

УДК 616-001.1-003.93

С.В. Сазонов^{1, 2}

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК СЕЛЕЗЕНКИ

¹ ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»,
Екатеринбург, Российская Федерация;

² ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России,
Екатеринбург, Российская Федерация

Резюме. *Цель исследования* — определить особенности морфогенетических свойств лимфоидных клеток селезенки у животных из разных возрастных групп. *Материалы и методы исследования.* В проведенных экспериментах использована модель адаптивного переноса лимфоидных клеток селезенки нефрэктомированных животных из разных возрастных групп. Исследования выполнены на крысах-самцах линии Вистар зрелого (8-10 месяцев, массой 200-250 г) и старого (19-22 месяца, массой 400-500 г) возраста. Исследованные группы: контрольная группа — модель адаптивного переноса спленоцитов от зрелых животных зрелым; вторая — опытная группа: модель адаптивного переноса лимфоидных клеток от старых — старым животным; третья группа — трансплантация лимфоидных клеток от старых животных — зрелым; четвертая группа — трансплантация лимфоидных клеток от зрелых животных — старым. Морфогенетические свойства клеток селезенки нефрэктомированных животных из разных возрастных групп исследовались через 19 ч. после выполнения односторонней нефрэктомии (донорский интервал). Полученная суспензия вводилась внутривенно реципиентам по 400×10^3 клеток на 0,2 кг массы животного. За 8 часов до забоя животные получали внутривенно однократно в дозе 2 мг/кг массы винбластин. Реципиентов забивали через 40, 48 и 56 ч после переноса спленоцитов. *Результаты исследования.* При трансплантации спленоцитов, полученных от старых доноров старым реципиентам не обнаружено стимуляции пролиферативных процессов в эпителии канальцев почек последних. Перенос этих же спленоцитов зрелым донорам сопровождается проявлением их морфогенетической функции. При этом активность пролиферативных процессов в почках реципиентов оказалась выражена не меньше, чем в контрольной группе.

Ключевые слова: спленоциты, адаптивный перенос, морфогенетические свойства, возрастные особенности, нефрэктомия, иммуногистохимическое исследование, статмокинетический индекс

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Сазонов Сергей Владимирович
prof-ssazonov@yandex.ru

Дата поступления 02.11.2020 г.

Образец цитирования:

Сазонов С.В. Возрастные особенности морфогенетических свойств лимфоидных клеток селезенки. Вестник уральской медицинской академической науки. 2020, Том 17, №2, с. 149–160, DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-2-149-160

Регуляция клеточной пролиферации в органах осуществляется с помощью сложной иерархической системы, в которой выделяют внутриклеточный, межклеточный, внутритканевый, межтканевый и организменные уровни [1]. На уровне целого организма эти процессы находятся под контролем основных его регулирующих систем: гуморальной, нервной и иммунной. До сих пор определенная роль в регуляции клеточного деления в органах и тканях отводится нервной и эндокринной системам, представляющих из себя системы регуляции функций, из которых как следствие вытекает и формообразующая регуляция, не сводимая к функциональной. В то же время показано, что денервация органов или изменение уровней содержания гормонов как в центральных, так и периферических эндокринных органах не отменяют развитие регенераторных процессов в тканях, а оказывают влияние только на темпы и масштабы их проявления через изменение активности метаболических процессов в клетках. Являясь важнейшей и филогенетически более древней функциональной частью иммунной системы, чем та, которая обеспечивает развитие гуморального иммунитета и образование антител, морфогенетическая функция лимфоцитов осуществляет регуляцию пролиферативных процессов в организме [2-6]. В норме лимфоидная регуляция означает своевременную стимуляцию и торможение пролиферации клеток любой ткани, обеспечивая таким образом постоянство клеточной численности и анатомической целостности всех органов и тканей в процессе физиоло-

гической и репаративной регенерации. Морфогенетическая функция лимфоидных клеток обеспечивается путем реализации двухстадийной (двухфазной) программы регуляции пролиферации и дифференцировки клеток их тканей-мишеней, являясь при этом постоянной составляющей также и иммунных реакций и обеспечивая пролиферацию иммунокомпетентных клеток как при гуморальном, так и при клеточном иммунитете. Морфогенетическая функция лимфоидных клеток имеет ряд особенностей и закономерностей своего действия. В частности, морфогенетической функции лимфоидных клеток свойственна преимущественная органоспецифичность. Это означает, что при адоптивном переносе лимфоидных клеток они в организме реципиента обязательно влияют на пролиферацию клеток органа, гомологичного органу донора, подвергнутому тому или иному повреждающему воздействию (например, оперативному вмешательству) или любому другому воздействию, активирующему Т-клеточное звено иммунной системы [2, 4]. При этом следует отметить, что реакция пролиферативной активности лимфоидных клеток реципиента всегда развивается в направлении, соответствующем перенесенному сигналу. В действии активированных регенерационным процессом лимфоидных клеток также отмечается двухфазность. Сначала действуют лимфоциты, обладающие свойством стимулировать пролиферацию клеток органа-мишени, а затем, на высоте пролиферации, появляются лимфоциты, обладающие свойством тормозить клеточное деление в указанном органе. Эти лимфоциты не препятствуют завершению митотического цикла в клетках, вступивших в него, но препятствуют вступлению в цикл деления новых клеток. Тем самым они способствуют завершению пролиферативной волны и останавливают восстановительный процесс, предотвращая гиперрегенерацию. Таким образом, лимфоциты обеспечивают и начало, и завершение регенерационного процесса [2]. Функцию стимуляции и функцию ингибирования осуществляют разные популяции Т-лимфоцитов со свойствами Т-хелперов или Т-супрессоров [7]. Активированные лимфоциты со стимулирующими способностями индуцируют у реципиента модус ускоренной пролиферации, характерной для регенерационных процессов, однако нужно учитывать, что все описанные процессы можно отследить лишь в сингенной системе.

Эксперименты, проведенные на мышцах линии MRL, лишенных Т-клеток (исследования проведены в лаборатории проф. Ellen Heber-Katz) показали практически неограниченные регенераторные способности у этой линии мышцей на фоне их более быстрого старения. На фоне увеличения числа Т-лимфоцитов в крови молодых MRL-мышцей с возрастом они теряют способность к полноценной регенерации и наоборот, блокируя Т-клетки в крови взрослых мышцей иных линий, можно добиться стимуляции регенераторных процессов.

В настоящее время установлено, что старение организма протекает на всех уровнях его организации, в том числе и на клеточном. После прохождения клетками митотического цикла, периодов роста, дифференцировки и осуществления ими специфических функций, жизненный цикл заканчивается их старением, за которым, в конечном счете, наступает разрушение и гибель [8]. При этом процессы, определяющие старение, неразрывно связаны с противоположно направленным процессом — восстановлением утраченных и поврежденных структур, или клеточной регенерацией. Единство этих двух явлений, по-видимому, и определяет исход жизненного цикла клетки, а также интерес исследователей к клеточному уровню развития возрастных изменений регенераторных процессов в организме. Степень и форма проявления восстановительной способности различных внутренних органов млекопитающих очень вариабельны, что обусловлено различиями в морфофункциональных особенностях развивающихся органов, которые и определяют исход восстановительных процессов. Проведенные под руководством член.-корр. РАН проф. А.П. Ястребова исследования позволили определить особенности состояния пролиферативных процессов в тканях различных органов при возрастной инволюции организма [1, 8]. Так было установлено, что активность процессов клеточного деления при старении организма снижается в лимфоидной ткани тимуса, лимфатических узлов, селезенки, миелоидной ткани костного мозга, эпителии тонкой кишки. Все перечисленные ткани относятся к одной группе — с высокой скоростью клеточного обновления и используют на клеточном уровне один основной способ регенерации — митотическое деление. При возрастной инволюции во всех органах обнаружено снижение активности пролиферативных процессов, что связано с уменьшением величины пролиферативного пула и митотической активности клеток за счет замедления их выхода в митотический цикл [9-12]. При изучении особенностей состояния пролиферативных процессов в органах с низкой скоростью клеточного обновления (печень, легкие, почки, щитовидная железа) были обнаружены другие изменения в состоянии пролиферативных процессов. В первую очередь в этих органах, при использовании метода проточной ДНК-цитометрии, не обнаружено достоверного снижения числа ДНК-синтезирующих клеток в тканях органов старых животных. В то же время, одновременно в органах увеличивается доля полиплоидных клеток, происходит накопление клеток в премитотическом периоде цикла, за счет чего увеличивается и пролиферативный клеточный пул. Анализ полученных результатов позволяет говорить о связи процессов синтеза ДНК в тканях старых животных не с клеточным делением, так как не обнаруживается соответствующий уровень митотической активности, а с процессами эндомитоза, что сопровождается не делением клеток, а их полиплоидизацией [9]. Таким обра-

зом, если в тканях органов с быстрым клеточным обновлением при старении организма основным механизмом инволюции является подавление активности пролиферативных процессов за счет торможения вступления клеток в митотический цикл и снижения числа клеток-предшественников, то в органах с медленным клеточным обновлением на фоне торможения процессов клеточного деления происходит стимуляция эндомитоза, что сопровождается развитием полиплоидизации клеток [11, 12].

В экспериментах, проведенных проф. А.Г.Бабаевой в условиях относительного дефицита лимфоидной ткани (тимэктомия, спленэктомия, общее облучение, введение животным антилимфоцитарных сывороток), отмечается угнетение восстановительных процессов. Однако при трансплантации этим животным лимфоидных клеток степень угнетения пролиферации снижается [3, 13]. В экспериментах с адоптивным переносом лимфоидных клеток выявлена способность Т-популяции живых лимфоцитов оперированных животных стимулировать процессы пролиферации в тканях одноименных органов доноров. Показано, что такими свойствами обладают в основном Т-лимфоциты селезенки, тогда как тимоциты, Т-лимфоциты костного мозга и лимфатических узлов не способны переносить «пролиферативный стимул». Экспериментальные данные показывают, что первые часы после индукции регенераторных процессов протекают на фоне признаков усиления функции Т-хелперов, а подавление или снижение числа Т-супрессоров приводит к вспышке пролиферативной активности. Вместе с тем, лимфоциты неоперированных доноров не вызывают достоверного усиления пролиферации в модели адоптивного переноса [3, 7, 13]. В нашей лаборатории ранее было показано, что морфогенетическая функция лимфоцитов проявляется не только при регенерации миелоидной, костной тканей, печени, почек, кишечника, кожи, но эти клетки могут приобретать способность к стимуляции пролиферации эритроидного ростка при действии гипоксии на организм [1, 14-20]. В то же время получены данные, показывающие, что в результате старения организма в нем снижается как общее число Т-лимфоцитов, так и клеток, относящихся к популяции Т-хелперов [21, 22], а также значительно изменяются их свойства [23, 24].

Цель исследования

Определить особенности морфогенетических свойств лимфоидных клеток селезенки у животных из разных возрастных групп.

Материалы и методы

В проведенных экспериментах использована модель адоптивного переноса лимфоидных клеток селезенки нефрэктомированных животных из разных возрастных групп [25]. Исследования выполнены на крысах-самцах линии Вистар зрелого (8-10 месяцев, массой

200-250 г) и старого (19-22 месяца, массой 400-500 г) возраста. Животные содержались в условиях лабораторного вивария на стандартном рационе питания. Животных выводили из опыта путем передозировки паров эфира в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных». Группы животных формировались следующим образом: контрольная группа — модель адоптивного переноса спленоцитов от зрелых животных зрелым; вторая — опытная группа: модель адаптивного переноса лимфоидных клеток от старых — старым животным; третья группа — трансплантация лимфоидных клеток от старых животных — зрелым; четвертая группа — трансплантация лимфоидных клеток от зрелых животных — старым.

Учитывая, что эпителиальная ткань почечных канальцев относится в группу тканей с низким уровнем пролиферативной активности, состояние пролиферативных процессов оценивали с помощью изучения статмокинетического индекса (позволяющего накапливать митозы за определенный период времени) и иммуногистохимическим определением регуляторного белка пролиферации Ki67 (выявляется в ядрах клеток в G1, S и G2 периодах митотического цикла). Морфогенетические свойства клеток селезенки нефрэктомированных животных из разных возрастных групп исследовались через 19 ч. после выполнения односторонней нефрэктомии (донорский интервал). Животных забивали, из селезенки готовили взвесь клеток в среде 199. Все манипуляции по приготовлению суспензии проводили на холоде. Полученная суспензия вводилась внутривенно реципиентам по 400×10^3 клеток на 0,2 кг массы животного. За 8 часов до забоя животные получали внутривенно однократно в дозе 2 мг/кг массы винбластин. Реципиентов забивали через 40, 48 и 56 ч после переноса спленоцитов. Почки фиксировались в формалине, на гистологических срезах производили расчет статмокинетического индекса (СКИ), значения которого выражали в %. Для проведения иммуногистохимических исследований (ИГХ) материал фиксировали в 10% нейтральном формалине не более 24 часов, затем подвергали стандартной гистологической обработке [26]. Демаскировка антигенных детерминант проводилась в миниавтоклаве Pascal (Dako Cytomation), условия: 10 мин. при 15 psi (121 °C) в Target Retrieval Solution (Dako, S1699). На депарафинизированных срезах с использованием автоматической системы Universal Staining System Autosteiner Dako (Дания) проводили реакции с использованием системы визуализации EnVision+ Dual Link System — HRP (Dako, K4061), антигенреактивные клетки контрастировали хромогенным субстратом (3,3-диаминобензидин в буферном растворе — DAB). DAB-позитивные клетки идентифицировали по коричневому окрашиванию их ядер. Оценку ИГХ реакции Ki-67 определяли по процентному отношению

числа окрашенных ядер клеток ко всей клеточной популяции и выражали в % [27, 28].

Результаты исследования

При трансплантации лимфоидных клеток в контрольной группе (зрелые реципиенты и доноры) пик подъема статмокинетического индекса приходится на 48 часов после трансплантации спленоцитов доноров реципиентам (Таблица). В это время СКИ увеличивается в 26,8 раза ($p < 0,001$) по сравнению с предыдущим сроком. В эпителии канальцев обнаруживаются многочисленные митозы, увеличивается число клеток, ядра которых экспрессируют Ki67 (рис. 1). Через 56 часов процессы клеточного деления в почке реципиентов ослабевают, а к 72 часам уже не отличаются от уровня в почках интактных животных соответствующего возраста.

Таблица

Статмокинетический индекс в эпителии канальцев почки у реципиентов лимфоидных клеток от доноров с односторонней нефрэктомией, $M \pm m$, %, где M — среднее арифметическое, m — ошибка среднего

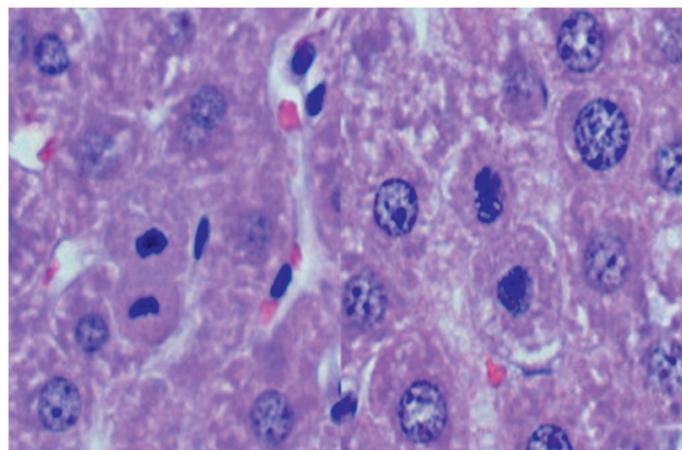
Модель адоптивного переноса	Продолжительность реципиентского интервала, ч.		
	40	48	56
Первая группа (контрольная)	0,4±0,03	10,7±1,64	1,0±0,33
Вторая группа (старые-старые)	0,3±0,04	0,7±0,28	0,6±0,30
Третья группа (старые-зрелые)	0,3±0,07	14,2±1,21	4,8±0,62
Четвертая группа (зрелые-старые)	0,4±0,03	2,8±0,51	2,2±0,45

При трансплантации спленоцитов старых животных после проведения им односторонней нефрэктомии старым реципиентам, у последних, во все изученные сроки, не обнаружено достоверного изменения уровня митотической активности в эпителии почечных канальцев (рис. 2).

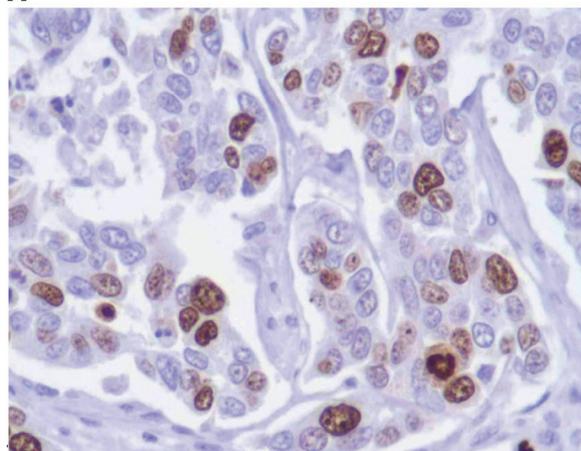
Трансплантация этих же спленоцитов зрелым животным сопровождается увеличением статмокинетического индекса и уровня экспрессии Ki67 (Таблица, рис. 3) в почечных канальцах в 47,3 раза ($p < 0,001$) с последующим снижением его уровня к 56 ч. Однако и в этот срок уровень активности процессов клеточного деления в 4,8 раза превышает ($p < 0,001$) уровень соответствующего показателя в почках контрольной группы.

Адоптивный перенос лимфоидных клеток от зрелых животных к старым также приводит к подъему (в 7 раз; $p < 0,001$) уровня статмокинетического индекса через 48 ч после их трансплантации (Таблица). Активность клеточного деления сохраняется примерно на этом же уровне и через 56 ч, что в 2,2 раза выше ($p < 0,05$) уровня статмокинетического индекса при трансплантации спленоцитов от зрелых зрелым животным, в 3,7 раза ($p < 0,01$) — при трансплантации от старых старым и в 2,2 раза ниже ($p < 0,05$) — при выполнении адоптивно-

го переноса этих же лимфоидных клеток зрелым животным.



А



В

Рис. 1. Извитые канальцы коркового вещества почки крыс контрольной группы. Реципиентский интервал 48 часов. А. — Высокая митотическая активность. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 1200$. В. — Иммуногистохимическое исследование Ki67. Ув. $\times 600$.

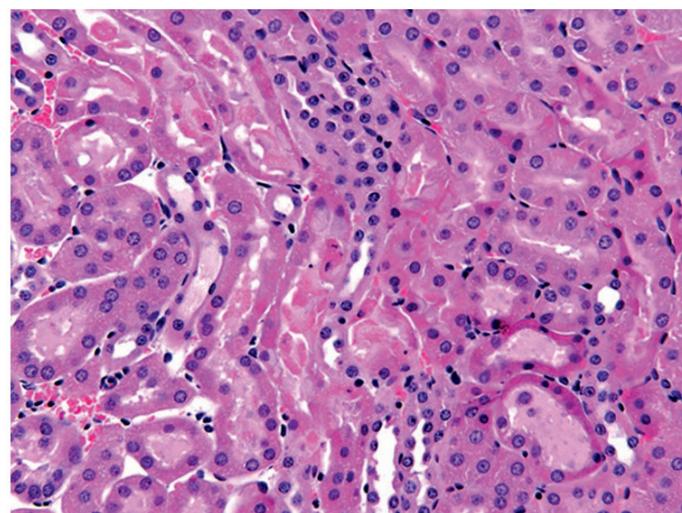


Рис. 2. Извитые канальцы коркового вещества почки крыс второй группы. Реципиентский интервал 48 часов. Низкий уровень митотической активности, значенный статмокинетического индекса. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$.

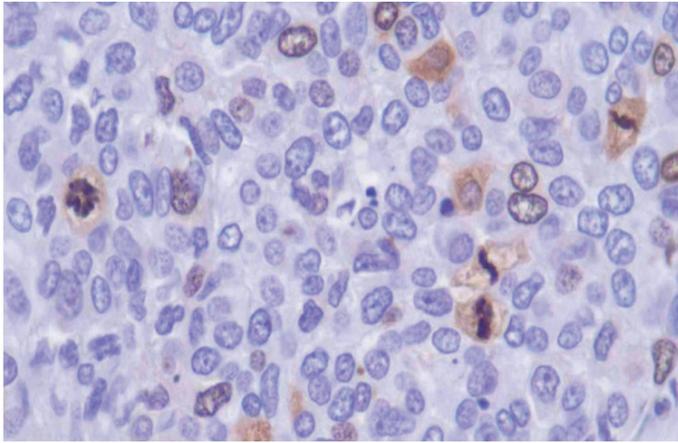
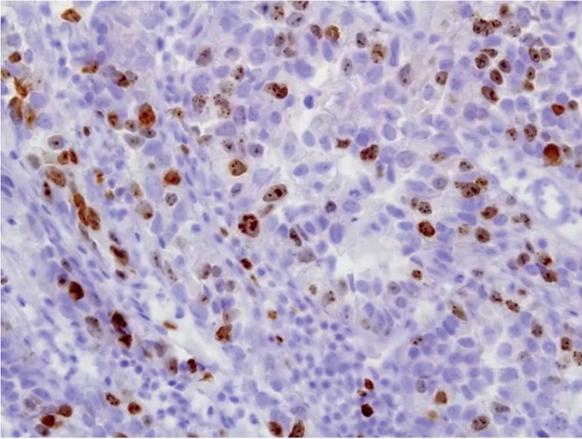
**А****В**

Рис. 3. Извитые канальцы коркового вещества почки крыс третьей группы. Реципиентский интервал 48 часов. А. — высокая митотическая активность. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 900$. В. — увеличение числа клеток, экспрессирующих Ki67. Иммуногистохимическое исследование. Ув. $\times 200$.

Обсуждение результатов

Использование системы адоптивного переноса позволило выявить особенности проявления морфогенетических свойств лимфоцитов у животных их разных возрастных групп. При трансплантации спленоцитов, полученных от старых доноров старым реципиентам, не обнаружено стимуляции пролиферативных процессов в эпителии канальцев почек последних. Подобные изменения в системе адоптивного переноса могут происходить как за счет изменения морфогенетических свойств лимфоидных клеток, так и за счет изменения пролиферативных потенциалов клеток почечного эпителия или за счет наличия обеих причин одновременно. Перенос этих же спленоцитов зрелым донорам сопровождается проявлением их морфогенетической функции. При этом активность пролиферативных процессов в почках реципиентов оказалась выражена не меньше, чем в контрольной группе. Трансплантация спленоцитов от зрелых доноров старым реципиентам также приводит к проявлению морфогенетических свойств лимфоидных клеток. Однако уровень активности пролиферативных процессов в почках реци-

пиентов оказался значительно ниже, чем в контрольной группе.

Анализ результатов проведенных исследований позволяет сделать основной вывод — при старении организма снижение уровня пролиферативных процессов не связано с ослаблением морфогенетических свойств лимфоидных клеток, так как последние в полной мере проявляются в организме молодых животных, хотя значительно снижены у старых. При старении в организме снижаются пролиферативные потенциалы почечной ткани, что проявляется в торможении реализации морфогенетических свойств лимфоцитов зрелых животных непосредственно в паренхиме органа у старых животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ястребов А.П. Некоторые итоги и перспективы изучения механизмов регенерации тканей при воздействии на организм экстремальных факторов/ Очерки экспериментальной патофизиологии. Екатеринбург: Изд-во «СВ-96». 1999. С.13-26.
2. Бабаева А.Г. Иммунология процессов адаптивного роста, пролиферации и их нарушений / А.Г. Бабаева, Е.А. Зотикова. М.: Наука, 1987. 207 с.
3. Бабаева А.Г. Единство и противоположность цитогенетической активности лимфоцитов и их антителообразующей функции при восстановительных процессах в органах. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1999, 128 (11), С. 484 – 490.
4. Сазонов С.В. Т-лимфоциты – регуляторы активности пролиферации клеток в ткани. Вестник Уральской медицинской академической науки. Екатеринбург, 2007, 1 (15), С. 14-20.
5. Сазонов С.В., Ястребов А.П. Возможности трансплантации лимфоцитов для восстановления регенерации в органах при старении организма. Госпитальный вестник. Екатеринбург, 2006, 4, С. 24-29.
6. Ястребов А.П., Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю., Осипенко А.В., Макеев О.Г., Мещанинов В.Н., Сазонов С.В., Вечкаева И.В., Сырнев В.А. Об участии стволовых клеток в регуляции регенераторных процессов при экстремальных повреждениях. Сборник научных работ «Клеточные технологии – практическому здравоохранению, 2015, С. 108-113.
7. Бляхер М.С., Гуророва Н.М., Федорова И.М. и др. Численность субпопуляций лимфоцитов в селезенке и уровень пролиферации кроветворной ткани у мышей при оперативных вмешательствах. Микробиология и иммунология, 1996, 3, С. 301 – 303.
8. Сазонов С.В. Возрастные особенности состояния регенераторных процессов в тканях/ Очерки экспериментальной патофизиологии. Екатеринбург: Изд-во «СВ-96». 1999. С.352-365.
9. Сазонов С.В. Анализ пролиферативных процессов в органах с разными механизмами клеточного обновления при старении организма. Морфология, 2016, 149 (3), С.177.

10. Сазонов С.В. Состояние митотического цикла в клетках почечного эпителия после односторонней нефрэктомии. Сборник научных трудов VIII Всероссийской конференции по патологии клетки, 11-12 ноября 2010, Москва, С.210-212.
11. Сазонов С.В. Особенности пролиферативных процессов в тканях с высокой скоростью клеточного обновления при возрастной инволюции организма. Морфология, 2012, Т.141, №3, С.136.
12. Сазонов С.В., Леонтьев С.Л., Ястребов А.П. Возрастные особенности временных параметров клеточного цикла в эпителиальных клетках паренхиматозных органов у крыс. Сборник научных трудов научной конференции с международным участием: «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии», Москва, 6-7 апреля 2016 г. С. 157-158.
13. Babaeva A.G. Recent trends in regeneration research. Life Sci. N.Y. Lond., 1989. Vol.172. -P.121-128.
14. Сазонов С.В., Попов А.М., Лисьих Ю.И., Попугайло М.В. Влияние лимфоцитов на пролиферацию почечного эпителия при гипотермии. Госпитальный вестник, Екатеринбург, 2006, №4, С.32-38.
15. Сазонов С.В., Шамшурина Е.О., Береснева О.Ю., Курумчина С.Г., Валамина И.Е. Изменение морфогенетических свойств трансплантированных Т-лимфоцитов при старении организма. Материалы Ш Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии», Москва, ЦИТО, 25-26 апреля 2007 г.
16. Сазонов С.В., Попов А.М., Лисьих Ю.И., Попугайло М.В. Морфогенетическая активность трансплантированных лимфоидных клеток при гипотермии. Материалы Ш Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии», Москва, ЦИТО, 25-26 апреля 2007 г.
17. Сазонов С.В. Морфогенетические свойства лимфоидных клеток при возрастной инволюции организма. Аллергология и иммунология, 2008, 3(9), С. 123.
18. Сазонов С.В., Ястребов А.П., Леонтьев С.Л. Состояние клеточной регенерации после односторонней нефрэктомии при действии холода на организм. Сборник научных трудов Всероссийской научной конференции «Регенеративная биология и медицина», Москва, 2011, С.136-137.
19. Гребнев Д.Ю., Ястребов А.П., Маклакова И.Ю., Сазонов С.В., Леонтьев С.Л. Сравнительный анализ регенерации эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных в условиях острой кровопотери на фоне трансплантации стволовых клеток. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2012, Т.VII, №2, С. 22-23.
20. Сазонов С.В., Ястребов А.П., Леонтьев С.Л. Влияние трансплантированных Т-лимфоцитов на состояние регенераторных процессов в органах при старении организма. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2012, Т.VII, №2, С. 46.
21. Flaherty D., Wagner C., Gross C. Aging and lymphocyte subsets in the spleen and peripheral blood of the Sprague-Dawley rat. Immunopharmacol. 1997, Vol.2, P.185-195.
22. Haynes L., Linton P.J., Swain S.L. Age-related changes in CD4 T cell of T cell receptor transgenic mice// Mech. Ageing Dev., 1997, Vol.93 (1-3), P.95-105.
23. Proust J.J., Quadri R.A., Arbogast A., Phelouzat M. Mecanismes moleculaires du dysfonctionnement lymphocytaire lie a l'age, Pathol.Biol.Paris, 1996, Vol.44 (8), P. 729-236.
24. Mora J.R., von Andrian U.H. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. Trends Immunol. 2016. 27 (5), P. 235-43.
25. Сазонов С.В., Конышев К.В. Использование адоптивного переноса лимфоидных клеток для стимуляции пролиферативных процессов при возрастной инволюции организма. Цитология, 2011, Т. 53, №9. С.735-736.
26. Сазонов С.В., Бриллиант А.А., Конышев К.В. Стандартизация иммуногистохимического определения уровня экспрессии Ki-67 в клетках различных тканей. Морфология, 2017, Т.151, №3, С. 100.
27. Сазонов С.В. Определение уровня пролиферации в тканях органов при иммуногистохимическом исследовании Ki-67. Морфология, 2018, Т.153, №3, С. 242.
28. Сазонов С.В., Ястребов А.П. Состояние процессов пролиферации в почечном эпителии после односторонней нефрэктомии. Морфология, 2010, Том 137, №4, С.167.

Автор

Сазонов Сергей Владимирович
ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии
Доктор медицинских наук, профессор
ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий
Заместитель главного врача по науке
Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3
Prof-SSazonov@yandex.ru

S.V. Sazonov^{1, 2}

AGE FEATURES OF MORPHOGENETIC PROPERTIES OF LYMPHOID CELLS OF THE SPLEEN

¹ Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, Russian Federation;
² Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Aim. The aim of the study is to determine the features of the morphogenetic properties of the spleen lymphoid cells in animals of different age groups. **Materials and research methods.** In the experiments, a model of adoptive transfer of lymphoid cells of the spleen of nephrectomized animals from different age groups was used. The studies were carried out on male Wistar rats of mature (8-10 months, weighing 200-250 g) and old (19-22 months, weighing 400-500 g) age. Study groups: control group — model of adoptive transfer of splenocytes from mature animals to mature ones; second — experimental group: model of adaptive transfer of lymphoid cells from old — old animals; the third group — transplantation of lymphoid cells from old animals — to mature ones; the fourth group — transplantation of lymphoid cells from mature animals — to old ones. The morphogenetic properties of the spleen cells of nephrectomized animals from different age groups were studied 19 hours after unilateral nephrectomy (donor interval). The resulting suspension was injected intravenously into recipients at 400×10^3 cells per 0.2 kg of animal weight. 8 hours before slaughter, the animals received a single intraperitoneal dose of 2 mg/kg of vinblastine. Recipients were sacrificed 40, 48 and 56 hours after splenocyte transfer. **Research results.** Transplantation of splenocytes obtained from old donors to old recipients did not reveal any stimulation of proliferative processes in the epithelium of the kidney tubules of the latter. The transfer of the same splenocytes to mature donors is accompanied by the manifestation of their morphogenetic function. At the same time, the activity of proliferative processes in the kidneys of the recipients was not less pronounced than in the control group.

Keywords: splenocytes, adoptive transfer, morphogenetic properties, age characteristics, nephrectomy, immunohistochemical study, statmokinetic index

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Sergey V. Sazonov

prof-ssazonov@yandex.ru

Received 29.09.2020

For citation:

Sazonov S.V. Age features of morphogenetic properties of lymphoid cells of the spleen. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2020, Vol. 17, no. 2, pp. 149–160. DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-2-149-160 (In Russ)

The regulation of cell proliferation in organs is carried out using a complex hierarchical system, in which the intracellular, intercellular, interstitial, interstitial and organism levels are distinguished [1]. At the level of the whole organism, these processes are under the control of its main regulatory systems: humoral, nervous and immune. Until now, a certain role in the regulation of cell division in organs and tissues has been assigned to the nervous and endocrine systems, which are systems of regulation of functions, from which, as a result, form-generating regulation follows, which is not reducible to functional. At the same time, it has been shown that denervation of organs or changes in the levels of hormones in both central and peripheral endocrine organs do not cancel the development of regenerative processes in tissues, but only affect the rates and extent of their manifestation through changes in the activity of metabolic processes in cells. Being the most important and phylogenetically more ancient functional part of the immune system than the one that ensures the development of humoral immunity and the formation of antibodies, the morphogenetic function of lymphocytes regulates proliferative processes in the body [2-6]. Normally, lymphoid regulation means timely stimulation and inhibition of the proliferation of cells of any tissue, thus ensuring the constancy of the cellular number and the anatomical integrity of all organs and tissues in the process of physiological and reparative regeneration. The morphogenetic function of lymphoid cells is provided by the implementation of a two-stage (two-phase) program for the regulation of proliferation and differentiation of cells of their target tissues, being at the same time a constant component of immune reactions and ensuring the proliferation of immunocompetent cells in both humoral and cellular immunity. The morphogenetic function of lymphoid cells has a number of features and patterns of its action. In particular, the morphogenetic function of lymphoid cells is characterized by predominant organ-specificity. This means that in the case of adoptive transfer of lymphoid cells, they in the recipient's body necessarily affect the proliferation of cells of an organ homologous to the donor's organ, which has undergone one or another damaging effect (for example, surgery) or any other effect that activates the T-cell link of the immune system [2, 4]. It should be noted that the reaction of the proliferative activity of the recipient's lymphoid cells always develops in the direction corresponding to the transferred signal. In the action of the lymphoid cells activated by the regeneration

process, two-phase is also noted.

First, lymphocytes act, which have the property of stimulating the proliferation of cells of the target organ, and then, at the height of proliferation, lymphocytes appear, which have the property of inhibiting cell division in the specified organ. These lymphocytes do not prevent the completion of the mitotic cycle in the cells that have entered it, but they prevent new cells from entering the cycle of division. Thus, they contribute to the completion of the proliferative wave and stop the recovery process, preventing hyperregeneration. Thus, lymphocytes provide both the beginning and the end of the regeneration process [2]. The function of stimulation and the function of inhibition is carried out by different populations of T-lymphocytes with the properties of T-helpers or T-suppressors [7]. Activated lymphocytes with stimulating abilities induce in the recipient the mode of accelerated proliferation, characteristic of regenerative processes, but it should be borne in mind that all the described processes can be traced only in the syngeneic system.

Experiments carried out on T-cell-depleted MRL mice (studies carried out in the laboratory of Prof. Ellen Heber-Katz) showed practically unlimited regenerative abilities in this line of mice against the background of their faster aging. Against the background of an increase in the number of T-lymphocytes in the blood of young MRL-mice with age, they lose the ability to full-fledged regeneration, and vice versa, by blocking T cells in the blood of adult mice of other strains, stimulation of regenerative processes can be achieved.

It has now been established that aging of an organism occurs at all levels of its organization, including the cellular one. After the cells pass through the mitotic cycle, periods of growth, differentiation and the implementation of specific functions by them, the life cycle ends with their aging, followed by destruction and death [8]. At the same time, the processes that determine aging are inextricably linked with an opposite process - the restoration of lost and damaged structures, or cell regeneration. The unity of these two phenomena, apparently, determines the outcome of the cell's life cycle, as well as the interest of researchers in the cellular level of development of age-related changes in regenerative processes in the body. The degree and form of manifestation of the regenerative ability of various internal organs of mammals is very variable, which is due to differences in the morphological and functional characteristics of developing organs, which determine the outcome of the regenerative processes. Conducted under the guidance of a member RAS prof. A.P. Yastrebov's studies made it possible to determine the features of the state of proliferative processes in the tissues of various organs during age-related involution of the organism [1, 8]. So it was found that the activity of the processes of cell division with aging of the body decreases in the lymphoid tissue of the thymus, lymph nodes, spleen, myeloid tissue of the bone marrow, epithelium of the small intestine. All of these tissues belong to one group — with a high rate of

cellular renewal and use one main method of regeneration at the cellular level — mitotic division. With age-related involution, a decrease in the activity of proliferative processes was found in all organs, which is associated with a decrease in the size of the proliferative pool and mitotic activity of cells due to a slowdown in their release into the mitotic cycle [9-12]. When studying the features of the state of proliferative processes in organs with a low rate of cellular renewal (liver, lungs, kidneys, thyroid gland), other changes in the state of proliferative processes were found. First of all, in these organs, when using the method of flow DNA cytometry, no significant decrease in the number of DNA-synthesizing cells in the tissues of organs of old animals was found. At the same time, at the same time, the proportion of polyploid cells in the organs increases, and the accumulation of cells occurs in the premitotic period of the cycle, due to which the proliferative cell pool also increases. Analysis of the results obtained allows us to talk about the connection between the processes of DNA synthesis in tissues of old animals not with cell division, since the corresponding level of mitotic activity is not detected, but with the processes of endomitosis, which is accompanied not by cell division, but by their polyploidization [9]. Thus, if in tissues of organs with rapid cellular renewal during aging of the body, the main mechanism of involution is the suppression of the activity of proliferative processes due to inhibition of the entry of cells into the mitotic cycle and a decrease in the number of progenitor cells, then in organs with slow cellular renewal against the background of inhibition of cell division processes endomitosis is stimulated, which is accompanied by the development of cell polyploidization [11, 12].

In experiments conducted by prof. A.G. Babaeva under conditions of relative deficiency of lymphoid tissue (thymectomy, splenectomy, general irradiation, administration of anti-lymphocytic serums to animals), suppression of recovery processes is noted. However, upon transplantation of lymphoid cells to these animals, the degree of inhibition of proliferation decreases [3,13]. In experiments with adoptive transfer of lymphoid cells, the ability of the T-population of living lymphocytes in operated animals to stimulate proliferation processes in the tissues of donor organs of the same name was revealed. It has been shown that such properties are mainly possessed by T-lymphocytes of the spleen, while thymocytes, T-lymphocytes of the bone marrow and lymph nodes are unable to tolerate the «proliferative stimulus». Experimental data show that the first hours after the induction of regenerative processes proceed against the background of signs of increased T-helper function, and suppression or decrease in the number of T-suppressors leads to an outbreak of proliferative activity. At the same time, lymphocytes from non-operated donors do not cause a significant increase in proliferation in the model of adoptive transfer [3, 7, 13]. In our laboratory, it was previously shown that the morphogenetic function of lymphocytes is manifested not only during the regeneration

of myeloid, bone tissues, liver, kidneys, intestines, skin, but these cells can acquire the ability to stimulate the proliferation of the erythroid germ under the action of hypoxia on the body [1, 14-20]. At the same time, data have been obtained showing that as a result of aging of the organism, both the total number of T-lymphocytes and cells belonging to the population of T-helpers decrease in it [21, 22], and their properties also change significantly [23, 24].

Purpose of the study

To determine the features of the morphogenetic properties of the spleen lymphoid cells in animals of different age groups.

Materials and research methods

In the experiments, we used a model of adoptive transfer of lymphoid cells in the spleen of nephrectomized animals from different age groups [25]. The studies were carried out on male Wistar rats of mature (8-10 months, weighing 200-250 g) and old (19-22 months, weighing 400-500 g) age. The animals were kept in a laboratory vivarium on a standard diet. The animals were taken out of the experiment by an overdose of ether vapors in accordance with the «International Recommendations for Medical and Biological Research Using Laboratory Animals.» The groups of animals were formed as follows: the control group — a model of adoptive transfer of splenocytes from mature animals to mature ones; second — experimental group: model of adoptive transfer of lymphoid cells from old — old animals; the third group — transplantation of lymphoid cells from old animals — to mature ones; the fourth group — transplantation of lymphoid cells from mature animals — to old ones.

Considering that the epithelial tissue of the renal tubules belongs to the group of tissues with a low level of proliferative activity, the state of proliferative processes was assessed by studying the static-kinetic index (allowing accumulation of mitoses over a certain period of time) and immunohistochemical determination of the regulatory protein of proliferation Ki67 (detected in the nuclei of cells in G1, S and G2 periods of the mitotic cycle). The morphogenetic properties of the spleen cells of nephrectomized animals from different age groups were studied 19 hours after unilateral nephrectomy (donor interval). The animals were sacrificed from the spleen, and a suspension of cells in medium 199 was prepared. All procedures for preparing the suspension were carried out in the cold. The resulting suspension was injected intravenously into recipients at 400×10^3 cells per 0.2 kg of animal weight. 8 hours before slaughter, the animals received a single intraperitoneal dose of 2 mg/kg of vinblastine. Recipients were sacrificed 40, 48 and 56 hours after splenocyte transfer. The kidneys were fixed in formalin, and the statokinetic index (SCI) was calculated on histological sections, the values of which were expressed in ‰. For immunohistochemical studies

(IHC), the material was fixed in 10% neutral formalin for no more than 24 hours, then underwent standard histological processing [26]. Unmasking of antigenic determinants was carried out in a Pascal mini-autoclave (DakoCytomation), conditions: 10 min. at 15 psi (121 °C) in Target Retrieval Solution (Dako, S1699). On dewaxed sections using the Universal Staining System Autostainer (Dako (Denmark), reactions were performed using the EnVision + Dual Link System — HRP (Dako, K4061), antigen-reactive cells were contrasted with a chromogenic substrate (3,3-diaminobenzidine in buffered solution — DAB). DAB-positive cells were identified by the brown staining of their nuclei. Evaluation of the IHC reaction Ki-67 was determined by the percentage ratio of the number of stained cell nuclei to the entire cell population and was expressed in ‰ [27, 28].

Research results

When transplanting lymphoid cells in the control group (mature recipients and donors), the peak of the rise in the statokinetic index falls on 48 hours after the transplantation of donor splenocytes to recipients (Table). At this time, the SKI increases 26.8 times ($p < 0.001$) compared with the previous term. Numerous mitoses are found in the epithelium of the tubules, and the number of cells whose nuclei express Ki67 increases (Fig. 1). After 56 hours, the processes of cell division in the kidney of the recipients weaken, and by 72 hours they no longer differ from the level in the kidneys of intact animals of the corresponding age.

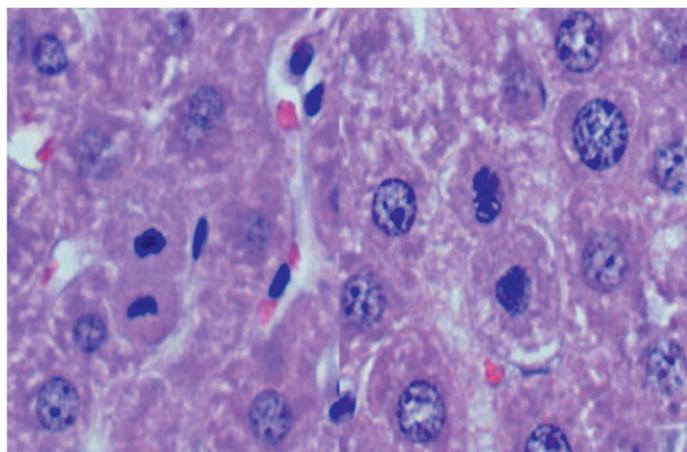
Table

Statokinetic index in the epithelium of the kidney tubules in recipients of lymphoid cells from donors with unilateral nephrectomy, $M \pm m$, ‰, where M is the arithmetic mean, m is the error of the mean.

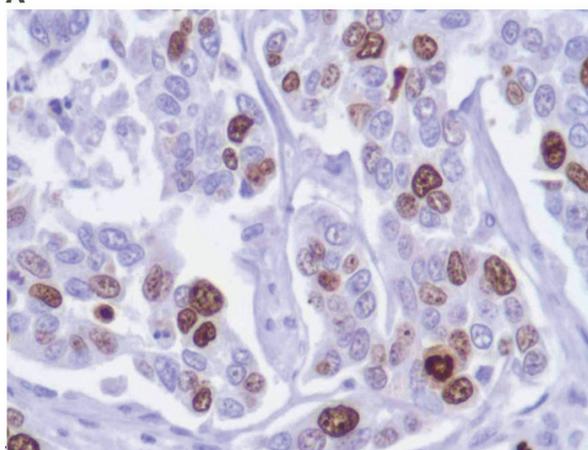
Model of adoptive transfer	Duration of the recipient interval, h		
	40	48	56
The first group (control)	0,4±0,03	10,7±1,64	1,0±0,33
Second group (old-old)	0,3±0,04	0,7±0,28	0,6±0,30
The third group (old-mature)	0,3±0,07	14,2±1,21	4,8±0,62
Fourth group (mature-old)	0,4±0,03	2,8±0,51	2,2±0,45

When splenocytes were transplanted from old animals after unilateral nephrectomy to old recipients, no significant changes in the level of mitotic activity in the epithelium of the renal tubules were found in the latter, at all studied periods (Fig. 2).

Transplantation of the same splenocytes to mature animals is accompanied by an increase in the statokinetic index and the level of Ki67 expression (Table, Fig. 3) in the renal tubules by 47.3 times ($p < 0.001$), followed by a decrease in its level by 56 hours. However, during this period, the level of activity processes of cell division 4.8 times ($p < 0.001$) the level of the corresponding indicator in the kidneys of the control group.



A



B

Fig. 1. The convoluted tubules of the cortex of the kidney of the rats of the control group. The recipient interval is 48 hours. A. — High mitotic activity. Staining with hematoxylin and eosin. $\times 1200$. B. — Ki67 immunohistochemical study. $\times 600$.

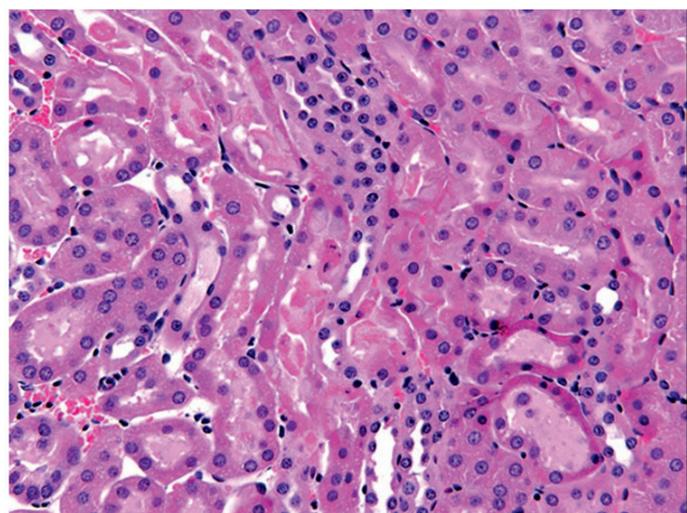
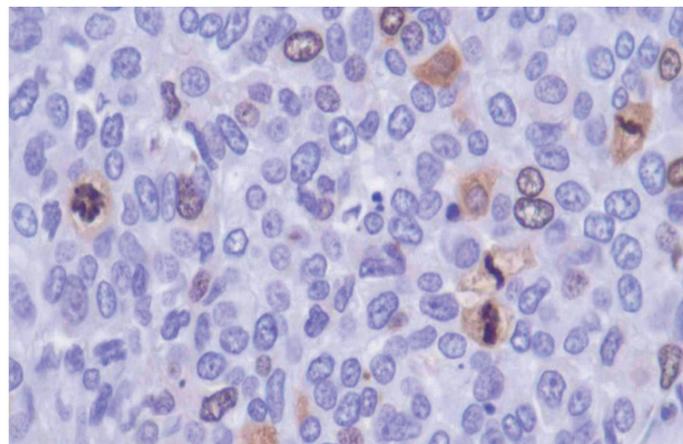
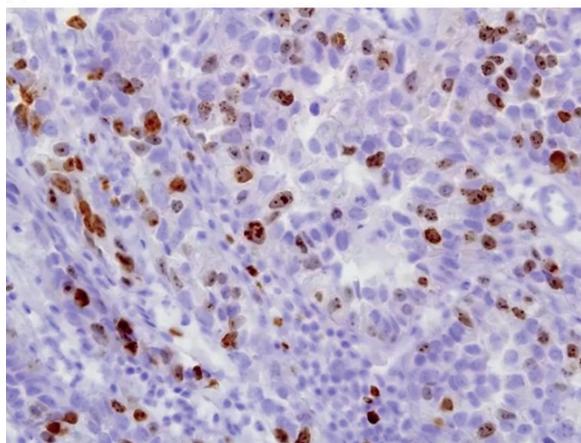


Fig. 2. The convoluted tubules of the cortex of the kidney of rats of the second group. The recipient interval is 48 hours. Low level of mitotic activity, statokinetic index values. Staining with hematoxylin and eosin. $\times 200$.



A



B

Fig. 3. The convoluted tubules of the kidney cortex of rats of the third group. The recipient interval is 48 hours. A. — high mitotic activity. Staining with hematoxylin and eosin. $\times 900$. B. — an increase in the number of cells expressing Ki67. Immunohistochemical study. $\times 200$.

The adoptive transfer of lymphoid cells from mature animals to old ones also leads to an increase (by a factor of 7; $p < 0.001$) in the level of the statokinetic index 48 h after their transplantation (Table). The activity of cell division remains approximately at the same level after 56 hours, which is 2.2 times higher ($p < 0.05$) than the level of the statokinetic index during transplantation of splenocytes from mature to mature animals, 3.7 times ($p < 0.01$) — when transplanting from old to old and 2.2 times lower ($p < 0.05$) — when performing an adoptive transfer of the same lymphoid cells to mature animals.

The discussion of the results

The use of the system of adoptive transfer made it possible to reveal the features of the manifestation of the morphogenetic properties of lymphocytes in animals of their different age groups. Transplantation of splenocytes obtained from old donors to old recipients did not reveal any stimulation of proliferative processes in the epithelium of the kidney tubules of the latter. Such changes in the system of adoptive transfer can occur both due to changes in the morphogenetic properties of lymphoid cells, and due to changes in the proliferative potencies of renal epithelial

cells, or due to the presence of both causes simultaneously. The transfer of the same splenocytes to mature donors is accompanied by the manifestation of their morphogenetic function. At the same time, the activity of proliferative processes in the kidneys of the recipients was not less pronounced than in the control group. Transplantation of splenocytes from mature donors to old recipients also leads to the manifestation of the morphogenetic properties of lymphoid cells. However, the level of activity of proliferative processes in the kidneys of the recipients was significantly lower than in the control group.

The analysis of the results of the conducted studies allows us to draw the main conclusion — with aging of the body, a decrease in the level of proliferative processes is not associated with a weakening of the morphogenetic properties of lymphoid cells, since the latter are fully manifested in the body of young animals, although they are significantly reduced in old ones. With aging, the proliferative potential of the renal tissue decreases in the body, which is manifested in the inhibition of the realization of the morphogenetic properties of the lymphocytes of mature animals directly in the parenchyma of the organ in old animals.

REFERENCES

1. Yastrebov A.P. Some results and prospects of studying the mechanisms of tissue regeneration when exposed to the body of extreme factors. Essays on experimental pathophysiology. Yekaterinburg: Publishing house «SV-96». 1999.S. 13-26. (In Russ.)
2. Babaeva A.G. Immunology of processes of adaptive growth, proliferation and their disorders / A.G. Babaeva, E.A. Zotikova. Moscow: Nauka, 1987.207 p. (In Russ.)
3. Babaeva A.G. The unity and opposition of the cytogenetic activity of lymphocytes and their antibody-forming function during the restoration processes in organs. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 1999, 128 (11), pp. 484 - 490. (In Russ.)
4. Sazonov S.V. T-lymphocytes are regulators of cell proliferation activity in tissue. Bulletin of the Ural Medical Academic Science. Ekaterinburg, 2007, 1 (15), pp. 14-20. (In Russ.)
5. Sazonov S.V., Yastrebov A.P. Possibilities of lymphocyte transplantation to restore regeneration in organs during aging of the body. Hospital messenger. Ekaterinburg, 2006, 4, pp. 24-29. (In Russ.)
6. Yastrebov A.P., Grebnev D.Yu., Maklakova I.Yu., Osipenko A.V., Makeev O.G., Meshchaninov V.N., Sazonov S.V., Vechkaeva I.V., Syrnev V.A. On the participation of stem cells in the regulation of regenerative processes in extreme injuries. Collection of scientific works «Cell technologies for practical health care, 2015, pp. 108-113. (In Russ.)
7. Blyakher M.S., Gutorova N.M., Fedorova I.M. and others. The number of subpopulations of lymphocytes in the spleen and the level of proliferation of hematopoietic tissue in mice during surgical interventions. Microbiology and Immunology, 1996, 3, p. 301 - 303. (In Russ.)
8. Sazonov S.V. Age features of the state of regenerative processes in tissues. Essays on experimental pathophysiology. Yekaterinburg: Publishing house «SV-96». 1999.S. 352-365. (In Russ.)
9. Sazonov S.V. Analysis of proliferative processes in organs with different mechanisms of cellular renewal during aging. Morphology, 2016, 149 (3), P. 177. (In Russ.)
10. Sazonov S.V. The state of the mitotic cycle in the cells of the renal epithelium after unilateral nephrectomy. Collection of scientific papers of the VIII All-Russian conference on cell pathology, November 11-12, 2010, Moscow, pp. 210-212. (In Russ.)
11. Sazonov S.V. Features of proliferative processes in tissues with a high rate of cellular renewal during age-related involution of the organism. Morphology, 2012, Vol. 141, No. 3, P. 136. (In Russ.)
12. Sazonov S.V., Leontiev S.L., Yastrebov A.P. Age features of the temporal parameters of the cell cycle in the epithelial cells of parenchymal organs in rats. Collection of scientific papers of a scientific conference with international participation: «Topical issues of morphogenesis in health and disease», Moscow, April 6-7, 2016, pp. 157-158. (In Russ.)
13. Babaeva A.G. Recent trends in regeneration research. Life Sci. N.Y. Lond. 1989. Vol. 172. pp. 121-128.
14. Sazonov S.V., Popov A.M., Lisikh Yu.I., Popugailo M.V. Influence of lymphocytes on the proliferation of renal epithelium in hypothermia. Hospital Bulletin, Yekaterinburg, 2006, No. 4, pp. 32-38. (In Russ.)
15. Sazonov S.V., Shamshurina E.O., Beresneva O.Yu., Kurumchina S.G., Valamina I.E. Changes in morphogenetic properties of transplanted T-lymphocytes during aging. Materials of the III All-Russian symposium with international participation «Actual issues of tissue and cell transplantology», Moscow, CITO, April 25-26, 2007 (In Russ.)
16. Sazonov S.V., Popov A.M., Lisikh Yu.I., Popugailo M.V. Morphogenetic activity of transplanted lymphoid cells in hypothermia. Materials of the III All-Russian symposium with international participation «Actual issues of tissue and cell transplantology», Moscow, CITO, April 25-26, 2007 (In Russ.)
17. Sazonov S.V. Morphogenetic properties of lymphoid cells during age-related involution of the organism. Allergology and Immunology, 2008, 3 (9), P. 123. (In Russ.)
18. Sazonov S.V., Yastrebov A.P., Leontiev S.L. The state of cell regeneration after unilateral nephrectomy under the action of cold on the body. Collection of scientific papers of the All-Russian Scientific Conference «Regenerative Biology and Medicine», Moscow, 2011, pp. 136-137. (In Russ.)
19. Grebnev D.Yu., Yastrebov A.P., Maklakova I.Yu., Sazonov S.V., Leontiev S.L. Comparative analysis of the regeneration of the jejunal epithelium of mature and old laboratory animals under conditions of acute blood loss on the background of stem cell transplantation. Cell

- transplantology and tissue engineering, 2012, T.VII, No. 2, pp. 22-23. (In Russ.)
20. Sazonov S.V., Yastrebov A.P., Leontiev S.L. Influence of transplanted T-lymphocytes on the state of regenerative processes in organs during aging of the body. Cell transplantology and tissue engineering, 2012, T.VII, No. 2, P. 46. (In Russ.)
21. Flaherty D., Wagner C., Gross C. Aging and lymphocyte subsets in the spleen and peripheral blood of the Sprague-Dawley rat. Immunopharmacol. 1997, Vol. 2, P. 185-195.
22. Haynes L., Linton P. J., Swain S. L. Age-related changes in CD4 T cell of T cell receptor transgenic mice. Mech. Ageing Dev., 1997, Vol.93 (1-3), P.95-105.
23. Proust J. J., Quadri R. A., Arbogast A., Phelouzat M. Mecanismes moleculaires du dysfonctionnement lymphocytaire lie a l'age, Pathol. Biol. Paris, 1996, Vol. 44 (8), P. 729-236.
24. Mora J.R., von Andrian U.H. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. Trends Immunol. 2016. 27 (5), P. 235-43.
25. Sazonov S.V., Konyshov K.V. The use of adoptive transfer of lymphoid cells to stimulate proliferative processes during age-related involution of the body. Cytology, 2011, T. 53, No. 9. S. 735-736. (In Russ.)
26. Sazonov S.V., Brilliant A.A., Konyshov K.V. Standardization of immunohistochemical determination of the expression level of Ki-67 in cells of various tissues. Morphology, 2017, Vol. 151, No. 3, P. 100. (In Russ.)
27. Sazonov S. V. Determination of the level of proliferation in the tissues of organs during the immunohistochemical study of Ki-67. Morphology, 2018, T.153, No. 3, P. 242. (In Russ.)
28. Sazonov S.V., Yastrebov A.P. The state of proliferation processes in the renal epithelium after unilateral nephrectomy. Morphology, 2010, Volume 137, No. 4, P. 167. (In Russ.)

Author

Sergey V. Sazonov

Ural State Medical University, Department of Histology, Cytology and Embryology

Doctor of Medical Sciences, Professor

Institute of Medical Cell Technologies

Deputy Chief Physician for Science

3, st. Repin, Yekaterinburg, Russian Federation, 620028

prof-ssazonov@yandex.ru