



**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**



**Факультет ветеринарної медицини
Кафедра нормальної та патологічної морфології та судової
ветеринарії**

**ОСНОВИ ТЕХНІКИ ГІСТОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.
МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ З
ОСВІТНЬОГО КОМПОНЕНТУ «ЦИТОЛОГІЯ, ГІСТОЛОГІЯ,
ЕМБРІОЛОГІЯ».**

**для здобувачів денної форми навчання другого (магістерського) рівня
вищої освіти, спеціальності 211 ветеринарна медицина**

Одеса, 2025

УДК: 619:591.4
Г 51

Укладачі:

Кандидат ветеринарних наук, доцент Бондаренко І.В.

Кандидат ветеринарних наук, доцент Коренєва Ж.Б.

Рецензент: Кандидат ветеринарних наук, доцент Дубін Р.А.

Основи техніки гістологічних досліджень. Методичні рекомендації до практичних занять з освітнього компоненту з освітнього компонента «Цитологія, гістологія, ембріологія». для здобувачів денної форми навчання другого (магістерського) рівня вищої освіти, спеціальності 211 ветеринарна медицина / І. В. Бондаренко – Одеса. : ОДАУ, 2025. – 24 с.

Методичні рекомендації до практичних занять з освітнього компонента «Цитологія, гістологія, ембріологія. Основи техніки гістологічних досліджень.» містять теоретичний базовий матеріал, необхідний для дослідження гістологічних мікрофотографій. Описаний та систематизований матеріал, необхідний для формування у здобувачів вищої освіти фундаментальних знань про основи техніки гістологічних досліджень. Матеріал буде корисним для здобувачів вищої освіти спеціальності 211 «Ветеринарна медицина».

Затверджено до друку методичною комісією факультету ветеринарної медицини (протокол № 10 від 12 червня 2025 р.)

Відповідальний за випуск: І. В. Бондаренко, кандидат ветеринарних наук, доцент

ЗМІСТ

Факультативні дані до практичного заняття 1.

1. Значення гістології як науки.
2. Будова мікроскопа, правило роботи з ним.
3. Основи техніки гістологічних досліджень.
4. Методика виготовлення гістологічних препаратів.
5. Культура клітин та тканин.
6. Ферментна гістохімія

Мікрофотографії препаратів використані з наступних джерел: Жункейра Л.К., Карнейро Ж. Гистология: Навчальний посібник. Атлас: Переклад с англ. під ред. В.Л. Бикова., 2009. 572с.

Література: 1. Стойка Р. Гістологія, цитологія та ембріологія: підручник для студентів вищих навчальних закладів міністерства охорони здоров'я України / за редакцією о.д.луцика, ю.в. б. Чайковського. Вінниця : нова книга 2020. 496 С. :ІЛ. Proc Shevchenko Sci Soc Med Sci [Інтернет]. 2021Jun.10 [цитовано 2025Apr.27];64(1). 2. Садлер ТВ. Медична ембріологія за Лангманом. Переклад 8-го видання/ за ред. Луцика ОД. Львів, Наутілус, 2001. 3. Mescher AL. Junqueira's basic histology: text and atlas. 15th ed. Lange, 2021. 7.Gartner LP. Textbook of histology. 5th ed. Elsevier, 2020. 5. Pawlina W, Ross MH. Histology: a text and atlas with correlated cell and molecular biology. 8th ed. Wolters Kluwer, 2020.

Факультативні дані до практичного заняття 1.

Значення Гістології як науки. Будова мікроскопа. Основи техніки гістологічних досліджень. Методика виготовлення гістологічних препаратів.

Гістологія та її методи дослідження.

Гістологія — це дослідження тканин тіла тварин та того, як ці тканини влаштовані для формування органів. Цей предмет охоплює всі аспекти біології тканин, зосереджуючись на тому, як структура та розташування клітин оптимізують функції, специфічні для кожного органу.

Тканини мають два взаємодіючі компоненти: клітини та позаклітинний матрикс (ЕСМ). ЕСМ складається з багатьох типів макромолекул, більшість з яких утворюють складні структури, такі як колагенові фібрили. ЕСМ підтримує клітини та містить рідину, яка транспортує поживні речовини до клітин і виносить їхні відходи та секреторні продукти. Клітини виробляють позаклітинний матрикс локально і, в свою чергу, піддаються сильному впливу молекул матриксу.

Багато компонентів матриксу зв'язуються зі специфічними рецепторами клітинної поверхні, які охоплюють клітинні мембрани та з'єднуються зі структурними компонентами всередині клітин, утворюючи симбіоз, у якому клітини та позаклітинні структури функціонують разом у добре скоординований спосіб. Під час розвитку, клітини та пов'язаний з ними позаклітинний матрикс, стають функціонально спеціалізованими та дають початок основним типам тканин із характерними структурними особливостями.

Органи утворюються впорядкованим поєднанням цих тканин, і їх точне розташування забезпечує функціонування кожного органу та організму в цілому. Невеликий розмір клітин і компонентів матриксу робить гістологію залежною від використання мікроскопів і молекулярних методів дослідження. Досягнення біохімії, молекулярної біології, фізіології, імунології та патології є важливими для кращих знань тканинної біології. Знайомство з інструментами та методами будь-якої галузі науки має важливе значення для правильного розуміння предмета.

Існують наступні етапи, що використовуються для вивчення клітин і тканин, за допомогою мікроскопа:

Підготовка тканин до дослідження:

1. Фіксація. 2. Відбір та зрізи. 3. Фарбування.

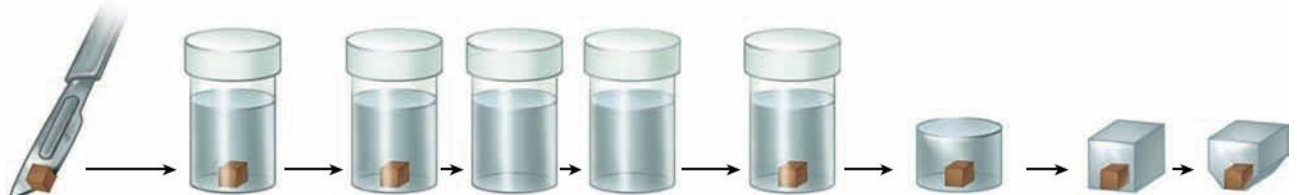


Рис. 1 Підготовка тканин до дослідження

Світлова мікроскопія:

1. Світлопольна мікроскопія. 2. Флуоресцентна мікроскопія. 3 Фазово-контрастна мікроскопія. 4. Конфокальна мікроскопія. 5 Поляризаційна мікроскопія.



(а)



(б)

Рис. 2 Будова мікроскопа (а) та мікротома (б).

Електронна мікроскопія:

1. Просвічуюча електронна мікроскопія. 2. Скануюча електронна мікроскопія 9

Підготовка тканин до дослідження

Найпоширенішою процедурою, яка використовується в гістологічному дослідженні, є підготовка шматочків або «зрізів» тканини, які можна досліджувати візуально в прохідному світлі. Оскільки більшість тканин і органів занадто товсті для проходження світла, з них вирізають тонкі напівпрозорі зрізи та поміщають їх на предметне скло для мікроскопічного дослідження внутрішніх структур.

Ідеальний мікроскопічний препарат той, в якому зберігається тканина на предметному склі, маючи ті самі структурні особливості, що й у тілі. Однак це часто неможливо, оскільки процес підготовки може видалити клітинний ліпід із незначними спотвореннями клітинної структури. Основні етапи підготовки тканини для світлової мікроскопії:

- Невеликі шматочки тканини поміщають у розчини хімічних речовин, які з'єднують білки та інактивують деградаційні ферменти, що зберігає структуру клітин і тканин.

- Зневоднення: тканина передається через серію все більш концентрованих спиртових розчинів, закінчуючи 100%, що видаляє всю воду.

- Очищення: Спирт видаляється в органічних розчинниках, у яких змішуються спирт і парафін.

- Інфільтрація: потім тканину поміщають у розплавлений парафін, поки вона повністю не просочиться цією речовиною.

- Заливка: тканину, просочену парафіном, поміщають у невелику форму з розплавленим парафіном і дають їй затвердіти.

- Обрізка: Отриманий парафіновий блок обрізають, щоб відкрити тканину для розрізання (нарізання) на мікротомі.

Фіксація. Щоб зберегти структуру тканини та запобігти деградації ферментами, що вивільняються з клітин або мікроорганізмів, шматочки органу поміщають якомога швидше після вилучення з організму в розчинах стабілізуючих або ушільнюючих сполук, які називаються *фіксаторами*.

Оскільки фіксатор повинен повністю просочитися крізь тканини, щоб зберегти всі клітини, тканини зазвичай розрізають на невеликі фрагменти перед фіксацією, щоб полегшити проникнення. Щоб покращити збереження клітин у великих органах, фіксатори часто вводять через кровоносні судини, при цьому судинна перфузія дозволяє швидко фіксувати тканини. Одним із широко використовуваних фіксаторів для світлової мікроскопії є формалін, забуферений ізотонічний розчин 37% формальдегіду. Ця сполука, і глутаровий альдегід, фіксатор, який використовується для електронів. Подібні етапи використовуються для підготовки тканини для трансмісійної електронної мікроскопії (ЕМ), за винятком того, що спеціальні фіксатори та дегідратаційні розчини використовуються для менших зразків тканини, а вбудовування включає епоксидні смоли, які стають твердішими за парафін, щоб дозволити дуже тонкі зрізи.

Мікротом використовується для розрізу залитих парафіном тканин для світлової мікроскопії. Обрізаний зразок тканини встановлюється в тримач парафінового блоку, і кожен оберт ведучого колеса гістологом переміщує тримач на контрольовану відстань, як правило, від 1 до 10 мкм. Після кожного руху вперед тканинний блок проходить через сталеву кромку ножа, і зріз розрізається товщиною, що дорівнює відстані, на яку просунувся блок. Парафінові зрізи поміщають на предметне скло і дають приклеїтися, депарафінують і фарбують для дослідження під світловим мікроскопом.

Для електронної мікроскопії готують зрізи товщиною менше 1 мкм із залитих смолою клітин за допомогою ультрамікротома зі скляним або алмазним ножом. мікроскопії, реагують з амінними групами (NH₂) білків, запобігаючи їх

деградації звичайними протеазами. Глутаральдегід також з'єднує сусідні білки, зміцнюючи клітинні та тканинні структури. Електронна мікроскопія забезпечує набагато більше збільшення та роздільну здатність дуже дрібних клітинних структур, і фіксація повинна бути виконана дуже ретельно, щоб зберегти додаткові «ультраструктурні» деталі. Зазвичай у таких дослідженнях оброблену глутаровим альдегідом тканину потім занурюють у забуферений чотириокис осмію, який зберігає (і забарвлює) клітинні ліпіди, а також білки.

Більшість клітин і позаклітинного матеріалу абсолютно безбарвні, і для мікроскопічного дослідження зрізи тканини повинні бути пофарбовані (пофарбовані). Були розроблені методи фарбування, які роблять різні компоненти тканини не тільки помітними, але й відмінними один від одного.

Барвники забарвлюють матеріал більш-менш вибірково, часто поводяться як кислотні або основні сполуки та утворюють електростатичні (сольові) зв'язки з іонізованими радикалами макромолекул у тканинах. Компоненти клітини, такі як нуклеїнові кислоти з сумарним негативним зарядом (аніонні), мають спорідненість до основних барвників і називаються базофільними; катіонні компоненти, такі як білки з багатьма іонізованими аміногрупами, легше забарвлюються кислотними барвниками і називаються ацидофільними.

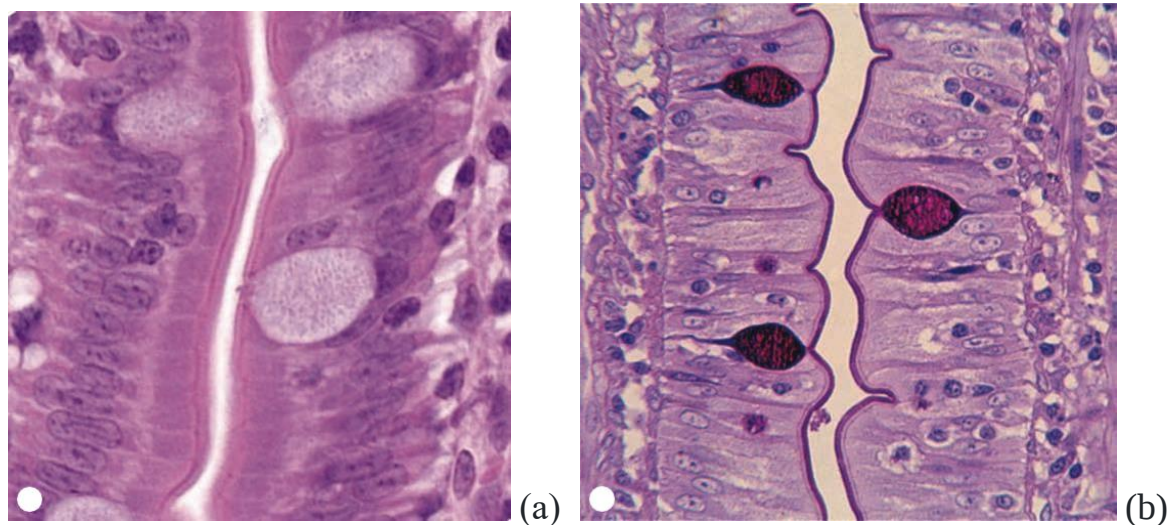


Рис. 3 Мікрофотографії епітелію тонкого кишечника, (а) помітні мікрроворсинки та розсіяні келихоподібні клітини, що виділяють слиз, і (b) пофарбований за допомогою реакції PAS для дослідження на глікопротеїни також, щоб показати клітинні ядра.

Приклади основних барвників включають толуїдиновий синій, альціановий синій і метиленовий синій. Гематоксилін веде себе як основний барвник, забарвлюючи базофільні компоненти тканини. Основні компоненти тканин, які іонізуються та реагують з основними барвниками, роблять це завдяки кислотам у своєму складі (ДНК, РНК і глікозаміноглікани). Кислотні барвники (наприклад, еозин, апельсин G і кислотний фуксин) забарвлюють ацидофільні компоненти тканин, такі як мітохондрії, секреторні гранули та колаген.

З усіх методів фарбування найчастіше використовується проста комбінація гематоксиліну та еозину (H&E). Гематоксилін забарвлює ДНК у клітинному ядрі, збагачені РНК частини цитоплазми та матрикс хряща, утворюючи темно-синій або фіолетовий колір. Навпаки, еозин забарвлює інші цитоплазматичні структури та колаген у рожевий колір (рис. 1–2а). Тут еозин розглядається як контрфарба, яка зазвичай є одним барвником, що наноситься окремо для виділення додаткових ознак тканини. Більш складні процедури, такі як трихромне фарбування (наприклад, трихром за Массоном), дозволяють краще розрізнити різні компоненти позаклітинної тканини. Реакція періодичної кислоти-Шиффа (PAS) використовує гексозні кільця полісахаридів та інших тканинних структур, багатих вуглеводами, і забарвлює такі макромолекули в чітко фіолетовий або пурпуровий колір.

ДНК клітинних ядер можна спеціально пофарбувати за допомогою модифікації процедури PAS, яка називається реакцією Феульгена. Базофільний або PAS-позитивний матеріал можна додатково ідентифікувати ферментним розщепленням, попередньою обробкою ділянки тканини ферментом, який спеціально перетравлює один субстрат. Наприклад, попередня обробка рибонуклеазою значно зменшить цитоплазматичну базофілію з незначним загальним впливом на ядро, що вказує на важливість РНК для фарбування цитоплазми.

Збагачені ліпідами структури клітин виявляють шляхом уникнення етапів обробки, які видаляють ліпіди, таких як обробка теплом і органічними розчинниками, а також фарбування жиророзчинними барвниками, такими як суданський чорний, що може бути корисним у діагностиці метаболічних захворювань, які включають внутрішньоклітинне накопичення холестерину, фосфоліпідів або гліколіпідів.

Менш поширені методи фарбування можуть використовувати техніку просочення металом, як правило, з використанням розчинів солей срібла для візуалізації певних волокон ЕСМ і специфічних клітинних елементів у нервовій тканині.

Біопсія – це зразки тканини, вилучені під час операції або звичайних медичних процедур. В операційній біоптати фіксують у флаконах з формаліном для обробки та мікроскопічного дослідження в патологоанатомічній лабораторії. Якщо результати таких аналізів потрібні до завершення медичної процедури, наприклад, щоб дізнатися, чи є новоутворення злоякісним, перш ніж закрити пацієнта, використовується набагато швидший метод обробки. Біопсія швидко заморожується в рідкому азоті, зберігаючи клітинні структури та роблячи тканину твердою та готовою до розтину.

Мікротом, названий кріостатом, у шафі при температурі нижче нуля використовується для розділення блоку тканиною, а заморожені зрізи поміщаються на предметні скла для швидкого фарбування та мікроскопічного дослідження патологоанатомом. Заморожування тканин також ефективно в

гістохімічних дослідженнях дуже чутливих ферментів або малих молекул, оскільки заморожування, на відміну від фіксації, не інактивує більшість ферментів. Нарешті, оскільки очищувальні розчинники часто розчиняють клітинні ліпіди у фіксованих тканинах, заморожені зрізи також корисні, коли необхідно гістологічно досліджувати структури, що містять ліпіди.

Щоб зробити тонкі зрізи, фіксовані тканини інфільтруються та занурюються в матеріал, який надає міцну консистенцію. Матеріали для вбудовування включають парафін, який зазвичай використовується для світлової мікроскопії, і пластикові смоли, які адаптовані як для світлової, так і для електронної мікроскопії.

Перед інфільтрацією таким середовищем фіксована тканина повинна пройти дегідrataцію шляхом поступового вилучення води шляхом переміщення через серію зростаючих розчинів етанолу, закінчуючи 100% етанолом. Потім етанол замінюють органічним розчинником, який змішується як зі спиртом, так і з середовищем для заливки, цей етап називають очищенням, оскільки інфільтрація реагентами, які тут використовуються, надає тканині напівпрозорий вигляд. Потім повністю очищену тканину поміщають у розплавлений парафін у духовку при 52–60 °C, що випаровує очищувальний розчин і сприяє інфільтрації тканини парафіном, а потім занурюють, дозволяючи їй затвердіти в невеликій ємності з парафіном при кімнатній температурі.

Тканини, в які буде вставлена пластикова смола, також зневоднюються в етанолі, а потім просочуються пластиковими розчинниками, які твердіють при додаванні полімеризаторів для зшивання. Пластикове вбудовування дозволяє уникнути високих температур, необхідних для парафіну, що допомагає уникнути деформації тканини. Затверділий блок із тканиною та навколишнім середовищем для закладення обрізають і поміщають для розрізання в інструмент, який називається мікротом.

Для світлової мікроскопії парафінові зрізи зазвичай розрізають товщиною 3-10 мкм, але для електронної мікроскопії потрібні зрізи товщиною менше 1 мкм. Один мікромметр (1 мкм) дорівнює 1/1000 міліметра (мм) або 10⁻⁶ м. Іншими просторовими одиницями, які зазвичай використовуються в мікроскопії, є нанометр (1 нм = 0,001 мкм = 10⁻⁹ м = 10⁻⁶ мм). Зрізи поміщають на предметне скло і фарбують для світлової мікроскопії або на металеві сітки для електронно-мікроскопічного фарбування та дослідження.

Фарбування.

Підготовка предметного скла, від фіксації тканини до спостереження за допомогою світлового мікроскопа, може тривати від 12 годин до 2 з половиною днів, залежно від розміру тканини, середовища для введення та методу фарбування. Останнім кроком перед мікроскопічним спостереженням є встановлення захисного накривного скла на предметне скло за допомогою прозорого адгезиву.

Мікроскопія.

Звичайна світлопольна мікроскопія, а також більш спеціалізовані застосування, такі як флуоресцентна, фазово-контрастна, конфокальна та поляризаційна мікроскопія, базуються на взаємодії світла з компонентами тканини та використовуються для виявлення та вивчення особливостей тканини.

Світлопольна мікроскопія. За допомогою світлопольного мікроскопа пофарбовану тканину досліджують за допомогою звичайного світла, що проходить через препарат. Як показано на рисунку 2, мікроскоп містить оптичну систему та механізми для переміщення та фокусування зразка. Оптичними компонентами є конденсор, що фокусує світло на досліджуваному об'єкті; лінза об'єктива, що збільшує і проєктує зображення предмета на спостерігача; і просвіт окуляра, (або окулярна лінза), додатково збільшуючи це зображення та проєктуючи його на сітківку глядача або пристрій із зарядовим зв'язком, високочутливий до низького рівня освітлення за допомогою камери та монітора.

Загальне збільшення виходить шляхом множення збільшувальної сили об'єктива та окулярної лінзи. Критичним фактором для отримання чіткого детального зображення за допомогою світлового мікроскопа є його роздільна здатність, яка визначається як найменша відстань між двома структурами, на якій їх можна побачити як окремі об'єкти. Максимальна роздільна здатність світлового мікроскопа становить приблизно 0,2 мкм, що дозволяє отримати чіткі зображення, збільшені в 1000-1500 разів. Об'єкти менші або тонші за 0,2 мкм (такі як одна рибосома або цитоплазматична мікрофіламент) не можуть бути розрізнені за допомогою цього приладу. Подібним чином дві структури, такі як мітохондрії, будуть розглядатися як єдиний об'єкт, якщо вони розділені менш ніж на 0,2 мкм. Роздільна здатність мікроскопа визначає якість зображення, його чіткість і багатство деталей і залежить головним чином від якості його об'єктива. Збільшення має значення лише тоді, коли воно супроводжується високою роздільною здатністю.

Лінзи об'єтивів, які забезпечують більше збільшення, також мають вищу роздільну здатність. Лінза окуляра лише збільшує зображення, отримане об'єктивом, і не покращує роздільну здатність. Мікроскопія, яка зазвичай використовується для дослідження світлопольових мікроскопічних препаратів, передбачає збільшення, та підготовку пофарбованих тканин до цифрових зображень із високою роздільною здатністю, що дозволяє вивчати тканини за допомогою комп'ютера чи іншого цифрового пристрою без фактично пофарбованого предметного скла чи мікроскопа. У цій техніці ділянки зразка, встановленого на склі, фіксуються цифровим способом у вигляді сітки при багаторазовому збільшенні за допомогою спеціального скануючого мікроскопа та зберігаються як тисячі послідовних файлів зображень. Програмне забезпечення потім перетворює цей набір даних для зберігання на сервері, використовуючи формат, який забезпечує доступ, візуалізацію та навігацію

оригінального слайда за допомогою звичайних веб-браузерів або інших пристроїв.

Фазово-контрастна мікроскопія. За допомогою цих модифікованих світлових мікроскопів можна вивчати незабарвлені клітини та зрізи тканин, які зазвичай прозорі та безбарвні. У незабарвлених тканинах зазвичай важко побачити клітинні деталі, оскільки всі частини зразка мають приблизно однакову оптичну густину. Однак у фазово-контрастній мікроскопії використовується система лінз, яка створює видимі зображення з прозорих об'єктів і, що важливо, може використовуватися з живими культивованими клітинами).

Фазово-контрастна мікроскопія заснована на принципі зміни швидкості світла при проходженні клітинних і позаклітинних структур з різними показниками заломлення. Ці зміни використовуються системою фазового контрасту, щоб структури виглядали світлішими або темнішими відносно одна одної. Оскільки вони дозволяють досліджувати клітини без фіксації або фарбування, фазово-контрастні мікроскопи є відомим інструментом у всіх лабораторіях клітинних культур.

Модифікацією фазово-контрастної мікроскопії є диференційна інтерференційна мікроскопія з оптикою Номарського, яка створює зображення живих клітин із більш очевидним тривимірним (3D) аспектом.

Флуоресцентна мікроскопія. У звичайному світлопольному мікроскопі промінь світла відносно великий і заповнює зразок. Розсіяне (надлишкове) світло зменшує контраст зображення та погіршує роздільну здатність променя.

Коли певні клітинні речовини опромінюються світлом відповідної довжини хвилі, вони випромінюють світло з більшою довжиною хвилі — явище, яке називається флуоресценцією. У флуоресцентній мікроскопії зрізи тканин зазвичай опромінюють ультрафіолетовим (УФ) світлом, і випромінювання відбувається у видимій частині спектру. Флуоресцентні речовини виглядають яскравими на темному тлі. Для флуоресцентної мікроскопії прилад має джерело ультрафіолетового або іншого світла та фільтри, які відбирають промені різної довжини хвилі, випромінювані речовинами, які візуалізуються. Флуоресцентні сполуки зі спорідненістю до специфічних клітинних макромолекул можуть бути використані як флуоресцентні барвники. Прикладом є акридиновий помаранчевий, який зв'язує як ДНК, так і РНК. При спостереженні у флуоресцентний мікроскоп ці нуклеїнові кислоти випромінюють дещо іншу флуоресценцію, що дозволяє їм окремо локалізуватися в клітинах (рис. 4 а та б)

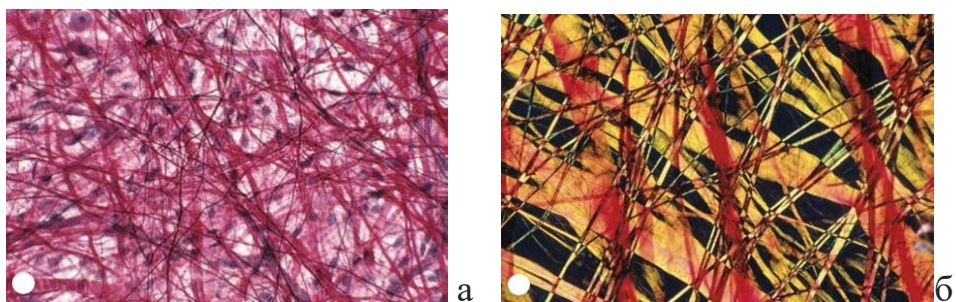


Рис. 4 Зовнішній вигляд тканини за допомогою світлової (а) та флуоресцентної (б) мікроскопії. Фарбування червоним пікосиріусом, орцеїном і гематоксиліном.

Інші сполуки, такі як DAPI і фарбування Hoechst, специфічно зв'язують ДНК і використовуються для фарбування ядер клітинних, що випромінюють характерну блакитну флуоресценцію під УФ-променями. Інше важливе застосування флуоресцентної мікроскопії досягається шляхом зв'язування таких сполук, як флуоресцеїн, із молекулами, які специфічно зв'язуються з певними клітинними компонентами, що дозволяє ідентифікувати ці структури під мікроскопом (рис.4б). Антитіла, мічені флуоресцентними сполуками, надзвичайно важливі для імуногістологічного фарбування.

Компоненти клітин часто забарвлюються сполуками, видимими за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Акридиновий помаранчевий зв'язує нуклеїнові кислоти та змушує ДНК у клітинних ядрах випромінювати жовте світло, а насичена РНК цитоплазма стає помаранчевою в цих клітинах ниркових каналців. Поляризаційна мікроскопія дозволяє розпізнавати забарвлені або незабарвлені структури, що складаються з високоорганізованих субодиниць. Коли звичайне світло проходить через поляризаційний фільтр, воно вібрає лише в одному напрямку. Якщо другий світлофільтр розташувати в мікроскопі над першим, головна вісь якого перпендикулярна першому, світло не проходить. Проте, якщо тканинні структури, що містять орієнтовані макромолекули, розташовані між двома поляризаційними фільтрами, їх повторювана структура повертає вісь світла, що виходить із поляризатора, і вони виглядають як яскраві структури на темному тлі. Здатність змінювати напрямок вібрації поляризованого світла називається подвійним променезаломленням і є властивістю кристалічних речовин або речовин, що містять високоорієнтовані молекули, такі як целюлоза, колаген, мікротрубочки та актинові нитки. Користь усіх методів світлової мікроскопії значно розширюється завдяки використанню цифрових камер. Багато характеристик оцифрованих гістологічних зображень можна проаналізувати кількісно за допомогою відповідного програмного забезпечення. Такі зображення також можна покращити, щоб об'єкти, які безпосередньо не видно через окуляри, можна було досліджувати на моніторі.

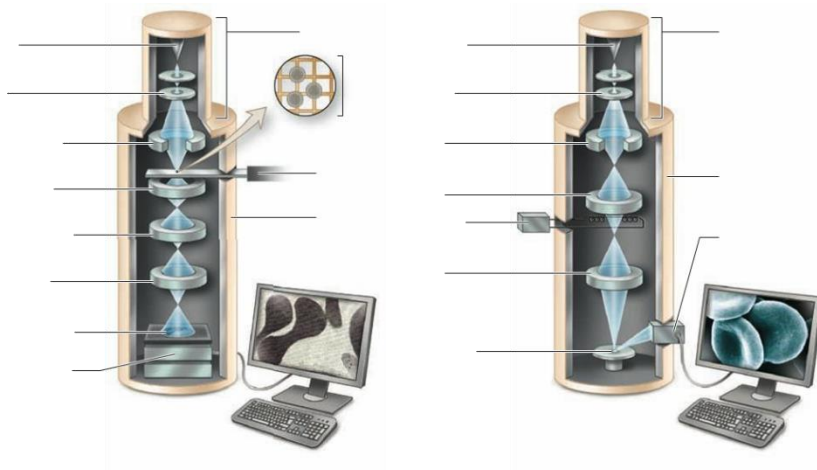


Рис. 5 Трансмісійний електронний мікроскоп. (схема складових електронного мікроскопа).

Електронна мікроскопія. Просвічуючий і скануючий електронні мікроскопи засновані на взаємодії компонентів тканини з пучками електронів. Довжина хвилі в електронному пучку набагато коротша, ніж у світла, що дозволяє збільшити роздільну здатність у 1000 разів.

Трансмісійна електронна мікроскопія Трансмісійна електронна мікроскопія (ТЕМ) — це система зображення, яка забезпечує роздільну здатність близько 3 нм. Ця висока роздільна здатність дозволяє детально розглядати ізольовані частинки, збільшені в 400 000 разів. Дуже тонкі (40-90 нм) зрізи тканин, залиті смолою, зазвичай досліджуються за допомогою ПЕМ при збільшенні приблизно до 120 000 разів. На рисунку 5 показані компоненти ПЕМ та основні принципи його роботи: пучок електронів, сфокусований за допомогою електромагнітних «лінз», проходить через ділянку тканини, створюючи зображення за допомогою чорного, білого та проміжного електронного мікроскопа.

Електронні мікроскопи — це великі прилади, які зазвичай розміщуються в спеціалізованому приміщенні для ЕМ.

Схематично, вигляд основних компонентів просвічуючого електронного мікроскопа (ТЕМ), схожий на перевернутий світловий мікроскоп. Коли колонка мікроскопа знаходиться у вакуумі, металева (зазвичай вольфрамова) нитка (катод) у верхній частині випускає електрони, які рухаються до анода з прискорювальною напругою від 60 до 120 кВ. Електрони, що проходять через отвір в аноді, утворюють промінь, який електромагнітно фокусується круглими електричними котушками аналогічно дії оптичних лінз на світло. Перша лінза являє собою конденсор, що фокусує промінь на ділянці. Деякі електрони взаємодіють з атомами в секції, поглинаючись або розсіюючись різною мірою, тоді як інші просто пропускаються через зразок без взаємодії. Електрони, що досягають лінзи об'єктива, формують зображення, яке потім збільшується і,

нарешті, проектується на флуоресцентний екран або монітор і камеру пристрою із зарядовим зв'язком.

Мікроскопічна авторадіографія — метод локалізації новосинтезованих макромолекул у клітинах або зрізах тканин. Радіоактивно мічені метаболіти (нуклеотиди, амінокислоти, цукри), які надходять до живих клітин, вбудовуються в специфічні макромолекули (ДНК, РНК, білок, глікопротеїни та полісахариди) і випромінюють слабе випромінювання, яке обмежене тими регіонами, де розташовані молекули. Предметні скла з радіоактивно міченими клітинами або зрізами тканин покривають у темній кімнаті фотографічною емульсією, у якій кристали броміду срібла діють як мікродетектори випромінювання так само, як вони реагують на світло у фотоплівці. Після достатнього часу експонування у світлонепроникних боксах слайди проявляються фотографічно. Кристали броміду срібла, відновлені під дією випромінювання, утворюють невеликі чорні зерна металевого срібла, які під світловим мікроскопом або ТЕМ вказують на розташування мічених радіоактивним ізотопом макромолекул у тканині (рис. 6).

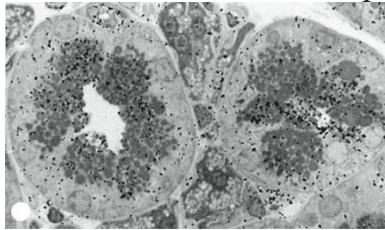


Рис. 6 Мікроскопічна авторадіографія. Чорні зерна срібла зі світлочутливого матеріалу, видно над ділянками клітин із секреторними гранулами та протокою, що вказує на розташування глікопротеїнів.

Велика кількість гістологічної інформації стає доступною за допомогою авторадіографії. Якщо використовується радіоактивний попередник ДНК (наприклад, мічений тритієм тимідин), можна дізнатися, які клітини в тканині (і скільки) реплікують ДНК.

Авторадіографи — це тканинні препарати, в яких частинки, які називаються зернами срібла, вказують на клітини або ділянки клітин, у яких були синтезовані певні макромолекули безпосередньо перед фіксацією. Тут показані авторадіографії слинної залози миші, якій ввели ³H-фукозу за 8 годин до фіксації тканини. Фукоза була включена в олігосахариди, а вільна ³H-фукоза була видалена під час фіксації та розрізання залози. Авторадіографічна обробка та мікроскопія виявляють розташування новосинтезованих глікопротеїнів, що містять цей цукор.

Скануюча електронна мікроскопія (SEM) забезпечує зображення з високою роздільною здатністю поверхонь клітин, тканин і органів. Подібно до ТЕМ, цей мікроскоп виробляє та фокусує дуже вузький пучок електронів, але в цьому інструменті промінь не проходить крізь зразок. Натомість поверхню зразка

спочатку висушують і покривають розпилювачем дуже тонким шаром важкого металу (часто золота), який відбиває електрони в промені, що сканує зразок.

Відбиті електрони вловлюються детектором, створюючи сигнали, які обробляються для отримання чорно-білого зображення. SEM-зображення зазвичай легко інтерпретувати, оскільки вони являють собою тривимірне зображення, яке здається освітленим так само, як великі об'єкти видно з відблисками та тінями, викликаними світлом.

Відтінки сірого. Ці області електронної мікрофотографії відповідають ділянкам тканини, через які електрони легко проходили (здавалися яскравішими або електронно-прозорими), і областям, де електрони поглиналися або відхилялися (виглядали темнішими або більш електронно-щільними). Для покращення контрасту та роздільної здатності в TEM, сполуки з іонами важких металів часто додають до фіксуючих або дегідратуючих розчинів, які використовуються для підготовки тканин. До них відносяться чотириокис осмію, цитрат свинцю та уранілові сполуки, які зв'язують клітинні макромолекули, збільшуючи їх електронну щільність і видимість.

Культура клітин та тканин.

Живі клітини та тканини можна утримувати та вивчати поза організмом у культурі (*in vitro*). В організмі (*in vivo*) клітини омиваються рідиною, отриманою з плазми крові, яка містить багато різних молекул, необхідних для виживання та росту. Культура клітин дозволяє безпосередньо спостерігати за поведінкою клітин під фазово-контрастним мікроскопом, і багато експериментів, які технічно неможливо виконати на інтактній тварині, можна провести *in vitro*. Клітини і тканини вирощують у складних розчинах відомого складу (солі, амінокислоти, вітаміни), до яких додають сироватку або специфічні фактори росту. Клітини, що підлягають культивуванню, механічно або ферментативно диспергують із тканини чи органу та поміщають за допомогою стерильної процедури в прозорий посуд, до якого вони прилипають, як правило, одним шаром.

Такі препарати називають первинними культурами клітин. Деякі клітини можна підтримувати *in vitro* протягом тривалого періоду часу, оскільки вони стають увічненими та утворюють постійну лінію клітин. Більшість клітин, отриманих із нормальних тканин, мають кінцеву, генетично запрограмовану тривалість життя. Проте певні зміни (деякі пов'язані з онкогенами; див. Розділ 3) можуть сприяти безсмертю клітини, процесу, що називається трансформацією, і подібні до початкових змін у нормальній клітині, яка перетворюється на ракову. Удосконалення технології культивування та використання специфічних факторів росту тепер дозволяють підтримувати *in vitro* більшість типів клітин. Як показано в розділі 2, інкубація живих клітин *in vitro* з різноманітними новими флуоресцентними сполуками, які секвеструються та метаболізуються в певних компартментах клітини, забезпечує новий підхід до розуміння цих компартментів як структурно, так і фізіологічно. Інші гістологічні методи,

застосовані до культивованих клітин, особливо важливі для розуміння розташування та функцій мікротрубочок, мікрофіламентів та інших компонентів цитоскелету.

Практичне застосування. Культура клітин дуже широко використовується для вивчення молекулярних змін, які відбуваються при раку; аналізувати інфекційні віруси, мікоплазми та деякі найпростіші; і для багатьох рутинних генетичних або хромосомних аналізів. Клітини раку шийки матки пацієнтки, яку пізніше ідентифікували як Генрієтту Лекс, яка померла від хвороби в 1951 році, були використані для створення однієї з перших клітинних ліній, які називаються клітинами HeLa, які досі використовуються в дослідженнях клітинної структури та функцій у всьому світі.

Ферментна гістохімія (або цитохімія) — це метод локалізації клітинних структур за допомогою специфічної ферментативної активності, присутньої в цих структурах. Щоб зберегти ендogenous ферменти, гістохімічні процедури зазвичай використовують нефіксовану або м'яко фіксовану тканину, яку розрізають на кріостаті, щоб уникнути несприятливого впливу тепла та органічних розчинників на ферментативну активність. Для ферментної гістохімії зрізи тканини занурюють у розчин, що містить субстрат ферменту, який локалізується; ферменту дозволяється діяти на його субстрат; зріз потім приводиться в контакт з маркерною сполукою, яка реагує з продуктом ферментативної дії на субстрат; і кінцевий продукт маркера, який повинен бути нерозчинним і видимим за допомогою світлової або електронної мікроскопії, випадає в осад на місці ферментів, ідентифікуючи їх розташування.

Приклади ферментів, які можна виявити гістохімічно, включають наступне:

- Фосфатази, які видаляють фосфатні групи з макромолекул.

- Дегідрогенази, які переносять іони водню з одного субстрату на інший, такі як багато ферментів циклу лимонної кислоти (Кребса), що дозволяє гістохімічно ідентифікувати такі ферменти в мітохондріях. Пероксидаза, яка сприяє окисленню субстратів з переходом іонів водню на перекис водню.

Практичне застосування. Багато ферментних гістохімічних процедур використовуються в медичній лабораторії, включно з реакцією Берлінського блакитного Перлза на залізо (використовується для діагностики захворювань накопичення заліза, гемохроматозу та гемосидерозу), реакцію PAS-амілази та альціанового синього на полісахариди (для виявлення глікогенозу та мукополісахаридоз), а також реакції на ліпіди та сфінголіпіди (для виявлення сфінголіпідозу).

Візуалізація специфічних молекул. Конкретну макромолекулу, присутню в ділянці тканини, також можна ідентифікувати за допомогою мічених сполук або макромолекул, які специфічно зв'язуються з цікавою молекулою. Сполуки, які

взаємодіють з молекулою, повинні бути видимі за допомогою світлового або електронного мікроскопа, часто позначені міткою, яку можна виявити. Найбільш часто використовувані мітки - це флуоресцентні сполуки, радіоактивні атоми, які можна виявити за допомогою авторадіографії, молекули пероксидази або інших ферментів, які можна виявити за допомогою гістохімії, і частинки металу (зазвичай золота), які можна побачити за допомогою світлової та електронної мікроскопії. Ці методи можна використовувати для виявлення та локалізації специфічних цукрів, білків і нуклеїнових кислот.

Високоспецифічна взаємодія між макромолекулами – це взаємодія між антигеном та його антитілом. З цієї причини мічені антитіла регулярно використовуються в імуногістохімії для ідентифікації та локалізації багатьох специфічних білків, а не лише тих, що мають ферментативну активність, яку можна продемонструвати гістохімією. Імунні клітини організму взаємодіють з іншими макромолекулами, які називаються антигенами, та виробляють антитіла проти них, розпізнані як «чужорідні», не є нормальною частиною організму та потенційно небезпечні. Антитіла належать до родини імуноглобулінів – глікопротеїнів, і секретуються лімфоцитами. Ці молекули зазвичай специфічно зв'язуються з антигенами, що їх провокують, і допомагають їх знищувати. Кожен імуногістохімічний метод, який широко застосовується як для досліджень, так і для діагностичних цілей, вимагає наявності антитіла проти білка, який необхідно виявити. Це означає, що білок повинен бути попередньо очищений за допомогою біохімічних або молекулярних методів, щоб можна було виробити антитіла проти нього. Щоб виробити антитіла проти білка певного виду тварин (наприклад, людини або щура), ізольований білок вводять тварині іншого виду (наприклад, кролику або козі). Якщо амінокислотна послідовність білка достатньо відрізняється для того, щоб ця тварина розпізнала його як чужорідний, тобто як антиген, тварина вироблятиме антитіла проти білка.

Різні групи (клони) лімфоцитів у тварини, якій вводять препарат, розпізнають різні частини білка x, і кожен клон виробляє антитіло проти цієї частини. Перевага використання моноклональних антитіл, а не поліклональних антитіл, полягає в тому, що їх можна вибрати так, щоб вони були високоспецифічними та міцно зв'язувалися з білком, який потрібно виявити, з меншим неспецифічним зв'язуванням з іншими білками, подібними до того, що представляє інтерес.

В імуногістохімії зріз тканини, який, як вважають, містить цікавий білок, інкубується в розчині, що містить антитіло (або моноклональне, або поліклональне) проти цього білка. Антитіло специфічно зв'язується з білком, і після промивання розташування білка в тканині або клітинах можна побачити за допомогою світлового або електронного мікроскопа шляхом візуалізації антитіла. Антитіла зазвичай мітять флуоресцентними сполуками, пероксидазою або лужною фосфатазою для гістохімічного виявлення або електронно-щільними частинками золота для ТЕМ.

Існують прямі та непрямі методи імуноцитохімії. Прямий метод включає лише мічене антитіло, яке зв'язує цікавий білок. Непряма імуногістохімія передбачає послідовне нанесення двох антитіл і додаткові етапи промивання. (Первинне) антитіло, що специфічно зв'язує цікавий білок, не позначене. Виявлена мітка кон'югується з вторинним антитілом, виробленим у виді тварини, відмінному («чужому») від того, який утворив первинне антитіло. Наприклад, первинні антитіла, вироблені мишачими лімфоцитами (такі як більшість моноклональних антитіл), специфічно розпізнаються та зв'язуються антитілами, виробленими у кролика чи кози, яким ввели імуноглобулін мишачого антитіла.

Непрямий метод ширше використовується в дослідженнях і патологічних тестах, оскільки він більш чутливий, з додатковим рівнем зв'язування антитіл, що служить для посилення видимого сигналу. Крім того, один і той самий препарат міченого вторинного антитіла можна використовувати в дослідженнях з різними первинними антитілами (специфічними для різних антигенів), за умови, що всі вони виготовлені в одному виді. Існують інші непрямі методи, які передбачають використання інших проміжних молекул, таких як методика біотин-авідин, які також використовуються для посилення сигналів виявлення.

Практичне значення. Оскільки клітини при деяких захворюваннях, включаючи багато ракових клітин, часто виробляють білки, унікальні для їх патологічного стану, імуногістохімія може використовуватися патологами для діагностики багатьох захворювань, включаючи певні типи пухлин і деякі інфіковані вірусом клітини.

Методи гібридизації. Гібридизація зазвичай передбачає специфічне зв'язування між двома окремими ланцюгами нуклеїнової кислоти, яке відбувається за відповідних умов, якщо ланцюги є комплементарними. Чим більша подібність їхніх нуклеотидних послідовностей, тим легше комплементарні ланцюги утворюють «гібридні» дволанцюгові молекули. Гібридизація в суворих умовах дозволяє специфічно ідентифікувати послідовності в генах або РНК. Це можна зробити за допомогою методів імуноцитохімії.

Пряма імуноцитохімія (або імуногістохімія) може бути прямою або непрямою. Пряма імуноцитохімія використовує антитіло, створене проти тканинного білка, що цікавить, і позначене безпосередньо міткою, такою як флуоресцентна сполука або пероксидаза. При розміщенні разом із зрізом тканини на предметному склі ці мічені антитіла специфічно зв'язуються з білком (антигеном), проти якого вони були вироблені, і можуть бути візуалізовані відповідним методом.

Непряма імуноцитохімія спочатку використовує первинне антитіло, створене проти цікавого білка (антигену) і нанесене на ділянку тканини для зв'язування його специфічного антигену. Потім отримують мічені вторинні антитіла, які були створені іншим видом проти імуноглобулінових білків (антитіл) від виду, в якому були створені первинні антитіла, і мічені

флуоресцентною сполукою або пероксидазою. Коли мічене вторинне антитіло наноситься на зріз тканини, воно специфічно зв'язує первинні антитіла, опосередковано позначаючи цікавий білок на предметному склі. Оскільки більше одного міченого вторинного антитіла може зв'язувати кожен первинну молекулу антитіла, мічення білка, що цікавить, посилюється непрямим методом.

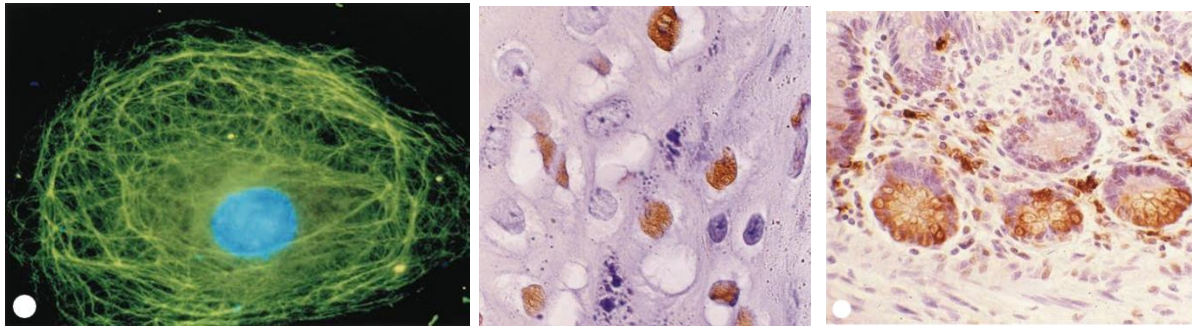


Рис. 7. Візуалізація специфічних молекул Клітини та тканини, забарвлені імуногістохімічним методом.

Імуноцитохімічні методи локалізації специфічних білків можуть бути застосовані для препаратів світлової мікроскопії або ТЕМ з використанням різноманітних міток. Приклади специфічних антигенів, які мають діагностичне значення. Цей метод ідеально підходить для визначення того, чи має клітина певну послідовність ДНК, таку як ген або частину гена (рис. 7), ідентифікації клітин, що містять специфічні матричні РНК (мРНК) (у яких транскрибується відповідний ген), або визначення локалізації гена в певній хромосомі.

Ідентифікація клітинних структур на ділянках тканини. Вивчаючи та інтерпретуючи пофарбовані зрізи тканини, важливо пам'ятати, що мікроскопічні препарати є кінцевим результатом серії процесів, які почалися зі збору тканини та завершилися встановленням покривного скла на предметне скло. Певні етапи цієї процедури можуть дещо спотворити тканини, спричинивши незначні структурні аномалії, які називаються артефактами, яких немає в живій тканині. Одним із таких спотворень є незначна усадка клітин або ділянок тканини, спричинена фіксатором, етанолом або теплом, необхідним для заливання парафіну. Усадка може створити штучні простори між клітинами та іншими компонентами тканини. Такі простори також можуть бути наслідком втрати ліпідів або низькомолекулярних речовин, які не зберігаються фіксатором або видаляються рідинами для зневоднення та очищення.

Невеликі тріщини на зрізах також можуть виглядати як великі простори в тканині. Інші артефакти можуть включати дрібні зморшки на розрізі (які новачок може сплутати з лінійними структурами в тканині) та виділення з плями (які можна сплутати з клітинними структурами, такими як цитоплазматичні гранули). Учні повинні знати про існування артефактів і вміти їх розпізнавати. Іншою складністю дослідження гістологічних зрізів є неможливість диференційованого

фарбування всіх тканинних компонентів на одному предметному склі. Одне фарбування рідко може добре продемонструвати ядра, мітохондрії, лізосоми, базальні мембрани, еластичні волокна і т. д.

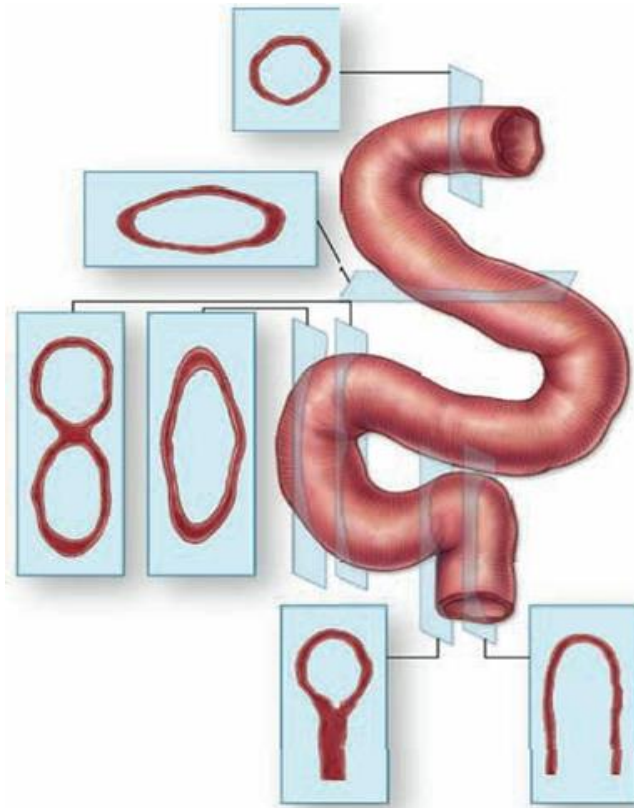


Рис. 8. Візуалізація кровоносної судини та інших трубчастих структур, що виглядають на розрізах у вигляді круглих або овальних форм, розмір і форма яких залежать від поперечного або косого кута розрізу.

За допомогою світлового мікроскопа необхідно розглянути препарати, пофарбовані різними методами, перш ніж можна отримати уявлення про повний склад і структуру клітини або тканини. ПЕМ дозволяє спостерігати за клітинами з усіма їхніми внутрішніми структурами та оточуючими компонентами ЕСМ, але лише кілька клітин у тканині можна зручно досліджувати в цих дуже маленьких зразках. Нарешті, коли тривимірний об'єм конструкції розрізають на дуже тонкі секції, мікроскопічно здається, що секції мають лише два виміри: довжину та ширину.

Досліджуючи зріз під мікроскопом, глядач повинен завжди мати на увазі, що компоненти відсутні перед і позаду того, що видно, оскільки багато тканинних структур товщі за зріз.

Круглі структури, які можна побачити під мікроскопом, насправді можуть бути частинами сфер або труб. Оскільки структури в тканині мають різну орієнтацію, їхній двовимірний (2D) вигляд також буде відрізнятися залежно від

площини розрізу. Одна звивиста трубка буде виглядати в розрізі тканини як багато окремих округлих або овальних структур (рис 8). У тонких зрізах тривимірні структури виглядають лише двовимірно. Такі зображення необхідно правильно інтерпретувати, щоб зрозуміти справжню структуру тканин і компонентів органів.

Наприклад, кровоносні судини та інші трубчасті структури виглядають на розрізах у вигляді круглих або овальних форм, розмір і форма яких залежать від поперечного або косого кута розрізу. Сильно згорнута трубка буде виглядати як кілька круглих і овальних структур. У ТЕМ-зрізах клітин круглі структури можуть являти собою сферичні органели або поперечні розрізи трубчастих органел, таких як мітохондрії. Важливо розвинути такі навички інтерпретації, щоб зрозуміти морфологію тканин і клітин у мікроскопічних препаратах.

Питання для самоконтролю:

1. Яка процедура безпосередньо передуючи очищенню зразка органічним розчинником під час підготовки тканини до звичайного світлового мікроскопічного дослідження? а. Зневоднення б. Фіксація с. Фарбування d. Очищення е. Вбудовування

2. Яка з наведених нижче процедур фарбування базується на катіонних та аніонних властивостях матеріалу, що фарбується? а. Гістохімія ферментів б. Періодична кислота-реакція Шиффа с. Фарбування гематоксиліном та еозином d. Імуногістохімія е. Методи просочування металом

3. Від якого компонента у світловому мікроскопі, що використовується для гістології, роздільна здатність і збільшення клітин значною мірою залежать? а. Конденсатор б. Об'єктив с. Окуляри або окулярні лінзи d. Предметне скло зразка е. Контроль інтенсивності освітлення

4. За допомогою якої процедури найкраще гістологічно можна виявити клітинні відкладення глікогену, вільного полісахариду? а. Авторадіографія б. Електронна мікроскопія с. Гістохімія ферментів d. Фарбування гематоксиліном і еозином е. Періодична кислотна реакція Шиффа

5. Для якої гістологічної процедури використовується додавання сполук важких металів до фіксатора та ультратонких зрізів вбудованої тканини скляним ножом? а. Скануюча електронна мікроскопія б. Флуоресцентна мікроскопія с. Гістохімія ферментів d. Конфокальна мікроскопія е. Просвічуюча електронна мікроскопія

6. Роздільна здатність електронної мікроскопії значно перевищує роздільну здатність світлової мікроскопії через що з наведеного? а. Довжина хвилі електронів у пучку мікроскопа коротша, ніж у пучка світла. б. Лінзи електронного мікроскопа мають значно покращену якість. в. Для електронної мікроскопії зразок тканини не вимагає фарбування. d. Електронний мікроскоп дозволяє значно більше збільшити проектоване зображення, ніж світловий

мікроскоп. д. Електронним мікроскопом можна керувати набагато точніше, ніж світловим мікроскопом.

7. Лабораторії часто використовують незафіксовані, заморожені зразки тканин, розрізані за допомогою кріостата, для швидкого фарбування, мікроскопічного дослідження та діагностики патологічних станів. Окрім економії багато часу завдяки уникненню фіксації та процедур, необхідних для заливання парафіном, заморожені зрізи зберігають і дозволяють вивчати макромолекули, які зазвичай втрачаються під час процедури парафінування? а. Вуглеводи б. Мала мРНК с. Основні білки d. Кислі білки е. Ліпіди

Відповіді: 1а, 2с, 3б, 4е, 5е, 6а, 7е.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Горальський Л. П., Хомич В. Т., Сокульський І. М. та ін. Гістологія свійських тварин: навч. Посібник. Житомир: ЖНАЕУ, 2020. 296 с.
2. Новак В. П., Пилипенко М. Ю., Бичков Ю. П. Цитологія, гістологія, ембріологія. Київ: Віра-Р, 2001. 288 с. 3. Хомич В. Лекції з цитології, ембріології та гістології свійських тварин: Навчальний посібник. Київ. ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2012. 296 с. 4. Хомич В. Т., Мазуркевич Т. А., Дишлюк Н. В., Стегней Ж. Г., Усенко С. І. Міжнародна ветеринарна гістологічна номенклатура (Термінологічний словник). Київ, ФОП «Ямчинський О.В.», 2019. 276 с.
3. Луцик О. Д., Чайковський Ю. Б. Гістологія. Цитологія. Ембріологія.: підручник. Вінниця.: Нова Книга, 2018. 592 с.
4. Напханюк В. К., Кузьменко В. А., Заярна С. П., Ульянцева О. А. Цитологія, загальна гістологія та ембріологія: Практикум: Навч. Посібник Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2002. 218 с.
5. Хомич В. Т., Рудик С. К., Левчук В. С. та ін. Морфологія с.-г. тварин. К.: Вища освіта, 2003. 527 с.
6. Michael H. Ross, Gordon I. Kaye, Wojciech Pawlina. Histology: A Text and Atlas. 4th Edition, 2002. 864 p.
7. Sorenson R. L., Belje T. C. Atlas of human histology: a guide to microscopic structure of cells, tissues and organs. 2014. 367 p.
8. Ветеринарний посібник. URL: [URL:https://www.merckvetmanual.com](https://www.merckvetmanual.com)
9. Горальський Л.П., Хомич, В.Т., Кононський О.І. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології

Основи техніки гістологічних досліджень. Методичні рекомендації до
практичних занять з освітнього компоненту з освітнього компонента
«Цитологія, гістологія, ембріологія».

Формат 60x84/16. Гарнітура Times New Roman
Папір для цифрового друку. Друк ризографічний.

Ум. друк. арк. _.
Наклад

ОДАУ

65000, м. Одеса, вул. Пантелеймонівська, 13