

Uporaba celičnih kultur parenhimskih jetrnih celic (hepatocitov) pri razvoju novih zdravil

The use of primary hepatocyte cultures in drug discovery and development

Tina Batista Napotnik, Irena Mlinarič-Raščan

POVZETEK: Celične kulture jetrnih celic (hepatocitov) uporabljamo v predkliničnih študijah novih zdravilnih učinkovin kot vmesni člen med biokemičnimi in *in vivo* poskusi. *In vitro* modeli so enostavni, dajo hitre rezultate v strogo nadzorovanih pogojih, omogočajo dobro ponovljivost in lahko kvantifikacijo. Tako dobimo številne informacije o molekularnem mehanizmu, biotransformaciji, farmakokinetiki in toksičnosti preiskovanih snovi ter zmanjšamo število žrtvovanih živali in prostovoljcev v kliničnih testiranjih. Z uporabo primarnih človeških hepatocitov lahko ugotavljamo tudi dejavnike starosti, spola in okolja ter individualne razlike v odzivanju na učinkovine. Ker so primarni človeški hepatociti težko dostopni, celice različnih darovalcev shranjujemo z zamrzovanjem. Hepatocitne celične linije imajo sposobnost delitve celic in so tako na voljo v neomejenem številu, vendar pa so fenotipske lastnosti slabše izražene kot v primarnih hepatocitih, zato je treba biti pazljiv pri interpretaciji rezultatov.

KLJUČNE BESEDE: jetra, hepatocit, celična kultura, celična linija, predklinične študije

ABSTRACT: Cultured hepatocytes are used in preclinical studies of drugs as a link between biochemical and *in vivo* assays. The *in vitro* models are simple, with quick acquisition of data in a highly controlled environment. The data can easily be quantified and reproduced. Primary hepatic cultures are suitable for investigating molecular mechanisms, the biotransformation, the pharmacokinetics and the toxicity of novel compounds, therefore the number of laboratory animals and volunteers in clinical trials can be reduced. Primary human hepatocytes are used to study the effects of age, sex and environment factors, and the interindividual variability in response to drugs. Human hepatocytes are very scarce thus the cells derived from the different donors are cryopreserved. Hepatic cell lines are immortalized and therefore available at a large number of cells, but the expression of hepatic functions is lower than in primary hepatocytes so the prediction to *in vivo* data is always prone to some degree of uncertainty.

KEY WORDS: liver, hepatocyte, cell culture, cell line, preclinical studies

1 Uvod

Odkrivanje in optimizacija novih zdravilnih učinkovin zahteva hitre in ponovljive teste. V predkliničnih študijah se je tako pojavila nova stopnja testiranja – uporaba *in vitro* modelov (1).

Biotransformacija ksenobiotikov ima posledično terapevtske ali pa toksične učinke. Proces biotransformacije sicer poteka v različnih tkivih, vendar so jetra najaktivnejši organ pri določanju usode ksenobiotikov. Z razvojem metod izolacije in kultivacije parenhimskih jetrnih celic (hepatocitov) je mogoče v strogo nadzorovanih *in vitro* pogojih ugotavljati mehanizme učinkovanja in biotransformacije snovi na celičnem in molekularnem nivoju (2).

Med *in vitro* modele jeter štejemo očiščene jetrne frakcije in enoenimske sisteme, izolirane jetrne celice in hepatocitne celične kulture, jetrne rezine, pretočne sisteme celotnih izoliranih jeter in računalniške modele. Prednosti in slabosti *in vitro* modelov jeter so zbrane v preglednici 1. Najpogosteje uporabljamo izolirane in kultivirane hepatocite (1, 3, 4), ki delujejo kot vmesni člen med biokemičnimi in *in vivo* poskusi. Čeprav *in vitro* modeli ne morejo v celoti nadomestiti *in vivo* poskusov, imajo pred njimi številne prednosti. Modele hitro postavimo, mogoče jih je avtomatizirati, dajo hitre rezultate, pogoje lahko strogo nadzorujemo, omogočajo dobro ponovljivost in lahko kvantifikacijo, so ekonomični. Izločimo tudi živčne dejavnike ter

dejavnike krvnega obtoka. Tako dobimo številne koristne informacije o delovanju, biotransformaciji, farmakokinetiki in toksičnosti preiskovanih snovi. Zmanjšamo tudi število žrtvovanih živali in prostovoljcev v kliničnih testiranjih ter lažje določimo primerno živalsko vrsto za *in vivo* testiranja. Vse to pa omogoči racionaliziracijo in pospešitev selekcije testiranih potencialnih farmakoloških molekul (1, 3, 4).

2 Primarni hepatociti

2.1 Izolirani hepatociti

V 50. in 60. letih prejšnjega stoletja, v času bliskovitega razvoja celičnih kultur, so poskušali izolirati tudi glodalske jetrne celice in sicer z mehanskim delovanjem na jetrno tkivo. Metode so bile neuspešne, ker so hepatociti v tkivu trdno speti s stičnimi kompleksi (5). Šele encimatske tehnike so dale vzpodbudne rezultate: z *in situ* perfuzijo jeter z raztopino kolagenaze so učinkovito izolirali tudi do 50 % celic podganjih jeter (6). Metodo so kasneje izpopolnjevali in danes izoliramo hepatocite z dvostopenjsko *in situ* perfuzijo jeter: jetra najprej perfundiramo s pufrom, ki vsebuje kelator EGTA, ki odstrani kalcijeve ione in tako razbije od kalcija odvisne medcelične povezave in sicer poruši strukturo kadherinov. Sledi perfuzija z raztopino kolagenaze, ki razgradi zunajcelični matriks v nekaj minutah (7). Metoda je bila prirejena tudi za druge živali pa tudi za človeka (8, 9, 10).

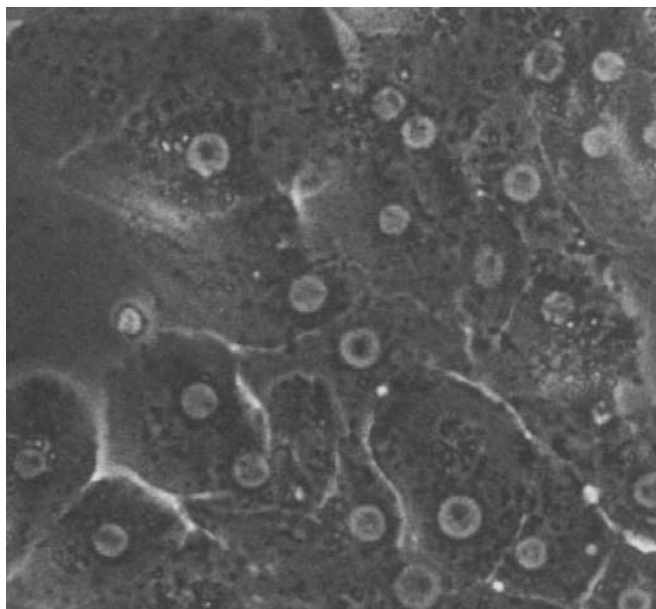
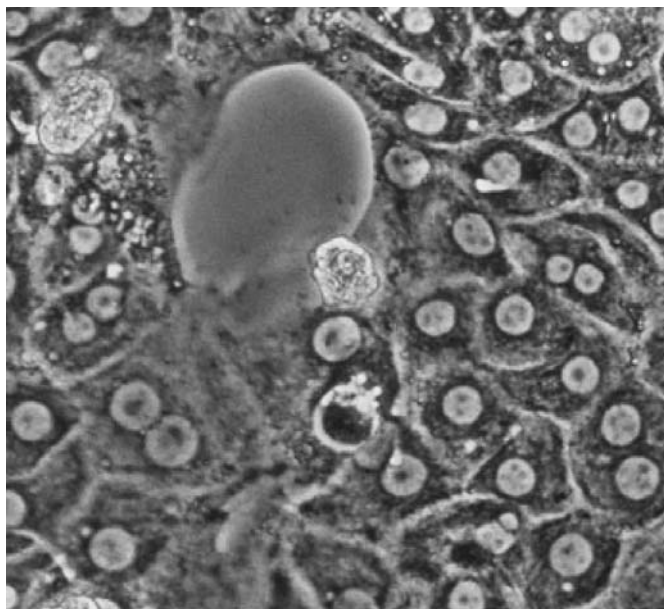
Izolirani hepatociti v suspenziji obdržijo večino metabolnih funkcij, sistem je tehnično nezahteven in omogoča dostop preiskovanih molekul do vseh celic. Slabost modela je kratkotrajna uporaba, saj celice lahko uporabljamo za preiskave le 2-4 ure, nato prične aktivnost jetrnih encimov in viabilnost celic močno upadati (3, 4).

2.2 Primarna kultura jetrnih celic

Za daljše raziskave moramo hepatocite gojiti v celični kulturi. S centrifugiranjem pri nizkem številu obratov (50 g) odstranimo neparenhimatske celice (endotelne, Kupfferjeve, stelatne celice in celice NK), v suspenziji ostanejo le hepatociti, ki vršijo veliko večino jetrnih funkcij (11). Hepatociti rastejo pritrjeni na podlago v posodicah, prevlečenih s kolagenom, v gojišču William's z 10 % telečjega seruma pri 37 °C in 5 % CO₂/95 % zraka (6). Celice po nasaditvi v posodice potrebujejo nekaj časa, da si opomorejo od šoka zaradi izolacije, zato pričnemo s poskusi najmanj 24 ur po nasaditvi (12). Celice se v kulturi ne delijo, zato jih nasadimo v visoki koncentraciji, da dosežejo konfluentnost – se staknejo med seboj (3) (slika 1).

Celice v kulturi zadržijo veliko večino jetrnih funkcij, kot jih vršijo *in vivo*: presnavljajo ogljikove hidrate, sečnino, lipide, žolčne kisline, sintetizirajo plazemske proteine, se odzivajo na hormone in vršijo biotransformacijo oziroma razstrupljanje snovi z encimi I. in II. stopnje in so zato primeren model za raziskave številnih bioloških učinkovin (2). Tako lahko ugotovljamo mehanizme delovanja preiskovanih snovi v različnih koncentracijah (3). Ker so kulture enostavnejši sistem od organizmov, lažje preučujemo interakcije med zdravili (13, 14).

Encimi biotransformacije v kultiviranih jetrnih celicah so aktivni, zato lahko z njimi ugotovljamo presnovo potencialnih zdravil (3, 15). To je za razvoj učinkovine zelo pomembna stopnja, saj presnova učinkovine vpliva na očistek in odstranjevanje zdravila iz telesa, klinično učinkovitost, individualne farmakokinetične razlike, različno koncentracijo na tarčnem mestu in toksičnost zdravila (2). Ugotovili so, da se večina snovi v kulturi podobno presnavlja kot *in vivo* – glavne presnovke najdemo v obeh sistemih, pogoste pa so razlike v



Slika 1: Fazno-kontrastna mikrofografija primarnih hepatocitov v kulturi. Levo: podganji hepatociti, desno: človeški hepatociti. 200-kratna povečava, merilo: 25 µm (35).

Figure 1: Phase-contrast micrograph of primary cultured hepatocytes. Left: rat hepatocytes, right: human hepatocytes. 200x magnification, bar: 25 µm (35).

Uporaba celičnih kultur parenhimskih jetrnih celic (hepatocitov) pri razvoju novih zdravil

Preglednica 1: In vitro modeli jeter, njihove prednosti in slabosti. Povzeto po: 1, 3, 4.

Table 1: In vitro liver models, their advantages and disadvantages. Summarized from: 1, 3, 4.

Model	Prednosti	Slabosti
Celične frakcije (mikrosomi, mitohondriji) in enoenzimski sistemi	Molekularni mehanizmi, izolirani encimski sistemi	Odsotnost citosolnih encimov, kratkotrajnost
Izolirane jetrne celice v suspenziji	Funkcije podobne <i>in vivo</i> celicam, tehnično nezahteven, lahka dostopnost preiskovanih molekul do vseh celic, možnost krioprezerviranja, medvrstne raziskave	Kratkotrajnost (2-4 ure), ni žolčnih kanalčkov
Primarne kulture hepatocitov	Funkcije ohranjene več dni, raziskava procesov biotransformacije, medvrstne raziskave	Pod standardnimi pogoji omejeno trajanje (nekaj dni), fenotipične spremembe, ni celičnih delitev
Hepatične celične linije	Neomejeno število (nesmrtno – se delijo), številne jetrne funkcije ohranjene	Jetrne funkcije manj izražene kot v normalnih hepatocitih, nekatere celo odsotne
Jetrne rezine	Ohranjena lobularna struktura, dostopni humani vzorci	Kratkotrajnost (do 10 ur), celice niso enakomerno funkcionalne, zbiranje žolča ni mogoče
Pretočni sistemi celotnih izoliranih jeter	Podobno <i>in vivo</i> stanju, 3D struktura, funkcionalni žolčni kanalčki, mogoče zbiranje žolča, kinetične študije	Tehnično zahteven model, kratkotrajnost (nekaj ur), preiskovanje več snovi ni možno, človeški organi niso dostopni
Računalniški modeli	zmanjšamo število prostovoljcev in poskusnih živali	Ne moremo predvideti vseh okoliščin poskusa

količini posameznih produktov (13, 14, 17). Podobno kot *in vivo* lahko tudi v kulturi z induktorji in inhibitorji spreminjamo aktivnost citokromov P450. Tako ugotavljamo, kako preiskovane snovi vplivajo na presnovo drugih ksenobiotikov (15, 16). V kultiviranih hepatocitih se ohranijo tudi encimi II. stopnje biotransformacije, ki vršijo konjugacijo različnih skupin na izhodne produkte redoks reakcij I. stopnje biotransformacije (2).

Problem potencialnih zdravil so običajno nepredvideni stranski učinki, ki so toksični za različna tkiva in organe. Najpogostejša tarča so običajno jetra, saj hepatotoksičnost velikokrat povzročijo produkti biotransformacije (1, 3). Biotransformacija je običajno detoksifikacijski proces, včasih pa presnovki zdravil postanejo bolj toksični kot osnovna učinkovina, npr. številni intermedijati so elektrofilni in nepovratno alkilirajo celične makromolekule, kar vodi v poškodbe tkiva (1, 2). S pomočjo različnih kvalitativnih in kvantitativnih metod lahko s hepatocitnimi kulturami ugotavljamo toksične vplive preiskovanih snovi na delovanje jetrnih celic (sintezo DNA in proteinov, na homeostazo kalcija, znotrajcelični K^+ , vsebnost ATP in AMP, nivo glutationa, glukoneogenezo, ureagenezo, sintezo holesterola in lipoproteinov, sintezo in sekrecijo albumina, serumske encime, transport konjugiranih žolčnih kislin in bilirubina, membranski transport, iztekanje citosolnih encimov ob poškodbi membrane), spremembe morfologije celic (na citoskelet, celični volumen, celično membrano), genotoksičnost (poškodbe DNA, formacija adduktov z DNA, spremembe popravljanih mehanizmov), celično smrt (nekrozo, apoptozo) (1, 3). Kulture so tudi zelo uporabne za določanje kemoprotektivnih sredstev, ki jetra oziroma organizem zaščitijo pred škodljivimi vplivi učinkovin (16).

Kot vse metode imajo tudi primarne kulture jetrnih celic svoje slabosti. Največja je ta, da izražanje specifičnih jetrnih funkcij s časom upada, kar vodi v fenotipske spremembe hepatocitov in v dediferenciacijo (3). Tudi aktivnosti encimov družine citokromov P450 (CYP450) v primarnih hepatocitih s časom upadajo. Vzrok je v zmanjšanem prepisu CYP mRNA, zato je v celicah vse manj encimov in celotna CYP450 aktivnost v celici upade (2, 15).

Na ohranjanje specifičnih jetrnih funkcij vplivajo štiri skupine dejavnikov: topni dejavniki gojišča, zunajcelični matriks, interakcije med celicami in dejavniki replikacije (2). S spreminjanjem teh dejavnikov so razvili tehnike gojenja hepatocitov, ki vzdržujejo funkcionalnost dlje časa. Zelo uspešno je gojenje hepatocitov v kokulturi, torej skupaj z drugo vrsto celic, npr. linijskimi epitelnimi, strelatnimi in drugimi neparenhimskimi jetrnimi ter celo nehepatičnimi celicami (18). Te celice sproščajo v kulturo snovi, ki omogočijo okolje, ki bolje posnema pogoje *in vivo*, zato hepatociti aktivneje vršijo specifične funkcije. Drugi način je tridimenzionalna kultura v obliki kolagenskega sendviča ali sferoidov, ki lahko vsebujejo tudi druge celice. V teh kulturah hepatociti zadržijo tridimenzionalno kuboidno obliko, kar vpliva tudi na izražanje jetrnih funkcij (19). Med celicami nastanejo celo žolčni kanalčki (12).

2.3 Primarna kultura človeških jetrnih celic

Najpogosteje uporabljamo podganje hepatocite, saj je njihova izolacija in kultivacija najlažje izvedljiva in podganja jetra so relativno lahko dostopna. Napovedovanje učinkov biološko aktivnih snovi na človeka na osnovi raziskav na poskusnih živali pa je zaradi medvrstnih razlik vedno pod-

vrženo določenemu tveganju. Zato so za preučevanje potencialnih zdravilnih učinkovin primernejši hepatociti humanega izvora. Pridobimo jih lahko s perfuzijo celih ali dela jeter darovalcev organov, iz ostankov terapevtskih hepatektomij ali manjših kirurških biopsij (2). Perfuzija je prav tako dvostopenjska, uporabljamo kolagenazo, lahko pa tudi druge encime (npr. dispazo, liberazo), metode pa so precej uspešne, saj je viabilnost celic nad 85 % (2) (slika 1).

Tudi človeški hepatociti v kulturi zadržijo večino jetrnih funkcij. So celo bolj stabilni kot glodalski, saj svojo diferenciranost ohranjajo dlje časa (nekaj tednov) (17). Za daljšo funkcionalnost pa jih moramo tako kot živalske gojiti v ko-kulturah ali tridimenzionalnih kulturah (19).

Primarni človeški hepatociti veljajo danes za zlati standard preučevanja metabolizma človeških jeter. Primerni so za raziskave biotransformacije zdravil (prek CYP450 in encimov II. stopnje), saj obstaja dobra povezava metabolizma *in vitro*/*in vivo* (13, 17). Ksenobiotiki se v človeških jetrih v I. stopnji biotransformacije pretvarjajo predvsem s citokromom P450 3A4, pa tudi z 1A2, 2A6, 2B6, 2C, 2D6 in 2E1, ti pa so v kultiviranih celicah dobro izraženi (2). Njihova aktivnost tudi v človeških hepatocitih upada s časom. Nekateri CYP450 encimi (CYP3A4, CYP2C9 in CYP 2D6) po 72-96 urah kulture aktivnost obnovijo, drugi (CYP1A2, CYP2E1) pa ne (2). To je tudi razlog, da imajo transformirane spojine podobne metabolne profile kot *in vivo*, razlikujejo pa se kvantitativno (13, 14, 17). Drugi razlog za kvantitativne razlike je sistemski: *in vivo* se učinkovina lahko slabo absorbira ali pa se veže na molekule v drugih tkivih, torej ne doseže jeter v tolikšni koncentraciji kot jetrne celice v kulturi (20).

Primarne človeške hepatocite v kulturi uporabljamo tudi za študije molekularnih mehanizmov, toksičnosti, biokinetike in interakcije med zdravili. Ugotavljamo lahko dejavnike starosti, spola in okolja (13, 14). Pomembni so pri ugotavljanju individualnih razlik v odzivanju na učinkovine, saj obstaja veliko genetskih polimorfizmov genov, ki se izražajo v jetrih (21, 22). Največje razlike so opazne v družini citokromov P450, kar lahko precej vpliva na presnovo snovi in tako na potek zdravljenja (13, 22). Preučujemo lahko tudi idiosinkratično (nenačrtovano) hepatotoksičnost, pri kateri so prizadeti le redki posamezniki, verjetno pa je povezana z neobičajno presnovo ali imunoalergijskim fenomenom (3, 23).

V metabolizmu vsake snovi lahko obstajajo kvalitativne ali kvantitativne razlike med živalskimi vrstami in človekom. S primerjavo učinkov na celice različnega izvora lahko določimo živalski model, ki bo deloval podobno kot človeške celice, torej je najprimernejši za nadaljnje raziskave (13).

2.4 Zamrzovanje hepatocitov

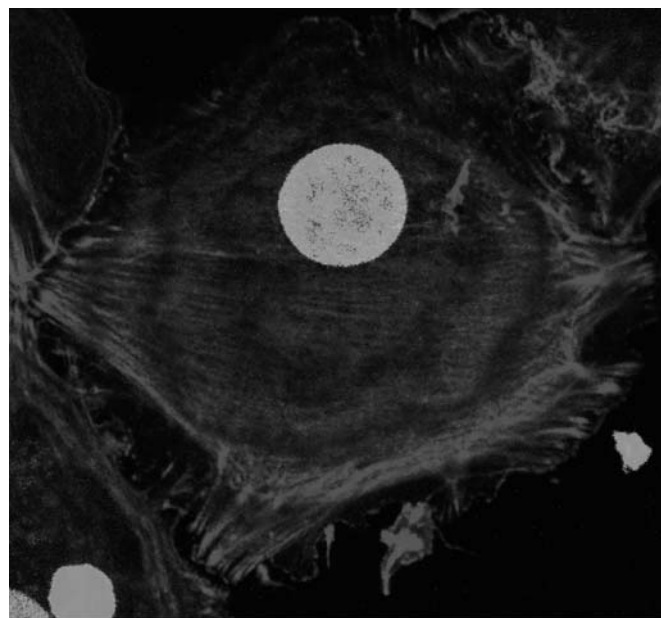
Največji problem pri vzpostavitvi primarne kulture človeških hepatocitov je legalna in etična omejenost dostopa do človeških celic. Potrebna je tudi vsakokratna izolacija svežih celic, ker je kultura kratkotrajna in se celice v njej ne delijo. Pri vsaki izolaciji dobimo veliko število celic, ki jih običajno sproti ne moremo porabiti, zato je priporočljivo celice shraniti. Z metodo zamrzovanja je to možno. Kritični elementi za uspešno zamrzovanje hepatocitov so protokol zamrzovanja, izbira krioprotektivnega sredstva in odstranitev mrtvih celic po odmrzovanju. Izolirane hepatocite v suspenziji moramo zamrzniti v krioprotektivnem sredstvu, običajno je to 10 % DMSO, z nadzorovano hitrostjo zamrzovanja (-1,9 °C/min od +4 do -30 °C ter -30 °C/min od -30 °C do -150 °C) (8, 9). Celice nato prenesemo v tekoči dušik, kjer jih lahko obdržimo tudi več let. Odmrzovanje pa mora potekati čim hitreje, v vodni kopeli na 37 °C, hitro tudi odstranimo DMSO (8, 9).

Proces zamrzovanja in odtajanja celic sicer zmanjša njihovo viabilnost, predvsem zaradi poškodb celične membrane, vpliva na membranski transport in sintezo proteinov (24). Vendar pa so z izboljševanjem metode dosegli, da po odmrzovanju celice vršijo svoje funkcije skoraj v enaki meri kot sveže izolirane (25). Torej je zamrzovanje priporočljivo za vzpostavljanje banke hepatocitov, izoliranih iz različnih pacientov ali živalskih vrst, ki so primerni za raziskave. To nam omogoča ugotavljati individualne razlike v enem samem poskusu.

3 Celične linije

Alternativa težko dostopnim primarnim hepatocitom so jetrne celične linije. Njihova prednost je v tem, da se delijo in so zato na voljo v neomejenem številu. Hepatocitne linije so pridobili na več načinov: 1.) iz primarnih tumorjev jeter [humani liniji Hep G2 (26) in Mz-Hep-1 (27), podganja H4IIE (28)], 2.) SV40-transformirani normalni primarni hepatociti [humani liniji THLE-2 in THLE-3 (29)], 3.) iz embrionalnih jetrnih celic [mišja linija BNL CL.2 (30)], 4.) iz TGF- α transgenih miši [linija AML12 (31)] in 5.) s fuzijo dveh različnih tipov celic [hibrid fibroblastov in hepatomskih celic WIF12-1 (32)].

Slabost hepatocitnih linij je v tem, da so fenotipske lastnosti jetrnih celic slabše izražene, zato se lahko na ksenobiotike odzivajo drugače kot primarni hepatociti. V raziskavah največkrat uporabljamo linijo Hep G2, ki izvira iz hepatocelularnega karcinoma (26). To je precej



Slika 2: Laserska konfokalna fluorescenčna mikrografija primarnega človeškega hepatocita, 3 ure po dodatku 50 nM mikrocinista-LR. Aktinski filamenti (rdeče) začenejajo potovati proti središču celice, jedro se krči. Aktinski filamenti so označeni z rodamin faloidinom (rdeče), jedro pa s Sytox Green (zeleno). Merilo: 5 μ m (34, 35).

Figure 2: Laser-scanning confocal fluorescent micrograph of primary human hepatocyte, the cells were treated with 50 nM microcystin-LR for 3 hours. Actin filaments (shown in red) start to move towards the center of the cell, the nucleus condense. Actin filaments are stained with rhodamine-phalloidin (red) and nuclei with Sytox Green (green). Bar: 5 μ m (34, 35).

stabilna celična linija, ki izraža 96 % genov primarnih hepatocitov in vrši številne jetrne funkcije (23, 26).

Vrši tudi številne procese biotransformacije I in II stopnje, vendar v manjši meri kot primarni hepatociti (23). Aktivnost citokromov P450 v celicah je precej nižja kot v primarnih, CYP 2E1 je celo nezaznaven. Vzrok je manjše prepisovanje mRNA, kar je posledica nižjega nivoja transkripcijskih faktorjev v hepatičnih linijah (15). Zaradi odsotnosti CYP 2E1 in alkoholdehidrogenaze je linija Hep G2 odporna proti citotoksičnim in lipogenim učinkom etanola (23). Celice Hep G2 so idealen model za študije mitohondrijske toksičnosti zaradi velikega števila mitohondrijev in mitohondrijske DNA (33).

Hepatične linije uporabljajo v številnih študijah, vendar se moramo ves čas zavedati, da drugačne aktivnosti encimov v linijah lahko privedejo do razlik v odgovoru na preiskovano učinkovino, zato je potrebna pazljivost pri interpretaciji rezultatov (23).

4 Primer uporabe hepatocitov v toksikologiji

Primarni hepatociti v kulturi so zelo primerni za študij toksičnih vplivov na celičnem in biokemičnem nivoju. Primer uporabe je ugotavljanje učinkov mikrocistinov (cianobakterijskih hepatotoksinov) na obliko celic, citoskelet in jedra, sprožanje apoptoze in aktivnost citokroma P450 1A. Ugotovili smo, da mikrocistini v primarnih podganjih in človeških hepatocitih povzročajo skrdčenje in brstenje celic, prerazporeditev aktinskih filamentov v središče celice, kar je posledica sprožitve apoptoze. Uporabljali smo laserski konfokalni mikroskop, kjer smo opazovali fluorescenčno označene hepatocite (slika 2). Pri tem se aktivirajo kaspaze, vendar je vzorec aktivacije kaspaz pri podganjih in človeških hepatocitih drugačen. Človeški hepatociti so tudi bolj občutljivi na delovanje mikrocistinov, kar moramo upoštevati pri napovedovanju rezultatov z živalskih modelov na človeka. Uporaba hepatocitov več pacientov pa nam je omogočila ugotavljanje razlik med posamezniki (34, 35).

5 Zaključek

Celične kulture ne morejo nadomestiti raziskav na živalih in prstovoljcih, dajo pa nam veliko koristnih informacij o presnovi zdravil na celičnem in molekularnem nivoju. Z uporabo kultur v predkliničnih študijah delujemo etično, saj zmanjšamo število poskusnih živali in prstovoljcev v kliničnih poskusih, in gospodarno, ker zmanjšamo število napačnih odločitev v razvoju zdravil. Za doseganje čim boljših rezultatov pa bo še naprej potrebno izboljševati hepatocitne kulture, predvsem v smeri čim boljšega posnemanja *in vivo* celice, ter razviti hepatično celično linijo z visoko izraženimi jetrnimi funkcijami.

6 Zahvala

Delo s primarnimi podganjami in človeškimi hepatociti je bilo opravljeno na Inštitutu za patološko fiziologijo Medicinske fakultete v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Dušana Šuputa, ter v laboratoriju INSERM v Antibesu v Franciji pod mentorstvom prof. dr. Rogerja Rahmanija. Obema se iskreno zahvaljujem.

7 Literatura

1. Davila JC, Rodriguez RJ, Melchert RB et al. Predictive value of *in vitro* model systems in toxicology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38: 63-96.
2. Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Castell JV et al. Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Curr Drug Metab* 2003; 4: 292-312.
3. Guillouzo A, Morel F, Langouët S et al. Use of hepatocyte cultures for the study of hepatotoxic compounds. *J Hepatol* 1997; 26: 73-80.
4. Cross DM, Bayliss MK. A commentary on the use of hepatocytes in drug metabolism studies during drug discovery and development. *Drug Metab Rev* 2000; 32: 219-240.
5. Berry MN, Simpson FO. Fine structure of cells isolated from adult mouse liver. *J Biol Chem* 1962; 15: 9.
6. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J Cell Biol* 1969; 43: 506-520.
7. Williams GM, Bermudez E, Scaramuzzino D. Rat hepatocyte primary cell cultures III: Improved dissociation and attachment techniques and the enhancement of survival by culture medium. *In Vitro* 1977; 13: 809-817.
8. de Sousa G, Dou M, Barbe D et al. Freshly isolated or cryopreserved human hepatocytes in primary culture: Influence of drug metabolism on hepatotoxicity. *Toxic in Vitro* 1991; 5: 483-486.
9. Dou M, de Sousa G, Lacarelle B et al. Thawed human hepatocytes in primary culture. *Cryobiology* 1992; 29: 454-469.
10. Freshney RI. *Liver. In: Culture of animal cells. A manual of basic technique*, 4th ed. New York: Chichester-Weinheim-Brisbane-Singapore-Toronto: Wiley-Liss, 2000: 357-358.
11. Quistorff B, Dich J, Grunnet N. Preparation of isolated rat liver hepatocytes. In: Pollard JW, Walker JM. *Animal cell culture*. Clifton, New Jersey: Humana press, 1990; 151-160.
12. Puviani AC, Ottolenghi C, Tassinari B et al. An update on high-yield hepatocyte isolation methods and on the potential use of isolated liver cells. *Comp Biochem Physiol, Part A* 1998; 121: 99-109.
13. Rahmani R, de Sousa G, Marre F et al. Potential of freshly isolated and cryopreserved human hepatocytes in drug research and development. In: Rogiers V, Sonck W, Shepherd E et al. *Human cells in *in vitro* pharmacotoxicology. Present status within Europe*. Brussel: Vub press, 1993: 117-138.
14. de Sousa G, Florence N, Valles B et al. Relationships between *in vitro* and *in vivo* biotransformation of drugs in humans and animals: pharmacotoxicological consequences. *Cell Biol Toxicol* 1995; 11: 147-153.
15. Rodríguez-Antona C, Donato MT, Boobis A et al. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica* 2002; 32: 505-520.
16. Guillouzo A. Liver cell models in *in vitro* toxicology. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 511-532.
17. Guillouzo A, Morel F, Fardel O et al. Use of human hepatocyte cultures for drug metabolism studies. *Toxicology* 1993; 82: 209-219.
18. Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML et al. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB J* 1999; 13: 1883-1900.
19. Chen HL, Wu HL, Fon CC et al. Long-term culture of hepatocytes from human adults. *J Biomed Sci* 1998; 5:435-440
20. Fautrel A, Chesné C, Guillouzo A et al. A multicentre study of acute *in vitro* cytotoxicity in rat hepatocytes: tentative correlation between *in vitro* toxicities and *in vivo* data. *ATLA* 1993; 21: 281-284.
21. Miller III, MC, Mohrenweiser, Bell DA. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Tox Lett* 2001; 120: 269-280
22. Ingelman-Sundberg M. Genetic variability and susceptibility and response to toxicants. *Tox Lett* 2001, 120: 259-268.
23. Harris AJ, Dial SL, Casciano DA. Comparison of basal gene expression profiles and effects of hepatocarcinogens on gene expression in cultured primary human hepatocytes and HepG2 cells. *Mutat Res* 2004; 549: 79-99.
24. De Loecker P, Fuller BJ, Gruwez et al. The effects of cryopreservation on membrane integrity, membrane transport, and protein synthesis in rat hepatocytes. *Cryobiology* 1990; 27: 143-152.
25. Son JH, Kim KH, Nam YK et al. Optimization of cryoprotectants for cryopreservation of rat hepatocyte. *Biotechnol Lett* 2004; 26:829-833.
26. Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 1980; 209: 497-499.
27. Dippold WG, Dienes HP, Knuth A et al. Hepatocellular carcinoma after thorotrast exposure: establishment of a new cell line (Mz-Hep-1). *Hepatology* 1985; 5: 1112-1119.
28. Rau MA, Whitaker J, Freedman JH et al. Differential susceptibility of fish and rat liver cells to oxidative stress and cytotoxicity upon exposure to prooxidants. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2004; 137: 335-42.
29. Pfeifer AM, Cole KE, Smoot DT et al. Simian virus 40 large tumor antigen-immortalized normal human liver epithelial cells express hepatocyte characteristics and metabolize chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: 5123-7.
30. Patek PQ, Collins JL, Cohn M. Transformed cell lines susceptible or resistant to *in vivo* surveillance against tumorigenesis. *Nature* 1978; 276: 510-511.
31. Wu JC, Merlino G, Fausto N. Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic for transforming growth factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 674-8.
32. Cassio D, Hamon-Benais C, Guerin M et al. Hybrid cell lines constitute a potential reservoir of polarized cells: isolation and study of highly differentiated hepatoma-derived hybrid cells able to form functional bile canaliculi *in vitro*. *J Cell Biol* 1991; 115: 1397-408.
33. Pinti M, Troiano L, Nasi M et al. Hepatoma HepG2 cells as a model for *in vitro* studies on mitochondrial toxicity of antiviral drugs: which correlation with the patient? *J Biol Regul Homeost Agents*. 2003; 17: 166-171.
34. Batista T, de Sousa G, Šuput JS, Rahmani R, Šuput D. Microcystin-LR causes the collapse of actin filaments in primary human hepatocytes. *Aquat Toxicol* 2003; 65: 85-91.
35. Batista Napotnik T. Vpliv mikrocistina-LR na primarne človeške hepatocite in keratinocite. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 2004.