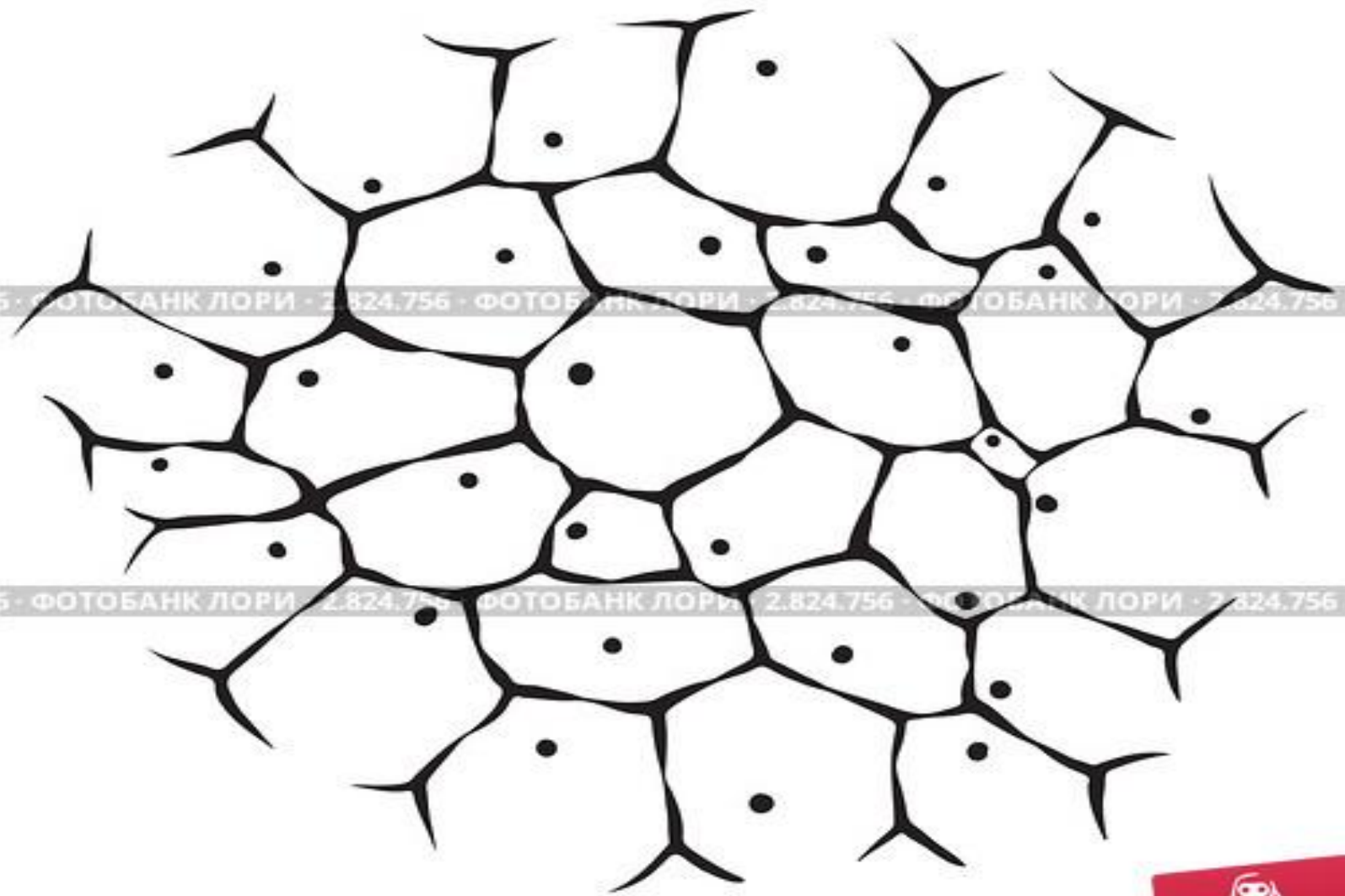


Ткани  
организмов.  
Культивирование  
тканей



Клетки живой ткани - иллюстрация

© pzAxe / Фотобанк Лори



lori.ru / 2.824.756

# ТКАНИ РАСТЕНИЙ

Название	Образовательные	Покровные	Основные	Проводящие	Механические
Функции	Рост, образование всех остальных тканей	Защита, связь растения с внешней средой	Образование и накопление питательных веществ	Транспорт воды, минеральных и органических веществ	Опора
Особенности строения	Клетки живые, мелкие, тонкостенные, с крупным ядром, вакуоли мелкие или отсутствуют	Клетки живые или мертвые, плотно прилегают друг к другу	Клетки живые, крупные, неправильной формы, расположены рыхло, вакуоли есть	Сосуды — мертвые клетки вытянутой формы, с утолщенными оболочками; ситовидные трубки — живые клетки вытянутой формы, без ядра, вакуолей и пластид	Клетки живые и мертвые, с утолщенными и одревесневшими оболочками; каменные клетки
Место-расположение	На верхушке побега, в почках, около кончика корня; камбий	Кожица (с устьицами), пробка (с чечевичками)	Мякоть листьев, стеблей и корней	Древесина (сосуды), луб (ситовидные трубки и клетки-спутницы)	Механические волокна сопровождают проводящую ткань; тяжи вдоль стебля и корня

# Основные условия культивирования клеток и тканей

Для производства, получения и хранения культур клеток и тканей необходимы стерильные помещения, широкий ассортимент солевых р-ров, питательных сред и антибиотиков. Кроме того, требуется следующее оборудование: стерильные боксы с ультрафиолетовым облучением и установками с ламинарным потоком стерильного воздуха; микроскопы — инвертированные для просмотра культур и обычные для анализа препаратов; центрифуги; термостаты с водяным обогревом и с контролируемой подачей CO<sub>2</sub>; рефрижераторы для хранения сред, антибиотиков, сывороток, ферментов; установки для замораживания и емкости с жидким азотом для хранения клеточных линий; магнитные мешалки; резиновые пробки, трубки, наконечники; посуда из нейтрального стекла типа «Пирекс». Посуду кипятят в специальных детергентах, многократно прополаскивают дист. водой, стерилизуют сухим жаром или автоклавированием. Используемые биол. жидкости стерилизуют фильтрованием под давлением через мембранные фильтры с размером пор 220 нм после предфильтрования через глубинные фильтры (из асбеста или стеклянного волокна).

Кроме традиционного оборудования, современная культуральная лаборатория использует микрополычашки (пластиковые панели с углублениями) с набором автоматических микропипеток и микродозиметров, роллерные и суспензионные установки. Желательно применение пластиковой посуды одноразового пользования.

При поддержании жизнедеятельности клеток *in vitro* важное значение имеют осмотическое давление, концентрация ионов водорода (рН) и ряд других неорганических ионов, состав газовой среды, температура. Осмотическое давление в клетках млекопитающих составляет при  $t^{\circ} 38^{\circ}$  ок. 7,6 атм, и его необходимо поддерживать в культуральной среде. Осмотическое давление в питательных средах создается гл. обр. концентрацией хлорида натрия. Определенную роль играют другие неорганические ионы и глюкоза. Высокомолекулярные соединения мало влияют на величину осмотического давления.



Кроме традиционного оборудования, современная культуральная лаборатория использует микрополичашки (пластиковые панели с углублениями) с набором автоматических микропипеток и микродозиметров, роллерные и суспензионные установки. Желательно применение пластиковой посуды одноразового пользования.

При поддержании жизнедеятельности клеток *in vitro* важное значение имеют осмотическое давление, концентрация ионов водорода (рН) и ряд других неорганических ионов, состав газовой среды, температура. Осмотическое давление в клетках млекопитающих составляет при  $t^{\circ} 38^{\circ}$  ок. 7,6 атм, и его необходимо поддерживать в культуральной среде. Осмотическое давление в питательных средах создается гл. обр. концентрацией хлорида натрия. Определенную роль играют другие неорганические ионы и глюкоза. Высокомолекулярные соединения мало влияют на величину осмотического давления.

Оптимальная концентрация ионов водорода, т. е. рН среды, для роста большинства клеток близка к нейтральным значениям. Для роста диплоидных фибробластов необходимо поддерживать рН в пределах 7,2 — 7,4. Большинство клеток, особенно постоянные клеточные линии, т. е. пересеваемые линии, выдерживают рН от 6,8 до 7,6. Величина рН в культуральной среде зависит от соотношения Гидрокарбонат натрия является частью сбалансированного солевого р-ра питательной среды,  $\text{CO}_2$  образуется в результате дыхания клеток. При культивировании в закрытых сосудах, в случае низкой начальной концентрации клеток, уровень рН сдвигается резко в щелочную сторону, что сказывается на жизнеспособности клеток. Этого можно избежать, вдувая во флаконы  $\text{CO}_2$  сразу после посева. Предпочтительно культивирование в открытых сосудах, в термостатах с контролируемой подачей  $\text{CO}_2$  (5 — 10%  $\text{CO}_2$  и 95—90% воздуха). Производятся среды с большой буферной емкостью на основе фосфатного буфера, Tris или HEPES (оксиметил-аминометан и N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-этансульфоновая к-та).

Для постоянного контроля за уровнем pH в состав ростовых сред вводят индикатор pH, в качестве которого часто применяют фенол-красный или фенол-сульфонталеин. Эти вещества не токсичны для клеток в концентрации до 0,002 г/л.

Для поддержания жизнедеятельности клеток и тканей *in vitro* необходимы ионы натрия, кальция, магния, железа, которые не только участвуют в поддержании постоянства осмотического давления, но необходимы для функционирования ряда клеточных ферментов. Существенна также и достаточная концентрация кислорода, которая в закрытых сосудах обеспечивается определенными отношениями объема воздуха и объема среды.



# Культуры растущих тканей

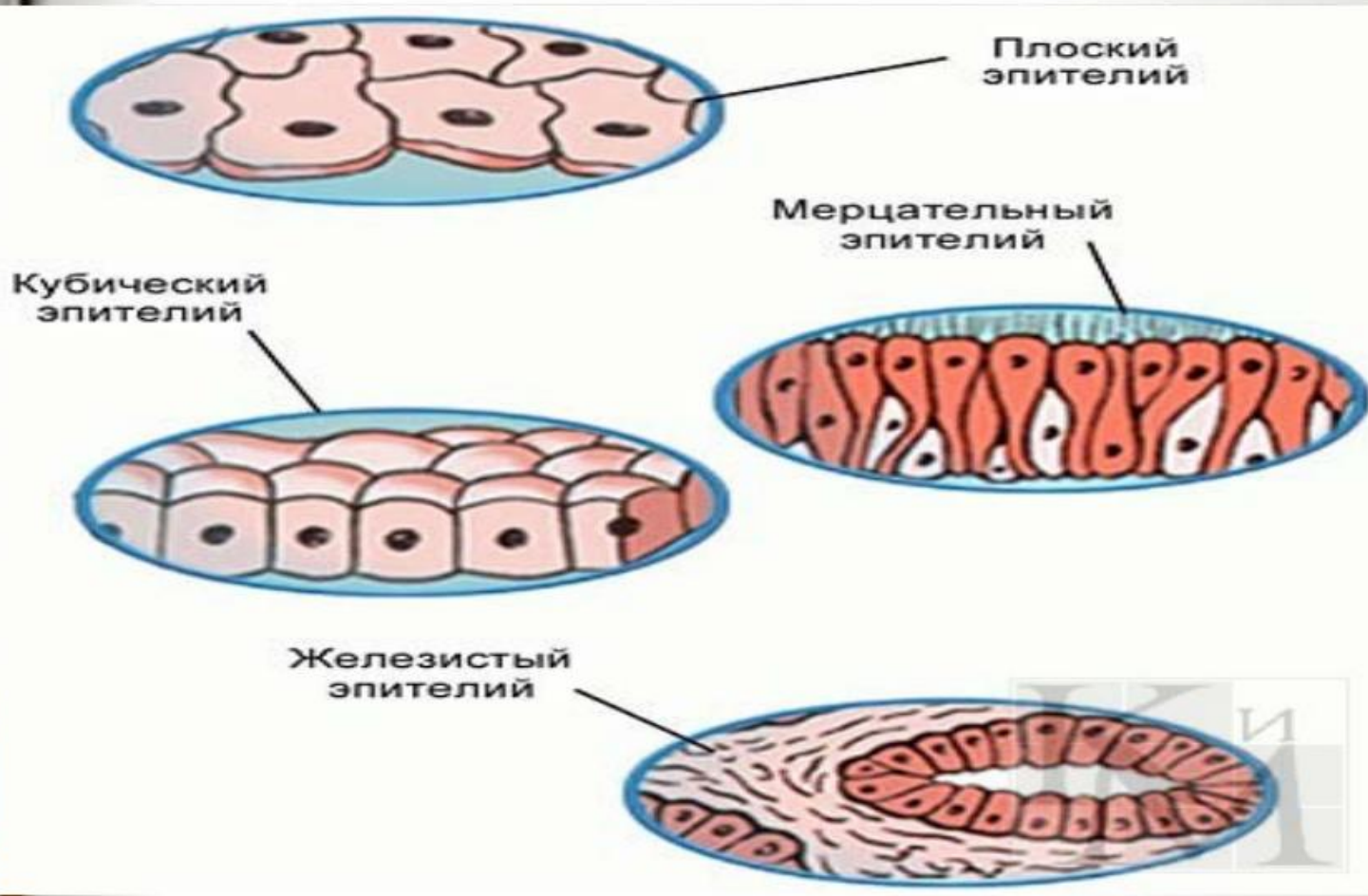
- Получение культур тканей основано на первичной эксплантации растущих тканей, изолированных непосредственно из организма. К основной группе методов относятся те, в которых используются предметные стекла с лунками, флаконы Карреля, а также пробирки и перфузионные камеры.
- Эксплантацию небольших кусочков ткани для морфол, исследований в сочетании с микрокиносъемкой проводят на предметном стекле, к-рое потом накрывают специальным покровным стеклом и заклеивают. Более известны модификации этого метода: эксплантация на одинарное покровное стекло со сгустком плазмы, к-рое помещают над лункой предметного стекла (Гаррисон); метод Максимова с двойным покровным стеклом; метод культивирования в капле среды на покровном стекле [Льюис и Льюис (W. Lewis, M. Lewis)]. Методы культивирования К. к. и т. на стеклах удобны для кратковременных исследований, т. к. длительное ведение связано с необходимостью сложной замены питательной среды. Культуры на покровных стеклах можно пересевать. Для этого эксплантат рассекают на кусочки и переносят на новые покровные стекла. Каждый кусочек обрабатывают затем, как новый эксплантат.

- Более длительное культивирование эксплантатов возможно в сгустке плазмы во флаконах Карреля [Эрл (W. R. Earle)]. Метод используют при формировании линий и штаммов клеток. Для этой цели во флаконы Карреля помещают каплю смеси плазмы и эмбрионального экстракта, к-рую распределяют по дну флакона, помещают кусочки ткани в плазму и дают образоваться сгустку, а затем приливают питательную среду. Ткань можно переносить из сосуда в сосуд, нарезаая кусочками или трипсинизируя ткань и сгусток, как в случае получения первично трипсинизированных культур.
- Культивирование в сгустке плазмы в неподвижной или вращающейся пробирке, метод «летающих стекол» близки к культивированию во флаконах Карреля. Эксплантаты можно укреплять на стенках пробирки или на узких покровных стеклах, которые помещают в пробирки с питательной средой. Пробирки можно поместить в наклонном положении во вращающийся барабан для лучшего контакта эксплантата со средой. Метод «летающих стекол» получил широкое применение для исследования большого числа эксплантатов

□ Вместо сгустка плазмы можно использовать подложки: коллагеновые, лавсановые (для дальнейших электронно-микроскопических исследований), пластиковые, агаровые, из пористой бумаги, ацетатцеллюлозы. Можно эксплантировать ткань и непосредственно на стекле, в частности при эксплантации кусочков кожи, макрофагов и других клеток, способных прикрепляться к стеклу. Задачей метода органных культур является создание условий культивирования, максимально близких к условиям *in vivo*. Основным принципом метода состоит в том, что эксплантат помещают на границе двух фаз — питательная среда/газовая смесь. Существует несколько вариантов поддержания органных культур: культивирование на поверхности плазменного сгустка, на часовом стекле в чашке Петри [Фелл (H. Fell)] — классическая техника, являющаяся основой современных методов; культивирование в мягком (полутвердом) агаре, насыщенном питательной средой, эмбриональным экстрактом, сывороткой; культивирование на металлических (тантал или нержавеющая сталь) сетках, покрытых агаром

□ [Троуэлл (O. Trowell)], нижняя поверхность которых касается жидкой питательной среды; культивирование на «плоту» из ацетатцеллюлозы или папиросной бумаги [Чан (J. Chan), 1954; Рихтер (Richter), 1955]; культивирование на миллиметровых фильтрах [Гробштейн (C. Grobstein), 1955]. Для создания оптимальных условий культуры инкубируют в газовой смеси, состоящей из 95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub> с ежедневной сменой питательной среды. Широкое распространение в технике тканевых и органных культур имеют перфузионные камеры, позволяющие прижизненно изучать процессы развития.

# Эпителиальная ткань





# Культура тканей

- Выращивание из отдельных клеток культур тканей (например, женьшеня), которые продуцируют лекарственные вещества, как и целое растение.

