

APOPTOZA TOKOM RAZVOJA HUMANOG FETALNOG BUBREGA

Marija Daković-Bjelaković*, Natalija Stefanović*, Goran Bjelaković**, Rade Čukuranović*,
Svetlana Antić* i Vuka Katić***

Morfogeneza bubrega je kompleksan i postepen proces. Nastanku zrelog bubrega sisara (metanefrosa) prethodi nastanak dva primitivna embrionalna bubrega, pronefrosa i mezonefrosa. Metanefros nastaje kao rezultat recipročnog induktivnog delovanja ureteralnog pupoljka, epitelnog izraštaja Wolff-ovog kanala, i metanefričke blasteme, grupe mezenhimalnih ćelija. Ureteralni pupoljak utiče na diferencijaciju metanefričkog mezenhima i nastanak nefrona, dok metanefrički mezenhim dovodi do rasta i grananja ureteralnog pupoljka od koga nastaju sabirni kanalići. Nefron prolazi kroz četiri stadijuma razvoja, koji su opisani kao: 1) vezikula, 2) zapeta-oblik i S-oblik 3) glomerul u razvoju i 4) zreo glomerul.

Apoptoza, ili programirana ćelijska smrt predominantna je forma fiziološke ćelijske smrti, putem koje organizam eliminiše nepotrebne ili oštećene ćelije. Ona je glavna komponenta normalnog razvoja i bolesti. Apoptoza je rezultat serije biohemijskih procesa koji se određenim redosledom odvijaju u ćeliji koja umire, od kojih je najvažniji aktivacija familije enzima cistein proteaza (kaspaza) koji deluju na različite ćelijske sastojke. Ona se morfološki karakteriše izbočenjem ćelijske membrane, skupljanjem ćelije, fragmentacijom jedra i kondenzacijom hromatina. Organele su skoro intaktne. Dolazi i do promene ćelijskih površinskih molekula. Različiti fiziološki i patološki stimuli mogu inicirati apoptozu. Oni deluju preko receptora, biohemijskih agenasa, ili dovode do oštećenja DNA i ćelijske membrane.

Apoptoza je značajna komponenta fetalnog razvoja. Smatra se da je apoptoza jedan od glavnih regulatornih događaja uključenih u morfogenezu bubrega, s obzirom da od velikog broja ćelija koje nastaju samo je nekoliko uključeno u program razvoja izbegavajući apoptozu. U bilo kom periodu, između 3 i 5% ćelija u bubregu u razvoju su apoptotične. Potpuni razumevanje kontrole procesa apoptoze u bubregu tokom razvoja može dovesti do otkrića terapijskih sredstava koja mogu prevenirati nastanak razvojnih poremećaja bubrega. *Acta Medica Mediana* 2005; 44(1): 69–72.

Ključne reči: apoptoza, razvoj, bubreg

Institut za anatomiju Medicinskog fakulteta u Nišu*
Klinika za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničkog centra u Nišu**
Institut za patologiju Kliničkog centra u Nišu***

Kontakt: Marija Daković-Bjelaković
Institut za anatomiju Medicinskog fakulteta
Bulevar Dr Zorana Đinđića 81
18000 Niš, Srbija i Crna Gora
Tel.: +381 18 532381
E-mail: marija.bjelakovic@medfak.ni.ac.yu

Razvoj bubrega

Bubreg predstavlja jedan od glavnih ekskretornih i homeostatskih organa u telu koji kontroliše koncentraciju određenih sastojaka telesnih tečnosti. Razvoj bubrega je kompleksan i postepen proces. Razvoju zrelog bubrega sisara (metanefrosa) prethodi nastanak dva primitivna embrionalna bubrega, pronefrosa i mezonefrosa, koji nastaju iz intermedijernog mezoderma. Pronefros i mezonefros su prolazne strukture sa malim ekskretornim kapacitetom. Pronefros je tranzitorna nefunkcionalna struktura lokalizovana blizu cervikal-

nih somita. U osnovi, to je jedan veliki neintegrisani nefron u kome vaskularizovana filtraciona jedinica (glomus) nije direktno integrisana u tubul bubrega. Pronefrosni kanal pruža se kaudalno i otvara se u kloaku. Nakon degeneracije pronefrosa najveći deo pronefrosnog kanala postaje mezonefrosni ili Wolff-ov kanal (1). Mezonefros je veliki izduženi organ, lokalizovan lateralno i kaudalno od pronefrosa, a sastoji se od glomerula i tubula. Mezonefrosni nefron je sastavljen od glomerula i dva tubularna segmenta (proksimalnog i distalnog). Ovi tubuli se otvaraju u mezonefrosni kanal, koji se prazni u urogenitalni sinus, ventralni izraštaj kloake. Glomeruli mezonefrosa su veći, ima ih manje nego u metanefrosu i funkcionalni su. Mezonefrosni nefroni ne sadrže Henle-ovu petlju (2).

Metanefros nastaje kao rezultat recipročnog induktivnog delovanja ureteralnog pupoljka, epitelnog izraštaja Wolff-ovog kanala, i metanefričke blasteme, grupe mezenhimalnih ćelija. Ureteralni pupoljak utiče na diferencijaciju metanefričkog mezenhima i nastanak nefrona, dok metanefrički mezenhim dovodi do rasta i grananja ureteralnog pupoljka od koga nastaju sabirni

kanalići. Pretvaranje mezenhima u epitel tokom organogeneze bubrega dešava se kada ureteralni pupoljak indukuje diferencijaciju mezenhima (3,4). Diferencijacija mezenhima, indukovana od strane ureteralnog pupoljka dovodi do pojave epitelnih ćelijskih markera kao što su tip IV kolagena, alfa lanac laminina i uvo-morilina, i nestanak mezenhimalnih proteina kao što su vimentin i N-CAM (5). Apoptoza je dokumentovana tokom razvoja metanefrosa, tj. tokom indukcije metanefričkog mezenhima od strane ureteralnog pupoljka (6).

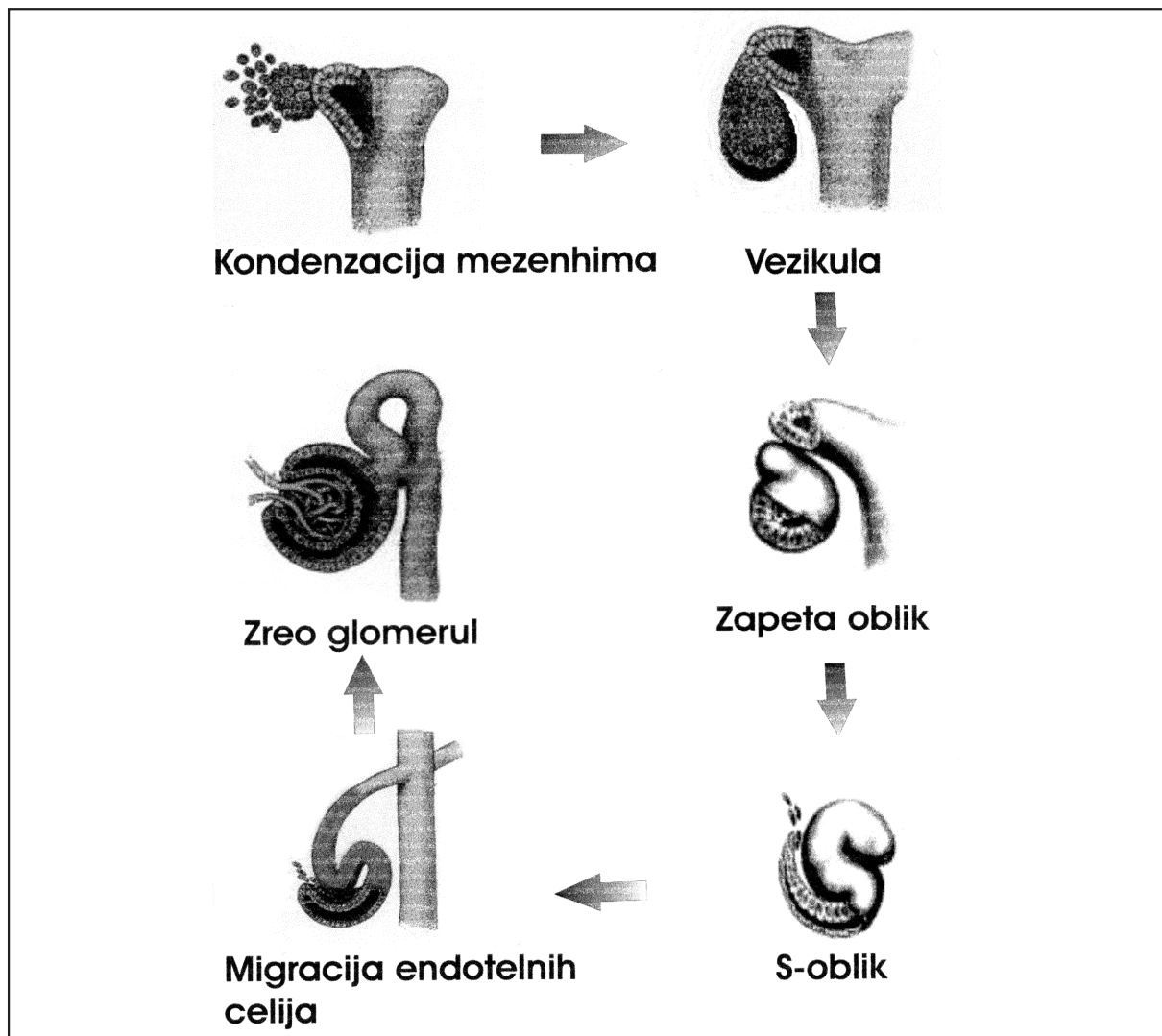
Nefron prolazi kroz četiri stadijuma razvoja, koji su opisani kao 1) vezikula, 2) zapeta-oblik i S-oblik 3) glomerul u razvoju (migracija endotelnih ćelija) i 4) zreo glomerul (Slika 1).

Poreklo vaskulature bubrega nije u potpunosti jasno. Nakon invaginacije renalne vezikule signali nastali u ćelijama vaskularnog žleba dovode do privlačenja angioblasta ili endotelnih ćelija u glomerul u razvoju. Kada se jednom nađu u vaskularnom žlebu, endotelne ćelije podležu mitozu i organizuju se u kapilare paralelno sa širenjem glomerula (5). Glomerularna bazalna membrana je izgrađena od komponenti ekstra-ćelijskog matriksa produkovananih od strane endotela i

podocita. Mezangijalne ćelije ili "glomerularni periciti" se takođe regrutuju u glomerul doprinoseći stabilizaciji glomerularnog klupčeta (7).

Apoptoza - programirana ćelijska smrt

Činjenica da ćelijska smrt ne mora uvek biti loša stvar je bila iznenađenje za mnoge istraživače. Fiziološka ćelijska smrt je zabeležena kod različitih više-ćelijskih organizama (8). Apoptoza, ili programirana ćelijska smrt, predominantna je forma fiziološke ćelijske smrti, putem koje organizam eliminiše nepotrebne ili oštećene ćelije. Ona je glavna komponenta normalnog razvoja i bolesti (9,10). Apoptoza je rezultat serije biohemijskih procesa koji se određenim redosledom odvijaju u ćeliji koja umire, od kojih je najvažniji aktivacija familije enzima cistein proteaza (kaspaza) koji deluju na različite ćelijske sastojke (11). Ona se morfološki karakteriše izbočenjem ćelijske membrane, skupljanjem ćelije, fragmentacijom jedra i kondenzacijom hromatina. Organele su skoro intaktne. Dolazi do promene ćelijskih površinskih molekula što osigurava



Slika 1. Razvojni stadijumi nefrona (prilagođeno iz Saxen L. *Organogenesis of the Kidney*. New York: Cambridge University Press; 1987)

da apoptotična ćelija bude odmah prepoznata i fagocitovana od susednih ćelija, ne dovodeći do zapaljenja (12). Različiti fiziološki i patološki stimuli mogu inicirati apoptozu. Oni deluju preko receptora, biohemijskih agenasa, ili dovode do oštećenja DNA i ćelijske membrane. Receptori "smrti" koji iniciraju apoptozu obuhvataju Fas receptore i TNF receptor sistem (13). Posle odgovarajućeg stimulusa nastupa prva faza ili "faza odluke" koja predstavlja genetski kontrolisanu tačku ćelijske smrti. Nakon toga sledi druga faza ili "faza egzekucije", koja je odgovorna za morfološke promene u apoptozu. Treći stadijum je fagocitoza i razgradnja DNA ćelije koja umire (10). Postoje dva puta prenošenja signala koji vode apoptozu i koji se preklapaju, unutrašnji i spoljašnji. U unutrašnjem, različiti stimuli kao oksidativni stres, dovode do poremećaja funkcije mitohondrija i oslobađanja pro-apoptičkih faktora. Vezivanje liganda za receptore "smrti" na ćelijskoj površini, kao što su Fas, aktivira spoljašnji put (11). Tokom poslednje dekade otkriveni su molekularni mehanizmi uključeni u poremećaje apoptoze, sugerišući da su kancer, mnoga hronična oboljenja, kao i poremećaji nastali tokom fetalnog razvoja, posledica poremećene apoptoze (10).

Apoptoza tokom razvoja bubrega

Programirana ćelijska smrt je značajna komponenta fetalnog razvoja (14,15). Intrauterini život se karakteriše visokim stepenom apoptoze (16), nasuprot periodu nakon rođenja kada je ona suprimirana (17).

Kao i u razvoju drugih organa, za razvoj bubrega odgovorna su dva procesa, organogeneza, proces indukcije i diferencijacije ćelija, i maturacija, proces tokom koga organ dostiže kompletnu morfološku i funkcionalnu zrelost. Intrauterini život karakteriše se visokom stepenom ćelijske proliferacije i apoptoze u različitim fetalnim tkivima (17). Apoptoza igra vrlo važnu ulogu u embriogenezi uobličavanjem organa tokom razvoja putem eliminacije specifičnih populacija ćelija u različitim stadijumima embriogeneze. Apoptoza tokom razvoja humanog fetalnog bubrega je dokumentovana u mnogim situacijama (5,18,19). Smatra se da je apoptoza jedan od glavnih regulatornih događaja uključenih u morfogenezu bubrega s obzirom da od velikog broja ćelija koje nastaju, samo je nekoliko uključeno u program razvoja izbegavajući apoptozu. Apoptoza u mezonefrosu i metanefrosu, kao i klirens apoptotičnog debrisa od strane specijalizovanih makrofaga opisana je kod miša (20). Dokazano je da apoptoza takođe ima važnu ulogu u regresiji primitivnih bubrega pacova (21). Apoptotične ćelije se

mogu uočiti u početnim fazama razvoja bubrega, neposredno uz agregate mezenhimalnih ćelija, kao i uz vezikulu (18,22). Ona je mnogo izraženija u mezenhimalnim ćelijama spoljašnjeg sloja nefrogenog korteksa gde programirana ćelijska smrt ima ulogu u otklanjanju mezenhimalnih ćelija koje nisu odabrane za pretvaranje u epitel. To ukazuje da induktivni signali mogu biti dvostepeni. Sprečavanje apoptoze praćeno je pretvaranjem mezenhimalnog u epitelijalni fenotip (23,24). Ostrvca apoptotičnih ćelija su prisutna i između nefrona u razvoju. U bilo kom periodu, između 3 i 5% ćelija u bubregu u razvoju su apoptotične (18). Zbog brze eliminacije apoptotičnih ćelija iz tkiva njih je na neki način teško detektovati na tkivnim preseccima, te prisustvo nekoliko apoptotičnih ćelija može ukazivati na relativno obimnu programiranu ćelijsku smrt. Treba naglasiti da se apoptoza odvija određenim redosledom tokom razvoja bubrega, i nasuprot, vrlo je redak događaj kod zrelog bubrega (25). U zreлом bubregu apoptoza je dokumentovana u dva slučaja: regeneraciji bubrega nakon akutne ishemije i tokom procesa cistogeneze u policističnoj bolesti bubrega. Procenjeno je da tokom razvoja bubrega, dok jedna ćelija umire, dve do četiri ćelije nastaju deljenjem (18). Tokom kasnijih stadijuma razvoja bubrega, kod pacova je zabeležena apoptoza kako u nefrogenoj zoni tako i u papilama medule. Apoptoza u nefrogenoj zoni odvija se prvenstveno u ćelijama metanefričke blasteme koje se nalaze u blizini, ali nisu inkorporisane u nefrogene strukture. Oko 40% apoptoze odvija se u tubularnim epitelnim strukturama. Apoptotične ćelije su locirane ili u zidovima nefrona u razvoju, ili u njihovom lumenu. Broj apoptotičnih ćelija u nefrogenoj zoni smanjuje se tokom 14. dana nakon rođenja (18,25). Dok se apoptoza dešava u novonastalim ćelijama tubula u nefrogenoj zoni, to nije slučaj sa papilom (18).

Apoptoza u ćelijama bubrega je regulisana kako unutrašnjim tako i spoljašnjim faktorima. Protoonkogen bcl-2 je važan unutrašnji, a epidermalni faktor rasta, važan spoljašnji faktor (25).

Zaključak

Potpunije razumevanje kontrole procesa apoptoze u bubregu, kako tokom razvoja tako i nakon oporavka od akutne ishemije ili cistogeneze u policističnoj bolesti bubrega, može dovesti do otkrića terapijskih sredstava koja mogu prevenirati nastanak razvojnih poremećaja bubrega, potpomoći bržu regeneraciju nakon akutne ishemije i usporiti progresiju bubrežne insuficijencije u policističnoj bolesti bubrega.

Literatura

1. Sorenson C, Rogers SA, Korsmeyer SJ, Hammerman MR. Fulminant metanephric apoptosis and abnormal kidney development in bcl-2 deficient mice. *Am J Physiol* 1995;268:F73-F81.
2. Moritz KM, Wintour EM. Functional development of the meso- and metanephros. *Pediatr Nephrol* 1999;13:171-8.
3. Saxen L. Organogenesis of the Kidney. New York: Cambridge University Press; 1987.
4. Daković-Bjelaković M. Razvojne karakteristike nefrona kod humanog fetusa (magistarski rad). Niš: Medicinski fakultet; 1999.

5. Koseki C. Cell death programmed in uninduced metanephric mesenchymal cells. *Pediatr Nephrol* 1993; 7: 609–11.
6. Ekblom P. Developmentally regulated conversion of mesenchyme to epithelium. *FASEB J* 1989;3:2141–50.
7. Abrahamson DR, Robert B, Hyink DP, St. John PL, Daniel TO. Origins and formation of microvasculature in the developing kidney. *Kidney Int* 1998;54 suppl 67:s7–s11.
8. Häcker G, Vaux DL. A chronology of cell death. *Apoptosis* 1997; 2:247–56.
9. Kam PCA, Ferch NI. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia* 2000;55:1081–93.
10. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* 1999; 107:489–506.
11. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselbog S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *European Journal of Biochemistry* 1998;254:439–59.
12. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *British Medical Bulletin* 1997;53:451–65.
13. Rudin CM, Thompson CB. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev Med* 1997; 48:267–81.
14. Haanen C, Vermes I. Apoptosis: Programmed cell death in fetal development. *Eur J Obstetrics & Gynecology* 1996;64:129–33.
15. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999;96:245–54.
16. Negata S, Goldstein P. The Fas Death Factor. *Science* 1995;267: 1449–56.
17. Malamitsi-Puchner A, Sarandakou A, Tziotis J, Trika P, Creatas G. Evidence for a suppression of apoptosis in early postnatal life. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001; 80:994–7.
18. Coles HSR, Burne JF, Raff MC. Large scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor. *Development* 1993;118:777–84.
19. Koseki C, Herzlinger D, Al-Awqati Q. Apoptosis in metanephric development. *J Cell Biol* 1992; 119: 1327–33.
20. Camp V, Martin P. Programmed cell death and its clearance in the developing mammalian kidney. *Exp Nephrol* 1996;4:105–11.
21. Pole RJ, Qi BQ, Beasley SW. Patterns of apoptosis during degeneration of the pronephros and mesonephros. *J Urol* 2002;167:269–71.
22. Huber S, Braun G, Burger-Kentsch A, Reinhart B, Luckow B, Horster M. CFTR mRNA and its truncated splice variant (TRN-CFTR) are differentially expressed during collecting duct ontogeny. *FEBS Lett* 1998; 423:362–6.
23. Barasch J, Pressler L, Connor J, Malik A. A ureteric bud cell line induces nephrogenesis in two steps by distinct signals. *Am J Physiol* 1996;271:F50–F61.
24. Foley JGD, Bard JBL. Apoptosis in the cortex of the developing mouse kidney. *J Anat* 2002;201:477–84.
25. Hammerman MR. Regulation of cell survival during renal development. *Pediatr Nephrol* 1998;12:596–602.

APOPTOSIS DURING HUMAN FETAL KIDNEY DEVELOPMENT

Marija Dakovic-Bjelakovic, Natalija Stefanovic, Goran Bjelakovic, Rade Cukuranovic, Svetlana Antic and Vuka Katic

Kidney morphogenesis is a complex and stepwise process. The formation of mature kidney in mammals is preceded by two primitive embryonic kidneys known as pronephros and mesonephros. Metanephros develops as a result of reciprocal inductive interactions between two primordial mesodermal derivatives: ureteric bud, an epithelial outgrowth of the Wolffian duct, and metanephric blastema, a group of mesenchymal cells. The ureteric bud induces the metanephric mesenchyme to differentiate and form nephrons, whilst the metanephric mesenchyme induces the ureteric bud to grow and branch to form collecting ducts. The nephron goes through four developmental stages, which are described as: 1) vesicle, 2) comma-shaped and S-shaped stages, 3) developing capillary loop, and finally 4) maturing glomerulus.

Apoptosis (programmed cell death) is a predominant form of physiological cell death, by which organism eliminate unwanted or damaged cells. It is the major component of normal development and disease. Apoptosis is the result of series of biochemical processes happening in certain order in a dying cell, among which the most important is activation of enzyme families called caspases which influence different cell components. Apoptosis is characterized by membrane blebbing, shrinkage of the cell, nuclear fragmentation and chromatin condensation. Organelles are preserved almost intact. Cell surface molecules change. A variety of physiological and pathological stimuli can initiate apoptosis. They act via receptor mechanisms, through biochemical agents, or cause DNA and cell membrane damage.

Apoptosis is an important component of fetal development. It is thought that apoptosis is the one of the main regulatory events involved in kidney morphogenesis, considering that among great number of developed cells, only a few of them are involved in the developing program by escaping apoptosis. In any period during kidney development about 3 to 5% of cells are apoptotic. Thorough elucidation of the regulators controlling apoptotic pathways during development may contribute to the development of therapeutic agents that can prevent onset of developmental abnormalities of the kidney. *Acta Medica Medianae* 2005; 44(1): 69–72.

Key words: *apoptosis, development, kidney*