

Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej  
im. Macieja Nałęcz Polskiej Akademii Nauk

## Rozprawa doktorska

Karolina Ewa Zakrzewska

Metody hodowli ludzkich komórek pochodzenia wątrobowego  
z wykorzystaniem modyfikowanych genetycznie komórek  
podtrzymujących hodowlę

Promotor: dr hab. Dorota G. Pijanowska, prof. IBIB PAN

Promotor pomocniczy: dr Krzysztof D. Pluta

Warszawa, 2015



Pragnę podziękować wszystkim,  
bez których niniejsza rozprawa nie mogłaby powstać.

Badania były częściowo realizowane w ramach projektu finansowanego przez NCBiR: Mikro- i Nano-Systemy w Chemii i Diagnostyce Biomedycznej MNS-DIAG - Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka (POIG, projekt kluczowy współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, umowa nr: POIG.01.03.01-00-014/08-00).

## Spis treści

Wykaz skrótów	5
Wykaz symboli	6
Streszczenie	7
Abstract	9
1. Wstęp	11
2. Wprowadzenie	15
2.1 Izolacja komórek wątrobowych	15
2.1.1 Metody izolacji poszczególnych frakcji komórek wątrobowych	16
2.2. Hodowla komórek wątrobowych – dodatki do pożywki	18
2.2.1 Czynniki wzrostu (HGF, EGF, IGF-I, FGF, VEGF)	18
2.2.2 Substancje inne niż czynniki wzrostu	20
2.3. Hodowla komórek wątrobowych – kokultury	21
2.3.1 Kokultura hepatocyty – komórki gwiaździste (komórki Ito, komórki okołozatokowe)	23
2.3.2 Kokultura hepatocyty – komórki Browicza-Kupffera	24
2.3.3 Kokultura hepatocyty – fibroblasty	25
2.3.4 Kokultura hepatocyty – komórki epitelialne	26
2.3.5 Kokultura hepatocyty – komórki endotelialne	27
2.3.6 Kokultura hepatocyty – komórki macierzyste	28
2.3.7 Kokultura hepatocyty – komórki wysp trzustkowych	28
2.4. Hodowla komórek wątrobowych – podłoża	29
2.4.1 Podłoża naturalne	30
2.4.2 Podłoża sztuczne	36
2.4.3 Hodowle trójwymiarowe	40
2.4.4 Decelularyzowana wątroba	40
2.4.5 Hodowle w przepływie	42
2.5 Komórki stosowane jako zamienniki hepatocytów	43
2.5.1 Linie komórkowe i unieśmiertelnione hepatocyty	44
2.5.2 Hepatocyty izolowane ze zwierząt	47
2.5.3 Hepatocyty płodowe	49
2.5.4 Komórki hepatocytopodobne różnicowane z indukowanych komórek pluripotentnych	50
2.6 Metody wprowadzania DNA do komórek zwierzęcych	52
2.6.1 Transfekcja metodami chemicznymi	53
2.6.2 Transfekcja metodami fizycznymi	56

2.6.3	Transdukcja wektorami wirusowymi	58
2.7	Cel i tezy rozprawy	62
3.	Materiały	63
3.1	Oświadczenia	63
3.2	Materiał biologiczny	63
3.3	Sprzęt	65
3.4	Odczynniki	65
3.5	Materiały	68
4.	Metody	69
4.1	Porównanie metod izolacji komórek z fragmentów ludzkich resekowanych wątrób	69
4.1.1	Przygotowanie buforów i odczynników stosowanych podczas izolacji komórek z fragmentów ludzkich resekowanych wątrób	69
4.1.2	Izolacja komórek wątrobowych – perfuzja (P)	70
4.1.3	Izolacja komórek wątrobowych – maceracja (M)	70
4.2	Hodowla komórkowa	72
4.2.1	Przygotowanie buforów i odczynników stosowanych podczas hodowli komórkowej	72
4.2.2	Pasażowanie komórek	73
4.2.3	Liczenie komórek w komorze Bürkera	73
4.3	Oznaczenie markerów charakterystycznych dla różnych populacji izolatu wątrobowego oraz dla izolowanych ludzkich fibroblastów	74
4.3.1	Przygotowanie buforów i odczynników stosowanych podczas oznaczania markerów charakterystycznych dla różnych rodzajów komórek	74
4.3.2	Przygotowywanie i znakowanie komórek do cytometrii przepływowej	74
4.3.3	Przygotowywanie i znakowanie komórek do mikroskopii fluorescencyjnej	75
4.4	Modyfikacje genetyczne izolowanych ludzkich fibroblastów	76
4.4.1	Wprowadzenie komórek <i>E. coli</i> STBL3 w stan kompetencji	76
4.4.2	Wprowadzenie i namnożenie plazmidów w kompetentnych komórkach <i>E. coli</i> STBL3	77
4.4.3	Optymalizacja transfekcji z wykorzystaniem polietylenoiminy (PEI) i Lipofectamine 2000 (LP2000)	78
4.4.4	Produkcja wektorów lentiwirusowych 2. generacji	80
4.4.5	Wprowadzenie genów kodujących białka fluorescencyjne i EGF do izolowanych ludzkich fibroblastów skóry (HSF) i ocena modyfikacji	82
4.4.6	Ocena wpływu wprowadzonych modyfikacji genetycznych na HSF	86
4.5	Badanie kokultury komórek wątrobowych z izolowanymi ludzkimi fibroblastami	87
4.5.1	Badanie kokultury komórek wątrobowych z izolowanymi ludzkimi fibroblastami produkującymi białka fluorescencyjne (EGFP i DsRed2)	87

4.5.2	Badanie kokultury komórek wątrobowych z izolowanymi ludzkimi fibroblastami nadprodukującymi EGF	90
5.	Wyniki	92
5.1	Porównanie metod izolacji komórek z fragmentów ludzkich resekowanych wątrób	92
5.1.1	Porównanie perfuzji i maceracji jako metod izolacji komórek z fragmentów ludzkich wątrób po resekcji	92
5.1.2	Porównanie wydajności i żywotności komórek izolowanych z ludzkich resekowanych wątrób w zależności od modyfikacji metody izolacji	93
5.1.3	Porównanie typów kolagenazy stosowanych podczas izolacji komórek z fragmentów ludzkich wątrób po resekcji	94
5.2	Oznaczenie markerów charakterystycznych dla różnych populacji komórek izolatu wątrobowego oraz dla izolowanych ludzkich fibroblastów	95
5.2.1	Analiza cytometryczna izolatu wątrobowego	95
5.2.2	Badanie markerów izolowanych ludzkich fibroblastów	104
5.2.3	Badanie markerów komórek linii C3A i HOS	105
5.3	Modyfikacje genetyczne izolowanych ludzkich fibroblastów – białka fluorescencyjne	107
5.3.1	Wprowadzenie komórek <i>E. coli</i> szczep STBL3 w stan kompetencji	107
5.3.2	Wprowadzenie plazmidów do komórek kompetentnych <i>E. coli</i> STBL3	107
5.3.3	Optymalizacja metody PEI – transfekcja komórek HEK293T	108
5.3.4	Określenie miana preparatów wirusowych	110
5.3.5	Transdukcja izolowanych ludzkich fibroblastów	111
5.3.6	Wpływ transdukcji na izolowane ludzkie fibroblasty	112
5.4	Badanie kokultury komórek wątrobowych z izolowanymi ludzkimi fibroblastami produkującymi białka fluorescencyjne (EGFP i DsRed2)	115
5.4.1	Ocena wpływu komórek podtrzymujących hodowlę na komórki wątrobowe - analiza morfologii	115
5.4.2	Ocena wpływu komórek podtrzymujących hodowlę na komórki wątrobowe – analiza cytometryczna markerów komórkowych	118
5.4.3	Ocena wpływu komórek podtrzymujących hodowlę na komórki wątrobowe – oznaczanie zawartości albuminy w medium hodowlanym metodą ELISA	121
5.4.4	Ocena wpływu komórek podtrzymujących hodowlę na komórki wątrobowe – polaryzacja komórek	123
5.5	Modyfikacje genetyczne izolowanych ludzkich fibroblastów – EGF	125
5.5.1	Ocena skuteczności wprowadzonych modyfikacji w HSF	126
5.6	Badanie kokultury komórek wątrobowych z izolowanymi ludzkimi fibroblastami nadprodukującymi EGF	130
5.6.1	Ocena wpływu komórek podtrzymujących hodowlę na komórki wątrobowe – tempo proliferacji i żywotność komórek	130

5.6.2 Ocena wpływu komórek podtrzymujących hodowlę na komórki wątrobowe - badania markerów komórkowych	133
5.6.3 Ocena wpływu komórek podtrzymujących hodowlę na komórki wątrobowe – oznaczanie zawartości albuminy metodą ELISA	135
5.6.4 Ocena wpływu komórek podtrzymujących hodowlę na komórki wątrobowe – polaryzacja komórek	137
5.7 Badanie kokultury komórek izolatu wątrobowego z izolowanymi ludzkimi fibroblastami nadprodukującymi EGF	138
6. Dyskusja	140
6.1 Porównanie metod izolacji (w tym typów kolagenazy) fragmentów ludzkich resekowanych wątrób	140
6.2 Oznaczenie markerów charakterystycznych dla różnych populacji komórek izolatu wątrobowego	141
6.3 Badanie kokultury komórek wątrobowych z izolowanymi ludzkimi fibroblastami produkującymi białka fluorescencyjne (EGFP i DsRed2)	143
6.4 Badanie kokultury komórek wątrobowych z izolowanymi ludzkimi fibroblastami nadprodukującymi EGF	144
7. Podsumowanie i wnioski	147
8. Bibliografia	152
DODATEK	183
A. Klonowanie genu <i>EGF</i> do plazmidu wektorowego	183
Przygotowanie plazmidu wektorowego – wersja I	183
Przygotowanie plazmidu wektorowego – wersja II	184
Przygotowanie wstawki zawierającej <i>EGF</i>	186
Przygotowanie plazmidu wektorowego ze wstawką	187
B. Charakterystyka otrzymanych fragmentów ludzkich wątrób po resekcji	192



## Wykaz skrótów

3D – trójwymiarowe  
A1AT – alpha-1-antytrypsyna  
AAV (ang. *Adeno-Associated Virus*) – wirusy związane z adenowirusami  
AFP –  $\alpha$ -fetoproteina  
ALB – albumina  
ALT – aminotransferaza alaninowa  
APC (ang. *AlloPhycoCyanin*) – allofikocyjanina  
ARG – arginaza I  
ASGR (ang. *ASialoGlycoprotein Receptor*) – receptor asialoglikoproteiny  
AST – aminotransferaza asparaginowa  
ATCC (ang. *American Type Culture Collection*) – Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych  
AV (ang. *AdenoVirus*) – adenowirusy  
BAL (ang. *BioArtificial Liver*) – biosztuczna wątroba  
bFGF (ang. *basic Fibroblasts Growth Factor*) – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów  
CuZnSOD (ang. *SuperOxide Dismutase*) – dysmutaza ponadtlenkowa zawierająca miedź i cynk  
Cy5 (ang. *Cyanine 5 dye*) – barwnik cyjaninowy 5  
DEAE-dekstran – dwuetyloaminoetyl-dekstran  
DEX – deksametazon  
DMSO (ang. *DiMethyl SulfOxide*) – dimetylosulfotlenek  
DNA (ang. *DeoxyriboNuclei Acid*) – kwas deoksyrybonukleinowy  
ECM (ang. *ExtraCellular Matrix*) – macierz zewnątrzkomórkowa  
EDTA (ang. *EthyleneDiamineTetraacetic Acid*) – kwas wersenowy  
EGF (ang. *Epidermal Growth Factor*) – epidermalny czynnik wzrostu  
ELAD (ang. *Extracorporeal Liver Assist Device*) – zewnątrzustrojowe urządzenie wspomagające pracę wątroby  
ELISA (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) – test immunoenzymatyczny  
FA – formaldehyd  
FITC (ang. *Fluorescein IsoThioCyanate*) – izotiocyjanian fluoresceiny  
GAG – glikozaminoglikany  
GH (ang. *Growth Hormone*) – czynnik wzrostu  
HCV (ang. *Hepatitis C Virus*) – wirus zapalenia wątroby typu C  
HGF (ang. *Hepatocyte Growth Factor*) – czynnik wzrostu hepatocytów  
HL (ang. *Hepatocyte-Like*) – komórki hepatocytopodobne  
HLA (ang. *Human Leukocyte Antigen*) – antygen zgodności tkankowej  
HNF1 $\alpha$  (ang. *Hepatocyte Nuclear Factor 1 $\alpha$* ) – jądrowy czynnik hepatocytów 1 $\alpha$   
HNF-4 (ang. *Hepatocyte Nuclear Factor-4*) – jądrowy czynnik hepatocytów 4  
HRP (ang. *HorseRadish Peroxidase*) – peroksydaza chrzanowa  
HSF (ang. *Human Skin Fibroblasts*) – fibroblasty izolowane z ludzkiej skóry  
HSV (ang. *Herpes Simplex Virus*) – wirus opryszczki  
hTERT (ang. *human TElomerase Reverse Transcriptase*) – podjednostka katalityczna ludzkiej telomerazy  
HUVEC (ang. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) – komórki endotelialne izolowane z żyły pępowinowej  
IGF-I (ang. *Insulin-like Growth Factor I*) – insulinopodobny czynnik wzrostu I  
IL-6 – interleukina 6  
iPSc (ang. *induced Pluripotent Stem cells*) – indukowane pluripotentne komórki macierzyste

komórki BK – komórki Browicza-Kupffera  
 LP2000 – Lipofectamine 2000  
 LPS – lipopolisacharyd  
 LV (ang. *LentiVirus*) – lentiwirusy  
 MARS (ang. *Molecular Adsorbent Recirculating System*) – system recykulacji oparty na adsorpcji molekularnej  
 MDR (ang. *MultiDrug Resistance*) – białka związane z opornością wielolekową  
 MFI (ang. *Median Fluorescence Intensity*) – mediana natężenia fluorescencji  
 MHC (ang. *Major Histocompatibility Complex*) – białka zgodności tkankowej  
 mRNA (ang. *messenger RiboNucleicAcid*) – matrycowy kwas rybonukleinowy  
 MSCs (ang. *Mesenchymal Stem Cells*) – mezenchymalne komórki macierzyste  
 NAD (ang. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*) – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy  
 NADP (ang. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*) – fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego  
 OSM – onkostatyna M  
 OTC – karbamoilotransferaza ornitynowa  
 PBS (ang. *Phosphate Buffered Saline*) – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej  
 PE (ang. *PhycoErythrin*) – fikoerytryna  
 PEI – polietylenoimina  
 PET – polietylen tereftalanu  
 PerCP (ang. *Peridinin ChloroPhyll*) – peridininochlorofil  
 PLL – polilizyna  
 RT – (ang. *Room Temperature*) – temperatura pokojowa  
 RV (ang. *RetroVirus*) – retrowirusy  
 SDS (ang. *Sodium Dodecyl Sulfate*) – dodecylosiarczan sodu  
 SIN (ang. *Self-INactivating*) – samo inaktywujące się (dot. wektorów wirusowych)  
 SV40 (ang. *Simian Virus 40*) – małpi wirus 40  
 TGF $\alpha$  (ang. *Transforming Growth Factor  $\alpha$* ) – transformujący czynnik wzrostu  $\alpha$   
 VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*) – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego  
 VSV-G (ang. *Vesicular Stomatitis Virus G*) – wirus pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej

## Wykaz symboli

$g$  – przyspieszenie ziemskie  
 $N$  – liczba komórek podczas transdukcji  
 $P$  – ilość użytego DNA  
 $p$  – poziom istotności statystycznej  
 $R$  – proporcja N/P (liczby atomów azotu w PEI do liczby atomów fosforu w DNA)  
 $S$  – wyjściowe stężenie PEI  
 $TU$  – jednostki transdukujące  
 $V$  – objętość preparatu wirusowego  
 $V_0$  – objętość Percollu  
 $V_k$  – objętość końcowa Percollu  
 $V_{PEI}$  – objętość PEI  
 $\rho$  – oczekiwana gęstość Percollu  
 $\rho_0$  – wyjściowa gęstość Percollu  
 $\rho_{10}$  – gęstość 1,5 M NaCl

## Streszczenie

Hodowla izolowanych ludzkich hepatocytów sprawia badaczom wiele trudności. W ciągu kilkunastu dni hodowli dochodzi do zmian zarówno morfologicznych jak i fizjologicznych, co prowadzi do upośledzenia funkcji tych komórek. Nie pozwala to na wykorzystanie ich m.in. do testów cytotoksyczności leków czy jako części biologicznej w biosztucznej wątrobie (ang. *BioArtificial Liver*, BAL). Istotną metodą, wśród wielu metod zapobiegających odróżnicowaniu hepatocytów, takich jak zmiana składu pożywki hodowlanej, pokrywanie podłoża hodowlanych substancjami zwiększającymi przyleganie, hodowle trójwymiarowe, jest hodowla z komórkami ją podtrzymującymi (ang. *feeder layer cells*). Jednym z typów komórek wykorzystywanych do takich kokultur są fibroblasty, ze względu m.in. na zdolność do produkcji dużej ilości białek macierzy zewnątrzkomórkowej oraz wydzielanie wielu czynników wzrostu i cytokin.

Celem rozprawy było opracowanie metody długotrwałej hodowli komórek pochodzenia wątrobowego przy użyciu genetycznie zmodyfikowanych ludzkich fibroblastów jako komórek podtrzymujących hodowlę.

Wykonanie badań zostało podzielone na trzy etapy. W pierwszym etapie z materiału pooperacyjnego dostarczanego ze Szpitala Klinicznego WUM zostały pozyskane, metodami podwójnej perfuzji i/lub maceracji, komórki wątrobowe. Porównane zostały parametry izolacji (wydajność i żywotność komórek) oraz charakterystyki poszczególnych typów komórek zasiedlających wątrobę, które uzyskano na podstawie wybranych markerów komórkowych. Dla porównania analizowano komórki linii wątrobiaka C3A, ludzkich komórek osteosarkomy (ang. *Human Osteosarcoma*, HOS) i izolowane z ludzkiej skóry fibroblasty (ang. *Human Skin Fibroblasts*, HSF). Drugim etapem było skonstruowanie genetycznie zmodyfikowanych komórek podtrzymujących hodowlę. Etap ten obejmował przygotowanie odpowiednich plazmidów, produkcję wektorów lentiwirusowych, transdukcję komórek oraz ocenę wpływu wprowadzonych zmian genetycznych na żywotność komórek modyfikowanych. Do izolowanych ludzkich fibroblastów wprowadzono geny kodujące białka fluorescencyjne – zielone (ang. *Enhanced Green Fluorescent Protein*, EGFP) i czerwone (ang. *Discosoma sp. Red fluorescent protein 2*, DsRed2) oraz epidermalny czynnik wzrostu (ang. *Epidermal Growth Factor*, EGF). W trzecim etapie prowadzono hodowlę kokultur zmodyfikowanych genetycznie fibroblastów z komórkami wątrobiaka linii C3A, a następnie oceniano stan hodowli na podstawie produkcji albuminy,  $\alpha$ -1-antytrypsyny,

żywołności komórek oraz tworzenia kanalików żółciowych w formie wakuoli apikalnych (łac. *bile canaliculi*).

Stwierdzono, że izolacja komórek z resekowanych fragmentów wątroby przy użyciu metody maceracji pozwoliła na uzyskanie większej liczby komórek niż przy zastosowaniu metody podwójnej perfuzji. W tym przypadku, również żywotność komórek izolowanych metodą maceracji była wyższa w porównaniu do metody podwójnej perfuzji. Opracowano prostszą i szybszą metodę izolacji komórek z fragmentów ludzkich resekowanych wątrób, która z powodzeniem może zastąpić powszechnie stosowaną metodę podwójnej perfuzji. Analiza markerów komórkowych izolatu wątrobowego wykazała zależności między produkcją albuminy – białka charakterystycznego dla hepatocytów, a płcią, wiekiem i stosowaniem chemioterapii u pacjentów, od których pochodziły fragmenty tkanki. Na podstawie otrzymanych wyników wskazano na możliwość istnienia mniejszej tzw. rezerwy regeneracyjnej hepatocytów kobiet. Oryginalna metoda cytometrycznej analizy izolatu wątrobowego może w przyszłości posłużyć do opracowania nowej metody prognostycznej do oceny stanu wątroby pacjentów.

Wyniki badań potwierdzają, iż kokultura izolowanych ludzkich fibroblastów z komórkami pochodzenia wątrobowego wpływa pozytywnie na parametry komórek wątrobowych. Komórki C3A produkowały więcej albuminy oraz formowały więcej struktur *bile canaliculi*. Modyfikacja genetyczna HSF, wprowadzająca trwałą ekspresję znacznikowych białek fluorescencyjnych, ułatwiła obserwację komórek w kokulturze, a zastosowane fibroblasty – jako warstwa podtrzymująca hodowlę, również pozytywnie wpłynęły na morfologię i fizjologię komórek pochodzenia wątrobowego. Zwiększenie produkcji epidermalnego czynnika wzrostu w fibroblastach, wywołane przez transdukcję wektorami LV niosącymi dodatkową kopię genu, także wpłynęło pozytywnie na komórki pochodzenia wątrobowego. Zarówno zdolności biosyntetyczne jak i częstość powstawania *bile canaliculi* zostały zwiększone. Produkcja albuminy przez komórki linii C3A w kokulturze z fibroblastami nadprodukującymi czynnik wzrostu wykazywała najwyższą tendencję wzrostową przez cały czas trwania eksperymentu, co jest szczególnie ważne w kontekście długotrwałej hodowli komórek wątrobowych.

Otrzymane wyniki potwierdzają tezy rozprawy o: (I) możliwości opracowania wydajniejszej metody pozyskiwania hepatocytów oraz (II) pozytywnym wpływie zmodyfikowanych komórek *feeder layer* na parametry komórek pochodzenia wątrobowego.

## Abstract

The culture of isolated human hepatocytes that last longer than two weeks leads to morphological and physiological dedifferentiation of the cells. These altered cells cannot be used in applications based on liver cells, such as drug cytotoxicity tests or as biological part of the bioartificial liver (BAL). Among many methods used to slow down this dedifferentiation process e.g.: medium supplementation, growth surface modifications and various 3D scaffolds, coculture of hepatocytes with feeder layer cells is the most promising. Due to ability to produce large amounts of extracellular matrix and to secrete many types of growth factors and cytokines, fibroblasts are the most congruent feeder layer cell types.

The aim of this study is an attempt to coculture liver cells and genetically modified human skin fibroblasts (HSF), characterized by stable expression of epidermal growth factor (EGF), as feeder layer cells.

Execution of the tasks presented in the study was divided into three parts. First, isolation of cells from post-operation fragments of liver obtained in cooperation with Clinical Hospital of WUM. Two isolation methods were used – double perfusion and/or maceration. The parameters such as: isolation efficiency, percentage of live cells, and production of specific marker were analyzed. Markers production in C3A, HOS, and human skin fibroblasts were also analyzed. The second stage of this study was production of genetically modified feeder layer cells, including: plasmid construction, lentiviral vectors production, HSF transduction, and evaluation of the genetic modifications impact on fibroblasts viability. Human fibroblasts were transduced with the lentiviral vectors bearing three genes – green and red fluorescent proteins (Enhanced Green Fluorescent Protein – EGFP and *Discosoma sp.* Red fluorescent protein 2 – DsRed2), as well as epidermal growth factor (EGF). Thirdly, the genetically modified fibroblasts were cocultured with hepatoma cells, followed by the culture status evaluation: albumin and  $\alpha$ -1-antitrypsin production, cells viability, and *bile canaliculi* formation.

We developed simpler and faster method for liver cells isolation from human resected liver fragments. It was stated that the greater number of cells characterized by higher viability were obtained from liver fragments using maceration method than double perfusion. We also proposed a method based on flow cytometry for analysis the populations of cells isolated from human livers, which could be developed into new prognostic method. Moreover, we observed that albumin production (marker typical for

hepatocytes) in cells that came from human liver fragments was affected by the sex, age, and chemotherapy treatment of the donors. The significantly lower percentage of albumin in hepatocytes isolated from women after chemotherapy could indicate lower regeneration capacity in this group.

Secondly, the human skin fibroblasts cocultured with liver cells improved their parameters – the hepatoma cells produced more albumin and formed more *bile canaliculi*. The culture consisted of “green” or “red” HSF and C3A cells was an excellent tool to study coculture model and HSF as feeder layer cells had positive impact on morphology and physiology of the liver cells. The human fibroblasts with stable overexpression of *EGF* also improved parameters of the liver cells in the coculture – biosynthetic capability and *bile canaliculi* formation were increased. Albumin production in C3A cells cocultured with fibroblast with increased production of EGF was the highest throughout the experiment, which is particularly important for a long-term culture of liver cells.

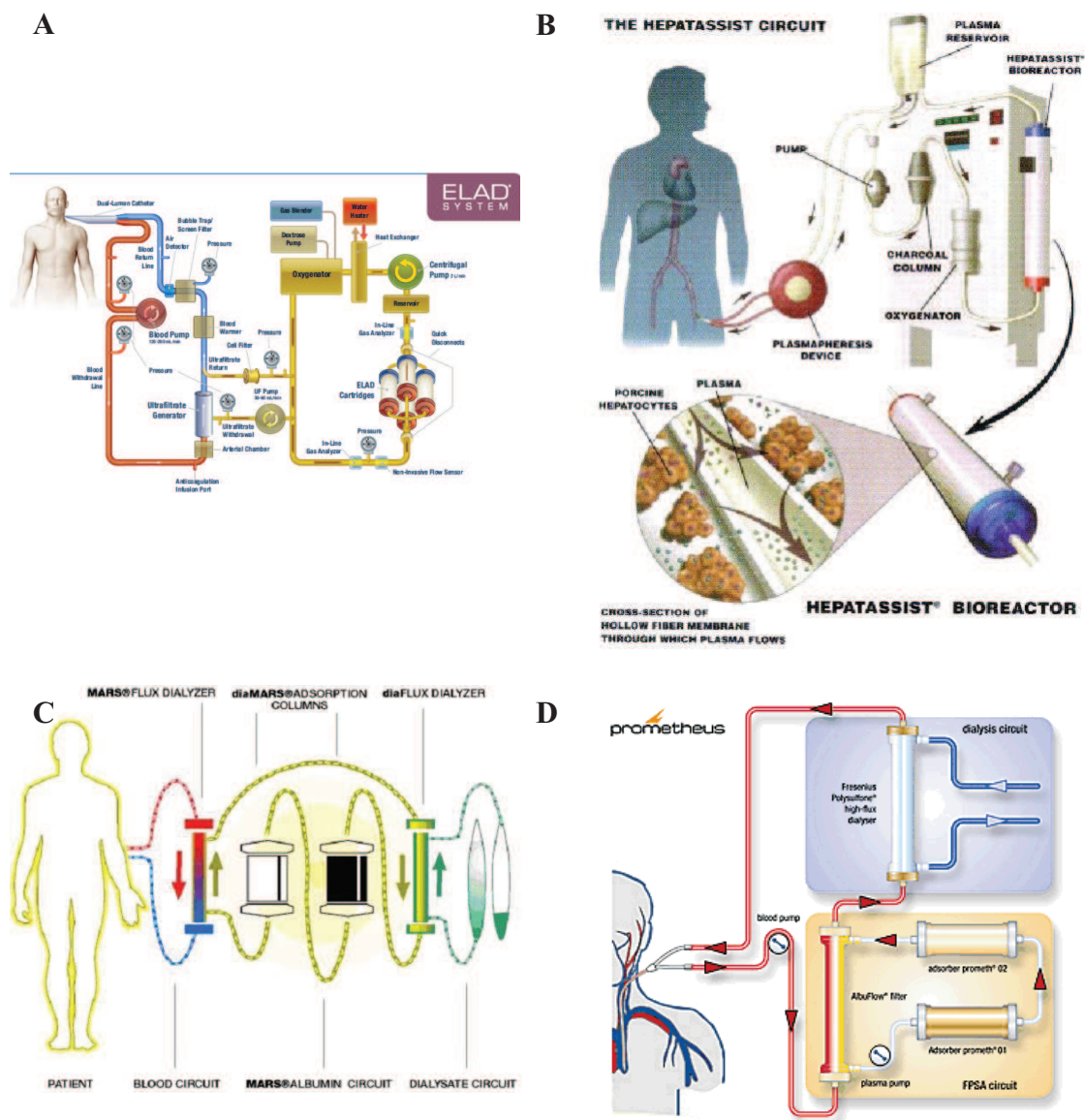
The results confirmed the both hypotheses of the thesis: (I) possibility to develop hepatocytes’ isolation method characterized by higher efficiency and (II) the positive impact of the modified fibroblasts on liver cells.



## 1. Wstęp

Wątroba jest jednym z największych narządów w ludzkim organizmie i pełni w nim ponad kilkaset funkcji, w tym: (1) metabolizowanie węglowodanów, tłuszczu i białek, (2) produkcja białek, m.in. osocza i czynników krzepnięcia, (3) magazynowanie energii w formie glikogenu oraz witamin i składników mineralnych, (4) biotransformacja ksenobiotyków, (5) oczyszczanie krwi z produktów przemiany materii. Funkcje te wykonywane są przez komórki parenchymalne wątroby – hepatocyty [Ichihara, 1982; Hewitt, 2007]. Poza hepatocytami w wątrobie występują komórki nieparenchymalne: komórki śródbłonka naczyń, komórki gwiaździste (Ito), komórki Browicza-Kupffera, cholangiocyty i inne. Są one odpowiedzialne m.in. za magazynowanie witaminy A i kolagenu, fagocytozę włókniaka, bakterii, zużytych erytrocytów i komórek nowotworowych oraz wydzielanie żółci [Bouwens, 1992; Flisiak, 1997; Malarkey, 2005].

Zaburzenia pracy wątroby, przewlekłe i ostre, mogą być wywoływane przez zakażenia wirusowe, chorobę alkoholową lub substancje czynne (m.in. leki, toksyny, metale ciężkie). Rak pierwotny wątroby jest drugą najczęściej występującą przyczyną śmierci wśród pacjentów z nowotworem, a prognoza dla tego typu guzów jest bardzo pesymistyczna – proporcja śmiertelność : występowanie wynosi 0,95 [[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)]. Jedyną skuteczną formą leczenia chorób wątroby pozostaje allogeniczny przeszczep wątroby. Niestety, największą wadą tego rozwiązania jest niedobór dawców. Rozwijane są alternatywne metody leczenia, jak np. (1) przeszczep hepatocytów, (2) zewnątrzustrojowe wspomaganie przy użyciu systemów sztucznych, np.: transfuzja krwi, wymiana osocza, hemodializa, hemofiltracja, hemoadsorpcja lub (3) biosztucznych – biosztuczna wątroba (ang. *BioArtificial Liver*, BAL), łącząca system wymiany krwi lub osocza z aktywnie działającymi komórkami. Systemy, których status badań klinicznych jest zakończony lub znajdują się w trakcie badań klinicznych to: ELAD (ang. *Extracorporeal Liver Assist Device*), HepatAssist, MARS (ang. *Molecular Adsorbent Recirculating System*), czy Prometheus [Lee, 2015]. Schemat ich budowy został przedstawiony na Rysunku 1.1.



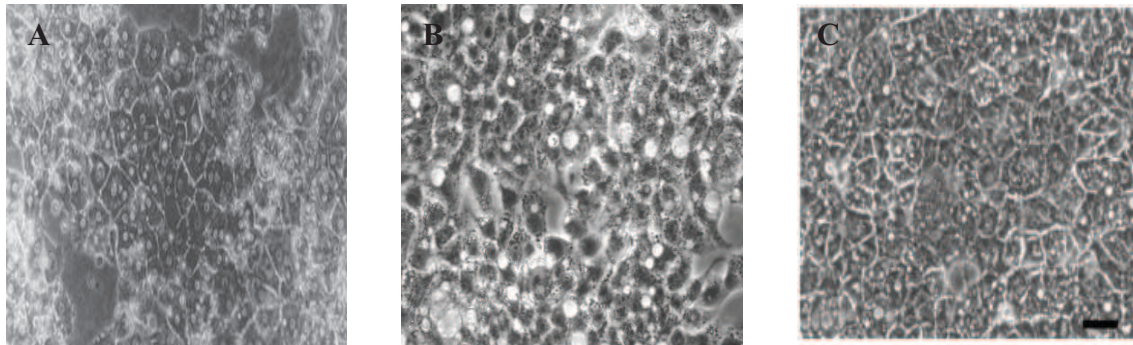
Rysunek 1.1. Biosztuczne i sztuczne systemy wykorzystywane w terapii pomostowej – utrzymanie pacjenta przy życiu do momentu otrzymania przeszczepu, po operacji oraz podczas zatruc. A – system ELAD zawiera komórki linii C3A (<http://vitaltherapies.com>), B – system HepatAssist zawiera hepatocyty świńskie (<http://biomed.brown.edu>), C – system MARS oparty na adsorpcji molekularnej pozwala na usuwanie bilirubiny, soli żółciowych i wolnych kwasów tłuszczowych przy zachowaniu w osoczu albuminy,  $\alpha$ -1-antytrypsyny, transferyny i hormonów (<http://biomed.brown.edu>), D – system Prometheus oparty na adsorpcji umożliwia oczyszczenie krwi z toksyn związanych z albuminą bez jej utraty ([www.fresenius.com](http://www.fresenius.com)).

Systemy biosztuczne mają za zadanie wspomóc wątrobę w regeneracji do odzyskania pełnej sprawności lub ustabilizować pacjenta w oczekiwaniu na przeszczep. Dzięki obecności w nich części biologicznej – komórek ludzkiej hepatomy (ELAD) lub świńskich hepatocytów (HepatAssist), są w stanie oprócz mechanicznego oczyszczania krwi, a ściślej osocza, z toksyn i produktów przemiany materii, częściowo zastąpić



niesprawną wątrobę. W systemach tych został zastosowany bioreaktor kapilarny zbudowany z membran półprzepuszczalnych, co pozwala na pośredni kontakt z osoczem pacjenta i zaopatrzenie organizmu w niezbędne substancje (m.in. albuminę, czynniki krzepnięcia krwi, hormony i czynniki wzrostu) [Park, 2005, Carpentier, 2009].

Z powodu niedoboru ludzkich hepatocytów w wyżej wymienionych systemach podtrzymujących oraz trudności w ich hodowli, które są wynikiem szybkiego odróżnicowywania się połączonego z utratą funkcji i brakiem zdolności do proliferacji, stosuje się zamienniki w postaci: (1) hepatocytów zwierzęcych, głównie świńskich, rzadziej psich lub pochodzących od naczelnych, (2) komórek pochodzenia nowotworowego – linii komórkowych ludzkiej hepatomy – HepG2 lub jej pochodnej C3A, (3) komórek hepatocytopodobnych uzyskiwanych na drodze różnicowania indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych (ang. *induced Pluripotent Stem cells*, iPSc) pochodzących z komórek somatycznych [Huebert, 2014; Forbes, 2015]. Ich morfologia została przedstawiona na Rysunku 1.2. Niestety, mimo ich potencjalnego zastosowania, nie są one materiałem, który może zastąpić zróżnicowane hepatocyty ludzkie. Komórki zwierzęce są łatwo dostępne i często ich hodowla jest łatwiejsza niż komórek ludzkich, ale mogą być źródłem zoonoz, a ich białka klasy MHC (ang. *Major Histocompatibility Complex*) i inne, np. renina czy erytropoetyna są niezgodne z białkami ludzkimi [Kobayashi, 2003; Dooldeniya, 2003]. Komórki linii nowotworowych, w przeciwieństwie do świeżo izolowanych hepatocytów ludzkich, charakteryzują się szybką i praktycznie nieograniczoną zdolnością do proliferacji oraz dostępnością. Nie posiadają jednak niektórych enzymów, np. cyklu mocznikowego – arginazy I i karbamoiltransferazy ornitynowej, mają obniżoną aktywność pewnych izoform cytochromu P450 i produkcję białek, np. albuminy. Znane są również doniesienia o ich możliwości przekształcania komórek zdrowych w komórki nowotworowe [Bhatia, 2014]. Komórki hepatocytopodobne uzyskane z komórek iPS są łatwo dostępne (np. fibroblasty skóry, komórki mięśni zęba, adipocyty) i nie budzą zastrzeżeń etycznych. Możliwe jest uzyskanie komórek hepatocytopodobnych pobranych bezpośrednio od pacjenta. Mimo stałego rozwoju tej dziedziny wydajność procesu przekształcania komórek somatycznych w komórki iPS, a następnie w komórki hepatocytopodobne jest bardzo niska, a podczas tych procesów stosowane są czynniki transkrypcyjne i czynniki wzrostu, które mogą prowadzić do nowotworzenia. Ponadto ich funkcjonalność jest dużo niższa w porównaniu ze świeżo izolowanymi hepatocytami ludzkimi [Schwartz, 2014].

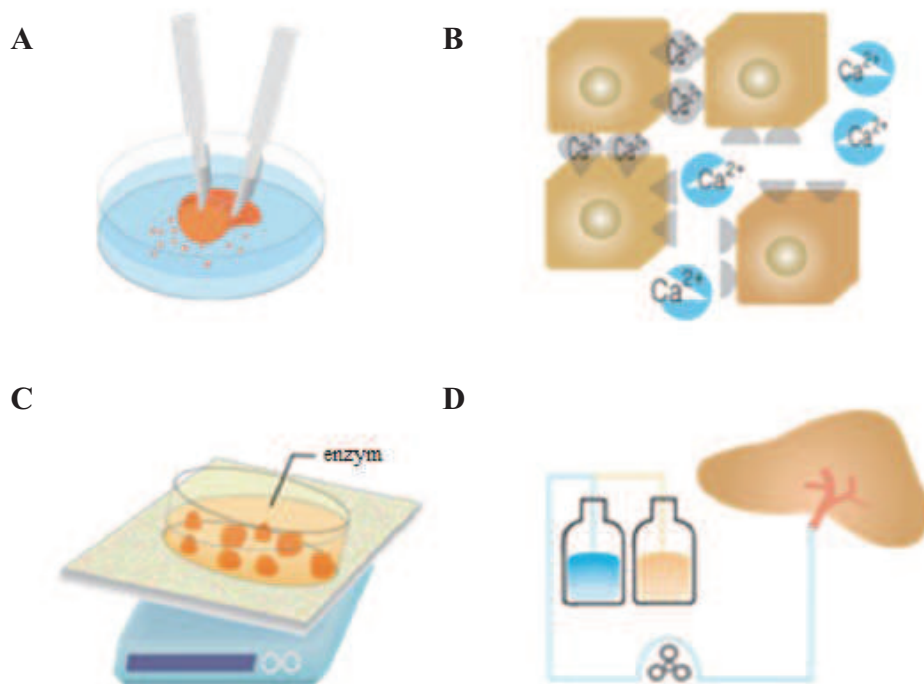


Rysunek 1.2. Przykłady komórek stosowanych jako zamienniki ludzkich hepatocytów. A – hepatocyty świni (Primary hepatocyte culture in collagen gel mixture and collagen Sandwich, Wang, 2004), B – komórki linii C3A (zdjęcie własne), C – hepatocytopodobne komórki odróżnicowane z komórek iPS (Bioartificial Liver Device Based on Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Hepatocytes, Ren, 2015).

## 2. Wprowadzenie

### 2.1 Izolacja komórek wątrobowych

Początki izolacji komórek wątrobowych datuje się na lata 40. ubiegłego wieku. Stosowano wówczas metody mechaniczne, charakteryzujące się bardzo niską wydajnością: przeciskanie wątroby przez gazę, wytrząsanie z kulkami szklanymi czy homogenizacja [Anderson, 1953]. W 1962 r. Berry i wsp. opublikowali artykuł, w którym opisali nieenzymatyczną metodę izolacji komórek z mysiej wątroby opartą na zerwaniu połączeń pomiędzy komórkami, następnie mechanicznym zniszczeniu tkanki. Wadami tej procedury była niska wydajność oraz powtarzalność [Berry, 1962]. Najpowszechniej obecnie stosowany enzymatyczny sposób izolacji zwierzęcych komórek z wątroby został opisany przez Seglena w 1973 r. i 1976 r. na modelu szczurzym. Metoda podwójnej perfuzji opiera się na zastosowaniu dwóch roztworów do rozluźnienia połączeń między komórkami a białkami macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *ExtraCellular Matrix*, ECM), a następnie wypłukania tychże komórek. Pierwszy roztwór to zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (ang. *Phosphate Buffered Saline*, PBS) pozbawiony jonów dwuwartościowych, a w niektórych modyfikacjach stosowanych przez autorów, z dodatkiem związku chelatującego jony dwuwartościowe, np. kwas wersenowy (ang. *EthyleneDiamineTetraacetic Acid*, EDTA). Obecność jonów  $Ca^{2+}$  jest niezbędna takim białkom adhezyjnym jak kadheryny czy selektyny, a ich pozbycie się rozluźnia tkankę i ułatwia oddzielenie się komórek od ECM [Chen, 1997]. Drugim środkiem perfundującym jest roztwór kolagenazy w buforze zawierającym jony  $Ca^{2+}$ , których to enzym ten wymaga do efektywnego działania. Kolagenaza jest proteazą działającą na wiązania pomiędzy aminokwasem obojętnym (X) a glicyną w sekwencji Pro-Gly-X-Pro, występującej ze znaczną częstością w kolagenie [Fields, 1987; [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)]. Obecnie, oprócz kolagenazy I stosowanej głównie do hepatocytów mysich i szczurzych, używa się innych typów kolagenazy (np. IX), mieszanki enzymów trawiących (np. kolagenaza z elastazą, Worthington czy kolagenaza z dispazą, Roche) lub specjalnie przygotowane przez firmy biotechnologiczne zestawy dedykowane (np. Liberase, Roche czy Czyme, VitaCyte). Na Rysunku 2.1 przedstawiono schematycznie sposoby izolacji hepatocytów.

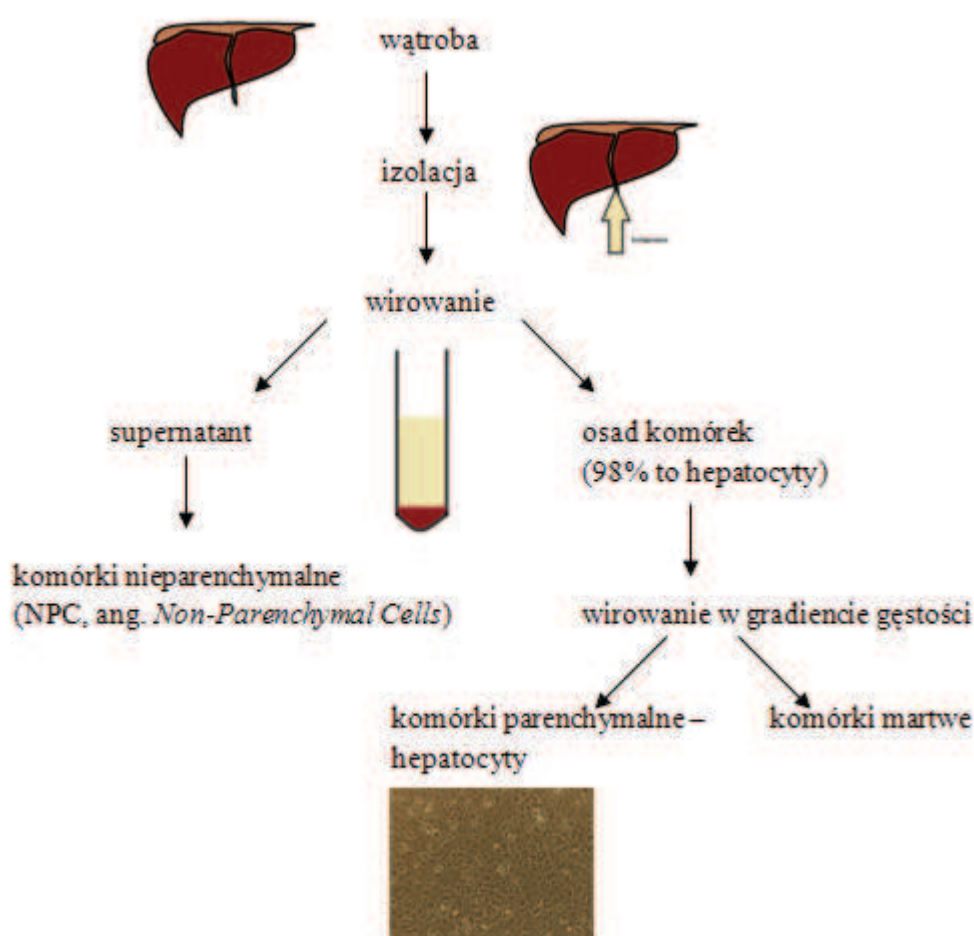


Rysunek 2.1. Historia izolacji hepatocytów (na podstawie *Hepatocyte Isolation, Culture, and Its Clinical Applications*, Lee, 2014). A – mechaniczne rozdrobnienie, B – chelatowanie jonów  $Ca^{2+}$ , C – enzymatyczne trawienie, D – podwójna perfuzja przez żyłę wrotną.

### 2.1.1 Metody izolacji poszczególnych frakcji komórek wątrobowych

Kolejne lata przyniosły zmiany w protokole izolacji głównie w obrębie składu buforów, ich liczby oraz czasu perfuzji. W literaturze znaleźć można procedury 2-, 3-, 4-, a nawet 5-stopniowe, a ich zróżnicowanie ma zapewnić większą wydajność, zmniejszyć odsetek martwych komórek czy pozwolić na izolację specyficznej grupy komórek [Gerlach, 1993; Alexandrova, 2005; Meng, 2010; Lee, 2013]. Wiele laboratoriów stosuje dodatkowe filtrowanie zawiesiny uzyskanej po trawieniu enzymatycznym, co pozwala na uzyskanie preparatu o pożądanej wielkości, np. stosując sitko o średnicy 70 lub 100  $\mu\text{m}$  pozbywamy się zlepek komórek lub fragmentów nie w pełni strawionej tkanki [Bhagal, 2011; Shulman, 2013]. Izolat wątrobowy można oczyszczać stosując wirowanie w gradiencie gęstości (np. używając preparatów Percoll, Ficoll, Histopaque i in.), co umożliwia oddzielenie komórek o większej gęstości, np. hepatocytów od komórek o mniejszej gęstości, np. erytrocytów. Warto zaznaczyć, że hepatocyty pochodzące z wątrób stłuszczonych będą zawierać w sobie krople tłuszczu, które spowodują zmniejszenie ich gęstości i tym samym mogą nie zostać osadzone przez wirowanie w standardowych warunkach [Kondrup, 1980]. Najpowszechniejszymi parametrami

wirowania używanymi w przypadku hepatocytów jest 3-krotne wirowanie przez kilka minut przy prędkości 50xg [Baccarani, 2003]. Jeżeli w obszarze zainteresowań są np. komórki gwiaździste (Ito), to przykładowy protokół polega na zebraniu supernatantu po wirowaniu 50xg i wirowaniu go przy prędkości zwiększonej do 400xg i 1400xg. Dzięki takim procedurom jesteśmy w stanie izolować wszystkie komórki zasiedlające wątrobę lub skupić się tylko na interesującym nas typie [Graham, 2002; Liu, 2011]. Schemat izolacji komórek wątrobowych został przedstawiony na Rysunku 2.2. Rozwijane są również nieenzymatyczne metody izolacji komórek wątrobowych – głównie zwierzęcych [Kravchenko, 2002; Crema, 2007].



Rysunek 2.2. Schemat izolacji komórek wątrobowych z podziałem na komórki parenchymalne (hepatocyty) i nieparenchymalne (komórki śródbłonna naczyń, komórki gwiaździste (Ito), komórki Browicza-Kupffera, cholangiocyty i inne), (na podstawie *Induction of lacZ Mutations in Muta<sup>TM</sup> Mouse Primary Hepatocytes*, Chen, 2010).

Hepatocyty zwierzęce – najczęściej izolowane są komórki szczurze, mysie, świńskie – pozyskiwane są dla różnych celów. Znajdują zastosowanie m.in. w badaniach cytotoxyczości leków, do oceny parametrów stosowanych podczas hodowli, czy

w urządzeniach typu biosztuczna wątroba (BAL). Są one dobrym materiałem do badań wyjściowych ze względu na ich dostępność, koszt i dobrze zdefiniowane procedury badawcze, ale mają również wiele wad, jak np. niemożność pełnego transferu wyników z modelu zwierzęcego na człowieka, różnice w metabolizmie i ekspresji białek oraz brak zgodności białek z klasy MHC [O'Brien, 2004]. W przypadku małych zwierząt, np. gryzoni, najczęściej izoluje się komórki z wątroby znajdującej się w organizmie – zwierzę poddaje się anestezji, a roztwory używane podczas izolacji podawane są przez żyłę wrotną lub inne naczynie. Izolacja komórek wątrobowych z większych zwierząt oraz z człowieka odbywa się zazwyczaj po wcześniejszej resekcji części lub całej wątroby, a płyny podawane są do największego naczynia [Richert, 2004; Shen, 2012].

## **2.2. Hodowla komórek wątrobowych – dodatki do pożywki**

W hodowli ludzkich oraz zwierzęcych hepatocytów stosuje się wiele dodatków do pożywki, które mają: (1) stymulować komórki do działania, (2) zatrzymać proces odróżnicowania, (3) zwiększyć lub zaindukować proliferację komórek. Poniżej opisane zostały najczęściej używane substancje.

### **2.2.1 Czynniki wzrostu (HGF, EGF, IGF-I, FGF, VEGF)**

Czynnik wzrostu hepatocytów (ang. *Hepatocyte Growth Factor*, HGF) – opisany po raz pierwszy w 1984 r. jako białko mitogenne dla szczurzych hepatocytów [Nakamura, 1984]. Najlepiej poznaną rolą HGF jest wspomaganie syntezy DNA w hepatocytach oraz regulacja rozwoju wątroby w stanie fizjologicznym i podczas regeneracji [Strain, 1991; Schmidt, 1995; Gómez-Lechón, 1995; Huh, 2004]. Czynniki wzrostu hepatocytów wycisza również czynniki apoptotyczne [Suzuki, 2009], ale w przypadku wątrób zwłókniałych promuje apoptozę komórek mięśniowych i miofibroblastów [Kim, 2005]. Ten niezwykle przydatny proces został zaadaptowany przez komórki nowotworowe na potrzeby metastazy [Weidner, 1990]. Warto również wspomnieć, że ścieżka sygnałowa HGF-Met, zaangażowana w proliferację, morfogenezę i działania antyapoptotyczne, jest obecna w wielu różnych typach komórek i tkanek: nerki, płuca, tkanka nerwowa, naczynia krwionośne, układ odpornościowy, kości itd. [Sakamaki, 2002; Yamaura, 2004; Okunishi, 2005; Ohya, 2007; Dai, 2010; Nakase, 2010].

Epidermalny czynnik wzrostu (ang. *Epidermal Growth Factor*, EGF) – wspomaga syntezę DNA w szczurzych hepatocytach [Block, 1996]. Współdziała z transformującym



czynnikiem wzrostu  $\alpha$  (ang. *Transforming Growth Factor  $\alpha$* , TGF $\alpha$ ) – receptor EGF zależy od autokrynej stymulacji TGF $\alpha$  w hepatocytach szczurzych [Liu, 2013]. Brak receptora EGF u dorosłych myszy nie wywołuje zmian w masie ciała czy w funkcjonowaniu wątroby, ale w przypadku hepatektomii prowadzi do większej śmiertelności. Regeneracja wątroby może zostać opóźniona przez obniżenie potencjału proliferacyjnego. Kompensacja tego niedoboru opiera się na zwiększeniu stężenia TNF $\alpha$  i wydłużeniu aktywacji białka c-Jun [Natarajan, 2007].

Insulinopodobny czynnik wzrostu I (ang. *Insulin-like Growth Factor I*, IGF-I) – białko o wysokim podobieństwie sekwencji aminokwasów do insuliny, wydzielane głównie przez wątrobę po stymulacji hormonem wzrostu (ang. *Growth Hormone*, GH). Opisany został w połowie lat 50. ubiegłego wieku jako substancja wspomagająca w budowywanie siarczanów do chrząstki u szczurów [Salmon, 1957]. Jest również mediatorem procesów anabolicznych i indukujących mitozę zależnych od GH [Laron, 1999]. W literaturze znaleźć można doniesienia dotyczące związku pomiędzy IGF-I a EGF podczas regeneracji wątroby – EGF stymuluje syntezę IGF-I [Rogers, 1991; Barreca, 1992; van Neck, 2000]. Działają one podobnie na uszkodzoną wątrobę, ale efekt IGF-I jest bardziej ukierunkowany – EGF m.in. wpływa na produkcję IGF-I. IGF-I stymuluje powstawanie kinazy AKT – białka odpowiedzialnego za przetrwanie komórki. Przykładowo, w mózgu i sercu blokuje ona sygnały programowanej śmierci docierające do komórek. Nieznany jest dokładny mechanizm w przypadku hepatocytów [Zaouali, 2010]. Podczas regeneracji uaktywniają się m.in. czynniki wzrostu wymagane do zainicjowania cyklu komórkowego: TNF $\alpha$ , IL6 oraz wymagane do kontynuowania procesu regeneracji (punkt restrykcyjny w fazie G1 – zapoczątkowanie syntezy DNA): HGF, EGF, TGF $\alpha$  – ekspresja cykliny D1 [Taub, 2004; Fausto, 2006].

Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *basic Fibroblasts Growth Factor*, bFGF) – jego poziom ulega podwyższeniu po utracie części wątroby [Presta, 1989; Sturm, 2004]. Zwiększa on proliferację i migrację (przez nadprodukcję włókien aktywny stresowej) hepatocytów do miejsca zranienia – współdziałanie ze zwiększoną produkcją białek ECM [Ma, 1999].

Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) – grupa białek zaangażowana w procesy rozwoju naczyń krwionośnych (angiogeneza) zarówno fizjologiczne, np. w okresie płodowym, podczas gojenia ran, regeneracji endometrium u kobiet, jak i patologiczne, np. nowotworzenie. W wątrobie wpływa pośrednio na komórki parenchymalne przez uaktywnienie komórek

endotelialnych do wydzielania czynników wzrostu [LeCouter, 2003]. VEGF stymuluje podziały hepatocytów we wczesnej fazie po uszkodzeniu wątroby u szczurów [Bockhorn, 2007]. Podczas regeneracji wątroby, oprócz zwiększenia poziomu VEGF, zwiększa się również liczba jego receptorów na komórkach endotelialnych [Ross, 2001].

### 2.2.2 Substancje inne niż czynniki wzrostu

Onkostatyna M (OSM) to cytokina należąca do grupy interleukin-6 syntetyzowana przez limfocyty T i monocyty. Początkowo była charakteryzowana jako mediator zapalenia, następnie odkryto, że jest zaangażowana w przebieg cyklu komórkowego, transport membranowy i polaryzację komórek. Onkostatyna M jest inhibitorem proliferacji komórek nowotworowych, prawdopodobnie przez wpływ na białka regulujące cykl komórkowy, w tym inhibitor kinazy zależnej od cyklin p27Kip1 [Kortylewski, 1999; Klausen, 2000; Li, 2001]. Odgrywa ona również znaczną rolę w rozwoju wątroby przez m.in. stymulację jądrowego czynnika hepatocytów HNF-4 (ang. *Hepatocyte Nuclear Factor-4*), odpowiedzialnego za ekspresję wielu genów charakterystycznych dla wątroby [Späth, 1998; Kamiya, 2003]. Onkostatyna M indukuje tworzenie połączeń międzykomórkowych przez zmianę położenia białek zaangażowanych w ten proces – E-kadheryny i katenin [Matsui, 2002]. W komórkach niezróżnicowanych, takich jak płodowe ludzkie hepatocyty oraz w komórkach ludzkiej hepatomy – HepG2, uznanej za model dojrzałych hepatocytów, stymuluje rozwój *bile canaliculi*, aktywując kinazę A przez łączenie się z glikoproteiną 130 (gp130) – podjednostką receptora cytokin typu I, co stymuluje transport z obszaru subapikalnego do błony komórkowej w apikalnej części komórki [van der Wouden, 2002; Lázaro, 2003].

Deksametazon (DEX) – syntetyczny glikokortykosteroid o silnym i długotrwałym działaniu przeciwzapalnym i immunosupresyjnym. Stosowany jest w leczeniu takich chorób jak: schorzenia reumatoidalne, choroby skóry, alergie, astma, zapalenie stawów, toczeń i in. [<http://www.drugs.com/dexamethasone.html>]. Dodatek deksametazonu do medium hodowlanego hamuje spontaniczną i indukowaną przez TNF- $\alpha$  apoptozę w ludzkich neutrofilach [Cox, 1995; Liles, 1995; Kato, 1995], hamuje aktywność fosfolipazy A2 i nie dopuszcza do syntezy mediatorów zapalenia [Suffys, 1991; Chang, 1992], hamuje spontaniczną i zależną od TGF  $\beta$ 1 apoptozę w szczurzych komórkach hepatomy przez indukcję Bcl-xL [Chaya, 1996; Yamamoto, 1998], hamuje apoptozę w szczurzych i ludzkich hepatocytach przez zwiększenie ekspresji Bcl-2 i Bcl-xL oraz przez obniżenie aktywności kaspazy-3 [Bailly-Maitre, 2001].



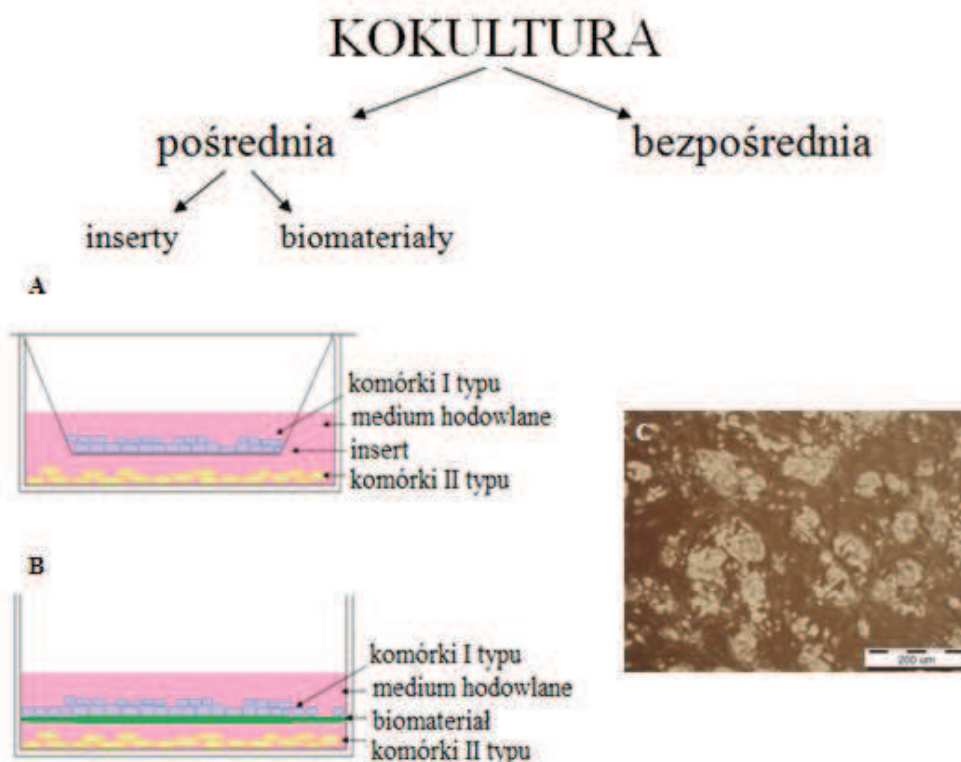
Nikotynamid (wit. B3) jest m.in. prekursorem koenzymów NAD (ang. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*) i NADP (ang. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*) biorących udział w procesach oddychania komórkowego i przemianach energetycznych [Belenky, 2007]. W hepatocytach szczurzych wpływa pozytywnie na produkcję albuminy, zwiększenie ilości DNA w komórce (a pośrednio na zwiększenie liczby hepatocytów) oraz poprawia żywotność komórek w hodowli. Dodatkowo, wspomaga zachowanie właściwego hepatocytom fenotypu – m.in. przez spowalnianie utraty aktywności cytochromu P450, utrzymuje poziom oksygenazy tryptofanu i NAD oraz wzmacnia efekt indukcji syntezy DNA wywołanej przez insulinę i EGF [Paine, 1979; Inoue, 1989; Mitaka, 1991]. Wpływ nikotynamidu na proliferację hepatocytów został odnotowany również w komórkach mysich [Sawada, 1988]. Obecność nikotynamidu w medium powoduje pojawienie się w hodowli małych hepatocytów, przypominających komórki progenitorowe [Mitaka, 1992; Mitaka, 1999; Sato, 1999].

Interleukina 6 (IL-6) jest glikoproteiną należącą do grupy cytokin. Bierze udział m.in. w odpowiedzi immunologicznej, reakcji zapalnej i krwiotworzeniu. Jest czynnikiem stymulującym wzrost i/lub dojrzewanie komórek układu odpornościowego, w tym limfocytów B i komórek cytotoksycznych Tc. Zaangażowana jest w regulację metabolizmu, regenerację i neurogenezę [Simpson, 1997; Scheller, 2011]. Badania nad związkiem IL-6 z komórkami wątrobowymi gryzoni wykazały m.in. na podwyższenie stężenia IL-6 po hepatektomii. Cytokina ta, wydzielana przez komórki Browicza-Kupffera, stymulowała produkcję czynników transkrypcyjnych (STAT3 i C/EBP $\beta$ /NF-IL-6, a w przypadku wątrób zwłókniałych – PIAS3) przez co zwiększona była ekspresja wielu genów. Uważa się, że jest ona substancją powodującą przełączenie faz G0/G1 w hepatocytach [Cressman, 1996; Tiberio, 2008]. Brak IL-6 podczas regeneracji wątroby zaburza syntezę DNA w hepatocytach, opóźnia powrót do wyjściowej masy wątroby oraz zwiększa śmiertelność pooperacyjną [Cressman, 1996; Sudo, 2008]. Wpływ IL-6 na regenerację wątroby jest zależny od dawki – przy zwiększonym podawaniu (hiperstymulacji) powodowała spowolnienie zmiany fazy cyklu komórkowego [Wüstefeld, 2000].

### **2.3. Hodowla komórek wątrobowych – kokultury**

Jednoczesna hodowla dwóch lub więcej typów komórek (kokultura), stosowana od ponad 30 lat, jest jednym ze sposobów przedłużania żywotności i poprawy funkcjonowania tych typów komórek zróżnicowanych, które tracą swoje właściwości bez

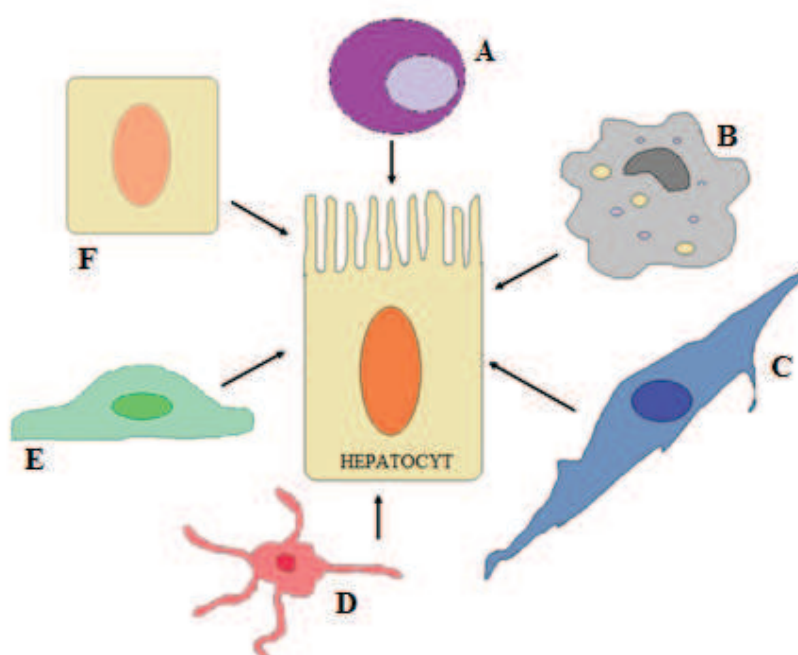
stymulacji ze strony innych komórek [Guguen-Guillouz, 1983; Mesnil, 1987]. Kokultura z innymi komórkami wpływa pozytywnie na funkcjonowanie hepatocytów [Harimoto, 2002; Takayama, 2007; Khetani, 2008], a wynika to z fizycznego oddziaływania, o charakterze heterotypowym, pomiędzy komórkami oraz wpływu cytokin i innych cząsteczek biologicznie czynnych (czynniki wzrostu i hormony), wydzielanych przez komórki podtrzymujące, chociaż szczegółowy mechanizm tego oddziaływania nie jest do tej pory poznany [Krause, 2009; Shang, 2014]. W zależności od rodzaju oddziaływań kokultury można podzielić na bezpośrednie – komórki mają zapewniony kontakt bezpośredni [West, 1985] oraz pośrednie, w tym rozdzielenie dwóch lub więcej typów komórek przy pomocy biomateriału, np. warstwą kolagenu [Bader, 1996] lub hodowla w insertach (wkładkach do dołków płytki hodowlanej z błoną półprzepuszczalną), gdzie komórki mają ze sobą kontakt jedynie przez substancje rozpuszczalne w medium hodowlanym [Kang, 2013]. Schematyczny podział typów kokultury ze względu na rodzaj oddziaływań został przedstawiony na Rysunku 2.3.



Rysunek 2.3 Schemat podziału kokultur ze względu na rodzaj oddziaływania między komórkami. A – hodowla z użyciem insertu, B – hodowla z użyciem biomateriału, C – kokultura bezpośrednia komórek linii C3A z fibroblastami z ludzkiej skóry (zdjęcie własne, skala 200 μm).

Hepatocyty ludzkie i zwierzęce hodowane były m.in. z: (1) wątrobowymi komórkami nieparenchymalnymi, (2) fibroblastami, (3) komórkami epitelialnymi,

(4) komórkami endotelialnymi, (5) komórkami macierzystymi oraz (6) wyspami trzustkowymi [Ricordi, 1989; Guillouzo, 1998; Gao, 2004; Dash, 2009; Shulman, 2013; Samluk, 2013]. Typy komórek stosowane w kokulturze z hepatocytami przedstawiono na Rysunku 2.4. Hepatocyty w kokulturze zachowują specyficzny wielościenny kształt, zdolność do tworzenia *bile canaliculi* oraz utrzymują funkcje syntetyczne (produkcja albuminy, białek macierzy zewnątrzkomórkowej, czynników krzepnięcia krwi i in.) i metaboliczne (przekształcanie amoniaku w mocznik i aktywność cytochromu P450) przez okres dłuższy niż w przypadku monokultury [Guguen-Guillouzo, 1983; Begue, 1984; Agius, 1988; Donato, 1991; Gressner, 1992; Rojkind, 1995; Bhandari, 2001].



Rysunek 2.4 Typy komórek stosowane w kokulturze z hepatocytami (A – komórka macierzysta, B – komórka Browicza-Kupffera, C – fibroblast, D – komórka gwiaździsta, E – komórka endotelialna, F – komórka epitelialna).

### 2.3.1 Kokultura hepatocyty – komórki gwiaździste (komórki Ito, komórki okołozatokowe)

Komórki mezenchymalne, do których zaliczają się komórki gwiaździste, odgrywają rolę podczas rozwoju wątroby – mezenchyma jest inicjatorem różnicowania hepatocytów [Zaret, 2000]. Są one niezbędne również w trakcie regeneracji wątroby, kiedy to powstają niewielkie klastry hepatocytów pozbawione dopływu krwi. Komórki gwiaździste, dzięki swojej budowie, są w stanie rozdzielić grupy hepatocytów i wypełnić przestrzenie pomiędzy nimi lamininą. Komórki endotelialne, dzieląc się, migrują wzdłuż tak powstałych traktów i tworzą sieć naczyniową [Martinez-Hernandez, 1995].

W warunkach *in vivo* komórki gwiaździste wpływają na hepatocyty w sposób mechaniczny – przez oddziaływania komórka-komórka, łącząc hepatocyty z naczyniami krwionośnymi oraz chemiczny – przez wydzielanie mitogenów, m.in.: czynnik wzrostu hepatocytów (HGF), transformujący czynnik wzrostu  $\alpha$  (TGF  $\alpha$ ), epidermalny czynnik wzrostu (EGF) [Schirmacher, 1992; Friedman, 2008]. Natomiast hepatocyty wydzielają insulinopodobny czynnik wzrostu I (IGF I) o potwierdzonym w badaniach *in vitro* działaniu aktywującym proliferację komórek Ito [Gressner, 1995]. Kokultura z komórkami gwiaździstymi wpływa pozytywnie na produkcję albuminy [Abu-Absi, 2004], aktywność cytochromu P450 w hepatocytach ludzkich [Okamoto, 1998] oraz opóźnia proces odróżnicowania w hepatocytach szczurzych [Rojkind, 1995].

### **2.3.2 Kokultura hepatocyty – komórki Browicza-Kupffera**

Komórki Browicza-Kupffera (komórki BK), osiadłe makrofagi występujące wewnątrz sinusoidów wątroby, produkują głównie mediatory stanu zapalnego i reaktywne formy tlenu, ale uważa się również, że są w stanie produkować czynniki wzrostu i cytokiny, inicjujące procesy naprawcze i regenerację wątroby [Lemasters, 1995; Ju, 2002; Olthoff, 2002; Selzner, 2003]. Badania wpływu komórek BK na hepatocyty w warunkach *in vitro* wykazały, że: (1) poziom syntezy białek w hepatocytach w kokulturze z komórkami BK rośnie proporcjonalnie do liczby tych komórek, ale w obecności lipopolisacharydu (LPS) obniża się [West, 1986], (2) czynnikiem aktywującym komórki BK do hamowania produkcji białek przez hepatocyty jest interleukina 2, IL-2 [Curran, 1988], (3) medium pochodzące z hodowli komórek BK izolowanych z wątroby po hepatektomii stymuluje syntezę DNA w hepatocytach [Katsumoto, 1989] oraz (4) obniżenie produkcji albuminy po uszkodzeniu wątroby jest odpowiedzią na cytokiny ostrej fazy produkowane przez komórki BK [Kowalski-Saunders, 1992].

Głównym celem prowadzenia kokultury hepatocytów z komórkami BK jest opracowanie modelu do badań hepatotoksyczności i toksyczności ogólnoustrojowej ksenobiotyków. Używanie monokultury hepatocytów w testach toksyczności leków pozwala jedynie na obserwację bezpośredniego wpływu badanej substancji i/lub jej metabolitów. Zastosowanie kokultury z komórkami Browicza-Kupffera umożliwia symulację wątrobowej odpowiedzi zapalnej na LPS, reakcji na ksenobiotyki oraz interakcji ksenobiotyk-stan zapalny [Hoebe, 2000; Hoebe, 2001; Tukov, 2006; Döll, 2009; Fang, 2012]. Rosnące zapotrzebowanie na możliwie zbliżony do warunków

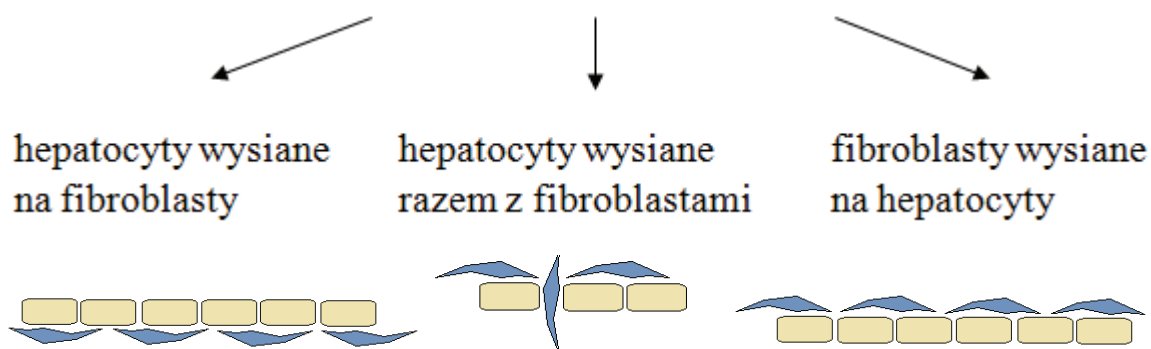
panujących w organizmie model do badania toksyczności ksenobiotyków jest spowodowane niemożnością przełożenia wyników uzyskiwanych *in vitro* czy na modelach zwierzęcych na faktyczne działanie tych substancji na człowieka. Niepowodzenia wynikają z błędnego założenia, że wykorzystanie jedynie hepatocytów (lub ich zamienników, np. hepatocytów unieśmiertelnionych czy nowotworowych linii komórkowych) będzie w stanie właściwie odwzorować sytuację panującą *in vivo*. Odpowiedź organizmu na ksenobiotyki jest wynikiem powiązań występujących pomiędzy komórkami różnego typu – stąd korzystanie z m.in. komórek Browicza-Kupffera do wyżej wspomnianych badań [Edwards, 1993; Milosevic, 1999].

### **2.3.3 Kokultura hepatocyty – fibroblasty**

Fibroblasty, komórki pochodzenia mezodermalnego, są najliczniejszymi komórkami tkanki łącznej. Są zaangażowane w proces gojenia się ran, produkują białka macierzy zewnątrzkomórkowej ECM, w tym kolagen oraz produkują czynniki wzrostu, m.in. czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) [Carrel, 1926; Stoker, 1987; Hiramatsu, 2005]. Jako komórki podtrzymujące (*feeder layer*) w hodowli hepatocytów szczurzych używane były do tej pory fibroblasty mysie [Bhatia, 1998; Kidambi, 2007; Cho, 2008; Miyamoto, 2009; Cho, 2010], ludzkie [Michalopoulos, 1981; Strom, 1981] oraz linie komórkowe, np. NIH 3T3 [Kuri-Harcuch, 1989; Jurima-Romet, 1995; Leite, 2011]. Podczas tego typu hodowli istotne jest pochodzenie fibroblastów (zarodek, namiętność, skóra), proporcja wysiania fibroblastów i hepatocytów [Lu, 2005; Cho, 2007; Samluk, 2013] oraz układ doświadczalny – hepatocyty wysiane na warstwie fibroblastów i odwrotnie lub hepatocyty wysiane jednocześnie z fibroblastami [Strom, 1982; Cho, 2007; Samluk, 2013]. Układy hodowalne stosowane w kokulturze hepatocytów z fibroblastami zostały przedstawione na Rysunku 2.5. Kokultura hepatocytów z fibroblastami, zarówno płaska jak i przestrzenna, wpływa pozytywnie na produkcję albuminy i mocznika oraz aktywność cytochromu P450 [Takezawa, 1992; Kidambi, 2007; Nishikawa, 2008; Cho, 2010; Kobayashi, 2013; Tamai, 2013; Samluk, 2013].

# KOKULTURA

## HEPATOCYTY – FIBROBLASTY



Rysunek 2.5. Układy hodowlane stosowane w kokulturze hepatocytów z fibroblastami.

### 2.3.4 Kokultura hepatocyty – komórki epitelialne

Komórki epitelialne, w tym m.in. cholangiocyty, są jednym z typów komórek używanych w kokulturach z hepatocytami. Wywodzą się one z hepatoblastów – komórek bipotentnych o fenotypie zbliżonym do wątrobowych komórek macierzystych, ale charakteryzujących się ekspresją niektórych izoform P450 (np. 3A7), wyższą ekspresją  $\alpha$ -fetoproteiny (AFP) i albuminy (ALB). W zależności od tego, która ścieżka przekazywania sygnału jest aktywowana, mogą się one przekształcić w progenitory hepatocytów (o fenotypie ALB+, CK19-) lub komórek dróg żółciowych (o fenotypie ALB-, CK19+) [Wauthier, 2008]. Tego rodzaju hodowlę stosuje się m.in. do badań nad aktywnością cytochromu P450. Należy zwrócić uwagę, że ekspresja niektórych izoform tego białka w hepatocytach może ulec obniżeniu w kokulturze (np. CYP2C6, CYP2E1), co może być związane z aktywnością czynników transkrypcyjnych lub hormonów, np. insuliny – działanie na CYP2E1 czy hormonu wzrostu – działanie na CYP2E6 [Lerche, 1997]. Kolejnym obszarem, w którym kokultura hepatocytów z komórkami epitelialnymi znalazła zastosowanie są badania nad białkami ostrej fazy. Niektórzy autorzy wskazują możliwość obniżenia produkcji albuminy w hepatocytach po zastosowaniu interleukiny 6 (IL-6) lub bakteryjnego lipopolisacharydu (LPS) [Conner, 1990; Peters, 2010]. Pozytywny wpływ komórek epitelialnych na hepatocyty przejawia się m.in. w: (1) utrzymaniu hepatocytów w stanie zróżnicowanym (komórki izolowane ze szczura przez okres 3 miesięcy [Perrone, 1998]), (2) zachowaniu specyficznych funkcji (zdolność do produkcji albuminy w hepatocytach szczurzych [Sakai, 1996], produkcji czynników krzepnięcia, aktywności enzymów I i II fazy biotransformacji i zdolności



komórek do detoksyfikacji amoniaku w hepatocytach ludzkich [Auth, 2005]) oraz (3) skróceniu czasu przyklejania się hepatocytów mysich do podłoża [Takashi, 2007].

### 2.3.5 Kokultura hepatocyty – komórki endotelialne

Komórki endotelialne sinusoidów stanowią około 20% komórek wątroby i odgrywają ważną rolę w fizjologii tego narządu, m.in. są zaangażowane w wychwytywanie tłuszczu, a ich uszkodzenie może być powiązane z powstawaniem nowotworów [LeCouter, 2003; Enomoto, 2004; Cogger, 2006]. Komórki te charakteryzują się udziałem w przetwarzaniu różnych substancji *in vivo*, trudnością w utrzymaniu ich w hodowli oraz niskim poziomem lub brakiem typowego dla komórek endotelialnych markera CD31, a linie komórkowe wyprowadzone na ich podstawie nie wykształcają pełnego fenotypu *in vitro* [Braet, 1994; DeLeve, 2004; McCuskey, 2006]. Komórki sinusoidów mogą być zaangażowane w procesy regeneracji wątroby – wzrost przepływu krwi po hepatektomii wpływa na komórki endotelialne, które mogą inicjować procesy związane z podziałami hepatocytów. Zaktywowane komórki sinusoidów wydzielają cytokiny i czynniki wzrostu, jak IL-6, HGF, tlenek azotu, które odgrywają ważną rolę w pierwszym etapie regeneracji wątroby [Ping, 2006]. Wpływają one również pozytywnie na zachowanie specyficznych dla hepatocytów cech – produkcji albuminy i mocznika oraz detoksyfikacji ksenobiotyków [Zinchenko, 2006; Kang, 2013]. Kokultura komórek sinusoidów z hepatocytami wpływa również pozytywnie na komórki endotelialne przez wydłużenie czasu ekspresji właściwego dla nich fenotypu [Kim, 2010].

Drugą grupą komórek endotelialnych wykorzystywanych w kokulturach z hepatocytami są komórki pochodzące z żyły pępowinowej (ang. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC), które są często stosowane jako model śródbłonka. W hodowli z hepatocytami ludzkimi, zarówno w warunkach statycznych jak i dynamicznych, zwiększają one produkcję albuminy, mocznika oraz aktywność cytochromu P450 w porównaniu z monokulturą [Salerno, 2011; Shang, 2014]. Obecność komórek HUVEC utrzymuje poziom ekspresji genów w hodowli szczurzych hepatocytów, a produkcja białek takich jak albumina czy transferyna zostaje nawet zwiększona [Takayama, 2007].

### **2.3.6 Kokultura hepatocyty – komórki macierzyste**

Mezenchymalne komórki macierzyste (ang. *Mesenchymal Stem Cells*, MSCs) to multipotentne komórki adherentne, które mogą zostać pozyskane m.in. z pępowiny, łożyska, szpiku kostnego czy tkanki tłuszczowej. Oprócz zaangażowania w procesy regeneracji tkanek, w tym wątroby, mają również właściwości antyapoptotyczne [Baksh, 2007; Parekkadan, 2007]. Kokultura bezpośrednia ludzkich hepatocytów z ludzkimi MSCs izolowanych z sznura pępowinowego działała pozytywnie na żywotność i fizjologię hepatocytów, ale sam dodatek medium pochodzącego z komórek macierzystych nie wywołuje takiego efektu [Fitzpatrick, 2015]. Odmienne wyniki – największy wpływ medium pochodzącego na hepatocyty – otrzymano podczas hodowli hepatocytów szczurzych z komórkami pochodzącymi ze szczurzego szpiku kostnego [Murakami, 2004; Ijima, 2008]. Inne badania wykazały, że czas przeżycia szczurów, którym przeszczepiono enkapsulowane hepatocyty wraz z komórkami mezenchymalnymi pochodzącymi z tkanki tłuszczowej, był znacznie dłuższy niż po przeszczepieniu samych hepatocytów, a ich parametry biochemiczne – poziom aminotransferazy alaninowej (ALT), aminotransferazy asparaginowej (AST) i bilirubiny – lepsze [Zhang, 2014]. Podobne wyniki uzyskano na modelu mysim [Takeda, 2005].

### **2.3.7 Kokultura hepatocyty – komórki wysp trzustkowych**

Komórki wysp trzustkowych produkują wiele substancji czynnych – insulina, glukagon, somatostatyna, HGF – potencjalnie mogących pozytywnie wpływać na hepatocyty [Tasaka, 1989; Vonen, 1989], a dodatek wysp podczas przeszczepu zwiększa szanse na jego sukces oraz zapobiega zwłóknieniu tkanki [Ricordi, 1989; Ricordi, 1991]. Podczas hodowli hepatocytów z komórkami wysp trzustkowych dochodzi zarówno do zwiększenia ich liczby jak i zwiększenia produkcji albuminy w przeliczeniu na komórkę. W tym przypadku dowiedziono, że większe znaczenie mają substancje wydzielane do medium hodowlanego przez komórki podtrzymujące niż oddziaływania heterotypowe pomiędzy dwoma typami komórek [Juang, 1998; Kaufmann, 1999]. Podobne wyniki uzyskano badając żywotność, produkcję albuminy oraz późną i wczesną apoptozę w hepatocytach mysich hodowanych z mysimi komórkami wysp trzustkowych oddzielonych od siebie membraną [Kuo, 2011].

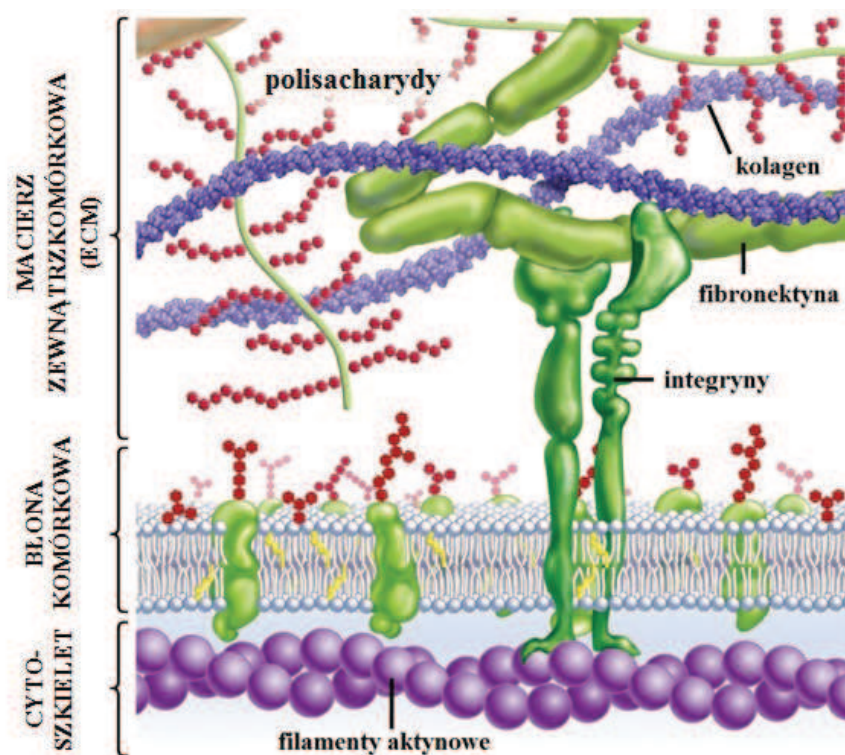


## 2.4. Hodowla komórek wątrobowych – podłoża

Począwszy od lat 50. ubiegłego wieku zwracano uwagę na różnice występujące między komórkami w organizmie a tymi rosnącymi na szkle czy na polistyrenie [Leighton, 1951], a w latach 80. zaczęły pojawiać się artykuły traktujące o istotnym wpływie podłoża na polarność i zachowanie funkcji w hepatocytach [Chambard, 1981; Chen, 1985; Dich, 1988]. W skład tkanek budujących organizm zwierzęcy, oprócz komórek, zalicza się również macierz zewnątrzkomórkową (ECM), która jest wytworem tychże komórek oraz zapewnia im właściwe środowisko (rozmszczenie przestrzenne) i oddziaływania międzykomórkowe. W zależności od rodzaju tkanki i stadium jej rozwoju, rola ECM jest mniej lub bardziej znacząca, ale można wyróżnić kilka wspólnych funkcji, jakie pełni: podtrzymywanie komórek, oddzielanie różnych tkanek i regulowanie przepływu informacji między komórkami. W skład ECM wchodzi m.in. kolageny, proteoglikany, cukry złożone, elastyna, fibronektyna, laminina, integryny, ale także czynniki wzrostu, cytokiny i chemokiny, a ich zawartość, głównie kolagenów i elastyny, ma wpływ na takie właściwości jak sztywność i elastyczność tkanki (Rysunek 2.6). Właściwości te, poza zróżnicowaniem tkanek na miękkie – nerwowa i twarde – kości, mają znaczenie w ekspresji genów, proliferacji, różnicowaniu i migracji komórek. Macierz zewnątrzkomórkowa odgrywa dużą rolę podczas wzrostu, gojenia ran i włóknienia tkanek, a jej składniki najintensywniej produkują komórki tkanki łącznej – fibroblasty, chondrocyty i osteoblasty [Bosman, 2003; Badyłak, 2007; Hynes, 2009; Rozario, 2010].

Macierz zewnątrzkomórkowa wątroby zawiera znaczne ilości proteoglikanów i kolagenu typu I, co zwiększa jej opór na ściskanie. Odpowiedź komórek na ECM jest regulowana przez receptory znajdujące się na powierzchni komórek, np. receptor dla galaktozy na hepatocytach przekazuje sygnały do cytoplazmy i jądra komórkowego [Dini, 1987]. Możliwość zapewnienia komórkom środowiska zbliżonego do tego panującego w organizmie skłoniła do badań nad wykorzystaniem w hodowlach hepatocytów ECM, poszczególnych jej składników, syntetycznych zamienników oraz rusztowań pochodzących z decelularyzowanej tkanki. Zastosowanie takich rozwiązań wymusza często hodowlę trójwymiarową, co dodatkowo imituje stan *in vivo*. Metodą rozwijaną przez ostatnie kilkanaście lat jest hodowla hepatocytów w przepływie, czyli umieszczenie komórek w bioreaktorze, w którym medium hodowlane z niewielką prędkością przepływa ciągle przez komórki. Głównym założeniem tego rodzaju hodowli jest odtworzenie

warunków panujących w organizmie – krążenia krwi w tkance wątrobowej, co ma zmobilizować hepatocyty do zachowania polarności.



Rysunek 2.6. Mikrośrodowisko komórki z uwzględnieniem składników macierzy zewnątrzkomórkowej (na podstawie <http://jonlieffmd.com/blog/extra-cellular-matrix-is-critical-to-neuroplasticity>).

#### 2.4.1 Podłoża naturalne

Do podłoży naturalnych zaliczane są substancje izolowane z tkanki wątrobowej – głównie kolageny i fibronektyna. Ze względu na swoje pochodzenie wydają się być naturalnym wyborem do hodowli hepatocytów.

##### 2.4.1.1 Kolageny

Rodzina białek kolagenowych jest jedną z podstawowych budujących organizm zwierzęcy (kręgowców) i stanowi 20-30% całkowitej masy białek. Najwięcej kolagenu występuje w skórze (ok. połowa całkowitej masy kolagenu), a jego głównym producentem są fibroblasty [Myllyharju, 2004]. Do rodziny białek kolagenowych zaliczają się cząsteczki złożone z trzech łańcuchów alfa – identycznych lub nie i mające zdolność do formowania sieci makrocząsteczkowej. Charakterystyczne w budowie kolagenu jest układ aminokwasów Gly-X-Y, gdzie X to najczęściej prolina, a Y – hydroksyprolina. Do tej pory zidentyfikowano 28 typów kolagenu u kręgowców, a wiele innych białek zawiera tzw. domeny kolagenowe [Kadler, 2007]. Na podstawie struktury,

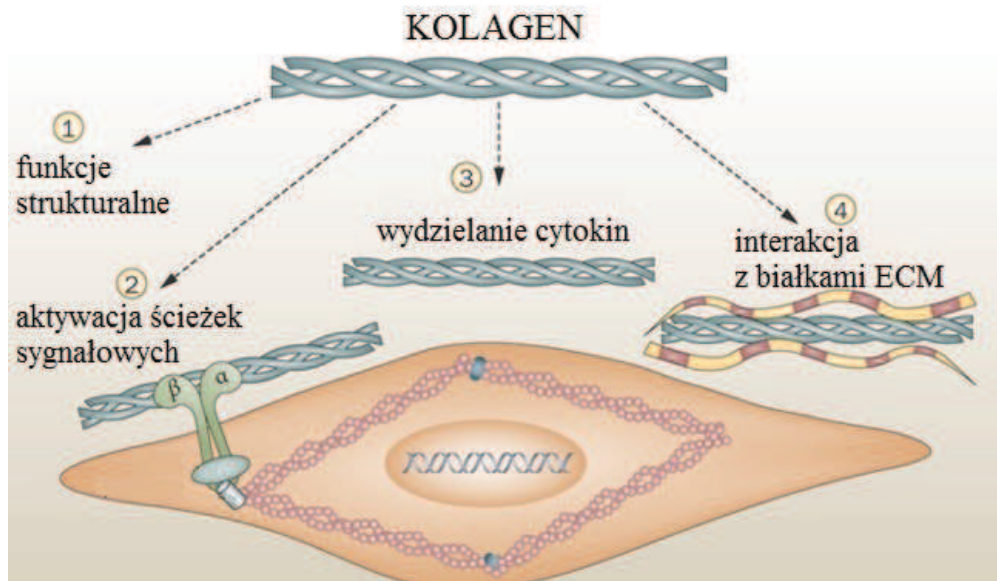
jaką przyjmują cząsteczki kolagenu, można wyróżnić: (1) kolagen włókienkowy, do którego zalicza się typ I, II, III i V, (2) kolagen niewłókienkowy, do którego zalicza się typ VI i IX oraz (3) kolagen IV tworzący błonę podstawną (Tabela 2.1). Najbardziej rozpowszechnionym w organizmie jest kolagen typu I [Ricard-Blum, 2011; Shoulders, 2009].

Tabela 2.1. Wybrane typy kolagenów – podział ze względu na strukturę (na podstawie *The Collagen Family*, Ricard-Blum, 2011).

<b>Typ</b>	<b>Budowa</b>	<b>Lokalizacja</b>
I (włókienkowy)	2 łańcuchy $\alpha 1$ + 1 łańcuch $\alpha 2$	skóra, ścięgna, kości, więzadła, zębina
II (włókienkowy)	3 łańcuchy $\alpha 1$	chrząstka, ciało szkliste
III (włókienkowy)	3 łańcuchy $\alpha 1$	skóra, mięśnie, naczynia krwionośne
IV	2 łańcuchy $\alpha 1$ + 1 łańcuch $\alpha 2$	błona podstawna
V (włókienkowy)	3 łańcuchy $\alpha 1$	podobnie jak typ I
VI (niewłókienkowy)	1 łańcuch $\alpha 1$ + 1 łańcuch $\alpha 2$ + 1 łańcuch $\alpha 3$	większość tkanek miękkich
IX (niewłókienkowy)	2 łańcuchy $\alpha 1$ + 1 łańcuch $\alpha 2$	chrząstka, ciało szkliste

Kolageny są zaangażowane w wiele procesów: podtrzymywanie, przyleganie i migracja komórek, nowotworzenie, angiogeneza, morfogeneza, odbudowa tkanek, filtracja na poziomie molekularnym [Gelse, 2003]. Sposoby oddziaływania kolagenów na komórki przedstawione zostały na Rysunku 2.7.

Pierwsze doniesienia dotyczące wykorzystania żelu utworzonego z kolagenu typu I jako podłoża w hodowli hepatocytów pochodzą z lat 70. ubiegłego wieku [Michalopoulos, 1975]. Sposób ten używany jest do tej pory i wspomaga m.in. metabolizm i aktywność transportową w świeżo izolowanych hepatocytach przez okres kilku dni [Rippin, 2001; Ulvestad, 2011]. Kolagen w formie włókienkowej hamuje wzrost wielu typów komórek, w tym również hepatocytów, a w formie monomerów stymuluje cykl komórkowy [Hansen, 1999]. Zwiększa on jednak ich przeżywalność i zachowuje zróżnicowany fenotyp [Ben-Ze'ev, 1988]. Struktura kolagenu jest powiązana z przekazywaniem sygnału przez EGF w hepatocytach – kolagen spolimeryzowany blokuje syntezę DNA przez zmianę w fosforylacji receptora dla EGF, a przez to hamowanie przejścia fazy cyklu G1-S [Fassett, 2003; Fassett, 2006].

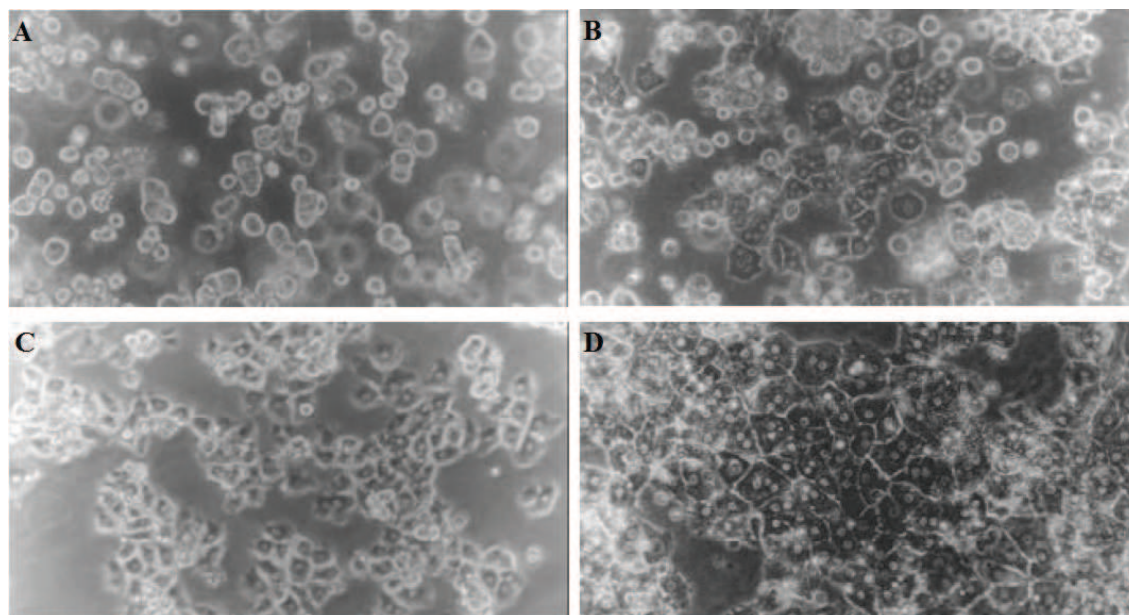


Rysunek 2.7. Podstawowe funkcje kolagenu w organizmie (na podstawie *Cellular and molecular mechanisms of thoracic aortic aneurysms*, El-Hamamsy, 2009).

Kolejną modyfikacją z użyciem kolagenu jest tzw. kanapka kolagenowa, czyli umieszczenie hepatocytów pomiędzy dwoma warstwami kolagenu, co ma zapewnić środowisko zbliżone do warunków *in vivo*. Hepatocyty mysie w kanapce kolagenowej charakteryzują się wyraźniej zaznaczonymi granicami pomiędzy komórkami oraz formowaniem *bile canaliculi* [Choi, 2013]. Ten typ hodowli pozwolił również na zwiększenie żywotności, zachowanie polarności komórek oraz specyficznych dla nich funkcji w porównaniu do jednej warstwy kolagenu [Dunn, 1991; Liu, 1999]. Ponadto w hodowli hepatocytów w kanapce kolagenowej, zwiększone zostało wydzielanie mocznika, aktywność różnych izoform cytochromu P450, układ filamentów aktynowych przypominał ten występujący w warunkach *in vivo*, formowały się struktury *bile canaliculi*, a poziom ekspresji białek transportowych był zbliżony do tego występującego w organizmie [LeCluyse, 1994; Turncliff, 2006; Swift, 2010; Yin, 2012; Shaefer, 2012]. Kanapkę kolagenową, ze względu na pozytywny wpływ na aktywność enzymów I i II fazy biotransformacji oraz produkcję białek transportowych, stosuje się m.in. w badaniach nad cytotoksycznością ksenobiotyków i ich wpływem na wydzielanie kwasów żółciowych na poziomie hepatocytów [Richert, 2002; Richert, 2009; De Bruyn, 2013]. Analiza mikromacierzowa ekspresji genów specyficznych dla wątroby (tj. metabolizm cholesterolu, kwasów tłuszczowych, alkoholu i węglowodanów, produkcja mocznika, detoksyfikacja ksenobiotyków) wykazała znacznie wyższy poziom ekspresji w hepatocytach szczurzych hodowanych w kanapce kolagenowej niż w hepatocytach



hodowanych na warstwie żelu kolagenowego [Kim, 2010]. Wykorzystanie kolagenu w formie żelu lub kanapki kolagenowej w hodowli świńskich hepatocytów poprawiło parametry wątrobowe, takie jak synteza albuminy, zawartość AST i produkcja mocznika, po krioprezerwacji w porównaniu do komórek kontrolnych [Liu, 2004]. Porównanie morfologii hepatocytów hodowanych na różnych podłożach zostało przedstawione na Rysunku 2.8.



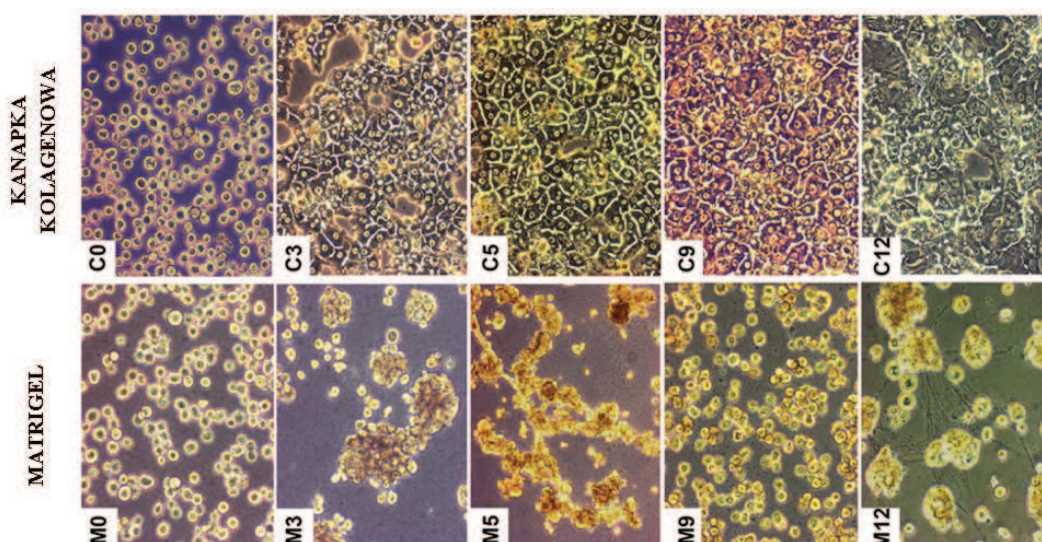
Rysunek 2.8. Porównanie morfologii hepatocytów hodowanych na różnych podłożach kolagenowych. A – hepatocyty szczurze w żelu kolagenowym po 24 godzinach, B – hepatocyty szczurze w żelu kolagenowym po 72 godzinach, C – hepatocyty świńskie na żelu kolagenowym po 4 godzinach, D – hepatocyty świńskie w kanapce kolagenowej po 5 dniach hodowli. Powiększenie 200x (na podstawie *Primary hepatocyte culture in collagen gel mixture and collagen sandwich*, Wang, 2004).

Działanie kolagenu może zostać wzmocnione przez odpowiednie suplementowanie medium hodowlanego. Praca Jasmunda i wsp. pokazała, że występuje zależność między rodzajem medium hodowlanego – Medium Williamsa i SF-3, a rodzajem użytego podłoża – kolagen lub kolagen z dodatkiem innych białek ECM [Jasmund, 2007]. Stosowane są również mieszaniny kolagenu z innymi substancjami wspomagającymi funkcjonowanie hepatocytów, np. dodatek heparyny lub karagenu typu lambda znaczenie przedłużał okres produkcji albuminy przez szczurze hepatocyty *in vitro* (odpowiednio 4 i 5 tygodni w porównaniu do 1 tygodnia w kontroli, jaką był niemodyfikowany żel kolagenowy). Nie obserwowano takich zmian w przypadku suplementowania medium hodowlanego tymi substancjami [Lin, 1997].

#### 2.4.1.2 Inne białka macierzy zewnątrzkomórkowej (Matrigel<sup>®</sup>, fibronektyna)

Matrigel<sup>®</sup> – nazwa handlowa produktu firmy Corning Life Sciences – to mieszanina białek pozyskiwanych z mysiego mięsaka. Miała ona zastąpić kolagen typu I jako substrat stosowany w celu zwiększenia adhezji komórek w warunkach *in vitro*, a jej głównymi składnikami są laminina, kolagen typu IV i proteoglikany. Oddziaływania pomiędzy składnikami Matrigelu<sup>®</sup> a hepatocytami szczurzymi wpływały na kształt komórek i jądra komórkowego oraz na strukturę chromatyny [Schuetz, 1988]. Badania Liu i współpracowników na hepatocytach szczurzych, dotyczące wpływu różnego rodzaju podłoży na ekspresję enzymu II fazy biotransformacji – sulfotransferazy, wykazały największą indukcję tego enzymu podczas hodowli na Matrigelu<sup>®</sup> w porównaniu do kolagenu, kanapki kolagenowej i kokultury z komórkami epitelialnymi. Morfologia komórek została zachowana przez okres 4 dni [Liu, 1996]. Podobne wyniki uzyskano podczas indukcji fenobarbitalem cytochromu P450 (dokładniej białek P450-b i P450-e) – poziom mRNA w komórkach hodowanych na Matrigelu<sup>®</sup> był zbliżony do występującego w tak samo traktowanej wątrobie szczurzej. Hepatocyty na podłożu z kolagenu typu I produkowały ilości cytochromu niemożliwe do detekcji [Schuetz, 1988]. Również hodowla ludzkich hepatocytów z użyciem Matrigelu<sup>®</sup> charakteryzowała się wyższym poziomem ekspresji genów kodujących białka biorące udział w biotransformacji ksenobiotyków – zarówno przed jak i po indukcji [Gross-Steinmeyer, 2005]. Co ciekawe, interakcja komórka-komórka w hodowli hepatocytów na Matrigelu<sup>®</sup> nie jest istotna do zachowania funkcji specyficznych dla tego rodzaju komórek. W przeciwieństwie do hepatocytów hodowanych w kanapce kolagenowej, które wymagały wysokiej gęstości wysiania i formowania agregatów, aby spowolnić proces odróżnicowania, hepatocytom na Matrigelu<sup>®</sup> wystarczało bogactwo składników, jakie zapewniała macierz [Moghe, 1997]. Porównanie morfologii hepatocytów szczurzych hodowanych w kanapce kolagenowej i na podłożu z Matrigelu<sup>®</sup> przedstawiono na Rysunku 2.9.

Potwierdzony został również wpływ Matrigelu<sup>®</sup> jako podłoża na zwiększenie produkcji charakterystycznych dla hepatocytów białek m.in. albuminy [Ben-Ze'ev, 1988; Matsushita, 1994] oraz na obniżenie ekspresji białek cytoszkieletu, czyli markerów odróżnicowania – aktyny, tubuliny, wimentyny [Harris, 2004]. Również ekspresja czynników transkrypcyjnych, w tym HNF1 $\alpha$  (ang. *Hepatocyte Nuclear Factor 1 $\alpha$* ), HNF1 $\beta$ , HNF3 $\gamma$ , HNF4 $\alpha$ , HNF6, jest podwyższona w hepatocytach hodowanych na Matrigelu<sup>®</sup> w porównaniu do tych hodowanych w kanapce kolagenowej [Borlak, 2015].



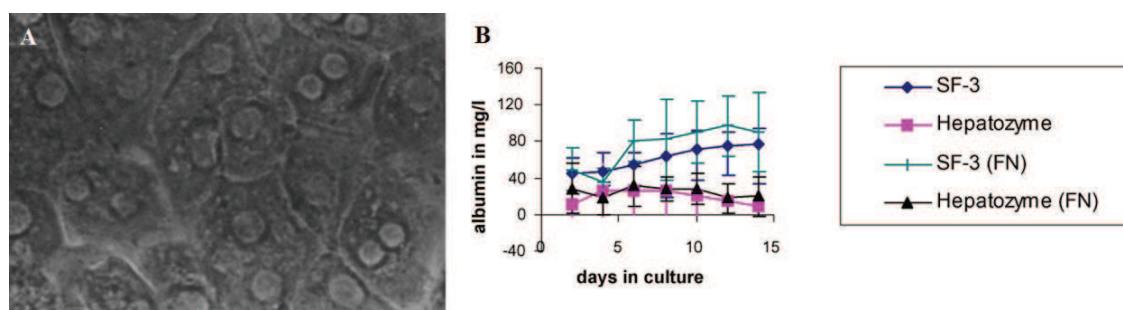
Rysunek 2.9. Porównanie morfologii hepatocytów szczurzych hodowanych w kanapce kolagenowej i na podłożu z Matrigelu<sup>®</sup>. Zdjęcia wykonywane były po wysianiu komórek (C0, M0) oraz w 3 (C3, M3), 5 (C5, M5), 9 (C9, M9) i 12 (C12, M12) dniu hodowli. Powiększenie 200x (na podstawie *Regulation of liver enriched transcription factors in rat hepatocytes cultures on collagen and EHS sarcoma matrices*, Borlak, 2015).

Fibronektyna jest glikoproteiną złożoną z dwóch podjednostek o masie ok. 250 kDa, na które składają się 3 różne moduły aminokwasowe o różnej długości, a ich układ jest wynikiem alternatywnego splicingu mRNA [Schwarzbauer, 1991]. W organizmie występuje w dwóch podstawowych formach: fibronektyny osoczowej – rozpuszczalnego dimeru produkowanego przez hepatocyty i krążącego w krwi i fibronektyny komórkowej – dimeru (lub jego wielokrotności) produkowanego m.in. przez fibroblasty i komórki epitelialne i odkładanego w formie włókien w ECM [Tamkun, 1984; Kornblihtt, 1996]. Fibronektyna odgrywa rolę w adhezji, proliferacji, różnicowaniu i migracji komórek, co jest istotne w takich procesach jak embriogeneza, naprawa tkanek czy podczas przekazywania sygnału [Miyamoto, 1998; Magnusson, 1998; Ruoslati, 1999; Ghosh, 2006]. Podczas regeneracji wątroby poziom mRNA fibronektyny zwiększa się kilkukrotnie [Caputi, 1995]. W hodowli ułatwia przyczepianie się i rozplaszczanie hepatocytów szczurzych [Blaauboer, 1979] oraz promuje zależną od EGF syntezę DNA [Sawada, 1986]. Morfologia hepatocytów szczurzych hodowanych z dodatkiem fibronektyny została przedstawiona na Rysunku 2.10.A. Badania przeprowadzone na myszach z inaktywowanym genem fibronektyny wykazały, że jej brak indukuje apoptozę w hepatocytach przez obniżenie poziomu białka Bcl-xL. Ponadto hepatocyty hodowane na podłożu z fibronektyny były lepiej chronione przed niekorzystnym wpływem reaktywnych form tlenu niż te, które rosły na kolagenie typu I [Moriya, 2012].



Fibronektyna w hodowli wspiera formowanie struktur imitujących organizację wątroby oraz pozytywnie oddziałuje na poziom ekspresji charakterystycznych dla hepatocytów genów – albuminy i  $\alpha$ -fetoproteiny, co jest związane z nadekspresją HNF4 [Sánchez, 2000]. Praca Jasmunda i wsp. z 2007 r. również wykazała pozytywny wpływ fibronektyny na produkcję albuminy w hepatocytach ludzkich (Rysunek 2.10.B)

W roku 2000 Hodgkinson i wsp. opublikowali dane dotyczące niekorzystnego wpływu fibronektyny na hepatocyty. Jej obecność przyspiesza degradację mRNA (przez indukcję rybonukleazy) izoformy cytochromu P450 – CYP2C11 i dysmutazy ponadtlenkowej zawierającej miedź i cynk (ang. *SuperOxide Dismutase*, CuZnSOD). Jest to skorelowane z rozplaszczaniem się komórki, ale badania wykazały, że rearanżacja cytoszkieletu jedynie zapoczątkowuje ten proces [Hodgkinson, 2000].



Rysunek 2.10. Wpływ fibronektyny na hepatocyty. A – morfologia hepatocytów szczurzych na podłożu z fibronektyny (na podstawie *Substrate adhesion of rat hepatocytes: a comparison of laminie and fibronectin as attachment proteins*, Johansson, 1981). B – pozytywny wpływ fibronektyny (jasnoniebieska linia SF-3 (FN)) na produkcję albuminy w hepatocytach ludzkich (na podstawie *The influence of medium composition and matrix on long-term cultivation of primary porcine and human hepatocytes*, Jasmund, 2007).

#### 2.4.2 Podłoża sztuczne

Biomateriały, w przeciwieństwie do macierzy zewnątrzkomórkowej, nie mają tak skomplikowanej budowy i składu chemicznego, co znacznie upośledza ich rolę w przekazywaniu sygnałów między komórkami. Ich głównym zadaniem jest podtrzymywanie komórek i tworzenie środowiska zbliżonego do warunków *in vivo*. W tym celu stosuje się dodatkowe modyfikacje biomateriałów przy użyciu peptydów sygnałowych lub czynników wzrostu. Jako biomateriały wykorzystywane są polimery naturalne, np. alginian, żelatyna, chitozan i sztuczne, np. polistyren, polilizyna, polieterosulfon. Polimery naturalne mają właściwości mechaniczne zbliżone do tkanek ludzkich i są biodegradowalne, ale ich skład może być zmienny, a ich trwałość jest ograniczona. Polimery sztuczne z kolei mogą być wytwarzane na skalę przemysłową,



a ich parametry mechaniczne, okres degradacji czy wielkość porów mogą być z łatwością kontrolowane na etapie produkcji [Rosso, 2005; Ananthanarayanan, 2011].

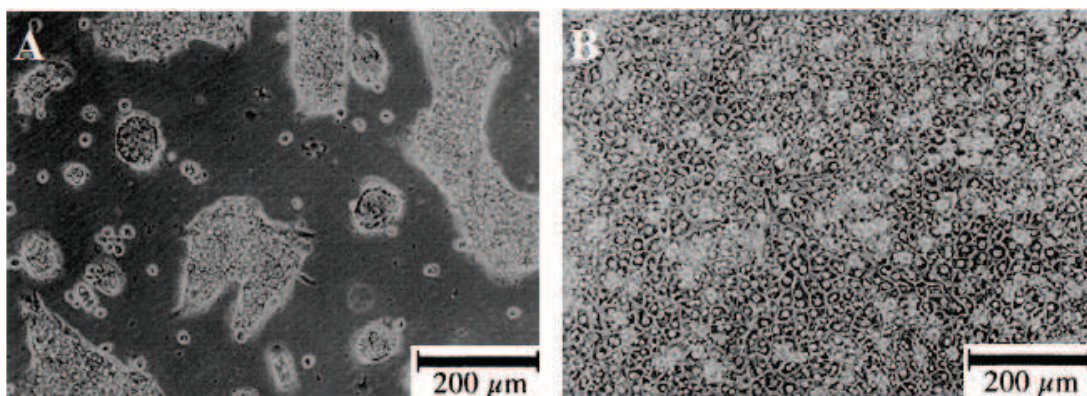
Alginiiany to naturalnie występujące polimery anionowe pozyskiwane z wodorostów morskich (brązowych alg, np. *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera*). Ze względu na biogodność, niewielką toksyczność, niską cenę i zdolność do formowania żelu w obecności jonów dwuwartościowych, np.  $\text{Ca}^{2+}$ , znalazły one szerokie zastosowanie w aplikacjach biomedycznych – ułatwiają gojenie ran, są nośnikami substancji biologicznie czynnych i wykorzystywane są podczas przeszczepów komórkowych [Langer, 1993; Wee, 1998; Lee, 2001].

Zarówno w przypadku linii komórkowych (HepG2, HHY41) jak i hepatocytów izolowanych ze szczura hodowla w kulkach alginianowych lub na podłożu z alginianu pozwalała na utrzymanie funkcji wątrobowych – synteza białek, w tym albuminy, aktywność cytochromu P450, produkcja mocznika [Glicklis, 2000; Khalil, 2001; Nayak, 2014]. Prowadzone były również badania dotyczące optymalizacji tego typu hodowli pod kątem badań cytotoksyczności [Ringel, 2005]. Kulki alginianowe ułatwiają również zachowanie funkcji po krioprezerwacji hepatocytów szczurzych i ludzkich [Guyomard, 1996]. Prowadzone były także badania nad optymalizacją hepatocytów ludzkich w kulkach alginianowych do przeszczepu w ramach terapii komórkowej [Jitraruch, 2014].

Chitozanem określa się grupę polimerów biokompatybilnych i biodegradowalnych, pochodnych chityny, o różnej masie cząsteczkowej, lepkości i stopniu deacetylacji, który waha się między 40 a 98%. Dzięki obecności grup aminowych jest podatny na różne modyfikacje. Charakteryzuje się wysoką reaktywnością chemiczną, przyłącza się do ujemnie naładowanych powierzchni oraz chelatuje jony metali. Chitozan znalazł szerokie zastosowanie m.in. w przemyśle farmaceutycznym i jest wykorzystywany w transporcie leków (ze szczególnym uwzględnieniem kontrolowanego uwalniania substancji czynnej), w tym transporcie peptydów oraz zwiększaniu stopnia absorpcji leków hydrofilowych (dotyczy drogi pokarmowej i wziewnej). Ponadto używany jest do wprowadzania DNA do komórek eukariotycznych, jako materiał budujący sztuczną skórę oraz jako substancja o działaniu przeciwbakteryjnym [Kumar, 2000; Singla, 2001; Rinaudo 2006]. Chitozan jest wykorzystywany do hodowli hepatocytów ze względu na swoją budowę przypominającą strukturę glikozaminoglikanów (GAG) w wątrobie [Kawase, 1997].

Podłoże z chitozanu w formie gąbki sprzyja adhezji hepatocytów szczurzych, ich wzrostowi, produkcji albuminy i mocznika – efekt ten był zwiększony w obecności fruktozy [Li, 2003] lub alginianu [Li, 2003]. Dobre efekty uzyskuje się przy zastosowaniu chitozanu z dodatkiem galaktozy, która jest rozpoznawana przez receptor ASGR (ang. *ASialoGlycoprotein Receptor*) na hepatocytach, przez co zwiększa dodatkowo wiązanie komórek do podłoża – 69,1% komórek po 2 godzinach na podłożu niemodyfikowanym i 94,1% komórek po 2 godzinach na podłożu z dodatkiem galaktozy [Park, 2003]. Ponadto zwiększona zostaje produkcja albuminy, mocznika i aktywność cytochromu P450 [Feng, 2009]. Rodzaj dodatków wykorzystywanych w przygotowaniu podłoża może być zależny od pochodzenia komórek. Badania przeprowadzone przez Elçin i wsp. w 1998 r. pokazały, że hepatocyty szczurze funkcjonują lepiej na podłożu chitozan + kolagen, a hepatocyty świńskie na podłożu chitozan + albumina + żelatyna [Elçin, 1998]. Chitozan z dodatkiem polilaktydu zastosowano przy przeszczepianiu hepatocytów świńskich szczurom z ostrą niewydolnością wątroby – zachowana została produkcja albuminy, mocznika i białka Ki67, które jest markerem proliferacji komórek [Chen, 2011]. Poprawę funkcji wątrobowych – produkcja albuminy i mocznika oraz zwiększenie proliferacji uzyskano również w komórkach linii L-02 hodowanych na podłożu chitozan + żelatyna [Wu, 2011].

Najczęściej stosowanym podłożem do hodowli komórek adherentnych jest polistyren. Ten biokompatybilny materiał nie zapewnia jednak odpowiednich warunków do funkcjonowania hepatocytów *in vitro*, stąd modyfikacje z użyciem peptydów adhezyjnych lub ligandów cukrowych. Peptyd RGD (arginina-glicyna-kwas asparaginowy) stymuluje adhezję komórek, ponieważ jest to najmniejsza domena większości białek ECM, w tym kolagenu i fibronektyny [Hersel, 2003]. Hepatocyty hodowane na podłożu z dodatkiem peptydu RGD wykazują większą produkcję albuminy i mocznika oraz większą aktywność cytochromu P450 [De Bartolo, 2005; Ijima, 2005]. Przykłady morfologii hepatocytów szczurzych hodowanych na polistyrenie i polistyrenie zmodyfikowanym peptydem RGD przedstawione zostały na Rysunku 2.11.



Rysunek 2.11. Porównanie morfologii hepatocytów szczurzych na polistyrenie (A) i polistyrenie zmodyfikowanym peptydem RGD (B) po 2 dniach hodowli (na podstawie *Promotion of Monolayer Formation and High Expression of Ammonia Metabolism of Primary Rat Hepatocytes on Arginine-Glycine-Aspartic Acid-Containing Peptide-Coated Polystyrene Dish*, Ijima, 2005).

Modyfikacja polistyrenu przy użyciu ligandów cukrowych zwiększa możliwość połączenia się komórek z podłożem przez obecność na hepatocytach odpowiednich receptorów. Dodatek galaktozy promuje formowanie agregatów z hepatocytów szczurzych i ogranicza proliferację komórek nieparenchymalnych wątroby [Yura, 2009]. Modyfikacja przy użyciu laktozy spowalnia utratę funkcji wątrobowych (produkcja albuminy, aktywność cytochromu P450) w hepatocytach szczurzych [Gutsche, 1996].

Polimery sztuczne w hodowli hepatocytów szczurzych mogą imitować właściwości chemiczne, mechaniczne i strukturę ECM lub jego składników i w ten sposób zwiększać adhezję i rozplaszczanie komórek do tego stopnia, że zmniejszona zostaje synteza albuminy i mocznika – istnieje zależność między stopniem przyklejenia hepatocytów do podłoża a ich wydajnością produkcyjną [Bettinger, 2009]. Wykorzystywane są również podłoża mieszane, np. hepatocyty ludzkie hodowane były na podłożu z kolagenu i kopolimeru glikolidu z laktydem. Na podłożu tym zachowana była największa produkcja albuminy i mocznika przez okres prawie 2 tygodni [Li, 2006]. Na bazie polimerów sztucznych powstała również syntetyczna kanapka, zawierająca hepatocyty szczurze. Warstwa dolna składała się z polietylenu tereftalanu (PET) z dodatkiem galaktozy, warstwa górna z PET z dodatkiem peptydu GRGDS (glicyna-arginina-glicyna-kwas asparaginowy-seryna). Hepatocyty w takich warunkach zachowały polarność, zwiększyła się liczba interakcji komórka-komórka oraz dłużej utrzymał się stan zróżnicowania (w porównaniu do monowarstwy na kolagenie). Zwiększona została wymiana substancji odżywczych, metabolitów, ksenobiotyków i sygnałów biochemicznych. Ponadto można zyskać większą kontrolę nad transportem, wybierając

membrany o dowolnej wielkości (0,1 – 10  $\mu\text{m}$ ) i gęstości ( $10^5$  –  $10^8/\text{cm}^2$ ) porów oraz otrzymać bardziej jednorodną populację, dzięki utrzymaniu stabilnych warunków wzrostu [Du, 2008].

### 2.4.3 Hodowle trójwymiarowe

Hodowle 3-wymiarowe (3D) uważa się za najbardziej przypominające środowisko *in vivo*, a więc i za takie, które zapewniają charakterystyczny dla hepatocytów fenotyp. Widoczne jest to zwłaszcza w przypadku linii komórkowych, które z różnych powodów mają upośledzoną produkcję niektórych białek, np. enzymów cyklu mocznikowego lub obniżoną zdolność biotransformacji. Komórki te, hodowane w 3D, charakteryzują się zmienioną ekspresją genów – bardziej zbliżoną do wątrobowej, przez co mogą być odpowiednim modelem, np. do badań cytotoksyczności. Izolowane hepatocyty, dzięki zapewnieniu oddziaływań komórka-komórka i polaryzacji, utrzymują swoje funkcje dłużej i mogą być wykorzystane w przeszczepach i w systemach podtrzymujących wątrobę [Landry, 1985; Koide, 1989; Wu, 1999; Nahmias, 2007; Pampaloni, 2009; Ijima, 2010].

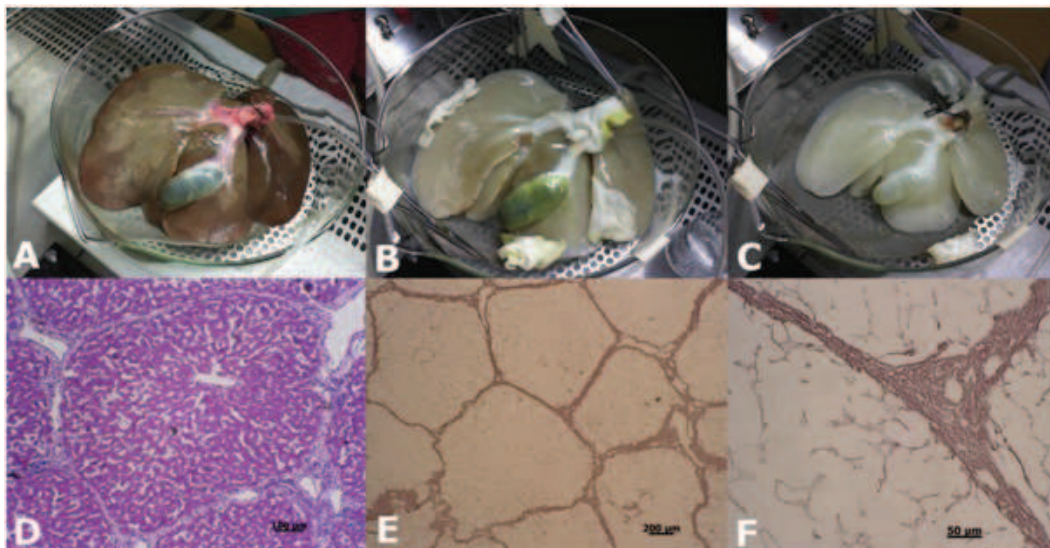
Hepatocyty mysie w podłożu 3D z kolagenu typu I charakteryzują się zwiększoną produkcją glukozy [Wen, 2009], a mysia linia komórkowa mhAT3F w podłożu 3D z Matrigelu<sup>®</sup> produkuje więcej albuminy i bilirubiny niż komórki kontrolne na podłożu z kolagenu [Haouzi, 2005]. Hepatocyty szczurze w podłożu 3D z kolagenu typu I syntetyzują więcej albuminy i mocznika oraz wykazują większą aktywność cytochromu P450 [Gómez-Lechón, 1998]. Podobne wyniki uzyskano w hodowli na gąbce alginianowej [Glicklis, 2000] i w siatce drukowanej z żelatyny wymieszanej z komórkami [Wang, 2006]. Hepatocyty ludzkie hodowane zarówno w podłożu 3D z Matrigelu<sup>®</sup> (komórki linii QSG-7701) jak i na specjalnie przygotowanych płytkach ze szklanym dnem (komórki mrożone) produkowały więcej albuminy i bilirubiny oraz miały wyższą aktywność cytochromu P450 niż kontrola rosnąca w hodowli płaskiej [Zhang, 2010; Nishimura, 2010; Nishimura, 2011].

### 2.4.4 Decelularyzowana wątroba

Podłoża do hodowli komórek składające się z tkanki pozbawionej komórek są jednym z bardziej atrakcyjnych sposobów uzyskiwania macierzy zewnątrzkomórkowej do trójwymiarowych hodowli. Dzięki zachowaniu struktury tkanki i domen wiążących się



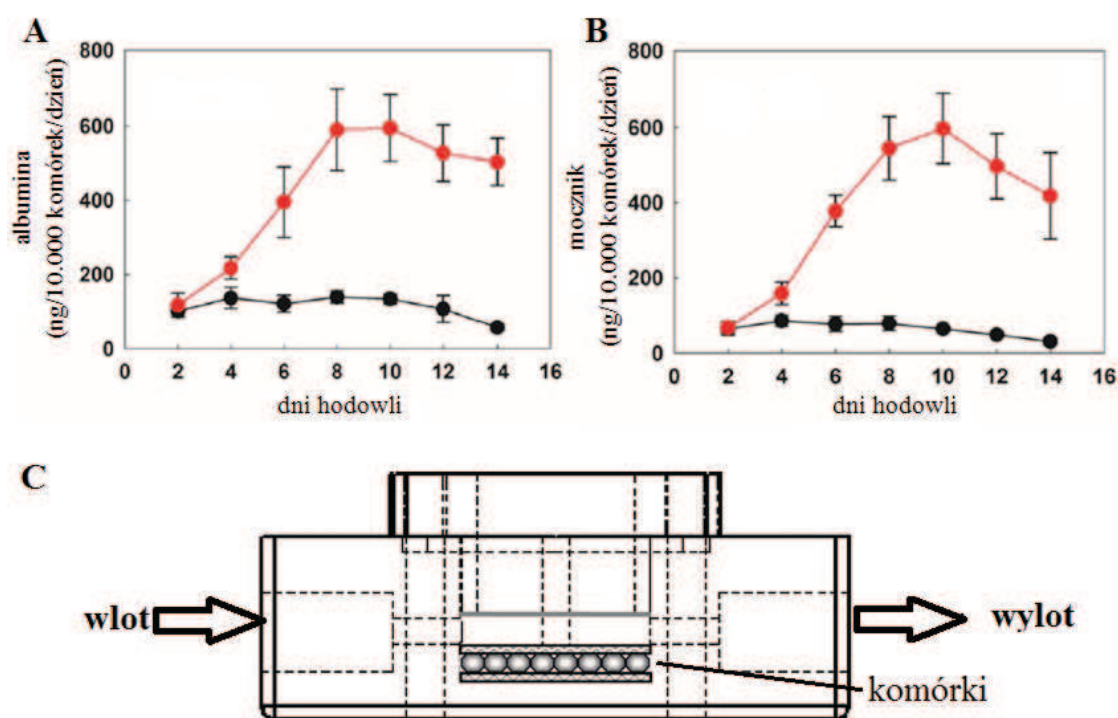
z komórkami stanowią one idealne środowisko dla wzrostu hepatocytów, ich migracji i podziałów [Ren, 2013; Wang, 2014; Hussein, 2015). Metoda decelularyzowania tkanki wątrobowej opiera się na wypłukaniu krwi, rozpuszczeniu komórek przy użyciu detergentu, np. SDS (ang. *Sodium Dodecyl Sulfate*) oraz oczyszczeniu tak przygotowanej tkanki przy użyciu neutralnego buforu, np. PBS. W zależności od wielkości zwierzęcia, a tym samym wielkości wątroby, oraz oczekiwanego efektu końcowego są stosowane różne modyfikacje przedstawionej metody decelularyzacji [Baptista, 2011; Barakat, 2012; Nakumara, 2013]. W pozbawionej komórek wątrobie pozostają składniki ECM – białka fibronektyna, laminina, kolagen typ I, II i IV [Mattei, 2014; Pan, 2014; Bühler 2015]. Przykładowy schemat przygotowania decelularyzowanej wątroby świńskiej został przedstawiony na Rysunku 2.12. Hepatocyty umieszczone w decelularyzowanej wątrobie podejmują swoje podstawowe funkcje – produkcja albuminy i mocznika oraz biotransformacja ksenobiotyków przy pomocy cytochromu P450, np.: hepatocyty szczurze w szczurzej wątrobie [Uygun, 2011], komórki linii HepG2 w szczurzej wątrobie [Pan, 2014] oraz hepatocyty szczurze w świńskiej wątrobie [Wu, 2015]. Tak przygotowany materiał, w którym obserwujemy się podjęcie funkcji przez hepatocyty, może zostać przeszczepiony [Uygun, 2010].



Rysunek 2.12. Etapy przygotowywania decelularyzowanej wątroby świńskiej. A – po płukaniu PBS, B – po 12 godzinach perfuzji 1% roztworem SDS, C – po 24 godzinach perfuzji 1% roztworem SDS, D – barwienie hematoksyliną/eozyną wątroby przed decelularyzacją, E, F – barwienie hematoksyliną/eozyną wątroby po decelularyzacji (na podstawie *Controlled processing of a full-sized porcine liver to a decellularized matrix in 24 h*, Bühler, 2015).

## 2.4.5 Hodowle w przepływie

Dynamiczna hodowla hepatocytów pozwala na zachowanie zarówno cech strukturalnych jak i biologicznych. W warunkach *in vivo* jest to wynikiem oddziaływań komórka-komórka, hydrodynamiki płynów (krwi) oraz fizykochemicznego gradientu tlenu i substancji zawartych w osoczu. Rozwiązania zastosowane w urządzeniach mikroprzepływowych mają za zadanie odtworzyć wyżej wspomniane warunki, co pozwoli na zachowanie morfologii właściwej hepatocytom – polaryzacja komórek oraz charakterystycznych dla nich funkcji [Kane, 2006; Nahmias, 2006; Lee, 2007; Carraro, 2008; Toh, 2009; Huh, 2011]. Porównanie produkcji albuminy i mocznika w hodowli statycznej i dynamicznej oraz przykładowy model bioreaktora mikroprzepływowego zostały przedstawione na Rysunku 2.13.



Rysunek 2.13. Porównanie hodowli statycznej i dynamicznej hepatocytów. A – produkcja albuminy w hepatocytach szczurzych (czerwone kółka – hodowla w przepływie, czarne kwadraty – kontrola), B – produkcja mocznika w hepatocytach szczurzych (czerwone kółka – hodowla w przepływie, czarne kwadraty – kontrola), C – przykładowy model bioreaktora mikroprzepływowego zastosowanego w hodowli hepatocytów szczurzych do oceny hepatotoksyczności (na podstawie *Dynamic Interplay of Flow and Collagen Stabilizes Primary Hepatocytes Culture in a Microfluidic Platform*, Hegde, 2014 oraz *Laminar-flow immediate-overlay hepatocyte sandwich perfusion system for drug hepatotoxicity testing*, Xia, 2009).

Badania pokazują, że hepatocyty różnych gatunków (ludzkie, szczurze, świńskie) oraz linie komórkowe w hodowli w przepływie produkują więcej albuminy i mocznika,

aktywność cytochromu P450 jest zwiększona, formują się struktury kanalików żółciowych, przywrócone zostaje działanie transporterów błonowych oraz powstają połączenia międzykomórkowe typu *gap junction* w porównaniu do hodowli statycznej [Morsiani, 2001; Hongo, 2005; Xia, 2009; Goral, 2010; Miranda, 2010; Tostões, 2011; Vinci, 2011; Dash, 2013; Hegde, 2014].

## 2.5 Komórki stosowane jako zamienniki hepatocytów

Niepowodzenia związane z hodowlą ludzkich hepatocytów skłoniły do poszukiwania innych źródeł komórek wątrobowych, takich jak: (1) linie komórkowe, np. wątrobiak HepG2 lub jego pochodna C3A, (2) komórki pochodzenia zwierzęcego (głównie hepatocyty świńskie), (3) hepatocyty płodowe oraz (4) komórki hepatocytopodobne różnicowane z indukowanych macierzystych komórek pluripotentnych – iPSc. Niestety, każdy z wymienionych wyżej typów komórek ma swoje niezaprzeczalne wady. Komórki linii ludzkiego wątrobiaka są pochodzenia nowotworowego, a ich funkcje są ograniczone, np. bardzo niska produkcja mocznika w porównaniu ze świeżo izolowanymi hepatocytami. Hepatocyty pochodzenia zwierzęcego mogą być źródłem zoonoz, a ich białka MHC nie są w pełni zgodne z ludzkimi. Ludzkie hepatocyty płodowe mają niewykształcony w pełni fenotyp, m.in. produkcja  $\alpha$ -fetoproteiny zamiast albuminy i brak niektórych izoform cytochromu P450, a ich pozyskiwanie budzi wątpliwości etyczne. Proces generacji indukowanych komórek macierzystych i ich przekształcania w hepatocyto-podobne wymaga użycia czynników transkrypcyjnych i wzrostu, co może prowadzić do nowotworzenia, a wydajność tego procesu, jak i stopień zróżnicowania, są wciąż bardzo niskie. W Tabeli 2.2 przedstawiono zestawienie najważniejszych parametrów komórek stosowanych jako zamienniki hepatocytów ludzkich.

Tabela 2.2. Zestawienie cech komórek stosowanych jako zamienniki hepatocytów ludzkich.

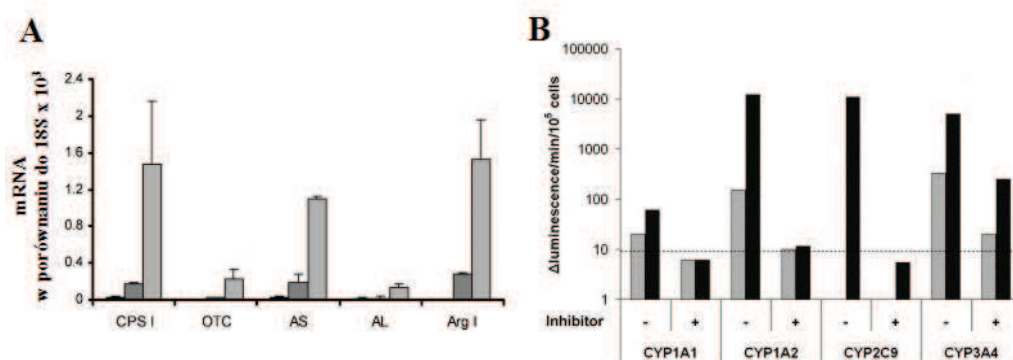
	<b>Podziały</b>	<b>Dostępność</b>	<b>Funkcje</b>	<b>Zastosowanie</b>
linie komórkowe	+++	+++	+	testy cytotoksyczności, BAL
hepatocyty zwierzęce	+	++	++	testy cytotoksyczności, BAL
hepatocyty płodowe	++	+	++	testy cytotoksyczności, BAL, przeszczep
komórki hepatocytopodobne	+++	+++	++	testy cytotoksyczności, BAL, przeszczep



### 2.5.1 Linie komórkowe i unieśmiertelnione hepatocyty

Linie komórkowe są jednym z szeroko stosowanych modeli do badań nad hepatocytami. Wykorzystuje się je również jako część biologiczną w systemach BAL. Największą wadą takiego rozwiązania jest brak linii komórkowej zarówno odpowiednim tempie i liczbie podziałów jak i posiadającej fenotyp możliwie najbardziej zbliżony do komórek wątrobowych. Wątrobowe linie komórkowe charakteryzują się praktycznie nieograniczoną liczbą podziałów, ale ich funkcje, np. produkcja mocznika czy aktywność poszczególnych izoform cytochromu P450 są upośledzone. Ponadto istnieje możliwość rozwinięcia się nowotworu u pacjenta, korzystającego z urządzenia typu BAL, zawierającego komórki hepatomy.

Najczęściej wykorzystywane (ponad 2 500 wyników w PubMed, pole wyszukiwania – tytuł) są linia komórkowa HepG2, pochodząca z raka wątrobokomórkowego, oraz wyprowadzony z niej klon – linia C3A, która charakteryzuje się zwiększoną produkcją albuminy (www.atcc.org). Obie te linie wyróżniają się na tle innych fenotypem najbardziej zbliżonym do wątrobowego, np. synteza albuminy i innych białek, w tym czynników krzepnięcia oraz zachowaniem żywotności i funkcjonalności podczas perfuzji osoczem pochodzącym od pacjentów z niewydolnością wątroby [Coward, 2009].



Rysunek 2.14. Porównanie funkcji wątrobowych w liniach komórkowych i hepatocytach ludzkich. A – brak ekspresji mRNA genów *OTC* i *ARG1* cyklu mocznikowego w komórkach C3A; C3A – czarne słupki, izolowane ludzkie hepatocyty – ciemnoszare słupki, ludzka wątroba – jasnoszare słupki; CPSI – syntetaza karbamoilofosforanowa I, OTC – karbamoilotransferaza ornitynowa, AS – syntetaza argininobursztynianowa, AL – liaza argininobursztynianowa, ArgI – arginaza I (na podstawie *Cells for Bioartificial Liver Devices: The Human Hepatoma-Derived Cell Line C3A Produces Urea But Does Not Detoxify Ammonia*, Mavri-Damelin, 2008). B – porównanie aktywności różnych izoform cytochromu P450 w izolowanych ludzkich hepatocytach – czarne słupki i komórkach linii HepG2 – szare słupki (na podstawie *Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells*, Westerink, 2007).

Największą ich wadą jest brak możliwości przekształcania amoniaku do mocznika ze względu na brak funkcjonalnych enzymów cyklu mocznikowego – arginazy I [ARG] i karbamoiltransferazy ornitynowej [OTC] oraz obniżone zdolności detoksyfikacyjne, w tym aktywność cytochromu P450 (Rysunek 2.14). W przypadku cytochromu ogromny wpływ na jego działanie mają warunki hodowli – skład medium hodowlanego, numer pasażu [Doostdar, 1988; Wilkening, 2003].

Podjęmowane są próby przywrócenia komórkom HepG2 i C3A pełnego fenotypu wątrobowego, a najbardziej obiecujące wydają się być modyfikacje genetyczne – stabilne transfekcje, prowadzące do ekspresji transgenów ARG i OTC [Tang, 2012] oraz różnych izoform cytochromu P450 [Tolosa, 2012]. Należy również wspomnieć, że linie komórkowe nie są idealnym modelem do badań nad hepatocytami ze względu na różną odpowiedź na te same bodźce, np. dodatek HGF do hodowli HepG2 zmniejszał produkcję albuminy w przeciwieństwie do hodowli szczurzych hepatocytów, kiedy to produkcja tego białka zwiększyła się [Iseki, 2000].

Innymi przykładami wyprowadzonych z nowotworów wątroby linii komórkowych mogą być linia HACL-1 i HepaRG. Linia HACL-1 to epithelialne komórki pochodzące z gruczolaka wątrobowokomórkowego. Wykazują one inhibicję kontaktową i nie tworzą guzów po wstrzyknięciu do myszy niewytwarzających komórek T układu immunologicznego. Komórki tej linii są albumino- i CK18-pozytywne, ale CK19-negatywne, co świadczy o pochodzeniu od hepatocytów, a nie cholangiocytów [Schleger, 1997]. Linia HepaRG jest uznana za dobrze odzwierciedlającą funkcje hepatocytów ludzkich. Została wyprowadzona z komórek wątrobiaka (podłoże: zapalenie wątroby spowodowane wirusem typu C). Komórki tej linii posiadają zdolność do przechodzenia od stanu niezróżnicowanego do stanu wysoce zróżnicowanego, dzięki temu mogą być modelem w badaniach nad szlakami detoksyfikacji ksenobiotyków [Aninat, 2006]. Linia ta znalazła również zastosowanie w badaniach nad metabolizmem żelaza, gdzie autorzy stwierdzili między innymi, że występuje zależność między metabolizmem żelaza a stanem zróżnicowania hepatocytów [Troade, 2006].

Ciekawym przykładem wątrobowej linii komórkowej jest hybryda hepatocytów szczurzych pochodzących z wątrobiaka (linia Fao) i ludzkich fibroblastów (linia WI 38). Komórki WIF-B zostały skonstruowane do badań nad funkcjami skrajnie zróżnicowanych hepatocytów spolaryzowanych. Formują one struktury *bile canaliculi*, a produkcja białek wątrobowych, takich jak albumina i fibrynogen została zachowana [Cassio, 1991]. Linia ta była wykorzystywana ponadto w badaniach nad białkami błonowymi i transporterami,

m.in. nad obecnością i lokalizacją akwaporyn i substancji rozpuszczalnych oraz jako model w uszkodzeniu wątroby indukowanym alkoholem [Ihrke, 1993; Shanks, 1994; Ihrke, 1998; Gradilone, 2005].

Proces unieśmiertelniania hepatocytów pozwala na otrzymanie zdrowych, zróżnicowanych komórek o fenotypie zbliżonym do hepatocytów znajdujących się w wątrobie oraz jednocześnie z zachowaną zdolnością do podziałów. W Tabeli 2.3 przedstawione zostały przykłady linii unieśmiertelnionych hepatocytów wraz z ich krótką charakterystyką.

Tabela 2.3. Przykłady linii unieśmiertelnionych hepatocytów.

Nazwa	Gen	Charakterystyka	Referencje
THLE-5b	SV40	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nie wywołuje transformacji nowotworowej</li> <li>- brak nadprodukcji czynników wzrostu</li> <li>- charakterystyka komórek progenitorowych</li> <li>- stosowane jako kontrola zamiast hepatocytów</li> </ul>	[Lechner, 1991; Enosawa, 2012; Shimizu, 2007]
Fa2N4	SV40	<ul style="list-style-type: none"> <li>- zachowana zdolność do indukcji cytochromu P450</li> <li>- zachowana aktywność transporterów, np. MDR-1</li> <li>- używana do oceny metabolizowania rifampicyny</li> <li>- używana do oceny metabolizowania omeprazolu</li> <li>- model odpowiedzi klinicznej izoformy CYP3A4</li> </ul>	[Roymans, 2004; Mills, 2004; Ripp, 2006; Youdim, 2006; Tompkins, 2010]
HepLL	SV40	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nie wywołuje transformacji nowotworowej</li> <li>- brak receptora ASGP</li> <li>- zachowana produkcja albuminy i mocznika</li> <li>- zachowana aktywność cytochromu P450</li> <li>- zachowana zdolność do produkcji glikogenu</li> </ul>	[Li, 2005]
cBAL111	hTERT	<ul style="list-style-type: none"> <li>- zdolność różnicowania do dojrzałych hepatocytów</li> <li>- CK19- i CD146-pozytywne (charakter płodowy)</li> <li>- o aktywności transferazy glutationowej</li> <li>- obniżona produkcja albuminy i mocznika</li> </ul>	[Poyck, 2008; Deurholt, 2009]

Jedną z metod jest użycie genów wirusowych, np. pochodzącego z małego wirusa 40 (SV40, ang. *Simian Virus 40*) genu kodującego duży antygen T (T-ag). Białko to ma zdolność do tworzenia kompleksów z białkiem p53 – inhibitorem cyklu komórkowego, przez co traci ono swoją aktywność supresorową i pośrednio stymuluje komórki do wejścia w fazę S i syntezę DNA [Shay, 1993; Miyazaki, 1993; MacDonald, 1997; Yamasaki, 2009; Takenouchi, 2010]. Badania prowadzone na szczurzych hepatocytach unieśmiertelnionych przy użyciu T-ag wykazały, że komórki te są bezpieczne, tj. nie wywołują transformacji nowotworowej, ale przy wysokich pasażach

(powyżej 50.) mogą spontanicznie zmieniać swój charakter na nowotworowy [Drubin, 2004].

Inną z metod otrzymywania komórek unieśmiertelnionych jest wymuszenie ekspresji telomerazy przez wprowadzenie genu kodującego katalityczną podjednostkę ludzkiej telomerazy – hTERT (ang. *human TElomerase Reverse Transcriptase*) wraz z innymi zmianami – głównie wyciszeniem genu kodującego białko p53. Komórki hTERT nie wykazują zmian typowych dla nowotworów złośliwych, a kariotyp pozostaje normalny, chociaż zdania w tej kwestii są wśród naukowców podzielone [Bodnar, 1998; Jiang, 1999; Farwell, 2000; Smith, 2003; Milyavsky, 2003]. Pozostałe metody unieśmiertelniania to m.in. nadekspresja cykliny D1 [Opitz, 2001] i usunięcie genów z rodziny retinoblastomy [Dannenberg, 2000].

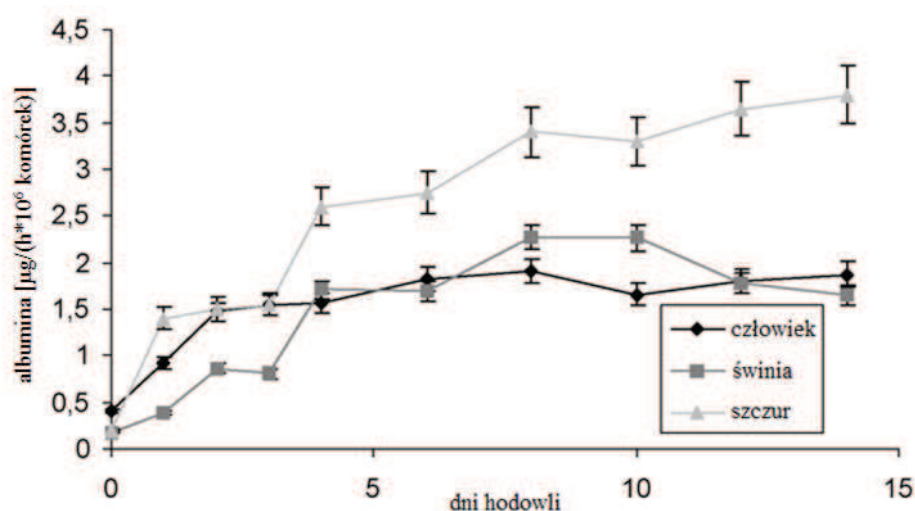
### **2.5.2 Hepatocyty izolowane ze zwierząt**

Hepatocyty zwierzęce są stosowane jako alternatywa dla hepatocytów ludzkich głównie jako część biologiczna BAL. Ich największą zaletą jest praktycznie nieograniczona dostępność oraz metabolizm zbliżony do ludzkiego. Niestety, podobnie jak komórki izolowane z ludzkich wątrób, tracą one *in vitro* swoje funkcje. Ponadto są potencjalnym źródłem zoonoz, mogą wywoływać silną odpowiedź ze strony układu immunologicznego, a produkowane przez nie białka nie muszą być zgodne z ludzkimi [te Velde, 1997; Yang, 2010].

Drugim ważnym zastosowaniem jest wykorzystanie hepatocytów, głównie szczurzych, jako modelu do badań cytotoksyczności leków i innych substancji. Niestety, mimo podobnych zalet jak w przypadku hepatocytów świńskich, czyli przede wszystkim dostępności komórek, model oparty na szczurach nie jest doskonały. Wątroba szczurza jest znacznie mniejsza i ma inną budowę, m.in. brak pęcherza żółciowego, a funkcje komórkowe nie zawsze są identyczne, np. inne izoformy cytochromu P450 metabolizują ten sam ksenobiotyk [Hanson, 1980; Agius, 1987; Bars, 1989; Paine, 1990; Kogure, 1999]. CYP3A4, najpowszechniej występująca izoforma, charakteryzuje się najmniejszą zmiennością międzygatunkową i to właśnie szczur (ale jedynie osobniki męskie ze względu na prawie 7-krotną różnicę w metabolizowaniu między samcami a samicami) jest modelem rekomendowanym dla ludzkich hepatocytów [Bogaards, 2000]. Poza działaniem cytochromu P450, hepatocyty szczurze i ludzkie charakteryzują się inną aktywnością transporterów zaangażowanych w wyrzut substancji szkodliwych. Po podaniu rifampicyny następuje wzrost ekspresji mRNA dla białek związanych

z opornością wielolekową (ang. *MultiDrug Resistance*) – MDR i MRP1 w hepatocytach ludzkich, który nie występuje w hepatocytach szczurzych (odpowiednio białka Mdr1a i Mdr1b). Ponadto inna jest zmiana ekspresji mRNA dla białka MRP2 – u człowieka następuje niewielki wzrost po podaniu rifampicyny, a u szczura znaczny wzrost po podaniu deksametazonu [Nishimura, 2006]. W przypadku białka MRP2 jego ilość jest zmienna gatunkowo i w hodowli kontrolnej jest największa w hepatocytach szczurzych, następnie znacznie mniejsza w małpich, a najmniejsza w ludzkich i psich [Li, 2009]. Z kolei ilość kwasów żółciowych wydzielanych przez hepatocyty ludzkie jest kilkukrotnie większa niż wydzielanych przez komórki szczurze w takich samych warunkach hodowli [Marion, 2012].

Ze względu na te różnice coraz więcej badań prowadzonych jest na hepatocytach świńskich, których fizjologia jest bardziej zbliżona do komórek ludzkich. Badania porównujące funkcje hepatocytów ludzkich, szczurzych i świńskich z 2009 r. wykazały, że te ostatnie wydają się być lepszym modelem dla komórek ludzkich. Produkcja albuminy i dehydrogenazy mleczanowej (ang. *Lactate DeHydrogenase*, LDH) oraz poziom metabolizmu etoksyrezorufiny i etoksykumaryny był zbliżony w hepatocytach ludzkich i świńskich, a znacznie inny w komórkach szczurzych (różnice rzędu kilku-kilkudziesięciu razy) mimo takich samych warunków hodowli [Langsch, 2009]. Porównanie produkcji albuminy w hepatocytach ludzkich, świńskich i szczurzych została przedstawiona na Rysunku 2.15.



Rysunek 2.15. Porównanie produkcji albuminy w hepatocytach ludzkich, świńskich i szczurzych. Poziom albuminy w komórkach ludzkich i świńskich jest zbliżony (na podstawie *Interspecies difference in liver-specific functions and biotransformation of testosterone of primary rat, porcine and human hepatocyte in an organotypical Sandwich culture*, Langsch, 2009).

Wartym uwagi rozwiązaniem są również hepatocyty małpie, u których występuje najbardziej zbliżone do ludzkiego działanie cytochromu P450 – specyficzność wobec substratów, chemiczne właściwości białek, duża zgodność w sekwencji DNA genów kodujących poszczególne izoformy [Komori, 1992]. Badania Nishimury i wsp. z 2007 r. wykazały, że w metabolizm omeprazolu w hepatocytach ludzkich i małpich są zaangażowane izoformy CYP1A1 i 1A2. Zespół nie wykrył zmian w aktywności tych enzymów w hepatocytach szczurzych [Nishimura, 2007]. Z kolei badania z roku 2012 pokazały znacznie (9-krotnie) wyższą ekspresję izoformy CYP1A2 w hepatocytach szczurzych po podaniu dawek kofeiny przyjętych jako dawka znajdująca się w przeciętnej kawie. W hepatocytach ludzkich nie występuje tego typu zmiana [Vaynshteyn, 2012].

### 2.5.3 Hepatocyty płodowe

Hepatocyty płodowe są atrakcyjnym źródłem komórek wątrobowych ze względu na zachowanie zdolności do podziału oraz oporność na krioprezervację i niedokrwienie [Lilja, 1998; Malhi, 2002]. Wykorzystywane są w badaniach nad wirusem zapalenia wątroby typu C – HCV (ang. *Hepatitis C Virus*), jako model do testów cytotoksyczności leków oraz jako potencjalne źródło komórek do przeszczepów komórek wątroby lub w urządzeniach typu BAL [Carpenter, 1996; Monga, 2005; Begum, 2010; Weber, 2010; Chen, 2010; Zhou, 2014; Zhou, 2014]. Charakteryzują się one nieznacznie innym od hepatocytów dojrzałych fenotypem. Ekspresja genów wątrobowych zmienia się w zależności od stadium rozwoju płodu, np. AFP i ALB są pierwszymi białkami produkowanymi przez wątrobę, następnie w połowie ciąży rozpoczyna się synteza transferyny, a pod koniec –  $\alpha$ -1-antytrypsyny [Shiojiri, 1991; Lázaro, 2003]. Płodowe hepatocyty gryzoni w porównaniu do komórek dojrzałych posiadają mniej mitochondriów i produkują przez to mniej energii, a aktywność takich enzymów jak glukoza-6-fosfataza, palmitoilotransferaza karnitynowa czy cytochrom c jest znacznie mniejsza [Mintz, 1967; Sharma, 2008]. W przypadku komórek ludzkich nie zaobserwowano takich zmian [Chinnici, 2014]. Analiza metabolomu komórek ludzkich wykazała natomiast, że wydajność takich procesów jak glikoliza i glikogenogeneza, cykl Krebsa czy cykl mocznikowy jest niższa w wątrobie płodowej [Kim, 2014]. Różnice w wynikach mogą być spowodowane prowadzeniem badań nad komórkami pochodzącymi z różnych stadiów rozwoju.

Najpowszechniej występującą izoformą cytochromu P450 w hepatocytach płodowych jest CYP3A7 – w przeciwieństwie do komórek dojrzałych, w których



największą ekspresję wykazuje izoforma CYP3A4. Jest to cecha łącząca hepatocyty płodowe z komórkami linii HepG2 [Wilkening, 2003; Maruyama, 2007]. Ponadto w warunkach *in vitro* aktywność CYP3A4 w hepatocytach dojrzałych spada, a CYP3A7 w komórkach płodowych rośnie [Nishimura, 2002; Matsunaga, 2004]. Rola CYP3A7 w płodowej wątrobie jest związana z rozwojem organizmu, jego wzrostem i ochroną przed działaniem substancji, które mogłyby zaburzyć proliferację i różnicowanie komórek [Leeder, 2005].

#### **2.5.4 Komórki hepatocytopodobne różnicowane z indukowanych komórek pluripotentnych**

Komórki macierzyste zajmowały i zajmują specjalne miejsce w badaniach naukowych. Dzięki swoim właściwościom mogą być użyte jako narzędzie w terapii komórkowej, jednak ich wykorzystanie wywołuje wiele kontrowersji etycznych m.in. ze względu na pozyskiwanie ich również z tkanek płodowych. Na początku XXI w. okazało się, że możliwe jest otrzymanie takich komórek, które łączyłyby najlepsze cechy komórek macierzystych, czyli zdolność do namnażania i różnicowania się do dowolnego typu komórek, a jednocześnie nie wywoływałyby problemów etycznych. Komórki te nazwano indukowanymi pluripotentnymi komórkami macierzystymi – iPSc. Źródłem iPSc są komórki somatyczne pozyskiwane od osobników dorosłych, zwykle fibroblasty, które na drodze przemian z udziałem czynników transkrypcyjnych zostają odróżnicowane do stadium komórek pluripotentnych. Pierwsze iPSc zostały skonstruowane w 2006 r. przez Takahashiego i Yamanakę (Nagroda Nobla w dziedzinie medycyny lub fizjologii w roku 2012). Wykorzystali oni mysie fibroblasty, które transdukowali zestawem genów *Oct4*, *Sox2*, *cMyc* i *Klf4* [Takahashi, 2006]. Rok później zaproponowany został inny zestaw czynników transkrypcyjnych – *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* i *Lin 28*, niezbędnych do przekształcenia ludzkich fibroblastów w iPSc [Yu, 2007]. Dalsze badania przyniosły odkrycie innych zestawów genów oraz bezpieczniejszych metod otrzymywania iPSc [Okita, 2011].

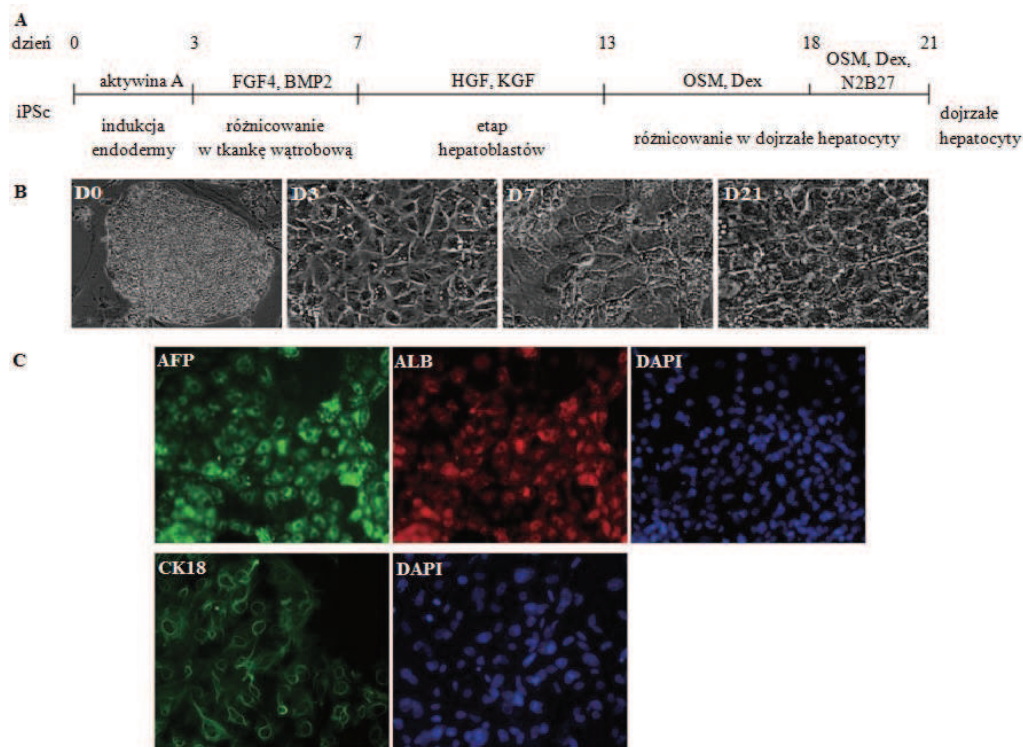
Indukowane komórki macierzyste posiadają wiele cech wspólnych z embrionalnymi komórkami macierzystymi – morfologię, profil ekspresji genów, antygeny powierzchniowe, możliwość przekształcania się w komórki 3 listków zarodkowych oraz prawie nieograniczone zdolności proliferacyjne i różnicujące [Wakao, 2012]. Wykorzystanie iPSc w medycynie regeneracyjnej jest możliwe ze względu na zachowanie takiego samego antygeny zgodności tkankowej HLA (ang. *Human Leukocyte*



*Antigen*), co komórka, z której wyprowadzane są iPSc, dzięki temu użyte mogą być komórki pacjenta [Masaki, 2007]. Niestety, iPSc wymagają wciąż wielu badań i udoskonaleń istniejących protokołów – należy zminimalizować możliwość wystąpienia mutacji w genomie komórek poddanych odróżnicowaniu oraz transformacji nowotworowej po podaniu ich do organizmu. Proces powstawania iPSc wciąż jest mało wydajny i często obciążony składnikami pochodzenia zwierzęcego, np. stosowanie mysich fibroblastów jako komórek podtrzymujących hodowlę [Medvedev, 2010].

Możliwość różnicowania iPSc w komórki hepatocytopodobne zostało potwierdzone wieloma publikacjami [Song, 2009; Si-Tayeb, 2010; Behbahan, 2011; Chen, 2012; Ma, 2013; Mobarra, 2014; Tomizawa, 2015]. Komórki hepatocytopodobne (ang. *Hepatocyte-Like*, HL) wykazywały ekspresję genów charakterystycznych dla tkanki wątrobowej – *ALB*, *CK8*, *CK18*,  $\alpha$ -*1-antyrypsyny* (*AIAT*), różnych izoform cytochromu P450 (*CYP3A4*, *2A6*, *7A1*), ale również typowych dla wątroby płodowej – *AFP*, *CK19* [Nagamoto, 2015; Tomizawa, 2015]. Podejmowały one funkcje hepatocytów – syntezę albuminy i innych białek, w tym fibrynogenu, produkcję mocznika, magazynowanie glikogenu oraz aktywność cytochromu P450 [Waclawczyk, 2010; Yu, 2012].

Otrzymywanie komórek hepatocytopodobnych z iPSc opiera się na 4 etapach: (1) różnicowanie indukowanych komórek macierzystych w kierunku endodermy, (2) różnicowanie endodermy w kierunku tkanki wątrobowej, (3) etap hepatoblastów i (4) różnicowanie w kierunku dojrzałych hepatocytów. Czynniki wykorzystywane w poszczególnych etapach oraz czas ich trwania jest wciąż nieustalony, ale przykładowy schemat postępowania przedstawiony został na Rysunku 2.16. Możliwe jest również bezpośrednie przeprogramowanie komórek somatycznych mysich [Huang, 2011; Sekiya, 2011; Miura, 2014] lub ludzkich [Simeonov, 2014] do komórek HL. Oprócz iPSc do otrzymywania komórek hepatocytopodobnych wykorzystuje się mezenchymalne komórki macierzyste pozyskiwane np. z tkanki tłuszczowej [Yin, 2014] czy miazgi zęba [Su, 2014].

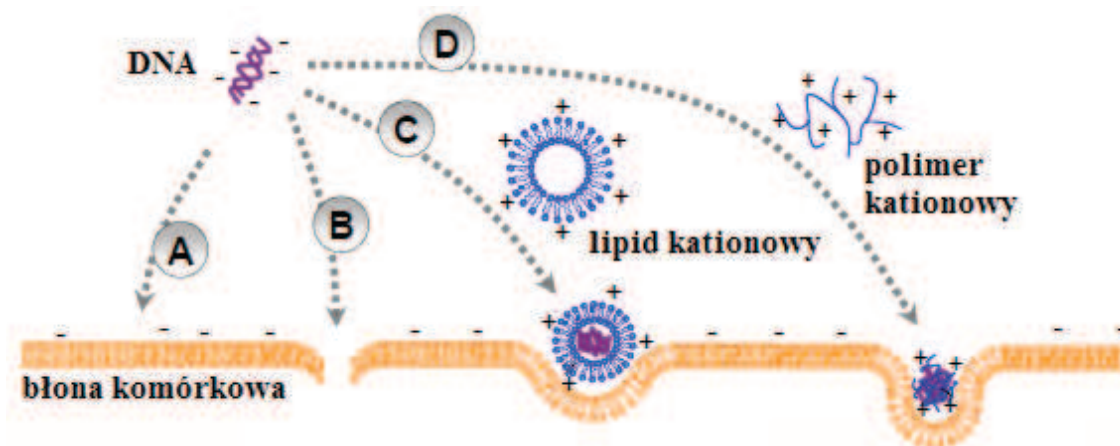


Rysunek 2.16. Otrzymywanie komórek hepatocytopodobnych z iPSc (na podstawie *Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells*, Song, 2009). A – przykładowy schemat różnicowania iPSc w kierunku hepatocytów (FGF4 – czynnik wzrostu fibroblastów 4, ang. *Fibroblasts Growth Factor 4*, BMP2 – białko morfogenetyczne kości 2, ang. *Bone Morphogenetic Protein 2*, HGF – czynnik wzrostu hepatocytów, ang. *Hepatocyte Growth Factor*, KGF – czynnik wzrostu keratynocytów, ang. *Keratinocyte Growth Factor*, OSM – onkostatyna M, Dex – deksametazon, N2B27 – suplementy używane w hodowli komórek neuronalnych. B – zdjęcia przedstawiające poszczególne etapy różnicowania. C – ekspresja markerów wątrobowych w komórkach iPSc po 7 dniach różnicowania.

## 2.6 Metody wprowadzania DNA do komórek zwierzęcych

Wprowadzenie DNA do komórki składa się z kilku etapów: (1) zbliżenie się kompleksów DNA do jej powierzchni i związanie się z błoną komórkową, (2) przejście do wnętrza komórki, np. na drodze endocytozy, (3) wejście do jądra komórkowego i ekspresja genów. Wybór metody jest uzależniony od typu komórek, oczekiwanej wydajności, kosztów oraz umiejętności. Podstawowym wymogiem jest użycie DNA o wysokiej czystości, tzn. pozbawionego RNA, białek i innych zanieczyszczeń komórkowych [Ehlert, 1993]. Wprowadzanie kwasów nukleinowych do komórek zwierzęcych może odbywać się na drodze transfekcji lub transdukcji. Wyróżnia się dwa podstawowe rodzaje transfekcji – przejściową, kiedy DNA nie ulega integracji z genomem, a ekspresja wprowadzonego genu ulega stopniowemu osłabieniu wraz z kolejnymi podziałami komórkowymi i postępującą degradacją DNA, oraz stabilną,

kiedy pod wpływem czynnika selekcyjnego, np. antybiotyku przeżywają jedynie klony z zintegrowanym transgenem [Cheeks, 2009]. Transdukcja jest procesem wykorzystującym wektory wirusowe, które w zależności od potrzeb mają różną pojemność, specyficzność wobec komórek, stopień integracji i ekspresji genu. Mechanizm dostarczania DNA jest typowy dla danego wirusa, np. endocytoza zależna od receptorów w przypadku adenowirusów [Tomanin, 2004]. Wybrane metody wprowadzania DNA do komórki zwierzęcej przedstawiono na Rysunku 2.17.



Rysunek 2.17. Wybrane drogi wprowadzania DNA do komórki zwierzęcej. A – nagie DNA w niewielkim stopniu przechodzi przez błonę komórkową, B – tworzenie przejściowych porów w błonie komórkowej metodami fizycznymi, np. elektroporacją, umożliwia wniknięcie DNA do cytoplazmy, C – związanie się z błoną i endocytoza liposomu zawierającego wewnątrz DNA, D – związanie z błoną i endocytoza kompleksu DNA/polimer (na podstawie *Non-viral gene delivery methods*, Wang, 2013).

### 2.6.1 Transfekcja metodami chemicznymi

Chemiczne metody transfekcji były pierwszymi zastosowanymi do wprowadzania obcego materiału genetycznego do komórek ssaczy [Pagano, 1965]. Ich działanie opiera się na znoszeniu ładunków – dodatnio naładowanej substancji i ujemnie naładowanego DNA, co umożliwia przejście takiego kompleksu przez błonę komórkową. Wydajność metod chemicznych jest zależna od typu komórek, proporcji między kwasem nukleinowym a kationowym odczynnikiem, pH roztworu i stanu błony komórkowej. Ich zaletami są niska toksyczność, brak mutagenyzy i prawie nieograniczona wielkość DNA, a podstawową wadą – niska, w porównaniu do transdukcji, wydajność, zwłaszcza w warunkach *in vivo* [Nayerossadat, 2012].

### 2.6.1.1 Fosforan wapnia

Metoda z zastosowaniem fosforanu wapnia do wprowadzania obcego DNA do komórek jest stosowana od lat 70. ubiegłego wieku zarówno do transfekcji przejściowej jak i stabilnej [Graham, 1973]. DNA z fosforanem wapnia przylegają do błon komórkowych i dochodzi do endocytozy kompleksów, ale dokładny mechanizm działania nie jest w pełni poznany [Loyter, 1982; Batard, 2011]. Metoda ta charakteryzuje się niską powtarzalnością i wydajnością zależną od typu komórek, a jej działanie jest ograniczone jedynie do wąskiego zakresu warunków fizykochemicznych, kontrolujących powstawanie i wzrost kompleksów DNA-fosforan wapnia [Chen, 1987; Kjer, 1991; Mahoney, 1994]. Głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za poziom wydajności są: (1) pH (zmiana pH o 0,1 może spowodować drastyczny spadek wydajności), (2) stężenie wapnia (wysokie stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  jest korzystniejsze), (3) temperatura (optimum działania w  $37^{\circ}\text{C}$ , spadek temperatury obniża wydajność), (4) czas trwania reakcji i wielkość kompleksów (im krótszy – ok. 1 minuty, a kompleksy mniejsze, tym wydajność większa) i (5) stężenie DNA (mniejsze stężenie – ok. 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , zwiększa wydajność) [Jordan, 1996]. Dodatkowym sposobem na zwiększenie wydajności jest użycie substancji permeabilizującej błony komórkowe, np. dimetylosulfotlenku – DMSO (ang. *DiMethyl SulfOxide*) [Lewis, 1980]. Metoda fosforanu wapnia była stosowana do wielu linii komórkowych, w tym pochodzenia wątrobowego [Kumar, 1994; Anderson, 1996; Li, 2015] oraz do hepatocytów [Hilliard, 1996; Edwards, 2006].

### 2.6.1.2 Lipidy kationowe

Lipidy kationowe stosowane są w transfekcji przejściowej i stabilnej. Zbudowane są z 3 domen: dodatnio naładowanej głowy, hydrofobowego ogona i łącznika pomiędzy regionem polarnym i niepolarnym [Gao, 2001]. Potencjalna toksyczność jest zależna od liczby łańcuchów w ogonie (1 – większa toksyczność i mniejsza efektywność, 2 – mniejsza toksyczność i większa efektywność) i od składu hydrofilowej głowy (np. aminy IV-rzędowe są bardziej toksyczne niż III-rzędowe, a obecność pierścienia heterocyklicznego znacząco zmniejsza toksyczność), natomiast łącznik nie ma na cytotoxyczność większego wpływu [Pinnaduwege, 1989; Bottega, 1992; Ilies, 2003]. Podobnie jak w przypadku metody opartej na fosforanie wapnia, dzięki posiadaniu dodatnio naładowanych grup, spontanicznie formują kompleksy DNA i umożliwiają mu wniknięcie przez ujemnie naładowaną błonę do wnętrza komórki. Charakteryzują się wyższą wydajnością niż użycie fosforanu wapnia i dwuetyloaminoetylu-dekstranu

(DEAE-dekstranu) oraz mniejszą toksycznością w porównaniu do DEAE-dekstranu [Felgner, 1987]. Transfekcja z udziałem lipidów kationowych jest drogą, ale wydajną, powtarzalną i łatwą metodą. Ponadto wywołują one niewielką lub brak odpowiedzi ze strony układu immunologicznego i są mało toksyczne [Deshpande, 1998]. Stosowane były do transfekcji linii komórkowych [Koul, 2005] oraz w hodowlach pierwotnych [Rippe, 1990; Jarnagin, 1992; Holmen, 1995; Gardmo, 2005].

### 2.6.1.3 Polimery kationowe

Kompleksy DNA-polimer są bardziej stabilne niż lipidowe, a DNA jest lepiej chronione przed degradacją ze strony nukleaz [Minagawa, 1991; de Smedt, 2000]. W porównaniu do lipidów kationowych, polimery pomagają w przejściu z cytoplazmy do jądra komórkowego, zwiększają dla niego dostępność DNA i nie wymagają przerwania otoczki jądrowej, aby się w nim znaleźć, co potwierdza możliwość transfekcji komórek postmitotycznych, np. neuronów [Abdallah, 1996; Pollard, 1998]. Polimery naturalne, np. chitozan, są dodatkowo biokompatybilne i biodegradowalne, słabo immunogenne, mało toksyczne i tanie [Rolland, 1998]. Ponadto stosowane są modyfikacje nośników zwiększające wydajność transfekcji przez oddziaływania z receptorem, np. funkcjonalizacja przy użyciu galaktozy rozpoznawanej przez receptor ASGP [Park, 2000].

Jednym z powszechnie wykorzystywanych polimerów kationowych jest polietylenoimina (PEI), która jako transfektant nie wywołuje efektu toksycznego w hepatocytach szczurzych, a jej wydajność *in vivo* jest kilkukrotnie wyższa niż *in vitro* [Mediavilla, 2006]. Zaletami PEI jest możliwość formowania kompleksów z dużymi cząsteczkami DNA oraz bardzo wydajna ochrona przed działaniem nukleaz, co prawdopodobnie jest wynikiem dużego zagęszczenia ładunków dodatnich. Niestety, jest to również jednym z powodów jej toksyczności. Innymi czynnikami odpowiedzialnymi za wydajność transfekcji i toksyczność PEI są: masa molowa (im większa, tym większa wydajność, ale i toksyczność), stopień rozgałęzienia (polimery liniowe są wydajniejsze i mniej toksyczne od rozgałęzionych), siła jonowa roztworu, potencjał zeta i wielkość cząsteczki [Godbey, 1999; Kunath, 2003]. Pierwotna toksyczność PEI jest związana z obecnością wolnych, niezwiązanych z DNA, cząsteczek, które wchodzi w interakcje z ujemnie naładowanymi białkami, np. albuminą, a w organizmie również z czerwonymi krwinkami, tworząc agregaty [Fisher, 1999]. Toksyczność wtórna to wynik odłączenia się PEI z kompleksów z DNA w cytoplazmie. Powoduje to hamowanie procesów



komórkowych, kurczenie się komórek, zmniejszenie liczby ich podziałów i wakuolizację cytoplazmy [Godbey, 2001].

Innymi przykładami polimerów kationowych są polilizyna (PLL), wielocukry, np. wspomniany wyżej chitozan i inne, np. dendrymery [Wu, 1987; Bielinska, 2000; Guang Liu, 2002]. Polilizyna, jeden z pierwszych polimerów użytych do wprowadzania obcego DNA, jest biodegradowalna, co można wykorzystać w aplikacjach *in vivo*. Niestety, charakteryzuje się dość wysoką toksycznością w porównaniu do PEI przy zbliżonej wydajności transfekcji [Wolfert, 1999]. Chitozan, liniowy polimer naturalny, formuje małe, dość stabilne kompleksy z DNA, któremu jest w stanie zapewnić ochronę przed nukleazami w stopniu porównywalnym do PEI. Charakteryzuje się również większą od PEI biozgodnością i porównywalną wydajnością transfekcji [Köping-Höggård, 2001].

### **2.6.2 Transfekcja metodami fizycznymi**

Fizyczne metody transfekcji polegają na wprowadzeniu DNA bez obecności dodatkowych substancji. Obcy materiał genetyczny w normalnych warunkach podlega w komórce zniszczeniu przez nukleazy. Wydajność takiego procesu wydaje się być znikoma, jednak bezpośrednie wprowadzenie DNA do jądra komórkowego pozwala na usunięcie tego problemu. Ponadto możliwość zmniejszenia ilości DNA potrzebnej do uzyskania oczekiwanego efektu, wprowadzenie go dokładnie w obszar naszych zainteresowań oraz znikoma toksyczność, zwiększają atrakcyjność fizycznych metod transfekcji.

Elektroporacja polega na poddaniu błony komórkowej działaniu impulsu elektrycznego o wysokim natężeniu pola elektrycznego, co powoduje jej przejściową i lokalną destabilizację, a wyniku czego zwiększenie przepuszczalności dla egzogennych cząsteczek, w tym DNA. Przyjmuje się, że potencjał transbłonowy wymagany do permeabilizacji zawiesiny komórek powinien wynosić 1 V, ale jego wartość jest zmienna i zależy m.in. od składu błony [Gehl, 2003]. Początki tej metody przypadają na lata 80. [Neumann, 1982], a do tej pory była stosowana m.in. na komórkach mięśniowych, skóry i wątroby [Aihara, 1998; Suzuki, 1998; Dujardin, 2004]. Dokładny mechanizm powstawania porów oraz pobierania DNA nie jest do tej pory wyjaśniony. Kwestiami spornymi są np. odległość DNA od komórki (czy możliwe jest wnikanie tylko kwasów związanych z błoną? czy zachodzi zjawisko elektroforezy?) oraz możliwość samodzielnego formowania porów przez cząsteczki DNA [Lurquin, 1997; Gehl, 2003]. Wydajność elektroporacji zależy od czasu trwania impulsu, natężenia pola elektrycznego,

stężenia DNA i wielkości komórek [Andreason, 1988; Gehl, 2003]. Badania Rabussay'a i wsp. pokazały, że krótki impuls (100  $\mu$ s) o wysokim natężeniu ( $> 700$  V/cm) był optymalny do dostarczenia substancji o niewielkim rozmiarze, a długi impuls (20-60 ms) o niskim natężeniu (100-200 V/cm) do transferu genów [Rabussay, 2003].

Działo genowe, czyli metoda biolistyczna (połączenie słów „biologiczna” i „balistyczna”) polega na wstrzeliwaniu do komórki cząstek, np. złota z przyczepionymi fragmentami DNA. Po raz pierwszy została opisana w 1987 r. jako sposób na przezwycięzenie trudności z ekspresją transgenów w komórkach roślinnych [Klein, 1987]. Została zaadaptowana do komórek ssaczych [Yang, 1990; Williams, 1991] i znalazła zastosowanie w badaniach klinicznych [Trimble, 2003]. Cząstki, wystrzeliwane z odpowiednią prędkością, muszą spełniać wymagania dotyczące toksyczności, reaktywności i wielkości. Metoda ta znalazła zastosowanie w szczepionkach genetycznych, immunomodulacji i terapii genowej w leczeniu nowotworów [Lin, 2000]. Wydajność dział genowego zależy od wielkości cząstek, czasu dostarczenia, ilości związanego DNA [Matthews, 1993].

Mikroiniekcja jest najbardziej precyzyjną metodą wprowadzenia DNA do cytoplazmy lub jądra komórkowego. Przeprowadzana jest na pojedynczej komórce, do której przy użyciu mikropipety i dzięki ciśnieniu hydrostatycznemu, wprowadzany jest materiał genetyczny. Tak duża dokładność w umieszczeniu DNA jest możliwa dzięki rozmiarom końcówki mikropipety i wysokiej precyzji mikromanipulatora. Początki tej metody datuje się na 1980 r., kiedy to Capecchi wprowadził DNA do cytoplazmy i jądra komórek mysich [Capecchi, 1980]. Umieszczenie DNA bezpośrednio na terenie jądra komórkowego pozwoliło na ominięcie nukleaz znajdujących się w cytoplazmie, co znacznie zwiększyło wydajność transfekcji. Mikroiniekcja została natychmiast wykorzystana do wytworzenia zwierząt transgenicznych i jest stosowana również obecnie [Gordon, 1980; Gordon, 1983; Auerbach, 2004; Hofmann, 2004]. Mimo jej prostoty i najwyższej wydajności wśród metod fizycznych, jest ona bardzo pracochłonna – transfekować można tylko jedną komórkę na raz, co obniża jej szanse na powszechne zastosowanie w aplikacjach *in vivo*. Innymi fizycznymi metodami transfekcji są: sonoporacja, hydroporacja, naświetlanie laserem, magnetofekcja i mikrofluidyczny transfer genów, tzw. *cell squeezing*. Zestawienie chemicznych i fizycznych metod wprowadzania DNA zostało umieszczone w Tabeli 2.4.



Tabela 2.4. Zestawienie podstawowych niewirusowych metod wprowadzania DNA (na podstawie *Advances in Gene Delivery Systems*, Kamimura, 2011; *Non-Viral Gene Delivery Methods*, Wang, 2013).

Metoda	Czynnik	Zalety	Wady
chemiczne:			
fosforan wapnia	ładunek dodatni	- biogodność, - niski koszt przygotowania	- ściśle określone warunki reakcji, - niska powtarzalność
lipidy kationowe	ładunek dodatni	- wysoka wydajność <i>in vitro</i> , - łatwe w przygotowaniu	- niska wydajność <i>in vivo</i> , - mogą wywoływać odpowiedź immunologiczną
polimery kationowe	ładunek dodatni	- wysoka wydajność <i>in vitro</i> , - łatwe w przygotowaniu	- niska wydajność <i>in vivo</i> , - mogą wywoływać odpowiedź immunologiczną - toksyczne dla komórek
fizyczne:			
elektroporacja	impuls elektryczny	- wysoka wydajność, - powtarzalność	- zniszczenie tkanki, - ograniczony obszar działania
działo genowe	ciśnienie	- dobra wydajność	- zniszczenie tkanki, - ograniczony obszar działania
mikroiniekcja	mechanicznie	- łatwa w wykonaniu, - powtarzalność	- niska wydajność - ograniczony obszar działania

### 2.6.3 Transdukcja wektorami wirusowymi

Wprowadzenie genów za pomocą transdukcji dotyczy zarówno wirusów zawierających informację genetyczną w formie DNA jak i RNA [Kay, 2001]. Wektory wirusowe pozbawione są sekwencji chorobotwórczych i wykorzystywane od lat 90. ubiegłego wieku w badaniach klinicznych [Blaese, 1995; Thomas, 2003]. Wirusy oparte na RNA, głównie retrowirusy, zapewniają długotrwałą ekspresję, dzięki integracji transgenu do genomu gospodarza [Barquinero, 2004; Daniel, 2008]. Z kolei wektory zawierające DNA przyjmują formę episomów i nie integrują do genomu [St George, 2003]. Zestawienie wybranych wektorów wirusowych umieszczono w Tabeli 2.5.

Adenowirusy (ang. *AdenoVirus*, AV), najpopularniejsze wektory DNA, są badane jako nośniki genów od lat 70. ubiegłego wieku [Graham, 1977]. Są cząstkami o średnicy 70-90 nm, pozbawionymi otoczki i zawierającymi podwójną nić DNA. Proces replikacji wirusowego DNA i składania wirionów następuje jedynie w jądrze zainfekowanych komórek. Infekcja jest skomplikowanym i zależnym od fazy cyklu komórkowego

procesem, który obejmuje związanie białek wirusa z receptorem w błonie komórkowej, internalizację na drodze endocytozy, uwolnienie z endosomu, zniszczenie kapsydu, migrację do jądra i replikację jako episom [Campos, 2007]. Transdukcja wektorami adenowirusowi była testowana m.in. w nerce, trzustce, mięśniach szkieletowych i sercowych, mózgu. Zazwyczaj ekspresja transgenu jest niezależna od sposobu podania i docelowej tkanki, swój najwyższy poziom osiąga w przeciągu tygodnia, a po 2-4 tygodniach jest znikoma, co jest wynikiem odpowiedzi ze strony układu immunologicznego [Spergel, 1991; Liu, 2003]. Ostatnie generacje wektorów adenowirusowych, mogące pomieścić fragmenty DNA nawet do 37 kpz (tysięcy par zasad), są bardziej bezpieczne i pozwalają na uzyskanie ekspresji transgenu w myszach nawet przez ponad rok [Kim, 2001]. Wektory AV zostały wykorzystane podczas produkcji indukowanych komórek pluripotentnych z fibroblastów ludzkich [Zhou, 2009].

Wektory pochodzące od wirusów związanych z adenowirusami (ang. *Adeno-Associated Virus*, AAV), czyli niepatogennych parwowirusów, są małymi (18-26 nm) cząsteczkami zawierającymi pojedynczą nić DNA [Atchison, 1965]. Do wnętrza komórki dostają się przez endocytozę zależną od receptorów. W genomie tych wirusów występują sekwencje palindromowe, tzw. odwrócone powtórzenia końcowe (ang. *Inverted Terminal Repeat*, ITR), które umożliwiają specyficzną integrację DNA wirusa w chromosomie 19. [Smith, 2008]. Ich unikalną cechą jest zróżnicowanie względem różnych typów komórek w zależności od serotypu wirusa. Serotypy AAV 1, 2 i 5 infekują komórki nerwowe i mięśniowe, a AAV8 – hepatocyty [Daya, 2008].

Najpopularniejszymi wektorami RNA są retrowirusy (ang. *RetroVirus*, RV). Są to cząstki o rozmiarach 80-130 nm, zawierające w kapsydzie, oprócz kwasu nukleinowego, enzymy integrazę i odwrotną transkryptazę [Kay, 2001]. Podczas produkcji wektorów dochodzi do zastąpienia elementów replikacyjnych przez gen, który ma zostać wprowadzony (pojemność 7-10 kpz), a pozostawione zostają wszystkie niezbędne elementy, odpowiedzialne za pakowanie, integrację, odwrotną transkrypcję i jej regulację. Białka otoczki wektorów retrowirusowych są rozpoznawane przez receptory w błonie komórki gospodarza, co umożliwia im przejście do wnętrza komórki. Następnie, dzięki odwrotnej transkryptazie RNA zostaje przepisane na DNA prowirusa, który za pomocą integrazy zostaje wprowadzony do chromosomu [Barquintero, 2004; Daniel, 2008].

Jednym z rodzajów retrowirusów są lentiwirusy (ang. *LentiVirus*, LV), które w ostatnich latach są intensywnym przedmiotem badań dotyczących dostarczania genów. Ich charakterystyczną cechą jest aktywny transport kompleksu preintegracyjnego przez

pory w otoczce jądrowej, dzięki temu nie wymagają one dezintegracji błony jądrowej i mogą transdukować komórki niedzielące się w odróżnieniu od wektorów RV [Lewis, 1994; Naldini, 1996]. Jest to związane z ich zdolnością do infekowania skrajnie zróżnicowanych linii makrofagów. Wektory lentiwirusowe preferują aktywne miejsce transkrypcji jako obszar integracji transgeny, w odróżnieniu od RV, które integrują w miejsca regulatorowe [Sinn, 2005]. Powinowactwo wektorów do gospodarza, czyli docelowych komórek, może zostać wzmocnione dzięki psuedotypowaniu, czyli zastosowaniu białek otoczki innego wirusa. Często wykorzystywane jest białko pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (ang. *Vesicular Stomatitis Virus G*, VSV-G), które zapewnia wysokie miano i szeroki tropizm [Escors, 2010; Osten, 2007]. Wektory LV są uznawane za jedne z bezpieczniejszych wektorów [Xu, 2001]. Jest to spowodowane m.in. usunięciem niemal wszystkich genów wirusowych i sekwencji regulatorowych (wektory 2. generacji i wyższe), znacznym obniżeniem prawdopodobieństwa rekombinacji oraz zastosowaniem wektorów samo inaktywujących się (ang. *Self-INactivating*, SIN), co obniża szansę na mobilizację wirusa [Pluta, 2009]. Obecnie prowadzonych jest ponad 100 badań klinicznych, wykorzystujących wektory LV, co stanowi 5% spośród opisanych wektorów (<http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>).

Neurotropowy wirus opryszczki (ang. *Herpes Simplex Virus*, HSV) zawiera podwójną nić DNA o długości ok. 150 kbp, kodującą ponad 80 białek, zamkniętą w cząstce o średnicy 180-200 nm. Jest przenoszony przez kontakt bezpośredni, namnaża się na skórze i/lub błonie śluzowej zanim zainfekuje komórki ośrodkowego układu nerwowego [Epstein, 2009]. Do wnętrza komórki przedostaje się przez fuzję wywołaną połączeniem się glikoprotein wirusowych z siarczanem heparyny [Manservigi, 2010]. Zaletami wektorów opartych na HSV jest duża pojemność (do 30 kbp) i powinowactwo do komórek nerwowych [Burton, 2002; Shah, 2003]. Wadami – przejściowa ekspresja oraz wysoki poziom immunogenności i możliwość wystąpienia szoku anafilaktycznego ze względu na powszechne narażenie ludzi na kontakty z HSV w środowisku [Vannucci, 2013].

Tabela 2.5. Zestawienie podstawowych wektorów wirusowych (na podstawie *Advances in Gene Delivery Systems*, Kamimura, 2011; *Current Progress in Gene Delivery Technology Based on Chemical Methods and Nano-carriers*, Jin, 2014 oraz *Novel gene delivery systems*, Manjila, 2013).

<b>Wektor</b>	<b>Wielkość transgenu</b>	<b>Zalety</b>	<b>Wady</b>
adenowirus [AV]	35-38 kpz	- duża pojemność, - brak specyficzności wobec gospodarza	- ekspresja przejściowa, - odpowiedź ze strony układu immunologicznego
związane z adenowirusami [AAV]	4-5 kpz	- niska odpowiedź układu immunologicznego, - szeroki zakres gospodarzy	- niewielka pojemność - skomplikowany proces produkcji
lentiwirus [LV]	8 kpz	- wysoce wydajne w komórkach dzielących się, - stabilna ekspresja, - niska odpowiedź układu immunologicznego, - brak transformacji nowotworowej	- stosunkowo niewielka pojemność, - trudne w przechowywaniu
retrowirus [RV]	8 kpz	- wysoka wydajność w komórkach dzielących się	- losowe miejsce integracji, - niska wydajność <i>in vivo</i> , - ryzyko transformacji nowotworowej (potwierdzone w badaniach klinicznych)
wirus opryszczki [HSV]	30-150 kpz	- wysoce wydajne w ośrodkowym układzie nerwowym, - duża pojemność	- ekspresja przejściowa, - niska wydajność

## 2.7 Cel i tezy rozprawy

Celem rozprawy było opracowanie metody długotrwałej (ponad dwutygodniowej) hodowli komórek pochodzenia wątrobowego wraz z zachowaniem ich funkcji przy użyciu zmodyfikowanych genetycznie komórek podtrzymujących hodowlę.

Tezy rozprawy:

- I. Metoda izolacji komórek z ludzkiej wątroby oparta na maceracji jest wydajniejsza i mniej szkodliwa dla komórek niż powszechnie stosowana metoda podwójnej perfuzji (metoda Seglena).
- II. Zmodyfikowane genetycznie fibroblasty ludzkie, zawierające dodatkową kopię genu kodującego epidermalny czynnik wzrostu, w hodowli z komórkami pochodzenia wątrobowego wpływają pozytywnie na wybrane parametry komórek wątrobowych.

### 3. Materiały

#### 3.1 Oświadczenia

Fragmety resekowanych wątrób zostały pozyskane we współpracy z dr. hab. Krzysztofem Dudkiem z Katedry i Kliniki Chirurgii Ogólnej, Transplantacyjnej i Wątroby Szpitala Klinicznego WUM w Warszawie. Laboratorium Pracowni Inżynierii Tkankowej IBIB PAN posiada zgodę Komisji Bioetycznej WUM na izolację i prowadzenie badań z wykorzystaniem ludzkich hepatocytów (KB/182/2008).

Izolowane ludzkie fibroblasty były dostępne dla doktoranta w ramach Pracowni Inżynierii Tkankowej. Ich źródłem są pozostałości z operacji plastycznych i są mieszanką komórek pochodzących zarówno od kobiet jak i mężczyzn w różnych wieku.

Laboratorium Pracowni Inżynierii Tkankowej posiada zgodę Ministra Środowiska na zamknięte użycie genetycznie zmodyfikowanych ludzkich linii komórkowych i komórek w celu modyfikacji genetycznych ludzkich hepatocytów oraz komórek podtrzymujących hodowlę za pomocą wektorów lentiwirusowych (nr w Rejestrze Zamkniętego Użycia GMO: 01-21/2011).

#### 3.2 Materiał biologiczny

Linie komórkowe C3A (CRL-10741), HepG2 (HB-8065), HOS (CRL-1543) i HEK293T (CRL-3216) zostały zakupione w banku komórek ATCC (ang. *American Type Culture Collection*).

Komórki *Escherichia coli* szczep STBL3 zostały udostępnione przez dr. Jakoba Reisera (FDA, Bethesda, USA).

Plazmid pGEM-3Zf(+) Vector (Promega, Warszawa, Polska) został udostępniony przez mgr Dorotę Tułacz (IBB PAN).

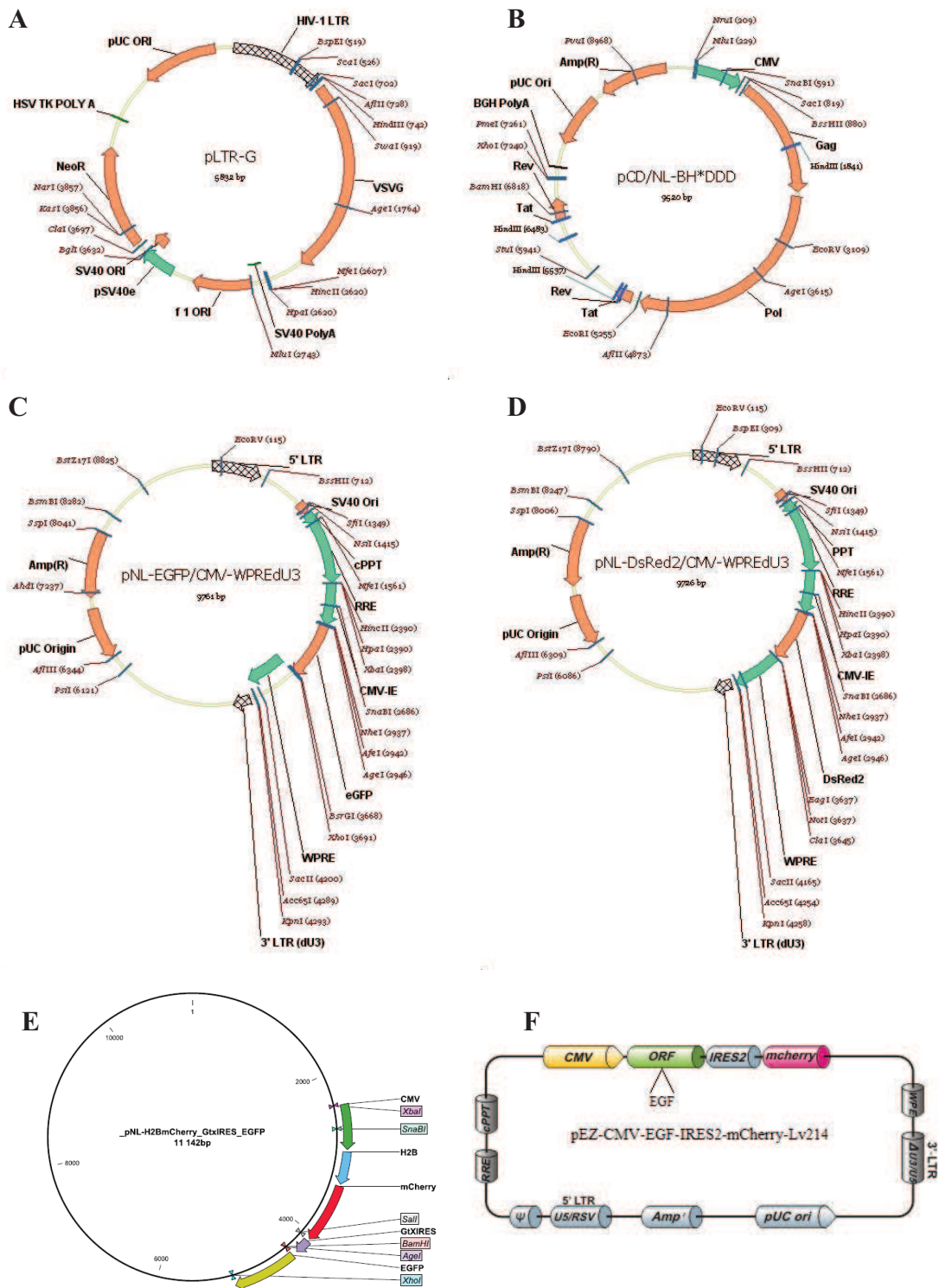
Plazmidy pLTR-G, pCD/NL-BH\* $\Delta\Delta\Delta$ , pNL-EGFP/CMV-WPRE/ $\Delta$ U3 i pNL-DsRed2/CMV-WPRE/ $\Delta$ U3 zostały skonstruowane przez dr. Jakoba Reisera (FDA, Bethesda, USA).

Plazmid pNL-H2B/mCherry-gtxIRES/EGFP-WPRE/ $\Delta$ U3 został skonstruowany przez dr. Krzysztofa Plutę (IBIB PAN).

Plazmid pCMV6-hEGF-XL4 został zakupiony w firmie OriGene (STI, Poznań, Polska).

Plazmid pEZ-CMV-EGF-IRES2-mCherry-Lv214 został zakupiony w firmie Genecopoeia (THP, Wiedeń, Austria).





Rysunek 3.1. Mapy plazmidów. A – plazmid otoczki, B – plazmid pakujący, C – plazmid wektorowy z genem kodującym białko EGFP, D – plazmid wektorowy z genem kodującym białko DsRed2, E – plazmid wektorowy z genem kodującym białka mCherry i EGFP oraz z sekwencją IRES (ang. *Internal Ribosome Entry Side*), F – plazmid wektorowy z genem kodującym białko EGF i mCherry oraz z sekwencją IRES2. Schematy A-D pochodzą ze strony [www.addgene.org](http://www.addgene.org), schemat E został wykonany przez dr. Krzysztofa Plutę, schemat F pochodzi ze strony [www.genecopoeia.com](http://www.genecopoeia.com).

### 3.3 Sprzęt

Autoklaw Classic Prestige Medical (Bionovo, Legnica, Polska).  
Cytometr przepływowy FACS Canto II (BD, Warszawa, Polska).  
Inkubator CO<sub>2</sub> do prowadzenie hodowli komórek i tkanek zwierzęcych/ludzkich NuAire (Biogenet, Warszawa, Polska).  
Komora hematologiczna typu Bürkera (Equimed, Warszawa, Polska).  
Komora laminarna do pracy jałowej NUAIRE LABGARD (Biogenet, Warszawa, Polska).  
Łaźnia wodna Grant (Biogenet, Józefów, Polska).  
Łaźnia wodna MLL 547 (AJL Electronic, Kraków, Polska).  
Mieszadło magnetyczne z grzaniem IKA RCT basic (Labo Baza, Jelonek, Polska)  
Mikroskop fluorescencyjny IX-71 (Olympus, Warszawa, Polska).  
Mikroskop konfokalny FV10i (Olympus, Warszawa, Polska).  
pH-metr PHM250 MeterLab (HACH LANGE, Wrocław, Polska).  
Pipeta wielokanałowa (Medlab, Raszyn, Polska).  
Pipetor automatyczny Gilson MacroMan (A.G.A. Analytical, Warszawa, Polska).  
Pipety automatyczne (Eppendorf, Warszawa, Polska).  
Pipety automatyczne (Medlab, Raszyn, Polska).  
Pompa perystaltyczna ISM597A (IDEX, Wertheim-Mondfeld, Niemcy).  
Spektrofotometr mikropłytkowy Synergy HT Bio-Tek (BIOKOM, Janki, Polska).  
Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Warszawa, Polska).  
Spektrofotometr Spectronic Genesys 2 (Thermo Fisher Scientific, Warszawa, Polska).  
Termoblok z wytrząsaniem TS-100C (Biogenet, Józefów, Polska).  
Termocykler T100 Bio-Rad (Bio-Rad, Warszawa, Polska).  
Transiluminator 3UV (UVP, Cambridge, Wielka Brytania).  
Waga precyzyjna WTB2000 (RADWAG, Warszawa, Polska).  
Wirówka Eppendorf Centrifuge 5415R (Eppendorf, Warszawa, Polska).  
Wirówka MiniSpin (Eppendorf, Warszawa, Polska).  
Wirówka MPW-350R (MPW, Warszawa, Polska).  
Wirówka Sorvall RC5B Plus (Kendro, Warszawa, Polska).  
Worteks Gilson GVLab, (A .G.A. Analytical, Warszawa, Polska).  
Wytrząsarka Innova 44 (Eppendorf, Warszawa, Polska).  
Zestaw do elektroforezy poziomej Bio-Rad (Bio-Rad, Warszawa, Polska).

### 3.4 Odczynniki

4',6-diamidyno-2-fenylindol – DAPI (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).  
Agaroza (Life Technologies, Warszawa, Polska).  
Albumina izolowana z osocza krów – BSA, ang. *Bovine Serum Albumin* (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).  
Ampicylina (TZF, Warszawa, Polska).  
Błękit trypanu (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).  
Bromek etydyny (Life Technologies, Warszawa, Polska).  
Bromek dimetylotiazolilodifenylotetrazolu – MTT (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).  
Chlorek amonu – NH<sub>4</sub>Cl (POCH, Gliwice, Polska).

Chlorek magnezu –  $MgCl_2$  (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).  
Chlorek manganu –  $MnCl_2$  (Merck, Warszawa, Polska).  
Chlorek potasu –  $KCl$  (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).  
Chlorek sodu –  $NaCl$  (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).  
Chlorek wapnia –  $CaCl_2$  (POCH, Gliwice, Polska).  
Coating Buffer (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).  
Dimetylosulfotlenek – DMSO (POCH, Gliwice, Polska).  
DNA Polimeraza I – fragment Klenowa (ABO, Gdańsk, Polska).  
DNaza (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska).  
dNTPs 10 mM każdy (ABO, Gdańsk, Polska).  
Dodecylosiarczan sodu – SDS (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).  
Ekstrakt drożdżowy (Diag-Med, Warszawa, Polska).  
Enzym restrykcyjny BamHI (ABO, Gdańsk, Polska).  
Enzym restrykcyjny EcoRI (ABO, Gdańsk, Polska).  
Enzym restrykcyjny Sall (ABO, Gdańsk, Polska).  
Enzym restrykcyjny SnaBI (ABO, Gdańsk, Polska).  
Etanol rektyfikowany 96% (Polmos, Warszawa, Polska).  
Falloidyna wyznakowana izotiocyanianem tetrametylorodaminy – TRITC (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).  
Formaldehyd (FA) pozbawiony domieszki metanolu (ALAB, Warszawa, Polska).  
Fosfataza alkaliczna FastAP (ABO, Gdańsk, Polska).  
Glukoza (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).  
Hoechst33342 (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).  
Izopropanol (POCH, Gliwice, Polska).  
Jodek propidyny (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).  
Kolagenaza typ I (Life Technologies, Warszawa, Polska).  
Kolagenaza typ XI (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).  
Kwas octowy lodowaty –  $CH_3COOH$  (POCH, Gliwice, Polska).  
Kwas siarkowy –  $H_2SO_4$  (POCH, Gliwice, Polska).  
Kwas solny –  $HCl$  (POCH, Gliwice, Polska).  
Kwas wersenowy – EDTA (POCH, Gliwice, Polska).  
Ligaza DNA T4 (ABO, Gdańsk, Polska).  
Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Warszawa, Polska).  
Marker DNA GeneRuler DNA Ladder Mix (ABO, Gdańsk, Polska).  
Medium (DMEM, ang. *Dulbecco Modified Eagle Medium*) o wysokiej zawartości glukozy (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).  
Medium OptiMEM (Life Technologies, Warszawa, Polska).  
Medium Williama (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).  
NaOH (Chempur, Piekary Śląskie, Polska).  
Nie-niezbędne aminokwasy – NEAA, ang. *Non-Essential AminoAcids* (Genos, Łódź, Polska).  
Obciążnik próbek DNA Gel Loading Dye (ABO, Gdańsk, Polska).  
Octan amonu 7,5 M (Lab Empire, Rzeszów, Polska).  
Percoll (Life Technologies, Warszawa, Polska).

PIPES (Merck, Warszawa, Polska).

Płodowa surowica bydlęca – FBS, ang. *Fetal Bovine Serum* (Genos, Łódź, Polska).

Polietylenoimina – PEI, polimer rozgałęziony o liczbowo średniej masie molowej 60 000, roztwór 50% (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).

Polimeraza RUN z buforem (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska).

Postcoat Solution (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).

Przeciwciała stosowane podczas analizy cytometrycznej i immunofluorescencji:

Nazwa	Numer	Znacznik	Rozcieńczenie	Pochodzenie
albumina	ab18075	-	1:250	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
albumina	A80129F	FITC	1:150	Bethyl, Warszawa, Polska
α-1-antytrypsyna	0096R	Cy5	1:75	antibodies-online, Aachen, Niemcy
α-1-antytrypsyna	A80-122F	FITC	1:750	Bethyl, Warszawa, Polska
CD14	345787	APC	1:100	BD, Warszawa, Polska
CD45	345809	PerCP	1:100	BD, Warszawa, Polska
CD54	555511	PE	1:1 000	BD, Warszawa, Polska
CD73	550257	PE	1:100	BD, Warszawa, Polska
CK18	ab82254	-	1:100	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
IgG	A90-116PE	PE	1:200	Bethyl, Warszawa, Polska
IgG	ab37407	PE	1:100	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
IgG	ab37374	FITC	1:100	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
IgY	703-136-15	APC	1:1 000	Jacson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, Wielka Brytania

Przeciwciała stosowane podczas oznaczania białek metodą ELISA i Dot Blot:

Nazwa	Numer	Znacznik	Rozcieńczenie	Pochodzenie
albumina	A80129	-	1:1 000	Bethyl, Warszawa, Polska
albumina	A80129P	HRP	1:50 000	Bethyl, Warszawa, Polska
EGF	M806	-	1:2 000	Life Technologies, Warszawa, Polska
EGF	ABIN1045975	HRP	1:10 000	antibodies-online, Aachen, Niemcy

RNaza (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).

Siarczan magnezu – MgSO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).

Tetrametylobenzydyna – TMB (Biomibo, Warszawa, Polska).

Tris-HCl (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).

Trisma-base (Lab Empire, Rzeszów, Polska).

Triton X-100 (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).

Trypsyna (Genos, Łódź, Polska).

Trypton (Diag-Med, Warszawa, Polska).

Tween-20 (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).

Wash Solution (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).  
Woda o czystości do biologii molekularnej (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).  
Wodorotlenek potasu – KOH (Chempur, Piekary Śląskie, Polska).  
Wodorowęglan sodu – NaHCO<sub>3</sub> (POCH, Gliwice, Polska).  
Zbuforowana sól fizjologiczna – PBS bez jonów Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> (Lab Empire, Rzeszów, Polska).

### 3.5 Materiały

Materiały szklane:

Butelki z korkiem (Equimed, Warszawa, Polska).

Szalki (Equimed, Warszawa, Polska).

Zlewki (Equimed, Warszawa, Polska).

Materiały plastikowe:

Butelki hodowlane T25 i T75 (Scholagene, Kraków, Polska).

Filtr mesh 70 µm (Diag-Med, Warszawa, Polska).

Końcówki do pipet automatycznych (Profilab, Warszawa, Polska).

Lejek Büchnera (Equimed, Warszawa, Polska).

Pipety serologiczne (Scholagene, Kraków, Polska).

Płytki wielodołkowe (Scholagene, Kraków, Polska).

Płytki 96-dołkowe mocno-wiążące do testu ELISA (Scholagene, Kraków, Polska).

Probówki okrągłodenne do cytometru FACS Canto (Tominex, Wrocław, Polska).

Probówki typu eppendorf o pojemności 0,5, 1,5 i 2 ml (Profilab, Warszawa, Polska).

Probówki typu falkon o pojemności 15 i 50 ml (Scholagene, Kraków, Polska).

Strzykawki (Equimed, Warszawa, Polska).

Inne:

Filtry z polifluorku winylidenu o średnicy porów 0,22 µm wraz z adapterami (Merck, Warszawa, Polska).

Magnesy do mieszadła magnetycznego (Equimed, Warszawa, Polska).

Membrana nitrocelulozowa (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).

Pęsety (Equimed, Warszawa, Polska).

Skalpele (Equimed, Warszawa, Polska).

Wata szklana (Sigma Aldrich, Poznań, Polska).

Zestaw do izolacji plazmidowego DNA PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep (Life Technologies, Warszawa, Polska).



## 4. Metody

### 4.1 Porównanie metod izolacji komórek z fragmentów ludzkich resekowanych wątrób

Do izolacji komórek z fragmentów ludzkich resekowanych wątrób zastosowano metodę podwójnej perfuzji (in. metodę Seglena) i udoskonaloną przez nasz Zespół metodę maceracji. Porównano również działanie dwóch typów kolagenazy – I i XI.

#### 4.1.1 Przygotowanie buforów i odczynników stosowanych podczas izolacji komórek z fragmentów ludzkich resekowanych wątrób

Sposób przygotowania PBS:

Rozpuszczano 1 tabletkę PBS w 100 ml wody dejonizowanej. Roztwór filtrowano przez filtr 0,22  $\mu\text{m}$  pod komorą laminarną do sterylnych butelek i przechowywano w temperaturze pokojowej (RT, ang. *Room Temperature*).

Sposób przygotowania roztworu kolagenazy do trawienia tkanki wątrobowej:

Do 1 g kolagenazy dodano 20 ml medium Williamsa (końcowe stężenie: 5%) i rozdzielono do sterylnych probówek typu eppendorfów. Roztwór roboczy uzyskiwano przez 100-krotne rozcieńczenie 5% roztworu kolagenazy przy użyciu medium Williamsa. Przechowywano w temperaturze 4°C.

Sposób przygotowania roztworu do lizy erytrocytów:

Roztwór przygotowano w wodzie dejonizowanej i przefiltrowano przez filtr 0,22  $\mu\text{m}$  pod komorą laminarną do sterylnej butelki i przechowywano w temperaturze 4°C. Skład 10x stężonego roztworu do lizy erytrocytów: 1,55 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 100 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1 mM EDTA. Roztwór rozcieńczano 10-krotnie podczas izolacji hepatocytów przy pomocy sterylnej wody dejonizowanej.

Sposób przygotowania Percollu do oczyszczania izolatu:

Percoll o gęstości 1,04 g/ml przygotowano wg wzoru i dodano 0,1 objętości  $V_k$  1,5 M NaCl i uzupełniono do objętości końcowej  $V_k$  wodą o czystości do biologii molekularnej:

$$V_0 = V_k \cdot \frac{\rho - 0,1 \cdot \rho_{10} - 0,9}{\rho_0 - 1},$$

gdzie  $V_0$  – objętość Percollu [ml]

$V_k$  – objętość końcowa Percollu [ml]



$\rho$  – oczekiwana gęstość Percollu [ml]

$\rho_0$  – wyjściowa gęstość Percollu [g/ml]

$\rho_{10}$  – gęstość 1,5 M NaCl [g/ml],

#### **4.1.2 Izolacja komórek wątrobowych – perfuzja (P)**

Z fragmentu ludzkiej wątroby usunięto krew przy użyciu zimnego (4°C) PBS pozbawionego jonów wapnia i magnezu, płynącego z prędkością 10 ml/min przez rurkę połączoną z otwartym naczyniem krwionośnym, aż do momentu pojawienia się bezbarwnego roztworu (kilka-kilkanaście minut), po czym fragment płukano przy pomocy 0,05% roztworu kolagenazy I w medium Williamsa ogrzanego do temperatury 37°C przez 15 minut (obieg otwarty). Następnie fragment perfundowano przy pomocy 0,05% roztworu kolagenazy I w medium Williamsa ogrzanego do temperatury 37°C przez 60 minut w łaźni wodnej z wytrząsaniem (obieg zamknięty). Otrzymaną w wyniku trawienia zawiesinę komórek filtrowano przez filtr nylonowy (mesh) o średnicy porów 70  $\mu\text{m}$ , po czym przeprowadzano lizę erytrocytów. W tym celu do zawiesiny komórek dodano taką samą objętość buforu do lizy erytrocytów i inkubowano z wytrząsaniem w 37°C przez 5 minut, po czym dodano równoważną ilość medium hodowlanego i zwirowano (366xg, 4°C, 7 minut), a supernatant usunięto. W ostatnim etapie komórki zawieszano w medium hodowlanym i liczone pod mikroskopem w obecności 0,4% roztworu błękitu trypanu w proporcji 1:1.

#### **4.1.3 Izolacja komórek wątrobowych – maceracja (M)**

Poniższy opis dotyczy izolacji komórek wątrobowych metodą maceracji (M1). Zmiany procedury dotyczą postępowania po płukaniu fragmentu roztworem kolagenazy (A – maceracja M1, B – maceracja M2, C – maceracja M3). Schemat ilustrowany zdjęciami (Rysunek 4.1) przedstawiony niżej dotyczy maceracji M3.

Z fragmentu ludzkiej wątroby usunięto krew przy użyciu zimnego (4°C) PBS pozbawionego jonów wapnia i magnezu, płynącego z prędkością 10 ml/min przez rurkę połączoną z otwartym naczyniem krwionośnym, aż do momentu pojawienia się bezbarwnego roztworu (kilka-kilkanaście minut), po czym płukano fragment przy pomocy 0,05% roztworu kolagenazy I lub XI w medium Williamsa ogrzanego do temperatury 37°C (na każdy 1 g tkanki zużyto 1 ml roztworu kolagenazy). Fragment pocięto na niewielkie – kilkumilimetrowe kawałki (kilkucentymetrowe w maceracji M3).

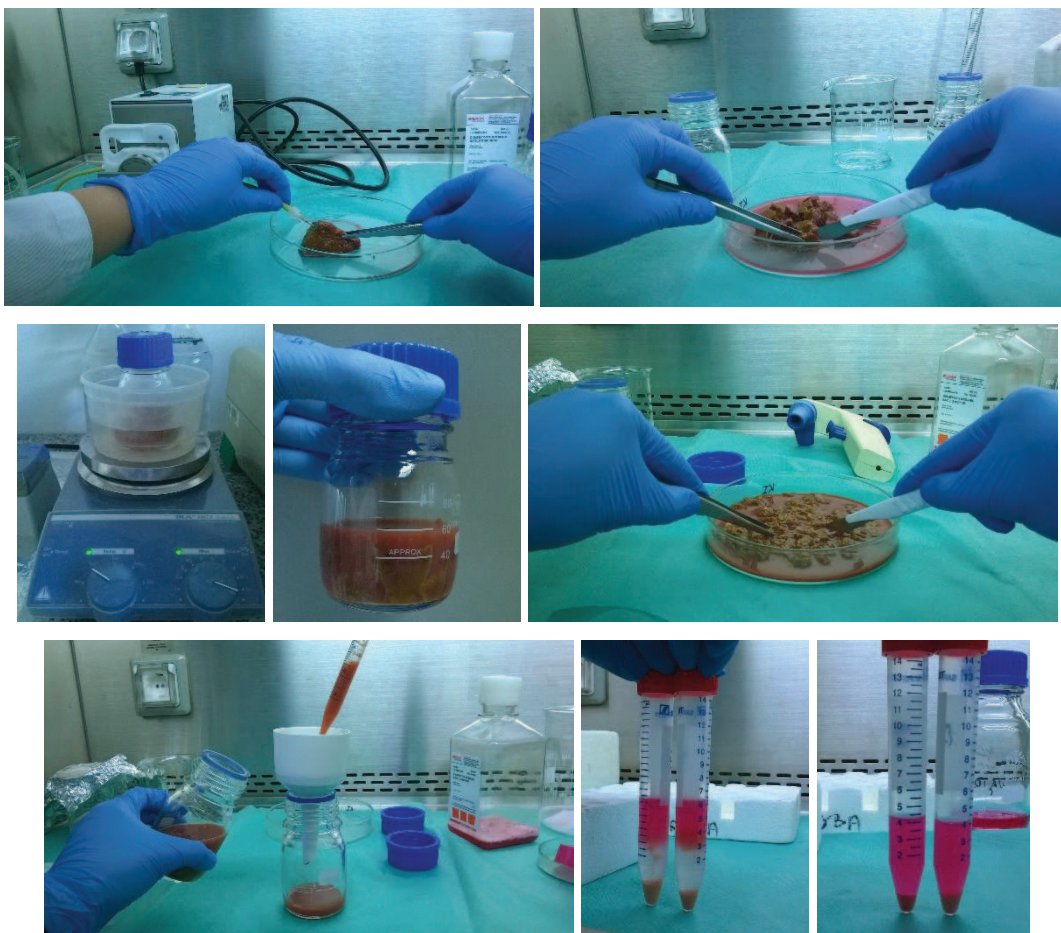
A: Fragmenty, zawieszono w 0,05% roztworze kolagenazy I w medium Williamsa, wytrząsano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 60 minut (na każdy 1 g tkanki zużyto łącznie 5 ml roztworu kolagenazy),

B: Fragmenty, zawieszono w 0,05% roztworze kolagenazy I w medium Williamsa, wytrząsano na mieszadło magnetycznym w temperaturze 37°C przez 60 minut (na każdy 1 g tkanki zużyto łącznie 5 ml roztworu kolagenazy),

C: Fragmenty, zawieszono w 0,05% roztworze kolagenazy I lub XI w medium Williamsa, wytrząsano na mieszadło magnetycznym w temperaturze 37°C przez 15 minut (zużyto tyle roztworu kolagenazy, aby fragmenty były przykryte). Następnie fragmenty pocięto na niewielkie – kilkumilimetrowe kawałki i wytrząsano na mieszadło magnetycznym przez kolejne 15 minut (zużyto tyle roztworu kolagenazy, aby fragmenty były przykryte).

Zawiesinę filtrowano przez filtr nylonowy (mesh) o średnicy porów 70  $\mu\text{m}$ , po czym przeprowadzano lizę erytrocytów. W tym celu do zawiesiny komórek dodano taką samą objętość buforu do lizy erytrocytów i inkubowano z wytrząsaniem w 37°C przez 5 minut, po czym dodano równoważną ilość medium hodowlanego i zwirowano (366xg, 4°C, 7 minut), a supernatant usunięto. W celu oczyszczenia izolatu wątrobowego wirowano zawiesinę na poduszce z Percollu – do zawiesiny komórek dodano kilka mililitrów izotonicznego roztworu Percollu o gęstości 1,04 g/ml i zwirowano (366xg, 4°C, 20 minut). Następnie supernatant usunięto, a komórki płukano medium hodowlanym w celu usunięcia pozostałości Percollu. W ostatnim etapie komórki zawieszano w medium hodowlanym i liczone pod mikroskopem w obecności 0,4% roztworu błękitu trypanu w proporcji 1:1.

Podsumowując, metoda perfuzji opiera się na zamkniętym przepływie roztworu kolagenazy przez fragment tkanki, maceracja M1 na wytrząsaniu w łaźni bardzo rozdrobnionej tkanki, maceracja M2 na wytrząsaniu przy użyciu mieszadła magnetycznego, które zapewnia dokładniejszą kontrolę prędkości mieszania, a maceracja M3 na dwustopniowym rozdrobnieniu tkanki i skróceniu czasu inkubacji w kolagenazie z 60 do 2x15 minut. Ponadto wszystkie fragmenty izolowane metodą maceracji były oczyszczane na warstwie (tzw. poduszce) z Percollu i dzięki temu możliwe było usunięcie fragmentów komórek i innych pozostałości. Większe fragmenty wątrób były dzielone, a metody izolacji były modyfikowane w taki sposób, aby uzyskać czystsza populację hepatocytów, np. poprzez dodatkowe wirowanie 50xg (jedno- lub kilkukrotne), zmianę czasu inkubacji z kolagenazą, stężenia lub gęstości Percollu.



Rysunek. 4.1. Schemat izolacji komórek z fragmentu ludzkiej wątroby przy pomocy metody maceracji M3. Kolejne etapy: wypłukanie krwi (perfuzja roztworem PBS) – pocięcie tkanki na mniejsze fragmenty – wytrząsanie na mieszadzie magnetycznym z roztworem kolagenazy – pocięcie tkanki na kilkumilimetrowe fragmenty – filtracja przez lejek Büchnera – wirowanie z Percollem – osad komórek po zakończeniu izolacji.

## 4.2 Hodowla komórkowa

Hodowlę izolowanych ludzkich fibroblastów, komórek linii C3A, HOS i HEK293T prowadzono w inkubatorze NuAire w temperaturze 37°C i w atmosferze zawierającej 5% CO<sub>2</sub>.

### 4.2.1 Przygotowanie buforów i odczynników stosowanych podczas hodowli komórkowej

Sposób przygotowania DMEM o wysokiej zawartości glukozy:

Rozpuszczono 1 porcję DMEM (zawartość glukozy 4,5 g/l) w 700 ml wody dejonizowanej. Następnie dodano 3,7 g NaHCO<sub>3</sub> i uzupełniono wodę do 1 l. Roztwór filtrowano przez filtr 0,22 μm pod komorą laminarną do sterylnych butelek i przechowywano w temperaturze 4°C.

Sposób przygotowania medium hodowlanego:

Do przygotowania 100 ml medium hodowlanego do 89 ml DMEM dodano 10 ml FBS (10% objętości) i 1 ml NEAA (1% objętości). Roztwór filtrowano przez filtr 0,22  $\mu\text{m}$  pod komorą laminarną do sterylnych butelek i przechowywano w temperaturze 4°C.

Sposób przygotowania trypsyny stosowanej podczas hodowli komórkowej:

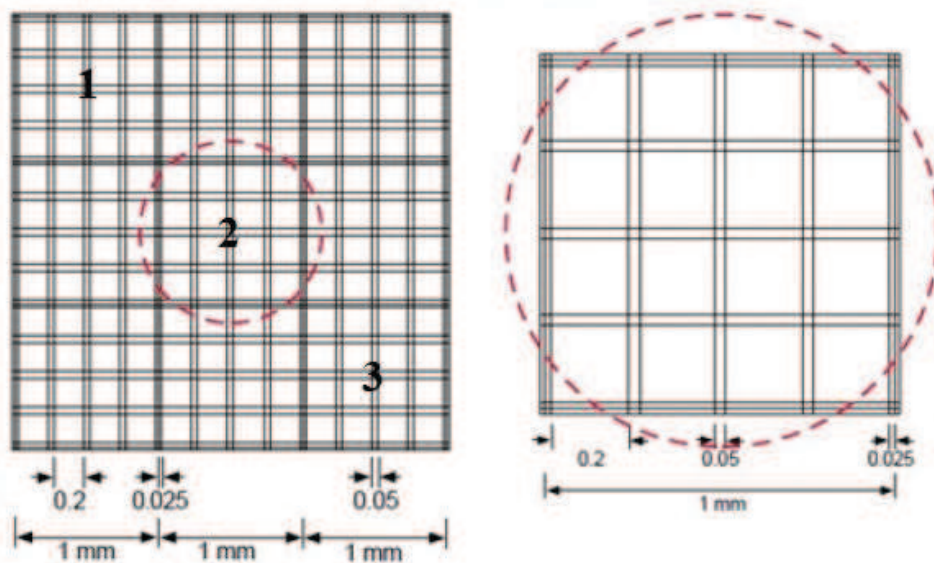
Do 50 ml 2,5% roztworu trypsyny dodano 450 ml PBS i 685  $\mu\text{l}$  0,5M EDTA (końcowe stężenie trypsyny: 0,25%). Roztwór filtrowano przez filtr 0,22  $\mu\text{m}$  pod komorą laminarną do sterylnych butelek. Przechowywano w temperaturze 4°C (do użytku bieżącego – 2-4 tygodnie) lub w -20°C (powyżej miesiąca).

#### **4.2.2 Pasażowanie komórek**

W celu przeniesienia komórek do nowego naczynia hodowlanego usunięto medium hodowlane i przepłukano warstwę komórek PBS, po czym dodano 0,25% roztwór trypsyny (o objętości 1,5 ml w przypadku butelki T25 i 3 ml – T75) i inkubowano w 37°C przez 3-10 minut w zależności od typu komórek. Zatrzymano działanie trypsyny przy użyciu medium hodowlanego w proporcji 1:1 lub większej, a zawiesinę komórek zwirowano (255xg, 4°C, 5 minut). Osad zawieszono w 1 ml medium hodowlanego, z czego pobrano 10  $\mu\text{l}$  zawiesiny komórek do liczenia w komorze Bürkera. Odpowiednią liczbę komórek wysiano w 4 ml (butelka T25) lub 10 ml (butelka T75) świeżego medium hodowlanego.

#### **4.2.3 Liczenie komórek w komorze Bürkera**

Do liczenia komórek pobierano 10  $\mu\text{l}$  z zawiesiny komórek po trypsynizacji (zawieszonych w 1 ml medium hodowlanego) i odpowiednio rozcieńczano w PBS. Mieszano 10  $\mu\text{l}$  zawiesiny komórek z 10  $\mu\text{l}$  0,4% błękitu trypanu i nakładano połowę objętości mieszaniny na złożoną komorę Bürkera. Liczone były przynajmniej 3 kwadraty (po skosie od lewego górnego do dolnego prawego, schemat przedstawiono na Rysunku 4.2) i liczono średnią liczbę komórek. Końcowa liczba komórek równa jest średniej pomnożonej przez rozcieńczenie i przelicza na 1 ml stosując mnożnik 10 000.



Rysunek 4.2. Schemat komory Bürkera z zaznaczonymi wybranymi polami do liczenia (1, 2, 3) i wymiarami poszczególnych części (na podstawie <http://www.e-mikroskopy.pl/media/catalog/product/cache/1/thumbnail/600x600/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/s/i/siatka-komory-burkera.jpg>). Wysokość komory wynosi 100  $\mu\text{m}$ .

### 4.3 Oznaczenie markerów charakterystycznych dla różnych populacji izolatu wątrobowego oraz dla izolowanych ludzkich fibroblastów

Do oznaczenia markerów charakterystycznych dla różnych populacji izolatu wątrobowego oraz dla izolowanych ludzkich fibroblastów zastosowano analizę z wykorzystaniem testów opartych na przeciwciałach.

#### 4.3.1 Przygotowanie buforów i odczynników stosowanych podczas oznaczania markerów charakterystycznych dla różnych rodzajów komórek

W celu przygotowania PBS-FBS do cytometrii przepływowej do 10 ml PBS dodano 200  $\mu\text{l}$  FBS (2% objętości). Przechowywano w temperaturze 4°C.

W celu przygotowania roztworu blokującego do znakowania komórek do mikroskopii fluorescencyjnej do 9,9 ml PBS dodano 0,1 ml 10% Tween 20 (końcowo 0,1% objętości), a następnie dodano 2,5 ml 5% BSA (końcowo 1% objętości). Przechowywano w temperaturze 4°C.

#### 4.3.2 Przygotowywanie i znakowanie komórek do cytometrii przepływowej

W celu przygotowania do analizy cytometrycznej komórki ( $10^6$  komórek/próbkę) zwirowano (600xg, 4°C, 5 minut) w PBS, a osad zawieszono w 4% FA (100  $\mu\text{l}/10^6$  komórek) i inkubowano w RT przez 10 minut. Po tym czasie komórki



zwirowano (600xg, 4°C, 5 minut), przepłukano PBS i ponownie zwirowano (600xg, 4°C, 5 minut). Uzyskany osad zawieszono w 0,1% roztworze Triton X-100 (100  $\mu$ l/10<sup>6</sup> komórek) i inkubowano w RT przez 10 minut. Po tym czasie komórki zwirowano (600xg, 4°C, 5 minut), przepłukano PBS i ponownie zwirowano (600xg, 4°C, 5 minut). Uzyskany osad zawieszono w PBS-FBS i rozdzielono na odpowiednią liczbę probówek (końcowa objętość: 100  $\mu$ l).

W celu znakowania do analizy cytometrycznej komórki inkubowano z przeciwciałami I-rzędowymi i właściwymi dla nich kontrolami izotypowymi w RT przez godzinę, po czym komórki zwirowano (600xg, 4°C, 5 minut), a osad zawieszono w PBS-FBS (końcowa objętość 100  $\mu$ l). Następnie komórki inkubowano z przeciwciałami II-rzędowymi w RT przez 30 minut, po czym komórki zwirowano (600xg, 4°C, 8 minut), a osad zawieszono w PBS (końcowa objętość 100  $\mu$ l). W celu wybarwienia jąder komórkowych zawieszoną komórek inkubowano z 20  $\mu$ l DAPI (stężenie wyjściowe: 10  $\mu$ g/ml) w RT przez 20 minut. Po tym czasie komórki przenoszono do probówek okrągłodennych i prowadzono analizę przy użyciu cytometru przepływowego i programu FACSDiva.

#### **4.3.3 Przygotowywanie i znakowanie komórek do mikroskopii fluorescencyjnej**

W celu przygotowania komórek do mikroskopii fluorescencyjnej z hodowli komórek na płytkach wielodołkowych usunięto medium hodowlane i przepłukano PBS, po czym komórki inkubowano z 4% FA w RT przez 15 minut. Po tym czasie usunięto FA i przepłukano komórki PBS (3-krotnie). Następnie inkubowano komórki z 0,1% Tritonem X-100 w RT przez 10 minut, po czym usunięto Triton i przepłukano komórki PBS (3-krotnie). Blokowanie komórek następowało przez inkubację z buforem blokującym w RT przez 30 minut

W celu znakowania komórek do mikroskopii fluorescencyjnej inkubowano komórki z przeciwciałami I-rzędowymi i właściwymi dla nich kontrolami izotypowymi w RT przez godzinę. Po tym czasie usunięto przeciwciała i przepłukano komórki PBS (3-krotnie). Następnie komórki inkubowano z przeciwciałami II-rzędowymi w RT przez 30 minut, po czym usunięto przeciwciała i przepłukano komórki PBS (3-krotnie). W celu wybarwienia jąder komórkowych utrwalone komórki inkubowano z DAPI (stężenie wyjściowe: 10  $\mu$ g/ml) w RT przez 5 minut, po czym usunięto DAPI, przepłukano komórki PBS (3-krotnie) i prowadzono obserwacje pod mikroskopem fluorescencyjnym.



#### **4.4 Modyfikacje genetyczne izolowanych ludzkich fibroblastów**

Modyfikacje genetyczne izolowanych ludzkich fibroblastów polegały na wprowadzeniu do ich genomu genów kodujących białka fluorescencyjne – EGFP i DsRed2 oraz epidermalny czynnik wzrostu (EGF).

##### **4.4.1 Wprowadzenie komórek *E. coli* STBL3 w stan kompetencji**

Do wprowadzenia komórek *E. coli* STBL3 w stan kompetencji zastosowano metodę chlorku wapnia.

###### **4.4.1.1 Przygotowanie buforów i odczynników stosowanych podczas wprowadzania komórek *E. coli* STBL3 w stan kompetencji**

Sposób przygotowania pożywki SOB (ang. *Super Optimal Broth*):

Pożywkę przygotowano w wodzie dejonizowanej i autoklawowano. Skład pożywki: 2% tryptonu, 0,5% ekstraktu drożdżowego, 10 mM NaCl i 2,5 mM KCl. Po wystudzeniu dodano sterylne roztwory MgCl<sub>2</sub> i MgSO<sub>4</sub> (końcowe stężenie: 0,1 M). Przechowywano w RT.

Sposób przygotowania roztworu buforującego PIPES:

PIPES - kwas piperazyno-N,N-bis(2-etanosulfonowy) przygotowano w wodzie dejonizowanej i przy pomocy 1 M KOH ustawiono pH na 6,7. Przechowywano w temperaturze -20°C.

Sposób przygotowania roztworu transformującego:

Roztwór transformujący przygotowano w wodzie dejonizowanej i przefiltrowano przez filtr 0,22 μm. Skład roztworu transformującego: 55 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, 10 mM PIPES. Przechowywano w temperaturze 4°C.

###### **4.4.1.2 Wprowadzenie komórek *E. coli* STBL3 w stan kompetencji metodą chlorku wapnia**

W celu wprowadzenia komórek *E. coli* STBL3 w stan kompetencji zaszczepiono hodowlę nocną z pojedynczej kolonii w pożywce LB (3 ml). Drugiego dnia zaszczepiono 250 ml pożywki SOB i inkubowano w temperaturze 18°C z wytrząsaniem (200 rpm). Trzeciego dnia zmierzono OD hodowli przy długości fali 600 nm (OD powinno wynosić 0,4-0,6), a jako kontrolę ujemną użyto pożywki SOB. Hodowlę przeniesiono do lodu na 10 minut, po czym komórki zwirowano (2 500xg, 4°C, 10 minut), a osad zawieszono w 80 ml buforu transformującego schłodzonego do temperatury 4°C. Następnie komórki

przeniesiono do lodu na 10 minut, zwirowano (2 500xg, 4°C, 10 minut), a osad rozwieszono w 18,6 ml buforu transformującego i dodano 1,4 ml DMSO (7% objętości). Komórki przeniesiono do lodu na 10 minut, po czym rozdzielono do sterylnych probówek typu eppendorff po 200 i 500 µl i od razu zamrożono w ciekłym azocie. Przechowywano w temperaturze -80°C.

#### **4.4.1.3 Obliczanie wydajności komórek kompetentnych *E. coli* STBL3**

W celu obliczenia wydajności komórek kompetentnych rozmrożono je na lodzie, dodano do 200 µl komórek 1 µl plazmidowego DNA o stężeniu 1ng/µl i inkubowano na lodzie przez 10 minut. Użyto plazmidu pGEM-3Zf(+) Vector. Po tym czasie przeniesiono mieszaninę do łaźni wodnej o temperaturze 42°C i inkubowano przez 45 s, a następnie przeniesiono mieszaninę ponownie do lodu i inkubowano przez 2 minuty. Komórki wytrząsano w temperaturze 37°C przez 45 minut, po czym wysiano na szalkę LB-agar z antybiotykiem selekcyjnym (ampicylina) o końcowym stężeniu 100 µg/ml i inkubowano w 37°C przez noc. Obliczono wydajność komórek kompetentnych w przeliczeniu na 1 µg DNA.

#### **4.4.2 Wprowadzenie i namnożenie plazmidów w kompetentnych komórkach *E. coli* STBL3**

Do namnażania plazmidów wykorzystano komórki *E. coli* STBL3, które wprowadzono w stan kompetencji metodą chlorku wapnia.

##### **4.4.2.1 Transformacja kompetentnych komórek *E. coli* STBL3**

W celu transformacji komórek kompetentnych do 50 µl komórek dodano 20 ng plazmidowego DNA i inkubowano na lodzie przez 10 minut, po czym przeniesiono mieszaninę do łaźni wodnej o temperaturze 42°C i inkubowano przez 45 s. Następnie mieszaninę przeniesiono ponownie do lodu i inkubowano przez 2 minuty, po czym dodano 1 ml pożywki LB i wytrząsano w temperaturze 37°C przez 45 minut. Komórki zwirowano (14 000xg, 4°C, 45 s), a osad rozwieszono w 100 µl LB, wysiano na szalkę LB-agar z antybiotykiem selekcyjnym (ampicylina) i inkubowano w 37°C przez noc.

##### **4.4.2.2 Izolacja plazmidowego DNA**

Do izolacji plazmidowego DNA, wykorzystywanego w kolejnych etapach do transfekcji komórek HEK293T, użyto zestawu PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep ze

względu na niską zawartość endotoksyn w otrzymywanym preparacie. Zestaw ten zapewnia izolację DNA o wysokiej czystości i z wysoką wydajnością. Jego działanie opiera się na kolumnach jonowymiennych, które wydajnie wiążą DNA, a zanieczyszczenia (białka i in.) przechodzą przez kolumnę niezwiązane. DNA zostaje usunięte z kolumny przy pomocy buforu o wysokim zasoleniu, a następnie odsolone i zagęszczone przez precypitację alkoholową.

#### **4.4.2.3 Pomiar stężenia plazmidowego DNA**

Pomiar stężenia plazmidowego DNA przeprowadzano na spektrofotometrze NanoDrop. Mierzona była absorbancja próbki przy długościach fali 260 i 280 nm w celu określenia czystości materiału.

#### **4.4.2.4 Elektroforeza plazmidowego DNA**

Rozdział elektroforetyczny plazmidowego DNA prowadzony był w celu potwierdzenia czystości materiału mierzonego wcześniej na spektrofotometrze NanoDrop oraz określeniu wielkości namnożonych plazmidów. Przeprowadzany był w żelu agarozowym o stężeniu 0,9-1% z dodatkiem bromku etydyny (stężenie: 1µg/ml) w buforze TAE (skład: 40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM kwas octowy). Czas rozdziału był zależny od wielkości plazmidów i wynosił 15-90 minut. Jako standard wielkości stosowany był marker DNA GeneRuler DNA Ladder Mix, a jako obciążnik próbek DNA Gel Loading Dye (6X).

#### **4.4.3 Optymalizacja transfekcji z wykorzystaniem polietylenoiminy (PEI) i Lipofectamine 2000 (LP2000)**

W celu wprowadzenia plazmidów do komórek linii HEK293T zastosowano metodę transfekcji, a jako substancji wspomagającej wnikanie DNA do wnętrza komórek użyto polimeru kationowego – polietylenoiminy (PEI) i lipidu kationowego – Lipofectamine 2000 (LP2000).

##### **4.4.3.1 Przygotowanie buforów i odczynników stosowanych podczas optymalizacji transfekcji z wykorzystaniem PEI i Lipofectamine 2000**

Przygotowanie roztworu PEI do transfekcji:

Do przygotowania 100 ml roztworu PEI do transfekcji wymieszano 65 mg PEI z 95 ml wody o czystości do biologii molekularnej. Przy użyciu 5M roztworu HCl

ustawiono pH roztworu na 7,4. Dopełniono wodą do objętości 100 ml i filtrowano przez filtr 0,22  $\mu\text{m}$  pod komorą laminarną. Przechowywano w temperaturze 4°C (do użytku bieżącego – do 3 miesięcy) lub w -20°C (do 1 roku).

Przygotowanie roztworu chlorku sodu:

Roztworu chlorku sodu o stężeniu 150 mM przygotowano w wodzie o czystości do biologii molekularnej. Przechowywano przez filtr 0,22  $\mu\text{m}$  pod komorą laminarną. Przechowywano w RT.

#### 4.4.3.2 Transfekcja komórek HEK293T – optymalizacja metody PEI

Optymalizacja transfekcji prowadzona była przez zmianę wartości N/P (stosunek liczby atomów azotu w PEI do liczby atomów fosforu w cząsteczce DNA) i ilości DNA.

Dnia pierwszego wysiano komórki HEK na płytce 6-dołkowej w gęstości 600 000/dołek i wstawiono do inkubatora CO<sub>2</sub> na 20-24 godziny. Dnia drugiego przygotowano: (1) roztwór DNA – plazmid wektorowy uzupełniono 150 mM NaCl do objętości 100  $\mu\text{l}$  i (2) roztwór PEI o objętości wyznaczonej wg poniższego wzoru ( $V_{PEI}$ ) [Reed, 2006], którą uzupełniono do 100  $\mu\text{l}$  150 mM NaCl:

$$V_{PEI} [\mu\text{l}] = \frac{3 \cdot P \cdot R}{S},$$

gdzie  $P$  – ilość użytego DNA [ $\mu\text{g}$ ],

$R$  – proporcja N/P,

$S$  – wyjściowe stężenie PEI [mM]

Każdy z roztworów inkubowano w RT przez 10 minut, po czym wymieszano oba roztwory przez wkraplanie roztworu PEI do DNA podczas worteksowania, następnie ponownie inkubowano mieszaninę w RT przez 10 minut. Po tym czasie powoli (kroplami) dodano mieszaninę DNA-PEI do komórek i dokładnie wymieszano przez kołysanie płytki. Komórki wstawiono do inkubatora CO<sub>2</sub> na około 16 godzin. Dnia trzeciego wymieniono medium hodowlane na świeże i wstawiono komórki do inkubatora CO<sub>2</sub> na 24-48 godzin. Dnia czwartego i/lub piątego obserwowano komórki pod mikroskopem fluorescencyjnym. Po upływie 24-48 godzin od wymiany medium hodowlanego przeprowadzono analizę cytometryczną w celu wybrania najbardziej optymalnych parametrów transfekcji. Dla każdego plazmidu przeprowadzono oddzielną optymalizację.

#### **4.4.3.3 Transfekcja komórek HEK293T – optymalizacja metody LP2000**

Optymalizacja transfekcji prowadzona była przez zmianę ilości DNA i LP2000.

Dnia pierwszego wysiano komórki HEK na płytki 6-dołkowe w gęstości  $10^6$  komórek/dołek i wstawiono do inkubatora CO<sub>2</sub> na 20-24 godziny. Dnia drugiego przygotowano roztwór DNA – plazmid wektorowy rozcieńczono w medium OptiMEM do objętości 100 µl i roztwór LP2000 przez rozcieńczenie wybranej objętości LP2000 w medium OptiMEM do objętości 100 µl. Następnie inkubowano każdy z roztworów w RT przez 5 minut, po czym przeniesiono roztwór LP2000 do DNA, wymieszano i inkubowano mieszaninę w RT przez 20 minut. Po tym czasie powoli (kroplami) dodano mieszaninę DNA-LP2000 do komórek, dokładnie wymieszano i wstawiono komórki do inkubatora CO<sub>2</sub> na około 16 godzin. Dnia trzeciego wymieniono medium hodowlane na świeże i wstawiono komórki do inkubatora CO<sub>2</sub> na 24-48 godzin. Dnia czwartego i/lub piątego obserwowano komórki pod mikroskopem fluorescencyjnym. Po upływie 24-48 godzin od wymiany medium hodowlanego przeprowadzono analizę cytometryczną w celu wybrania najbardziej optymalnych parametrów transfekcji. Dla każdego plazmidu przeprowadzono oddzielną optymalizację.

#### **4.4.4 Produkcja wektorów lentiwirusowych 2. generacji**

Do produkcji wektorów lentiwirusowych 2. generacji użyto komórek linii HEK293T oraz 3 plazmidów – wektorowego, otoczkowego i pakującego.

##### **4.4.4.1 Produkcja wektorów lentiwirusowych 2. generacji zawierających geny kodujące białka fluorescencyjne – metoda oparta na PEI**

W celu wyprodukowania wektorów lentiwirusowych 2. generacji dnia pierwszego wysiano komórki HEK na płytki 6-dołkowe w gęstości 600 000/dołek i wstawiono do inkubatora CO<sub>2</sub> na 20-24 godziny. Do produkcji wirusa używano komórek o liczbie pasaży nieprzekraczającej 30. Dnia drugiego przygotowano roztwór DNA – plazmid wektorowy (zawierający gen kodujący białko EGFP lub białko DsRed2), pakujący i otoczki rozcieńczono w 150 mM NaCl do objętości 100 µl. Wybrana na podstawie literatury proporcja masy plazmidów wynosiła 3:2:1, a końcowa ilość DNA 5 µg (wybrana na podstawie optymalizacji transfekcji). Równolegle przygotowano roztwór PEI – z roztworu wyjściowego PEI (7,5 mM) pobrano 50 µl i uzupełniono do 100 µl 150 mM NaCl. Wybrana na podstawie optymalizacji transfekcji proporcja N/P wynosiła 25. Każdy z roztworów inkubowano w RT przez 10 minut, po czym wymieszano oba roztwory przez

wkraplanie PEI do DNA podczas wortexowania, inkubowano mieszaninę w RT przez 10 minut i powoli (kroplami) dodano mieszaninę DNA-PEI do komórek i dokładnie wymieszać. Komórki wstawiono do inkubatora CO<sub>2</sub> na około 16 godzin. Dnia trzeciego wymieniono medium hodowlane na świeże i wstawiono komórki do inkubatora CO<sub>2</sub> na 48 godzin. Dnia piątego obserwowano komórki pod mikroskopem fluorescencyjnym oraz zebrano medium hodowlane zawierające wektory lentiwirusowe z komórek HEK i przefiltrowano przez filtr 0,22 μm do sterylnych probówek o objętości 2 ml. Przechowywano w temperaturze -80°C (do 1 roku).

#### **4.4.4.2 Produkcja wektorów lentiwirusowych 2. generacji zawierających geny kodujące białka fluorescencyjne – określanie miana preparatów wirusowych**

W celu określenia miana preparatów wirusowych przeprowadzono transdukcja komórek HOS. Dnia pierwszego wysiano komórki HOS na płytce 12-dółkowej w gęstości 150 000/dółek i wstawiono do inkubatora CO<sub>2</sub> na 20-24 godziny. Dnia drugiego przed transdukcją wymieniono medium hodowlane na świeże (objętość 0,5 ml), dodano do komórek preparat wirusowy w objętości 2,5 i 25 μl/dółek, dokładnie wymieszano i wstawiono do inkubatora CO<sub>2</sub> na około 20-24 godziny. Dnia trzeciego dodano 0,5 ml świeżego medium hodowlanego. Dnia czwartego i/lub piątego obserwowano komórki pod mikroskopem fluorescencyjnym, a następnie odklejono je z płytek i zwirowano (600xg, 4°C, 5 minut) w PBS. Osad zawieszono w 4% FA, inkubowano w RT przez 10 minut, zwirowano (600xg, 4°C, 5 minut), przepłukano PBS i ponownie zwirowano (600xg, 4°C, 5 minut). Komórki analizowano w cytometrze przepływowym i obliczono miano preparatów wg wzoru:

$$\text{miano} \left[ \frac{TU}{ml} \right] = \frac{F \cdot N \cdot 1000}{V},$$

gdzie  $TU$  – jednostki transdukujące,

$F$  – odsetek komórek wykazujących fluorescencję,

$N$  – liczba komórek podczas transdukcji (zakłada się, że komórki HOS podwoją swoją liczbę w ciągu doby),

$V$  – objętość preparatu wirusowego [μl].

Odsetek komórek wykazujących fluorescencję nie powinien przekraczać 40% (optymalnie w zakresie 5-40%), ponieważ wyliczone miano nie będzie znajdować się w zakresie liniowym. W przypadku otrzymania odsetka komórek pozytywnych przekraczającego 40% należy zwiększyć rozcieńczenie preparatu wirusowego.



#### **4.4.4.3 Produkcja wektorów lentiwirusowych 2. generacji zawierający gen kodujący EGF – metoda oparta na LP2000**

W celu wyprodukowania wektorów lentiwirusowych 2. generacji dnia pierwszego wysiano komórki HEK na płytce 6-dołkowej w gęstości 600 000/dołek i wstawiono do inkubatora CO<sub>2</sub> na 20-24 godziny. Do produkcji wirusa używano komórek o liczbie pasaży nieprzekraczającej 30. Dnia drugiego przygotowano roztwór DNA – plazmid wektorowy (zawierający gen kodujący EGF), pakujący i otoczki rozcieńczono w medium OptiMEM do objętości 100 µl. Wybrana na podstawie literatury proporcja masy plazmidów wynosiła 3:2:1, a końcowa ilość DNA 1,8 µg (wybrana na podstawie optymalizacji transfekcji). Równolegle przygotowano roztwór LP2000 – z roztworu wyjściowego pobrano 3 µl i uzupełniono do 100 µl medium OptiMEM. Każdy z roztworów inkubowano w RT przez 5 minut, po czym wymieszano oba roztwory przez wkraplanie LP2000 do DNA, inkubowano mieszaninę w RT przez 20 minut i powoli (kroplami) dodano mieszaninę DNA-LP2000 do komórek i dokładnie wymieszać. Komórki wstawiono do inkubatora CO<sub>2</sub> na około 16 godzin. Dnia trzeciego wymieniono medium hodowlane na świeże i wstawiono komórki do inkubatora CO<sub>2</sub> na 24-48 godzin. Dnia czwartego i/lub piątego obserwowano komórki pod mikroskopem fluorescencyjnym oraz zebrano medium hodowlane zawierające wektory lentiwirusowe z komórek HEK i przefiltrowano przez filtr 0,22 µm do sterylnych probówek o objętości 2 ml. Przechowywano w temperaturze -80°C (do 1 roku).

#### **4.4.5 Wprowadzenie genów kodujących białka fluorescencyjne i EGF do izolowanych ludzkich fibroblastów skóry (HSF) i ocena modyfikacji**

Geny kodujące białka fluorescencyjne i EGF zostały wprowadzone do izolowanych ludzkich fibroblastów skóry za pomocą wektorów lentiwirusowych 2. generacji.

##### **4.4.5.1 Transdukcja izolowanych ludzkich fibroblastów – wektory zawierające geny kodujące białka fluorescencyjne i ocena modyfikacji**

Dnia pierwszego wysiano HSF na płytce 12-dołkowej w gęstości 25 000/dołek i wstawiono do inkubatora CO<sub>2</sub> na 20-24 godziny. Dnia drugiego przed transdukcją wymieniono medium hodowlane na świeże (zredukowano objętość do 0,5 ml) i dodano do komórek preparat wirusowy o MOI (ang. *Multiplicity Of Infection*) = 2.

$$\text{objętość wirusa } [\mu\text{l}] = \frac{\text{MOI} \cdot \text{liczba komórek} \cdot 1000}{\text{miano wirusa}}$$

Dokładnie wymieszano i wstawiono komórki do inkubatora CO<sub>2</sub> na około 20-24 godziny. Dnia trzeciego dodano 0,5 ml świeżego medium hodowlanego. Dnia czwartego i/lub piątego obserwowano komórki pod mikroskopem fluorescencyjnym, a następnie odklejono je z płytek i zwirowano (600xg, 4°C, 5 minut) w PBS. Osad zawieszono w 4% FA i inkubowano w RT przez 10 minut, po czym komórki zwirowano (600xg, 4°C, 5 minut), przepłukano PBS i ponownie zwirowano (600xg, 4°C, 5 minut). Osad zawieszono w 100 μl PBS i analizowano w cytometrze przepływowym. W razie konieczności (zbyt niska liczba zmodyfikowanych komórek) powtarzano procedurę 2- lub 3-krotnie. Odsetek pozytywnych komórek powinien wynosić powyżej 90%.

#### **4.4.5.2 Transdukcja izolowanych ludzkich fibroblastów – wektor zawierający gen kodujący EGF**

Dnia pierwszego wysiano HSF na płytce 12-dołkowej w gęstości 25 000/dołek i wstawiono do inkubatora CO<sub>2</sub> na 20-24 godziny. Dnia drugiego przed transdukcją wymieniono medium hodowlane na świeże (zredukowano objętość do 0,5 ml). W celu pozbycia się ewentualnych plazmidów preparat wirusowy potraktowano DNazą (na 1 ml preparatu dodano 1 μl DNazy i inkubowano w RT przez 15 minut). Po tym czasie dodano do komórek 100 lub 200 μl preparatu wirusowego, dokładnie wymieszano i wstawiono do inkubatora CO<sub>2</sub> na około 20-24 godziny. Dnia trzeciego dodano 0,5 ml świeżego medium hodowlanego. Dnia czwartego i/lub piątego obserwowano komórki pod mikroskopem fluorescencyjnym.

#### **4.4.5.3 Ocena modyfikacji HSF – wektor zawierający gen kodujący EGF**

Ocena izolowanych ludzkich fibroblastów skóry po modyfikacji wektorem zawierającym gen kodujący EGF obejmowała badanie DNA oraz białka.

##### **4.4.5.3.1 Badanie DNA**

W celu sprawdzenia, czy wprowadzony transgen znajduje się w genomie fibroblastów przeprowadzono badanie DNA izolowanego z komórek modyfikowanych.

#### 4.4.5.3.1.1 Projektowanie starterów do sekwencjonowania i reakcji PCR

Startery do sekwencjonowania i reakcji PCR zostały zaprojektowane na podstawie sekwencji plazmidu wektorowego dostarczonej przez firmę GeneCopoeia oraz sekwencji nukleotydów cDNA dla ludzkiego *EGF* z GenBank (NM\_001963.4). Startery zostały zaprojektowane przy użyciu programu Primer-BLAST i zsyntetyzowane przez Pracownię Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN (oligo.pl). Starter przeznaczony do sekwencjonowania zaprojektowano w obrębie promotora CMV, a startery do reakcji PCR w obrębie promotora CMV (identyczny ze starterem do sekwencjonowania) i sekwencji *EGF* w taki sposób, aby możliwe było rozróżnienie między endogennym *EGF* a obecnością transgenu w genomie. Sekwencje starterów wraz z charakterystyką podano w Tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Startery wykorzystywane do sekwencjonowania i reakcji PCR

Nazwa	Sekwencja (5' → 3')	Długość [pz]	Zawartość GC [%]	TM [°C]
CMV	AAGTACGCCCCCTATTGACG	20	55,0	53,8
EGF	CATGATCACTGAGACACCAGC	21	52,4	54,4

#### 4.4.5.3.1.2 Sekwencjonowanie

Sekwencjonowanie zostało wykonane w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN (oligo.pl).

#### 4.4.5.3.1.3 Reakcja PCR

W celu przygotowania matrycy do reakcji PCR, komórki trypsynizowano, liczone i pobierano 50 000 komórek, zawieszając je w 20  $\mu$ l PBS. Następnie inkubowano w 95°C przez 15 minut, wirowano (10 000xg, 4°C, 2 minuty) i przenoszono supernatant do nowych probówek. Do tak przygotowanej matrycy dodawano pozostałe składniki mieszaniny reakcyjnej, której skład przedstawiono w Tabeli 4.2.

Tabela 4.2. Skład mieszaniny reakcyjnej

Składnik	Ilość na 1 reakcję
bufor dla polimerazy zawierający jony $Mg^{2+}$	2,5 $\mu$ l
dNTPs (10 mM każdy)	1,0 $\mu$ l
starter CMV (10 pM/ $\mu$ l)	0,75 $\mu$ l
starter EGF (10 pM/ $\mu$ l)	0,75 $\mu$ l
polimeraza RUN DNA (1U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
matryca	4 $\mu$ l
woda o czystości do biologii molekularnej	do końcowej objętości 25 $\mu$ l

Warunki reakcji PCR:

Wstępna denaturacja DNA	94°C	4 minuty	
Denaturacja	94°C	45 sekund	} 35 cykli
Przyłączanie starterów	57°C	45 sekund	
Wydłużanie nici DNA	72°C	1 minuta	
Końcowe wydłużanie	72°C	5 minut	

#### 4.4.5.3.1.4 Elektroforeza produktów reakcji PCR w żelu agarozowym

Rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA prowadzono w 1% żelu agarozowym z bromkiem etydyny (stężenie: 1 µg/ml), w buforze TAE, pod napięciem 90 V. Fragmenty DNA uwidaczniiano w świetle UV o długości fali 254 nm.

#### 4.4.5.3.2 Badanie białka

Badanie produkcji białka EGF przeprowadzono metodą Dot Blot (oznaczenie jakościowe) i metodą ELISA (oznaczenie ilościowe).

##### 4.4.5.3.2.1 Oznaczanie jakościowe – metoda Dot Blot

W celu przygotowania matrycy do metody Dot Blot, komórki trypsynizowano i liczone, po czym pobierano 50 000 komórek, zawieszano w 10 µl 0,1% SDS i inkubowano w 95°C przez 3 minuty, a następnie wirowano (10 000xg, 2 minuty, 4°C) i przenoszono supernatant do nowych probówek.

W celu identyfikacji białek metodą Dot Blot naniesiono 10 µl matrycy na membranę nitrocelulozową i pozostawiono do wyschnięcia, po czym inkubowano z 5% BSA przez 1 godzinę w RT. Następnie inkubowano z przeciwciałem skoniugowanym z HRP w stężeniu 1:10 000 (stężenie wyjściowe: 1 µg/µl) w RT przez 1 godzinę (przeciwciało przygotowane w roztworze 1% BSA w PBST), po czym płukano membranę 3 razy po 10 minut w PBST, inkubowano ją z 5 ml TMB w RT przez 5 minut i usuwano TMB, pozostawiając membranę w 5-10 ml PBS.

##### 4.4.5.3.2.2 Oznaczanie ilościowe – metoda ELISA

Przygotowanie buforów stosowanych w metodzie ELISA:

Coating Buffer: 1 kapsułkę (C3041, Sigma Aldrich) rozpuszczono w 100 ml wody dejonizowanej. Przechowywano w temperaturze 4°C (do 1 roku).

Wash Solution: 1 porcję (T9039, Sigma Aldrich) rozpuszczono w 1 l wody dejonizowanej. Przechowywano w temperaturze 4°C (do 1 roku).

Postcoat Solution: 1 porcję (T6789, Sigma Aldrich) rozpuszczono w 1 l wody dejonizowanej. Przechowywano w temperaturze 4°C (do 1 roku).

Sample Diluent: Do 100 ml Postcoat Solution dodano 0,5 ml 10% Tween 20. Przechowywano w temperaturze 4°C (do 1 roku).

W celu identyfikacji białek kanapkową metodą ELISA inkubowano płytkę 96-dołkową mocno-wiążącą z przeciwciałem w stężeniu 1:5 000 (stężenie wyjściowe: 1 µg/µl) w RT przez 1 godzinę (przeciwciało przygotowane w Coating Buffer), po czym wypłukano płytkę 2-krotnie przy pomocy Wash Solution i inkubowano płytkę z Postcoat Solution w RT przez 30 minut. Następnie wypłukano płytkę 3-krotnie przy pomocy Wash Solution, inkubowano z próbkami rozcieńczonymi w PBS oraz standardem o wzrastającym geometrycznie stężeniu w RT przez 1 godzinę i wypłukano 2-krotnie przy pomocy Wash Solution. Tak przygotowaną płytkę inkubowano z przeciwciałem skoniugowanym z HRP w stężeniu 1:10 000 (stężenie wyjściowe: 1 µg/µl) przez 1 godzinę w RT (przeciwciało przygotowane w Sample Diluent), po czym wypłukano płytkę 2-krotnie przy pomocy Wash Solution, inkubowano z TMB (100 µl/dołek) w 37°C przez 15 minut i zatrzymano reakcję przy pomocy 0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbancję mierzono przy długości fali 450 nm.

Mierzone próbki pochodziły z 10-dniowej hodowli HSF, HSF-EGF, C3A i HOS (początkowa liczba komórek wynosiła 20 000/dołek płytki 24-dołkowej).

#### **4.4.6 Ocena wpływu wprowadzonych modyfikacji genetycznych na HSF**

Wpływ wprowadzonych modyfikacji genetycznych na izolowane ludzkie fibroblasty skóry był oceniany na podstawie pomiaru odsetka martwych komórek i aktywności mitochondrialnej.

##### **4.4.6.1 Pomiar odsetka martwych komórek – analiza mikroskopowa**

Komórki nietransdukowane i zmodyfikowane wysiano w gęstości 38 000/dołek płytki 12-dołkowej. W celu określenia odsetka komórek martwych, co czwarty dzień hodowli komórki z kolejnych dołków trypsynizowano i liczono po wybarwieniu błękitem trypanu. Odsetek komórek martwych obliczano na podstawie wzoru:

$$\text{odsetek komórek martwych} = \frac{\text{liczba komórek martwych } h}{\text{liczba wszystkich } h \text{ komórek}} \cdot 100\% .$$

#### **4.4.6.2 Pomiar odsetka martwych komórek – analiza cytometryczna**

Komórki nietransdukowane i zmodyfikowane wysiano w gęstości 38 000/dołek płytki 12-dołkowej. W 8. i 16. dniu hodowli komórki trypsynizowano, płukano w PBS i przenoszono do probówek okrągłodennych. Bezpośrednio przed analizą cytometryczną dodawano 5 µl jodku propidyny o stężeniu: 0,1 mg/ml i określano odsetek komórek martwych.

#### **4.4.6.3 Pomiar aktywności mitochondrialnej – test MTT**

Komórki nietransdukowane i zmodyfikowane wysiano w gęstości 10 000/dołek na płytki 96-dołkowe. W 7. i 14. dniu hodowli przeprowadzono test MTT. Usunięto pożywkę i dodano 50 µl roztworu MTT (stężenie: 250 µg/ml). Po 3 godzinach inkubacji w 37°C dodano 150 µl izopropanolu i rozpuszczono powstałe kryształki przez pipetowanie. Zmierzono absorbancję przy długości fali 570 nm.

### **4.5 Badanie kokultury komórek wątrobowych z izolowanymi ludzkimi fibroblastami**

Kokultura komórek wątrobowych była prowadzona z niemodyfikowanymi fibroblastami, z fibroblastami produkującymi białka fluorescencyjne oraz z fibroblastami nadprodukującymi EGF.

#### **4.5.1 Badanie kokultury komórek wątrobowych z izolowanymi ludzkimi fibroblastami produkującymi białka fluorescencyjne (EGFP i DsRed2)**

Badanie kokultury komórek wątrobowych z izolowanymi ludzkimi fibroblastami produkującymi białka fluorescencyjne obejmowało analizę morfologii, analizę cytometryczną markerów komórkowych, oznaczanie ilości wydzielonej albuminy oraz ocenę polaryzacji komórek.

##### **4.5.1.1 Plan doświadczenia**

Komórki ludzkiej hepatomy (C3A) wysiano w kokulturze z izolowanymi ludzkimi fibroblastami (HSF) jako komórkami podtrzymującymi hodowlę w różnych proporcjach. Do doświadczeń użyto komórek C3A o stabilnej ekspresji białek EGFP i DsRed2 wygenerowanych przez mgr Annę Samluk z Pracowni Inżynierii Tkankowej IBIB. Jako kontroli negatywnej użyto komórek ludzkiej osteosarkomy (HOS). Hodowlę prowadzono na płytkach 6-dołkowych w gęstości 100 000/dołek przez 16 dni w inkubatorze CO<sub>2</sub>.



Co drugi dzień zbierano medium hodowlane do pomiaru stężenia albuminy produkowanej przez komórki C3A i wykonywano zdjęcia przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego w celu oceny parametrów morfologicznych struktur utworzonych przez C3A i HSF, przypominających wyspy (wielkość, liczba, *etc.*). Po 16 dniach hodowli analizowano komórki metodą cytometrii przepływowej – zarówno odsetek komórek pozytywnych dla danego markera jak i medianę natężenia fluorescencji (ang. *Median Fluorescence Intesity*, MFI). Schemat doświadczenia znajduje się w Tabeli 4.3.

Tabela 4.3. Schemat kokultury komórek wątrobowych z fibroblastami produkującymi białka fluorescencyjne.

Nr 1	Komórki wątrobowe 2	Komórki podtrzymujące 3	Proporcja (2:3) 4	Liczba komórek (2:3) 5
I	C3A	HSF	4:1	80 000:20 000
			2:1	67 000:33 000
			1:1	50 000:50 000
II	C3A-EGFP	HSF-DsRed2	4:1	80 000:20 000
			2:1	67 000:33 000
			1:1	50 000:50 000
III	C3A-DsRed2	HSF-EGFP	4:1	80 000:20 000
			2:1	67 000:33 000
			1:1	50 000:50 000
IV	C3A-EGFP	HOS	4:1	80 000:20 000
			2:1	67 000:33 000
			1:1	50 000:50 000
V	C3A	-	1:0	100 000:0
VI	-	HSF	0:1	0:100 000

#### 4.5.1.2 Ocena wpływu komórek podtrzymujących hodowlę na komórki wątrobowe – analiza morfologii

Morfologia komórek rosnących w kokulturze analizowana była przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego i programu CellP. Obserwowano wzrost komórek, a dodatkowo w 16 dniu hodowli na podstawie 20 zdjęć dokonano pomiarów liczby i wielkości struktur przypominających wyspy utworzonych przez komórki C3A. Pomiary dotyczyły jedynie III wariantu kokultury (różne proporcje) ze względu na łatwość analizy (dwukolorowa kokultura). Podjęto próbę oceny wysp w innych wariantach hodowli na podstawie przyżyciowego barwienia DNA w jądrze komórkowym przy pomocy Hoechst33342, jednak było to znacznie trudniejsze niż w przypadku obserwacji „kolorowych” linii.

#### **4.5.1.3 Ocena wpływu komórek podtrzymujących hodowlę na komórki wątrobowe - analiza cytometryczna markerów komórkowych**

Analiza cytometryczna przeprowadzana była zgodnie z protokołem umieszczonym w rozdziale 4.3.2 z modyfikacjami – komórki przed przygotowaniem nie były liczone. W celu uniknięcia różnic pomiędzy dołkami, po trypsynizacji komórki z wszystkich dołków danego wariantu i proporcji traktowano wspólnie. Do znakowania wybrano następujące markery: albumina (ALB),  $\alpha$ -1-antytrypsyna (A1AT), CK18, CK19 i CD73. Do analizy danych użyto programu FACSDiva.

#### **4.5.1.4 Ocena wpływu komórek podtrzymujących hodowlę na komórki wątrobowe - oznaczanie ilości wydzielonej albuminy metodą ELISA**

W celu identyfikacji białek kanapkową metodą ELISA inkubowano płytkę 96-dołkową mocno-wiążącą z przeciwciałem w stężeniu 1:750 (stężenie wyjściowe: 1  $\mu$ g/ $\mu$ l) w RT przez 1 godzinę (przeciwciało przygotowane w Coating Buffer), po czym wypłukano płytkę 2-krotnie przy pomocy Wash Solution i inkubowano płytkę z Postcoat Solution w RT przez 30 minut. Następnie wypłukano płytkę 3-krotnie przy pomocy Wash Solution, inkubowano z próbkami rozcieńczonymi w PBS oraz standardem o wzrastającym geometrycznie stężeniu w RT przez 1 godzinę i wypłukano 2-krotnie przy pomocy Wash Solution. Tak przygotowaną płytkę inkubowano z przeciwciałem skoniugowanym z HRP w stężeniu 1:75 000 (stężenie wyjściowe: 1  $\mu$ g/ $\mu$ l) przez 1 godzinę w RT (przeciwciało przygotowane w Sample Diluent), po czym wypłukano płytkę 2-krotnie przy pomocy Wash Solution, inkubowano z TMB (100  $\mu$ l/dołek) przez 15 minut w 37°C i zatrzymano reakcję przy pomocy 0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbancję mierzono przy długości fali 450 nm.

Mierzone próbki pochodziły z 16-dniowej hodowli, medium hodowlane było zbierane i wymieniane co drugi dzień.

#### **4.5.1.5 Ocena wpływu komórek podtrzymujących hodowlę na komórki wątrobowe - polaryzacja komórek**

Ocena polaryzacji komórek przeprowadzana była przy użyciu automatycznego mikroskopu konfokalnego Olympus FluoView FV10i i programu FV10-ASW 1.7 Viewer. Doświadczenia dotyczyły jedynie I wariantu hodowli (proporcja 2:1) ze względu na lepszą widoczność obserwowanych struktur. Włókna aktyny, składnik m.in. ścian

wakuoli apikalnych, wiążą się z falloidyną skoniugowaną z TRITC, barwiąc struktury *bile canaliculi* na czerwono.

W celu oceny stopnia polaryzacji z hodowli komórek na płytkach wielodołkowych usunięto medium hodowlane, przepłukano PBS i inkubowano komórki z 4% FA w RT przez 15 minut, po czym usunięto FA i przepłukano komórki PBS (3-krotnie). Następnie inkubowano komórki z 0,1% Triton X-100 w RT przez 10 minut, usunięto Triton i przepłukano komórki PBS (3-krotnie). Aby uwidocznić wakuole apikalne zbudowane z aktyny inkubowano komórki z falloidyną skoniugowaną z TRITC (stężenie: 50 µg/ml) w RT w ciemności przez 15 minut, po czym usunięto barwnik, przepłukano komórki PBS (3-krotnie) i inkubowano z DAPI (stężenie: 10 µg/ml) w RT przez 5 minut. Następnie usunięto DAPI, przepłukano komórki PBS (3-krotnie) i obserwowano pod mikroskopem konfokalnym.

#### **4.5.2 Badanie kokultury komórek wątrobowych z izolowanymi ludzkimi fibroblastami nadprodukującymi EGF**

Badanie kokultury komórek wątrobowych z izolowanymi ludzkimi fibroblastami nadprodukującymi EGF obejmowało analizę cytometryczną markerów komórkowych, oznaczanie ilości wydzielonej albuminy oraz ocenę polaryzacji komórek.

##### **4.5.2.1 Plan doświadczenia**

Komórki ludzkiej hepatomy (C3A) wysiano w kokulturze z izolowanymi ludzkimi fibroblastami nadprodukującymi EGF (HSF-EGF) jako komórkami podtrzymującymi hodowlę w różnych proporcjach. Hodowlę prowadzono na płytkach 12-dołkowych w gęstości 50 000/dołek w proporcji 5:1 (C3A:HSF-EGF) przez 18 dni w inkubatorze CO<sub>2</sub>. Dodatkowo prowadzono kokulturę C3A z HSF, kokulturę C3A z HSF z suplementacją EGF oraz hodowlę C3A z suplementacją EGF. Jako kontrolę przyjęto monokulturę C3A. Co trzeci dzień zbierano medium hodowlane do pomiaru stężenia albuminy produkowanej przez komórki C3A. Po 9 dniach hodowli analizowano komórki metodą cytometrii przepływowej – zarówno odsetek komórek pozytywnych dla danego markera jak i medianę natężenia fluorescencji (ang. *Median Fluorescence Intesity*, MFI). Schemat doświadczenia znajduje się w Tabeli 4.4.

Tabela 4.4. Schemat kokultury komórek wątrobowych z fibroblastami nadprodukującymi EGF

<b>Nr</b>	<b>Komórki wątrobowe</b>	<b>Komórki podtrzymujące</b>	<b>Inne</b>
I	C3A	-	-
II	C3A	-	suplementacja EGF [10 ng/ml]
III	C3A	HSF	-
IV	C3A	HSF-EGF	-
V	C3A	HSF	suplementacja EGF [10 ng/ml]

Analiza cytometryczna przeprowadzana była zgodnie z opisem zamieszczonym w Rozdziale 4.5.1.3. Oznaczanie zawartości albuminy przeprowadzany był zgodnie z opisem zamieszczonym w Rozdziale 4.5.1.4. Ocena polaryzacji komórek była przeprowadzana zgodnie z opisem zamieszczonym w Rozdziale 4.5.1.5.

## 5. Wyniki

### 5.1 Porównanie metod izolacji komórek z fragmentów ludzkich resekowanych wątrób

Jeżeli nie zaznaczono inaczej, wyniki podawane są w formie mediany i ewentualnie zakresu danych. Analiza statystyczna przeprowadzona była w programie Statistica z wykorzystaniem testu nieparametrycznego U Manna-Whithney'a. Wartości  $p \leq 0,05$  uznano za statystycznie istotne.

#### 5.1.1 Porównanie perfuzji i maceracji jako metod izolacji komórek z fragmentów ludzkich wątrób po resekcji

Analizie poddano komórki pochodzące z 41 fragmentów wątrób ludzkich, z czego 19 pobranych od kobiet, a 22 – od mężczyzn. 22 fragmenty pochodziły od osób poniżej 60 r.ż., a 19 od osób powyżej 60 r.ż. Spośród 38 fragmentów wątrób poddanych maceracji 25 pobrano od pacjentów poddanych chemioterapii. W Tabeli 5.1 podano zestawienie charakterystyki fragmentów wątrób i parametrów komórek z nich wyizolowanych z podziałem na zastosowane metody izolacji. Pełna charakterystyka fragmentów wątrób ludzkich znajduje się w Dodatku B.

Tabela 5.1 Zestawienie fragmentów wątroby izolowanych różnymi metodami

Cecha	P	M1	M2	M3
Liczba N	3	7	21	11
Płeć (K/M)	2/1	2/5	11/10	8/1
Wiek	54 (50-57)	60 (39-73)	57 (21-69)	62 (34-75)
Chemioterapia (Tak/Nie)	b.d.	4/3	15/6	6/5
Wydajność [mln/g]	0,85 (0,5-1,3)	4,1 (2,4-12,0)	3,2 (1,3-11,0)	2,7 (1,1-7,8)
Żywotność [%]	79,0 (64,0-90,6)	97,0 (91,8-97,9)	97,6 (94,3-99,9)	96,4 (92,0-99,0)

Wartości wieku, całkowitej liczby komórek, wydajności i żywotności przedstawione zostały w formie: mediana (zakres wyników).

Zaobserwowano różnice w wydajności pomiędzy metodą perfuzji a maceracji (P vs M  $p=0,006$ ). Z fragmentów izolowanych metodą maceracji pozyskiwano więcej żywych komórek wątrobowych niż podczas stosowania perfuzji. Nie zaobserwowano

natomiast różnic w wydajności pomiędzy opisanymi metodami maceracji (M1 vs M2  $p=0,118$ , M1 vs M3  $p=0,057$ , M2 vs M3  $p=0,475$ ) oraz pomiędzy fragmentami pochodzącymi od kobiet i mężczyzn (K vs M  $p=1,000$ ), od osób poniżej i powyżej 60 r.ż. (60- vs 60+  $p=1,000$ ) oraz od osób niepoddanych i po chemioterapii (CH- vs CH+  $p=0,551$ ).

Zaobserwowano różnice w żywotności komórek pomiędzy metodą perfuzji a maceracji (P vs M  $p=0,005$ ). Z fragmentów izolowanych metodą maceracji pozyskiwano większy odsetek żywych hepatocytów niż podczas stosowania perfuzji. Nie zaobserwowano różnic w żywotności pomiędzy metodami maceracji M1 i M2 ( $p=0,090$ ) oraz M1 i M3 ( $p=1,000$ ). Różnica median pomiędzy żywotnością komórek izolowanych metodami M2 i M3 wynosiła 1,2%, ale była istotna statystycznie ( $p=0,026$ ). Pomiedzy fragmentami pochodzącymi od kobiet i mężczyzn (K vs M  $p=0,910$ ), od osób poniżej i powyżej 60 r.ż. (60- vs 60+  $p=0,673$ ) oraz od osób niepoddanych i po chemioterapii (CH- vs CH+  $p=0,907$ ) nie stwierdzono istotnych różnic. Jedynie, pomiędzy fragmentami pochodzącymi od kobiet poniżej 60 r.ż i kobiet powyżej 60 r.ż. (K60- vs K60+  $p=0,022$ ) zaobserwowano różnice w żywotności, jednak różnica median wynosiła jedynie 1,6%.

### 5.1.2 Porównanie wydajności i żywotności komórek izolowanych z ludzkich resekowanych wątrób w zależności od modyfikacji metody izolacji

Przykłady modyfikacji metody izolacji polegające na zmianie czasu, temperatury i parametrów wirowania wraz z uzyskanymi wartościami wydajności i żywotności izolowanych komórek zostały przedstawione w Tabeli 5.2. Dodatkowo sprawdzono oczyszczanie izolatu przy użyciu poduszki z Percollu.

Tabela 5.2 Zestawienie przykładowych wartości wydajności i żywotności podczas stosowania modyfikacji izolacji hepatocytów.

Modyfikacja	Parametry	Wydajność	Żywotność
1. Czas izolacji	60 minut	2,7 mln/g	97,0%
	40 minut	1,9 mln/g	97,0%
2. Temperatura izolacji	37°C	2,7 mln/g	97,0%
	33°C	2,8 mln/g	97,0%
3. Parametry wirowania	-	4,4 mln/g	96,3%
	1x50xg	4,1 mln/g	96,5%
	3x50xg	3,1 mln/g	91,2%
4. Oczyszczanie izolatu	Percoll	7,8 mln/g	97,3%
	brak Percollu	14,0 mln/g	95,5%



Wydłużenie czasu izolacji powoduje zwiększenie liczby komórek uzyskiwanych z grama tkanki bez wpływu na ich żywotność. Ponieważ kolagenaza ma zakres tolerancji temperaturowej rzędu kilku stopni Celsjusza, to niewielkie obniżenie optymalnej temperatury jej działania (37°C) nie wpływa na jej aktywność, a tym samym wydajność izolacji. Zastosowanie wirowania 50xg (jedno- lub kilkukrotnego), które ma na celu oddzielenie komórek nieparenchymalnych od hepatocytów obniżyło wydajność izolacji (z 4,4 mln/g do 3,1 mln/g przy 3-krotnym wirowaniu) i żywotność komórek (z 96,3% do 91,2% przy 3-krotnym wirowaniu). Natomiast zastosowanie Percollu, przy ustalonych dla hepatocytów parametrach wirowania (gęstość Percollu 1,04 g/ml, 366xg, 4°C, 20 minut), znacząco obniża liczbę izolowanych komórek (z 14 mln/g do 7,8 mln/g), głównie nieparenchymalnych, których liczba jest redukowana ze względu na mniejsze rozmiary i gęstość.

### 5.1.3 Porównanie typów kolagenazy stosowanych podczas izolacji komórek z fragmentów ludzkich wątrób po resekcji

Porównanie między typem I a XI kolagenazy dotyczy komórek izolowanych metodą M3 z fragmentów pobranych od tych samych pacjentów. W Tabeli 5.3 przedstawiono zestawienie charakterystyki fragmentów wątrób i parametrów komórek z nich wyizolowanych z podziałem na zastosowany typ kolagenazy.

Tabela 5.3. Zestawienie fragmentów wątroby izolowanych różnymi typami kolagenaz.

Cecha	Kolagenaza typ I	Kolagenaza typ XI
Liczba N	4	
Płeć (K/M)	2/2	
Wiek	61,5 (45-63)	
Chemioterapia (T/N)	1/3	
Wydajność [mln/g]	2,5 (1,1-7,1)	3,0 (2,0-4,0)
Żywotność [%]	95,9 (92,0-97,2)	95,8 (92,7-98,6)

Wartości wieku, całkowitej liczby komórek, wydajności i żywotności przedstawione zostały w formie: mediana (zakres wyników).

Nie zaobserwowano istotnych zmian w wydajności ani w żywotności pomiędzy komórkami izolowanymi przy użyciu kolagenazy I i kolagenazy XI.

## 5.2 Oznaczenie markerów charakterystycznych dla różnych populacji komórek izolatu wątrobowego oraz dla izolowanych ludzkich fibroblastów

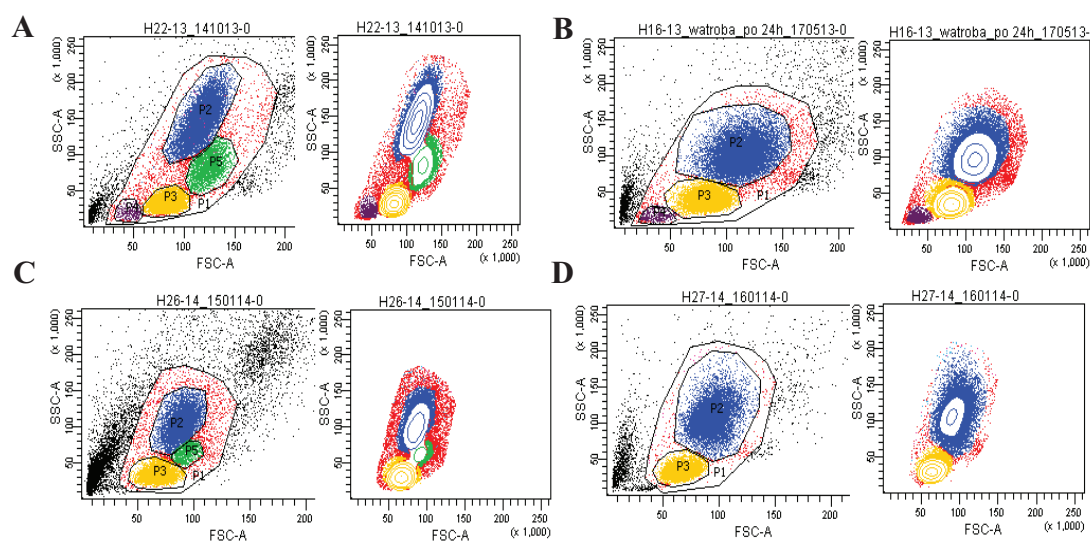
Oznaczenie markerów charakterystycznych dla różnych populacji komórek izolatu wątrobowego oraz dla izolowanych ludzkich fibroblastów przeprowadzono przy użyciu testów opartych na przeciwciałach (cytometria przepływowa, mikroskopia fluorescencyjna).

### 5.2.1 Analiza cytometryczna izolatu wątrobowego

Analiza cytometryczna izolatu wątrobowego obejmowała badanie populacji występujących w izolacie oraz badanie markerów charakterystycznych dla poszczególnych typów komórek.

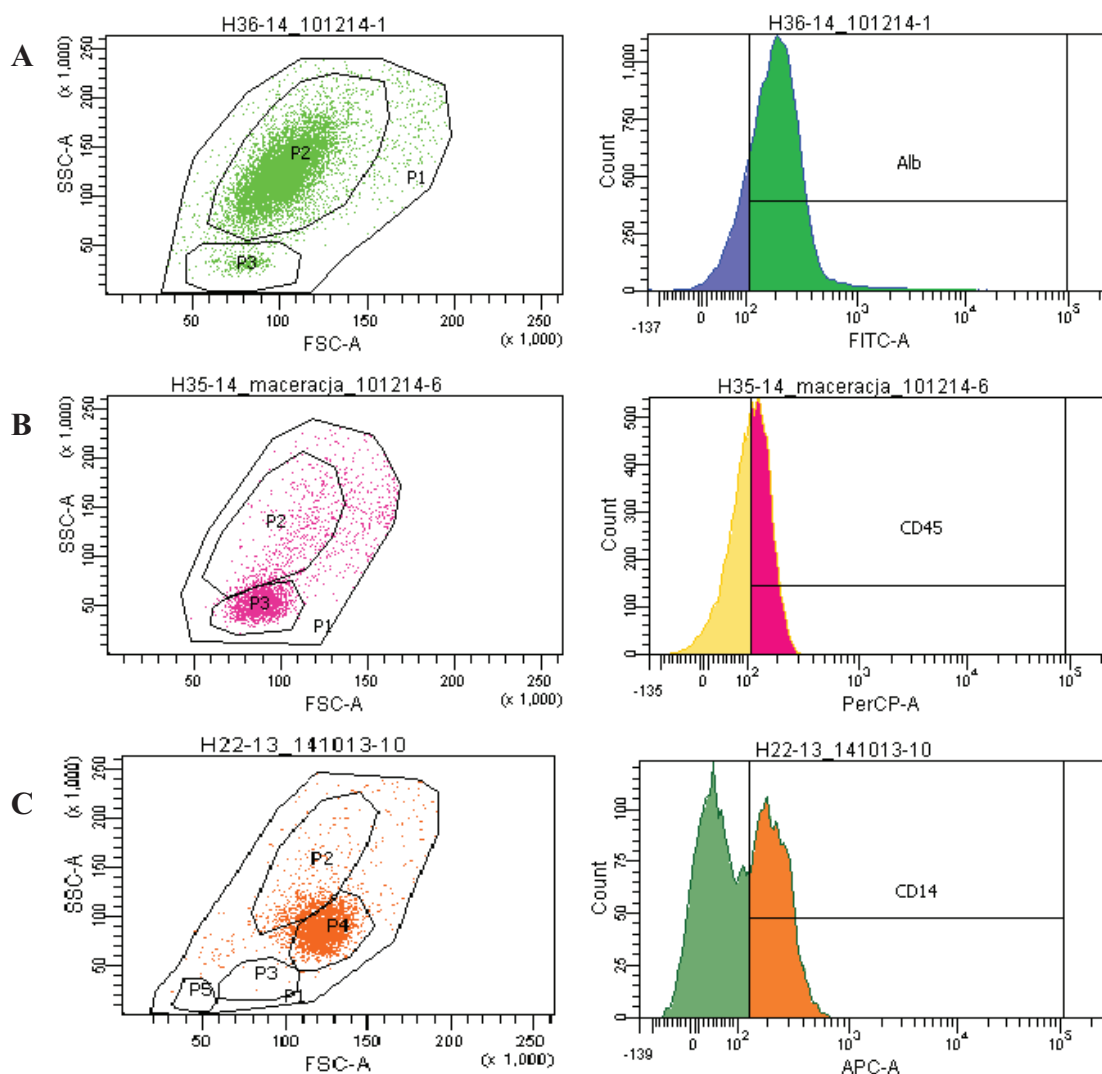
#### 5.2.1.1 Populacje komórek występujące w izolacie z fragmentów ludzkich resekowanych wątrób

Na podstawie analizy cytometrycznej komórek izolowanych z ludzkich wątrób w świetle przechodzącym i rozproszonym można w obrębie populacji P1 (komórki analizowane, bez fragmentów komórkowych powstałych w trakcie przygotowania preparatów) wyróżnić kilka populacji (P2-P5). Nie wszystkie populacje pojawiają się w każdym analizowanym fragmencie (Rysunek 5.1). W każdym z izolowanych fragmentów występowały populacje P2 i P3, a populacje P4 i P5 pojawiały się w mniej niż połowie przypadków.



Rysunek 5.1. Na podstawie wykresów typu dot plot (lewy panel) i wykresów poziomicowych (prawy panel) wyodrębniono 4 populacje komórek występujących w izolacie z wątroby (P2-P5). A – H22-13 (kobieta, 22 lata), C – H26-14 (kobieta, 62 lata), B – H16-13 (kobieta, 67 lat), D – H27-14 (mężczyzna, 69 lat).

Populacje P2-P5, poza inną wielkością i ziarnistością komórek, różnią się występowaniem charakterystycznego markera. Komórki populacji P2 znakowały się przeciwciałami skierowanymi przeciwko albuminie i  $\alpha$ -1-antytrypsynie, komórki populacji P3 – CD45, komórki populacji P5 – CD14. Dotychczas nie wykryliśmy markera charakterystycznego dla populacji P4 (Rysunek 5.2). Na tej podstawie stwierdzono, że komórki populacji P2 są hepatocytami, a komórki nieparenchymalne znajdują się w populacjach P3-P5.



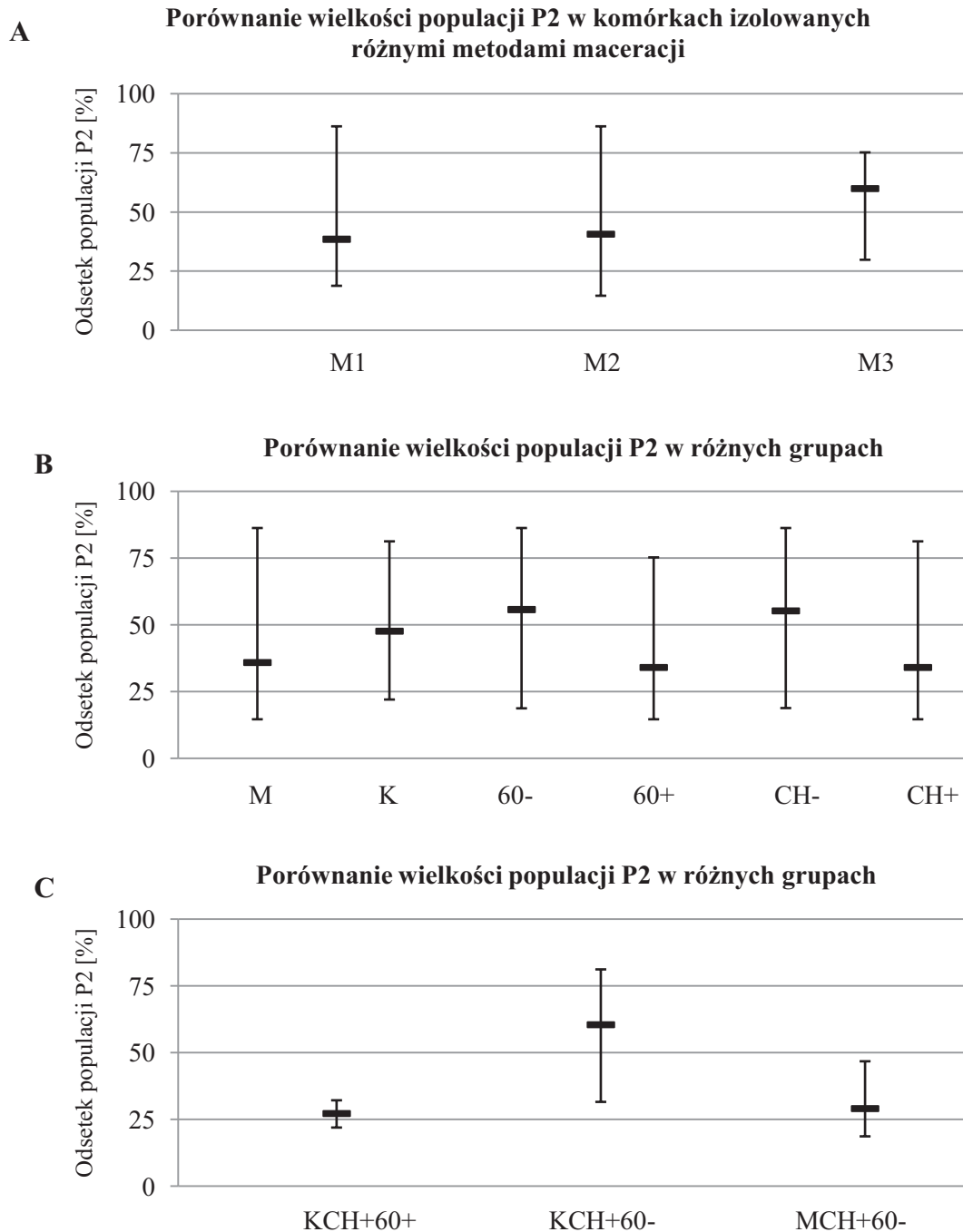
Rysunek 5.2. Populacje komórek w izolacie wątrobowym wykazują ekspresję charakterystycznych dla nich markerów, co można zaobserwować na wykresach typu dot plot (lewy panel) i histogramach (prawy panel). A – albumina-FITC w populacji P2, B – CD45-PerCP w populacji P3, C – CD14-APC w populacji P5.

Odsetek komórek, jakie znajdowały się w poszczególnych populacjach był zmienny i wynosił:

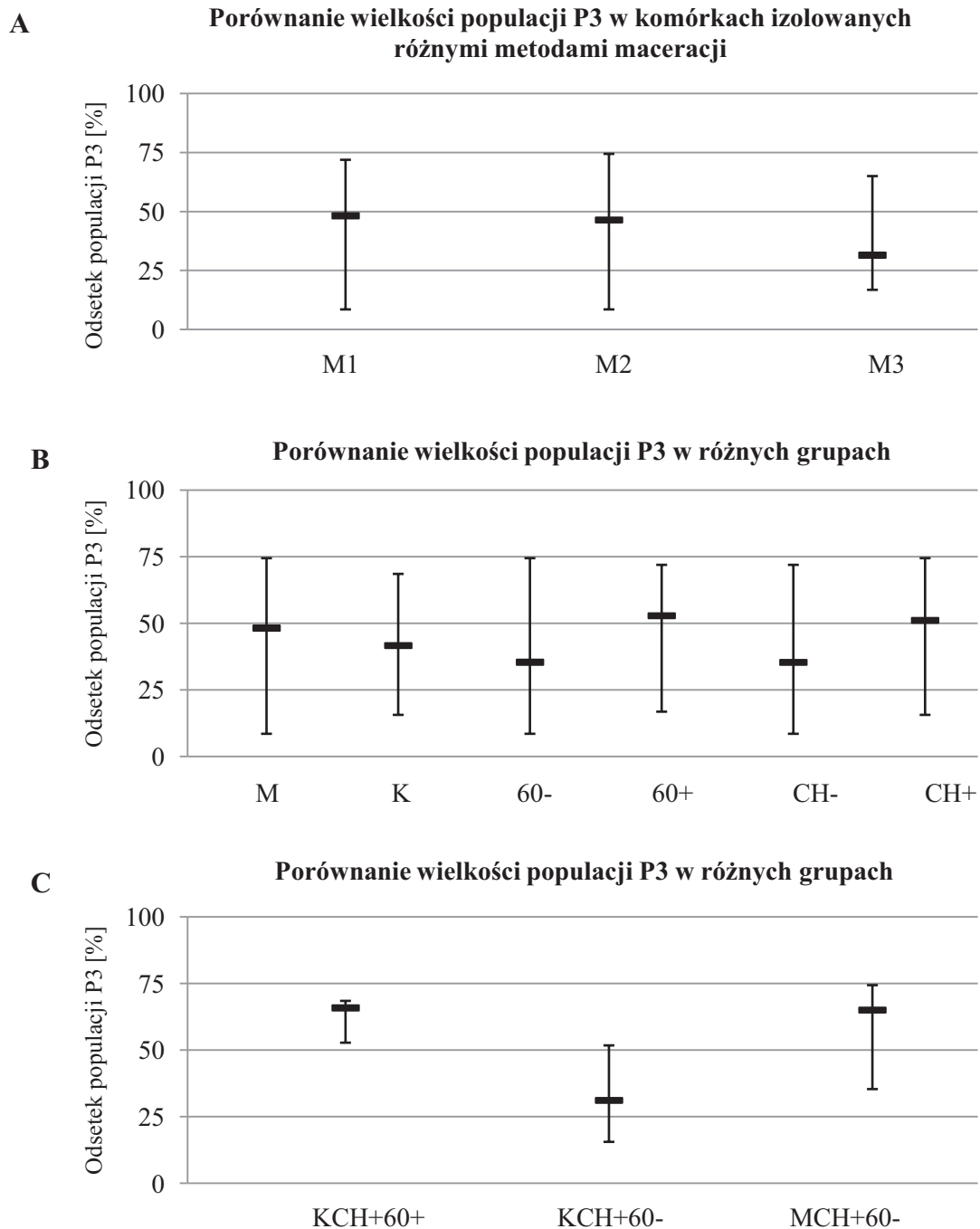
- 41,5-93,4% (mediana: 76,9%) dla populacji P1,
- 14,6-86,2% (mediana: 43,7%) dla populacji P2,
- 8,5-74,4% (mediana: 44,0%) dla populacji P3,
- 0,6-4,2% (mediana: 2,1%) dla populacji P4 (jeśli występowała),
- 5,5-11,0% (mediana: 6,1%) dla populacji P5 (jeśli występowała).

Nie zaobserwowano różnic w wielkości populacji P1 (wszystkie komórki) pomiędzy opisanymi metodami maceracji (M1 vs M2  $p=0,064$ , M1 vs M3  $p=1,000$ , M2 vs M3  $p=0,830$ ). Nie zaobserwowano również takich różnic pomiędzy fragmentami pochodzącymi od kobiet i mężczyzn ( $p=0,860$ ), od osób poniżej i powyżej 60 r.ż. ( $p=0,988$ ) oraz od osób niepoddanych i po chemioterapii ( $p=0,176$ ).

Odsetek populacji P2 w wyżej opisanych grupach przedstawiono na Rysunku 5.3. Nie zaobserwowano różnic w wielkości populacji P2 pomiędzy opisanymi metodami maceracji (M1 vs M2  $p=0,978$ , M1 vs M3  $p=0,415$ , M2 vs M3  $p=0,353$ ), jak również pomiędzy fragmentami pochodzącymi od kobiet i mężczyzn ( $p=0,445$ ), od osób poniżej i powyżej 60 r.ż. ( $p=0,189$ ) oraz od osób niepoddanych i po chemioterapii ( $p=0,142$ ). Zaobserwowano jednak różnicę w wielkości populacji P2 pomiędzy fragmentami pochodzącymi od kobiet po chemioterapii przed i po 60 r.ż., odpowiednio 60,4% i 27,2% ( $p=0,011$ ). Grupa kobiet niepoddanych chemioterapii jest zbyt mało liczna, aby móc ją właściwie analizować ( $n=4$ , w tym 2 przed 60 r.ż. i 2 po 60 r.ż.). Zaobserwowano także różnicę w wielkości populacji P2 pomiędzy fragmentami pochodzącymi od kobiet i mężczyzn po chemioterapii przed 60 r.ż. i wynosiła ona odpowiednio 60,4% i 29,0% ( $p=0,011$ ).



Rysunek 5.3. Różnice w wielkości populacji P2 w izolacie wątrobowym w różnych grupach. A – porównanie odsetka komórek w populacji P2 po izolacji trzema modyfikacjami maceracji (M1, M2 i M3), B – porównanie odsetka komórek w populacji P2 z fragmentów pochodzących od kobiet (K) i mężczyzn (M), osób przed (60-) i po 60 (60+) r.ż. oraz niepoddanych (CH-) i po chemioterapii (CH+), C – porównanie odsetka komórek w populacji P2 z fragmentów pochodzących od kobiet po chemioterapii przed i po 60 r.ż. (odpowiednio KCH+60- i KCH+60+) oraz z fragmentów pochodzących od kobiet i mężczyzn po chemioterapii przed 60 r.ż. (odpowiednio KCH+60- i MCH+60-). Wyniki przedstawiono w formie mediany i zakresu danych (wartość minimalna i maksymalna).



Rysunek 5.4. Różnice w wielkości populacji P3 w różnych grupach. A – porównanie odsetka komórek w populacji P3 po izolacji trzema modyfikacjami maceracji (M1, M2 i M3), B – porównanie odsetka komórek w populacji P3 z fragmentów pochodzących od kobiet (K) i mężczyzn (M), osób przed (60-) i po 60 (60+) r.ż. oraz niepoddanych (CH-) i po chemioterapii (CH+), C – porównanie odsetka komórek w populacji P3 z fragmentów pochodzących od kobiet po chemioterapii przed i po 60 r.ż. (odpowiednio KCH+60- i KCH+60+) oraz z fragmentów pochodzących od kobiet i mężczyzn po chemioterapii przed 60 r.ż. (odpowiednio KCH+60- i MCH+60-). Wyniki przedstawiono w formie mediany i zakresu danych (wartość minimalna i maksymalna).



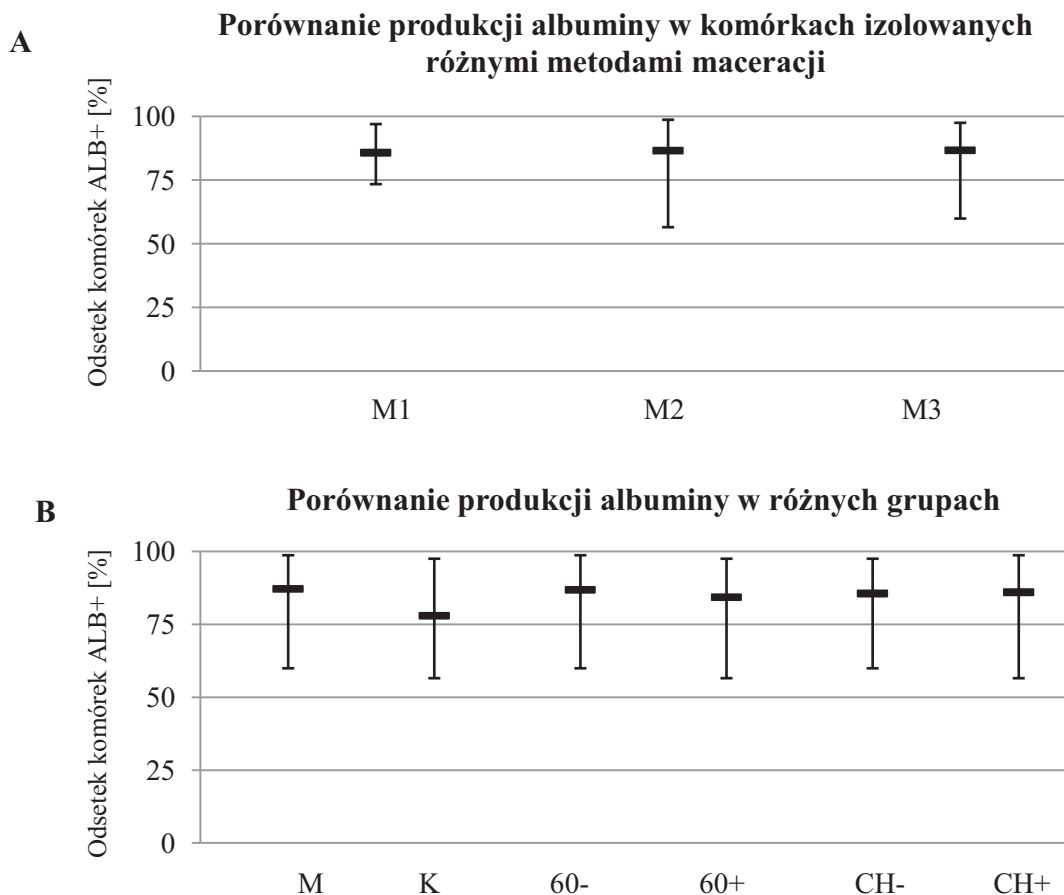
Odsetek populacji P3 w wyżej opisanych grupach przedstawiono na Rysunku 5.4. Nie zaobserwowano różnic w wielkości populacji P3 pomiędzy opisanymi metodami maceracji (M1 vs M2  $p=0,846$ , M1 vs M3  $p=0,634$ , M2 vs M3  $p=0,397$ ), jak również pomiędzy fragmentami pochodzącymi od kobiet i mężczyzn ( $p=0,589$ ), od osób poniżej i powyżej 60 r.ż. ( $p=0,209$ ) oraz od osób niepoddanych i po chemioterapii ( $p=0,340$ ). Zaobserwowano jednak różnice w wielkości populacji P3 pomiędzy fragmentami pochodzącymi od kobiet po chemioterapii przed i po 60 r.ż., odpowiednio 31,1% i 65,8% ( $p=0,022$ ). Jak już wspomniano wyżej, grupa kobiet niepoddanych chemioterapią jest zbyt mało liczna, aby móc ją właściwie analizować ( $n=4$ , w tym 2 przed 60 r.ż. i 2 po 60 r.ż.). Ponadto zaobserwowano różnice w wielkości populacji P3 pomiędzy fragmentami pochodzącymi od kobiet i mężczyzn po chemioterapii przed 60 r.ż., odpowiednio 31,1% i 65,0% ( $p=0,017$ ).

### 5.2.1.2 Albumina w komórkach izolatu z fragmentów ludzkich resekowanych wątrób

Najbardziej interesującą z naszego punktu widzenia grupą komórek, znajdującą się w izolacie, są hepatocyty, czyli komórki populacji P2. Jednym z podstawowych markerów do ich oceny jest albumina (ALB). Odsetek komórek ALB-pozytywnych, który był możliwy do zmierzenia przy zastosowaniu opisanego w Rozdziale 3.4 przeciwciała, wyniósł 85,3% (56,5-98,7%).

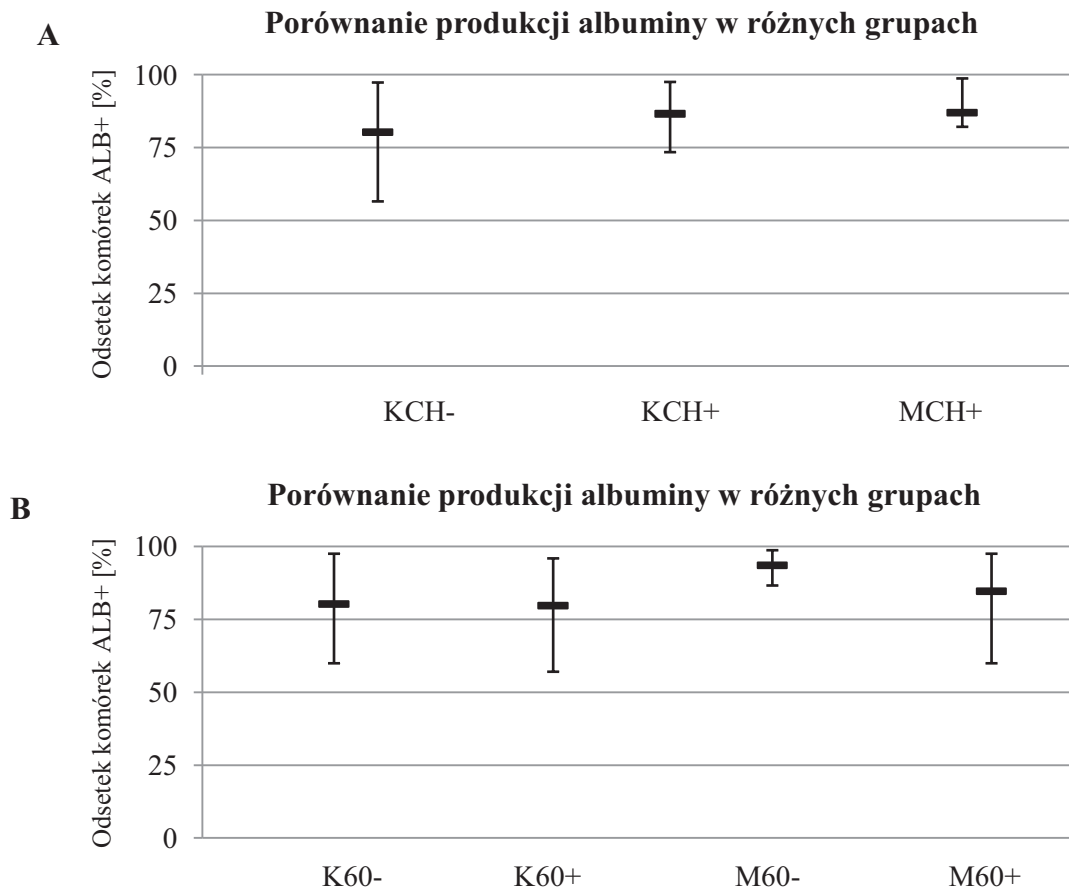
Nie zaobserwowano różnic w produkcji albuminy pomiędzy opisanymi metodami maceracji (M1 vs M2  $p=0,466$ , M1 vs M3  $p=1,000$ , M2 vs M3  $p=0,539$ ), jak również pomiędzy fragmentami pochodzącymi od osób poniżej i powyżej 60 r.ż. ( $p=0,335$ ) oraz od osób niepoddanych i po chemioterapii ( $p=0,794$ ). Odsetek komórek ALB-pozytywnych w populacji P2 w wyżej opisanych grupach przedstawiono na Rysunku 5.5.

Nie zaobserwowano różnic w produkcji albuminy pomiędzy fragmentami pochodzącymi od kobiet i mężczyzn ( $p=0,150$ ), jednak w grupach kobiet i mężczyzn po chemioterapii takie różnice są widoczne (odpowiednio 80,3% i 87,0%,  $p=0,033$ ). Również przy wyłączeniu z analizy próbek pochodzących od dawców ( $n=5$ , tylko mężczyźni), różnice pomiędzy fragmentami pochodzącymi od kobiet i mężczyzn stają się widoczne (odpowiednio 80,3% i 87,0%,  $p=0,042$ ).



Rysunek 5.5. Różnice w produkcji albuminy w różnych grupach. A – porównanie odsetka komórek ALB+ po izolacji trzema modyfikacjami maceracji (M1, M2 i M3), B – porównanie odsetka komórek ALB+ w izolatach z fragmentów pochodzących od kobiet (K) i mężczyzn (M), osób przed (60-) i po 60 (60+) r.ż. oraz niepoddanych (CH-) i po chemioterapii (CH+).

W grupach kobiet i mężczyzn niepoddanych chemioterapii nie zaobserwowano różnic w produkcji albuminy ( $p=0,316$ ). Porównanie odsetka komórek ALB-pozytywnych w grupach mężczyzn przed i po 60 r.ż. wykazało istotną różnicę (odpowiednio 93,6% i 84,7%,  $p=0,046$ ), czego nie zaobserwowano w grupie kobiet ( $p=0,725$ ). Odsetek komórek w populacji P2 w wyżej opisanych grupach przedstawiono na Rysunku 5.6.



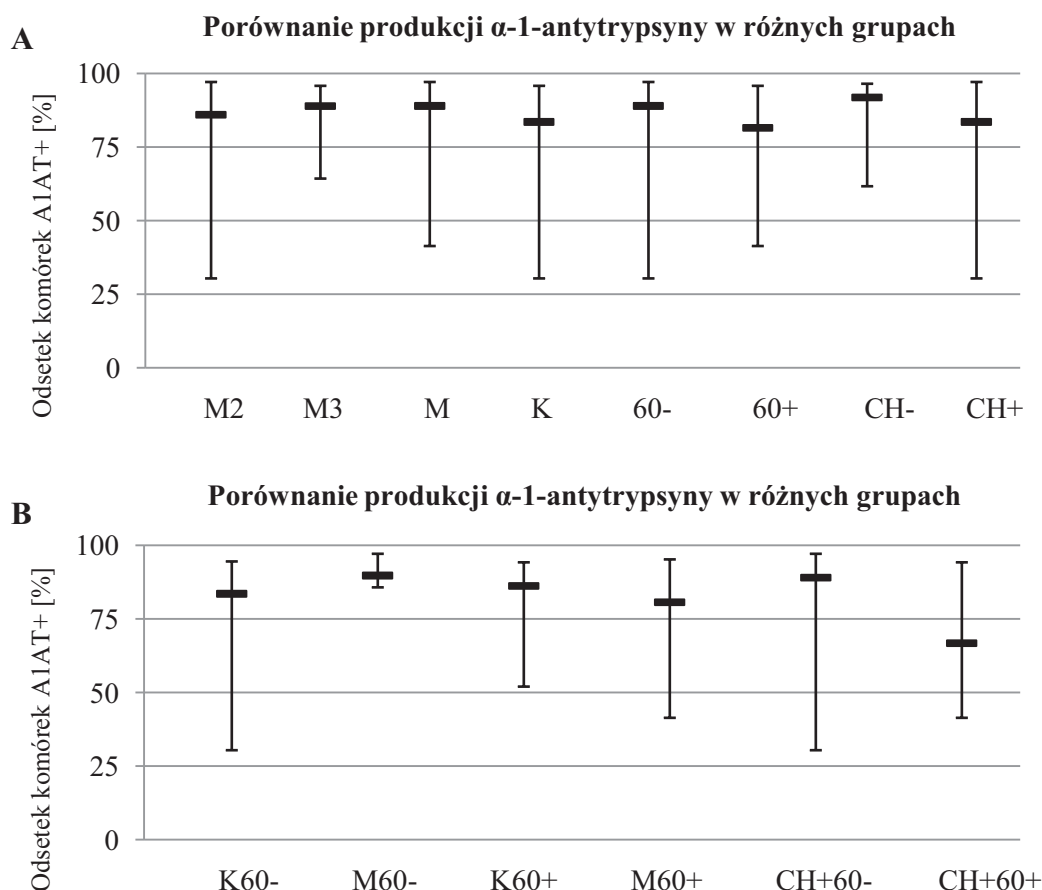
Rysunek 5.6. Różnice w produkcji albuminy w różnych grupach A – porównanie odsetka komórek ALB+ z fragmentów pochodzących od kobiet niepoddanych i po chemioterapii (odpowiednio KCH- i KCH+) oraz mężczyzn po chemioterapii (MCH+), B – porównanie odsetka komórek ALB+ z fragmentów pochodzących od kobiet przed i po 60 r.ż. (odpowiednio K60- i K60+) oraz mężczyzn przed i po 60 r.ż. (odpowiednio M60- i M60+). Wyniki przedstawiono w formie mediany i zakresu danych (wartość minimalna i maksymalna).

### 5.2.1.3 $\alpha$ -1-antytrypsyna w komórkach izolatu z fragmentów ludzkich resekowanych wątrób

Drugim charakterystycznym markerem do oceny hepatocytów jest  $\alpha$ -1-antytrypsyna (A1AT). Odsetek komórek A1AT-pozytywnych (A1AT+), który był możliwy do zmierzenia przy zastosowaniu opisanego w Rozdziale 3.4 przeciwciała, wyniósł 88,9% (30,4-97,1%).

Nie zaobserwowano różnic w produkcji A1AT pomiędzy dwoma z opisanych metod maceracji (M2 vs M3  $p=0,984$ ), jak również pomiędzy fragmentami pochodzącymi od kobiet i mężczyzn ( $p=0,567$ ), osób poniżej i powyżej 60 r.ż. ( $p=0,286$ ) oraz od osób niepoddanych i po chemioterapii ( $p=0,099$ ). Analiza A1AT była możliwa jedynie dla preparatów izolowanych metodą maceracji M2 i M3, stąd brak porównania z metodą M1.

Zaobserwowano różnicę w produkcji A1AT pomiędzy fragmentami pochodzącymi od osób poddanych chemioterapii przed i po 60 r.ż. (odpowiednio 89,0% i 66,8%,  $p=0,046$ ), co nie jest widoczne w grupach osób niepoddanych chemioterapii przed i po 60 r.ż. ( $p=1,000$ ). Odsetek komórek A1AT-pozytywnych w populacji P2 w wyżej opisanych grupach przedstawiono na Rysunku 5.7.

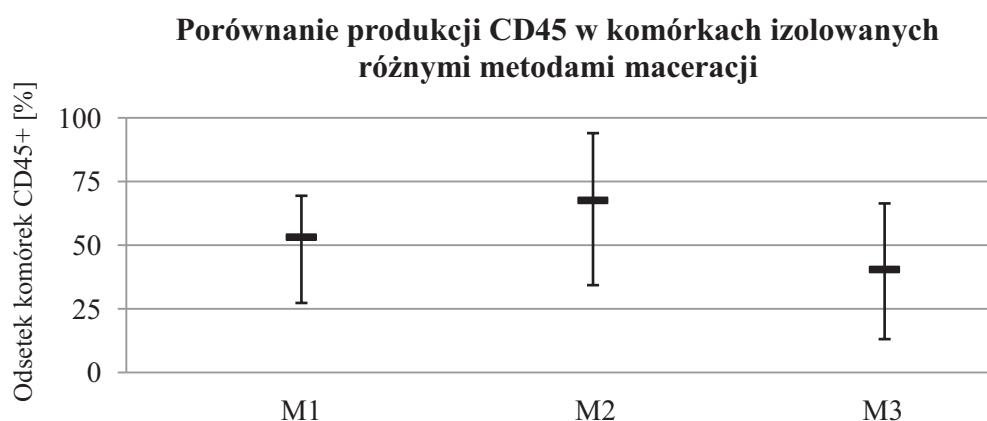


Rysunek 5.7. Różnice w produkcji  $\alpha$ -1-antytrypsyny w różnych grupach. A – porównanie odsetka komórek A1AT+ po izolacji metodą maceracji (M2 i M3), w izolatach od kobiet (K) i mężczyzn (M), osób przed (60-) i po (60+) 60 r.ż. oraz niepoddanych (CH-) i po chemioterapii (CH+), B – porównanie odsetka komórek A1AT+ z fragmentów pochodzących od kobiet i mężczyzn przed 60 r.ż. (odpowiednio K60- i M60-), kobiet i mężczyzn po 60 r.ż. (odpowiednio K60+ i M60+) oraz osób po chemioterapii przed i po 60 r.ż. (odpowiednio CH+60- i CH+60+). Wyniki przedstawiono w formie mediany i zakresu danych (wartość minimalna i maksymalna).

#### 5.2.1.4 CD45 w komórkach izolatu z fragmentów ludzkich resekowanych wątroób

Jednym z markerów charakteryzujących komórki nieparenchymalne wątroby w naszym eksperymencie jest CD45. Odsetek komórek CD45-pozytywnych (CD45+), który był możliwy do zmierzenia przy zastosowaniu opisanego w Rozdziale 3.4 przeciwciała, wyniósł 57,7% (13,1-94,0%).

Nie zaobserwowano różnic w produkcji CD45 pomiędzy metodami maceracji M1 i M2 ( $p=0,091$ ) oraz M1 i M3 ( $p=0,955$ ), a jedynie między metodami M2 i M3 ( $p=0,0002$ ). Może to wynikać ze skrócenia czasu izolacji, co pozwoliło na zmniejszenie udziału komórek nieparenchymalnych w otrzymywanych preparatach. Odsetek komórek CD45-pozytywnych w populacji P3 w wyżej opisanych grupach przedstawiono na Rysunku 5.8. Również odsetek komórek CD45+ nie różnił się istotnie pomiędzy fragmentami pochodzącymi od kobiet i mężczyzn ( $p=0,976$ ), osób poniżej i powyżej 60 r.ż. ( $p=0,323$ ) oraz od osób niepoddanych i po chemioterapii ( $p=0,316$ ).



Rysunek 5.8. Różnice w produkcji CD45 w komórkach po izolacji trzema modyfikacjami maceracji (M1, M2 i M3). Wyniki przedstawiono w formie mediany i zakresu danych (wartość minimalna i maksymalna).

### 5.2.1.5 CD14 w izolacie z fragmentów ludzkich resekowanych wątroób

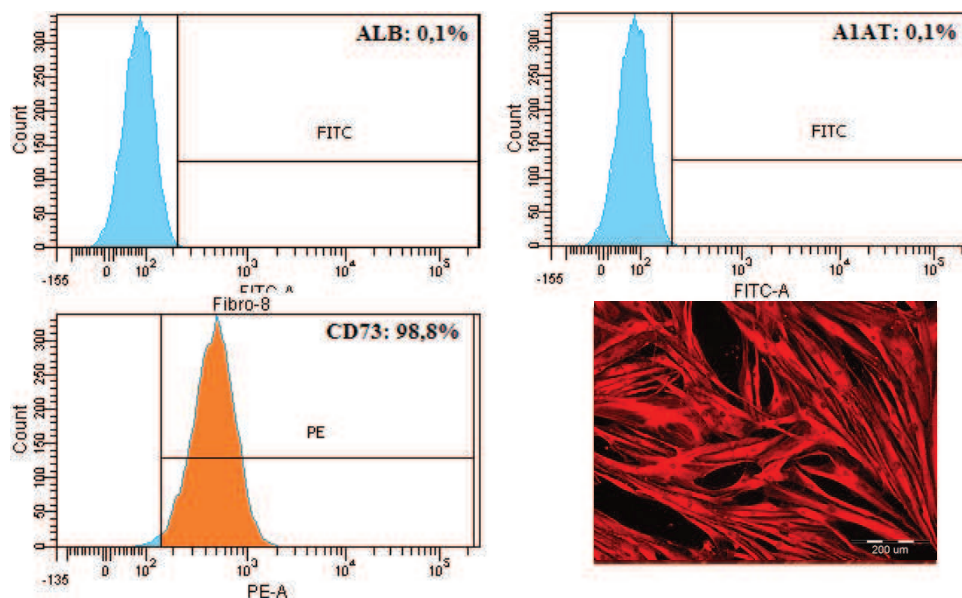
Kolejnym markerem charakteryzującym komórki nieparenchymalne wątroby jest CD14. Odsetek komórek CD14-pozytywnych (CD14+), który był możliwy do zmierzenia przy zastosowaniu opisanego w Rozdziale 3.4 przeciwciała, wyniósł 4,2% (1,6-14,5%). Dotyczy to pomiaru w populacji P1 ze względu na to, że komórki CD14+ występowały czasami na terenie populacji P2 lub P3 i niemożliwe było rozdzielenie ich.

Nie zaobserwowano różnic w produkcji CD14 pomiędzy opisanymi metodami maceracji (M1 vs M2  $p=0,396$ , M1 vs M3  $p=0,247$ , M2 vs M3  $p=0,296$ ), jak również pomiędzy fragmentami pochodzącymi od kobiet i mężczyzn ( $p=0,361$ ), osób poniżej i powyżej 60 r.ż. ( $p=0,810$ ) oraz od osób niepoddanych i po chemioterapii ( $p=0,880$ ).

### 5.2.2 Badanie markerów izolowanych ludzkich fibroblastów

Na podstawie analizy cytometrycznej i wyników znakowania immunofluorescencyjnego izolowanych ludzkich fibroblastów w świetle przechodzącym

i rozproszonym można stwierdzić, że są one większe od innych typów badanych komórek. Charakteryzują się obecnością markera powierzchniowego CD73 oraz nie wykazują ekspresji białek typowych dla komórek wątrobowych – albuminy,  $\alpha$ -1-antytrypsyny, CD45, CD14 (Rysunek. 5.9).



Rysunek 5.9. Charakterystyka izolowanych ludzkich fibroblastów (analiza cytometryczna i znakowanie immunofluorescencyjne). Komórki te charakteryzują się produkcją białka CD73 i brakiem ekspresji białek typowych dla hepatocytów – albuminy i  $\alpha$ -1-antytrypsyny. Odsetek komórek pozytywnych jest średnią z przynajmniej 3 niezależnych eksperymentów. Zdjęcie z mikroskopu fluorescencyjnego – potwierdzenie obecności markera CD73 w HSF przy użyciu przeciwciała anti-CD73-PE (skala 200  $\mu$ m).

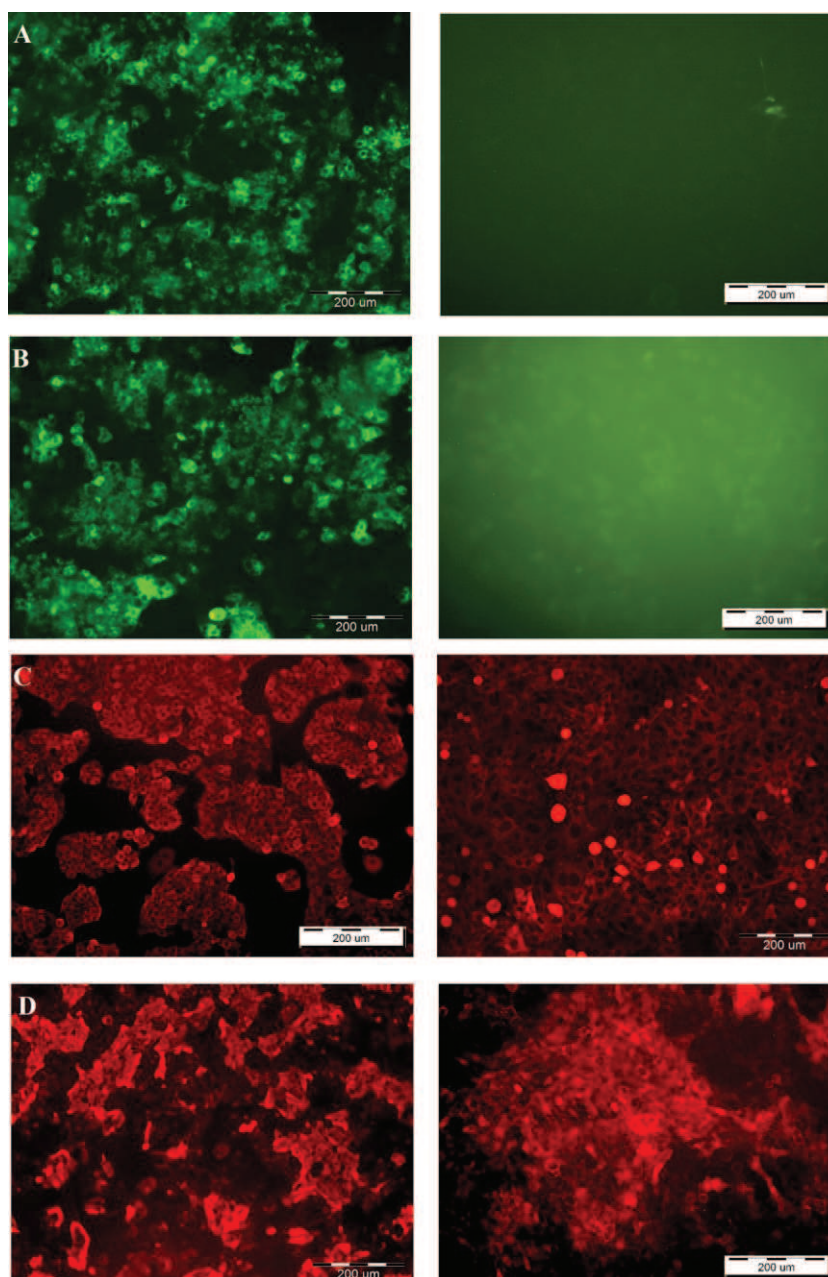
### 5.2.3 Badanie markerów komórek linii C3A i HOS

Analiza cytometryczna komórek linii C3A wskazała markery charakterystyczne dla tych komórek – albuminę,  $\alpha$ -1-antytrypsynę i CD54. Podobnie w przypadku komórek linii HOS, stosowanych jako kontrola w oznaczeniach markerów innych linii, wykryto obecność białek CK18 i CD54 oraz nie wykryto białek typowych dla komórek wątrobowych (ALB i A1AT). Szczegółowe wyniki przedstawiono w Tabeli 5.4 oraz na Rysunku 5.10.



Tabela 5.4. Charakterystyka komórek linii C3A i HOS na podstawie analizy cytometrycznej. Odsetek komórek pozytywnych jest średnią z przynajmniej 3 niezależnych eksperymentów.

odsetek komórek pozytywnych [%]	C3A	HOS
ALB	82,0 ± 1,3	2,5 ± 0,3
A1AT	92,4 ± 2,7	3,1 ± 0,5
CK18	26,0 ± 1,2	87,1 ± 6,3
CD54	92,8 ± 7,5	43,1 ± 8,2



Rysunek 5.10 Markery charakterystyczne dla komórek linii C3A (lewy panel) i HOS (prawy panel). A – albumina (FITC), B –  $\alpha$ -1-antytrypsyna (FITC), C – CK18 (PE), D – CD54 (PE). Skala 200  $\mu$ m.

### 5.3 Modyfikacje genetyczne izolowanych ludzkich fibroblastów – białka fluorescencyjne

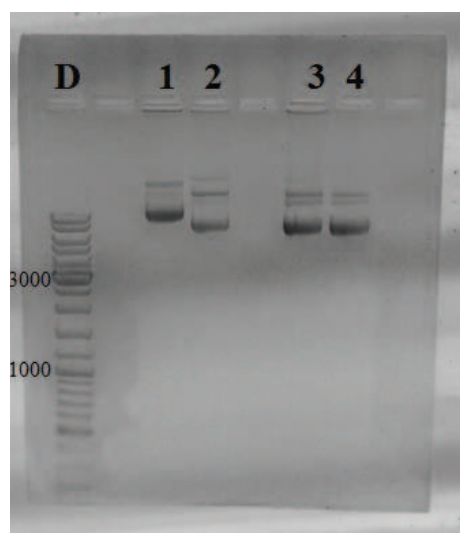
Wprowadzenie do izolowanych ludzkich fibroblastów genów kodujących białka fluorescencyjne pozwoliło na uzyskanie narzędzia do łatwiejszej oceny oddziaływań heterotypowych w kokulturze.

#### 5.3.1 Wprowadzenie komórek *E. coli* szczep STBL3 w stan kompetencji

Do przygotowania komórek kompetentnych wybrano hodowlę o  $OD_{600} = 0,447$ , co odpowiada fazie wzrostu logarytmicznego. Wydajność komórek szczepu STBL3 była testowana na szalach z LB-agar z dodatkiem ampicyliny po transformacji plazmidem niosącym oporność na ten antybiotyk i wynosiła  $6,4 \times 10^6$  (tzn.  $6,4 \times 10^6$  komórek ulega transformacji 1  $\mu\text{g}$  plazmidowego DNA).

#### 5.3.2 Wprowadzenie plazmidów do komórek kompetentnych *E. coli* STBL3

Plazmidy pLTR-G, pCD/NL-BH\* $\Delta\Delta\Delta$ , pNL-EGFP/CMV-WPRE/ $\Delta$ U3 i pNL-DsRed2/CMV-WPRE/ $\Delta$ U3 zostały wprowadzone i namnożone w bakteriach szczepu STBL3, a następnie wyizolowane przy użyciu kitu PureLink<sup>TM</sup> HiPure Plasmid Maxiprep. Uzyskano preparaty o wysokiej czystości (o stosunku A260/A280 wyższym niż 1,9) i odpowiednim stężeniu (odpowiednio 1,18  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0,53  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 4,90  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  i 4,65  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), a rozdział elektroforetyczny potwierdził jakość preparatu oraz jego odpowiednią wielkość (Rysunek 5.11).



Rysunek 5.11. Kontrolny rozdział elektroforetyczny – sprawdzenie jakości preparatu po izolacji. D – marker DNA GeneRuler, 1 – pLTR-G, 2 – pCD/NL-BH\* $\Delta\Delta\Delta$ , 3 – pNL-EGFP/CMV-WPRE/ $\Delta$ U3, 4 – pNL-DsRed2/CMV-WPRE/ $\Delta$ U3. W każdej z kieszonek znajduje się ok. 500 ng DNA.

### 5.3.3 Optymalizacja metody PEI – transfekcja komórek HEK293T

Optymalizacja transfekcji prowadzona była przez zmianę wartości N/P i ilości DNA. Zastosowano kilka podejść, w których stopniowo zawężano właściwe wartości N/P i stężenie DNA (opisane poniżej jako Podejście I – IV, x – wynik negatywny, ✓ – wynik pozytywny). Na Rysunku 5.12 znajdują się zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiające wynik transfekcji zgodnie z Podejściem II, na podstawie których planowano kolejne warianty doświadczenia. Inną metodą umożliwiającą ocenę poprawności doboru proporcji N/P i ilości DNA jest cytometria przepływowa, a przykładowy wynik analizy znajduje się w Tabeli 5.5 (Podejście III).

Podejście I:

Zmienna	Wynik	Zmienna	Wynik	Zmienna	Wynik
N/P = 12 DNA = 0,8 µg	x	N/P = 12 DNA = 1,0 µg	x	N/P = 12 DNA = 1,6 µg	x
N/P = 15 DNA = 0,8 µg	x	N/P = 15 DNA = 1,0 µg	✓	N/P = 15 DNA = 1,6 µg	✓
N/P = 18 DNA = 0,8 µg	x	N/P = 18 DNA = 1,0 µg	✓	N/P = 18 DNA = 1,6 µg	✓

Podejście II:

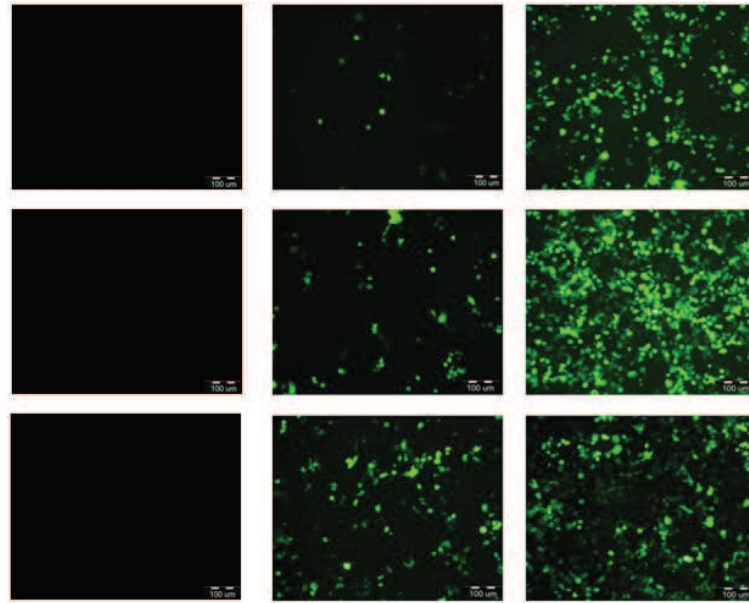
Zmienna	Wynik	Zmienna	Wynik	Zmienna	Wynik
N/P = 15 DNA = 1,0 µg	x	N/P = 15 DNA = 2,0 µg	✓	N/P = 15 DNA = 3,0 µg	✓
N/P = 25 DNA = 1,0 µg	x	N/P = 25 DNA = 2,0 µg	✓	N/P = 25 DNA = 3,0 µg	✓
N/P = 40 DNA = 1,0 µg	x	N/P = 40 DNA = 2,0 µg	✓	N/P = 40 DNA = 3,0 µg	✓

Podejście III:

Zmienna	Wynik	Zmienna	Wynik	Zmienna	Wynik
N/P = 25 DNA = 3,0 µg	x	N/P = 25 DNA = 4,0 µg	x	N/P = 25 DNA = 5,0 µg	✓
N/P = 30 DNA = 3,0 µg	x	N/P = 30 DNA = 4,0 µg	x	N/P = 30 DNA = 5,0 µg	x
N/P = 35 DNA = 3,0 µg	x	N/P = 35 DNA = 4,0 µg	x	N/P = 35 DNA = 5,0 µg	x

Podejście IV:

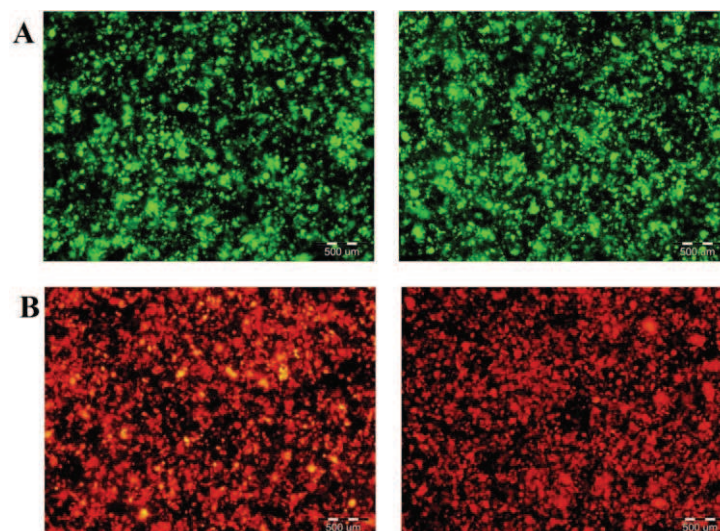
Zmienna	Wynik	Zmienna	Wynik	Zmienna	Wynik
N/P = 25 DNA = 5,0 µg	✓	N/P = 25 DNA = 6,0 µg	✓	N/P = 25 DNA = 7,0 µg	✓



Rysunek 5.12. Zdjęcia komórek HEK293T po transfekcji plazmidem wektorowym zawierającym gen *egfp*. Układ zdjęć odpowiada schematowi przedstawionemu powyżej (Podejście II). Skala 100 µm.

Tabela 5.5. Odsetek komórek produkujących białko EGFP (zielone pola) lub DsRed2 (czerwone pola) po transfekcji komórek HEK293T plazmidami wektorowymi (podejście III).

DNA \ N/P	25		30		35	
3,0 µg	x		x		75%	43%
4,0 µg	46%	62%	57%	x	45%	65%
5,0 µg	65%	79%	62%	65%	22%	69%

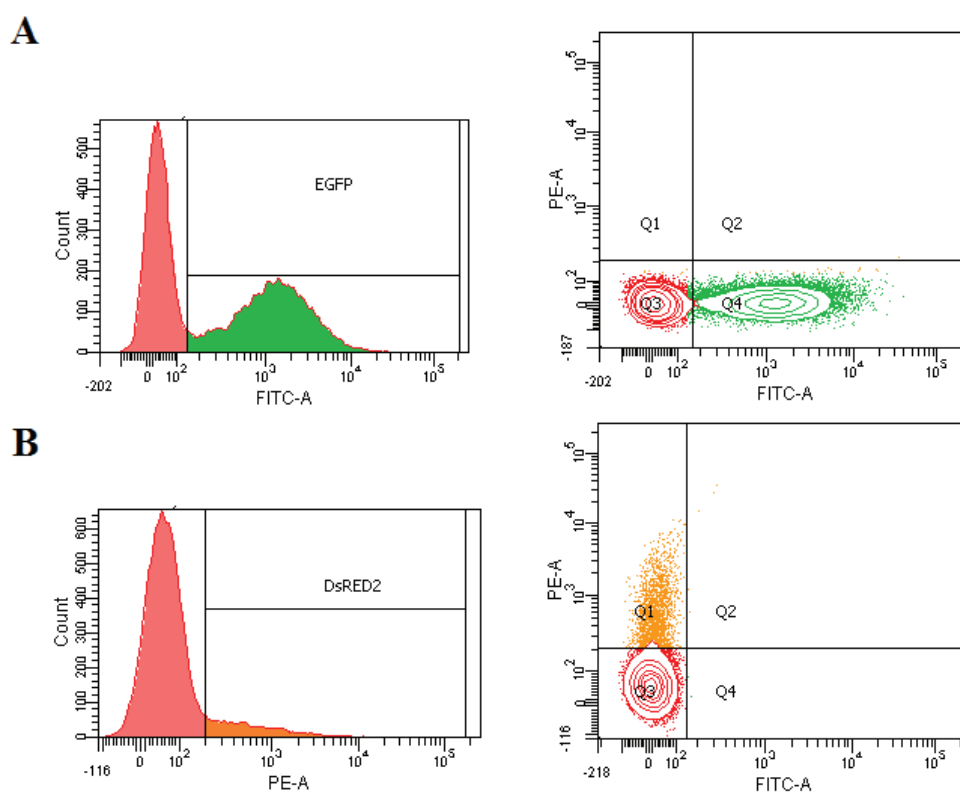


Rysunek 5.13. Zdjęcia komórek HEK293T po transfekcji plazmidem wektorowym zawierającym gen kodujący białka EGFP (A) i DsRed2 (B). Lewy panel: komórki po transfekcji z użyciem 5 µg DNA, prawy panel: komórki po transfekcji z użyciem 6 µg DNA. Skala 500 µm.

Do produkcji wektorów LV zawierających geny białek fluorescencyjnych (EGFP i DsRed2) wybrana została metoda wykorzystująca  $N/P = 25$  i ilość DNA = 5  $\mu\text{g}$ . Zdecydowano się na mniejszą ilość DNA ze względu na to, że zwiększanie jej nie wiązało się ze wzrostem wydajności transfekcji. Zdjęcie komórek HEK po transfekcji (produkujących białko EGFP lub DsRed2) zostało przedstawione na Rysunku 5.13.

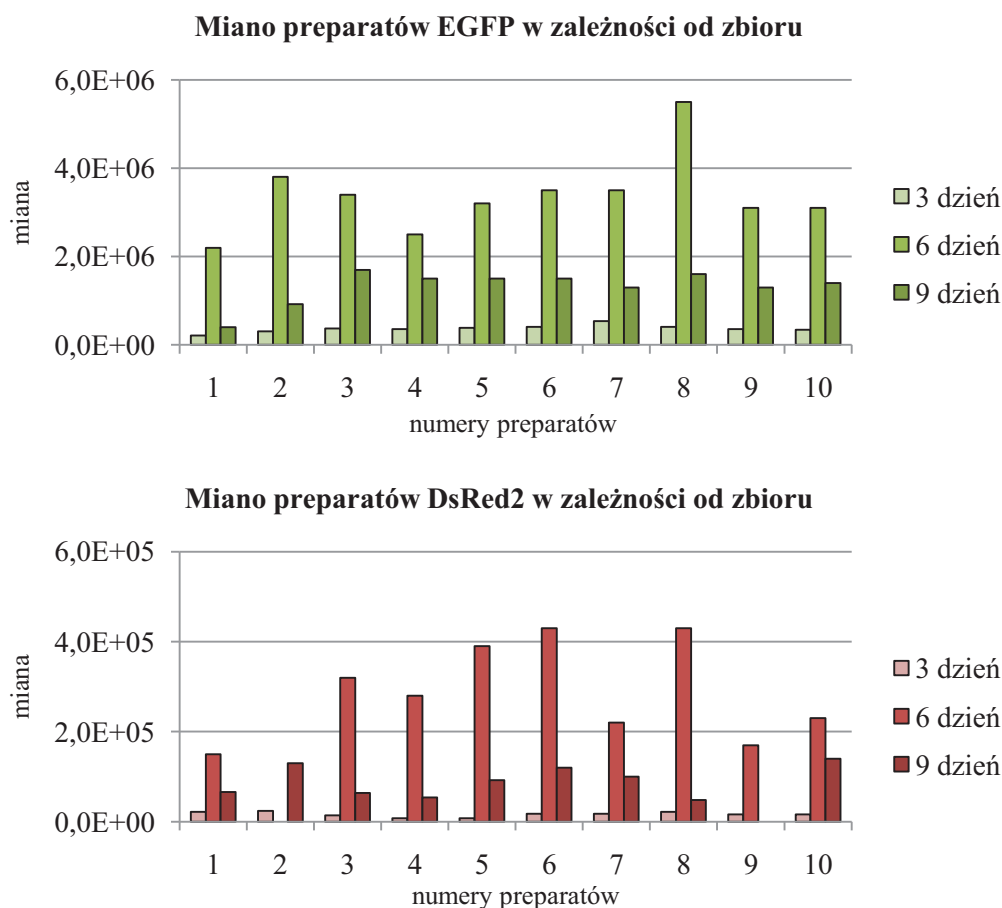
### 5.3.4 Określenie miana preparatów wirusowych

Miana preparatów wirusowych określano na podstawie odsetka komórek pozytywnych po transdukcji (zgodnie ze wzorem podanym w Rozdziale 4.4.5.2). Otrzymane miana dla preparatów zawierających *egfp* wynosiły  $1,4-5,5 \times 10^6$ , a dla preparatów zawierających *dsred2*  $4,0-8,5 \times 10^5$ . Analizę populacji prowadzono przy użyciu cytometrii przepływowej (Rysunek 5.14).



Rysunek 5.14. Przykładowe histogramy (lewy panel) i wykresy poziomicowe (prawy panel) dla komórek HOS po transdukcji preparatami zawierającymi gen kodujący białka EGFP (A) i DsRed2 (B).





Rysunek 5.15 Zmiana wartości miana preparatów wirusowych w zależności od terminu ich zbierania. Górny panel: EGFP, dolny panel: DsRed2. Poniżej podano wartości  $p$ .

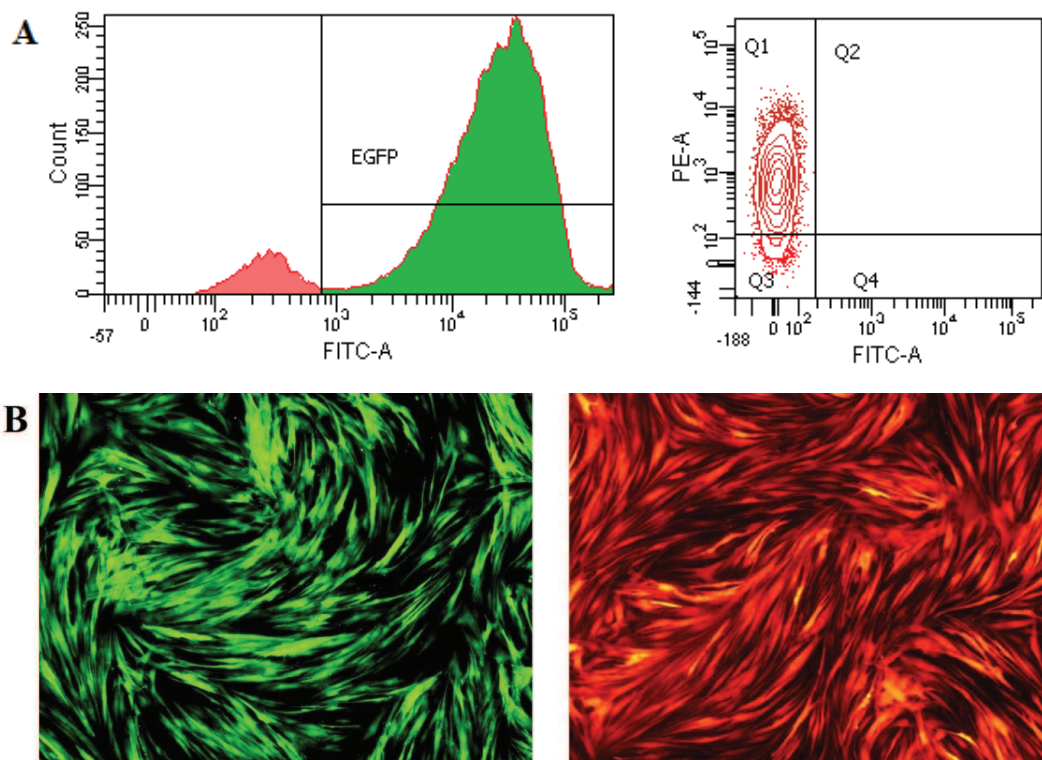
preparat	dzień 3 vs dzień 6	dzień 3 vs dzień 9	dzień 6 vs dzień 9
EGFP	<b>6,3E-05</b>	<b>9,5E-04</b>	<b>1,4E-04</b>
DsRed2	<b>6,4E-05</b>	0,092	<b>1,8E-04</b>

Dodatkowo, przeprowadzona została optymalizacja czasu zbierania medium hodowlanego zawierającego wektory wirusowe – porównano miana preparatów po 3, 6 i 9 dniach od transfekcji. Zarówno skrócenie, jak i wydłużenie czasu potrzebnego na złożenie wektorów obniżyło ich miano (Rysunek 5.15).

### 5.3.5 Transdukcja izolowanych ludzkich fibroblastów

Izolowane ludzkie fibroblasty transdukowane były 2-krotnie preparatami wirusowymi (EGFP i DsRed2) o MOI równym dwa, uzyskując kolejno 61,4 i 91,2% oraz 82,2 i 90,7% komórek pozytywnych. Wstępna ocena odsetka komórek pozytywnych („kolorowych”) była możliwa dzięki zastosowaniu mikroskopii fluorescencyjnej, a dokładna ocena przy pomocy cytometrii przepływowej (Rysunek 5.16).





Rysunek 5.16. Izolowane ludzkie fibroblasty po 2-krotnej transdukcji, MOI=2 produkują białka fluorescencyjne. A – przykładowy histogram (po lewej) i wykres poziomicowy (po prawej) umożliwiające określenie odsetka komórek „kolorowych”, B – zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego. Lewy panel dla preparatu zawierającego gen kodujący białko EGFP, prawy panel dla DsRed2. Powiększenie 40x.

### 5.3.6 Wpływ transdukcji na izolowane ludzkie fibroblasty

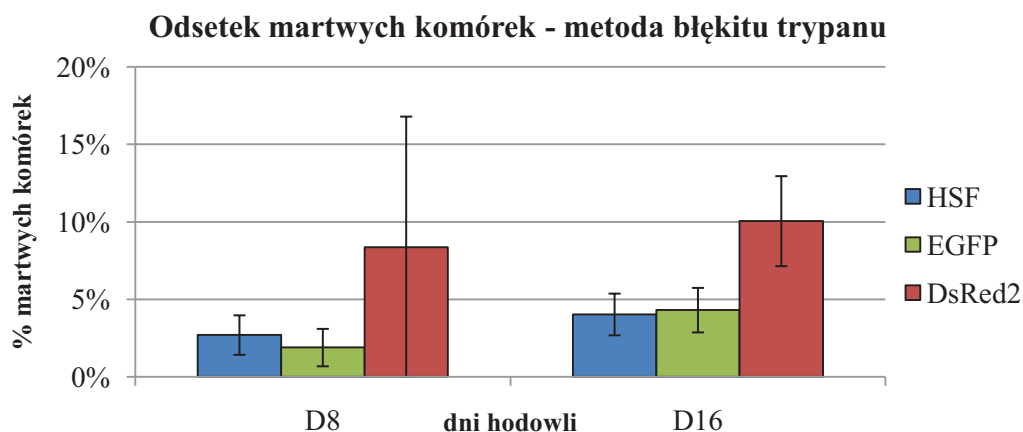
Wpływ transdukcji na izolowane ludzkie fibroblasty określany był na podstawie pomiaru odsetka martwych komórek oraz aktywności mitochondrialnej.

#### 5.3.6.1 Pomiar odsetka martwych komórek – analiza mikroskopowa

Błękit trypanu jest substancją, która nie wnika do komórek żywych, czyli takich, których ciągłość błony komórkowej nie została przerwana. W przypadku uszkodzenia błony komórkowej, związek ten przenika do wnętrza komórki i barwi jej wnętrze. Jest to powszechnie stosowana metoda określania stosunku komórek żywych i martwych, jednak ze względu na możliwość wystąpienia dużego błędu podczas pomiaru (ręczne liczenie komórek), wyniki powinny być potwierdzone przy pomocy innej metody.

Porównanie komórek nietransdukowanych (HSF) z komórkami transdukowanymi (EGFP i DsRed2) wypada na niekorzyść komórek produkujących białko DsRed2, jednak końcowy odsetek martwych komórek wynosi maksymalnie 10,1% (Rysunek 5.17).

Jeżeli nie zaznaczono inaczej, wyniki podawane są w formie średniej i odchylenia standardowego. Analiza statystyczna przeprowadzona była w programie Statistica z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA. Różnice między grupami analizowane były z wykorzystaniem testu *post-hoc* Duncana. Wartości  $p \leq 0,05$  uznano za statystycznie istotne.



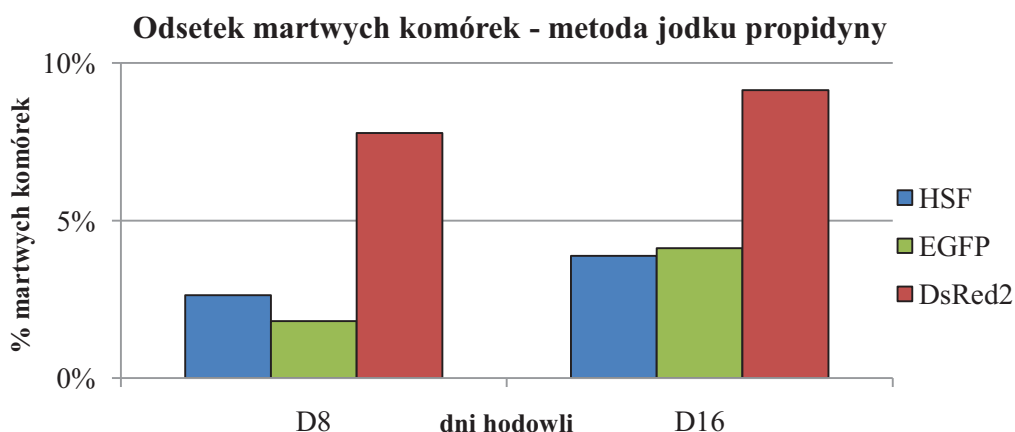
Rysunek 5.17. Porównanie odsetka martwych komórek w fibroblastach nietransdukowanych (HSF) oraz po transdukcji wektorami EGFP i DsRed2. Komórki liczone były z użyciem błękitu trypanu w 3 powtórzeniach. Poniżej przedstawiono wartości  $p$ .

dzień hodowli	HSF vs EGFP	HSF vs DsRed2	EGFP vs DsRed2
D8	0,852	0,276	0,226
D16	0,831	<b>0,004</b>	<b>0,005</b>

### 5.3.6.2 Pomiar odsetka martwych komórek – analiza cytometryczna

Jodek propidyny jest substancją, która, podobnie jak błękit trypanu, nie wnika do komórek żywych, o zachowanej ciągłości błony komórkowej. W przypadku uszkodzenia błony komórkowej, związek ten przenika do wnętrza komórki i interkaluje do kwasów nukleinowych. Dzięki emisji fluorescencji przy wzbudzeniu odpowiednią długością fali możliwa jest ocena odsetka komórek martwych. Zastosowanie cytometrii przepływowej zapewnia znacznie bardziej dokładne i wiarygodne wyniki niż podczas pomiaru z błękitem trypanu.

Wyniki uzyskane dzięki metodzie z jodkiem propidyny potwierdzają negatywny wpływ produkcji białka DsRed2 na izolowane ludzkie fibroblasty, jednak, podobnie jak w przypadku liczenia z błękitem trypanu, końcowy odsetek martwych komórek nie przekracza 10% (Rysunek 5.18).

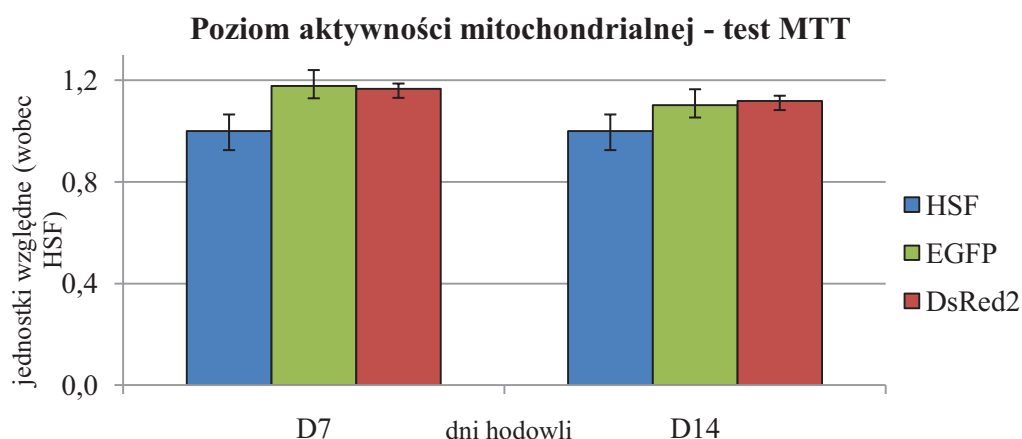


Rysunek 5.18. Porównanie odsetka martwych komórek w fibroblastach nietransdukowanych (HSF) oraz po transdukcji wektorami EGFP i DsRed2. Komórki liczone były z użyciem jodku propidyny przy użyciu cytometrii przepływowej (minimum 10 000 komórek).

### 5.3.6.1 Pomiar aktywności mitochondrialnej – test MTT

Test MTT umożliwia pomiar aktywności przemian energetycznych w mitochondriach. Sól tetrazolowa (rozpuszczalna w wodzie, jasnożółta) jest redukowana do nierozpuszczalnego formazanu (niebiesko-fioletowy), a jego ilość jest proporcjonalna do aktywności oksydacyjnej mitochondriów. Przy zachowaniu tej samej początkowej liczby komórek można stosować go jako test żywotności (im mniej komórek, tym mniej barwnego produktu), jednak należy pamiętać, że aktywność mitochondrialna jest różna w różnych typach komórek i nie powinny być ze sobą porównywane jako surowe dane, a jako odsetek komórek kontrolnych.

Aktywność mitochondrialna w fibroblastach produkujących białka EGFP i DsRed2 jest wyższa niż w komórkach kontrolnych (odpowiednio o 18 i 17% wobec kontroli w 7. dniu hodowli oraz 10 i 12% w dniu 14.). Nie zauważono różnic pomiędzy fibroblastami po transdukcji wektorami EGFP i DsRed2 (Rysunek 5.19).



Rysunek 5.19. Porównanie aktywności mitochondrialnej w fibroblastach nietransdukowanych (HSF) oraz po transdukcji wektorami EGFP i DsRed2. Wyniki przedstawiono jako średnią z 8 pomiarów. Poniżej przedstawiono wartości *p*.

dzień hodowli	HSF vs EGFP	HSF vs DsRed2	EGFP vs DsRed2
D7	1,2E-04	2,3E-04	0,740
D14	0,011	0,005	0,667

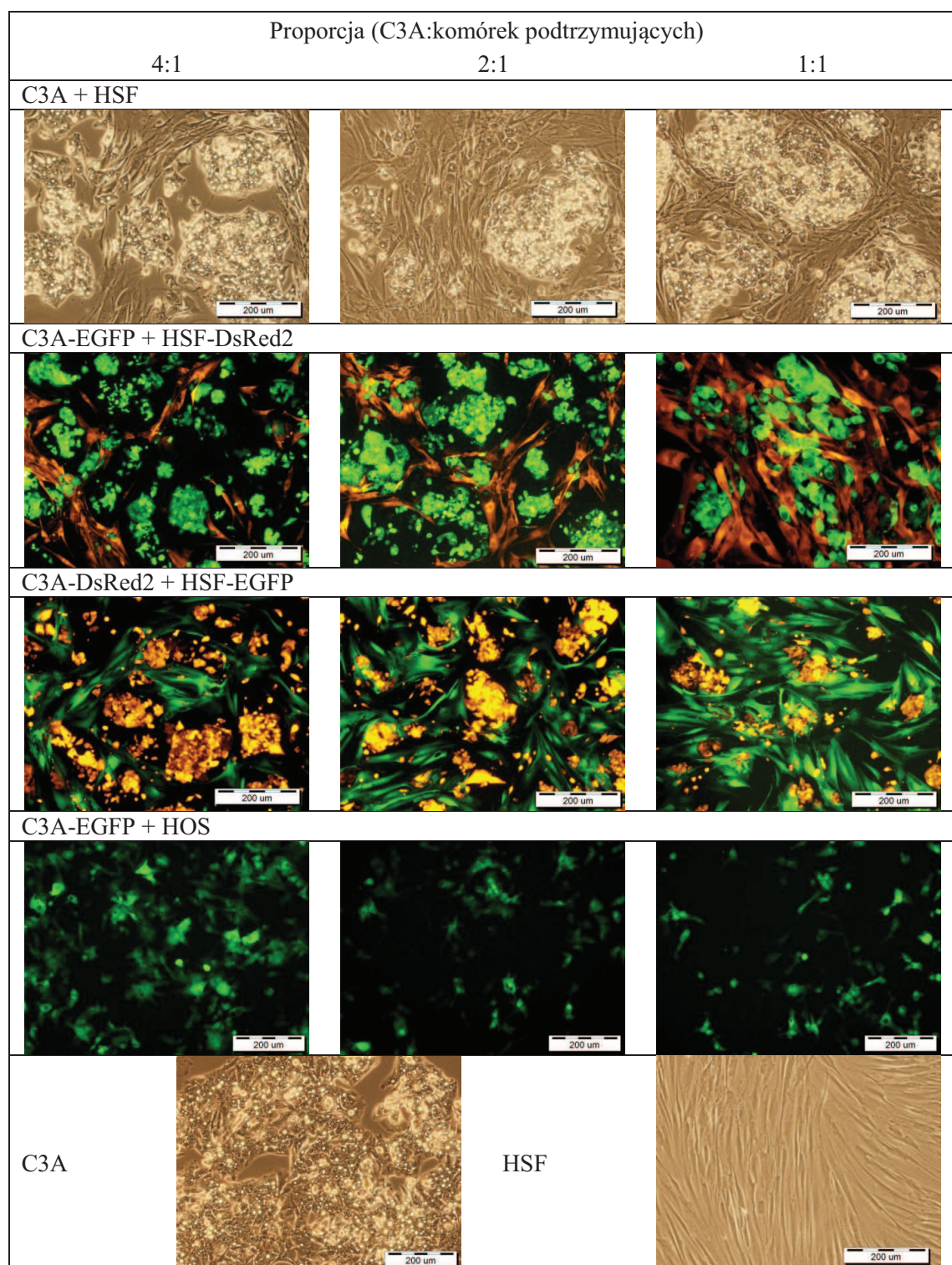
#### 5.4 Badanie kokultury komórek wątrobowych z izolowanymi ludzkimi fibroblastami produkującymi białka fluorescencyjne (EGFP i DsRed2)

Badanie kokultury komórek wątrobowych z izolowanymi ludzkimi fibroblastami produkującymi białka fluorescencyjne obejmowało analizę morfologii, analizę cytometryczną markerów komórkowych, oznaczanie zawartości albuminy oraz ocenę polaryzacji komórek.

##### 5.4.1 Ocena wpływu komórek podtrzymujących hodowlę na komórki wątrobowe - analiza morfologii

Komórki linii C3A w kokulturze z izolowanymi ludzkimi fibroblastami tworzyły struktury (zwane dalej wyspami) otoczone przez HSF. Niskie tempo podziałów fibroblastów (wywołane późnymi pasażami) umożliwiło swobodny wzrost komórek wątrobowych. Podczas kokultury z komórkami HOS, które charakteryzują się szybkim tempem podziałów, komórki C3A rosły jako pojedyncze komórki albo formowały niewielkie – kilkukomórkowe struktury. Obserwacja komórek nietransdukowanych w kokulturze była możliwa, jednak znacznie ułatwiona, kiedy dwa typy komórek produkowały różne białka fluorescencyjne (Rysunek 5.20).

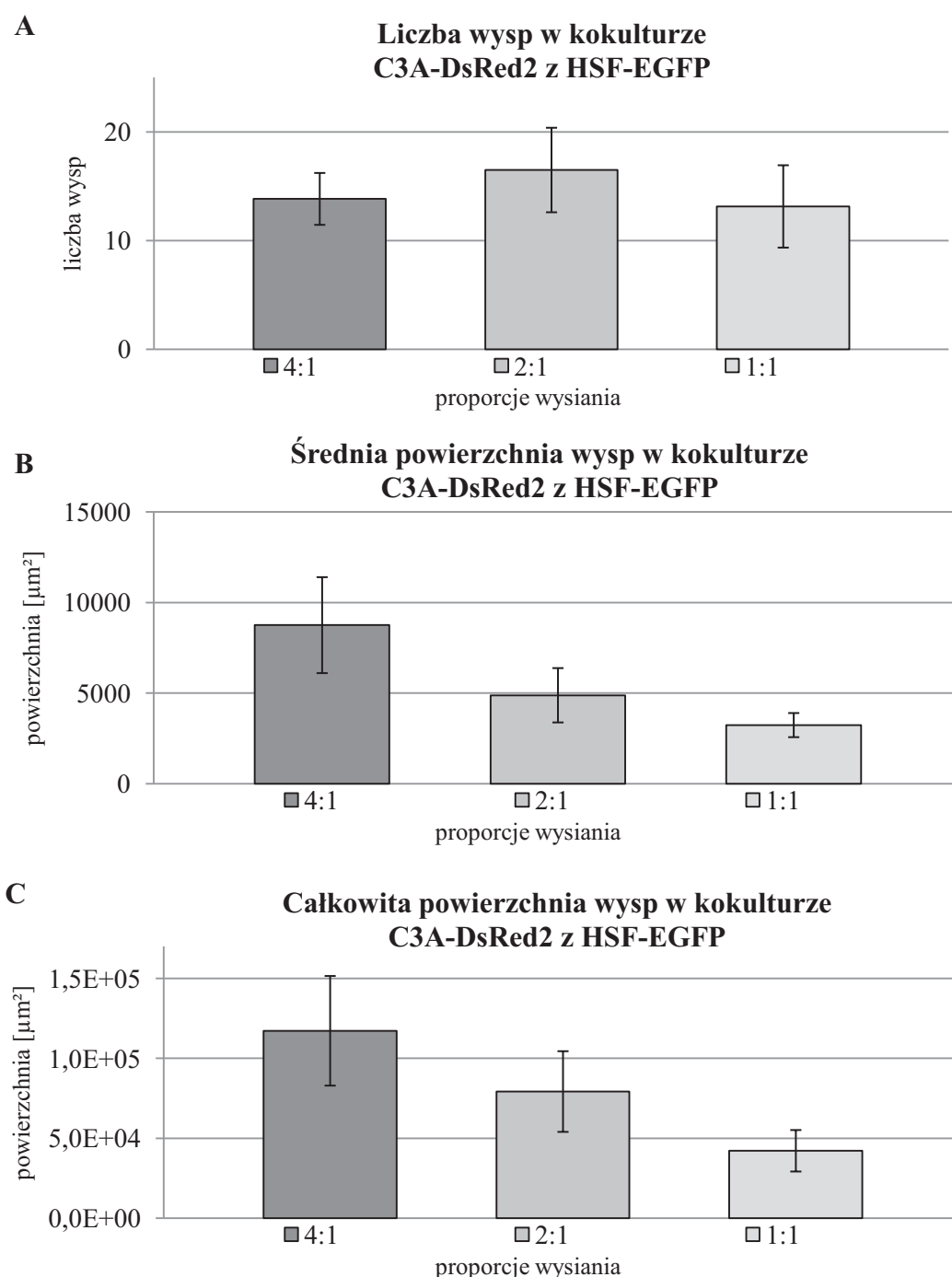




Rysunek 5.20. Morfologia komórek C3A rosnących w kokulturze z izolowanymi ludzkimi fibroblastami, komórkami linii HOS oraz w monokulturze po 16 dniach hodowli. Podane są proporcje komórek w dniu wysiania. Zdjęcia dla komórek produkujących białka fluorescencyjne wykonano w filtrze dla FITC (ze względu na nachodzenie się widm emisji, fluorescencja białka DsRed2 była widoczna jako ciemnożółta). Skala 200  $\mu\text{m}$ .

Zarówno liczba, średnia, jak i całkowita powierzchnia wysp utworzonych z komórek C3A otoczonych przez HSF mogła być kontrolowana przez proporcję ich

wysiania (4:1, 2:1, 1:1). Najwięcej wysp powstawało przy proporcji 2:1, a największą średnią i całkowitą powierzchnię zajmowały przy proporcji 4:1 – prawdopodobnie ze względu na największy początkowy odsetek komórek C3A (Rysunek 5.21).



Rysunek 5.21. Analiza morfologii w kokulturze C3A-DsRed2 z HSF-EGFP. A – liczba wysp w zależności od proporcji wysiania, B – średnia powierzchnia wyspy w zależności od proporcji wysiania, C – całkowita powierzchnia wysp w zależności od proporcji wysiania. Wyniki są przedstawione jako średnia z 20 zdjęć z każdej proporcji wykonanych po 16 dniach hodowli. Analizę przeprowadzono przy użyciu programu CellP. Poniżej przedstawiono wartości *p*.

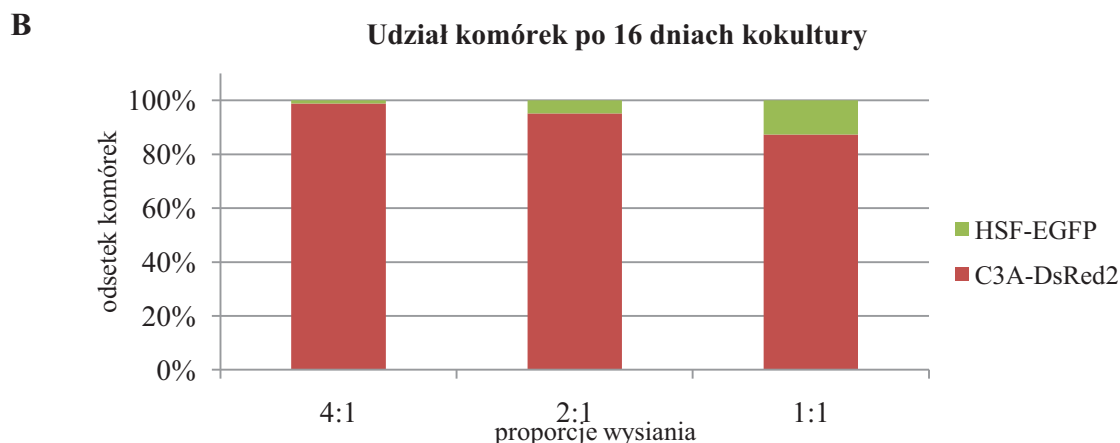
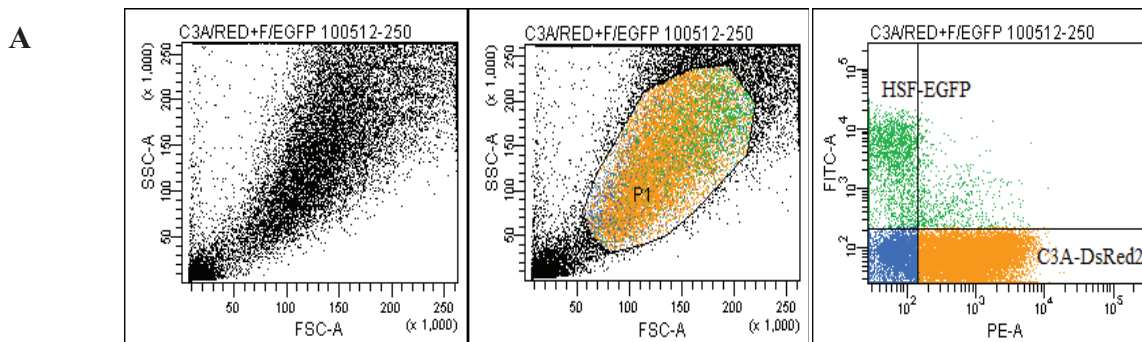


<b>parametr</b>	<b>4:1 vs 2:1</b>	<b>4:1 vs 1:1</b>	<b>2:1 vs 1:1</b>
liczba wysp	<b>0,019</b>	0,531	<b>0,005</b>
średnia wielkość wyspy	<b>1,1E-04</b>	<b>6,0E-05</b>	<b>0,005</b>
całkowita powierzchnia wysp	<b>1,1E-04</b>	<b>6,0E-05</b>	<b>1,1E-04</b>

Zarówno liczba jak i wielkość wysp mają wpływ na oddziaływania homo- i heterotypowe pomiędzy komórkami C3A a HSF. Im większe jest pole kontaktu obydwu typów komórek, tym lepsze warunki mają zapewnione komórki wątrobowe.

#### **5.4.2 Ocena wpływu komórek podtrzymujących hodowlę na komórki wątrobowe – analiza cytometryczna markerów komórkowych**

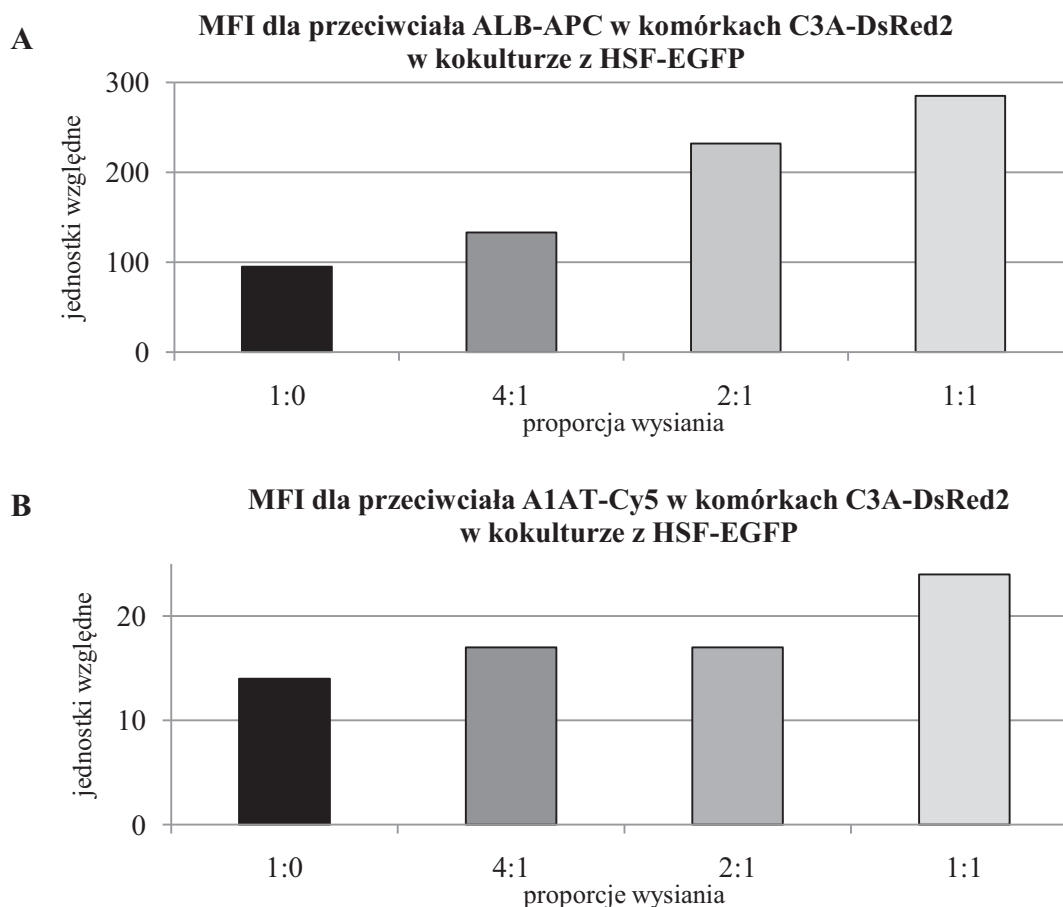
Wykorzystanie komórek produkujących białka fluorescencyjne w analizie cytometrycznej jest z jednej strony bardzo korzystne – pozwala m.in. na rozdzielenie dwóch populacji bez konieczności znakowania ich i dalszą analizę, z drugiej strony utrudnia znakowanie komórek, wymuszając dobieranie fluoroforów o innej niż wprowadzone białko emisji fluorescencji. Na przykładzie kokultury komórek C3A-DsRed2 i HSF-EGFP można prześledzić kolejne etapy rozdziału dwóch populacji. Początkowo, dysponujemy wykresem kropkowym (dot plot), którego osie opisane jako FCS (światło przechodzące) i SSC (światło rozproszone), co odpowiada wielkości i ziarnistości komórek. W lewym dolnym rogu widoczna jest populacja fragmentów komórkowych, a w centralnej części wykresu – analizowane komórki. Po zaznaczeniu tej populacji i opisanie jej jako P1, zostają jej nadane kolory – pomarańczowy dla komórek C3A-DsRed2, zielony dla HSF-EGFP i niebieski dla komórek niewykazujących fluorescencji (nietransdukowanych lub o bardzo niskim poziomie produkcji białek fluorescencyjnych). Na tym etapie można już zaobserwować, że fibroblasty są komórkami większymi niż C3A (większe wartości na osi FSC). Analiza populacji P1 pod względem produkcji białek fluorescencyjnych (kanał FITC dla białka EGFP i kanał PE dla białka DsRed2), pozwala na dalszą analizę tylko w obrębie wybranej populacji (P1, C3A-DsRed2 lub HSF-EGFP). Ponadto możliwe jest dokładne określenie odsetka komórek po 16 dniach hodowli. Dzięki temu można zaobserwować, że komórki linii C3A dzielą się znacznie częściej niż fibroblasty i po 16 dniach ich odsetek wynosi: 98,9%, 95,2% i 87,3%, odpowiednio dla proporcji wysiania 4:1, 2:1 i 1:1 (Rysunek 5.22).



Rysunek 5.22. Analiza populacji przy zastosowaniu podziału ze względu na produkcję białek fluorescencyjnych. A – etapy wydzielenia poszczególnych populacji z obrazu cytometrycznego; panel lewy: wszystkie zarejestrowane zdarzenia, panel środkowy: wydzielenie populacji komórek C3A i HSF oraz nadanie im odpowiednich kolorów (pomarańczowy i zielony), panel prawy: rozdzielenie populacji C3A-DsRed2, HSF-EGFP i komórek nieprodukujących żadnego z białek fluorescencyjnych. B – udział komórek obydwu populacji po 16 dniach hodowli w zależności od proporcji wysiania, komórki niewykazujące fluorescencji zostały pominięte.

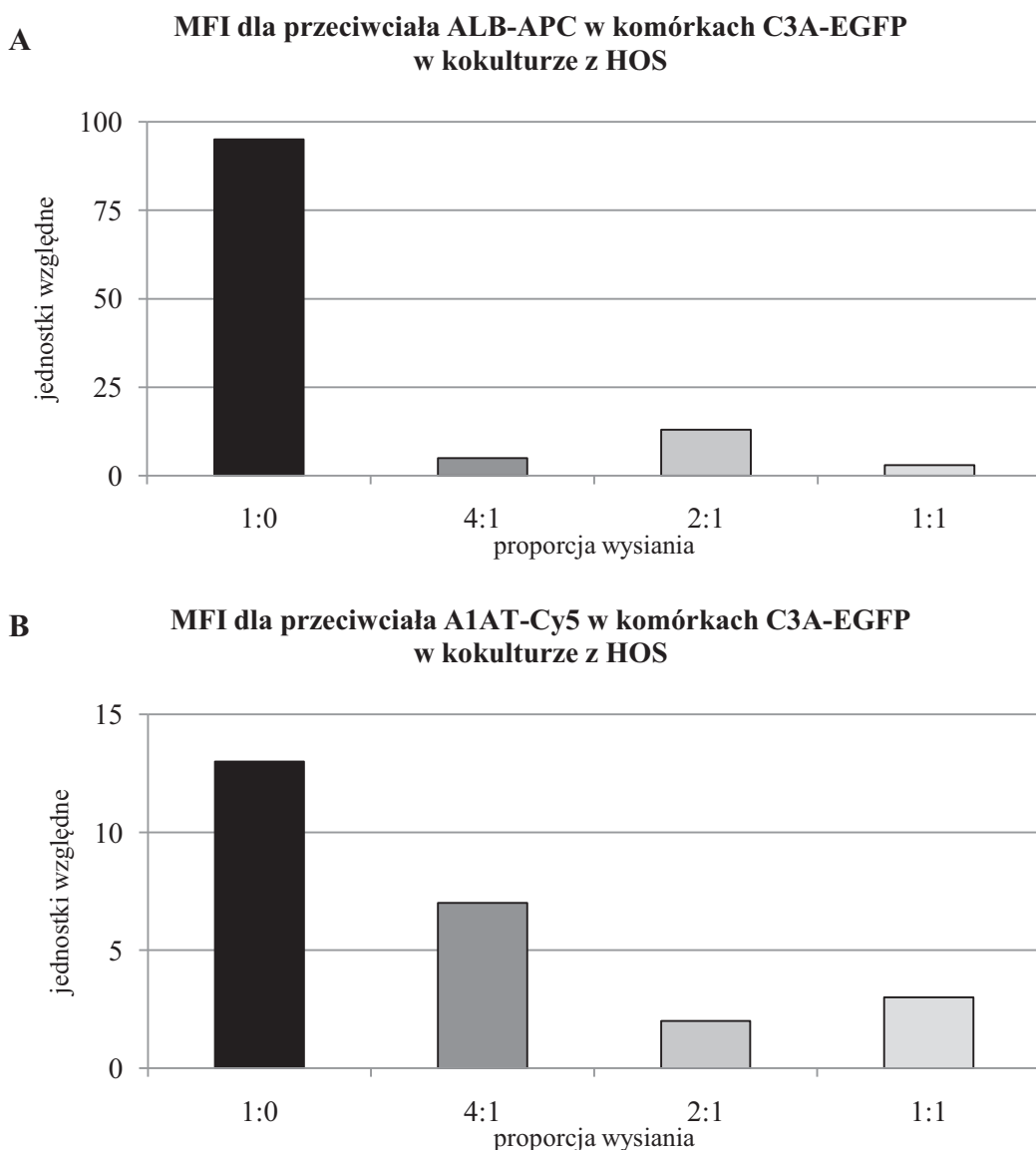
Analiza cytometryczna markerów komórkowych specyficznych dla komórek C3A i fibroblastów nie wykazała różnic w odsetku komórek je produkujących w zależności od rodzaju hodowli i jest zbliżona do tych przedstawionych w Rozdziałach 5.2.2 i 5.2.3, dlatego poniższa analiza została przeprowadzona na podstawie parametru MFI. Jest to możliwe ze względu na przeprowadzenie pomiarów tego samego dnia i możliwości porównania ich między sobą. Odsetek komórek pozytywnych określa, w jakim procencie populacji wykrywana jest minimalna ilość białka, która wiąże się z przeciwciałem. Parametr MFI natomiast pokazuje, w jednostkach względnych, jak duża jest jego produkcja. Komórki C3A w hodowli z fibroblastami wykazują większe natężenie fluorescencji zarówno dla fluoroforów związanych z przeciwciałem dla albuminy jak i dla  $\alpha$ -1-antytrypsyny (Rysunek 5.23). Ponadto wartość ta rośnie wraz ze wzrostem odsetka

fibroblastów i jest największa w proporcji 1:1 (3-krotnie więcej dla albuminy i o 70% więcej dla  $\alpha$ -1-antytrypsyny).



Rysunek 5.23. Porównanie parametru MFI dla przeciwciała ALB-APC (panel górny – A) i A1AT-Cy5 (panel dolny – B) w komórkach C3A-DsRed2 w kokulturze z HSF-EGFP w różnych proporcjach po 16 dniach hodowli. Medianę natężenia fluorescencji przedstawiono w jednostkach względnych jako różnicę między próbką badaną a właściwą dla niej kontrolą.

Pozytywny wpływ hodowli komórek wątrobowych z fibroblastami został również potwierdzony pośrednio przez hodowlę komórek C3A z komórkami HOS. W tym typie kokultury komórki HOS, które dzielą się szybciej niż komórki C3A, nie dopuściły do podziałów tych drugich, przez to zarówno odsetek komórek ALB+ i A1AT+, jak i parametr MFI są niskie (Rysunek 5.24). Komórki HOS nie są właściwym typem komórek podtrzymujących hodowlę.

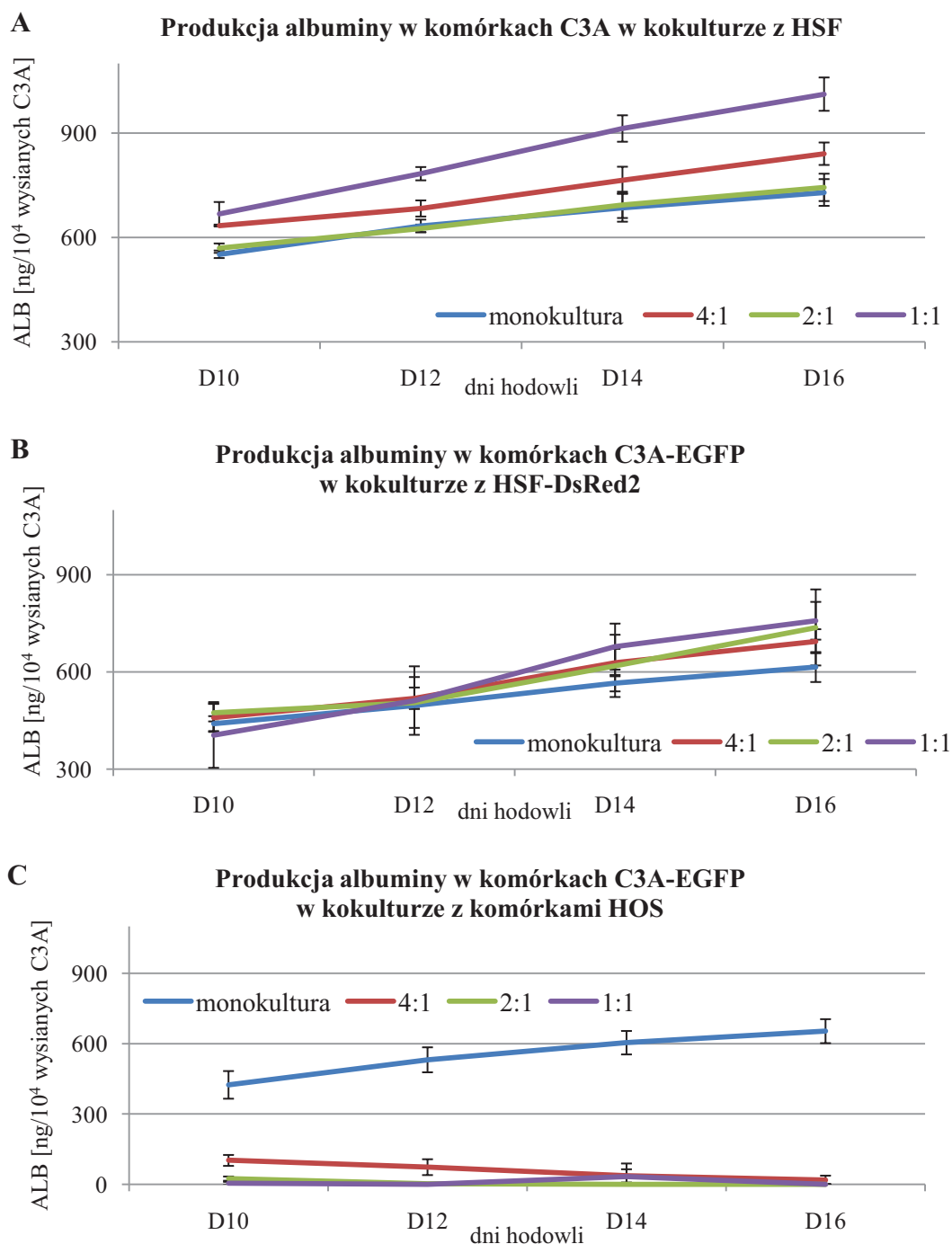


Rysunek 5.24. Porównanie parametru MFI dla przeciwciała ALB-APC (panel górny – A) i A1AT-Cy5 (panel dolny – B) w komórkach C3A-EGFP w kokulturze z komórkami HOS w różnych proporcjach po 16 dniach hodowli. Medianę natężenia fluorescencji przedstawiono w jednostkach względnych jako różnicę między próbką badaną a właściwą dla niej kontrolą.

#### 5.4.3 Ocena wpływu komórek podtrzymujących hodowlę na komórki wątrobowe – oznaczanie zawartości albuminy w medium hodowlanym metodą ELISA

Test immunoenzymatyczny ELISA pozwala na określenie ilościowej produkcji białka. Porównana została produkcja i wydzielanie albuminy w komórkach C3A w kokulturze z fibroblastami ludzkimi wysianymi w kokulturze w różnych proporcjach. Próbkę medium pochodzącego z hodowli zbierano co dwa dni i przeliczano na wyjściową liczbę komórek. Największą produkcję albuminy w komórkach C3A zaobserwowano w kokulturze z HSF w proporcji wysiania 1:1, a najmniejszą w monokulturze C3A, co

potwierdza wyniki otrzymane podczas analizy cytometrycznej. Podobną tendencję uzyskano dla hodowli C3A-DsRed2 z HSF-EGFP i C3A-EGFP z HSF-DsRed2, jednak ilość albuminy jest niższa, co prawdopodobnie jest związane z nieco wolniejszą proliferacją komórek po transdukcji.



Rysunek 5.25. Porównanie produkcji albuminy oznaczanej metodą ELISA w komórkach wątrobowych. A – komórki C3A w kokulturze z HSF w różnych proporcjach wysiania, B – komórki C3A-EGFP w kokulturze z HSF-DsRed2 w różnych proporcjach wysiania, C – komórki C3A-EGFP w kokulturze z HOS w różnych proporcjach wysiania. Próbkę zbierane były co dwa dni z 4 niezależnych dołków, z których wykonano po 2 pomiary. Wartości  $p$  podano w Tabeli 5.6.

W przypadku nietransdukowanych komórek ilość produkowanej albuminy w monokulturze różni się znacznie od tej produkowanej w kokulturze w proporcjach wysiania 4:1 i 1:1. Wraz z kolejnymi dniami hodowli coraz bardziej rozbieżne stają się wyniki uzyskane dla proporcji 4:1 i 2:1 oraz 4:1 i 1:1. Nie wykryto różnic pomiędzy produkcją albuminy w monokulturze i kokulturze 2:1 (Rysunek 5.25 A). W komórkach transdukowanych produkcja albuminy utrzymuje się na podobnym poziomie, niezależnie od liczby fibroblastów. Jednak w ostatnich dniach hodowli można zauważyć znacząco większą produkcję tego białka w proporcji wysiania 1:1 (Rysunek 5.25 B).

Kokultura komórek C3A z komórkami HOS nie była korzystna również pod względem produkcji albuminy wykrywanej w medium pohodowlanym, co można obserwować prawie przez cały okres hodowli. Produkcja albuminy od dnia szóstego zaczęła spadać i pod koniec hodowli była prawie niewykrywalna. Znaczne różnice występują między ilością albuminy w monokulturze i wszystkich typach kokultury, które nie różnią się między sobą (Rysunek 5.25 C).

Tabela 5.6 Zestawienie wartości *p* (istotności statystycznej) dla produkcji albuminy w monokulturach i kokulturach C3A.

A	dzień hodowli	monokultura vs 4:1	monokultura vs 2:1	monokultura vs 1:1	4:1 vs 2:1	4:1 vs 1:1	2:1 vs 1:1
	D16	<b>0,006</b>	0,655	<b>6,7E-05</b>	<b>0,011</b>	<b>3,3E-04</b>	<b>9,6E-05</b>
	D14	0,071	0,832	<b>1,7E-04</b>	0,088	<b>0,002</b>	<b>2,1E-04</b>
	D12	0,088	0,794	<b>2,4E-04</b>	0,065	<b>0,003</b>	<b>1,9E-04</b>
	D10	<b>0,026</b>	0,582	<b>0,004</b>	0,059	0,303	<b>0,010</b>
B	dzień hodowli	monokultura vs 4:1	monokultura vs 2:1	monokultura vs 1:1	4:1 vs 2:1	4:1 vs 1:1	2:1 vs 1:1
	D16	0,143	<b>0,040</b>	<b>0,022</b>	0,419	0,260	0,623
	D14	0,210	0,265	<b>0,040</b>	0,827	0,302	0,239
	D12	0,675	0,854	0,773	0,798	0,880	0,905
	D10	0,686	0,482	0,446	0,744	0,275	0,176
C	dzień hodowli	monokultura vs 4:1	monokultura vs 2:1	monokultura vs 1:1	4:1 vs 2:1	4:1 vs 1:1	2:1 vs 1:1
	D16	<b>2,1E-04</b>	<b>7,0E-05</b>	<b>9,2E-05</b>	0,482	0,463	1,000
	D14	<b>2,1E-04</b>	<b>7,0E-05</b>	<b>9,2E-05</b>	0,318	0,915	0,346
	D12	<b>2,1E-04</b>	<b>7,0E-05</b>	<b>9,2E-05</b>	<b>0,028</b>	<b>0,030</b>	0,951
	D10	<b>2,1E-04</b>	<b>7,0E-05</b>	<b>9,2E-05</b>	<b>0,024</b>	<b>0,009</b>	0,490

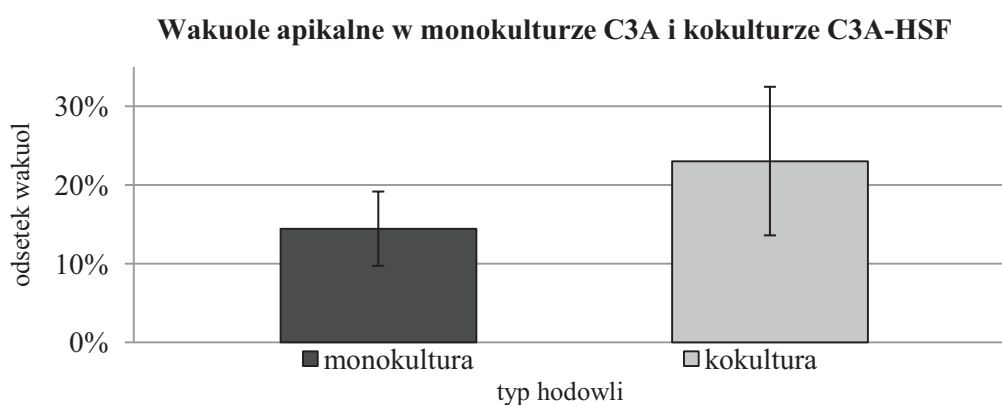
#### 5.4.4 Ocena wpływu komórek podtrzymujących hodowlę na komórki wątrobowe – polaryzacja komórek

W budowie hepatocytów można wyróżnić dwa bieguny: naczyniowy i żółciowy, in. kanalikowy. Błona komórkowa od strony bieguna naczyniowego posiada mikrokosmki, ER szorstkie jest obfite, następuje tu wchłanianie produktów trawienia oraz

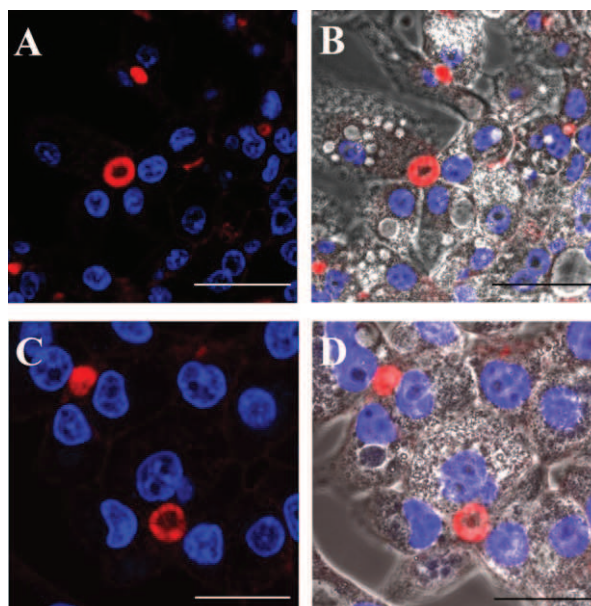


wydzielanie glukozy, białek i lipoprotein. Po stronie bieguna żółciowego formuje się kanalik żółciowy w formie wakuoli apikalnej (uszczelniany przez połączenia międzykomórkowe), występują tam licznie lizosomy i diktiosomy oraz wydzielana jest żółć. Stopień polaryzacji komórek wątrobowych jest jednym z parametrów określających jakość hodowli.

Komórki linii C3A w kokulturze z fibroblastami ludzkimi wytwarzały znacznie więcej wakuol apikalnych zbudowanych z włókien aktynowych, z którymi łączy się falloidyna wyznakowana TRITC (Rysunek 5.26).



Rysunek 5.26. Odsetek wakuoli apikalnych w monokulturze C3A i kokulturze komórek C3A z HSF po 8 dniach hodowli (proporcja wysiania 2:1). Przedstawione wartości są średnią z 9 zdjęć z obydwu typów hodowli ( $p = 0,017$ ).



Rysunek 5.27. Wakuole apikalne w monokulturze C3A (A, B) i kokulturze komórek C3A z HSF (C, D) po 8 dniach hodowli (proporcja wysiania 2:1). Panel lewy: wybarwione wakuole apikalne (TRITC) i jądra komórkowe (DAPI), panel prawy: zdjęcia z panelu lewego nałożone na zdjęcia wykonane w świetle przechodzącym. Skala: 40  $\mu\text{m}$  (A, B) i 25  $\mu\text{m}$  (C, D).

Wakuole apikalne powstają na granicy dwóch lub więcej hepatocytów i mogą być tak duże jak komórka (Rysunek 5.27). Dodatkowe barwienie jąder komórkowych przy pomocy DAPI pozwoliło na obliczenie, w jakim odsetku komórek powstają wakuole apikalne i porównać monokulturę z kokulturą.

## 5.5 Modyfikacje genetyczne izolowanych ludzkich fibroblastów – EGF

### 1. Przygotowanie konstruktów

Opis działań podjętych w celu przygotowania konstruktów zawierających gen kodujący epidermalny czynnik wzrostu EGF znajduje się w Dodatku A. Ze względu na niepowodzenie w otrzymaniu właściwego plazmidu wektorowego, opartego na plazmidzie pNL-H2BmCherry/GtxIRES/EGFP, wykonanie zsyntetyzowanego wektora, zawierającego gen kodujący EGF pod promotorem CMV (pEZ-CMV-EGF-IRES2-mCherry-Lv214), zlecono firmie Genecopoeia.

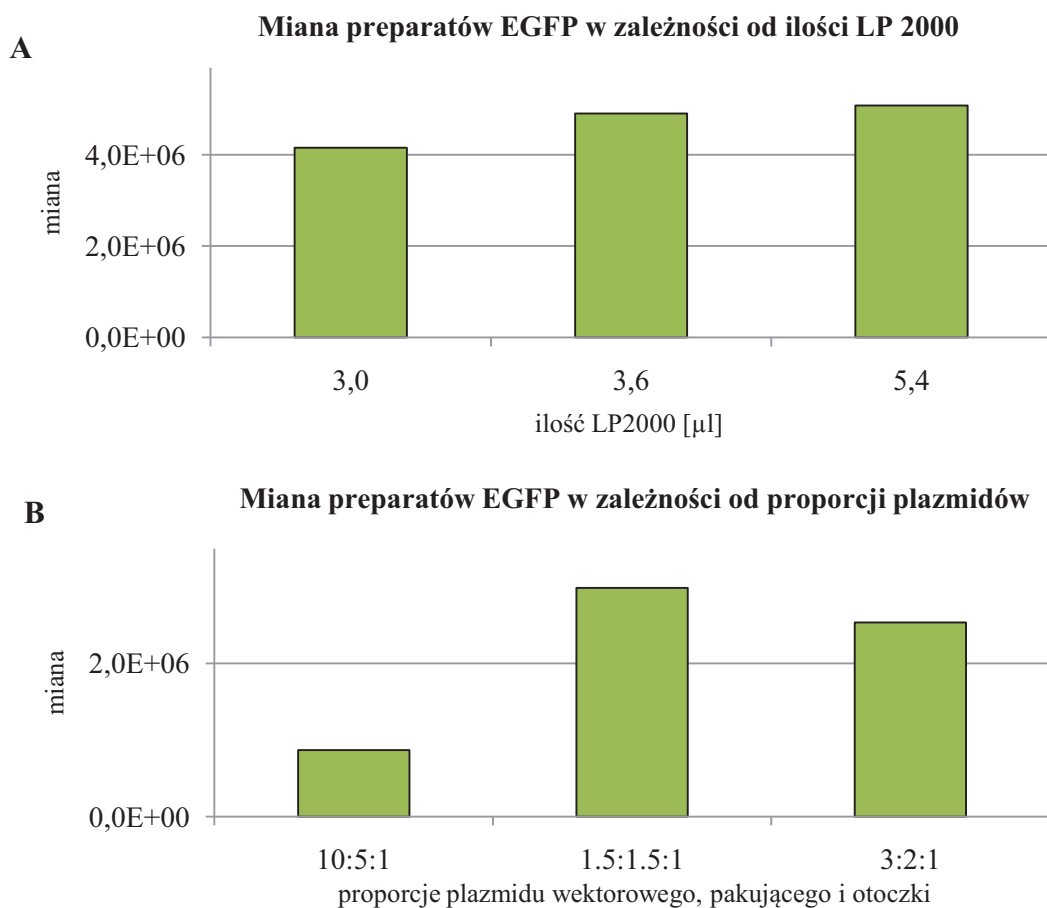
### 2. Wprowadzenie komórek *E. coli* szczep STBL3 w stan kompetencji

Wprowadzenie komórek *E. coli* (szczep STBL3) w stan kompetencji przeprowadzono zgodnie z opisem zamieszczonym w Rozdziale 5.3.1.

### 3. Optymalizacja metody LP2000 – transfekcja komórek HEK293T

Optymalizacja transfekcji prowadzona była przez zmianę ilości LP2000 oraz proporcji plazmidu wektorowego, pakującego i otoczki z wykorzystaniem plazmidu zawierającego gen kodujący białko EGFP (pNL-EGFP/CMV-WPRE/ $\Delta$ U3). Miana preparatów zostały obliczone na podstawie odsetka komórek pozytywnych po transdukcji i przedstawione na Rysunku 5.28.

Do produkcji preparatów EGF użyto 3  $\mu$ l LP2000 (ze względu na niewielkie różnice w wydajności transdukcji przy zwiększeniu ilości LP2000) i zastosowano proporcję plazmidów 3:2:1. Tak przygotowanymi wektorami transdukowano izolowane ludzkie fibroblasty, a następnie oceniono powstałą linię komórkową.



Rysunek 5.28. Miana preparatów EGFP (optymalizacja metody transfekcji LP2000) w zależności od ilości użytej LP2000 (A) i proporcji plazmidu wektorowego, pakującego i otoczki (B).

### 5.5.1 Ocena skuteczności wprowadzonych modyfikacji w HSF

Plazmid wektorowy, zawierający gen kodujący EGF, skonstruowany był w taki sposób, aby możliwa była szybka ocena wydajności transdukcji. Sposób ten polegał na zastosowaniu sekwencji IRES (ang. Internal Ribosome Entry Side), która umożliwia jednoczesną ekspresję genu *EGF* i genu kodującego marker – w tym wypadku fluorescencyjne białko mCherry z jednego transkryptu. Niestety, białko mCherry nie zostało wykryte, co mogło świadczyć zarówno o niskim mianie uzyskanych preparatów, niewłaściwym działaniu sekwencji IRES, ale również niedopasowaniu ścieżki optycznej w cytometrze przepływowym. Zdecydowano się więc na ocenę uzyskanych linii fibroblastów jedynie pod kątem obecności w genomie sekwencji zawierającej *EGF* pod promotorem CMV oraz zmiany w produkcji białka EGF w komórkach niemodyfikowanych i po transdukcji. Wcześniej, poddano uzyskane plazmidy wektorowe sekwencjonowaniu (w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów

IBB PAN), a otrzymane wyniki analizowano w programie BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov). Uzyskano 100% zgodność z sekwencją ludzkiego epidermalnego czynnika wzrostu (Rysunek 5.29).

Download GenBank Graphics

Homo sapiens epidermal growth factor (EGF), transcript variant 1, mRNA  
Sequence ID: ref|NM\_001963.4| Length: 5600 Number of Matches: 1

Range 1: 453 to 946 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
913 bits(494)	0.0	494/494(100%)	0/494(0%)	Plus/Plus

```

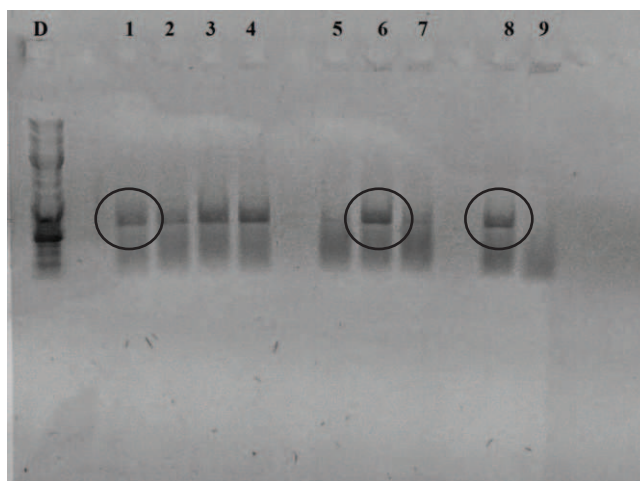
Query 316 ATGCTGCTCACTCTTATCATTCTGTTGCCAGTAGTTTCAAATTTAGTTTGTAGTCTC 375
Sbjct 453 ATGCTGCTCACTCTTATCATTCTGTTGCCAGTAGTTTCAAATTTAGTTTGTAGTCTC 512
Query 376 TCAGCACCCGAGCACTGGAGCTGTCTTGAAGTACTCTCGCAGGAAATGGGAATCTACT 435
Sbjct 513 TCAGCACCCGAGCACTGGAGCTGTCTTGAAGTACTCTCGCAGGAAATGGGAATCTACT 572
Query 436 TGTGTGGGTCCTGCACCCCTCTTAATTTCTCCCATGGAAATAGTATCTTTAGGATTGAC 495
Sbjct 573 TGTGTGGGTCCTGCACCCCTCTTAATTTCTCCCATGGAAATAGTATCTTTAGGATTGAC 632
Query 496 ACAGAAGGAACCAATTATGAGCAATTGGTGGTGGATGCTGGTGTCTCAGTGATCATGGAT 555
Sbjct 633 ACAGAAGGAACCAATTATGAGCAATTGGTGGTGGATGCTGGTGTCTCAGTGATCATGGAT 692
Query 556 TTTCAATATAATGAGAAAAGAACTATTGGGTGGATTTAGAAAAGACAACCTTTGCAAAGA 615
Sbjct 693 TTTCAATATAATGAGAAAAGAACTATTGGGTGGATTTAGAAAAGACAACCTTTGCAAAGA 752
Query 616 GTTTTCTGAAATGGGTCAAGGCAAGAGAGATGTAAATAGAGAAAAATGTTCTGGA 675
Sbjct 753 GTTTTCTGAAATGGGTCAAGGCAAGAGAGATGTAAATAGAGAAAAATGTTCTGGA 812
Query 676 ATGGCAATAAATGGATAAATGAAGAAGTATTGGTCAAATCAACAGGAAGGAATCATT 735
Sbjct 813 ATGGCAATAAATGGATAAATGAAGAAGTATTGGTCAAATCAACAGGAAGGAATCATT 872
Query 736 ACAGTAACAGATATGAAAAGGAAATAATCCACATTCTTTAAGTCTTTAAAATATCCT 795
Sbjct 873 ACAGTAACAGATATGAAAAGGAAATAATCCACATTCTTTAAGTCTTTAAAATATCCT 932
Query 796 GCAAAATGTAGCAGT 809
Sbjct 933 GCAAAATGTAGCAGT 946

```

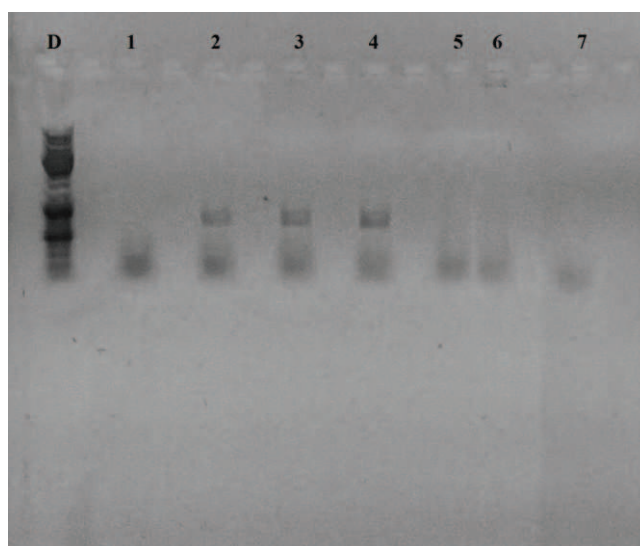
Rysunek 5.29. Wyniki analizy sekwencji nukleotydów programem BLAST potwierdzające sekwencję *hEGF* w plazmidzie wektorowym użytym do produkcji wektorów lentiwirusowych.

### 5.5.2 Ocena skuteczności wprowadzonych modyfikacji w HSF – analiza DNA

Rozdział elektroforetyczny, przeprowadzony po reakcji PCR przy użyciu starterów zaprojektowanych zgodnie z opisem przedstawionym w Rozdziale 4.4.5.3.1.1, potwierdził obecność wprowadzonych zmian w niektórych preparatach (Rysunek 5.30). Dalszym analizom poddano komórki HSF-E1/100/1 (nazywane dalej HSF-E1), HSF-E2/100/2 (nazywane dalej HSF-E2) i HSF-E3/100/1 (nazywane dalej HSF-E3). W celu potwierdzenia prawidłowego przebiegu reakcji PCR, przeprowadzono ją również z udziałem komórek C3A i HOS oraz nietransdukowanych HSF. W żadnej z tych linii nie powstał produkt typowy dla komórek HSF-E1, HSF-E2 i HSF-E3 (Rysunek 5.31).



Rysunek 5.30. Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym po reakcji PCR w celu sprawdzenia obecności genu kodującego EGF pod kontrolą promotora CMV w poszczególnych preparatach. Zaznaczono preparaty poddane dalszej analizie. 1 – HSF-E1/100/1, 2 – HSF-E1/100/2, 3 – HSF-E1/200/1, 4 – HSF-E1/200/2, 5 – HSF-E2/100/1, 6 – HSF-E2/100/2, 7 – HSF-E2/200/1, 8 – HSF-E3/100/1, 9 – HSF-E3/100/2. D – marker DNA GeneRuler.

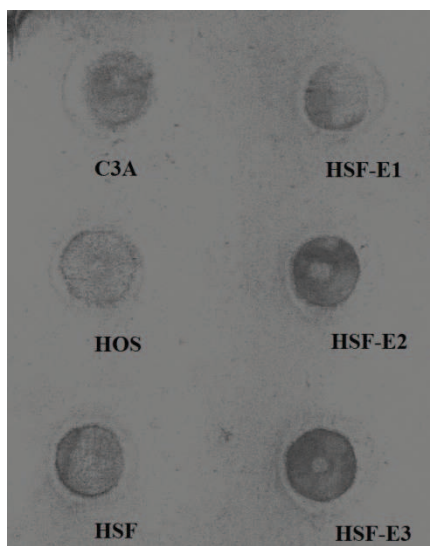


Rysunek 5.31. Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym po reakcji PCR w celu sprawdzenia obecności genu kodującego EGF pod kontrolą promotora CMV w poszczególnych preparatach. 1 – HSF, 2 – HSF-E1/100/1, 3 – HSF-E2/100/2, 4 – HSF-E3/100/1, 5 – HOS, 6 – C3A, 7 – bez matrycy DNA. D – marker DNA GeneRuler.

### 5.5.3 Ocena skuteczności wprowadzonych modyfikacji w HSF – analiza białka

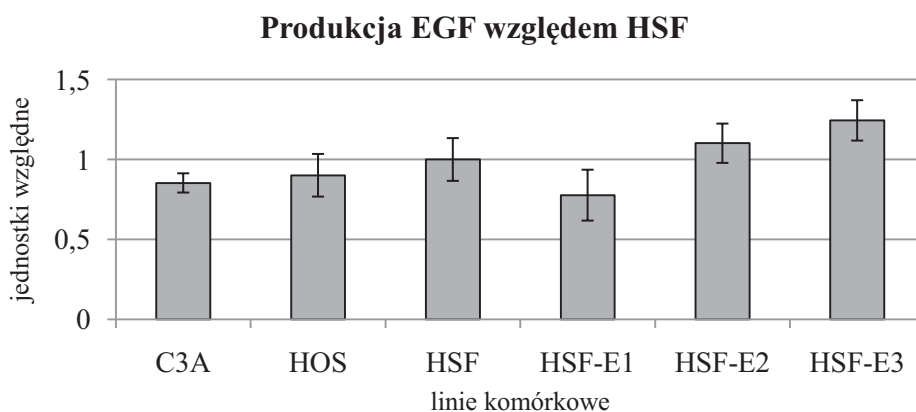
Analiza metodą DotBlot potwierdziła zdolność komórek do produkcji EGF w fibroblastach ludzkich, komórkach linii C3A i HOS. Najciemniejsze punkty widoczne są w preparatach pochodzących z komórek HSF-E2 i HSF-E3. Ze względu na naniesienie na membranę białka pochodzącego z takiej samej liczby komórek, można przypuszczać, że w tych fibroblastach znajduje się najwięcej EGF (Rysunek 5.32).





Rysunek 5.32. Wyniki analizy DotBlot z wykorzystaniem przeciwciała skierowanego przeciw EGF. Najciemniejsze punkty znajdują się w preparatach pochodzących z komórek HSF-E2 i HSF-E3.

Analiza ilościowa metodą ELISA również potwierdziła ekspresję genu kodującego EGF w fibroblastach ludzkich, komórkach linii C3A i HOS (Rysunek 5.33). Najwięcej tego białka produkowały komórki HSF-E2 i HSF-E3 (odpowiednio o 10,2% i 24,4% więcej niż niemodyfikowane HSF). Komórki były wysiane w takiej samej liczbie i hodowane przez taką samą liczbę dni.



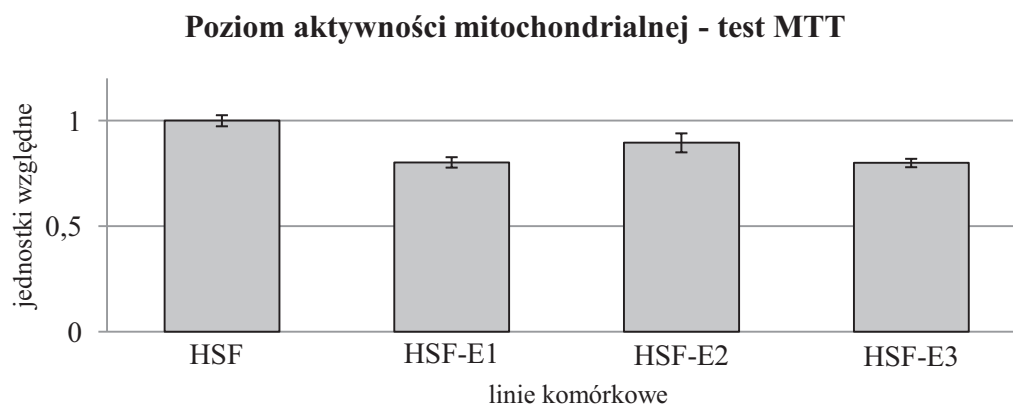
Rysunek 5.33. Porównanie produkcji EGF w komórkach transdukowanych (HSF-E1, HSF-E2 i HSF-E3), w komórkach linii C3A i HOS oraz w fibroblastach niemodyfikowanych. Największą produkcję wykryto w komórkach HSF-E3 (o prawie 25% większą niż w fibroblastach niemodyfikowanych). Poniżej podano wartości *p*.

	<b>C3A</b>	<b>HOS</b>	<b>HSF</b>	<b>HSF-E1</b>	<b>HSF-E2</b>	<b>HSF-E3</b>
C3A	-	0,376	<b>0,018</b>	0,236	<b>4,2E-04</b>	<b>1,0E-05</b>
HOS	-	-	0,162	0,113	<b>0,008</b>	<b>1,2E-04</b>
HSF	-	-	-	<b>0,009</b>	0,137	<b>0,002</b>
HSF-E1	-	-	-	-	<b>5,1E-04</b>	<b>2,0E-05</b>
HSF-E2	-	-	-	-	-	<b>0,038</b>



### 5.5.4 Wpływ transdukcji na izolowane ludzkie fibroblasty

Wykryto niższą aktywność mitochondrialną w fibroblastach produkujących białko EGF niż w komórkach kontrolnych – o 19,7% dla HSF-E1, 10,5 % dla HSF-E2 i 20,0% dla HSF-E3 (Rysunek 5.34). Na podstawie wyżej opisanych wyników do dalszych doświadczeń wybrano HSF-E3 (ze względu na najwyższą produkcję EGF).



Rysunek 5.34. Porównanie aktywności mitochondrialnej w fibroblastach nietransdukowanych (HSF) oraz po transdukcji w komórkach HSF-E1, HSF-E2 i HSF-E3. Wyniki przedstawiono jako średnią z 8 pomiarów. Poniżej przedstawiono wartości  $p$ .

**HSF vs HSF-E1**  
**3,5E-10**

**HSF vs HSF-E2**  
**1,3E-4**

**HSF vs HSF-E3**  
**2,5E-10**

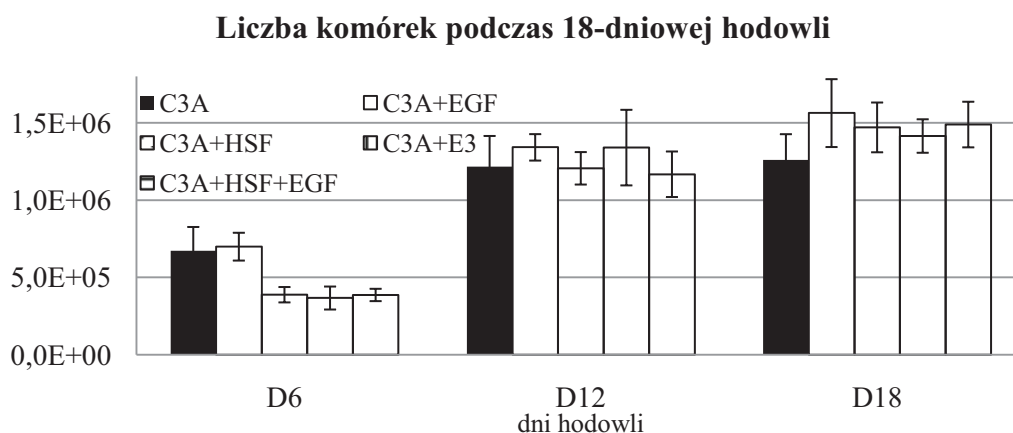
### 5.6 Badanie kokultury komórek wątrobowych z izolowanymi ludzkimi fibroblastami nadprodukującymi EGF

Jeżeli nie zaznaczono inaczej, wyniki podawane są w formie średniej i odchylenia standardowego. Analiza statystyczna przeprowadzona była w programie Statistica z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA. Różnice między grupami analizowane były z wykorzystaniem testu *post-hoc* Duncana. Wartości  $p \leq 0,05$  uznano za statystycznie istotne.

#### 5.6.1 Ocena wpływu komórek podtrzymujących hodowlę na komórki wątrobowe – tempo proliferacji i żywotność komórek

Podczas 18-dniowej hodowli największą liczbę komórek zanotowano w monokulturze C3A suplementowanej 10 ng/ml EGF (istotnie statystycznie jedynie w D18 w porównaniu do monokultury C3A –  $p=0,0015$ ). W szóstym dniu hodowli różnice między liczbą komórek są widoczne – monokultura C3A i monokultura C3A suplementowana 10 ng/ml EGF osiągają najwyższe wartości (odpowiednio ok. 673 tys.

i 700 tys.) w porównaniu do kokultur (średnio ok. 380 tys.). W dwunastym dniu hodowli różnice te zacierają się, a w dniu osiemnastym komórek w monokulturze C3A jest najmniej (Rysunek 5.35).

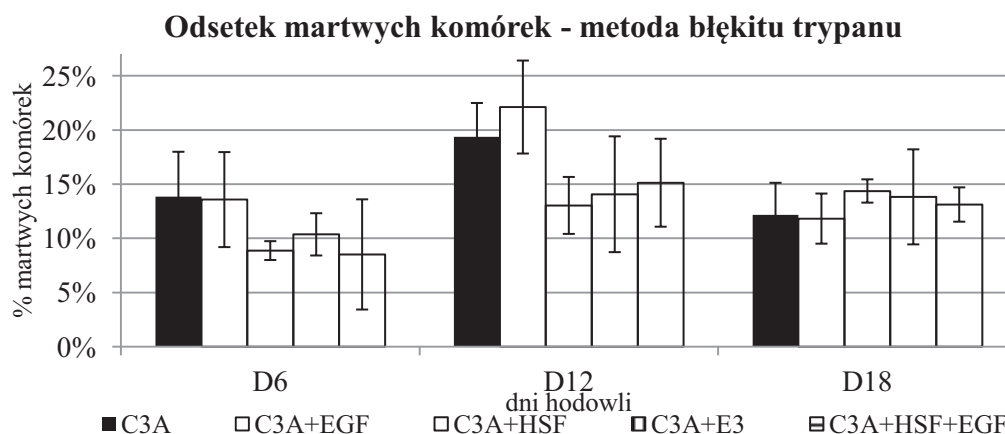


Rysunek 5.35 Porównanie liczby komórek w monokulturach i kokulturach w szóstym, dwunastym i osiemnastym dniu hodowli. Słupki czarne – monokultura C3A, słupki białe – monokultura C3A suplementowana 10 ng/ml EGF, słupki z kropkami – kokultura C3A z HSF, słupki z liniami pionowymi – kokultura C3A z HSF-E3, słupki z liniami poziomymi – kokultura C3A z HSF suplementowana 10 ng/ml EGF. Komórki liczone były z 4 niezależnych powtórzeń. Wartości *p* podano poniżej.

<b>D6</b>	<b>C3A</b>	<b>C3A+EGF</b>	<b>C3A+HSF</b>	<b>C3A+E3</b>	<b>C3A+HSF+EGF</b>
C3A	-	0,459	<b>1,1E-04</b>	<b>5,2E-05</b>	<b>5,9E-05</b>
C3A+EGF	-	-	<b>5,9E-05</b>	<b>3,3E-05</b>	<b>5,2E-05</b>
C3A+HSF	-	-	-	0,577	0,963
C3A+E3	-	-	-	-	0,582
C3A+HSF+EGF	-	-	-	-	-
<b>D12</b>	<b>C3A</b>	<b>C3A+EGF</b>	<b>C3A+HSF</b>	<b>C3A+E3</b>	<b>C3A+HSF+EGF</b>
C3A	-	0,079	0,866	0,068	0,484
C3A+EGF	-	-	0,064	0,980	<b>0,020</b>
C3A+HSF	-	-	-	0,059	0,562
C3A+E3	-	-	-	-	<b>0,018</b>
C3A+HSF+EGF	-	-	-	-	-
<b>D18</b>	<b>C3A</b>	<b>C3A+EGF</b>	<b>C3A+HSF</b>	<b>C3A+E3</b>	<b>C3A+HSF+EGF</b>
C3A	-	<b>1,5E-04</b>	<b>0,003</b>	<b>0,021</b>	<b>0,002</b>
C3A+EGF	-	-	0,291	0,073	0,398
C3A+HSF	-	-	-	0,395	0,778
C3A+E3	-	-	-	-	0,288
C3A+HSF+EGF	-	-	-	-	-

Żywotność komórek podczas 18-dniowej hodowli oceniana była przy pomocy barwienia z użyciem błękitu trypanu, który wnika do komórek z uszkodzoną błoną komórkową. Odsetek martwych komórek w szóstym i dwunastym dniu hodowli był niższy we wszystkich typach kokultur w porównaniu do monokultur C3A (nieznaczący

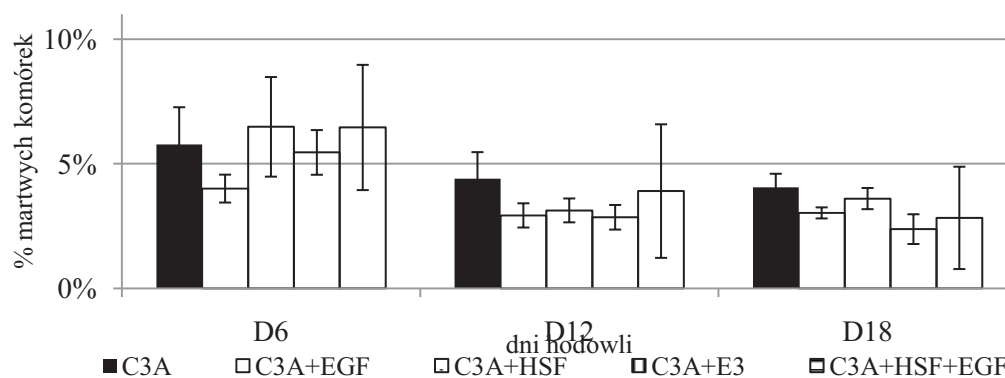
statystycznie w D6). W osiemnastym dniu odsetek martwych komórek wyrównał się we wszystkich typach hodowli (Rysunek 5.36).



Rysunek 5.36. Porównanie odsetka martwych komórek w monokulturach i kokulturach w szóstym, dwunastym i osiemnastym dniu hodowli. Słupki czarne – monokultura C3A, słupki białe – monokultura C3A suplementowana 10 ng/ml EGF, słupki z kropkami – kokultura C3A z HSF, słupki z liniami pionowymi – kokultura C3A z HSF-E3, słupki z liniami poziomymi – kokultura C3A z HSF suplementowana 10 ng/ml EGF. Komórki liczone były z 4 niezależnych powtórzeń. Poniżej podano wartości *p*.

D12	C3A	C3A+EGF	C3A+HSF	C3A+E3	C3A+HSF+EGF
C3A	-	0,347	0,056	0,095	0,155
C3A+EGF	-	-	<b>0,010</b>	<b>0,018</b>	<b>0,032</b>
C3A+HSF	-	-	-	0,721	0,494
C3A+E3	-	-	-	-	0,713
C3A+HSF+EGF	-	-	-	-	-

**Odsetek martwych komórek - metoda jodku propidyny**

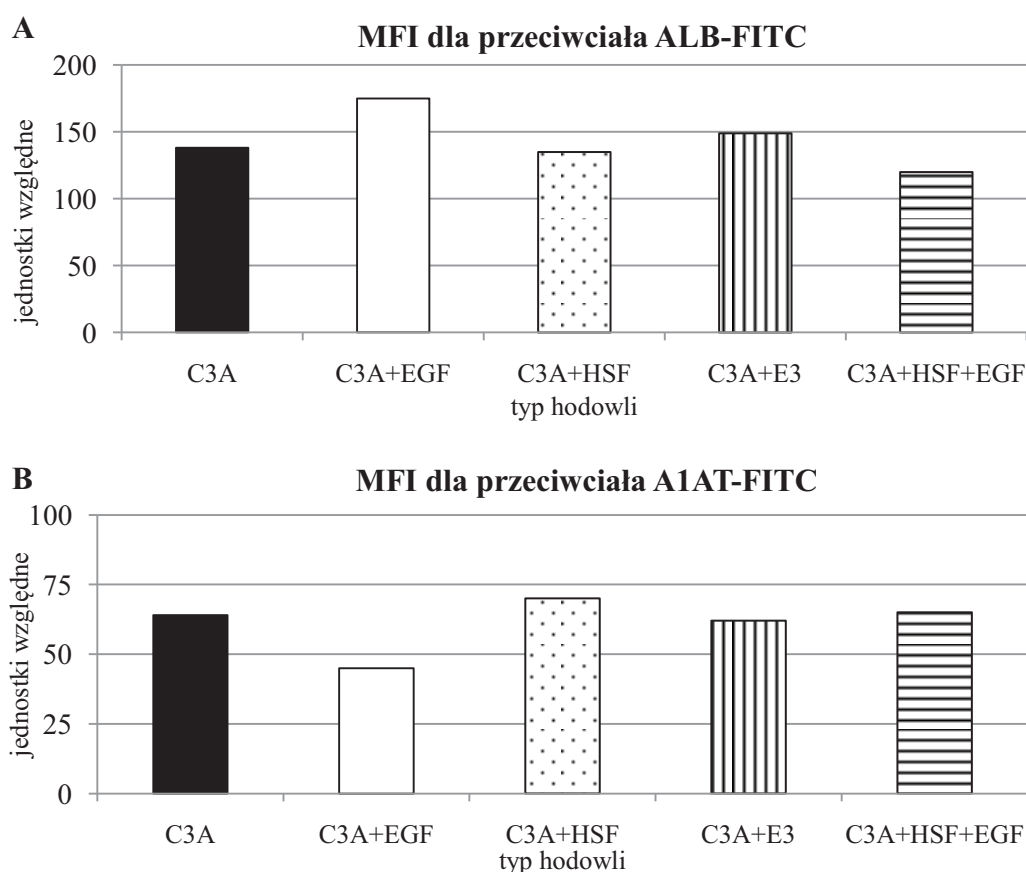


Rysunek 5.37. Porównanie odsetka martwych komórek w monokulturach i kokulturach w szóstym, dwunastym i osiemnastym dniu hodowli. Słupki czarne – monokultura C3A, słupki białe – monokultura C3A suplementowana 10 ng/ml EGF, słupki z kropkami – kokultura C3A z HSF, słupki z liniami pionowymi – kokultura C3A z HSF-E3, słupki z liniami poziomymi – kokultura C3A z HSF suplementowana 10 ng/ml EGF. Komórki liczone były z 4 niezależnych powtórzeń i analizowane przy pomocy cytometru przepływowego.

Żywotność komórek podczas 18-dniowej hodowli oceniana była również metodą cytometrii przepływowej z użyciem jodku propidyny, który także wnika do komórek z uszkodzoną błoną komórkową, barwiąc je. Odsetek martwych komórek nie różnił się znacząco we wszystkich typach hodowli (Rysunek 5.37).

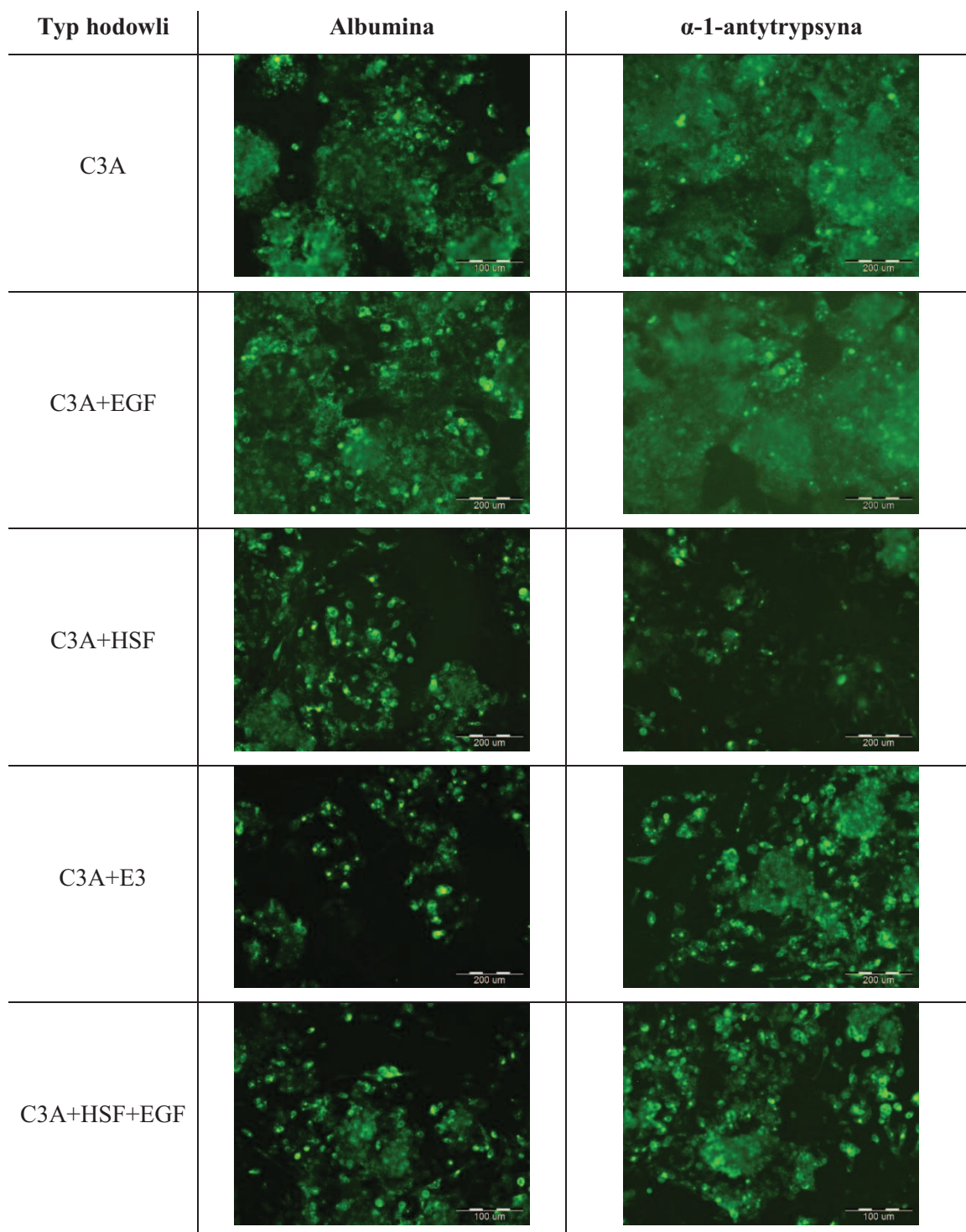
### 5.6.2 Ocena wpływu komórek podtrzymujących hodowlę na komórki wątrobowe - badania markerów komórkowych

Analiza cytometryczna markerów komórkowych specyficznych dla komórek C3A nie wykazała znaczących różnic w odsetku komórek je produkujących w zależności od rodzaju hodowli. Może być to spowodowane ograniczeniami, z jakimi wiąże się ta metoda, np. stosunkowo wysoki punkt progowy, od którego komórka produkująca dane białko jest uznawana za pozytywną. Z kolei najwyższą wartość parametru MFI dla albuminy zanotowano w monokulturze C3A suplementowanej 10 ng/ml EGF i w kokulturze z HSF-E3, a dla  $\alpha$ -1-antytrypsyny w kokulturze z HSF (Rysunek 5.38).



Rysunek 5.38. Porównanie parametru MFI dla przeciwciała ALB-FITC (panel górny – A) i A1AT-FITC (panel dolny – B) w komórkach C3A w różnych typach hodowli. Medianę natężenia fluorescencji przedstawiono w jednostkach względnych jako różnicę między próbką badaną a właściwą dla niej kontrolą.

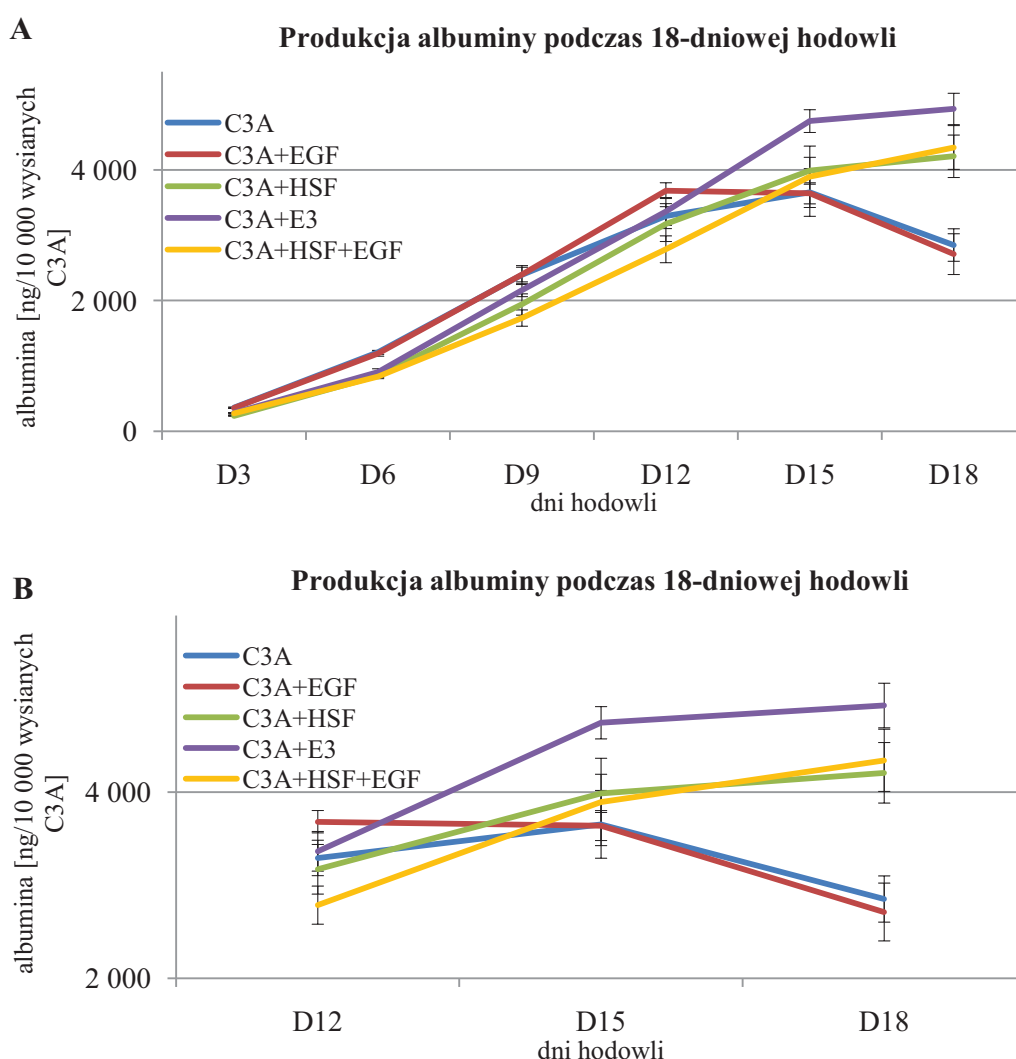
Obserwacje mikroskopowe potwierdziły obecność markerów charakterystycznych dla komórek pochodzenia wątrobowego – albuminy i  $\alpha$ -1-antytrypsyny we wszystkich typach hodowli (Rysunek 5.39).



Rysunek 5.39 Markery charakterystyczne dla komórek linii C3A – albumina (lewy panel) i  $\alpha$ -1-antytrypsyna (prawy panel) w różnych typach hodowli po 9 dniach od wysiania. Skala 200  $\mu$ m.

### 5.6.3 Ocena wpływu komórek podtrzymujących hodowlę na komórki wątrobowe – oznaczanie zawartości albuminy metodą ELISA

Test immunoenzymatyczny ELISA pozwala na określenie ilościowej produkcji białka. Porównana została produkcja albuminy w komórkach C3A w monokulturze i monokulturze suplementowanej 10 ng/ml EGF oraz kokulturach z: fibroblastami, modyfikowanymi fibroblastami HSF-E3 i fibroblastami suplementowanymi 10 ng/ml EGF. Próbkę medium pochodzącego z hodowli zbierano co trzy dni i przeliczano na wyjściową liczbę komórek. Dodatkowo, w dniu szóstym, dwunastym i osiemnastym, ilość albuminy została przeliczona na faktyczną liczbę komórek.



Rysunek 5.40. Porównanie produkcji albuminy oznaczanej metodą ELISA w komórkach wątrobowych w różnych typach hodowli. A – w trakcie całej 18-dniowej hodowli, B – od dnia dwunastego. Próbkę zbierano co trzy dni z 4 niezależnych dołków, z których wykonano po 3 pomiary. W Tabeli 5.7 przedstawiono wartości *p*.

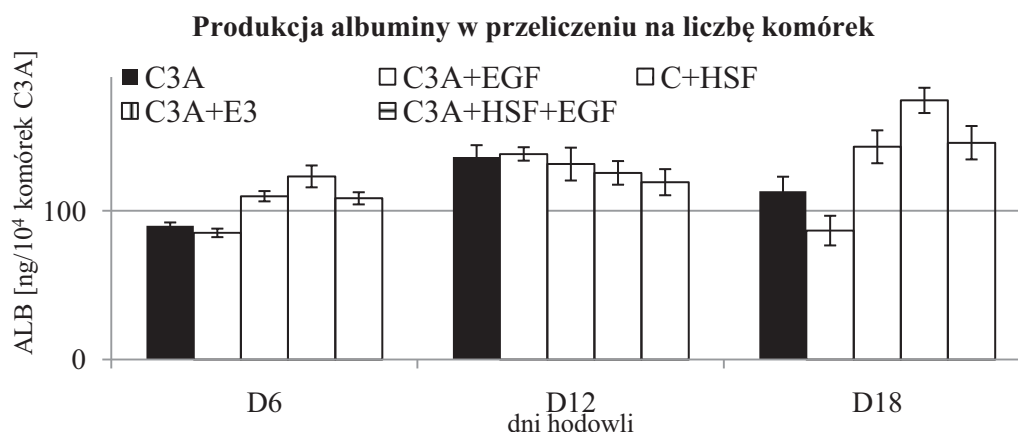


Tabela 5.7 Zestawienie wartości  $p$  (istotności statystycznej) dla produkcji albuminy w monokulturach i kokulturach C3A.

<b>D12</b>	<b>C3A</b>	<b>C3A+EGF</b>	<b>C3A+HSF</b>	<b>C3A+E3</b>	<b>C3A+HSF+EGF</b>
C3A	-	<b>0,021</b>	0,413	0,628	<b>0,004</b>
C3A+EGF	-	-	<b>0,005</b>	<b>0,044</b>	<b>6,8E-05</b>
C3A+HSF	-	-	-	0,224	<b>0,018</b>
C3A+E3	-	-	-	-	<b>0,002</b>
C3A+HSF+EGF	-	-	-	-	-
<b>D15</b>	<b>C3A</b>	<b>C3A+EGF</b>	<b>C3A+HSF</b>	<b>C3A+E3</b>	<b>C3A+HSF+EGF</b>
C3A	-	0,950	0,158	<b>2,6E-04</b>	0,276
C3A+EGF	-	-	0,153	<b>2,5E-04</b>	0,275
C3A+HSF	-	-	-	<b>0,003</b>	0,670
C3A+E3	-	-	-	-	<b>0,002</b>
C3A+HSF+EGF	-	-	-	-	-
<b>D18</b>	<b>C3A</b>	<b>C3A+EGF</b>	<b>C3A+HSF</b>	<b>C3A+E3</b>	<b>C3A+HSF+EGF</b>
C3A	-	0,513	<b>1,7E-04</b>	<b>6,2E-05</b>	<b>9,1E-05</b>
C3A+EGF	-	-	<b>9,1E-05</b>	<b>3,7E-05</b>	<b>6,3E-05</b>
C3A+HSF	-	-	-	<b>0,005</b>	0,528
C3A+E3	-	-	-	-	<b>0,013</b>
C3A+HSF+EGF	-	-	-	-	-

Największą całkowitą produkcję albuminy w komórkach C3A zaobserwowano w kokulturach, zwłaszcza w kokulturze z HSF-E3, a najmniejszą w obydwu monokulturach C3A (Rysunek 5.40 A). Począwszy od dnia dwunastego zaobserwowano zmianę w dynamice produkcji albuminy. Zanotowano niewielkie przyrosty poziomu tego białka w medium zebrany w monokulturach, a w ostatnich dniach hodowli – jego spadek. Zupełnie inaczej wyglądało to w kokulturach, gdzie we wszystkich punktach pomiarowych obserwowano wzrost poziomu albuminy – najwięcej w kokulturze z HSF-E3 (Rysunek 5.40 B)

Analiza ilości albuminy w przeliczeniu na faktyczną liczbę komórek pozwoliła na bardziej precyzyjną obserwację zmian produkcji tego białka. Różnice, widoczne na poprzednich wykresach, stały się wyraźniejsze – w osiemnastym dniu hodowli produkcja albuminy jest znacznie większa w warunkach kokultury, a największa w kokulturze z HSF-E3 ( $p=0,0009$  w porównaniu do monokultury C3A). Co ciekawe, produkcja albuminy w monokulturze suplementowanej 10 ng/ml EGF spadła istotnie pod koniec hodowli (Rysunek 5.41).

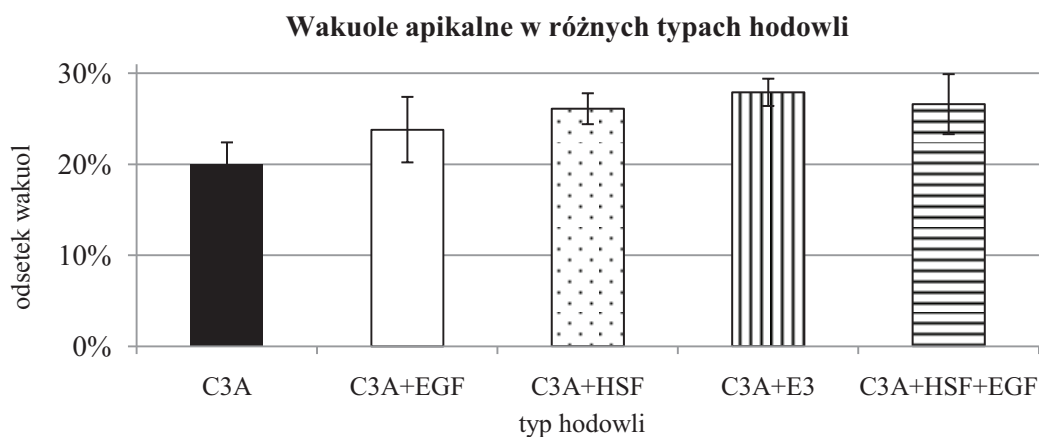


Rysunek 5.41. Porównanie produkcji albuminy oznaczanej metodą ELISA w komórkach wątrobowych w przeliczeniu na faktyczną liczbę komórek w różnych typach hodowli. Słupki czarne – monokultura C3A, słupki białe – monokultura C3A suplementowana 10 ng/ml EGF, słupki z kropkami – kokultura C3A z HSF, słupki z liniami pionowymi – kokultura C3A z HSF-E3, słupki z liniami poziomymi – kokultura C3A z HSF suplementowana 10 ng/ml EGF. Próbkę zbierano co trzy dni z 4 niezależnych dołków, z których wykonano po 3 pomiary. Poniżej przedstawiono wartości *p*.

<b>D6</b>	<b>C3A</b>	<b>C3A+EGF</b>	<b>C3A+HSF</b>	<b>C3A+E3</b>	<b>C3A+HSF+EGF</b>
C3A	-	0,391	<b>0,042</b>	<b>0,001</b>	<b>0,035</b>
C3A+EGF	-	-	<b>0,009</b>	<b>3,2E-04</b>	<b>0,007</b>
C3A+HSF	-	-	-	0,084	0,837
C3A+E3	-	-	-	-	0,103
C3A+HSF+EGF	-	-	-	-	-
<b>D12</b>	<b>C3A</b>	<b>C3A+EGF</b>	<b>C3A+HSF</b>	<b>C3A+E3</b>	<b>C3A+HSF+EGF</b>
C3A	-	0,878	0,657	0,435	0,212
C3A+EGF	-	-	0,573	0,370	0,175
C3A+HSF	-	-	-	0,699	0,377
C3A+E3	-	-	-	-	0,579
C3A+HSF+EGF	-	-	-	-	-
<b>D18</b>	<b>C3A</b>	<b>C3A+EGF</b>	<b>C3A+HSF</b>	<b>C3A+E3</b>	<b>C3A+HSF+EGF</b>
C3A	-	<b>0,026</b>	<b>0,008</b>	<b>9,6E-05</b>	<b>0,008</b>
C3A+EGF	-	-	<b>1,6E-04</b>	<b>3,8E-05</b>	<b>1,4E-04</b>
C3A+HSF	-	-	-	<b>0,011</b>	0,914
C3A+E3	-	-	-	-	<b>0,011</b>
C3A+HSF+EGF	-	-	-	-	-

#### 5.6.4 Ocena wpływu komórek podtrzymujących hodowlę na komórki wątrobowe – polaryzacja komórek

Komórki linii C3A w kokulturze z fibroblastami nadprodukcją epidermalny czynnik wzrostu wytwarzały znacznie więcej wakuol apikalnych w porównaniu do innych typów hodowli, zwłaszcza monokultury C3A (Rysunek 5.42).

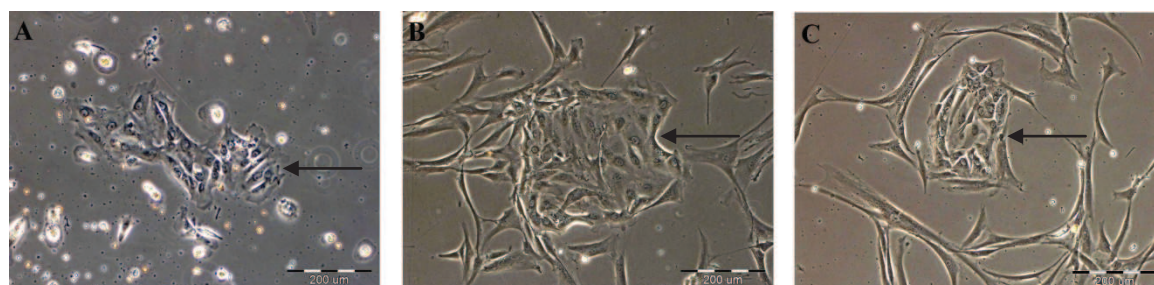


Rysunek 5.42. Odsetek wakuoli apikalnych w monokulturach C3A i C3A suplementowanej 10 ng/ml EGF oraz w kokulturach z HSF, HSF-E3 i HSF suplementowanej 10 ng/ml EGF po 9 dniach hodowli. Słupki czarne – monokultura C3A, słupki białe – monokultura C3A suplementowana 10 ng/ml EGF, słupki z kropkami – kokultura C3A z HSF, słupki z liniami pionowymi – kokultura C3A z HSF-E3, słupki z liniami poziomymi – kokultura C3A z HSF suplementowana 10 ng/ml EGF. Przedstawione wartości są średnią z 5 zdjęć z każdego typu hodowli. Poniżej przedstawiono wartości *p*.

	C3A	C3A+EGF	C3A+HSF	C3A+E3	C3A+HSF+EGF
C3A	-	<b>0,032</b>	<b>0,002</b>	<b>2,9E-04</b>	<b>0,001</b>
C3A+EGF	-	-	0,185	<b>0,036</b>	0,133
C3A+HSF	-	-	-	0,333	0,745
C3A+E3	-	-	-	-	0,449
C3A+HSF+EGF	-	-	-	-	-

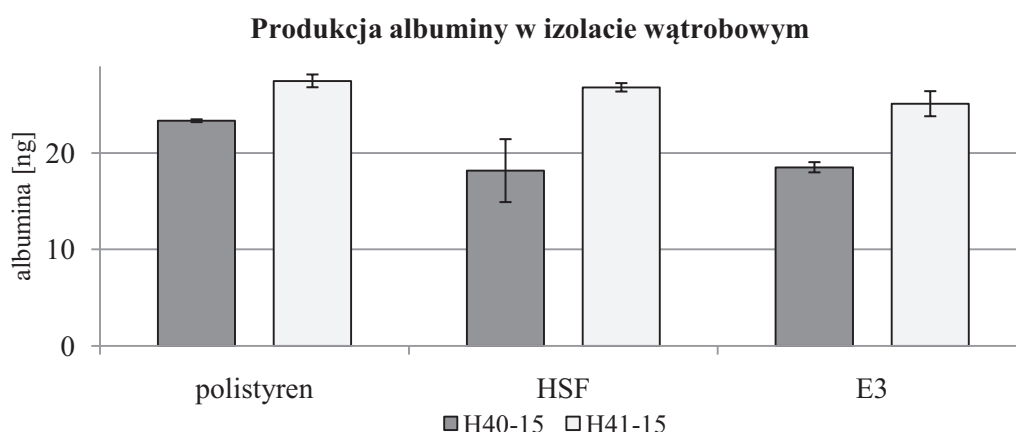
### 5.7 Badanie kokultury komórek izolatu wątrobowego z izolowanymi ludzkimi fibroblastami nadprodukującymi EGF

Podjęto próby hodowli komórek izolatu wątrobowego w kokulturze z ludzkimi fibroblastami nadprodukującymi EGF. Komórki wątrobowe, niezależnie od typu hodowli, przyjęły po kilku dniach od wysiania wielościenny, płaski kształt (Rysunek 5.43).



Rysunek 5.43. Morfologia komórek izolowanych z ludzkiej wątroby na zwykłym podłożu hodowlanym (A) oraz w kokulturze z HSF (B) i HSF-E3 (C). Strzałki wskazują komórki wyizolowane z wątroby ludzkiej. Skala 200  $\mu$ m.

Poziom albuminy zmierzony po 48 lub 96 godzinach od izolacji nie przekroczył 30 ng, a po 5 dniach hodowli był niewykrywalny (Rysunek 5.44). W tym wypadku kokultura z fibroblastami (modyfikowanymi lub nie) nie wpłynęła pozytywnie na produkcję albuminy. Ze względu na małą liczbę komórek niemożliwe było przeprowadzenie innych testów – analizy cytometrycznej lub znakowania immunofluorescencyjnego. Być może zmiana układu hodowlanego, np. hodowla w opracowywanym w Zakładzie mikrobioreaktorze przepływowym, pozwoliłaby na zachowanie produkcji albuminy przez dłuższy okres.



Rysunek 5.44. Produkcja albuminy w komórkach izolowanych z wątroby po dwóch (H40-15) i trzech dniach (H41-15) hodowli. Poziom albuminy w dniu piątym był zbyt niski, aby mógł być wykryty testem ELISA. Próbkę zbierano z 2 niezależnych dołków, z których wykonano po 3 pomiary. Poniżej podano wartości *p*.

<b>H40-15</b>	<b>polistyren</b>	<b>HSF</b>	<b>E3</b>
polistyren	-	<b>1,5E-04</b>	<b>2,5E-04</b>
HSF	-	-	0,711
E3	-	-	-

<b>H41-15</b>	<b>polistyren</b>	<b>HSF</b>	<b>E3</b>
polistyren	-	0,240	<b>8,9E-04</b>
HSF	-	-	<b>0,008</b>
E3	-	-	-

## 6. Dyskusja

Największym problemem podczas hodowli izolowanych ludzkich hepatocytów jest szybkie i nieodwracalne odróżnicowanie się, połączone z utratą charakterystycznych dla nich funkcji. Już po kilku-kilkunastu dniach *in vitro* dochodzi do zmniejszenia produkcji albuminy, znacznego obniżenia przekształcania amoniaku w mocznik oraz ograniczenia aktywności cytochromu P450 [Katsura, 2002]. Podejmowane były próby modyfikacji hodowli (zmiana składu medium hodowlanego, kokultury, hodowle 3D itd.) oraz użycie różnych typów komórek jako zamienników dla hepatocytów [Dong, 2008; Khetani, 2008; Ijima, 2010; Tomizawa, 2015]. Jednakże, zastosowanie żadnej z przedstawionych wyżej metod nie zakończyło się pełnym sukcesem. Niewystarczająca liczba narządów do przeszczepów, a także problemy z częścią biologiczną biosztucznych wątrób, skłoniły do poszukiwania innych rozwiązań, z których najlepszym byłaby możliwość prowadzenia długotrwałej hodowli ludzkich hepatocytów z zachowaniem ich funkcji przez okres wystarczający do zastosowania ich u pacjentów. Próbę ustanowienia takiej hodowli podjęto w opisanych tu badaniach z wykorzystaniem genetycznie zmodyfikowanych fibroblastów ludzkich jako komórek podtrzymujących.

### 6.1 Porównanie metod izolacji (w tym typów kolagenazy) fragmentów ludzkich resekowanych wątrób

Izolacja hepatocytów jest procesem czaso- i kosztochłonnym, a także logistycznie wymagającym (zgoda Komisji Bioetycznej, bliskość szpitala, nawiązanie współpracy z lekarzami itd.). Wciąż jednak utrzymuje się duże zapotrzebowanie na wysokiej jakości hepatocyty ludzkie (narzędzie do badań nad cytotoksycznością leków, część biologiczna biosztucznej wątroby, przeszczep hepatocytów). Porównanie metody podwójnej perfuzji (P) z metodą maceracji (M) udoskonaloną w naszej Pracowni wykazało, że hepatocyty ludzkie izolowane metodą maceracji charakteryzują się wyższą żywotnością (P: 79,0%, M: 97,3%), a ponadto uzyskuje się ich więcej (P: 0,85 mln/g, M: 3,3 mln/g). Na podstawie danych literaturowych można określić wydajność procesu izolacji metodą podwójnej perfuzji w zakresie 0,7-13 mln/g, natomiast żywotność izolowanych komórek jest przeważnie niższa [Donini, 2001; Baccarani, 2003; Łaba, 2005; Kawahara, 2010; Gramignoli, 2012]. Dane przedstawione w rozprawie znajdują się w dolnym przedziale

wydajności izolacji, należy jednak zwrócić uwagę na wiele zmiennych wpływających na ten proces (pochodzenie tkanki, rodzaj kolagenazy, dokładna procedura itd.) oraz wysoką żywotność otrzymywanych komórek.

Modyfikacje metody maceracji zastosowane podczas izolacji hepatocytów ludzkich nie wpłynęły w znaczący sposób na jej wydajność, ani na żywotność komórek. Pozwoliły natomiast na znaczne skrócenie czasu procedury (M3). Również porównanie dwóch typów kolagenazy (I i XI) nie wykazało różnic między nimi. Dostępne na rynku produkty przeznaczone do izolacji hepatocytów ludzkich (np. tu nie testowany *Clzyme*), charakteryzują się podobną wydajnością, ale niższą żywotnością komórek. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że etapem, który ma znaczący wpływ na jakość otrzymywanego preparatu jest zastosowanie Percollu do wirowania komórek po izolacji. Pozwala to na oczyszczenie izolatu z pozostałości komórkowych oraz mniejszych komórek nieparenchymalnych i uzyskanie lepszej jakościowo zawiesiny komórek wątrobowych. Percoll (lub inna substancja o podobnych właściwościach) jest szeroko stosowany podczas izolacji komórek z wątroby [Bhagal, 2011].

## **6.2 Oznaczenie markerów charakterystycznych dla różnych populacji komórek izolatu wątrobowego**

Analiza cytometryczna komórek izolowanych z ludzkich wątrób jest metodą oryginalną, powstającą w naszej Pracowni. Rozwijana jest w celu opracowania procedury użytecznej klinicznie. W preparatach izolowanych z fragmentów ludzkich wątrób, poddanych analizie cytometrycznej, wyróżniono kilka populacji, do których zaliczają się różne typy komórek zasiedlających tkankę wątrobową. Liczba tych populacji była zmienna – zawsze pojawiały się dwie określone jako P2 (hepatocyty) i P3 (komórki CD45-pozytywne), a dodatkowo występowały również populacje P4 (typowy marker nie został wyodrębniony) i P5 (CD14-pozytywne). Nie znaleziono jednak zależności pomiędzy liczbą występujących populacji a wiekiem, płcią lub stosowaniem chemioterapii u osób, od których pochodziły analizowane fragmenty.

Wielkość populacji P2 (hepatocyty, komórki ALB+ i A1AT+) była różna u kobiet przed i po 60 r.ż. po zastosowaniu chemioterapii. W preparatach kobiet młodszych populacja P2 była znacznie większa niż u kobiet starszych, co może świadczyć o zmniejszaniu się populacji hepatocytów w wątrobie wraz z wiekiem lub o negatywnym wpływie chemioterapii na kobiety starsze. W przypadku fragmentów pochodzących od młodych (do 60 r.ż.) osób po chemioterapii zaobserwowano, że wielkość populacji P2 jest



znacznie większa u kobiet niż u mężczyzn – być może chemioterapia wpływa na liczbę hepatocytów silniej w grupie młodych mężczyzn i starszych kobiet. Analiza populacji P3 (komórki CD45+, w większości komórki Browicza-Kupffera) wykazała odwrotną, niż opisywana wyżej, zależność. Kobiety poddane chemioterapii przed 60 r.ż. charakteryzowały się znacznie mniejszym odsetkiem komórek populacji P3 niż kobiety po 60 r.ż. Zaobserwowano również wzrost wielkości populacji P3 u młodych mężczyzn po chemioterapii (w porównaniu do analogicznej grupy kobiet). Można przypuszczać więc, że z jakiś przyczyn związanych z wiekiem, dochodzi do zmiany proporcji hepatocytów i komórek CD45+ w wątrobie osób poddanych chemioterapii.

Najpowszechniej stosowanym markerem hepatocytów jest albumina. Na jej podstawie przeprowadzono porównanie, jakie parametry mogą wpływać na liczbę hepatocytów. Odsetek komórek ALB+ pochodzących od kobiet był istotnie niższy niż komórek pochodzących od mężczyzn (analiza przeprowadzona na populacji z wyłączeniem grupy dawców, gdzie narządy odrzucono ze względu na ich jakość). W wątrobie kobiet może znajdować mniej hepatocytów lub mogą one produkować mniej albuminy, przez co przeciwciało zastosowane podczas analizy może być za mało czułe.

Wpływ wieku na liczbę hepatocytów był opisywany już wyżej, jednak należy dodać, że porównanie komórek pochodzących od kobiet i mężczyzn po 60 r.ż. nie wykazało różnic w odsetku komórek ALB+, natomiast były one widoczne podczas porównania preparatów pochodzących od kobiet i mężczyzn przed 60 r.ż. (na korzyść mężczyzn). Co ciekawe, komórki izolowane od mężczyzn młodszych miały większy odsetek komórek ALB+ niż te od mężczyzn starszych. Taką samą tendencję zaobserwowano podczas analizy komórek A1AT+.

Praca Kawahary i wsp. z 2010 r. podkreśla znaczenie ischemii (czyli czasu pomiędzy wycięciem tkanki a rozpoczęciem izolacji) i wieku osób, od których były pobierane fragmenty wątroby. Wydłużenie czasu ciepłej ischemii obniżało żywotność izolowanych komórek. Podobny wpływ miał zwiększający się wiek pacjentów [Kawahara, 2010]. Wnioski te tylko częściowo pokrywają się z opisywanymi w niniejszej rozprawie. Istotne obniżenie żywotności obserwowano jedynie w populacji kobiet, jednak różnica median wynosiła jedynie 1,6%. Dane dotyczące czasu ciepłej ischemii nie były gromadzone. Wiek wpływał jednak znacząco na wielkość populacji P2 (hepatocyty) i P3 (komórki CD45+) w populacji kobiet.

Praca opublikowana rok później przez Bhogala i wsp. przedstawiała okres pomiędzy hepatektomią a rozpoczęciem perfuzji jako najważniejszy czynnik wpływający

na wydajność izolacji hepatocytów ludzkich. Ponadto autorzy sugerowali skrócenie czasu inkubacji z kolagenazą do niezbędnego minimum [Bhagal, 2011]. Bliskość Szpitala Klinicznego zapewniła możliwie najkrótszy czas pomiędzy wycięciem tkanki a rozpoczęciem izolacji, nieprzekraczający zwykle 30 minut. Z kolei modyfikacje metody maceracji (M1-M3) opisane w tej rozprawie polegały m.in. na skróceniu czasu inkubacji tkanki z enzymem. Nie uzyskano jednak istotnego zwiększenia żywotności komórek czy wydajności izolacji.

Różnice w działaniu hepatocytów w zależności od płci zaobserwowano również w przypadku aktywności cytochromu P450. Hepatocyty szczurze izolowane od samic i samców reagują odmiennie na działanie ksenobiotyków. Aktywność izoformy CYP3A4 cytochromu P450 u samców może 7-krotnie przewyższać wartości obserwowane u samic [Bogaards, 2000]. Podobną tendencję wykazują hepatocyty ludzkie. W pracy z 2015 r. Mennecozzi i wsp. pokazano, że hepatocyty kobiet są bardziej podatne na działanie ksenobiotyków niż hepatocyty mężczyzn [Mennecozzi, 2015]. Także w przypadku naszych badań odsetek hepatocytów ALB+ był niższy u kobiet niż u mężczyzn (obie grupy poddane chemioterapii), co może świadczyć o niższej tzw. rezerwie regeneracyjnej wątroby kobiet.

Na podstawie wyżej opisanych wyników zaproponowano zestawienie źródeł hepatocytów ludzkich, pozyskiwanych z fragmentów otrzymanych z resekcji wątroby lub z odrzuconych dawców wątroby. Najlepszymi parametrami charakteryzowały się komórki pochodzące od mężczyzn przed 60 r.ż., u których nie stosowano chemioterapii oraz od mężczyzn przed 60 r.ż., u których stosowano chemioterapię. Najniższe parametry zaobserwowano u kobiet po 60 r.ż., u których stosowano chemioterapię. Tak więc wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie stanowią zbiór interesujących klinicznie obserwacji.

### **6.3 Badanie kokultury komórek wątrobowych z izolowanymi ludzkimi fibroblastami produkującymi białka fluorescencyjne (EGFP i DsRed2)**

Wprowadzenie do izolowanych ludzkich fibroblastów genów kodujących białka fluorescencyjne nie wpłynęło negatywnie na ich funkcjonowanie. Analiza żywotności (test z jodkiem propidyny i test MTT) wykazała niewielkie obniżenie parametrów lub nawet ich wzrost. Większy wpływ na fibroblasty miało białko DsRed2, które zostało opisane jako potencjalnie cytotoksyczne [Waldeck, 2012; Zakrzewska, 2014]. Pod wpływem światła widzialnego może prowadzić do powstania wolnych rodników tlenowych i śmierci komórek [Waldeck, 2009]. Jest zdolne również do hamowania

translacji białka z rodziny Bcl-2, a tym samym promocji apoptozy [Zhou, 2011]. Toksyczność EGFP jest mniej rozpoznana, jednak należy wspomnieć o skłonności do agregacji i wiązania się do innych białek w komórce, np. miozyny w mięśniach [Agbulut, 2007].

Wykorzystanie przez nasz Zespół fibroblastów ludzkich produkujących białka fluorescencyjne do hodowli z komórkami C3A umożliwiło opracowanie narzędzia do obserwacji i analizy zmian występujących w kokulturze. W tym typie hodowli dużą rolę odgrywają zarówno oddziaływania homo- jak i heterotypowe. Dzięki użyciu komórek produkujących białka EGFP lub DsRed2 ułatwione było obliczanie liczby i powierzchni wysp złożonych z komórek hepatomy otoczonych fibroblastami. Wszystkie opisywane parametry, tj. liczba wysp, ich średnia i całkowita powierzchnia były różne w zależności od proporcji wysiania komórek C3A i HSF. Najmniejsze wyspy formowały się w proporcji 1:1 i tam właśnie oddziaływania heterotypowe były największe. Natomiast oddziaływania homotypowe największe były w kokulturze 4:1, czyli tam, gdzie wyspy zajmowały największą powierzchnię [Samluk, 2013]. O tym, jak ważne są oddziaływania heterotypowe i komórki *feeder layer* w hodowli komórek wątrobowych opublikowano wiele prac [Miyamoto, 2009; Cho, 2010; Leite, 2011].

Oznaczanie stężenia (test ELISA) i względnej produkcji albuminy (MFI w cytometrii przepływowej) potwierdziły pozytywny wpływ fibroblastów na komórki C3A. Im mniejsze były wyspy, a tym samym więcej oddziaływań heterotypowych, tym produkcja albuminy była wyższa [Samluk, 2013]. Izolowane ludzkie fibroblasty wpływały również pozytywnie na formowanie się *bile canaliculi*. Ich liczba była znacznie większa niż w monokulturze [wyniki niepublikowane], co potwierdzają liczne artykuły [Nishikawa, 2008; Cho, 2010; Kobayashi, 2013; Tamai, 2013]. Należy tutaj wspomnieć, że nie każdy typ komórek może być użyty jako komórki podtrzymujące hodowlę. Linia HOS, prawdopodobnie ze względu na znacznie większe tempo podziałów, nie wpłynęła pozytywnie na komórki C3A. Albumina po 16 dniach hodowli była prawie niewykrywalna. Również parametr MFI dla albuminy i  $\alpha$ -1-antytrypsyny był znacznie niższy niż w monokulturze.

#### **6.4 Badanie kokultury komórek wątrobowych z izolowanymi ludzkimi fibroblastami nadprodukującymi EGF**

Wprowadzenie do izolowanych ludzkich fibroblastów dodatkowej kopii genu kodującego epidermalny czynnik wzrostu nie wpłynęło negatywnie na ich

funkcjonowanie. Jedynie analiza aktywności mitochondrialnej (test MTT) wykazała jej kilkunastoprocentowy spadek w porównaniu do komórek nietransdukowanych. Obserwowane zmiany mogą mieć związek z wprowadzeniem do ich genomu dużego, znacznie większego niż w przypadku genów białek fluorescencyjnych, konstruktu i potencjalnym obciążeniem aparatu translacyjnego komórek.

Epidermalny czynnik wzrostu jest jednym z mitogenów hepatocytów o dobrze udokumentowanym działaniu. Wywołuje on transdukcję sygnału przez zmiany w receptorach błonowych, które prowadzą do syntezy DNA i proliferacji komórek [Kimura, 2011]. Pozwala on również wydłużyć okres, w jakim hepatocyty pozostają zróżnicowane *in vitro* i utrzymać przez kilkanaście dni produkcję albuminy czy aktywność cytochromu P450 [Guégan, 2012]. Hodowla komórek C3A z fibroblastami HSF-E3, w przeciwieństwie do monokultury suplementowanej 10 ng/ml EGF, nie wykazała wzrostu liczby komórek. Być może ilość EGF wydzielanego przez linię HSF-E3 była niewystarczająca do pobudzenia syntezy DNA w komórkach C3A lub podziały te były spowolnione przez obecność w hodowli komórek zajmujących dużą powierzchnię, jakimi są fibroblasty.

Metody pozwalające określić obecność dodatkowej kopii genu w modyfikowanych genetycznie komórkach HSF zarówno na poziomie DNA (PCR z wykorzystaniem specyficznych starterów), jak i białka (testy oparte na wiązaniu przeciwciał – ELISA i DotBlot) potwierdziły obecność zwiększonej produkcji epidermalnego czynnika wzrostu. Komórki pochodzenia wątrobowego (linia C3A) w hodowli z fibroblastami nadprodukującymi EGF (HSF-E3) charakteryzowały się zwiększonym wydzielaniem albuminy podczas 18-dniowej hodowli (w ostatnim dniu pomiarów o ponad 70% w porównaniu do monokultury C3A i o prawie 20% w porównaniu do kokultury z niemodyfikowanymi HSF). Co ważne w kontekście długoterminowej hodowli tych komórek, ilość albuminy wydzielanej do medium wciąż rosła w przeciwieństwie do stężenia zaobserwowanego w monokulturach, czego podłożem może być inhibicja kontaktowa komórek linii C3A. Liczba komórek albuminopozytywnych, określona na podstawie analizy cytometrycznej, była podobna. Pozytywny efekt kokultury z linią HSF-E3 odnotowano również przy formowaniu się *bile canaliculi*. Odsetek wakuol apikalnych był najwyższy w tym typie hodowli. Badania przeprowadzone na hepatocytach szczurzych potwierdzają pozytywny wpływ EGF na żywotność komórek, produkcję albuminy i przekształcanie amoniaku w mocznik [Na, 2015].

W przypadku hodowli komórek izolowanych z ludzkiej wątroby z fibroblastami niemodyfikowanymi lub charakteryzującymi się nadprodukcją EGF nie stwierdzono korzystnego wpływu na morfologię ani produkcję albuminy. Może to być związane z podstawowymi trudnościami z adhezją hepatocytów ludzkich do podłoża hodowlanego lub ze zbyt małą produkcją czynnika wzrostu przez fibroblasty. Badania te należy powtórzyć z wykorzystaniem linii HSF-E3 o ponad 90% zawartości komórek zmodyfikowanych (sortowanie na podstawie białka mCherry) oraz z wykorzystaniem innych układów hodowlanych (substancje zwiększające adhezję hepatocytów, hodowle w mikroprzepływie *etc.*).

Kokultura komórek pochodzenia wątrobowego z fibroblastami jako komórkami *feeder layer* ma pozytywny wpływ na ich funkcjonowanie. Zostało to potwierdzone, również przez nasz Zespół, wieloma badaniami z wykorzystaniem różnych typów komórek i układów hodowlanych. Również obecność epidermalnego czynnika wzrostu w warunkach *in vitro* korzystnie działa na komórki pochodzenia wątrobowego. Połączenie tych dwóch składników wydaje się być więc jednym z obiecujących rozwiązań problemu długotrwałej hodowli hepatocytów. Opisane, po raz pierwszy, w niniejszej rozprawie doświadczenia z wykorzystaniem genetycznie zmodyfikowanych fibroblastów ludzkich trwale nadprodukującymi EGF potwierdzają pozytywny wpływ zarówno oddziaływań heterotypowych (fibroblasty) jak i obecności w hodowli czynnika wzrostu (EGF). Ponadto wykorzystanie zmodyfikowanych fibroblastów wyklucza konieczność suplementacji medium, co jest udogodnieniem zarówno pod względem praco- jak i kosztochłonności prowadzonych eksperymentów.

## 7. Podsumowanie i wnioski

Jedyną w pełni skuteczną formą terapii krańcowej niewydolności wątroby jest jej allogeniczny przeszczep. Niestety, liczba dawców tego narządu jest niewystarczająca. Obecnie rozwijane są inne metody leczenia, w tym przeszczep hepatocytów oraz zewnątrzustrojowe wspomaganie przy użyciu systemów biosztucznych. Ograniczeniami metod alternatywnych są m.in. dostępność hepatocytów i utrata typowych dla nich funkcji w warunkach *in vitro*. W badaniach opisujących rozwiązania tych problemów można wyróżnić dwa kierunki – wykorzystanie komórek hepatocytopodobnych, szczególnie tych różnicowanych z iPSc oraz opracowanie metod długotrwałej hodowli hepatocytów. W niniejszej rozprawie przedstawiono wyniki dotyczące zarówno udoskonalonej metody pozyskiwania hepatocytów ludzkich jak i hodowli komórek wątrobowych z genetycznie modyfikowanymi komórkami podtrzymującymi.

Najczęściej stosowaną metodą izolacji komórek z wątrób ludzkich i zwierzęcych jest metoda podwójnej perfuzji (in. metoda Seglena). Polega ona na wykorzystaniu naturalnie występującej siatki naczyń krwionośnych do rozprowadzenia kolagenazy, przez co dochodzi do uwolnienia komórek z macierzy zewnątrzkomórkowej. Metoda maceracji, udoskonalona przez nasz Zespół, różni się głównie sposobem dostarczenia enzymu do tkanki oraz czasem trawienia. Fragmenty wątrób, pocięte na mniejsze kawałki, są zanurzane w roztworze kolagenazy i mieszane do momentu uwolnienia hepatocytów. Porównanie wydajności procesu (liczba komórek na 1 g tkanki) wskazało wyraźnie, że przy użyciu metody maceracji otrzymać można więcej komórek niż stosując podwójną perfuzję. Czas izolacji, wybrany eksperymentalnie, jest krótki, co pozwala na uzyskanie wysokiego odsetka żywych komórek. Oba te czynniki sprawiają, że metoda maceracji jest mniej czaso- i kosztochłonna niż metoda podwójnej perfuzji oraz wpływa pozytywnie na żywotność komórek po izolacji. Tym samym potwierdzona została I teza rozprawy o możliwości opracowania wydajniejszej i mniej szkodliwej dla komórek metodzie izolacji – maceracji w porównaniu do powszechnie stosowanej metody podwójnej perfuzji (metody Seglena).

Analiza cytometryczna służy do oceny wielu parametrów komórkowych – wielkości, ziarnistości, występowania markerów zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych oraz względnej produkcji białek na podstawie mediany natężenia fluorescencji (MFI). W przypadku ludzkich hepatocytów jest stosowana rzadko i zazwyczaj jako metoda



potwierdzająca fenotyp właściwy tym komórkom. Zastosowanie cytometru przepływowego do oceny izolatu wątrobowego pozwala na wyciągnięcie wielu interesujących wniosków. Na podstawie zależności opisujących wielkość komórek względem ich ziarnistości, wyodrębnione zostały populacje komórek występujące w izolacie wątrobowym (populacja P1). Poza hepatocytami, obecnymi w populacji P2, zawsze występowała populacja komórek nieparenchymalnych, określona jako populacja P3. Zarówno wielkość tych populacji, jak i ich wzajemny stosunek procentowy był zależny od wieku u kobiet poddanych chemioterapii. U pacjentek do 60 roku życia odsetek P2 względem wszystkich zdarzeń uznanych za komórki (P1) był wyższy niż u pacjentek powyżej 60 roku życia. Odwrotną zależność zaobserwowano w przypadku populacji P3 czyli niższy odsetek populacji P3 zanotowano u pacjentek przed 60 rokiem życia, a wyższy u pacjentek po 60 roku życia. Ponadto wnioskując na podstawie wiązania się komórek z przeciwciałem skierowanym przeciwko albuminie (ALB), stwierdzono, że populacja P2 w próbkach pochodzących od kobiet charakteryzowała się mniejszym odsetkiem komórek ALB-pozytywnych niż w próbkach pochodzących od mężczyzn z wyłączeniem dawców, których wątroby odrzucono ze względu na niską jakość. Różnica w produkcji albuminy w zależności od płci jest jeszcze bardziej widoczna w izolatach pochodzących od młodych kobiet i mężczyzn, a nie występuje u osób po 60 roku życia. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że kobiety charakteryzują się mniejszą tzw. rezerwą regeneracyjną hepatocytów, co może wynikać z właściwości samych komórek lub powstawać na skutek poddania pacjentek podczas leczenia niedostosowanymi dawkami chemioterapeutyków. Wyjaśnienie tego zjawiska wymaga jednak zebrania znacznie większej próby statystycznej niż ta opisana w rozprawie oraz szczegółowych danych na temat przebiegu leczenia pacjentów. Na podkreślenie zasługuje oryginalne zastosowanie cytometrii przepływowej do analizy izolatu ludzkich komórek wątrobowych jako wstępu do opracowania metody diagnostycznej.

Jednym z obecnie rozwijanych kierunków badawczych, dotyczących sposobów hodowli hepatocytów ludzkich, jest odtworzenie, możliwie jak najdokładniejsze, warunków panujących *in vivo*. Do tego celu służą hodowle zawierające wiele różnych typów komórek występujących w wątrobie, hodowle w warunkach dynamicznych – w przepływie, hodowle przestrzenne m.in. na biosztucznym rusztowaniu 3D czy też hodowle w decelularyzowanej wątrobie – biorusztowanie. Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie wskazują, że zastosowanie komórek podtrzymujących bardzo dobrze wpływa na funkcjonowanie komórek pochodzenia wątrobowego. Fibroblasty

izolowane z ludzkiej skóry, jako *feeder layer cells*, w kokulturze z komórkami linii C3A pozytywnie oddziałują zarówno na ich morfologię (polaryzacja) jak i zdolności biosyntetyczne (produkcja białek – albuminy i  $\alpha$ -1-antytrypsyny). Wspólny wzrost fibroblastów i komórek linii C3A powodował formowanie się struktur w postaci zespołu komórek C3A przypominających wyspy otoczone i rozgraniczone przez fibroblasty. W zależności od proporcji komórek fibroblasty/C3A w dniu wysiania powstawały wyspy różnej wielkości, co może pozwolić na regulację oddziaływań homo- i heterotypowych. Analiza liczby i powierzchni wysp była znacznie ułatwiona, dzięki użyciu „kolorowych” linii C3A i HSF, produkujących trwale białka fluorescencyjne EGFP i DsRed2. Linie powstałe w wyniku transdukcji wektorami lentiwirusowymi, zostały zbadane, a następnie wykorzystane wyniki badań zostały przedstawione w 3 publikacjach.

Wprowadzenie do fibroblastów dodatkowej kopii genu *EGF* i nadprodukcja epidermalnego czynnika wzrostu miała, zgodnie z doniesieniami literaturowymi, wpłynąć pozytywnie na komórki pochodzenia wątrobowego. Trudności z samodzielnym przygotowaniem wektorów lentiwirusowych zawierających *EGF* dotyczyły zarówno procesu klonowania wstawki do plazmidu wektorowego, jak i produkcji wektorów LV. Po przeprowadzeniu kilkuset prób, zastosowaniu różnych podejść i testowaniu kilku szczepów bakterii kompetentnych, w tym specjalnie dedykowanych do wektorów lentiwirusowych *E. coli* STBL3 nie udało się wprowadzić do plazmidu wektorowego wstawki o wielkości ok. 6 kpz. W związku z niepowodzeniem w uzyskaniu własnego konstruktów, zdecydowano się na użycie zsinytyzowanego plazmidu zawierającego *EGF* i jako białko znacznikowe – mCherry, firmy Genecopoeia. Kolejnym problemem była produkcja wektorów o odpowiednim mianie. Niestety, procedura opracowana na podstawie plazmidów zawierających gen kodujący białko EGFP i DsRed2 okazała się niewłaściwa i mimo kilkudziesięciu prób nie otrzymano wektorów o mianie wystarczającym do transdukcji HSF. Z tego powodu zdecydowano się na użycie LP2000, która jest znacznie droższa, ale charakteryzuje się większą skutecznością w porównaniu z metodą wykorzystującą PEI.

Kokultura komórek C3A z fibroblastami izolowanymi z ludzkiej skóry nadprodukującymi EGF po raz pierwszy została opisana w niniejszej rozprawie. Linia HSF-E3 została wybrana na podstawie badań i charakteryzuje się wzrostem produkcji czynnika wzrostu o ok. 25% w porównaniu do fibroblastów niemodyfikowanych (dane na podstawie testu ELISA). Wpływ HSF-E3 na komórki C3A dotyczył zarówno ich morfologii – zwiększenie częstości występowania struktur *bile canaliculi*, jak i fizjologii

– zwiększenie produkcji albuminy. W budowie skrajnie zróżnicowanych hepatocytów można wyróżnić dwa bieguny: naczyniowy i żółciowy, a stopień ich polaryzacji jest jednym z parametrów określających jakość hodowli. Częstość powstawania *bile canaliculi* w komórkach C3A w kokulturze z HSF-E3 została podwyższona o prawie 40% w porównaniu do monokultury C3A. Zarówno suplementacja EGF (10 ng/ml), jak i kokultura z niemodyfikowanymi fibroblastami, nie przyniosły tak dużego wzrostu, odpowiednio było to ok. 19% i 30%. Przebieg produkcji albuminy podczas 18-dniowej hodowli w komórkach C3A w kokulturach z fibroblastami modyfikowanymi i niemodyfikowanymi był zupełnie inny niż w monokulturach. Od dnia 15. w monokulturach stężenie wydzielanej do medium albuminy spada w przeciwieństwie do kokultur, gdzie stężenie ALB stale rośnie. Należy dodać, że największą produkcję uzyskano w kokulturze C3A z HSF-E3. W ostatnim, 18. dniu hodowli, stężenie albuminy w medium w kokulturze C3A+HSF-E3 było o ponad 70% wyższe niż w monokulturze C3A. Biorąc pod uwagę hodowle długotrwałe, utrzymanie wysokiej i wzrostowej tendencji w produkcji albuminy jest bardzo znaczącym, a w ocenie autora – najważniejszym, uzyskanym wynikiem badań. Przewaga kokultury z HSF-E3 nad kokulturą z niemodyfikowanymi fibroblastami lub kokulturą z niemodyfikowanymi fibroblastami suplementowaną EGF może wynikać z lepszej dostępności czynnika wzrostu dla komórek hepatomy. Być może EGF wydzielany przez HSF-E3 znajduje się pośród białek macierzy zewnątrzkomórkowej i przez to jest bardziej dostępny dla komórek C3A. Dodatek 10 ng EGF na 1 ml medium hodowlanego jest rekomendowany przez producentów odczynników, które są stosowane w hodowlach hepatocytów, jednakże nie wpłynął on pozytywnie na komórki C3A, w takim stopniu jak kokultura z HSF-E3. Zatem, można stwierdzić, że ten typ hodowli – kokultura C3A+HSF-E3, wpłynął najlepiej spośród badanych na funkcjonowanie komórek C3A. Tym samym potwierdzona została II teza rozprawy o pozytywnym wpływie kokultury z genetycznie zmodyfikowanymi fibroblastami ludzkimi na parametry komórek wątrobowych.

Na podstawie wyniki przedstawionych w rozprawie wskazują, iż wprowadzony przez autora nowy układ hodowli komórek wątrobowych z fibroblastami nadprodukcją czynnika wzrostu jest korzystny ze względu na utrzymanie wysokiej i wzrostowej tendencji w produkcji albuminy. Linia HSF-E3 może być ulepszona przez zastosowanie sortowania komórek po transdukcji w celu uzyskania populacji o minimalnej czystości ok. 90%. W przyszłości można będzie również podjąć próbę skonstruowania całego panelu wektorów lentiwirusowych do modyfikacji izolowanych

ludzkich fibroblastów, np. *HGF*, *HNF4* oraz zastosować regulację ich ekspresji do pożądanego poziomu. Ponadto zastosowanie innych układów hodowlanych, np. hodowla w przepływie, może wspomóc osiągnięcie długotrwałej hodowli hepatocytów izolowanych z fragmentów ludzkich wątrób.

Podsumowując, można stwierdzić, że

1. opracowano prostszą i szybszą metodę izolacji komórek z fragmentów ludzkich resekowanych wątrób, która z powodzeniem może zastąpić powszechnie stosowaną metodę podwójnej perfuzji, tym samym potwierdzając pierwszą tezę rozprawy;
2. opracowano oryginalną metodę cytometrycznej analizy izolatu wątrobowego, co może w przyszłości posłużyć do wprowadzenia nowej metody prognostycznej i diagnostycznej stosowanej do oceny stanu wątroby pacjentów;
3. po raz pierwszy wskazano, stosując wyżej wymienioną metodę analizy cytometrycznej, na możliwość istnienia mniejszej tzw. rezerwy regeneracyjnej hepatocytów kobiet;
4. po raz pierwszy użyto genetycznie modyfikowane fibroblasty izolowane z ludzkiej skóry, produkujące trwale czynnik wzrostu, w kokulturze z komórkami pochodzenia wątrobowego;
5. potwierdzono drugą tezę rozprawy o pozytywnym wpływie hodowli z fibroblastami nadprodukującymi epidermalny czynnik wzrostu na funkcjonowanie komórek pochodzenia wątrobowego, w tym na zwiększoną polaryzację komórek i produkcję albuminy.

## 8. Bibliografia

1. Abdallah B, Hassan A, Benoist C, Goula D, Behr JP, Demeneix BA (1996) A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Hum Gene Ther* 7, 1947-1954.
2. Abu-Absi SF, Hansen LK, Hu WS (2004) Three-dimensional co-culture of hepatocytes and stellate cells. *Cytotechnology* 45, 125-140.
3. Agius L (1988) Metabolic interactions of parenchymal hepatocytes and dividing epithelial cells in co-culture. *Biochem J* 252, 23-28.
4. Agius L, Wright PD, Alberti KG (1987) Carnitine acyltransferases and acyl-CoA hydrolases in human and rat liver. *Clin Sci (Lond)* 73, 3-10.
5. Agbulut O, Huet A, Niederländer N, Puceat M, Menasché P, Coirault C (2007) Green fluorescent protein impairs actin-myosin interactions by binding to the actin-binding site of myosin. *J Biol Chem* 282, 10465-10471.
6. Aihara H, Miyazaki J (1998) Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nat Biotechnol* 16, 867-870.
7. Alexandrova K, Griesel C, Barthold M, Heuft HG, Ott M, Winkler M, Schrem H, Manns MP, Bredehorn T, Net M, Vidal MM, Kafert-Kasting S, Arseniev L (2005) Large-scale isolation of human hepatocytes for therapeutic application. *Cell Transplant* 14, 845-853.
8. Ananthanarayanan A, Narmada BC, Mo X, McMillian M, Yu H (2011) Purpose-driven biomaterials research in liver-tissue engineering. *Trends Biotechnol* 29, 110-118.
9. Anderson K, Yin L, Macdonald C, Grant MH (1996) Immortalized hepatocytes as in vitro model systems for toxicity testing: the comparative toxicity of menadione in immortalized cells, primary cultures of hepatocytes and HTC hepatoma cells. *Toxicol In Vitro* 10, 721-727.
10. Anderson NG (1953) The mass isolation of whole cells from rat liver. *Science* 117, 627-628.
11. Andreason GL, Evans GA (1988) Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation. *Biotechniques* 6, 650-660.
12. Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouët S, Morel F, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A (2006) Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* 34, 75-83.
13. Atchison RW, Casto BC, Hammon WM (1965) Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* 149, 754-756.
14. Auerbach AB (2004) Production of functional transgenic mice by DNA pronuclear microinjection. *Acta Biochim Pol* 51, 9-31.
15. Auth MK, Woitaschek D, Beste M, Schreiter T, Kim HS, Oppermann E, Joplin RE, Baumann U, Hilgard P, Nadalin S, Markus BH, Blaheta RA (2005) Preservation of the synthetic and metabolic capacity of isolated human hepatocytes by coculture with human biliary epithelial cells. *Liver Transpl* 11, 410-419.
16. Baccarani U, Sanna A, Cariani A, Sainz-Barriga M, Adani GL, Zambito AM, Piccolo G, Risaliti A, Nanni-Costa A, Ridolfi L, Scalapogna M, Bresadola F, Donini A (2003) Isolation of human hepatocytes from livers rejected for liver transplantation on a national basis: results of a 2-year experience. *Liver Transpl* 9, 506-512.
17. Bader A, Knop E, Kern A, Böker K, Frühauf N, Crome O, Esselmann H, Pape C, Kempka G, Sewing KF (1996) 3-D coculture of hepatic sinusoidal cells with primary hepatocytes-design of an organotypical model. *Exp Cell Res* 226, 223-233.



18. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW (2007) Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater* 5, 1-13.
19. Bailly-Maitre B, de Sousa G, Boulukos K, Gugenheim J, Rahmani R (2001) Dexamethasone inhibits spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes via Bcl-2 and Bcl-xL induction. *Cell Death Differ* 8, 279-288.
20. Baksh D, Yao R, Tuan RS (2007) Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 25, 1384-1392.
21. Baptista PM, Siddiqui MM, Lozier G, Rodriguez SR, Atala A, Soker S (2011) The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology* 53, 604-617.
22. Barakat O, Abbasi S, Rodriguez G, Rios J, Wood RP, Ozaki C, Holley LS, Gauthier PK (2012) Use of decellularized porcine liver for engineering humanized liver organ. *J Surg Res* 173, e11-25.
23. Barquinero J, Eixarch H, Pérez-Melgosa M (2004) Retroviral vectors: new applications for an old tool. *Gene Ther* 11, S3-9.
24. Barreca A, Voci A, Minuto F, de Marchis M, Cecchelli E, Fugassa E, Giordano G, Gallo G (1992) Effect of epidermal growth factor on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein synthesis by adult rat hepatocytes. *Mol Cell Endocrinol* 84, 119-126.
25. Bars RG, Mitchell AM, Wolf CR, Elcombe CR (1989) Induction of cytochrome P-450 in cultured rat hepatocytes. The heterogeneous localization of specific isoenzymes using immunocytochemistry. *Biochem J* 262, 151-158.
26. Batard P, Jordan M, Wurm F (2011) Transfer of high copy number plasmid into mammalian cells by calcium phosphate transfection. *Gene* 270, 61-68.
27. Begue JM, Guguen-Guillouzo C, Padeloup N, Guillouzo A (1984) Prolonged maintenance of active cytochrome P-450 in adult rat hepatocytes co-cultured with another liver cell type. *Hepatology* 4, 839-842.
28. Begum S, Joshi M, Ek M, Holgersson J, Kleman MI, Sumitran-Holgersson S (2010) Characterization and engraftment of long-term serum-free human fetal liver cell cultures. *Cytotherapy* 12, 201-211.
29. Behbahan IS, Duan Y, Lam A, Khoobyari S, Ma X, Ahuja TP, Zern MA (2011) New approaches in the differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells toward hepatocytes. *Stem Cell Rev* 7, 748-759.
30. Belenky P, Bogan KL, Brenner C (2007) NAD<sup>+</sup> metabolism in health and disease. *Trends Biochem Sci* 32, 12-19.
31. Ben-Ze'ev A, Robinson GS, Bucher NL, Farmer SR (1988) Cell-cell and cell-matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2161-2165.
32. Ben-Ze'ev A, Robinson GS, Bucher NL, Farmer SR (1988) Cell-cell and cell-matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2161-2165.
33. Berry MN (1962) Metabolic properties of cells isolated from adult mouse liver. *J Cell Biol* 15, 1-8.
34. Bettinger CJ, Kulig KM, Vacanti JP, Langer R, Borenstein JT (2009) Nanofabricated collagen-inspired synthetic elastomers for primary rat hepatocyte culture. *Tissue Eng Part A* 15, 1321-1329.
35. Bhandari RN, Riccalton LA, Lewis AL, Fry JR, Hammond AH, Tandler SJ, Shakesheff KM (2001) Liver tissue engineering: a role for co-culture systems in modifying hepatocyte function and viability. *Tissue Eng* 7, 345-357.



36. Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M (1998) Microfabrication of hepatocyte/fibroblast co-cultures: role of homotypic cell interactions. *Biotechnol Prog* 14, 378-387.
37. Bhatia SN, Underhill GH, Zaret KS, Fox IJ (2014) Cell and tissue engineering for liver disease. *Sci Transl Med* 6, 245sr2.
38. Bhogal RH, Hodson J, Bartlett DC, Weston CJ, Curbishley SM, Haughton E, Williams KT, Reynolds GM, Newsome PN, Adams DH, Afford SC (2011) Isolation of primary human hepatocytes from normal and diseased liver tissue: a one hundred liver experience. *PLoS One* 6, e18222.
39. Bielinska AU, Yen A, Wu HL, Zahos KM, Sun R, Weiner ND, Baker JR Jr, Roessler BJ (2000) Application of membrane-based dendrimer/DNA complexes for solid phase transfection in vitro and in vivo. *Biomaterials* 21, 877-887.
40. Blaauboer BJ, Paine AJ (1979) Attachment of rat hepatocytes to plastic substrata in the absence of serum requires protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 90, 368-374.
41. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsey WJ, Muul L, Morgan RA, Anderson WF (1995) T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270, 475-480.
42. Block GD, Locker J, Bowen WC, Petersen BE, Katyal S, Strom SC, Riley T, Howard TA, Michalopoulos GK (1996) Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J Cell Biol* 132, 1133-1149.
43. Bockhorn M, Goralski M, Prokofiev D, Dammann P, Grünewald P, Trippler M, Biglarnia A, Kamler M, Niehues EM, Frilling A, Broelsch CE, Schlaak JF (2007) VEGF is important for early liver regeneration after partial hepatectomy. *J Surg Res* 138, 291-299.
44. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349-352.
45. Bogaards JJ, Bertrand M, Jackson P, Oudshoorn MJ, Weaver RJ, van Bladeren PJ, Walther B (2000) Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man. *Xenobiotica* 30, 1131-1152.
46. Borlak J, Singh PK1, Rittelmeyer II (2015) Regulation of Liver Enriched Transcription Factors in Rat Hepatocytes Cultures on Collagen and EHS Sarcoma Matrices. *PLoS One* 10, e0124867.
47. Bosman FT, Stamenkovic I (2003) Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* 200, 423-428.
48. Bottega R, Epand RM (1992) Inhibition of protein kinase C by cationic amphiphiles. *Biochemistry* 31, 9025-9030.
49. Bouwens L, De Bleser P, Vanderkerken K, Geerts B, Wisse E (1992) Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells. *Enzyme* 46, 155-168.
50. Braet F, De Zanger R, Sasaoki T, Baekeland M, Janssens P, Smedsrød B, Wisse E (1994) Assessment of a method of isolation, purification, and cultivation of rat liver sinusoidal endothelial cells. *Lab Invest* 70, 944-952.
51. Bühler NE, Schulze-Osthoff K, Königsrainer A, Schenk M (2015) Controlled processing of a full-sized porcine liver to a decellularized matrix in 24 h. *J Biosci Bioeng* 119, 609-613.

52. Burton EA, Bai Q, Goins WF, Glorioso JC (2002) Replication-defective genomic herpes simplex vectors: design and production. *Curr Opin Biotechnol* 13, 424-428.
53. Campos SK, Barry MA (2007) Current advances and future challenges in Adenoviral vector biology and targeting. *Curr Gene Ther* 7, 189-204.
54. Capecchi MR (1980) High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 22, 479-488.
55. Caputi M, Melo CA, Baralle FE (1995) Regulation of fibronectin expression in rat regenerating liver. *Nucleic Acids Res* 23, 238-43.
56. Carpenter SP, Lasker JM, Raucy JL (1996) Expression, induction, and catalytic activity of the ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) in human fetal liver and hepatocytes. *Mol Pharmacol* 49, 260-268.
57. Carpentier B, Gautier A, Legallais C (2009) Artificial and bioartificial liver devices: present and future. *Gut* 58, 1690-1702.
58. Carraro A, Hsu WM, Kulig KM, Cheung WS, Miller ML, Weinberg EJ, Swart EF, Kaazempur-Mofrad M, Borenstein JT, Vacanti JP, Neville C (2008) In vitro analysis of a hepatic device with intrinsic microvascular-based channels. *Biomed Microdevices* 10, 795-805.
59. Carrel A, Ebeling AH (1926) The fundamental properties of the fibroblast and the macrophage: III. The malignant fibroblast of sarcoma 10 of the crocker foundation. *J Exp Med* 48, 105-123.
60. Cassio D, Hamon-Benais C, Guérin M, Lecoq O (1991) 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* 115, 1397-1408.
61. Chambard M, Gabrion J, Mauchamp J (1981) Influence of collagen gel on the orientation of epithelial cell polarity: follicle formation from isolated thyroid cells and from preformed monolayers. *J Cell Biol* 91, 157-166.
62. Chang DJ, Ringold GM, Heller RA (1992) Cell killing and induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor-alpha is mediated by lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 188, 538-546.
63. Chaya D, Fougère-Deschatrette C, Weiss MC (1996) Spontaneous apoptosis in a rat hepatoma cell line and its inhibition by dexamethasone. *Cell Death Differ* 3, 97-104.
64. Cheeks MC, Edwards AD, Arnot CJ, Slater NK (2009) Gene transfection of HEK cells on supermacroporous polyacrylamide monoliths: a comparison of transient and stable recombinant protein expression in perfusion culture. *N Biotechnol* 26, 289-299.
65. Chen C, Okayama H (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7, 2745-2752.
66. Chen H, Paradies NE, Fedor-Chaiken M, Brackenbury R (1997) E-cadherin mediates adhesion and suppresses cell motility via distinct mechanisms. *J Cell Sci* 110, 345-356.
67. Chen J, Stuckey EC, Berry CL (1985) Three-dimensional culture of rat exocrine pancreatic cells using collagen gels. *Br J Exp Pathol* 66, 551-559.
68. Chen Y, Li J, Liu X, Zhao W, Wang Y, Wang X (2010) Transplantation of immortalized human fetal hepatocytes prevents acute liver failure in 90% hepatectomized mice. *Transplant Proc* 42, 1907-1914.
69. Chen YF, Tseng CY, Wang HW, Kuo HC, Yang VW, Lee OK. (2012) Rapid generation of mature hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells by an efficient three-step protocol. *Hepatology* 55, 1193-1203.

70. Chen Z, Chang R, Guan W, Cai H, Tang F, Zhu W, Chen J (2011) Transplantation of porcine hepatocytes cultured with polylactic Acid-o-carboxymethylated chitosan nanoparticles promotes liver regeneration in acute liver failure rats. *J Drug Deliv* 2011, 797503.
71. Chinnici CM, Timoneri F, Amico G, Pietrosi G, Vizzini G, Spada M, Pagano D, Gridelli B, Conaldi PG (2014) Characterization of Liver-Specific Functions of Human Fetal Hepatocytes in Culture. *Cell Transplant* 24, 1139-1153.
72. Cho CH, Berthiaume F, Tilles AW, Yarmush ML (2008) A new technique for primary hepatocyte expansion in vitro. *Biotechnol Bioeng* 101, 345-356.
73. Cho CH, Park J, Nagrath D, Tilles AW, Berthiaume F, Toner M, Yarmush ML (2007) Oxygen uptake rates and liver-specific functions of hepatocyte and 3T3 fibroblast co-cultures. *Biotechnol Bioeng* 97, 188-199.
74. Cho CH, Park J, Tilles AW, Berthiaume F, Toner M, Yarmush ML (2010) Layered patterning of hepatocytes in co-culture systems using microfabricated stencils. *Biotechniques* 48, 47-52.
75. Choi HJ, Choi D (2013) Successful mouse hepatocyte culture with sandwich collagen gel formation. *J Korean Surg Soc* 84, 202-208.
76. Cogger VC, Hilmer SN, Sullivan D, Muller M, Fraser R, Le Couteur DG (2006) Hyperlipidemia and surfactants: the liver sieve is a link. *Atherosclerosis* 189, 273-281.
77. Conner J, Vallet-Collom I, Daveau M, Delers F, Hiron M, Lebreton JP, Guillouzo A (1990) Acute-phase-response induction in rat hepatocytes co-cultured with rat liver epithelial cells. *Biochem J* 266, 683-688.
78. Coward SM, Legallais C, David B, Thomas M, Foo Y, Mavri-Damelin D, Hodgson HJ, Selden C (2009) Alginate-encapsulated HepG2 cells in a fluidized bed bioreactor maintain function in human liver failure plasma. *Artif Organs* 33, 1117-1126.
79. Cox G (1995) Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol* 154, 4719-4725.
80. Crema E, Werneck AM, Martins Júnior A, Ribeiro LB, Lima TS, Silva AA (2007) Comparative analysis of preparation of human hepatocytes by the ethylenediamine tetraacetic acid and collagenase technique. *Acta Cir Bras* 22, 53-56.
81. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R (1996) Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 274, 1379-1383.
82. Curran RD, Billiar TR, West MA, Bentz BG, Simmons RL (1988) Effect of interleukin 2 on Kupffer cell activation. Interleukin 2 primes and activates Kupffer cells to suppress hepatocyte protein synthesis in vitro. *Arch Surg* 123, 1373-1378.
83. Dai C, Saleem MA, Holzman LB, Mathieson P, Liu Y (2010) Hepatocyte growth factor signaling ameliorates podocyte injury and proteinuria. *Kidney Int* 77, 962-973.
84. Daniel R, Smith JA (2008) Integration site selection by retroviral vectors: molecular mechanism and clinical consequences. *Hum Gene Ther* 19, 557-568.
85. Dannenberg JH, van Rossum A, Schuijff L, te Riele H (2000) Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes Dev* 14, 3051-3064.
86. Dash A, Inman W, Hoffmaster K, Sevidal S, Kelly J, Obach RS, Griffith LG, Tannenbaum SR (2009) Liver tissue engineering in the evaluation of drug safety. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5, 1159-1174.
87. Dash A, Simmers MB, Deering TG, Berry DJ, Feaver RE, Hastings NE, Pruett TL, LeCluyse EL, Blackman BR, Wamhoff BR (2013) Hemodynamic flow improves rat

- hepatocyte morphology, function, and metabolic activity in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol* 304, C1053-1063.
88. Daya S, Berns KI (2008) Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* 21, 583-593.
  89. De Bartolo L, Morelli S, Lopez LC, Giorno L, Campana C, Salerno S, Rende M, Favia P, Detomaso L, Gristina R, d'Agostino R, Drioli E (2005) Biotransformation and liver-specific functions of human hepatocytes in culture on RGD-immobilized plasma-processed membranes. *Biomaterials* 26, 4432-4441.
  90. De Bruyn T, Chatterjee S, Fattah S, Keemink J, Nicolai J, Augustijns P, Annaert P (2013) Sandwich-cultured hepatocytes: utility for in vitro exploration of hepatobiliary drug disposition and drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 9, 589-616.
  91. De Smedt SC, Demeester J, Hennink WE (2000) Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharm Res* 17, 113-126.
  92. DeLeve LD, Wang X, Hu L, McCuskey MK, McCuskey RS (2004) Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is maintained by paracrine and autocrine regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, G757-763.
  93. Deshpande D, Blezinger P, Pillai R, Duguid J, Freimark B, Rolland A (1998) Target specific optimization of cationic lipid-based systems for pulmonary gene therapy. *Pharm Res* 15, 1340-1347.
  94. Deurholt T, van Til NP, Chhatta AA, ten Bloemendaal L, Schwartzlander R, Payne C, Plevris JN, Sauer IM, Chamuleau RA, Elferink RP, Seppen J, Hoekstra R (2009) Novel immortalized human fetal liver cell line, cBAL111, has the potential to differentiate into functional hepatocytes. *BMC Biotechnol* 9, 89.
  95. Dich J, Vind C, Grunnet N (1988) Long-term culture of hepatocytes: effect of hormones on enzyme activities and metabolic capacity. *Hepatology* 8, 39-45.
  96. Dini L, Conti-Devirgiliis L, Russo-Caia S (1987) The galactose-specific receptor system in rat liver during development. *Development* 100, 13-22.
  97. Döll S, Schrickx JA, Valenta H, Dänicke S, Fink-Gremmels J (2009) Interactions of deoxynivalenol and lipopolysaccharides on cytotoxicity protein synthesis and metabolism of DON in porcine hepatocytes and Kupffer cell enriched hepatocyte cultures. *Toxicol Lett* 189, 121-129.
  98. Donato MT, Castell JV, Gómez-Lechón MJ (1991) Co-cultures of hepatocytes with epithelial-like cell lines: expression of drug-biotransformation activities by hepatocytes. *Cell Biol Toxicol* 7, 1-14.
  99. Dong J, Mandenius CF, Lübberstedt M, Urbaniak T, Nüssler AK, Knobloch D, Gerlach JC, Zeilinger K (2008) Evaluation and optimization of hepatocyte culture media factors by design of experiments (DoE) methodology. *Cytotechnology* 57, 251-261.
  100. Donini A, Baccarani U, Piccolo G, Lavaroni S, Djaliti V, Cautero N, Risaliti A, Degrossi A, Scalamogna M, Bresadola F (2001) Hepatocyte isolation using human livers discarded from transplantation: analysis of cell yield and function. *Transplant Proc* 33, 654-655.
  101. Dooldeniya MD, Warrens AN (2003) Xenotransplantation: where are we today? *J R Soc Med* 96, 111-117.
  102. Doostdar H, Duthie SJ, Burke MD, Melvin WT, Grant MH (1988) The influence of culture medium composition on drug metabolising enzyme activities of the human liver derived Hep G2 cell line. *FEBS Lett* 241, 15-18.
  103. Drubin DA, Clawson GA (2004) Spontaneous transformation of an immortalized hepatocyte cell line: potential role of a nuclear protease. *Cancer Lett* 213, 39-48.



104. Du Y, Han R, Wen F, Ng San San S, Xia L, Wohland T, Leo HL, Yu H (2008) Synthetic sandwich culture of 3D hepatocyte monolayer. *Biomaterials* 29, 290-301.
105. Dujardin N, Pr eat V (2004) Delivery of DNA to skin by electroporation. *Methods Mol Biol* 245, 215-226.
106. Dunn JC, Tompkins RG, Yarmush ML (1991) Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnol Prog* 7, 237-245.
107. Edwards M, Wong SC, Chotpadiwetkul R, Smirlis D, Phillips IR, Shephard EA (2006) Transfection of primary cultures of rat hepatocytes. *Methods Mol Biol* 320, 273-282.
108. Edwards MJ, Keller BJ, Kauffman FC, Thurman RG (1993) The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 119, 275-279.
109. Ehlert F, Bierbaum P, Schorr J (1993) Importance of DNA quality for transfection efficiency. *Biotechniques* 14, 546.
110. El cin YM, Dixit V, Gitnick G (1998) Hepatocyte attachment on biodegradable modified chitosan membranes: in vitro evaluation for the development of liver organoids. *Artif Organs* 22, 837-846.
111. Enomoto K, Nishikawa Y, Omori Y, Tokairin T, Yoshida M, Ohi N, Nishimura T, Yamamoto Y, Li Q (2004) Cell biology and pathology of liver sinusoidal endothelial cells. *Med Electron Microsc* 37, 208-215.
112. Enosawa S, Yamazaki T, Kohsaka H, Tokiwa T (2012) Repopulation of human origin hepatocyte progenitor-like cell line, THLE-5b, in the SCID mouse liver under p21-mediated cell growth-arresting conditions. *Cell Transplant* 21, 447-452.
113. Epstein AL (2009) Progress and prospects: biological properties and technological advances of herpes simplex virus type 1-based amplicon vectors. *Gene Ther* 16, 709-715.
114. Escors D, Breckpot K (2010) Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 58, 107-119.
115. Fang X, Gao G, Xue H, Zhang X, Wang H (2012) In vitro and in vivo studies of the toxic effects of perfluorononanoic acid on rat hepatocytes and Kupffer cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 34, 484-494.
116. Farwell DG, Shera KA, Koop JI, Bonnet GA, Matthews CP, Reuther GW, Coltrera MD, McDougall JK, Klingelhutz AJ (2000) Genetic and epigenetic changes in human epithelial cells immortalized by telomerase. *Am J Pathol* 156, 1537-1547.
117. Fassett J, Tobolt D, Hansen LK (2006) Type I collagen structure regulates cell morphology and EGF signaling in primary rat hepatocytes through cAMP-dependent protein kinase A. *Mol Biol Cell* 17, 345-356.
118. Fassett JT, Tobolt D, Nelsen CJ, Albrecht JH, Hansen LK (2003) The role of collagen structure in mitogen stimulation of ERK, cyclin D1 expression, and G1-S progression in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 278, 31691-31700.
119. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ (2006) Liver regeneration. *Hepatology* 43, S45-53.
120. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7413-7417.
121. Feng ZQ, Chu X, Huang NP, Wang T, Wang Y, Shi X, Ding Y, Gu ZZ (2009) The effect of nanofibrous galactosylated chitosan scaffolds on the formation of rat primary hepatocyte aggregates and the maintenance of liver function. *Biomaterials* 30, 2753-2763.
122. Fields GB, Van Wart HE, Birkedal-Hansen H (1987) Sequence specificity of human skin fibroblast collagenase. Evidence for the role of collagen structure in determining the collagenase cleavage site. *J Biol Chem* 262, 6221-6226.

123. Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsässer HP, Kissel T (1999) A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res* 16, 1273-1279.
124. Fitzpatrick E, Wu Y, Dhadda P, Hughes RD, Mitry RR, Qin H, Lehec SC, Heaton ND, Dhawan A (2015) Coculture with mesenchymal stem cells results in improved viability and function of human hepatocytes. *Cell Transplant* 24, 73-83.
125. Flisiak R (1997) Role of Ito cells in the liver function. *Pol J Pathol* 48, 139-145.
126. Forbes SJ, Gupta S, Dhawan A (2015) Cell therapy for liver disease: From liver transplantation to cell factory. *J Hepatol* 62, S157-169.
127. Friedman SL (2008) Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 88, 125-172.
128. Gao H, Hui KM (2001) Synthesis of a novel series of cationic lipids that can act as efficient gene delivery vehicles through systematic heterocyclic substitution of cholesterol derivatives. *Gene Ther* 8, 855-863.
129. Gao Y, Xu J, Sun B, Jiang HC (2004) Microencapsulated hepatocytes and islets as in vivo bioartificial liver support system. *World J Gastroenterol* 10, 2067-2071.
130. Gardmo C, Kotokorpi P, Helander H, Mode A (2005) Transfection of adult primary rat hepatocytes in culture. *Biochem Pharmacol* 69, 1805-1813.
131. Gehl J (2003) Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand* 177, 437-447.
132. Gelse K, Pöschl E, Aigner T (2003) Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 1531-1546.
133. Gerlach JC, Brombacher J, Courtney JM, Neuhaus P (1993) Nonenzymatic versus enzymatic hepatocyte isolation from pig livers for larger scale investigations of liver cell perfusion systems. *Int J Artif Organs* 16, 677-681.
134. Ghosh K, Ren XD, Shu XZ, Prestwich GD, Clark RA (2006) Fibronectin functional domains coupled to hyaluronan stimulate adult human dermal fibroblast responses critical for wound healing. *Tissue Eng* 12, 601-613.
135. Glicklis R, Shapiro L, Agbaria R, Merchuk JC, Cohen S (2000) Hepatocyte behavior within three-dimensional porous alginate scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 67, 344-353.
136. Godbey WT, Wu KK, Mikos AG (1999) Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J Biomed Mater Res* 45, 268-275.
137. Godbey WT, Wu KK, Mikos AG (2001) Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability. *Biomaterials* 22, 471-480.
138. Goral VN, Hsieh YC, Petzold ON, Clark JS, Yuen PK, Faris RA (2010) Perfusion-based microfluidic device for three-dimensional dynamic primary human hepatocyte cell culture in the absence of biological or synthetic matrices or coagulants. *Lab Chip* 10, 3380-3386.
139. Gordon JW, Ruddle FH (1983) Gene transfer into mouse embryos: production of transgenic mice by pronuclear injection. *Methods Enzymol* 101, 411-433.
140. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 7380-7384.
141. Gómez-Lechón MJ, Castelli J, Guillén I, O'Connor E, Nakamura T, Fabra R, Trullenque R (1995) Effects of hepatocyte growth factor on the growth and metabolism of human hepatocytes in primary culture. *Hepatology* 21, 1248-1254.
142. Gómez-Lechón MJ, Jover R, Donato T, Ponsoda X, Rodriguez C, Stenzel KG, Klocke R, Paul D, Guillén I, Bort R, Castell JV (1998) Long-term expression of



- differentiated functions in hepatocytes cultured in three-dimensional collagen matrix. *J Cell Physiol* 177, 553-562.
143. Gradilone SA, Tietz PS, Splinter PL, Marinelli RA, LaRusso NF (2005) Expression and subcellular localization of aquaporin water channels in the polarized hepatocyte cell line, WIF-B. *BMC Physiol* 5, 13.
  144. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
  145. Graham FL, van der Eb AJ (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467.
  146. Graham JM (2002) Fractionation of hepatic nonparenchymal cells. *ScientificWorldJournal* 2, 1347-1350.
  147. Gramignoli R, Green ML, Tahan V, Dorko K, Skvorak KJ, Marongiu F, Zao W, Venkataramanan R, Ellis EC, Geller D, Breite AG, Dwulet FE, McCarthy RC, Strom SC (2012) Development and application of purified tissue dissociation enzyme mixtures for human hepatocyte isolation. *Cell Transplant* 21, 1245-1260.
  148. Gressner AM, Lahme B, Brenzel A (1995) Molecular dissection of the mitogenic effect of hepatocytes on cultured hepatic stellate cells. *Hepatology* 22, 1507-1518.
  149. Gressner AM, Lotfi S, Gressner G, Lahme B (1992) Identification and partial characterization of a hepatocyte-derived factor promoting proliferation of cultured fat-storing cells (parasinusoidal lipocytes). *Hepatology* 16, 1250-1266.
  150. Gross-Steinmeyer K, Stapleton PL, Tracy JH, Bammler TK, Lehman T, Strom SC, Eaton DL (2005) Influence of Matrigel-overlay on constitutive and inducible expression of nine genes encoding drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes. *Xenobiotica* 35, 419-438.
  151. Guang Liu W, De Yao K (2002) Chitosan and its derivatives--a promising non-viral vector for gene transfection. *J Control Release* 83, 1-11.
  152. Guégan JP, Frémin C, Baffet G (2012) The MAPK MEK1/2-ERK1/2 Pathway and Its Implication in Hepatocyte Cell Cycle Control. *Int J Hepatol* 2012, 328372.
  153. Guguen-Guillouzo C, Clément B, Baffet G, Beaumont C, Morel-Chany E, Glaise D, Guillouzo A (1983) Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type. *Exp Cell Res* 143, 47-54.
  154. Guguen-Guillouzo C, Clément B, Baffet G, Beaumont C, Morel-Chany E, Glaise D, Guillouzo A (1983) Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type. *Exp Cell Res* 143, 47-54.
  155. Guillouzo A (1998) Liver cell models in in vitro toxicology. *Environ Health Perspect* 106, 511-532.
  156. Gutsche AT, Zurlo J, Deyesu E, Leong KW (1996) Rat hepatocyte morphology and function on lactose-derivatized polystyrene surfaces. *Biotechnol Bioeng* 49, 259-265.
  157. Guyomard C, Rialland L, Fremont B, Chesne C, Guillouzo A (1996) Influence of alginate gel entrapment and cryopreservation on survival and xenobiotic metabolism capacity of rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 141, 349-356.
  158. Hansen LK, Albrecht JH (1999) Regulation of the hepatocyte cell cycle by type I collagen matrix: role of cyclin D1. *J Cell Sci* 112, 2971-2981.
  159. Hanson RW (1980) Is there a single best species for studies of metabolic regulation? *Trends Biochem Sci* 5, 1-2.
  160. Haouzi D, Baghdiguian S, Granier G, Travo P, Mangeat P, Hibner U (2005) Three-dimensional polarization sensitizes hepatocytes to Fas/CD95 apoptotic signalling. *J Cell Sci* 118, 2763-2773.

161. Harimoto M, Yamato M, Hirose M, Takahashi C, Isoi Y, Kikuchi A, Okano T (2002) Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes. *J Biomed Mater Res* 62, 464-470.
162. Harris AJ, Shaddock JG, Delongchamp R, Dragan Y, Casciano DA (2004) Comparison of Basal gene expression in cultured primary rat hepatocytes and freshly isolated rat hepatocytes. *Toxicol Mech Methods* 14, 257-270.
163. Hegde M, Jindal R, Bhushan A, Bale SS, McCarty WJ, Golberg I, Usta OB, Yarmush ML (2014) Dynamic interplay of flow and collagen stabilizes primary hepatocytes culture in a microfluidic platform. *Lab Chip* 14, 2033-2039.
164. Hersel U, Dahmen C, Kessler H (2003) RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 24, 4385-4415.
165. Hewitt NJ, Lechón MJ, Houston JB, Hallifax D, Brown HS, Maurel P, Kenna JG, Gustavsson L, Lohmann C, Skonberg C, Guillouzo A, Tuschl G, Li AP, LeCluyse E, Groothuis GM, Hengstler JG (2007) Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev* 39, 159-234.
166. Hilliard CM, Fletcher S, Yeoh GC (1996) Calcium phosphate transfection and cell-specific expression of heterologous genes in primary fetal rat hepatocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 28, 639-650.
167. Hiramatsu K, Matsumoto Y, Miyazaki M, Tsubouchi H, Yamamoto I, Gohda E (2005) Inhibition of hepatocyte growth factor production in human fibroblasts by ursodeoxycholic acid. *Biol Pharm Bull* 28, 619-624.
168. Hodgkinson CP, Wright MC, Paine AJ (2000) Fibronectin-mediated hepatocyte shape change reprograms cytochrome P450 2C11 gene expression via an integrin-signaled induction of ribonuclease activity. *Mol Pharmacol* 58, 976-981.
169. Hoebe KH, Monshouwer M, Witkamp RF, Fink-Gremmels J, van Miert AS (2000) Cocultures of porcine hepatocytes and Kupffer cells as an improved in vitro model for the study of hepatotoxic compounds. *Vet Q* 22, 21-25.
170. Hoebe KH, Witkamp RF, Fink-Gremmels J, Van Miert AS, Monshouwer M (2001) Direct cell-to-cell contact between Kupffer cells and hepatocytes augments endotoxin-induced hepatic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G720-728.
171. Hofmann A, Zakhartchenko V, Weppert M, Sebald H, Wenigerkind H, Brem G, Wolf E, Pfeifer A (2004) Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol Reprod* 71, 405-409.
172. Holmen SL, Vanbrocklin MW, Eversole RR, Stapleton SR, Ginsberg LC (1995) Efficient lipid-mediated transfection of DNA into primary rat hepatocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31, 347-351.
173. Hongo T, Kajikawa M, Ishida S, Ozawa S, Ohno Y, Sawada J, Umezawa A, Ishikawa Y, Kobayashi T, Honda H (2005) Three-dimensional high-density culture of HepG2 cells in a 5-ml radial-flow bioreactor for construction of artificial liver. *J Biosci Bioeng* 99, 237-244.
174. Huang P, He Z, Ji S, Sun H, Xiang D, Liu C, Hu Y, Wang X, Hui L (2011) Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* 475, 386-389.
175. Huebert RC, Rakela J (2014) Cellular therapy for liver disease. *Mayo Clin Proc* 89, 414-424.

176. Huh CG, Factor VM, Sánchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS (2004) Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4477-4482.
177. Huh D, Hamilton GA, Ingber DE (2011) From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol* 21, 745-754.
178. Hussein KH, Park KM, Ghim JH, Yang SR, Woo HM (2015) Three dimensional culture of HepG2 liver cells on a rat decellularized liver matrix for pharmacological studies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* doi: 10.1002/jbm.b.33384.
179. Hynes RO (2009) The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326, 1216-1219.
180. Ichihara A, Nakamura T, Tanaka K (1982) Use of hepatocytes in primary culture for biochemical studies on liver functions. *Mol Cell Biochem* 43, 145-160.
181. Ihrke G, Martin GV, Shanks MR, Schrader M, Schroer TA, Hubbard AL (1998) Apical plasma membrane proteins and endolyn-78 travel through a subapical compartment in polarized WIF-B hepatocytes. *J Cell Biol* 141, 115-133.
182. Ihrke G, Neufeld EB, Meads T, Shanks MR, Cassio D, Laurent M, Schroer TA, Pagano RE, Hubbard AL (1993) WIF-B cells: an in vitro model for studies of hepatocyte polarity. *J Cell Biol* 123, 1761-1775.
183. Ijima H (2010) Practical and functional culture technologies for primary hepatocytes. *Biochem Eng J* 48, 332-336.
184. Ijima H, Kawakami K (2005) Promotion of monolayer formation and high expression of ammonia metabolism of primary rat hepatocytes on arginine-glycine-aspartic acid-containing peptide-coated polystyrene dish. *J Biosci Bioeng* 100, 62-66.
185. Ijima H, Matsuo T, Kawakami K (2008) The mixed coculture effect of primary rat hepatocytes and bone marrow cells is caused by soluble factors derived from bone marrow cells. *J Biosci Bioeng* 105, 226-231.
186. Ilies MA, Seitz WA, Caproiu MT, Wentz M, Garfield RE, Balaban AT (2003) Pyridinium-based cationic lipids as gene-transfer agents. *Eur J Org Chem* 2003, 2645-2655.
187. Inoue C, Yamamoto H, Nakamura T, Ichihara A, Okamoto H (1989) Nicotinamide prolongs survival of primary cultured hepatocytes without involving loss of hepatocyte-specific functions. *J Biol Chem* 264, 4747-4750.
188. Iseki K, Nakao K, Nakata K, Shima Y, Hamasaki K, Kato Y, Ishii N, Eguchi K (2000) Diverse regulations of albumin gene expression by hepatocyte growth factor in HepG2 human hepatoma cells and primary culture of rat hepatocytes. *Int J Oncol* 16, 1141-1145.
189. Jarnagin WR, Debs RJ, Wang SS, Bissell DM (1992) Cationic lipid-mediated transfection of liver cells in primary culture. *Nucleic Acids Res* 20, 4205-4211.
190. Jasmund I, Schwientek S, Acikgöz A, Langsch A, Machens HG, Bader A (2007) The influence of medium composition and matrix on long-term cultivation of primary porcine and human hepatocytes. *Biomol Eng* 24, 59-69.
191. Jiang XR, Jimenez G, Chang E, Frolkis M, Kusler B, Sage M, Beeche M, Bodnar AG, Wahl GM, Tlsty TD, Chiu CP (1999) Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat Genet* 21, 111-114.
192. Jitraruch S, Dhawan A, Hughes RD, Filippi C, Soong D, Philippeos C, Lehec SC, Heaton ND, Longhi MS, Mitry RR (2014) Alginate microencapsulated hepatocytes optimised for transplantation in acute liver failure. *PLoS One* 9, e113609.

193. Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM (1996) Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Rev* 24, 596-601.
194. Ju C, Reilly TP, Bourdi M, Radonovich MF, Brady JN, George JW, Pohl LR (2002) Protective role of Kupffer cells in acetaminophen-induced hepatic injury in mice. *Chem Res Toxicol* 15, 1504-1513.
195. Juang JH, Hsu BR, Kuo CH, Huang HS (1998) Timing of insulin therapy for diabetic recipients with islet transplantation. *Transplant Proc* 30, 576-577.
196. Jurima-Romet M, Casley WL, Neu JM, Huang HS (1995) Induction of CYP3A and associated terfenadine N-dealkylation in rat hepatocytes cocultured with 3T3 cells. *Cell Biol Toxicol* 11, 313-327.
197. Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP (2007) Collagens at a glance. *J Cell Sci* 120, 1955-1958.
198. Kamiya A, Inoue Y, Gonzalez FJ (2003) Role of the hepatocyte nuclear factor 4alpha in control of the pregnane X receptor during fetal liver development. *Hepatology* 37, 1375-1384.
199. Kane BJ, Zinner MJ, Yarmush ML, Toner M (2006) Liver-specific functional studies in a microfluidic array of primary mammalian hepatocytes. *Anal Chem* 78, 4291-4298.
200. Kang YB, Rawat S, Cirillo J, Bouchard M, Noh HM (2013) Layered long-term co-culture of hepatocytes and endothelial cells on a transwell membrane: toward engineering the liver sinusoid. *Biofabrication* 5, 045008.
201. Kato T, Takeda Y, Nakada T, Sendo F (1995) Inhibition by dexamethasone of human neutrophil apoptosis in vitro. *Nat Immun* 14, 198-208.
202. Katsumoto F, Miyazaki K, Nakayama F (1989) Stimulation of DNA synthesis in hepatocytes by Kupffer cells after partial hepatectomy. *Hepatology* 9, 405-410.
203. Katsura N, Ikai I, Mitaka T, Shiotani T, Yamanokuchi S, Sugimoto S, Kanazawa A, Terajima H, Mochizuki Y, Yamaoka Y (2002) Long-term culture of primary human hepatocytes with preservation of proliferative capacity and differentiated functions. *J Surg Res* 106, 115-123.
204. Kaufmann PM, Fiegel HC, Kneser U, Pollok JM, Kluth D, Rogiers X (1999) Influence of pancreatic islets on growth and differentiation of hepatocytes in co-culture. *Tissue Eng* 5, 583-596.
205. Kawahara T, Toso C, Douglas DN, Nourbakhsh M, Lewis JT, Tyrrell DL, Lund GA, Churchill TA, Kneteman NM (2010) Factors affecting hepatocyte isolation, engraftment, and replication in an in vivo model. *Liver Transpl* 16, 974-982.
206. Kawase M, Michibayashi N, Nakashima Y, Kurikawa N, Yagi K, Mizoguchi T (1997) Application of glutaraldehyde-crosslinked chitosan as a scaffold for hepatocyte attachment. *Biol Pharm Bull* 20, 708-710.
207. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L (2001) Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 7, 33-40.
208. Khalil M, Shariat-Panahi A, Tootle R, Ryder T, McCloskey P, Roberts E, Hodgson H, Selden C (2001) Human hepatocyte cell lines proliferating as cohesive spheroid colonies in alginate markedly upregulate both synthetic and detoxificatory liver function. *J Hepatol* 34, 68-77.
209. Khetani SR, Bhatia SN (2008) Microscale culture of human liver cells for drug development. *Nat Biotechnol* 26, 120-126.
210. Kidambi S, Sheng L, Yarmush ML, Toner M, Lee I, Chan C (2007) Patterned co-culture of primary hepatocytes and fibroblasts using polyelectrolyte multilayer templates. *Macromol Biosci* 7, 344-353.



211. Kim IH, Józkwicz A, Piedra PA, Oka K, Chan L (2001) Lifetime correction of genetic deficiency in mice with a single injection of helper-dependent adenoviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13282-13287.
212. Kim SR, Kubo T, Kuroda Y, Hojyo M, Matsuo T, Miyajima A, Usami M, Sekino Y, Matsushita T, Ishida S (2014) Comparative metabolome analysis of cultured fetal and adult hepatocytes in humans. *J Toxicol Sci* 39, 717-723.
213. Kim WH, Matsumoto K, Bessho K, Nakamura T (2005) Growth inhibition and apoptosis in liver myofibroblasts promoted by hepatocyte growth factor leads to resolution from liver cirrhosis. *Am J Pathol* 166, 1017-1028.
214. Kim Y, Lasher CD, Milford LM, Murali TM, Rajagopalan P (2010) A comparative study of genome-wide transcriptional profiles of primary hepatocytes in collagen sandwich and monolayer cultures. *Tissue Eng Part C Methods* 16, 1449-1460.
215. Kim Y, Rajagopalan P (2010) 3D hepatic cultures simultaneously maintain primary hepatocyte and liver sinusoidal endothelial cell phenotypes. *PLoS One* 5, e15456.
216. Kimura M, Moteki H, Ogihara M (2011) Inhibitory effects of dexamethasone on epidermal growth factor-induced DNA synthesis and proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Biol Pharm Bull* 34, 682-687.
217. Kjer KM, Fallon AM (1991) Efficient transfection of mosquito cells is influenced by the temperature at which DNA-calcium phosphate coprecipitates are prepared. *Arch Insect Biochem Physiol* 16, 189-200.
218. Klausen P, Pedersen L, Jurlander J, Baumann H (2000) Oncostatin M and interleukin 6 inhibit cell cycle progression by prevention of p27kip1 degradation in HepG2 cells. *Oncogene* 19, 3675-3683.
219. Klein RM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Biotechnology* 24, 384-386.
220. Kobayashi A, Yamakoshi K, Yajima Y, Utoh R, Yamada M, Seki M (2013) Preparation of stripe-patterned heterogeneous hydrogel sheets using microfluidic devices for high-density coculture of hepatocytes and fibroblasts. *J Biosci Bioeng* 116, 761-767.
221. Kobayashi N, Okitsu T, Tanaka N (2003) Cell choice for bioartificial livers. *Keio J Med* 52, 151-157.
222. Kogure K, Ishizaki M, Nemoto M, Kuwano H, Makuuchi M (1999) A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 6, 171-175.
223. Koide N, Shinji T, Tanabe T, Asano K, Kawaguchi M, Sakaguchi K, Koide Y, Mori M, Tsuji T (1989) Continued high albumin production by multicellular spheroids of adult rat hepatocytes formed in the presence of liver-derived proteoglycans. *Biochem Biophys Res Commun* 161, 385-391.
224. Komori M, Kikuchi O, Kitada M, Kamataki T (1992) Molecular cloning of monkey P450 1A1 cDNA and expression in yeast. *Biochim Biophys Acta* 113, 23-29.
225. Kondrup J, Bro B, Dich J, Grunnet N, Thieden HI (1980) Fractionation and characterization of rat hepatocytes isolated from ethanol-induced fatty liver. *Lab Invest* 43, 182-190.
226. Köping-Höggård M, Tubulekas I, Guan H, Edwards K, Nilsson M, Vårum KM, Artursson P (2001) Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. *Gene Ther* 8, 1108-1121.
227. Kornbliht AR, Pesce CG, Alonso CR, Cramer P, Srebrow A, Werbajh S, Muro AF (1996) The fibronectin gene as a model for splicing and transcription studies. *FASEB J* 10, 248-257.

228. Kortylewski M, Heinrich PC, Mackiewicz A, Schniertshauer U, Klingmüller U, Nakajima K, Hirano T, Horn F, Behrmann I (1999) Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1. *Oncogene* 18, 3742-3753.
229. Koul S, Johnson T, Pramanik S, Koul H (2005) Cellular transfection to deliver alanine-glyoxylate aminotransferase to hepatocytes: a rational gene therapy for primary hyperoxaluria-1 (PH-1). *Am J Nephrol* 25, 176-182.
230. Kowalski-Saunders PW, Winwood PJ, Arthur MJ, Wright R (1992) Reversible inhibition of albumin production by rat hepatocytes maintained on a laminin-rich gel (Engelbreth-Holm-Swarm) in response to secretory products of Kupffer cells and cytokines. *Hepatology* 16, 733-741.
231. Krause PI, Saghatolislam F, Koenig S, Unthan-Fechner K, Probst I (2009) Maintaining hepatocyte differentiation in vitro through co-culture with hepatic stellate cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 45, 205-212.
232. Kravchenko L, Petrenko A, Shanina I, Fuller B (2002) A simple non-enzymatic method for the isolation of high yields of functional rat hepatocytes. *Cell Biol Int* 26, 1003-1006.
233. Kumar MNVR (2000) A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym* 46, 1-27.
234. Kumar S, O'Dowd C, Dunckley MG, Lund T (1994) A comparative evaluation of three transfection procedures as assessed by resistance to G418 conferred to HEPG2 cells. *Biochem Mol Biol Int* 32, 1059-1066.
235. Kunath K, von Harpe A, Fischer D, Petersen H, Bickel U, Voigt K, Kissel T (2003) Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *J Control Release* 89, 113-125.
236. Kuo CH, Juang JH, Peng HL (2011) Coculture of hepatocytes with islets. *Transplant Proc* 43, 3167-3170.
237. Kuri-Harcuch W, Mendoza-Figueroa T (1989) Cultivation of adult rat hepatocytes on 3T3 cells: expression of various liver differentiated functions. *Differentiation* 41, 148-157.
238. Landry J, Bernier D, Ouellet C, Goyette R, Marceau N (1985) Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. *J Cell Biol* 101, 914-923.
239. Langer R, Vacanti JP (1993) Tissue engineering. *Science* 260, 920-926.
240. Langsch A, Giri S, Acikgöz A, Jasmund I, Frericks B, Bader A (2009) Interspecies difference in liver-specific functions and biotransformation of testosterone of primary rat, porcine and human hepatocyte in an organotypical sandwich culture. *Toxicol Lett* 188, 173-179.
241. Laron Z (1999) Somatomedin-1 (recombinant insulin-like growth factor-1): clinical pharmacology and potential treatment of endocrine and metabolic disorders. *BioDrugs* 11, 55-70.
242. Lázaro CA, Croager EJ, Mitchell C, Campbell JS, Yu C, Foraker J, Rhim JA, Yeoh GC, Fausto N (2003) Establishment, characterization, and long-term maintenance of cultures of human fetal hepatocytes. *Hepatology* 38, 1095-1106.
243. Lázaro CA, Croager EJ, Mitchell C, Campbell JS, Yu C, Foraker J, Rhim JA, Yeoh GC, Fausto N (2003) Establishment, characterization, and long-term maintenance of cultures of human fetal hepatocytes. *Hepatology* 38, 1095-1106.



244. Lechner JF, Smoot DT, Pfeifer AMA, Cole KH, Weston A, Groopman JD, Shields PG, Tokiwa T, Harris CC (1991) A non-tumorigenic human liver epithelial cell culture model for chemical and biological carcinogenesis investigations. *Neoplastic Transformation in Human Cell Culture*, str. 307-321, doi: 10.1007/978-1-4612-0411-4\_31.
245. LeCluyse EL, Audus KL, Hochman JH (1994) Formation of extensive canalicular networks by rat hepatocytes cultured in collagen-sandwich configuration. *Am J Physiol* 266, C1764-1774.
246. LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, Ferrara N (2003) Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 299, 890-893.
247. LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, Ferrara N (2003) Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 299, 890-893.
248. Lee KY, Mooney DJ (2001) Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev* 101, 1869-1879.
249. Lee PJ, Hung PJ, Lee LP (2007) An artificial liver sinusoid with a microfluidic endothelial-like barrier for primary hepatocyte culture. *Biotechnol Bioeng* 97, 1340-1346.
250. Lee SM, Schelcher C, Demmel M, Hauner M, Thasler WE (2013) Isolation of human hepatocytes by a two-step collagenase perfusion procedure. *J Vis Exp* 79.
251. Lee SY, Kim HJ, Choi D (2015) Cell sources, liver support systems and liver tissue engineering: alternatives to liver transplantation. *Int J Stem Cells* 8, 36-47.
252. Leeder JS, Gaedigk R, Marcucci KA, Gaedigk A, Vyhldal CA, Schindel BP, Pearce RE (2005) Variability of CYP3A7 expression in human fetal liver. *J Pharmacol Exp Ther* 314, 626-635.
253. Leighton J (1951) A sponge matrix method for tissue culture; formation of organized aggregates of cells in vitro. *J Natl Cancer Inst* 12, 545-561.
254. Leite SB, Teixeira AP, Miranda JP, Tostões RM, Clemente JJ, Sousa MF, Carrondo MJ, Alves PM (2011) Merging bioreactor technology with 3D hepatocyte-fibroblast culturing approaches: Improved in vitro models for toxicological applications. *Toxicol In Vitro* 25, 825-832.
255. Lemasters JJ, Peng XX, Bachmann S, Currin RT, Gao W, Thurman RG (1995) Dual role of Kupffer cell activation and endothelial cell damage in reperfusion injury to livers stored for transplantation surgery. *J Gastroenterol Hepatol* 10, S84-87.
256. Lerche C, Fautrel A, Shaw PM, Glaise D, Ballet F, Guillouzo A, Corcos L (1997) Regulation of the major detoxication functions by phenobarbital and 3-methylcholanthrene in co-cultures of rat hepatocytes and liver epithelial cells. *Eur J Biochem* 244, 98-106.
257. Lewis PF, Emerman M (1994) Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol* 68, 510-516.
258. Lewis WH, Srinivasan PR, Stokoe N, Siminovitch L (1980) Parameters governing the transfer of the genes for thymidine kinase and dihydrofolate reductase into mouse cells using metaphase chromosomes or DNA. *Somatic Cell Genet* 6, 333-347.
259. Li C, Ahlborn TE, Kraemer FB, Liu J (2001) Oncostatin M-induced growth inhibition and morphological changes of MDA-MB231 breast cancer cells are abolished by blocking the MEK/ERK signaling pathway. *Breast Cancer Res Treat* 66, 111-121.

260. Li J, Crowley ST, Duskey J, Khargharia S, Wu M, Rice KG (2015) Miniaturization of gene transfection assays in 384- and 1536-well microplates. *Anal Biochem* 470, 14-21.
261. Li J, Li L, Yu H, Cao H, Gao C, Gong Y (2006) Growth and metabolism of human hepatocytes on biomodified collagen poly(lactic-co-glycolic acid) three-dimensional scaffold. *ASAIO J* 52, 321-327.
262. Li J, Li LJ, Cao HC, Sheng GP, Yu HY, Xu W, Sheng JF (2005) Establishment of highly differentiated immortalized human hepatocyte line with simian virus 40 large tumor antigen for liver based cell therapy. *ASAIO J* 51, 262-268.
263. Li J, Pan J, Zhang L, Guo X, Yu Y (2003) Culture of primary rat hepatocytes within porous chitosan scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 67, 938-943.
264. Li J, Pan J, Zhang L, Yu Y (2003) Culture of hepatocytes on fructose-modified chitosan scaffolds. *Biomaterials* 24, 2317-2322.
265. Li N, Zhang Y, Hua F, Lai Y (2009) Absolute difference of hepatobiliary transporter multidrug resistance-associated protein (MRP2/Mrp2) in liver tissues and isolated hepatocytes from rat, dog, monkey, and human. *Drug Metab Dispos* 37, 66-73.
266. Liles WC, Dale DC, Klebanoff SJ (1995) Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. *Blood* 86, 3181-3188.
267. Lilja H, Blanc P, Demetriou AA, Rozga J (1998) Response of cultured fetal and adult rat hepatocytes to growth factors and cyclosporine. *Cell Transplant* 7, 257-266.
268. Lin KH, Maeda S, Inagaki H, Saito T (1997) Long-term culture of primary rat hepatocytes on heparin- or lambda carrageenan-containing collagen gels. *Biosci Biotechnol Biochem* 61, 971-974.
269. Lin MT, Pulkkinen L, Uitto J, Yoon K (2000) The gene gun: current applications in cutaneous gene therapy. *Int J Dermatol* 39, 161-170.
270. Liu HL, Wang YJ, Guo HT, Wang YM, Liu J, Yu YC (2004) Cryopreservation and gel collagen culture of porcine hepatocytes. *World J Gastroenterol* 10, 1010-1014.
271. Liu L, LeCluyse EL, Liu J, Klaassen CD (1996) Sulfotransferase gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 52, 1621-1630.
272. Liu Q, Muruve DA (2003) Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Ther* 10, 935-940.
273. Liu S, Wierød L, Skarpen E, Grøsvik H, Duan G, Huitfeldt HS (2013) EGF activates autocrine TGF $\alpha$  to induce prolonged egf receptor signaling and hepatocyte proliferation. *Cell Physiol Biochem* 32, 511-522.
274. Liu W, Hou Y, Chen H, Wei H, Lin W, Li J, Zhang M, He F, Jiang Y (2011) Sample preparation method for isolation of single-cell types from mouse liver for proteomic studies. *Proteomics* 11, 3556-3564.
275. Liu X, LeCluyse EL, Brouwer KR, Gan LS, Lemasters JJ, Stieger B, Meier PJ, Brouwer KL (1999) Biliary excretion in primary rat hepatocytes cultured in a collagen-sandwich configuration. *Am J Physiol* 277, G12-21.
276. Loyter A, Scangos GA, Ruddle FH (1982) Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 422-426.
277. Lu HF, Chua KN, Zhang PC, Lim WS, Ramakrishna S, Leong KW, Mao HQ (2005) Three-dimensional co-culture of rat hepatocyte spheroids and NIH/3T3 fibroblasts enhances hepatocyte functional maintenance. *Acta Biomater* 1, 399-410.
278. Lurquin PF (1997) Gene transfer by electroporation. *Mol Biotechnol* 7, 5-35.
279. Łaba A, Ostrowska A, Patrzalek D, Paradowski L, Lange A (2005) Characterization of human hepatocytes isolated from non-transplantable livers. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz.)* 53, 442-453.

280. Ma TY, Kikuchi M, Sarfeh IJ, Shimada H, Hoa NT, Tarnawski AS (1999) Basic fibroblast growth factor stimulates repair of wounded hepatocyte monolayer: modulatory role of protein kinase A and extracellular matrix. *J Lab Clin Med* 134, 363-371.
281. Ma X, Duan Y, Tschudy-Seney B, Roll G, Behbahan IS, Ahuja TP, Tolstikov V, Wang C, McGee J, Khoobyari S, Nolte JA, Willenbring H, Zern MA (2013) Highly efficient differentiation of functional hepatocytes from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2, 409-419.
282. Macdonald C, Willett B (1997) The immortalisation of rat hepatocytes by transfection with SV40 sequences. *Cytotechnology* 23, 161-170.
283. Magnusson MK, Mosher DF (1998) Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 1363-1370.
284. Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR (2005) New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol* 33, 24-34.
285. Malhi H, Irani AN, Gagandeep S, Gupta S (2002) Isolation of human progenitor liver epithelial cells with extensive replication capacity and differentiation into mature hepatocytes. *J Cell Sci* 115, 2679-2688.
286. Manservigi R, Argnani R, Marconi P (2010) HSV Recombinant Vectors for Gene Therapy. *Open Virol J* 4, 123-156.
287. Marion TL, Perry CH, St Claire RL 3rd, Brouwer KL (2012) Endogenous bile acid disposition in rat and human sandwich-cultured hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 261, 1-9.
288. Martinez-Hernandez A, Amenta PS (1995) The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J* 9, 1401-1410.
289. Maruyama M, Matsunaga T, Harada E, Ohmori S (2007) Comparison of basal gene expression and induction of CYP3As in HepG2 and human fetal liver cells. *Biol Pharm Bull* 30, 2091-2097.
290. Masaki H, Ishikawa T, Takahashi S, Okumura M, Sakai N, Haga M, Kominami K, Migita H, McDonald F, Shimada F, Sakurada K (2007) Heterogeneity of pluripotent marker gene expression in colonies generated in human iPS cell induction culture. *Stem Cell Res* 1, 105-115.
291. Matsui T, Kinoshita T, Morikawa Y, Tohya K, Katsuki M, Ito Y, Kamiya A, Miyajima A (2002) K-Ras mediates cytokine-induced formation of E-cadherin-based adherens junctions during liver development. *EMBO J* 21, 1021-1030.
292. Matsunaga T, Maruyama M, Harada E, Katsuyama Y, Sugihara N, Ise H, Negishi N, Ikeda U, Ohmori S (2004) Expression and induction of CYP3As in human fetal hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 318, 428-434.
293. Matsushita N, Oda H, Kobayashi K, Akaike T, Yoshida A (1994) Induction of cytochrome P-450s and expression of liver-specific genes in rat primary hepatocytes cultured on different extracellular matrices. *Biosci Biotechnol Biochem* 58, 1514-1516.
294. Mattei G, Di Patria V, Tirella A, Alaimo A, Elia G, Corti A, Paolicchi A, Ahluwalia A (2014) Mechanostructure and composition of highly reproducible decellularized liver matrices. *Acta Biomater* 10, 875-882.
295. Matthews KE, Mills GB, Horsfall W, Hack N, Skorecki K, Keating A (1993) Bead transfection: rapid and efficient gene transfer into marrow stromal and other adherent mammalian cells. *Exp Hematol* 21, 697-702.
296. Mavri-Damelin D, Damelin LH, Eaton S, Rees M, Selden C, Hodgson HJ (2008) Cells for bioartificial liver devices: the human hepatoma-derived cell line C3A produces urea but does not detoxify ammonia. *Biotechnol Bioeng* 99, 644-651.

297. McCuskey RS (2006) Sinusoidal endothelial cells as an early target for hepatic toxicants. *Clin Hemorheol Microcirc* 34, 5-10.
298. Mediavilla MG, Krapp A, Carrillo N, Rodríguez JV, Tiribelli C, Guibert EE (2006) Efficient cold transfection of pea ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase into rat hepatocytes. *J Gene Med* 8, 306-313.
299. Medvedev SP, Shevchenko AI, Zakian SM (2010) Induced Pluripotent Stem Cells: Problems and Advantages when Applying them in Regenerative Medicine. *Acta Naturae* 2, 18-28.
300. Meng FY, Chen ZS, Han M, Hu XP, He XX, Liu Y, He WT, Huang W, Guo H, Zhou P (2010) Porcine hepatocyte isolation and reversible immortalization mediated by retroviral transfer and site-specific recombination. *World J Gastroenterol* 16, 1660-1664.
301. Mesnil M, Fraslin JM, Piccoli C, Yamasaki H, Guguen-Guillouzo C (1987) Cell contact but not junctional communication (dye coupling) with biliary epithelial cells is required for hepatocytes to maintain differentiated functions. *Exp Cell Res* 173, 524-533.
302. Mennecozzi M, Landesmann B, Palosaari T, Harris G, Whelan M (2015) Sex differences in liver toxicity-do female and male human primary hepatocytes react differently to toxicants in vitro? *PLoS One* 10, e0122786.
303. Michalopoulos G, Pitot HC (1975) Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. Morphological and biochemical observations. *Exp Cell Res* 94, 70-78.
304. Michalopoulos G, Strom SC, Kligerman AD, Irons GP, Novicki DL (1981) Mutagenesis induced by procarcinogens at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus of human fibroblasts cocultured with rat hepatocytes. *Cancer Res* 41, 1873-1878.
305. Mills JB, Rose KA, Sadagopan N, Sahi J, de Morais SM (2004) Induction of drug metabolism enzymes and MDR1 using a novel human hepatocyte cell line. *J Pharmacol Exp Ther* 309, 303-309.
306. Milosevic N, Schawalder H, Maier P (1999) Kupffer cell-mediated differential down-regulation of cytochrome P450 metabolism in rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 368, 75-87.
307. Milyavsky M, Shats I, Erez N, Tang X, Senderovich S, Meerson A, Tabach Y, Goldfinger N, Ginsberg D, Harris CC, Rotter V (2003) Prolonged culture of telomerase-immortalized human fibroblasts leads to a premalignant phenotype. *Cancer Res* 63, 7147-7157.
308. Minagawa K, Matsuzawa Y, Yoshikawa K, Matsumoto M, Doi M (1991) Direct observation of the biphasic conformational change of DNA induced by cationic polymers. *FEBS Lett* 295, 67-69.
309. Mintz HA, Yawn DH, Safer B, Bresnick E, Liebelt AG, Blailock ZR, Rabin ER, Schwartz A (1967) Morphological and biochemical studies of isolated mitochondria from fetal, neonatal, and adult liver and from neoplastic tissues. *J Cell Biol* 34, 513-523.
310. Miranda JP, Rodrigues A, Tostões RM, Leite S, Zimmerman H, Carrondo MJ, Alves PM (2010) Extending hepatocyte functionality for drug-testing applications using high-viscosity alginate-encapsulated three-dimensional cultures in bioreactors. *Tissue Eng Part C Methods* 16, 1223-1232.
311. Mitaka T, Mikami M, Sattler GL, Pitot HC, Mochizuki Y (1992) Small cell colonies appear in the primary culture of adult rat hepatocytes in the presence of nicotinamide and epidermal growth factor. *Hepatology* 16, 440-447.



312. Mitaka T, Sato F, Mizuguchi T, Yokono T, Mochizuki Y (1999) Reconstruction of hepatic organoid by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *Hepatology* 29, 111-125.
313. Mitaka T, Sattler CA, Sattler GL, Sargent LM, Pitot HC (1991) Multiple cell cycles occur in rat hepatocytes cultured in the presence of nicotinamide and epidermal growth factor. *Hepatology* 13, 21-30.
314. Miura S, Suzuki A (2014) Acquisition of lipid metabolic capability in hepatocyte-like cells directly induced from mouse fibroblasts. *Front Cell Dev Biol* 2, 43.
315. Miyamoto S, Katz BZ, Lafrenie RM, Yamada KM (1998) Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 857, 119-129.
316. Miyamoto Y, Enosawa S, Takeuchi T, Takezawa T (2009) Cryopreservation in situ of cell monolayers on collagen vitrigel membrane culture substrata: ready-to-use preparation of primary hepatocytes and ES cells. *Cell Transplant* 18, 619-626.
317. Miyazaki M, Mihara K, Bai L, Kano Y, Tsuboi S, Endo A, Seshimo K, Yoshioka T, Namba M (1993) Immortalization of epithelial-like cells from human liver tissue with SV40 T-antigen gene. *Exp Cell Res* 206, 27-35.
318. Mobarra N, Soleimani M, Kouhkan F, Hesari Z, Lahmy R, Mossahebi-Mohammadi M, Arefian E, Jaafarpour Z, Nasiri H, Pakzad R, Tavakoli R, Pasalar P (2014) Efficient Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cell (hiPSC) Derived Hepatocyte-Like Cells on hMSCs Feeder. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 8, 20-29.
319. Moghe PV, Coger RN, Toner M, Yarmush ML (1997) Cell-cell interactions are essential for maintenance of hepatocyte function in collagen gel but not on matrigel. *Biotechnol Bioeng* 56, 706-711.
320. Monga SP, Hout MS, Baun MJ, Micsenyi A, Muller P, Tummalapalli L, Ranade AR, Luo JH, Strom SC, Gerlach JC (2005) Mouse fetal liver cells in artificial capillary beds in three-dimensional four-compartment bioreactors. *Am J Pathol* 167, 1279-1292.
321. Moriya K, Sakai K, Yan MH, Sakai T (2012) Fibronectin is essential for survival but is dispensable for proliferation of hepatocytes in acute liver injury in mice. *Hepatology* 56, 311-321.
322. Morsiani E, Brogli M, Galavotti D, Bellini T, Ricci D, Pazzi P, Puviani AC (2001) Long-term expression of highly differentiated functions by isolated porcine hepatocytes perfused in a radial-flow bioreactor. *Artif Organs* 25, 740-748.
323. Murakami S, Ijima H, Ono T, Kawakami K (2004) Development of co-culture system of hepatocytes with bone marrow cells for expression and maintenance of hepatic functions. *Int J Artif Organs* 27, 118-126.
324. Myllyharju J, Kivirikko KI (2004) Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* 20, 33-43.
325. Na GH, Kim DG, Jung ES (2015) Culture with Growth Factor Supplements Improves the Viability and Function of Rat Hepatocytes. *J Korean Soc Transplant* 29, 139-147.
326. Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, Tateno C, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Ikeda K, Tanaka Y, Mizuguchi H (2015) Efficient Engraftment of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocyte-Like Cells in uPA/SCID Mice by Overexpression of FNK, a Bcl-xL Mutant Gene. *Cell Transplant* 24, 1127-1138.
327. Nahmias Y, Berthiaume F, Yarmush ML (2007) Integration of technologies for hepatic tissue engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 103, 309-329.
328. Nahmias Y, Kramvis Y, Barbe L, Casali M, Berthiaume F, Yarmush ML (2006) A novel formulation of oxygen-carrying matrix enhances liver-specific function of cultured hepatocytes. *FASEB J* 20, 2531-2533.

329. Nakamura S, Ijima H (2013) Solubilized matrix derived from decellularized liver as a growth factor-immobilizable scaffold for hepatocyte culture. *J Biosci Bioeng* 116, 746-753.
330. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A (1984) Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 122, 1450-1459.
331. Nakase J, Kitaoka K, Matsumoto K, Tomita K (2010) Facilitated tendon-bone healing by local delivery of recombinant hepatocyte growth factor in rabbits. *Arthroscopy* 26, 84-90.
332. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267.
333. Natarajan A, Wagner B, Sibilina M (2007) The EGF receptor is required for efficient liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17081-17086.
334. Nayak S, Dey S, Kundu SC (2014) Silk sericin-alginate-chitosan microcapsules: hepatocytes encapsulation for enhanced cellular functions. *Int J Biol Macromol* 65, 258-266.
335. Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA (2012) Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res* 1, 27.
336. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1, 841-845.
337. Nishikawa M, Kojima N, Komori K, Yamamoto T, Fujii T, Sakai Y (2008) Enhanced maintenance and functions of rat hepatocytes induced by combination of on-site oxygenation and coculture with fibroblasts. *J Biotechnol* 133, 253-260.
338. Nishimura M, Ejiri Y, Kishimoto S, Suzuki S, Satoh T, Horie T, Narimatsu S, Naito S (2011) Expression levels of drug-metabolizing enzyme, transporter, and nuclear receptor mRNAs in a novel three-dimensional culture system for human hepatocytes using micro-space plates. *Drug Metab Pharmacokinet* 26, 137-144.
339. Nishimura M, Hagi M, Ejiri Y, Kishimoto S, Horie T, Narimatsu S, Naito S (2010) Secretion of albumin and induction of CYP1A2 and CYP3A4 in novel three-dimensional culture system for human hepatocytes using micro-space plate. *Drug Metab Pharmacokinet* 25, 236-242.
340. Nishimura M, Koeda A, Suganuma Y, Suzuki E, Shimizu T, Nakayama M, Satoh T, Narimatsu S, Naito S (2007) Comparison of inducibility of CYP1A and CYP3A mRNAs by prototypical inducers in primary cultures of human, cynomolgus monkey, and rat hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet* 22, 178-186.
341. Nishimura M, Koeda A, Suzuki E, Kawano Y, Nakayama M, Satoh T, Narimatsu S, Naito S (2006) Regulation of mRNA expression of MDR1, MRP1, MRP2 and MRP3 by prototypical microsomal enzyme inducers in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet* 21, 297-307.
342. Nishimura M, Yoshitsugu H, Naito S, Hiraoka I (2002) Evaluation of gene induction of drug-metabolizing enzymes and transporters in primary culture of human hepatocytes using high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi* 122, 339-361.
343. O'Brien PJ, Chan K, Silber PM (2004) Human and animal hepatocytes in vitro with extrapolation in vivo. *Chem Biol Interact* 50, 97-114.
344. Ohya W, Funakoshi H, Kurosawa T, Nakamura T (2007) Hepatocyte growth factor (HGF) promotes oligodendrocyte progenitor cell proliferation and inhibits its differentiation during postnatal development in the rat. *Brain Res* 1147, 51-65.



345. Okamoto M, Ishida Y, Keogh A, Strain A (1998) Evaluation of the function of primary human hepatocytes co-cultured with the human hepatic stellate cell (HSC) line LI90. *Int J Artif Organs* 21, 353-359.
346. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, Hong H, Nakagawa M, Tanabe K, Tezuka K, Shibata T, Kunisada T, Takahashi M, Takahashi J, Saji H, Yamanaka S (2011) A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 8, 409-412.
347. Okunishi K, Dohi M, Nakagome K, Tanaka R, Mizuno S, Matsumoto K, Miyazaki J, Nakamura T, Yamamoto K (2005) A novel role of hepatocyte growth factor as an immune regulator through suppressing dendritic cell function. *J Immunol* 175, 4745-4753.
348. Olthoff KM (2002) Molecular pathways of regeneration and repair after liver transplantation. *World J Surg* 26, 831-837.
349. O'Mahoney JV, Adams TE (1994) Optimization of experimental variables influencing reporter gene expression in hepatoma cells following calcium phosphate transfection. *DNA Cell Biol* 13, 1227-1232.
350. Opitz OG, Suliman Y, Hahn WC, Harada H, Blum HE, Rustgi AK (2001) Cyclin D1 overexpression and p53 inactivation immortalize primary oral keratinocytes by a telomerase-independent mechanism. *J Clin Invest* 108, 725-732.
351. Osten P, Grinevich V, Cetin A (2007) Viral vectors: a wide range of choices and high levels of service. *Handb Exp Pharmacol* 178, 177-202.
352. Pagano JS, Vaheri A (1965) Enhancement of infectivity of poliovirus RNA with diethylaminoethyl-dextran (DEAE-D). *Arch Gesamte Virusforsch* 17, 456-464.
353. Paine AJ (1990) The maintenance of cytochrome P-450 in rat hepatocyte culture: some applications of liver cell cultures to the study of drug metabolism, toxicity and the induction of the P-450 system. *Chem Biol Interact* 74, 1-31.
354. Paine AJ, Williams LJ, Legg RF (1979) Apparent maintenance of cytochrome P 450 by nicotinamide in primary cultures of rat hepatocytes. *Life Sci* 24, 2185-2191.
355. Pampaloni F, Stelzer EH, Masotti A (2009) Three-dimensional tissue models for drug discovery and toxicology. *Recent Pat Biotechnol* 3, 103-117.
356. Pan MX, Hu PY, Cheng Y, Cai LQ, Rao XH, Wang Y, Gao Y (2014) An efficient method for decellularization of the rat liver. *J Formos Med Assoc* 113, 680-687.
357. Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, Yarmush ML (2007) Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One* 2, e941.
358. Park IK, Park YH, Shin BA, Choi ES, Kim YR, Akaike T, Cho CS (2000) Galactosylated chitosan-graft-dextran as hepatocyte-targeting DNA carrier. *J Control Release* 69, 97-108.
359. Park IK, Yang J, Jeong HJ, Bom HS, Harada I, Akaike T, Kim SI, Cho CS (2003) Galactosylated chitosan as a synthetic extracellular matrix for hepatocytes attachment. *Biomaterials* 24, 2331-2337.
360. Park JK, Lee DH (2005) Bioartificial liver systems: current status and future perspective. *J Biosci Bioeng* 99, 311-319.
361. Perrone CE, Williams GM (1998) Rodent hepatocarcinogenic peroxisome proliferators induce proliferation of rat hepatocytes in primary mixed cultures with rat liver epithelial cells. *Cancer Lett* 123, 27-33.
362. Peters SJ, Vanhaecke T, Papeleu P, Rogiers V, Haagsman HP, van Norren K (2010) Co-culture of primary rat hepatocytes with rat liver epithelial cells enhances interleukin-6-induced acute-phase protein response. *Cell Tissue Res* 340, 451-457.

363. Ping C, Xiaoling D, Jin Z, Jiahong D, Jiming D, Lin Z (2006) Hepatic sinusoidal endothelial cells promote hepatocyte proliferation early after partial hepatectomy in rats. *Arch Med Res* 37, 576-583.
364. Pinnaduwa P, Schmitt L, Huang L (1989) Use of a quaternary ammonium detergent in liposome mediated DNA transfection of mouse L-cells. *Biochim Biophys Acta* 985, 33-37.
365. Pluta K, Kacprzak MM (2009) Use of HIV as a gene transfer vector. *Acta Biochim Pol* 56, 531-595.
366. Pollard H, Remy JS, Loussouarn G, Demolombe S, Behr JP, Escande D (1998) Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem* 273, 7507-7511.
367. Poyck PP, van Wijk AC, van der Hoeven TV, de Waart DR, Chamuleau RA, van Gulik TM, Oude Elferink RP, Hoekstra R (2008) Evaluation of a new immortalized human fetal liver cell line (cBAL111) for application in bioartificial liver. *J Hepatol* 48, 266-275.
368. Presta M, Statuto M, Rusnati M, Dell'Era P, Ragnotti G (1989) Characterization of a Mr 25,000 basic fibroblast growth factor form in adult, regenerating, and fetal rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 164, 1182-1189.
369. Rabussay D, Dev NB, Fewell J, Smith LC, Widera G, Zhang L (2003) Enhancement of therapeutic drug and DNA delivery into cells by electroporation. *J Phys D Appl Phys* 36, 348-363.
370. Ren H, Shi X, Tao L, Xiao J, Han B, Zhang Y, Yuan X, Ding Y (2013) Evaluation of two decellularization methods in the development of a whole-organ decellularized rat liver scaffold. *Liver Int* 33, 448-458.
371. Ricard-Blum S (2011) The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a004978.
372. Richert L, Alexandre E, Lloyd T, Orr S, Viollon-Abadie C, Patel R, Kingston S, Berry D, Dennison A, Heyd B, Manton G, Jaeck D (2004) Tissue collection, transport and isolation procedures required to optimize human hepatocyte isolation from waste liver surgical resections. A multilaboratory study. *Liver Int* 24, 371-378.
373. Richert L, Binda D, Hamilton G, Viollon-Abadie C, Alexandre E, Bigot-Lasserre D, Bars R, Coassolo P, LeCluyse E (2002) Evaluation of the effect of culture configuration on morphology, survival time, antioxidant status and metabolic capacities of cultured rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 16, 89-99.
374. Richert L, Tuschl G, Abadie C, Blanchard N, Pekthong D, Manton G, Weber JC, Mueller SO (2009) Use of mRNA expression to detect the induction of drug metabolising enzymes in rat and human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 235, 86-96.
375. Ricordi C, Callery MP, Lacy PE, Flye MW (1989) Pancreatic islets enhance hepatocellular survival in combined hepatocyte-islet-cell transplantation. *Transplant Proc* 21, 2689-2690.
376. Ricordi C, Lacy PE, Callery MP, Park PW, Flye MW (1989) Trophic factors from pancreatic islets in combined hepatocyte-islet allografts enhance hepatocellular survival. *Surgery* 105, 218-223.
377. Ricordi C, Zeng Y, Tzakis A, Alejandro R, Demetris AJ, Fung J, Bereiter DR, Mintz DH, Starzl TE (1991) Evidence that canine pancreatic islets promote the survival of human hepatocytes in nude mice. *Transplantation* 52, 749-751.
378. Rinaudo M (2006) Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci* 31, 603-632.

379. Ringel M, von Mach MA, Santos R, Feilen PJ, Brulport M, Hermes M, Bauer AW, Schormann W, Tanner B, Schön MR, Oesch F, Hengstler JG (2005) Hepatocytes cultured in alginate microspheres: an optimized technique to study enzyme induction. *Toxicology* 206, 153-167.
380. Ripp SL, Mills JB, Fahmi OA, Trevena KA, Liras JL, Maurer TS, de Morais SM (2006) Use of immortalized human hepatocytes to predict the magnitude of clinical drug-drug interactions caused by CYP3A4 induction. *Drug Metab Dispos* 34, 1742-1748.
381. Rippe RA, Brenner DA, Leffert HL (1990) DNA-mediated gene transfer into adult rat hepatocytes in primary culture. *Mol Cell Biol* 10, 689-695.
382. Rippin SJ, Hagenbuch B, Meier PJ, Stieger B (2001) Cholestatic expression pattern of sinusoidal and canalicular organic anion transport systems in primary cultured rat hepatocytes. *Hepatology* 33, 776-782.
383. Rogers SA, Miller SB, Hammerman MR (1991) Insulin-like growth factor I gene expression in isolated rat renal collecting duct is stimulated by epidermal growth factor. *J Clin Invest* 87, 347-351.
384. Rojkind M, Novikoff PM, Greenwel P, Rubin J, Rojas-Valencia L, de Carvalho AC, Stockert R, Spray D, Hertzberg EL, Wolkoff AW (1995) Characterization and functional studies on rat liver fat-storing cell line and freshly isolated hepatocyte coculture system. *Am J Pathol* 146, 1508-1520.
385. Rolland AP (1998) From genes to gene medicines: recent advances in nonviral gene delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 15, 143-198.
386. Ross MA, Sander CM, Kleeb TB, Watkins SC, Stolz DB (2001) Spatiotemporal expression of angiogenesis growth factor receptors during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology* 34, 1135-1148.
387. Rosso F, Marino G, Giordano A, Barbarisi M, Parmeggiani D, Barbarisi A (2005) Smart materials as scaffolds for tissue engineering. *J Cell Physiol* 203, 465-470.
388. Roymans D, Van Looveren C, Leone A, Parker JB, McMillian M, Johnson MD, Koganti A, Gilissen R, Silber P, Mannens G, Meuldermans W (2004) Determination of cytochrome P450 1A2 and cytochrome P450 3A4 induction in cryopreserved human hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 67, 427-437.
389. Rozario T, DeSimone DW (2010) The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol* 341, 126-140.
390. Ruoslahti E (1999) Fibronectin and its integrin receptors in cancer. *Adv Cancer Res* 76, 1-20.
391. Sakai Y, Ichikawa K, Sakoda A, Suzuki M (1996) Quantitative comparison of rat hepatocyte functions in two improved culture systems with or without rat liver epithelial cell line. *Cytotechnology* 21, 243-252.
392. Sakamaki Y, Matsumoto K, Mizuno S, Miyoshi S, Matsuda H, Nakamura T (2002) Hepatocyte growth factor stimulates proliferation of respiratory epithelial cells during postpneumectomy compensatory lung growth in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26, 525-533.
393. Salerno S, Campana C, Morelli S, Drioli E, De Bartolo L (2011) Human hepatocytes and endothelial cells in organotypic membrane systems. *Biomaterials* 32, 8848-8859.
394. Salmon WD jr, Daughaday WH (1957) A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* 49, 825-836.
395. Samluk A, Zakrzewska KE, Pluta KD (2013) Generation of fluorescently labeled cell lines, C3A hepatoma cells, and human adult skin fibroblasts to study coculture models. *Artif Organs* 37, E123-130.

396. Sánchez A, Alvarez AM, Pagan R, Roncero C, Vilaró S, Benito M, Fabregat I (2000) Fibronectin regulates morphology, cell organization and gene expression of rat fetal hepatocytes in primary culture. *J Hepatol* 32, 242-250.
397. Sato F, Mitaka T, Mizuguchi T, Mochizuki Y, Hirata K (1999) Effects of nicotinamide-related agents on the growth of primary rat hepatocytes and formation of small hepatocyte colonies. *Liver* 19, 481-488.
398. Sawada N, Lee GH, Mochizuki Y, Ishikawa T (1988) Active proliferation of mouse hepatocytes in primary culture under defined conditions as compared to rat hepatocytes. *Jpn J Cancer Res* 79, 983-988.
399. Sawada N, Tomomura A, Sattler CA, Sattler GL, Kleinman HK, Pitot HC (1986) Extracellular matrix components influence DNA synthesis of rat hepatocytes in primary culture. *Exp Cell Res* 167, 458-470.
400. Schaefer O, Ohtsuki S, Kawakami H, Inoue T, Liehner S, Saito A, Sakamoto A, Ishiguro N, Matsumaru T, Terasaki T, Ebner T (2012) Absolute quantification and differential expression of drug transporters, cytochrome P450 enzymes, and UDP-glucuronosyltransferases in cultured primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 40, 93-103.
401. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S (2011) The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 1813, 878-888.
402. Schirmacher P, Geerts A, Pietrangelo A, Dienes HP, Rogler CE (1992) Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A is expressed in fat-storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells. *Hepatology* 15, 5-11.
403. Schlegel C, Heck R, Niketeghad F, Schirmacher P, Radaeva S, Oesch F, Dienes HP, Bannasch P, Steinberg P (1997) Establishment and characterization of a nontumorigenic cell line derived from a human hepatocellular adenoma expressing hepatocyte-specific markers. *Exp Cell Res* 236, 418-426.
404. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C (1995) Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373, 699-702.
405. Schuetz EG, Li D, Omiecinski CJ, Muller-Eberhard U, Kleinman HK, Elswick B, Guzelian PS (1988) Regulation of gene expression in adult rat hepatocytes cultured on a basement membrane matrix. *J Cell Physiol* 134, 309-323.
406. Schwartz RE, Fleming HE, Khetani SR, Bhatia SN (2014) Pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. *Biotechnol Adv* 32, 504-513.
407. Schwarzbauer JE (1991) Identification of the fibronectin sequences required for assembly of a fibrillar matrix. *J Cell Biol* 113, 1463-1473.
408. Sekiya S, Suzuki A (2011) Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Science* 475, 390-393.
409. Selzner N, Selzner M, Odermatt B, Tian Y, Van Rooijen N, Clavien PA (2003) ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF-alpha/IL-6 in mice. *Gastroenterology* 124, 692-700.
410. Shah AC, Benos D, Gillespie GY, Markert JM (2003) Oncolytic viruses: clinical applications as vectors for the treatment of malignant gliomas. *J Neurooncol* 65, 203-226.
411. Shang Y, Tamai M, Ishii R, Nagaoka N, Yoshida Y, Ogasawara M, Yang J, Tagawa Y (2014) Hybrid sponge comprised of galactosylated chitosan and hyaluronic acid mediates the co-culture of hepatocytes and endothelial cells. *J Biosci Bioeng* 117, 99-106.



412. Shanks MR, Cassio D, Lecoq O, Hubbard AL (1994) An improved polarized rat hepatoma hybrid cell line. Generation and comparison with its hepatoma relatives and hepatocytes in vivo. *J Cell Sci* 107, 813-825.
413. Sharma N, Schloss R, Yarmush M (2008) What came first: fully functional or metabolically mature liver? *Crit Rev Biomed Eng* 36, 413-439.
414. Shay JW, Van Der Haegen BA, Ying Y, Wright WE (1993) The frequency of immortalization of human fibroblasts and mammary epithelial cells transfected with SV40 large T-antigen. *Exp Cell Res* 209, 45-52.
415. Shen L, Hillebrand A, Wang DQ, Liu M (2012) Isolation and primary culture of rat hepatic cells. *J Vis Exp* 64, pii:3917.
416. Shimizu A, Takamura T, Matsuzawa N, Nakamura S, Nabemoto S, Takeshita Y, Misu H, Kurita S, Sakurai M, Yokoyama M, Zen Y, Sasaki M, Nakanuma Y, Kaneko S (2007) Regulation of adiponectin receptor expression in human liver and a hepatocyte cell line. *Metabolism* 56, 1478-1485.
417. Shiojiri N, Lemire JM, Fausto N (1991) Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development. *Cancer Res* 51, 2611-2620.
418. Shoulders MD, Raines RT (2009) Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* 78, 929-958.
419. Shulman M, Nahmias Y (2013) Long-term culture and coculture of primary rat and human hepatocytes. *Methods Mol Biol* 945, 287-302.
420. Shulman M, Nahmias Y (2013) Long-term culture and coculture of primary rat and human hepatocytes. *Methods Mol Biol* 945, 287-302.
421. Simeonov KP, Uppal H1 (2014) Direct reprogramming of human fibroblasts to hepatocyte-like cells by synthetic modified mRNAs. *PLoS One* 9, e100134.
422. Simpson RJ, Hammacher A, Smith DK, Matthews JM, Ward LD (1997) Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci* 6, 929-955.
423. Singla AK, Chawla M (2001) Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects--an update. *J Pharm Pharmacol* 53, 1047-1067.
424. Sinn PL, Sauter SL, McCray PB Jr. (2005) Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors--design, biosafety, and production. *Gene Ther* 12, 1089-1098.
425. Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, Duris C, North PE, Dalton S, Duncan SA (2010) Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 51, 297-305.
426. Smith LL, Collier HA, Roberts JM (2003) Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nat Cell Biol* 5, 474-479.
427. Smith RH (2008) Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther* 15, 817-822.
428. Song Z, Cai J, Liu Y, Zhao D, Yong J, Duo S, Song X, Guo Y, Zhao Y, Qin H, Yin X, Wu C, Che J, Lu S, Ding M, Deng H (2009) Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Res* 19, 1233-1242.
429. Späth GF, Weiss MC (1998) Hepatocyte nuclear factor 4 provokes expression of epithelial marker genes, acting as a morphogen in dedifferentiated hepatoma cells. *J Cell Biol* 140, 935-946.
430. Spergel JM, Chen-Kiang S (1991) Interleukin 6 enhances a cellular activity that functionally substitutes for E1A protein in transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6472-6476.
431. St George JA (2003) Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Ther* 10, 1135-1141.

432. Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J (1987) Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* 327, 239-242.
433. Strain AJ, Ismail T, Tsubouchi H, Arakaki N, Hishida T, Kitamura N, Daikuhara Y, McMaster P (1991) Native and recombinant human hepatocyte growth factors are highly potent promoters of DNA synthesis in both human and rat hepatocytes. *J Clin Invest* 87, 1853-1857.
434. Strom S, Kligerman AD, Michalopoulos G (1981) Comparisons of the effects of chemical carcinogens in mixed cultures of rat hepatocytes and human fibroblasts. *Carcinogenesis* 2, 709-715.
435. Strom S, Michalopoulos G (1982) Mutagenesis and DNA binding of benzo(a)pyrene in cocultures of rat hepatocytes and human fibroblasts. *Cancer Res* 42, 4519-4524.
436. Sturm J, Keese M, Zhang H, Bönninghoff R, Magdeburg R, Vajkoczy P, Dono R, Zeller R, Gretz N (2004) Liver regeneration in FGF-2-deficient mice: VEGF acts as potential functional substitute for FGF-2. *Liver Int* 24, 161-168.
437. Su WT, Chen XW1 (2014) Stem cells from human exfoliated deciduous teeth differentiate into functional hepatocyte-like cells by herbal medicine. *Biomed Mater Eng* 24, 2243-2247.
438. Sudo K, Yamada Y, Saito K, Shimizu S, Ohashi H, Kato T, Moriwaki H, Ito H, Seishima M (2008) TNF-alpha and IL-6 signals from the bone marrow derived cells are necessary for normal murine liver regeneration. *Biochim Biophys Acta* 1782, 671-679.
439. Suffys P, Beyaert R, De Valck D, Vanhaesebroeck B, Van Roy F, Fiers W (1991) Tumour-necrosis-factor-mediated cytotoxicity is correlated with phospholipase-A2 activity, but not with arachidonic acid release per se. *Eur J Biochem* 195, 465-475.
440. Suzuki H, Toyoda M, Horiguchi N, Kakizaki S, Ohyama T, Takizawa D, Ichikawa T, Sato K, Takagi H, Mori M (2009) Hepatocyte growth factor protects against Fas-mediated liver apoptosis in transgenic mice. *Liver Int* 29, 1562-1568.
441. Suzuki T, Shin BC, Fujikura K, Matsuzaki T, Takata K (1998) Direct gene transfer into rat liver cells by in vivo electroporation. *FEBS Lett* 425, 436-440.
442. Swift B, Pfeifer ND, Brouwer KL (2010) Sandwich-cultured hepatocytes: an in vitro model to evaluate hepatobiliary transporter-based drug interactions and hepatotoxicity. *Drug Metab Rev* 42, 446-471.
443. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
444. Takashi H, Katsumi M, Toshihiro A (2007) Hepatocytes maintain their function on basement membrane formed by epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 359, 151-156.
445. Takayama G, Taniguchi A, Okano T (2007) Identification of differentially expressed genes in hepatocyte/endothelial cell co-culture system. *Tissue Eng* 13, 159-166.
446. Takayama G, Taniguchi A, Okano T (2007) Identification of differentially expressed genes in hepatocyte/endothelial cell co-culture system. *Tissue Eng* 13, 159-166.
447. Takeda M, Yamamoto M, Isoda K, Higashiyama S, Hirose M, Ohgushi H, Kawase M, Yagi K (2005) Availability of bone marrow stromal cells in three-dimensional coculture with hepatocytes and transplantation into liver-damaged mice. *J Biosci Bioeng* 100, 77-81.
448. Takenouchi T, Yoshioka M, Yamanaka N, Kitani H (2010) Reversible conversion of epithelial and mesenchymal phenotypes in SV40 large T antigen-immortalized rat liver cell lines. *Cell Biol Int Rep* 17, e00001.



449. Takezawa T, Yamazaki M, Mori Y, Yonaha T, Yoshizato K (1992) Morphological and immuno-cytochemical characterization of a hetero-spheroid composed of fibroblasts and hepatocytes. *J Cell Sci* 101, 495-501.
450. Tamai M, Adachi E, Tagawa Y (2013) Characterization of a liver organoid tissue composed of hepatocytes and fibroblasts in dense collagen fibrils. *Tissue Eng Part A* 19, 2527-2535.
451. Tamkun JW, Schwarzbauer JE, Hynes RO (1984) A single rat fibronectin gene generates three different mRNAs by alternative splicing of a complex exon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 5140-5144.
452. Tang N, Wang Y, Wang X, Zhou L, Zhang F, Li X, Chen Y (2012) Stable overexpression of arginase I and ornithine transcarbamylase in HepG2 cells improves its ammonia detoxification. *J Cell Biochem* 113, 518-527.
453. Tasaka Y, Matsumoto H, Inoue Y, Hirata Y (1989) Contents and secretion of glucagon and insulin in rat pancreatic islets from the viewpoint of their localization in pancreas. *Tohoku J Exp Med* 159, 123-130.
454. Taub R (2004) Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 836-847.
455. te Velde AA, Flendrig LM, Ladiges NC, Chamuleau RA (1997) Immunological consequences of the use of xenogeneic hepatocytes in a bioartificial liver for acute liver failure. *Int J Artif Organs* 20, 229-233.
456. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 4, 346-358.
457. Tiberio GA, Tiberio L, Benetti A, Cervi E, Montani N, Dreano M, Garotta G, Cerea K, Steimberg N, Pandolfo G, Ferrari-Bravo A, Mazzoleni G, Giulini SM, Schiaffonati L (2008) IL-6 Promotes compensatory liver regeneration in cirrhotic rat after partial hepatectomy. *Cytokine* 42, 372-378.
458. Toh YC, Lim TC, Tai D, Xiao G, van Noort D, Yu H (2009) A microfluidic 3D hepatocyte chip for drug toxicity testing. *Lab Chip* 9, 2026-2035.
459. Tolosa L, Donato MT, Pérez-Cataldo G, Castell JV, Gómez-Lechón MJ (2012) Upgrading cytochrome P450 activity in HepG2 cells co-transfected with adenoviral vectors for drug hepatotoxicity assessment. *Toxicol In Vitro* 26, 1272-1277.
460. Tomanin R, Scarpa M (2004) Why do we need new gene therapy viral vectors? Characteristics, limitations and future perspectives of viral vector transduction. *Curr Gene Ther* 4, 357-372.
461. Tomizawa M, Shinozaki F, Motoyoshi Y, Sugiyama T, Yamamoto S, Ishige N (2015) An Optimal Medium Supplementation Regimen for Initiation of Hepatocyte Differentiation in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *J Cell Biochem* 116, 1479-1489.
462. Tompkins L, Lynch C, Haidar S, Polli J, Wang H (2010) Effects of commonly used excipients on the expression of CYP3A4 in colon and liver cells. *Pharm Res* 27, 1703-1712.
463. Tostões RM, Leite SB, Miranda JP, Sousa M, Wang DI, Carrondo MJ, Alves PM (2011) Perfusion of 3D encapsulated hepatocytes--a synergistic effect enhancing long-term functionality in bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 108, 41-49.
464. Trimble C, Lin CT, Hung CF, Pai S, Juang J, He L, Gillison M, Pardoll D, Wu L, Wu TC (2003) Comparison of the CD8+ T cell responses and antitumor effects generated by DNA vaccine administered through gene gun, biojector, and syringe. *Vaccine* 21, 4036-4042.
465. Troadec MB, Glaise D, Lamirault G, Le Cunff M, Guérin E, Le Meur N, Détiavaud L, Zindy P, Leroyer P, Guisle I, Duval H, Gripon P, Théret N, Boudjema K, Guguen-

- Guillouzo C, Brissot P, Léger JJ, Loréal O (2006) Hepatocyte iron loading capacity is associated with differentiation and repression of motility in the HepaRG cell line. *Genomics* 87, 93-103.
466. Tukov FF, Maddox JF, Amacher DE, Bobrowski WF, Roth RA, Ganey PE (2006) Modeling inflammation-drug interactions in vitro: a rat Kupffer cell-hepatocyte coculture system. *Toxicol In Vitro* 20, 1488-1499.
467. Turncliff RZ, Tian X, Brouwer KL (2006) Effect of culture conditions on the expression and function of Bsep, Mrp2, and Mdr1a/b in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 71, 1520-1529.
468. Ulvestad M, Björquist P, Molden E, Asberg A, Andersson TB (2011) OATP1B1/1B3 activity in plated primary human hepatocytes over time in culture. *Biochem Pharmacol* 82, 1219-1226.
469. Uygun BE, Price G, Saedi N, Izamis ML, Berendsen T, Yarmush M, Uygun K (2011) Decellularization and recellularization of whole livers. *J Vis Exp* 48, pii: 2394.
470. Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Izamis ML, Guzzardi MA, Shulman C, Milwid J, Kobayashi N, Tilles A, Berthiaume F, Hertl M, Nahmias Y, Yarmush ML, Uygun K (2010) Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med* 16, 814-820.
471. van der Wouden JM, van IJendoorn SC, Hoekstra D (2002) Oncostatin M regulates membrane traffic and stimulates bile canalicular membrane biogenesis in HepG2 cells. *EMBO J* 21, 6409-6418.
472. van Neck JW, Berghout EM, Vinter-Jensen L, Groffen CA, Cingel V, Dits NF, Drop SL, Flyvbjerg A (2000) The effect of epidermal growth factor and IGF-I infusion on hepatic and renal expression of the IGF-system in adult female rats. *J Endocrinol* 165, 115-122.
473. Vannucci L, Lai M, Chiuppesi F, Ceccherini-Nelli L, Pistello M (2013) Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol* 36, 1-22.
474. Vaynshteyn D, Jeong H (2012) Caffeine induces CYP1A2 expression in rat hepatocytes but not in human hepatocytes. *Drug Metab Lett* 6, 116-119.
475. Vinci B, Duret C, Klieber S, Gerbal-Chaloin S, Sa-Cunha A, Laporte S, Suc B, Maurel P, Ahluwalia A, Daujat-Chavanieu M (2011) Modular bioreactor for primary human hepatocyte culture: medium flow stimulates expression and activity of detoxification genes. *Biotechnol J* 6, 554-564.
476. Vonen B, Florholmen J, Giaever AK, Burhol P (1989) Somatostatin secretion from isolated rat pancreatic islets. *Scand J Clin Lab Invest* 49, 139-143.
477. Waclawczyk S, Buchheiser A, Flögel U, Radke TF, Kögler G (2010) In vitro differentiation of unrestricted somatic stem cells into functional hepatic-like cells displaying a hepatocyte-like glucose metabolism. *J Cell Physiol* 225, 545-554.
478. Wakao S, Kitada M, Kuroda Y, Ogura F, Murakami T, Niwa A, Dezawa M (2012) Morphologic and gene expression criteria for identifying human induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 7, e48677.
479. Waldeck W, Mueller G, Wiessler M, Brom M, Tóth K, Braun K (2009) Autofluorescent proteins as photosensitizer in eukaryotes. *Int J Med. Sci* 6, 365-373.
480. Waldeck W, Heidenreich E, Mueller G, Wiessler M, Tóth K, Braun K (2012) ROS-mediated killing efficiency with visible light of bacteria carrying different red fluorochrome proteins. *J Photochem Photobiol B* 109, 28-33.
481. Wang X, Cui J, Zhang BQ, Zhang H, Bi Y, Kang Q, Wang N, Bie P, Yang Z, Wang H, Liu X, Haydon RC, Luu HH, Tang N, Dong J, He TC (2014) Decellularized liver scaffolds effectively support the proliferation and differentiation of mouse fetal hepatic progenitors. *J Biomed Mater Res A* 102, 1017-1025.

482. Wang X, Yan Y, Pan Y, Xiong Z, Liu H, Cheng J, Liu F, Lin F, Wu R, Zhang R, Lu Q (2006) Generation of three-dimensional hepatocyte/gelatin structures with rapid prototyping system. *Tissue Eng* 12, 83-90.
483. Wauthier E, Schmelzer E, Turner W, Zhang L, LeCluyse E, Ruiz J, Turner R, Furth ME, Kubota H, Lozoya O, Barbier C, McClelland R, Yao HL, Moss N, Bruce A, Ludlow J, Reid LM (2008) Hepatic stem cells and hepatoblasts: identification, isolation, and ex vivo maintenance. *Methods Cell Biol* 86, 137-225.
484. Weber A, Touboul T, Mainot S, Branger J, Mahieu-Caputo D (2010) Human foetal hepatocytes: isolation, characterization, and transplantation. *Methods Mol Biol* 640, 41-55.
485. Wee S, Gombotz WR (1998) Protein release from alginate matrices. *Adv Drug Deliv Rev* 31, 267-285.
486. Weidner KM, Behrens J, Vandekerckhove J, Birchmeier W (1990) Scatter factor: molecular characteristics and effect on the invasiveness of epithelial cells. *J Cell Biol* 115, 2097-2108.
487. West MA, Keller GA, Hyland BJ, Cerra FB, Simmons RL (1985) Hepatocyte function in sepsis: Kupffer cells mediate a biphasic protein synthesis response in hepatocytes after exposure to endotoxin or killed *Escherichia coli*. *Surgery* 98, 388-395.
488. West MA, Keller GA, Hyland BJ, Cerra FB, Simmons RL (1986) Further characterization of Kupffer cell/macrophage-mediated alterations in hepatocyte protein synthesis. *Surgery* 100, 416-423.
489. Wilkening S, Bader A (2003) Influence of culture time on the expression of drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2. *J Biochem Mol Toxicol* 17, 207-213.
490. Wilkening S, Stahl F, Bader A (2003) Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos* 31, 1035-1042.
491. Williams RS, Johnston SA, Riedy M, DeVit MJ, McElligott SG, Sanford JC (1991) Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2726-2730.
492. Wolfert MA, Dash PR, Nazarova O, Oupicky D, Seymour LW, Smart S, Strohaln J, Ulbrich K (1999) Polyelectrolyte vectors for gene delivery: influence of cationic polymer on biophysical properties of complexes formed with DNA. *Bioconjug Chem* 10, 993-1004.
493. Wu FJ, Friend JR, Remmel RP, Cerra FB, Hu WS (1999) Enhanced cytochrome P450 IA1 activity of self-assembled rat hepatocyte spheroids. *Cell Transplant* 8, 233-246.
494. Wu GY, Wu CH (1987) Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem* 262, 4429-4432.
495. Wu Q, Bao J, Zhou YJ, Wang YJ, Du ZG, Shi YJ, Li L, Bu H (2015) Optimizing perfusion-decellularization methods of porcine livers for clinical-scale whole-organ bioengineering. *Biomed Res Int* 2015: 785474.
496. Wu XB, Peng CH, Huang F, Kuang J, Yu SL, Dong YD, Han BS (2011) Preparation and characterization of chitosan porous microcarriers for hepatocyte culture. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 10, 509-515.
497. Wüstefeld T, Rakemann T, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C (2000) Hyperstimulation with interleukin 6 inhibits cell cycle progression after hepatectomy in mice. *Hepatology* 32, 514-522.

498. Xia L, Ng S, Han R, Tuo X, Xiao G, Leo HL, Cheng T, Yu H (2009) Laminar-flow immediate-overlay hepatocyte sandwich perfusion system for drug hepatotoxicity testing. *Biomaterials* 30, 5927-5936.
499. Xu K, Ma H, McCown TJ, Verma IM, Kafri T (2001) Generation of a stable cell line producing high-titer self-inactivating lentiviral vectors. *Mol Ther* 3, 97-104.
500. Yamamoto M, Fukuda K, Miura N, Suzuki R, Kido T, Komatsu Y (1998) Inhibition by dexamethasone of transforming growth factor beta1-induced apoptosis in rat hepatoma cells: a possible association with Bcl-xL induction. *Hepatology* 27, 959-966.
501. Yamasaki K, Kawasaki S, Young RD, Fukuoka H, Tanioka H, Nakatsukasa M, Quantock AJ, Kinoshita S (2009) Genomic aberrations and cellular heterogeneity in SV40-immortalized human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 604-613.
502. Yamaura K, Ito K, Tsukioka K, Wada Y, Makiuchi A, Sakaguchi M, Akashima T, Fujimori M, Sawa Y, Morishita R, Matsumoto K, Nakamura T, Suzuki J, Amano J, Isobe M (2004) Suppression of acute and chronic rejection by hepatocyte growth factor in a murine model of cardiac transplantation: induction of tolerance and prevention of cardiac allograft vasculopathy. *Circulation* 110, 1650-1657.
503. Yang NS, Burkholder J, Roberts B, Martinell B, McCabe D (1990) In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9568-9572.
504. Yang Q, Liu F, Pan XP, Lv G, Zhang A, Yu CB, Li L (2010) Fluidized-bed bioartificial liver assist devices (BLADs) based on microencapsulated primary porcine hepatocytes have risk of porcine endogenous retroviruses transmission. *Hepatol Int* 4, 757-761.
505. Yin J, Meng Q (2012) Use of primary rat hepatocytes in the gel entrapment culture to predict in vivo biliary excretion. *Xenobiotica* 42, 417-428.
506. Yin L, Zhu Y1, Yang J1, Ni Y1, Zhou Z1, Chen Y1, Wen L1 (2014) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiated into hepatocyte-like cells in vivo and in vitro. *Mol Med Rep* 11, 1722-1732.
507. Youdim KA, Tyman CA, Jones BC, Hyland R (2007) Induction of cytochrome P450: assessment in an immortalized human hepatocyte cell line (Fa2N4) using a novel higher throughput cocktail assay. *Drug Metab Dispos* 35, 275-282.
508. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.
509. Yu Y, Liu H, Ikeda Y, Amiot BP, Rinaldo P, Duncan SA, Nyberg SL (2012) Hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells: relevance to cellular therapies. *Stem Cell Res* 9, 196-207.
510. Yura H, Ishihara M, Nakamura S, Kishimoto S, Kanatani Y, Horio T, Ishizuka T, Kawakami M, Matsui T (2009) Coatings of low-density lipoprotein and synthetic glycoconjugates as substrata for hepatocytes. *Artif Organs* 33, 419-424.
511. Zakrzewska KE, Samluk A, Pluta KD, Pijanowska DG (2014) Evaluation of the effects of antibiotics on cytotoxicity of EGFP and DsRed2 fluorescent proteins used for stable cell labeling. *Acta Biochim Pol* 61, 809-813.
512. Zaouali MA, Padriisa-Altés S, Ben Mosbah I, Alfany-Fernandez I, Massip-Salcedo M, Casillas-Ramirez A, Bintanel-Morcillo M, Boillot O, Serafin A, Rimola A, Rodés J, Roselló-Catafau J, Peralta C (2010) Improved rat steatotic and nonsteatotic liver

- preservation by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I to University of Wisconsin solution. *Liver Transpl* 16, 1098-1111.
- 513.Zaret KS (2000) Liver specification and early morphogenesis. *Mech Dev* 92, 83-88.
- 514.Zhang F, Xu R, Zhao MJ (2010) QSG-7701 human hepatocytes form polarized acini in three-dimensional culture. *J Cell Biochem* 110, 1175-1186.
- 515.Zhang Y, Chen XM, Sun DL (2014) Effects of coencapsulation of hepatocytes with adipose-derived stem cells in the treatment of rats with acute-on-chronic liver failure. *Int J Artif Organs* 37, 133-141.
- 516.Zhou J, Lin J, Zhou C, Deng X, Xia B (2011) Cytotoxicity of red fluorescent protein DsRed is associated with the suppression of Bcl-xL translation. *FEBS Lett* 585, 821-827.
- 517.Zhou M, Huang Y, Cheng Z, Zhao F, Li J, Zhi X, Tian X, Sun W, Hu K (2014) Revival, characterization, and hepatitis B virus infection of cryopreserved human fetal hepatocytes. *J Virol Methods* 207, 29-37.
- 518.Zhou M, Zhao F, Li J, Cheng Z, Tian X, Zhi X, Huang Y, Hu K (2014) Long-term maintenance of human fetal hepatocytes and prolonged susceptibility to HBV infection by co-culture with non-parenchymal cells. *J Virol Methods* 195, 185-193.
- 519.Zhou W, Freed CR (2009) Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27, 2667-2674.
- 520.Zinchenko YS, Culberson CR, Cogger RN (2006) Contribution of non-parenchymal cells to the performance of micropatterned hepatocytes. *Tissue Eng* 12, 2241-1251.



## DODATEK

### A. Klonowanie genu *EGF* do plazmidu wektorowego

Wybór miejsc restrykcyjnych w plazmidzie wektorowym i plazmidzie ekspresyjnym zawierającym wstawkę zostały wybrane na podstawie wyników z analizy sekwencji nukleotydów programem NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).

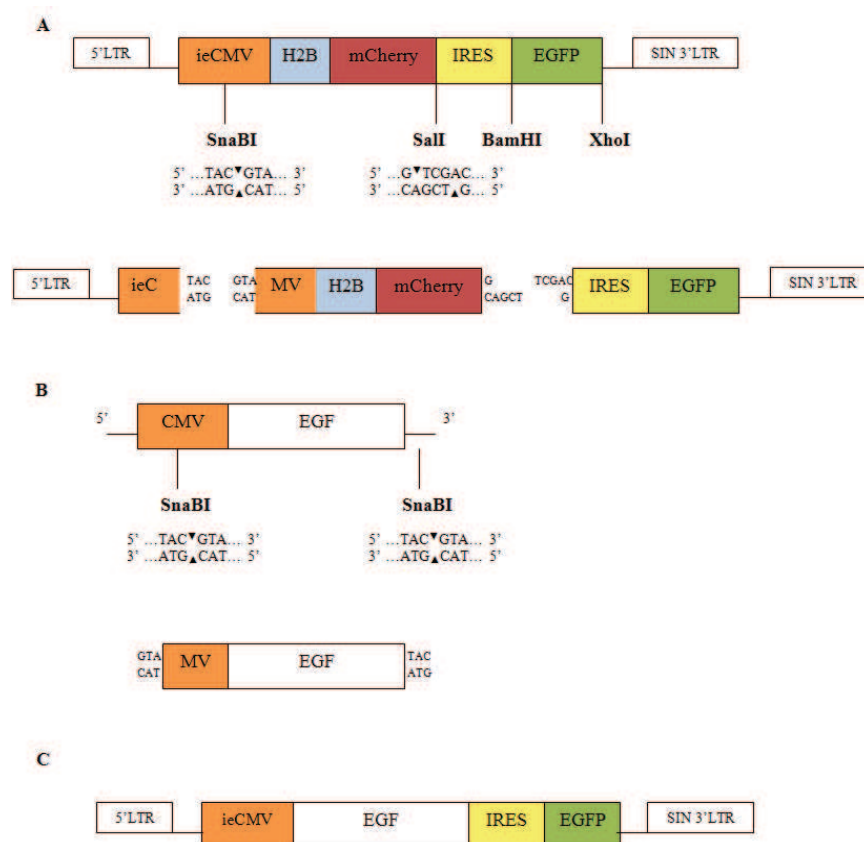
### Przygotowanie plazmidu wektorowego – wersja I

Przygotowanie plazmidu wektorowego rozpoczęto od trawienia plazmidu pNL-H2BmCherry/GtxIRES/EGFP przez inkubację z enzymem SalI w buforze 2xTango w 37°C przez 2 godziny. Reakcję zatrzymano przez ogrzanie próbki w 65°C przez 20 minut. Lepkie końce pozostałe po trawieniu plazmidu tępiono przez dodanie do mieszaniny dNTPs i DNA Polimerazy I (fragment Klenowa) i inkubowanie w RT przez 1 godzinę. Reakcję zatrzymano przez ogrzanie próbki w 75°C przez 10 minut. Kolejny etap trawienia przebiegał z wykorzystaniem enzymu SnaBI w rozcieńczonym buforze Tango w 37°C przez 2 godziny. Reakcję zatrzymano przez ogrzanie próbki w 65°C przez 20 minut. Następnie usunięto reszty fosforanowe znajdujące się na końcach plazmidu przez inkubację mieszaniny z enzymem FastAP w 37°C przez 10 minut. Reakcję zatrzymano przez ogrzanie próbki w 65°C przez 20 minut.

W celu izolacji plazmidu wektorowego od wyciętych fragmentów przeprowadzono rozdział elektroforetyczny. Na 0,8% żel agarozowy z dodatkiem bromku etydyny (1 µg/ml) nałożono mieszaninę wraz z obciążnikiem i markerem wielkości. Rozdział prowadzono przez 1-1,5 godziny pod napięciem 90 V. Po tym czasie z żelu agarozowego wycięto prążek DNA o spodziewanej wielkości i przełożono do 0,5 ml probówki typu eppendorf wypełnionej watą szklaną. Dno 0,5 ml probówki przekłuto i całość zamrożono w ciekłym azocie. Następnie przełożono zamrożoną probówkę do 1,5 ml probówki typu eppendorf i zwirowano (14 000xg, 4°C, 2 minuty). Uzyskany płyn przeniesiono do nowej probówki typu eppendorf i zmierzono objętość. Dodano 0,1x objętości 7,5 M octanu amonu i 2,5x objętości 96% etanolu (obie substancje schłodzone wcześniej w temperaturze -20°C). Inkubowano w -20°C przez noc. Następnego dnia próbki zwirowano (10 000xg, 4°C, 20 minut) i usunięto supernatant, po czym dodano 500 µl 70% etanolu (schłodzonego do -20°C) i ponownie zwirowano (14 000xg, 4°C, 20



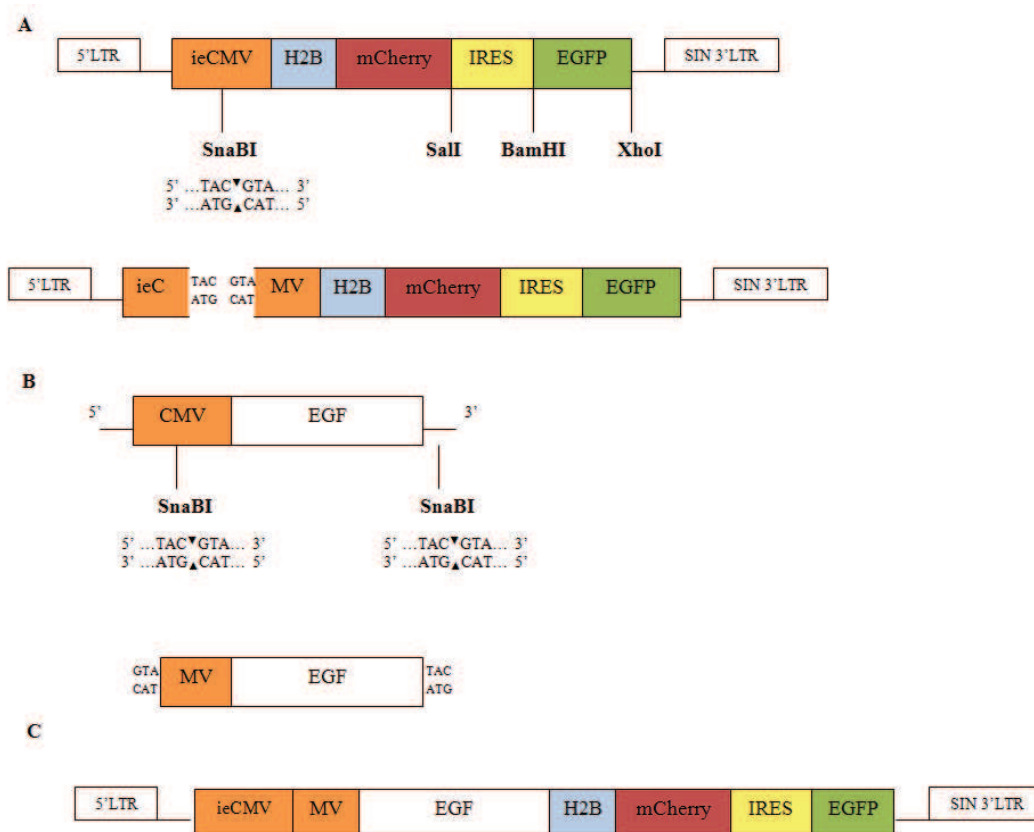
minut). Supernatant usunięto, a wysuszony osad zawieszono w 50  $\mu$ l TE (skład: 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH ok. 8,0). Przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ . Schemat przygotowania plazmidu wektorowego przedstawiono na Rysunku D.1.



Rysunek D.1. Schemat klonowania genu *EGF* do plazmidu wektorowego – wersja I, A – przygotowanie plazmidu wektorowego (trawienie enzymami SnaBI i Sall, tępienie lepkich końców, defosforylacja końców plazmidu), B – przygotowanie wstawki (trawienie plazmidu ekspresyjnego enzymem SnaBI), C – ligacja wstawki do plazmidu wektorowego.

## Przygotowanie plazmidu wektorowego – wersja II

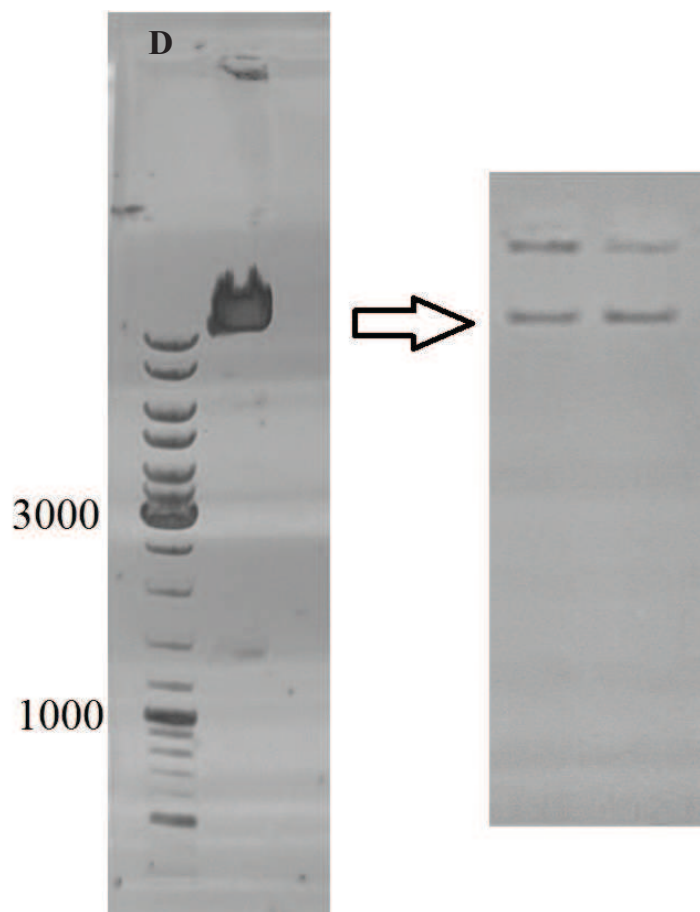
Przygotowanie plazmidu wektorowego rozpoczęto od trawienia plazmidu pNL-H2BmCherry/GtxIRES/EGFP przez inkubację z enzymem SnaBI w buforze 1xTango w  $37^{\circ}\text{C}$  przez 2 godziny. Reakcję zatrzymano przez ogrzanie próbki w  $65^{\circ}\text{C}$  przez 20 minut. Następnie usunięto reszty fosforanowe znajdujące się na końcach plazmidu przez inkubację mieszaniny z enzymem FastAP w  $37^{\circ}\text{C}$  przez 10 minut. Reakcję zatrzymano przez ogrzanie próbki w  $65^{\circ}\text{C}$  przez 20 minut. Plazmid przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ . Schemat przygotowania plazmidu wektorowego przedstawiono na Rysunku D.2.



Rysunek D.2. Schemat klonowania genu *EGF* do plazmidu wektorowego – wersja II. A – przygotowanie plazmidu wektorowego (trawienie enzymem *SnaBI*, defosforylacja końców plazmidu), B – przygotowanie wstawki (trawienie plazmidu ekspresyjnego enzymem *SnaBI*), C – ligacja wstawki do plazmidu wektorowego.

Plazmid wektorowy pNL-H2BmCherry/GtxIRES/EGFP został przygotowany zgodnie z opisem zamieszczonym powyżej. Wielkość wektora po usunięciu fragmentu promotora CMV oraz sekwencji kodującej H2B i mCherry była zgodna z danymi dostępnymi na stronie [www.addgene.org](http://www.addgene.org) i została przedstawiona na Rysunku D.3.

Na każdym z etapów przygotowywania wektora oceniano jego jakość na podstawie liczby kolonii bakteryjnych uzyskanych po transformacji wektorem po ligacji (bez wstawki). Jako kontrolę pozytywną stosowano transformację plazmidem wyjściowym (pNL-H2BmCherry/GtxIRES/EGFP), a jako kontrolę negatywną – transformację wektorem nie poddanym procesowi ligacji.



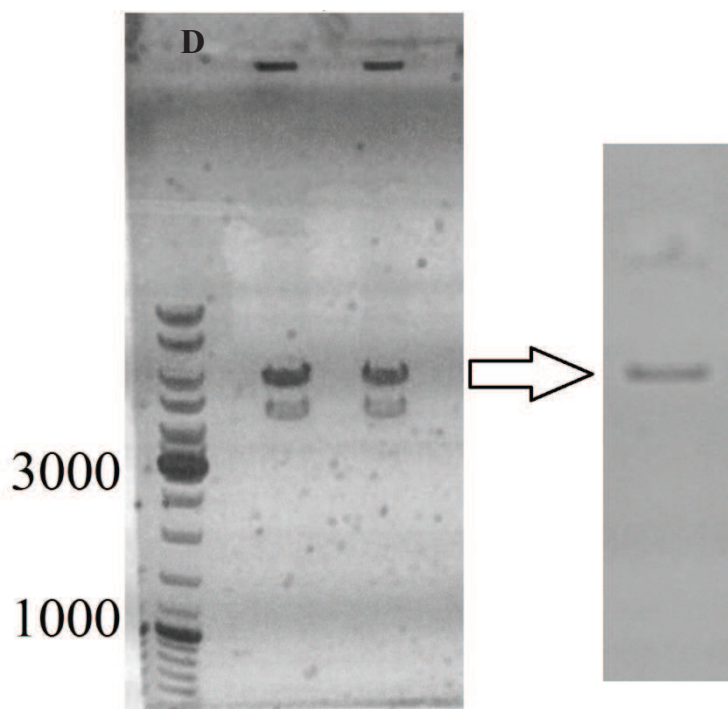
Rysunek D.3. Kontrolny rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym – sprawdzenie jakości wektora otrzymanego po trawieniu enzymami *SalI* i *SnaBI* (panel lewy) i po oczyszczeniu przy użyciu silikonowanej waty szklanej (panel prawy). Wektor przygotowany przy użyciu enzymu *SnaBI* (wersja II) wyglądał identycznie. D – marker DNA GeneRuler.

### Przygotowanie wstawki zawierającej *EGF*

W celu przygotowania wstawki zawierającej *EGF* trawiono plazmid pCMV6-hEGF-XL4 przy użyciu enzymu *SnaBI* w buforze 1xTango w 37°C przez 4 godziny. Reakcję zatrzymano przez ogrzanie próbki w 65°C przez 20 minut. W celu izolacji wstawki od reszty plazmidu przeprowadzono rozdział elektroforetyczny. Na 0,6% żel agarozowy z dodatkiem bromku etydyny (1 µg/ml) nałożono mieszaninę wraz z obciążnikiem i markerem wielkości. Rozdział prowadzono przez 2 godziny pod napięciem 0 V. Po tym czasie z żelu agarozowego wycięto prążek DNA o spodziewanej wielkości i przełożono do 0,5 ml probówki typu eppendorf wypełnionej watą szklaną. Dno probówki przekłuto i zamrożono całość w ciekłym azocie. Następnie przełożono 0,5 ml probówkę do 1,5 ml probówki typu eppendorf i zwirowano (14 000xg, 4°C, 2 minuty). Uzyskany płyn przeniesiono do nowej probówki i zmierzono objętość. Dodano

0,1x objętości 7,5 M octanu amonu i 2,5x objętości 96% etanolu (obie substancje schłodzone wcześniej w  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Inkubowano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  przez noc. Następnego dnia próbki zwirowano ( $10\ 000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 20 minut) i usunięto supernatant, po czym dodano  $500\ \mu\text{l}$  70% etanolu (schłodzonego do  $-20^{\circ}\text{C}$ ) i ponownie zwirowano ( $14\ 000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 20 minut). Supernatant usunięto, a wysuszony osad zawieszono w  $50\ \mu\text{l}$  TE (skład: 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH ok. 8,0). Wstawkę przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Z plazmidu ekspresyjnego pCMV6-hEGF-XL4 wycięto cDNA kodujące *EGF* zgodnie z opisem zamieszczonym powyżej. Wielkość wstawki, podana przez producenta na stronie [www.origene.com](http://www.origene.com), powinna wynosić 6 kbp i była zgodna z prążkiem widocznym na żelu agarozowym (Rysunek D.4).



Rysunek D.4. Kontrolny rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym – sprawdzenie jakości wstawki otrzymanej po trawieniu enzymem SnaBI (panel lewy) i po oczyszczeniu przy użyciu waty szklanej (panel prawy). D – marker DNA GeneRuler.

#### **Przygotowanie plazmidu wektorowego ze wstawką**

W celu przygotowania plazmidu wektorowego zawierającego wstawkę *EGF* ligowano plazmid wektorowy i wstawkę w proporcji molarnej 1:5 przy użyciu ligazy DNA T4 w  $14^{\circ}\text{C}$  przez noc. Następnego dnia przeprowadzono transformację bakterii kompetentnych. Do  $50\ \mu\text{l}$  komórek kompetentnych dodano połowę ( $5\ \mu\text{l}$ ) mieszaniny ligacyjnej i inkubowano na lodzie przez 10 minut, po czym przeniesiono mieszaninę do

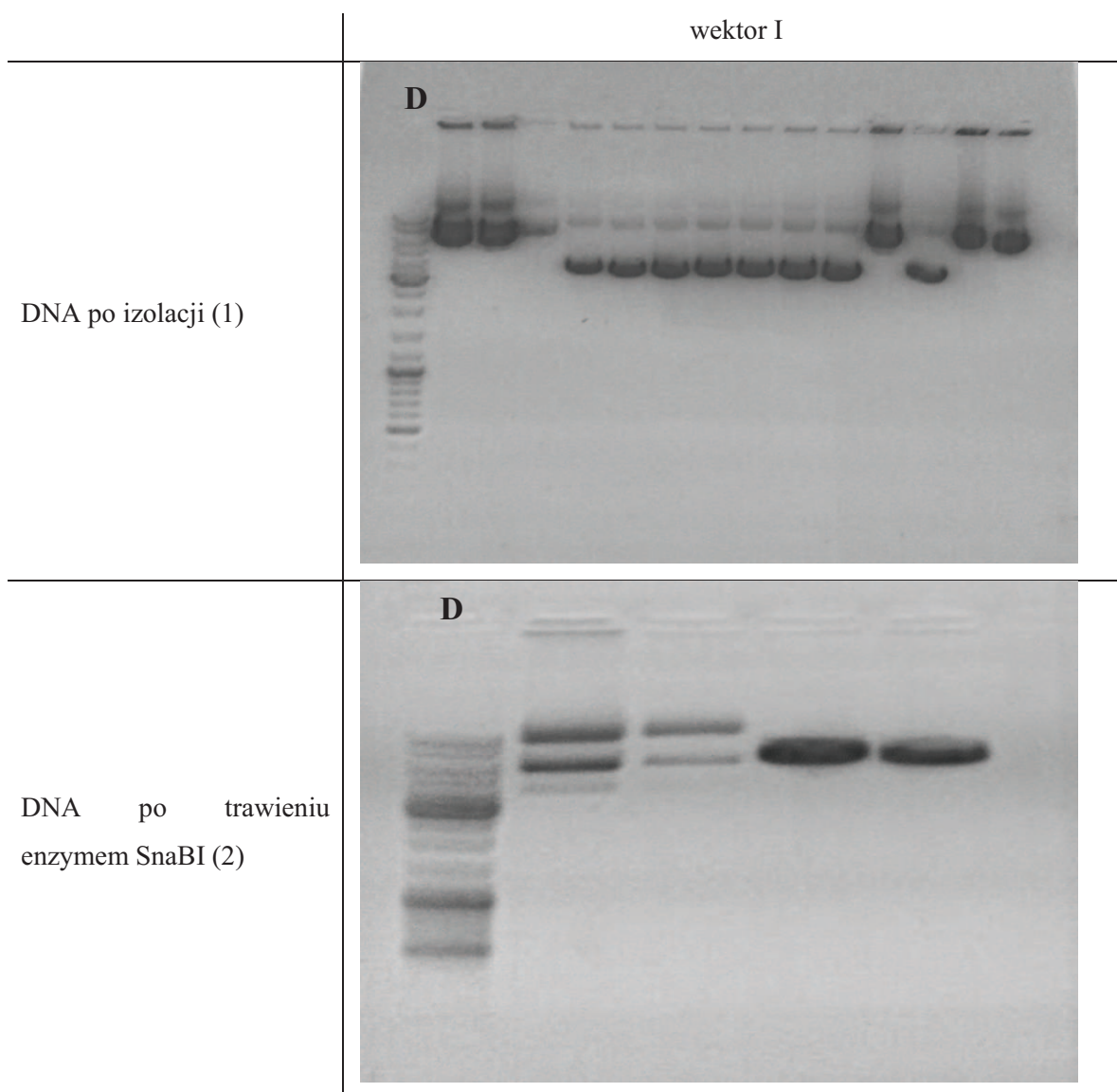
łaźni wodnej o temperaturze 42°C i inkubowano przez 45 s. Następnie mieszaninę przeniesiono ponownie do lodu i inkubowano przez 2 minuty. Po upływie tego czasu do mieszaniny dodano 1 ml pożywki LB i wytrząsano w temperaturze 37°C przez 45 minut, po czym zwirowano (10 000xg, RT, 45s), osad rozwieszono w 100 µl LB, wysiano na szalkę LB-agar z antybiotykiem selekcyjnym (ampicylina) i inkubowano w 37°C przez noc.

W celu izolacji plazmidowego DNA z pojedynczej kolonii zaszczepiono hodowlę nocną w pożywce LB (3 ml). Następnego dnia 200 µl hodowli przeniesiono do jałowej probówki typu eppendorf i zamrożono z dodatkiem 14 µl DMSO (7% objętości) w temperaturze -80°C. Pozostałą część hodowli nocnej zwirowano (14 000xg, RT, 1 minuta) i dokładnie rozwieszono osad w 100 µl GTE (skład: 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, 50 mM glukoza). Dodano 5 µl RNazy (10 mg/ml) i inkubowano w RT przez 5 minut. Następnie, dodano 200 µl buforu lizującego (skład: 1% SDS, 0,2 M NaOH), zamieszano delikatnie i inkubowano na lodzie przez 3 minuty, po czym dodano 150 µl 7,5 M octanu amonu (z -20°C), silnie wstrząśnięto i inkubowano na lodzie przez 10 minut. Próbkę zwirowano (14 000xg, RT, 15 minut) i przeniesiono supernatant do nowej probówki typu eppendorf. Następnie dodano 500 µl izopropanolu, zwirowano (14 000xg, RT, 15 minut), osad zawieszono w 96% etanolu (-20°C) i zwirowano (14 000xg, RT, 5 minut). Osad po wysuszeniu zawieszono w 50 µl TE.

Ostatnim etapem było trawienie analityczne preparatów i rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym. Część preparatu po izolacji inkubowano z enzymem SnaBI w buforze Tango w 37°C przez 2 godziny. Następnie na 0,8% żel agarozowy z dodatkiem bromku etydyny (1 µg/ml) nałożono mieszaninę wraz z obciążnikiem i markerem wielkości. Prowadzono rozdział przez 1 godzinę pod napięciem 90 V. Jeżeli wynik rozdziału był zgodny z oczekiwanym, przeprowadzono dodatkowe trawienia enzymami BamHI i EcoRI.

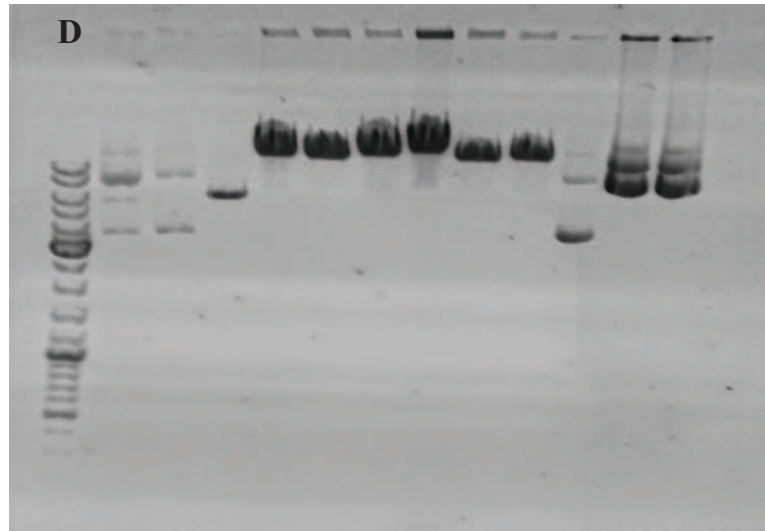
Do przygotowania plazmidu wektorowego ze wstawką zastosowano różne warianty ligacji. Zmieniano m.in. proporcje molarne wektora do wstawki (od 1:1 do 1:10), a za optymalne przyjęto 1:5 (30 ng plazmidu wektorowego i 80 ng wstawki). Po transformacji bakterii kompetentnych STBL3 mieszaniną ligacyjną i izolacji plazmidowego DNA oceniono, czy w preparatach znajduje się DNA zawierające *EGF*. W tym celu przeprowadzono rozdział elektroforetyczny, aby znaleźć plazmidy większe niż 10 kbp. Następnie, preparaty takie poddano trawieniu enzymem SnaBI, aby sprawdzić, czy odtworzone zostało miejsce restrykcyjne w promotorze CMV, co byłoby

równoznaczne z obecnością wstawki w plazmidzie (a w przypadku zastosowania wektora II również z możliwością uzyskania „pustego plazmidu”, tzn. plazmidu bez wstawki). W ostatnim etapie wybrane preparaty poddawano kolejnym trawieniom – enzymami EcoRI i BamHI w celu sprawdzenia, czy wstawka znajduje się we właściwej orientacji. Niestety, żaden z ponad 200 preparatów nie zawierał właściwego plazmidu, bez względu na to, czy użyty plazmid wektorowy przygotowywany był według wersji I lub II. Przykładowe rozdziały elektroforetyczne otrzymanych preparatów przedstawiono na Rysunku D.5.



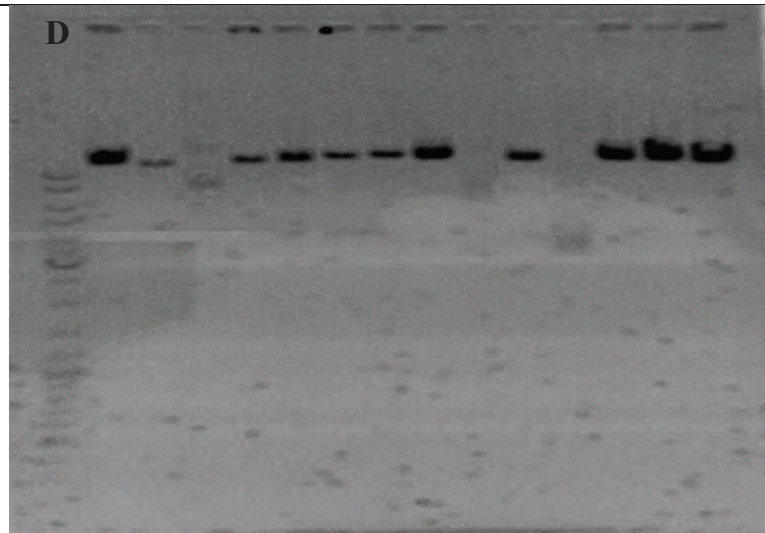


DNA po trawieniu  
enzymami BamHI i EcoRI  
(3)

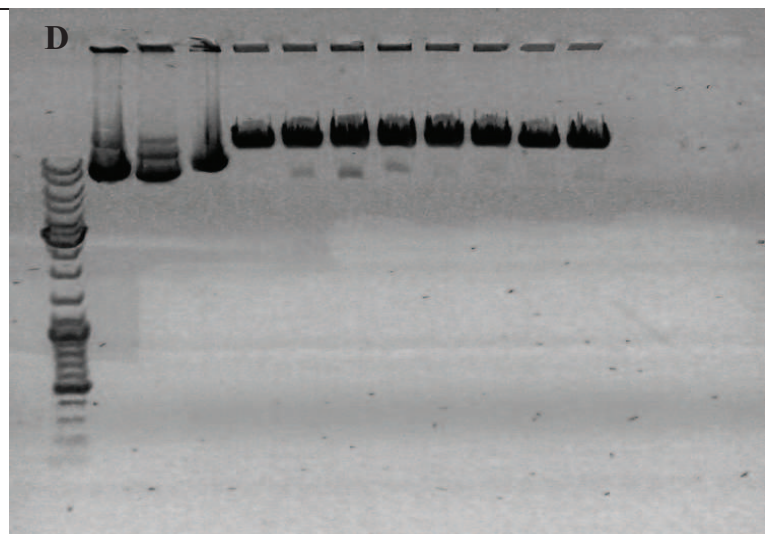


wektor II

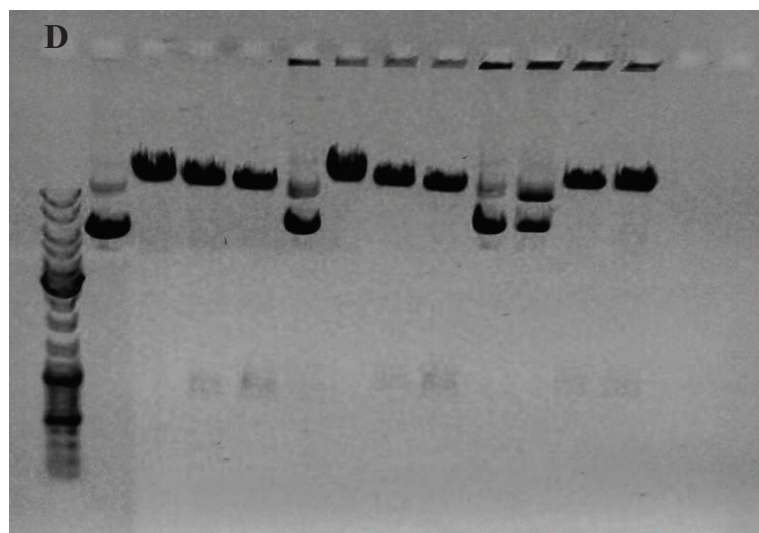
DNA po izolacji (4)



DNA po trawieniu  
enzymem SnaBI (5)



DNA po trawieniu  
enzymem EcoRI (6)



Rysunek D.5. Przykładowe rozdziały elektroforetyczne otrzymanych preparatów na bazie wektora I lub wektora II. 1 – preparaty po izolacji DNA (brak plazmidów większy niż 10 kpz); 2 – preparaty po trawieniu enzymem SnaBI (brak odtworzonego miejsca dla restryktazy); 3 – preparaty po trawieniu enzymami BamHI i EcoRI (brak właściwych prążków – powyżej 10 kpz dla BamHI i 2 prążków, w tym jednego na wysokości ok. 4 kpz dla EcoRI); 4 – preparaty po izolacji DNA (występują plazmidy większe niż 10 kpz); 5 – preparaty po trawieniu enzymem SnaBI (brak odtworzonego miejsca dla restryktazy); 6 – preparaty po trawieniu enzymem EcoRI (brak oczekiwanych 3 prążków, w tym jednego na wysokości ok. 4,5 kpz). D – marker DNA GeneRuler.

Ze względu na niepowodzenie w otrzymaniu właściwego plazmidu wektorowego, bazującego na plazmidzie pNL-H2BmCherry/GtxIRES/EGFP, zdecydowano się na zakup zsyntetyzowanego wektora, zawierającego gen kodujący *EGF* pod promotorem CMV (pEZ-CMV-EGF-IRES2-mCherry-Lv214).

## B. Charakterystyka otrzymanych fragmentów ludzkich wątrób po resekcji

Nr	Płeć	Wiek	Chemioterapia	Rozpoznanie		
H1P-11	K	57	b.d.	b.d.		
H2P-11	M	54	b.d.	przerzuty raka jelita grubego do wątroby		
H3P11	K	50	b.d.	przerzuty raka piersi do wątroby		
H2-12	M	60	T	przerzuty raka esicy do wątroby		
H3-12	M	72	T	przerzuty raka odbytnicy do wątroby		
H4-13	K	51	T	przerzuty raka jelita grubego do wątroby		
H5-13	M	72	T	przerzut brodawczaka Vatera do wątroby		
H6-13	M	73	N	przerzut raka esicy do wątroby		
H7-13	K	39	N	hemoanioendotelioma w segmencie wątroby		
H8-13	M	49	N	odrzucony dawca wątroby		
H9-13	M	62	T	przerzut raka esicy do wątroby		
H10-13	K	54	T	przerzut raka jajników do wątroby		
H11-13	K	54	T	przerzut raka piersi do wątroby		
H12-13	K	60+	T	przerzut raka esicy do wątroby		
H13-13	K	57	T	przerzut raka jelita grubego do wątroby		
H14-13	M	40	T	przerzut raka jelita grubego do wątroby		
H15-13	K	53	T	przerzut raka esicy do wątroby		
H16-13	K	67	N	uszkodzenie dróg żółciowych		
H17-13	K	50	T	przerzut raka esicy do wątroby		
H18-13	M	59	T	przerzut raka wstępnicy do wątroby		
H19-13	M	43	N	naczyniak w IV segmencie wątroby		
H20-13	K	64	T	przerzuty raka dróg żółciowych do wątroby		
H21-13	K	49	T	przerzut raka piersi do wątroby		
H22-13	K	22	N	guz wątroby – zmiana łagodna		
H23-13	M	64	N	odrzucony dawca wątroby		
H24-13	M	21	T	pierwotny guz wątroby		
H26-14	K	62	T	przerzut raka piersi do wątroby		
H27-14	M	69	N	przerzut raka odbytnicy do wątroby		
H28-14	M	57	T	przerzut raka odbytnicy do wątroby		
H29-14	M	60	T	przerzut raka jelita grubego do wątroby		
H31-14	K	44	T	przerzut raka jelita grubego do wątroby		
H32-14	M	42	T	przerzut raka jelita grubego do wątroby		
H33-14	M	70	T	przerzut raka odbytnicy do wątroby		
H34-14	M	75	N	rak wątrobowokomórkowy		
H35-14	M	65	N	odrzucony dawca wątroby		
H36-14	M	70	T	przerzut raka wstępnicy do wątroby		
H37-15	K	34	T	przerzut raka piersi do wątroby		
H38-15	M	61	N	odrzucony dawca wątroby		
H39-15	M	45	N	odrzucony dawca wątroby		
H40-15	K	62	T	przerzut raka odbytnicy do wątroby		
H41-15	K	63	N	wznowa raka dróg żółciowych		
N = 41	K = 19	M = 22	60- = 22	60+ = 19	CH- = 13	CH+ = 25