

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ В ХРОМСОДЕРЖАЩИХ ФИКСАТОРАХ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

© 2018 г. А.Ю. Буданцев, В.П. Кутьшенко

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пушкино Московской области, Институтская ул., 3*

E-mail: budantsev@mail.ru

Поступила в редакцию 15.04.18 г.

Изучение кинетики окислительно-восстановительных реакций в хромсодержащих фиксаторах (смесь хромовой кислоты, бихроматов, формальдегида и уксусной кислоты) показало, что эти фиксаторы представляет неустойчивую химическую смесь с быстрой кинетикой окислительно-восстановительных процессов. Вследствие этого фиксация биологического материала происходит в нестационарном растворе переменного состава, включающем хромовую кислоту, бихроматы (хром VI), формальдегид, уксусную кислоту, муравьиную кислоту и ацетат хрома (III). Предложено разделить химическую фиксацию в этих фиксаторах на два последовательных процесса («двухступенчатый протокол фиксации»): на первой стадии провести фиксацию ткани в смеси формальдегида с уксусной кислотой (быстро проникающая фиксирующая смесь), а затем на второй стадии, после тщательной промывки, провести хромирование ткани для последующего использования протравных красителей. Такой протокол как минимум позволит сохранить исходный состав хромсодержащих фиксаторов.

Ключевые слова: окислительно-восстановительные реакции, хромовая кислота, формальдегид, уксусная кислота, спектральные методы, методы электрохимического анализа.

DOI: 10.1134/S0006302918050010

Изучение микробиохимии (цито- и гистохимия) и микроморфологии (цитология и гистология) клеток и тканей обычно начинается с фиксации биологической ткани для останковки метаболизма в клетках и тканях, сохранения их «нативного» химического состава и микроструктуры. Для этой цели используются фиксаторы – отдельные химические соединения (альдегиды, кетоны, спирты, неорганические и органические кислоты и др.) или их смеси (альдегиды + спирты, альдегиды + спирты + уксусная кислота и др.).

Изучение химических реакций между компонентами фиксирующих соединений в сложных фиксаторах при их приготовлении и в процессе фиксации биологического материала имеет решающее значение для определения их реального состава и является ключом к изучению влияния фиксирующих соединений на микробиохимию и структуру фиксируемой ткани [1].

Большая группа сложных хромсодержащих фиксаторов (СХФ) имеет в своем исходном составе хромовую кислоту, хроматы и бихро-

маты в сочетании с формальдегидом и уксусной кислотой.

Фиксатор Навашина (хромовая кислота + формальдегид + уксусная кислота), являющаяся вариантом известного фиксатора Флемминга (тетроксид осмия + хромовая кислота + уксусная кислота) [2], широко используется в ботанической гистологии. Ф. Санфеличе использовал смесь, аналогичную по составу фиксатору Навашина, для фиксации ткани животных в паразитологии [3]. Из фиксаторов, содержащих бихроматы, наиболее популярными являются фиксатор Рего (Cl. Regaud) и фиксатор Чиаччио (C. Ciaccio).

Совершенно ясно, что в СХФ, содержащих активные окислители и восстановитель, происходят окислительно-восстановительные реакции с образованием дополнительных продуктов, изменяющих исходный состав и свойства фиксирующей смеси, что определяет конечный результат фиксации.

В данной работе представлены результаты изучения кинетики окислительно-восстановительных реакций в СХФ, на основе которых сформулирован «двухступенчатый протокол»

Сокращение: СХФ – сложные хромсодержащие фиксаторы.

использования этих фиксаторов, позволяющий избежать изменения состава фиксаторов в процессе фиксации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Спектральные измерения. Измерения спектров поглощения проводили на спектрофотометре UV-2401 PC (Shimadzu, Япония). Растворы готовили на воде, полученной на бидистилляторе из Шоттовского стекла (Zeiss Jena GmbH, Германия), использовали основные реагенты фирм Sigma (США) и MP Biomedicals (США). Раствор формальдегида готовили из параформа (Sigma, США). Состав фиксатора Навашина: 1%-й раствор трехоксида хрома, 16%-й раствор формалина и ледяная уксусная кислота в объемном соотношении 10 : 4 : 1. 1%-й раствор трехоксида хрома соответствует концентрации 0,1 М (в конечной смеси фиксатора Навашина концентрация хромовой кислоты составляла $7 \cdot 10^{-2}$ М, а формальдегида – 1,5 М).

Раствор трехоксида хрома в концентрации 0,1 М имеет значения оптической плотности (D) значительно выше 2,0, поэтому исходный раствор разбавляли в 100 раз и для измерений спектров применяли кюветы толщиной 0,5 см. Калибровку зависимости оптической плотности от концентрации хромовой кислоты проводили в диапазоне от 10^{-3} до 10^{-4} М.

Такие же условия измерения спектров поглощения применяли для исходного раствора фиксатора Навашина. При разбавлении фиксатора Навашина в 100 раз конечная концентрация хромовой кислоты составляла $7 \cdot 10^{-4}$ М.

Два фиксатора на основе бихромата калия имели следующий состав: фиксатор Чиаччио – бихромат калия (5%-й раствор), формалин (40%) и ледяная уксусная кислота (8 : 2 : 0,5 по объему); фиксатор Рего – бихромат калия (3%-й раствор) и формалин (40%) (8 : 2 по объему) [1]. При измерении спектров поглощения исходные растворы фиксаторов разводили бидистиллированной водой в следующих соотношениях: фиксатор Чиаччио – 1 : 300 и фиксатор Рего – 1 : 200, использовали кюветы толщиной 0,5 см.

В ходе реакций между компонентами смеси фиксатора Навашина уровень оптической плотности пиков, характерных для хрома (VI), уменьшался и в длинноволновой части спектра появлялся пик восстановленного хрома (III). В связи с низкими значениями коэффициента молярной экстинкции для ионов Cr (III) измерение спектров проводилось без разведения исходного раствора фиксатора в кюветах толщиной 2 мм [4].

Электрохимические измерения. Измерения рН и окислительно-восстановительного потенциала (E_h) проводили на анализаторе жидкостей «Эксперт-001-1-(01) (НПО «Измерительная техника», Россия). Для определения рН использовали комбинированный электрод ЭСК-10614, для измерения значений E_h – комбинированный платиновый электрод ЭРП-105. Значение E_h контрольного раствора (циано-(II)феррат калия + циано-(III)феррат калия) равнялось 266 мВ. Динамику изменения значений рН и E_h регистрировали на компьютере с помощью программы Exp2pr.

ЯМР-спектроскопия. ЯМР-измерения проводили на спектрометре AVANCE 600 III (Bruker США) с рабочей частотой 600 МГц, при температуре 298 К, ширине спектра 24 мд и 90-градусном импульсе 11–12 мкс. Задержка перед 90-градусным импульсом составляла 1–2 с. Для достижения хорошего соотношения сигнал/шум использовали 64 повторения, которые накапливались в 32 К ячейках памяти управляющего компьютера. Подавление сигнала воды не использовалось.

В образец, содержащий раствор формальдегида и ледяной уксусной кислоты (концентрация и соотношение – согласно составу фиксатора Навашина), добавляли 10% D_2O и затем хромовую кислоту (см. фиксатор Навашина); сразу после этого начинали регистрацию спектра. Следующие измерения проводили через 6 и 24 ч. Положения сигналов отсчитывали от сигнала воды, сам спектр представлял собой сложную суперпозицию из сигналов воды, формальдегида и, возможно, других продуктов, появляющихся при воздействии реактивов, входящих в состав фиксатора Навашина.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Спектр поглощения хромовой кислоты (раствор трехоксида хрома). На рис. 1 показан спектр поглощения хромовой кислоты в концентрации 10^{-3} М. Видно, что имеются три полосы поглощения: два пика в ультрафиолетовой области – 258 нм и 350 нм и один минорный, плохо разрешенный пик, в области 435 нм.

Результаты измерений спектров калибровочных водных растворов хромовой кислоты в диапазоне концентраций 10^{-3} – 10^{-4} М и расчеты коэффициентов молярной экстинкции (ϵ , л/моль·см) приведены в табл. 1.

Спектры поглощения фиксатора Навашина. Измерение концентрации ионов хрома (VI). Готовили смесь фиксатора Навашина, сразу же брали аликвоту смеси, разбавляли ее в 100 раз и записывали спектр разбавленного фиксатора

Таблица 1. Результаты измерения значений оптической плотности для разных концентраций CrO_3 и расчета коэффициента молярной экстинкции (ϵ , л/моль·см)

Концентрация CrO_3 , М	Длина волны				
	258 нм		351 нм		436 нм
	D	ϵ^* , л/моль·см	D	ϵ^* , л/моль·см	D
10^{-4}	0,10	2000	0,08	1600	0,01
$2 \cdot 10^{-4}$	0,20	2000	0,16	1600	–
$3 \cdot 10^{-4}$	0,31	2066	0,24	1600	–
$4 \cdot 10^{-4}$	0,42	2100	0,31	1550	–
$5 \cdot 10^{-4}$	0,52	2080	0,39	1560	–
$6 \cdot 10^{-4}$	0,64	2133	0,46	1533	–
$7 \cdot 10^{-4}$	0,74	2114	0,54	1542	–
$8 \cdot 10^{-4}$	0,84	2100	0,62	1550	–
$9 \cdot 10^{-4}$	0,94	2088	0,70	1555	–
10^{-3}	1,06	2120	0,78	1560	0,10

Примечание. * – Расчет коэффициента молярной экстинкции проводили по формуле $\epsilon = D/Cd$, где D – оптическая плотность, C – концентрация в моль/л и d – толщина кюветы в см. При измерениях использовали кювету толщиной 0,5 см.

в кювете толщиной 5 мм в диапазоне от 200 до 800 нм. Затем аналогичные измерения проводили через разные промежутки времени. Результаты измерений кинетики изменения концентрации ионов хрома (VI) приведены на рис. 2а. Положение основных максимумов в спектрах раствора Навашина не изменялось по сравнению со спектром CrO_3 (рис. 1). Начальная скорость изменения оптической плотности фиксатора Навашина (в первые три часа) составляла: $V_{258 \text{ нм}} = 0,01 D/\text{ч}$; $V_{351 \text{ нм}} = 0,009 D/\text{ч}$ и $V_{436 \text{ нм}} = 0,0023 D/\text{ч}$.

Измерение концентрации ионов хрома (III).

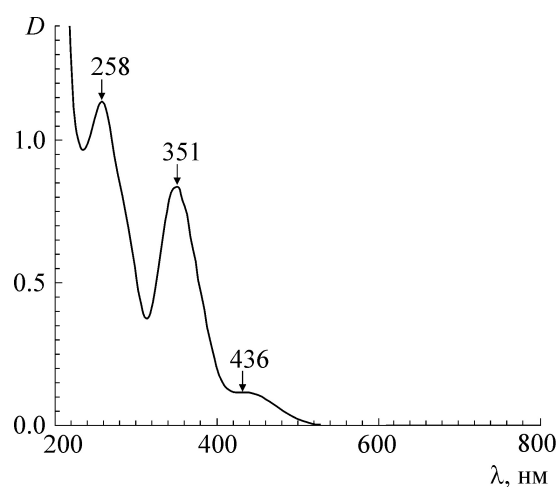
В ходе окислительно-восстановительных реакций в фиксаторе Навашина в спектрах появлялся максимум в области 580 нм, который отсутствовал в начале измерений. Кинетика изменения оптической плотности смеси Навашина в области 580 нм показана на рис. 2б (скорость изменения оптической плотности в первые три часа равна 0,053 D/ч). Через 24 ч после приготовления смеси фиксатора Навашина раствор приобретал отчетливый темно-зеленый цвет, что, возможно, связано с образованием ацетата хрома (III). В опытах, когда вместо уксусной кислоты в фиксатор добавляли эквивалентный объем дистиллированной воды, увеличение оптической плотности в области 580 нм сильно замедлялось.

Спектры поглощения растворов фиксаторов Чиаччио и Рего. Результаты измерения динамики изменения оптической плотности в максимумах поглощения растворов фиксаторов показали, что по сравнению с фиксаторами Чи-

аччио и Рего наиболее нестабильным является фиксатор Навашина (табл. 2).

Результаты электрохимических измерений.

При электрохимических измерениях отдельно готовили смеси «формалин + уксусная кислота» и раствор хромового ангидрида или бихроматов. Затем растворы смешивали и сразу же начинали измерение значений pH и Eh. В табл. 3 приведены результаты измерения pH хромосодержащих фиксаторов. Видно, что через 6 ч наблюдается уменьшение кислотности растворов, продолжающееся и через 24 ч. Динамика изменения Eh растворов трех хромосодержащих фиксаторов приведена в табл. 4. Видно, что в

**Рис. 1.** Спектр поглощения водного раствора триоксида хрома (10^{-3} М, толщина кюветы 0,5 см).

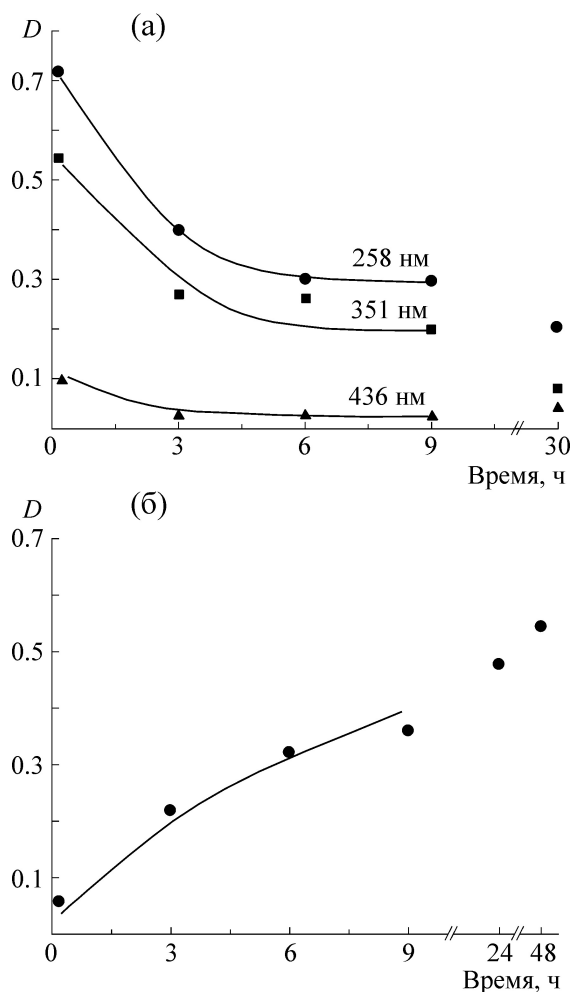


Рис. 2. (а) – Изменение во времени оптической плотности в максимумах спектра раствора Навашина (толщина кюветы 0,5 см); (б) – увеличение во времени оптической плотности максимума 580 нм в спектре раствора Навашина (толщина кюветы 0,2 см).

первые минуты начинается активная окислительно-восстановительная реакция между реагентами фиксаторов и уже через 30 мин происходит значительное уменьшение E_h , продолжающееся и в последующие часы.

Результат ЯМР-спектроскопии. На рис. 3 представлены ^1H -ЯМР-спектры в области поглощения протонов ацетата сразу после добавления хромовой кислоты, через 6 и 24 ч. В спектрах имеется еще один очень широкий сигнал, представляющий собой суперпозицию сигналов воды и формальдегида, плохо пригодный для анализа и интерпретации.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В наших измерениях спектр хромовой кислоты имеет три пика: 258, 351 и 436 нм. На

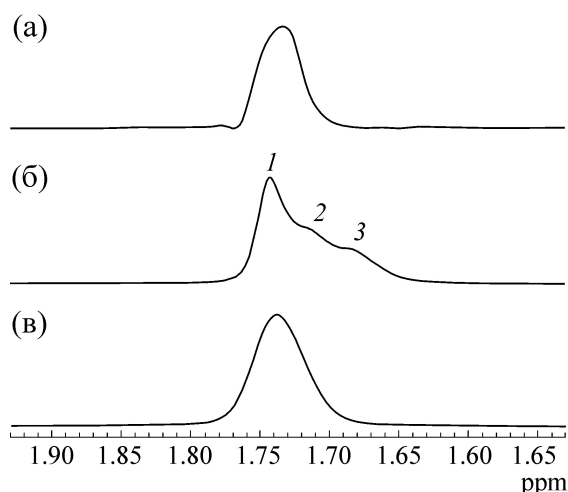
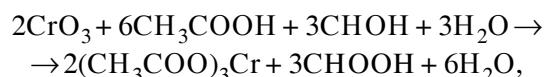


Рис. 3. ^1H -ЯМР-спектры в области поглощения протонов ацетата: (а) – сразу после добавления хрома, (б) – через 6 ч, (в) – через 24 ч. Цифрами обозначены сигналы, проявляющиеся через 6 ч.

основе сравнения с данными Б. Кассельмана [5, 6] можно предположить, что за пик 258 нм отвечает ион $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, за пик 351 нм – ион HCrO_4^- , а за пик 436 нм – ион CrO_4^{2-} . Однако в работе Люцена и др. (Lucena et al., 1970, цит. по работе [7]) приводятся данные, что максимум поглощения бихромат-ионов наблюдается при 350 нм ($\epsilon = 750$). В любом случае все указанные максимумы связаны с ионами хрома (VI) и падение уровня указанных максимумов, показанное в наших опытах, отражает уменьшение в растворе концентрации разных ионов хрома (VI).

При реакции формальдегида с хромом (VI) необходимые электроны для восстановления хрома (VI) до хрома (III) появляются в результате окисления формальдегида до муравьиной кислоты.

Реакция, протекающая в хромсодержащих фиксаторах в присутствии формальдегида и уксусной кислоты и проходящая согласно уравнению



использована в изобретении «Способ получения ацетата хрома» [8]. Результаты изучения окислительно-восстановительных реакций хрома (VI) с разными восстановителями – сульфитом натрия, аскорбиновой кислотой, перекисью водорода – показало, что при восстановлении хрома (VI) наблюдалось появление максимума в области 580 нм, характерного для хрома (III), и уменьшение максимума в области 420 нм [9].

Таблица 2. Оптическая плотность растворов хромсодержащих фиксаторов в разное время после их приготовления

	Максимумы поглощения		
	258 нм	351 нм	436 нм
Фиксатор Навашина			
Контроль*	0,74**	0,53	0,08
через 3 ч	0,40	0,26	0,07
через 6 ч	0,30	0,24	0,07
через 24 ч	0,20	0,08	0,02
Фиксатор Чиаччио			
Контроль	0,88	0,64	0,11
через 3 ч	0,82	0,59	0,08
через 6 ч	0,82	0,59	0,08
через 24 ч	0,74	0,51	0,07
Фиксатор Рего			
Контроль	1,15	0,70	0,10
через 3 ч	1,14	0,68	0,10
через 6 ч	1,14	0,68	0,10
через 24 ч	1,12	0,67	0,10

Примечание. * – Первая минута после приготовления фиксаторов; ** – значения D приведены для кюветы с длиной оптического пути 0,5 см.

Таблица 3. pH растворов хромсодержащих фиксаторов в разное время после приготовления

Фиксатор	Через 0–2 мин	Через 6 ч	Через 24 ч
Фиксатор Навашина	1,41	2,63 (+1,22)	2,80 (+0,17) 3,00*
Фиксатор Чиаччио	2,37	3,24 (+0,87)	3,49 (+0,25)
Фиксатор Рего	3,74 4,70*	4,48 (+0,74)	4,71 (+0,23) 4,85*

Примечание. * Данные из работы Б. Кассельмана [5].

Таблица 4. Динамика изменения E_h хромсодержащих фиксаторов

Время от начала измерений, мин	Фиксатор Навашина	Фиксатор Рего	Фиксатор Чиаччио
0	674,3	340,2	494,2
5	666,7	176,6	290,6
10	620,1	72,4	253,5
15	578,0	48,0	249,1
20	551,6	42,5	247,9
25	534,0	38,4	247,7
30	521,4	37,0	247,9

Наши данные показывают, что с уменьшением пиков в спектрах поглощения хрома (VI) нарастает пик 580 нм, что можно объяснить образованием в фиксаторах ацетата хрома (III).

Таким образом, как показано в наших опытах, уже в течение первых часов (минут) в растворе Навашина и бихроматных фиксаторах Чиаччио и Рего происходят реакции, значи-

тельно изменяющие первоначальный состав фиксатора – с нарастанием концентрации хрома (III) (в виде ацетата хрома), уменьшением концентрации хрома (VI), уменьшением концентрации формальдегида и увеличением в фиксаторе концентрации муравьиной кислоты.

Восстановление хрома (VI) и окисление формальдегида сопровождается падением значений Eh и увеличением уровня pH, что также происходит с первых минут приготовления фиксаторов.

Попытки использовать ЯМР-спектроскопию для анализа концентрации формальдегида и уксусной кислоты в ходе окислительно-восстановительных реакций в фиксаторе Навашина не привели к однозначным результатам.

Изменения в ^1H -ЯМР-спектрах в области поглощения протонов ацетата наблюдаются в зависимости от времени после добавления ионов хрома. Сразу после добавления сигнал представлен широкой ассиметричной линией без заметных признаков присутствия под этой широкой огибающей дополнительных сигналов. Вершина этого сигнала на 10 Гц смещена в область высоких полей (рис. 3а). В спектре, полученном через шесть часов (рис. 3б), наблюдаются три сигнала, смещенные в область высоких полей: сигнал 1 – с интенсивностью, равной единице; сигналы 2 и 3 – с интенсивностями ~0,6 и 0,3 относительно первого, основного сигнала. Через 24 ч сигнал превращается в широкий симметричный синглет (рис. 3в), что означает завершение основных химических превращений в исследуемом образце. Появление трех сигналов к шестому часу после добавления ионов хрома по соотношению интенсивностей напоминает значения концентраций ионов хрома в 0,17 М хромовой кислоте (по расчетам Б. Кассельмана [5]). Через сутки процессы прекращаются и сигнал ацетата скорее всего связан с появлением ацетата хрома, который соответствует пику 580 нм в спектрах поглощения.

Мы пытались использовать хромотроповую кислоту для анализа кинетики окисления формальдегида в фиксаторе Навашина. Однако, по-видимому, присутствие в смеси фиксаторов хрома не позволило получить достоверные результаты.

Данные об изменении морфологии клеток под действием хромосодержащих фиксаторов детально описаны в монографии автора [10]. В работах [11–13] было изучено действие на растительные клетки солей хрома (VI). Показано, в частности, влияние pH среды на разную сохранность внутриклеточных структур. Точка перехода «кислых» изображений в «основные»

наблюдалась при pH 4,6. По данным Б. Кассельмана точка такого перехода лежит в области pH 3,4–3,6 [5]. Влияние хрома (III) на биологическую ткань изучено недостаточно [14].

В работах Г.А. Левицкого детально изучено действие исходных реагентов и их смесей в фиксаторе Навашина на клетки и ткани и отмечено, что надо учитывать химическое взаимодействие между реагентами данного фиксатора [15]. В ряде работ последователей С.Г. Навашина были описаны важные детали практического применения фиксатора Навашина в цитологии растений [16,17] и предлагалось готовить смесь непосредственно перед фиксацией биологического материала ([16–19] и др. работы). Наши данные показывают, что такая практическая рекомендация не имеет смысла.

Как следует из наших измерений, СХФ представляют *неустойчивую* химическую смесь с быстрой кинетикой окислительно-восстановительных процессов, а фиксация происходит в нестационарном растворе переменного состава, включающего *хромовую кислоту, бихроматы (хром (VI)), формальдегид, уксусную кислоту, муравьиную кислоту и ацетат хрома (III)*.

Главный механизм участия хромовой кислоты и хроматов в составе фиксаторов связан с образованием координационных связей с биохимическими лигандами в биологической ткани. Координационные центры хрома (III) с числом 6 участвуют в образовании лаков с рядом протравных красителей, широко используемых для окраски клеточных структур ([20,21] и др. работы).

Для процесса фиксации имеет значение скорость проникновения фиксирующих реагентов в биологическую ткань. Показано, что формальдегид и уксусная кислота приблизительно в три–четыре раза быстрее фиксируют ткани по сравнению с хроматами [1,22–25].

ВЫВОДЫ

1. СХФ представляют *неустойчивую* химическую смесь с быстрой кинетикой окислительно-восстановительных процессов, а фиксация биологического материала происходит в нестационарном растворе переменного состава, включающего *хромовую кислоту, бихроматы (хром (VI)), формальдегид, уксусную кислоту, муравьиную кислоту и ацетат хрома (III)*.

2. Необходимо разделить химическую фиксацию при помощи СХФ на два последовательных процесса («*двухступенчатый протокол фиксации*»). На первой стадии следует проводить фиксацию ткани в смеси формальдегида

с уксусной кислотой (быстро проникающая фиксирующая смесь), а затем, после тщательной промывки, проводить «хромирование» ткани для эффективного использования протравных красителей. Такой протокол как минимум позволит сохранить исходный состав сложных хромсодержащих фиксаторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 14-08-00-295).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Baker, *Principles of biological microtechnique. A study of Fixtion and Dyening* (Methium and Co LTD, London – Jonh Wiley and Sons Inc., New York, 1958).
2. W. Flemming, *Archiv fur Mikroskopische Anatomie* **16**, 302 (1879).
3. F. Sanfelice, *Ann. de l'Institut Pasterur* **32** (8), 363 (1918).
4. А. Ю. Буданцев, *Журн. аналит. химии* **71** (9), 927 (2016).
5. W. G. B. Casselman, *Quart. J. Microscop. Sci.* **96** (2), 203 (1955).
6. W. G. B. Casselman, *Quart. J. Microscop. Sci.* **96** (2), 223 (1955).
7. А. К. Лаврухина и Л. В. Юкина, *Аналитическая химия хрома* (Наука, М., 1979).
8. М. И. Рудь, Е. Г. Гаевой, Р. С. Магадов и др., А. с. РФ №:2186030, Б.И., 27 Июля (2002).
9. В. М. Иванов, Я. И. Щербакова и В. Н. Фигуровская, *Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия* **52** (6), 413 (2011).
10. А. Ю. Буданцев, *Гистологический процессинг* (Наука, М., 2015).
11. С. Zirkle, *Protoplasma* **4**, 201 (1928 a).
12. С. Zirkle, *Bot. Gas.* **86**, 402 (1928 б).
13. С. Zirkle, *Protoplasma* **5**, 511 (1929).
14. J. A. Kiernan, *Histochem. J.* **17**, 1131 (1985).
15. Г. А. Левицкий. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции* **27** (1), 175 (1931).
16. М. С. Навашин, *Методика цитологического исследования для селекционных целей* (Сельхозгиз, М., 1936), Изд. 2-е, исправленное.
17. М. С. Навашин и Е. Н. Герасимова-Навашина, *Ботан. журн.* **43**, 167 (1958).
18. Р. П. Барыкина, Т. Д. Веселова, А. Г. Девятков и др., *Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы* (Издательство МГУ, М., 2004).
19. G. P. Berlyn and J. P. Miksche, *Botanical microtechnique and histochemistry* (Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, 1976).
20. Б. Н. Мельников и Г.И. Виноградова, *Применение красителей* (Химия, М., 1986).
21. J. D. Bancroft and A. Stevens, *Theory and practice of histological techniques* (Churchill Livingstone, Edinburg, London, New-York. 1977).
22. W. T. Dempster, *Amer. J. Anatomy* **107**, 59 (1960).
23. D. Hopwood, *Histochem. J.* **1**, 323 (1969).

Oxidation-Reduction Reactions in Chromium-Containing Stabilisers of Biological Material

A.Yu. Budantsev and V.P. Kutysenko

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The results of a study on the kinetics of oxidation-reduction reactions in chromium-containing stabilisation reagents (mixture of chromic acid, bichromate, formaldehyde and acetic acid) have shown that these fixatives represent an unstable chemical mixture with the rapid kinetics of oxidation-reduction processes. In this connection, fixation of a biological material occurs in a non-stationary solution with a variable composition containing chromic acid, bichromate (chromium VI), formaldehyde, acetic acid, formic acid and chromium (III) acetate. It is proposed to divide chemical fixation in these fixators into two successive processes ("two-stage fixation protocol"): fix the tissue in a formaldehyde-acetic acid mixture (a rapidly penetrating fixing mixture (the first stage), and then, after thorough washing, tissue is treated with chromium for the subsequent use of mordant dyes (the second stage). Such a protocol is at least suitable for use in conservation of the original composition of chromium-containing fixatives.

Keywords: oxidation-reduction reactions, chromic acid, formaldehyde, acetic acid, spectral methods, methods of electrochemical analysis