



Toksikolojide İn Vitro Karaciğer Modelleri

In Vitro Liver Models in Toxicology

 Pinar ERKEKOĞLU^a,
 Belma KOÇER GÜMÜŞEL^a

^aFarmasötik Toksikoloji AD,
Hacettepe Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi,
Ankara, TÜRKİYE

Received: 31.05.2018
Received in revised form: 11.07.2018
Accepted: 13.07.2018
Available online: 04.04.2019

Correspondence:
Pinar ERKEKOĞLU
Hacettepe Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Toksikoloji AD, Ankara,
TÜRKİYE/TURKEY
erkekp@yahoo.com

ÖZET Karaciğer organizmanın temel metabolik işlevlerinin gerçekleştiği organdır. Birçok kimyasal maddenin hepatotoksik olduğu bilinmektedir. Bir kimyasal maddenin in vivo olarak karaciğer hasarı yapabilme kapasitesi; bu maddenin alımı, biyotransformasyonu ve eliminasyonu sırasında geçirdiği bir seri kompleks hücresel prosese bağlıdır. Ayrıca, karaciğer hasarı yapan pek çok kimyasal madde için hayvan modellerinden elde edilen bilgilerin insana tam olarak ekstrapole edilmesi bazı durumlarda uygun değildir. Bu durumda, in vitro karaciğer sistemlerinin potansiyel hepatotoksik bileşiklerin belirlenmesi ve bunların yarattığı hepatotoksitenin altında yatan mekanizma veya mekanizmaların araştırılması açısından daha iyi bir deneysel yaklaşımı sağladığı belirtilmektedir. En sık kullanılan in vitro karaciğer modelleri arasında; izole perfüze organ parçaları, karaciğer dilimleri, subselüler fraksiyonlar ve izole ve kültür hepatositler gelmektedir. Son 20-30 yıldır insan veya hayvanlardan elde edilen diferansiyel hepatositlerin ve karaciğer dilimlerinin hazırlanma ve kültürlenmeleriyle ilgili çok büyük gelişmeler sağlanmıştır. Ayrıca, izole hepatositlerin ilaç metabolizması ve toksisite çalışmalarında sağlayabilecekleri yararlar hakkında önemli araştırmalar yapılmıştır. Ancak, başta ilaç geliştirme çalışmaları olmak üzere, in vitro çalışmalar in vivo çalışmalara henüz tam bir alternatif değildir. Ayrıca, kültür hepatositlerinde gözlenen erken fenotipik değişiklikler, düşük proliferasyon kapasiteleri ve insan hepatositlerinin bulunma zorlukları gibi bazı sınırlamalar bulunmaktadır. Gelecekte bu çalışmalardan beklenen en büyük gelişme kültür koşullarının iyileştirilerek in vivo koşulları daha iyi taklit edebilmesi ve bu koşullarla daha büyük korelasyon oluşturmasıdır. Bu çalışma kapsamında, toksikolojide kullanılan in vitro karaciğer modellerinden söz edilerek, her modelin kullanım koşulları, avantaj ve dezavantajlarının anlatılması amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: İn vitro teknikler; karaciğer; hepatositler; hücresel yapılar

ABSTRACT Liver is the organ where the basic metabolic functions of the organism is actualized. Several chemicals are known to be hepatotoxic. The capacity of a chemical to cause liver damage depends on a series of complex biological processes during its uptake, biotransformation and elimination. In addition, for several liver damaging chemicals, the extrapolation of information obtained from animal models to humans is not appropriate in some situations. Under these circumstances, in vitro liver systems provide a better experimental approach for determining the hepatotoxic substances and their mechanism/s of hepatotoxicity. The most widely used in vitro liver models are isolated perfused organ parts, liver slices, subcellular fractions and isolated and cultured hepatocytes. In the last twenty and thirty years, the preparation and culturing of the differentiated hepatocytes and liver slices obtained from animals and humans have intensively developed. Moreover, important research on the advantages of the use of isolated hepatocytes in drug metabolism and toxicity studies have been performed. However, in vitro studies are not still an alternative to in vivo studies, particularly in the field of drug development. In addition, the phenotypic changes observed in cultured hepatocytes, their proliferation capacity and the difficulty in finding human hepatocytes are still the limitations. In the future, the highly expected development is the recruitment of culture conditions for these models to highly mimic in vitro conditions and provide high correlations. In this review, I will mainly focus on in vitro liver models used in toxicology, their utilization, advantages and disadvantages.

Keywords: In vitro techniques; liver; hepatocytes; cellular structures

İN VİTRO TOKSİKOLOJİK TESTLER

Akut ve kronik toksisite testlerinin amaçları, kimyasalların kısa veya uzun dönemde sağlık üzerinde oluşturabileceği tehlikelerin belirlenmesidir. Bu testler uzun süredir hayvanlar üzerinde yürütülmektedir. Son yıllarda, gerek hayvan aktivistleri gerekse hayvan kullanımında ortaya çıkan zorluklar, araştırmacıları in vivo yerine in vitro testler kullanmaya yönlendirmiştir. İn vivo ve in vitro testler arasında elde edilen korelasyonun yüksek olması, in vitro testleri özellikle akut sistemik toksisite tayininde kullanılan in vivo testlerin önemli alternatifi hâline getirmiştir.^{1,2}

İlk kez 1950'li yıllarda in vitro hücre modellerinin akut letaliteyi tayin etmek için in vivo akut toksisite testlerine alternatif kullanımı başlamıştır. Son yıllarda, laboratuvarlarda kullanılan hayvan sayılarını azaltmak için, in vitro testlerin kullanımlarında önemli artış gözlenmektedir.³ Bu testlere belirli bir standardizasyon getirilmesi için, Amerikan Çevre Koruma Ajansı (EPA), Ulusal Çevre Sağlık Bilimleri Enstitüsü [National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS)] ve Ulusal Toksikoloji Programı (NTP) beraberce çalışmaktadır. NIEHS'nin 2001 yılında yayımladığı "Akut Sistemik Toksisitenin Değerlendirilmesi için İn Vitro Metotlar Üzerine Uluslararası Çalıştay Raporu", özellikle in vitro sitotoksikite testleri ile in vivo letalite testleri arasında büyük bir korelasyon olduğuna işaret etmiştir. Bu raporda, 347 kimyasal maddenin hem fareler, hem de sıçanlara ait medyan inhibitör konsantrasyon 50 (IC₅₀) değerleri ve medyan letal doz (LD₅₀) değerleri beraberce verilmektedir. Bu bilgilerden de in vivo ve in vitro veriler arası korelasyonun büyüklüğü görülebilmektedir.⁴

KÜLTÜR HÜCRELERİ

Kültür hücreleri kullanılarak yapılan in vitro testlerin araştırmacılara sağlayabileceği avantajlar ve neden olabileceği dezavantajlar [Şekil 1](#) ve [Şekil 2](#)'de görülmektedir.⁵⁻⁷

Günümüzde ilkel test ortamları yerine geliştirilen karmaşık test ortamlarının in vitro testlerin

pek çok toksisite çalışmasında kullanılabilirliğini ve validasyonunu artırdığı görülmektedir. Olası gelişmelerle in vitro testlerin in vivo testlere alternatif olmaktan çıkıp, düzenleyici kuruluşlarca önerilen testler olma yolunda hızla ilerlediği söylenebilmektedir.⁸

İN VİTRO TOKSİKOLOJİDE KARACİĞER HÜCRE MODELLERİNİN ÖNEMİ

Karaciğer, temel metabolik işlevlerinin gerçekleştiği organdır. Görevleri; besin öğelerinin alımı, biyotransformasyonu, depolanması, bunların kan ve safraya salımıdır.⁹

Birçok kimyasalın hepatotoksik olduğu bilinmektedir. Bir kimyasalın in vivo olarak karaciğer hasarı yapabilme kapasitesi; bu maddenin alımı, biyotransformasyonu ve eliminasyonu sırasında geçirdiği bir seri kompleks hücresel prosese bağlıdır. Hepatotoksik bileşikler makromoleküllerle etkileşip karaciğer yağlanmasıyla başlayan lezyonlarını indükleyebilmektedirler. Bir kimyasalın neden olduğu karaciğer hasarı doku, hücre ve moleküler düzeylerde incelenebilmekte; ancak karaciğer birçok endojen/ekzojen maddenin ve organın etkisi altında olduğundan bu hasarın in vivo olarak incelenebilmesi zordur. Ayrıca, karaciğer hasarı yapan birçok kimyasal için hayvan modellerinden elde edilen bilgilerin insana tam olarak ekstrapole edilmesi bazen uygun olmayabilmektedir. Bu durumda, in vitro karaciğer sistemlerinin potansiyel hepatotoksik bileşiklerin belirlenmesi ve bunların yarattığı hepatotoksitenin altında yatan mekanizma/ların araştırılması açısından daha iyi bir deneysel yaklaşımı sağladığı belirtilmektedir.^{9,10}

En sık kullanılan karaciğer modelleri arasında, izole perfüze organ parçaları, doku dilimleri, subse-lüler fraksiyonlar ve izole ve kültür hepatositler gelmektedir. Bunların içinde, izole ve kültür hepatositler toksisite çalışmaları için en sık kullanılan modellerdir.⁹

İN VİTRO KARACİĞER HÜCRE MODELLERİ

İN vitro karaciğer hücre modelleri [Şekil 3](#)'te görülmektedir.



ŞEKİL 1: Kültür hücreleri kullanılarak yapılan in vitro testlerin araştırmacılara sağlayabileceği avantajlar.

İNTAKT SELÜLER SİSTEMLER

İzole Perfüze Organlar

İzole perfüze karaciğer organ modeli, *in vivo* modele en yakın *in vitro* modeldir. Temel avantajları üç boyutlu yapının korunması, safra akışının olması, safranın toplanabilmesi ve bunun karaciğerden ayrı olarak incelenebilmesidir. Ayrıca, hemodinamik ile ilgili konuların incelenebilmesini

sağlayan tek modeldir. Bu model ilaç ve kimyasallarla indüklenen hepatotoksisitenin araştırılması için kullanılmaktadır; fizyolojik temele dayanan toksikokinetik modelleme açısından ilgi çekicidir. Avantajlarına rağmen bu modelle çalışmak güçtür; organ bütünlüğünü sınırlı bir süre korumaktadır. Ayrıca, modelin doz-yanıt çalışmalarına uygun olmadığı düşünülmektedir. Bu model için insan karaciğeri bulmak çok zordur.¹⁰⁻¹²

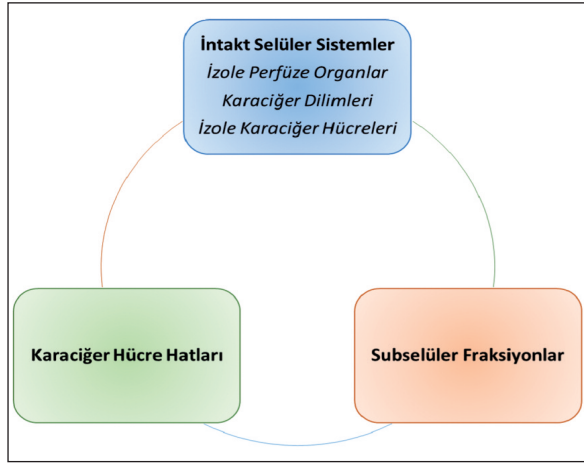


ŞEKİL 2: Kültür hücreleri kullanılarak yapılan *in vitro* testlerin neden olabileceği dezavantajlar.

Karaciğer Dilimleri

İnsan karaciğerinde kısa dönemli çalışmalar için uygundur. Doku dilim modeli ile doku organizasyonunun korunması ve hücre-hücre ve hücre-matris ilişkilerinin incelenmesi mümkün olabilmektedir; ancak safra akışı tek başına izlenememektedir. Daha önceleri, doku dilimleri *in vitro*

toksikolojik model olarak inkübasyon ortamından besin öğelerinin ve oksijenin düşük alımı nedeni ile büyük sınırlamalar varlığında kullanılabilmektedir. Son yıllarda yeni tasarlanmış doku dilimleyici cihazlar sayesinde sınırlamalar azalmış, bu modele ilgi artmıştır. Bu yeni cihazlar ile benzer boyutlarda (~250 mm kalınlığında) doku dilimleri minimum



ŞEKİL 3: İn vitro karaciğer hücre modelleri.

travma ile hazırlanabilmektedir.^{9,10,13-16} Doku dilimleri karaciğer fragmanlarının eldesi veya iğne biyopsileriyle sağlanabilmektedir; bu modelde histolojik inceleme yapılabilmektedir. Son çalışmalarda, doku dilimlerinin 2-3 gün arası metabolik olarak aktif kalabileceği gösterilmiştir; ancak hücre canlılığı ve doku dilimlerinin işlevsel kapasiteleri farklı deneysel ortamlarda değişebilmektedir. Doku dilimlerinin soğukta ve uygun koşullarda saklanabileceği belirtilse de parankimal hücrelerin dondurulup çözöldükten sonra canlılığındaki değişimler henüz aydınlığa kavuşmamıştır.^{9,13-16}

İZOLE KARACİĞER HÜCRELERİ

HEPATOSİTLERİN İZOLASYONU VE KÜLTÜRE HAZIRLANMASI

İntakt erişkin sıçan hepatositlerinin elde edilmesinde, 1967 yılında kollajenaz ve hiyalüronidazın disosiasyon ajanları olarak kullanılmaya başlanmasıyla büyük bir gelişme sağlanmıştır.¹⁷ 1969 yılında, karaciğeri kollajenaz ve hiyalüronidaz içeren, kalsiyum içermeyen Hanks Tamponu içinde in situ olarak perfüze ederek bu teknik geliştirilmiştir.¹⁸ Teknik, 1976 yılında hem modifiye edilmiş hem basitleştirilmiş ve iki basamaklı kollajenaz perfüzyon modeli geliştirilmiştir. İlk iki basamak kalsiyum içermeyen tampon içinde perfüzyon olayının gerçekleşmesinden ve kollajenaz içeren kalsiyum-suplemente tamponda sirkülasyondan oluşmaktadır. Hapes Tamponu en çok kullanılan

tampondur. İlk perfüzyon desmozomlara ait yarılmayı ve karaciğer hücrelerinin ileri dispersiyonunu sağlamaktadır. Enzim çözeltisine kalsiyumun katılması, kollajenaz aktivitesi için gereklidir.¹⁹ Metot yüksek miktarda canlı parankimal hücrenin elde edilmesini sağlamaktadır. Genç sıçan karaciğerinin 1 g'dan yaklaşık 40×10^6 - 60×10^6 arası hepatosit elde edilmekte; canlı hücre sayısı %85-95 arasında değişmektedir. Elde edilen hücrelerin yaklaşık %5'i nonparankimal hücredir. İzole hücrelerin canlılığında belirgin bir kayıp olmadan disagregasyondan önce, organlar belirli bir süre hipotermik olarak prezerve edilebilmektedir.^{19,20} Hepatosit subpopulasyonlarını da hazırlamak mümkündür. Temel kollajenaz metodunu uygulamadan önce, perivenöz veya periportal bölgelere digitonin perfüzyonu uygulayarak selektif olarak perivenöz veya periportal hepatositler elde edilebilmektedir. Hepatosit subpopulasyonları çökme derecelerine göre, tüm karaciğerden ters akış santrifüjleme ile elde edilmektedir. Zenginleştirilmiş çiftli hepatosit populasyonları kollajenaz çözeltisine tripsin inhibitörü gibi farklı eklemeler yapılarak elde edilebilmektedir. Hazırlanan hücrelerin ~%30'u hepatositlerdir; bu sayı ters akış yıkayarak ayırma işleminden sonra %85'e çıkmaktadır.^{21,22}

Saflaştırılmamış kollajenaz solüsyonu başka proteolitik enzimler de içerebileceğinden, parankimal hücrelerin yüzey özelliklerini değiştirebilmektedir. Bunu önlemek için, kollajenaz kullanmadan uygulanabilen ayrıştırma teknikleri geliştirilmeye çalışılmıştır ve enzim bir şelatör ajanla değiştirilmiştir. Kollajenaz-içermeyen perfüzyon sıvı besiyerine etilen diamin tetra asetik asit eklenmesiyle de canlı hepatositler elde edilebilmekte; ancak bu durumda elde edilen hepatosit sayısı azalmakta; hasarlı hücre sayısı artmaktadır. Hasarlı hücreler Percoll gradyanı kullanarak uzaklaştırılabilmektedir. Bu durumda kültür hepatositlerinin işlevsel kapasitelerinin arttığı belirtilmiştir, ancak tam tersini öne süren sonuçlar da mevcuttur.²³

SIÇAN DIŞINDAKİ DİĞER TÜRLERDEN HEPATOSİT HAZIRLANMASI

İki basamaklı kollajenaz perfüzyon protokolü ilk olarak sıçan hepatositleri için uygulanmaya başla-

mıştır; ancak insan hepatositleri dâhil diğer pek çok küçük türün hepatositlerine de uygulanabileceği belirtilmektedir. Canlı hepatositler tam karaciğer, lop porsiyonları veya biyopsilerden elde edilebilmektedir. Biyopsi örneklerinden hazırlanan parankimal hepatositler ise insan gibi büyük memelilerden elde edilmektedir.²⁴

İZOLE HEPATOSİTLERİN KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİ

Taze hazırlanmış izole hepatositler, karaciğer dokusundan ayrılmadan önce değişik sinyallere belli yanıtlar vermekteler; ancak dokudan ayrıldıktan sonra bazı fenotipik değişiklikler göstermektedirler. Bu değişikliklere örnek olarak sitokrom P450 (CYP450) enzimlerindeki değişiklikler örnek verilebilmektedir. Farklı insanlardan elde edilen hepatositlerin farklı selüler işlevleri olabilmektedir. Yaş, seks, karaciğer hastalıkları ve genetik polimorfizmler hepatositlerin metabolik aktivitelerini önemli ölçüde etkilemektedir.^{13,23,24}

Vons ve ark., disosiasyondan önce, 7±2 saat soğukta saklanan insan karaciğerlerinin gram doku başına biyopsilerden daha az verim verdiğini ve bu hücre popülasyonlarının plastiğe zayıf yapıştığını bildirmişlerdir. Ayrıca, karaciğer ayrıştırılmadan önce, hipotermik prezervasyonun süresi ve tamponla yıkama da hücre verimini etkilemektedir.²⁵

İzole hepatositlerin süspansiyonda yaşamları kısadır, işlevsel kapasiteleri inkübasyon için kullanılan sıvı besiyerinin bileşimine bağlıdır. Eğer sıçan hepatositleri aljinat boncuklarına tutulursa, bunların bilirubin konjuge etme yetenekleri 24 saatten daha fazla olmaktadır.^{13,24,26} Taze izole edilmiş sıçan hepatositleri 4°C'de, Leibovitz sıvı besiyerinde 1-2 gün saklanabilmektedir. İki günlük saklamadan sonra sadece Leibovitz sıvı besiyerinde saklanan hepatositler plastiğe yapışabilmekte, kültürde yaşayabilmekte, aylarca veya yıllarca hipotermik olarak veya soğukta ve uygun koşullarda saklanabilmektedirler. Hepatositlerin seroprezervasyonu için birçok prosedür vardır. Seroprotektanın yapısı, konsantrasyonu, soğutma hızı ve tekrar çözme seroprezervasyonu etkileyen en önemli faktörlerdir.^{27,28} Birçok türün parankimal hücresi dondurulabilmektedir; ancak bu işlemle hücre canlılığı azalabilmekte ve enzim aktiviteleri değişebilmek-

tedir. Sıvı azotta dondurulup çözüldükten sonra hücrelerin yaklaşık %50'si yapışma ve kültürde yaşama özelliğine sahip olarak kalmaktadır. Prezervasyon süresi çok önemli bir parametre değildir; hücre canlılığı birkaç gün-4 yıl saklanmış hepatositler arasında farklılık göstermemektedir. Dondurma/çözme işleminden sonra sitozolik Faz II enzimleri ve protein neosentezinde azalmalar gözlenmektedir. Eğer çözülmüş sıçan hepatositleri sıçan ilkel safra kesesi hücreleriyle birlikte kültürlenirse, işlevsel aktiviteleri taze hepatositlerin farklı hücrelerle birlikte kültürlenmesi sonucu oluşan karmaşık yapılu hücre kültürleriyle hemen hemen aynı hâle gelmektedir.^{29,30}

İnsan hepatositlerinde daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir. Zira hipotermik ve/veya patolojik insan hepatositlerinden elde edilen sonuçlar bireyler arası büyük farklılıklar göstermektedir. Ayrıca, insan hepatositlerinin seroprezervasyonu, dondurup/çözümleri ve kısa dönemli inkübasyon gibi konularda daha ileri çalışmalar gerekmektedir.^{29,30}

İZOLE HEPATOSİTLERİN KÜLTÜRLENMESİ

Primer karaciğer hücre kültürlemede, birçok sorunla karşılaşabilmektedir. Bunlara örnek olarak; canlılıklarının kısa süreli olması ve ilaç metabolize edici enzimlerinde olduğu gibi, karaciğerin spesifik işlevlerinde kayıplara rastlanması verilebilmektedir. Daha uzun zaman canlı kalmalarını sağlamak amacıyla, kültüre parankimal hücreler eklenmelidir.³¹ Kemirici hepatositlerinde *CYP450* konsantrasyonları ilk 24-48 saat arası ~%50 oranında azalmakta; ancak immünoaktif protein miktarındaki azalış daha yavaş gerçekleşmektedir. Steward ve ark., ilk üç günde total *CYP450* aktivitesinde %68 azalış olduğunu; ancak 7 *CYP450* enzimi için immünoaktif protein azalışının aynı sürede %24'te kaldığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlar asıl kaybın *CYP450* proteinlerinde değil, *CYP450* proteinlerinin yapısında bulunan "hem proteini"nde olduğunu göstermektedir.³² Ayrıca, *CYP450* mRNA'larının ilk üç günde büyük bir düşüş gösterdiği belirlenmiştir. İnsan hepatosit kültürlerinde ise mRNA'lar bifazik bir yanıt oluşturmakta; *CYP450* enzimlerinin aktivitesindeki

düşüşe paralel olarak hücrelerin metabolik kapasitelerinde de bir azalmaya rastlanılmaktadır. Birçok immüno blotlama analizi *CYP450* enzimlerinin bekleme sırasında farklı şekilde etkilendiğini göstermiştir. Bekledikçe *CYP450*'lerin fenobarbitalle indüklenmeleri güçleşmektedir.^{33,34} Ayrıca, UDP-glukronoziltransferaz (UGT), sulfotransferaz (SULT) ve glutatyon S-transferaz (GST) enzimlerinde de önemli değişiklikler gözlenmiştir. Bu tip spesifik işlevlerde kaybın erken safhada karaciğer-spesifik genlerdeki kayba bağlı olarak ortaya çıktığı belirtilmektedir.³⁵ Albumin ve transferrin gibi proteinlerde de ilk 24 saat içinde önemli kayıplara rastlanılmaktadır.³⁶ Ayrıca, kültürdeki sıçan hepatositlerinde 2-3 gün içinde P-glikoprotein miktarı ve çoklu ilaç rezistans geninde önemli artışlar gözlenir ki bu hepatositlerin antikanser ilaçlara karşı daha az hassas hâle gelmesine neden olmaktadır. Yine de ilaç eflüks pompası çalışmaktadır ve bu doksorubisinin intraselüler akümülyasyondaki düşüşle gösterilmiştir. İzolasyon prosedürü sırasında gerçekleşen hücre ekimi veya yapışması gibi olaylar kritik basamakları oluşturmaktadır. c-jun, c-fos gibi erken veya ara gen ürünlerinin oluşumu ve nükleer faktör kappa B'nin aktivasyonu, belirli mRNA'ların degradasyonu ve transkripsiyonel olayların azalışı hemen hücre izolasyonundan sonra başlamaktadır. Bu olaylardan karaciğer-spesifik *CYP450*'ler ve süperoksit dismutaz gibi enzimler etkilenmektedir.³⁷

HEPATOSİT YAŞAMA SÜRELERİNİ VE FONKSİYONLARINI ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Birçok çalışmanın sonucunda in vitro olarak selüler işlevleri etkileyen üç farklı faktör olduğu bulunmuştur. Bunlar ekzojen çözünür faktörler, ekstraselüler matriks bileşenleri ve hücre-hücre interaksiyonlarıdır.

i. Ekzojen Çözünür Faktörler

Kültür için kullanılan sıvı besiyerine eklenen hormonlar, büyüme faktörleri ve eser elementler hepatositlerin yaşama sürelerini ve işlevlerini artırmaktadır. Ayrıca, metipiron ve izonikotinamid gibi ligandlar, fenobarbital gibi indükleyiciler ve dimetil sülfoksit (DMSO) gibi çözücüler kapsayan nonfizyolojik çözünür faktörler de etkindir. Bun-

ların içinde en etkin olanı DMSO'dur; maksimum etkiyi oluşturmak için %2 oranında kültür ortamına eklenebilmektedir. DMSO hepatositlerin dondurulup saklanması için de kullanılmaktadır. Standart kültür ortamında (örneğin; mitojenik faktörlerin yokluğunda) sıçan hepatositlerin üremesi orta-geç G₁ fazında durmaktadır. Ayrıca çözünür faktörlerin DNA sentezini stimüle ettiği de belirtilmektedir.^{9,38}

ii. Ekstraselüler Matriks Bileşenleri

Ekstraselüler matriks bileşenlerinin karaciğer-spesifik işlevler üzerine etkisi geniş bir şekilde araştırılmıştır ve birçok ekstraselüler matriks bileşeni denenmiştir. Matriks proteinleriyle kaplanan plastik kutulardaki hepatositlerin yapışma verimi ve birçok durumda hepatosit yayılması artmıştır; ancak bu spesifik işlevlerin kaybını beraberinde getirmektedir. Ayrıca, hepatositler eğer matrigel (fare tümör hücreleri tarafından salgılanan ve bir plak üzerine tutturulan jelatin yapıdaki protein) üzerinde veya sandviç içinde kültürlenirlerse, işlev süreleri uzamakta ve bu hücrelerin globüler şekillerini korumalarına yardımcı olmaktadır. Ayrıca bu durumda, *CYP2B1/2*'nin fenobarbitalle indüklenbilirlikleri ve bunun süresi artmaktadır. Yine de matrigel etkilerinin kesin olarak belirlenebilmesi zordur; zira protein, hormon ve/veya büyüme faktörlerinin kontaminasyonu gerçekleşebilmektedir.^{39,40}

Sıçan hepatositleri, 40 gün boyunca daha fazla albumin salgılamakta; bu etki iki katman Tip I kollajen arasında olduklarında artmaktadır ve sandviç yapının I-pirolin mutlaka gereksinim duyduğunu belirtmiştir. Ayrıca, sıçan hepatositlerinde *CYP450* enzimlerinin varlığı ve indüklenbilirlikleri, yeterli miktarda matriks bileşenlerinin (örneğin; laminin, Tip IV kollejen) varlığı ile doğrudan bağlantılıdır.⁴¹

iii. Hücre-Hücre İnteraksiyonları

Diğer bir yaklaşım hücre-hücre interaksiyonlarını in vitro olarak sağlamaktır. Karaciğer pek çok hücre tipinden oluşan bir organ olduğundan, karaciğer işlevlerini homotipik ve heterotipik interaksiyonlar etkileyebilmektedir. Saf kültürde hücreler tekrar agregre olmakta; ancak birkaç saat sonra hü-

reler arasındaki gap birleşmeler yok olmaya başlamaktadır. Her ne kadar pek çok işlevin gerçekleşmesi hücrelerin düşük/yüksek dansitesine bağlı olsa da hepatositlerin canlılıkları ve fenotipik karakterleri farklıdır. Bu durum in vitro olarak spesifik işlevlerin sağlanmasında homotipik interaksiyonların kritik olmadığına işaret etmektedir.^{42,43}

Hepatositlerin sinüsoidal hücreler veya insan fibroblastlarıyla birlikte kültürlenmesi, hepatositlerin yaşamları ve işlevlerinde hafif bir iyileşme sağlamaktadır. Hepatositleri diğer epitel hücrelerle (örneğin, ilkel safra kesesi hücreleri ile) birlikte kültürlemekse, hepatositlerin yaşamları ve işlevlerinde belirgin bir iyileşme sağlamakta; özellikle Faz I ve Faz II enzimlerinin ekspresyonunda ve plazma protein üretiminde önemli bir iyileşmeyi beraberinde getirmektedir.^{42,43} Sonuç olarak, erişkin hepatositler karmaşık/gelişmiş kültür ortamlarına birkaç hafta süreyle karaciğer-spesifik işlevleri gerçekleştirebilseler de tam anlamıyla in vivo ortamı yansıtılmaları güçtür. Bazı fenotipik değişimler izolasyon işlemi veya hücre ekiminden hemen sonra ortaya çıkabilmektedir. Bunun nedeni, parankimal hücrelerin yeni çevrelerine uyum sağlamaya çalışmalarıdır.^{42,43}

Hepatik Nonparankimal Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürlenmesi

Kupffer hücreleri ve endotel hücreler kollajenaz-pronaz metoduyla elde edilip, yıkanarak ayrılabilirler. Her ne kadar karaciğer endotel hücrelerinin elde edilmesi ve kültürlenmesi zor olsa da günümüzde belli bir derecede bunun başarıldığını gösteren yayınlar mevcuttur. Ayrıca, Stellate hücreleri kollajenaz-pronaz metoduyla elde edilebilmektedir. İntrahepatik safra kesesi hücreleri de izole edilip, kültürlenebilmektedirler.⁴⁴

KARACİĞER HÜCRE HATLARI

Hepatosit hücre hatları, hepatomalardan veya normal hepatositlerin viral veya selüler DNA ile transfeksiyonundan sonra elde edilmektedir. İnsan veya sıçan hepatoma hücrelerinden elde edilen birçok hücre hattı kullanılmaktadır; ancak bunların hiçbirinden normal karaciğerdeki ilaç metabolize edici

enzimlerin tam spektrumu elde edilememektedir. Ayrıca, hücre hatlarında zamanla kültür içinde belirgin fenotipik/genotipik varyasyonlar görülebilmektedir; bu hücre hatlarının doku-spesifik işlevlerini in vivo duruma yakın bir şekilde yansıtamadığı belirtilmektedir. Nonparankimal hücre hatları da kullanılmaktadır. İlkel safra kesesi hücrelerinden türevlendirilen sıçan epitel hücreleri genç sıçanların karaciğerinden tripsinazasyonla elde edilmektedir. Bunlar *CYP2E1* ve epoksit hidrosilaz aktivitesi gibi sınırlı sayıda hepatik işlevi incelemek için kullanılmaktadır.^{9,42}

SUBSELÜLER FRAKSİYONLAR

Doku homojenatları, mikrozomlar, sitozoller ve pürifiye organlar ilaç ve kimyasallarla indüklenen hepatotoksisiteyi incelemek için kullanılabilirler. 9000 ×g süpernatant fraksiyonu ve takiben 100.000 ×g santrifüj sonrası elde edilen mikrozomlar mutajenite test prosedürleri için kullanılabilirler.⁴⁵

KARACİĞER HÜCRE MODELLERİNİN TOKSİSİTE TESTLERİNDE KULLANIMI

İnsan maruziyetinden önce bir kimyasalın güvenilirliğinin test edilmesi çok kritik bir basamaktır. Özellikle bir ilacın geliştirilmesinde kullanılan kronik toksisite çalışmaları hem çok zaman alır hem de maliyeti çok yüksektir. Bu çalışmalar genelde bir kemirici bir de kemirici olmayan bir türde gerçekleştirilmektedir. Türler arası önemli ilaç metabolizma farklılıkları nedeni ile, hayvanlardan verilerinin tam olarak insana ekstrapole edilmesi uygun değildir. Bununla beraber, etnik nedenlerle de hayvanların toksisite testlerinde daha az sayıda kullanımı ve toksisite test maliyetleri de dikkate alınır ise, in vivo testlerin kullanımının sınırlandırılıp, in vitro testlerle ilgili deneylerin devam ettirilmesi daha az zamanda daha düşük maliyetle deney yapılabilmesini sağlayacak ve hayvan kaybını önleyecektir.^{2,9,10,46,47}

Günümüzde in vitro karaciğer hücre modelleri toksisite testlerinde kolaylıkla kullanılabilen yöntemlerdir. Özellikle, süspansiyon veya primer kültür şeklinde izole hepatosit hücrelerinin kullanımı

çok yaygındır. Bu hepatositlerle farklı sınıflardaki kimyasal maddelerin spesifik veya nonspesifik son noktaları belirlenebilmektedir. Hepatosit kültürlerinin en çok kullanıldığı alan ise hepatotoksinlerin etki mekanizmalarının araştırılmasıdır.^{10,47}

BİYOGÖSTERGELER

Kimyasallarla indüklenen toksisitenin belirlenmesi için çok sayıda morfolojik ve biyokimyasal gösterge mevcuttur. Bu göstergeler hücresel ve moleküler düzeydeki hasarları belirtebilmektedir ve birçok şekilde sınıflandırılabilir. Plazma membran bütünlüğündeki hasarı bildiren göstergeler, geri dönüşsüz sitotoksikite veya geri dönüşlü hücre hasarını bildiren göstergeler, nonspesifik veya karaciğer-spesifik son noktalar ölçülerek hücresel ve moleküler düzeydeki olaylar belirlenebilmektedir.^{9,10,46,47}

İ. NONSPESİFİK SON NOKTALAR

Nonspesifik son noktalar genelde geri dönüşsüz hücresel hasarı belirtmek için kullanılmaktadır. Sitotoksikite göstergesinin güvenilirliği, tekrarlanabilirliği, hassasiyeti, maliyeti ve tür spesifitesi de bu son noktanın seçiminde önemlidir. Nonspesifik kriterler arasında morfolojik değişimler (hücrenin şekli, sitoplazmik değişimler), membran bütünlüğü, subselüler bozulmalar ve metabolik aktivite sayılabilmektedir. Işık mikroskobu incelemesi ile hücrenin çevrenmesi, yapışkanlığı, oluşan küçük apoptotik cisimcikler, vakuolizasyon ve lipid damlacıklarının akümüasyonu gibi biyokimyasal son noktalar incelenebilmektedir. Ayrıca elektron mikroskobuyla organellerdeki değişimleri incelemek mümkündür. Metabolik parametreler olarak, GSH içeriği, adenzin trifosfat içeriği, lipid peroksidasyon, kovalent bağlanma ve proteinlerin yeniden sentezi ölçülebilmektedir.^{48,49}

Plazma membran bütünlüğünün kaybı, hücre ölümünün en önemli belirtilerindendir. Sitotoksikite tripan mavisi alımı ve sitozolik enzimlerin sızması ile ölçülebilmektedir. Tripan mavisi testiyle izole hepatosit süspansiyonlarındaki canlı hücre sayısı belirlenebilmektedir. Ayrıca, birçok enzim de hücre canlılığının belirlenmesinin ölçütü olarak kabul edilebilmektedir. Bunların dışında, ekstrasel-

lüler laktat dehidrogenaz (LDH)'in total LDH'ye oranı da hücre canlılığının belirlenmesinde yararlanılan ölçütlerdendir; ancak LDH insan hepatositlerinin canlılığının belirlenmesinde sıçan hepatositleri kadar etkili bir ölçüt sayılmamaktadır.⁵⁰ Bu yöntemlerin dışında, ⁵¹Cr ile de membran bütünlüğü ölçülerek hücre ölümü belirlenebilmektedir. ⁵¹Cr kullanımına karar verildiğinde, hücreler ⁵¹Cr izotopu ile önceden yüklenmelidir. ⁵¹Cr lizise uğramış hücrelerden tam olarak salınması bazen mümkün olmayabilmektedir. Ayrıca, ortama ekzojen süksinat eklenmesiyle ortaya çıkan oksijen tüketimindeki değişimler de geri dönüşsüz hücre hasarının göstergelerinden kabul edilmektedir.^{9,50} İnsan hepatositleri dâhil, tüm hücre kültürlerinde sitotoksikitenin belirlenmesi için en sık kullanılan yöntem 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür (MTT) testidir. Testin prensibi, proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrogenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu hücrelerde kullanarak formazan (mor) boya üretilmesi ve hücrelerde görülen renk değişiminin ölçülmesine dayalıdır. Hücre canlılığı kontrol grubuna göre % olarak belirtilmektedir.⁵¹ Bazı sınırlamaları olmasına karşın günümüzde en sık kullanılan yöntemdir.⁵¹ Ayrıca, lizozomal aktiviteyle ilişkili olarak nötral kırmızısı, asit fosfataz ve hücre proliferasyon hızıyla ilgili olarak kristal viyole ile de sitotoksikite testlerini yapmak mümkündür.⁵²⁻⁵⁴

Geri dönüşsüz hücre hasarının ölçüldüğü testler genelde 96 kuyucuklu plaklarda her kuyucuğa ~10.000-30.000 hücre koyarak yapılmaktadır. Bu şekilde doz-yanıt eğrileri elde edilmekte; IC₅₀ değeri belirlenmektedir. IC₅₀, *in vitro* testlerde en çok kullanılan değerdir. Uzun dönemde yapılan sitotoksikite testlerinde ise maksimum nontoksik konsantrasyon da belirlenebilmektedir.⁵¹⁻⁵⁵

Geri dönüşlü plazma membran değişimleri, hücrelerdeki geri dönüşlü hasarın en önemli belirticidir. Plazma membranının iyonlara ve küçük moleküllere geçirgenliğinin artması, total hücre canlılığında azalmaya işaret etmektedir. Özellikle artmış intraselüler potasyum ve kalsiyum miktarı bu amaçla kullanılan en önemli göstergelerdir. Geri dönüşlü hücre hasarının belirlenmesinde vücuttaki

en önemli koruma mekanizmalarından olan GSH'nin miktarının belirlenmesinden de yararlanılabilmektedir. Hem GSH hem okside glutasyon miktarları total hücrede veya mitokondride ölçülerek hasarın derecesi belirlenebilmektedir. Ayrıca glutasyon peroksidaz, GST protein/aktivite ve lipit peroksidasyon düzeyi de ölçülerek geri dönüşlü hücre hasarı konusunda bilgi edinilebilmektedir.^{30,36}

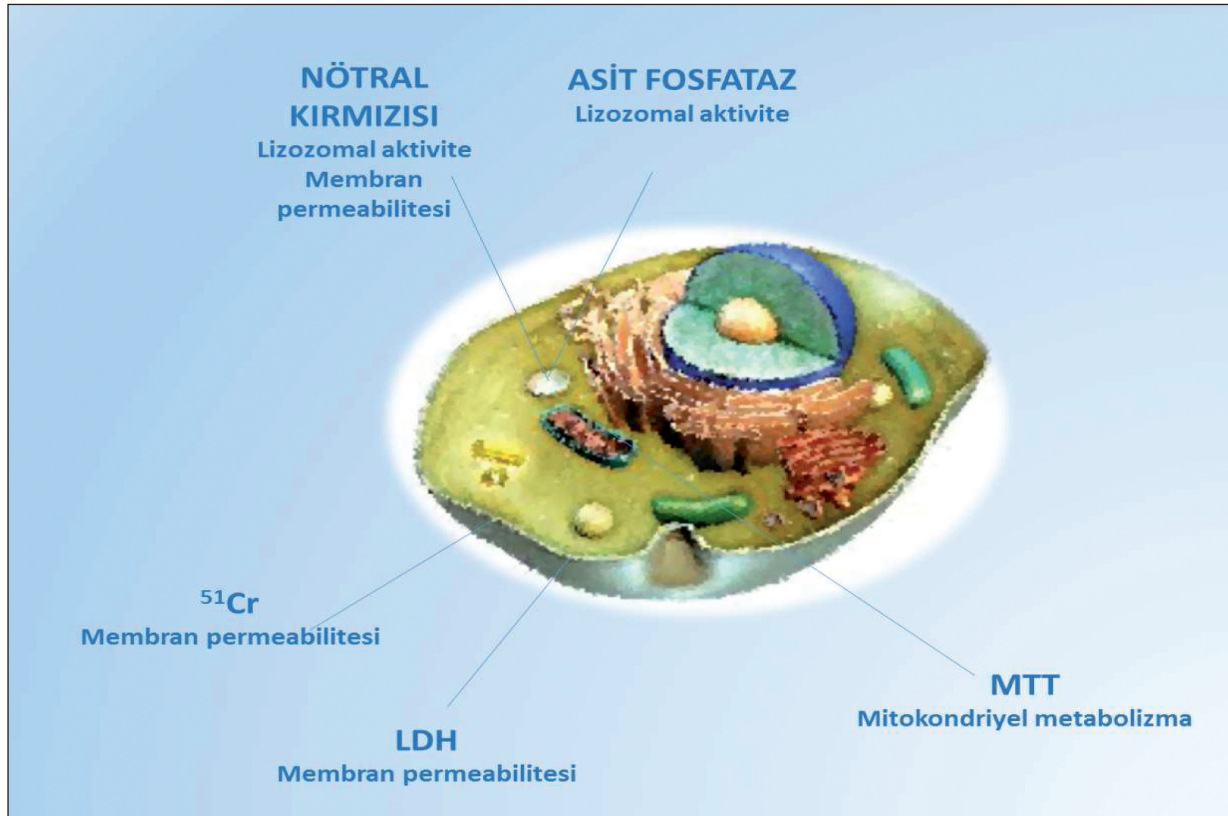
Hücrel makromoleküllere reaktif bileşiklerin kovalent bağlanması ksenobiyotiklerin hepatotoksitesini gösteren en önemli ölçütlerdendir. Proteinler gibi hücrel hedeflere kovalent bağlanmanın hücre ölümüyle bir noktaya dek bağlantılı olabileceği, ancak bunun kesin olarak belirlenmesi için uygun kontrollerin kullanılması gerektiği belirtilmektedir.^{56,57} Hepatositlerde sitotoksitenin değerlendirilmesi için sıklıkla kullanılan yöntemler Şekil 4'te görülmektedir.

ii. KARACİĞER-SPESİFİK KRİTERLER

İzole hepatositlerin ksenobiyotiklere maruziyeti sonucu ortaya çıkan karaciğere spesifik işlev

değişiklikleri de sitotoksitate testlerinde son nokta göstergesi olarak kullanılabilir. En çok karaciğer-spesifik plazma proteinlerinin (albumin, transferrin) ve akut-faz proteinlerinin neosentezi, glikoneojenez, glikojen sentezi, üre sentezi, lipoprotein sentezi, *CYP450*'lerin indüksiyonu veya inhibisyonu ve safra asidi sentezi ölçülmektedir. Ayrıca, elektron mikroskopu incelemesiyle karaciğer parankimal hücrelerindeki organellerde görülen spesifik değişimler de belirlenebilmektedir. Örneğin; düz endoplazmik retikulum proliferasyonu ve stresi, artmış peroksisom sayısı ve lizozomlarda konsentrik membranların karakteristik akümüasyonu belirlenerek sitotoksitate hakkında bir karara varılabilmektedir.^{58,59}

Karaciğer-spesifik işlev değişikliklerinin belirlenmesi hücre membran bütünlüğü gibi nonspesifik son noktaların belirlenmesinden çok daha hassastır. Ancak, birçok ksenobiyotik için çok spesifik son noktalar henüz belirlenmemiştir.⁹



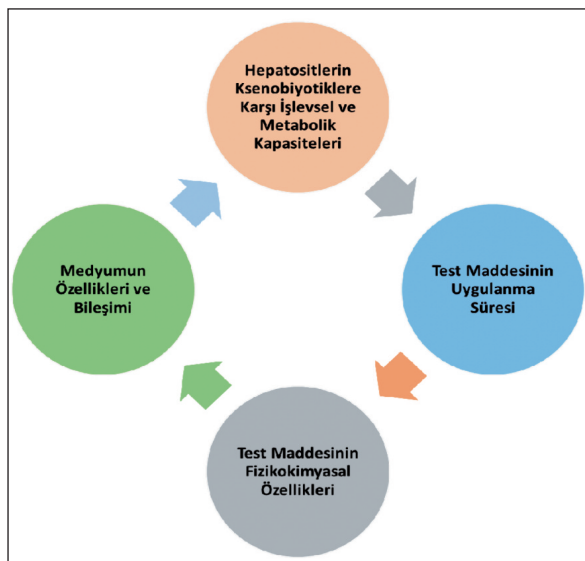
ŞEKİL 4: Hepatositlerde sitotoksitenin değerlendirilmesi için sıklıkla kullanılan yöntemler.

HEPATOSİTLERLE ÇALIŞIRKEN DENEYSEL KOŞULLARIN BELİRLENMESİ

Hepatositlerle çalışırken deneysel koşulların çok dikkatle belirlenmesi gerekmektedir; zira bu koşullar sonuçları önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Hücrelerin işlevsel/metabolik kapasiteleri, sıvı besiyerinin bileşimi, test maddesinin fizikokimyasal özellikleri, uygulama süresi ve son noktaların seçimi sonuçların elde edilmesinde ve yorumlanmasında etkili olan en önemli faktörlerdir (Şekil 5).

İ. İZOLE HEPATOSİTLERİN KSENObİYOTİKLERE KARŞI İŞLEVSEL VE METABOLİK KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Bazı maddeler biyotransformasyondan hemen sonra hepatotoksosite gösterebilmektedir. Reaktif metabolitlerin oluşumu aktivasyon-inaktivasyon yolları arasındaki dengeye bağlıdır. İzole hepatositler de aynı in vivo koşullarda olduğu gibi aynı metabolitleri oluşturma kapasitesine sahiptir. Ana ksenobiyotik ve metabolitlerinin neden olabileceği hücre hasarı hem hücre ekstraktlarında hem de sıvı besiyerinde ölçülebilmekte; bunların yaptığı intraselüler kovalent bağlanma yüzdesi belirlenebilmektedir. Birçok çalışma, izole hepatositlerin in vitro olarak oluşturdukları metabolitlerinin aynıının in vivo olarak da oluşturduğunu göstermiştir. İzole hepatosit modelleri türler arası biyotransformasyon farklarının ve potansiyel ilaç etkileşmelerinin belirlenmesinde de iyi modellerdir.^{60,61}



ŞEKİL 5: Hepatositlerle çalışırken deneysel koşulların belirlenmesi.

Faz I-II'de oluşan metabolitler için in vivo/in vitro kalitatif korelasyonlar olduğu bilinmektedir. İn vitro koşullarda, kimyasal konsantrasyonu ve inkübasyon süresi gibi farklı parametreler metabolit profilini büyük ölçüde etkilemektedir. Konjuge metabolitlerin saptanması için, in vitro deneylerde 6-8 saat yeterlidir. Ortamdaki ksenobiyotiğin konsantrasyonu çok düşük ise, bazı metabolitler saptanmayabilmektedir. Eğer ksenobiyotiğin konsantrasyonu çok yüksekse, ciddi hücre toksisite gözlenebilmektedir. Kültür koşulları ne kadar uygun olsa da bazı ilaçlar için in vivo koşullardan daha düşük biyotransformasyon gerçekleşebilmektedir. Biyotransformasyon hücre başına hesap edilirse, in vivo ve in vitro koşullardaki kalitatif değişiklik miktarının azaldığı belirtilmektedir.^{47,60} Bu olay daha önce kafein için gösterilmiş ve hücre başına kafeinin biyotransformasyonu hesap edilerek, in vivo ve in vitro koşullardaki biyotransformasyon miktarı arasında bir korelasyon gözlenmiştir. Bu durumda in vivo ve in vitro farklılıklardan çok türler arası kültür izole hepatositler arası biyotransformasyon farklarından söz etmek mümkündür. Bazı ilaçların in vitro biyotransformasyonları açısından sıçan ve insan hepatositleri arasında önemli farklar olduğu bilinmektedir.⁶²

Kültürdeki hepatositlerin metabolit oluşturma kapasiteleri zamanla azalmaktadır. Özellikle sıçan hepatositlerinin ilaç metabolize edici enzim aktiviteleri zamanla hızla azalmaktadır ve metabolik hızlarındaki ve majör metabolit oluşturma oranlarındaki düşüş insan hepatositlerine göre fazladır. Buna en iyi örnek; ketotifenin sıçan ve insan hepatositleri arasındaki zamanla gerçekleşen farklı metabolizma hızı ve iki temel metabolitin oluşum miktarları arasındaki farktır.^{9,63}

Gelişmiş kültür koşulları kullanarak kültür hepatositlerinde ilaç metabolizma aktivitesi uzatılabilmektedir. Bu durum, özellikle ilaç testlerinde çok önemlidir. Örneğin; sıçan epitel hücreleriyle sıçan hepatositleri ko-kültürlenerek *CYP450* enzim aktiviteleri indüklenebilmektedir. Bu eritromisin estolat için gösterilmiştir. Ayrıca, farklı hücrelerle birlikte kültürlenmiş insan hepatositlerinde metilkolantren uygulanmasından 3 gün sonra kafein ve teofilin metabolizmaları hızlanmaktadır.⁶⁴

İnsan hepatositleriyle çalışılır iken, büyük ilaç metabolizma farkları görülebilmektedir; bunun nedeni bireyler arası genetik polimorfizme bağlı olarak Faz I-II ilaç metabolize edici enzimler arası farklılıklardan ileri gelmektedir. Ayrıca; sigara, ilaç kullanımı ve çevresel maruziyetler biyotransformasyon farklılıklarını beraberinde getirmektedir.⁶⁵

ii. SIVI BESİYERİNİN ÖZELLİKLERİ VE BİLEŞİMİ

Kültür sıvı besiyerinin bileşimi izole hepatositlerin sitotoksik ajanlara karşı verdikleri yanıtı önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Örneğin; sodyum salisilatın kültür sıçan hepatositlerindeki sitotoksitesi sıvı besiyerinde bulunan sığır serum albumini miktarına bağlıdır. Ayrıca, proteinlere bağlanarak toksisite gösterdiği bilinen eritromisin estolatın toksisitenin sıvı besiyerinde bulunan protein miktarı ile ilişkili olduğu, protein miktarı arttıkça sitotoksitenin arttığı gösterilmiştir.⁶⁴ Ortamdaki kalsiyum miktarı artışı ile sıçan hepatositlerinde CCl_4 toksitesinin arttığı belirtilmektedir. Bunun hücre içine kalsiyum girişinin CCl_4 'ün neden olduğu karaciğer hasarının artırmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Birçok sitotoksik ajanın kalsiyum içermeyen ortamda daha az karaciğer hasarına neden oldukları gösterilmiştir.⁶⁶ Ayrıca, kalsiyumun ilaç etkileşimleri sonucu oluşan hepatosit hasarını da modifiye edebileceği gösterilmiştir.⁶⁶

iii. UYGULANAN TEST MADDESİNİN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Araştırmacılar deneye başlamadan önce, test maddesinin fizikokimyasal özelliklerine uygun bir deney ortamı oluşturmaya çalışmalıdır. Test maddesinin uçucu olup olmadığı, hangi çözücüde çözülmesi gerektiği, sıvı besiyerinde bulunan test maddesi arasındaki etkileşimin nasıl bir pH, ozmolarite ve bulanıklık değişimi yaratabileceği ve çökelek oluşup oluşmayacağı konularına azami önem gösterilmesi gerekmektedir.¹³

iv. UYGULANAN TEST MADDESİNİN UYGULANMA SÜRESİ

Kültür ortamında toksik bileşiklerin ekstrahepatik eliminasyonun olmaması ve dolayısıyla bunların kültür ortamında biriktikleri göz önüne alındığında, izole hepatositlerin kimyasallarla inküasyon zamanının kritik bir parametre olabileceği

sonucuna varılabilmektedir. Zamanla kültür ortamında azalan ilaç metabolize edici enzim miktarlarının da biyotransformasyonun azalmasına ve toksisitenin artmasına neden olabileceği düşünülmektedir. Azalan *CYP450* miktarları ile *CYP450*lerle biyoaktivasyona uğrayıp toksisite oluşturan toksik bileşiklerin/toksinlerin biyoaktivasyonu azalabilmektedir. Bu durumda, *in vitro* kültür testlerinin *in vivo* durumu yansıtması zorlaşmaktadır. *In vitro* testlerde bu durumu önlemek için hepatosit kültürlerinin farklı hücrelerle birlikte kültürlenmesi önerilmektedir. Özellikle sürekli maruz kalınan kimyasalların uzun dönemli sitotoksitesinin belirlenmesinde hepatosit kültürlerinin karaciğer epitel hücreleriyle ko-kültürlenmesi önerilmektedir.^{13,67}

SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK BİLEŞİKLERİN KARACİĞER HÜCRE KÜLTÜRLERİYLE BELİRLENMESİ

SİTOTOKSİK BİLEŞİKLERİN İN VİTRO TESTLERLE BELİRLENMESİ

Süspansiyon veya kültür hâlindeki izole hepatositler, aynı hücre süspansiyonu içinde farklı konsantrasyonlarda, farklı kriterler kullanılabilmesine olanak vermeleri açısından çok önemli bir deneysel yaklaşımı temsil etmektedirler. Ancak, bu hücrelerle hipersensitivite kökenli olan bir idiyo-senkretik reaksiyon oluşturarak etki eden toksik maddelerin/toksinlerin etkilerini belirlemek imkânsızdır. Zira, bu tip maddeler etki göstermek için bir immünolojik reaksiyona ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durumda, hepatosit kültürleri kullanarak immünolojik kaynaklı reaksiyonlar sonucu oluşacak sitotoksik etkileri belirlemek olası değildir.^{9,13}

Taze izole edilmiş parankimal hepatositler ile sadece 2-4 saatlik kısa süreli çalışmalar yapılabilmektedir. Bunun nedeni, zamanla bu hepatositlerin yapılarında değişiklikler ortaya çıkmasıdır. Örneğin; zamanla 5'-nükleotidaz aktivitesi, alkalin fosfataz aktivitesi ve hormonlara yanıt azalmaktadır. Ayrıca, Faz I-II enzimlerindeki değişimler kaçınılmazdır. Bu da parankimal hepatositler ile yapılan çalışmaların neden 24 saatten önce tamamlanması gerektiğinin ve bu hepatositlerin sadece kısa süreli

çalışmalara uygun olduğunun bir göstergesidir. Ayrıca, hepatositlerden elde edilen sonuçların non-hepatik hücre kültürleriyle (örneğin; HeLa hücreleri) karşılaştırılması sonucu, hepatositlerin metabolik aktivasyon gerektiren bileşiklere karşı daha hassas olduğu belirlenmiştir. Normal hepatositlerin daha düşük ilaç metabolize etme yeteneği olan hepatoma hücrelerine göre daha hassas oldukları bulunmuştur. Türler arası farklılıklar da hepatositlerin hassasiyetlerini etkileyebilmektedir.⁶⁸

Benzer yapı gösteren bileşiklerin izole hepatositlerle yapılan sitotoksikite çalışmalarından *in vivo* koşullara uygun sonuçlar elde edilmektedir. Örneğin; benzer yapıya sahip nöroleptik ajanlar ile benzer yapıya sahip makrolidlerin *in vivo* ve *in vitro* sitotoksikite testleri arasında büyük korelasyon bulunmaktadır.^{13,64,69}

In vitro sistemlerden elde edilen verilerin *in vivo* duruma ekstrapolasyonu için sıklıkla son nokta olarak enzim seviyeleri ve medyan letal konsantrasyon (LD₅₀) gibi değerlerin karşılaştırması yapılmaktadır. IC₅₀ değerleri ile *in vivo* letal dozlar karşılaştırılarak kimyasalların letal dozları arasında *in vitro* ve *in vivo* koşullarda bir korelasyon olup olmadığı araştırılmış ve IC₅₀ ve intravenöz LD₅₀ değerleri arasında büyük bir korelasyon olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, 10 kimyasal madde üzerinde yapılan bir çalışma sonucu, insan hepatosit kültürlerinden MTT testi ile bulunan IC₅₀ değerleri ile insan akut letal kan konsantrasyonu arasında iyi bir korelasyon olduğu belirlenmiştir. Diğer bir önemli soru ise *in vitro* toksik konsantrasyonlar ile *in vivo* toksik dozlar arası bir korelasyon olup olmadığıdır. Bu durumda ilaçların farmakokinetiği gibi konular dikkate alınmalıdır.⁷⁰

GENOTOKSİK BİLEŞİKLERİN İN VİTRO TESTLERLE BELİRLENMESİ

In vitro hücre modelleri uzun zamandan beri kimyasal ve fiziksel ajanların DNA'ya kovalent bağlanarak hasar yaratma, DNA onarım proseslerinin inhibisyonu, spesifik gen lokuslarının mutasyonu, fenotipik olarak değişmiş hücrelerin indüksiyonu, kromozom ve kromatid aberasyonlarının indüklenmesi gibi genotoksik potansiyellerini araştırmak

için kullanılmaktadır. İzole hepatositlerde kritik bir aktivasyon/inaktivasyon dengesi bulunduğundan, farklı genotoksik ajanların DNA onarım proseslerini nasıl etkilediklerinin araştırılması için iyi bir model oldukları düşünülmektedir.^{63,71}

Genelde sıçan ve insan hepatositlerinin kimyasallara verdiği genotoksik yanıt aynıdır. Birçok düzenleyici kuruluş, sıçan hepatositlerinin DNA onarım testlerinde kullanılmasını uygun bulmaktadır. Bunun nedeni planlanmamış DNA sentezinin (UDS) araştırılması için, az sayıda hücreye ihtiyaç duyulması ve sıçan hepatositleriyle yapılan deneylerde alınan sonuçların insan hepatosit deneyleriyle büyük korelasyon göstermesidir. UDS'yi indükleyen kimyasallar arasında aflatoxin B₁, 2-asetaminofluren, benzo(a)piren ve dinitropirenler sayılabilmektedir. UDS testinin sadece DNA'daki değişiklikleri ölçtüğü, mutasyonları belirlemediği belirtilmektedir.⁷²

Hepatositlerin klonal büyümelerine olanak olmadığından, hepatositlerle mutajenez deneylerinin yapılması mümkün değildir. Bu güçlüğü aşmak için, hepatositler insan fibroblastları veya V79 Çin Hamster fibroblastları gibi çabuk proliferen hücrelerle birlikte kültürlenebilmektedir. Ayrıca, primer hepatositlerin düşük büyüme kapasitesi mikroçekirdek ve kardeş kromatid değişimi testlerinde kullanılabilirlikleri konusunda sorun oluşturmaktadır.⁷²

TOKSİK MADDELERCE İNDÜKLENEN KARACİĞER LEZYONLARI VE BUNUN ALTINDA YATAN BİYOKİMYASAL MEKANİZMALAR

KARAKTERİSTİK KARACİĞER LEZYONLARI

İzole hepatositlerde steatoz gelişimi gibi karaciğerde görülen bazı lezyonlar *in vitro* testlerle de izlenebilmektedir. Hepatotoksik bileşiklerin sıçan hepatosit kültür süspansiyonlarında steatozu indüklemesinin yağ asit metabolizmasında ve protein sentezinde azalma ile saptanması mümkündür.^{72,73} *In vivo* olarak steatoza neden olduğu bilinen tetrasiklin ve metotreksat ile *in vitro* deneylerde de steatoz oluşumu gösterilmiştir.⁷³ Ayrıca falloidin, eritromisin esteolat ve etinil estradiolle yapılan ça-

lışmalarda izole hepatositlerde, hepatosit kupletlerinde ve primer hepatosit kültürlerinde kanaliküler sekresyonun inhibe edildiği gösterilmiştir. Falloidinle aktin filamentlerinde gözlenen değişim hem in vivo hem de in vitro modellerde benzer şekilde belirlenmiştir.⁷⁴ Ancak; parasetamol, galaktozamin, baz eritromisin ve klorpromazinin in vivo koşullarda yol açtığı kolestasis in vitro koşullarda gösterilememiştir.⁷⁴ Bunun nedeni, örneğin; klorpromazinin uzun sürede geçirdiği biyotransformasyon sonucu kolestasis neden olması, ancak in vitro deneydeki gözlemin kısa süreli olması olabilmektedir.^{9,13}

İn vitro testlerde sıçan veya insan hepatositlerinde amiodaron maruziyetin ve metaboliti olan desetilamiodaronun multilamellar inklüzyon cisimcikleri oluşturduğu gözlenmiştir. Amiodaron ile myelinoid inklüzyonu da gözlenmektedir. Ayrıca, perheksilin maleat ve eritromisin ve trospektin sülfat gibi antibiyotikler kültür hepatositlerin lizozomlarının konsantrik membranlarında akümüle olmaktadır. Klofibrik asit, nafenopin ve beklofibrin asit gibi hiperlipidemik ajanların in vitro olarak peroksizom proliferasyonuna neden oldukları belirtilmektedir. İn vivo ve in vitro olarak ftalatların neden olduğu peroksizom proliferasyonu ve ditterkalinyuma maruz kalan sıçan hepatositlerinde mitokondriyal değişiklikler belirlenmiştir.⁹

BİYOKİMYASAL MEKANİZMALAR

Karbon tetraklorürün hepatoksik etkileri hem in vivo hem de in vitro olarak çalışılmıştır. Her iki durumda da primer sıçan hepatositlerinde azalmış protein ve lipoprotein sentezi ve artmış lipit peroksidasyonu belirlenmiştir. Ayrıca, karaciğer hasarı yaptığı bilinen kimyasallardan sonra CCl_4 verildiğinde, hem in vivo hem de in vitro olarak karaciğer hasarının potansiyalize olduğu görülmüştür. Ancak, farklı antioksidanların CCl_4 ile uygulanmasının oluşan karaciğer hasarını önlediği farklı in vitro ve in vivo çalışmalarla gösterilmiştir.⁷⁵ Parasetamol için de in vivo koşullarda gözlenen hepatotoksosite in vivo koşullarda da hamsterden izole hepatositler kullanılarak gösterilmiştir.⁷⁵ İn vitro koşullarda da parasetamolün reaktif metaboliti olan N-asetil p-benzokinoniminin

selüler proteinlere bağlanarak, sitotoksositeye neden olduğu belirtilmiştir.⁷⁴ Halotanın neden olduğu geçici karaciğer işlev bozukluğu ve daha nadiren gelişen hepatit de in vitro koşullarda izole hepatositler kullanarak gösterilmiştir.⁷²

Metaller ile indüklenen hepatoksisitede in vitro koşullarda izole hepatositler kullanarak gösterilmiştir. Metalleri uzaklaştırmak için kullanılan şelatör ajanların etkileri de incelenmiş, en etkin ve sitotoksositeyi en çok önleyen ajan “desferoksamin B” olarak belirlenmiştir.⁷²

TARTIŞMA

İzole hepatositlerin süspansiyon veya primer kültür hâlinde in vitro toksisite testlerinde kullanımına dair günümüze dek birçok çalışma yapılmıştır. Her ne kadar bu çalışmalarda pek çok farklı metodoloji kullanılmış olsa da bu çalışmaların sonuçları izole hepatosit modelinin potansiyel toksik bileşiklerin belirlenmesi ve mekanistik analizinde kullanımlarının avantajları ve sınırlamaları hakkında oldukça geniş bilgi sağlamaktadır.

Ekimden sonra hepatositlerde erken ortaya çıkan fenotipik değişiklikler yöntemin kullanımında büyük bir kısıtlamayı beraberinde getirmektedir. Ancak, gelişmiş kültür koşullarının kullanımını bu kısıtlamanın aşılmasını sağlayabilmektedir.

Uzun veya kısa dönem çalışmalarda araştırmacılara şu strateji önerilebilmektedir: İlk olarak bileşikler fibroblastlar ve hücre hatları gibi hepatik olmayan hücrelerde test edilebilmekte ve non-spesifik bir son nokta seçilerek IC_{50} değeri saptanabilmektedir. Sonrasında, bu veriler bileşiğin çözünürlüğünün ve intrinsek toksisitesinin belirlenmesinde kullanılabilir. İkinci basamakta ise bu veriler bileşiğin sıçan hepatositlerine uygulanması için kullanılabilir. Eğer bileşiğin karaciğer-spesifik lezyonlar yaratabileceğinden şüpheleniliyor ise, uygun karaciğer-spesifik indikatörler bulunmaktadır. Uzun dönemli toksisite testleri için ise birlikte kültürlenen hücreler kullanılabilir. Kültürler bileşiğe 1-2 gün veya 1-2 hafta her gün maruz bırakılmaktadır. Hayvan hepatositlerinde karaciğer-spesifik toksisiteye rastlanılmışsa

ve bu toksisitenin tür spesifik olduğu düşünülüyor ise, daha ileri bir basamak olarak insan hepatositleri kullanılmalıdır. Ayrıca, hepatositler nonhepatik hedef hücrelerle (örneğin; böbrek hücreleriyle) in vitro olarak ko-kültürlenerek kullanılabilir. Bu model ile karaciğer hücrelerince oluşturulan metabolitlerin diğer hücelere toksik olup olmadığı belirlenebilmektedir.

İntakt hepatosit modelleri ve genetik mühendisliği yardımıyla değiştirilmiş hücreler son zamanlarda özellikle mutajenlerin araştırılmasında ilgi çekmektedir. Ayrıca CYP450'lerde görülen genetik farklılıklar dâhil, insanlardaki tüm farklı olası durumların genetik mühendisliği yardımıyla değiştirilmiş hücreler tarafından taklit edilerek toksisite testlerinin yapılabileceği önerilmektedir.

SONUÇ

Son yıllarda diferansiye hepatositlerin ve karaciğer dilimlerinin hazırlanma ve kültürlenmeleriyle ilgili çok büyük gelişmeler sağlanmış; izole hepatositlerin ilaç metabolizması ve toksisite çalışmalarında sağlayabilecekleri yararlar hakkında önemli araştırmalar yapılmıştır.

Başta ilaç geliştirme çalışmaları olmak üzere, in vitro çalışmalar in vivo çalışmalara henüz tam bir alternatif değildir. Ayrıca, kültür hepatositlerinde gözlenen erken fenotipik değişiklikler, düşük proliferasyon kapasiteleri ve insan hepatositlerinin bulunma zorlukları gibi bazı sınırlamalar bulunmaktadır. Gelecekte bu çalışmalardan beklenen en

büyük gelişme; kültür koşullarının iyileştirilerek uzun ömürlü, transforme olmamış ve karaciğer-spesifik fonksiyonları tam olarak yansıtabilen primer hepatositlerinin in vivo koşulları daha iyi taklit edebilmesi ve bu koşullarla daha büyük korelasyon oluşturmasıdır. Bunun sağlanması için regülatör kuruluşlar ve bilim çevrelerince standardize metodolojilerin geliştirilmesi zorunludur.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Pınar Erkekoğlu; **Tasarım:** Pınar Erkekoğlu, Belma Koçer Gümüşel; **Denetleme/Danışmanlık:** Pınar Erkekoğlu, Belma Koçer Gümüşel; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Pınar Erkekoğlu; **Analiz ve/veya Yorum:** Pınar Erkekoğlu, Belma Koçer Gümüşel; **Kaynak Taraması:** Pınar Erkekoğlu; **Makalenin Yazımı:** Pınar Erkekoğlu, Belma Koçer Gümüşel; **Eleştirel İnceleme:** Pınar Erkekoğlu, Belma Koçer Gümüşel; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Pınar Erkekoğlu, Belma Koçer Gümüşel.

KAYNAKLAR

- Holme JA, Dybing E. The use of in vitro methods for hazard characterisation of chemicals. *Toxicol Lett.* 2002;127(1-3):135-41. [Crossref]
- Liebsch M, Spielmann H. Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology. *Toxicol Lett.* 2002;127(1-3):127-34. [Crossref]
- Eagle H, Foley GE. The cytotoxic action of carcinolytic agents in tissue culture. *Am J Med.* 1956;21(5):739-49. [Crossref]
- National Toxicology Program (NTP). Report of the International Workshop on In Vitro Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity. NTP; 2001. p.137.
- Buchwald M. Use of cultured human cells for biochemical analysis. *Clin Biochem.* 1984; 17(3):143-50. [Crossref]
- Erkekoglu P, Elnour A, Kocer-Gumusel B, Bhagavathula A, Shehab A. Cellular and molecular aspects of drug-induced liver toxicity: recent prominent mechanisms. *MOJ Toxicol.* 2015;1(5):156-61. [Crossref]
- Guillouzo A. Liver cell models in in vitro toxicology. *Environ Health Perspect.* 1998;106 Suppl 2:511-32. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Kandárová H, Letašiová S. Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods. *Interdiscip Toxicol.* 2011;4(3):107-13. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact.* 2007;168(1):66-73. [Crossref] [PubMed]
- Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* 2002;65(2):166-76. [Crossref] [PubMed]

11. Bessems M, 't Hart NA, Tolba R, Doorschodt BM, Leuvenink HG, Ploeg RJ, et al. The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model. *Lab Anim.* 2006;40(3):236-46. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
12. Brouwer KL, Thurman RG. Isolated perfused liver. *Pharm Biotechnol.* 1996;8:161-92. [[Crossref](#)]
13. Soldatow VY, Lecluyse EL, Griffith LG, Rusyn I. In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicol Res (Camb).* 2013;2(1):23-39. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
14. Ferrero JL, Brendel K. Liver slices as a model in drug metabolism. *Adv Pharmacol.* 1997;43:131-69. [[Crossref](#)]
15. Fasinu P, Bouic PJ, Rosenkranz B. Liver-based in vitro technologies for drug biotransformation studies-a review. *Curr Drug Metab.* 2012;13(2):215-24. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
16. Lerche-Langrand C, Toutain HJ. Precision-cut liver slices: characteristics and use in in vitro pharmaco-toxicology. *Toxicology.* 2000;153(1-3):221-53. [[Crossref](#)]
17. Howard RB, Christensen AK, Gibbs FA, Pesch LA. The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver. *J Cell Biol.* 1967;35(3):675-84. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
18. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol.* 1969;43(3):506-20. [[Crossref](#)]
19. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* 1976;13:29-83. [[Crossref](#)]
20. Strain AJ. Isolated hepatocytes: use in experimental and clinical hepatology. *Gut.* 1994;35(4):433-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
21. Graf J, Gautam A, Boyer JL. Isolated rat hepatocyte couplets: a primary secretory unit for electrophysiologic studies of bile secretory function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(20):6516-20. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
22. Quistorff B. Gluconeogenesis in periportal and perivenous hepatocytes of rat liver, isolated by a new high-yield digitonin/collagenase perfusion technique. *Biochem J.* 1985;229(1):221-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
23. Osypiw JC, Allen RL, Billington D. Subpopulations of rat hepatocytes separated by Percoll density-gradient centrifugation show characteristics consistent with different acinar locations. *Biochem J.* 1994;304(Pt 2):617-24. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
24. Bhogal RH, Hodson J, Bartlett DC, Weston CJ, Curbishley SM, Haughton E, et al. Isolation of primary human hepatocytes from normal and diseased liver tissue: a one hundred liver experience. *PLoS One.* 2011;6(3):e18222. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
25. Vons C, Pegorier JP, Ivanov MA, Girard J, Melcion C, Cordier A, et al. Comparison of cultured human hepatocytes isolated from surgical biopsies or cold-stored organ donor livers. *Toxicol In Vitro.* 1990;4(4-5):432-34. [[Crossref](#)]
26. Łaba A, Ostrowska A, Patrzalek D, Paradowski L, Lange A. Characterization of human hepatocytes isolated from non-transplantable livers. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2005;53(5):442-53.
27. Chesné C, Guyomard C, Fautrel A, Poullain MG, Frémond B, De Jong H, et al. Viability and function in primary culture of adult hepatocytes from various animal species and human beings after cryopreservation. *Hepatology.* 1993;18(2):406-14. [[Crossref](#)]
28. Fuller BJ, Petrenko AY, Rodriguez JV, Somov AY, Balaban CL, Guibert EE. Biopreservation of hepatocytes: current concepts on hypothermic preservation, cryopreservation, and vitrification. *Cryo Letters.* 2013;34(4):432-52.
29. Abdennebi HB, Steghens JP, Margonari J, Ramella-Virieux S, Barbieux A, Boillot O. Evaluation of parenchymal and nonparenchymal cell injury after different conditions of storage and reperfusion. *Transpl Int.* 1998;11(5):365-72. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
30. Diener B, Utesch D, Beer N, Dürk H, Oesch F. A method for the cryopreservation of liver parenchymal cells for studies of xenobiotics. *Cryobiology.* 1993;30(2):116-27. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
31. Guillouzo A, Morel F, Fardel O, Meunier B. Use of human hepatocyte cultures for drug metabolism studies. *Toxicology.* 1993;82(1-3):209-19. [[Crossref](#)]
32. Steward AR, Dannan GA, Guzelian PS, Guengerich FP. Changes in the concentration of seven forms of cytochrome P-450 in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Mol Pharmacol.* 1985;27(1):125-32. [[PubMed](#)]
33. Donato MT, Viitala P, Rodriguez-Antona C, Lindfors A, Castell JV, Raunio H, et al. CYP2A5/CYP2A6 expression in mouse and human hepatocytes treated with various in vivo inducers. *Drug Metab Dispos.* 2000;28(11):1321-6. [[PubMed](#)]
34. Pascucci JM, Drocourt L, Gerbal-Chaloin S, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ. Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor. *Eur J Biochem.* 2001;268(24):6346-58. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
35. Westerink WM, Schoonen WG. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro.* 2007;21(8):1592-602. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
36. Kono Y, Yang S, Roberts EA. Extended primary culture of human hepatocytes in a collagen gel sandwich system. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1997;33(6):467-72. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
37. Fardel O, Lecreur V, Guillouzo A. Regulation by dexamethasone of P-glycoprotein expression in cultured rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 1993;327(2):189-93. [[Crossref](#)]
38. Stéphenne X, Najimi M, Sokal EM. Hepatocyte cryopreservation: is it time to change the strategy? *World J Gastroenterol.* 2010;16(1):1-14. [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
39. Pan J, Hong JY, Li D, Schuetz EG, Guzelian PS, Huang W, et al. Regulation of cytochrome P450 2B1/2 genes by diallyl sulfone, disulfiram, and other organosulfur compounds in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 1993;45(11):2323-9. [[Crossref](#)]
40. Schuetz EG, Li D, Omiecinski CJ, Muller-Eberhard U, Kleinman HK, Elswick B, et al. Regulation of gene expression in adult rat hepatocytes cultured on a basement membrane matrix. *J Cell Physiol.* 1988;134(3):309-23. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
41. Schuetz JD, Schuetz EG. Extracellular matrix regulation of multidrug resistance in primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes. *Cell Growth Differ.* 1993;4(1):31-40. [[PubMed](#)]
42. Adams RLP. Work TS, Burton RH. *Cell Culture for Biochemists.* 1st ed. Amsterdam; New York: Elsevier/North Holland Biomedical Press; 1980. p.292.
43. Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB J.* 1999;13(14):1883-900. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
44. Weiskirchen R, Gressner AM. Isolation and culture of hepatic stellate cells. *Methods Mol Med.* 2005;117:99-113. [[Crossref](#)]
45. Fleischer S, Kervina M. Subcellular fractionation of rat liver. *Methods Enzymol.* 1974;31:6-41. [[Crossref](#)]
46. Groneberg DA, Grosse-Siestrup C, Fischer A. In vitro models to study hepatotoxicity. *Toxicol Pathol.* 2002;30(3):394-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
47. Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods Mol Biol.* 2010;640:1-40. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
48. Han D, Hanawa N, Saberi B, Kaplowitz N. Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;291(1):G1-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
49. Macé K, Offord EA, Harris CC, Pfeifer AM. Development of in vitro models for cellular and molecular studies in toxicology and chemoprevention. *Arch Toxicol Suppl.* 1998;20:227-36. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

50. Stoddart MJ. Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*. Vol. 740. 1st ed. New York: Humana Press/Springer; 2011. p.240. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
51. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 1986;89(2):271-7. [[Crossref](#)]
52. Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016;2016(4):pdb.prot087379.
53. Friedrich J, Eder W, Castaneda J, Doss M, Huber E, Ebner R, et al. A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay. *J Biomol Screen*. 2007;12(7):925-37. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
54. Zuang V. The neutral red release assay: a review. *Altern Lab Anim*. 2001;29(5):575-99. [[PubMed](#)]
55. Smith CG, Grady JE, Northam JI. Relationship between cytotoxicity in vitro and whole animal toxicity. *Cancer Chemother Rep*. 1963;30:9-12. [[PubMed](#)]
56. Reed DJ, Fariss MW, Pascoe GA. Mechanisms of chemical toxicity and cellular protection systems. *Fundam Appl Toxicol*. 1986;6(4):591-7. [[Crossref](#)]
57. Macé K, Offord EA, Harris CC, Pfeifer AM. Development of in vitro models for cellular and molecular studies in toxicology and chemoprevention. *Arch Toxicol Suppl*. 1998;20:227-36. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
58. Chaudhari P, Prasad N, Tian L, Jang YY. Determination of functional activity of human iPSC-derived hepatocytes by measurement of CYP metabolism. *Methods Mol Biol*. 2016;1357:383-94. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
59. Neupert D, Glöckner R, Neupert G, Müller D. Ultrastructural changes in hepatocytes of precision-cut rat liver slices after incubation for 24 and 48 hours. *Exp Toxicol Pathol*. 2003;54(5-6):481-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
60. Shen C, Meng Q. Prediction of cytochrome 450 mediated drug-drug interactions by three-dimensional cultured hepatocytes. *Mini Rev Med Chem*. 2012;12(10):1028-36. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
61. Donato MT, Lahoz A, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Curr Drug Metab*. 2008;9(1):1-11. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
62. Berthou F, Goasduff T, Dréano Y, Ménez JF. Caffeine increases its own metabolism through cytochrome P4501A induction in rats. *Life Sci*. 1995;57(6):541-9. [[Crossref](#)]
63. Greim H, Andrae U, Forster U, Schwarz L. Application, limitations and research requirements of in vitro test systems in toxicology. *Arch Toxicol Suppl*. 1986;9:225-36. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
64. Villa P, Bégue JM, Guillouzo A. Effects of erythromycin derivatives on cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*. 1984;33(24):4098-101. [[Crossref](#)]
65. Rasmussen MK, Balaguer P, Ekstrand B, Daujat-Chavanieu M, Gerbal-Chaloin S. Skatole (3-methylindole) is a partial Aryl hydrocarbon receptor agonist and induces CYP1A1/2 and CYP1B1 expression in primary human hepatocytes. *PLoS One*. 2016;11(5):e0154629. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
66. Smith MT, Thor H, Orrenius S. Toxic injury to isolated hepatocytes is not dependent on extracellular calcium. *Science*. 1981;213(4513):1257-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
67. Li AP. Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development. *Chem Biol Interact*. 2007;168(1):16-29. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
68. Fautrel A, Chesné C, Guillouzo A, de Sousa G, Placidi M, Rahmani R, et al. A multicentre study of acute in vitro cytotoxicity in rat liver cells. *Toxicol In Vitro*. 1991;5(5-6):543-7. [[Crossref](#)]
69. Ratanasavanh D, Riche C, Begue J, Guillouzo A. Les hepatocytes en culture: utilisation en pharmacotoxicologie. In: Adolphe M, Guillouzo A, eds. *Metodes In Vitro en Pharmacotoxicologie*. Vol 170. 1st ed. Paris: Les Editions INSERM; 1998. p.1-16.
70. Li AP, Lu C, Brent JA, Pham C, Fackett A, Ruegg CE, et al. Cryopreserved human hepatocytes: characterization of drug-metabolizing enzyme activities and applications in higher throughput screening assays for hepatotoxicity, metabolic stability, and drug-drug interaction potential. *Chem Biol Interact*. 1999;121(1):17-35. [[Crossref](#)]
71. Gómez-Lechón MJ, Lahoz A, Gombau L, Castell JV, Donato MT. In vitro evaluation of potential hepatotoxicity induced by drugs. *Curr Pharm Des*. 2010;16(17):1963-77. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
72. Persson M, Løye AF, Jacquet M, Mow NS, Thougard AV, Mow T, et al. High-content analysis/screening for predictive toxicology: application to hepatotoxicity and genotoxicity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2014;115(1):18-23. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
73. Amacher DE, Martin BA. Tetracycline-induced steatosis in primary canine hepatocyte cultures. *Fundam Appl Toxicol*. 1997;40(2):256-63. [[Crossref](#)]
74. Hardwick SJ, Wilson JW, Fawthrop DJ, Boobis AR, Davies DS. Paracetamol toxicity in hamster isolated hepatocytes: the increase in cytosolic calcium accompanies, rather than precedes, loss of viability. *Arch Toxicol*. 1992;66(6):408-12. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
75. Chan KW, Ho WS. Anti-oxidative and hepatoprotective effects of lithospermic acid against carbon tetrachloride-induced liver oxidative damage in vitro and in vivo. *Oncol Rep*. 2015;34(2):673-80. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]