

С.В. Сазонов<sup>1,2</sup>

## МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ ИЗУЧЕНИЯ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В КЛЕТКАХ ТКАНЕЙ ПРИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ НА ОРГАНИЗМ

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Российская Федерация;  
<sup>2</sup>ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»,  
г. Екатеринбург, Российская Федерация

**Резюме.** При исследовании регенерации часто трудно дать однозначный ответ на вопрос о том, падает или повышается регенераторная способность у млекопитающих при экстремальных воздействиях на организм, особенно когда речь идет о изначально низких значениях изучаемых показателей. Оценка регенераторных процессов подразумевает решение перед проведением исследований нескольких принципиальных вопросов. Игнорирование их может приводить к методическим просчетам как в планировании исследований, так и непосредственно уже при получении результатов, и тем более, при их последующем анализе. **Материалы и методы.** Оценка регенераторных процессов на клеточном уровне проводилась с использованием морфометрического метода, метода проточной ДНК-цитометрии, автордиографии, расчета статмокинетического индекса, иммуногистохимического определения экспрессии Ki67. Использована экспериментальная модель регенерации печени после частичной гепатэктомии и резекции тонкой кишки. **Результаты.** Показано, что входящие в орган ткани могут регенерировать разными способами и с различной скоростью, что, по-видимому, и определяет особенности и исход регенераторного процесса на уровне органа. Выделение основных групп тканей для исследования регенерации одновременно связано с решением вопроса не только о уровне течения регенераторных процессов, но и необходимых методических приемов для их оценки. Так, если планируемая к изучению ткань имеет только клеточный уровень регенерации, нет необходимости их изучения на внутриклеточном уровне, а исследование регенерации в этом случае ограничивается оценкой проявлений в ее клетках митотической активности. Определены методы для исследования клеточной пролиферации и требования к их применению.

**Ключевые слова:** регенерация, клеточная пролиферация, методы исследования, модели репаративной регенерации, планирование эксперимента, экстремальные воздействия

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Сазонов Сергей Владимирович

Prof-SSazonov@yandex.ru

Дата поступления 01.12.2022 г.

Образец цитирования:

Сазонов С.В. Методические приемы изучения пролиферативных процессов в клетках тканей при экстремальных воздействиях на организм. [Электронный ресурс] Вестник уральской медицинской академической науки. 2022, Том 19, №5, с. 474–484, DOI: 10.22138/2500-0918-2022-19-5-474-484

### Введение

Исследователям часто трудно дать однозначный ответ на вопрос о том, падает или повышается регенераторная способность у млекопитающих при экстремальных воздействиях на организм, особенно когда речь идет о изначально низких значениях изучаемых показателей [1–5]. Оценка регенераторных процессов подразумевает решение перед проведением исследований нескольких принципиальных во-

просов. Игнорирование их может приводить к методическим просчетам как в планировании исследований, так и непосредственно уже при получении результатов, и тем более, при их последующем анализе. А это, в свою очередь, ведет к тому, что полученные результаты не отражают особенности регенераторного процесса в органе. И особенно это становится принципиальным при его изучении при действии на организм экстремальных факторов, когда особенно важно улавливать динамику изменений состояния физиологической регенерации.

**Цель исследования** — сформировать представления о необходимом методическом сопровождении изучения регенераторных процессов в тканях на клеточном уровне.

### Материалы и методы

Оценка регенераторных процессов проводилась с использованием гистологического, морфометрического метода, метода проточной ДНК-цитометрии, авторадиографии, расчета статмокинетического индекса, иммуногистохимического определения экспрессии Ki67. Использована экспериментальная модель регенерации печени после частичной гепатэктомии и резекции тонкой кишки.

В первую очередь исследователю необходимо решить, в какой ткани органа предстоит изучать регенераторные процессы [2]. Вопрос является принципиальным, так как очень часто регенерация изучается только в одной из тканей, входящих в структуру органа. Так, при изучении регенераторных процессов в кишке почти всегда подразумевается их оценка только в эпителии эпителиального слоя слизистой оболочки, тогда как все другие ткани (соединительные, висцеральная мышечная, нервная) обычно остаются за пределами внимания исследователя. В этом случае некорректна и сама постановка столь широкой задачи — оценка регенерации кишки как органа в целом. Более того, особенности изменений в состоянии регенераторных процессов в этих тканях могут существенно отличаться. Таким образом, исследование должно быть или ограничено изучением состояния регенераторных процессов в одной ткани (в нашем примере — в эпителии слизистой оболочки) или во всех тканях, по отдельности входящих в состав органа, что, в свою очередь, должно быть четко отражено в задачах планируемой работы. Только последний момент позволяет говорить о том, что оценить особенности регенераторных процессов в органе — это значит дать характеристику этих процессов во всех основных тканях, входящих в его состав. В противном случае оценка регенераторных процессов в органе окажется неполной.

Однако входящие в орган ткани могут регенерировать разными способами и с различной скоростью, что, по-видимому, и определяет особенности и исход регенераторного процесса на уровне органа [2]. Все известные ткани по особенностям использования уровня регенерации можно разделить на 3 основные группы:

Первая группа: ткани, клетки которых регенерируют путем клеточной регенерации. Это эпителиальные ткани кожи, слизистых, серозных оболочек, эндотелий, все виды соединительных тканей [2, 6–8];

Вторая группа: ткани, клетки которых регенерируют путем клеточной и внутриклеточной регенерации: эпителиальные ткани паренхиматозных органов, поперечно-полосатые скелетные мышечные ткани, висцеральная мышечная ткани внутренних органов [2, 10–15, 24];

Третья группа: ткани, клетки которых регенерируют только путем внутриклеточной регенерации: сердечная мышечная ткань, нервная ткань [2].

Ткани, использующие уровень клеточной регенерации, восстанавливаются с большей скоростью, чем те, у которых преобладает развитие регенераторных процессов на внутриклеточном уровне. Особенно четко это проявляется при индукции регенераторных процессов в органах. Как пример можно вспомнить развитие регенераторного процесса после повреждения сердечной мышцы при развитии инфаркта миокарда. Регенераторный процесс в этом случае развивается, в первую очередь, достаточно быстро (максимум проявлений в 2–3 сутки) в соединительной ткани эндомизия путем клеточной регенерации, что приводит к ее разрастанию на месте погибших кардиомиоцитов. Развитие регенерации в окружающей неповрежденной мышечной ткани происходит в более поздние сроки (уже после 5–7 суток), преимущественно на внутриклеточном уровне и протекает по типу регенерационной гипертрофии клеток. Особенности течения регенераторных процессов в этих двух тканях в дальнейшем, с одной стороны, обеспечивает формирование соединительнотканного рубца, с другой — приводит к гипертрофии сократительных кардиомиоцитов и в целом обеспечивает регенерацию в органе, которая

проявляется внешне гипертрофией органа. Это классический пример патологической регенерации органа, когда в итоге течения восстановительного процесса нарушаются обычные, изначальные, характерные для данного органа в норме соотношения между тканями.

### Результаты и их обсуждение

Выделение основных групп тканей для исследования регенерации одновременно связано с решением вопроса не только об уровне течения регенераторных процессов, но и необходимых методических приемов для их оценки. Так, если планируемая к изучению нами ткань имеет только клеточный уровень регенерации (ткани из первой группы), нет необходимости их изучения на внутриклеточном уровне, а исследование регенерации в этом случае ограничивается оценкой проявлений в ее клетках митотической активности. Если же планируется исследовать регенераторные процессы в органе, исследуемая ткань которого относится ко второй группе и в этом случае реализация регенерации осуществляется как на клеточном, так и на внутриклеточном уровнях, то и методические подходы должны быть направлены на оценку обоих уровней регенерации одновременно.

Но, даже если решено оценивать конкретную ткань на клеточном уровне, нужно учитывать, что клетки ткани могут реализовывать разные способы клеточной регенерации. Клеточная регенерация может осуществляться или только путем митоза (ткани из первой группы) или с использованием как митоза, так и эндомитоза (ткани второй группы), что требует использования разных методических приемов. Эндомитоз, в свою очередь, может проявляться в двух формах: или появлением клеток с одним полиплоидным ядром или многоядерных клеток [9, 10]. Недоучет этого момента может существенно исказить данные о динамике, характере, особенностях регенераторного процесса и значительно сузить понимание особенностей течения последнего в ткани, а значит оставить наши знания о нем неполными. Решение этого вопроса напрямую связано с правильным подбором методов оценки регенераторных процессов на клеточном уровне. Так, в использованном выше примере с оценкой регенерации в однослойном каемчатом эпителии слизистой оболочки тонкой кишки (из первой группы тканей) достаточно использовать методы оценки состояния пролиферативных процессов, т.к. регенерация в этом эпителии осуществляется только на клеточном уровне за счет вступления и прохождения клеток через митотический цикл, а эндомитоз и внутриклеточная регенерация из за высокой скорости обновления клеток эпителия (обновление клеток ткани за 3–5 сут.) — вообще не реализуются. Опять же нужно учитывать, что для тканей, относящихся к первой группе, характерен полный тканевой дифферон, т.е. имеются все клеточные популяции: стволовые, дифференцирующиеся и зрелые клетки, при этом стволовые и дифференцирующиеся клетки имеют определенную локализацию — так называемые генеративные зоны, в которых и будут в основном обнаруживаться пролиферирующие клетки. В используемом нами примере с тонкой кишкой такая генеративная зона в системе крипт-ворсинка располагается в криптах, в то время как в эпителии, выстилающем ворсинки сосредоточены в основном зрелые клетки, в которых пролиферативные процессы уже выражены слабо. Таким образом, в разобранный пример оценки регенерации по сути сводится к оценке состояния клеточной регенерации в эпителии крипт тонкой кишки, а исследование и последующий анализ получаемых данных должен осуществляться или только при проведении исследований регенераторного процесса в клетках эпителия крипт (в генеративной зоне) или отдельно в эпителии крипт и эпителии ворсинок.

Какие же методические приемы помогут нам адекватно оценить состояние процессов клеточной регенерации в тканях из первой группы? Во-первых — это привлечение для исследования методов оценки клеточного деления. И здесь следует стремиться к методам, позволяющим перевести проводимое исследование в область доказательной медицины. Конечно, и обзорное гистологическое исследование имеет право на жизнь, однако останавливаться лишь на описании «мало митозов», «много митозов» «выраженная пролиферация», «слабая пролиферация» и т.д. — сегодня явно недостаточно. Нужно привлекать методы, позволяющие объективно оценить уровень митотической активности ткани. Самым простым и наиболее часто применяемым методом является подсчет митотического индекса (МИ). При этом учитываются все клетки, ядра которых находятся в разных фазах митотического деления. Обычно исследователем просматривается не менее 600 клеток, пересчет идет на % или ‰, в зависимости от получаемого уровня активности пролиферативного процесса в ткани. В используемом нами примере состояние процессов физиологической клеточной пролиферации в эпителии тонкой кишки, относящегося к тканям с высокой скоростью клеточного обновления, МИ выражается в % и

вполне достаточно обсчитать 600 клеток. В тканях с низким уровнем клеточного обновления может понадобиться просчет большего числа клеток и результаты могут быть выражены в %.



Рис. 1. Ворсинки (1) и крипты (2) в слизистой тонкой кишки. Окраска гематоксилином и эозином. Световая микроскопия. Ув.  $\times 20$ .

Fig. 1. Villi (1) and crypts (2) in the mucosa of the small intestine. Stained with hematoxylin and eosin. Light microscopy. SW.  $\times 20$ .

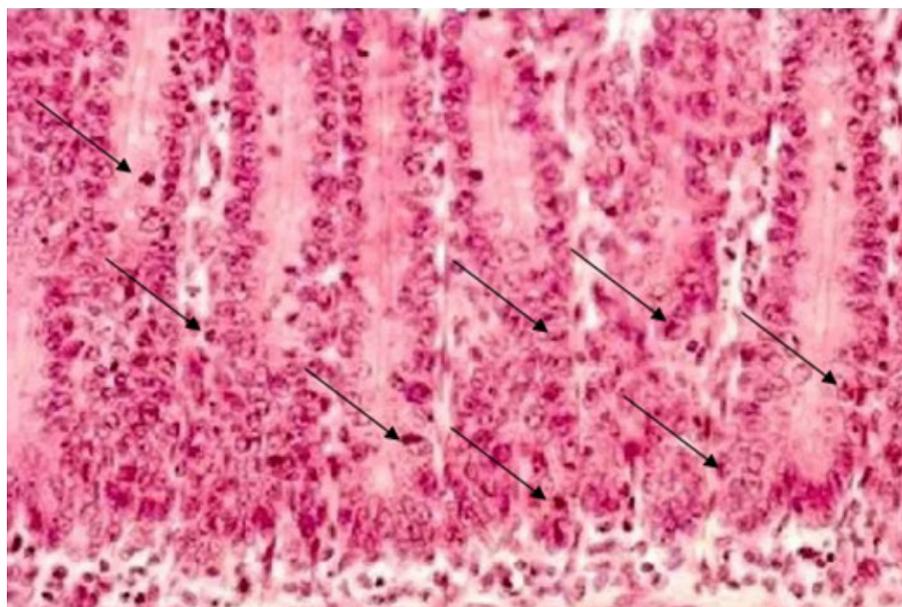


Рис. 2. Фигуры митозов в клетках эпителия крипт тонкой кишки (указаны стрелками). Окраска гематоксилином и эозином. Световая микроскопия. Ув.  $\times 200$ .

Fig. 2. Figures of mitoses in the epithelial cells of the crypts of the small intestine (indicated by arrows). Stained with hematoxylin and eosin. Light microscopy. SW.  $\times 200$ .

Однако, при использовании этого метода, нужно учитывать некоторые моменты. В первую очередь нужно определиться с увеличением, на котором будет проводиться исследование. При малом увеличении часть фигур митозов может быть пропущена и не учтена при расчетах, тогда как при большом увеличении, несмотря на уменьшение площади среза в поле зрения микроскопа, что может увеличивать время проведения исследования, однако его достоверность и объективность при этом повыша-

ется. Таким образом следует применять комбинированное исследование, когда сначала проводится обзорный просмотр среза, а уже после того, как складывается общее впечатление о уровне митотической активности ткани, особенностях распределения митозов в структурах и срезе, сам подсчет ведется уже с использованием большого увеличения.

Также нужно определиться с временными точками проведения исследования. Так, если проводится исследование физиологической регенерации, когда изменения состояния регенерации меняются в течении времени не так значительно, то и между точками наблюдения могут быть достаточно большие промежутки. Однако, если используются экстремальные воздействия на организм, модель индукции регенераторных процессов, расстояние между точками наблюдения должны быть максимально сокращены, т.к. пик подъема митотической активности может быть пропущен. И здесь нужно исходить из знания временных параметров клеточного цикла клеток изучаемой ткани [16]. Так, если сам митоз занимает по времени около 1 часа (когда мы можем обнаружить фигуры митоза на разных фазах), то продолжительность пресинтетического, синтетического и премитотического периодов в среднем обычно колеблется в пределах 12–18 часов (Рис. 3).

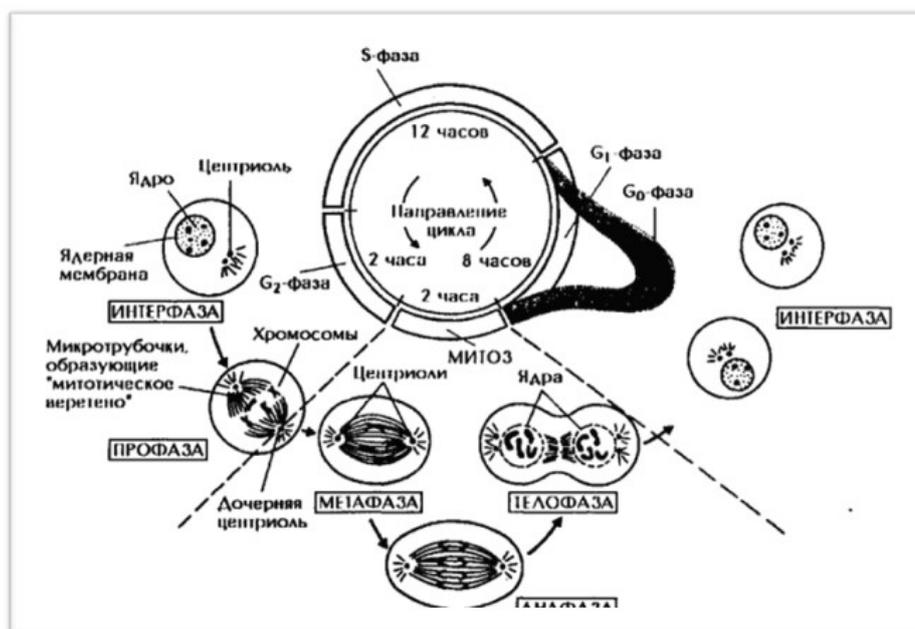


Рис. 3. Средние показатели временных параметров клеточного цикла (принципиальная схема).  
Fig. 3. Mean indicators of time parameters of the cell cycle (principle diagram).

Таким образом, при изучении пролиферации при оценке МИ и промежутков между точками наблюдения должен быть в пределах и не более этих значений. При его увеличении при индукции регенераторных процессов возникает вероятность пропустить пик пролиферации, когда большинство клеток ткани пройдет через митоз (или еще не выйдет в него), а исследователь в этом случае будет иметь дело уже с остаточной волной митотической активности в ткани. И это, конечно, может существенно отразиться на получаемых результатах проводимого исследования.

Существенным является и способ представления получаемых результатов исследования. Часто результаты представляются в виде графика, где точки со значениями МИ через определенные интервалы времени соединяются последовательно между собой, что дает картину некой виртуальной динамики пролиферативного процесса в ткани (рис. 4). Более точным, правильным представлением полученных данных является использование для этой цели столбиковых гистограмм. По крайней мере, значения МИ в данной конкретной точке, в которой расположен столбик, действительно соответствует отражаемому гистограммой показателю в этот конкретный момент, через указанный промежуток времени после выполнения резекции кишки [7]. Однако, объективность представляемых результатов также связана с правильностью определения интервалов между проведенными исследованиями (точками исследования). Так, при анализе результатов исследований, приведенных на рис. 4, вполне можно решить, что пик митотической активности в эпителии приходится на 7 сутки после выполнения резекции кишки. В то же время проведенное дополнительное исследование показывает (рис. 5), что

подъем МИ на 2 сутки в 2,5 раза больше, чем на седьмые сутки после резекции. Таким образом пик пролиферативной активности на самом деле приходится не на 7 сутки, а на вторые. И если этот срок в эксперименте будет пропущен, полученные результаты не будут отражать динамику развития регенераторных процессов в эпителии кишки после ее резекции.

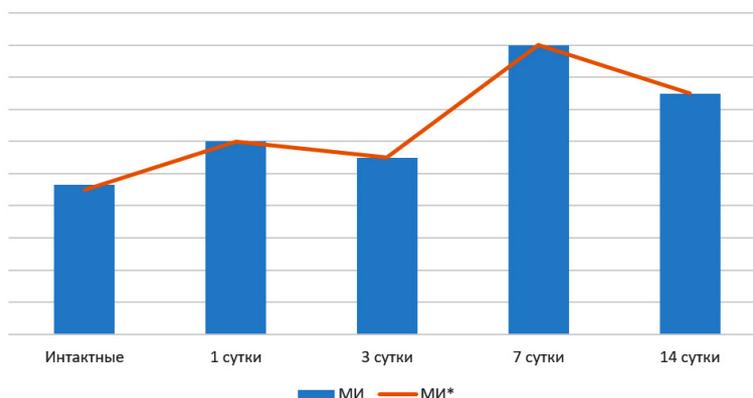


Рис. 4. Состояние пролиферативных процессов в эпителии тонкой кишки при изучении митотического индекса при индукции регенераторных процессов в эпителии тонкой кишки после ее резекции. Значения митотической активности представлены: МИ — в виде столбиковой гистограммы, МИ\* — в виде графика.

Fig. 4. The state of proliferative processes in the epithelium of the small intestine during the study of the mitotic index during the induction of regenerative processes in the epithelium of the small intestine after its resection. The values of mitotic activity are presented: MI — in the form of a bar graph, MI\* — in the form of a graph.

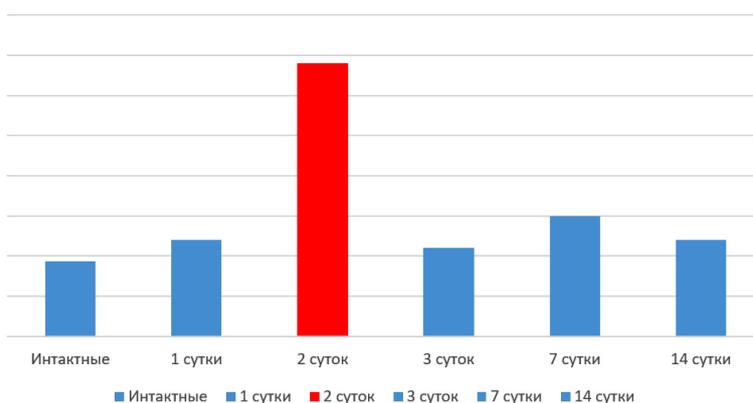


Рис. 5. Состояние пролиферативных процессов в эпителии тонкой кишки при изучении митотического индекса при индукции регенераторных процессов в эпителии тонкой кишки после ее резекции. Представлены значения митотической активности МИ в указанные сроки после резекции.

Fig. 5. The state of proliferative processes in the epithelium of the small intestine during the study of the mitotic index during the induction of regenerative processes in the epithelium of the small intestine after its resection. The values of MI mitotic activity at the specified times after resection are presented.

Как же избежать подобных ошибок? Можно воспользоваться несколькими приемами. Подобные ошибки при изучении состояния клеточной пролиферации возможны в том случае, когда точки исследования в эксперименте находятся неоправданно далеко друг от друга. Выше уже упоминалось, что продолжительность самого митоза составляет чуть меньше 1 часа в совершенно разных тканях. Поэтому, даже несмотря на то, что клетки ткани после резекции (индукции), формирующие основной при пролиферации выходят в нее достаточно компактно, этот подъем обычно для большинства этой популяции клеток не превышает нескольких часов. По графику мы видим, что подъем митотической активности наблюдается и в более ранние и более поздние сроки после прохождения пика пролиферации, но количественные значения происходящих изменений в ткани все равно оказываются на стороне основного пика.

Как же не пропустить пик пролиферации после индукции пролиферативных процессов при развитии репаративной регенерации в ткани? Можно применить разные методические приемы, от самых простых до более сложных, если они доступны исследователю.

Во-первых, можно взять в качестве контроля уже **отработанную ранее модель** изучения репаративного процесса, в том числе и другими исследователями. До начала проведения основных экспериментов нужно постараться повторить, отработать эту модель и подтвердить правильность планируемой для исследования модели и точек исследования. Здесь важно учесть планируемый для использования вид животных, их пол, возраст, время выполнения резекции, время забоя животных после выполнения резекции (точки исследования) и др. моменты, которые могут так же существенно повлиять на получаемый результат.

При изучении репаративной регенерации в паренхиматозных органах можно ориентироваться на динамику **увеличения массы органа**. Однако здесь нужно опираться только на результаты, полученные при исследовании сухой массы органа. Только по увеличению сухой массы можно судить об увеличении числа клеток в органе вследствие прохождения клетками митотического цикла и вступления их в митоз.

Можно ограничиться **изучением МИ** в ткани через каждые 3 часа после выполнения индукции. В этом случае достаточно много шансов не пропустить пик пролиферации в ткани. Однако, в этом случае эксперимент значительно усложнится за счет увеличения точек наблюдения и увеличения количества необходимых для проведения исследований животных, произойдет значительное увеличение стоимости, возрастет трудоемкость эксперимента.

Можно воспользоваться определением **статмокинетического индекса (СКИ)** с применением препаратов, разрушающих веретено деления клетки (как пример — использование винбластина). В этом случае удастся собрать митозы клеток за 6–8 часов, что позволяет значительно сократить число точек наблюдения в эксперименте. Использование в нашей лаборатории оценка СКИ при изучении митотической активности клеток почек в модели адоптивного переноса лимфоцитов показала достаточную надежность данного метода, существенно снизило затраты на проводимые исследования [17–19].

Возможно оценить состояние пролиферативных процессов, величину пролиферативного пула клеток по **интенсивности синтеза ДНК** по уровню включения НЗ-тимидина в ДНК исследуемой ткани органа. Метод вполне может быть реализован при наличии в лаборатории радиометрического анализа (например, метод жидкостной сцинтилляции на счетчике СБС-2). Учитывая, что синтез ДНК в клетке — достаточно стабильный показатель и продолжается около 6–8 часов, это также позволяет соответственно уменьшить число точек наблюдения в эксперименте и не пропустить пик пролиферации в ткани.

Также для изучения ДНК-синтезирующей способности клеток можно использовать **радиоавтографическое исследование** с Н<sup>3</sup>-тимидином [20]. Однако, кроме имеющейся трудоемкости выполнения данного исследования, сегодня еще введены и достаточно существенные ограничения для работы в исследовательских лабораториях с изотопными метками.

Можно определять величину и особенности пролиферативного пула клеток в ткани **методом ДНК-цитофлуориметрии**. С помощью комплекса ЛЮАМ-3 (ЛМО, Россия) можно измерять количество ДНК в ядрах клеток с одновременным распределением анализируемой клеточной популяции по плоидности и фазам клеточного цикла. Также, получив при исследовании эти показатели можно рассчитывать временные параметры клеточного цикла [21]. Метод достаточно трудоемкий, средняя скорость подсчета составляет всего около 100 клеток в час.

Более адаптированным для исследований является **метод проточной ДНК-цитометрии**, позволяющий проводить анализ клеток со скоростью до 50 тыс. клеток в сек. и анализировать распределение клеток по периодам клеточного цикла в автоматическом режиме с использованием уже предустановленных в прибор программ обсчета получаемых ДНК-гистограмм [22]. Наличие проточного цитометра в лаборатории может не только значительно облегчить исследования клеточной регенерации, но, и за счет большого числа наблюдений для конкретного случая существенно повысить точность получаемых показателей.

Современным, достаточно простым решением является использование **иммуногистохимического выявления белка Ki67** при наличии данной технологии в лаборатории или ее доступности для исследователей. Показано, что белок Ki67 обнаруживается только в ядрах клеток, вступивших в пролифе-

рацию и находящихся в  $G_1$ , S,  $G_2$  — периодах клеточного цикла и отсутствует в клетках, находящихся в  $G_0$  периоде [23, 24]. Таким образом, определяя количество клеток, ядра которых экспрессируют белок Ki67, можно судить о величине пролиферативного пула клеток ткани (рис. 6).

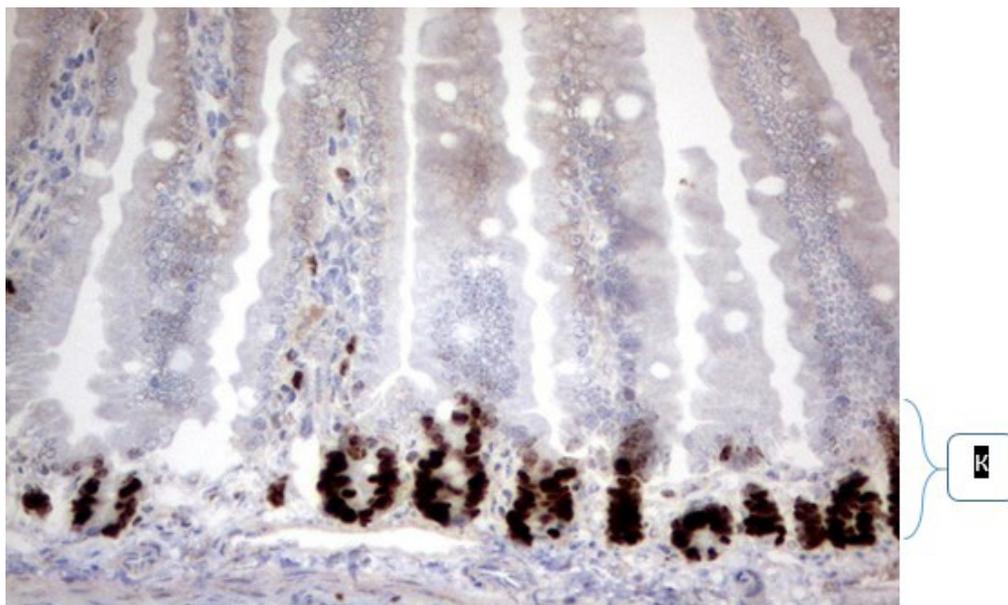


Рис. 6. Экспрессия белка Ki67 (коричневое окрашивание клеточных ядер) преимущественно в генеративной зоне эпителия тонкой кишки — криптах (K). Клетки эпителия, покрывающего ворсинки не экспрессируют белок. Иммуногистохимическое исследование. Докраска ядер клеток гематоксилином. Ув.  $\times 100$ .

Rice. 6. Ki67 protein expression (brown staining of cell nuclei) mainly in the generative zone of the small intestine epithelium — crypts (K). The cells of the epithelium covering the villi do not express the protein. Immunohistochemical study. Staining of cell nuclei with hematoxylin. SW.  $\times 100$ .

Учитывая, что продолжительность прохождения клетками митотического цикла в несколько раз больше, чем продолжительность митоза, соответственно можно пропорционально увеличить время между точками наблюдения. Важно учесть, в какую группу тканей относится планируемая для изучения ткань и определиться с наличием или отсутствием в ней генеративных зон. Наличие такой зоны требует отдельной оценки состояния пролиферативной активности в этой зоне и отдельно в остальной части эпителия.

## 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 г., С. 13-26
2. Сазонов С.В. Возрастные особенности состояния регенераторных процессов в тканях/ Очерки экспериментальной патофизиологии. Екатеринбург, Изд-во «СВ-96», 1999 г., С. 352-364
3. Клеточные технологии – практическому здравоохранению, 2019 / Сборник научных работ. под общей редакцией проф. Леонтьева С.Л. – ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург: Изд-во Вестник Уральской медицинской академической науки, 2019. 230 с.
4. Сазонов С.В. Анализ пролиферативных процессов в органах с разными механизмами клеточного обновления при старении организма. Морфология. 2016. Т.149, №3. С. 177-177а.
5. Сазонов С.В. Особенности состояния пролиферативных процессов в условиях возрастной инволюции организма. Автореферат дис. ... доктора медицинских наук, Челябинск, 1999
6. Гребнев Д.Ю., Ястребов А.П., Маклакова И.Ю. и др. 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.7, №2. С. 22-23.
7. Медведева С.Ю. Состояние регенераторных процессов в тонкой кишке при воздействии холода

на организм. Очерки экспериментальной патофизиологии. Екатеринбург, Изд-во «СВ-96», 1999 г., С. 184-200.

8. Сазонов С.В. Особенности пролиферативных процессов в тканях с высокой скоростью клеточного обновления при возрастной инволюции организма. Морфология. 2012. Т.141, №3. С. 136.

9. Yamanaka, K., Yamamoto, O., Honda, T. Pathophysiology of psoriasis: A review. The Journal of dermatology, 2021, Vol. 48, no. 6, pp. 722–731. doi.org/10.1111/1346-8138.15913

10. Блинкова Н.Б., Сазонов С.В., Леонтьев С.Л. Полиплоидия гепатоцитов в регенерации печени при хроническом гепатите у пациентов из разных возрастных групп. Юника, Екатеринбург, 2017. 106 с.

11. Корель А.В., Кузнецов С.Б. Тканеинженерные стратегии для восстановления дефектов костной ткани. Современное состояние вопроса. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2019, № 4. С. 228-234.

12. Сазонов С.В. Состояние процессов пролиферации в почечном эпителии после односторонней нефрэктомии. Морфология. 2010. Т.137, №4. С. 167.

13. Сазонов С.В. Состояние пролиферативных процессов в почке при холодном воздействии на организм. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2008. №4 (22). С.105-107.

14. Титова О.Н., Кузубова Н.А., Лебедева Е.С., Волчкова Е.В. Активация регенеративного потенциала легочной ткани при тяжелой внебольничной пневмонии. РМЖ. 2020, 4, С. 24-28.

15. Шурыгин М.Г., Болбат А.В., Шурыгина И.А. Миосателлиты как источник регенерации мышечной ткани. Фундаментальные исследования. 2015. № 1-8. С. 1741-1746.

16. Фадеев Ф.А., Луговец Д.В., Улитко М.В., и др. Влияние состава ростовой среды и концентрации фетальной сыворотки на пролиферативную активность фибробластов. Гены и клетки. 2016. Т.11, №4. С. 75-79.

17. Коньшев К.В., Сазонов С.В. Использование адоптивного переноса лимфоидных клеток для стимуляции пролиферативных процессов при возрастной инволюции организма. Цитология. 2011. Т.53, №9. С. 735-736.

18. Сазонов С.В. Т-лимфоциты регуляторы активности пролиферации клеток в ткани (научный обзор). Вестник Уральской медицинской академической науки. 2007. №1. С. 91-95.

19. Юшков Б.Г. Клетки иммунной системы и регуляция регенерации. Бюллетень сибирской медицины. 2017. 16 (4). С. 94–105.

20. Епифанова О.И., Терских В.В., Полуновских В.А. Регуляторные механизмы пролиферации клеток. Общие проблемы физико-химической биологии. М., 1988, В.10. С. 1-164.

21. Dean P.N. A simplified method of DNA distribution analysis. Cell Tissue Kinet. 1980. Vol. 13, №3. pp. 299-308.

22. Розанов Ю.М. Проточная цитометрия. Методы культивирования клеток. Под ред. Г.П. Пинаева. Л.: Наука, 1988. С. 136-146.

23. Сазонов С.В. Определение уровня пролиферации в тканях органов при иммуногистохимическом исследовании Ki-67. Морфология. 2018. Т. 153, №3. С. 242-242а.

24. Сазонов С.В., Бриллиант А.А., Коньшев К.В. Стандартизация иммуногистохимического определения уровня экспрессии Ki-67 в клетках различных тканей. Морфология. 2017. Т. 151, №3. С. 100.

Автор:

Сазонов Сергей Владимирович

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения РФ

Заведующий кафедрой гистологии, доктор медицинских наук, профессор

Российская Федерация, 620028, Екатеринбург, ул. Репина, 3, usma@usma.ru

Prof-SSazonov@yandex.ru

**S.V. Sazonov<sup>1,2</sup>**

## **SOME METHODOLOGICAL TECHNIQUES FOR STUDYING PROLIFERATIVE PROCESSES IN TISSUE CELLS UNDER EXTREME IMPACTS ON THE ORGANISM**

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Ural State Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Yekaterinburg, Russian Federation;

<sup>2</sup>GAUZ SO “Institute of Medical Cellular Technologies”, Yekaterinburg, Russian Federation

**Abstract.** When studying regeneration, it is often difficult to give an unambiguous answer to the question of whether the regenerative capacity in mammals decreases or increases under extreme effects on the body, especially when it comes to initially low values of the studied parameters. The assessment of regenerative processes implies the solution of several fundamental questions before conducting research. Ignoring them can lead to methodological miscalculations both in the planning of studies and directly when the results are obtained, and even more so in their subsequent analysis. **Materials and methods.** The assessment of regenerative processes at the cellular level was carried out using the morphometric method, DNA flow cytometry, autoradiography, calculation of the statmokinetic index, and immunohistochemical determination of Ki67 expression. An experimental model of liver regeneration after partial hepatectomy and resection of the small intestine was used. **Results.** It has been shown that the tissues entering the organ can regenerate in different ways and at different rates, which, apparently, determines the features and outcome of the regenerative process at the organ level. The identification of the main groups of tissues for the study of regeneration is simultaneously associated with the solution of the question not only of the level of the course of regenerative processes, but also of the necessary methodological techniques for their assessment. So, if the tissue planned for study has only the cellular level of regeneration, there is no need to study them at the intracellular level, and the study of regeneration in this case is limited to assessing the manifestations of mitotic activity in its cells. Methods for studying cell proliferation and requirements for their use are defined.

**Keywords:** regeneration, cell proliferation, research methods, models of reparative regeneration, experiment planning, extreme exposure

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Sergey V. Sazonov

Prof-SSazonov@yandex.ru

Received 01.12.2022

For citation:

Sazonov S.V. Some methodological techniques for studying proliferative processes in tissue cells under extreme impacts on the organism. [Online] Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2022, Vol. 19, no. 5, pp. 474–484. DOI: 10.22138/2500-0918-2022-19-474-484 (In Russ)

### REFERENCE

1. Yastrebov A.P. Some results and prospects of studying the mechanisms of tissue regeneration under the influence of extreme factors on the body / Essays on experimental pathophysiology. Yekaterinburg, Publishing house «SV-96», 1999, p.13-26. (In Russ)
2. Sazonov S.V. Age-related features of the state of regenerative processes in tissues / Essays on experimental pathophysiology. Yekaterinburg, Publishing house «SV-96», 1999, p.352-364. (In Russ)
3. Cellular technologies for practical healthcare, 2019. Collection of scientific papers. under the general editorship of prof. Leontieva S.L. - GAUZ SO «Institute of Medical Cellular Technologies», Yekaterinburg: Bulletin of the Ural Medical Academic Science, 2019. 230 p. (In Russ)
4. Sazonov S.V. Analysis of proliferative processes in organs with different mechanisms of cell renewal

during aging. *Morphology*. 2016. V.149, No. 3. С. 177-177a. (In Russ)

5. Sazonov S.V. Features of the state of proliferative processes in conditions of age-related involution of the organism. Abstract dis. ... doctors of medical sciences, Chelyabinsk, 1999. (In Russ)

6. Grebnev D.Yu., Yastrebov A.P., Maklakova I.Yu. Comparative analysis of jejunal epithelium regeneration in mature and old laboratory animals under conditions of acute blood loss during stem cell transplantation. *Cell transplantation and tissue engineering*. 2012. Vol. 7, No. 2. S.22-23. (In Russ)

7. Medvedeva S.Yu. The state of regenerative processes in the small intestine when exposed to cold on the body. *Essays on experimental pathophysiology*. Yekaterinburg, Publishing house «SV-96», 1999, pp. 184-200. (In Russ)

8. Sazonov S.V. Features of proliferative processes in tissues with a high rate of cell renewal during age-related involution of the body. *Morphology*. 2012. Vol. 141, No. 3. P.136.

9. Yamanaka, K., Yamamoto, O., Honda, T. Pathophysiology of psoriasis: A review. *The Journal of Dermatology*, 2021, Vol. 48, no. 6, pp. 722–731. doi.org/10.1111/1346-8138.15913

10. Blinkova N.B., Sazonov S.V., Leontiev S.L. Hepatocyte polyploidy in liver regeneration in chronic hepatitis in patients from different age groups. *Yunika*, Yekaterinburg, 2017. 106 p. (In Russ)

11. Korel A.V., Kuznetsov S.B. Tissue engineering strategies for the restoration of bone defects. The current state of the issue. *International Journal of Applied and Basic Research*. 2019, No. 4. S. 228-234. (In Russ)

12. Sazonov S.V. The state of proliferation processes in the renal epithelium after unilateral nephrectomy. *Morphology*. 2010. Vol. 137, No. 4. P.167. (In Russ)

13. Sazonov S.V. The state of proliferative processes in the kidney during cold exposure to the body. *Bulletin of the Ural medical academic science*. 2008. No. 4 (22). pp.105-107. (In Russ)

14. Titova O.N., Kuzubova N.A., Lebedeva E.S., Volchkova E.V. Activation of the regenerative potential of the lung tissue in severe community-acquired pneumonia. *breast cancer*. 2020, 4, pp. 24-28. (In Russ)

15. Shurygin M.G., Bolbat A.V., Shurygina I.A. Myosatellites as a source of muscle tissue regeneration. *Basic research*. 2015. No. 1-8. S. 1741-1746. (In Russ)

16. Fadeev F.A., Lugovets D.V., Ulitko M.V., et al. Effect of growth medium composition and fetal serum concentration on the proliferative activity of fibroblasts. *Genes and cells*. 2016. V.11, No. 4. pp.75-79. (In Russ)

17. Konyshev K.V., Sazonov S.V. The use of adoptive transfer of lymphoid cells to stimulate proliferative processes during the age-related involution of the body. *Cytology*. 2011. V.53, No. 9. pp.735-736. (In Russ)

18. Sazonov S.V. T-lymphocytes are regulators of cell proliferation activity in tissues (scientific review). *Bulletin of the Ural medical academic science*. 2007. No. 1. pp. 91-95. (In Russ)

19. Yushkov B.G. Cells of the immune system and regulation of regeneration. *Bulletin of Siberian medicine*. 2017. 16(4). pp. 94–105. (In Russ)

20. Epifanova O.I., Terskikh V.V., Polunovskikh V.A. Regulatory mechanisms of cell proliferation. *General problems of physical and chemical biology*. M., 1988, V.10. pp. 1-164. (In Russ)

21. Dean P.N. A simplified method of DNA distribution analysis. *Cell Tissue Kinet*. 1980 Vol. 13, no. 3. P.299-308.

22. Rozanov Yu.M. flow cytometry. *Cell culture methods*. Ed. G.P. Pinaeva. L.: Nauka, 1988. S.136-146. (In Russ)

23. Sazonov S.V. Determination of the level of proliferation in organ tissues in the immunohistochemical study of Ki-67. *Morphology*. 2018. V.153, No. 3. S.242-242a. (In Russ)

24. Sazonov S.V., Brilliant A.A., Konyshev K.V. Standardization of immunohistochemical determination of Ki-67 expression level in cells of various tissues. *Morphology*. 2017. V.151, No. 3. P.100. (In Russ)

Author

Sergey V. Sazonov

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Ural State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation

Head of the Department of Histology, Doctor of Medical Sciences, Professor

3 Repina str. Yekaterinburg Russian Federation 620028, usma@usma.ru

Prof-SSazonov@yandex.ru