

**PREPARAZIONE DELLE COLTURE DI CELLULE UMANE EPITELIALI BRONCHIALI (ATCC-PCS-301-010), ENDOTELIALI (ATCC-PCS-100-011) E MESOTELIALI (ATCC-CRL-9444) PER IL TRATTAMENTO CON IPEROSSIGENO LIQUIDO**

**Diario di laboratorio cellulare aggiornato al 15/03/2022**

**Giorno 21/02/2022**

- preparazione del mezzo di crescita.

Mezzo per le cellule epiteliali bronchiali utilizzo del kit "Bronchial Epithelial Cell Growth".

Aggiunta in 500 ml di airway epithelial cell basal medium di :

L-Glutamine 15 ml  
Extract-P 2 ml  
HLL Supplement 1,25 ml  
Airway Epithelial Cell Supplement 5 ml  
Streptomicina/Penicillina 5 ml  
Anfotericina B 8 ml

Mezzo vascolare per le cellule endoteliali e mesoteliali utilizzo del kit "Endothelial Cell Growth BBE".

Aggiunta in 500 ml di vascular cell basal medium di:

Ascorbic Acid 0,5 ml  
FBS 10 ml  
rhEGF 0,5 ml  
Heparin Sulfate 0,5 ml  
L-Glutamine 25 ml  
Hydrocortisone 0,5 ml  
Bovine Brain Extract 1 ml  
Streptomicina/Penicillina 5 ml  
Anfotericina B 8 ml

- Preparazione delle cellule.

Una volta prelevate le cellule (congelate) sono state messe in incubatore per circa 10 minuti (fase di scongelamento); le cellule prelevate dalle wells sono state messe in delle eppendorf secondo il seguente rapporto: 1 ml (contenuto delle wells >  $5 \times 10^5$  cellule) e 2 ml di mezzo di crescita. Le eppendorf sono state poi centrifugate a 1000 rcp per 10 minuti senza freno e accelerazione. Eliminato il surnatante (contenente etanolo; non adeguato alla crescita cellulare) il pellet cellulare è stato risospeso in 20 ml del corrispettivo mezzo e suddiviso in due Tissue Culture Dish da 100 x 20 mm (10 ml di mezzo più cellule in ogni dish); e in fine messe in incubatore.

La procedura è stata ripetuta per tutte e tre le linee cellulari.

**Giorno 22/02/2022**

- Controllo delle cellule.

Al controllo le cellule appaiono aumentate di numero e adese; alcune rimangono ancora in sospensione. Le cellule epiteliali bronchiali risultano adese di meno rispetto alle precedenti e di poco aumentate di numero.

La morfologia cellulare di ogni linea cellulare è rimasta invariata.

In ogni dish è stato aggiunto 1,5 ml di mezzo di crescita delle rispettive cellule.

**Giorno 24/02/2022**

- Controllo delle cellule.

Al controllo odierno le cellule risultano aumentate di numero con morfologia ancora invariata e maggiormente adese alla piastra; le epiteliali bronchiali leggermente aumentate ma una notevole quantità di cellule risulta in sospensione.

Si è proceduto al cambio mezzo; rimosso il mezzo di entrambe le dish (per ogni linea) e trasferito in una terza dish contenente ora 20 ml di mezzo di crescita. In ogni dish è stato aggiunto 8 ml del corrispondente mezzo di crescita.

### **Giorno 26/02/2022**

- controllo cellule e loro processazione.

Al controllo odierno le cellule risultano essere ancora troppo distanziate le une dalle altre senza cambiamenti morfologici; per tali motivi si è deciso di aumentare la concentrazione cellulare al fine di ridurre la distanza intercellulare e favorire il contatto cellulare e dunque la loro attivazione.

Si è proceduto nel seguente modo:

- il mezzo di crescita è stato prelevato ( da una delle due dish processate giorno 21/02/2022 e dalla dish contenente il mezzo di giorno 24/02/2022) e trasferito in una eppendorf e centrifugato a 1000 rcf per 10 minuti senza freno e accelerazione;
- In ogni dish ( quella processata giorno 21/02/2022 in qui è stato prelevato il mezzo e quella contenente il mezzo di giorno 24/02/2022) è stato aggiunto 1 ml di Tripsina, le dish sono state riposte in incubatore per 5 minuti;
- Dopo 5 minuti al controllo microscopico si è evidenziato il distacco delle cellule per cui si è trasferito il contenuto delle dish in delle eppendorf e centrifugate a 1000 rcf per 10 minuti senza freno e accelerazione;
- Il surnatante è stato eliminato e per essere sicuri di aver eliminato tutta la tripsina presente è stato effettuato un secondo passaggio ( solo nell'eppendorf che conteneva la tripsina): aggiunta di 100 µl di siero (FBS) nel quale le cellule sono state risospese e ricentrifugate a 1000 rcf per 5 minuti senza freno e accelerazione.
- Una volta ottenuto i pellet cellulari ( due pellet: uno proveniente dal mezzo di crescita e un altro ottenuto dalla processazione del distacco cellulare per via enzimatica ) sono stati riuniti e le cellule risospese in 50 µl di mezzo specifico e 50 µl di siero (FBS).
- Le cellule risospese sono state seminate nella dish restante ( processata giorno 21/02/2022).

La procedura è stata effettuata per tutte e tre le linee cellulari.

A fine procedura il controllo microscopico ha evidenziato un maggior numero di cellule.

### **Giorno 28/02/2022**

- Controllo cellulare dove si evidenzia adesione cellulare incompleta. Morfologia invariata.

### **Giorno 03/03/2022**

- Controllo cellulare. Dopo il controllo si è deciso di procedere nel seguente modo per cercare di aumentare la concentrazione cellulare.

- Prelevato il mezzo di crescita dalle colture e centrifugato a 18° a 1000 rpm per 10 minuti senza freno e accelerazione;
- Le cellule adese sono state trattate con 1 ml di tripsina per 10 minuti in incubatore; al controllo microscopico si è evidenziato una quantità elevata di cellule ancora adese per cui si è deciso di procedere al loro distacco meccanicamente mediante procedura cell scraping;
- Il contenuto è stato messo in un'eppendorf e centrifugata (sempre alla stessa impostazione) il surnatante è stato eliminato e per ridurre al minimo il rischio di contaminazione con la tripsina (tossica per le cellule) si è proceduto a un lavaggio con mezzo e 50 µl di siero (risospendendo le cellule in tale soluzione);
- Si è proceduto a una nuova centrifuga (stessa impostazione); eliminato il surnatante il pellet cellulare (unito al corrispettivo pellet del mezzo di crescita precedentemente centrifugato) è stato risospeso in 3 ml di mezzo di crescita e inseminato in maniera omogenea nelle nuove piastre di petri ( precedentemente in ogni piastra di petri sono stati messi 5 ml di solo mezzo di crescita con aggiunta di 50 µl di siero, in tal modo otteniamo alla fine un totale di circa 8 ml di mezzo);
- Tale procedura è stata ripetuta per tutte e tre le linee cellulari.

## **Giorno 07/03/2022**

- Controllo cellule; aumentate di numero senza cambio della morfologia.

## **Giorno 11/03/2022**

- Controllo cellule e cambio.
  - Prelevato il mezzo della dish e messo in un'ependorf data l'estrema adesione cellulare si è deciso di effettuare il distacco direttamente tramite tecnica cell scraping (utilizzando per il distacco mezzo nuovo e aggiungendolo alla corrispondente eppendorf realizzata precedentemente);
  - Messe in centrifuga a 18°C a 1000 rpm per 10 minuti senza freno e accelerazione;
  - Al termine della centrifuga si è proceduto alla eliminazione del surnatante e risospensione del pellet cellulare in 3 ml di mezzo di crescita;
  - La sospensione cellulare è stata disseminata omogeneamente in nuove piastre di petri contenente 5 ml di mezzo (totale 8 ml);
  - La procedura è stata ripetuta per tutte e tre le colture cellulari.

## **15/03/2022**

- Al controllo odierno le cellule risultano parzialmente adese. Le cellule mesoteliali sono quelle più adese rispetto alle altre colture, le epiteliali bronchiali quasi tutte in sospensione, la coltura endoteliale è quella che presenta un numero inferiore di cellule.  
Si è proceduto al loro cambio:
  - Raccolto il mezzo di coltura e trasferito in un'ependorf;
  - Poiché le cellule risultano poco adese si è proceduto al loro distacco chimicamente mediante l'uso di 2,5 ml di tripsina per 8 minuti in incubatore;
  - Al controllo microscopico si è evidenziato un totale distacco cellulare; tale soluzione è stata trasferita nella corrispondente eppendorf contenente il mezzo raccolto;
  - Messe in centrifuga a 18°C a 1000 rpm per 10 minuti senza freno e accelerazione;
  - Al termine della centrifuga si è proceduto alla eliminazione del surnatante e risospensione del pellet in 5 ml del loro mezzo di crescita;
  - Il mezzo con le cellule risospese è stato trasferito in flask (invece che piastre petri) con altri 5 ml di mezzo Malara (totale 10ml);
  - La procedura è stata ripetuta per tutte e tre le colture cellulari.