

## ДЕФОРМАЦИЯ ТКАНЕЙ В ХОДЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССИНГА. II. ДЕЙСТВИЕ ФОРМАЛЬДЕГИДА И СПИРТСОДЕРЖАЩИХ ФИКСАТОРОВ НА АПИКАЛЬНУЮ ЧАСТЬ КОРНЕЙ ЛУКА

© А. Ю. Буданцев,<sup>1</sup> А. Ю. Демьянов

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, 142290;

<sup>1</sup>электронный адрес: budantsev@mail.ru

Фиксаторы Боуэна, Кларка, Карнуа и формалин приводят к продольной, поперечной и объемной деформации (сжатию) апикальной части корня *Allium cepa*. Продольная деформация (6—14 %) наиболее сильно проявляется в первые минуты фиксации, кроме фиксатора Боуэна: деформация (7—9 %) проявляется только через 10 ч фиксации. Поперечная деформация наиболее сильно выражена в зоне меристемы корней по сравнению с зоной растяжения. Объемная деформация в пределах 30—40 % также отмечена в первые минуты фиксации всеми фиксаторами (кроме фиксатора Боуэна). Отмечено мацерирующее действие фиксатора Боуэна на апексы корней, что затрудняет измерение поперечной деформации. Полученные данные свидетельствуют о деформации клеток и межклеточных структур апикальной части корня лука при химической фиксации. Представлена количественная оценка указанных деформаций.

Ключевые слова: химическая фиксация, апикальная часть корня, деформации при фиксации, формалин, фиксаторы Боуэна, Кларка и Карнуа.

Химическая фиксация используется в гистологии для остановки биохимических процессов в клетках нативной ткани с сохранением прижизненной морфологической структуры клеток и межклеточных структур. Фиксация является первой операцией гистологического процессинга — технологии приготовления препаратов для микроскопического анализа клеток и тканей.

Большинство химических фиксаторов представляет собой смеси, в состав которых входят различные химически активные соединения — альдегиды, кислоты, соли неорганических и органических кислот, органические растворители, буферные системы и др.

Деформации тканей, возникающие внутри ткани при действии химических фиксаторов, обусловлены денатурацией и коагуляцией белков и других биохимических субстратов, осмотическими силами, изменением зарядов и др. Кроме этого, химическая фиксация приводит к экстракции соединений, разрушению некоторых органелл и образованию новых химических продуктов (Левитский, 1931, 1976; Ромейс, 1954; Навашин, Герасимова-Навашина, 1958; Дженсен, 1965; Хиллман, 1975; O'Brien, McCully, 1981; Srinivasan et al., 2002; Барыкина и др., 2004; Буданцев, 2015, и др.).

Многочисленные наблюдения показывают, что химическая фиксация сопровождается появлением разных артефактов, в том числе в виде деформаций — сжатия и набухания клеток.

В данной работе приведены результаты анализа деформаций тканей апикальной части корешков лука *Allium cepa* в процессе действия водосодержащих фиксаторов: формалина, фиксатора с пикриновой кислотой (фиксатор Боуэна) и спиртосодержащих фиксаторов — фиксатор

Кларка и Карнуа. Для анализа деформаций использованы морфометрические методы, описанные ранее (Буданцев, Демьянов, 2017).

### Материал и методика

В опытах использовали апикальные части корешков лука *Allium cepa* (сорт Штутгартер Ризен). Луковицы лука-севка диаметром 1.0—1.5 см проращивали на водопроводной воде в течение 3—4 сут при комнатной температуре в темноте (длина корешков достигала 3—5 см). Апикальную часть корешков длиной 2.5—3.0 мм отрезали и переносили в кювету, содержащую 2 мл водопроводной воды (диаметр кюветы 3 см, высота 1.5 см, в одну кювету помещали 8—10 образцов ткани). Сразу после помещения в кювету образцы ткани фотографировали цифровым фотоаппаратом Олимпус-330 на стереомикроскопе МБС-10 (для калибровки размеров корешков отдельно фотографировали объект-микрометр проходящего света). Затем воду из кюветы отсасывали водоструйным насосом и кювету заполняли фиксатором (2 мл).

В работе использовали следующие фиксаторы: 4%-ный формалин, забуференный фосфатным буфером, рН 7.0; фиксатор Боуэна (пикриновая кислота + формалин (40 %) + ледяная уксусная кислота в соотношении 16 : 5 : 1 v/v); фиксатор Кларка (96%-ный этиловый спирт + ледяная уксусная кислота, в соотношении 1 : 3 v/v) и фиксатор Карнуа (96%-ный этиловый спирт + хлороформ + ледяная уксусная кислота в соотношении 6 : 3 : 1 v/v) (4%-ный забуференный формалин, этанол, хлороформ и ледяная уксусная кислота производства фирмы Sigma).

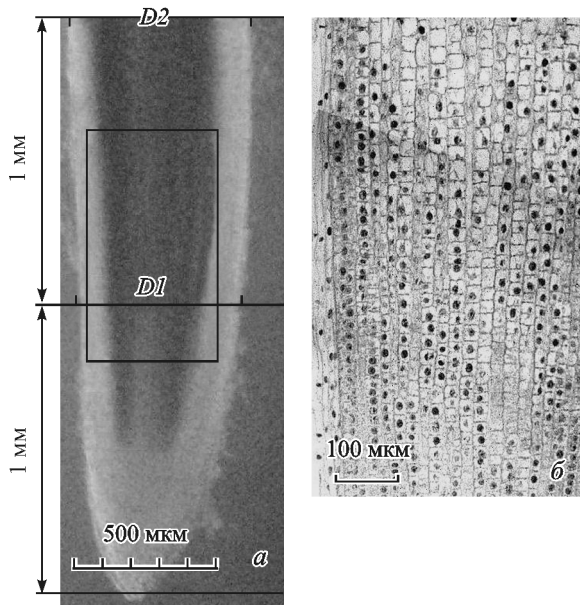


Рис. 1. Схема измерения диаметров  $D1$  и  $D2$ .

$a$  — апикальная часть корня лука в контроле (нижняя часть — «зона чехлика и меристемы», верхняя часть — «зона растяжения»);  $b$  — клеточное строение фрагмента апекса, отмеченного прямоугольной рамкой (окраска кислым кармином).

Время отсоса и заполнения кюветы фиксатором составляло 20–30 с. В случае, когда образцы тканей содержали пузырьки воздуха и плавали на поверхности воды, кюветы помещали в специальную вакуумную камеру и выдерживали при остаточном давлении 200–300 мм рт. ст. в течение 2–3 мин. На цифровых изображениях апекса корней в контроле и при фиксации разной продолжительности (3–5 мин, 2, 6, 10, 24 и 48 ч) измеряли общую длину апексов корней ( $L$ ), площадь профиля ( $AP$ ) и длину его периметра ( $LP$ ), объем ( $V$ ) и площадь поверхности ( $AS$ ). На основе измеренных параметров рассчитывали коэффициенты продольного, попереч-

ного и объемного сжатия (см.: Буданцев, Демьянов, 2017).

Анализ цифровых изображений и статистический анализ результатов проводили при помощи программ AnalySis 5.0 (Olympus Soft Image System), 3d Studio Max v.5 (Autodesk) и Statistica 6.0 (StatSoft Inc.USA).

На рис. 1 представлена схема положения измеряемых параметров корня — диаметры  $D1$  и  $D2$ . Нижний отрезок корня (1 мм) мы условно обозначили как «зона чехлика и меристемы», а верхний (1 мм) — как «зона растяжения» (Jensen, Kavaljian, 1958).

## Результаты

Формалин. Длина корней уменьшалась в первые 3–5 мин фиксации в формалине, затем уменьшение медленно продолжалось до 86–87 % от первоначальной длины корня. Диаметр нижней части апекса корня («зона чехлика и меристемы»  $D1$ ) изменялся более сильно по сравнению с верхней частью образца корня («зона растяжения»  $D2$ ) (табл. 1).

Резкое изменение площади профиля изображения корешков ( $AP$ ) и длины периметра ( $LP$ ) происходят в первые минуты фиксации, затем наблюдается постепенное уменьшение указанных параметров в течение последующих часов фиксации (табл. 2).

При действии формалина наблюдали значительное изменение объемов корней и площади их поверхности (табл. 3). В первые минуты фиксации сильное сжатие корешков достигает ~30 % от первоначального объема, в последующие часы фиксации значения объема и площади поверхности практически не изменяются.

Фиксатор Боуэна. Измерение продольной деформации показало отсутствие достоверного сжатия или набухания апикальной части корешков в начале фиксации. Только через 10 ч фиксации отмечено достоверное продольное сжатие на 7–8 % от исходной длины апексов. Можно отметить частичную мацерацию и отслаивание поверхностных слоев корешков (рис. 2), что затрудняет

Таблица 1

Результаты измерений длины ( $L$ ) и диаметров ( $D2$  и  $D1$ ) корней в контроле (вода) и в формалине ( $\Phi$ )

Вариант опыта	$L$ , мм	$\varepsilon$	$D2$ , мм	$\beta_2$	$ \mu $	$D1$ , мм	$\beta_1$	$ \mu $
Вода	$2.29 \pm 0.04$ (9)		$0.62 \pm 0.01$ (9)			$0.63 \pm 0.01$ (9)		
$\Phi$ , 3–5 мин	$2.14 \pm 0.05$ (10)	–0.065	$0.59 \pm 0.01$ (10)	–0.048	0.738	$0.59 \pm 0.01$ (10)	–0.063	0.926
$\Phi$ , 2 ч	$2.05 \pm 0.05$ (9)	–0.105	$0.57 \pm 0.01$ (9)	–0.081	0.771	$0.57 \pm 0.01$ (9)	–0.095	0.905
$\Phi$ , 6 ч	$1.99 \pm 0.05$ (9)	–0.131	$0.54 \pm 0.01$ (9)	–0.129	0.985	$0.52 \pm 0.02$ (9)	–0.175	1.336
$\Phi$ , 10 ч	$2.01 \pm 0.05$ (9)	–0.122	$0.54 \pm 0.01$ (9)	–0.129	1.057	$0.52 \pm 0.02$ (9)	–0.175	1.434
$\Phi$ , 24 ч	$2.00 \pm 0.05$ (9)	–0.127	$0.55 \pm 0.01$ (9)	–0.113	0.890	$0.53 \pm 0.01$ (9)	–0.159	1.252
$\Phi$ , 48 ч	$1.96 \pm 0.04$ (10)	–0.144	$0.56 \pm 0.01$ (10)	–0.097	0.674	$0.54 \pm 0.01$ (10)	–0.143	0.993

Примечание. Различия с контролем во всех случаях достоверны для  $p < 0.05$ ; в скобках указано число исследованных образцов;  $\varepsilon$  — коэффициент относительного продольного сжатия;  $\beta$  — коэффициент относительного поперечного сжатия;  $|\mu|$  — коэффициент Пуассона (см.: Буданцев, Демьянов, 2017).

Таблица 2

**Результаты измерений периметра контура корней ( $LP$ ) и площади контура корней ( $AP$ ) в контроле (вода) и в формалине**

Вариант опыта	$LP$ , мм	%	$AP$ , мм <sup>2</sup>	%
Контроль	$1.30 \pm 0.03$ (9)	100	$6.28 \pm 0.15$ (9)	100
Формалин, 3—5 мин	$1.13 \pm 0.03$ (10)	86.92	$5.60 \pm 0.10$ (10)	89.17
Формалин, 2 ч	$1.07 \pm 0.02$ (9)	82.31	$5.37 \pm 0.10$ (9)	85.51
Формалин, 6 ч	$0.97 \pm 0.02$ (9)	74.61	$5.03 \pm 0.10$ (9)	80.09
Формалин, 10 ч	$1.00 \pm 0.02$ (9)	76.92	$5.20 \pm 0.12$ (9)	82.80
Формалин, 24 ч	$0.98 \pm 0.02$ (9)	75.38	$5.30 \pm 0.12$ (9)	84.39
Формалин, 48 ч	$1.01 \pm 0.02$ (10)	77.69	$5.05 \pm 0.08$ (10)	80.41

Примечание. Различия с контролем во всех случаях достоверны для  $p < 0.05$ ; в скобках указано число исследованных образцов.

Таблица 3

**Результаты измерений объема ( $V$ ) и площади поверхности ( $AS$ ) корней в контроле (вода) и в формалине**

Вариант опыта	$V$ , мм <sup>3</sup>	$v$	$AS$ , мм <sup>2</sup>	$\tau$	$v/\tau$
Контроль	$0.59 \pm 0.02$ (9)		$4.78 \pm 0.15$ (9)		
Формалин, 3—5 мин	$0.42 \pm 0.02$ (10)	-0.288	$3.84 \pm 0.11$ (10)	-0.197	1.462
Формалин, 2 ч	$0.42 \pm 0.02$ (9)	-0.288	$3.52 \pm 0.21$ (9)	-0.263	1.095
Формалин, 6 ч	$0.39 \pm 0.02$ (9)	-0.399	$3.39 \pm 0.13$ (9)	-0.291	1.371
Формалин, 10 ч	$0.38 \pm 0.02$ (9)	-0.356	$3.72 \pm 0.11$ (9)	-0.222	1.604
Формалин, 24 ч	$0.39 \pm 0.02$ (9)	-0.399	$3.40 \pm 0.12$ (9)	-0.289	1.381
Формалин, 48 ч	$0.42 \pm 0.02$ (10)	-0.288	$3.72 \pm 0.11$ (10)	-0.222	1.297

Примечание. Различия с контролем во всех случаях достоверны для  $p < 0.001$ ; в скобках указано число исследованных образцов;  $v$  — коэффициент относительного объемного сжатия;  $\tau$  — коэффициент относительного сжатия площади поверхности.

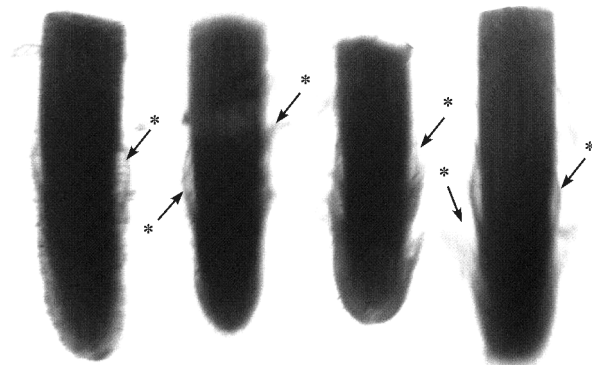


Рис. 2. Отслаивание поверхностного слоя экзодермы апекса корня в фиксаторе Боуэна (продолжительность фиксации — 2 ч).

Звездочками показаны места отслаивания.

Результаты измерений длины корней ( $L$ ), диаметров ( $D1$  и  $D2$ ) расчет величины  $\varepsilon$  в контроле (вода) и в фиксаторе Кларка

Вариант опыта	$L$ , мм	$\varepsilon$	$D2$ , мм	$\beta 1$	$ \mu $	$D1$ , мм	$\beta 2$	$ \mu $
Контроль	$2.09 \pm 0.05$ (9)		$0.63 \pm 0.01$ (9)			$0.61 \pm 0.01$ (9)		
Фиксатор, 3—5 мин	$1.96 \pm 0.04$ (10) НД	—	$0.58 \pm 0.01$ (10)	-0.079	—	$0.52 \pm 0.01$ (10)	-0.147	—
Фиксатор, 2 ч	$1.91 \pm 0.05$ (10)	-0.086	$0.59 \pm 0.01$ (10)	-0.063	0.732	$0.51 \pm 0.01$ (10)	-0.164	1.907
Фиксатор, 6 ч	$1.90 \pm 0.04$ (10)	-0.091	$0.56 \pm 0.01$ (10)	-0.110	1.459	$0.50 \pm 0.01$ (10)	-0.180	1.978
Фиксатор, 10 ч	$1.89 \pm 0.04$ (10)	-0.096	$0.56 \pm 0.01$ (10)	-0.110	1.209	$0.51 \pm 0.01$ (10)	-0.164	1.708
Фиксатор, 24 ч	$1.90 \pm 0.05$ (9)	-0.091	$0.56 \pm 0.01$ (9)	-0.110	1.459	$0.49 \pm 0.01$ (9)	-0.197	1.978
Фиксатор, 48 ч	$1.95 \pm 0.04$ (10)	-0.067	$0.57 \pm 0.01$ (10)	-0.095	1.418	$0.51 \pm 0.01$ (10)	-0.164	2.448

Примечание. НД — различия с контролем недостоверны, в остальных случаях различия с контролем достоверны для  $p < 0.05$ ; в скобках указано число исследованных образцов. Остальные обозначения в примечании к табл. 1.

получение надежных данных о диаметрах  $D1$  и  $D2$ , площади профиля корней и длине периметра, объеме и площади поверхности апексов корней.

Фиксатор Кларка. Результаты измерения продольной и поперечной деформации корешков в фиксаторе Кларка приведены в табл. 4. Поперечное сжатие в первые минуты фиксации составляет ~8 %. В последующие часы фиксации поперечное сжатие увеличивается до ~8—15 % (от исходного уровня) и наиболее выражено в «зоне меристемы». Аналогично изменяются площадь профиля изображения корней и длина периметров в течение фиксации (табл. 5). Уменьшение объема ткани при фиксации, как и в предыдущих случаях, происходит в первые мину-

ты контакта с фиксатором (~40 %), в течение последующих часов фиксации наблюдается уменьшение объемов корешков до 20—40 % от исходного значения (табл. 6).

Фиксатор Карнуа. В первые минуты фиксации наблюдается продольное сжатие на ~7 %, которое затем практически не изменяется. Поперечное сжатие слабо выражено в «зоне растяжения» (~7—8 % через 6—24 ч фиксации) и почти в 2 раза больше в «зоне чехлика и меристемы» (~11—19 %) (табл. 7). Динамика уменьшения площади профиля и длины периметра корней в ходе фиксации представлена в табл. 8. Динамика уменьшения объема корней при фиксации в смеси Карнуа почти точно совпадает с данными, полученными при фиксации в сме-

Таблица 5

Результаты измерений периметра ( $LP$ ) и площади контура корней ( $AP$ ) в контроле (вода) и в фиксаторе Кларка

Вариант опыта	$LP$ , мм	%	$AP$ , мм <sup>2</sup>	%
Контроль	$5.47 \pm 0.10$ (9)	100	$1.10 \pm 0.03$ (9)	100
Фиксатор, 3—5 мин	$5.04 \pm 0.09$ (10)	92.14	$0.91 \pm 0.02$ (10)	82.73
Фиксатор, 2 ч	$4.97 \pm 0.11$ (10)	90.86	$0.91 \pm 0.03$ (10)	82.73
Фиксатор, 6 ч	$4.84 \pm 0.09$ (10)	88.48	$0.88 \pm 0.02$ (10)	80.00
Фиксатор, 10 ч	$4.84 \pm 0.10$ (10)	88.48	$0.87 \pm 0.03$ (10)	79.09
Фиксатор, 24 ч	$4.84 \pm 0.11$ (8)	88.48	$0.86 \pm 0.02$ (8)	79.09
Фиксатор, 48 ч	$5.00 \pm 0.08$ (10)	91.41	$0.95 \pm 0.02$ (10)	86.36

Примечание. Различия с контролем во всех случаях достоверны для  $p < 0.05$ ; в скобках указано число исследованных образцов.

Таблица 6

**Результаты измерений объема (*V*) и площади поверхности (*A*) корней  
в контроле (вода) и в фиксаторе Кларка**

Вариант опыта	<i>V</i> , мм <sup>3</sup>	<i>v</i>	<i>A</i> , мм <sup>2</sup>	%
Контроль	0.44 ± 0.01 (9)		4.10 ± 0.09 (9)	100
Фиксатор, 3—5 мин	0.27 ± 0.01 (10)	0.386	3.07 ± 0.09 (10)	74.88
Фиксатор, 2 ч	0.26 ± 0.01 (10)	0.409	2.95 ± 0.09 (10)	71.95
Фиксатор, 6 ч	0.35 ± 0.02 (10)	0.204	3.61 ± 0.13 (10)	88.05
Фиксатор, 10 ч	0.28 ± 0.01 (10)	0.364	3.17 ± 0.12 (10)	77.32
Фиксатор, 24 ч	0.34 ± 0.01 (9)	0.227	3.54 ± 0.09 (9)	86.34
Фиксатор, 48 ч	0.25 ± 0.01 (10)	0.500	2.91 ± 0.10 (10)	70.97

Примечание. Различия с контролем во всех случаях достоверны для  $p < 0.05$ ; в скобках указано число исследованных образцов. Обозначения см. в примечании к табл. 3.

си Кларка: значительное уменьшение объема в первые минуты фиксации (~40 %) и последующее постепенное изменение объема до ~20—35 % от исходного значения (табл. 9).

### Обсуждение

Результаты измерения сжатия ткани апикальной части корней лука показали, что в первые минуты фиксации наблюдается продольное сжатие во всех фиксаторах на 9—10 %. Формалин вызывал постепенное сжатие ткани: продольное сжатие на 6—14 %, поперечное сжатие на

6—17 % в «зоне чехлика и меристемы» и на 8—13 % в «зоне растяжения». В фиксаторе Боуэна продольное сжатие достоверно наблюдается через 10 ч фиксации, но количественные измерения поперечной и объемной деформации затруднены в связи с мацерацией ткани. Спиртосоудержащие фиксаторы (Карнуа и Кларка) вызывают одинаковый эффект на сжатие ткани: в первые минуты и через 2 ч (фиксатор Кларка) происходит продольное и поперечное сжатие на 8—12 %, затем в течение последующих часов фиксации наблюдается менее выраженное сжатие апексов корней. Поперечная деформация наиболее сильно выражена в «зоне чехлика и меристемы» (6—20 %) по сравнению с «зоной растяжения» (6—13 %)

Таблица 7

**Результаты измерений длины (*L*) и диаметров (*D2* и *D1*) корней  
в контроле и в фиксаторе Карнуа**

Вариант опыта	<i>L</i> , мм	$\epsilon$	<i>D2</i> , мм	$\beta_1$	$ \mu $	<i>D1</i> , мм	$\beta_2$	$ \mu $
Контроль	1.99 ± 0.02 (9)		0.59 ± 0.01 (9)			0.56 ± 0.01 (9)		
Карнуа 3—5 мин	1.86 ± 0.04 (10)	-0.065	0.57 ± 0.01 (10) НД	—	—	0.46 ± 0.01 (10)	-0.178	2.738
Карнуа, 2 ч	1.84 ± 0.04 (10)	-0.075	0.56 ± 0.01 (10) НД	—	—	0.50 ± 0.01 (10)	-0.107	1.427
Карнуа, 6 ч	1.80 ± 0.04 (10)	-0.095	0.55 ± 0.01 (10)	-0.068	0.716	0.48 ± 0.01 (10)	-0.143	1.505
Карнуа, 10 ч	1.81 ± 0.04 (10)	-0.090	0.55 ± 0.01 (10)	-0.068	0.755	0.47 ± 0.01 (10)	-0.161	1.789
Карнуа, 24 ч	1.81 ± 0.04 (10)	-0.090	0.54 ± 0.01 (10)	-0.085	0.944	0.47 ± 0.01 (10)	-0.161	1.789
Карнуа, 48 ч	1.82 ± 0.04 (10)	-0.085	0.56 ± 0.01 (10)	—	—	0.48 ± 0.01 (10)	-0.143	1.682

Примечание. НД — различия с контролем недостоверны, в остальных случаях различия с контролем достоверны для  $p < 0.05$ ; в скобках указано число исследованных образцов. Остальные обозначения см. в примечании к табл. 1.

Таблица 8

**Результаты измерений периметра (*LP*) и площади профиля (*AP*) корней  
в контроле и в фиксаторе Карнуа**

Вариант опыта	<i>LP</i> , мм	%	<i>AP</i> , мм <sup>2</sup>	%
Контроль	5.27 ± 0.08 (9)	100	1.02 ± 0.02 (9)	100
Карнуа, 3—5 мин	4.82 ± 0.09 (10)	91.46	0.83 ± 0.02 (10)	81.37
Карнуа, 2 ч	4.78 ± 0.10 (10)	90.70	0.83 ± 0.02 (10)	81.37
Карнуа, 6 ч	4.61 ± 0.08 (10)	87.48	0.78 ± 0.02 (10)	76.47
Карнуа, 10 ч	4.58 ± 0.09 (10)	86.91	0.78 ± 0.03 (10)	76.47
Карнуа, 24 ч	4.61 ± 0.08 (10)	87.48	0.79 ± 0.02 (10)	77.45
Карнуа, 48 ч	4.78 ± 0.09 (10)	90.70	0.83 ± 0.02 (10)	81.37

Примечание. Различия с контролем во всех случаях достоверны для  $p < 0.05$ ; в скобках указано число исследованных образцов.

во всех фиксаторах, кроме фиксатора Боуэна (измерение поперечной деформации затруднено из-за мацерации ткани). Свойство пикриновой кислоты вызывать мацерацию отмечено в литературе (O'Brien, McCully, 1981). Наиболее сильно изменяются объем и площадь поверхности апексов корней (на 20—40 % от исходного объема), что происходит в начале фиксации.

Можно ли использовать полученные данные о деформации для определения времени фиксации апексов корня лука? Этот вопрос требует дополнительного исследования. При изучении действия фиксирующих реагентов на модельные системы (стержни желатин-альбуминовых гелей) Дж. Бейкер (Baker, 1958) разделил фиксирующие

реагенты на две группы по отношению к белкам: коагулирующие (этанол, пикриновая кислота и др.) и некоагулирующие (формальдегид и уксусная кислота) (Baker, 1958; O'Brien et al., 1973). Эти авторы показали, что фиксирующие реагенты по-разному изменяют объем желатин-альбуминовых гелей: этанол приводит к сжатию гелей на 60, пикриновая кислота — на 5 %, в то время как формальдегид вызывает набухание на 20—30 %, а уксусная кислота — значительное набухание — в 4.5 раза (Baker, 1958). Показано, что сжатие ткани сильнее в 96%-ном этаноле по сравнению со 100%-ным этанолом. Возможно, этим объясняется замена 96%-ного этанола в составе фиксатора Кларка на 100%-ный спирт в прописи,

Таблица 9

**Результаты измерений объема (*V*) и площади поверхности (*AS*) корней  
в контроле (вода) и в фиксаторе Карнуа**

Вариант опыта	<i>V</i> , мм <sup>3</sup>	$\nu$	<i>AS</i> , мм <sup>2</sup>	$\tau$	$\nu/\tau$
Контроль	0.40 ± 0.03 (9)		3.51 ± 0.20 (9)		
Фиксатор, 3—5 мин	0.23 ± 0.01 (10)	-0.425	2.61 ± 0.13 (10)	-0.256	1.660
Фиксатор, 2 ч	0.26 ± 0.01 (10)	-0.350	2.93 ± 0.15 (10)	-0.165	2.121
Фиксатор, 6 ч	0.33 ± 0.02 (10)	-0.175	3.23 ± 0.11 (10) НД	—	—
Фиксатор, 10 ч	0.29 ± 0.02 (10)	-0.275	2.95 ± 0.10 (10)	-0.159	1.729
Фиксатор, 24 ч	0.31 ± 0.02 (9)	-0.225	3.06 ± 0.12 (9) НД	—	—
Фиксатор, 48 ч	0.28 ± 0.01 (10)	-0.300	2.84 ± 0.11 (10)	-0.191	1.571

Примечание. НД — различия с контролем недостоверны, в остальных случаях различия с контролем достоверны для  $p < 0.05$ ; в скобках указано число исследованных образцов. Остальные обозначения см. в примечании к табл. 3.

известной как «формула Фармера» (Sass, 1958; Berlyn, Miksche, 1976).

Наши результаты не совпадают с данными Дж. Бейкера (Baker, 1958) о сжатии и набухании желатин-альбуминовых гелей. Это объясняется двумя причинами: 1) фиксаторы, примененные в данной работе, представляют собой смеси коагулирующих и некоагулирующих реагентов, и их кумулятивное действие не изучено; 2) реальная ткань в отличие от модельных гелей представляет собой гетерогенную систему, состоящую из клеток и межклетника, имеющих разное содержание белков, разную проницаемость для фиксирующих реагентов, распределенные заряды и т. д.

В случае спиртосодержащих фиксаторов наблюдается уменьшение прозрачности апексов корней: на цифровых изображениях они видны в виде темных объектов. Формалин и фиксатор Боуэна не приводят к таким оптическим эффектам. Дж. Бейкер (Baker, 1958) объяснил этот эффект увеличением светорассеивания при взаимодействии фиксаторов с белками, приводящем к изменению их агрегатного состояния.

В ряде работ показано, что фиксирующие реагенты с разной скоростью проникают в ткань (Medawar, 1941; Baker, 1958; Dempster, 1960; Hopwood, 1969, 1977, 1985; Mersey, McCully, 1978; Start et al., 1992, и др.). Согласно данным, полученным на модельных желатин-альбуминовых гелях (Baker, 1958), фиксирующие реагенты по скорости проникновения распределяются следующим образом: формальдегид > уксусная кислота > этанол (метанол) > пикриновая кислота (Baker, 1958). Результаты, полученные на клетках селезенки, печени и такой модели, как коагулированная плазма крови, несколько отличаются от данных, полученных на желатин-альбуминовых гелях: формальдегид и уксусная кислота меняются местами (Medawar, 1941). Необходимо отметить, что методы измерения скорости проницаемости фиксирующих реагентов в ткани несовершенны и что в целом эта проблема почти не разработана.

Также не разработана общая схема динамики химической фиксации клеток и тканей. Можно полагать, что в зависимости от скорости проникновения фиксирующих реагентов происходят последовательные «волны продвижения» отдельных реагентов сложных фиксаторов в ткань, т. е. химическая фиксация при таком представлении будет состоять из последовательного действия реагентов сложного фиксатора на ткань. Причем каждая последующая «волна» фиксирующего реагента будет проходить через клетки, уже измененные предыдущим фиксирующим реагентом. Такое представление о динамике химической фиксации требует экспериментального исследования. Разработка общей теории химической фиксации имеет важное значение не только для понимания физико-химических механизмов фиксации, но и для научно обоснованного поиска новых фиксирующих реагентов и определения состава сложных фиксаторов.

Полученные количественные данные об изменении геометрических размеров клеток и межклеточника внутри апексов корней при использовании разных фиксаторов должны учитываться при 3-мерной реконструкции клеток и тканей с использованием серийных срезов (Буданцев, Айвазян, 2005) или конфокальной микроскопии (Gray et al., 1999).

## Список литературы

- Барыкина Р. П., Веселова Т. Д., Девятков А. Г., Джалилова Х. Х., Ильина Г. М., Чубатова Н. В. 2004. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: МГУ. 311 с. (Barykina R. P., Veselova T. D., Devyatov A. G., Djalilova Kh. Kh., Ilyina G. M., Chubatova N. V. 2004. Handbook for botanical microtechnic. Moscow: Moscow Univ Publ. 311 p.)
- Буданцев А. Ю. 2015. Гистологический процессинг. М.: Наука. 132 с. (Budantsev A. Yu. 2015. Histological processing. Moscow: Nauka. 132 p.)
- Буданцев А. Ю., Айвазян А. Р. 2005. Компьютерная 3-х мерная реконструкция биологических объектов с использованием серийных срезов. Морфология. 127 (1): 72—78. (Budantsev A. Yu., Ayvazyan A. R. 2005. 3-D reconstruction of biological objects with serial sections. Morphology (Russia). 127 (1): 72—78.)
- Буданцев А. Ю., Демьянов А. Ю. 2017. Деформация тканей в ходе гистологического процессинга. I. Методы морфометрической оценки деформаций. Цитология. 59 (5): 362—368. (Budantsev A. Yu., Demyanov A. Yu. 2017. Deformations during histological tissue processing. I. Methods for morphometric analysis of deformations. Tsitologiya. 59 (5): 362—368.)
- Дженсен В. 1965. Ботаническая гистохимия. М.: Мир. 377 с. (Jensen W. A. 1965. Botanical histochemistry. Moscow: Mir. 377 p.)
- Левитский Г. А. 1931. Опыт цитологического анализа фиксационного действия хром-ацетат-формола. Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 27 (1): 3—8. (Levitsky G. A. 1931. Cytological analysis of chrom-acetate-formol fixative. Bull. of Applied botany, Genetic and Selection. 27 (1): 3—8.)
- Левитский Г. А. 1976. Сравнительное исследование хондриосом в живых и фиксированных клетках растений. В кн.: Левитский Г. А. Цитология растений. Избранные труды. М.: Наука. 216 с. (Levitsky G. A. 1976. Comparative study of chondriosomes in native and fixative plant cells. In: Levitsky G. A. Plant cytology. Moscow: Nauka. 216 p.)
- Навашин С. Г., Герасимова-Навашина Е. И. 1958. Об изучении клеточных процессов на фиксированном материале. Бот. журн. 43 (2): 167—177. (Navashin S. G., Gerasimova-Navashina E. I. 1958. Studing of cell processes on the fixative tissues. Botanical J. (Russia). 43 (2): 167—177.)
- Ромейс Б. 1954. Микроскопическая техника. М.: Изд-во иностр. лит-ры. 718 с. (Romies B. 1954. Mikroskopicheskaja Technika. Moscow: Izd. Inostr. Literat. 718 p.)
- Хиллман Г. 1975. Определенность и неопределенность в биохимических методах. М.: Мир. 156 с. (Hillman H. 1975. Certainty and uncertainty in biochemical techniques. Moscow: Mir. 156 p.)
- Baker J. 1958. Principles of biological microtechnique. A study of fixation and dyeing. London: Methium and Co LTD; New York: Jonh Wiley and Sons Inc. 357 p.
- Berlyn G. P., Miksche J. P. 1976. Botanical microtechnique and histochemistry. Ames, Iowa: Iowa State Univ. Press. 321 p.
- Dempster W. T. 1960. Rates of penetration of fixing fluids. Amer. J. Anat. 107: 59—72.
- Gray J. D., Kolesik P., Hoj P. B., Coombe B. G. 1999. Confocal measurement of the three-dimensional size and shape of plant parenchyma cells in a developing fruit tissue. Plant J. 19: 229—236.
- Hopwood D. 1969. Fixatives and fixation: a review. Histochemical J. 1: 323—360.
- Hopwood D. 1977. Fixation and fixatives. In: Theory and practice of histological techniques. Edinburgh; London; New York: Churchill Livingstone. 16—29.
- Hopwood D. 1985. Cell and tissue fixation, 1972—1982. Histochemical J. 17: 389—442.
- Jensen W. A., Kavaljian L. G. 1958. An analysis of cell morphology and the periodicity of division in the root tip of *Allium cepa*. Amer. J. Bot. 45: 365—372.
- Medawar P. B. 1941. The rate of penetration of fixatives. J. R. Microsc. Soc. 61: 46—57.

Mersey B., McCully M. E. 1978. Monitoring of the course of fixation of plant cells. *J. Microscopy*. 114 : 49—67.

O'Brien T. P., Kuo J., McCully M. E., Zee S.-Y. 1973. Coagulant and non-coagulant fixation of plant cells. *Austr. J. Biol. Sci.* 26 : 1231—1250.

O'Brien T. P., McCully M. E. 1981. The study of plant structure principles and selected methods. Melburn, Australia: Termarcaphi Pty. Ltd. 390 p.

Sass J. E. 1958. *Botanical microtechnique*, 3th Ed. Ames, Iowa: Iowa State Univ. Press. 227 p.

Srinivasan M., Sedmak D., Jewell S. 2002. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Amer. J. Pathol.* 161 : 1961—1971.

Start R. D., Layton C. M., Cross S. S., Smith J. H. F. 1992. Re-assessment of the rate of fixative diffusion. *J. Clin. Pathol.* 45 : 1120—1121.

Поступила 13 XII 2016

DEFORMATIONS DURING HISTOLOGICAL TISSUE PROCESSING.  
II. EFFECTS OF FORMALDEHYDE AND ALCOHOL-CONTAINING FIXATIVES  
ON ROOT APEX OF *ALLIUM*

A. Yu. Budantsev,<sup>1</sup> A. Yu. Demyanov

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, 142290;

<sup>1</sup> e-mail: budantsev@mail.ru

Bowen, Clark, Carnoy fixatives and formaldehyde lead to longitudinal, transverse and volume deformation (compression) of the apical part of the root of *Allium cepa*. Longitudinal deformation (6—14 %) is most pronounced in the first minutes of fixation, except Bowen fixative: deformation (7—9 %) manifests itself only after 10 h of fixation. Transverse deformation is most pronounced in the meristem zone of the roots compared to the extension zone. Volume deformation within 30—40 % is also noted in the first minutes of fixation by all fixatives (except for the Bowen fixative). The macerating effect of Bowen's fixative on apexes of the root is noted, which makes it difficult to measure transverse deformation. The obtained data testify to deformation of cells and intercellular structures of the apical part of the root of onions during chemical fixation. A quantitative data of these deformations is presented.

**Key words:** chemical fixation, roots apex, deformation at fixation, formalin, Bouin fixative, Clark and Carnoy fixatives.