



ГЛОБА
Ольга Федорівна,
кандидат історичних наук,
доцент кафедри біології та методики
навчання ДВНЗ «Переяслав-Хмельницький
державний педагогічний університет імені
Григорія Сковороди»
(м. Переяслав-Хмельницький)

З ІСТОРІЇ ТЕХНІКИ МІКРОСКОПІЇ ХІХ СТ.

У статті висвітлюється історія створення і застосування різних технік дослідження біологічних об'єктів, винахід барвників, що використовувалися для виготовлення препаратів у мікроскопії.

В статье рассказывается история изобретательства и использования разных техник исследования биологических объектов, изобретение красок, которые использовались для изготовления препаратов в микроскопии.

The article tells the story of invention and the use of different techniques of biological research, the invention of colors that have been used for the manufacture of drugs in microscopy.

Вступ. Потреба проникнення в «тонку» (мікро-) структуру клітини спонукала вчених до пошуків нових методів і техніки мікроскопічного дослідження. Вся остання чверть ХІХ ст. проходила під знаком удосконалення мікроскопічної техніки, до того ж це стосується як самого мікроскопу і низки допоміжних приладів, так і методики підготовки об'єктів для вивчення. Висунуте Брюкке припущення щодо складності будови елементарного організму – клітини – мало апіорний характер; фактичних даних для такого припущення в ХVІІІ ст. – на поч. ХІХ ст. ще не існувало [1, с. 206]. Щоб клітина у розумінні біолога перестала бути «простою грудочкою» протоплазми, потрібні були досконаліші методи дослідження ніж ті способи мікроскопічного вивчення тканин, які використовувалися в першій половині ХІХ століття.

Виклад основного матеріалу. Мікроскоп, як би він не був удосконаленим, не дав би можливості проникнути у тонкі гістологічні структури, як би

паралельно з удосконаленням мікроскопа не розвивалася техніка обробки матеріалу, техніка виготовлення «мікроскопічного» препарату. Мікроскопісти першої половини ХІХ ст. вивчали тканини або у свіжому стані, або у стані початкових після смертних змін. Методи підготовки матеріалу біологічного об'єкту обмежувалися розщепленням або роздавлюванням тканин і використанням таких реактивів як оцтова кислота, луги, йод і рідко – спирт. Постійних препаратів протягом першої половини ХІХ ст. не виготовляли або майже не виготовляли, і це, звичайно утруднювало вивчення об'єкту [1, с. 207].

Вже у другій чверті ХІХ ст. починаються пошуки консервуючих рідин, в яких можна було б зберігати препарат протягом тривалого часу. Головним інгредієнтом у таких рідинах була сулема, яка використовувалася у великому розведенні (дуже малій концентрації). У 1839 р. Гудбай (Goodbay) запропонував «універсальну консервуючу речовину» для виготовлення постійних препаратів. До її складу входили сулема, поварена сіль і квасці. Узавши згаданий склад консервуючої речовини за зразок, низка інших мікроскопістів намагалися створити інші варіанти консервуючих речовин. Як виявлялося, вони були поганими і у більшості випадків дослідник не міг вивчати об'єкти і розв'язувати поставлені перед собою завдання.

Але потрібно відмітити, що позитивне значення запропонованих на поч. ХІХ ст. консервуючих речовин полягає у тому, що усі вони мали перевагу вивчення тканин не у повітрі (сухому стані), а у рідинному середовищі, і тому, починаючи з 40-х років ХІХ ст., були зроблені дослідниками спроби знайти зручні консервуючи речовини, які б використовувалися при дослідженні об'єкту. З іншого боку, консервуючи рідини того часу мали й негативне значення. У той час як вивчалися переважно свіжі об'єкти, поява консервуючих рідин призвела до того, що дослідник піддаючи тканину розщепленню або роздавлюванню, занурюючи її у консервуючи рідину вважав, що ним виготовлений «постійний» препарат. У дійсності ж об'єкт підлягав у цих рідинах таким змінам, що будова не зберігалася і, вивчалися не відповідаючи дійсності залишки структури [1, с. 207].

Лише з 60-х років XIX ст. почали використовуватися більш раціональні методики занурення об'єкту у рідке середовище. Задовільною методикою виявилось занурення об'єкту у гліцерин, яке почали вперше використовувати в Англії. Поряд з гліцерином використовувалися різні суміші: гліцерин із желатиною, гліцерин із гуміарабіком. Ці речовини давали беззаперечну перевагу перед водою і в 60-х роках XIX ст. мали широке застосування.

Здавна пробували використовувати і канадський бальзам [2, с. 50], звичайне середовище для занурення об'єктів у сучасній мікротехніці. Ще у 1832 р. його намагався використовувати Бон (Bond), а у 1835 р. – Прічард (Pritchard J.C., 1786–1848). Але перші спроби застосування канадського бальзаму давали погані результати, оскільки об'єкти попередньо підлягали просушуванню. Вперше у 1851 році англійський невролог Кларк (Jacob A.L. Clarke) під час виготовлення препаратів мозку замінив висушування їх на зневоднення спиртом, а потім просвітлення його у скипидарі. Так, ще у 1868 р. англійський мікроскопіст Біл (Beal L.S.B., 1828-1906), у посібнику мікротехніки вказує, що при використанні канадського бальзаму об'єкт має бути висушений при високій температурі. Методика Кларка також не давала хороших результатів, оскільки зневоднення було недостатнім.

У 1865 р. німецький патологоанатом Ріндфлейш (Rindfleisch, 1836–1908) запропонував використовувати гвоздичну олію, а в 1863 р. російський гістолог К.З. Кучін (1834–1895), пізніше дерптський анатом Л.Х. Штіда (1837–1918) використовували креозот (Креозот, креозотове масло, Kreosotum, Creosotum від грец. *kreas* – м'ясо и *sozo* – зберігаю. Вперше цим ім'ям було названо речовину, виділену Рейхенбахом (Reichenbach; 1832) з букового дьогтю. Пізніше (1863), коли було отримано з кам'яновугільного дьогтю карболову кислоту, припускали, що вона і креозот Рейхенбаха – одна й та сама рідина, аж доки Лоран і Рунге (Loran, Runge) не показали їхні відмінності [3]). Л. Штіда також увів у використання бергамотну олію. Найкращим серед згаданих сполук був креозот, при його застосуванні препарати були краще зневодненими. Лише в 70-х рр., коли навчилися учені проводити достатнє зневоднення об'єкта

(препарату), канадський бальзам отримав перевагу перед іншими речовинами і знайшов широке застосування під час біологічних досліджень.

Слід зазначити, що головним недоліком старої техніки виготовлення постійних препаратів була відсутність фіксації. Методи фіксації виникли на основі методики ущільнення тканин. Для виготовлення зрізів з м'яких тканин дослідники шукали засоби їх ущільнення. Одним із перших рідину для ущільнення почав використовувати Пуркіне. У 40–50-х рр. ущільнення тканин під час виготовлення препаратів стає загальноприйнятим [1, с. 208].

У 1840 р. датський анатом і патолог Ганновер (Hannover Adolph H., 1814–1894) публікує у «Мюллеровском архиве» статтю «Хромовой кислоте, превосходном средстве для микроскопических исследований», і з цього часу хромова кислота стає одним із поширеніших реактивів, які використовувалися для ущільнення тканин при виготовленні препаратів, а у подальшому – і фіксації тваринних тканин. Пізніше для цієї мети починають використовувати двохромокислий калій [1, с. 208]. У пошуках кращих речовин для збереження структури тканин мікроскопісти намагаються скласти складні фіксатори, до складу яких входили різні інгредієнти. Г. Мюллер (Müller H., 1820–1864), професор анатомії в Вюрцбурзі, відомий своїми дослідженнями з анатомії ока, запропонував у 1859 р. ущільнюючу рідину, до складу якої входили двохромокислий калій і сірчаноокислий натрій, відому у подальшому як «мюллерівська рідина». Вона на протязі багатьох років була поширенішим гістологічним фіксатором. У кінці 60-х рр. французький гістолог Ранв'є (Ranvier Louis A., 1835–1922) запропонував для ущільнення та фіксації пікринову кислоту, яка знайшла у подальшому широке застосування.

Значне досягнення у фіксації тканин було досягнуто завдяки застосуванню сулеми. З консервуючих рідин вона використовувалася давно, але її концентрація була недостатньою для фіксації тканин. В якості фіксатора сулема ввійшла в гістологічну техніку лише після 1878 р., коли швейцарський зоолог Ланг (Lang Arnold, 1855–1914) запропонував її у концентрованих розчинах і в комбінації з оцтовою кислотою (Для фіксації тонких гістологічних

структур сулему вперше використав видатний німецький фізіолог Рудольф Гейденгайн (Heidenhain Rudolf, 1834–1897) у 1888 р.). Інгредиенты для фіксаторів збагатилися у подальшому введенням у гістологічну техніку осмієвої кислоти (Макс Шульце, 1864), яка зберігала особливо добре ліпоїдні структури клітини. Використання осмієвої кислоти в якості фіксатора в комбінації з іншими реактивами широко увійшло до гістологічної практики. Флеш (Flesch Max) у 1879 р. запропонував комбінацію хромової й осмієвої кислот, а у 1882 р. Флемінг, один з великих гістологів кінця XIX ст., запропонував свою відому фіксуєчу рідину. (Впритул до 70-х років XIX ст. мікроскопісти говорили не про фіксацію, а про консервування та ущільнення тканин. Термін «фіксація» і зв'язане з ним поняття увійшло у вжиток лише на початку 80-х рр. XIX ст.) До складу флеммінговської рідини входили хромова, осмієва і оцтова кислоти; вона довгий час вважалася кращим фіксатором для вивчення тонкої будови (мікроструктури) клітин. Фіксуєчі рідини XX ст. Шампі та Мевеса являють собою її модифікацію. У 1894 р. К. Ценкер (Zenker K.) запропонував свій варіант мюллерівської рідини, додавши до неї сулему і оцтову кислоту. Ценкерівська рідина довгий час залишається однією з кращих і використовуваних фіксаторів. У 1893 р. Блум (F. Blum) вводить у практику формалін, який отримав у подальшому широке застосування як фіксатор.

Таким чином, до 80-х рр. XIX ст. гістологія збагатилася значним арсеналом фіксаторів, які зберігали структуру тканин [1, с. 209]; відійшло на другорядний план вивчення тканин свіжо виготовлених препаратів; поповнюється перелік реактивів, які використовувалися для фіксації гістологічних об'єктів; збільшується кількість пропозицій щодо складу фіксуєчих рідин і сумішей, з яких лише невелика кількість міцно увійшла в мікроскопічну практику.

У цьому розвитку мікроскопічної техніки не можна не відмітити негативного моменту. По-перше, успіхи методів фіксації привели до того, що дослідження свіжого матеріалу було покинуто; структури фіксованої

протоплазми без критики сприймалися як прижиттєві структури, і на цьому ґрунті було немало захоплень і зроблено немало помилок. Сама методика фіксації розвивалася емпірично: дослідники, експериментуючи той чи інший фіксатор, часто не виходили з наукових позицій, а безсистемно відшукували практично придатні реактиви [6].

Оскільки вже з XVIII ст. почали застосовувати для мікроскопії проникаюче світло, виникла потреба відповідної обробки біологічного об'єкта. Дослідники першої половини XIX ст. намагалися обійти ці труднощі вивченням тонких плівок або шматочків тканин, які попередньо підлягали розщепленню голками або роздавленню. Це грубо порушувало структуру тканин. По відношенню до більш щільних тканин для отримання тонких прозорих пластинок почали застосовувати лезо (бритву). М'які тканини, під час виготовлення з них зрізів за допомогою леза, затискали у м'яку частину гілки бузини або в ущільнену довгим перебуванням у хромовій кислоті печінку. В середині XIX ст. для виготовлення зрізів стали застосовувати заливання в більш щільну речовину. У п'ятидесятих роках ботанік Фенцль (Fenzl Eduard) запропонував для цієї мети парафін, в 1856 р. Бьотхер (Böttcher A.V., 1831–1889), професор в Дерті почав застосовувати желатину. Спочатку при заливанні в парафін не виходило просочування ним об'єкта, і, природно, що таке заливання не давало позитивних результатів. В кінці 70-х рр. починають використовувати проміжні рідини: гвоздична олія, креозот, бергамотна олія, ксилол; але лише з введенням заливання в термостатах (Giesbrecht W., 1881) (Гісбрехт уперше застосував в якості проміжної речовини хлороформ). Застосування парафіну дало позитивні результати і увійшло в постійну практику мікроскопічної техніки. У 1879 р. французький гістолог Дюраль (Duval Mathias, 1844–1907) запропонував нову речовину для заливання об'єктів – колодій. Німецький гістолог Шіффердеккер (Schiefferdecker Paul, 1849–1931) замінив колодій целоїдином, який, поряд з парафіном, став головною речовиною, яка використовувалася для заливання тонких зрізів [1, с. 210].

Оскільки виготовлення тонких зрізів ручною бритвою потребувало майстерності і все ж таки товщина їх була надто великою, виникла думка щодо конструкції спеціального приладу для отримання тонких зрізів – мікротома. Однією з перших спроб такого типу – «резательная машина» – була згідно конструкції Каммінгса описана Дж. Гіллом. Існувало ще кілька аналогічних конструкцій, які не знайшли свого постійного застосування.

Сучасний мікротом бере свій початок від мікротому Ошатца (учня Пуркіне), сконструйованого у 1844 р. [1, с. 115]. Удосконалений німецьким анатомом Велькером (Welcker Hermann, 1822–1897), мікротом до кінця XIX ст. піддавався багато чисельним реконструкціям. Перші, як їх називали циліндричні, мікротоми являли собою об'єктотримач, що пересувався за допомогою мікрометричного гвинта; зрізи робили ручною бритвою, яку під час виготовлення зрізів проводили по поверхні платформи, розташованої у верхній частині мікротома. Впритул до останньої чверті XIX ст. мікротом не користувався попитом, оскільки не існувало задовільного способу заливки об'єктів з достатнім просочуванням кусочків органів і тканин. Лише в 70-х рр., завдяки працям Гіса (His Wilhelm, 1831–1904), мікротом починає знаходити широке застосування і до кінця XIX ст. остаточно витісняє виготовлення зрізів ручним способом. У Росії перший мікротом сконструював київський гістолог П.І. Перемежко [7]. Використання мікротома дало можливість виготовляти тонкі зрізи і отримувати неперервні серії зрізів, що знаменувало великий успіх в мікроскопії.

Якщо вивчаючи тканини прижиттєво можливо було замітити деякі структури, використовуючи різне переломлення світла окремих частин препарату (особливо з появою часткового відмирання тканин), то і ці обмежені можливості були практично втрачені при появі і застосуванні методів ущільнення і фіксації. Постала необхідність винайдення способів виявлення різних структур клітини після фіксації тканин і це було досягнуто завдяки застосуванню зафарбування зрізів. У 1858 р. Корті (Corti A., 1822–1876), досліджуючи у 1854 р. орган слуху, важлива частина якого названа в честь

вченого, використав для забарвлення мікроскопічних препаратів кармін (кармін представляет собой экстракт кошенили (паразитических Hemiptera – Coccus cacti) и встречается только в жировом теле и яичном желтке самок этих насекомых. Кармін является незаменимым красителем для тотального окрашивания простейших, мелких многоклеточных организмов, эмбрионов, а также самых различных объектов, при изучении их микроскопической анатомии. Дает отличное четкое окрашивание ядер. [4]). Для ботаничних об'єктів кармін був використаний ще раніше Геппертом і Коном (Goepfert and Cohn) у 1849 р. та Гартінгом (Harting Pieter H., 1812–1885) у 1854 р. Але розповсюдження кармін набув лише з 1858 році [6], коли Герлах (Gerlach Josef, 1820–1895) запропонував розчин аміачного карміну в якості барвника, який специфічно забарвлював ядро, і у 80-х роках [1, с. 211] кармін став найулюбленішим барвником, що використовувався у повсякденній мікроскопічній практиці.

У 1865 році [7] Бюмер (Böhmer F.) ввів у гістологічну техніку новий барвник – гематоксилін, але впритул до 90-х років XIX ст. він не витримав конкуренції з карміном. Лише з 90-х років гематоксилін поступово витісняє кармін і стає головною фарбою, що використовується на практиці для фарбування ядра. Особливого значення набув метод фарбування гематоксиліном із протравленням залізними квасцями, розроблений видатним гістологом кінця XIX ст. Мартіном Гейденгайном у 1892 р. Цей метод протягом XX ст. належав до числа кращих способів забарвлення найтонших структур клітин.

У 60-х рр. XIX ст. почали використовувати для фарбування мікроскопічних препаратів анілінові фарби, які з 70–80-х рр. знаходять широке застосування. Наприклад, індигокармін, введений у гістологічну техніку Меркелем (Merkel) в 1874 р., еозин – Фішером (Fischer Ernst) в 1875 р., кислий фуксин – Ерліхом (Ehrlich Paul) в 1880 р., сафранін – Германом (Hermann E.) в 1888 р.

Слід згадати й прізвище відомого німецького вченого Роберта Коха (1843–1910), майстра прикладних досліджень, який зробив неоціненний внесок у мікробіологію: удосконалив мікробіологічну техніку, застосував імерсійні об'єктиви, мікрофотографію; використав анілінові барвники; запропонував методи виділення чистої культури та щільні живильні середовища.

Мікроскопія збагачується новим арсеналом речовин для виявлення різних тканин і клітинних структур, про які – під час застосування відповідних методів фіксації і фарбування – мікроскопісти першої половини ХІХ ст. не могли навіть і мріяти. З'ясовано, що в мікроскопічну техніку були введені й деякі інші методи. Так, застосовувалося зафарбування гематоксиліном і пікрофуксином, введене Ван-Гізеном (Ira Thompson van Gieson, 1866–1913) у 1889 р.; широко відомий метод фарбування сполучної тканини за Маллорі (Mallory Frank B., 1862–1941) в оригінальній модифікації запропонований в 1900 році, а його видозміна – азановий метод М. Гейденгайн увів у 1915 році. Нуклеїнова реакція за Фьольгеном (Feulgen Robert, 1884–1955), що використовувалася активно у ХХ ст. запропонована у 1923 році. Методи сріблення почали широко входити у використання після робіт Гольджі, перша з яких опублікована у 1873 р. [7]. Метод сріблення Більшовського (Bielschowsky M., 1869–1940), запропонований у 1903–1904 р. Метиленовий синій для дослідження нервової системи увійшов у використання після робіт О.С. Догеля (1852–1922) і О.Є. Смірнова (1859–1910) [7], проведених у казанській лабораторії К.А. Арнштейна (1840–1919) та опублікованих у 1887 році [1, с. 212], [5, с. 155].

Але історія науки має не лише прихильників нововведень, так, київський гістолог Петро Іванович Перемежко (1833–1893) використовував як живий так і фіксований матеріал не використовуючи барвники, вважаючи, що застосування фарб не дає ніяких переваг [1, с. 223]. У своїх роботах він використовував для фіксування лише спирт і хлористе золото [1, с. 224].

Висновки. Завдяки фіксації біологічного матеріалу та отриманню з нього найтонших зафарбованих зрізів дослідники кінця ХІХ ст. мали можливість значно глибше проникнути в таємницю будови тканин і клітин, завдяки чому

була зроблена низка великих відкриттів. Наприклад, у 1833 р. Р. Браун відкрив постійний компонент клітини – ядро. У 1861 р. М. Шульцце затвердив погляд на клітину, як на «грудочка протоплазми з розташованим всередині неї ядром» [7]. У 70-х рр. XIX ст. групою дослідників одночасно і незалежно один від одного був відкритий непрямий спосіб поділу клітин – каріокінез, або мітоз. Вивчення мітозу й запліднення привернуло особливу увагу дослідників до ядра клітини та з'ясуванню його значення в процесі передачі спадкових ознак. У 1884 р. О. Гертвиг і Є. Страсбургер незалежно один від одного висловили гіпотезу про те, що хроматин є матеріальним носієм спадковості. З вивченням ядра клітини, було звернено увагу на більш глибокий аналіз і цитоплазми. Успіхи мікроскопічної техніки обумовили відкриття в цитоплазмі органел (клітинного центру, або центросоми, О. Гертвиг і Ван-Бенеден у 1875–1876 рр.; комплекс Гольджі, 1898 р.; тощо).

Таким чином, на основі успішного розвитку мікроскопічної техніки і аналізу даних про мікроскопічну будову клітини остання чверть XIX ст. проходила під лозунгом проникнення у деталі мікробудови клітини, був накопичений величезний обсяг матеріалу, який дозволив виявити низку важливих закономірностей в будові та розвитку клітин і тканин. Саме у цей час вчення про клітину виокремлюється у самостійний розділ біології – цитологію. У той час, коли на початку XIX ст. вчення про клітину розробляється окремими вченими, у XX ст. цитологія вже розробляється багатьма дослідниками.

Кінець XIX ст. також ознаменувався боротьбою різних поглядів на будову цитоплазми (теорія «сітчастої будови» протоплазми (Гейцман, 1873); теорія «нитчастої будови» протоплазми (Флеммінг, 80-ті роки); теорія «пінистої будови (або комірчастої будови) цитоплазми (Бючлі, 1892); теорія «зернистої будови» цитоплазми (Альтман, 90-ті роки). Цієї проблеми не існувало, поки дослідники вивчали переважно живі об'єкти, проблема виникла з введенням складних методів обробки гістологічних препаратів.

Із розвитком колоїдної хімії з'ясовується примітивність морфологічних теорій постійної будови протоплазми. До 20-х рр. XX ст. ці теорії втрачають

позиції і чисто морфологічний напрям у вивченні протоплазми змінюється захопленням фізико-хімічними методами дослідження. Критичне відношення до оцінки фіксованих препаратів знайшло відображення у монографіях Харді (Hardy W.B.) «Строение протоплазмы клетки» і Фішера (Fischer Alfred, 1859–1913) «Фиксирование, окраска и строение протоплазмы» (1899). Уперше експериментально було показаний вплив методу обробки на структури, виявлені в препараті та була надана їм критична оцінка.

Відмітимо, що відкриття різних структур у клітинах припадає на невеликий відрізок часу. Потреба зазирнути у будову клітини чітко виявилася до кінця XIX ст.; це змушувало до пошуку нових методів дослідження і створило нову схему будови клітини, яка з'являється в усіх посібниках біології XX ст.

Мікроскопія як науковий метод отримала визнання лише в XIX ст. Предтечею цьому стало створення клітинної теорії, оскільки саме вона визначила інтерес до мікроскопічних спостережень. Мікроскоп став широко розповсюдженим інструментом біолога та вніс у біологію багато нового і специфічного, за його допомогою були створені особливі розділи науки про життя – цитологія і гістологія.

Список використаної літератури

1. *Кацнельсон З. С.* Клеточная теория в её историческом развитии / З. С. Кацнельсон. – Ленинград : Гос. изд-во мед. лит-ры, 1963.
2. *Кононский А. И.* Гистохимия / А. И. Кононский. – К. : Вища шк., 1976.
3. *Креозот* [електронний ресурс] // Большая медицинская энциклопедия. – Режим доступа : <http://medwiki.org.ua/article/Креозот>
4. *Кармин* – один из самых старинных красителей, применяемых в микроскопии [електронний ресурс]. – Режим доступа <http://mydoc.ru/2006/03/15/karmin-odin-iz-samyh-starinnyh-krasitelej/>
5. *Алексей Ефимович Смирнов (1859–1910 гг.)* : из истории формирования школы морфологов в Томске [електронний ресурс] / С. А. Некрылов, С. Ф. Фомин, С. В. Логвинов [и др.] // Сибирский мед. журн. – 2010. – Т. 25, вып. 4-1. – Режим доступа. – <http://cyberleninka.ru/article/n/aleksey-efimovich-smirnov-1859-1910-gg-iz-istorii-formirovaniya-shkoly-morfologov-v-tomske>
6. *Роскин Г. И.* Микроскопическая техника / Г. И. Роскин. – М. : Сов. наука, 1946.

7. *Микроскоп*. Развитие микроскопии. Открытие клетки [электронный ресурс]. – Режим доступа. – <http://meduniver.com/Medical/gistologia/12.html> MedUniver