Fähigkeit der meisten Zelllinien zur Metabolisierung von Fremdstoffen. Die biologische Wirksamkeit von Substanzen wird jedoch durch Art und Ausmaß ihrer Metabolisierung stark verändert (1, 12).

In vivo kommt der Leber wesentliche Bedeutung für den Fremdstoffmetabolismus zu, da die Hepatozyten über eine hohe Aktivität zahlreicher Enzyme des Fremdstoffmetabolismus verfügen, insbesondere der mikrosomalen P450-abhängigen Monooxygenasen. In der Leberzelle gebildete toxische Metabolite können abhängig von Reaktivität und zellulärem Angriffsort Schädigungen in der Leberzelle selbst oder in Zellen anderer Gewebe verursachen (9).

Um Auswirkungen der Metabolisierung von Fremdstoffen auf ihre biologische Wirkung in vitro untersuchen zu können, sind verschiedene experimentelle Ansätze entwickelt worden. Eine neuere Methode, die in der letzten Ausgabe dieser Zeitschrift beschrieben ist (7), basiert auf der gentechnischen Manipulation von Zelllinien mit dem Ziel, diese Zellen mit funktionsfähigen, definierten Enzymen des Fremdstoffmetabolismus auszustatten. Diese Methode ermöglicht in vitro-Untersuchungen zur Bedeutung spezifischer Monooxygenasen bei der Metabolisierung von Fremdstoffen, erscheint jedoch für ein Screening von Substanzen wegen der Vielzahl bekannter fremdstoffmetabolisierender Reaktionen problematisch.

Eine zunächst für in vitro-Prüfungen auf mutagene Wirkungen, nunmehr aber auch für Untersuchungen zur Zytotoxizität benutzte Methode ist die Zugabe von S9-Mix als metabolisierendes System zur Zellkultur. Dabei handelt es sich um das postmitochondriale Zentrifugat eines Leberhomogenats, in dem die Mikrosomen enthalten sind. In Anwesenheit von Kofaktoren können die mikrosomalen Monooxygenasen Fremdstoffe metabolisieren und Wirkungen toxischer Produkte an den Zellkulturen erfaßt werden. S9-Mix kann tiefgefroren längere Zeit gelagert werden, so daß mit einer Präparation zahlreiche Untersuchungen durchgeführt werden können. Die Verwendung von S9-Mix weist jedoch einige Nachteile auf. Andere Enzyme des Fremdstoffmetabolismus als P450-Monooxygenasen, die oftmals toxische Metabolite in inaktive Produkte umwandeln, sind im S9-Mix nicht vorhanden oder aufgrund fehlender Kofaktoren inaktiv. Darüber hinaus kann der S9-Mix selbst auf Zellen zytotoxisch wirken (4, 11).

Diese Nachteile können durch Verwendung intakter Zellen als metabolisierende Systeme umgangen werden. Dabei können zwei Typen von Zellen eingesetzt werden: (1) *Hepatomzellen*, d.h. aus Lebertumoren gewonnene, in Kultur unbegrenzt lebensfähige Zellen, oder (2) *isolierte Hepatozyten*, die sich in der Kultur nicht teilen und vermehren lassen.

Eine Reihe von Untersuchungen hat gezeigt, daß Hepatomzelllinien in Kultur leberzellenspezifische Funktionen aufweisen können. Einige ausgewählte Klone verfügen außerdem über eine verglichen mit anderen Zelllinien hohe Aktivität verschiedener mikrosomaler Monooxygenasen (18). Gegenüber den bisher genannten metabolisierenden Systemen bietet die Verwendung von Leberzellen in Kokultur mit Zielzellen eine Reihe von Vorteilen. Frisch isolierte Hepatozyten weisen ein breites, den Verhältnissen im intakten Organismus am nächsten kommendes Spektrum fremdstoffmetabolisierender Reaktionen auf. Suspensionen frisch isolierter Hepatozyten stellen ein leicht zu handhabendes experimentelles System dar; allerdings ist die Vitalität der Zellen auf einen Zeitraum von wenigen Stunden beschränkt. Die Primärkultur von Hepatozyten erfordert demgegenüber einen höheren experimentellen Aufwand, erlaubt aber eine Kultivierung über zumindest einige Tage. Obwohl viele Enzyme des Fremdstoffmetabolismus, besonders die mikrosomalen Monooxygenasen, in der Primärkultur eine rasche, enzymespezifische Aktivitätsabnahme aufweisen, haben zahlreiche Untersuchungen die Brauchbarkeit dieses Systems bei der Aufklärung toxischer Wirkmechanismen gezeigt (5). In Kokulturen können darüber hinaus unterschiedliche, möglicherweise selektive Wirkungen toxischer Metabolite auf zelluläre Funktionen von Hepatozyten und kokultivierten Zellen untersucht werden, die an Einzelkulturen oder bei Einsatz subzellulärer Aktivierungssysteme nicht erkannt werden können.

Primärkulturen von Leberzellen sind bisher nur in wenigen zytotoxikologischen Untersuchungen als metabolisierendes System verwendet worden. Eine von Walum entwickelte Methode der Rollkammerkokultur ist in dieser Reihe beschrieben worden (17). Ziel unserer Arbeiten ist es, Verfahren zu entwickeln, die es ermöglichen, primär kultivierte Leberzellen mit vertretbarem Aufwand als metabolisierendes System in Kokulturen mit unterschiedlichen Arten von Zielzellen einzusetzen. Die Kultivierung auf Microcarriern vereint die Vorteile der einfachen Handhabung von Zellsuspensionen mit denen herkömmlicher Kulturen von Leberzellen in Kulturschalen.

Im folgenden werden einige der Ergebnisse dargestellt, die an Kokulturen von Leberzellen auf Microcarriern mit BALB/c 3T3-Zellen, einer für zytotoxikologische Untersuchungen häufig eingesetzten Zelllinie, gewonnen wurden (15, 16).

Material und Methoden

Für die Zellkulturen wurden folgende Medien benutzt:

1. zur Anheftung der Leberzellen an die Microcarrier Kulturmedium Waymouth MB 752/1 mit Zusatz von 1 μ M Insulin, Penicillin (50 U/ml), Streptomycin (50 μ g/ml), 25 mM HEPES, 1 mM Natriumpyruvat, je 0,5 mM Alanin und Serin, 0,1 mM Asparagin sowie 10 % fetalem Kälberserum,
2. für die 3T3-Zellen sowie die Kokulturen beider Zellen Kulturmedium DMEM mit Zusatz von 10 mM HEPES, Gentamicin (100 μ g/ml) sowie 10 % fetalem Kälberserum.

Cytodex 3-Microcarrier wurden von Pharmacia oder Sigma bezogen. Diese Microcarrier bestehen aus einer Dextranmatrix mit kovalent an der Oberfläche gebundenem Kollagen. In gequollenem Zustand weisen die Microcarrier einen Durchmesser von ca. 150 μ m auf. Vor Versuchsbeginn wurden die Microcarrier mit Alkohol sterilisiert und in Kulturmedium für Leberzellen überführt.

	Hepatocyten	BALB/c 3T3-Zellen
t=0	Zellisolierung Anheftung auf Microcarrier (9×10^6 Zellen, 40 mg Cyt. 3, 12 ml Medium, 100 mm-Schalen)	Aussaat (6-wells) (45000 Zellen, 1.5 ml Medium)
t=4h	Waschen und Resuspendieren der Microcarrier mit Hepatocyten	
t=24h	Exposition von Kokulturen und Kontrollen	
t=48h		
	Best.: EOD-Aktivität LDH-Aktivität Zellprotein	(Mediumwechsel)
t=72h		Best.: Zellprotein

Abb. 1: Versuchsschema

Einen Überblick über den Versuchsablauf gibt die Abbildung 1.

Hepatozyten wurden durch Kollagenaseperfusion aus der Leber adulter Ratten gewonnen (2) und nach Einstellen der Zellkonzentration zusammen mit den Microcarriern inkubiert. Nach 4 h wurde das Medium erneuert und die Ansätze weitere 20 h inkubiert. Unter diesen Bedingungen hefteten sich in 24 h ca. 32 % der eingesetzten Hepatozyten an die Microcarrier an und bildeten eine einschichtige, die Oberfläche der Microcarrier teilweise bedeckende Lage abgeflachter Zellen. Nach Wechsel des Kulturmediums und 24 h Kokultur betrug die Anheftungsrate ca. 25 %. BALB/c 3T3-Zellen wurden aus Erhaltungskulturen durch Trypsinieren isoliert und Kulturen mit der angegebenen Zellkonzentration in 6-well Schalen (Costar) angelegt. 24 h nach Anlegen beider Kulturen

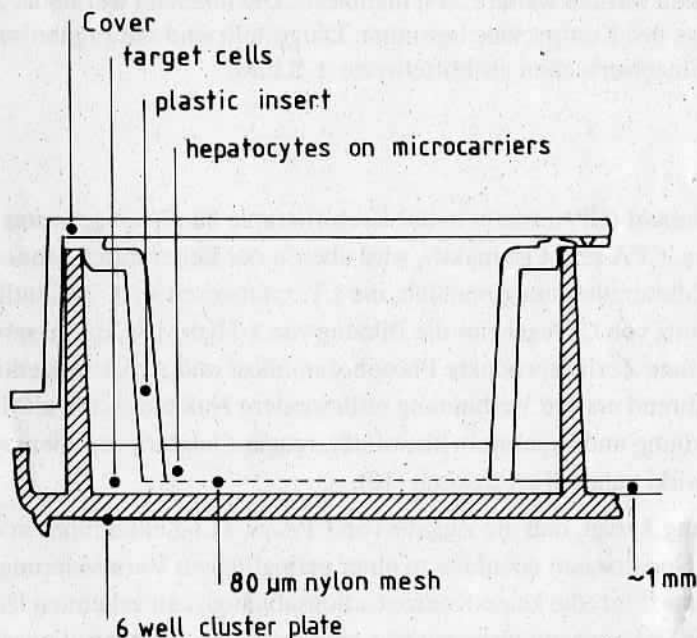


Abb. 2: Schematischer Querschnitt einer Kulturschale für Kokulturen von Hepatozyten auf Microcarriern und Zielzellen



wurden die Leberzellkulturen auf Microcarriern in Plastikeinsätze mit einem Nylonnetz (80 μm Maschenweite) als Boden pipettiert und diese in Kulturschalen mit 3T3-Zellen überführt (Abb. 2).

Nach Zugabe von 4,5 ml Medium mit den entsprechenden Konzentrationen der Testsubstanzen wurden die Kokulturen sowie 3T3-Zellen ohne Leberzellen als Kontrollen für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Einsätze entnommen und an den Leberzellen folgende Parameter erfaßt:

1. die Bildung von 7-Hydroxycumarin durch oxidative Deethylierung von 7-Ethoxycumarin (EOD-Aktivität) (2),
2. die Leberzellproteinmenge pro Ansatz,
3. die intrazelluläre Aktivität der Laktatdehydrogenase.

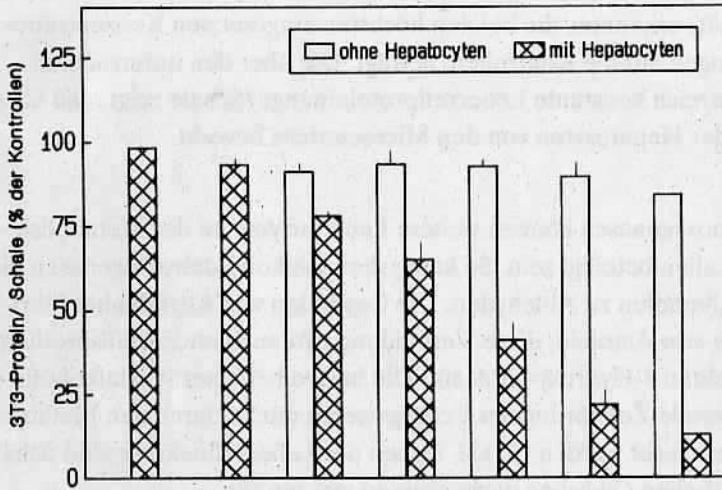
Die 3T3-Zellen wurden weitere 24 h inkubiert. Abschließend wurde die Zellproteinmenge pro Kulturschale bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von jeweils 3-5 Einzelversuchen als Mittelwerte $\pm$ S.E.M.

Ergebnisse

Cyclophosphamid (CPA) ist ein in der Krebstherapie häufig eingesetztes Zytostatikum. CPA selbst ist inaktiv, wird aber in der Leber durch Monooxygenasen zu Metaboliten umgewandelt, die z.T. zytotoxisch sind. Wesentlich für die Aktivierung von CPA scheint die Bildung von 4-Hydroxy-CPA zu sein, als dessen spontane Zerfallsprodukte Phosphoramidlost und Acrolein identifiziert wurden. Während erstere Verbindung insbesondere Nukleinsäuren alkyliert und daher Zellteilung und -wachstum beeinflußt, reagiert letztere vor allem mit Proteinen und wirkt generell zytotoxisch (10).

Die Abbildung 3 zeigt, daß die Zugabe von CPA zu 3T3-Zellkulturen in Abwesenheit von Hepatozyten allenfalls zu einer geringfügigen Verminderung des Zellwachstums führt, die keine Konzentrationsabhängigkeit erkennen läßt. In Kokultur mit Hepatozyten hingegen tritt eine deutliche, konzentrationsabhängige Verminderung der 3T3-Zellproteinmenge auf, wobei schon eine anfängliche CPA-Konzentration von 107.5 μM zu einer signifikanten Reduktion verglichen mit den Kontrollen führt.

3T3-Zellen



Hepatocyten

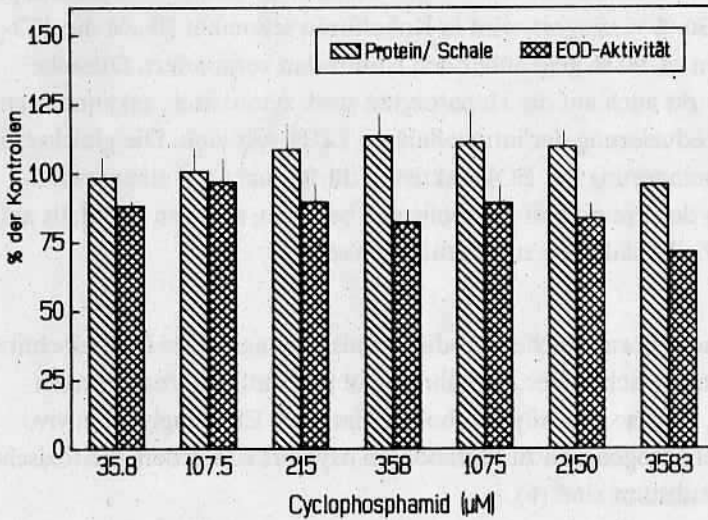


Abb. 3: Wirkung von Cyclophosphamid auf Kokulturen von BALB/c 3T3-Zellen und Rattenhepatocyten



Betrachtet man die Wirkung von CPA auf die Hepatozyten, so läßt sich zumindest in der Tendenz eine Hemmung des Fremdstoffmetabolismus (gemessen an der EOD-Aktivität) erkennen, die bei den höchsten eingesetzten Konzentrationen 20-30%, bezogen auf die Kontrollen, beträgt. Die über den untersuchten Konzentrationsbereich konstante Leberzellproteinmenge/Schale zeigt, daß CPA keine Ablösung der Hepatozyten von den Microcarriern bewirkt.

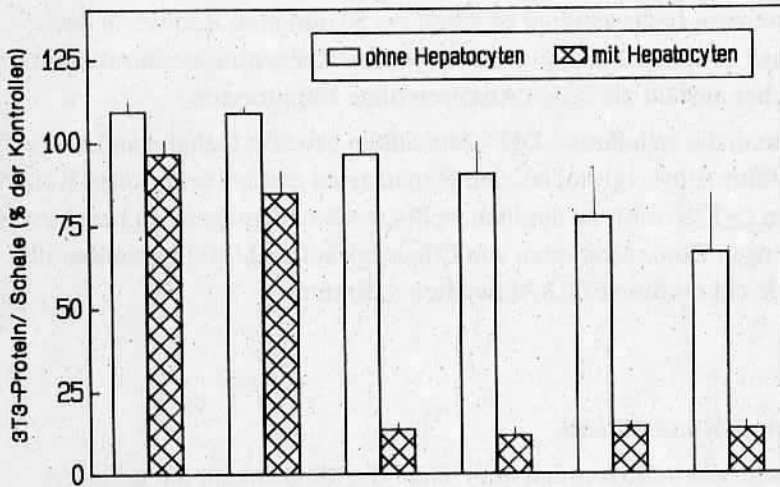
Neben den Monooxygenasen können weitere Leberenzyme an der Metabolisierung von Chemikalien beteiligt sein. So katalysieren Alkoholdehydrogenasen die Oxydation von Alkoholen zu Aldehyden. Die Oxydation von **Allylalkohol** führt dabei zur Bildung von Acrolein; diese Verbindung tritt auch als Zerfallsprodukt des CPA-Metaboliten 4-Hydroxy-CPA auf. Die in vivo bei einer Allylalkoholintoxikation auftretende Zerstörung des Lebergewebes dürfte durch den Metaboliten Acrolein verursacht werden (3, 13). Neben der Leberzellnekrose sind Schäden in extrahepatischen Geweben nachgewiesen worden (8).

In vitro führt Allylalkohol zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung des Wachstums von 3T3-Zellen (Abb. 4). Während jedoch in Abwesenheit von Leberzellen eine Konzentration von 500 μM den Gehalt an 3T3-Zellprotein pro Schale um etwa 30 % verringert, wird in Kokulturen schon bei 50 μM die 3T3-Proteinmenge um ca. 90 % gegenüber den Kontrollen vermindert. Dieselbe Konzentration wirkt auch auf die Hepatozyten stark zytotoxisch, erkennbar an der deutlichen Reduzierung der intrazellulären LDH-Aktivität. Die gleichzeitig auftretende Verminderung der EOD-Aktivität dürfte nicht auf einer spezifischen Hemmung des Fremdstoffmetabolismus beruhen, sondern ebenfalls auf die strukturelle Zellschädigung zurückzuführen sein.

Ethylenglykol findet in zahlreichen Produkten als Lösungs- oder Gefrierschutzmittel Verwendung. Nach oraler Aufnahme sind z.T. tödliche Vergiftungen aufgetreten (14). Ebenso wie Allylalkohol scheint auch Ethylenglykol in vivo durch Alkoholdehydrogenasen zu Metaboliten oxydiert zu werden, die toxischer als die Ausgangssubstanz sind (6).

Werden in dem hier beschriebenen experimentellen Ansatz 3T3-Zellen in Abwesenheit von Hepatozyten gegenüber Ethylenglykol exponiert, so wird der Gehalt an 3T3-Zellprotein vermindert, wozu allerdings sehr hohe Konzentrationen

3T3-Zellen



Hepatocyten

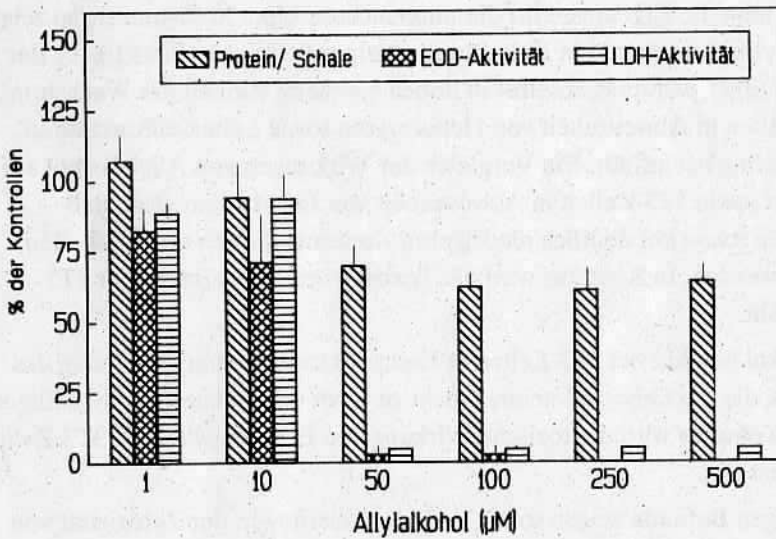


Abb. 4: Wirkung von Allylalkohol auf Kokulturen von BALB/c 3T3-Zellen und Rattenhepatocyten

nen (>500 mM) nötig sind (Abb. 5). Deutlich empfindlicher reagieren die 3T3-Zellen, wenn sie in Anwesenheit von Ratten-Hepatozyten mit Ethylenglykol behandelt werden. In diesem Fall ist schon bei 50 mM eine Reduktion der Proteinmenge zu verzeichnen, die mit steigenden Konzentrationen zunimmt und stets deutlicher ausfällt als in den Ansätzen ohne Hepatozyten.

Betrachtet man die zellulären LDH - Aktivitäten bzw. die Gehalte an Leberzellprotein, so führt Ethylenglykol bei den Hepatozyten erst bei sehr hohen Konzentrationen (≥ 1250 mM) zu deutlich meßbaren Schädigungen. Zu beachten ist, daß bei geringen Konzentrationen von Ethylenglykol im Mittel gegenüber den Kontrollen leicht erhöhte EOD-Aktivitäten auftreten.

Schlußfolgerungen und Ausblick

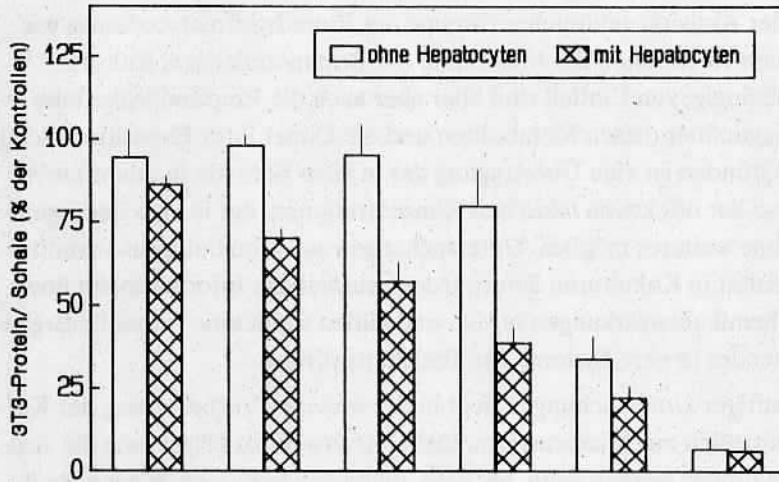
Das hier beschriebene Kokultursystem bietet die Möglichkeit, mit geringem technischen Aufwand eine große Zahl von Parallelinkubationen durchzuführen, hinreichend lange Expositionszeiten zu verwenden und Wirkungen einer Substanz auf Hepatozyten und Zielzellen getrennt zu erfassen.

Betrachtet man die Ergebnisse für die untersuchten Modellschubstanzen, so zeigt sich, daß Cyclophosphamid in Kokulturen zu einer deutlichen Schädigung der 3T3-Zellen führt, während es selbst in hohen Konzentrationen das Wachstum von 3T3-Zellen in Abwesenheit von Hepatozyten sowie Leberzellfunktionen allenfalls gering beeinflusst. Ein Vergleich der Wirkungen von Allylalkohol auf Leberzellen sowie 3T3-Zellen in Abwesenheit von Leberzellen zeigt, daß Hepatozyten schon bei deutlich niedrigeren Konzentrationen als 3T3-Zellen geschädigt werden. In Kokultur wird die Toxizität von Allylalkohol für 3T3-Zellen erhöht.

Ethylenglykol bewirkt bei 3T3-Zellen in Konzentrationen eine Hemmung des Wachstums, die bei Leberzellen noch nicht zu einer erkennbaren Zellschädigung führen. In Kokultur wird die toxische Wirkung von Ethylenglykol auf 3T3-Zellen deutlich verstärkt.

Die bisherigen Befunde zeigen somit, daß Veränderungen der Zytotoxizität von Chemikalien als Folge ihrer Metabolisierung *in vitro* an diesen Kokulturen erkannt und untersucht werden können. Das Ausmaß der beobachteten Verän-

3T3-Zellen



Hepatocyten

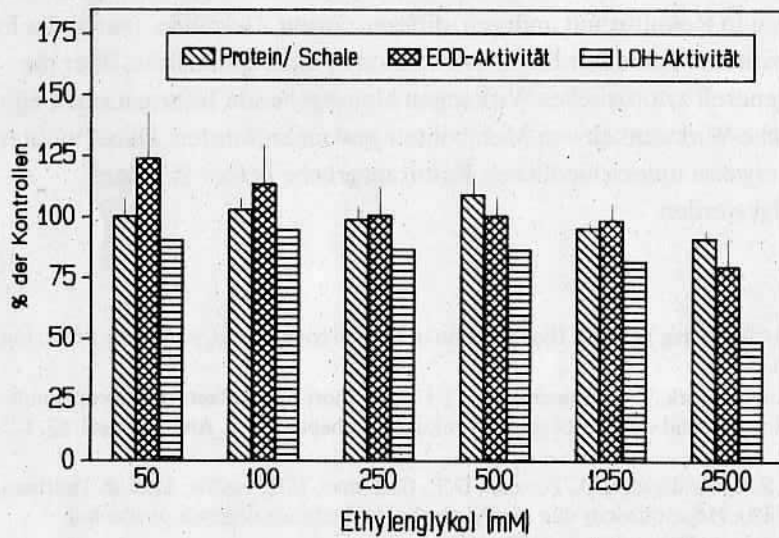


Abb. 5: Wirkung von Ethylenglykol auf Kokulturen von BALB/c 3T3-Zellen und Rattenhepatocyten



derung der Zytotoxizität wird im Einzelnen durch eine Reihe von Faktoren bestimmt. So sind z.B. die Menge und Konzentration reaktiver toxischer Metabolite von der Aktivität zahlreicher Enzyme des Fremdstoffmetabolismus wie von möglichen Reaktionen der Metabolite mit Bestandteilen des Kulturmediums abhängig; von Einfluß sind aber auch die Empfindlichkeit der Zielzellen gegenüber diesen Metaboliten und die Dauer ihrer Exposition. Schon aus diesen Gründen ist eine Übertragung der *in vitro* Befunde in quantitativer Hinsicht, also der effektiven toxischen Konzentrationen, auf *in vivo* Bedingungen nicht ohne weiteres möglich. Untersuchungen zur Metabolismus-vermittelten Zytotoxizität in Kokulturen liefern jedoch zusätzliche Informationen über mögliche Chemikalienwirkungen *in vivo* und bilden somit eine wertvolle Ergänzung bestehender *in vitro* Systeme zur Toxizitätsprüfung.

Ein Ziel künftiger Untersuchungen liegt in der weiteren Verbesserung der Kultur von Leberzellen auf Microcarriern. Dabei ist sowohl zu klären, wie die Anheftungsrate erhöht werden kann, als auch, unter welchen Bedingungen Reaktionen des Fremdstoffmetabolismus in diesen Kulturen auch bei längerer Kulturdauer auf einem höheren Niveau erhalten werden können.

Gegenstand weiterer Untersuchungen ist der Einsatz von Leberzellkulturen auf Microcarriern in Kokultur mit anderen, differenzierten Zielzellen. Durch die Erfassung spezifischer zellulärer Funktionen könnten dann zusätzliche, über die Erfassung generell zytotoxischer Wirkungen hinausgehende Informationen über die biologische Wirksamkeit von Metaboliten gewonnen werden. Dabei müßten die möglicherweise unterschiedlichen Kulturansprüche beider Zellarten berücksichtigt werden.

Literatur

1. Anders, M.W., (Hrsg.) (1985). Bioactivation of foreign compounds. Academic Press, Inc., Orlando.
2. Aschmann, C., Stork, T. & Wassermann, O. (1989). Short-term effects of chlorophenols on the function and viability of primary cultured rat hepatocytes. *Arch. Toxicol.* **63**, 121-126.
3. Belinsky, S.A., Bradford, B.U., Forman, D.T., Glassman, E.B., Felder, M.R. & Thurman, R.G. (1985). Hepatotoxicity due to allyl alcohol in deermice depends on alcohol dehydrogenase. *Hepatology* **5**, 1179-1182.
4. Benford, D.J., Reavy, H.J. & Hubbard, S.A. (1988). Metabolizing systems in cell culture cytotoxicity tests. *Xenobiotica* **18**, 649-656.

5. Boelsterli, U.A. & Suter, W. (1988). Anwendungen von Hepatozytenkulturen in der Toxikologie. *ALTEX (Alternat. Tierexp.)* **9**, 18-31.
6. Chou, J.Y. & Richardson, K.E. (1978). The effect of pyrazole on ethylene glycol toxicity and metabolism in the rat. *Tox. appl. Pharmacol.* **43**, 33-44.
7. Doehmer, J., Barrenschenn, M., Dogra, S., Edigkauer, M., Glatt, Hr., Oesch, F., Platt, K.L., Seidel, A & Wölfel, C. (1991). Die gentechnologische Konstruktion von V79 Chinesische Hamsterzellen zur stabilen Expression von Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen. *ALTEX (Alternat. Tierexp.)* **15**, 52-64.
8. Ferrali, M., Ciccoli, L., Signorini, C. & Comporti, M. (1990). Iron release and erythrocyte damage in allyl alcohol intoxication in mice. *Biochem. Pharmacol.* **40**, 1485-1490.
9. Fry, J.R. (1982). Activation systems in tissue culture toxicity studies. *Toxicology* **25**, 1-12.
10. Fry, J.R., Garle, M.J. & Hammond, A.H. (1990). Competing pathways in metabolism-mediated cytotoxicity in vitro. *Toxic. in Vitro* **4**, 467-473.
11. Lebsanft, J., MacMahon, J.B., Steinmann, J.J. & Shoemaker, R.H. (1989). A rapid in vitro method for the evaluation of potential antitumor drugs requiring metabolic activation by hepatic S9-enzymes. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 4477-4483.
12. Nelson, S.D. (1982). Metabolic activation and drug toxicity. *J. Med. Chem.* **25**, 753-765.
13. Reid, W.D. (1972) Mechanism of allyl alcohol-induced hepatic necrosis. *Experientia* **28**, 1058-1061.
14. Velvart, J. (1989). *Toxikologie der Haushaltsprodukte. 2. Auflage*, Verlag H. Huber, Bern.
15. Voß, J.-U. & Seibert, H. (1991) Microcarrier-attached rat hepatocytes as a xenobiotic-metabolizing system in cocultures. *Cell Biol. Toxicol.* **7**(4), 1991, in Druck.
16. Voß, J.-U. & Seibert, H. (1992) Toxicity of glycols and allyl alcohol evaluated by means of cultures of microcarrier-attached rat hepatocytes and BALB/c 3T3 cells. *ATLA*, zur Veröffentlichung eingereicht.
17. Walum, E. (1989). Rollkammer-Technik für Zellkulturen in der Toxikologie. *ALTEX (Alternat. Tierexp.)* **10**, 12-28.
18. Wiebel, F.J. & Röscher, E. (1988). Enzyme des Fremdstoffmetabolismus in permanenten Zellkulturen bei der in vitro Toxizitätsprüfung. *ALTEX (Alternat. Tierexp.)* **9**, 33-44.

