

Pojedyncze komórki śródbłonka zawieszony w żelu kolagenowym bardzo szybko giną, nawet w obecności czynników wzrostu. Jeśli jednak będą mogły kontaktować się ze sobą, staną się wrażliwe na działanie czynników wzrostowych, co zapobiegnie apoptozie.

Test śródbłonkowych hodowli sferoidalnych został opracowany przez Thomasa Knorffa i Helmuta Augustina w 1998 roku. Jest to jedna z najlepszych metod pozwalających ocenić in vitro różnicowanie śródbłonka i tworzenie kapilar. W odróżnieniu od testów formowania tubul na matryzeli (gdzie pojedynczo wysiane komórki śródbłonka zmieniają kształt i łączą się ze sobą) w teście hodowli sferoidalnych bada się wyrastanie kapilar z agregatów komórkowych zawieszonych w kolagenie, co znacznie bardziej przypomina angiogenezę in vivo. Sferki zbudowane z komórek śródbłonka różnicują się. Komórki znajdujące się na ich powierzchni wykazują fenotyp charakterystyczny dla spoczynkowego śródbłonka w naczyniach in vivo. Powstające wypustki morfologicznie przypominają kapilary i tworzą sieć anastomozujących naczyń.

Wariantem tego testu są kokultury komórek śródbłonka i mięśni gładkich ściany naczynia.

## **I. Przygotowanie metylcelulozy**

*Potrzebne odczynniki:*

- metylceluloza (Sigma, M-0512)
- medium bez surowicy
- medium z podwójnym stężeniem surowicy

*Procedura:*

1. Wysterylizować w autoklawie 6 g metylcelulozy w kolbie Erlenmeyera o pojemności 1 L (z mieszadłem magnetycznym).
2. Ogrzać 250 ml medium (bez surowicy) do 60°C i dodać je do sterylnej metylcelulozy.
3. Mieszać na mieszadle magnetycznym przez 20 min – medium powinno zrobić się przejrzyste.
4. Dodać 250 ml medium z podwójnym stężeniem surowicy i mieszać w temperaturze 4°C przez co najmniej 1 godzinę (lepiej robić to przez noc) – medium powinno być przejrzyste.
5. Rozporcjować medium z pkt. 4 po 50 ml do sterylnych probówek do wirowania i zwirować 1.5 h, 10 000g, 4°C.
6. Zebrać czysty supernatant do 50 ml probówek. Jest to tzw. 100% metylceluloza. Można ją przechowywać w lodówce przez kilka miesięcy.

## **II. Przygotowanie kolagenu**

*Potrzebne materiały i odczynniki:*

- ogony z dwóch dorosłych, zdrowych szczurów
- etanol (70%)
- kwas octowy

- woda destylowana

*Procedura:*

1. Przygotować 2 zlewki po 500 ml etanolu (70%)
2. Przygotować butelkę z 250 ml kwasu octowego rozpuszczonego w wodzie destylowanej, w proporcji 1 : 1000. Roztwór musi być sterylny.
3. Włożyć ogony szczurów do 500 ml etanolu 70% na 10-15 minut w temperaturze pokojowej.
4. Wyciągnąć ogony z etanolu, usunąć skórę i naczynia krwionośne. Zebrać ścięgna (biała, opalizująca tkanka)
5. Umieścić ścięgna na dużej szalce Petriego i zalać świeżym etanolem (70%) na 10-20 min w temperaturze pokojowej.
6. Przełożyć ścięgna na nową, sterylną i suchą szalkę Petriego i suszyć pod laminarem przez godzinę.
7. Włożyć wysuszone ścięgna do butelki z 250 ml kwasu octowego, zamknąć szczelnie i trzymać w lodówce przez 48 h.
8. Rozporcjować powstały roztwór kolagenu do sterylnych probówek do wirowania i wirować (1 h, 4°C, 20 000g).
9. Zebrać supernatant do sterylnych probówek. Musi być absolutnie czysty. Można go również dodatkowo przefiltrować używając filtrów o średnicy porów 0.2 µm. Otrzymany roztwór to kolagen do doświadczeń. Może być przechowywany w lodówce przez kilka miesięcy.

### **III. Formowanie sferek**

*Potrzebne materiały i odczynniki:*

- 100% metylceluloza
- medium dla komórek śródbłonna
- trypsyna
- PBS
- konfluentna hodowla komórek śródbłonna w butelce 75 cm<sup>2</sup>
- płytki hodowlane U-kształtne przeznaczone do hodowli komórek nieprzylegających

*Procedura:*

1. Przenieść 10 ml 100% metylcelulozy do probówki o pojemności 50 ml.
2. Dodać 40 ml medium i dokładnie wymieszać, unikając bąbli powietrza. Otrzymany roztwór to robocza metylceluloza.
3. Podgrzać roboczą metylcelulozę do 37°C.
4. Strypsynizować komórki śródbłonna rosnące w butelce 75 cm<sup>2</sup>.

5. Zawiesić strypsyzynizowane komórki w 10 ml roboczej metylcelulozy.
6. Pobrać 1 ml komórek w metylcelulozie i przenieść do nowej probówki z 40 ml roboczej metylcelulozy (lub przygotować zawiesinę komórek o stężeniu 7500 komórek/ml).
7. Wysiać zawiesinę komórek na płytce hodowlanej (po 100  $\mu$ l na dołek). Jedna płytka pozwala na przygotowanie dwóch hodowli sferoidalnych w kolagenie.
8. Inkubować przez noc (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). W każdym dołku powstanie jedna sferka – agregat złożony z około 750 komórek śródbłonka. Sferki są bardzo stabilne i nie rozpadają się podczas pipetowania lub wirowania.

#### **IV. Zatapianie sferek w kolagenie.**

##### *Potrzebne odczynniki:*

- płytki z przygotowanymi sferkami
- płytka 24-dołkowa
- płodowa surowica bydlęca (FCS)
- 100% metylceluloza
- kolagen (cały czas w lodzie)
- końcówki na 200 ml, przycięte nożyczkami do ok. 2/3 długości (sterylne)
- medium (z czerwienią fenolową) stężone 10x
- NaOH 1 N
- medium hodowlane dla komórek śródbłonka

##### *Procedura:*

1. Przygotować płytkę 24-dołkową: dodać do dołków sąsiadujących z dołkami w których planowany jest eksperyment po 1 ml PBS a następnie ogrzać płytkę w cieplarni do 37°C, najlepiej umieszczając ją dodatkowo na butelce z ciepłą wodą.
2. Wymieszać w próbówce 1.5 ml FCS i 3.5 ml 100% metylcelulozy (ta ilość wystarczy na 10 dołków z kolagenem).
3. Przygotować probówki o objętości 15 ml (1 probówka na jeden planowany dołek z kolagenem).
4. Zebrać sferki z płytek (pół płytki na 1 probówkę).
5. Zwirować probówki ze sferkami (500 rpm, 3 min, temperatura pokojowa).
6. Usunąć delikatnie supernatant (sferki zostaną na dnie probówki)
7. Dodać do probówek ze sferkami po 500  $\mu$ l 100% metylcelulozy z FCS i delikatnie wymieszać
8. Przygotować kolagen (trzeba pracować szybko):
  - delikatnie wymieszać 500  $\mu$ l medium 10 x stężonego i 4.5 ml kolagenu (na lodzie); roztwór będzie żółty
  - dodawać po kropli NaOH, za każdym razem mieszając delikatnie (wstrząsając probówką, nie pipetując!), do momentu, kiedy roztwór przybierze kolor właściwy dla medium hodowlanego; roztwór powinien być cały czas na lodzie
9. Wyciągnąć płytkę 24-dołkową z cieplarki, najlepiej trzymając ją cały czas na butelce z ogrzaną wodą.
10. Dodać delikatnie 500  $\mu$ l przygotowanego kolagenu (z pkt. 8) do probówki z zawiesiną sferek w metylcelulozie i natychmiast przenieść całość do dołka w przygotowanej płytce. Czynność powtórzyć dla wszystkich probówek.
11. Inkubować w cieplarni (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) przez 30 min. Kolagen powinien zżelifikować.
12. Dodać delikatnie 200  $\mu$ l medium hodowlanego. Dodać badany związek (np. VEGF).

13. Inkubować 24 h-72 h. Ze sferek będą wyrastać mikronaczynia. Ich długość i liczba są miarą aktywności angiogennej.

**Dodatkowe informacje:**

Alicja Józkowicz  
Zakład Biotechnologii Medycznej  
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii  
Uniwersytet Jagielloński

tel. 012-664-6411

email: [alicja.jozkowicz@uj.edu.pl](mailto:alicja.jozkowicz@uj.edu.pl)

**Bardzo proszę o cytowanie pracy:**

Korff, T., Augustin, H.G. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol.* 143:1341. 1998.