

Porównanie aktywności metabolicznej bioreaktora wątrobowego z perfundowaną wątrobą

WOJCIECH KARLIK, PATRYCJA SZTUK, ADAM BĄKAŁA,
ALEKSANDER GŁOWAŁA, DANUTA GRONO, MARIA WIECHETEK

Zakład Farmakologii i Toksykologii Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW,
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Karlik W., Szuk P., Bąkała A., Głowała A., Grono D., Wiechetek M.

Comparative study of metabolic activity of liver bioreactor with perfused liver

Summary

The aim this study was to compare metabolic activity of a hollow fiber bioreactor with a perfused liver. A special construction of a hollow fiber bioreactor was used with freshly isolated rat hepatocytes. After isolation, hepatocytes were incubated in the bioreactor for the duration of 3 hrs in the following conditions: 100 ml medium Hanks Balances Salts Solution supplemented with 4% albumin, 2 mM ornithine, 10 mM ammonium chloride and 6 mM ethanol were used; the medium was perfused in a circulated system for 25 ml/min; samples of the medium were taken to estimate ammonia, urea, glucose, lactate, ethanol, AST and ALT activity before and after 5 min and every 15 min of perfusion time. The same experimental condition was used in the perfused rat liver system. Utilization of ammonia was different in both systems and amounted to: 8.89 and 5.23 $\mu\text{mol/h/g}$ hepatocytes in the bioreactor and perfused liver, respectively. Urea production was: 2.35 and 8.22 $\mu\text{mol/h/g}$ hepatocytes, respectively. The largest differences between the compared systems were observed in the glucose and lactate metabolism. The bioreactor did not release glucose and lactate during the entire time of perfusion. In contrast, perfused liver intensively released glucose (31.32 $\mu\text{mol/hr/g}$ cells) and produced lactate (29.42 $\mu\text{mol/hr/g}$ cells). On the other hand, there was no statistically significance difference in the rate of ethanol metabolism between both systems, which amounted to 2.55 and 2.04 $\mu\text{mol/h/g}$ hepatocytes in the bioreactor and perfused liver, respectively. The results indicate that a bioreactor with freshly isolated hepatocytes is not bioequivalent to a perfused liver if estimation is made on the basis of ureogenesis and/or glucose utilization. However, ethanol utilization gives evidence that the metabolic activity of the bioreactor is comparable with a perfused liver. On the basis of the obtained results it can be concluded that the difference in metabolic activity of the bioreactor and perfused liver is connected with catabolic state and disturbances of energy metabolism in freshly isolated hepatocytes. In such a condition HBSS is not the proper medium for the recovery of homeostasis. To estimate the metabolic activity of freshly isolated hepatocytes cultivated in various *in vitro* systems such as a marker of model usefulness it is suggested to use the activity of inducible enzymes, but not constituent enzymes.

Keywords: hepatocytes, fiber bioreactor, liver

W badaniach funkcji wątroby wykorzystuje się wiele modeli *in vitro*, z których modelem spełniającym najwięcej wymagań fizjologicznych, ważnych dla funkcjonowania izolowanych hepatocytów, są bioreaktory kapilarne (bioreaktor typu hollow-fiber) (3, 4, 6, 7, 11, 18). W porównaniu z innymi modelami doświadczalnymi, bioreaktor jest niewątpliwie najbardziej zaawansowany konstrukcyjnie: zapewnia nie tylko kontakt komórek z pożywką i podłożem stałym, ale umożliwia również przepływ medium odżywczego oraz właściwą polaryzację komórek. Dodatkowo, podobnie jak wątroba, bioreaktor posiada co najmniej 2 kompartmenty: centralny i tkankowy, co jest niezwykle istotne

w badaniach kinetycznych. Moduł bioreaktora przeznaczony specjalnie do hodowli izolowanych hepatocytów został opracowany przez zespół Zakładu Farmakologii i Toksykologii SGGW we współpracy z Instytutem Biocybernetyki PAN. W uprzednich badaniach udowodniono, że opracowany moduł nadaje się do hodowli hepatocytów (13) oraz porównano jego aktywność z innymi prostszymi układami *in vitro* w zakresie nasilenia ureogenezy (14). Proponujemy, aby ocenę bioreaktorów wątrobowych przeprowadzać w odniesieniu do modelu perfundowanej wątroby, jako układu wzorcowego dla bioreaktorów, oraz aby powyższe porównanie przeprowadzać w medium ubogim

w składniki odżywcze. Dotychczas takich badań nie przeprowadzano. Istotna jest również odpowiedź na pytanie, jakie parametry należy badać, a z jakich zrezygnować, aby otrzymane wyniki miały wartość praktyczną oraz pozwalały na wyznaczenie współczynników ekstrapolacji danych uzyskiwanych w badaniach *in vitro* do warunków *in vivo*. Celem badań było porównanie aktywności metabolicznej skonstruowanego przez autorów bioreaktora wątrobowego z aktywnością perfundowanej wątroby, w specyficznych warunkach eksperymentalnych, z wykorzystaniem medium ubogiego w składniki odżywcze.

Materiały i metody

W doświadczeniu wykorzystano szczury szczepu Wistar, samce, o średniej masie ciała 450 g, od których pozyskiwano wątrobę do perfuzji lub izolacji hepatocytów.

Moduł bioreaktora. W eksperymencie wykorzystano moduł bioreaktora opracowany specjalnie do hodowli świeżo izolowanych hepatocytów, skonstruowany przez Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej PAN we współpracy z Katedrą Farmakologii i Toksykologii SGGW w Warszawie. Moduł oparty jest na schemacie budowy hemofiltera z obudową wykonaną z polipropylenu. Wewnątrz obudowy znajduje od 600 do 800 kapilar (wykonanych z polisulfonu) o długości 140 mm, średnicy wewnętrznej 360 μm i grubości ścian 60 μm . W modułach wykorzystanych w pracy punkt odcięcia membran kapilarnych wahał się w granicach 50-250 kD. Całkowita powierzchnia zewnętrzna kapilar umieszczonych w module wynosiła 0,10-0,18 m^2 . Pod względem funkcjonalnym moduł bioreaktora posiada 2 kompartmenty oddzielone membraną kapilar: kompartment centralny, który jest sumą połączonych przestrzeni wewnętrznych kapilar oraz kompartment zewnętrzny (tkankowy, komórkowy), który stanowi przestrzeń znajdującą się wewnątrz obudowy (na zewnątrz kapilar). Przez kompartment centralny przepływa medium odżywcze, a w kompartmentcie zewnętrznym znajdują się komórki. Oba kompartmenty posiadają niezależne porty wejścia i wyjścia.

Izolacja hepatocytów. Hepatocyty izolowano metodą dwustopniowej perfuzji wątroby zgodnie z procedurą opisaną przez Seglana (19) z niewielkimi modyfikacjami. Do inkubacji w bioreaktorze przeznaczono tylko te populacje komórek, których przeżywalność wynosiła powyżej 85%, a wydajność izolacji przekraczała 10 g hepatocytów/wątrobę. Wyizolowane hepatocyty w ilości 10 g umieszczano w module bioreaktora metodą aktywnego osadzania na wewnętrznej powierzchni kapilar (13).

Perfuzja bioreaktora. Bioreaktor z osadzonymi hepatocytami, po zamknięciu portów bocznych, podłączano portami centralnymi do pompy perystaltycznej w celu prowadzenia perfuzji. Jako medium perfuzyjne zastosowano bufor Hanksa (100 ml) z dodatkiem 4% albuminy, 2 mM ornityny, 10 mM chlorku amonowego i 6 mM etanolu. Bioreaktor perfundowano przez 3 godziny z szybkością 2,5 ml/min./g hepatocytów. Przed rozpoczęciem perfuzji, w 5. minucie trwania perfuzji, a następnie co 15 minut, pobierano po 2 ml medium z przeznaczeniem do analiz biochemicznych.

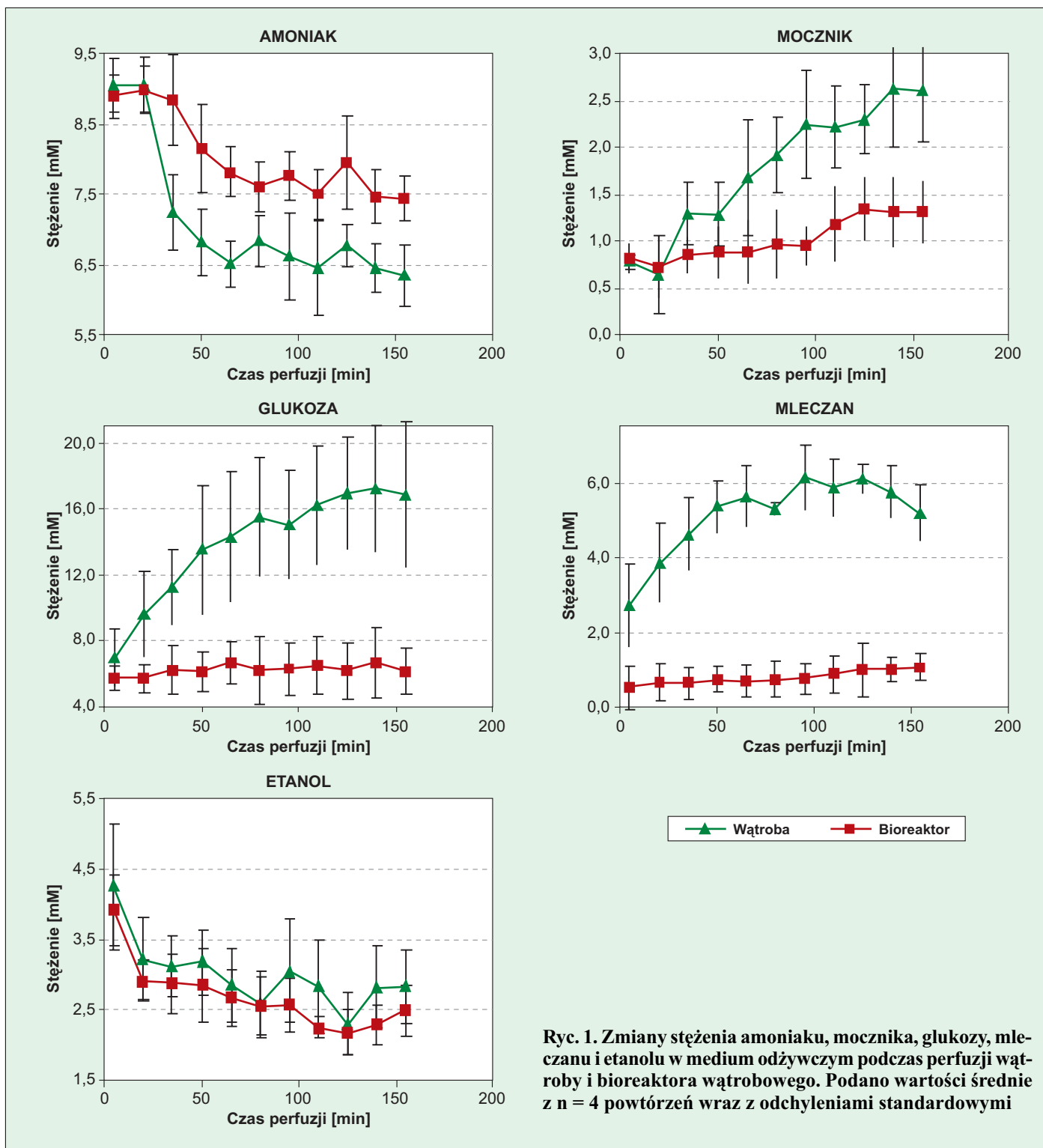
Perfuzja wątroby *in situ*. Perfuzję wątroby prowadzono *in situ*, wprowadzając bufor Hanksa do żyły wrotnej i odbierając go z żyły głównej tylnej od strony prawego przedsionka serca. Stosowano identyczne warunki perfuzji jak w przypadku bioreaktora. Szybkość perfuzji ustalano przyjmując, że masa wątroby wynosi 6,5% masy ciała szczura, a masa hepatocytów 60% masy wątroby. W celu oceny warunków przepływu przez wątrobę prowadzono pomiar ciśnienia medium na wejściu i wyjściu z wątroby. Po zakończeniu eksperymentu wątroby ważono.

Analizy chemiczne. W próbkach medium, pobieranych podczas perfuzji bioreaktora i wątroby, oznaczano stężenie amoniaku, mocznika, mleczanu, glukozy, etanolu oraz aktywność aminotransferaz (ALT i AST). Wszystkie oznaczenia wykonywano przy użyciu odpowiednich testów kolorymetrycznych firmy Sigma.

Analiza statystyczna. Analizę zmian metabolitów w czasie perfuzji przeprowadzono testem wieloczynnikowej analizy wariancji. Do porównania wyników uzyskanych w obydwu układach doświadczalnych stosowano test t-Studenta. W każdym przypadku porównywane średnie pochodziły z 4 niezależnych doświadczeń.

Wyniki i omówienie

Zarówno w doświadczeniach z perfundowaną wątrobą, jak i bioreaktorem obserwowano spadek stężenia amoniaku w medium, któremu towarzyszył wzrost stężenia mocznika (ryc. 1). Po zakończeniu perfuzji stężenie amoniaku w medium perfundującym bioreaktor wynosiło 7,43 mM, podczas gdy w perfuzacji wątroby było o ponad 1 mM niższe i wynosiło 6,34 mM. W obydwu układach doświadczalnych szczególnie intensywny spadek stężenia amoniaku obserwowano w ciągu pierwszych 50 min. perfuzji, natomiast od 80. minuty stężenie amoniaku utrzymywało się na niemal niezmiennym poziomie do końca trwania eksperymentu (ryc. 1). Porównując dynamikę zmian stężenia amoniaku można zauważyć, że w modelu perfundowanej wątroby spadek stężenia amoniaku był większy niż w modelu bioreaktora. Należy jednak podkreślić, iż stwierdzona różnica nie świadczy o mniejszym wykorzystaniu amoniaku przez hepatocyty w bioreaktorze. Oceniając bowiem otrzymane wyniki, należy uwzględnić fakt, iż przez pierwsze 30 minut perfuzji zachodzi proces dystrybucji amoniaku z kompartmentu centralnego bioreaktora do kompartmentu tkankowego. Dystrybucja wszystkich badanych metabolitów została wyznaczona w innym eksperymencie, w którym wykazano, że czas wyrównania stężeń między kompartmentem centralnym a kompartmentem dla stosowanego modułu bioreaktora (przy szybkości przepływu 25 ml/min. i 100 ml krążącego buforu perfuzyjnego) wynosi około 30 min. (danych nie zamieszczono). A zatem dynamikę wykorzystania amoniaku należy analizować poczynając od 35 min. doświadczenia. Od 35. minuty perfuzji krzywe ilustrujące zmiany stężenia amoniaku w obydwu modelach doświadczalnych miały równoległy przebieg opisany funkcją eksponentialną, znaną z farmakokinetyki pierwszego



Ryc. 1. Zmiany stężenia amoniaku, mocznika, glukozy, mleczanu i etanolu w medium odżywczym podczas perfuzji wątroby i bioreaktora wątrobowego. Podano wartości średnie z $n = 4$ powtórzeń wraz z odchyleniami standardowymi

rzędu. Wykorzystując powyższą zależność można z krzywej regresji precyzyjnie obliczyć stopień wykorzystania amoniaku. Dane przedstawione w tabeli 1. wskazują, że wykorzystanie amoniaku w modelu z bioreaktorem było o ponad 60% większe niż w modelu perfundowanej wątroby, mimo że bezwzględne stężenie amoniaku w perfuzacji bioreaktora było wyższe przez cały okres objęty doświadczeniem (ryc. 1).

Stężenie mocznika w medium po 3-godzinnej perfuzji wątroby było ok. 2-razy wyższe od stwierdzonego w tym czasie w doświadczeniu z bioreaktorem

i wynosiło, odpowiednio, 2,61 i 1,31 mM (ryc. 1). Przez cały okres perfuzji obserwowano liniowy wzrost stężenia mocznika w obydwu badanych modelach doświadczalnych, przy czym ogólna ilość zsyntetyzowanego mocznika w układzie perfundowanej wątroby była ponad 3-krotnie większa niż w bioreaktorze (tab. 1).

Na podstawie stechiometrycznych przeliczeń reakcji syntezy mocznika z amoniaku można wnioskować, że w perfundowanej wątrobie amoniak wykorzystywany był do syntezy mocznika, natomiast w bioreak-

torze znaczna część amoniaku (ok. 50%) wykorzystywana była w innych procesach niż synteza mocznika. Ponadto otrzymane wyniki wskazują, że w perfundowanej wątrobie znaczna część mocznika (ponad 60%) syntetyzowana była z innych źródeł niż dodany do medium NH_4Cl . Należy zatem podkreślić, że w odniesieniu do natężenia zużywania amoniaku i ureogenezy porównywane modele doświadczalne nie są biorównoważne.

Podobnie jak w przypadku mocznika, znaczące statystycznie różnice między porównywanymi układami doświadczalnymi zaobserwowano w odniesieniu do stężenia glukozy i mleczanu w medium (ryc. 1). W układzie perfundowanej wątroby obserwowano niemal liniowy wzrost stężenia glukozy w perfuzacji, któremu towarzyszył wzrost stężenia mleczanu. Stężenie mleczanu w pierwszych 60 min. perfuzji wątroby wzrosło do wartości blisko 6 mM i utrzymywało się na tym poziomie do końca doświadczenia (ryc. 1). Natomiast w układzie z bioreaktorem nie obserwowano istotnych zmian stężenia glukozy i mleczanu w medium podczas trwania eksperymentu (ryc. 1). Powyższe zmiany stężeń badanych metabolitów w perfuzacji znajdują odzwierciedlenie w różnicach kinetyki uwalniania glukozy i mleczanu w porównywanych modelach (tab. 1). Tak więc, podobnie jak w przypadku ureogenezy, również w odniesieniu do natężenia procesów glikogenolizy i glikolizy porównywane modele doświadczalne okazały się różne.

W prezentowanej pracy wykorzystano bioreaktor specjalnie przystosowany do pracy na izolowanych hepatocytach szczura. Moduł bioreaktora miał odpowiednio dobrane membrany polisulfonowe, które w osobnych eksperymentach uznano za najbardziej biozgodne (5, 9, 10, 12). Wielkość powierzchni membran oraz objętość kompartmentu komórkowego została dostosowana do ilości hepatocytów uzyskiwanych w standardowej izolacji z wątroby szczura, metodą dwustopniowej perfuzji (500×10^6 hep.). Odpowiednie rozmiary modułu oraz sprawdzony sposób umieszczenia komórek na membranach gwarantowały przyleganie do ścian kapilar wszystkich wprowadzonych komórek i jednocześnie nie zmieniały istotnie transportu przez błonę badanych metabolitów. Mimo powyższych cech, po porównaniu natężenia ureogenezy i przemian glukozy, okazało się, że w zastosowanych warunkach doświadczenia konstrukcja bioreaktora nie spełniała pokładanych w nim oczekiwań. Nie uzyskano dowodu na to, że bioreaktor, dzięki zapewnieniu w maksymalnym stopniu wymagań fizjologicznych hepatocytów, mógłby stanowić bardziej wiarygodny model doświadczalny w zakresie ekstrapolacji danych doświadczalnych niż obecnie dostępne modele *in vitro*. Uzyskany wynik jest zaskakujący, jeśli uwzględnić fakt, że w wielu publikacjach zwraca się

Tab. 1. Wykorzystanie amoniaku i etanolu oraz produkcja mocznika, glukozy i mleczanu w modelu bioreaktora i perfundowanej wątroby obliczone między 35. a 95. minutą perfuzji

Rodzaj modelu	Wykorzystanie amoniaku	Produkcja mocznika	Produkcja glukozy	Produkcja mleczanu	Wykorzystanie etanolu
	$\mu\text{moli} / [\text{godz} \cdot \text{g hepatocytów}]$				
Bioreaktor	8,89 ± 2,90	2,35 ± 0,44	1,35 ± 1,4	1,55 ± 1,51	2,55 ± 1,13
Wątroba	5,23 ± 1,39	*8,22 ± 1,10	*31,32 ± 9,1	*29,42 ± 2,32	2,04 ± 1,26

Objaśnienia: obliczeń dokonano z krzywych regresji funkcji stężenia od czasu, wyznaczonych z uwzględnieniem zmian stężenia poszczególnych związków w przebiegu całego eksperymentu. Uzyskane wartości zostały przeliczone na 1 g hepatocytów, przy założeniu, że 60% masy wątroby szczura stanowią hepatocyty. W tabeli zamieszczono średnie arytmetyczne z 4 doświadczeń ± SD. * – $p < 0,01$ między modelami doświadczalnymi

uwagę na podobieństwo aktywności metabolicznej izolowanych hepatocytów do aktywności wątroby *in vivo*, nawet w tak prostych układach doświadczalnych, jak zawiesina komórkowa (1, 2, 8, 15-17, 20). Dodatkowo, w badaniach własnych wykazano, że zastosowany bioreaktor jest bardziej uniwersalnym modelem niż zawiesina czy kultura jednowarstwowa (14).

Uzyskane dane mogą sugerować, że w niniejszym eksperymencie wybór wskaźników aktywności hepatocytów, w połączeniu z zastosowanym medium, jest nieodpowiedni. Wydaje się, że w zaproponowanych warunkach eksperymentalnych lepszymi wskaźnikami do porównania aktywności metabolicznej różnych modeli *in vitro* wykorzystujących świeżo izolowane hepatocyty powinny być raczej reakcje katalizowane przez enzymy indukcyjne (głównie superrodziny CYP450). Oceniane w niniejszej pracy procesy (ureogeneza i przemiany glukozy) katalizowane są przez enzymy konstytucyjne, w których czynnikiem limitującym dla reakcji jest podaż substratów, podczas gdy w reakcjach katalizowanych przez enzymy indukcyjne limitująca jest raczej „podaż” enzymu. Wiadomo, że podczas izolacji hepatocytów dochodzi przede wszystkim do wyczerpania zasobów energetycznych komórki (a nie puli dostępnych enzymów), stąd bezpośrednio po izolacji dają się zauważyć przede wszystkim różnice w zakresie przemian limitowanych dostępnością substratów. W stanie nasilonego katabolizmu, stwierdzanego w hepatocytach po procedurze izolacji, warunki fizjologiczne gwarantowane przez model badawczy mają znaczenie drugorzędne. Bardziej istotny jest wówczas łatwy dostęp składników odżywczych. W eksperymentach, w których porównywano nasilenie ureogenezy w zawieszynie, hodowli płytkowej i bioreaktorze, bezpośrednio po izolacji hepatocytów, najwyższe natężenie ureogenezy stwierdzono właśnie w zawieszynie komórkowej, która pozbawiona jest barier dyfuzyjnych, a więc zapewnia najlepszą dostępność substratów (14). Z upływem czasu, w prawidłowo prowadzonej hodowli hepatocytów, bilans energetyczny komórek zostaje przywrócony, ale ze względu na ograniczoną syntezę białek enzymatycznych oraz niewielką stymulację ze strony ksenobioty-

ków, między poszczególnymi układami *in vitro* pojawiają się istotne różnice w zakresie aktywności enzymów indukcyjnych. W kulturze zawieszinowej już po 4 godz., a w kulturze płytkowej dopiero po 4-5 dniach silnie spada aktywność CYP450 (15, 16, 21). Warto tutaj zaznaczyć, że w przedstawionym eksperymencie do perfuzji zastosowano dość ubogie (pozbawione aminokwasów, hormonów i mikroelementów) medium. W takiej sytuacji komórki bardzo wolno wychodzą ze stanu katabolicznego. Stąd wpływ procedury izolacji na funkcjonowanie hepatocytów umieszczonych w bioreaktorze okazał się szczególnie widoczny.

Powyższe wyjaśnienia braku biorównoważności bioreaktora z perfundowaną wątrobą nie znalazły odzwierciedlenia w danych dotyczących zdolności do metabolizowania etanolu przez perfundowaną wątrobę i bioreaktor. W obydwu modelach doświadczalnych obserwowano identyczny spadek stężenia etanolu w medium perfundującym (ryc. 1); był on szczególnie intensywny w pierwszych 30 min. perfuzji. Ponieważ pierwszy etap zmian stężenia etanolu związany jest z dystrybucją tego związku do kompartmentu tkankowego, analizę eliminacji przeprowadzono poczynając od 35. minuty perfuzji. Okazało się, że wykorzystanie etanolu oceniane po okresie dystrybucji nie różniło się istotnie w badanych modelach (tab. 1). Na tej podstawie należałoby stwierdzić, iż opracowany bioreaktor i perfundowana wątroba są układami w pełni biorównoważnymi. Jednak na tle poprzednich wyjaśnień, wynikających z porównania ureogenezy i glikolizy, trudno jest jednoznacznie wytłumaczyć wyniki dotyczące metabolizmu etanolu, szczególnie, że dehydrogenaza alkoholowa nie jest enzymem indukcyjnym. Można przypuszczać, że dostępność NAD niezbędne do utlenienia etanolu była podobna w porównywanych układach, mimo procedury izolacji komórek i zastosowania ubogiej pożywki.

Z przeprowadzonych badań wynika, że wybór indikatora może mieć decydujące znaczenie dla oceny jakości i przydatności danego modelu doświadczalnego do badań *in vitro*. W przypadku bioreaktora zbudowanego na bazie świeżo izolowanych hepatocytów, perfundowanego dodatkowo medium ubogim w składniki odżywcze, poziom ureogenezy, analiza przemian glukozy i metabolizmu etanolu są niewłaściwie dobranymi markerami, ponieważ prowadzą do rozbieżnych wyników. Przeprowadzony eksperyment sugeruje jednocześnie, że w przypadku izolowanych hepatocytów obserwacja procesów kontrolowanych przez układy enzymatyczne o charakterze konstytucyjnym zwiększa ryzyko uzyskania rozbieżnych wyników między różnymi układami *in vitro*. Ponieważ wspomniane rozbieżności są spowodowane prawdopodobnie silnym stanem katabolicznym świeżo izolowanych hepatocytów, częściowym rozwiązaniem powyższego problemu wydaje się przeprowadzanie badań porównawczych po dłuższym okresie stabilizacji komórek, w pożywce bogatej w składniki odżywcze. Jednak z dru-

giej strony, zbyt długi okres stabilizacji zmniejsza aktywność enzymów indukcyjnych, które należałoby polecić jako odpowiednie markery dla porównania różnych modeli *in vitro* opartych na izolowanych hepatocytach.

Piśmiennictwo

1. Benford D. J., Hubbard S. A.: Preparation and culture of mammalian cells, [w:] Snell K., Mullock B. (red.): Biochemical Toxicology. A Practical Approach, IRL Press Ltd., Oxford 1987, 57-82.
2. Berry M. N., Edwards A. M., Barritt G. J.: Utilization of hepatocytes for drug studies, [w:] Burdon R. H., van Knippenberg P. H. (red.): Isolated Hepatocytes. Preparation, Properties and Applications. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford 1991, 179-200.
3. Dixit V. D.: Development of a bioartificial liver using isolated hepatocytes. Artificial Organs 1994, 18, 371-384.
4. Flendrich L. M. F., Soe J. S., Jorning G. G. A.: In vitro evaluation of a novel bioreactor based on an integral oxygenator and a spirally wound nonwoven polyester matrix for hepatocyte culture as small aggregates. J. Hepatol. 1997, 26, 1379-1392.
5. Garwacki S., Karlik W., Wiechetek W., Weryński A.: Evaluation of metabolic activity of hepatocytes encapsulated in the hollow fiber, [w:] Capocaccia L., Merli M., Riggio O. (red.): Advances in Hepatic Encephalopathy and Metabolic Nitrogen Exchange. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida 1995, 495-499.
6. Gerlach J. G.: Development of a hybrid liver support system: a review. Int. J. Artif. Organs 1996, 19, 645-654.
7. Gerlach J. G., Encke J. E., Hole O. H., Muller C. M., Ryan C. R., Neuhaus P. N.: Bioreactor for a large scale hepatocyte in vitro perfusion. Transplantation 1994, 58, 984-988.
8. Griffin S. J., Houston J. B.: Comparison of fresh and cryopreserved rat hepatocyte suspensions for the prediction of in vitro intrinsic clearance. Drug Metabolism Disposition 2004, 32, 552-558.
9. Józwiak A., Karlik W., Weryński A., Wiechetek M.: Polysulfone membrane promotes hepatocytes adhesion in non-serum, non-hormones medium. XIth World Congress of the International Soc. Artif. Organs, Providence. Artif. Organs 1997, 21, 207.
10. Józwiak A., Karlik W., Wiechetek M., Weryński A.: Attachment and metabolic activity of hepatocytes cultivated on selected polymeric membranes. Int. J. Artif. Organs 1998, 21, 460-466.
11. Kamlot A. K., Rozga J. R., Watanabe F. W., Demetriou A. D.: Review: artificial liver support systems. Biotechnol. Bioeng. 1996, 50, 382-391.
12. Karlik W., Józwiak A., Weryński A., Wiechetek M.: Polysulfone membrane improves hepatocytes metabolism and reduce damaging effect of heparin on hepatocytes. XIth World Congress of the International Soc. Artif. Organs, Providence. Artif. Organs 1997, 21, 209.
13. Karlik W., Józwiak A., Wiechetek M., Weryński A.: A simple method for hepatocyte attachment in hollow fibre bioreactors. Int. J. Artif. Organs 1999, 22, 566-572.
14. Karlik W., Józwiak A., Wiechetek M., Weryński A.: Hollow fiber hepatic bioreactor as an in vitro model for metabolism. A comparative study with monolayer and suspension culture. The Wessex Conference Centre Sparholt, Winchester, UK, 14-18 IX. Abstract Book of 10th International Workshop on In Vitro Toxicology 1998, 3, 11.
15. Kowalska-Pylka H., Muzyczuk-Piekarska A.: Komórki wątroby – model w badaniach *in vitro*. Medycyna Wet. 2002, 58, 189-191.
16. Li A. P.: Primary hepatocyte culture as an in vitro toxicological system of the liver, [w:] Gad S. C. (red.): In Vitro Toxicology, Raven Press, New York 1994, 195-220.
17. Naritomi Y., Terashita S., Kagayama A., Sugiyama Y.: Utility of hepatocytes in predicting drug metabolism: comparison of hepatic intrinsic clearance in rats and humans in vivo and in vitro. Drug Metabolism Disposition 2003, 31, 580-588.
18. Nyberg S. L. N., Shirabe K. S., Peshwa M. V. P., Sielaff T. D. S., Crotty P. L. C., Mann H. J. M., Remmel R. P. R., Payne W. D. P., Hu W. H., Cerra F. B. C.: Extracorporeal application of a gel-entrapment bioartificial liver: demonstration of drug metabolism and other biochemical functions. Cell Transplantation 1993, 2, 441-452.
19. Seglen P. O. S.: Preparation of isolated rat liver cells. Methods Cell Biol. 1976, 13, 29-83.
20. Tyson C. A., Green C. E.: Application of liver and kidney cell system that reduce animal usage, [w:] Salem H. (red.): Animal Test Alternatives: Refinement, Reduction, Replacement. Marcel Dekker, Inc., New York 1995, 9-17.
21. Wiechetek M., Karlik W.: Izolowane hepatocyty: alternatywny model w badaniach toksyczności. Medycyna pracy 1996, XLVII (supl. 6), 105-114.

Adres autora: dr Wojciech Karlik, ul. Ciszewskiego 8, 02-796 Warszawa;
e-mail: wojciech_karlik@sggw.pl