

УДК 612,823:636.22/28

МОРФОЛОГІЯ ДОРЗАЛЬНОГО ЯДРА БЛУКАЮЧОГО НЕРВА ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

О. С. Куклін, Б. В. Смолянінов
Cooklin@ukr.net

Одеський державний аграрний університет, вул. Канатна, 99, м. Одеса, Україна

Відомо, що внутрішньостовбурові компоненти блукаючого нерва представлені трьома структурами: ядром солітарного тракту, дорзальним ядром блукаючого нерва та вентральним ядром блукаючого нерва. На відміну від солітарного тракту та вентрального ядра блукаючого нерва, функція дорзального ядра була тривалий час невизначеною, що пов'язане із складністю його будови, яка на сьогодні вивчена тільки у людини та деяких лабораторних тварин. Ціллю дослідження було вивчити морфологічні особливості будови дорзального ядра блукаючого нерва у великої рогатої худоби. Матеріалом дослідження були 23 зразки довгастого мозку великої рогатої худоби, з яких готували гістологічні препарати, зафарбовані за Нісслем, за Гейденгайном та гематоксилином і еозином. Морфометричні показники обробляли за допомогою програми image J. За результатами дослідження дорзальне ядро блукаючого нерва є одним з найбільш розвинутих вісцеральних структур довгастого мозку великої рогатої худоби. Ядро проходить крізь весь довгастий мозок і визначає його внутрішню каудальну межу. Цитоархітектонічно ядро має дві частини: каудальну, що сформована веретеноподібними нейронами, та краніальну, сформовану полігональними нейронами. Нейрони обох ділянок моторного типу, і за класифікацією Ніссля їх можна віднести до соматохромних парапикноморфних. Значність морфологічного розвитку дорзального ядра блукаючого нерва пов'язана з особливостями будови шлунково-кишкового тракту великої рогатої худоби, і зокрема багатокammerного шлунка.

Ключові слова: ДОВГАСТИЙ МОЗОК, БУЛЬБАРНО-МЕЗЕНЦЕФАЛЬНІ ЦЕНТРИ ВЕГЕТАТИВНОЇ НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ, ДОРЗАЛЬНЕ ЯДРО БЛУКАЮЧОГО НЕРВА, ЦИТОАРХІТЕКТОНІКА ЯДЕР СТОВБУРУ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

THE MORPHOLOGY OF A CATTLE'S DORSAL VAGAL NUCLEUS

A. E. Cooklin, B. V. Smolyaninov
Cooklin@ukr.net

Odessa state agrarian University, Canatna St., 99, Odesa, Ukraine

It is known, that solitary tract, dorsal and ventral nucleus of the vagus nerve are intrastem components of the vagus nerve. In contradistinction to the nucleus of solitary tract and ventral nucleus, the function of dorsal nucleus was unknown for a long time for reason to the complexity of its structure. Today, at present studied the morphology of the dorsal nucleus only in humans and some species of laboratory animals. Aim of our study was to investigate the specific features of the cattles nucleus vagus dorsalis structures. Material studies were 23 samples of the cattles medulla oblongata from which histological preparations were made with stained by Nissl, by Heidenhain and hematoxylin-eosin. Morphometric parameters were analyzed with program image J. In according to the results of our study, the dorsal nucleus of vagus nerve is one of the most developeds components of the cattles medulla oblongata. It is passing through all the medulla oblongata and determines its caudal border. Cytoarchitectonic, nuclous has two parts: the caudal, wich formed by elipsoidal or ovoid neurons; and cranial, formed by polygonal neurons. Neurons are both parts to the motor type and by Nissls classification are somatochrom-parapiknomorfy. The considerable of the development of the nucleus in this species of animal, connection with the complexity and the massiveness of the digestive system on the whole, and multicam stomach in particular.

Keywords: MEDULLA OBLONGATA, MEDULLA-MIDBRAIN CENTRAL PART OF AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM, DORSAL NUCLEUS OF VAGUS NERVE, CYTOARCHITECTONIC OF THE BRAINSTEMS NUCLEUS

МОРФОЛОГИЯ ДОРЗАЛЬНОГО ЯДРА БЛУЖДАЮЩЕГО НЕРВА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

А. Е. Куклин, Б. В. Смолянинов
Cooklin@ukr.net

Одесский государственный аграрный университет, ул. Канатная, 99,
г. Одесса, Украина

Известно, что внутриволоковыми компонентами блуждающего нерва являются солитарный тракт, дорзальное и вентральное ядра блуждающего нерва. В отличие от солитарного тракта и вентрального ядра, функция дорзального ядра была долгое время неизвестна, что связано с сложностью его строения. На сегодняшний день морфология ядра изучена у человека и отдельных видов лабораторных животных. Целью исследования было изучить видовые особенности строения дорзального ядра блуждающего нерва у крупного рогатого скота. Материалом исследования были 23 образца продолговатого мозга крупного рогатого скота, из которых изготовлены гистологические препараты, окрашенные по Нисслию, Гейденгайну и гематоксилин-эозином. Морфометрические показатели анализировались с помощью программы image J. Согласно результатам исследования, дорзальное ядро блуждающего нерва является одним из наиболее развитых компонентов продолговатого мозга крупного рогатого скота. Оно проходит через весь продолговатый мозг и определяет его внутреннюю каудальную границу. Цитоархитектонически, ядро имеет две части: каудальную, сформированную веретеноподобными нейронами; и краниальную, сформированную полигональными нейронами. Нейроны обеих частей относятся к двигательному типу, и по классификации Ниссля их можно отнести к соматохромным парапикноморфным. Значительность развития ядра у данного вида животного, связана со сложностью, и массивностью системы пищеварения в целом, и непосредственно многокамерного желудка.

Ключевые слова: ПРОДОЛГОВАТЫЙ МОЗГ, БУЛЬБАРНО-МЕЗЭНЦЕФАЛЬНЫЕ ЦЕНТРЫ ВЕГЕТАТИВНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ, ДОРЗАЛЬНОЕ ЯДРО БЛУЖДАЮЩЕГО НЕРВА, ЦИТОАРХИТЕКТОНИКА ЯДЕР СТВОЛА ГОЛОВНОГО МОЗГА

Дорзальне ядро блукаючого нерва (NVD) є компонентом стовбурової частини парасимпатичного відділу автономної (вегетативної) нервової системи, і входить до складу ядер блукаючого нерва — n. ambiguus (NAM), n. vagus dorsalis (NVD), n. tractus solitarii (NTS). На відміну від ядра одинокого шляху (чутливе) та подвійного ядра (рухове), функція NVD завдяки складності морфології та топографії тривалий час не була визначена. Наявність у складі ядра різних за розміром та тінкторіальних властивостей нейронів викликало неоднозначне трактування результатів дослідження. Так, Бехтерев

(1893), Stieda, Meynert, Duval, та Holm (1893) вважали ядро чутливим, в якому закінчуються аферентні волокна язикового, блукаючого та додаткового нервів [1]. Дослідження Forel` (1891), Осипова (1891) та Dees`, якими було встановлено факт атрофії NVD при перерізанні блукаючого нерва доводили рухову природу ядра. У дослідженнях Marinesco (1897), Mahaima (1898) та Van Gehuhten (1898) також підтверджувався факт виходу з ядра еферентних парасимпатичних волокон блукаючого нерва [2]. Набагато пізніше Papez (1929), Szentagothai (1952) та Crow (1972) знову

повернулися до трактування функції NVD як чутливої [3]. На сьогоднішній день відомо, що NVD філогенетично походить з єдиного рухового ядра [4], більшість сучасних дослідників відносять NVD до рухових компонентів системи парасимпатичної регуляції. Так, Karim M., Leong S., Pervwaiz S. (1981), виявили практично по всьому об'єму ядра нейрони, що іннервують стінку шлунку [5]. L. Rinaman та P. Levitt (1991) при цервікальній та піддіафрагмальній ваготомії застосовували підсадку до проксимального кінця відрізка блукаючого нерва тканини шлунку, при цьому спостерігали значне збереження клітин NVD [6]. T. Hayakawa, S. Kuwahara, S. Maeda, K. Tanaka, M. Seki (2006) за допомогою пероксидази хрину виявили прямий зв'язок нейронів NVD з інтрамуральними гангліями шлунку у пацюків [7]. Не менш складним було дослідження цитоархітекtonіки ядра. Huang, I. Torok та G. Paxinos (1993), досліджуючи NVD у людини, визначили шість окремих типів нейронів ядра, і відповідно до щільності розташування нейронів розділили ядро на три субодиноці — ростральну, каудальну та центральну, в двох з яких — ростральній та центральній розрізняли також по дві частини [8]. J. McLean та D. Hopkins (1981), вивчаючи NVD у кішки, виділяли два типи нейронів — середні та малі, але само ядро не поділяли на окремі субодиноці [9]. Fox E. та Terry L. (1992) визначили у пацюка п'ять морфологічних субодиноць NVD [10]. A. Smolen, R. Trueх не розділяли ядро кішки на окремі субодиноці, але виявили дегенерацію нейронів NVD на протилежній від ваготомії стороні [11]. На сьогоднішній день морфологія та фізіологія NVD дослідженна у людини та низки лабораторних тварин [12–18]. Враховуючи результати більшості досліджень, можна сказати що NVD є центром координації руху м'язового шару шлунково-кишкового тракту взагалі, і особливо для м'язів шлунку. Відомо, що шлунково-кишковий тракт жуйних має низку специфічних морфологічних і фізіологічних особливостей, що значно

відрізняють його від органів травної системи інших ссавців. Тому, ми поставили перед собою мету дослідити особливості морфології NVD у великої рогатої худоби.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на 23 зразках довгастого мозку великої рогатої худоби, що були відібрані від клінічно здорових тварин віком від 2 до 11 років. Вікова амплітуда пояснюється строками настання фізіологічної зрілості та вимогами щодо дослідження на губчастоподібну енцефалопатію (від 24 місяців). Отримували матеріал від господарств Одеської області в рамках проведення моніторингу губчастоподібної енцефалопатії. Довгастий мозок відбирали після забою протягом 2–4 годин та в залежності від методики дослідження фіксували або в 5–10 % розчину формаліну (фарбування гематоксиліном та еозином; фарбування за Гейденгайном), або в 70 % розчині етанолу (фарбування за Нісслем). З отриманих зразків виготовлено 241 гістологічних препаратів, які фарбувались гематоксиліном Ерліха та еозином (134), за Нісслем (69), гематоксиліном Гейденгайна (38). Фарбування проводилось згідно з прописом Lilli та Меркулова [19, 20].

Гістологічні зрізи виготовляли у фронтальній площині, товщина зрізу дорівнювала 2–3 мкм, крок зрізів — 100 мкм. Виготовлені гістологічні зрізи були розділені на чотири групи відповідно до ділянки тканини довгастого мозку: I — зона розходження чутливих канатиків, II — зона трикутника блукаючого нерва, III — зона трикутника під'язикового нерва, IV — зона вестибулярного підвищення.

У кожній зоні були визначені окремі рівні, кількість яких визначалась інтенсивністю морфологічних змін певної ділянки. Так, зона розходження чутливих канатиків була поділена на чотири рівні (1/1, 1/2, 1/3, 1/4); зона трикутника блукаючого нерва також чотири рівні (2/1, 2/2, 2/3, 2/4); зона трикутника під'язикового

нерва — один рівень (3/1); зона вестибулярного підвищення — два рівні (4/1, 4/2). Крім того, окремо були виділені ділянки розкриття спинномозкового каналу (ділянка затулки), і ділянка середнього підвищення.

Морфометричні показники зрізу досліджувались із застосуванням мікроскопу Eclipse 200, при збільшенні у 40 (загальна топографія ядра), 100 (морфологічна характеристика нейронів) та 400 (стан речовини Ніссля) разів. Об'єкт дослідження фотографувався, зображення переводилось на комп'ютер, де за допомогою програми ImageJ проводились такі проміри: 1 — форма NVD та його фронтальна площа (S-NVD), 2 — форма та кількість нейронів ядра у зрізі (nN), 3 — середній розмір нейронів ($\bar{x}SN$ та $\bar{x}LN = \sqrt{\bar{x}SN}$), 4 — максимальний розмір нейронів (SNmax, LNmax). Додатково

обчислювали дисперсію ($Q = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}$), середньквдратичне відхилення ($\sigma = \sqrt{Q}$) та щільність ядра ρ -NVD ($\rho = \frac{(S - N\mu * n - N) * 100}{(S - NVD\mu)}$). Окремо визначалась інтенсивність фарбування та характер розподілу речовини Ніссля.

Результати й обговорення

Топографія

Початок ядра визначається невеликою групою нейронів на рівні розходження чутливих канатиків у медіодорзальній ділянці товщі тканини довгастого мозку (рис. 1). Протягом всієї ділянки розходження чутливих канатиків форма ядра округла, незначно витягнута у латеральному напрямку. Ближче до початку формування трикутника блукаючого нерва медіальний край ядра стає широким і поступово зміщується дорзально. Від початку розходження чутливих канатиків, до рівня формування трикутника блукаючого нерва площа ядра збільшується практично вчетверо з 281601 μm^2 (0,2 mm^2), до 867201 μm^2 (0,8 mm^2). Проходячи крізь

ділянку трикутника блукаючого нерва, ядро зміщується дорзально і розвертається медіальним краєм до поверхні четвертого шлуночка наближаючись до неї практично впритул. Латеральний край залишається звуженим і спрямованим латероventрально (рис. 2). Від початку формування трикутника блукаючого нерва, до межі його із ділянкою трикутника під'язикового нерва площа ядра збільшується вдвічі, з 1652960 μm^2 (1,6 mm^2) до 2681072 μm^2 (2,6 mm^2). Але від рівня 2/2, до 2/3 ядро різко зменшується 276365 μm^2 (0,2 mm^2) і потім знову потовщується до 2681072 μm^2 (2,6 mm^2) (графік 1). Ділянка трикутника під'язикового нерва характеризується зміщенням ядра латерально, незначним зменшенням його площі — з 2912326 μm^2 (2,9 mm^2) до 2634106 μm^2 (2,6 mm^2) та розширенням медіального краю, який вже перетворюється на площину, що орієнтована паралельно поверхні четвертого шлуночка і на фронтальному зрізі надає ядру трикутної форми. На краніальній межі трикутника під'язикового нерва з вестибулярним підвищенням ядро зникає. Загальна довжина ядра складає біля 22 mm .

Цитоархітектоніка

Ділянка ядра від початку розходження чутливих канатиків до середини трикутника блукаючого нерва побудована з веретеноподібних, соматохромних парапікноморфних нейронів рухового типу. Форма нейронів доволі специфічна, повздовжня довжина може перевищувати поперечну в сім разів (80 μm x 12 μm). Від середини трикутника блукаючого нерва спостерігається поступова зміна форми нейронів з веретеноподібної на полігональну, при цьому, полігональні нейрони починають з'являтися з медіального краю ядра поступово поширюючись у латеральному напрямку, і на прикінці, повністю заміщують веретеноподібні (рис. 3). Початок зміни форми нейронів припадає на рівень 2/2.

Середня кількість нейронів у зрізі дорівнює 70, але амплітуда коливань досить значна — 32 клітини (графік 2). Динаміка кількісних коливань нейронів

характеризується загальним їх поступовим збільшенням, але на рівні 2/2, 2/3 спостерігається різке зменшення клітин з наступним поверненням до поступового збільшення їх кількості. Максимальний показник дорівнює 131, мінімальний — 11.

За розмірами нейрони ядра можна віднести до середніх (\bar{x} -32 μm , max 51 μm). Протягом майже всього ядра показник розмірів нейронів залишається стабільним, за виключенням ділянки 2/2, де спостерігається різкий сплеск різниці між

максимальним та середнім розміром в 35 μm (графік 3).

Щільність ядра, від рівня розходження чутливих канатиків до вестибулярного підвищення поступово знижується (від 4,6 до 3,1 %). Графік нерівномірний, протягом ядра відмічаються дві ділянки (2/2, 2/4) різкого падіння співвідношення загальної площі клітин, до площі ядра (відповідно 2,2; 2,9 %, графік 4).

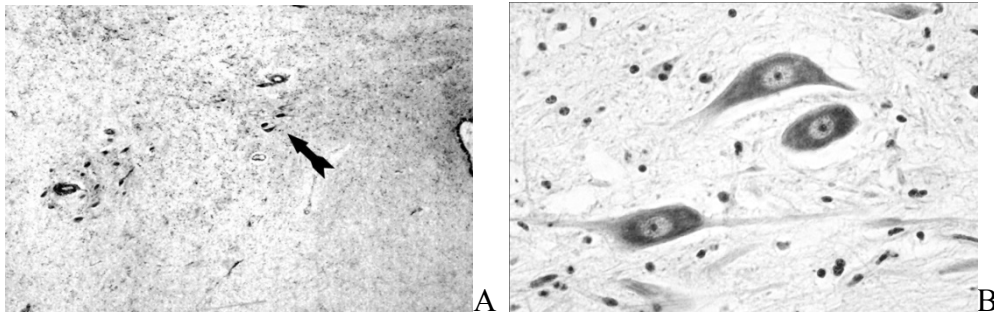


Рис. 1. А — Початок формування дорзального ядра блукаючого нерва на рівні розходження чутливих канатиків. Фарбування за Нісслем. А — Збільшення 100, В — збільшення 400

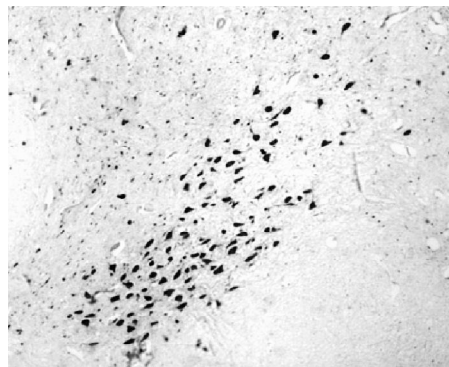


Рис. 2. Дорзальне ядро блукаючого нерва на трикутника блукаючого нерва. Фарбування за Нісслем, збільшення 40

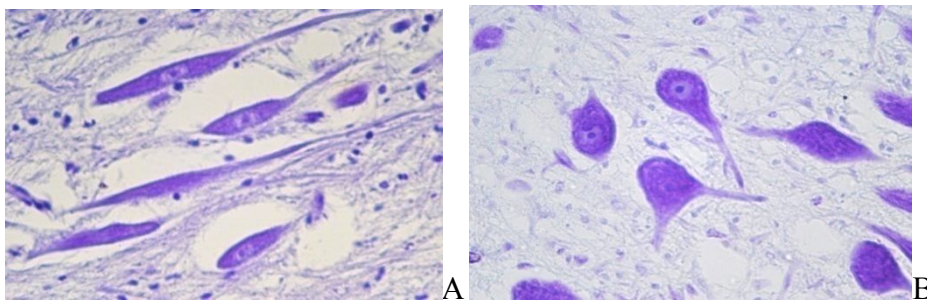
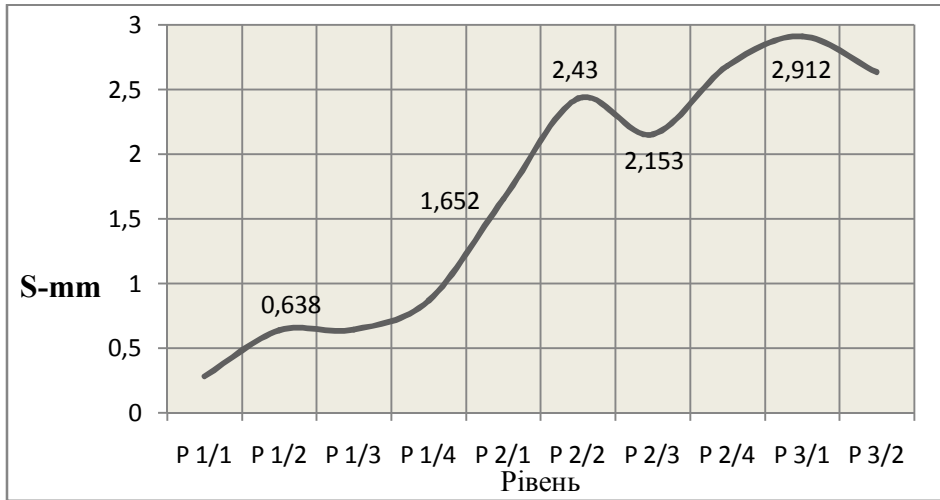
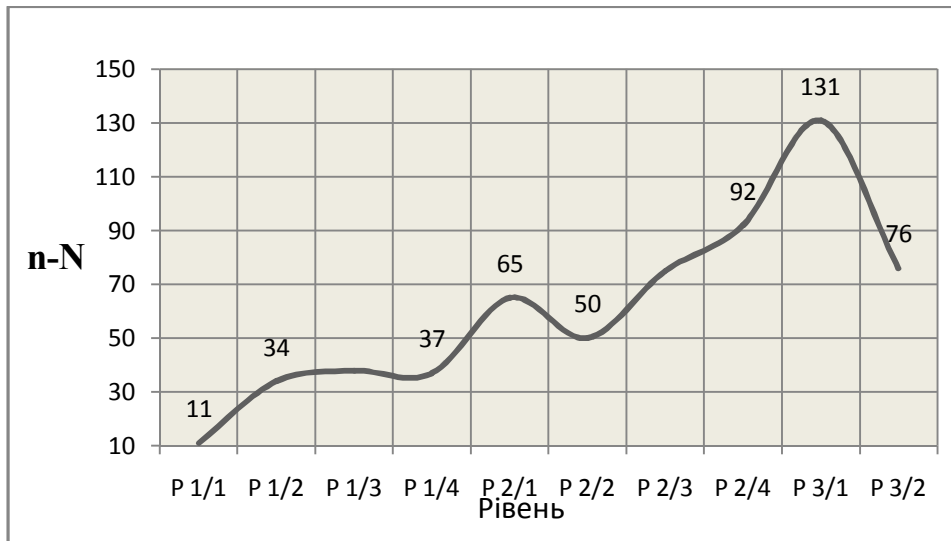


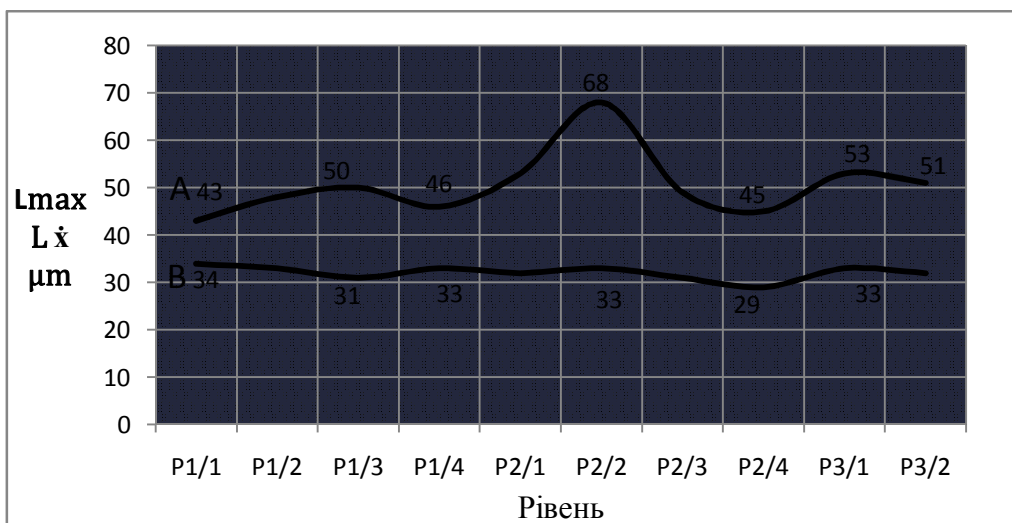
Рис. 3. Веретеноподібні (А) та полігональні (В) нейрони дорзального ядра блукаючого нерва, що формують краніальну та каудальну ділянку ядра. Збільшення 400, фарбування за Нісслем



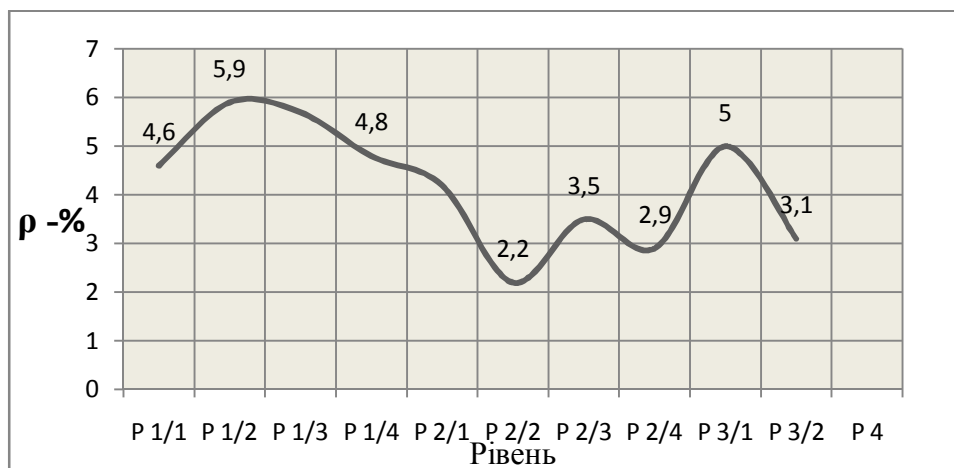
Графік 1. Динаміка зміни S-NVD (Y), відносно рівня зрізу (X)



Графік 2. Середня кількість нейронів в площині зрізу (Y), відносно рівня зрізу (X)



Графік 3. Співвідношення максимального (A) та середнього (B), розміру нейронів NVD



Графік 4. Щільність NVD (Y), відносно рівня зрізу (X)

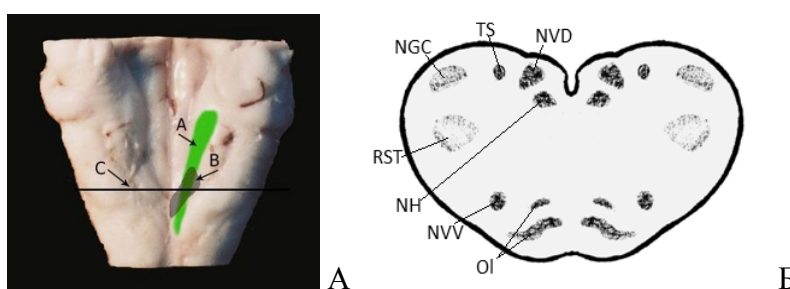


Рис. 4. Топографія дорзального ядра блукаючого нерва на рівні розкриття спинномозкового каналу у четвертий шлуночок

Примітка: А. Проекція дорзального ядра на поверхню четвертого шлуночка. А — ядро, В — трикутник блукаючого нерва, С — площина зрізу. В — Топографія дорзального ядра блукаючого нерва у площині фронтального зрізу С. Б. Топографія NVD у фронтальній площині. NVD — дорзальне ядро блукаючого нерва, TS — одинокий шлях, NGC — ядра чутливих шляхів, RST — спинний корінець трійчастого нерва, NH — ядро під'язикового нерва, NVV — вентральне ядро блукаючого нерва, NL — латеральне ядро, ОІ — оливи

Аналізуючи ці дослідження, можна сказати, що дорзальне ядро блукаючого нерва є одним з найбільш розвинуваних структур довгастого мозку великої рогатої худоби. Як представник довгастого мозку, NVD першим з'являється на рівні розходження чутливих канатиків, визначаючи внутрішню, каудальну межу цього відділу і прямує крізь весь довгастий мозок, закінчується біля його краніальної межі. У проекції на поверхню дна четвертого шлуночка ядро значно виходить за межі трикутника блукаючого нерва (рис. 4). За будовою ядро відрізняється від інших рухових ядер довгастого мозку (ядро під'язикового нерва, вентральне ядро блукаючого нерва). Починаючись як компактна, центрально-медіальна, у фронтальній площині округла структура, NVD поступово змінює форму фронтальної

площини на трикутну з основою, спрямованою до поверхні четвертого шлуночка, і в краніальному напрямку, пересуваючись дорзально, практично впритул зближаючись з поверхньою формує «вегетативну кору четвертого шлуночка». Особливо яскраві зміни в ядрі відбуваються на рівні розкриття спинномозкового каналу у четвертий шлуночок. Зміна форми клітин з веретеноподібною на полігональну, різкий стрибок розбіжності між середнім та максимальним розміром нейронів зі зниженням щільності ядра свідчать про відображення межі переходу спинномозкового типу будови сірої речовини на стовбурову. Необхідно відмітити що, складність будови та значність розвитку дорзального ядра блукаючого нерва у великої рогатої худоби

є відображенням складності та значності розвитку шлунково-кишкового тракту взагалі, і зокрема багатокамерного шлунку, регулятором функціонування м'язового шару якого і є NVD.

Висновки

Основними особливостями будови дорзального ядра блукаючого нерва великої рогатої худоби є: 1 — значність розвитку, 2 — сформованість двома типами нейронів — веретеноподібними та полігональними, 3 — наявність двох субодниць ядра — каудальної та краніальної, що сформовані різними за типом будови нейронами, 4 — перехід ядра з внутрітканинної локалізації до периферичної, 5 — щільна та крупнозерниста речовина Ніссля у всіх нейронах, незалежно від типу будови.

Перспективи подальших досліджень.

Необхідно дослідити особливості морфології ядра блукаючого нерва у великої рогатої худоби залежно від віку та стаї.

1- *Anatomija i gistologija nervnoj sistemy* [Anatomy and histology of the nervous system]. Editor in chief Prof. I. N. Filimonov. The Book 2. Medgiz. 1957. 543 p. (In Russian)

2- Blumenau L. V. *Mozg cheloveka. Anatomio-fiziologicheskoe vvedenie v kliniku nervnyh i dushevnyh boleznej* [The human brain. The Anatomist-physiological introduction to clinic nervous and emotional diseases]. Leningrad, State publish, 1925. 359 p. (In Russian)

3- *Fiziologija vegetativnoj nervnoj sistemy* [The physiology of autonomic nervous system] Editor Chernigovskiy V. N. Leningrad, Science, 1981. P. 75. (In Russian)

4- Andreeva N. G., Obuhov D. K. *Evolucionnaja morfologija nervnoj sistemy pozvonocnyh: Uchebnik dlja studentov vuzov.* [The evolutionary morphology of the vertebral's nervous system]. Moscow, Doe, 1999. 384 p. (In Russian)

5- Dr. Karim M. A. Leong S. K., Perwaiz S. A. On the anatomical organization of the vagal nuclei. *American Journal of Primatology*, 1981, V. 1, No. 3, p. 277–292.

6- Rinaman L., Levitt P. Access to gastric tissue promotes the survival of axotomized neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus in neonatal rats. *Journal of Comparative Neurology*, 1991, V. 313, No. 2, p. 213–22.

7- Hayakawa T., Kuwahara S., Maeda S., Tanaka K., Seki M. Direct synaptic contacts on the

mventeric ganglia of the rat stomach from the dorsal motor nucleus of the vagus. *Journal of Comparative Neurology*. 2006, no. 3, p. 352–362.

8- Huang X., Tork I., Paxinos G. Dorsal motor nucleus of the vagus nerve: A cyto- and chemoarchitectonic study in the human. *Journal of Comparative Neurology*, 1993, V. 330, No. 2, p. 158–182.

9- McLean J., Hopkins D. A light and electron microscopic study of the dorsal motor nucleus of the vagus nerve in the cat. *Journal of Comparative Neurology*, 1981, no. 1, p. 157–175.

10- Fox E., Terry L. Morphology of identified preganglionic neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus. *Journal of Comparative Neurology*, 1992, V. 322, No. 1, p. 79–98.

11- Smolen A., Truex R. The dorsal motor nucleus of the vagus nerve of the cat: Localization of preganglionic neurons by quantitative histological methods. *The Anatomical Record*, 1977, V. 189, no.4, p. 555–565.

12- Vakolyuk N. I. *Stereotaksicheskiy atlas podkorkovyh jader mozga sobaki* [A Stereotaxic atlas of subcortical nuclei of the dog's]. Kyiv, The scientific thought, 1973. 346 p. (In Russian)

13- Kurepina M. M. *Mozg zhivotnyh: metody fiziologicheskikh issledovanij* [The animal brain: methods of the physiological studies]. Moscow, Science, 1981. 139 p. (In Russian)

14- Newman J. A Combined histological and MRI brain atlas of the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J. Brain Research Reviews*. 2009, December 11, p. 1–18.

15- Rohlfing T., Zach N., Sullivan E., Pfefferbaum A. The SRI24 Multi-Channel Atlas of Normal Adult Human Brain Structure. *Human Brain Mapping*, 2010, V. 1, no. 5, p. 798–819.

16- Woods R. A Web-based Brain Atlas of the Vervet Monkey (*Chlorocebus aethiops*). *J. Neuroimage*, 2011 February, 1: 54(3), p. 1872–1880.

17- Lanciego J., Vazquez A. The basal ganglia and thalamus of the long-tailed macaque in stereotaxic coordinates. A template atlas based on coronal, sagittal and horizontal brain sections. *J. Brain Structure and Function*, 2012, April; 217 (2), p. 613–666.

18- Majka P., Kubik E., Furga G., Wojcik K. Common Atlas Format and 3D Brain Atlas Reconstructor: infrastructure for Constructing 3D Brain Atlases. *Neuroinformatics*. 2012 April, 10 (2), p. 181–197.

19- Lillie R. *Patogistologicheskaja tehnika i prakticheskaja gistohimija* [Histopathologic technic and practical histochemistry]. Moscow, World, 1969. 621 p. (In Russian)

20- Merkulov G. A. *Kurs patogistologicheskaj tehniki* [The Course of histopathologic technic]. Leningrad, Medicine, 1969. 422 p. (In Russian)