

Karaciğer Kanser Hücrelerinin Sitoplazmik Özellikleri ile Kültür Süreci İlişkisi: Konfokal Mikroskopik Karşılaştırmalı Kantitatif Bir Çalışma

The Relationship Between the Hepatocellular Carcinoma Cells and the Cell Culture Duration: A Quantitative Comparative Confocal Microscopic Study

Hatice İsan¹, Ayşe Cılacı Tombuş², Hüseyin Ozan Doğru³, Gözde Şanlı³, Ranan Gülhan Aktaş⁴

¹Msc., Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi.

²Yrd. Doç. Dr. Ayşe Tombuş, Maltepe Üniversitesi, Endüstri Mühendisliği, İstanbul.

³Dönem III, 3 Öğrencisi, Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul

⁴Prof. Dr., Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi, İstanbul.

İletişim: Hatice İsan, Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi, Maltepe, İstanbul. E-posta: htcisn@gmail.com

ÖZET

Amaç: Hepatosellüler karsinoma tanısı konulmuş bir hastadan izole edilmiş olan HepG2 hücrelerinin morfolojik özelliklerindeki (sitoplazmik organellerden mitokondri, endoplazmik retikulum ve golgi cisimciği ile hücre iskeletini oluşturan başlıca filament tipi olan aktin filamentlerinin miktarının) değişiminin kültür süreci ile bağlantılı olarak değişiminin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 37 C'da, %5 CO2 içeren inkübatörlerde, %10 Fetal Sığır Serum (FBS) ile %1 Streptomisin-Penisilin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) içerisinde HepG2 hücrelerinin kültürleri yapıldı. 10 gün boyunca gözlenen bu hücreler; kültür sürecinin üç ayrı döneminde (kültür yüzeyinin %30, %60 ve %100'ünü kapladıkları dönemlerde) fikse edildi. İndirekt immunofloresan boyama tekniği ile ilgili sitoplazmik yapılar işaretlendi. İşaretli alanlar Zen ve Image J görüntü analiz programları kullanılarak ölçüldü. Sayısal sonuçlar grafiksel olarak ve Excel veri çözümüleme aracı kullanılarak karşılaştırıldı. Sonuçlar regresyon ve eşleştirilmiş iki grup arasında t-testi (farklı varyanslar varsayarak) yöntemi kullanılarak karşılaştırıldı.

Bulgular: Kanser hücrelerinin mitokondri, golgi cisimciği ve endoplazmik retikulum içeriğinde anlamlı bir değişiklik gözlenmesine karşılık; sitoplazmik aktin filament varlığında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir.

Sonuçlar: Karaciğer kanser hücrelerinin sitoplazmik organel içeriği klasik kültür ortamında kültür sürecine, ortamdaki hücre yoğunluğuna bağlı değişmektedir. Hücre iskeletinde belirgin bir değişiklik olmamaktadır. Deneysel çalışmalarda; "çoğalma" aşamasındaki kültür hücrelerinin morfolojik özelliklerinin bu parametreler karşısındaki değişimi deneylerin sonuçlarını etkileyebilir. Bu nedenle, araştırmalarda hücrelerin çoğalma aşamasının hangi devresinde oldukları göz ardı edilmemelidir.

Anahtar Kelimeler: HepG2 hücreleri, endoplazmik retikulum, golgi cisimciği, mitokondri, aktin filament.

ABSTRACT

Aim: It was aimed to compare the changes of morphologic features (the content of mitochondria, endoplasmic reticulum, golgi apparatus and the actin filaments of the cell) of the HepG2 cells, a cell line isolated from a patient having hepatocellular carcinoma, with the cultivation period.

Materials And Methods: HepG2 cells were cultured in incubators (37 C, 5% CO2) within DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) including 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 1% Streptomycin-Penicillin. The cells had been observed for 10 days and fixed when they covered 30%, 60% of 100% of the culture surface. Indirect immunofluorescence staining method had been used to label sitoplasmic contents. The labeled areas were measured by Zen and Image J image analysis system. The measurements were graphically visualized. The Excel data analysis tool was used for the statistical analysis. The results were compared by using the regression method and t test.

Results: Mitochondria, endoplasmic reticulum and golgi content of the cells changed significantly. However amount of the cytoplasmic actin filament in the cells remained similar.

Conclusions: Cytoplasmic organel of the liver cancer cells changes according to the in vitro culture duration and the cell density. No dramatic change is seen at the structure of the cell cytoskeleton. Those changes of the cells at "proliferation" stages might effect the experiments. The current study demonstrates that the stage of the cultured cells during proliferation might be crucial to determine the results of the the studies.

Keywords: HepG2 cells, endoplasmic reticulum, golgi apparatus, mitochondria, actin filament.

GİRİŞ

Hücreler üzerinde yapılan in vitro çalışmalar; birçok klinik çalışmaya ışık tutmakta; kalıtsal hastalıklardan kansere kadar farklı hastalıkların oluşum mekanizmaları ve tedavileri konularında çok önemli bilgiye erişilmesini sağlamaktadır. In vitro çalışmaların büyük bir kısmı, hücreler kültür yüzeyinin %60-80'ini kaplamadan önce yapılmaktadır. Bunun nedeni; kültürlerde hücre sayısının artmasıyla birlikte; hücreler arası ilişkinin ve sinyal iletiminin artması, otokrin ve parakrin sinyallerin güçlenmesi ve sonucunda hücrelerin morfolojik ve fizyolojik özelliklerinin değişerek farklılaşma sürecinin başlamasıdır. Hücreler kültür yüzeyini kaplayıp "konfluent" duruma geldiğinde kültür ortamında kontakt inhibisyon adı verilen mekanizma devreye girer; hücreler "çoğalma" aşamasından "farklılaşma" aşamasına geçerler. Bu bağlamda, çoğalmaya ve konfluent durumda diferansiyasyona katılan hücrelerin populasyonel profillerinin anlaşılması, hücre yoğunluğunda ve geçiş hallerindeki hücre davranışı, hücre büyüme potansiyelleri, hücreler arası bağlantılar ve hücre durum belirteçlerinin gen ifadeleri açısından incelenmesi sonraki deneysel çalışmalara ışık tutacaktır.

HepG2 hücreleri, hepatosellüler karsinoma tanısı konulmuş bir hastadan izole edilmiş olan ve karaciğer kanseri üzerine çalışmalarında çok sık kullanılan bir hücre dizisidir. Bu çalışmada; HepG2 hücrelerinin çoğalmaları ile birlikte kültür yüzeyinin tümünü kaplayıncaya kadar geçirdikleri süreçte morfolojik özelliklerindeki değişimin sayısal verilerle karşılaştırmalı değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla; sitoplazmik organellerden mitokondri, endoplazmik retikulum ve golgi cisimciği ile hücre iskeletini oluşturan başlıca filament tipi olan aktin filamentlerinin miktarının ölçülerek karşılaştırmalı değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

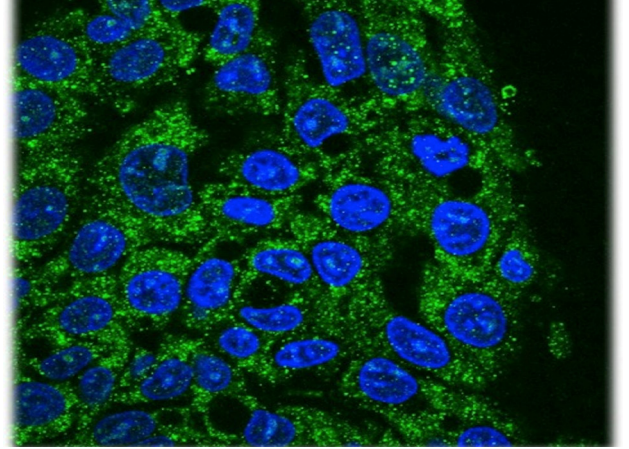
Hepatosellüler karsinoma tanısı konulmuş bir hastadan izole edilen altıncı pasaj HepG2 hücreleri (American Type Culture Collection, USA) kültür kaplarına homojen dağılacak şekilde ekildi. 37° C' de, % 5 CO₂ içeren inkübatörlerde, %10 Fetal Siğir Serum (FBS) ile %1 Streptomisin-Penisilin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) içerisinde HepG2 hücrelerinin kültürleri yapıldı. Hücreler aynı saatte gün aşırı beslenerek on gün süre ile gözlemlendi. Kültürlenen hücrelerin morfolojisi, çoğalma oranları PrimoVert Invert faz kontrast (Zeiss) mikroskobu ile izlendi ve farklı büyütme-lerde (X40, X100, X200, X400) canlı görüntüleri kaydedildi. 10 gün boyunca gözlenen bu hücreler; kültür sürecinin üç ayrı döneminde (kültür yüzeyinin %30, %60 ve %100'ünü kapladıkları dönemlerde) aseton ile fikse edildi. Bu örnekler; indirekt immunofloresan boyama tekniği uygulanarak sitoplazmik organellere spesifik primer antikolarla işaretlendi. Mitokondrileri görüntülemek için "anti-mitochondria antibody (MTC02, Abcam), golgi cisimciğini görüntüleme "anti-trans golgi network 38 (monoclonal antibody, Ther-

moscientific) ve endoplazmik retikulum görüntülenmesinde de "anti-ERp29 (polyclonal antibody, Thermo scientific) kullanıldı. Sekonder antikor olarak; primer antikora uygun olan Dylight (Abcam) ya da Alexafluor (Abcam) antikoları kullanıldı. Aktin filamentlerinin görüntülenmesi için sitoplazma aktin filamentlerini gösteren FITC-Phalloidin (Thermo-Scientific) kullanılarak direkt immunohistokimyasal boyama yapıldı. Hücre çekirdeklerinin boyanmasında ise DAPI kullanıldı.

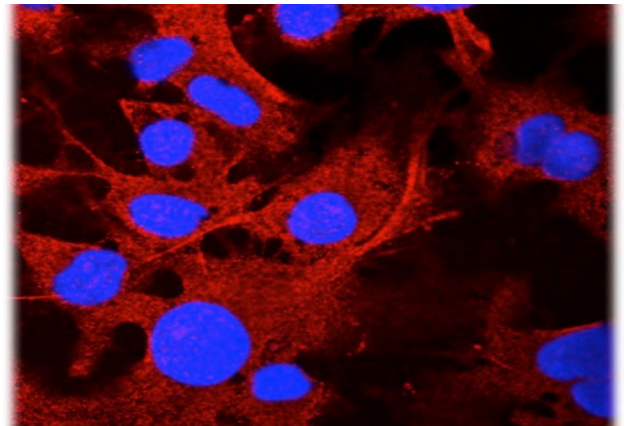
Boyanmış tüm örnekler; her gruptan 10 ayrı bölgeden olmak üzere, 200 kez büyütülerek konfokal mikroskop altında fotoğrafları çekildi. Çekilen fotoğraflar Zen ve Image J görüntü analiz programları altında incelenerek, boyalı alanların ölçümü ve çekirdek sayımı yapıldı. Her bir alandaki boyanmış alan miktarı o alana özgü toplam hücre sayısına bölünerek hücre başına düşen her bir organel için boyanmış alan bulundu. Grupların istatistiksel işlemleri için Excel veri çözümleme aracı kullanıldı. Sonuçlar regresyon ve eşleştirilmiş iki grup arasında t-testi (farklı varyanslar varsayarak) yöntemi kullanılarak karşılaştırıldı.

BULGULAR

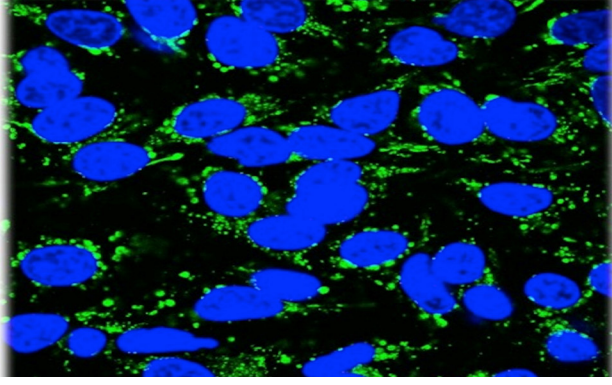
Mitokondriye, golgi cisimciğine, endoplazmik retikuluma ve aktin filamanlarına spesifik antikolarla boyanmış örneklerden fotoğraflar çekilerek karşılıklı değerlendirildi (Resim 1,2,3).



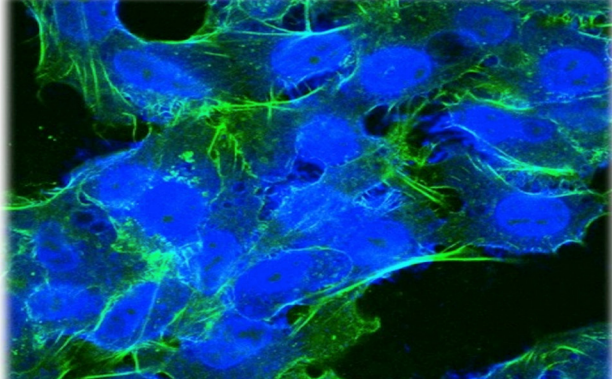
Resim 1. Mitokondri+DAPI X600.



Resim 2. Endoplazmik Retikulum+DAPI/ X600.

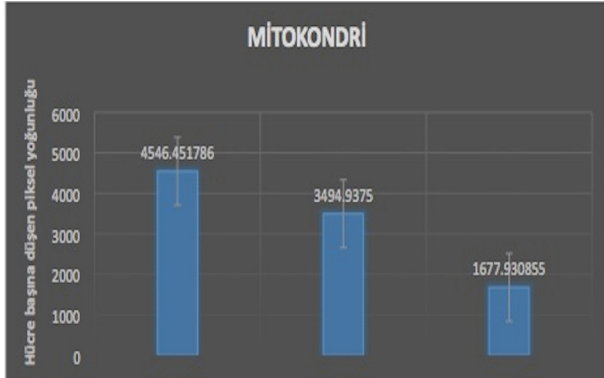


Resim 3. Golgi Cisimciği + Dapi /X600

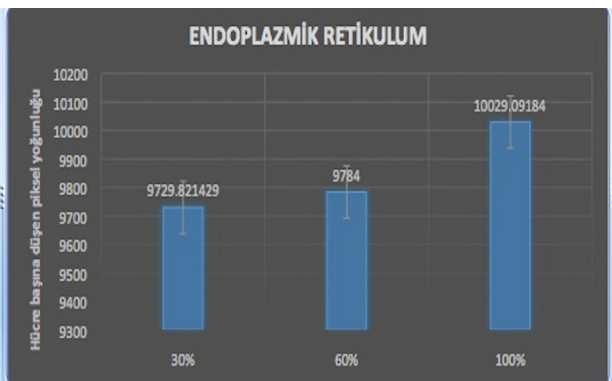


Resim 4. Aktin Flamentleri+DAPI, X600.

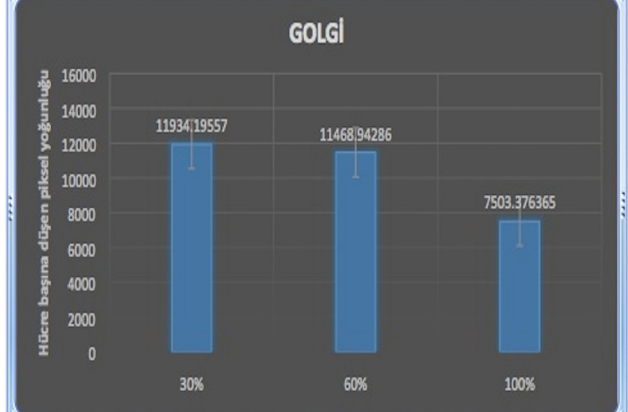
Atdından fotoğraflar üzerinde Image J görüntü analiz programı kullanılarak işaretli alanların ölçümleri yapıldı. Ölçümlerin sonuçları grafik 1,2,3 ve 4 de özetlenmiştir.



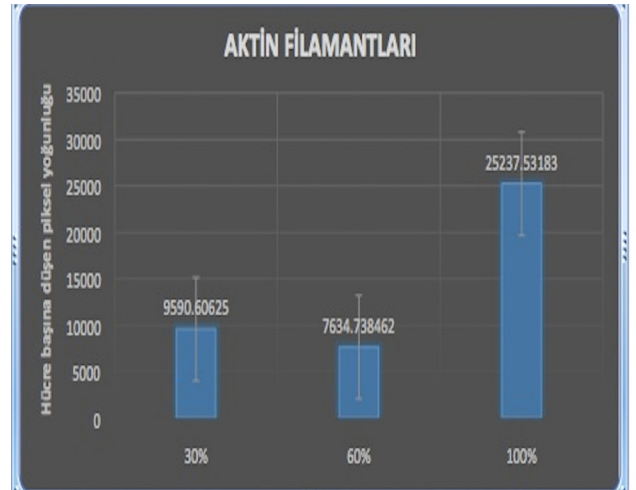
Grafik 1. Üç ayrı deney grubunda hücrelerde mitokondriye spesifik işaretlenmiş alanların Image J analiz programında ölçümü sonucu elde edilen sonuçlar.



Grafik 2. Üç ayrı deney grubunda hücrelerde endoplazmik retikuluma spesifik işaretlenmiş alanların Image J analiz programında ölçümü sonucu elde edilen sonuçlar.



Grafik 3. Üç ayrı deney grubunda hücrelerde golgi cisimciğine spesifik işaretlenmiş alanların Image J analiz programında ölçümü sonucu elde edilen sonuçlar.



Grafik 4. Üç ayrı deney grubunda hücrelerde aktin filamentlerine spesifik işaretlenmiş alanların Image J analiz programında ölçümü sonucu elde edilen sonuçlar.

Sonuçları istatistiksel olarak değerlendirmek amacıyla Excel veri çözümüleme aracı kullanıldı ve yüzeyin hücrelerle farklı oranlarda (%30 ve %100) kaplandığı durumlarda çekirdek başına düşen işaretli alan miktarının eşit olup olmadığı araştırıldı. Mitokondri, golgi ve aktin için %30 ve %100 büyüme oranlarında her iki popülasyonun hücre başına düşen işaretlenmiş alanın eşit olup olmadığı test edildi.

Bu amaçla öncelikle f-testi ile varyansların eşit olup olmadığı incelendi. Hipotezler aşağıdaki şekilde belirlendi:

$H_0: \sigma_1 = \sigma_2$ (H0 hipotezi %30 ve %100 kaplama altında varyanslar eşittir)

$H_1: \sigma_1 \neq \sigma_2$

Mitokondri, golgi ve aktin için yapılan f-testi sonuçlarına göre varyansların eşit olduğu hipotezi reddedilememiştir (Tablo 1-3).

F-Test Varyanslar için İki Örneklem – Mitokondri		
	30	100
Ortalama	4546,452	1910,871
Varyans	3109902	1309110
Gözlemler	2	9
Df	1	8
F	2,375585	
P(F<=f) tek-uçlu	0,161815	
F Kritik tek-uçlu	5,317655	

Tablo 1. Mitokondri için hücrelerin %30 ve %100 büyüme altında varyanslarını karşılaştıran f-testi sonuçlarını özetlemektedir. $F < F$ Kritik olduğu için H_0 hipotezi reddedilememiştir. Her iki popülasyon için varyans eşit kabul edilecektir.

F-Test Varyanslar için İki Örneklem Aktin		
	100	30
Ortalama	25237,53	9590,606
Varyans	2,4E+08	5175872
Gözlemler	9	2
Df	8	1
F	46,33985	
P(F<=f) tek-uçlu	0,113155	
F Kritik tek-uçlu	238,8827	

Tablo 2. Aktin için hücrelerin %30 ve %100 büyüme altında varyanslarını karşılaştıran f-testi sonuçlarını özetlemektedir. $F < F$ Kritik olduğu için H_0 hipotezi reddedilememiştir. Her iki popülasyon için varyans eşit kabul edilecektir.

F-Test Varyanslar için İki Örneklem Golgi		
	100	30
Ortalama	7503,376	11934,2
Varyans	10065243	2989425
Gözlemler	13	3
Df	12	2
F	3,36695	
P(F<=f) tek-uçlu	0,251652	
F Kritik tek-uçlu	19,41251	

Tablo 3. Golgi için hücrelerin %30 ve %100 büyüme altında varyanslarını karşılaştıran f-testi sonuçlarını özetlemektedir. $F < F$ Kritik olduğu için H_0 hipotezi reddedilememiştir. Her iki popülasyon için varyans eşit kabul edilecektir.

Tablo 1-3'ten görüldüğü üzere varyanslar eşittir. Dolayısıyla aynı varyansa sahip iki örnekleme için t testleri yapıldı. Hipotezler aşağıdaki şekilde belirlendi:

$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$ (H_0 hipotezi %30 ve %100 kaplama altında ortalamalar eşittir)

$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$

t-Test: Eşit Varyanslar Varsayarak İki Örneklem Mitokondri		
	30	100
Ortalama	4546,452	1910,871
Varyans	3109902	1309110
Gözlemler	2	9
Havuzlanmış Varyans	1509198	
Öngörülen Ortalama Farkı		
Fark	0	
Df	9	
t Stat	2,744372	
P(T<=t) tek-uçlu	0,011342	
t Kritik tek-uçlu	1,833113	
P(T<=t) çift-uçlu	0,022685	
t Kritik çift-uçlu	2,262157	

Tablo 4. Mitokondri için hücrelerin %30 ve %100 büyüme altında ortalamalarını karşılaştıran t-testi sonuçlarını özetlemektedir. t Stat $>$ t Kritik çift-uçlu olduğu için H_0 hipotezi reddedilmiştir. Her iki popülasyonun ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p < 0.012$) gözlemlenmiştir.

t-Test: Eşit Varyanslar Varsayarak İki Örnek Aktin		
	30	100
Ortalama	25237,53	9590,606
Varyans	2,4E+08	5175872
Gözlemler	9	2
Havuzlanmış Varyans	2,14E+08	
Öngörülen Ortalama Farkı		
Fark	0	

Df	9	
t Stat	1,368961	
P(T<=t) tek-uçlu	0,102101	
t Kritik tek-uçlu	1,833113	
P(T<=t) çift-uçlu	0,204203	
t Kritik çift-uçlu	2,262157	

Tablo 5. Aktin için hücrelerin %30 ve %100 büyüme altında ortalamalarını karşılaştıran t-testi sonuçlarını özetlemektedir. t Stat < t Kritik çift-uçlu olduğu için H0 hipotezi reddedilememiştir. Her iki popülasyonun ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

t-Test: Eşit Varyanslar Varsayarak İki Örnek Golgi		
	30	100
Ortalama	11934,2	7503,376
Varyans	2989425	10065243
Gözlemler	3	13
Havuzlanmış Varyans	9054412	
Öngörülen Ortalama Farkı		
Fark	0	
Df	14	
t Stat	2,298932	
P(T<=t) tek-uçlu	0,018713	
t Kritik one-tail	1,76131	
P(T<=t) çift-uçlu	0,037426	
t Kritik çift-uçlu	2,144787	

Tablo 6. Golgi için hücrelerin %30 ve %100 büyüme altında ortalamalarını karşılaştıran t-testi sonuçlarını özetlemektedir. t Stat > t Kritik çift-uçlu olduğu için H0 hipotezi reddedilmiştir. Her iki popülasyonun ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p < 0.019$) gözlemlenmiştir.

TARTIŞMA

Farklı hücre tiplerinin in vitro koşullardaki kültürleri sürecinde kültür yüzeylerinin tümünü kapladıklarında, yani "konfluent" olduklarında davranışlarının ve morfolojilerinin değiştiği ve de "farklılaşma" aşamasının başladığı bilinmektedir. Ancak bundan önceki "proliferasyon" aşamasında kültür süreci uzadıkça ve ortamdaki iletişime geçebilecek, otokrin ve parakrin salgılarıyla komşu hücreleri etkileyebilecek hücre sayısı arttığında ne gibi değişiklikler ortaya çıktığı konusundaki veriler kısıtlıdır. Kim ve ark. tarafından 2014 yılında yapılan çalışmada; konfluent MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerin Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) üzerinde farklı glukoz konsantrasyonunda kültür gen araştırmaları yapılmıştır (1). EMT geçiren kanser hücrelerinin kök hücre benzeri özelliklere sahip oldukları ve anti-kanser ajanlara dirençli oldukları gösterilmiştir (2). Kök hücre benzeri özellikli kanser hücrelerinin yüksek konsantrasyonda konfluent hücrelerde glukoz kültüründe önemli ölçüde artığı gösterilmiştir(3). Meme kanser hücrelerinin gen ekspresyonunun yanı sıra konfluent olarak buldukları koşullara göre önemli derecede farklılaştığı görülmektedir (3). Chowdhury ve ark, 2009 yılında yaptıkları çalışmada; miyoblast kültürlerindeki hücresel değişimi araştırmak için; P130, Myf5, myogenin ve MYH2'nin mRNA ekspresyonlarını analiz etmişlerdir. P130' un ekspresyonu konfluent hücrelerde, konfluent olmayanlarla karşılaştırıldığında ifade seviyesi daha yüksek bulmuştur. Myf5'in ekspresyon seviyesinde bir değişiklik gözlemlenmemiştir(5). Miyoblastları ayırt etmede kullanılan miyogenin ekspresyonu ise, hücre yoğunluğunda kültürde geçen zamanla artmış 36 kat daha fazla olmuştur. Miyoblastın fenotipik farklılaşması için bir gösterge olan MYH2 ifadesi de azalmıştır (6). Bu çalışma, hücre temasına bağlı indüksiyon farklılaşma sürecinde miyoblastların popülasyonel profilini tarif etmiştir. Kültürü konfluent duruma getiren fenotipik farklılaşmayı teşvik ederek MYH2'nin Myf5 ve myogenin miktarlarında düzenlenmeye neden olmuştur. Bir diğer araştırmada da, miyoblastların konfluensi halinin ilerlemesiyle birlikte hücreler arası ilişkinin artmasının farklılaşma sürecinin indüksiyonuna neden olduğu bildirilmiştir (7). Theil ve ark. da(8), hücrelerin tüm kültür yüzeyini kaplamaları, yani "konfluent" olmaları durumunda farklılaşma sürecinin başladığını bildirmişlerdir (8). İlaç keşfinde hücre kültürlerinin en büyük kısıtlamalarından birisi; hepatositlerin kültürde benzer işlev ve metabolik yeteneklerinin değiştirilmiş olmasıdır. İlaç metabolizmasında en önemli oyuncusu P450 enzim sistemidir. P450 enzim sisteminin ekspresyonunu sıkı bir kontrol altında olduğu bilinmektedir (9). PXR, Hepatik Nükleer Faktör(HNF)-4 ve CYP3A genlerinin regülasyon da diğer önemli modülatörlerdir. Louise Sivertsson ve ark (2010) da yaptıkları çalışmada; Konfluent Huh7 hücre kültürünün 5 haftalık büyümesinde ilaç metabolize eden genin ve özellikle CYP3A4(CYP3A4 seviyesi için Aflatoxin B1 ile ölçülmüştür) ifadesinin kademeli olarak arttığını gözlemişlerdir (10).

Çalışmada Huh7 hücrelerinin sağlıklı karaciğer dokusu gibi konfluent olmadan önce diferensiyasyonu ifade eden fonksiyonların ekspresyonu fazla iken, konfluent olduktan sonra bu fonksiyonların ekspresyonunun azaldığını; transkripsiyon faktörleri, metabolik enzimlerin ve albümin gibi karaciğere özgü olan genlerin ise daha yüksek seviyede ekspresyonunun gerçekleştiğini göstermişlerdir. HepG2 hücrelerinde ise benzer bir değişim gözlemleyememişlerdir (11, 12).

Bu çalışmada ise; ilk kez HepG2 hücrelerinin üç farklı sitoplazmik organelinin ve yine hücre iskeletinin en önemli filamentlerinden olan aktin filamentlerin hücre yoğunluğu ve kültür süreci ile birlikte değişiminin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla hücreler kültür yüzeyinin % 30'unu, %60'ını ve de %100'ünü kapladıkları aşamalarda, yani proliferasyon aşaması boyunca nasıl davrandıkları değerlendirilmiştir. Mikroskopik değerlendirme sırasında; ilk gözlemler hücrelerde mitokondri ve golgi miktarında azalma, endoplazmik retikulum ve aktin filamentleri miktarında ise artma yönünde olmuştur. Ancak bu sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; mitokondri ve golgiye spesifik işaretlenmede anlamlı bir değişiklik saptanırken, endoplazmik retikulum ve aktin içeriğinde bu değişikliğin anlamlı olduğu ispatlanamamıştır.

SONUÇ

Karaciğer kanserli bir hastadan izole edilen bir hücre dizisi olan HepG2 hücrelerinin klasik invitro kültür ortamında; konfluent olmaya başlamaları ile birlikte mitokondri ve golgi içeriklerinde belirgin bir değişiklik ortaya çıkmaktadır. Endoplazmik retikulum içeriği ve aktin iskeletinde ise bu dönemde anlamlı bir farklılık oluşmamaktadır. "Çoğalma" periyodunda ortaya çıkan morfolojik değişiklikler bu çalışmada gösterilmiştir. Yeni yapılacak çalışmalarla kültür sürecinin uzaması ve farklılaşma periyodunun başlaması ile beraber hücrelerin bu özelliklerinin değişiminin ne yönde ilerlediğinin ortaya çıkarılması; karaciğer kanser hücrelerinin farklılaşma sürecinin patofizyolojik özelliklerinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Thiery JP, Acloque H, Huang RY et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. 2009; Cell 139: 871-890,.
2. Scheel C and Weinberg RA: Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. Semin Cancer Biol 2012; 22: 396-403.
3. Liu PP, Liao J, Tang ZJ, et al: Metabolic regulation of cancer cell side population by glucose through activation of the Akt pathway. Cell Death Differ. 2014.; 21: 124-135
4. Singh JK, Simões BM, Howell SJ, et al: Recent advances reveal IL-8 signaling as a potential key to targeting breast cancer stem cells. Breast Cancer Res. 2013; 15: 210.
5. Chowdhury SR, Muneyuki Y, Takezawa Y, Kino-oka M, Saito A, Sawa Y, Taya M. Growth and differentiation po-

tentials in confluent state of culture of human skeletal muscle myoblasts . J Biosci Bioeng 2010 ;109(3):310-313.

6. Kitzmann, M., Carnac, G., Vandromme, et al: The muscle regulatory factors MyoD and Myf5 undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells, J. Cell Biol. 1998; 142, 1447-1459.
7. Chowdhury SR, Muneyuki Y, Takezawa Y. Synergic stimulation of laminin and epidermal growth factor facilitates the myoblast growth through promoting migration, J. Biosci. Bioeng. 2009; 108, 174-177.
8. Theil PK, Sørensen IL, Nissen PM. Temporal expression of growth factor genes of primary porcine satellite cells during myogenesis, Anim. Sci. J. 2006; 77, 330-337.
9. Donato MT, Lahoz A, Castell JV. A tool for in vitro drug metabolism studies. Curr Drug Metab. 2008; 9:1-11.
10. Sivertsson L, Ek M, Darnell, M. CYP3A4 Catalytic Activity Is Induced in Confluent Huh7 Hepatoma Cells Received. Drug Metabolism and Disposition. 2010; 38:995-1002.
11. Go'mez-Lecho 'n MJ, Donato T, Jover R. Expression and induction of a large set of drug-metabolizing enzymes by the highly differentiated human hepatoma cell line BC2. Eur J Biochem. 2001; 268: 1448 -1459.
12. Butura A, Johansson I, Nilsson K. Differentiation of human hepatoma cells during confluence as revealed by gene expression profiling. Biochem Pharmacol. 2004; 67:1249-1258.