

PRAKTYKA LABORATORYJNA

MARIAN GRUNDBOECK

Zasady i zastosowanie mikroskopii fluorescencyjnej

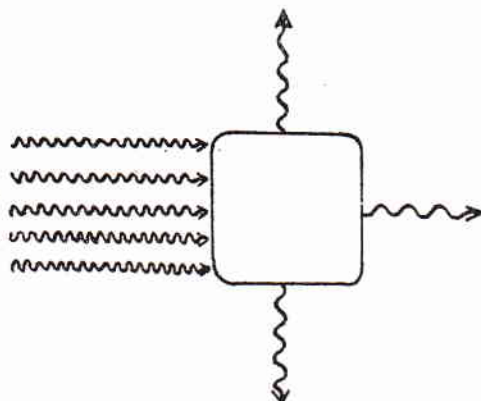
Z Pracowni Patologii Komórkowej Instytutu Weternarii w Puławach
Kierownik: prof. dr TADEUSZ ZULINSKI

Na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat mikroskopia fluorescencyjna wykazała niebywały rozwój. Znajduje ona zastosowanie w coraz to nowych kierunkach badań, zwłaszcza w naukach biologicznych i medycznych. Równocześnie udoskonala się sama metodyka badań. Szereg problemów naukowych rozwiązano przy użyciu metod fluorescencyjnych. Nadto metody te coraz większą rolę zaczynają odgrywać w praktyce, zwłaszcza w rozpoznawaniu niektórych schorzeń. Z roku na rok wzrasta ilość publikacji traktujących o tej metodzie, lub powołujących się na nią.

Zadaniem niniejszego artykułu jest przedstawienie zasad mikroskopii fluorescencyjnej oraz przykładów jej zastosowania, zwłaszcza w naukach weterynaryjnych.

Zasady fluorescencji

Niektóre substancje pod wpływem nasświetlania emitują promienie o innej, zazwyczaj większej długości fali. Zjawisko to nosi ogólną nazwę fotoluminescencji. Jeżeli proces absorpcji i emisji promieni jest w przybliżeniu równoczesny, mówimy o fluorescencji. W praktycznym zastosowaniu fluorescencji uzyskuje się świecenie o określonej barwie pod wpływem nasświetlania badanego ciała niewidzialnymi promieniami nadfioletowymi lub promieniami niebieskimi.



Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie zjawiska fluorescencji. Promienie pierwotne o krótkiej fali są pochłaniane przez substancję, która emituje widzialne promienie o długiej fali.

Do mikroskopii fluorescencyjnej potrzebny jest zwyczajny mikroskop, silne źródło światła, bogate w promienie o krótkiej długości fali oraz zestaw filtrów. Schematyczny układ tych elementów przedstawiono na ryc. 2.

Najłatwiej dostępne w naszych warunkach, a poza tym uniwersalne w zastosowaniu jest urządzenie produkcji C. Zeiss, Jena (NRD), zwane przez producenta Mikroskopierleuchte L. Głównym elementem tego urządzenia jest lampa rtęciowa HBO 50. Urządzenie jest zaopatrzone w filtry, z których dwa oznaczone literami UG służą do uzyskiwania oświetlenia nadfioletowego, dwa zaś ze znakiem EG do światła niebieskiego. Ponadto w urządzeniu są dwa filtry tzw. zamykające, nakładane na okular. Filtr żółty GG 9 zakłada się przy oświetleniu nadfioletowym, natomiast filtr pomarańczowy GG9/OG1 przy oświetleniu niebieskim. Zadaniem filtrów zamykających jest pochłanianie szkodliwych dla oka promieni o krótkiej długości fali.

Ponadto firma C. Zeiss, Jena, produkuje urządzenia fluorescencyjne do dużego, uniwersalnego mikroskopu „Nu” oraz urządzenia luminescencyjne, wyposażone w łuk węglowy, dostosowane do średniego mikroskopu LgOH, oraz innych mikroskopów podobnej wielkości.

oko badającego

filtr zamykający

okular

tubus

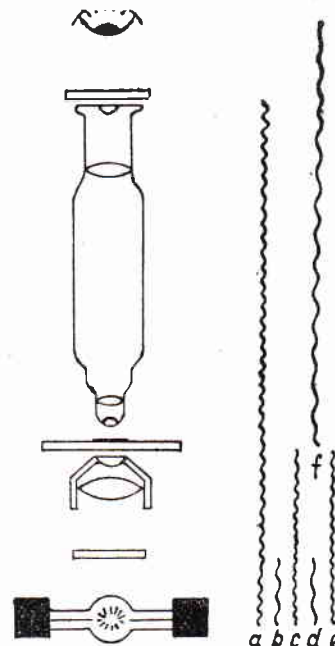
obiektyw

badany preparat

kondensator

filtr

lampa rtęciowa



Ryc. 2. Schemat mikroskopu fluorescencyjnego. Dla uproszczenia wszystkie elementy uszeregowano wzdłuż jednej osi. Jedynie powstały na skutek fluorescencji promień f dociera do oka obserwatora.

Urządzenia fluorescencyjne wysokiej jakości produkowane są również przez firmy: C. Reichert, Wiedeń, E. Leitz, Wetzlar (NRF) oraz przez wytwórnię w Związku Radzieckim.

Tylko niektóre substancje mogą wykazywać zjawisko fluorescencji. Należą tu między innymi liczne związki aromatyczne (benzen, naftalen, antracen itd.), oraz szereg związków heterocyklicznych (chinina, porfiryna, chlorofil itd.). Intensywną fluorescencją charakteryzują się również niektóre barwniki syntetyczne (fluoresceina, trypaflawina itd.). Zdolność fluorescencji zależy od obecności grup fluoroforowych w strukturze drobinowej substancji. Grupy te można porównać do grup chromoforowych w zwykłych barwnikach. Ponadto niektóre grupy, np. —CN mają zdolność wzmaganie własności fluorescencyjnych związku, inne natomiast, jak —NO₂ osłabiają wyraźnie fluorescencję. Istnieje ścisła relacja między procesem absorpcji i emisji promieniowania. Jeśli jakiś związek absorbuje tylko promienie nadfioletowe to emituje widzialne promienie fioletowe, lub niebieskie. Substancja pochłaniająca niebieskie promienie, daje zieloną, żółtą lub czerwoną fluorescencję. Większość barwników, używanych w badaniach fluorescencyjnych, zwłaszcza do znakowania przeciwciał, fluoryzuje w zielonym kolorze, a zatem wymaga niebieskiego oświetlenia preparatu.

Fluorescencja pierwotna

Proces fluoryzowania związków chemicznych, uwarunkowany ich szczególną strukturą drobinową, nazywa się fluorescencją pierwotną lub autofluorescencją. Substancje nie mające tych właściwości mogą również być badane przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego, ale po zabarwieniu odpowiednimi barwnikami. W tym drugim wypadku mamy do czynienia z fluorescencją wtórną.

Badania fluorescencji pierwotnej znajdują dotychczas niewielkie zastosowanie w naukach medycznych. Pochodzi to stąd, że tkanki zwierzęce (również człowieka) wykazują nikiłą fluorescencję, zwłaszcza w porównaniu z tkankami roślinnymi.

W komórkach zwierzęcych tylko zaródki wykazują słabą niebieskawą fluorescencję, jądro zaś pozostaje ciemne. Niektóre barwniki zawarte w komórkach, jak np. lipochromy i barwniki żółcia wykazują żółtawą lub oranżową fluorescencję. Wolne porfiryny fluoryzują czerwono, natomiast nem nie fluoryzuje. Obecności protoporfiryny przypisuje się zdolność do czerwonego fluoryzowania niektórych erytrocytów. Komórki te zwane fluorocytami stanowią z reguły poniżej 1% wszystkich erytrocytów, lecz w stanach chorobowych ilość ich może wzrastać. Krwinki białe, z wyjątkiem ziarnistości w eozynofiliach nie wykazują autofluorescencji.

Ponadto szereg witamin i niektóre hormony wykazują zdolność fluorescencji. Należą tu: witamina A₁, witamina A₂, tiamina, laktolawina, kwas nikotynowy i jego amid oraz witamin C.

Z hormonów należy tu wymienić hormony płciowe oraz noradrenalinę. Również koloid tarczycy wykazuje niebieską fluorescencję, której intensywność maleje przy niedoborze jodu.

W badaniach histologicznych wykorzystuje się niekiedy czerwoną fluorescencję niektórych nowotworów, spowodowaną spichrzeniem porfiryn.

Dokładna identyfikacja fluoryzującej substancji może być dokonana przy pomocy metod histospektrograficznych. Metody te opierają się na porównaniu widma światła fluoryzującej substancji z analogicznym widmem znanego związku chemicznego.

Szereg bakterii wykazuje zdolność autofluorescencji.

Fluorescencja wtórna

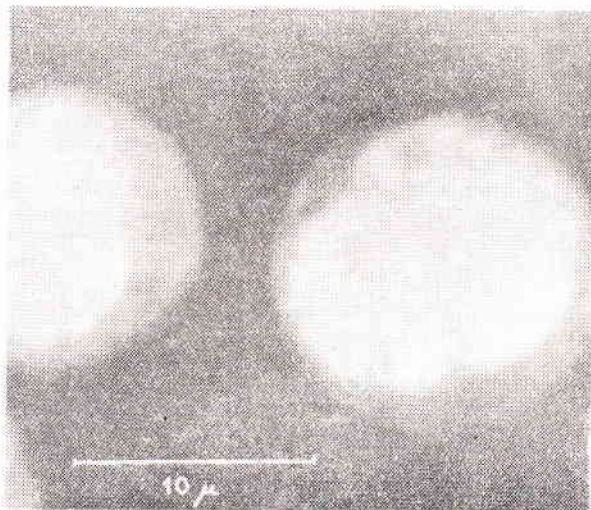
Tkanki zwierzęce i mikroorganizmy nie mające zdolności fluorescencyjnych można zabarwić fluoryzującymi barwnikami. Substancje te, zwane fluorochromami, są bardzo liczne. Najczęściej z nich stosowany jest oranż akrydynowy. Używa się go m. in. do określania lokalizacji kwasów nukleinowych w komórkach. Bertalanffy (3) opracował następującą metodę barwienia komórek zruszczonych z powierzchni błon śluzowych (żeńskich dróg rodnych, żołądka, dróg moczowych):

1. Utrwalić rozmaz w równych częściach alkoholu i eteru. (Gdy czas nagli, można to stadium pominąć).
2. Szybko przeprowadzić rozmaz przez alkohole 80, 70 i 50% oraz przez wodę destylowaną.
3. Spłukać krótko 1% kwasem octowym a następnie wodą destylowaną. Czynności wymienione w 2 i 3 punkcie powinny zająć 1 minutę.
4. Barwić 3 min. w 0.01% roztworze oranżu akrydynowego. (Roztwór przyrządzamy przez zmieszanie 1 części 0.1% roztworu wodnego barwnika z 9 częściami 1/15 M buforu fosforanowego, pH 6).
5. Przenieść rozmaz do 1/15 M buforu fosforanowego, pH 6, przynajmniej na 1 min. Rozmaz może jednak pozostać w tym buforze nawet przez kilka godzin.
6. Tonować w 0.1 M chlorku wapnia przez 1—2 min. aż jądra będą wykazywać jasnozieloną fluorescencję.
7. Spłukać buforem fosforanowym i nie osuszając przykryć rozmaz szkiełkiem nakrywkowym, kładąc to szkiełko na kropkę buforu.

Badając tak zabarwiony rozmaz w mikroskopie fluorescencyjnym stwierdza się zieloną lub zielono-żółtą fluorescencję kwasu desoksyrybonukleinowego

oraz czerwoną fluorescencję kwasu rybonukleinowego. Komórki nowotworowe, szczególnie bogate w kwas rybonukleinowy są przy użyciu tej metody łatwe do rozpoznania dzięki intensywnie czerwonemu zabarwieniu cytoplazmy.

Autor stwierdził, że podana powyżej metoda może być zastosowana do barwienia rozmazów krwi, szpiku, jak również preparatów odciskowych śledziony, grasicy, guzów nowotworowych itp. Fot. 1 przedstawia komórkę białaczkową barwioną oranżem akrydynowym. Barwienia dokonano w trakcie badań nad przeszczepialnym szczepem limfomatozy trzewiowej u kur.



Fot. 1. Komórki białaczkowe wywołanej doświadczalnie u kury szczepem limfomatozy RPL-12. Jedna z komórek w stadium podziału mitotycznego. Barwienie oranżem akrydynowym. Chromatyna jądrowa fluoryzuje jasno-żółto, zaródki zaś — intensywnie czerwono.

Armstrong i Niven (2) badali zmiany w zakresie kwasów nukleinowych w komórkach zwierząt zakażonych niektórymi wirusami. W doświadczeniu stosowano barwienie oranżem akrydynowym w pH 1.5 — 3.5. Wymienieni autorzy zakażali dwoma różnymi wirusami larwy owada *Tipula paludosa*. Jeden z wirusów powodował powstawanie ziarnistych tworów, fluoryzujących zielono w zarodki zakażonych komórek. W nie zakażonych komórkach zieloną fluorescencję, charakterystyczną dla kwasu desoksyrybonukleinowego, wykazywały tylko jądra. Drugi z wirusów powodował u wspomnianych larw powstanie patologicznych tworów w obrębie jąder. Twory te, fluoryzujące zielono, przedstawiały się później do zarodki i w nieco zmienionej postaci występowały też pozakomórkowo.

Ci sami autorzy badali również wpływ zakażenia wirusowego u myszy na obraz komórek, barwionych oranżem akrydynowym. Ciałka elementarne powstające w następstwie zakażenia myszy wirusem ospy, wykazywały zieloną fluorescencję. U myszy, zakażonych wirusem ektrmeli powstawały w zarodki komórek wątroby żółtozielone ciałka. Natomiast wirus zapalenia wątroby u myszy wywołał zwiększenie się ilości czerwono fluoryzującego materiału w zarodki.

Rozróżnienie komórkowego i wirusowego kwasu nukleinowego jest w pewnych wypadkach możliwe, gdyż wirusowy DNA wykazuje niekiedy oporność na działanie desoksyrybonukleazy.

Analogiczne badania przy użyciu oranżu akrydynowego przeprowadził Anderson (1) w odniesieniu do *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* i *Bacillus megaterium*, zakażonych bakteriofagami. Stwierdził on żółtozieloną fluorescencję związaną z obecnością bakteriofaga zarówno wewnątrz komórek, jak i pozakomórkowo. Substancja wywołująca tę fluorescencję ulegała rozkładowi pod wpływem desoksyrybonukleazy.

Mejsel i Gutkina (8) stosowali suprawitalne barwienie oranżem akrydynowym do badania zmian zachodzących w tkance limfatycznej pod wpływem promieni Rentgena. Prawidłowe komórki wykazywały po zabarwieniu mierną, zieloną fluorescencję, silniejszą w części jądrowej, słabszą w zarodki. Ale już pół godziny po naświetleniu pojawiały się zmiany w jądrach niektórych komórek. Jądra te fluoryzowały intensywnie w kolorze żółtozielonym, wykazując obrzęk oraz zgrubienie struktury chromatynowej. Prowadzone równocześnie badania histologiczne nie uwidaczniały w komórkach żadnych zmian.

Oranż akrydynowy bywa ponadto używany do rozróżniania komórek żywych od martwych. Leonhartsberger i Pakesch (7) podawali myszom dożylnie roztwór oranżu akrydynowego. W krwi pobranej następnie stwierdzali oni zieloną fluorescencję jąder i liczne czerwonozielone ziarnistości w zarodki żywych leukocytów. Martwe krwinki wykazywały natomiast pomarańczową fluorescencję jąder oraz blade zielone zabarwienie zarodki.

Przy pomocy barwienia oranżem akrydynowym można też rozróżnić żywe prątki gruźlicy od martwych; żywe fluoryzują zielono, martwe zaś — czerwono.

Barwienie oranżem akrydynowym jest bardzo polecane do wykrywania grzybów w rozmazach i skrawkach utrwalonych tkanek (9). Stosowano je również do określenia żywotności plemników buhaja (5) oraz do barwienia pasożytów zwierzęcych w krwi człowieka (10).

Przedstawione powyżej przykłady barwienia oranżem akrydynowym nie wyczerpują wszystkich możliwości zastosowania tego barwnika. Omówienie zaś innych fluorochromów nie jest możliwe w szczupłych ramach niniejszego artykułu. Należy tu jednak przynajmniej krótko omówić metodę barwienia drobnoustrojów kwasoopornych auraminą i rodaminą (6). Metoda ta posiada wielkie znaczenie praktyczne ze względu na przydatność do rozpoznawania gruźlicy i choroby Johnego. Skrawki narządów utrwalonych w 4% roztworze formaldehydu lub rozmazy utrwalone nad płomieniem barwi się w następujący sposób:

1. Barwić przesączonym roztworem auraminy i rodaminy w 60° C przez 10 min. (Skład barwnika: auramina O 1.5 g, rodamina B 0.75 g glicerol 75 ml, fenol krystaliczny rozpuszczony w 50° C 10 ml, woda destylowana 50 ml).
2. Płukać wodą z kranu 2 min.
3. Tonować w kwaśnym alkoholu (0.5% HCl w 70% etanolu) 2 min.
4. Płukać pod kranem 2 min.
5. Tonować w 0.5% nadmanganianie potasu 2 min.
6. Płukać pod kranem 2 min. i osuszyć.

Dalsze postępowanie, nie dotyczące już rozmazów tylko skrawków histologicznych, obejmuje odwodnienie w alkoholu absolutnym przez 15 sekund, prześwietlenie w ksylenie oraz zatopienie w niefluoryzującej substancji. Zabarwione tą metodą drobnoustroje kwasooporne (*Mycobact. tuberculosis*, *Mycobact. johni*) fluoryzują żółto z czerwonym odcieniem.

Obok fluorescencji wtórnej uzyskiwanej przy pomocy specjalnych barwników, spotykamy się z fluorescencją wywołaną wprowadzeniem do ustroju pewnych substancji np. leków. Szereg publikacji na ten temat dotyczy tetracyklin (4,11). Antybiotyki tej grupy podane w dawkach leczniczych gromadzą się wybiórczo w niektórych tkankach, które na skutek tego nabierają własności fluoryzowania światłem zielono-żółtym, żółtym, czy żółtopomarańczowym. Największe powinowactwo z tetracyklinami wykazuje tkanka kostna w okresie formowania się, a więc kości młodych zwierząt, świeże błony kostne i mięsokostniaki. Ponadto stwierdzono u ludzi pochłanianie tetracyklin przez nowotwory innego typu, a mianowicie raki żołądka, nowotwory szyjki macicy oraz raki skóry. Również wszczepione mięsaki u myszy fluoryzowały po podaniu tetracyklin. Badanie mikroskopowe

wykazało, że fluorescencja dotyczy histocytów i komórek siateczkowych zrębu tkanki nowotworowej, a nie samych komórek nowotworowych.

Również u szeregu nicieni z rodziny *Filariidae* stwierdzono zdolność intensywnego pocnlaniania tetracyklin zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* (12). Właściwość ta została wykorzystana w rozpoznawaniu schorzenia, wywołanego przez *Loa loa*.

Zalety i wady, mikroskopii fluorescencyjnej

Główną zaletą przedstawionej metody jest jej wielka czułość. Nawet drobne ilości fluoryzujących substancji uwidaczniają się wyraźnie jako jasne pola lub kropki, silnie kontrastujące z ciemnym tłem. W wypadku stosowania fluorescencji wtórnej stężenie używanych fluorochromów jest bardzo małe, co przyspiesza znacznie proces barwienia i nadaje temu barwieniu delikatny charakter. Przede wszystkim zaś słabe stężenie barwnika pozwala na barwienie żywych komórek i tkanek, tylko minimalnie zakłócając ich procesy fizjologiczne.

Badania fluorescencyjne należą do najszybszych i najprostszych metod histochemicznych, zwłaszcza w ustalaniu lokalizacji związków chemicznych, które same fluoryzują (witamina A, porfiryny itd), lub barwiących się swoiście fluorochromami (kwasy nukleinowe, lipidy itd.).

Mikroskop fluorescencyjny ułatwia ponadto liczenie drobnych obiektów na dużych powierzchniach. Można np. w ten sposób liczyć odpowiednio zabarwione bakterie, przy użyciu obiektywu o średnim powiększeniu.

Obok niewątpliwych zalet mikroskopia fluorescencyjnego wykazuje pewne cechy ujemne. Wymienić tu należy słabszą zdolność rozdzielczą mikroskopu fluorescencyjnego, co pozostaje w związku z różnokierunkowym rozchodzeniem się światła od obiektu fluoryzującego.

Poza tym nie jest łatwa ocena ilości fluoryzującej substancji na podstawie intensywności fluorescencji. Intensywność ta bowiem zależy od licznych chemicznych i fizycznych czynników i w związku z tym oznaczenia ilościowe obarczone są błędem standardowym rzędu 10—30%.

Bezwzględna jasność obrazu fluorescencyjnego jest stosunkowo mała. Stwarza to konieczność przeprowadzania badań w zaciemnionym pomieszczeniu. Przy robieniu zdjęć fotograficznych trzeba używać czułych filmów i naświetlać je przez stosunkowo długi czas.

W niektórych wypadkach obraz fluorescencyjny szybko zmienia się lub w ogóle znika, co pozostaje w związku z reakcjami fotochemicznymi. Dzięki reakcjom tego typu niektóre barwniki w ogóle nieszkodliwe dla żywych komórek w ciemności, silnie naruszają procesy życiowe po wzbudzeniu fluorescencji.

W mikroskopii fluorescencyjnej konieczna jest szczególna dbałość o czystość używanego sprzętu i odczynników. Szkiełka, głępek immersyjny oraz substancje do zatapiania preparatów powinny być zupełnie wolne od własnej fluorescencji.

* * *

W przedstawionych metodach fluorescencyjnych nie uwzględniono odczynu znakowanych przeciwciał. Metoda ta, którą dzisiaj w hierarchii ważności należy postawić na pierwszym miejscu, będzie przedmiotem osobnej publikacji.

Piśmiennictwo:

1. Anderson E. S.: Visual observation of deoxyribonucleic acid changes in bacteria during growth of bacteriophage, *Nature* (London), 180, 1336 (1957).
2. Armstrong J. A., Niven J. S. F.: Histochemical observations on cellular and virus nucleic acid, *Nature* (London), 180, 1335 (1957).

3. Bertalanffy F. D.: Fluorescence microscopy for cytodiagnosis of cancer, *Postgraduate Medicine*, 28, 627 (1960).
4. Cholewa L., Konturek S.: Fluorescencja tetracyklinowa w rozpoznawaniu nowotworów złośliwych, *Pol. Tyg. Lek.* 178, 1897 (1962).
5. Duijn C. van, Jun.: Effect of acridine orange on living bull spermatozoa, *Nature* (London), 187, 1006 (1960).
6. Kuper S. W. A., May J. R.: Detection of acid-fast organisms in tissue sections by fluorescence microscopy, *J. Path. Bact.* 79, 59 (1960).
7. Leonhartsberger F., Pakesch F.: Eigen-, Vital- und Intravitalfluoreszenz der Blutzellen, *Wien. Z. inn. Med. Grenzgeb.* 31, 7 (1950).
8. Mejsel M. N., Gutkina A. W.: Luminescentnyje issledowanija rannich luzewych powreżdienij kletok, *Izwest. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biolog.*, No. 5, 693 (1961).
9. Pickett J. P., Bishop C. M., Chick E. W., Baker R. D.: A simple fluorescent stain for fungi, *Am. J. Clin. Path.* 34, 197 (1960).
10. Rothstein N.: Vital staining of blood parasites with acridine orange, *J. Parasit.* 44, 29 (1958).
11. Owen L. N.: Fluorescence of tetracyclines in bone tumours, normal bone and teeth, *Nature* (London), 190, 500 (1961).
12. Tobie J. E., Beye H. K.: Fluorescence of tetracyclines in filarial worms, *Proc. Exp. Biol. Med.* 104, 137 (1960).

Podręczniki:

- Graumann W., Neumann K.: *Handbuch der Histochemie*, Band I, erster Teil, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1958).
- Haitinger M.: *Fluoreszenz Mikroskopie*. Akadem. Verlagsge-sell. Geest und Portig K. G. Leipzig (1959).

Oster G., Pollister A. W.: *Physical Techniques in Biological Research*. Vol. III, Cells and Tissues. Academic Press Inc., Publishers, New York (1956).

Pearse A. G. E.: *Histochemistry Theoretical and Applied*, J. and A. Churchill Ltd., London (1961).

Грундбек М. ПРИНЦИПЫ И ПРИМЕНЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ.

Автором описаны главные принципы фотолюминисценции и основные компоненты флуоресцентного микроскопа, а также первичная и вторичная флуоресценция. Представлены методы окрашивания нуклеиновых кислот окридиновым оранжем и флуорохромирования кислото-резистентных организмов аурамино-родановой смесью. Обсуждаются при этом положительные и отрицательные приметы флуоресцентной микроскопии.

Grundboeck M. — Principles and application of the fluorescence microscopy.

Following a short description of the basic principles of the photoluminescence and of the essential components of the fluorescence microscope, the application of primary and secondary fluorescence has been reviewed. The technique of acridine orange staining of nucleic acids and the fluorochroming of acid fast organisms with auramine — rhodamine mixture are presented. The advantages and disadvantages of the fluorescence microscopy have been discussed.

Z HISTORII WETERYNARII

KONRAD MILLAK

Pierwszy dyplom magistra nauk weterynaryjnych wydany w 1848 r. przez Radę Lekarską Królestwa Polskiego i dyplomant Robert Stichel

Z Ośrodka Historii Medycyny Weterynaryjnej

Powołana do życia w 1840 r. Szkoła Weterynarzy w Królestwie Polskim, przemianowana w 1846 r. na Szkołę Weterynaryjną, podlegała Głównemu Inspektorowi Służby Zdrowia, którego organem wykonawczym w stosunku do Szkoły była Rada Lekarska Królestwa Polskiego. Szkoła nie była uprawniona do wydawania świadectw upoważniających do wykonywania praktyki weterynaryjnej. Ostateczny egzamin odbywał się w obecności delegatów Rady Lekarskiej. Rada udzielała aprobaty i potwierdzała świadectwa szkolne. Kończącym Szkołę do 1845 r. włącznie nadawany był tytuł „weterynarza”, rozumiany jako niższy w hierarchii stopni weterynaryjnych.

Dnia 18/30.XII. 1845 r. wyszedł dekret cesarski wprowadzający w całym imperium rosyjskim, a więc i w Królestwie, jednolite wyższe stopnie weterynaryjne: „weterynarz” i „magister nauk weterynaryjnych”.

W przeciwieństwie do Królestwa tytuł „weterynarz” nie był używany przed 1846 r. w nomenklaturze stopni weterynaryjnych w Cesarstwie. Do 1845 r. włącznie w Rosji były używane: dla wyższych stopni tytuły — „wietierinarnyj lekar” 1 i 2 klasy i „starszij wietierinarnyj lekar” oraz dla niższych stopni — „wietierinarnyj pomocznik” 1 i 2 klasy.

W związku z dekretem z grudnia 1845 r. Rada Administracyjna Kr. Pol. poleciła we wszystkich dotychczas wydanych przez Szkołę Weterynarzy dyplomach zmienić tytuł „weterynarz” na — „pomocnik weterynaryjny”. Jednocześnie Rada zarządziła rozszerzenie programu Szkoły, przedłużenie czasu nauki z dwóch do trzech lat, podwyższenie wymagań kwalifikacyjnych od mowu wstępujących i zmianę

nazwy ze Szkoły Weterynarzy na Szkołę Weterynaryjną. Już kończącym Szkołę w 1849 r. pomocnikom weterynaryjnym pozwolono ubiegać się o wyższy stopień „weterynarza” po uzupełnieniu wiadomości przez ukończenie dodatkowo kursu w ówczesnej szkole farmaceutycznej przy Uniwersytecie.

Osoby, posiadające dyplomy lekarzy weterynaryjnych, czy też po 1845 r. — weterynarzy wydane przez uczelnię w imperium rosyjskim lub przez uczelnię cudzoziemskie, mogły odtąd ubiegać się o stopień magistra nauk weterynaryjnych. Tytuł ten zastąpił dotychczasowy, ustalony dekretem z dn. 28.XII.1838 r. tytuł starszego lekarza weterynaryjnego.

Rozporządzenie z 1838 r. mówiło, że o stopień starszego lekarza weterynaryjnego mogli się ubiegać lekarze weterynaryjni, którzy przebyli w służbie rządowej 5—6 lat, zależnie od klasy uzyskanej przy skończeniu uczelni. Kandydat do tytułu obowiązany był złożyć „własne użyteczne spostrzeżenie albo opisanie zasługującego na uwagę jakiegoś przedmiotu do nauki weterynaryjnej odnoszącego się”.

Dopiero w 1848 r. został wydany przez Radę Lekarską Kr. Pol. pierwszy dyplom z tytułem magistra nauk weterynaryjnych. Oryginał tego dyplomu znalazł się w 1960 r. w zbiorach Ośrodka Historii Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie i jest przedmiotem niniejszego opracowania 1).

1) Dyplom został ofiarowany do zbiorów Ośrodka Historii Medycyny Weterynaryjnej PTNW przez adiunkta Zakładu Epizootologii Wydziału Weterynaryjnego Warszawskiego Panią dr Janinę Oyrzanowską, której dyplomant był dziadkiem po kądzieli. W imieniu Ośrodka składam Jej podziękowanie za cenny dar.