



СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ФИКСАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ЦЕЛЕЙ

К.Н. Крупин¹, А.А. Супильников^{1, 2}, П.А. Лопанчук¹, Е.А. Мишурина¹, Я. Фришонс³

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, ул. Островитянова д. 1, г. Москва, 117997, Россия

²Медицинский университет «Реавиз», ул. Чапаевская, д. 227, г. Самара, 443001, Россия

³Ветеринарный университет Брно, Дворцево трж. 1946/1, 612 42 Брно, Чешская Республика

Резюме. Для обеспечения безопасности образовательного процесса в мире постоянно идёт поиск новых способов фиксации аутопсийного материала. Целью работы являлся поиск литературных данных о новых консервирующих растворах, применяемых в современных условиях для фиксации трупного биологического материала для образовательных целей. Для достижения поставленной цели был проведён научный поиск по базе РИНЦ и PubMed за последние 5 лет с дополнительным изучением постатейных ссылок. В результате литературного обзора установлено, что в настоящее время разработаны современные методы фиксации аутопсийного материала, включающие в себя растворы, как содержащие формальдегид, так и без его использования. Современная тенденция определяется в снижении количества используемого формальдегида в таких растворах или удалении его из тканей перед образовательным процессом. Современные методики консервации зарекомендовали себя с хорошей стороны, позволяя добиться реалистичности биологических тканей, но всегда дороже стандартной методики фиксации с использованием водного раствора формальдегида за счёт стоимости самого раствора или оборудования.

Ключевые слова: бальзамирование, консервация, труп, метод.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Супильников А.А. является членом редакционной коллегии, в принятии решения о публикации работы участия не принимал.

Финансирование. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Для цитирования: Крупин К.Н., Супильников, А.А. Лопанчук П.А., Мишурина Е.А., Фришонс Я. Современные методы фиксации биологического материала для образовательных целей. *Вестник медицинского института «РЕАВИЗ». Реабилитация, Врач и Здоровье.* 2024;14(5):13-17. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2024.5.MORPH.1>

MODERN METHODS OF FIXATION OF BIOLOGICAL MATERIAL FOR EDUCATIONAL PURPOSES

Konstantin N. Krupin¹, Aleksey A. Supil'nikov^{1, 2}, Pavel A. Lopanchuk¹, Evgeniya A. Mishurinskaya¹, Yan Frishons³

¹N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, 1 Ostrovityanova str., Moscow, 117997, Russia

²Medical University "Reaviz", 227 Chapayevskaya str., Samara, 443001, Russia

³University of Veterinary Sciences Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic

Abstract. To ensure the safety of the educational process, the world is constantly looking for new ways to fix autopsy material. The purpose of our work was to search for literature data on new preservative solutions used in modern conditions for the fixation of cadaveric biological material for educational purposes. To achieve this goal, a scientific search was conducted on the RSCI and PUBMED database over the past 5 years with additional study of article-by-article links. As a result of the literature review, it has been established that modern methods of fixation of autopsy material have been developed, including solutions both containing formaldehyde and without its use. The current trend is determined by reducing the amount of formaldehyde used in such solutions or removing it from tissues before the educational process. Modern conservation techniques have proven themselves on the good side, allowing for the realism of biological tissues, but they are always more expensive than the standard fixation technique using an aqueous formaldehyde solution due to the cost of the solution or equipment itself.

Keywords: embalming, preservation, corpse, method.

Competing interests. The authors declare no competing interests. Supilnikov A.A. is a member of the editorial board, he did not take part in the decision to publish the work.

Funding. This research received no external funding.

Compliance with ethical principles. The author confirm that they respect the rights of the people participated in the study, including obtaining informed consent.

Cite as: Krupin K.N., Supil'nikov, A.A. Lopanchuk P.A., Mishurinskaya E.A., Frishons Ya. Modern methods of fixation of biological material for educational purposes. *Bulletin of the Medical Institute "REAVIZ": Rehabilitation, Doctor and Health.* 2024;14(5):13-17. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2024.5.MORPH.1>

Введение

Сохранение биологического материала в настоящее время является актуальной проблемой для всех медицинских и образовательных учреждений в Российской Федерации. Несмотря на длительную историю консервации биологического материала, постоянный поиск новых методик не прекращается и в настоящее время для выявления более безопасных методов с сохранением морфологических свойств для дальнейшего изучения материала и использования его в образовательных целях.

В настоящее время самым распространённым методом фиксации биологического материала является применение десятипроцентного водного раствора формальдегида, который достаточно агрессивно взаимодействует с биологическим материалом, изменяя его морфологические свойства и ДНК в тканях [1], а также обладает раздражающим действием на слизистые оболочки исследователя и является достаточно токсичным веществом при длительном взаимодействии.

Ранее для консервации трупов использовался метод консервации насыщенным соевым раствором по Амбруаз Паре (1510–1590), состоящий из хлорида натрия, 20% формальдегида, фенола, глицерина, изопропилового спирта и воды, который до сих пор часто применяется для изготовления музейных препаратов.

Относительно новый метод «мягкой» фиксации трупного материала методом Тиля (фиксация материала в растворе этиленгликоля, 4-хлор-3-метилфенола, борной кислоты, нитрата калия и нитрата аммония с дальнейшим погружением в раствор 3% борной кислоты, 10% моноэтиленгликоля, 10% нитрата аммония, 5% нитрата калия, 7% сульфата натрия и 2% формалина на срок до 6-ти месяцев) достаточно эффективен в практике, но критикуется за сложность исполнения и высокую цену методики [2].

Цель работы – поиск литературных данных о новых консервирующих растворах, применяемых в современных условиях для фиксации трупного биологического материала для образовательных целей.

Материалы и методы

Для достижения поставленной цели был проведён научный поиск по базе РИНЦ и PubMed за последние 5 лет с дополнительным изучением статейных ссылок по следующим ключевым словам:

- по базе РИНЦ: (консервация или бальзамирование) and (труп) по тематике «Медицина и здравоохранение» и «Биология» – было получено 27 результатов;

- по базе PubMed: ((conservation) OR (embalming)) AND (cadaver) – было получено 695 результатов.

Критерии включения:

- статьи и патенты на русском и английском языках;
- оригинальные исследования;
- практические наблюдения метода бальзамирования.

Критерии исключения:

- обзорные статьи;
- методики пластинации биологического материала и создания 3D-моделей;
- статьи с обсуждением проблем получения биологического материала для научной и образовательной деятельности, правовых основ консервации биологического материала.

В итоге в обзор попали 9 статей.

Результаты

В 2019 году Рыковой Д.Г. с соавт. был предложен метод консервации биологических тканей с использованием диальдегида, что обеспечивало увеличение сроков хранения органов любых размеров, а также позволяло сохранить цвет и органолептические свойства мягких тканей препаратов [3]. Способ фиксации и хранения биоматериала включает промывание водой биоматериала с последующей фиксацией его путём полного погружения в 10% водный раствор диальдегида по объёму, превышающему объём биоматериала не менее чем в 10 раз, с заменой реагента на 7, 14 и 21 сутки, каждый раз промывая биоматериал после удаления реагента проточной водой. На 14-е сутки производят замену реагента, имеющего следующий состав исходных компонентов (мас.%): диальдегид – 24,97%, дистиллированная вода – 74,93%, эозин К – 0,0032%, карбоксиметилцеллюлоза – 0,0968%, с выдержкой последнего в растворе диальдегида не менее 12 часов. На 21-е сутки производят замену реагента, имеющего следующий состав исходных компонентов (мас.%): диальдегид – 24,271%, дистиллированная вода – 72,813%, эозин К – 0,0031%, глицерин – 2,9129%.

В 2019 году Абрамов А.А. предложил способ криоконсервации головного мозга трупа путём введения перфузии перфузата в верхний сагиттальный синус с дальнейшей возможностью изучения вещества головного мозга при образовательном процессе и в судебно-медицинской экспертизе [4]. Способ перфузии для криоконсервации головного мозга включает введение в головной мозг перфузата с последующим его удалением по двум отдельным каналам. В качестве охлаждающего канала выбран путь «сагиттальный синус – яремная вена» с входом в передний отдел сагиттального синуса. В качестве пропитывающего канала выбран путь «желудочки – шейные артерии и вены» с входом в желудочковые отделы головного мозга. Предлагаемый способ

перфузии для криоконсервации головного мозга за счёт пропускания охлаждающего перфузата через крупнокалиберные сосуды головы обеспечивает повышение скорости охлаждения мозговых тканей, а за счёт перфузии через ликворную систему с распределённой топологией – равномерную пропитку межклеточного пространства головного мозга криопротектором и устраняет проблему закупоривания путей его протекания.

В 2023 году была опубликована работа Алябьева Ф.В. с соавт. об использовании раствора «Альдофикс» для фиксации свежих макропрепаратов [5]. Биологический объект, изъятый после вскрытия трупа, промывали водой, после чего помещали в контейнер с раствором «Альдофикса», превышающим объём органа не менее чем в 10 раз. Состояние органа оценивалось сразу при помещении в раствор, через 7 дней, 1, 3 и 5 месяцев. По виду, по сравнению с исходным, макропрепараты были качественными, сохранились внешне и напоминали свежие, нефиксированные органы. Патентованный раствор «Альдофикс» выполнен на основе водного раствора глиоксаля с применением стабилизирующих веществ.

В 2020 году Воробиевской С.В. и соавт. был предложен новый метод изготовления мягких анатомических препаратов, который включает предварительное придание демонстрационной формы препарату, фиксацию препарата при температуре не выше +5 °С в растворе, содержащем формалин – 60 г, уксуснокислый натрий – 100 г, хлористый калий – 10 г, воду дистиллированную – 1000 г, при этом объём раствора в 3 раза превышает объём фиксируемого препарата. В этом растворе препарат выдерживают пока ткани равномерно уплотнятся и кровь перестанет экстрагироваться в раствор, что занимает от нескольких часов до 1 месяца, в зависимости от размера, плотности и строения органа. Раствор заменяют на новый 1 раз в 5 дней, затем проводят восстановление цвета в 95% спирте, с экспозицией от нескольких минут до 3 часов, в зависимости от плотности, размера и строения органа. Далее проводят консервацию в растворе, содержащем глицерина – 3800 г, уксуснокислого натрия – 30 г, воды – 1000 г, тимол – 10 г, при этом раствор должен полностью покрывать препарат. Экспозиция на данном этапе составляет от 2 до 4 месяцев. С помощью предложенного метода возможно изготавливать анатомические препараты, которые нетоксичны, лишены запаха, обладают высокой наглядностью и близки к естественной окраске и форме органов и тканей, что позволяет изучать их не только визуально, но и мануально, и хранить на открытом воздухе без использования герметично закрытых контейнеров [6].

Для лапароскопических гинекологических тренингов был разработан способ консервирования тел доноров на основе модификации старой методики с применением раствора, содержащего 70% этанола, 30% глицерина и дополненных лизоформин 0,3 объёмных процента. Лизоформин (Lysoform, Dr. Hans Rosemann GmbH, Германия) – дезинфицирующее средство, содержащее 6% формальдегида, 1,8% глутарала, 5% алкилэфирсульфата, 5% этанола и 5% анионных поверхностно-активных веществ. Раствор вводился внутрисосудисто. Дальнейшее хранение консервированных тел осуществлялось заворачиванием в салфетки с консервирующим раствором объёмом, содержащим около 1–2 л тимол в качестве консервирующего агента и с добавлением 1 литра этанола с дальнейшим разбавлением до 10 л воды. Труп далее упаковывался в полиэтилен для обеспечения влажности камеры хранения и находился в запечатанном пластиковом пакете при температуре +4 °С до одного года, при этом неоднократно использовался для манипуляций [7].

Предложен новый метод фиксации биологического материала раствором на основе феноксиэтанола (техника Кросадо). Этот раствор применялся в основном для фиксирования тканей трупов для обучения в университете морфологическим дисциплинам [8]. Особенность раствора заключается в том, что формальдегид в нём используется в минимальной концентрации. Был разработан протокол бальзамирования с использованием феноксиэтанола в концентрации 7 и 1,5 об.% в фиксаторе и консервационной жидкости соответственно. Метод феноксиэтанола обеспечивает эстетичные, прочные и не имеющие запаха ткани. Отбеливание менее выражено по сравнению с протоколами на основе этанола или формальдегида. Ткани остаются гибкими после бальзамирования на основе феноксиэтанола и в некоторой степени могут быть использованы для биомеханических экспериментов. Сам раствор помогает зафиксировать ткани в классическом виде с сохранением естественного цвета с появлением небольшой желтизны. При этом раствор относительно дешёвый в использовании, но дороже водного раствора формальдегида.

В 2019 году описан метод бальзамирования с применением N-винил-2-пирролидона при эндоскопическом трансназальном доступе к основанию черепа, выполненном на кадаверном материале. Фиксация раствором была произведена внутрисосудисто в концентрации 10%. После фиксации мягкие ткани сохраняли эластичность, а сосуды составили реальную картину операции. Недостатком этого метода посчитали, что фиксация главного мозга была недостаточной – он оставался относительно мягким и был неподдающимся для дальнейшего исследования. При этом, при повышении концен-

трации фиксирующего раствора уплотнялась слизистая оболочка и другие эпителиальные ткани, что затрудняло дальнейшие исследования. Тем не менее, положительной стороной метода являлось то, что для применения данного раствора не требовались какие-либо дополнительные условия в виде морозильных и вентиляционных камер, а также относительная дешевизна метода [9].

В статье 2021 года авторы описывают метод фиксации кадаверного материала без использования формальдегида раствором, содержащим этиловый спирт (25%), полиэтиленгликоль ПЭГ400 (20%), хлороксиленол (0,1%) и нитрат натрия (10%) с добавлением водопроводной воды, введенным внутриартериально. Последующее хранение материала осуществлялось в холодильной камере при температуре +4 °С. Забальзамированные экземпляры по цвету, консистенции, микробиологическому составу почти в точности напоминали своих живых аналогов [10].

Заслуживает отдельного упоминания работа 2022 года Shun Otsuka с соавт., описывающими уменьшение уплотнения мягких тканей и запаха у трупа, фиксированного водным раствором формальдегида, после перфузии водным раствором мочевины [11]. Десять трупов были забальзамированы с использованием 12 л раствора формалина (6,75% формальдегида), глицерина, solmix AP-7 (85,5% этанола, 9,6% n-пропилового спирта, 4,9% изопропилового спирта, 0,2% воды) и воды через дорсальные

артерии стопы и радиальные артерии. После фиксации трупы помещали в резервуаре с 60–70%-м этанолом на 2–4 недели, а затем консервировали в запечатанном полиэтиленовом пакете и хранили при комнатной температуре. Перед обучением хирургическим навыкам (за 2–7 дней до тренировочного вскрытия) 4 из 10 трупов реперфузировали 8–15 л водного раствора, насыщенного мочевиной (1 кг кристаллов мочевины на 1 л воды) через бедренные артерии с помощью механического насоса. После такой манипуляции курсанты и объективные механические тесты отмечали сходство фиксированных тканей с живой.

Заключение

В настоящее время разработаны отдельные современные методы фиксации биологического материала для образовательных целей, включающие в себя растворы, как содержащие формальдегид, так и без его использования. Современная тенденция определяется в снижении количества используемого формальдегида в таких растворах или удалении его из тканей перед образовательным процессом.

Современные методики консервации зарекомендовали себя с хорошей стороны, позволяя добиться реалистичности биологических тканей, но всегда дороже стандартной методики фиксации с использованием водного раствора формальдегида за счёт стоимости самого раствора или оборудования.

Литература [References]

- 1 Ashton M, Czado N, Harrel M, Hughes S. Genotyping strategies for tissues fixed with various embalming fluids for human identification, databasing, and traceability. *J Forensic Sci.* 2023 Oct 31. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15414> Epub ahead of print. PMID: 37904606
- 2 Ottone NE, Vargas CA, Fuentes R, del Sol M. Walter Thiel's Embalming Method: Review of Solutions and Applications in Different Fields of Biomedical Research. *Int J Morphol*, 2016.
- 3 Патент № 2692917 C1 Российская Федерация, МПК A01N 1/00. Способ фиксации и хранения биоматериала с использованием высокоэффективного и нетоксичного реагента / Д.Г. Рыкова, А.С. Сапега, С.К. Толмачева. № 2018123300 : заявл. 27.06.2018 : опубл. 28.06.2019. Invention № 2692917 C1 Russian Federation, Int. Cl. A01N 1/00. Method of fixing and storing biomaterial using highly efficient and non-toxic reagent / D.G. Rykova, A.S. Sapega, S.K. Tolmacheva. № 2018123300 : Effective date for property rights. 27.06.2018 : Registration date. 28.06.2019. (In Russ).
- 4 Патент № 2681484 C1 Российская Федерация, МПК A01N 1/00. Способ перфузии для криоконсервации головного мозга человека / А.А. Абрамов. № 2018105659 : заявл. 14.02.2018 : опубл. 06.03.2019. Invention № 2681484 C1 Russian Federation, Int. Cl. A01N 1/00. Perfusion method for cryo-conservation of human brain / A.A. Abramov. № 2018105659 : Effective date for property rights. 14.02.2018 : Registration date. 06.03.2019. (In Russ).
- 5 Алябьев Ф.В., Хлунова Н.В., Русских А.Н. [и др.] Использование раствора «Альдофикс» для фиксации свежих макропрепаратов. *Современные проблемы науки и образования*. 2023;6:104. Alyabyev F.V., Khludneva N.V., Russkikh A.N. (et al.) Use of «Aldofix» solution for fixing fresh macro preparations. *SOVREMENNYE PROBLEMY NAUKI I OBRAZOVANIYA*, 2023;6:104. (In Russ). <https://doi.org/10.17513/spno.33086>
- 6 Патент № 2727690 C1 Российская Федерация, МПК G09B 23/28. Способ изготовления мягких анатомических препаратов / С. В. Воробьевская, В. В. Дронов, М. И. Стаценко [и др.] ; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный аграрный университет имени В.Я. Горина». № 2020100766 : заявл. 09.01.2020 : опубл. 22.07.2020. Invention № 2727690 C1 Russian Federation, Int. Cl. G09B 23/28. Method for making soft anatomical preparations / S.V. Vorobievskaya, V.V. Dronov, M.I. Statsenko (et al.) ; Proprietor(s): Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet imeni V.YA. Gorina" (RU). № 2020100766 : Effective date for property rights. 09.01.2020 : Registration date. 22.07.2020. (In Russ).
- 7 Wedel T, Ackermann J, Hagedorn H, Mettler L, Maass N, Alkatout I. Educational training in laparoscopic gynecological surgery based on ethanol-glycerol-lysoformin-preserved body donors. *Ann Anat.* 2019 Jan;221:157-164. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2018.10.002> Epub 2018 Oct 9. PMID: 30312766.
- 8 Crosado B, Löffler S, Ondruschka B, Zhang M, Zwirner J, Hammer N. Phenoxylethanol-Based Embalming for Anatomy Teaching: An 18 Years' Experience with Crosado Embalming at the University of Otago in New Zealand. *Anat Sci Educ.* 2020 Nov;13(6):778-793. <https://doi.org/10.1002/ase.1933> Epub 2020 Jan 21. PMID: 31758863; PMCID: PMC7687111.

- 9 Maruyama K, Yokoi H, Nagase M, Yoshida H, Noguchi A, Matsumura G, Saito K, Shiokawa Y. Usefulness of N-vinyl-2-pyrrolidone Embalming for Endoscopic Transnasal Skull Base Approach in Cadaver Dissection. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2019 Oct 15;59(10):379-383. <https://doi.org/10.2176/nmc.2019-0069> Epub 2019 Jul 4. PMID: 31270286; PMCID: PMC6796061.
- 10 Menon, P., A. Aldarwich, L. Hamdan, M. Hammoud, and A. Al Aiyen. Novel Formaldehyde-Free Embalming Fluid Formulation for Long-Term Preservation of Cadavers for Anatomy Teaching. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2021 Dec.;33(9) <https://doi.org/10.9755/ejfa.2021.v33.i9.2753>
- 11 Otsuka S, Kawata S, Nanizawa E, Hatayama N, Hayashi S, Itoh M, Hirai S, Naito M. Efficacy of urea solution reperfusion to a formalin-embalmed cadaver for surgical skills training. *Anat Sci Int*. 2022 Jul;97(3):264-272. <https://doi.org/10.1007/s12565-022-00653-y> Epub 2022 Mar 3. PMID: 35239164

Авторская справка**Крупин Константин Николаевич**

Канд. мед. наук, доцент, специалист по учебно-методической работе Центра анатомического и симуляционного моделирования Мультипрофильного аккредитационно-симуляционного центра Института анатомии и морфологии имени академика Ю.М. Лопухина, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова.
ORCID 0000-0001-6999-8524; krupin_kn@rsmu.ru
Вклад автора: анализ данных литературы.

Супильников Алексей Александрович

Канд. мед. наук, доцент, заместитель директора Института анатомии и морфологии имени академика Ю.М. Лопухина, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова; первый проректор по научной деятельности, Медицинский университет «Реавиз».
ORCID 0000-0002-1350-0704; a.a.supilnikov@reaviz.online
Вклад автора: анализ данных литературы.

Лопанчук Павел Алексеевич

Директор Мультипрофильного аккредитационно-симуляционного центра, и.о. директора Института анатомии и морфологии имени академика Ю.М. Лопухина, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова.
ORCID 0009-0007-8727-1709; lopanchuk_pa@rsmu.ru
Вклад автора: анализ данных литературы.

Мишуринская Евгения Андреевна

Руководитель Центра анатомического и симуляционного моделирования Мультипрофильного аккредитационно-симуляционного центра Института анатомии и морфологии имени академика Ю.М. Лопухина, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова.
ORCID 0000-0003-1830-7492; mishurinskaya_ea@rsmu.ru
Вклад автора: анализ данных литературы.

Фришонс Ян

Кафедра анатомии, гистологии и эмбриологии факультета ветеринарной медицины, Ветеринарный университет Брно.
ORCID 0000-0003-2998-260
Вклад автора: подготовка выводов и заключения.

Author's reference**Konstantin N. Krupin**

Cand. Sci. (Med.), Docent, specialist in educational and methodological work of the Center for Anatomical and Simulation Modeling of the Multi-profile Accreditation and Simulation Center of the Institute of Anatomy and Morphology named after Academician Y.M. Lopukhin, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University.
ORCID 0000-0001-6999-8524; krupin_kn@rsmu.ru
Author's contribution: literature data analysis.

Aleksey A. Supilnikov

Cand. Sci. (Med.), Docent, Deputy Director of the Director of the Lopukhin Institute of Anatomy and Morphology, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University; First Vicerector for Scientific Activity, Medical University "Reaviz".
ORCID 0000-0002-1350-0704; a.a.supilnikov@reaviz.online
Author's contribution: literature data analysis.

Pavel A. Lopanchuk

Director of the Multiprofile Accreditation and Simulation Center, Acting Director of the Lopukhin Institute of Anatomy and Morphology, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University.
ORCID 0009-0007-8727-1709; lopanchuk_pa@rsmu.ru
Author's contribution: literature data analysis.

Evgeniya A. Mishurinskaya

Head of the Center for Anatomical and Simulation Modeling of the Multiprofile Accreditation and Simulation Center of the Lopukhin Institute of Anatomy and Morphology, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University.
ORCID 0000-0003-1830-7492; mishurinskaya_ea@rsmu.ru
Author's contribution: literature data analysis.

Jan Frishons

Ústav anatomie, histologie a embryologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno.
ORCID 0000-0003-2998-260
Author's contribution: preparation of findings and conclusions.