УДК 578.086

ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОЛОГИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ДЕЙСТВИИ СПИРТ-ФОРМАЛИНОВОГО ФИКСАТОРА

Буданцев А.Ю.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, e-mail: budantsev@mail.ru

Показано, что при действии фиксатора на живые клетки листа Элодеи их площадь уменьшается до 75–90% от исходной площади в контроле. После промывки водой площадь клеток увеличивается, но не достигает контрольного уровня. Происходят быстрая экстракция хлорофилла из хлоропластов, их сморщивание и остановка кругового движения, цитоплазма клеток приобретает мелкоскладчатый характер с появлением многочисленных ячеистых структур.

Ключевые слова: химическая фиксация, живые растительные клетки, морфометрический анализ

THE MORPHOLOGY OF ELODEA LEAF CELLS DURING OF ALCHOCOL-FORMALIN FIXATION

Budantsev A.Y.

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian Academy Sciences, Puschino, e-mail: budantsev@mail.ru

It is show that the areas of alive cells in Elodea leaf are decreased to 75–90% at action of alcohol-formalin fixation. After washing with water area of the cells was increased, but does not reach the control level. There is a fast extraction of chlorophyll from the wrinkling chloroplasts and cessation of cytoplasmic circular streaming. Into cells there are some vesiculation and other alteration of the cytoplasm structures.

Keywords: chemical fixation, living plant cells, morphology of plant cells, morphometric analysis

В настоящее время есть достаточный набор технических средств для реализации трехмерной реконструкции геометрии клеток и тканевых структур с помощью конфокальной микроскопии [7 и др.] или использования серийных срезов фиксированного материала [5, 6]. В связи с этим изучение действия химических фиксаторов на морфологию клеток, в частности растительных клеток, приобретает важнейшее значение, т.к. без учета изменения морфологии клеток под действием фиксаторов можно получить искаженную объемную модель изучаемых клеток и ее структур. Обсуждение роли морфологических артефактов при 3-мерной реконструкции клеток животных с использованием серийных срезов приведено в специальном обзоре [2]. Изучение действия химических фиксаторов на морфологию клеток представляет одну из важнейших и старых проблем цитологии и цитохимии [3, 8, 9].

В данной работе, приведены результаты изучения динамики изменения некоторых морфометрических характеристик живых растительных клеток при действии спирт-формалинового фиксатора, широко используемого в растительной гистологии и гистохимии.

Материал и методы исследования

В работе использован лист Элодеи (*Elodeae canadensis* Michx.). Мелкие верхушечные листочки целиком помещались в специальную проточную термостатированную микрокамеру объемом 50 мкм^3 [4]. Все опыты проводились при температуре 20ºС, состав спирт-формалинового фиксатора: этиловый спирт (96%) и формалина (4%, приготовлен из параформа), в соотношении 1:6. Проток растворов через микрокамеру осуществлялся перистальтическим микронасосом pp1-05, Польша, Zalimp), скорость протока 333 мкл/мин. Использовался инвертированный микроскоп Olympus IX 71, соединенный с 3-матричным видекамкордером HD GY101 (фирма JVC, Япония) и видеомонитором PWM-14M2E (Sony, Япония). Обработка видеофильмов осуществлялась программой Pinnacle Studio 9.0. Изображения отдельных кадров обрабатывались графическим редактором AdobePhotosop 7.0 (перевод в черно-белые 8-ми битовые изображения, фильтрация – усиление резкости границ). Измерение площадей проводилось при помощи программы PhotoM (http://t_lambda.chat.ru). Контур каждой клетки измерялся 5 раз и рассчитывалась средняя величина площади контура. Статистическая обработка результатов осуществлялась при помощи программы Statistica v.6.0. Всего было снято 8 видеофильмов, два из которых подвергнуты морфометрическому анализу.

Результаты исследования и их обсуждение

Эксперимент 1. Временная диаграмма эксперимента приведена на рис. 1.

После начала протока воды, через 15–20 мин, начинается интенсивное круговое движение крупных хлоропластов в клетках (на временной шкале опыта, рис. 1, это время не показано). Общий вид клеток листа в разные периоды видеосъемки представлен на рис. 2. Были выбраны 17 клеток верхнего слоя клеток листа элодеи,

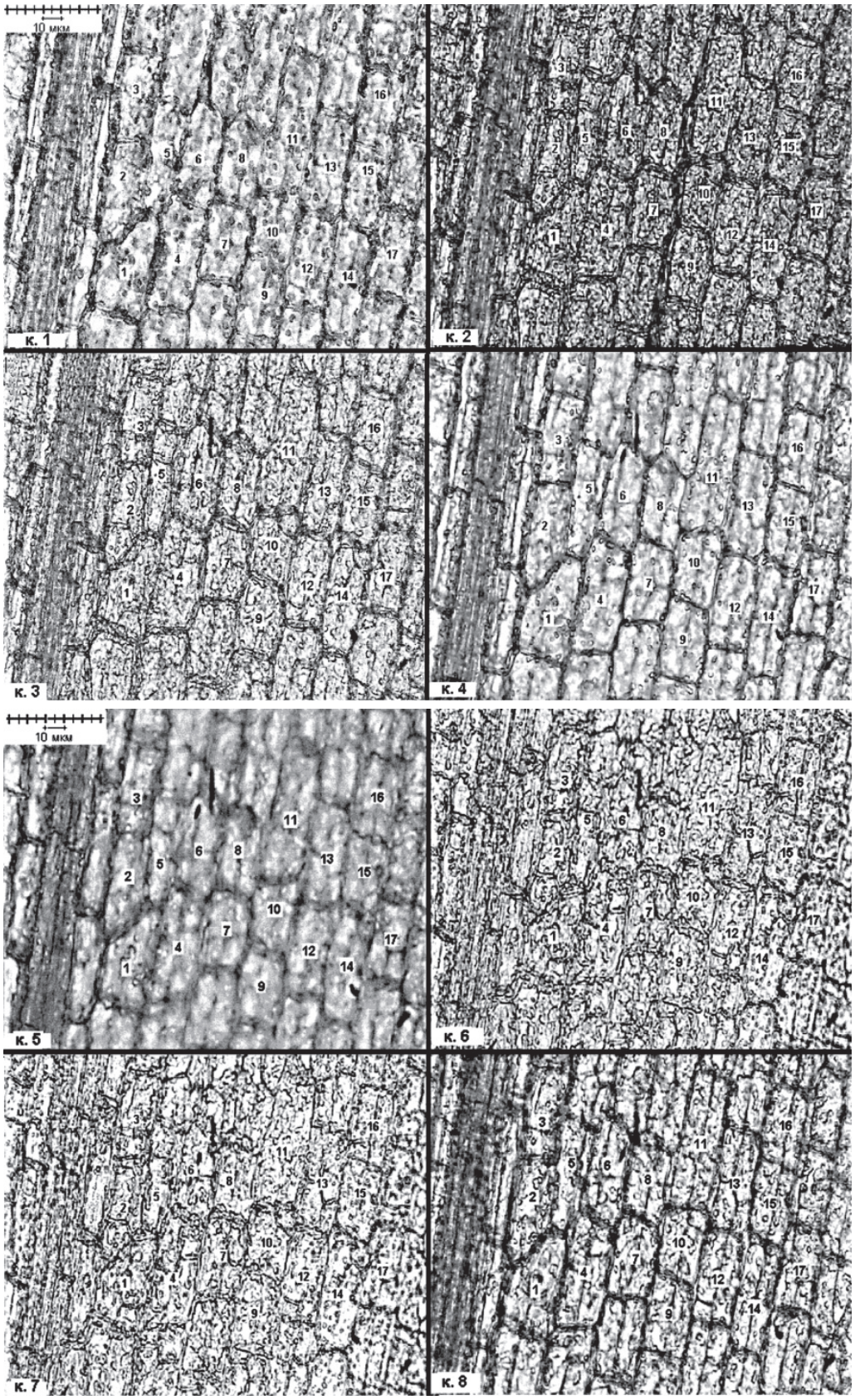

Рис. 2. Изменение морфологии клеток в динамике фиксации. Об.10х. Пластинки (к.1 – к.4 – номера кадров, к.1, 4 – проток воды; к.2, 3 – действие фиксатора (см. рис. 1). 1–17 – номера клеток, площадь которых была измерена (табл. 1); к.5, 8 – проток воды; к. 6, 7 – действие фиксатора

площадь которых измерялась в димнамике фиксации. Начальная площадь клеток была в пределах от 800 до 1440 мкм^2 (табл. 1).

Хлоропласты эллипсоидной формы, скорость их кругового движения равна, в среднем, 2–3 мкм/с.

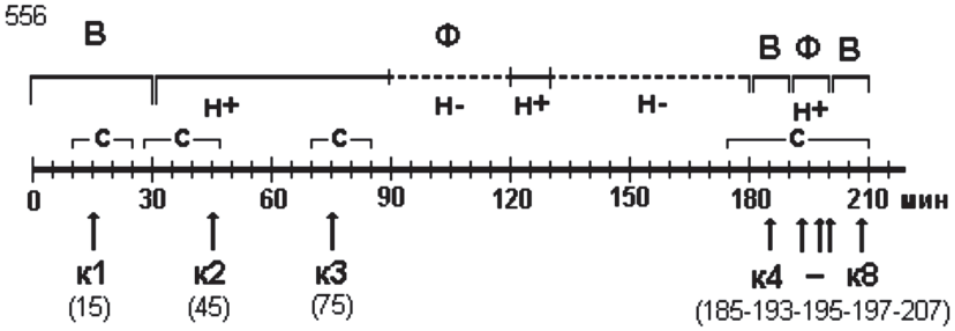

Рис. 1. Временная диаграмма эксперимента 1. Обозначения: В – проток воды; Ф – проток фиксатора; н+ и н- – насос включен (проток) или выключен (протока нет); с – периоды видеосъемки; к1 – к8 – кадры, взятые из видеофильма для морфометрического анализа, в скобках указаны времена соответствуюших кадров в общей шкале временной шкалы эксперимента

Таблица 1

Площади клеток листа Элодеи в динамике фиксации (рис. 2)

Номер клеток	к1 Вода Н Начало опыта (100 %) $M \pm m$	к2 Фиксатор		к 3 Фиксатор		к 4 Вода	
		$M \pm m$	%	$M \pm m$	%	$M \pm m$	%
1	1440,9 ± 19,3(4)	1275,7 ± 57,6(4)	88,5	1208,6 ± 18,8(6)	83,9	1380,5 ± 8,5 (3)	95,8*
2	1192,3 ± 25,7(7)	876,0 ± 12,8(3)	73,5	868,8 ± 17,8(6)	72,9	1107,4 ± 11,3(8)	92,9
3	1103,8 ± 32,8(3)	830,2 ± 31,9(3)	75,2	820,9 ± 20,1(6)	74,4	1046,0 ± 27,2(3)	94,8*
4	1502,7 ± 10,1(8)	1252,9 ± 19,6(8)	83,4	1330,1 ± 24,9(6)	88,5	1463,2 ± 8,4(3)	97,4*
5	940,0 ± 28,9(3)	854,5 ± 10,4(3)	90,9	667,8 ± 14,2(6)	71,0	923,6 ± 21,9(3)	98,2*
6	1127,1 ± 7,1 (8)	964,0 ± 16,0(8)	85,5	998,9 ± 57,5(6)	88,6	990,0 ± 14,0(3)	87,8
7	1042,8 ± 3,8 (8)	887,7 ± 5,9 (8)	85,1	881,4 ± 17,0(6)	84,5	1002,9 ± 3,4 (3)	96,2
8	965,6 ± 9,5 (8)	734,8 ± 6,6 (8)	76,1	826,2 ± 18,8(6)	85,6	932,8 ± 7,9 (3)	96,6*
9	975,0 ± 9,2 (8)	886,0 ± 9,8 (3)	90,9	841,5 ± 14,4(6)	86,3	941,4 ± 8,2 (8)	96,6
10	882,6 ± 22,3(3)	733,5 ± 15,0(3)	83,1	720,8 ± 20,4(6)	81,7	882,4 ± 22,3(3)	99,9*
11	1704,6 ± 40,7(4)	1575,1 ± 29,9(4)	92,4	1597,6 ± 18,1(6)	93,7	1685,5 ± 25,9(3)	98,9*
12	1153,8 ± 3,5 (8)	887,4 ± 5,5 (8)	76,9	983,5 ± 12,0(6)	85,2	1118,1 ± 22,5(3)	96,9
13	1194,7 ± 4,5 (8)	1026,4 ± 5,0 (8)	85,9	1021,0 ± 11,2(6)	85,5	1137,5 ± 11,46(8)	95,2
14	1254,4 ± 36,6(4)	1065,8 ± 55,1(4)	85,0	1057,5 ± 25,7(6)	84,3	1201,1 ± 5,4(3)	95,7*
15	904,6 ± 5,1 (8)	727,0 ± 5,3 (8)	80,4	845,6 ± 6,8 (6)	93,5	855,7 ± 9,3 (8)	94,6
16	990,4 ± 31,4(3)	873,8 ± 11,4(3)	88,2	792,3 ± 12,2(6)	80,0	935,1 ± 22,9(3)	94,4*
17	1007,6 ± 21,5(4)	898,4 ± 31,0(4)	89,2	828,3 ± 25,7(6)	82,2	900,0 ± 4,0 (3)	89,3

Примечание: площадь клеток в мкм^2; $M \pm m$ – среднее значение ± ошибка средней величины; t-критерий рассчитывался между значениями площади в к 1 и к 2-4. Для всех приведенных данных $P < 0,05$, кроме отмеченных * – разница недостоверна. В скобках – число измерений. Эксперимент 1, кадры 1-2-3-4 (см. рис. 2).

Продолжение табл. 1

Номер клеток	к 5 Переход от воды к фиксатору		к 6 Фиксатор		к 7 Фиксатор		к 8 Вода	
	M ± m	%	M ± m	%	M ± m	%	M ± m	%
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1263,9 ± 15,2(6)	87,7	1114,6 ± 17,7(6)	77,3	1179,5 ± 23,9(3)	81,8	1393,8 ± 22,8(6)*	96,7
2	984,7 ± 22,3(6)	82,7	871,0 ± 25,4(6)	73,0	868,4 ± 25,2(3)	72,8	1065,2 ± 24,9(6)	89,3
3	894,8 ± 21,4(6)	81,1	766,6 ± 18,5(6)	69,4	886,6 ± 23,8(3)	80,3	936,5 ± 19,1(6)	84,8
4	1306,5 ± 15,3(6)	86,9	1319,5 ± 36,2(6)	87,8	1372,2 ± 24,0(3)	91,3	1402,7 ± 18,7(6)	93,3

Окончание табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
5	716,7 ± 25,6(6)	76,2	655,9 ± 16,3(6)	69,8	710,9 ± 25,16(3)	75,6	789,4 ± 33,3(6)	84,0
6	979,7 ± 46,0(6)	86,9	997,8 ± 21,3(6)	88,5	996,6 ± 30,6(3)	88,4	1097,2 ± 15,1(6)*	97,3
7	928,7 ± 22,1(6)	89,1	767,1 ± 26,0(6)	73,6	938,3 ± 18,2(3)	90,0	968,8 ± 22,6(6)	92,9
8	859,1 ± 21,8(6)	89,0	810,0 ± 15,3(6)	83,9	753,2 ± 43,2(3)	78,0	877,8 ± 26,1(6)	90,9
9	873,4 ± 18,4(6)	89,6	828,1 ± 23,1(6)	84,9	806,4 ± 24,1(3)	82,7	914,5 ± 11,6(6)	93,8
10	818,6 ± 11,7(6)	92,8	719,5 ± 16,4(6)	81,5	796,7 ± 53,8(3)	90,3*	857,7 ± 10,8(6)*	97,2
11	1599,1 ± 20,7(6)	93,8	1575,7 ± 21,3(6)	92,4	1522,7 ± 52,6(3)	89,3	1605,0 ± 23,7(6)*	94,1
12	1048,8 ± 24,0(6)	90,9	970,9 ± 15,3(6)	84,1	990,7 ± 22,9(3)	85,9	1036,4 ± 18,0(6)	89,8
13	1105,6 ± 11,4(6)	92,5	1105,9 ± 14,0(6)	92,6	1076,6 ± 50,2(3)	90,1	1076,7 ± 22,0(6)	90,1
14	1150,0 ± 19,2(6)	91,7	1097,5 ± 20,8(6)	87,5	1242,8 ± 46,6(3)	99,1*	1076,5 ± 28,3(6)	85,8
15	821,2 ± 16,8(6)	90,8	813,6 ± 14,1(6)	89,9	855,3 ± 25,7(3)	94,5	883,5 ± 11,6(6)*	97,7
16	887,8 ± 16,3(6)	89,6	829,4 ± 26,0(6)	83,7	887,6 ± 66,2(3)	89,6*	892,2 ± 12,2(6)	90,1
17	839,1 ± 27,8(6)	83,3	822,2 ± 28,9(6)	81,6	829,3 ± 35,1(3)	82,3	885,8 ± 20,1(6)	87,9

Примечания: t-критерий рассчитывался между значениями площади в к1 и к5-8. Для всех приведенных данных $P < 0,05$;

* – разница недостоверна. В скобках – число измерений.Эксперимент 1, кадры 5-6-7-8 (см. рис. 1).

В первые секунды действия фиксатора во всех клетках наблюдается полная остановка движения хлоропластов, затем происходит усиление зеленого фона, что связано с разрушением хлоропластов и выходом хлорофилла в проточный раствор. При включении протока воды происходит постепенное восстановление площади клеток к исходному состоянию (рис. 2, к.4,5,8). Однако остановка движения и уменьшенное число хлоропластов в клетках необратимо. В конце опыта кратковременное включение протока фиксатора практически не изменяло картины (рис. 2, к.6,7).

Эксперимент 2. Временная диаграмма эксперимента приведена на рис. 3

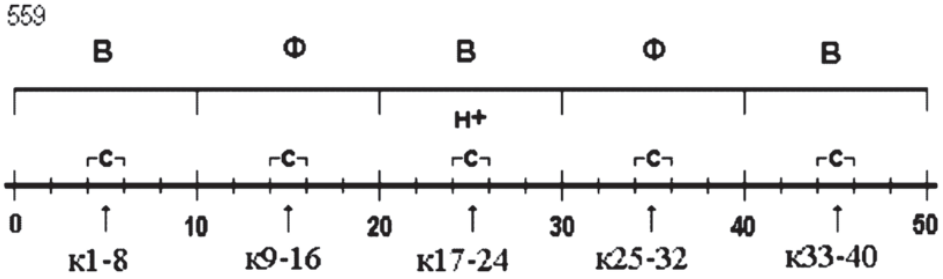

Рис. 3. Временная диаграмма эксперимента 2. Обозначения см. рис. 1

Для видеосъемки была выбрана клетка площадью около 400 мкм^2 для того, чтобы она полностью помещалась в поле зрения микроскопа при увеличении объектива 40×0,4.

В первые секунды контакта фиксатора с клетками листа хорошо видно, что происходит сморщивание хлоропластов, цитоплазма клеток приобретает мелкоскладчатый характер, с появлением многочисленных ячеистых структур. Клеточные стенки слегка утолщаются, становятся «лохматыми». В конце опыта внешний вид клеток приближается к норме, хотя видно сильное уменьшение количества хлоропластов и остаточные в цитоплазме и клеточной стенке.

Заключение

Таким образом, можно резюмировать, что при действии на клетки спирт-формалинового фиксатора площадь клеток листа Элодеи уменьшается до 75–90 % от исходной площади в контроле. После промывки площадь клеток листа элодеи постепенно возвращается к норме, но не достигает контрольного уровня. Другими словами, в клеточной стенке сохраняется остаточная деформация, вызванная фиксатором. В классических работах Байкера показано, что спирт и формалин приводят к уменьшению объемов модельных систем (альбумин-желатиновые блоки) [3]. Скорость проникновения формалина в клетки тычиночных волосков томатов равна 120 мкм/мин [9], добавление этанола практически не влияет на скорость проникновения в эти же клетки (данные для фиксатора Карнуа). Учитывая, что толщина листа элодеи равна в пределах 60–100 мкм, можно считать, что в наших опытах фиксация должна быть полной.

Таблица 2

Площади клетки (мкм^2) в норме и после действия фиксатора

№ к.*	I Вода (1)	№ к.	II Фиксатор (1)	№ к.	III Вода (2)	№ к.	IV Фиксатор (2)	№ к.	V Вода (3)
1	427,2 ± 4,3**	9	334,9 ± 5,6	17	420,0 ± 3,4	25	367,7 ± 3,1	33	423,4 ± 5,4
2	447,6 ± 2,5	10	387,7 ± 3,6	18	416,3 ± 7,8	26	367,2 ± 3,7	34	433,9 ± 3,8
3	436,8 ± 3,3	11	372,7 ± 4,5	19	457,2 ± 4,2	27	344,3 ± 4,8	35	414,8 ± 1,8
4	457,4 ± 3,4	12	355,5 ± 4,1	20	435,5 ± 4,3	28	355,1 ± 3,1	36	437,7 ± 3,0
5	459,1 ± 3,8	13	348,0 ± 5,9	21	444,7 ± 4,3	29	360,0 ± 5,1	37	431,2 ± 2,5
6	455,8 ± 6,5	14	340,3 ± 4,8	22	461,8 ± 5,0	30	361,2 ± 3,8	38	458,8 ± 5,9
7	460,4 ± 3,0	15	351,8 ± 2,1	23	409,4 ± 2,7	31	351,6 ± 3,9	39	438,6 ± 7,0
8	444,2 ± 7,4	16	355,9 ± 3,8	24	412,3 ± 3,5	32	369,6 ± 5,4	40	442,7 ± 5,2
	448,5 ± 2,3$^+$ (100 %)		355,8 ± 2,9 (79,3 %)		432,2 ± 3,4 (96,3 %)		359,6 ± 3,1 (80,2 %)		435,1 ± 2,5 (97,0 %)

Примечание: * – номера кадров из видеофильма (см. рис. 3); ** – M ± m (5 измерений); Разница достоверна по t-критерию: между I – II и I – IV ($P < 0,001$); $^+$ – M ± m (среднее значение площади, суммированное по 8 кадрам – 40 измерений).

При изучении действия разных фиксаторов на живые растительные клетки (черешковые волоски *Lycopersicum esculentum)*, в частности показано, что этанол вызывал интенсивное вспенивание цитоплазмы, в то время как движение протоплазмы продолжалось. Другие фиксаторы, такие как альдегиды, содержащие ионы кальция, приводили сразу к остановке движения цитоплазмы и везикуляции канальцевой системы [8]. В обзоре Р.Барера приводятся данные о том, что действие фиксаторов приводит к серьезным изменениям структуры живых клеток («мягкие» фиксаторы, такие как формальдегид в меньшей степени, а такие как пикриновая кислота или сулема приводят к появлению серьезных морфологических артефактов [1]. В ряде работ, проведенных в первой половине прошлого столетия, делалась попытка развить традиционные методы изучения фиксации живых клеток (см., например, ссылки [1, 3]). Эти работы ясно показали, «…ценность такого подхода и для выбора наилучшего фиксатора, и для интерпретации картин фиксированных клеток. Удивительно, однако, этот интенсивный поиск более лучших фиксаторов, развитие электронной микроскопии не возродили интерес к этому направлению…» [8]. С сожалением можно констатировать, что эти слова не потеряли актуальность и в наше время.

Дополнительные материалы к данной статье изложены в http://cam.psn.ru. Работа выполнена на средства гранта РФФИ № 07-04-00510.

Список литературы

1. Барер Р. Фазово-контрастная, интерференционно-контрастная и поляризационная микроскопия // Методы цитологичекого анализа; под ред. А.Л. Шабадаш.– М.: ИИЛ, 1957.– С. 107–178.

2. Буданцев А.Ю., Айвазян А.Р. Компьютерная 3-х мерная реконструкция биологических объектов с использованием серийных срезов // Морфология.– 2005. – Т. 127, №1.– С. 72–78.

3. Baker J.R. Principles of Biological Microtechnique. – London: Methuen, 1958.– P. 19–155.

4. Budantsev A.Yu. Microchambers for inverted microscopes // Biotechnic and Histochemistry. – 2007. – Vol. 82, № 4–5. – P. 263–266.

5. Budantsev A.Yu., Jakovlev Y.Y. 3-D Reconstruction of Biological Objects. The potencial of standard computer programs // Microscopy and Analysis. – 2000. – Vol. 67. – P. 29–31.

6. Fiala J.C. Reconstruct a free editor for serial section microscopy // Journal of Microscopy. – 2005. – Vol. 218, Pt. – P. 52–61.

7. Gray, J.D., Kolesik, P., Hoj, P.B., Coombe, B.G. Confocal measurement of the three-dimensional size and shape of plant parenchyma cells in a developing fruit tissue // The Plant Journal. – 1999. – Vol. 19. – P. 229–236.

8. Mersey B., McCully M.E. Monitoring of the course of fixation of plant cells // Journal of Microscopy. – 1978. – Vol. 114, Pt.1. – P. 49–76.

9. O'Brien T.P., McCully M.E. The study of plant structure principles and selected methods. – Melbourne: Blackwell Sci. Publ. – 1981. – P. 4.19–4.36.

Рецензенты:

Новоселов В.И., д.б.н., профессор, главный научный сотрудник Института биофизики клетки РАН, г. Пущино;

Асланиди К.Б., д.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино.

Работа поступила в редакцию 11.04.2011.