

## STRESZCZENIE

Choroby wątroby prowadzące do jej niewydolności są jedną z najczęstszych przyczyn zgonów na całym świecie. Jak dotąd jedynym skutecznym sposobem leczeniem ostrej niewydolności wątroby jest jej przeszczep. Niestety niedobór odpowiednich dawców stanowi główne ograniczenie tej terapii. Z tego powodu naukowcy stale szukają alternatywnych rozwiązań dla transplantacji tego organu. Najbardziej obiecujące są systemy wspomaganie wątroby i przeszczep komórkowy. Bez wątpienia hepatocyty są najlepszym źródłem komórek do zastosowania w terapiach wątrobowozastępczych. Jednakże izolowane ludzkie hepatocyty bardzo szybko odróżnicowują się i tracą swoje funkcje. Dlatego stale poszukuje się nowych źródeł komórek, które mogłyby zastąpić hepatocyty. Obecnie panuje pogląd, że aby pomóc pacjentom w walce z chorobami wątroby, potrzeba interdyscyplinarnego podejścia do rozwiązania tego problemu.

## WPROWADZENIE

Przewlekłe choroby wątroby są jednym z globalnych problemów zdrowotnych i prowadzą do około 2 milionów zgonów rocznie. Dodatkowo fakt, że patologiczne zmiany wątrobowe zachodzą bezobjawowo utrudnia wczesną diagnozę takich jednostek chorobowych [1]. Za zwiększającą się liczbę przypadków zachorowalności na niewydolność wątroby w Europie odpowiada głównie marskość (zwłóknienie) wątroby oraz rak wątrobowokomórkowy, zaś do wzrostu częstości występowania marskości wątroby przyczynia się rosnąca na przestrzeni lat konsumpcja alkoholu [2,3].

Transplantacja wątroby jest jak dotąd jedyną skuteczną terapią dla pacjentów cierpiących na ostrą i przewlekłą niewydolność wątroby. Z roku na rok lista osób kwalifikujących się do przeszczepu tego organu rośnie, ale co ważne rośnie również liczba odpowiednich dawców. Nie mniej jednak z racji dużej skali problemu rzesze naukowców na całym świecie poszukują alternatywnych rozwiązań, które mogłyby stanowić skuteczną terapię dla pacjentów dotkniętych schorzeniami wątroby. Jak dotąd najbardziej obiecującą koncepcją wydają się być systemy wspomaganie wątroby (ang. *liver support systems*, LSS), a także przeszczep hepatocytów [4].

Głównym celem systemów wspomaganie wątroby jest skuteczna terapia postostowa, która pozwoli pacjentowi doczekać przeszczepu lub go uniknąć ze względu na samoistną regenerację tego organu. Wśród LSS można wyróżnić sztuczne oraz biosztuczne systemy wspomaganie (ang. *artificial/bioartificial liver support systems*). Mają one te same cele, jednak w biosztucznych systemach, zwanych biosztucznymi wątrokami (ang. *bioartificial liver*, BAL), występuje biologicznie aktywny blok funkcyjny. Najlepszym źródłem komórek do zastosowania w BAL są ludzkie hepatocyty. Niestety, ich wykorzystanie wiąże się z pewnymi ograniczeniami. Są to między innymi: brak dostatecznej liczby dawców tkanki do izolacji komórek o wysokiej jakości (podobnie jak w przypadku transplantacji), a także szybkie odróżnicowywanie się hepatocytów *ex vivo*, a co za tym idzie utrata zdolności do pełnienia specyficznych funkcji wątrobowych. W związku z tym rozpoczęto poszukiwanie nowych metod hodowli komórek parenchymalnych wątroby, które pozwolą na wydłużenie czasu bycia w stanie zróżnicowania. Dla potrzeb biosztucznych systemów wspomaganie wątroby badane są również alternatywne źródła komórek, które mogłyby zastąpić ludzkie hepatocyty i pełnić funkcje, za które są one odpowiedzialne w warunkach *in vivo*. W obszarze zainteresowania naukowców znalazły się wątrobowe komórki pochodzenia zwierzęcego, różne rodzaje komórek macierzystych i komórki wyprowadzone z indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych oraz wątrobowe nowotworowe linie komórkowe [5].

mgr inż. Małgorzata  
Ciężkowska

dr Krzysztof Dariusz Pluta ✉

Pracownia Inżynierii Tkankowej Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcz PAN

[https://doi.org/10.18388/pb.2019\\_269](https://doi.org/10.18388/pb.2019_269)

✉ autor korespondujący: kpluta@ibib.waw.pl

**Słowa kluczowe:** wątroba, hepatocyty, systemy wspomaganie wątroby, przeszczep hepatocytów

**Skróty:** HBV i HCV – wirusy zapalenia wątroby typu B i C (ang. *hepatitis B/C virus*); HCC – rak wątrobowokomórkowy (ang. *hepatocellular carcinoma*); LSS – systemy wspomaganie wątroby (ang. *liver support systems*); BAL – biosztuczna wątroba (ang. *bioartificial liver*); iPSC – indukowane pluripotentne komórki macierzyste (ang. *induced pluripotent stem cells*); PERV – świński endogeny retrovirus (ang. *porcine endogenous retrovirus*)



wszystkim niedobór odpowiednich dawców. Dochodzą do tego również wysokie koszty przeprowadzenia operacji, a także ryzyko wystąpienia powikłań po przeszczepie oraz skutki uboczne przyjmowania leków immunosupresyjnych [15]. W związku z powyższym rozpoczęto poszukiwania alternatywnych rozwiązań dla transplantacji całego organu.

## ALTERNATYWNE ROZWIĄZANIA DLA TRANSPLANTACJI WĄTROBY

### PRZESZCZEP HEPATOCYTÓW

Jedną z alternatywnych rozwiązań dla transplantacji wątroby jest przeszczep komórkowy. Hepatocyty pozyskuje się głównie z fragmentów resekowanych wątrób albo z narządów niezakwalifikowanych do przeszczepu. Komórki izoluje się najczęściej z wykorzystaniem techniki podwójnej perfuzji z użyciem kolagenazy [16]. Następnie hepatocyty transportowane są (przy pomocy pompy perfuzyjnej) przez żyłę wrotną i przestrzenie pomiędzy komórkami endotelialnymi do tzw. przestrzeni Disse'go. Według danych literaturowych w zastosowaniach klinicznych hepatocyty przeznaczone do transplantacji powinny wykazywać żywotność powyżej 60%, a ich liczba powinna być większa niż  $5 \times 10^8$ . Co więcej, świeżo wyizolowane hepatocyty muszą być przeszczepione w przeciągu 48 godzin, co zwykle przewyższa zdolności żyły wrotnej do przyjęcia tylu komórek oraz rozdystrybuowania ich w wątrobie w tak krótkim czasie i stanowi wyzwanie dla hepatologów [17,18].

Istnieje wiele zalet przeszczepu hepatocytów – jest to tania oraz mniej inwazyjna procedura, przeszczep tych komórek potencjalnemu pacjentowi może zostać wykonany wielokrotnie, dodatkowo z jednej wątroby można uzyskać komórki dla więcej niż jednego potrzebującego. Dlatego też

badania kliniczne dotyczące skuteczności omawianej terapii zostały przeprowadzone u pacjentów cierpiących na ostrą niewydolność wątroby oraz jej metaboliczne dysfunkcje. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi przeszczep komórkowy przynosi jak dotąd najlepsze rezultaty w przypadku leczenia wrodzonych chorób metabolicznych wątroby [19].

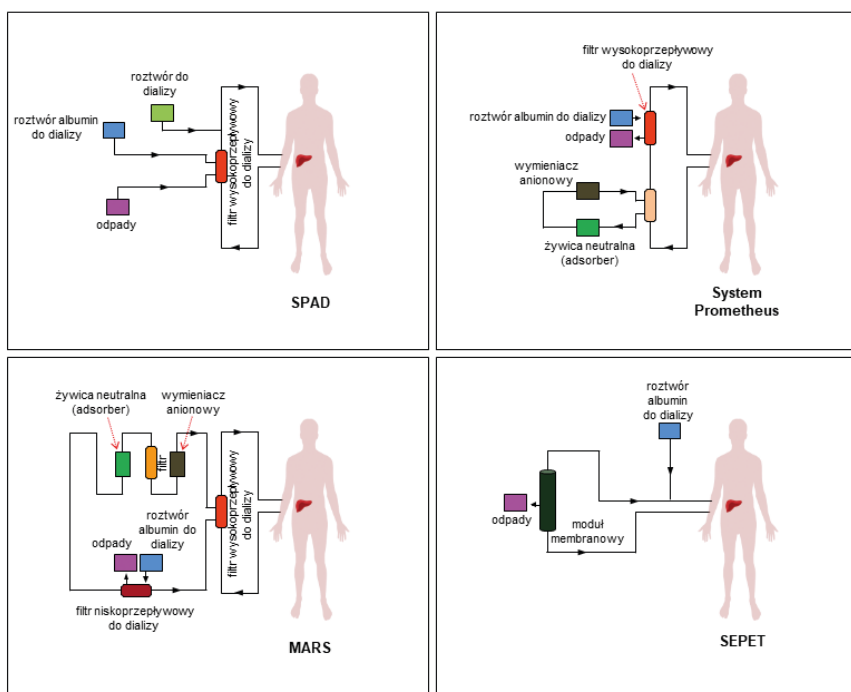
Ograniczeniem stosowania tej metody (oprócz braku odpowiedniej liczby dawców) jest fakt, iż wyizolowane hepatocyty dosyć szybko się odróżnicowują, co prowadzi do utraty zdolności do pełnienia specyficznych funkcji, takich jak produkcja albuminy czy metabolizm amoniaku [20]. Aby obejść ten problem, podejmowane są liczne próby optymalizacji hodowli hepatocytów, co miałyby wydłużyć czas, w którym komórki są w pełni funkcjonalne. Jak dotąd stosowane były: hodowle przestrzenne, mające na celu odtworzenie warunków *in vivo*, opłaszczanie podłoża hodowlanych polimerami wspomagającymi adhezję (laminina, fibronektyna, kolagen), wyspecjalizowane media hodowlane czy też kokultury, czyli współhodowle z innymi komórkami (np. fibroblastami) [21]. Najnowsze doniesienia literaturowe wskazują, iż najbardziej aktywne komórki można pozyskać izolując hepatocyty z wątrób uzyskanych od młodych mężczyzn. Jednak pomimo licznych prac badawczych prowadzonych w tym kierunku, wciąż nie ma opracowanych standardowych warunków, w których wyizolowane hepatocyty mogłyby być hodowane przez dłuższy czas [22,23].

### SYSTEMY WSPOMAGANIA NIEWYDOLNEJ WĄTROBY

Drugim alternatywnym rozwiązaniem dla transplantacji są systemy wspomaganie niewydolnej wątroby (ang. *liver support systems, LSS*). Ich celem jest pozaustrojowe wspomaganie funkcji uszkodzonego organu, głównie detoksykacyjnych oraz metabolicznych [24]. Można wśród nich wyróżnić dwie grupy: sztuczne oraz biosztuczne systemy wspomaganie wątroby (ang. *artificial/bioartificial liver support systems*). Choć różnią się budową, oba typy mają służyć pacjentowi jako skuteczna terapia pomostkowa, która pozwoli doczekać przeszczepu lub go uniknąć ze względu na samoistną regenerację tego organu. Nie mniej jednak należy wspomnieć, iż każde z urządzeń posiada zarówno wady jak i zalety, a do tej pory wciąż nie udało się skonstruować urządzenia w pełni skutecznie wspomagającego zaburzone funkcje tego narządu [25].

### SZTUCZNE SYSTEMY WSPOMAGANIA WĄTROBY

Sztuczne systemy wspomaganie wątroby mają na celu pełnienie jednej z ważniejszych funkcji tego narządu, a mianowicie detoksykacji różnych szkodliwych substancji zarówno endogennych jak i ksenobiotyków z wykorzystaniem technik dializy (w tym dializy albuminowej), filtracji, perfuzji oraz adsorpcji. Warto wspomnieć, iż efekt terapeutyczny sztucznych systemów zależy zarówno



Ryc. 2. Wybrane sztuczne systemy wspomaganie wątroby, których działanie opiera się na procesie adsorpcji, perfuzji, filtracji lub wykorzystuje techniki dializy.

od wybranego urządzenia jak i od stanu zdrowia pacjenta oraz schorzenia, na które cierpi [26]. Wśród nich można wyróżnić następujące systemy: MARS (ang. *molecular adsorbent recirculation system*), Prometheus (ang. *Prometheus system*), SEPET (ang. *selective plasma filtration therapy*), SPAD (ang. *single pass albumin dialysis*). Schematy działania poszczególnych systemów zostały przedstawione poniżej (Ryc. 2).

### MARS

Działanie tego systemu opiera się na zjawisku hemodializy albuminowej. MARS składa się z trzech kompartmentów. Pierwszym z nich jest obieg krwi, skąd z krwiobiegu pacjenta krew kierowana jest do systemu detoksykacji, a następnie oczyszczona do niego powraca. Kolejnym jest obieg albuminy, która dzięki obecności w płynie dializacyjnym może wiązać toksyny związane z albuminą z krwi pacjenta (dializa albuminowa). W trzecim kompartmentcie dochodzi do regeneracji albuminy z dializatu, natomiast oczyszczona krew wraca do obiegu krwi [27,28]. Doniesienia literaturowe wskazują, iż system MARS pozwala na stabilizację oraz podtrzymanie działania wątroby w oczekiwaniu na transplantację, a w niektórych przypadkach ze względu na samoregenerację tego narządu umożliwia uniknięcie przeszczepu [29]. Bardzo podobnym systemem jest SPAD. Jedyną różnicą jest brak etapu, w którym dochodzi do regeneracji dializatu. Zgodnie z danymi literaturowymi efektywność oczyszczania krwi w obydwu systemach jest porównywalna [30].

### System Prometheus

System Prometheus jest połączeniem hemodializy wykorzystywanej w systemie MARS z metodą FPSA (ang. *fractionated plasma separation and adsorption*). Ulepszenie w tym urządzeniu stanowi bezpośrednie oczyszczanie z toksyn al-

buminy pozyskanej z krwi pacjenta (frakcjonowanie osocza), podczas gdy, jak już wspomniano, w przypadku systemu MARS białko osocza niosące związki toksyczne oddaje je albuminie zawartej w płynie dializacyjnym. Uważa się, że połączenie tych dwóch technik zwiększy efektywność oczyszczania krwi pacjenta w porównaniu z systemem MARS [31].

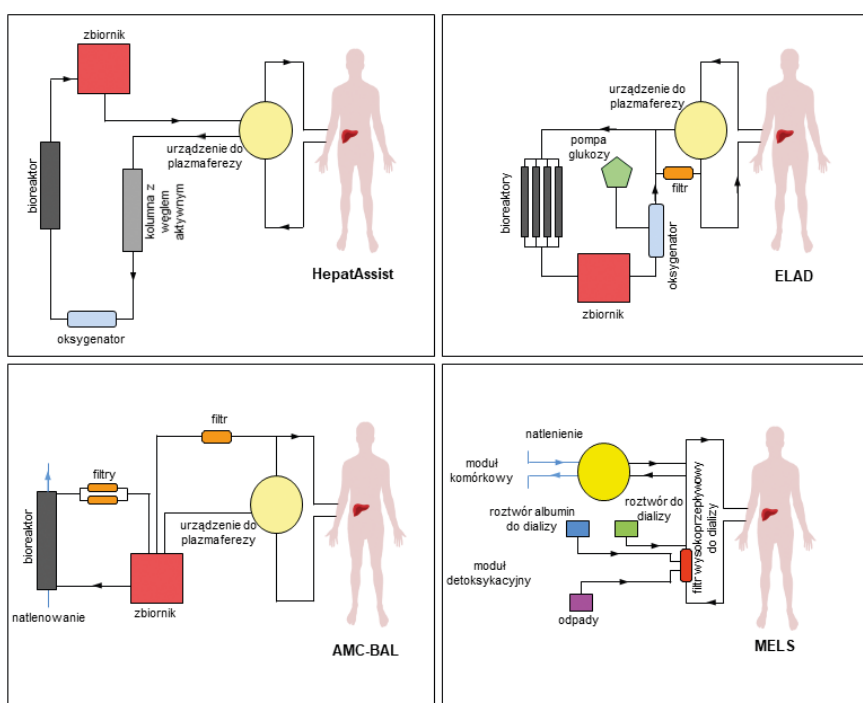
### SEPET

W systemie SEPET krew pacjenta poddawana jest dializie, dzięki której osocze krwi wraz ze związanymi toksynami jest zatrzymywane przez membranę. Następnie oczyszczona krew zostaje wzbogacona w roztwór elektrolitów wraz ze świeżym, mrożonym osoczem krwi oraz ludzką albuminą i wraca do krwiobiegu. Ze względu na to, iż membrana charakteryzuje się punktem odcięcia równym 100 kDa, wiele niezbędnych białek takich jak czynnik wzrostu hepatocytów (ang. *hepatocytes growth factor*), czynnik krzepnięcia krwi czy też niektóre immunoglobuliny zostaje zatrzymanych w krwiobiegu [32].

Chociaż systemy MARS i Prometheus przeszły wieloosrodkowe, randomizowane (na losowo dobranych grupach pacjentów wraz z grupą kontrolną) badania kliniczne, nie wykazano poprawy przeżywalności pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną leczoną standardową terapią zachowawczą. Za niepowodzenia te winą obarczano głównie źle dobrane grupy pacjentów, które charakteryzowały się zbytnią różnorodnością pod względem etiologii choroby, jej nasilenia czy też stanu zdrowia pacjenta. W związku z tym podejmowane są próby badań klinicznych na pacjentach o konkretnej jednostce chorobowej np. zainicjowane w tym roku badanie z użyciem systemu MARS na pacjentach po rozległej resekcji wątroby. Nie mniej jednak należy zdawać sobie sprawę z wady tych systemów, jaką jest niemożność pełnienia biosyntetycznych funkcji wątroby [33,34].

### BIOSZTUCZNE SYSTEMY WSPOMAGANIA WĄTROBY

Obecnie większe nadzieje pokłada się w bioszucznych systemach wspomaganie wątroby (ang. *bioartificial liver support systems, BAL*). Jest to spowodowane zastosowaniem w nich biologicznie aktywnego bloku funkcyjnego w postaci komórek pochodzenia wątrobowego, a co za tym idzie możliwości pełnienia przez urządzenie, oprócz funkcji detoksykacyjnych, także biosyntetycznych, regulacyjnych, wydzielniczych oraz metabolicznych. Bioszuczne systemy wspomaganie wątroby stanowią jak dotąd terapię pomocową głównie w leczeniu schorzeń ostrej niewydolności wątroby [35]. Wśród nich można wyróżnić: MELS (ang. *modular extracorporeal liver support*), AMC-BAL (ang. *academic medical centre – bioartificial liver*), HepatAssist oraz ELAD (ang. *extracorporeal liver assist device*). Schematy działania poszczególnych urządzeń zostały przedstawione poniżej (Ryc. 3).



Ryc. 3. Wybrane bioszuczne systemy wspomaganie wątroby, które dzięki wykorzystaniu biologicznie aktywnego bloku funkcyjnego, uwzględniają biosyntetyczne funkcje pełnione przez wątrobę.

W tego typu urządzeniach niezwykle ważna jest zarówno konstrukcja bioreaktora jak i dobranie odpowiedniego czynnika biologicznego. Zgodnie z danymi literaturowymi bioreaktor powinien spełniać następujące kryteria: odzwierciedlać warunki panujące *in vivo*, utrzymywać przez dłuższy czas żywotność oraz funkcjonalność komórek, a nawet je poprawiać; zapewniać wydajny dwukierunkowy transport masy, a także wykazywać potencjał do zastosowań klinicznych. W takich urządzeniach dwukierunkowy transport masy zapewniają membrany półprzepuszczalne, które pozwalają na transfer substancji pomiędzy krwią pacjenta a komórkami zasiedlającymi bioreaktor. Wśród membran używanych w biosztucznych systemach wspomagania wątroby można wyróżnić membrany kapilarne (ang. *hollow fibers*) oraz membrany płaskie. W urządzeniach testowanych klinicznie (np. ELAD, HepatAssist) wykorzystuje się membrany kapilarne, na zewnątrz których hodowane są komórki wątrobowe. Pomimo licznych zalet, nierównomierna dystrybucja komórek w przestrzeniach kapilar, a także bariera uniemożliwiająca sprawną dyfuzję substancji między komórkami a krwią pacjenta, skłoniły naukowców do prowadzenia dalszych badań w kierunku znalezienia doskonalszego bioreaktora [36].

Najlepszym źródłem komórek do zasiedlenia bioreaktora jest ludzka wątroba. Według danych literaturowych, aby efekt terapeutyczny był skuteczny, potrzeba około  $10^{10}$  funkcjonalnych komórek wątrobowych, co stanowi zaledwie 10% całkowitej liczby komórek znajdujących się w wątrobie. Co ciekawe w literaturze można również znaleźć informacje, że wydajność izolacji ludzkich hepatocytów nie przekracza 10% [23,37]. Dlatego też, ze względu na ich ograniczoną dostępność, rozpoczęto poszukiwania alternatywnych źródeł komórek wątrobowych. Jak dotąd pod kątem zastosowania w biosztucznych systemach wspomagania badano: pierwotne świńskie hepatocyty [38], linie komórkowe nowotworowe takie jak HepaRG [39], HepG2 [40] czy jej klon – C3A [41], komórki progenitorowe [42], komórki hepatocytopodobne otrzymywane z komórek macierzystych [43] oraz komórki iHep zróżnicowane z indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych iPSC (ang. *induced pluripotent stem cells*) [44]. W rezultacie w urządzeniach dopuszczonych do badań klinicznych zastosowanie znalazły: izolowane świeże lub mrożone świńskie hepatocyty oraz C3A – linia komórkowa wyprowadzona z pierwotnego ludzkiego raka wątroby [45].

#### ELAD

Biosztuczny system wspomagania wątroby, w którym upatrywano największe nadzieje jest system ELAD. Pierwotnie składał się on z czterech bioreaktorów zbudowanych z membran kapilarnych o punkcie odcięcia równym 70 kDa. W każdym z nich na zewnątrz kapilar znajdowały się komórki pierwotnego ludzkiego raka wątroby – C3A (do 400 g). Krew pacjenta przepływa przez wnętrze kapilar bioreaktorów (szybkość przepływu wynosi 150–200 ml/min), podczas gdy osocze przechodzi przez włókna z octanu celulozy do przestrzeni, w której może bezpośrednio kontaktować się z komórkami. Przed powrotem do krwiobiegu osocze poddawane jest filtracji, aby zapobiec ewentualne-

mu dostaniu się komórek nowotworowych do organizmu człowieka [46]. Pomimo ciekawej konstrukcji urządzenia przeprowadzone badania kliniczne nie wykazały znaczącej poprawy przeżywalności w porównaniu ze standardową terapią [47]. W rezultacie, system ELAD poddano modyfikacji. Zwiększeniu do 500 ml/min uległa szybkość przepływu. Włókna kapilar zostały wykonane z polisulfonu o punkcie odcięcia 100 kDa, a masa komórek w bioreaktorach miała łącznie wynosić przynajmniej 440 g. Kolejną modyfikacją było oddzielenie komórek krwi od osocza przed dotarciem do bioreaktorów. Dodatkowo cały czas monitorowane są parametry (zużycie glukozy oraz tlenu) świadczące o aktywności metabolicznej komórek. Zmodyfikowany system ELAD doszedł do trzeciej fazy badań klinicznych prowadzonych wieloosrodkowo na dużej liczbie pacjentów, w których sprawdzano skuteczność tego urządzenia w terapii ostrego alkoholowego uszkodzenia wątroby (NCT01471028 – numer identyfikacyjny danego badania klinicznego zarejestrowanego w bazie ClinicalTrials.gov) [strona www 3]. Niestety, pomimo wysokiego stopnia zaawansowania projektu nie udało się wykazać znaczącej poprawy w przeżywalności pacjentów i w rezultacie tego niepowodzenia projekt pod nazwą ELAD zawieszono [48].

#### HepatAssist

W systemie HepatAssist w pierwszym etapie osocze pacjenta zostaje oddzielone od komórek krwi, następnie przepływa przez kolumnę z węglem drzewnym oraz moduł napowietrzania i ostatecznie trafia do bioreaktora. Jest on zbudowany z membran kapilarnych o wielkości porów 0,2  $\mu\text{m}$ , a szybkość przepływu wynosi 400 ml/min. Źródłem komórek w przypadku tego urządzenia są mrożone świńskie hepatocyty w liczbie  $5\text{--}7 \times 10^9$ , które zasiedla się na zewnątrz kapilar. Oczyszczone osocze po opuszczeniu bioreaktora łączy się z komórkami krwi i trafia z powrotem do pacjenta [49]. Z dostępnych danych literaturowych wynika, że system HepatAssist znacząco poprawia przeżycie, co zostało wykazane na modelach zwierzęcych [50]. Jednakże w przeprowadzonych randomizowanych badaniach klinicznych nie zaobserwowano istotnego wpływu na przeżywalność pacjentów [51].

#### MELS

System MELS podzielony jest na dwa moduły: komórkowy oraz detoksykacyjny. Zasada działania tego urządzenia polega na cyrkulacji krwi pacjenta, podczas którego osocze zostaje oddzielone od komórek krwi, oczyszczone z wykorzystaniem zasiedlonych w bioreaktorze hepatocytów, a następnie zwracane do krwiobiegu. Moduł komórkowy zbudowany jest z bioreaktora (o szybkości przepływu 100–200 ml/min), na który składają się trzy pakiety splecionych między sobą membran kapilarnych. Dwa z nich wytworzone są z polieterosulfonu i charakteryzują się hydrofilowością oraz wielkością porów około 0,5  $\mu\text{m}$ . Ich zadaniem jest perfuzja osocza lub medium hodowlanego. Z kolei trzeci pakiet złożony z hydrofobowych włókien wykorzystuje się do napowietrzania. Złożona budowa bioreaktora pozwala zapewnić stały dopływ tlenu oraz składników odżywczych do komórek, których źródłem w tym urządzeniu są świeżo izolowane ludzkie lub świńskie hepatocyty

o łącznej masie nawet do 600 g. Zasiadła się je wewnątrz pojedynczych kapilar. W pierwszej fazie badań leczeniu z wykorzystaniem MELS zostało poddanych 8 pacjentów. Sześciu z nich dzięki tej terapii pomostowej doczekało przeszczepu, a ogólna poprawa zdrowia pacjentów ostatecznie potwierdziła bezpieczeństwo tego systemu, chociaż badanie nie było randomizowane [52,53].

#### AMC-BAL

System AMC-BAL działa na podobnej zasadzie jak urządzenia opisane powyżej. Charakteryzuje się ciekawą budową bioreaktora. Świeżo izolowane świńskie hepatocyty w liczbie około  $10^{10}$  są przytwierdzone do poliestrowej, spiralnie zwiniętej matrycy i tworzą strukturę trójwymiarową. Pomiedzy jej warstwami umieszczone są włókna odpowiedzialne za transfer tlenu. Taka konstrukcja bioreaktora skutkuje bezpośrednim kontaktem między agregatami komórkowym a osoczem pacjenta, co niweluje barierę dyfuzyjną. Szybkość przepływu płynu w bioreaktorze wynosi 150 ml/min [54]. Przeprowadzone badania kliniczne wykazały bezpieczeństwo tej terapii pomostowej w utrzymaniu pacjenta przy życiu do momentu transplantacji wątroby [55].

#### ALTERNATYWNE ŹRÓDŁA HEPATOCYTÓW STOSOWANE W BIOSZTUCZNYCH SYSTEMACH WSPOMAGANIA WĄTROBY

##### Świńskie hepatocyty

Wśród zwierzęcych hepatocytów najczęściej wykorzystywane w BAL są komórki pochodzenia świńskiego. Jest to spowodowane ich dużym podobieństwem do ludzkich hepatocytów, a także nieograniczoną dostępnością. Mogą być wykorzystywane zarówno świeżo po izolacji jak i mrożone. Jednakże sposobność zarażenia chorobą odzwierzęcą (np. świńskim endogennym retrowirusem PERV), różnice między białkami ludzkimi a zwierzęcymi, a także możliwość pojawienia się odpowiedzi immunologicznej zrodziły obawy w słuszności stosowania świńskich hepatocytów w celach klinicznych [5]. Dodatkowo w celu spełnienia nowych standardów obowiązujących w Unii Europejskiej wiele ośrodków badawczych rezygnuje z prowadzenia badań z wykorzystaniem izolowanych świńskich hepatocytów. Przykładowo, grupa badawcza, która opracowała jeden z biosztucznych systemów wspomaganie wątroby – AMC-BAL postanowiła zastąpić świńskie hepatocyty ludzką linią komórkową HepaRG pochodzącą z guza wątroby [56].

##### Linia komórkowa C3A

C3A to linia komórkowa pierwotnego raka wątroby (ang. *hepatocellular carcinoma*), będąca pochodną linii nowotworowej HepG2 wyprowadzonej z organizmu piętnastoletniego chłopca rasy białej. Są to komórki adherentne o morfologii nabłonkowej, charakteryzujące się silną inhibicją kontaktową, wysokim poziomem produkcji albuminy oraz alfa fetoproteiny, a także umiejętnością do wzrostu w medium pozbawionym glukozy. Komórki C3A prezentują funkcjonalność zbliżoną do pierwotnych ludzkich hepatocytów, dodatkowo są ogólnodostępne, mają niskie wymagania dotyczące zarówno warunków jak i sposobu prowadzenia hodowli oraz wykazują zdolność do szybkiego wzrostu (US

Patent 5290684; Kelly, 1994). Pomimo licznych zalet, posiadają one poważną wadę, a mianowicie niefunkcjonalny cykl mocznikowy, co wynika z niskiej ekspresji (lub jej braku) genów kodujących kluczowe enzymy tego szlaku tj. arginazy 1 (ARG1) i karbamoiltransferazy ornitynowej (OTC) [57]. Dlatego też ciężko spodziewać się w pełni pozytywnych efektów zastosowania linii komórkowej C3A w systemie ELAD, gdyż brak możliwości pełnienia jednej z najważniejszych funkcji wątroby jaką jest konwersja toksycznego amoniaku do mocznika może stanowić jedną z przyczyn nieskutecznego działania tego urządzenia.

#### NAJNOWSZE ALTERNATYWNE ŹRÓDŁA HEPATOCYTÓW

##### Indukowane pluripotentne komórki macierzyste

Indukowane pluripotentne komórki macierzyste (ang. *induced pluripotent stem cells*, iPSC) stanowią obiecujące źródło, z którego można uzyskać komórki hepatocytopodobne (tzw. iHEP), wykazujące funkcje zbliżone do hepatocytów i jednocześnie zastosować w biosztucznych systemach wspomaganie wątroby. Znalazły one również zastosowanie w wielu dziedzinach nauki i medycyny takich jak: inżynieria tkankowa, modelowanie *in vitro*, terapia komórkowa czy opracowywanie leków. Indukowane pluripotentne komórki macierzyste otrzymuje się metodą reprogramowania ludzkich komórek somatycznych, najczęściej fibroblastów skórnych. Niestety, hepatocyty otrzymane z iPSC, tzw. iHEP, charakteryzują się niższą produkcją mocznika, a także wolniejszym wydzielaniem albuminy w porównaniu z ludzkimi komórkami. Dodatkowo wykazują ekspresję alfa fetoproteiny, co świadczy o braku ich dojrzałości [58].

Zgodnie z doniesieniami literaturowymi iPSC zostały po raz pierwszy wykorzystane w prototypowym biosztucznym systemie wspomaganie wątroby. Celem tych badań było przedstawienie metodologii prowadzenia hodowli ludzkich hepatocytów otrzymanych z iPSC w bioreaktorze przepływowym i wykazanie słuszności zastosowania tych komórek. Wysoka żywotność komórek po 12 dniach hodowli, wysoki poziom sekrecji albuminy w warunkach hodowli dynamicznej, a także wzrastający w trakcie trwania eksperymentu poziom markerów świadczących o dojrzałości hepatocytów wydają się być obiecującymi wstępnymi wynikami, aczkolwiek prototyp urządzenia wciąż wymaga dalszych badań [59].

##### Linia komórkowa HepaRG

Linia komórkowa HepaRG została wyprowadzona, tak jak HepG2 i C3A, z ludzkiego pierwotnego raka wątroby. Charakteryzuje się ona silną inhibicją kontaktową, a także wymaga do wzrostu specjalnego medium hodowlanego (medium Williama). Co ciekawe, linia komórkowa HepaRG zaraz po wysianiu wykazuje morfologię nabłonkową, jednakże po osiągnięciu konfluencji pojawiają się dwie różne populacje komórek – komórki hepatocytopodobne oraz przypominające cholangiocyty. Ta unikalna cecha świadczy o progenitorowej naturze tych komórek. Wziąwszy to pod uwagę, linia HepaRG stanowi doskonałe narzędzie w badaniach naukowych dotyczących metabolizmu wątroby czy

też niepożądanego oddziaływania leków na organizm człowieka. Co więcej, zgodnie z doniesieniami literaturowymi HepaRG jest jedyną linią, która może być z dużą efektywnością poddana infekcji wirusem wątroby typu B, co stwarza możliwość wykorzystania tych komórek w badaniach wirusologicznych. Należy jednak pamiętać, że niezróżnicowane komórki HepaRG mogą wykazywać potencjał rakotwórczy [60].

W ostatnim czasie przeprowadzono również wstępne badania mające na celu porównanie linii komórkowych C3A i HepaRG i parametrów określających przebieg ich hodowli w bioreaktorze przepływowym. Okazuje się, że ze względu na znacznie niższą ekspresję genu kodującego alfa fetoproteinę, komórki HepaRG wykazują się większą dojrzałością, co jest bliższe pierwotnym ludzkim hepatocytom. Co więcej, w porównaniu z C3A, linia komórkowa HepaRG hodowana w warunkach przepływowych wykazała indukcję produkcji mocznika, a także dużo lepszą zdolność do detoksykacji ksenobiotyków. Poziom wydzielanej albuminy w przypadku obu linii komórkowych był porównywalny. Jednakże najnowsze doniesienia literaturowe wskazują, że linia komórkowa HepaRG podobnie jak C3A charakteryzuje się brakiem lub niskim poziomem ekspresji genów *ARG1* i *OTC*, a co za tym idzie niefunkcjonalnym cyklem mocznikowym [56,61].

## PODSUMOWANIE

Wszystkie omawiane w niniejszym artykule terapie wątrobowozastępcze oraz próby ich doskonalenia mają na celu poprawę przeżywalności i jakości życia pacjentów oczekujących na przeszczep. Jak dotąd nie udało opracować się „złotego standardu” w leczeniu pacjentów dotkniętych chorobą wątroby. Uważa się, że interdyscyplinarne podejście oraz współpraca i zaangażowanie wielu ośrodków badawczych może w przyszłości przyczynić się do jego powstania. Prace nad biologicznie aktywnym blokiem funkcyjnym sztucznej wątroby są prowadzone również w Pracowni Inżynierii Tkankowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza PAN (PIT IBIB PAN) w Warszawie. Badania te dotyczą całego systemu hodowlanego, który może zostać wykorzystany do budowy hybrydowych urządzeń wspomagających niewydolną wątrobę. System ten obejmuje zarówno opracowanie pożywki hodowlanej jak i modyfikacje powierzchni hodowlanych, mających zapewnić długotrwałą hodowlę komórek wątrobowych. W ramach tych działań w PIT IBIB PAN powstała np. nowatorska koncepcja przygotowania podłoża hodowlanego z użyciem suszonej konfluentnej hodowli ludzkich fibroblastów skóry [62]. Ponadto, w celu uzyskania ulepszanego materiału biologicznego dla biosztucznej wątroby, komórki linii C3A są modyfikowane genetycznie z użyciem wektorów lentiwirusowych [63,64] tak, aby przywrócić w nich funkcje cyklu mocznikowego. Opracowywany w PIT IBIB PAN biologicznie aktywny blok funkcyjny sztucznej wątroby obejmuje również współhodowlę komórek wątrobowych z komórkami warstwy odżywczej. Takie komórki jak modyfikowane genetycznie ludzkie fibroblasty skóry nadprodukcujące różne istotne dla wątroby czynniki wzrostu zostały już otrzymane. Ponadto, mając na uwadze, że hodowle trójwymiarowe lepiej odzwierciedlają warunki panujące *in*

*in vivo*, w PIT IBIB PAN prowadzone są również hodowle komórek C3A i C3A modyfikowanych genetycznie w kapilarnych bioreaktorach przepływowych. Wszystkie te prace są bardzo nowe i stanowią przedmiot wciąż trwających analiz. Uzyskane wyniki zostaną wkrótce opublikowane.

## PIŚMIENNICTWO

1. Marcellin P, Kutala BK (2018) Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening. *Liver Int* 38 Suppl 1: 2–6
2. Pimpin L, Cortez-Pinto H, Negro F, Corbould E, Lazarus JV, Webber L, Sheron N (2018) Burden of liver disease in Europe: epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies. *J Hepatol* 69: 718–735
3. Axley PD, Richardson CT, Signal AK (2019) Epidemiology of alcohol consumption and societal burden of alcoholism and alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis* 23: 39–50
4. Meirelles Júnior RF, Salvalaggio P, Rezende MB, Evangelista AS, Guardia DB, Matiolo CE, Neves DB, Pandullo FL, Felga GE, Alves JA, Curvelo LA, Diaz LG, Rusi MB, Viveiros Mde M, Almeida MD, Pedroso PT, Rocco RA, Meira Filho SP (2015) Liver transplantation: history, outcomes and perspectives. *Einstein (Sao Paulo)* 13: 149–152
5. Palakkan AA, Hay DC, Anil Kumar PR, Kumary TV, Ross JA (2013) Liver tissue engineering and cell sources: issues and challenges. *Liver Int* 33: 666–676
6. Sawicki W, Malejczyk J (2012) *Histologia*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa
7. Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, Bode JG, Bolleyn J, Borner C, Böttger J, Braeuning A i in. (2013) Recent advances in 2D and 3D *in vitro* systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol* 87: 1315–1530
8. Nakatani K, Kaneda K, Seki S, Nakajima Y (2004) Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function. *Med Electron Microsc* 37: 29–36
9. Kmiec Z (2001) Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 161: 1–151
10. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F (2013) The burden of liver disease in Europe. *J Hepatol* 58: 593–608
11. Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA (2010) Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology* 51: 1820–1832
12. Fox AN, Brown RS (2012) Is the patient a candidate for liver transplantation? *Clin Liver Dis* 16: 435–448
13. Wójcicki M, Pakosz-Golanowska M (2011) Transplantacja wątroby. Technika chirurgiczna i powikłania naczyniowe po operacji. *Gastroenterologia Kliniczna: Postępy i Standardy* 3: 46–54
14. Starzl TE, Groth CG, Brettschneider L, Penn I, Fulginiti VA, Moon JB, Blanchard H, Martin AJ, Porter KA (1968) Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Ann Surg* 168: 392–415
15. Davies NA, Bañares R (2015) A new horizon for liver support in acute liver failure. *J Hepatol* 63: 303–305
16. Seglen PO (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13: 29–83
17. Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A, Lesec SC, Girlanda R, Rela M, Heaton ND, Muiesan P (2006) Isolation of hepatocytes from livers from non-heart-beating donors for cell transplantation. *Liver Transplant* 12: 713–717
18. Fox IJ (2014) Hepatocyte transplantation. *Gastroenterol Hepatol* 10: 594–596
19. Iansante V, Mitry RR, Filippi C, Fitzpatrick E, Dhawan A (2018) Human hepatocyte transplantation for liver disease: current status and future perspectives. *Pediatr Res* 83: 232–240

20. Sellaro TL, Ranade A, Faulk DM, McCabe GP, Dorko K, Badyrak SF, Strom SC (2010) Maintenance of human hepatocyte function in vitro by liver-derived extracellular matrix gels. *Tissue Eng Part A* 16: 1075–1082
21. Lee DH, Lee KW (2014) Hepatocyte Isolation, Culture and Its Clinical Applications. *Hanyang Med Rev* 34: 165–172
22. Forbes SJ, Gupta S, Dhawan A (2015) Cell therapy for liver disease: From liver transplantation to cell factory. *J Hepatol* 62 (1 Suppl): S157–69
23. Zakrzewska KE, Samluk A, Wencel A, Dudek K, Pijanowska DG, Pluta KD (2017) Liver tissue fragments obtained from males are the most promising source of human hepatocytes for cell-based therapies – flow cytometric analysis of albumin expression. *PLoS One* 12: e0182846
24. Podoll AS, DeGolovine A, Finkel KW., 2012, Liver support systems – a review. *ASAIO* 58 (5), 443–449
25. Struecker B, Raschzok N, Sauer IM (2014) Liver support strategies: cutting-edge technologies, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11: 166–176
26. Laleman W, Wilmer A, Evenepoel P, Verslype C, Fevery J, Nevens F (2006) Review article: non-biological liver support in liver failure. *Aliment Pharmacol Ther* 23: 351–363
27. Saliba F (2006) The Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS) in the intensive care unit: a rescue therapy for patients with hepatic failure. *Crit Care* 10: 118
28. Mitzner SR, Stange J, Klammt S, Peszynski P, Schmidt R, Nöldge-Schomburg G (2001) Extracorporeal detoxification using the molecular adsorbent recirculating system for critically ill patients with liver failure. *J Am Soc Nephrol* 12 Suppl 17: S75–82
29. Stange J, Mitzner SR, Risler T, Erley CM, Lauchart W, Goehl H, Klammt S, Peszynski P, Freytag J, Hickstein H, Lohr M, Liebe S, Schreck W, Hopt UT, Schmidt R (1999) Molecular adsorbent recycling system (MARS): clinical results of a new membrane-based blood purification system for bioartificial liver support. *Artif Organs* 23: 319–330
30. Rademacher S, Oppert M, Jörres A (2011) Artificial extracorporeal liver support therapy in patients with severe liver failure. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 5: 591–599
31. Santoro A, Faenza S, Mancini E, Ferramosca E, Grammatico F, Zucchelli A, Facchini MG, Pinna AD (2006) Prometheus system: a technological support in liver failure. *Transplant Proc* 38: 1078–1082
32. Pless G (2007) Artificial and bioartificial liver support. *Organogenesis* 3: 20–24
33. Garcia Martinez JJ, Bendjelid K (2018) Artificial liver support systems: what is new over the last decade? *Ann Intensive Care* 8: 109
34. Gilg S, Sparrelid E, Saraste L, Nowak G, Wahlin S, Strömberg C, Lundell L, Isaksson B (2018) The molecular adsorbent recirculating system in posthepatectomy liver failure: results from a prospective phase I study. *Hepatol Commun* 2: 445–454
35. Lu J, Zhang X, Li J, Yu L, Chen E, Zhu D, Zhang Y, Li L (2016) A new fluidized bed bioreactor based on diversion-type microcapsule suspension for bioartificial liver systems. *PLoS One* 11: e0147376
36. Allen JW, Hassanein T, Bhatia SN (2001) Advances in bioartificial liver devices. *Hepatology* 34: 447–455
37. van de Kerkhove MP, Hoekstra R, Chamuleau RA, van Gulik TM (2004) Clinical application of bioartificial liver support systems. *Ann Surg* 240: 216–230
38. Rozga J, Williams F, Ro MS, Neuzil DF, Giorgio TD, Backfisch G, Moccioni AD, Hakim R, Demetriou AA (1993) Development of a bioartificial liver: properties and function of a hollow-fiber module inoculated with liver cells. *Hepatology* 17: 258–265
39. Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C (2002) Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15655–15660
40. Knowles BB, Howe CC, Aden DP (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209: 497–499
41. Sussman NL, Chong MG, Koussayer T, He DE, Shang TA, Whisenand HH, Kelly JH (1992) Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology* 16: 60–65
42. Khuu DN, Scheers I, Ehnert S, Jazouli N, Nyabi O, Buc-Calderon P, Meulmans A, Nussler A, Sokal E, Najimi M (2011) In vitro differentiated adult human liver progenitor cells display mature hepatic metabolic functions: a potential tool for in vitro pharmacotoxicological testing. *Cell Transplant* 20: 287–302
43. Stock P, Brückner S, Ebensing S, Hempel M, Dollinger MM, Christ B (2010) The generation of hepatocytes from mesenchymal stem cells and engraftment into murine liver. *Nat Protoc* 5: 617–627
44. Huang P, Zhang L, Gao Y, He Z, Yao D, Wu Z, Cen J, Chen X, Liu C, Hu Y, Lai D, Hu Z, Chen L, Zhang Y, Cheng X, Ma X, Pan G, Wang X, Hui L (2014) Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes. *Cell Stem Cell* 14: 370–384
45. 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
46. Gislason GT, Lobdell DD, Kelly JH, Sussman NL (1994) A treatment system for implementing an extracorporeal liver assist device. *Artif Organs* 18: 385–389
47. Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA, Dunne J, Langley PG, Kelly JH, Gislason GT, Sussman NL, Williams R (1996) Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology* 24: 1446–1451
48. Thompson J, Jones N, Al-Khafaji A, Malik S, Reich D, Munoz S, Mac-Nicholas R, Hassanein T, Teperman L, Stein L, Duarte-Rojo A, Malik R i in. (2018) Extracorporeal cellular therapy (ELAD) in severe alcoholic hepatitis: a multinational, prospective, controlled, randomized trial. *Liver Transplant* 24: 380–393
49. Demetriou AA, Rozga J, Podesta L, Lepage E, Morsiani E, Moccioni AD, Hoffman A, McGrath M, Kong L, Rosen H, Villamil F, Woolf G, Vierling J, Makowka L (1995) Early clinical experience with a hybrid bioartificial liver. *Scand J Gastroenterol* 30 (Suppl 208): 111–117
50. Suh KS, Lilja H, Kamohara Y, Eguchi S, Arkadopoulos N, Neuman T, Demetriou AA, Rozga J (1999) Bioartificial liver treatment in rats with fulminant hepatic failure: effect on DNA-binding activity of liver-enriched and growth-associated transcription factors. *J Surg Res* 85: 243–250
51. Demetriou AA, Brown RS, Busuttill RW, Fair J, McGuire BM, Rosenthal P, Am Esch JS II, Lerut J, Nyberg SL, Salizzoni M, Fagan EA, de Hemptinne B, Broelsch CE, Muraca M, Salmeron JM, Rabkin JM, Metselaar HJ, Pratt D, De La Mata M, McChesney LP, Everson GT, Lavin PT, Stevens AC, Pitkin Z, Solomon BA (2004) Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg* 239: 660–670
52. Sauer IM, Neuhaus P, Gerlach JC (2002) Concept for modular extracorporeal liver support for the treatment of acute hepatic failure. *Metab Brain Dis* 17: 477–484
53. Sauer IM, Gerlach JC (2002) Modular extracorporeal liver support. *Artif Organs* 26: 703–706
54. Flendrig LM, La Soe JW, Jörning GG, Steenbeek A, Karlsen OT, Bovée WM, Ladiges NC, te Velde AA, Chamuleau RA (1997) In vitro evaluation of a novel bioreactor based on an integral oxygenator and a spirally wound nonwoven polyester matrix for hepatocyte culture as small aggregates. *J Hepatol* 26: 1379–1392
55. van de Kerkhove MP, Di Florio E, Scuderi V, Mancini A, Belli A, Bracco A, Dauri M, Tisone G, Di Nucleo G, Amoroso P, Spadari A, Lombardi G, Hoekstra R, Calise F, Chamuleau RA (2002) Phase I clinical trial with the AMC-bioartificial liver. *Int J Artif Organs* 25: 950–959
56. Moedas MF, Adam AAA, Farello MA, Iljst L, Chamuleau RAFM, Hoekstra R, Wanders RJA, Silva MFB (2017) Advances in methods for characterization of hepatic urea cycle enzymatic activity in HepaRG cells using UPLC-MS/MS. *Anal Biochem* 535: 47–55
57. 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




58. Yu Y, Fisher JE, Lillegard JB, Rodysill B, Amiot B, Nyberg SL (2012) Cell therapies for liver diseases. *Liver Transplant* 18: 9–21
59. Ren S, Irudayam JI, Contreras D, Sareen D, Talavera-Adame D, Svendsen CN, Arumugaswami V (2015) Bioartificial liver device based on induced pluripotent stem cell - derived hepatocytes. *J Stem Cell Res Ther* 5: 263
60. Marion MJ, Hantz O, Durantel D (2010) The HepaRG cell line: biological properties and relevance as a tool for cell biology, drug metabolism, and virology studies. *Methods Mol Biol* 640: 261–272
61. van Wenum M, Adam AA, Hakvoort TB, Hendriks EJ, Shevchenko V, van Gulik TM, Chamuleau RA, Hoekstra R (2016) Selecting cells for bioartificial liver devices and the importance of a 3D culture environment: a functional comparison between the HepaRG and C3A cell lines. *Int J Biol Sci* 12: 964–978
62. Wencel A, Zakrzewska KE, Samluk A, Noszczyk BH, Pijanowska DG, Pluta KD (2017) Dried human skin fibroblasts as a new substratum for functional culture of hepatic cells. *Acta Biochim Pol* 64: 357–363
63. 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
64. 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


#### STRONY WWW

1. <https://www.poltransplant.org.pl>
2. OPTN Database 2018, <https://optn.transplant.hrsa.gov>
3. <https://www.clinicaltrials.gov>

## Clinical applications of liver support systems

Małgorzata Ciężkowska, Krzysztof Dariusz Pluta 

Laboratory of Tissue Engineering Nalecz Institute of Biocybernetics and Biomedical Engineering Polish Academy of Sciences

 corresponding author: [kpłuta@ibib.waw.pl](mailto:kpłuta@ibib.waw.pl)

**Keywords:** liver, hepatocytes, liver support systems, hepatocytes transplantation

### SUMMARY

Liver diseases that lead to its failure are one of the most frequent causes of death worldwide. Taking into account liver's complexity, there are no drug for acute or acute on chronic liver failure treatment. So far the only effective therapy is the liver transplantation. Unfortunately donor shortage is a main problem of this therapy. Due to this fact scientists have been looking for a new alternatives. The most promising are cell transplantation and bioartificial support systems. Without doubt hepatocytes are the best source of cells to use. But isolated human hepatocytes dedifferentiate very quickly and lose their functions *ex vivo*. Therefore, the new sources of cells, which could replace hepatocytes, are highly sought after. It is believed that, in order to help patients suffering from liver disease, the approach to solve this problem should be considered on different levels.