



**UNIVERZITET U NIŠU  
MEDICINSKI FAKULTET**



**Milorad M. Antić**

**KOMPARATIVNA ANALIZA IMUNOHISTOHEMIJSKIH I  
HISTOMORFOMETRIJSKIH KARAKTERISTIKA HUMANE  
METANEFROGENEZE**

- Doktorska disertacija -

Niš, 2022.



**UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF MEDICINE**



**Milorad M. Antić**

**COMPARATIVE ANALYSIS OF  
IMMUNOHISTOCHEMICAL AND  
HISTOMORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF  
HUMAN METANEPHROGENESIS**

- Doctoral dissertation -

Niš, 2022.

**Mentor:**

Redovni profesor, Prof. dr Marija Daković Bjelaković, Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet

**Članovi komisije:**

Redovni profesor, Prof. dr Rade Čukuranović, Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet

Redovni profesor, Prof. dr Dušica Marić, Univerzitet u Novim Sadu, Medicinski fakultet

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

## Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:	Prof.dr, Marija Daković Bjelaković, redovni profesor, Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet
Naslov:	Komparativna analiza imunohistohemijskih i histomorfometrijskih karakteristika humane metanefrogeneze
Rezime:	<p>Cilj istraživanja bio je da se imunohistohemijski prouči ekspresija proliferativnog markera Ki-67 i markera povezanih sa apoptozom, Bcl-2 i Bax, tokom nefrogeneze. Takođe, morfometrijski su ispitane razvojne karakteristike bubrežnog tkiva u različitim periodima gestacije. Analizirani su uzorci bubrega 38 humanih fetusa gestacijske starosti (GS) od 13 do 40 nedelja. Istraživanje je pokazalo da se Ki-67 ekspresira u brojnim ćelijama mezenhima, pretubularnim agregatima, bubrežnim vezikulama, zapeta- i ranim S-formama. Tokom maturacije i prostorne ekspanzije nefrona prema dubljim delovima korteksa, ekspresija Ki-67 se značajno smanjuje od korpuskularne prema tubularnoj porciji nefrona. Slično, Bcl-2 se jako ekspresira u indukovanim nefrogenim progenitornim ćelijama, pretubularnim agregatima, bubrežnim vezikulama i zapeta-formama. Kako vaskularizacija i maturacija nefrona napreduju, Bcl-2 bojenje postaje manje intenzivno i ograničeno na parijetalni sloj Boumanove kapsule i bubrežne tubule. Slaba Bax ekspresija zabeležena je u pojedinačnim ćelijama rasutim unutar segmenata nefrona u svim razvojnim stadijumima. U dubokom delu korteksa Bax se intenzivnije ekspresira u bubrežnim tubulima. Sa napredovanjem nefrogeneze, širina nefrogene zone opada, uz jaku negativnu korelaciju sa GS. Suprotno, broj generacija glomerula i debljina korteksa rastu, uz jaku pozitivnu korelaciju sa GS. Prosečna area, perimetar i Feretov dijametar bubrežnih korpuskula opadaju do perioda od 29-32 nedelje gestacije, a zatim rastu do perioda od 37-40 nedelja. Utvrđena je slaba negativna korelacija sa GS. Suprotno, numerička arealna gustina bubrežnih korpuskula raste do perioda od 21-24 nedelje, a zatim opada do perioda od 37-40 nedelja, uz umerenu negativnu korelaciju sa GS. Prosečna area bubrežnih tubula neznatno opada do perioda od 21-24 nedelje gestacije, a zatim raste sve do perioda od 36-40 nedelja, uz umerenu pozitivnu korelaciju sa GS. Numerička arealna gustina bubrežnih tubula raste do perioda od 21-24 nedelje gestacije, održava se relativno konstantno do perioda od 33-36 nedelja, a zatim ponovo raste u periodu od 36-40 nedelja. Utvrđena je jaka pozitivna korelacija sa GS.</p>
Naučna oblast:	Medicina
Naučna disciplina:	Anatomija
Ključne reči:	bubreg, razvoj, nefron, imunohistohemija, morfometrija
UDK:	612.46 : 616.61-074/076 (043.3)
CERIF klasifikacija:	B440 Anatomija i morfologija čoveka
Tip licence Kreativne zajednice:	CC BY-NC-ND

### Data on doctoral dissertation

Doctoral Supervisor:	Full Prof., Marija Daković Bjelaković, MD, PhD, University of Niš, Faculty of Medicine
Title:	Comparative analysis of immunohistochemical and histomorphometric characteristics of human metanephrogenesis
Abstract:	<p>The aim of this research was to investigate the expression of proliferation marker Ki-67 and apoptosis-related markers Bcl-2 and Bax during nephrogenesis by immunohistochemistry. Also, developmental characteristics of kidney tissue in different periods of gestation were quantified using morphometric analysis methods. Kidney samples of 38 human fetuses with gestational age (GA) ranging from 13-40 weeks were analyzed. The study showed that Ki-67 was expressed in numerous cells of the metanephric mesenchyme, the pretubular aggregate, the renal vesicles, the comma-shaped body, and the early S-shaped body. During subsequent development and the spatial expansion of nephrons toward the matured zone, the expression Ki-67 was markedly reduced from corpuscular toward tubular portion of nephron. Similarly, Bcl-2 was strongly expressed in the induced nephrogenic progenitor cells, the pretubular aggregates, the renal vesicles and the comma-shaped body. As the vascularization and maturation of the nephron proceeded, Bcl-2 staining became less intense and limited to the parietal layer of Bowman's capsule and renal tubules. Weak Bax expression is observed in individual scattered cells within segments of developing nephrons at all developmental stages. In the matured zone, more intense Bax staining was observed in the renal tubules. As nephrogenesis progresses, the width of the nephrogenic zone decreased, showing a strong negative correlation with GS. In contrast, the number of glomerular generations and the thickness of the cortex increased, showing a strong positive correlation with GS. The average area, perimeter, and Feret's diameter of the glomeruli decreased up to a period of 29-32 weeks of gestation and subsequently increased until a period of 37-40 weeks. There was a weak negative correlation with GA. In contrast, the areal density of glomeruli increased up to a period of 21-24 weeks and then decreased until a period of 37-40 weeks, showing a moderate negative correlation with GA. The average area of renal tubules slightly decreased until a period of 21-24 weeks of gestation and then increased until a period of 36-40 weeks, showing a moderate positive correlation with GA. The average areal density of renal tubules increased until a period of 21-24 weeks of gestation, remained relatively constant until a period of 33-36 weeks, and then increased at 36-40 weeks. There was a strong positive correlation with GA.</p>
Scientific Field:	Medicine
Scientific Discipline:	Anatomy
Key Words:	kidney, development, nephron, immunohistochemistry, morphometry
UDC:	612.46 : 616.61-074/076 (043.3)
CERIF Classification:	B440 Human anatomy and morphology
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND

*Zahvalnost ocu i majci.*

*Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru, Prof. dr Mariji Daković Bjelaković koja me je svojim nesebičnim znanjem kao i velikim iskustvom usmeravala na pravi put tokom izrade doktorske disertacije.*

*Svojoj porodici dugujem veliku zahvalnost na podršci i razumevanju tokom celog procesa izrade doktorske disertacije.*

*Zahvalnost dugujem i svim kolegama koji su učestvovali u procesu izrade, a posebno Doc. dr Sanji Stojanović na velikoj stručnoj pomoći i tehničkoj podršci.*

## **Naslov doktorske disertacije**

Komparativna analiza imunohistohemijskih i histomorfometrijskih karakteristika humane metanefrogeneze

### **Rezime**

Cilj istraživanja bio je da se imunohistohemijski prouči ekspresija proliferativnog markera Ki-67 i markera povezanih sa apoptozom, Bcl-2 i Bax, tokom nefrogeneze. Takođe, morfometrijski su ispitane razvojne karakteristike bubrežnog tkiva u različitim periodima gestacije. Analizirani su uzorci bubrega 38 humanih fetusa gestacijske starosti (GS) od 13 do 40 nedelja. Istraživanje je pokazalo da se Ki-67 eksprimira u brojnim ćelijama mezenhima, pretubularnim agregatima, bubrežnim vezikulama, zapeta- i ranim S-formama. Tokom maturacije i prostorne ekspanzije nefrona prema dubljim delovima korteksa, ekspresija Ki-67 se značajno smanjuje od korpuskularne prema tubularnoj porciji nefrona. Slično, Bcl-2 se jako eksprimira u indukovanim nefrogenim progenitornim ćelijama, pretubularnim agregatima, bubrežnim vezikulama i zapeta-formama. Kako vaskularizacija i maturacija nefrona napreduju, Bcl-2 bojenje postaje manje intenzivno i ograničeno na parijetalni sloj Boumanove kapsule i bubrežne tubule. Slaba Bax ekspresija zabeležena je u pojedinačnim ćelijama rasutim unutar segmenata nefrona u svim razvojnim stadijumima. U dubokom delu korteksa Bax se intenzivnije eksprimira u bubrežnim tubulima. Sa napredovanjem nefrogeneze, širina nefrogene zone opada, uz jaku negativnu korelaciju sa GS. Suprotno, broj generacija glomerula i debljina korteksa rastu, uz jaku pozitivnu korelaciju sa GS. Prosečna area, perimetar i Feretov dijametar bubrežnih korpuskula opadaju do perioda od 29-32 nedelje gestacije, a zatim rastu do perioda od 37-40 nedelja. Utvrđena je slaba negativna korelacija sa GS. Suprotno, numerička arealna gustina bubrežnih korpuskula raste do perioda od 21-24 nedelje, a zatim opada do perioda od 37-40 nedelja, uz umerenu negativnu korelaciju sa GS. Prosečna area bubrežnih tubula neznatno opada do perioda od 21-24 nedelje gestacije, a zatim raste sve do perioda od 36-40 nedelja, uz umerenu pozitivnu korelaciju sa GS. Numerička arealna gustina bubrežnih tubula raste do perioda od 21-24 nedelje gestacije, održava se relativno konstantno do perioda od 33-36 nedelja, a zatim ponovo raste u periodu od 36-40 nedelja. Utvrđena je jaka pozitivna korelacija sa GS.

**Ključne reči:** bubreg, razvoj, nefron, imunohistohemija, morfometrija.

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Anatomija



## **Title of doctoral thesis**

Comparative analysis of immunohistochemical and histomorphometric characteristics of human metanephrogenesis

### **Abstract**

The aim of this research was to investigate the expression of proliferation marker Ki-67 and apoptosis-related markers Bcl-2 and Bax during nephrogenesis by immunohistochemistry. Also, developmental characteristics of kidney tissue in different periods of gestation were quantified using morphometric analysis methods. Kidney samples of 38 human fetuses with gestational age (GA) ranging from 13-40 weeks were analyzed. The study showed that Ki-67 was expressed in numerous cells of the metanephric mesenchyme, the pretubular aggregate, the renal vesicles, the comma-shaped body, and the early S-shaped body. During subsequent development and the spatial expansion of nephrons toward the matured zone, the expression Ki-67 was markedly reduced from corpuscular toward tubular portion of nephron. Similarly, Bcl-2 was strongly expressed in the induced nephrogenic progenitor cells, the pretubular aggregates, the renal vesicles and the comma-shaped body. As the vascularization and maturation of the nephron proceeded, Bcl-2 staining became less intense and limited to the parietal layer of Bowman's capsule and renal tubules. Weak Bax expression is observed in individual scattered cells within segments of developing nephrons at all developmental stages. In the matured zone, more intense Bax staining was observed in the renal tubules. As nephrogenesis progresses, the width of the nephrogenic zone decreased, showing a strong negative correlation with GS. In contrast, the number of glomerular generations and the thickness of the cortex increased, showing a strong positive correlation with GS. The average area, perimeter, and Feret's diameter of the glomeruli decreased up to a period of 29-32 weeks of gestation and subsequently increased until a period of 37-40 weeks. There was a weak negative correlation with GA. In contrast, the areal density of glomeruli increased up to a period of 21-24 weeks and then decreased until a period of 37-40 weeks, showing a moderate negative correlation with GA. The average area of renal tubules slightly decreased until a period of 21-24 weeks of gestation and then increased until a period of 36-40 weeks, showing a moderate positive correlation with GA. The average areal density of renal tubules increased until a period of 21-24 weeks of gestation, remained relatively constant until a period of 33-36 weeks, and then increased at 36-40 weeks. There was a strong positive correlation with GA.

**Key words:** kidney, development, nephron, immunohistochemistry, morphometry.

**Scientific field:** Medicine

**Scientific discipline:** Anatomy

---

## Skraćenice

---

A - ampula sabirnog tubula

AIF - (engl. *apoptosis inducing factor*) - indukujući faktor apoptoze

BCL-2 - B-ćelijski limfom 2

CKD - (engl. *chronic kidney disease*) - hronična bolest bubrega

DT - distalni tubul

G - glomerul

GS - gestacijska starost

GBM - glomerularna bazalna membrana

IUGR - (engl. *intrauterine growth restriction*) - intrauterusna restrikcija rasta

JGA - jukstaglomerularni aparat

K - kapsula

LBW - (engl. *low birth weight*) - mala porođajna težina

LM - lunarni mesec

MB - metanefrosni blastem

MM - metanefrosni mezenhim

NZ - nefrogena zona

PCNA- proliferišući nuklerani antigen

PTA - pretubularni agregat

PT - proksimalni tubul

ST - sabirni tubul

S - telo u obliku slova S

TNF - (engl. *tumor necrosis factor*) - faktor tumorske nekroze

UP - ureterni pupoljak

V - vezikula

ZM - zona maturacije

---

---

# SADRŽAJ

---

<b>UVOD</b>	
<b>1. PREGLED LITERATURE</b>	<b>1</b>
<b>1.1. ANATOMIJA BUBREGA</b>	<b>1</b>
<b>1.2. GRAĐA BUBREGA</b>	<b>2</b>
1.2.1. Mikrostruktura bubrega	3
1.2.2. Nefron	3
1.2.2.1. Bubrežni korpuskul	4
1.2.2.1.1. Glomerul	4
1.2.2.1.2. Filtraciona barijera	4
1.2.2.1.3. Mezangijske ćelije	6
1.2.2.1.4. Boumanova kapsula	6
1.2.2.2. Proksimalni tubul	7
1.2.2.3. Tanki segment Henleove petlje	8
1.2.2.4. Distalni tubul	8
1.2.2.5. Jukstaklomerularni aparat	9
1.2.2.6. Spojni tubul	10
1.2.3. Sistem sabirnih kanalića	10
1.2.4. Intersticijum	11
1.2.5. Vaskularizacija bubrega	12
1.2.5.1. Mikrovaskulatura	12
1.2.6. Limfatici bubrega	14
1.2.7. Inervacija bubrega	14
<b>1.3. ORGANOGENEZA BUBREGA</b>	<b>15</b>
<b>1.4. RAZVOJ PERMANENTNOG BUBREGA</b>	<b>16</b>
1.4.1. Proliferacija	17
1.4.2. Apoptoza	18
1.4.2.1. Morfologija apoptoze	19
1.4.2.2. Mehanizmi apoptoze	20
1.4.2.2.1. Spoljašnji put apoptoze	21
1.4.2.2.2. Unutrašnji put apoptoze	21
1.4.2.3. Porodica Bcl-2 proteina	22
1.4.3. Razvoj ureternog pupoljka	24
1.4.4. Metanefrosni mezenhim	25
1.4.5. Razvoj nefrona	26
<b>1.5. NEFROGENEZA I BROJ NEFRONA</b>	<b>30</b>
1.5.1. Fetalno programiranje i razvojna plastičnost	32
1.5.2. Klinički korelati nefrogeneze i broja nefrona	34
1.5.3. Koncepti terapijski prolongirane nefrogeneze	37
<b>2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA</b>	<b>39</b>
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	<b>40</b>
<b>4. MATERIJAL I METODE</b>	<b>41</b>
<b>4.1. MATERIJAL</b>	<b>41</b>
<b>4.2. METODE</b>	<b>42</b>

---

---

4.2.1. Histološke metode	43
4.2.2. Imunohistochemijske metode	43
4.2.3. Morfometrijske metode	45
4.2.4. Statističke metode	47
<b>5. REZULTATI</b>	<b>49</b>
5.1. HISTOLOŠKA ANALIZA	49
5.2. IMUNOHISTOHEMIJSKA ANALIZA	55
5.2.1. Imunoekspresija Ki-67	55
5.2.2. Imunoekspresija Bcl-2	61
5.2.3. Imunoekspresija Bax	66
5.3. MORFOMETRIJSKA ANALIZA	70
<b>6. DISKUSIJA</b>	<b>87</b>
<b>7. ZAKLJUČCI</b>	<b>104</b>
<b>8. LITERATURA</b>	<b>107</b>
Biografija	127
Izjava o autorstvu	128

---

# UVOD

*Bubreg je primarni ekskretorni i homeostatski organ. Nefron, osnovna strukturalna i funkcionalna jedinica bubrega, izgrađen je od bubrežnog korpuskula, bubrežnog tubula i spojnog tubula koji ga povezuje sa sabirnim sistemom bubrega. Filtracija na glomerularnom nivou, selektivna resorpcija iz filtrata koji prolazi duž bubrežnih tubula i sekrecija od strane ćelija tubula u filtrat određuju ekskretornu i regulatornu funkciju bubrega. Svaki segment nefrona ima karakterističnu građu povezanu sa specifičnim funkcijama organa. Funkcionalna sposobnost bubrega zavisi od razvoja specifičnih tipova ćelija pojedinih segmenata nefrona koji zauzimaju mesto u korteksu i meduli. Razvoj bubrega obuhvata niz morfoloških i funkcionalnih promena koje se odvijaju na strogo kontrolisan vremenski i prostorni način kako bi se formirao konačan broj funkcionalnih nefrona. Tokom razvoja, bubreg raste usled povećanja broja ćelija zbog proliferacije, povećanja broja nefrona, veličine glomerula, dužine renalnih tubula i sabirnih kanala.*

*Razvoj metanefrosa ili permanentnog bubrega kod čoveka počinje u 5. nedelji gestacije kada ureterni pupoljak progresivno urasta u susedni metanefrosni blastem. Recipročna interakcija između epitelnih i mezenhimalnih ćelija indukuje razvoj sabirnog sistema i nefrogenezu. Formiranje bubrega in utero uključuje koordinisanu regulaciju osnovnih razvojnih procesa kao što su mezenhimsko-epitelna tranzicija, migracija, diferencijacija, morfogeneza i regulacija broja ćelija. Mezenhimne ćelije metanefrosnog blastema imaju potencijal da se diferenciraju u epitelne ćelije nefrona i ćelije strome. Kroz složene morfološke promene uspostavlja se trodimenzionalni odnos između nefrona, bubrežne vaskulature i sabirnog sistema, što je neophodno za normalnu strukturu i funkciju bubrega. Regulacija broja ćelija je ključna i održava se ravnotežom između proliferacije i apoptoze u različitim stadijumima razvoja.*

*Fiziološka adaptacija novorođenčeta na vanmaterični život zavisi od mnogih parametara uključujući intaktan morfološki i funkcionalni razvoj bubrega pre i posle rođenja. Ukupan broj nefrona limitiran je njihovim brojem formiranim tokom organogeneze. Nefrogeneza kod ljudi počinje u 9. nedelji gestacije i završava se u periodu između 32. i 36. nedelje. Svaki bubreg sadrži prosečno oko 900 000 do 1 000 000 nefrona, mada postoje značajne individualne varijacije. Broj nefrona može da varira od 200 000 do 2 000 000 u zavisnosti od pola, starosti, rasne i etničke pripadnosti, i telesne težine na rođenju. Individualne varijacije u broju nefrona dokazuju plastičnost bubrega tokom razvoja i značajnu ulogu faktora životne sredine u određivanju njihovog konačnog broja. Svaki neželjeni uticaj pre završetka nefrogeneze može kompromitovati rast i razvoj bubrega i ispoljiti dugotrajne efekte na konačni potencijal organa. Fetalni razvoj se sve češće prepoznaje kao važan modulator rizika za nastanak primarne hipertenzije i hronične bolesti bubrega. Prema hiperfiltracionoj teoriji, broj nefrona inverzno korelira sa veličinom bubrežnih korpuskula. U skladu sa tim, broj nefrona, veličina i distribucija segmenata nefrona u svakom stadijumu razvoja upućuju na adekvatnost nefrogeneze.*

# 1. PREGLED LITERATURE

---

Bubreg ima esencijalnu ulogu u regulaciji zapremine i sastava ekstracelularne tečnosti. Takođe, održava stabilno unutrašnje okruženje izlučivanjem mnogih materija koje su unete ili proizvedene metabolizmom. Ipak, funkcija bubrega u organizmu je višestruka. Bubreg reguliše izlučivanje metaboličkih otpadnih produkata i stranih hemijskih supstanci, ravnotežu vode i elektrolita, osmolarnost telesnih tečnosti i koncentraciju elektrolita, arterijski krvni pritisak, acido-baznu ravnotežu, lučenje, metabolizam i izlučivanje hormona i glikoneogenezu. Svoju ulogu u homeostazi, bubreg ostvaruje kroz procese glomerulske filtracije, tubulske reapsorpcije i sekrecije (Guyton i Hall, 2008). Učinak ovih aktivnosti zavisi od razvoja specifičnih tipova ćelija kako bi se u preciznom vremenskom i prostornom okviru formirao definitivan broj nefrona (Bates i sar., 2016).

## 1.1. ANATOMIJA BUBREGA

Bubreg, paran parenhimatozni organ, je kao i ostali derivati intermedijalnog mezoderma primarno retroperitonealni organ (Hallgrimsson i sar., 2003). Smešten je uz zadnji zid abdomena, sa obe strane kičmenog stuba u visini od 12. torakalnog do 2. lumbalnog pršljena. Na unutrašnjoj ivici bubrega nalazi se hilus, kroz koji prolaze bubrežni krvni i limfni sudovi, nervi i bubrežna karlica. Hilus vodi u centralnu šupljinu ili bubrežni sinus, čiji su zidovi obloženi fibroznom kapsulom i izdignuti brojnim bubrežnim papilama. Bubreg je obavijen sa tri omotača, koji štite njegove osetljive delove. Tanka fibrozna kapsula oblaže spoljašnju površinu bubrežnog tkiva i ulazi u sastav samog bubrega. Oko bubrega i njegovih sudova nalazi se masna kapsula, sloj perirenalne masti ili „bubrežni loj“, koji se preko hilusa nastavlja u bubrežni sinus. Fibrozno vezivno tkivo, kondenzovano u fasciju bubrega, deo je transverzalne fascije abdomena. Ovaj najpovršniji omotač oblaže prednju i zadnju stranu bubrega, nadbubrežnu žlezdu i sudovno-mokraćnu peteljku. Iza zadnjeg lista bubrežne fascije nalazi se masno jastuče koje čini oslonac bubregu. To je sloj pararenalnog masnog tkiva smešten između parijetalnog peritoneuma i transverzalne fascije i deo je endoabdominalnog odnosno

preperitonealnog masnog tkiva (Williams i sar., 1995; Hallgrímsson i sar., B 2003; Čukuranović, 2019).

Bubreg čoveka je multilobularan i multipapilaran, sa oko 12 do 14 lobusa kupastog oblika. Baze lobusa su orijentisane prema bubrežnoj kapsuli, dok njihovi vrhovi konvergiraju ka bubrežnom sinusu. Kortikalna područja susednih lobusa nisu jasno razgraničena, ali su njihovi medularni delovi odvojeni septama kortikalnog tkiva, poznatim kao Bertinijeve bubrežne kolumne. Kortikomedularni spoj je obično jasno vidljiv zbog razlika u građi korteksa i medule. Lobusi su jasno vidljivi na površini bubrega fetusa i novorođenčadi. Kod odraslih, površina bubrega je glatka, mada tragovi lobulacije nekada mogu zaostati. Vrhovi lobusa projektuju se u male čašice kao bubrežne papile, pri čemu u lumen svake čašice zalazi jedna do tri papile. Spajanjem dve do tri male čašice formiraju se velike bubrežne čašice, od kojih nastaje bubrežna karlica i ureter (Williams i sar., 1995; Hallgrímsson i sar., 2003).

## 1.2. GRAĐA BUBREGA

Tkivo bubrega izgrađuju unutrašnja, svetlija medula i spoljašnji, tamniji korteks. Najveći deo medule čine dužna isprugane bubrežne piramide. Ova dužna ispruganost potiče od pravih tubula i krvnih sudova koji se kroz piramide pružaju paralelno jedni sa drugima. Baze piramida su orijentisane prema korteksu, a njihovi vrhovi prema bubrežnom sinusu i odgovarajućoj maloj čašici. Na vrhu svake piramide nalazi se rešetkasto polje sa sitnim papilarnim otvorima, putem kojih se papilarni kanali otvaraju u male čašice (Williams i sar., 1995; Čukuranović, 2019). Broj bubrežnih papila, a time i piramida i lobusa, varira u rasponu od 4 do 18 (Cullen-McEwen i sar., 2016). Sa baza piramida, u korteks, projektuju se medularni zraci, koji nikada ne dosežu do površine korteksa. Prema histološkim karakteristikama, odnosno prisustva pojedinih segmenata bubrežnih tubula, medula se deli na spoljašnju i unutrašnju zonu. Spoljašnja zona obuhvata spoljašnji i unutrašnji isprugani deo.

Bubrežni korteks je sitnogradulisan deo parenhima koji okružuje bubrežne piramide. Periferni deo korteksa izgrađuje tamniji bubrežni lavirint ispresecan svetlijim medularnim zracima. Spoljašnju zonu ili subkapsularni sloj, između vrhova medularnih zraka i fibrozne kapsule, čini *cortex corticis*. Delovi korteksa koji se nalaze između bubrežnih piramida i pružaju prema sinusu označeni su kao Bertinijeve bubrežne kolumne. Korteks je, takođe, podeljen na spoljašnju ili perifernu i unutrašnju ili jukstamedularnu zonu. Unutrašnja zona korteksa odvojena je od medule arkuatnim arterijama i venama koje leže na spoju ove dve

supstance, mada se tanak sloj kortikalnog tkiva nazvan „subkorteks" pojavljuje na medularnoj strani ove zone (Williams i sar., 1995; Čukuranović, 2019).

### **1.2.1. Mikrostruktura bubrega**

Bubreg se sastoji od strome i parenhima. Stromu čine fibrozna kapsula i oskudno intersticijalno tkivo kroz koje prolaze krvni sudovi, limfni sudovi i nervi. Parenhim izgrađuju mnogobrojni, gusto zbijeni mokraćni tubuli koji se razvijaju iz dve različite embrionalne osnove, a povezani su u jedinstveni sistem. Početni deo ovog složenog sistema čine nefroni, mezenhimna komponenta, u kojima se stvara urin. Epitelnu komponentu čini sistem sabirnih tubula i papilarni kanali, koji odvede urin do bubrežnih čašica (Williams i sar., 1995).

### **1.2.2. Nefron**

Nefron, osnovna strukturna i funkcionalna jedinica bubrega, sastoji se od bubrežnog ili Malpigijevog korpuskula, proksimalnog tubula (vijugavi i pravi deo), tankog segmenta, distalnog tubula (pravi i vijugavi deo) i spojnog tubula (Williams i sar., 1995; Madsen i sar., 2008). Nefroni se razvijaju iz mezenhimnih ćelija blastema. Iako dugo nije postojala saglasnost o poreklu spojnog tubula, danas se generalno veruje da i on vodi poreklo iz mezenhimnih ćelija blastema (Neiss, 1982; Minuth, 2020; Minuth, 2021).

Nefroni se, u zavisnosti od dužine Henleove petlje, klasifikuju u dve glavne populacije, kratke ili kortikalne i duge ili jukstamedularne. U odnosu na lokalizaciju njihovih korpuskula u korteksu, pored kortikalnih i jukstamedularnih, opisuje se i populacija intermedijalnih nefrona. Nefroni čiji se glomeruli nalaze u spoljašnjoj ili intermedijalnoj zoni korteksa pokazuju tendenciju da imaju kratke Henleove petlje, koje savijaju u unutrašnjem ispruganom delu spoljašnje zone medule. Nefroni čiji se glomeruli nalaze jukstamedularno imaju duge Henleove petlje, koje se protežu do unutrašnje zone medule. Postoji značajna razlika u proporciji između kratkih nasuprot dugim nefronima (Hallgrimsson i sar., 2003; Madsen i sar., 2008). U ljudskom bubregu, prosečno 15% nefrona ima duge petlje. Kod pacova, koji imaju unilobularan i unipapilaran bubreg, broj dugih nefrona je oko 28% (Hallgrimsson i sar., 2003).

Nefroni se razvijaju *in utero*, ali nastavljaju da sazrevaju i nakon rođenja. Morfološke karakteristike nefrona kod novorođenčadi razlikuju se od nefrona odraslih. Najupadljivija razlika je fizička nerazvijenost tubula, naročito proksimalnog. Druga karakteristika bubrega



novorođenčeta je izražena heterogenost glomerula koji pripadaju različitim slojevima korteksa. Oni najstariji, a time i najzreliji i najveći, nalaze se u jukstamedularnoj zoni korteksa. Ove razlike u dimenzijama između glomerula na različitim nivoima korteksa iščezavaju oko 12-14. meseca života (Mc Crory, 1978). Ipak, maturacija se nastavlja sve do 6. godine kada većina glomerula sazreva, odnosno 12 godine kada svi glomeruli dostižu potpunu zrelost (Williams i sar., 1995).

### **1.2.2.1. Bubrežni korpuskul**

Bubrežni korpuskul je početni deo nefrona, ovalnog oblika, sastavljen od glomerula i Boumanove kapsule. Korpuskuli se nalaze u korteksu, u bubrežnom lavirintu i Bertinijevim stubovima, osim u uzanoj supkapsularnoj zoni korteksa, *cortex corticis*. Njihov prosečan prečnik je oko 200  $\mu\text{m}$  (Venkatachalam i Kritz, 1998) i prosečna zapremina 3 do  $7 \times 10^6 \text{ mm}^3$  (Nyengaard i Bendtsen, 1992; , Hughson i sar., 2003; Keller i sar., 2003). Međutim, broj i veličina bubrežnih korpuskula značajno variraju u zavisnosti od starost i pola, kao i težine na rođenju.

#### **1.2.2.1.1. Glomerul**

Glomerul je mreža vijugavih lobulisanih kapilara, koja se prostire između dva arterijska suda. U glomerularnom kapilarnom klubetu formira se 10 do 20 kapilarnih petlji. Krv u glomerul dovodi aferentna arteriola i grana se na 4-8 primarnih dovodnih ogranaka. Daljim grananjem svakog od njih nastaju glomerularni vaskularni lobulusi sa anastomozama unutar lobulusa. Glomerularni kapilari se zatim spajaju u primarne odvodne ogranke, od kojih nastaje eferentna arteriola. U međukapilarnom prostoru glomerula nalazi se vezivno tkivo, mezangijum (Popović i sar., 1984; Nikolić, 2012). U glomerulu se proizvodi ultrafiltrat selektivnim prolaskom komponenti krvi kroz filtracionu barijeru.

#### **1.2.2.1.2. Filtraciona barijera**

Filtracionu barijeru između krvi i urinarnog prostora gradi fenestrirani endotel glomerularnih kapilara, glomerularna bazalna membrana (GBM) i dijafragme filtracionih pukotina između stopalastih produžetaka podocita. Prosečna površina filtracione barijere po glomerulu iznosi  $0,203 \text{ mm}^2$  (Guasch i Myers, 1994).

Endotelne ćelije glomerularnih kapilara su pljosnate, perforirane brojnim fenestrama promera 70-100 nm koje nisu premošćene dijafragmama (Hallgrimsson i sar., 2003). Površina

endotelnih ćelija pokrivena je glikokaliksom bogatim polianjonima. Većina polianjona je na površini ćelija zbog prisustva sijaloproteina, podokaliksin, koji je imunolokalizovan na luminalnoj površini endotelnih ćelija bubrežnih kapilara i nekoliko drugih organa. Endotelne ćelije formiraju prvu barijeru za prolaz sastojaka krvi iz lumena kapilara u urinarni prostor i doprinose selektivnim svojstvima glomerula kroz svoj negativno naelektrisani glikokaliks. U normalnim uslovima, krvni elementi ne mogu da pristupe subendotelnom prostoru (Madsen i sar., 2008).

Preko fenestri krvna plazma dolazi u direktan kontakt sa GBM, sastavljenom od kondenzovanih bazalnih membrana endotelnih ćelija kapilara i epitelnih ćelija visceralnog lista Boumanove čaure. Debljina GBM je oko 0,33  $\mu\text{m}$  kod ljudi i približno duplo deblja od većine drugih bazalnih membrana u telu, što je delom posledica razvojnog procesa (Williams i sar., 1995). Prema ultrastrukturnim karakteristikama, GBM ima tri sloja različite elektronske gustine. *Lamina densa* je centralni, tamniji, elektronogušći sloj, debljine  $>100$  nm, koji sadrži uglavnom kolagen tip IV. *Lamina rara interna*, na bazi endotela i *lamina rara externa*, na bazi podocita, su periferni, svetliji, manje gusti slojevi, debljine  $\sim 40\text{-}60$  nm, sastavljeni od laminina, fibronektina i heparin-sulfata. Uprkos znatnim razlikama u strukturi, GBM se na vaskularnom polu korpuskula nastavlja bazalnom membranom epitela parijetalnog lista Boumanove kapsule (Abrahamson, 1987). Zahvaljujući svojoj gustini, GBM doprinosi strukturnoj podršci glomerulu i integritetu filtracione barijere nasuprot značajnom hidrostatskom pritisku koji se stvara unutar glomerularnih kapilara (Kriz i sar., 1995).

Spoljašnji sloj filtracione barijere čine visoko specijalizovane ćelije visceralnog lista Boumanove kapsule ili podociti. Podociti su najveće ćelije u glomerulu, zvezdastog oblika, sa dosta mitohondrija, mikrotubula, mikrofilamenata i vezikula različitih tipova, što ukazuje na aktivni metabolizam (Williams i sar., 1995). Podociti imaju krupno telo i ono se retko nalazi u većem kontaktu sa GBM, već je od nje udaljeno 1-2  $\mu\text{m}$ . Od tela se zrakasto odvajaju dugi primarni, a potom mnogobrojni sekundarni i tercijarni produžeci koji se završavaju u vidu stopalastih produžetaka stupajući u direktan kontakt sa *lamina rara externa*. Stopalasti produžeci istih i susednih podocita prepliću se ostavljajući među sobom uzane filtracione pukotine promera 25 nm do 60 nm. Filtracione pukotine su premošćene tankom *slit dijafragmom*, koja se nalazi približno 60 nm od GBM i sadrži centralni filament pričvršćen poprečnim mostovima za susedne stopalaste produžetke. (Madsen i sar., 2008). Sićušne ( $4 \times 14$  nm) pore na dijafragmi (Rodewald i Karnovsky 1974), služe kao barijera za makromolekule sa prečnikom većim od oko 4,0 nm (Venkatachalam i sar., 1998).

Filtraciona barijera deluje kao selektivni filter, dozvoljavajući prolaz vode i malih molekula i jona iz krvi, pod pritiskom, u cirkulaciju. Hemoglobin može proći kroz nju, ali veći molekuli bivaju zadržani (Williams i sar., 1995; Guyton i Hall, 2008). Filtraciona barijera funkcionise na dva načina. Prvo, ona deluje kao fino fibrilarni mehanički filter koji isključuje sve molekule veće od albumina (69 kDa, prečnika 3,6 nm). Drugo, mnoge komponente filtracione barijere, kao što je glikokaliks stopalastih produžetaka podocita, GBM i unutrašnja membrana endotelnih ćelija, mogu da se napune zbog prisustva negativno nalelektrisanih glikoproteina i heparin-sulfata. Ovo odbija negativno naelektrisane molekule kao što su proteini u plazmi i sprečava ih da prođu filtracionu barijeru (Hallgrimsson i sar., 2003).

#### **1.2.2.1.3. Mezangijske ćelije**

Intraglomerularni mezangijum, sastavljen od mezangijalnih ćelija i mezangijskog matriksa, okružuje glomerularne kapilare pružajući im potporu čime se održava strukturni integritet glomerulu nasuprot hidrostatskom pritisku (Nikolić, 2012). Mezangijske ćelije su specijalizovani periciti, sa funkcionalnim karakteristikama glatkomišićnih ćelija. One pokazuju kontraktilna svojstva i veruje se da imaju ulogu u regulaciji glomerulske filtracije. Mezangijske ćelije su nepravilnog oblika, sa gustim jedrom i izduženim citoplazmatskim produžecima. Pored uobičajenog komplementa ćelijskih organela, ove ćelije sadrže širok spektar mikrofilamenata sastavljenih bar delom od aktina,  $\alpha$ -aktina i miozina. Produžeci mezangijskih ćelija premošćuju međuprostor u kapilarnim petljama, dok se snopovi mikrofilamenata povezuju sa GBM što najverovatnije prevenira distenziju kapilara usled povećanja intrakapilarnog hidrostatskog pritiska (Drenckhahn i sar., 1990).

Mezangijske ćelije obavljaju i niz drugih funkcija, kao što je održavanje GBM, fagocitoza, sekrecija biološki aktivnih supstanci (prostaglandini i citokini) i sinteza mezangijskog matriksa (Schlondorff, 1987; Madsen i sar., 2008).

#### **1.2.2.1.4. Boumanova kapsula**

Boumanova kapsula je početni, prošireni deo bubrežnog tubula. To je dvostruki epitelni omotač glomerula izgrađen od spoljašnjeg ili parijetalnog i unutrašnjeg ili visceralnog (jukstakapilarnog) lista. Između dva lista kapsule nalazi se urinarni ili Boumanov prostor (lumen kapsule), čija širina varira u zavisnosti od sekretorne aktivnosti. Krvna plazma iz glomerularnih kapilara filtrira se u ovaj prostor u vidu primarnog urina.

Visceralni list Boumanove kapsule izgrađuje sloj podocita, koji okružuju kapilarne petlje i ulaze u sastav filtracione barijere. Parijetalni list gradi sloj pločastih epitelnih ćelija,

koje naležu na tanko bazalnu membranu. Visina ovih ćelija je od 0,1 do 0,3  $\mu\text{m}$ , osim u predelu jedra gde se povećava na 2,0 do 3,5  $\mu\text{m}$  i taj deo ćelija prominira u lumen kapsule. Na urinarnom polu Boumanove kapsule, pločasti epitel parijetalnog lista naglo prelazi u kubični epitel i ova tranzicija obeležava početak proksimalnog vijugavog tubula (Madsen i sar., 2008).

### **1.2.2.2. Proksimalni tubul**

Proksimalni tubul je prvi segment nefrona u kome se ultrafiltrat modifikuje. U njemu se vrši reapsorpcija svih proteina, aminokiselina, glukoze, većeg dela vode, jona  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ , kao i kalcijuma i fosfata. Osim ovoga, vijugavi deo izlučuje iz krvne plazme u filtrat kreatinin i strane materije tubularnom sekrecijom (Guyton i Hall, 2008). Proksimalni tubul je prečnika oko 40  $\mu\text{m}$  i lumen mu je uzan i nepravilan. Sastoji se iz dva dela, koji se međusobno razlikuju po obliku i delimično po strukturi (Madsen i sar., 2008).

Proksimalni vijugavi tubul, smešten je u kortikalnom lavirintu, izgrađen je od jednog reda relativno visokih, kubičnih ćelija. Ćelije imaju centralno postavljeno okruglo jedro, acidofilnu citoplazmu i brojne mikrovile na apikalnoj površini koji značajno proširuju apsorpcijsku površinu. U citoplazmi apikalnih zona prisutne su svetle i tamne vakuole, koje predstavljaju različite stadijume endocitoze i povezane su sa resorpcijom proteina iz ultrafiltrata. U bazalnom delu citoplazme nalaze se brojne dužno postavljene mitohondrije, što ukazuje na intenzivni aktivni transport i reapsorpciju jona. Bočne površine ćelija snabdevene su brojnim interdigitacijama (Popović i sar., 1984; Hallgrímsson i sar., 2003; Madsen i sar., 2008).

Proksimalni pravi tubul smešten je u medularnim zracima i spoljašnjem ispruganom delu spoljašnje zone medule. Njegov prečnik odgovara prečniku vijugavog dela koga nastavlja i slične je građe, mada su epitelne ćelije nešto niže. Ćelije poseduju brojne mikrovile, u citoplazmi je prisutno manje mitohondrija, dok su interdigitacije dosta retke (Popović i sar., 1984; Madsen i sar., 2008). Pravi deo proksimalnog tubula uključen je u sekreciju organskih kiselina i baza. To je deo nefrona koji često biva oštećen nefrotoksičnim supstancama.

Postoje značajne morfološke varijacije duž proksimalnog tubula. Kod pacova, proksimalni tubul je podeljen u tri morfološki različita segmenta - S1, S2, i S3. Kod ljudi, ovakva segmentacija nije definisana, ali postoji postepeni prelaz od pravog ka vijugavom delu. Morfološke varijacije su u korelaciji sa funkcionalnim karakteristikama pojedinih segmenata proksimalnog tubula (Hallgrímsson i sar., 2003; Madsen i sar., 2008).

### **1.2.2.3. Tanki segment Henleove petlje**

Tanki segment Henleove petlje je anatomska osnova za sistem protivstrujnog multiplikatora protiv protoka koji uspostavlja i održava osmotski gradijent u meduli bubrega (Hallgrimsson i sar., 2003, Madsen i sar., 2008). Njegov nishodni deo je slobodno propustljiv za vodu i jone, dok je ushodni deo mnogo manje propustljiv za vodu, ali je propustljiv za soli (Hallgrimsson i sar., 2003; Guyton i Hall, 2008).

Prelaz proksimalnog tubula u nishodni deo tankog segmenta označava granicu između spoljašnje i unutrašnje isprugane trake spoljašnje zone medule. Nefroni koji potiču iz superfičijalne i intermedijalne zone korteksa obično imaju veoma kratak tanki segment i nedostaje im ushodni deo. Jukstamedularni nefroni imaju jako dugačke tanke segmente koji se protežu do vrha papile. Prelaz ushodnog dela tankog segmenta u distalni tubul čini granicu između unutrašnje i spoljašnje zone medule. (Popović i sar., 1984; Hallgrimsson i sar., 2003; Madsen i sar., 2008). Tanki segment bubrežnog tubula je prečnika oko 30  $\mu\text{m}$ . Njegov descendentni deo je obložen jednoslojnim skvamoznim epitelom koji nema četkasti pokrov od mikrovila, sa dubokim tesnim spojevima i oblastima fuzije membrane (Venkatachalam i sar., 1998). U descendentnom delu jukstamedularnih nefrona, koji je složenije građe, prisutan je prelaz između epitelih ćelija koje se karakterišu prisustvom mikrovila i brojnim interdigitacijama do jednostavnog skvamoznog epitela bez mikrovila, koji se nastavlja unutar ascendentnog dela. Najveća razlika je odsustvo vodenih ili proteinskih kanala (Maunsbach i sar., 1997).

### **1.2.2.4. Distalni tubul**

Distalni tubul ima tri morfološki različita segmenta, pravi deo, makulu denzu i vijugavi deo (Madsen i sar., 2008). Zajedno sa ushodnim delom tankog segmenta, distalni pravi tubul uspostavlja osmotski gradijent u meduli uklanjanjem soli iz lumena dok istovremeno ostaje nepropustan za vodu. Ovaj efekat se dovodi u vezu sa prisustvom Tamm-Horsfall proteina u distalnom tubulu (Hoyer i Seiler; 1979; Kokot i Duława, 2000).

Distalni pravi tubul, prečnika oko 60  $\mu\text{m}$ , ima medularni i kortikalni segment (Madsen i sar., 2008). Njegov epitel izgrađuju kubične ćelije, niže od ćelija u proksimalnom tubulu, čija visina dodatno opada dužinom tubula (Kone i sar., 1984). Zbog nižeg epitela, lumen distalnih tubula je uočljiviji. Ćelije imaju svetliju citoplazmu sa brojnim dužno orijentisanim mitohondrijama slično proksimalnom tubulu, ali sadrže veoma izražene granule u matriksu. Prisutne su invaginacije bazalne membrane, koje se često protežu sve do luminalne površine

ćelija. Bočne površine snabdevene su brojnim interdigitacijama i imaju razvijene čvrste spojeve i dezmozome. Mikrovili su retki, kratki i nepravilno raspoređeni (Madsen i sar., 2008). Na mestu na kome se distalni tubul približava vaskularnom polu bubrežnog korpuskula, tubularni epitel se transformiše i formira makulu denzu.

Distalni vijugavi tubul počinje na promenljivom rastojanju od makule denze i smešten je u korteksu. Ovaj deo nefrona je sposoban za uklanjanje preostalog natrijuma i hlorida iz lumena tubula, i ima važnu ulogu u reapsorpciji  $\text{Ca}^{2+}$ . Takođe, može aktivno da luči vodonik i jone kalijuma u lumen tubula (Hallgrimsson i sar., 2003; Guyton i Hall, 2008). Epitelne ćelije su kubične, više nego u distalnom pravom tubulu, sadrže brojne mitohondrije i pokazuju interdigitacije na bočnim površinama, čvrste spojeve i dezmozome. Na apikalnoj površini nalaze se nešto gušće mikrovile nego u pravom delu i veći broj vezikula je prisutan u apikalnoj zoni citoplazme. Ipak, distalni vijugavi tubul nema dobro razvijen četkasti pokrov i endocitni aparat karakterističan za vijugavi deo proksimalnog tubula (Madsen i sar., 2008).

#### **1.2.2.5. Jukstaglomerularni aparat**

Jukstaglomerularni aparat (JGA) je složena mikroskopska struktura na vaskularnom polu Boumanove kapsule, gde deo distalnog tubula dolazi u kontakt sa glomerulom koga nastavlja. Vaskularna komponenta JGA sastoji se od završnog dela aferentne arteriole, početnog dela eferentne arteriole i ekstraglomerularnog mezangijuma. Tubularnu komponentu JGA čini makula denza (Hallgrimsson i sar., 2003; Madsen i sar., 2008; Nikolić, 2012).

Vaskularna komponenta JGA sadrži dva tipa ćelija. Granularne ćelije su modifikovane glatke mišićne ćelije krvnih sudova, sa razvijenim svojstvima sekretorne aktivnosti što uključuje izražen endoplazmatski retikulum i Goldžijev aparat (Madsen i sar., 2008). Prvobitno se smatralo da su ove ćelije izvor renina, a kasnije je u njima dokazano prisustvo i renina i angiotenzina II (Hallgrimsson i sar., 2003). Agranularne ćelije su glavna komponenta ekstraglomerularnog mezangijuma. Ekstraglomerularne mezangijalne ćelije poseduju dugačke, tanke citoplazmatske produžetke koji su ugrađeni u materijal bazalne membrane i u kontaktu su sa arteriolama i makulom denzom. Gap spojevi su opisani između različitih ćelija vaskularne komponente JGA, kao i između ekstraglomerularnih i intraglomerularnih mezangijskih ćelija. Ove karakteristike ukazuju da ekstraglomerularni mezangijum služi kao funkcionalna veza između ćelija makule denze, glomerularnih arteriola i intraglomerularnog mezangijuma (Madsen i sar., 2008).

Makula denza je plak niskih cilindričnih tubularnih ćelija sa apikalno orijentisanim jedrom, čija je uloga u regulaciji krvnog pritiska (Williams i sar., 1995). Ćelijama makule denze nedostaje Tamm Horsfall proteina (Hoyer i Seiler, 1979), što ukazuje da ove ćelije mogu biti propustnije za vodu od ćelija debelog ascendentnog kraka Henleove petlje, odnosno pravog distalnog tubula.

Ćelije JGA imaju sinaptičke spojeve sa autonomnim nervnim završecima, uglavnom adrenergičkog, što potvrđuje ulogu ove strukture i simpatičkog nervnog sistema u kontroli lučenja renina (Hallgrimsson i sar., 2003; Madsen i sar., 2008).

#### **1.2.2.6. Spojni tubul**

Epitelne ćelije završnog dela distalnog tubula pokazuju malobrojne invaginacije bazalne membrane i malo mitohondrija formirajući spojni tubul, prelazni segment između nefrona i sabirnog sistema (Williams i sar., 1995). Spojni tubuli superficijalnih nefrona nastavljaju se direktno sabirnim tubulom, dok kod intermedijalnih i jukstamedularnih nefrona formiraju arkade koje se penju kroz korteks i zatim nastavljaju sabirnim tubulom (Kaissling i Kriz, 1979).

Kod zečeva, spojni tubul je jasno definisan segment izgrađen od dva tipa ćelija, ćelija spojnog tubula i interkalatnih ćelija. U većini drugih vrsta, uključujući i ljude, postoji postepeni prelaz od distalnog vijugavog tubula prema kortikalnom sabirnom tubulu, pa spojni tubul nije jasno razgraničen zbog mešanja ćelija iz susednih segmenata (Madsen i sar., 2008).

#### **1.2.3. Sistem sabirnih kanalića**

Sabirni sistem bubrega provodi urin do malih čašica i procesima reapsorpcije i sekrecije doprinosi formiranju definitivnog urina. Sabirni tubuli i papilarni kanali pružaju se od spojnih tubula u korteksu, kroz spoljašnju i unutrašnju zonu medule, do vrhova bubrežnih papila. Nakon postepene tranzicije distalnog vijugavog tubula u spojni tubul, nastaju lučni sabirni tubuli u kortikalnom lavirintu i pravi sabirni tubuli u medularnim zracima. Njihovim spajanjem u bubrežnim piramidama formiraju se papilarni kanali (Nikolić, 2012; Ćukuranović, 2019). Uporedo, njihova veličina se povećava i prečnik sabirnih kanala na papili iznosi 200-300  $\mu\text{m}$  (Hallgrimsson i sar., 2003). Sabirni tubuli su obloženi kubičnim epitelom koji se prema papilarnim kanalima transformiše u visok cilindrični epitel (Nikolić, 2012). Epitel sadrži dva tipa ćelija, glavne (svetle) i interkalatne (tamne) ćelije.

Glavne ćelije su brojnije, imaju obilnu citoplazmu sa relativno malo organela. Na apikalnoj površini nalazi se po jedna cilija i samo nekoliko kratkih mikroresica. Prisutne su invaginacije bazalne membrane, bočne površine ćelija ne pokazuju interdigitacije već su ćelije međusobno povezane pomoću čvrstih spojeva i dezmozoma. Glavne ćelije su specijalizovane za transport vode i reaguju na vazopresin aktiviranjem akvaporin 2 vodenih kanala na apikalnoj površini (Hallgrímsson i sar., 2003).

Interkalatne ćelije su manje zastupljene, imaju elektron-gustu citoplazmu, brojne mitohondrije, razvijeniji Goldži kompleks i glatki endoplazmatski retikulum. Za razliku od glavnih ćelija, apikalna citoplazma je vezikularna i pokazuje razvijene tubulovezikularne strukture. Kao i kod glavnih ćelija, bazalna površina pokazuje umerene invaginacije i bočne površine su bez interdigitacije. Zbog veće morfološke i funkcionalne heterogenosti, interkalatne ćelije se dele na dva podtipa. Podtip A ima veću apikalnu površinu i specijalizovan je za izlučivanje jona vodonika u lumen sabirnog tubula. Podtip B poseduje manju apikalnu površinu i vezikule. Ove ćelije su specijalizovane za izlučivanje bikarbonata (Hallgrímsson i sar., 2003). Interkalatne ćelije imaju važnu ulogu u regulaciji acidobazne ravnoteže.

Proporcija i morfologija različitih tipova ćelija varira duž sabirnog sistema. U kortikalnim sabirnim tubulima, glavne ćelije čine oko dve trećine ćelijske populacije. Preostalu trećinu skoro jednako čine interkalatne ćelije tipa A i B. Duž sabirnih kanala, broj interkalatnih ćelija se smanjuje od korteksa ka papili i proporcionalna zastupljenost interkalatnih ćelija tipa A se povećava. U sabirnim kanalima unutrašnje medule, interkalatne ćelije čine samo 10% ćelijske populacije i sve su podtipa A (Madsen i sar., 1994).

#### **1.2.4. Intersticijum**

Intersticijum ispunjava uzane prostore između nefrona, sabirnih kanala, krvnih sudova, limfatika i živaca. Ima ga veoma malo u adultnom bubregu i skoro je neupadljiv. Ipak, njegova zapremina je veća u meduli nego u korteksu. Intersticijum izgrađuju intersticijumske ćelije i ekstracelularni matriks, sastavljen od sulfatisanih i nesulfatisanih glikozaminoglikana, kao i male količine kolagena tipa I i tipa III. On sadrži i mali broj fibroblasta, ćelija nalik limfocitima, i dendritične ćelije (Grupp i Müller, 1999).

Fibroblasti su najbrojnije intersticijumske ćelije. Oni su u bubregu povezani spojevima i pričvršćeni za tubule i krvne sudove. Fibroblasti imaju ulogu u održavanju ekstracelularnog matriksa i, veruje se, centralnu ulogu u intersticijalnoj fibrozi (Kaissling i sar., 1996). Kortikalna intersticijalna fibroza je odlika mnogih bolesti bubrega i pokazala se kao nezavistan



negativan prognostički faktor. Fibroblasti bubrega imaju endokrinu funkciju. Kortikalni fibroblasti učestvuju u sintezi eritropoetina, a medularni fibroblasti su uključeni u regulaciju vode i elektrolitnu homeostazu (Grupp i Müller, 1999).

Intersticijske dendritične ćelije su najbrojnije u peritubularnom prostoru spoljašnje trake medule (Kaissling i sar., 1996). Makrofagi su nađeni u vezivnom tkivu bubrežne kapsule i zidovima karlice. Limfociti su retki u zdravom bubregu, ali su često prisutni u mnogim bolestima bubrega (Hallgrimsson i sar., 2003).

### **1.2.5. Vaskularizacija bubrega**

Bubreg dobija krv preko bubrežne arterije, parne grane abdominalne aorte. Zbog uspijanja bubrega, arterije bubrega nastaju iz sve viših segmenata abdominalne aorte, dok niže nestaju. Bubrežna arterija je najkranijalnija grana koja vaskularizuje bubreg u njegovom definitivnom položaju. U oko 30% populacije, kao posledica razvojnog procesa, može postojati jedna ili više akcesornih bubrežnih arterija koje se rađaju iz aorte (Williams i sar., 1995). Protok krvi kroz bubrege mlade odrasle osobe iznosi 22 % minutnog volumena srca ili 1100 ml/min, zbog čega je kalibar bubrežne arterije dosta veliki u odnosu na organ (Guyton i Hall JE 2008). Na svom putu prema hilusu, bubrežna arterija daje donju suprarenalnu arteriju, uretralne i kapsularne grane. U hilusu bubrega, arterija se deli na prednju i zadnju granu koje ulaze u bubrežni sinus i daju segmentne grane (Venkatachalam i sar., 1998). Grane segmentnih arterija su lobarne, obični po jedna za svaku bubrežnu piramidu. Daljim grananjem svake lobarne arterije formiraju se dve do tri interlobarne grane (Williams i sar., 1995).

Vene dreniraju krv iz bubrega, uglavnom prate obrazac arterijskog sistema, ali nisu raspoređene segmentno. Brojne interlobarne vene napuštaju parenhim i u sinusu formiraju bubrežnu venu, koja kroz hilus napušta bubreg i uliva se u donju šuplju venu (Hallgrimsson i sar., 2003).

#### **1.2.5.1. Mikrovaskulatura**

Krv ulazi u parenhim bubrega putem interlobarnih arterija, tercijarnih grana bubrežne arterije. Interlobarne arterije probijaju zid bubrežne duplje između vrhova Malpigijevih bubrežnih piramida, penju se kroz Bertinijeve bubrežne stubove, dajući postepeno bočne grane od kojih nastaju aferentne arteriole za glomerule ovog dela korteksa. U nivou kortikomedularnog spoja, interlobarne arterije se dihotomo granaju i nastavljaju duž baza bubrežnih

piramida kao arterije arkuate. Od njihovih gornjih, konveksnih strana odvajaju se ushodne interlobularne arterije namenjene korteksu. Sa njihovih donjih, konkavnih strana odvajaju se nishodne prave arteriole namenjene meduli (Williams i sar., 1995; Čukuranović, 2019).

Interlobularne arterije pružaju se radijalno kroz kortikalni lavirint i na svom putu daju aferentne arteriole. Aferentna arteriola ulazi u bubrežni korpuskul na vaskularnom polu Boumanove kapsule i grana se u klube glomerularnih kapilara. Ponovnim spajanjem glomerularnih kapilara nastaje eferentna arteriola, portalni sud koji odvodi krv u peritubularnu kapilarnu mrežu širom korteksa i medule (Williams i sar., 1995; Hallgrimsson i sar., 2003; Čukuranović, 2019). Kapilarni pritisak glomerula, a samim tim i stopa glomerularne filtracije, u velikoj meri je regulisana nezavisnom vazokonstrukcijom i širenjem aferentne i eferentne arteriole (Hallgrimsson i sar., 2003).

Nakon što napusti bubrežni korpuskul, dalji tok eferentne arteriole zavisi od tipa nefrona kome pripada. Iz većine kortikalnih glomerula, osim malog broja onih koji su smešteni u intermedijalnoj zoni korteksa i jukstamedularnih nefrona, izlazi kratka eferentna arteriola koja se grana i obrazuje peritubularni kapilarni splet korteksa oko proksimalnih i distalnih vijugavih tubula. U kortikalnoj cirkulaciji, uglavnom, postoje tako dva seta kapilara, glomerularni i peritubularni, koji su povezani eferentnom arteriolom. Sa venskog kraja peritubularnog kapilarnog spleta, konvergiraju tanke venule, spajaju se i ulivaju u interlobularne vene. Interlobularne vene nastaju ispod fibrozne čaure od malih stelatnih vena koje prikupljaju krv iz najpovršnijeg dela korteksa, silaze prema kortikomedularnom spoju i ulivaju se u arkuatne vene. Arkuatne vene prate arkuatne arterije duž baza bubrežnih piramida i ulivaju se u interlobarne vene. Interlobarne vene silaze kroz bubrežne stubove prema bubrežnom sinusu.

Vaskularizacija medule u najvećoj meri potiče od eferentnih arteriola jukstamedularnih glomerula i malobrojnih glomerula koji se nalaze nešto površnije, kao i grana arkuatnih i interlobarnih arterija. Eferentne arteriole koje silaze prema meduli su relativno dugi i široki sudovi i svaka se deli na 12 do 25 pravih arteriola. Ovi sudovi se spuštaju do različitih dubina medule sve do vrhova bubrežnih piramida, dajući bočne grane za izdužene peritubularne kapilarne spletove medule oko Henleovih petlji i sabirnih tubula. Venski krajevi kapilara konvergiraju i spajaju se u prave venule, koje se penju prema kortikomedularnom spoju i dreniraju u arkuatne ili interlobarne vene. Suštinska karakteristika *vasa recta* je da su ovi sudovi, posebno u spoljašnjoj zoni medule, grupisani u vaskularne snopove koji su u bliskom odnosu sa Henleovim petljama i sabirnim tubulima. Kako ovi snopovi konvergiraju centralno prema vrhu piramide, od njih se na sukcesivnim nivoima odvajaju pojedinačni krvni sudovi koji završavaju u susednim kapilarnim spletovima. Ovaj blizak odnos nishodnih i ushodnih

spletova *vasa recta* i susjednih tubula predstavlja strukturnu osnovu za protivstrujnu razmenu i fenomen multiplikatora, koji su odgovorni za proces koncentrovanja urina (Williams i sar., 1995).

### **1.2.6. Limfatici bubrega**

Intersticijalna tečnost se drenira putem tri limfne mreže, intrarenalne, subkapsularne i perirenalne (Williams i sar., 1995). Intrarenalni limfatici nalaze se u periarterijskom rastresitom vezivnom tkivu i čine gustu mrežu u korteksu između vijugavih tubula (Bell i sar., 1968; Kriz i Dieterich, 1970). Oni najverovatnije počinju kao limfni kapilari oko interlobularnih arterija i dreniraju se u limfne sudove duž kortikomedularnog spoja oko arkuatnih arterija. Lučni limfatici se odводе u interlobarne limfatike, a zatim u hilarna limfna stabla (Kriz and Dieterich 1970). Limfa se drenira iz bubrega putem četiri do pet sabirnih limfnih stabala koja prolaze kroz hilus, prate bubrežnu venu i ulivaju se u lateralne aortične limfne noduse.

Slabije razvijena mreža limfnih sudova nalazi se unutar same bubrežne čaure i neposredno ispod nje. Limfatici iz bubrežne kapsule dreniraju se u subkapsularnu mrežu koja leži pored interlobularnih arterija. Subkapsularni limfatici najverovatnije obezbeđuju kontinuitet između intrarenalnih limfnih sudova unutar korteksa i kapsularnih limfnih sudova. Sabirna limfna stabla iz subkapsularne mreže ulivaju se u intrarenalne limfne sudove nakon njihovog prolaska kroz hilus. Mreža limfatika raspoređena u perirenalnom masnom i vezivnom tkivu povezana je sa mrežom subkapsularnih limfatika i drenira se direktno u lateralne aortične limfne noduse (Williams i sar., 1995).

### **1.2.7. Inervacija bubrega**

Bubreg je inervisan eferentnim vlaknima celijačnog plexusa, kao i vlaknima koja potiču iz velikog splahnjičnog nerva, intermezenteričnog plexusa i gornjeg hipogastričnog plexusa (Madsen i sar., 2008). Studije na pacovima su dokazale da ova vlakna potiču iz Th8 - L2 segmenta kičmene moždine i dolaze do bubrežnog spleta preko splahnjičnih nerava i sinapsi u bubrežnim ganglionima unutar bubrežnog spleta (Hallgrimsson i sar., 2003). Postganglijska simpatička vlakna prate arterijske sudove kroz ceo korteks i spoljašnju ispruganu traku spoljašnje zone medule. Vlakna bubrežnog spleta su uglavnom vazomotorna i inervišu krvne sudove, ali i tubule, posebno kortikalne. Adrenergička nervna vlakna leže pored glatko-mišićnih ćelija arkuatnih arterija, interlobularnih arterija i aferentnih arteriola. Vlakna iz

spleta oko arkuatnih arterija, koja inervišu eferentne arteriole jukstamedularnih glomerula i *vasa recta* imaju ulogu u regulaciji protoka krvi kroz korteks i medulu bubrega bez uticaja na glomerularnu cirkulaciju (Williams i sar., 1995, Čukuranović, 2019).

Viscerosenzitivna vlakna prate simpatički put do Th10 - 12 segmenata kičmene moždine. Kod ljudi, bol iz bubrega prenosi se na bočnu regiju abdomena, unutar dermatoma spinalnih nerava koji potiču iz ovih segmenata. Postojanje i funkcija parasimpatičke inervacije u bubregu nisu dovoljno poznate. Smatra se da bubreg ne prima parasimpatička vlakna, ali da ona inervišu početni deo urinarnih puteva i gornji deo uretera. Ipak, postoje dokazi da senzitivna vlakna iz bubrega mogu putovati duž parasimpatičkih nerava u vagusni nerv (Hallgrimsson i sar., 2003).

### **1.3. ORGANOGENEZA BUBREGA**

Organogeneza je proces obrazovanja organa tokom ontogenetskog razvića jedinke. Tokom razvoja, ćelije proliferišu, podležu apoptozi, migriraju, diferenciraju se, i stupaju u međusobne odnose da bi formirale tkiva i organe. Ovi različiti aspekti ćelijskog ponašanja kontrolisani su genima u prostoru i tokom vremena. Pre gastrulacije, ni jedan deo embriona ne može se smatrati zasebnim organom. Kod kičmenjaka, početne promene oblika koje označavaju početak organogeneze odigravaju se pri obrazovanju centralnog nervnog sistema. Kod ljudi, organogeneza počinje u 3. nedelji embrionalnog razvoja početnim formiranjem centralnog nervnog i kardiovaskularnog sistema. Urogenitalni sistem predstavlja poslednji organski sistem koji se razvija.

Razvoj bubrega prolazi kroz tri morfološka stadijuma, pronefros, mezonefros i metanefros, koji se smenjuju i delom vremenski preklapaju. Pronefros i mezonefros su prolazni organi, ali njihovo postojanje je neophodno za razvoj permanentnog bubrega. Sva tri bubrežna sistema razvijaju se iz intermedijalnog intraembrionalnog mezoderma koji leži između somita (paraksijalnog mezoderma) i lateralne mezodermne ploče, i pruža se celom dužinom embriona. Intermedijalni mezoderm gubi vezu sa somitima i formira uzdužno postavljen urogenitalni nabor, sastavljen iz nefrogenog niza i gonadnog nabora, čijom diferencijacijom nastaju epitelne strukture urinarnog i genitalnog sistema. Nefrogeni niz segmentiše u cefalo-kaudalnom smeru i formira cervikalne, torakalne, lumbalne i sakralne segmente (nefrotome). Ova segmentacija je jasno izražena u kranijalnom delu, jedva primetna u srednjem, a u kaudalnom delu ne postoji. Za sve tri forme bubrežnog razvoja zajednička je pojava bubrežnih

tubula nastalih od segmentiranog ili nesegmentiranog dela nefrogenog niza (Kostić, 1955; Nikolić, 2010).

Pronefrosni začeci javljaju se u cervikalnom regionu embriona čoveka krajem 3. nedelje gestacije (21-22. dan). Ipak, on se ne razvija u potpunosti i nije funkcionalan. Sastoji se od nekoliko cervikalnih nefrotoma koji se diferentuju u kratke, neuobličene, poprečno postavljene vezikule ili pronefrosne tubule. Regresija pronefrosnih tubula počinje veoma brzo. Kranijalni tubuli iščezavaju pre nego što su se stvorili kaudalni. Krajem 4. nedelje pronefros kod čoveka potpuno nestaje. Kako pronefros podleže regresiji, mezonefros počinje da se razvija kao drugi ekskretorni organ. Mezonefros je složeniji, sadrži većinu tipova ćelija uočenih i u metanefrosu i pokazuje slične faze diferencijacije nefrona. Njegovu filtracionu jedinicu čini glomerul koji je direktno povezan sa tubulom, na kome se diferenciraju samo proksimalni i distalni segment. Kranijalni tubuli su povezani sa mezonefrosnim kanalom (Wolff-ov kanal), dok se kaudalni nikada ne spajaju sa Wolff-ovim kanalom. Ekskretorna funkcija mezonefrosa kod čoveka je ograničena. Ipak, mezonefros funkcioniše kao "privremeni bubreg" približno četiri nedelje, dostigavši najviši nivo razvoja oko 33. dana gestacije. Prateći razvojni talas, kranijalni nefroni degenerišu pre nego što su se formirali kaudalni. Istovremeno iz kaudalnog dela Wolff-ovog kanala izrasta ureterni pupoljak koji započinje svoju invaziju u metanefrosni blastem, što vodi razvoju metanefrosa. Nekoliko narednih nedelja, od 5. do 9. nedelje gestacije, mezonefros i metanefros koegzistiraju u embrionu čoveka (Kostić, 1955; Popović, 1988; Nikolić, 2010). Kao i pronefros, mezonefros podleže apoptozi i degeneraciji, dok se istovremeno razvija metanefros (Pole i sar., 2002)

#### 1.4. RAZVOJ PERMANENTNOG BUBREGA

Metanefros ili permanentni bubreg razvija se iz dve različite ćelijske loze koje se diferentuju u nefrone i sabirni sistem. Recipročna induktivna interakcija između ureternog pupoljka i metanefrosnog blastema je centralni proces bubrežnog razvoja. Ureterni pupoljak urasta u metanefrosni mezenhim i podleže rastu i grananju, uspostavljajući radijalnu strukturu bubrega. Signali sa vrha ureternog pupoljka istovremeno indukuju konverziju mezenhima u epitel i formiranje nefrona (Reidy i Rosenblum, 2009; Costantini, 2012; Blake i Rosenblum 2014; Rosenblum i sar., 2017).

Formiranje bubrega *in utero* podrazumeva koordinisanu regulaciju osnovnih razvojnih procesa, kao što su mezenhimsko-epitelna tranzicija, migracija, diferencijacija, morfogeneza i regulacija broja ćelija, koji su čvrsto povezani i regulisani vremenski i prostorno. Tokom

razvoja, mezenhimne ćelije imaju potencijal da se diferenciraju u epitelne ćelije nefrona, ćelije strome i intersticijalne fibroblaste. Procesom diferencijacije prekusorne ćelije ili tkiva menjaju se morfološki i fiziološki da bi postale specijalizovane za obavljanje određene funkcije. Morfogeneza opisuje proces tokom koga ćelije ili tkiva stiču trodimenzionalni obrazac. Ona je posebno značajna u bubregu, kao trodimenzionalni odnos između sabirnog sistema, nefrona i vaskulature, što je ključno za normalnu strukturu i funkciju bubrega. Regulacija ćelijskog broja u različitim stadijumima razvoja je presudna i održava se finim balansom između novih ćelija stvorenih proliferacijom i starih izgubljenih apoptozom. Štaviše, proliferacija i apoptoza blisko su povezane unutar određene ćelijske populacije i njihova ravnoteža definitivno određuje broj ćelija u bubregu (Bates i sar., 2016). Prethodna istraživanja su pokazala da promene u okruženju, kao što je izmenjena ishrana majke, izazivaju pojačanu apoptozu praćenu smanjenjem broja nefrona i hipoplazijom bubrega (Woolf i Welham 2002). Izloženost alkoholu tokom trudnoće može smanjiti ekspresiju markera proliferacije Ki-67 i izazvati disregulaciju antiapoptotskih (Bcl-2) i proapoptotskih (Bax) markera u bubregu ploda (Akison i sar., 2020). Fizički inzult, kao što je opstrukcija uretera, dovodi do abnormalnog obrasca ćelijske proliferacije i apoptoze praćene disregulacijom ekspresije Bcl-2 i Bax u fetalnom bubregu (Liapis i sar., 2000).

Tokom razvojnog procesa, bubreg raste usled povećanja broja i veličine glomerula, kao i dužine bubrežnih tubula i sabirnih kanala. U početnim stadijumima razvoja, povećava se broj epitelnih ćelija unutar bubrežnih korpuskula i tubula. Nakon toga, postoji i fiziološko povećanje veličine ćelija (Shankland i Wolf, 2000). Dakle, veličina bubrega zavisi od broja ćelija, veličine pojedinačnih ćelija i ukupne mase (Conlon i Raff, 1999). Veoma usporen ćelijski „turnover“ postoji u adultnom bubregu u normalnim fiziološkim okolnostima (Pabst i Sterzel, 1983). Ipak, broj i veličina ćelija može se promeniti nakon različitih oblika oštećenja organa usled proliferacije, hipertrofije ili apoptoze, za koje se veruje da su povezane na nivou ćelijskog ciklusa (Shankland, 1997).

#### 1.4.1. Proliferacija

Proliferacija je jedan od ključnih faktora koja reguliše razvoj. Formiranje kompletnog organizma iz jedne oplodjene jajne ćelije zahteva generisanje velikog broja ćelija (Ruijtenberg i van den Heuvel, 2016). Rani razvoj karakteriše brza proliferacija embrionalnih ćelija, koje se diferenciraju i proizvode mnoštvo specijalizovanih tipova ćelija inkorporiranih u tkiva i organe višecelijskih organizama (Cooper, 2000). Progenitorne ćelije ureternog pupoljka i

metanefrosnog mezenhima proliferišu i diferenciraju se u više od 25 različitih tipova ćelija adultnog bubrega (Al-Awqati i Oliver, 2002). Proliferacija, povećanje broja ćelija zahvaljujući njihovoj intenzivnoj deobi, odvija se mitozom i regulisana je faktorima koji utiču na deobu ćelija, diferencijaciju, fenotipsku modulaciju i apoptozu (Nikolić, 2010). Prelazak iz jedne faze ćelijskog ciklusa u drugu je koordinisan, sekvencijalan i sinhronizovan proces koji se odvija vremenski precizno i definisanim redosledom kako bi ćelijska mašinerija obezbedila replikaciju DNK samo jednom u svakom ćelijskom ciklusu pre deobe i replikaciju hromozoma u identične setove u svim ćerkama ćelijama (Graña i Reddy, 1995).

Tokom embriogeneze, ali i regeneracije, proliferacija je tesno povezana sa diferencijacijom. Većina ćelija prati postepen proces specijalizacije, sa završnim korakom, terminalnom diferencijacijom, koju karakteriše potpuno diferencirani postmitotični stadijum. Pravilna prostorna i vremenska proliferacija ćelija neophodna je da bi se postigla odgovarajuća veličina, morfologija i funkcija organa (Takeuchi i Nakamura, 2014). Vremenska sprega između izlaska iz ćelijskog ciklusa i diferencijacije je ključna za normalan rast i razvoj, za homeostazu tkiva i zamenu ćelija kroz život. Kako se ćelije diferenciraju, brzina njihove proliferacije obično opada. Proliferacija i diferencijacija pokazuju izvanrednu inverznu povezanost. Prekursorne ćelije nastavljaju da se dele pre sticanja stadijuma kompletne diferencijacije, dok se terminalna diferencijacija obično poklapa sa prestankom proliferacije i trajnim izlaskom iz ciklusa deobe (Ruijtenberg i van den Heuvel, 2016). Posle rođenja nastavlja se proliferativna aktivnost i rast u mnogim, ali ne svim ćelijskim populacijama. Većina ćelija odraslih jedinki zaustavljena je u  $G_0$  fazi ćelijskog ciklusa. Nekoliko tipova diferenciranih ćelija nikada se ponovo ne dele, ali je većina ipak sposobna da po potrebi proliferiše kako bi se nadomestile ćelije izgubljene kao posledica oštećenja ili ćelijske smrti. Uz to, neke ćelije se kontinuirano dele tokom celog života kako bi zamenile one sa velikom brzinom obnavljanja kod odraslih jedinki (Cooper, 2000). Sa ove tačke gledišta, proliferacija ćelija uključena je u organogenezu, ali i starenje i regenerativnu medicinu.

### 1.4.2. Apoptoza

Uloga apoptoze u normalnoj fiziologiji podjednako je značajna kao i uloga mitoze. Ona pokazuje komplementarnu, ali suprotnu ulogu mitozu i proliferaciji ćelija u održavanju različitih populacija ćelija (Elmore, 2007). Nekoliko studija pokazalo da je ravnoteža između preživljavanja ćelija i apoptoze neophodna za normalnu funkciju progenitora nefrona. Studije *in vitro* koje su koristile izolovani metanefrosni mezenhim pokazale su da progenitori nefrona

prolaze kroz masivnu apoptozu kada se uzgajaju bez induktora (Bard, 2002). Kokultura sa izolovanim ureternim pupoljcima ili heterologim induktorima, kao što je embrionalna kičmena moždina, inhibira apoptozu i pokreće preživljavanje progenitora (Grobstein, 1953; Saxén, 1987).

Apoptoza je način programirane ćelijske smrti i vodi genetski uslovljenoj eliminaciji ćelija. Ovaj proces se javlja tokom razvoja i starenja i kao homeostatski mehanizam za održavanje populacija ćelija u tkivima. Apoptoza se takođe javlja i kao odbrambeni mehanizam tokom imunih reakcija i kod oštećenja ćelija bolešću ili štetnim agensima (Elmore, 2007). Morfološke i biohemijske promene karakteristične za apoptozu su kondenzacija hromatina, disfunkcija mitohondrija, i aktivacija ćelijskih cisteinil-aspartat specifičnih proteaza (kaspaza) i nukleaza sa posledičnom razgradnjom DNK. Finalno, apoptotska tela koja preostaju bivaju odstranjena fagocitozom. Za razliku od nekroze, neregulisanog oblika ćelijske smrti koji je često rezultat akutne traume ćelija (Galluzzi i sar., 2018), apoptoza zahteva unos energije i stoga je aktivan proces. Ona ne uzrokuje proizvodnju medijatora zapaljenja i uopšteno zapaljenjske promene (Singh i sar., 2019).

Različiti fiziološki i patološki stimuli mogu inicirati apoptozu. Stimulusi deluju preko receptora, biohemijskih agenasa ili dovode do oštećenja DNK i ćelijske membrane. Nakon delovanja odgovarajućeg stimulusa nastupa faza odluke koja predstavlja genetski kontrolnu tačku smrti. Posle toga sledi faza egzekucije, koja je odgovorna za morfološke promene u apoptozi. Poslednja faza obuhvata razgradnju DNK ćelije koja umire i fagocitozu.

#### **1.4.2.1. Morfologija apoptoze**

Primenom svetlosne i elektronske mikroskopije identifikovane su različite morfološke promene koje nastaju u apoptozi (Häcker, 2000). Tokom ranog procesa apoptoze, skvrčavanje ćelije i piknoza mogu se videti svetlosnim mikroskopom (Kerr i sar., 1972). Usled skvrčavanja, ćelije su manje, citoplazma je gusta i organele su zbijene. Piknoza je rezultat kondenzacije hromatina i najizraženija je karakteristika apoptoze. Na histološkim preparatima bojenim hematoxilinom i eozinom, apoptoza se može primetiti u pojedinačnim ćelijama ili malim grupama ćelija. Apoptotična ćelija se zapaža kao okrugla ili ovalna masa sa tamnom eozinofilnom citoplazmom i gustim ljubičastim fragmentima jedarnog hromatina. Elektronskom mikroskopijom bolje su definisane subcelularne promene. Rano, tokom faze kondenzacije hromatina, elektrono gust jedarni materijal formira karakteristične periferne agregate ispod jedarne membrane mada mogu da budu prisutna i elektronogusta jedra.



Prostrana izbočenja ćelijske membrane praćena karioreksijom i separacijom fragmenata ćelije u apoptotska tela dešava se tokom procesa nazvanog „pupljenje“. Apoptotska tela se sastoje od citoplazme sa gusto zbijenim organelama sa ili bez jedarnih fragmenata. Integritet organela se i dalje održava i sve to okružuje intaktna ćelijska membrana. Apoptotska tela naknadno bivaju fagocitovana od strane makrofaga, parenhimskih ćelija ili neoplastičnih ćelija i degradirana unutar fagolizozoma. Makrofagi koji fagocituju apoptotične ćelije često se nalaze unutar reaktivnih germinativnih centara limfnih folikula i u korteksu timusa i sadrže komadiće jedarnog debrisa iz apoptotičnih ćelija. U procesu apoptoze ne dolazi do inflamatorne reakcije jer se delovi apoptotičnih ćelija ne oslobađaju u okolno intersticijalno tkivo već ih okolne ćelije brzo fagocituju sprećavajući verovatno na taj naćin sekundarnu nekrozu, i ćelije koje fagocituju ne proizvode antiinflamatorne citokine (Savill, 1997; Kurosaka i sar., 2003).

#### **1.4.2.2. Mehanizmi apoptoze**

Mehanizmi apoptoze su veoma složeni, uključujući energetski zavisnu kaskadu molekularnih događaja. Kod sisara su opisana dva glavna puta apoptoze, spoljašnji ili put receptora smrti i unutrašnji ili mitohondrijalni put. Postoje, međutim, dokazi da su ta dva puta povezana komunikacijom u okviru cepanja proteina Bid - proapoptotskog pripadnika porodice Bcl-2 proteina i da oba rezultiraju aktivacijom izvršnih proteolitićkih enzima - kaspaza. Odnos spoljašnjeg prema unutrašnjem mehanizmu apoptoze u normalnom razvoju bubrega još uvek nije dokazan. Kaspaze imaju proteolitićku aktivnost i sposobne su da cepaju proteine na ostacima asparginske kiseline, iako različite kaspaze pokazuju različite specifićnosti koje uključuju prepoznavanje susednih aminokiselina (Elmore, 2007). Deset glavnih kaspaza je, prema ulogama u signalnim putevima, klasifikovano u pokretaćke kaspaze (kaspaze-2, -8, -9, -10), kaspaze izvršioce (kaspaze-3, -6, -7) i kaspaze koje podstiću upalu (kaspaze-1, -4, -5) (Cohen, 1997; Rai i sar. 2005). Ostale kaspaze koje su identifikovane uključuju kaspazu-11, za koju se navodi da reguliše apoptozu i maturaciju citokina tokom septićkog šoka, kaspaza-12, koja posreduje endoplazmatski-specifićnoj apoptozi i citotoksićnost amiloidom- $\beta$ , kaspaza-13, za koju se pretpostavlja da je goveđi gen i kaspaza-14, koja je visoko ekspimirana u embrionalnim tkivima, ali ne i u tkivima odraslih (Hu i sar., 1998; Nakagawa i sar., 2000; Koenig i sar., 2001; Kang i sar., 2002).

U normalnim ćelijama kaspaze postoje kao neaktivni enzimi, u latentnom obliku (prokaspaze). Kada ćelije prolaze apoptozu, kaspaze se aktiviraju kaskadno. Jednom inicijalno aktivirane kaspaze, ostaju nepovratno posvećene ćelijskoj smrti (Elmore, 2007). Opisane su dve

kaskade koje aktiviraju kaspaze i koje regulišu apoptozu. Jednu kaskadu podstiču receptori smrti na površini ćelija, a drugu promene integriteta mitohondrija.

#### 1.4.2.2.1. Spoljašnji put apoptoze

Spoljašnji signalni put apoptoze iniciran je interakcijom receptora na ćelijskoj membrani i specifičnih liganda. Receptori smrti su članovi superporodice transmembranskih proteina za faktore tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor* - TNF) (Locksley i sar., 2001). Članovi porodice TNF receptora dele slične ekstracelularne domene bogate cisteinom i imaju citoplazmatski domen od oko 80 aminokiselina koji se naziva domen smrti (engl. *death domain* – DD) (Ashkenazi i Dixit, 1998). Domen smrti igra ključnu ulogu u prenošenju signala smrti od površine ćelije do intracelularnih signalnih puteva. Najistaknutiji ligandi i odgovarajući receptori smrti uključuju FasL/FasR, TNF $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 i Apo2L/DR5 (Elmore, 2007).

Redosled događaja koji definišu spoljašnji put apoptoze najčešće je predstavljen modelima FasL/FasR i TNF $\alpha$ /TNFR1. Nakon što receptor smrti veže svoj ligand angažuju se citoplazmatski adaptorski proteini i prokaspaze-8. Vezivanje Fas liganda za Fas receptor dovodi do vezivanja adaptorskog proteina FADD (engl. *Fas - associated death domain*), dok vezivanje TNF liganda za TNF receptor dovodi do vezivanja adaptorskog proteina TRADD (engl. *TNFR1 - associated death domen protein*) uz angažovanje FADD i RIP (Hsu i sar., 1995; Wajant, 2002). FADD se zatim povezuje sa prokaspazom-8 dimerizacijom domena efektor smrti. Na ovoj tački, formira se signalni kompleks koji indukuje smrt (engl. *death-inducing signaling complex* - DISC), što dovodi do autokatalitičkog cepanja prokaspaze-8 (Kischkel i sar., 1995). Kada se aktivira kaspaza-8, pokreće se faza izvršenja apoptoze. Aktivirana kaspaza-8 izaziva zatim kaskadnu aktivaciju izvršnih kaspaza, kaspaze 3 i 7, da bi započela razgradnja ćelije i neizbežna apoptoza. Apoptoza posredovana receptorima smrti može biti inhibirana proteinom c-FLIP koji će se vezati za FADD i kaspazu-8, što ih čini neefikasnim (Kataoka i sar., 1998; Scaffidi i sar., 1999).

#### 1.4.2.2.2. Unutrašnji put apoptoze

Unutrašnji signalni put apoptoze može biti pokrenuti nizom različitih stimulusa koji proizvode intercelularne signale i događaji su inicirani mitohondrijama. Stimulusi koji pokreću unutrašnji put mogu delovati pozitivno ili negativno. Stimulansi koji deluju na pozitivan način, mada nisu isključivo na to limitirani, uključuju zračenje, toksine, hipoksiju, hipertermiju, virusne infekcije i slobodne radikale. Negativni signali uključuju odsustvo određenih faktora rasta,

hormona i citokina dovodeći do neuspešne supresije programa smrti, čime se pokreće apoptoza. Drugim rečima, dolazi do povlačenja faktora, gubitka apoptotične supresije i naknadne aktivacije apoptoze (Elmore, 2007).

Svi ovi stimulansi izazivaju promene u unutrašnjoj membrani mitohondrija što rezultira u otvaranju tranzicionih pora mitohondrijalne permeabilnosti (engl. *mitochondrial permeability transition pore* - MPT), gubitku mitohondrijalnog transmembranskog potencijala i oslobađanja dve glavne grupe normalno sekvestriranih proapoptotskih proteina iz intermembranskog prostora u citozol (Saelens i sar., 2004). Prva grupa sadrži citohrom c, Smac/DIABLO i serin proteazu HtrA2/Omi (Du i sar., 2000; van Loo i sar., 2002; Garrido i sar., 2006). Ovi proteini aktiviraju kaspaza-zavisni mitohondrijalni put. Citohrom c se vezuje i aktivira Apaf-1 kao i prokaspazu-9, formirajući „apoptozome“ (Chinnaiyan, 1999; Hill i sar., 2004). Grupisanje prokaspaze-9 na ovaj način dovodi do aktivacije kaspaze-9. Inicijator kaspaze-9 uzrokuje dalje aktivaciju egzekucionih kaspaza (kaspaza-3, 6 i 7) koji cepaju vitalne supstrate vodeći ćelijskoj smrti. Smac/DIABLO i HtrA2/Omi kontrolišu apoptozu posredstvom članova porodice proteina inhibitora apoptoze (engl. *inhibitor of apoptosis protein* - IAP) (van Loo i sar., 2002; Schimmer, 2004).

Druga grupa proapoptotskih proteina, indukujući faktor apoptoze (engl. *apoptosis inducing factor* - AIF), endonukleaza G i kaspaza-zavisna endonukleaza (engl. *caspase-activated DNase* - CAD), oslobađaju se iz mitohondrija tokom apoptoze, mada se ovaj kasni događaj javlja nakon što je ćelija počela da umire. Tokom apoptoze, AIF se translocira u jedro gde uzrokuje fragmentaciju DNK i perifernu kondenzaciju hromatina (Jozic i sar., 2001). Endonukleaza G se takođe translocira u jedro gde cepa jedarni hromatin da bi proizveo DNK fragmente (Li i sar., 2001). AIF i endonukleaza G funkcionišu na kaspaza-nezavistan način. CAD se zatim oslobađa iz mitohondrija i translocira u jedro, gde nakon cepanja kaspazom-3, dovodi do fragmentacije DNK sa izraženijom i naprednijom kondenzacijom hromatina (Enari i sar., 1998).

### 1.4.2.3. Porodica Bcl-2 proteina

Proteini porodice B-ćelijskog limfoma 2 (Bcl-2) su regulatori apoptoze, ali imaju i druge funkcije. Proteini ove porodice integrišu različite signale preživljavanja i smrti koji se generišu van i unutar ćelije. Zajedno, oni su regulatori unutrašnjeg ili mitohondrijalnog puta apoptoze. Ovaj put neophodan je za normalan razvoj embriona i prevenciju karcinoma. Bcl-2 porodica proteina kontroliše ključni korak u posvećenosti apoptozi promenom propustljivosti spoljašnje membrane mitohondrija (engl. *mitochondrial outer membrane* - MOM). Međutim, pre nego što

se indukuje apoptoza, Bcl-2 proteini imaju značajnu ulogu u fiziologiji normalne ćelije (Hardwick i Soane, 2013; Gross i Katz, 2017). Neapoptotske uloge ove grupe proteina obuhvataju širok spektar procesa koji uključuju regulaciju mitohondrijalne fiziologije, fiziologije endoplazmatskog retikuluma, jedarne procese, metabolizam cele ćelije i autofagiju. Ove neapoptične uloge su, verovatno, u velikoj meri povezane sa aktivacijom puteva preživljavanja ćelije koji su namenjeni da održe ili povrate opstanak ćelije, ali će u slučaju neuspeha preći u proapoptozni modalitet (Gross i Katz, 2017). Mehanizmi pomoću kojih proteini porodice Bcl-2 regulišu ćelijsku smrt su uglavnom nepoznati, iako se smatra da njihova funkcija zavisi najviše od njihove sposobnosti da regulišu permabilnost membrane mitohondrija, odnosno da moduliraju oslobađanje proteina iz intermembranskog prostora mitohondrija. Proteini porodice Bcl-2 mogu biti antiapoptotski (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG) i proapoptotski (Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik i Blk) (Elmore, 2007). Svaki član ove porodice sadrži jedan ili više Bcl-2 homologih (BH) domena, BH1-BH4. Kod ljudi i miševa, porodica Bcl-2 je podeljena na antiapoptotske multi-domenske proteine (prototipovi: Bcl-2 i Bcl-XL), koji sadrže četiri BH domena (BH1 do BH4), proapoptotske multi-domenske proteine (prototipovi: Bax i Bak), koji sadrže tri BH domena (BH1, BH2 i BH3), i proapoptotske BH3 proteine, koji sadrže samo jedan (BH3) domen (više od desetak članova) (Levine i sar., 2008; Shamas-Din i sar., 2013). Odnos između antiapoptotskih i proapoptotskih proteina igra ulogu u određivanju sudbine ćelije (Ho, 2014). Njihovi nivoi ekspresije se veoma razlikuju u zavisnosti od tipa tkiva, ćelijske loze, razvojnog stadijuma, promena u organizmu u vezi sa uzrastom i bilo kojeg oblika oštećenja tkiva (Singh i sar., 2019).

Članovi porodice Bcl-2 koji sadrže samo BH3 domen prepoznati su kao ključni senzori/posrednici ćelijskog stresa. Njihova aktivacija istovremeno vodi deaktiviranju antiapoptotskih članova porodice Bcl-2 (npr. Bcl-2) i aktiviranju proapoptotskih članova porodice, Bax i Bak, što rezultira oslobađanja citohroma c iz mitohondrija preko promene propustljivosti mitohondrijalne membrane, aktivacijom kaspaze i apoptozom (Gross i Katz, 2017). Aktivacija Bax i Bak na površini mitohondrija dovodi do alosterične promene u ovim proteinima, omogućavajući im da oligomerizuju i formiraju makropore u MOM, uzrokujući njenu permeabilizaciju (engl. *mitochondrial outer membrane permeabilization* - MOMP). MOMP je ključni korak u kome ćelija nepovratno podleže apoptozi (Singh sar., 2019). Međutim, još uvek nije potpuno jasno da li su oba događaja, inhibicija antiapoptotskih i aktivacija proapoptotskih proteina, apsolutno neophodni za izvršenje apoptoze.

### 1.4.3. Razvoj ureternog pupoljka

Ureterni pupoljak nastaje u 5. nedelji gestacije na dorzalnom zidu distalnog kraja Wolffov-og kanala kao solidni agregat epitelnih ćelija koje proliferišu, migriraju i progresivno urastaju u okolni metanefrosni mezenhim (Watanabe i Costantini 2004; Faa i sar., 2012). Kontrolisana arborizacija ureternog pupoljka odvija se jednostavnom i ponovljivom bifurkacijom njegovog terminalnog dela da bi se formirao sabirni sistem, bubrežne čašice, karlica i ureter. Nakon prodiranja u metanefrosni blastem, ureterni pupoljak se proširuje u primarnu bubrežnu karlicu, a zatim račva u strukturu oblika slova T. Prva bifurkacija je pod uglom od oko 180° i njene terminalne grane označavaju polove bubrega. Svako sledeće grananje je pod oštrijim uglom u odnosu na prvo (Saxén, 1987; Davies, 2003). Ureterni pupoljak nastavlja da se grana formirajući oko 15 generacija ogranaka. Najranije generacije njegovih ogranaka se spajaju i formiraju velike i male bubrežne čašice, dok se kasnije generacije ne spajaju da bi formirale sistem sabirnih kanala (Al-Awqati i Goldberg 1998). Proces grananja ureternog pupoljka obuhvata ekspanziju vrha njegovog terminalnog kraja u ampulu, podelu ampule da bi se formirale nove grane, kao i izduživaje novoformiranih grana (Lin i sar., 2003; Watanabe i Costantini 2004). Tokom prvih 9 generacija grananja, svaka grana ureternog pupoljka proširena u ampulu indukuje formiranje nefrona iz okolnog mezenhima u odnosu 1:1. Grananje ureternog pupoljka se završava u periodu od 20. do 22. nedelje gestacije. Naknadno formiranje i maturacija sabirnih tubula nastaje izduživanjem perifernih (kortikalnih) segmenata i remodelovanjem centralnih (medularnih) segmenata (Potter i Osathanondh, 1966). U ovoj fazi, svaka ampula indukuje formiranje 4-7 novih nefrona (Potter i Osathanondh, 1966; Saxén, 1987). Kasnije, nakon približno 15 generacija grananja tokom kojih će stvoriti nekoliko desetina hiljada vrhova, dolazi do eksplozije (naleta) u formiranju nefrona tako da se na istom nivou sabirnog tubula formira nekoliko nefrona i oni se zajedno povezuju u „arkade“. U ovoj fazi razvoja tokom formiranja arkada, sabirni tubuli se mnogo ređe granaju i nastavljaju da rastu kortikalno povezujući nekoliko arkada pre nego što formiraju još jednu granu (Potter i Osathanondh, 1966; Davies, 2003). U kojoj su meri arkade pre deo arhitekture sabirnih tubula nego arhitektura nefrona još uvek nije sigurno. Postoje posredni dokazi zasnovani na ekspresiji proteinskih markera kao što je Tamm Horsfall glikoprotein i PKK2 antigen (Howie i sar., 1993) da su vezujući tubuli izvedeni iz sabirnih kanala, a ne iz delova nefrona. Ipak, sigurni dokazi o poreklu ove ćelijske loze još uvek nisu izvedeni, mada novija istraživanja ukazuju da ćelije spojnih tubula imaju istu embrionalnu osnovu kao i ostale populacije ćelija inkorporirane u nefrone (Minuth, 2020; Minuth, 2021).

Iako se čini da su ćelije ranog ureternog pupoljka jednog tipa, tkivo se ipak podvrgava naknadnoj diferencijaciji u različite tipove specijalizovanih ćelija. Delovi zrelih sabirnih tubula sadrže dominantnu populaciju glavnih ćelija i manju populaciju interkalatnih ćelija. Glavne ćelije poseduju svetlu citoplazmu, centralno postavljeno jedro, nekoliko vrlo kratkih mikroresica, okrugle mitohondrije i jonske pumpe kako bi se omogućila resorpcija  $\text{Na}^+$  i vode i sekrecija  $\text{K}^+$ . Interkalatne ćelije imaju brojne mikroresice, velike i istaknute mitohondrije, i povezane su sa kiselinsko/baznom ravnotežom i nekim aspektima resorpcije. Zona diferencijacije ovih specifičnih tipova ćelija leži na kratkom rastojanju iza ampularnog vrha sabirnog tubula koji se razvija (Aigner i sar., 1995). Dokazano je da je formiranje ureternog pupoljka stimulirano metanefrosnim mezenhimom. U embrionima kojima nedostaje metanefrosni mezenhim, zbog hirurških ili genetskih lezija, ureterni pupoljak se ne formira.

#### **1.4.4. Metanefrosni mezenhim**

Metanefrosni blastem se razvija u blizini distalnog kraja Wolffov-og kanala unutar urogenitalnog nabora. Niz razvojnih događaja na molekularnom nivou programiraju mezenhimne ćelije blastema i usmeravaju ga ka nefrogenezi (determinacija). Nakon determinacije, genetski programirane ćelije blastema reaguju na induktivne signale iz ureternog pupoljka. Metanefrosni blastem je sastavljen od nekoliko hiljada mezenhimskih ćelija koje stvaraju praktično sve strukture bubrežnog parenhima osim sabirnih tubula (Sariola i sar., 2003). Iako su ćelije unutar blastema morfološki slične i ponašaju se sinhrono, studije sa lektinom su otkrile heterogenost njihove rane populacije (Laitinen i sar., 1987; Laitinen i sar., 1988). Iz ovih ćelija razvijaju se podtipovi epitelnih ćelija sekretornih nefrona, jukstaglomerularne, stromalne, glatko mišićne, endotelne i nervne ćelije. Ipak, razvoj bubrega održavaju dve osnovne populacije embrionalnih ćelija, nefrogene, koje daju nefrone, i stromagene, koje učestvuju u razvoju vezivnog tkiva i uglavnom su locirane unutar medule (Sariola i sar., 2003).

Nefrogene ćelije se lako prepoznaju u bubrezima embriona. To su nepolarizovane male ćelije sa oskudnom citoplazmom i izraženim ovalnim jedrom. Nalaze se u vidu tankog pojasa u najperifernijem delu korteksa i čine kompaktnu ćelijsku masu oko završnih grana ureternog pupoljka. Proces formiranja nefrona iz ove populacije ćelija odvija se na periferiji bubrega sve dok i poslednje ćelije blastema ne budu indukovane. Kraj nefrogeneze može biti posledica nesposobnosti nefrogenih ćelija da se dalje dele dovoljno brzo da bi se održale. Ipak, kod ljudi, male grupe mezenhimnih ćelija mogu povremeno da perzistiraju i posle rođe-

nja (Sariola i sar., 2003). Pretpostavlja se da onkogene mutacije ove ćelijske populacije mogu dovesti do abnormalnog rasta i maligne transformacije koja se manifestuje kao Wilms-ov tumor (Pritchard-Jones, 1999; Lee i Haber, 2001).

Stromagene ćelije su krupne ćelije vretenastog oblika sa obilnom citoplazmom i većim jedrom. Ovaj prelazni tip ćelija postaje morfološki prepoznatljiv ubrzo nakon što su indukovani prvi nefroni. Do sredine gestacije, ćelije strome su prisutne u velikom broju, ali skoro potpuno nestaju tokom kasne gestacije kao rezultat apoptoze velikih razmera. Mada su ćelije strome morfološki slične ostalim vrstama embrionalnog mezenhima, one ipak ne eksprimiraju tipične mezenhimske markere kao što je vimentin. Umesto toga, ove ćelije eksprimiraju neuronske molekule kao što su neurofilamenti, p75 neurotrofin receptor i FokB2 (ranije poznat kao moždani faktor-2 (BF-2) (Sariola i sar., 1988; Sainio i sar., 1994; Hatini i sar., 1996). Zbog svojih neuronskih karakteristika i činjenice da se nervne ćelije razvijaju unutar strome sugerisano je da su stromalne ćelije najverovatnije derivati nervnog grebena (Sainio i sar., 1994), mada direktnih dokaza o tome još uvek nema. Druga mogućnost je da stromalne ćelije predstavljaju krajnju tačku razvoja za one ćelije blastema koje nisu indukovane i usmerene ka nefrogenezi. Ipak, sigurno je da stromalne ćelije imaju uticaj na formiranje nefrona (Bard, 1996; Hatini i sar., 1996). Istraživanja su pokazala da bubrežna stroma eksprimira GD3 gangliozid i transkripcioni faktor FoxB2 koji ometaju diferencijaciju nefrona. Eksperimentalne studije su dokazale da miševi sa nedostatkom FoxB2, umesto formiranja normalnih malih epitelizirajućih kondenzata, proizvode nekoliko veoma velikih mezenhimskih agregata koji ne uspevaju da epitelizuju (Hatini i sar., 1996). Stroma, takođe, može da reguliše morfogenezu grananja u sistemu sabirnih tubula. Ipak, nije poznato još uvek koliko je različitih populacija ćelija prisutno u bubrežnoj stromi.

#### **1.4.5. Razvoj nefrona**

Nefrogeneza se odvija kao rezultat recipročne interakcije između terminalnih grana ureternog pupoljka i mezenhimnih progenitornih ćelija. Tokom razvoja, ćelije ampule terminalnih grana ureternog pupoljka i okolnog mezenhima čine specifičnu nišu (Costantini, 2012). Prethodne studije su pokazale da nefrogene niše uključuju četiri glavne populacije progenitornih ćelija, progenitorne ćelije ureternog pupoljka, stromalne, nefrogene i endotelne progenitorne ćelije (Al-Awqati i Oliver, 2002). Mezenhimne progenitorne ćelije raspoređene su topografski. Stromageni progenitori nalaze se blizu unutrašnje strane bubrežne kapsule, dok su nefrogeni progenitori orjentisani prema vrhu ampule sabirnih tubula (O'Brien i sar., 2018).

Prostorna i vremenska interakcija između nekoliko različitih ćelijskih populacija značajna je za uspešnu indukciju, održavanje i diferencijaciju svih tipova ćelija u bubregu.

Nakon što ureterni pupoljak penetrira metanefrosni blastem, započinje serija njegovog dihotomog grananja (Osathanondh i Potter, 1963; Al-Awqati i Goldberg, 1998). Vrh ampule sabirnog tubula i nefrogene mezenhimne ćelije koje ga okružuju označavaju mesto ćelijske komunikacije, gde se odvija indukcija i početno formiranje nefrona (Rosenblum i sar., 2017). Nefrogene progenitorne mezenhimne ćelije imaju kapacitet da se samoobnavljaju i diferenciraju da bi održale sopstvenu populaciju progenitora i stvorile sve tipove epitelnih ćelija nefrona. Nefrogeni progenitori podležu mezenhimno-epitelnoj tranziciji i kroz seriju morfoloških promena formiraju pretubularne agregate, bubrežne vezikule, zapeta- i S-oblikovana telašca i definitivno zrele nefrone. Svaki nefron je sastavljen od više od 20 različitih tipova ćelija uključujući podocyte, ćelije proksimalnog tubula, Henleove petlje, distalnog tubula i spojnog tubula (Al-Awqati i Oliver, 2002).

Nefrogena zona i komponente sadržane u njoj su biološka postavka ćelija koje treba da uspostave i sačuvaju matičnost, morfogenezu grananja sistema sabirnih tubula, indukciju i početno formiranje nefrona (Combes i sar., 2015; Da Sacco i sar., 2017). Epitelne progenitorne ćelije integrisane u vrh ampule sabirnog tubula i  $GDFN^+/Six2^+/Cited1^+$  nefrogene mezenhimalne progenitorne ćelije čine centralnu nefrogenu nišu (Combes i sar., 2015). Prisustvo morfogena kao što su GDNF, Wnts, FGFs i BMPs započinje razviće nefrona (Lindström i sar., 2018). Početni odgovor mezenhimnih progenitornih ćelija na induktivne signale iz ureternog pupoljka je njihova kondenzacija. Nefrogene progenitorne ćelije su najkondenzovanije oko vrha ampule sabirnog tubula gde formiraju polumesečasto telašce sastavljeno od nekoliko koncentričnih slojeva ćelija ili metanefrosnu kapu. Za razliku od mezenhimnih ćelija blastema koje su nepravilnog oblika, ćelije metanefrosne kape su pravilno izdužene i orijentisane svojom dužom osom prema površini ampule (Osathanondh i Potter, 1966a; Potter i Osathanondh, 1966). Ćelije metanefrosne kape predstavljaju jedinstvenu populaciju nefrogenih progenitornih ćelija koje su programirane da se diferenciraju u epitelne ćelije nefrona, ali imaju i sposobnost samoobnavljanja (Kopan i sar., 2014). Za uspešnu indukciju nefrona epitelnim ćelijama ampule sabirnog tubula neophodno je da se ove ćelije nađu u bliskom odnosu sa  $GDNF^+/Six2^+/Cited1^+$  mezenhimnim progenitornim ćelijama da bi se odvijala recipročna razmena morfogena (Oxburgh i sar., 2017).

Nakon uspešnog delovanja morfogena, grupa indukovanih mezenhimskih progenitornih ćelija izdvaja se iz metanefrosne kape i formira pretubularni agregat. Pretubularni agregat migrira duž ampule sabirnog tubula i lokalizuje se u uglu između ampule i stabla



rastućeg tubula. Ukoliko je grananje ampule simetrično dihotomo, ampula se širi bilateralno i mezenhimni kondenzati se formiraju na svakoj strani ampule. Ukoliko je grananje asimetrično dihotomo, ampula se širi unilateralno i samo jedna grupa ćelija se izdvaja iz metanefrosne kape (Osathanondh i Potter, 1966a). Pojava neujednačenih međuprostora između ćelija pretubularnog agregata i promena oblika ćelija ukazuje na početak polarizacije (Minuth, 2020). Razvićem epitela i pojavom malog lumena u pretubularnom agregatu nastaje bubrežna vezikula (Osathanondh i Potter, 1966a; Potter i Osathanondh, 1966; Saxén, 1987; Minuth, 2020, Faa i sar., 2012). Bubrežna vezikula se prepoznaje kao ovalna masa sastavljena od jednog sloja cilindričnih epitelnih ćelija koje su radialno raspoređene oko centralne šupljine. Na svom proksimalnom polu ona i početno ostvaruje kontakt sa unutrašnjim slojem nefrogenih progenitornih ćelija. U zavisnosti od ravni preseka, lumen je vidljiv bliže proksimalnom (orjentisanom prema meduli) polu vezikule. Detaljna analiza je pokazala da bazalna lamina uglavnom prekriva njen proksimalni pol (Minuth, 2019). Ćelije vezikule se umnožavaju i znatno povećanje njihovog broja, koje je posebno izraženo u predelu proksimalnog pola, uslovljava izduživanje prethodno sferične vezikule. Proksimalni deo vezikule se blago širi, formira se žleb na donjoj trećini njene spoljašnje površine i nastaje zapeta-oblik. Na zapeta-oblikovanom telašcu razlikuju se dva segmenta, proksimalni i distalni. Umnožavanjem epitelnih ćelija proksimalnog segmenta, žleb se produbljuje i formira se duboka srpasta pukotina. Ćelije vezikule ispod ove pukotine raspoređene su u dva sloja, donji i gornji. Donji sloj čine ćelije koje postaju pljosnate, dok se gornji sloj sastoji od kubičnih ćelija. Ovi slojevi razdvojeni su jedan od drugog uzanom šupljinom koja je deo originalnog lumena vezikule. Krvni elementi i mezenhimne ćelije iz okolne strome migriraju u pukotinu između proksimalnog i distalnog segmenta zapeta-oblikovanog telašca i pukotina postaje vaskularna. Istovremeno, formiranjem drugog žleba na gornjoj trećini unutrašnje strane telašca nastaje S-oblik. Na S-oblikovanom telašcu prepoznaju se tri segmenta, proksimalni, srednji i distalni. Svaki od segmenata se diferencira u jedan ili više delova nefrona. U proksimalnom segmentu ćelije donjeg sloja formiraju parijetalni list Bowman-ove kapsule, a one u gornjem sloju diferenciraju se u visceralni epitel ili podocyte. Prostor između ova dva epitelnog sloja predstavlja Bowmanov ili urinarni prostor. Srednji segment se diferencira u proksimalni tubul, Henleovu petlju i makulu denzu, dok distalni segment formira distalni tubul. Čim se razvije S-oblik, uspostavlja se komunikacija između lumena vezikule i sabirnog tubula (Osathanondh i Potter, 1966a; Osathanondh i Potter, 1966b; Potter i Osathanondh, 1966; Saxén, 1987; Faa i sar., 2012). S-oblikovano telašce je poslednji tranzitni stadijum nefrona koji se formira u nefrogonoj zoni. Nakon toga, nefroni ulaze u fazu sazrevanja praćenu razvojem glomerularnih kapila-

ra, diferencijacijom tubularnih segmenata i funkcionalnom diferencijacijom. Usled radialne ekspanzije nefrogene zone prema bubrežnoj čauri, dalje oblikovanje i sazrevanje nefrona odvija se u dubljim delovima bubrežnog tkiva (Minuth, 2020; Minuth, 2021).

Sledeći stadijumi razvoja nefrona karakterišu se rapidnim razvojem glomerularnog kapilarnog sistema. Iz prvobitnog suda razvijaju se brojne kapilarne petlje. Rast i razvoj unutar ograničenog prostora distalnog segmenta odgovoran je za vijugavost i višestruko savijanje novoformiranih kapilara. Uporedo sa razvojem glomerula postepeno se sužava vaskularni pol korpuskula. Iznad glomerula, srednji i proksimalni tubularni segment postepeno su izdužuju. Kada je sužavanje u nivou vaskularnog pola kompletno, tipične morfološke karakteristike nefrona postaju prepoznatljive. Bubrežni korpuskul ima oblik sfere, sa glomerulom koga okružuje Bowmanova kapsula i bubrežnim tubulima koji zauzimaju sve veći deo okolnog intersticijuma (Osathanondh i Potter, 1966a; Potter i Osathanondh, 1966; Faa i sar., 2012).

Strukturno i funkcionalno razvijeni krvni sudovi bubrega omogućavaju protok 22% minutnog volumena srca. Bubrežni krvotok ima dve kapilarne mreže, glomerulske i peritubularne kapilare (Guyton i Hall, 2008). Tri tipa ćelija, endotelne ćelije, mezangijalne ćelije i visceralne epitelne ćelije ili podociti mogu da se identifikuju u kapilarnim petljama glomerula (Naruse i sar, 2000; Takano i sar., 2007). Razvoj glomerula je dinamičan proces i obuhvata ekspanziju prvobitne kapilarne komponente u plexus koji se sastoji od šest do osam individualnih petlji i migracijom podocita koji se raspoređuju oko kapilara (Kreidberg, 2003). Normalna funkcija glomerula zavisi od strukturnog i funkcionalnog integriteta filtracione barijere (Quaggin i Kreidberg, 2008). Razvoj krvnih sudova bubrega je složen proces koji se odvija kroz vaskulogenezu, angiogenezu ili učešćem oba procesa (Abrahamson i sar, 1998). Vaskulogeneza podrazumeva diferencijaciju endotelnih ćelija iz angioblasta prisutnih u meta-nefrosnom mezenhimu, dok angiogeneza podrazumeva rast iz postojećih kapilara unutar ili oko bubrega u razvoju. Krvni sudovi formirani vaskulogenezom ili angiogenezom remodeluju se i sazrevaju prema specifičnim zahtevima tkiva (Risau, 1998). Najverovatnije oba procesa doprinose razvoju krvnih sudova bubrega, mada je angiogeneza posebno značajna u formiranju glomerularnih kapilara.

U nefrogenoj zoni, okolna mezenhimalna stroma je dobro vaskularizovana i prožeta brojnim kapilarima sa cirkulišućim eritroblastima i eritrocitima. Kapilar iz vaskularne mreže blastema migrira u vaskularnu pukotinu u stadijumu zapeta-oblikovanog telašca (Osathanondh i Potter, 1966a; Abrahamson, 1991). Pored krvnog suda, u vaskularnoj pukotini prisutno je nekoliko mezenhimalnih ćelija koje se raspoređuju oko kapilara i zauzimaju tipičnu lokalizaciju mezangijalnih ćelija. Diferencijacija glomerulskih kapilara je intenzivna u hemisferi

donjeg kraka S-oblikovanog telašca. U primitivnim kapilarima endotelne ćelije su krupne, visoke, skoro kubičnog oblika. Tokom diferencijacije, endotelne ćelije se poravnavaju, razmiču da bi formirale fenestre, a najverovatnije dolazi i do gubitka pojedinih ćelija. U centralnom delu kapilara formira se lumen. Istovremeno, endotelne ćelije počinju da stvaraju svoju bazalnu membranu (Ballermann, 2005). Transmisiona elektronska mikroskopija je pokazala postojanje dva tanka elektron gusta sloja, jedan ispod epitela i drugi ispod endotela, koje razdvaja sloj male elektronske gustine. Segmentnom fuzijom bazalne membrane koju je stvorio endotel i bazalne membrane podocita diferentuje se glomerulska bazalna membrana (Abrahamson, 1991). U stadijumu zrelog glomerula lumen kapilara je širok i ispunjen eritrocitima, dok je endotel tanak i fenestrovani. Glomerulska bazalna membrana je u najvećem delu kapilara diferentovana i sastoji se od centralnog sloja velike elektronske gustine, i dva sloja manje elektronske, jednog ispod epitela i drugog ispod endotela (Abrahamson, 1987).

Tokom razvoja nefrona, podociti gube svoj prvobitni oblik i od kubičnih epitelnih ćelija postaju zvezdasti podociti. U S-stadijumu, primitivni kubični podociti pokazuju čvrste apikalne spojeve. Baze ovih ćelija su široke i orijentisane prema vaskularnoj pukotini gde naležu na bazalnu membranu, dok su im vrhovi orijentisani prema uskom Boumanovom prostoru koji predstavlja deo lumena vezikule. Dok okružuju kapilarne petlje u razvoju, ove ćelije se međusobno razmiču počevši od vrhova, kompleks apikalnih spojeva se progresivno gubi, dok ih brojni lateralni spojevi povezuju na različitim nivoima. Razmicanje ćelija visceralnog epitela prati promena njihovog oblika od poligonalnog do loptastog i povećanje broja mikroresica na ćelijskoj površini. Citoplazmatski produžeci počinju da se razvijaju na bazi ćelija. Od tela podocita polaze debeli, primarni produžeci i granaju se u sekundarne, a zatim tercijalne ili stopalaste produžetke. Stopalasti produžeci se međusobno prepliću, podvlače jedni ispod drugog i ispod tela susednih ćelija. Sazrevanjem kapilara, broj stopalastih produžetaka se povećava, a tela ćelija se poravnavaju. Kod diferentovanih kapilara spoljašnji, epitelni sloj filtracione barijere grade zvezdasti podociti sa razgranatim stopalastim produžecima koji se na površini kapilara međusobno prepliću. Između stopalastih produžetaka je filtraciona pukotina koju premošćuje tanka slit dijafragma (Abrahamson, 1987; Hyodo i sar., 1997; Dakovic Bjelakovic i sar., 2018).

## **1.5. NEFROGENEZA I BROJ NEFRONA**

Procesi razvoja i sazrevanja organa odvijaju se kontinuirano tokom prenatalnog i postnatalnog perioda. Rast i razvoj *in utero* regulisan je uticajem nutritivnih i endokrinih

faktora na genetski potencijal ploda, uz prisustvo regulacionih mehanizama koji uključuje faktore rasta. Nakon rođenja, na rast utiču faktori životne sredine i genetska pozadina (Puddu i sar., 2009; Nikolić, 2010). Formiranje nefrona indukovano je granama ureternog pupoljka. Signalizacija epitelom ureternog pupoljka neophodna je za preživljavanje, proliferaciju i diferencijaciju ćelija metanefrosnog mezenhima (Yu i sar., 2002). Tokom perioda učestalog grananja ureternog pupoljka, vrh svake terminalne grane indukuje nefrogene progenitorne ćelije da formiraju nefrone (Luyckx i Brenner, 2010). Vaskularizacija bubrega odvija se sinhronizovano sa razvojem njegovih epitelnih komponenti. Svaki glomerul uspostavlja svoju sopstvenu cirkulaciju da bi omogućio pravilno funkcionisanje nefrona (Sequeira Lopez i Gomez, 2011). Prvi nefroni se, kod ljudi, formiraju u 9. nedelji gestacije i oni ubrzo postaju funkcionalni. Tokom kasnog drugog i u trećem trimestru, u periodu između 18. i 32. nedelje gestacije, broj nefrona se eksponencijalno povećava (Potter i Osathanondh, 1966; Hinchliffe i sar., 1991). Nefroni koji se prvi razvijaju nalaze se u meduli, a oni koji nastaju kasnije tokom razvoja smešteni su u perifernim područjima korteksa. Shodno tome, sazrevanje nefrona počinje u jukstamedularnoj zoni i napreduje prema bubrežnoj kapsuli. Aktivno stvaranje novih nefrona završava se u periodu između 32. i 36. nedelje gestacije (Hinchliffe i sar., 1991; Rosenblum i sar., 2017; Ryan i sar., 2018). Nakon formiranja punog komplementa, novi nefroni se ne formiraju (Potter i Osathanondh, 1966; Rodríguez i sar., 2004). Bubrezi donešenog novorođenčeta imaju konačan broj nefrona i svaki nefron sam za sebe može stvarati urin. Nakon rođenja, bubreg nastavlja da raste usled maturacije i rasta postojećih nefrona. Anatomska nezrelost nefrona smeštenih površnije u korteksu potpuno iščezava u sledećih nekoliko nedelja (Saxén, 1987; Hinchliffe i sar., 1991; Rosenblum i sar., 2017).

Ukupan broj nefrona limitiran je njihovim brojem formiranim tokom organogeneze. Kod ljudi, svaki bubreg sadrži prosečno oko 900 000 do 1 000 000 nefrona, mada postoje značajne individualne varijacije (Bertram i sar., 2011). Broj nefrona može da varira od 200 000 do 2 000 000 (Rosenblum i sar., 2017; Crump i sar., 2019). Varijacije broja nefrona značajno zavise od pola (prosečno 17% više kod muškaraca), starosti (inverzno), rase i telesne težine na rođenju (Hoy i sar., 2005). Broj nefrona/glomerula povećava se za oko 257 000 po kilogram težine do rođenja (Hughson i sar., 2003). Kod odraslih, broj nefrona/glomerula se smanjuje za približno 4500 po bubregu godišnje u periodu od 18 do 70 godina, mada su rezultati studije Nyengaard i Bendtsen (1992) pokazali da je ovaj fenomen uglavnom uočljiv nakon 60 godina. U tom periodu broj funkcionalnih jedinica postepeno opada za 6000-6500 svake godine (Denic i sar., 2017). Odgovarajuće smanjenje stope glomerularne filtracije je proporcionalno malo zbog kompenzatornih mehanizama hiperfiltracije u preostalim nefronima. U bubrežima

odraslih sisara, epitelne ćelije mreže bubrežnih tubula i ćelije glomerularnih struktura podležu stalnom samoobnavljanju kao posledica starenja ili povreda (Vogetseder, i sar., 2005; Humphreys i sar., 2008). Ipak, zreo bubreg sisara ne može da kompenzuje gubitak nefrona nastao usled oštećenja formiranjem novih generacija nefrona. Individualne varijacije u broju nefrona dokazuju plastičnost bubrega tokom razvoja i značajnu ulogu faktora životne sredine u određivanju njihovog konačnog broja. Svaki neželjeni uticaj koji se dogodi pre završetka nefrogeneze može kompromitovati rast i razvoj bubrega i uzrokovati dugotrajne efekte na njegov konačni potencijal. Barker i Osmond (1988) kao i Brenner i saradnici (1988) su ukazali da suboptimalni embrionalni/fetalni razvoj koji rezultira malom telesnom težinom (engl. *low birth weight* - LBW) može imati za posledicu smanjen broj nefrona, bolesti bubrega i hipertenziju kasnije u životu.

### 1.5.1. Fetalno programiranje i razvojna plastičnost

Postoje brojni dokazi u različitim oblastima istraživanja da neki događaji uključeni u normalan razvoj mogu imati dugoročne efekte i imati posledice na zdravlje kod odraslih (Ramírez-Vélez, 2012). Metaboličke promene *in utero* utiču na uspostavljanje strukturnih i fizioloških karakteristika koje programiraju zdravlje u kasnijim periodima života (Hall, 2007; Bloomfield, 2011; Vieau, 2011). Iako je rast fetusa genetski uslovljen, studije na životinjama i ljudima su ukazale da on može biti limitiran uticajem sredine, posebno hranljivim materijama i kiseonikom primljenim od majke. Dr David Barker je sa grupom saradnika, od sredine osamdesetih godina prošlog veka, nizom istraživanja pokazali da se osobe rođene sa LBW zbog restrikcije rasta *in utero* (engl. *intrauterine growth restriction* - IUGR) biološki razlikuju od osoba rođenih sa normalnom telesnom težinom i imaju veći rizik za pojavu bolesti kasnije u životu (Barker i Osmond, 1988; Barker i sar., 1989; Barker i sar., 1993). Time je postavljena hipoteza o fetalnom programiranju bolesti koja je kasnijim istraživanjima redefinisana u hipotezu o razvojnom poreklu zdravlja i bolesti (engl. *developmental origins of health and disease* – DOHaD). Spektar hroničnih bolesti kod odraslih povezanih sa fetalnim i ranim post-natalnim razvojem uključuju kardiovaskularne bolesti (Ingelfinger i Nuyt, 2012; Yeung i sar., 2014), bolesti bubrega (Luyckx i sar., 2013; Dorey i sar., 2014), gojaznost (Desai i sar., 2013; Yajnik, 2014) i dijabetes (Thompson i Regnault, 2011; Simmons, 2012). Prema DOHaD hipotezi, promene u ishrani fetusa i endokrini status vode razvojnim adaptacijama koje trajno menjaju strukturu, fiziologiju i metabolizam, što predisponira pojavu bolesti i/ili poremećaja kod odraslih osoba (Godfrey i Barker, 2001). U uslovima ugroženosti fetusa dolazi do

adaptacije sa ciljem da se ograniči rast, podstakne razvoj vitalnih organa i ubrza maturacija. Krv se usmerava iz donjih delova tela i ekstremiteta prema mozgu, na račun razvoja bubrega, jetre, pankreasa, mišića i kostiju. Sekretija hormona koji utiču na rast (inzulin i IGF) i senzitivnost na ove hormone se ograničavaju, dok hipotalamo-pituitarno-adrenalna (HPA) osovina pojačava aktivnost da bi se ubrzala maturacija. Fetus, na osnovu signala koje dobija od majke, pokazuje "štedljiv fenotip" čija je posledica asimetrična restrikcija rasta sa konačnim rezultatom da je porođajna težina više smanjena nego dužina i nalazi se ispod 10 procenata korigovano prema trajanju gestacije (engl. *small for gestational age* – SGA) (Hales i Barker, 2001).

U suštini, programiranje se odnosi na proces održavanja ili uticaja stimulusa/inzulata u ključnoj tački razvoja. Privremena izloženost stimulusu/inzultu u kritičnom ili senzitivnom periodu razvoja dovodi do trajnih poremećaja u strukturi i funkciji organa. Kritični ili senzitivni periodi su specifični za pojedine sisteme ili organe i za većinu su vezani za razvoj *in utero*. Programiranjem se ograničava opseg postnatalne adaptacije i na taj način organizam postaje vulnerabilan i sklon pojavi bolesti (Crews i sar., 2007).

Zajedničko za sva živa bića, pa tako i za ljude, je plastičnost u ranim periodima života i ona je oblikovana uticajem sredine. Razvojna plastičnost se može definisati kao fenomen u kojem se jedan genotip može izraziti u više različitih fenotipova u odgovoru na različite signale iz okoline za vreme kritičnog perioda razvoja, specifično za svaki organ ili sistem. Tokom embrionalnog i fetalnog perioda, tkiva i organi prolaze kroz kritične periode, koji se najčešće poklapaju sa periodima brze deobe i diferencijacije ćelija (Godfrey i Barker, 2001; Kwon i Kim, 2017). Tokom ovih perioda sistem je plastičan i osetljiv na okolinu, nakon čega sledi gubitak plastičnosti i dolazi do fiksne funkcionalne sposobnosti (Barker, 2007). Biološka osnova programiranja i plastičnosti čine epigenetske regulacije gena, bez promene sekvencije nukleotida DNK.

Epigenetske modifikacije su doživotne, sa potencijalom prenosa u sledeću generaciju pomoću trajnog epigenetskog imprintinga (Gluckman i sar., 2008). Najpoznatiji mehanizmi kojima se reguliše ekspresija gena su metilacija DNK, modifikacija histona i aktivnost mikroRNK. Ovi procesi su od značaja za embriogenezu, rast i diferencijaciju ćelija.

Obrazac epigenetske modifikacije prenošen se mitozom specifično za svaki tip ćelija i tkiva i od značaja je za održavanje profila ekspresije gena u organizmu. Epigenetske modifikacije mogu nastati u interakciji sa faktorima okoline, posebno u toku prenatalnog i ranog postnatalnog perioda razvoja (Dressler, 2008; Patel i Dressler, 2013).

### 1.5.2. Klinički korelati nefrogeneze i broja nefrona

Prenatalno programiranje kontroliše nefrogenezu tokom faza razvoja. Broj nefrona raste proporcionalno sa porastom gestacijske starosti (GS) i telesnom težinom (Hughson i sar., 2003). U normalnim uslovima, nefrogeneza se odvija *in utero* sa platom koji dostiže do 36. nedelje gestacije (Hoy i sar., 2005). Iako se broj nefrona kod donesene novorođenčadi ne povećava nakon rođenja, bubreg usklađuje svoj kapacitet filtracije sa potrebama tela povećanjem veličine glomerula kroz hipertrofiju (Mañalich i sar., 2000; Hoy i sar., 2003; Hughson i sar., 2003; Hoy i sar., 2005; Hoy i sar., 2006). Kao takav, prosečan volumen glomerula inverzno kolerira sa brojem glomerula i direktno sa telesnom težinom (Hoy i sar., 2008). Kod novorođenčadi rođenih pre termina (pre navršene 37. nedelje gestacije) nefrogeneza je još uvek u toku. Intrauterini stres, kao i prenatalni ili postnatalni poremećaji kod nedonoščadi mogu imati štetni efekat na razvojno programiranje u periodu kada je bubreg posebno vulnerabilan i dovesti do smanjenja broja nefrona (Puddu i sar., 2009; Black i sar., 2013).

Prethodne studije su pokazale da je urođeni ili stečeni deficit nefrona potencijalni faktor rizika za razvoj hipertenzije i hronične bolesti bubrega (engl. *chronic kidney disease* - CKD) koje se mogu javiti kasnije u životu (Brenner i sar., 1988; Keller i sar., 2003; Luyckx i Brenner, 2005; Hoy i sar., 2006; Taal i Brenner, 2006; Bertram i sar., 2011; Schreuder, 2012). U osnovi smanjenog broja nefrona leže genetska predispozicija i faktori spoljašnje sredine. Uticaj životne sredine na genetski potencijal kontroliše prenatalno programiranje bubrega. Stalna interakcija između gena i okruženja od prenatalnog do odraslog životnog doba doprinosi da se razvije bubrežni potencijal kod svakog pojedinca. Signalni molekuli i transkripcijski faktori imaju značaja u razvoju segmenata nefrona i funkcionalnoj diferencijaciji (El-Dahr i sar., 2008; Zaffanello i sar., 2008). Fetalni razvoj se sve češće prepoznaje kao važan modulator rizika za nastanak progresivne bolesti bubrega kod odraslih (Luyckx i Brenner, 2015). Nadovezujući se na rane epidemiološke studije koje su dovele u vezu LBW i kardiovaskularne bolesti kod odraslih, Brenner i saradnici (1988) su izneli hipotezu da redukcija broja nefrona može povećati rizik od nastanka hipertenzije i CKD kod odraslih. Autori su pretpostavili da bi smanjenje filtracione površine glomerula povećalo rizik za nastanak sistemske hipertenzije i CKD zbog manjeg kapaciteta za izlučivanje soli (Na<sup>+</sup>) i smanjenog kapaciteta da se kompenzuje oštećenje organa. Bubreg sa smanjenim komplementom nefrona verovatno prolazi kroz određeni stepen hiperfiltracije, posebno ako su telesna težina i funkcionalni zahtevi visoki, i može pokazati suptilne strukturne abnormalnosti što bi sve zajedno moglo smanjiti otpornost ili povećati podložnost na dodatni stres ili oštećenja. Prolongirana

hiperfiltracija vodi ubrzanoj glomerularnoj hipertrofiji i intraglomerularnoj hipertenziji i posledično glomerularnoj sklerozi i eventualnom gubitku glomerula, što dalje može produbiti bolest i dovesti do krajnjeg stadijuma bubrežne bolesti (Brenner i sar., 1996). Keller i saradnici (2003) su dokazali da je kod hipertenzivnih pacijenata broj nefrona/glomerula smanjen za 46,6% i prosečan volumen glomerula povećan za 133% u poređenju sa kontrolnom grupom. Konačno, smanjen broj nefrona na rođenju ne mora nužno dovesti do hipertenzije. Urođena varijabilnost u broju nefrona i samim tim filtracionoj površini može objasniti zašto samo neke, ali ne sve, osobe izložene potencijalno štetnim stimulusima eventualno manifestuju hroničnu nefropatiju (Brenner i sar., 1988). Zimanyi i saradnici (2009) su analizirali odnos između broja i zapremine glomerula kod pripadnika populacija sa manjim i većim rizikom za nastanak hipertenzije i CKD. Činilo se da veći broj nefrona u populaciji sa manjim rizikom štiti od glomerularne hipertrofije i heterogenosti njihove zapremine kod belaca. Heterogenost zapremina pojedinih glomerula u odnosu na broj nefrona povezanih sa kompenzatornom hipertrofijom u populaciji sa manjim rizikom sugerše da protektivni tretman, koji smanjuje glomerularnu perfuziju, može minimizirati oštećenje najvećih glomerula i pomoći u očuvanju mnogih nefrona čije glomerularne zapremine ostaju relativno male. Takav tretman treba da bude takođe efikasan i kod pojedinaca sa većim rizikom za nastanak bolesti bubrega, ali u zavisnosti od prirode dodatnih stimulusa koji mogu da izazovu hiperperfuziju i hipertrofiju glomerula, tretman treba dopuniti i drugim intervencijama.

Osim grubih procena broja nefrona primenom nuklearne magnetne rezonance ili biopsije bubrega, tačan broj nefrona može da se odredi samo *post mortem*. Prethodne studije dovele su u vezu gestacijsku starost i porođajnu težinu sa povećanjem sistolnog krvnog pritiska (Lawlor i sar., 2007; Cooper i sar., 2009). LBW, restrikcija rasta i prevremeno rođenje su najdosledniji klinički korelati za smanjen broj nefrona i povezani su sa povećanim rizikom od hipertenzije, proteinurije i CKD kasnije u životu. Manalich i saradnici (2000) su u svojoj humanoj autopsijskoj studiji pokazali da novorođenčad rođena u terminu sa LBW imaju 20% manji broj nefrona i veću prosečnu zapreminu glomerula u odnosu na novorođenčad čije je telesnom težinom bila odgovarajuća za datu GS (engl. *appropriate for gestational age* - AGA). Hodgins i saradnici (2009) su u nalazima biopsija šest odraslih osoba rođenih prevremeno i sa LBW opisali konzistentne nalaze fokalne i segmentne glomeruloskleroze, povezane sa glomerulomegalijom, najverovatnije na osnovu kongenitalno smanjenog broja nefrona. U skladu sa tim, LBW je povezana sa lošijim ishodom kod pacijenata sa nefrotskim sindromom, membranskom nefropatijom, IgA nefropatijom, minimalnim promenama i dijabetičnom nefropatijom (Duncan i sar., 1994; Zidar i sar., 1998; Na i sar., 2002; Teeninga i



sar., 2008). Abnormalna adaptacija glomerula i veća oštećenja bubrega dokazana su eksperimentalno kod životinja sa LBW i smanjenim brojem nefrona (Jones i sar., 2006; Plank i sar., 2010). Mogući ćelijski i molekularni mehanizmi koji povezuju LBW i CKD kod odraslih uključuju neravnotežu između proliferacije ćelija i apoptoze, ubrzano starenje i mitohondrijalnu disfunkciju (Hershkovitz i sar., 2007).

Iako IUGR predstavlja heterogenu grupu sa različitom etiologijom, istraživanja su pokazala da IUGR dovodi do smanjenja zapremine bubrega i broja nefrona (Hoogenboom i sar., 2021). Painter i saradnici (2005) su koristeći Holandsku kohortu gladi pokazali da je period organogeneze u kome nastaje IUGR povezan sa profilom rizika kasnije u životu. Što se tiče efekata tajminga IUGR na broj nefrona, studije na animalnim modelima su pokazale da kod pacova IUGR u nastao ranoj trudnoći izazvan jednostranom ligacijom umbilikalnih krvnih sudova, dovodi do smanjenja broja nefrona za 21% (Schreuder i sar., 2005). U modelu ovce gde su majke tokom trudnoće unosile ograničenu količinu hranljivih materija, zabeležen je 11% manji broj nefrona (Gilbert i sar., 2007). Sa druge strane, IUGR nastao u kasnoj gestaciji dovodi do veće redukcije nefrona. Animalni model koji je koristio pacove podvrgnute ograničenju hranljivih materija u poslednjoj fazi nefrogeneze pokazao je smanjenje od 35% (Schreuder i sar., 2006). Stepenu redukcije broja nefrona najverovatnije ne zavisi samo od perioda u kome nastaje IUGR, već i etiologije, mada nema dovoljno dokaza koji bi podržali ovu pretpostavku. U pokušaju da utvrde da li IUGR ima uticaja na smanjenje broja nefrona i veličinu kortikalnih i medularnih segmenata nefrona, Hinchliffe i saradnici (1992) su primenom stereoloških metoda ispitivali broj nefrona kod mrtvorodenih i novorođenčadi koja su umrla tokom prve godine života u grupi sa asimetričnim IUGR i AGA (kontrola) i pokazali da IUGR može imati snažan uticaj na razvoj bubrega. U obe starosne grupe, kod novorođenčadi sa IUGR, zabeležen je značajno manji broj nefrona. Istovremeno, zapremine segmenata nefrona nisu se razlikovale između grupa. Osim toga, kod novorođenčadi sa IUGR umrlih tokom prve godine života broj nefrona nije porastao u poređenju sa mrtvorodenim, što dokazuje nedostatak postnatalne kompenzacije u broju nefrona.

Epidemiološke studije su ukazale na vezu između prevremenog rođenja i izmenjene funkcije bubrega u detinjstvu i odraslom dobu (Rodríguez-Soriano i sar., 2005). Stepenu redukcije broja nefrona kod prevremeno rođenih zavisi od GS u kojoj se trudnoća završava. Pre perioda u kome se nefrogeneza kompletira (32 - 36. nedelja gestacije), broj nefrona je u jakoj korelaciji sa GS. Prevremeno rođenje i prestanak nefrogeneze pre tog perioda, rezultira smanjenim komplementom nefrona i povećanim rizikom od razvoja progresivne bolesti bubrega kasnije tokom života (Hoogenboom i sar., 2021). Stelloh i saradnici (2012) potvrdili

su ovu korelaciju na modelu prevremeno rođenih miševa. Rezultati istraživanja na humanim bubrezima potvrdili su da je broj zrelih nefrona, meren radijalnim glomerularnim brojem, značajno smanjen u slučajevima prevremenog rođenja u odnosu na decu rođenu u terminu (Rodríguez i sar., 2004; Faa i sar., 2010). Aktivna glomerulogeneza, koju karakteriše nefrogena zona i prisustvo nezrelih S-oblika nefrona u subkapsularnom delu bubrežnog korteksa, dokazana je postnatalno kod prevremeno rođenih beba (Rodríguez i sar., 2004; Faa i sar., 2010; Sutherland i sar., 2011). Iako se nefrogena nastavlja nakon prevremenog rođenja i broj generacija nefrona raste, ona nije dovoljna da kompenzuje oligonefroniju prisutnu na rođenju (Rodríguez i sar., 2004; Faa i sar., 2010). Rodríguez i saradnici (2004) i Sutherland i saradnici (2011) našli su povećanu prosečnu areu bubrežnih korpuskula u prvim mesecima nakon rođenja kao morfološku indikaciju glomerularne hiperfiltracije u uslovima smanjenog broja nefrona. Brennan i Kandasamy (2017) su u pokušaju da vizualizuju nefrogenozu nakon prevremenog rođenja merili ultrazvučno ukupnu debljinu bubrežnog parenhima i utvrdili da se kod nedonoščadi (< 32 nedelje gestacije) debljina bubrežnog parenhima povećava postnatalno, mada nikada ne dostiže vrednosti kao kod donesene novorođenčadi. Takođe, bio je povećan odnos debljine parenhima i zapremine bubrega, što ukupno ukazuje na vizualizaciju glomerularne hiperfiltracije.

### **1.5.3. Koncepti terapijski prolongirane nefrogeneze**

Fiziološka adaptacija novorođenčeta na vanmaterični život zavisi od mnogih parametara uključujući i intaktan morfološki i funkcionalni razvoj bubrega pre i posle rođenja (Sulemanji i Vakili, 2013). Kompleksni procesi indukcije nefrona obično su završeni u vreme rođenja. Međutim, kada se beba rodi prevremeno ili sa LBW, bubrezi su još uvek u procesu nefrogeneze (Black i sar., 2013; Luyckx i sar., 2017; Stritzke i sar., 2017). Sada je sve više dokaza da prevremeno rođenje rezultira smanjenim brojem nefrona za koji se procenjuje da se kreće između 8 i 24% (Luyckx i sar., 2017; Stritzke i sar., 2017). Nekoliko humanih studija je dokazalo da se nefrogena može nastaviti nakon prevremenog porođaja (Rodríguez i sar., 2004; Faa i sar., 2010; Sutherland i sar., 2011). Nefrogena je uočena i 40 dana postnatalno kod ekstremno prevremeno rođenih beba (Rodríguez i sar., 2004). Ipak, postnatalnu nefrogenozu kod prematurusa karakteriše ubrzana maturacija i prisustvo većeg broja abnormalnih bubrežnih korpuskula, sa dilatiranim Bowmanovim prostorom i skvrčenim glomerulom, koji su obično primećeni u spoljašnjem korteksa (Rodríguez i sar., 2004; Sutherland i sar., 2011). Rezultati istraživanja Sutherland i saradnika (2011) pokazali da se broj abnormalnih

korpuskula kreće do 13,7 %, pri čemu je najveći broj zabeležen kod prevremeno rođenih kod kojih je istovremeno dijagnostikovano IUGR. Njihova lokacija ukazuje da su nefrogena zona, stem ćelijske niše i poslednje generacije nefrona pogođene. Pretpostavlja se da su to korpuskuli nefrona koji su novoformirani u vanmateričnom okruženju i stoga vulnerabilni. Gubhaju i saradnici (2009) su koristili model prevremeno rođenih pavijana (ekvivalentno 27 nedelja gestacije kod ljudi) za proučavanje eventualnog uticaja na postnatalnu nefrogenezu. Dokazano je da se glomerulogeneza nastavlja nakon rođenja sa velikom varijabilnošću u udelu abnormalnih glomerula, koja se kretala u rasponu od 0,2 do 18,3%. Njihovi rezultati sugerišu da abnormalnosti možda nisu nastale samo kao rezultat prevremenog rođenja, već su verovatno povezane sa faktorima njihove postnatalne nege koja je varirala između novorođenčadi. Izlaganje nefrotoksičnim lekovima (nesteroidnim antiinflamatornim lekovima i antibioticima) povezano je sa strukturnim i funkcionalnim oštećenjima bubrega (Zaffanello i sar., 2010). S obzirom na obim abnormalnosti, moguće je da zahvaćeni glomeruli možda nikada neće postati funkcionalni što dovodi do deficita funkcionalnih nefrona, koji je potvrđen u predhodnim studijama na humanim fetusima.

Mogući terapijski pristup za prevremeno rođene bebe i bebe sa LBW trebao bi da ima za cilj da stimuliše morfogenu aktivnost u nefrogenoj zoni da bi se time produžila nefrogeneza postnatalno, produžio rasta i razvoja nefrona i eventualna kompenzovala oštećenja nefrogeneze lekovima tokom ranog postnatalnog perioda (Fanos i sar., 2015). Međutim, svi dostupni podaci ukazuju da je takav pristup teško sprovesti, s obzirom da mora biti prilagođen personalnim strukturnim i funkcionalnim karakteristikama sadržanim u nefrogenoj zoni (Minuth i Denk, 2012; Minuth, 2017). S obzirom da podaci za primenu lekova u ovom posebnom okruženju nedostaju, obećavajući koncept za produženje nefrogeneze čeka solidnu implementaciju. Pre toga, postoji potreba za istraživanjima na humanim fetalnim bubrezima koja se odnose na sve aspekte, uključujući morfogenezu, sintezu, sekreciju i transport morfogena lokalno uključenih u održanje matičnosti i nefrogenezu (Krause i sar., 2015). Do danas nije razvijena metoda koja omogućava rano otkrivanje redukovane rezerve nefrona. U skladu sa tim, dijagnoza poremećaja rasta treba da se zasniva na razlici između izmerenih i pretpostavljenih vrednosti za određenu GS, što zahteva dodatna istraživanja u ovoj oblasti.

## **2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA**

---

U istraživanje su postavljene hipoteze:

### **NULTA HIPOTEZA**

Ho: U humanom fetusnom bubregu ne postoje razlike u proliferativnom kapacitetu ćelija (procenjenim imunoekspresijom Ki-67 markera), imunoekspresiji proapoptotskih (Bax) i antiapoptotskih (Bcl-2) markera tokom nefrogeneze, kao ni razlike u veličini, broju i distribuciji korpuskularne i tubularne porcije nefrona u odnosu na GS.

### **RADNA HIPOTEZA**

Ha: U humanom fetusnom bubregu postoje razlike u proliferativnom kapacitetu ćelija (procenjenim imunoekspresijom Ki-67 markera), imunoekspresiji proapoptotskih (Bax) i antiapoptotskih (Bcl-2) markera tokom nefrogeneze, kao i razlike u veličini, broju i distribuciji korpuskularne i tubularne porcije nefrona u odnosu na GS.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

---

Radi utvrđivanja hipoteze postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

- Da se histološkom analizom, na tkivnim presecima bojenim hematoksilin-eozin (HE) i perjodna kiselina-Shiff metodom (PAS), utvrde specifične morfološke karakteristike bubrežnog tkiva i dinamika razvojnih promena u odnosu na GS;
- Da se imunohistohemijskom analizom, primenom monoklonskog antitela za Ki-67 protein, analizira proliferativna aktivnost ćelija različitih populacija u odnosu na stadijume nefrogeneze i GS;
- Da se imunohistohemijskom analizom, primenom monoklonskog antitela za Bcl-2 protein, detektuje prisustvo i nivo antiapoptotske aktivnosti u različitim populacijama ćelija u odnosu na stadijume nefrogeneze i GS;
- Da se imunohistohemijskom analizom, primenom monoklonskog antitela za Bax, detektuje prisustvo i nivo proapoptotske aktivnosti u različitim populacijama ćelija u odnosu na stadijume nefrogeneze i GS;
- Da se kvantifikuju razvojne promene bubrežnog tkiva koje su uslovljene nefrogenezom, širina nefrogene zone, broj glomerularnih generacija i debljina korteksa, u slučajevima različite GS;
- Da se morfometrijskim metodama, merenjem aree, perimetra, Feretovog dijametra, kao i izračunavanjem numeričke arealne gustine kvantifikuju promene veličine i broja bubrežnih korpuskula u slučajevima različite GS;
- Da se morfometrijskim metodama, merenjem aree, kao i izračunavanjem numeričke arealne gustine kvantifikuju promene veličine i broja bubrežnih tubula u slučajevima različite GS;
- Da se statističkim testovima utvrde periodi najznačajnijih razvojnih promena analiziranih komponenti bubrežnog tkiva;
- Da se ispita moguća povezanost i stepen povezanosti između vrednosti ispitivanih parametara i GS primenom metoda statističke analize.

## **4. MATERIJAL I METODE**

---

Istraživanje je sprovedeno na Institutu za anatomiju, Institutu za histologiju i embriologiju, Institutu za biologiju i humanu genetiku, Odeljenju za ćelijsko i tkivno inženjerstvo Medicinskog fakulteta u Nišu i Institutu za patologiju Kliničkog centra u Nišu koji je nastavna i naučna baza Medicinskog fakulteta u Nišu.

### **4.1. MATERIJAL**

Materijal su predstavljali uzorci bubrega 38 humanih fetusa oba pola (20 ženskog i 18 muškog pola) GS od 13 do 40 nedelja. Materijal je nabavljen legalnim putem, nakon obdukcija urađenih na Institutu za patologiju Kliničkog centra u Nišu, uz poštovanje etičkih principa. Etički komitet Medicinskog fakulteta u Nišu odobrio je naučno istraživanje (odluka broj-12-6329/4) u skladu sa etičkim normama propisanim za upotrebu humanog materijala u biomedicinskim istraživanjima.

Obdukcije su rađene prema standardnom protokolu. Podaci o istoriji bolesti majke i fetusa bili su dostupni iz izveštaja o obdukciji. Uzroci fetalne smrti bili su spontani pobačaj, legalni pobačaj koji je urađen u skladu sa etičkim principima da bi se zaštitilo zdravlje majke, kao i intrapartalna fetalna smrt nastala zbog prevremenog porođaja ili asfiksije. Svi fetusi su makroskopski pregledani i izmereni. Osnovni kriterijum za izbor materijala bili su odsustvo makroskopski vidljivih anomalija ploda, makroskopskih dokaza o anomalijama i patološkim promenama na bubregu i znakova maceracije. Za sve fetuse utvrđeni su osnovni parametri, pol, temeno-trtična dužina (TTD), težina i GS. Starost fetusa je procenjena prema akušerskim kriterijumima na osnovu podataka majke o poslednjem menstrualnom ciklusu i anatomskim kriterijumima na osnovu TTD ploda upoređivanjem dobijenih vrednosti sa podacima iz literature (Patten, 1968). U istraživanje su uključeni samo oni fetusi čija je težina bila odgovarajuća za GS. Na osnovu GS uzorci su podeljeni u sedam starosnih grupa, pri čemu je svaka grupa odgovarala jednom lunarnom mesecu (Tabela 4.1.).

## 4.2. METODE

Tokom obdukcije, bubrezi su makrodisekcijom izolovani u bloku zajedno sa okolnim masnim i vezivnim tkivom. Nakon toga su pažljivo oslobođeni okolnog tkiva. Svaki bubrež je presečen na pola, u srednjoj frontalnoj ravni. Bubrezi su zaseceni duž spoljašnje ivice, upravno na bubrežnu čauru, nakon čega je rez nastavljan prema sredini hilusa. Kod starijih fetusa, svaka polovina je presecana još jedanput upravno na prvi presek. Nakon rutinske obrade, uzorci su kalupljeni u parafinske blokove sa prvom reznom površinom usmerenom na dole, čime su obezbeđeni izotropni preseki optimalni za histološku i morfometrijsku analizu.

**Tabela 4.1.** Distribucija fetusnog materijala u odnosu na gestacijsku starost, temeno-trtičnu dužinu i pol.

Gestacijska starost (nedelje)		Temeno-trtična dužina (mm)	Pol		n	%
Grupe	Prosečna gestacijska starost		Muški	Ženski		
13 - 16	14,4 ± 1,1 (14,0)	115,0 ± 15,1 ( 115,0)	3	4	7	18,4
17 - 20	18,5 ± 1,1 (18,5)	166,1 ± 21,3 (165,0)	3	5	8	21,1
21 - 24	22,5 ± 1,3 (22,5)	207,5 ± 9,3 (205,0)	4	4	8	21,1
25 - 28	26,3 ± 1,1 (26,0)	248,8 ± 16,7 (247,5)	3	1	4	10,5
29 - 32	30,3 ± 0,9 (31,0)	281,7 ± 10,3 (280,0)	1	2	3	7,9
33 - 36	34,7 ± 0,5 (35,00)	321,0 ± 10,3 (320,0)	2	1	3	7,9
37 - 40	39,2 ± 1,0 (40,0)	407,0 ± 55,6 (365,0)	2	3	5	13,1
Σ			18	20	38	100

Vrednosti su prikazane kao srednje ± standardna devijacija (medijana).

#### **4.2.1. Histološke metode**

Histološka analiza uzoraka fetusnih bubrega u različitim periodima gestacije, kao i utvrđivanje razvojnih promena, bazirana je na svetlosno mikroskopskoj analizi.

Uzorci bubrežnog tkiva fiksirani su u 10% pufersanom formalinu u trajanju od 24h. Nakon fiksacije, uzorci su dalje rutinski obrađivani i kalupljeni u parafin sa prvom reznom površinom na dole. Tkivni preseći debljine 4  $\mu\text{m}$  sečeni su sa parafinskih kalupa uz pomoć mikrotoma (LEICA RM2255) i montirani na predmetna stakla. Za identifikaciju struktura bubrežnog tkiva primenjena je hematoksilin-eozin (HE) i PAS metoda bojenja. Obojeni tkivni preseći su analizirani svetlosnim mikroskopom Leica DMLS (Leica) pod različitim uvećanjem objektivna (x 5, x 10, x 20 i x 40). Digitalne slike analiziranih preseka dobijene su korišćenjem digitalne kamere CMEX-10 Pro (Euromex Microscope BV, Netherlands).

Rutinsko histološko ispitivanje potvrdilo je optimalnu morfologiju bubrežnog tkiva svih uzoraka koji su uključeni u istraživanje. Fragmenti bubrežnog tkiva obuhvatali su punu debljinu korteksa i celu ili veći deo susedne medule.

#### **4.2.2. Imunohistohemijske metode**

Za imunohistohemijsku analizu korišćeni su izabrani uzorci bubrežnog tkiva fetusa različite GS koji su fiksirani u formalinu i ukalupljeni u parafin. Utvrđeno je prisustvo struktura bubrega sa pozitivnom reakcijom ćelija na primenjene imunohistohemijske markere uz primenu monoklonskih antitela za identifikaciju proliferativne aktivnosti ćelija (anti-Ki67 antitelo; Clone MIB-1; Dako; 1:75), antiapoptozne aktivnosti ćelija (anti-Bcl-2-Oncoprotein; Clone bcl-2/100/D5; Leica; 1:100) i proapoptozne aktivnosti ćelija (anti-Bax; Clone SP47; Abcam; 1:50). UltraVision LP Detection System: HRP polymer (Thermo Scientific, USA; Cat. No. TL-125-HL) tehnika primenjena je za svako primarno antitelo (Tabela 4.2).

Tkivni preseći debljine 4  $\mu\text{m}$  sečeni su sa parafinskih blokova i montirani na Super-Frost Ultra Plus predmetna stakla (ThermoScientific, USA). Sušeni su jedan sat na 60°C u termostatu, a zatim preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon toga, tkivni preseći su deparafinisani provođenjem kroz ksilol (2x5min) i hidrirani u opadajućim koncentracijama etanola (100% - 2x3min, 96% - 3min i 70% - 3min) do destilovane vode. Aktivnost endogene peroksidaze blokirana je inkubacijom u 3% rasvoru H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u vodi 5 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega su isprani u destilovanoj vodi. Procedura je nastavljena demaskiranjem antigena,



što se postiže izlaganjem tkivnih preseka potopljenih u odgovarajući pufer za demaskiranje visokoj temperaturi.

**Tabela 4.2.** Procedura imunohistohemijskog bojenja za primenjena antitela.

Tehnika	Ultravision LP- HRP polymer detekciona tehnika		
<b>Primarno antitelo</b>	Ki-67, Clone MIB-1	Bcl-2 Oncoprotein, Clone bcl-2/100/D5	Bax, Clone SP47
<b>Proizvođač</b>	Dako	Leica	Abcam
<b>Kataloški broj</b>	M7240	BCL-2-L-CE	ab81083
<b>Razblaženje</b>	1:75	1:100	1:50
<b>Pretretman</b>	0,01M citratni pufer pH=6,20 min, mikrotalasna pećnica	Epitope retrieval solution pH=9,20 min, mikrotalasna pećnica	0,01M citratni pufer pH=6,20 min, mikrotalasna pećnica
<b>Inkubacija primarnim antitelom</b>	60 min na sobnoj T	60 min na sobnoj T	preko noći na +4°C
<b>Kit</b>	Ultravision LP- HRP polymer		
<b>Proizvođač</b>	ThermoScientific, USA		
<b>Kataloški broj</b>	Cat. No. TL-125-HL		

Da bi se to postiglo, tkivni preseki su potopljeni u 0,01M citratni pufer (pH 6,2) za Ki-67 i Bax, ili *Epitope retrieval solution* (pH 9,2) za Bcl-2, i kuvani 20 min na 780W u mikrotalasnoj pećnici. Nakon kuvanja, hladili su se u istom puferu 20 minuta, a potom su isprani u destilovanoj vodi 5 minuta i potopljeni u 0,1M rastvor fosfatnog pufera (PBS) (pH 7,2). Inkubacija sa primarnim antitelom vršena je 60 min na sobnoj temperaturi za Ki-67 i Bcl-2, ili preko noći na 4°C za Bax u vlažnoj komori, nakon čega su preseki ispirani u PBS-u 3x3 minuta. Sledila je inkubacija sa *Primary Antibody Enhancer* komponentom kita 12 minuta na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori, nakon čega su ponovo isprani u PBS-u 3x3 minuta. Sledeći korak je podrazumevao inkubaciju sa *HRP Polymer* reagensom 15 minuta na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori. (Napomena: *HRP Polymer* je foto-senzitivan zbog čega treba izbegavati nepotrebno izlaganje svetlosti.) Nakon toga, uzorci su ponovo isprani u PBS-u 3x3 minuta. Imunohistohemijska reakcija ispitivanih antigena dobijena je inkubacijom u rastvoru 3,3-diamino benzidin (DAB) primenjenim kao hromogeni supstrat (Liquid DAB+

Substrate Chromogen System, Cat. No. K3467, Dako) 3-5 minuta na sobnoj temperaturi. Za svako antitelo, kao negativna kontrola, služili su uzorci tkiva kod kojih je tokom tretmana izostavljeno primarno antitelo, dok su ostale faze imunohistohemijske procedure sprovedene.

Tkivni preseki su zatim isprani tekućom vodom, kontrastirani *Mayer*-ovim hematoxilinom 1 minut i ponovo isprani u tekućoj vodi. Dehidrirani su u rastućim koncentracijama etanola do 100% (70%, 96% i 100%), potapani u ksilol, a zatim pokriveni odgovarajućom sintetskom smolom (DPX Mountant for histology, Cat. No. 06522, Sigma-Aldrich) i pokrovnim staklom.

Ukoliko je traženi antigen prisutan uočava se precipitat hromogena na mestu koje je braon obojeno, za razliku od okolnog tkiva koje je plavo. Pozitivna imunoreaktivnost za Ki-67 protein procenjuvana je kao jasna ili intenzivna nuklearna prebojenost, dok je u proceni ekspresije Bcl-2 i Bax proteina kao pozitivna reakcija vrednovana kompletna citoplazmatska prebojenost različitog intenziteta (slaba, umerena i jaka).

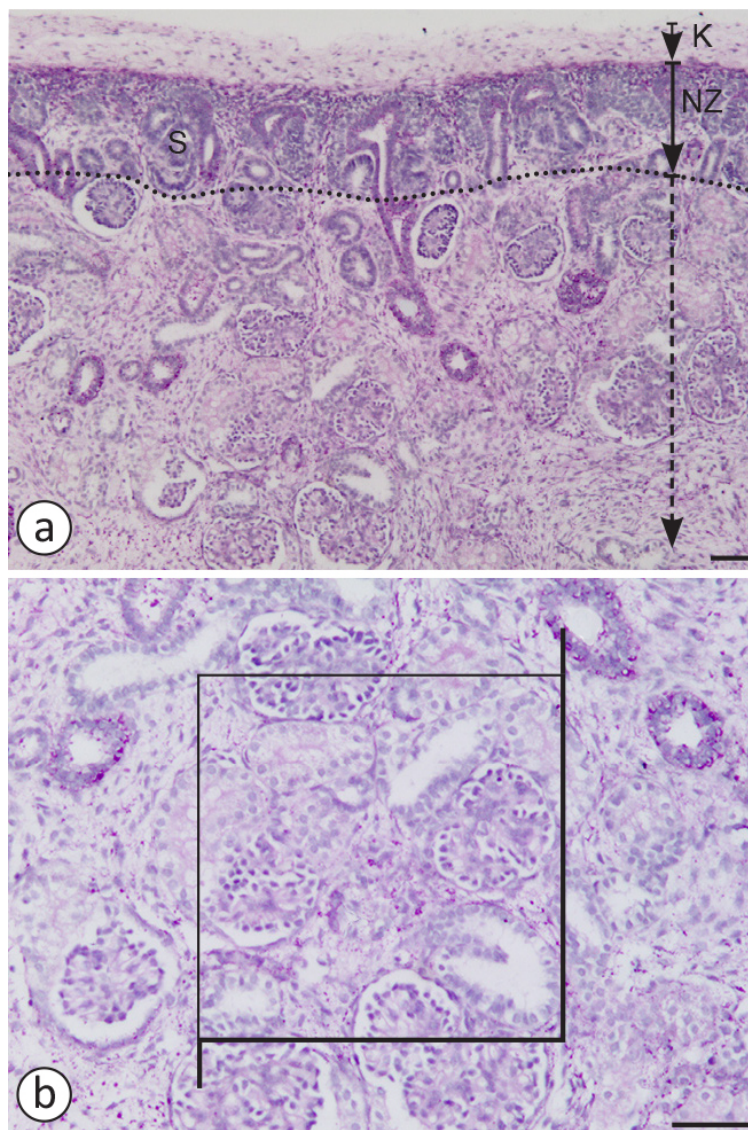
Ekspresija Ki-67, Bcl-2 i Bax analizirana je pojedinačno unutar strukturnih komponenti bubrežnog korteksa i medule. Ekspresija ispitivanih markera detaljno je analizirana u različitim populacijama ćelija nefrona razvoja distribuiranih u zonama korteksa, koje su na osnovu mikromorfoloških kriterijuma definisane kao nefrogena zona, zona maturacije i zona zrelih glomerula (Minuth, 2020; Minuth, 2021).

### **4.2.3. Morfometrijske metode**

Morfometrijska analiza sprovedena je na tkivnim presecima bojenim PAS metodom, uz pomoć sistema za analizu digitalne slike Image J v. 1.53v (Wayne Rasband, national Institute of Health, USA). Mikroskopski preparati su analizirani, vidna polja selektovana i fotografisana digitalnom kamerom, a fotodokumentacija je sačuvana u TIFF (Tagged Image File Format) formatu kompjuterskog fajla i podvrgnuta metričkoj kalibraciji za odgovarajuće mikroskopsko povećanje u programu Image J.

Da bi se odredila širina nefrogene zone, broj generacija glomerula i debljina korteksa, mikroskopski preparati su fotografisani pod uvećanjem objektiva x 5. Vidna polja su uzorkovana na tri lokacije koje su odgovarale bubrežnim lobusima. Nefrogena zona se pružala u vidu šire ili uže trake bubrežnog tkiva duž unutrašnje strane bubrežne čaure, koja se na mikroskopskim preparatima bojila intenzivnije. Unutrašnja granica nefrogene zone, prema ostalom delu korteksa, definisana je nepravilnom linijom koja se protezala duž parijetalnih

epitelnih ćelija na proksimalnom polu (orijentisan prema meduli) kasnih S-formi nefrona (Slika 4.1.).



**Slika 4.1.** Histološki presek humanog fetusnog bubrega u 14. nedelji gestacije obojen perjodnom kiselinom-Shiff metodom. a.) Formiranje i sazrevanje nefrona u zonama korteksa; proksimalni pol kasnih S-formi nefrona označava unutrašnju granicu nefrogene zone (tačkasta linija); glomeruli i tubuli su selektovani počevši od unutrašnje granice nefrogene zone prema najdubljem sloju korteksa (isprekidana linija). b.) Nepristrasni stereološki ram za brojanje sa linijama uključivanja (tanja linija) i zabranjenim linijama (deblja linija) postavljen je na sliku histološkog preseka; glomerularni i tubularni profili unutar rama ili dodirujući linije inkluzije, su prebrojani dok su oni profili izvan okvira za brojanje ili dodirivanje zabranjenih linija zanemareni. K, kapsula; NZ, nefrogena zona; S, telo u obliku slova S; (razmera 50 $\mu$ m).

Širina nefrogene zone određivana je povlačenjem merne linije od duboke strane bubrežne čaure do najniže tačke proksimalnog pola S-forme nefrona. Debljina korteksa određivana je merena je povlačenjem merne linije od duboke strane bubrežne čaure do najniže tačke na parijetalnom listu Boumanove kapsule najdubljeg jukstamedularnog korpuskula. Broj

generacija glomerula dobijen je brojanjem sferičnih glomerula u prostoru između donje granice nefrogene zone i medule, duž linija paralelnih sa tokom sabirnih tubula (kod mlađih fetusa gde medularni zraci nisu diferentovani) ili tokom medularnih zraka. Rani glomerularni oblici koji su pripadali nefrogenoj zoni nisu bili uključeni u analizu.

Bubrežni korpuskuli i tubuli analizirani su na mikrofotografijama koji su dobijene pod uvećanjem objektiva x 40. Merenja su urađena na 25 vidnih polja za svaki analizirani uzorak, koja su sistematski uzorkovana širinom bubrežnog korteksa počevši od unutrašnje granice nefrogene zone prema najdubljem delu korteksa, u oblastima između sabirnih tubula. Bubrežni korpuskuli i tubuli su selektovani pomeranjem kursora duž obrisa parijetalnog lista Boumanove čaure i obrisa tubularnog preseka.

Numerička arealna gustina (NA) izračunavana je kao količnik broja ispitivanih struktura (N) sa površinom (A) korteksa ( $\text{mm}^2$ ) prema formuli:  $NA = N/A$ . Bubrežni korpuskuli i tubuli su brojani na površini korteksa od  $1,45 \text{ mm}^2$ . Na svakom vidnom polju brojani su svi profili osim onih koji su prelazili zabranjenu liniju (Gundersen, 1977). Numerička arealna gustina je prikazana kao broj bubrežnih korpuskula ili tubula po jedinici površine kortikalnog tkiva izražena u  $\text{mm}^2$ .

Vrednosti svih ispitivanih parametara po svakom analiziranom slučaju dobijeni su kao prosek vrednosti za sva analizirana vidna polja.

#### **4.2.4. Statističke metode**

Podaci dobijeni tokom istraživanja statistički su obrađivani uz pomoć aplikacionog programa SPSS 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY). Osnovna statistička obrada dobijenih rezultata izvršena je određivanjem srednje vrednosti, standardne varijacije i medijane za numerička obeležja. Da bi se proverilo da li distribucija podataka u varijablama značajno odstupa ili ne od modela normalne distribucije, primenjivan je Shapiro-Wilk test. Statistička značajnost razlike između dve sukcesivne starosne grupe utvrđivana je Studentovim t-testom za nezavisne uzorke u slučajevima normalnih distribucija ili Mann-Whitney U testom u slučajevima kada su distribucije varijabli odstupale od normale.

Za testiranje zavisnosti ispitivanih morfometrijskih parametara od pripadnosti starosnim grupama korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (One-Way ANOVA). Naknadnom analizom obavljani su nizovi poređenja i istražene razlike između svih starosnih grupa ponosob primenom odgovarajućih post hoc testova. U okviru ANOVA testa, homogenost varijansi u grupama koje u poređene ispitivana je Leveneovim testom. Za naknadna višestruka pore-

đenja korišćen je Tukey HSD test u slučajevima kada Leveneovog testa pokazivao statističku značajnost, dok je u slučaju statistički značajnog Leveneovog testa primenjivan Dunnettov test.

Korelacionom analizom ispitivana je jačina uzajamne povezanosti između ispitivanih morfometrijskih parametara i GS. S obzirom da GS nije pokazala normalnu distribuciju, korišćen je Spearmanov ( $\rho$ ) koeficijent korelacije ranga. Povezanost između odgovarajućih morfometrijskih parametara, kao zavisnih varijabli, i GS, kao nezavisne varijable, ispitana je univarijantnom linearnom regresionom analizom (Enter metodom). Statistička zaključivanja izvedena su na nivou značajnosti  $p < 0,05$ . Rezultati morfometrijske i statističke analize prikazani su tabelarno i grafički u programu MS Excel.

## 5. REZULTATI

Istraživanje je sprovedeno na uzorcima bubrega 38 humanih fetusa, od kojih je 20 bilo ženskog pola što je činilo 52,6% ispitivanog uzorka i 18 muškog pola što je činilo 47,4% ispitivanog uzorka. Prosečna GS ispitivanih fetusa iznosila je  $24,34 \pm 8,35$  nedelja, sa medijanom od 22,50 gestacijskih nedelja. Prosečna GS za fetuse ženskog pola iznosila je  $23,90 \pm 8,81$  nedelja, a za fetuse muškog pola  $24,83 \pm 8,04$  nedelja (Tabela 5.1). Nije utvrđena statistički značajna razlika između GS fetusa ženskog i muškog pola ( $p > 0,05$ ). Shapiro-Wilk test je pokazao da je raspodela GS u celom uzorku odstupa od normalne.

**Tabela 5.1.** Prosečna gestacijska starost u odnosu na pol i u ukupnom ispitivanom uzorku

Pol	<i>n</i>	%	Gestacijska starost (nedelje)
Ženski	20	52,6	$23,90 \pm 8,81$ (21,00)
Muški	18	47,4	$24,83 \pm 8,04$ (23,50)
Ukupno	38	100,0	$24,34 \pm 8,35$ (22,50)

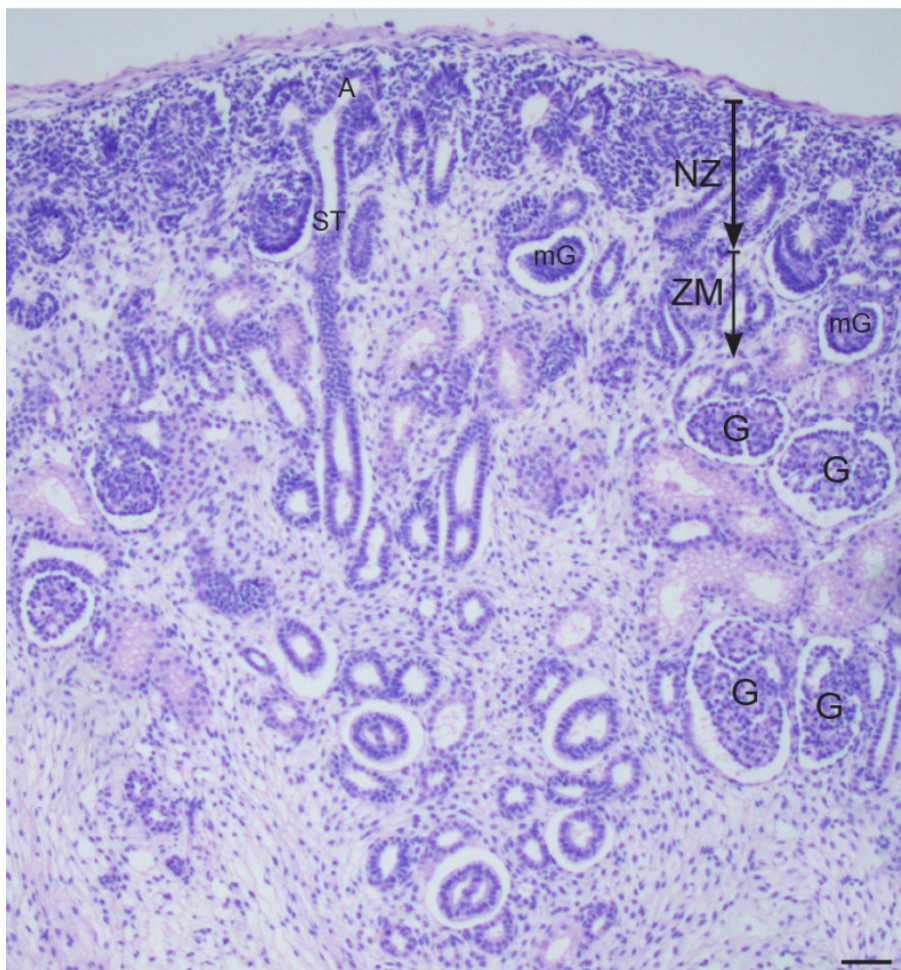
Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (medijana);

### 5.1. HISTOLOŠKA ANALIZA

Svetlosnomikroskopska analiza preparata bojjenih HE omogućila je da se sagleda celokupna morfologija bubrežnog tkiva u odnosu na GS. U ranim stadijumima razvoja, korteks i medula nisu diferentovani. Lobulisanje korteksa bubrega je prepoznatljivo. Fetalni bubrezi pokazuju prostorni i vremenski gradijent diferencijacije nefrona sa karakterističnim zonama korteksa. Spoljašnji deo korteksa izgrađuju nefrogena zona i susedna zona maturacije. Obe zone se pružaju duž cele površine svakog bubrežnog lobusa. U svim starosnim grupama kod kojih je nefrogeneza bila u toku, nefrogena zona se prostire duž unutrašnje površine bubrežne kapsule u vidu šireg ili užeg pojasa koji se boji intenzivnije. Distalne grane ureternog pupoljka dominiraju u nefrogenoj zoni. Njihovi terminalni krajevi, prošireni u ampulu, vidljivi su subkapsularno. U zavisnosti od ravni preseka mogu se videti mesta grananja sabirnih tubula.

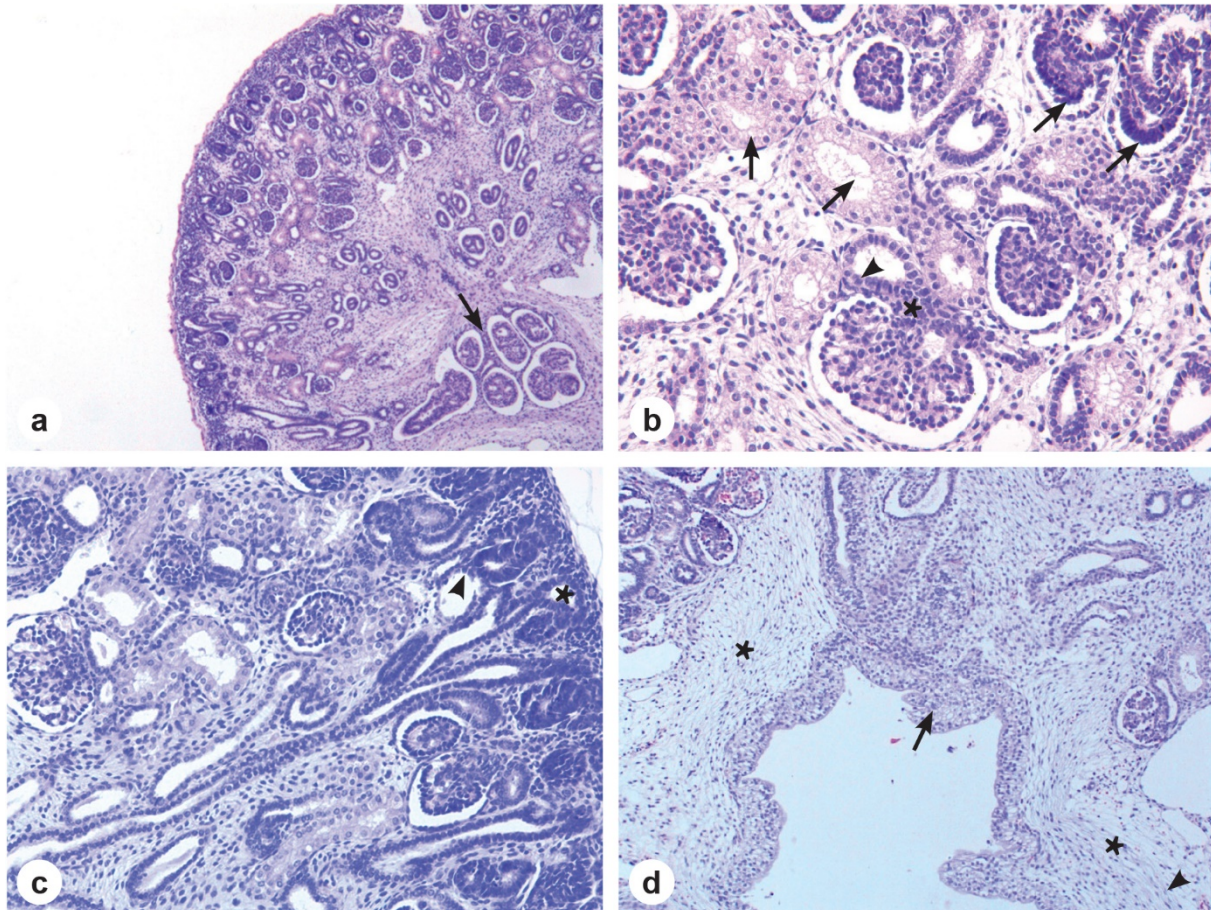
Mezenhimne progenitorne ćelije i tranzitni stadijumi nefrona u nastajanju, pretubularni agregati, bubrežne vezikule, zapeta- i S-forme, prisutni su u nefrogenoj zoni (Slika 5.1.).

Formiranje nefrona započinje u perifernom delu nefrogene zone. Nekoliko slojeva mezenhimnih progenitornih ćelija ispunjava prostor između unutrašnje površine bubrežne kapsule i ampularnih krajeva sabirnih tubula. Stromalne progenitorne ćelije raspoređene su neposredno ispod kapsule, dok su nefrogene progenitorne ćelije usmerene prema vrhu ampule. Izdvojene grupe kondenzovanih nefrogenih mezenhimnih ćelija u vidu pretubularnih agregata uočavaju se pored ampule sabirnih tubula.



**Slika 5.1. Formiranje i sazrevanje nefrona u zonama bubrežnog korteksa (13. nedelja razvoja).** Fibrozna kapsula prekriva spoljašnju površinu organa; nefrogena zona se prostire duž unutrašnje strane kapsule i prikazuje se kao tkivna traka koja se boji intenzivnije; sabirni tubul se dihotomo grana prema površini bubrega; distalni kraj sabirnog tubula proširen je u ampulu; mezenhimske progenitorne ćelije se vide između vrha ampule i unutrašnje strane bubrežne kapsule; početni stadijumi nefrona u nastajanju vidljivi u nefrogenoj zoni ukazuju na aktivnu nefrogenezu; nezreli nefroni prisutni su u susednoj maturacionoj zoni; nefroni koji pokazuju morfološke karakteristike definitivnih nefrona nalaze se u unutrašnjem delu korteksa.; ST, sabirni tubul; A, ampula sabirnog tubula; NZ, nefrogena zona; ZM, zona maturacije; mG, nezreo glomerul u zoni maturacije; G, zreo glomerul; (razmera = 50 $\mu$ m).

Razvojem epitela i pojavom malog lumena u proksimalnom delu pretubularnog agregata formiraju se primitivne bubrežne vezikule. Primitivna vezikula se postepeno izdužuje, savija i transformiše, preko različitih stadijuma vezikule, u zapeta- i S-formu.



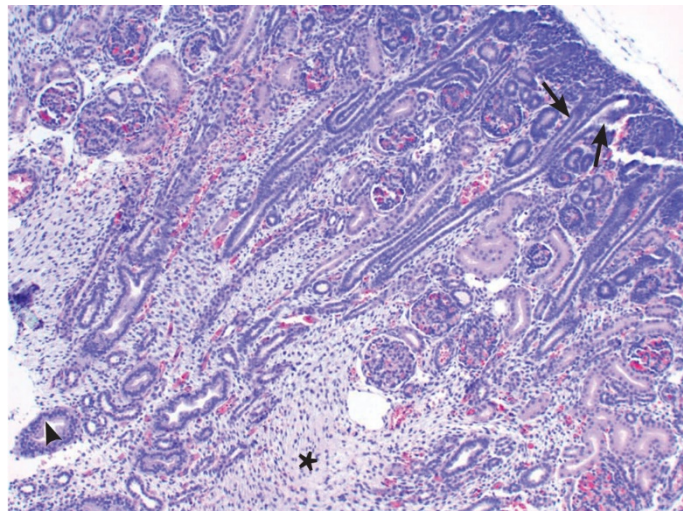
**Slika 5.2. Bubrež u 13. nedelji razvoja.** a) Uočava se aktivna nefrogeneza u perifernom delu korteksa; ispod kapsule je kontinuirani sloj nefrogene zone; u dubljim delovima korteksa uočavaju se formirani bubrežni korpuskuli i tubuli; u meduli su formirani delovi sabirnog sistema (strelica); HE x 50. b) U korteksu, na periferiji, vide se nezrele S-forme (gore desno, strelice); ispod nefrogene zone su glomeruli u fazi sazrevanja i formirani renalni korpuskuli, proksimalni (strelice) i distalni (glava strelice) tubuli; definisan je i jukstaglomerulski aparat (zvezdica). U dubljem delu korteksa uočavaju se formirani bubrežni korpuskuli i bubrežni tubuli; HE x 250. c) Ogranak ureternog pupoljka se grana i završava ampulom (zvezdica) oko koje su bubrežne vezikule (glava strelice); formirani bubrežni korpuskuli su u unutrašnjem delu korteksa; između parenhimskih struktura uočavaju se intersticijske ćelije; HE x 200. d) Epitel prelaznog tipa - urotel (strelica) oblaže bubrežnu karlicu; između urotela i korteksa je širok intersticijum (zvezdica) koga čine mezenhimske ćelije (glava strelice); HE x 100.

Razvoj nefrona se odvija upravo na bubrežnu kapsulu, paralelno sa sabirnim tubulima. Nastavljajući S-stadijum, nefroni napuštaju nefrogenu zonu i spuštaju se dublje u korteks gde sazrevaju. U susednoj zoni maturacije, diferencijacija bubrežnih korpuskula i tubula je dominantna. Glomerularni kapilari se progresivno razvijaju što je praćeno produbljanjem



Boumanove čaure i postepenim sužavanjem njene baze. Visceralni list Boumanove čaure izgrađuju primitivni podociti kubičnog oblika koji grade kontinuirani sloj oko nezrelog glomerula. U dubokom delu korteksa, jukstamedularno, prisutni su formirani bubrežni korpuskuli sa jasnom lobulacijom glomerularnih kapilara i brojni tubuli koji pokazuju tipične morfološke karakteristike definitivnih nefrona. Ipak, na nepotpunu zrelost ukazuje kubični izgled podocita.

U 13. nedelji razvoja, nefrogena zona je dosta široka u odnosu na ostale delove bubrežnog tkiva. Ona sadrži zgusnute ćelije metanefričnog blastema i rane morfološke stadijume razvoja nefrona. U spoljašnjem delu nefrogene zone, ćelije metanefrosnog mezenhima su organizovane u gomilice oblika „kape“ iznad ampularnih krajeva sabirnih tubula. Ispod toga, prisutni su različiti rani morfološki stadijumi razvoja nefrona, pretubularni agregati, vezikule, zapeta- i S- forme (Slika 5.2. a, c). Nepotpuno vaskularizovani bubrežni korpuskuli sadrže nezreli glomerul i dvolisnu Boumanovu kapsulu. Oba lista Boumanove kapsule čine kockaste ćelije. Formirani bubrežni korpuskuli imaju jednoslojni pločasti epitel u parijetalnom listu i kockaste ćelije, buduće podocite, u visceralnom listu Boumanove kapsule. Evidentna je razlika u veličini bubrežnih korpuskula (Slika 5.2. b).

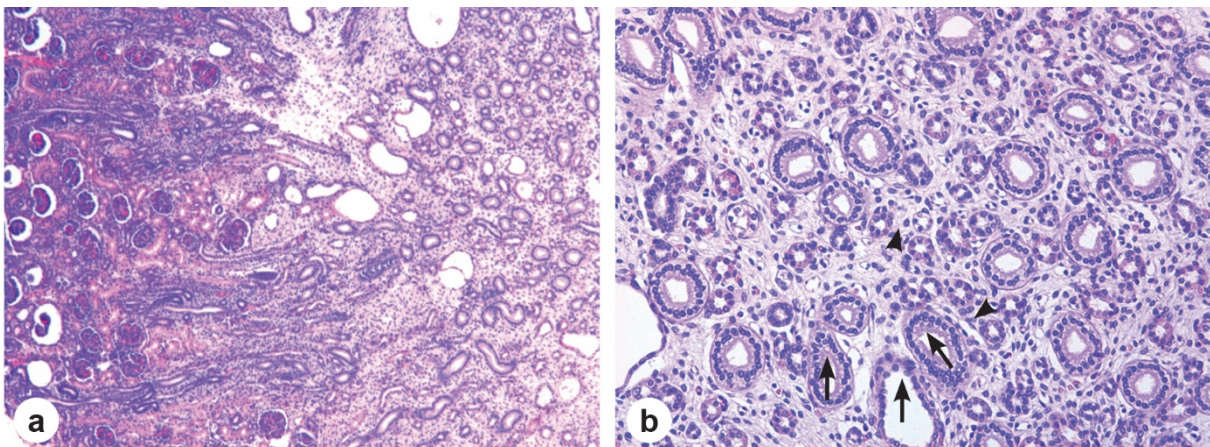


**Slika 5.3. Bubrež u 15. nedelji razvoja.** Na površini nefrogene zone uočava se metanefrosni mezenhim; kondenzovane ćelije mezenhima nalaze se iznad ampula ureteralnog pupoljka (strelice); oko ampula su vezikule i S-forme; dublje u korteksu vide se proksimalni i distalni tubuli i formirani renalni korpuskuli; jukstamedularno lokalizovani renalni korpuskuli su veći u poređenju sa korpuskulima spoljašnje zone korteksa; medulu karakteriše širok intersticijski prostor (zvezdica) koga čine mezenhimske ćelije, i bubrežne čašice obložene urotelom (glava strelice); HE  $\times 100$ .

Renalni korpuskuli lokalizovani jukstamedularno su veći u poređenju sa onima koji su smešteni u površnijim delovima korteksa, mada kortikomedularni spoj nije jasno prepoznat-

ljiv (Slika 5.2. c). Pored nefrona, u bubregu se razvija sabirni sistem. Bubrežna karlica i bubrežne čašice obložene su epitelom prelaznog tipa - urotelom (Slika 5.2. d). Intersticijski prostor ispunjavaju mezenhimske ćelije.

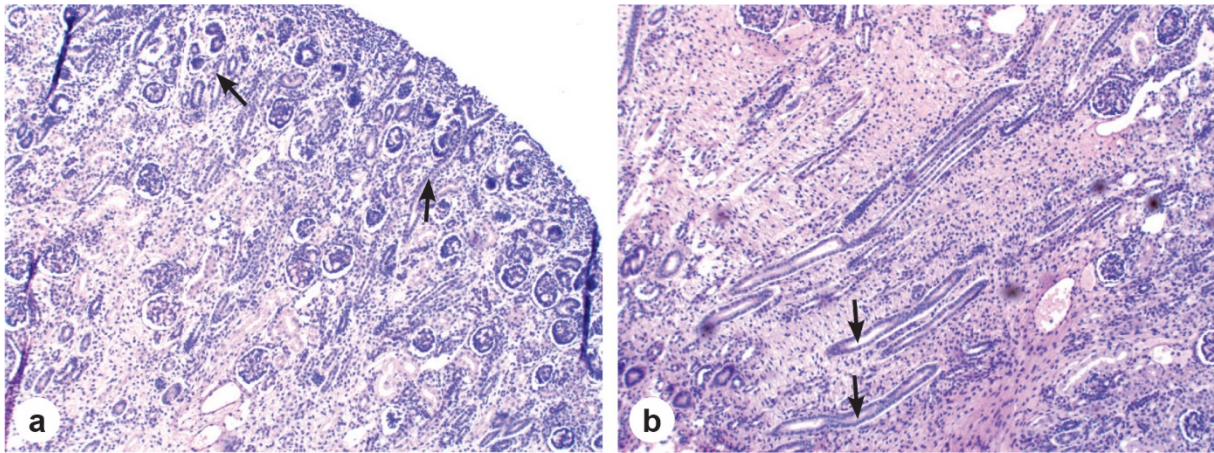
Do 15. nedelje razvoja, u unutrašnjem delu korteksa prisutni su malobrojni formirani nefroni sa jasno definisanim renalnim korpuskulima, diferentovanim proksimalnim tubulima i ne sasvim diferentovanim distalnim tubulima. Proksimalni tubuli imaju specifičan epitel sa visokim prizmatičnim ćelijama koje karakteriše izrazito acidofilna citoplazma, dok distalni tubuli sadrže niske kockaste ćelije bazofilne citoplazme, koje su morfološki slične epitelnim ćelijama ogranaka ureteralnog pupoljka. Intersticijski prostor ispunjavaju mezenhimske ćelije. Pored nefrona, bubreg formira sabirni sistem. Medularni deo bubrega karakterišu tubularne strukture obložene niskim kockastim epitelom. U ovom periodu razvoja postoji širok intertubularni prostor, budući intersticijum bubrega, sa mezenhimijskim ćelijama koje mu daju izgled mrežaste strukture (Slika 5.3.).



**Slika 5.4. Bubrež u 19. nedelji razvoja.** a) U korteksu, ispod istanjene nefrogene zone, uočavaju se strukturni delovi nefrona i sabirni kanali koji formiraju medularne zrake; HE x 100; b) U meduli se vide poprečni preseći sabirnih kanala (strelice) i širih i užih delova Henleovih petlji (glave strelica); HE x 200.

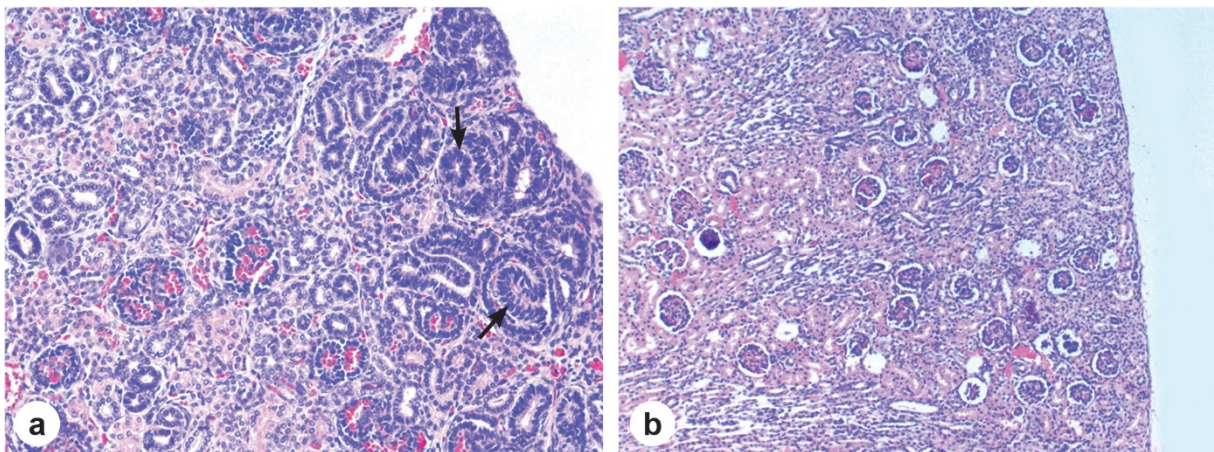
Od 19. do 28. nedelje razvoja bubrega, nefrogena zona se istanjuje, ali je i dalje uočljiva kao kontinuirani sloj na površini kore bubrega. Ostali deo bubrežnog tkiva pokazuje histološku građu formiranog bubrega. Najveći deo kore bubrega sadrži zrele nefrone i delove sabirnih kanala koji formiraju medularne zrake (Slika 5.4. a). Medulu bubrega čine sabirni kanali, širi i uža delovi Henleovih petlji i intersticijum (Slika 5.4. b).

U 22. nedelji razvoja bubreg ima definisan korteks (Slika 5.5. a) i medulu u kojoj još uvek dominira intersticijum u odnosu na tubularnu, tj. parenhimsku komponentu (Slika 5.5. b).



**Slika 5.5. Bubrež u 22. nedelji razvoja.** a) U nefrogenoj zoni se uočavaju ogranci ureteralnog pupoljka (strelica) i renalni korpuskuli različitog stepena zrelosti; dublje u korteksu su formirani renalni korpuskuli; HE  $\times 100$ ; b) U meduli se uočavaju uzdužni presecci sabirnih kanala (strelice) između kojih je širok intersticijum; HE  $\times 100$ .

Posle 28. nedelje razvoja, nefrogena zona predstavlja sasvim tanak, isprekidan površinski sloj kore bubrega u kome se još uvek vide nezrele forme nefrona (Slika 5.6. a). Na granici prema meduli formirano je vezivno tkivo u kome su prisutni veći arterijski i venski krvni sudovi. Medulu karakteriše, pored sabirnih tubula, širih i užih delova Henleove petlje, znatno redukovano vezivno tkivo intersticijuma.



**Slika 5.6. Bubrež u 28. (a) i 36. (b) nedelji razvoja.** a) Na površini kore, u redukovanoj nefrogenoj zoni, uočavaju se nezrele forme nefrona (strelice); dublje u korteksu vide se formirani svi strukturni delovi nefrona; HE  $\times 200$ ; b) Bubrežni korteks čiji morfološki izgled odgovara morfološkom izgledu adultnog bubrega; HE  $\times 100$ .

Posle 32. nedelje razvoja nefrogena zona iščezava. Bubrež sadrži sve gradivne komponente kore i medule zrelog bubrega, sa bubrežnim korpuskulima različite veličine. Najveći pripadaju jukstamedularnim nefronima, srednje veličine su u srednjem korteksu, a najmanji su najmlađi bubrežni korpuskuli na površini kore bubrega (Slika 5.6. b).

## 5.2. IMUNOHISTOHEMIJSKA ANALIZA

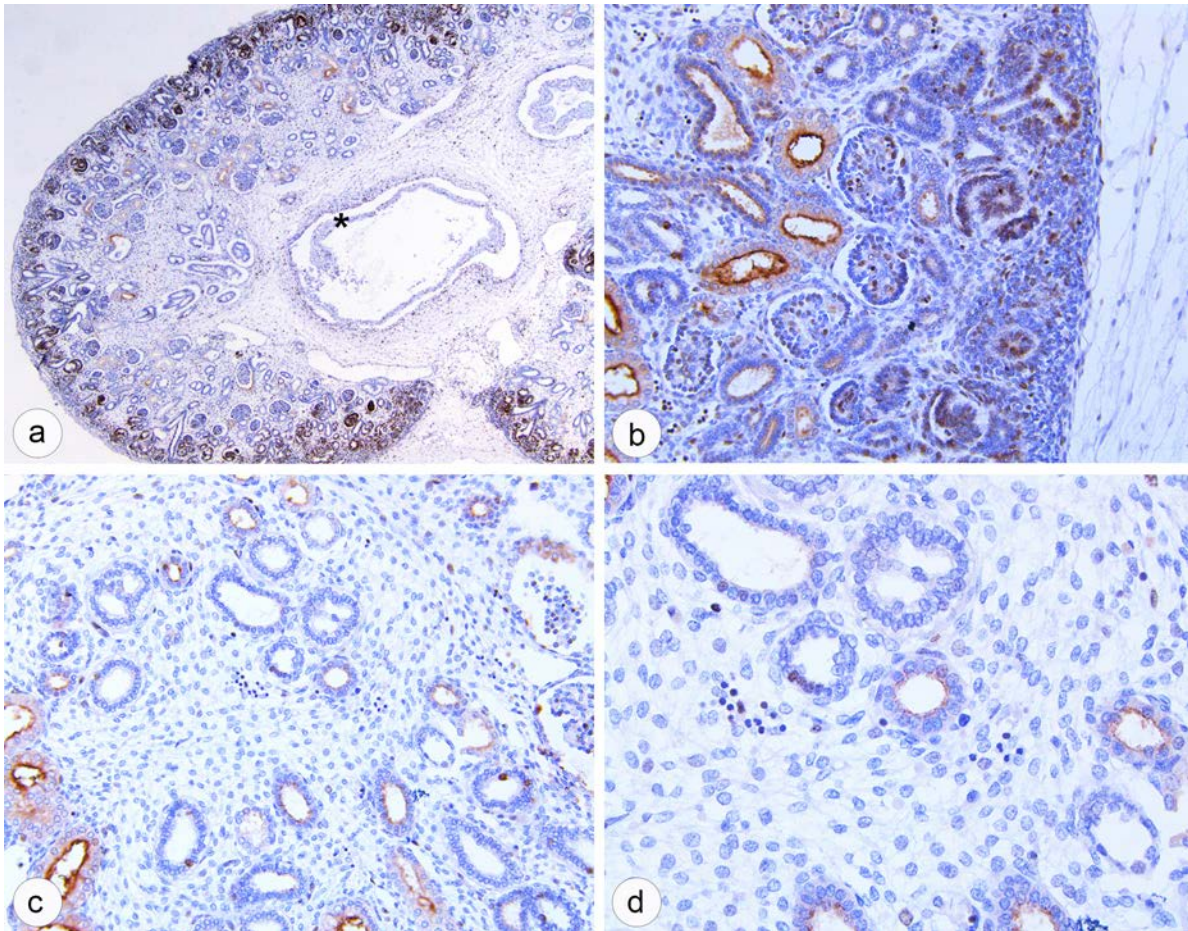
Uzimajući u obzir Ki-67, Bcl-2 i Bax protein, zapaža se razlika u njihovoj ekspresiji u odnosu na GS. Izražena ekspresija Ki-67 i Bcl-2 uočena je u ranim periodima razvoja bubrega. Takođe, uočena je značajna razlika u ekspresiji ovih markera u odnosu na slojeve korteksa, sa dominantno izraženom imunopozitivnošću ćelija koje pripadaju strukturama spoljašnjeg dela korteksa. Sa porastom GS i sazrevanjem nefrona, ekspresije Ki-67 i Bcl-2 se postepeno smanjuju. Suprotno, ekspresija Bax proteina je veoma slaba i sporadična u ranim stadijumima razvoja. Kasnije, Bax se jače eksprimira samo u bubrežnim tubulima. Razvoj medule bubrega započinje kasnije, u odnosu na korteks. U drugoj polovini gestacije prisutna je karakteristična ekspresija Ki-67 u malobrojnim epitelnim ćelijama sabirnih kanala i užih delova Henleovih petlji. U istom periodu, ćelije Henleovih petlji eksprimiraju Bcl-2, dok su epitelne ćelije sabirnih kanala imunonegativne.

### 5.2.1. Imunoekspresija Ki-67

U prvim nedeljama razvoja, Ki-67 antigen se jako eksprimira u brojnim ćelijama spoljašnjeg korteksa dok je imunopozitivnost ćelija unutrašnjeg korteksa i medule slabija po intenzitetu (Slika 5.7. a).

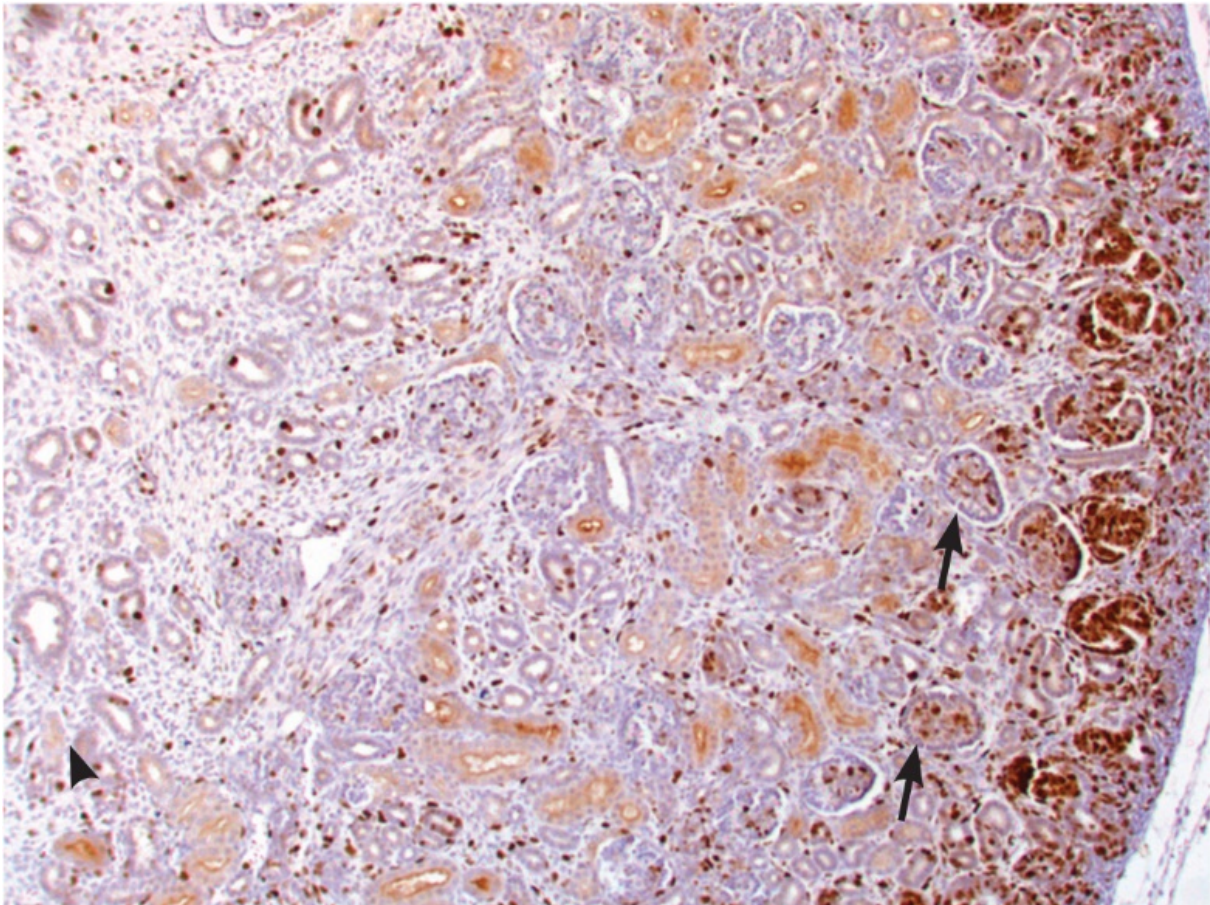
Jaka Ki-67 imunopozitivna reakcija prisutna je u četkastom pokrovu na apikalnoj površini epitelnih ćelija proksimalnih tubula nefrona (Slika 5.7. b). Takva lokalizacija imunopozitivne reakcije olakšava razlikovanje proksimalnih od distalnih tubula nefrona i ogranaka ureteralnog pupoljka, čije ćelije sporadično pokazuju standardnu nuklearnu lokalizaciju pozitivne reakcije na bojenje Ki-67 antigena.

Mali broj mezenhimskih ćelija u intersticijumu bubrega pokazuje pozitivnu reakciju na Ki-67 antigen. Ćelije epitela bubrežne karlice i bubrežnih čašica ne eksprimiraju Ki-67 antigen (Slika 5.7. c i d).



**Slika 5.7. Ekspresija Ki-67 antigena u tkivu bubrega u 13. nedelji razvoja.** a) Jaka ekspresija Ki-67 antigena prisutna je u nefrogenoj zoni; slabija imunopozitivnost uočava se u ostalom delu korteksa; epitelne ćelije urotela bubrežne karlice (zvezdica) i bubrežnih čašica ne ekspimiraju Ki-67 antigen; x 50. b) jaka imunopozitivnost uočava se u ćelijama vezikula (glava strelice), dok se pojedinačne imunopozitivne ćelije vide u ampulama ureteralnog pupoljka (strelica) i renalnim korpuskulima; apikalna površina epitelnih ćelija, pre svega, proksimalnih tubula nefrona, pokazuje jaku imunopozitivnu reakciju; x 200. c) U meduli, na poprečnim preseccima sabirnih kanala, uočavaju se retke imunopozitivne epitelne ćelije; mezenhimske ćelije u okolnom intersticijumu su imunonegativne; x 200. d) Vidi se slaba imunopozitivnost u retkim epitelnim ćelijama sabirnih kanala; x 400.

Najjača Ki-67 imunopozitivnost ispoljava se u nefrogenoj zoni, u ćelijama metanefrosnog mezenhima, nefronima u nastajanju i ampuli sabirnih tubula. Imunopozitivnost postepeno opada prema dubljim delovima korteksa i formirajućoj meduli prateći prostorni gradijent sazrevanje nefrona (Slika 5.8.)

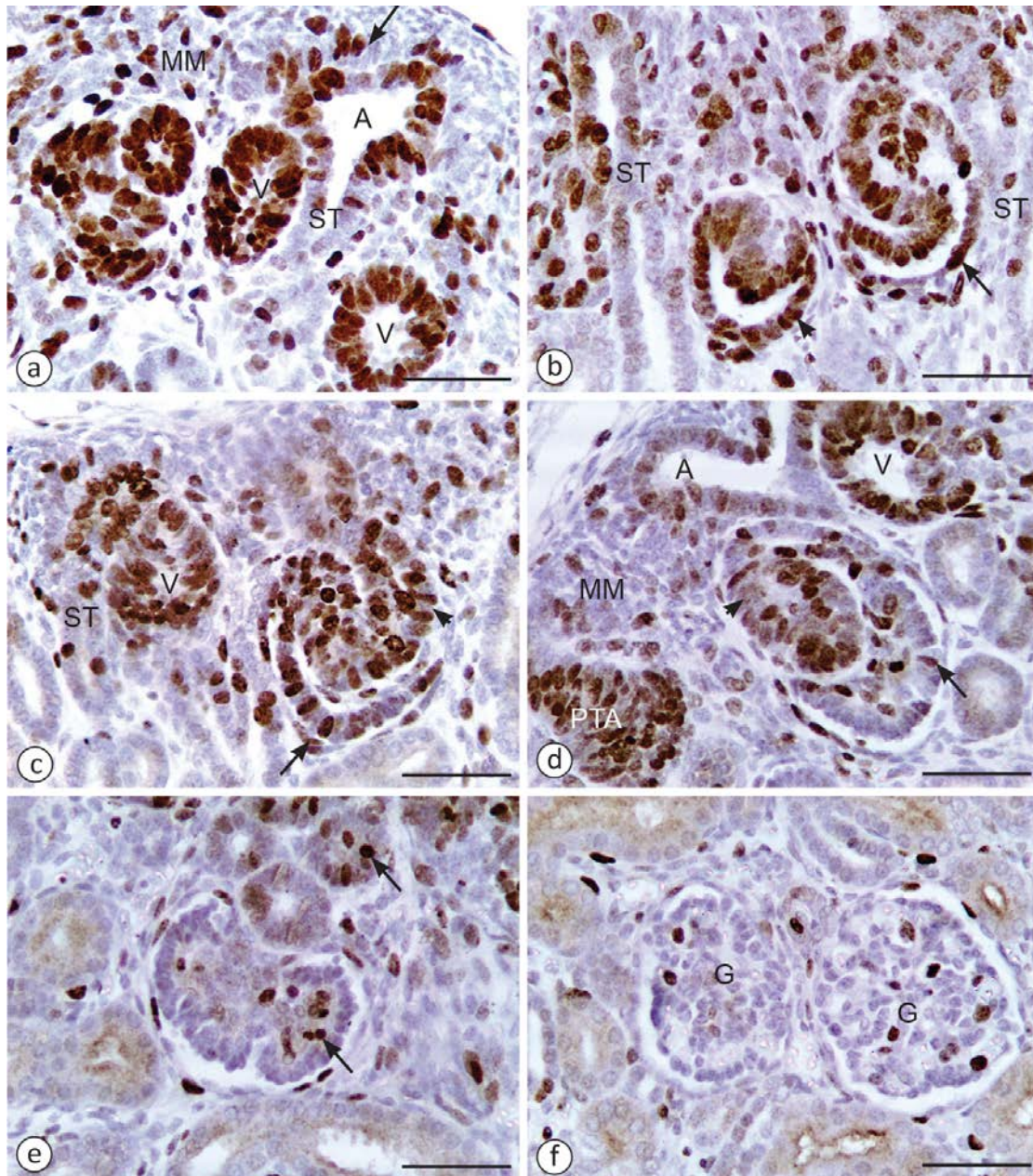


**Slika 5.8. Ekspresija Ki-67 antigena u tkivu bubrega u 15. nedelji razvoja.** Jaka ekspresija Ki-67 antigena uočava se u površinskom sloju korteksa; u dubljim delovima korteksa imunopozitivna reakcija se vidi kao kontinuirana linija u apikalnom regionu epitelnih ćelija proksimalnih tubula nefrona i u pojedinačnim ćelijama unutar renalnih korpuskula (strelica); x 100.

Unutar nefrogene zone, Ki-67 antigen eksprimiran je u brojnim mezenhimalnim progenitornim ćelijama, kako stromalnim tako i nefrogenim, ćelijama pretubularnih agregata i ampuli sabirnih tubula (Slika 5.9. a, b, c, d).

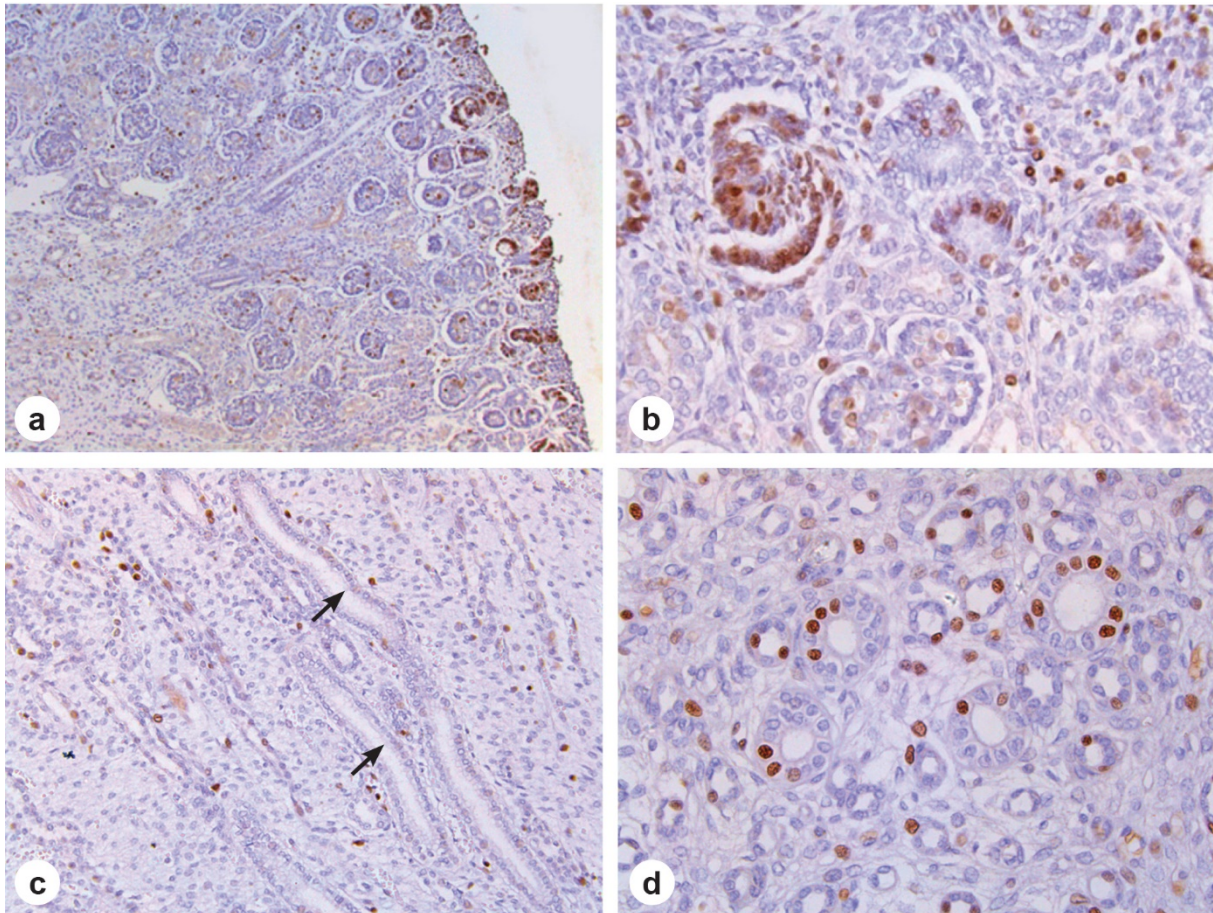
Većina ćelija vezikula, zapeta-oblikovanog telašca i ranog S-oblikovanog telašca eksprimira Ki-67 antigen (Slika 5.9. a, b i c).

Tokom daljeg razvoja S-forme nefrona, njegove konverzije u napredniji stadijum i istovremene prostorne ekspanzije prema zoni maturacije, broj Ki-67 pozitivnih ćelija postepeno se smanjuje u proksimalnom segmentu koji se diferencira u glomerul i Boumanovu kapsulu. Ki-67 nuklearni antigen eksprimira se kako u ćelijama glomerula, tako i u ćelijama parijetalnog i visceralnog lista Boumanove kapsule. Iznad glomerula koji se razvija, u srednjem i distalnom segmentu koji se diferenciraju u delove bubrežnog tubula, prisutan je primetno veći broj Ki-67 pozitivnih ćelija (Slika 5.9. c i d).



**Slika 5.9. Ekspresija Ki-67 antigena u različitim stadijumima razvoja nefrona (16. nedelja).** a) Nefrogena zona; brojne Ki-67 pozitivne ćelije (braon obojena jedra) prisutne su u metanefrosnom mezenhimu; Ki-67 pozitivne ćelije zapažaju se u ampuli sabirnog tubula i metanefrosnoj kapi (strelica); velika gustina Ki-67 pozitivnih ćelija je u vezikulama. b) Brojne ćelije nefrona u stadijumu zapeta-forme (vrh strelice) i rane S-forme (strelica) su Ki-67 imunopozitivne. c) Bubrežna vezikula nalazi se pored sabirnog tubula; brojne ćelije vezikule pokazuju Ki-67 imunopozitivnost; S-forma vidi se desno; proksimalni segment (strelica); tubularni segmenti (glava strelice). d) Nefrogena zona i deo susedne zone maturacije; jako velika gustina imunopozitivnih ćelija evidentna je u pretubularnim agregatima i vezikulama; manji broj Ki-67 pozitivnih ćelija prisutan je u delovima bubrežnog korpuskula (strelica). e) U zoni maturacije, broj Ki-67 pozitivnih ćelija je značajno smanjen u bubrežnim korpuskulima i tubulima (strelice). f) Formirani bubrežni korpuskuli dubokog dela korteksa; samo nekoliko Ki-67 pozitivnih ćelija prisutno je u bubrežnim korpuskulima i okolnim proksimalnim i distalnim tubulima. ST, sabirni tubul; A, ampula; MM, metanefrosni mezenhim; PTA, pretubularni agregat; V, vezikula; G, glomerul; (razmera = 50 $\mu$ m).

U zoni maturacije, kapilarni sistem glomerula podleže brzim razvojnim promenama i formira nezreli, ali postepeno sužen bubrežni korpuskul. Broj ćelija koje ekspimiraju Ki-67 antigen primetno opada kako u komponentama bubrežnih korpuskula tako i u okolnim tubulima (Slika 5.9. e). U dubokom delu korteksa prisutni su krupni bubežni korpuskuli sferičnog oblika. Razvijene glomerularne kapilarne petlje okružene su podocitima. Samo nekoliko Ki-67 pozitivnih ćelija je primećeno u bubrežnim korpuskulima i okolnim proksimalnim i distalnim tubulima (Slika 5.9. f).

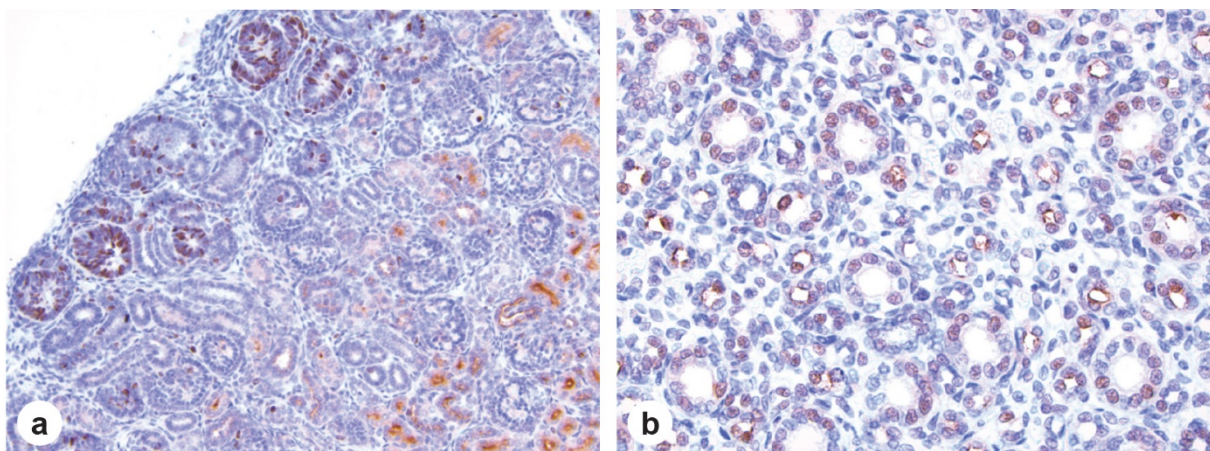


**Slika 5.10. Ekspresija Ki-67 antigena u tkivu bubrega u 22. nedelji razvoja.** a) Jaka imunopozitivnost uočava se u najpovršnijem delu nefrogene zone; manji broj imunopozitivnih ćelija je prisutno u korteksu i meduli; x 100. b) Deo nefrogene zone pokazuje ekspresiju Ki-67 antigena u ćelijama S-forme nefrona i renalnom korpuskulu u stadijumu sazrevanja; x 400; c) U meduli, epitelne ćelije sabirnih kanala (strelice) uglavnom su Ki-67 imunonegativne; ćelije intersticijuma sporadično ekspimiraju Ki-67 antigen; x 200. d) Medula bubrega; na poprečnom preseku, pojedinačne epitelne ćelije sabirnih kanala jako ekspimiraju Ki-67 antigen; u epitelnim ćelijama tankih i debelih delova Henleove petlje uočava se sporadična i slabija imunopozitivna reakcija; x 400.

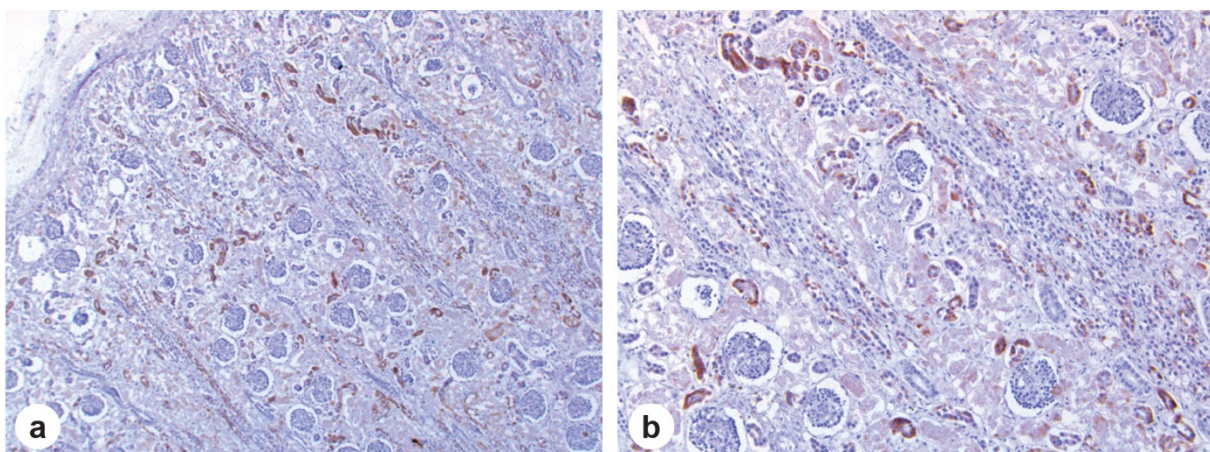
Do 21. nedelje razvoja bubrega, najintenzivnija Ki-67 imunopozitivna reakcija zadržava se u nefrogenoj zoni. Od 21. do 28. nedelje razvoja slabi intenzitet Ki-67 imunopozitivnosti u tkivu bubrega.



Samo malobrojne mezenhimske ćelije na površini nefrogene zone pokazuju slabu ekspresiju Ki-67 antigena, dok su nešto brojnije imunopozitivne ćelije prisutne unutar nezrelih renalnih korpuskula (Slika 5.10. a i b). U formiranim renalnim korpuskulima raspoređenim jukstamedularno Ki-67 antigen ekspimiraju pojedinačne ćelije glomerula, koje po lokalizaciji odgovaraju endotelnim ćelijama glomerularnih kapilara (Slika 5.10. b). Slaba pozitivna reakcija je i dalje prisutna u apikalnom regionu epitelnih ćelija proksimalnih tubula, dok su ostale tubularne strukture uglavnom Ki-67 imunonegativne. Medulu karakterišu pojedinačne imunopozitivne ćelije sabirnih kanala i Henleove petlje i mezenhimske ćelije intersticijuma koje sporadično ekspimiraju Ki-67 antigen (Slika 5.10. c i d).



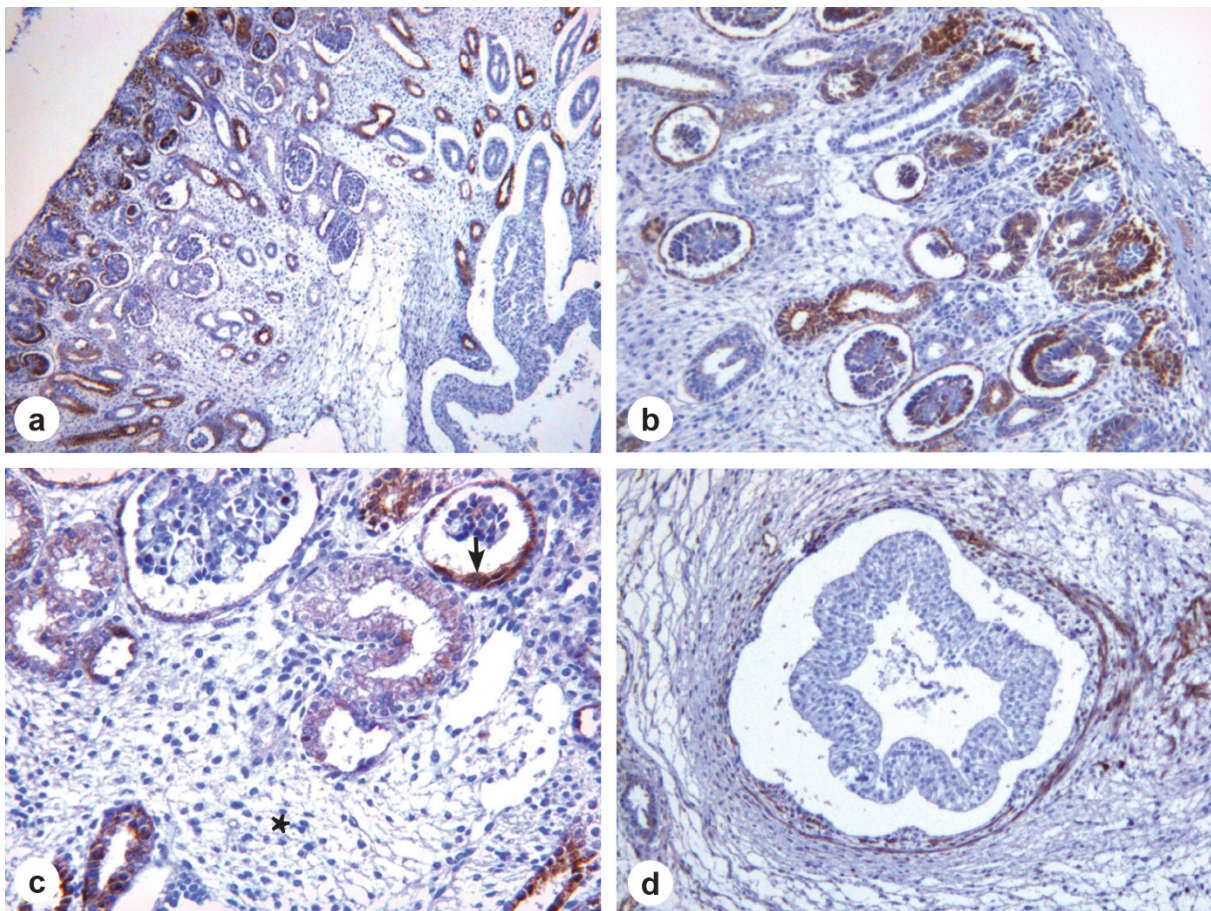
**Slika 5.11. Ekspresija Ki-67 antigena u tkivu bubrega u 28. nedelji razvoja.** a) Imunopozitivna reakcija je najjača u nezrelim formama nefrona u redukovanoj nefrogenoj zoni; x 200. b) U meduli, imunopozitivne ćelije pripadaju sabirnim kanalima i užim delovima Henleove petlje; x 400.



**Slika 5.12. Ekspresija Ki-67 antigena u tkivu bubrega u 36. nedelji razvoja.** a) Slaba sitnozrnasta citoplazmatska Ki-67 imunopozitivna reakcija uočava se u epitelnim ćelijama distalnih tubula nefrona i epitelnim ćelijama sabirnih kanala koji formiraju medularne zrake; x 100. b) U bubrežnim korpuskulima nema ekspresije Ki-67 antigena; x 200.

Tokom 28. nedelje razvoja nefrogeneza je još uvek u toku. U skladu sa ovom karakteristikom, najjača imunopozitivna reakcija prisutna je u tankom perifernom sloju nefrogene zone (Slika 5.11. a). U meduli imunopozitivnost pokazuju pojedinačne ćelije sabirnih kanala i užih delova Henleove petlje (Slika 5.11. b). Između 32. i 36. nedelje razvoja nestaju ampule i iščezava nefrogena zona. U bubregu donesenog novorođenčeta, imunopozitivna reakcija se može uočiti samo u pojedinačnim ćelijama svih strukturnih delova bubrega (Slika 5.12. a i b).

### 5.2.2. Imunoekspresija Bcl-2



**Slika 5.13. Ekspresija Bcl-2 proteina u tkivu bubrega u 13. nedelji razvoja.** a) Jaka imunopozitivna reakcija uočava se u ćelijama metanefrosnog blastema i ćelijama parijetalnog i visceralnog lista Boumanove kapsule nezrelih renalnih korpuskula; x 100; b) Ćelije ampula ureteralnog pupoljka su Bcl-2 imunonegativne; x 200. c) U formiranim renalnim korpuskulima Bcl-2 imunopozitivnost je prisutna samo u parijetalnom listu (strelica) Boumanove kapsule; intersticijske ćelije (zvezdica) su uglavnom imunonegativne; x 320. d) Ćelije urotela bubrežnih čašica ne ekspresiraju Bcl-2 protein; okolne mezemhimne ćelije sporadično ekspresiraju Bcl-2 protein; x 160.

U periodu od 13. do 15. nedelje razvoja, pored Bcl-2-imunopozitivnosti u ćelijama metanefrosnog mezenhima koji je prisutan subkapsularno, ekspresija Bcl-2 proteina uočava se

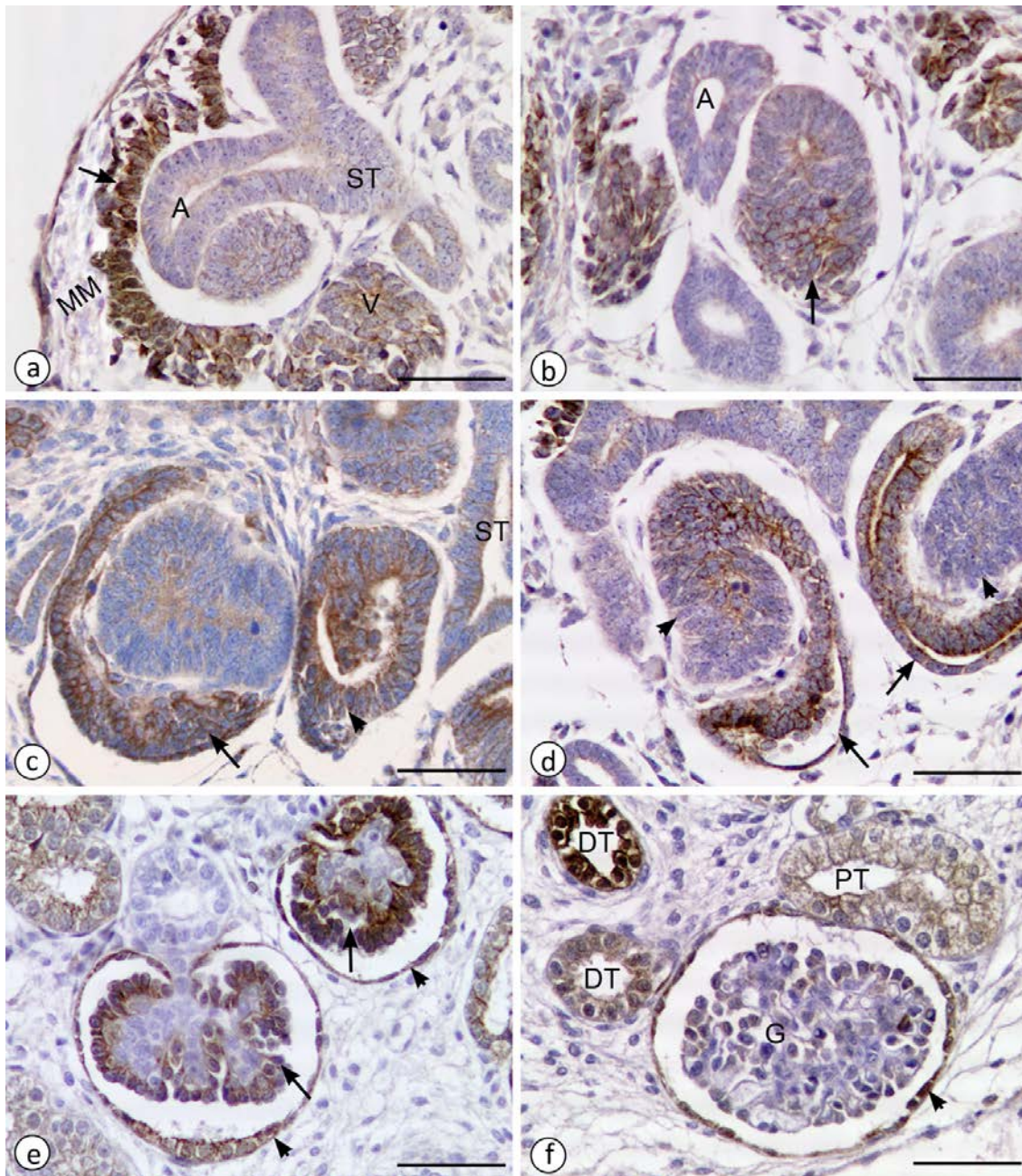
i u dubljim delovima korteksa i to u parijetalnom i visceralnom listu Boumanove kapsule bubrežnih korpuskula nezrelih nefrona (Slika 5.13. a, b i c). Intersticijske mezenhimske ćelije uglavnom ne ekspimiraju Bcl-2 protein (Slika 5.13. c). Ćelije urotela bubrežne karlice i bubrežnih čašica, slično intersticijskim ćelijama, nisu imunoreaktivne za Bcl-2 protein (Slika 5.13. d).

Jaku Bcl-2 imunopozitivnost pokazuju samo indukovane nefrogene mezenhimske ćelije koji u vidu polumesečastog telašca ili kape okružuju vrhove ampula sabirnih kanala. Stromalne mezenhimske ćelije su, uglavnom, Bcl-2 imunonegativne, kao i ćelije u ampulama sabirnih tubula (Slika 5.14 a). Slično indukovanim mezenhimijskim ćelijama, Bcl-2 se ekspimirira jako u ćelijama pretubularnih agregata, vezikulama i zapeta-formama (Slika 5.14 b, c).

Nakon prodiranja kapilara i mezenhimnih ćelija iz okolne strome u vaskularnu pukotinu formiranu između ćelija proksimalnog i srednjeg segmenta, nefron ulazi u stadijum S-forme i nastavlja da se oblikuje. U proksimalnom segmentu S-forme, epitelne ćelije su raspoređene u dva sloja. Bcl-2 protein se jako ekspimirira u citoplazmi ćelija oba sloja, gornjem ili visceralnom i donjem ili parijetalnom. Ekspresija progresivno opada prema tubularnim segmentima, čije ćelije veoma slabo ekspimiraju Bcl-2 (Slika 5.14 c, d).

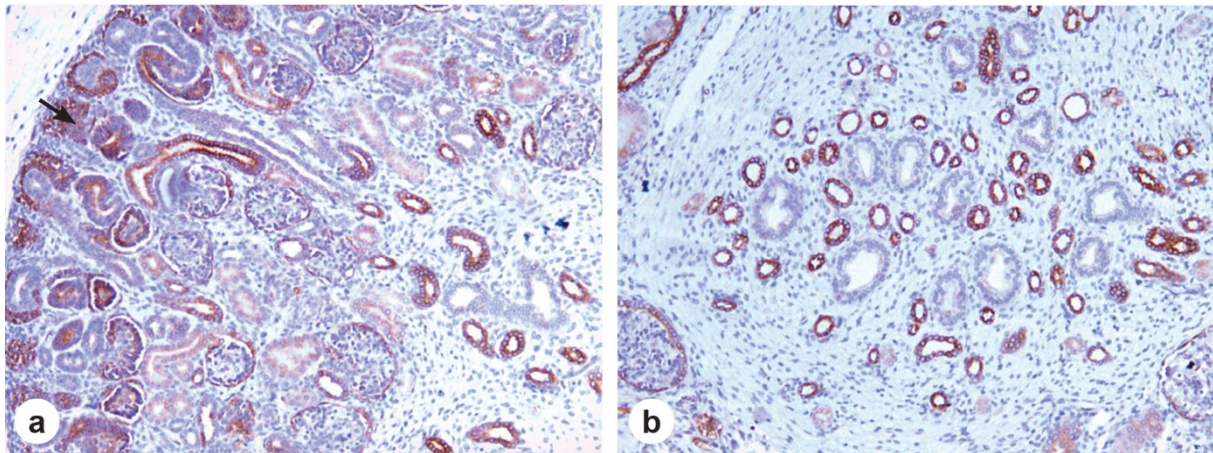
U susednoj zoni maturacije, jaka Bcl-2 imunopozitivnost je još uvek prisutna je u citoplazmi primitivnih podocita koji u jednom redu okružuju glomerul koji se razvija. Nešto niža ekspresija, jaka do umerena, primećuje se u sloju parijetalnih epitelnih ćelija Boumanove kapsule. Suprotno, ćelije unutar razvijajućeg glomerula ne pokazuju Bcl-2 imunoreaktivnost (Slika 5.14. e).

Tokom dalje diferencijacije korpuskularne i tubularne porcije nefrona, lokalizacija i nivoi ekspresije Bcl-2 proteina se menjaju. Podociti koji okružuju formirane glomerularne kapilarne petlje ne ekspimiraju Bcl-2. Umerena do slaba ekspresija ograničena je na parijetalni sloj Boumanove kapsule.



**Slika 5.14. Ekspresija Bcl-2 u različitim stadijumima razvoja nefrona (14. nedelja).** a) Jaka Bcl-2 imunoreaktivnost zapaža se u indukovanom mezenhimu metanefrosne kape i vezikuli; ampule ureternog pupoljka su imunonegativne. b) Jaka Bcl-2 imunoreaktivnost je prisutna u ćelijama pretubularnih agregata i ćelija vezikule (strelica). c) Jaku Bcl-2 imunoreaktivnost pokazuju ćelije zapeta-forme (glava strelice) i ćelije distalnog segmenta S-forme (strelica). d) S-forma nefrona u nastajanju presečena je duž uzdužne ose; jako Bcl-2 imunobojenje pokazuju ćelije parijetalnog (strelica) i visceralnog sloja distalnog segmenta; Bcl-2 se slabije eksprimira u srednjem (vrh strelice) i proksimalnom segmentu. e) Dva glomerula u stadijumu maturacije; Bcl-2 se jako eksprimira u sloju nezrelih podocita (strelica); ćelije parijetalnog lista Boumanove kapsule pokazuju jaku do umerenu ekspresiju (vrh strelice). f) Formirani bubrežni korpuskul lokalizovan u dubokom delu korteksa; parijetalni epitel Boumanove kapsule (vrh strelice) i epitel proksimalnih tubula pokazuju umerenu do slabu Bcl-2 imunoreaktivnost; u distalnim tubulima Bcl-2 imunoreaktivnost je umerena do jaka. ST, saccularni tubul; A, ampula; MM, metanefrosni mezenhim; G, glomerul; PT, proksimalni tubul; DT, distalni tubul; (razmera = 50 $\mu$ m).

Pored toga, okolni proksimalni tubuli pokazuju umerenu do slabu Bcl-2 imunoreaktivnost. Jaka do umerena imunoreaktivnost primećuje se u distalnim tubulima (Slika 5.14. f)



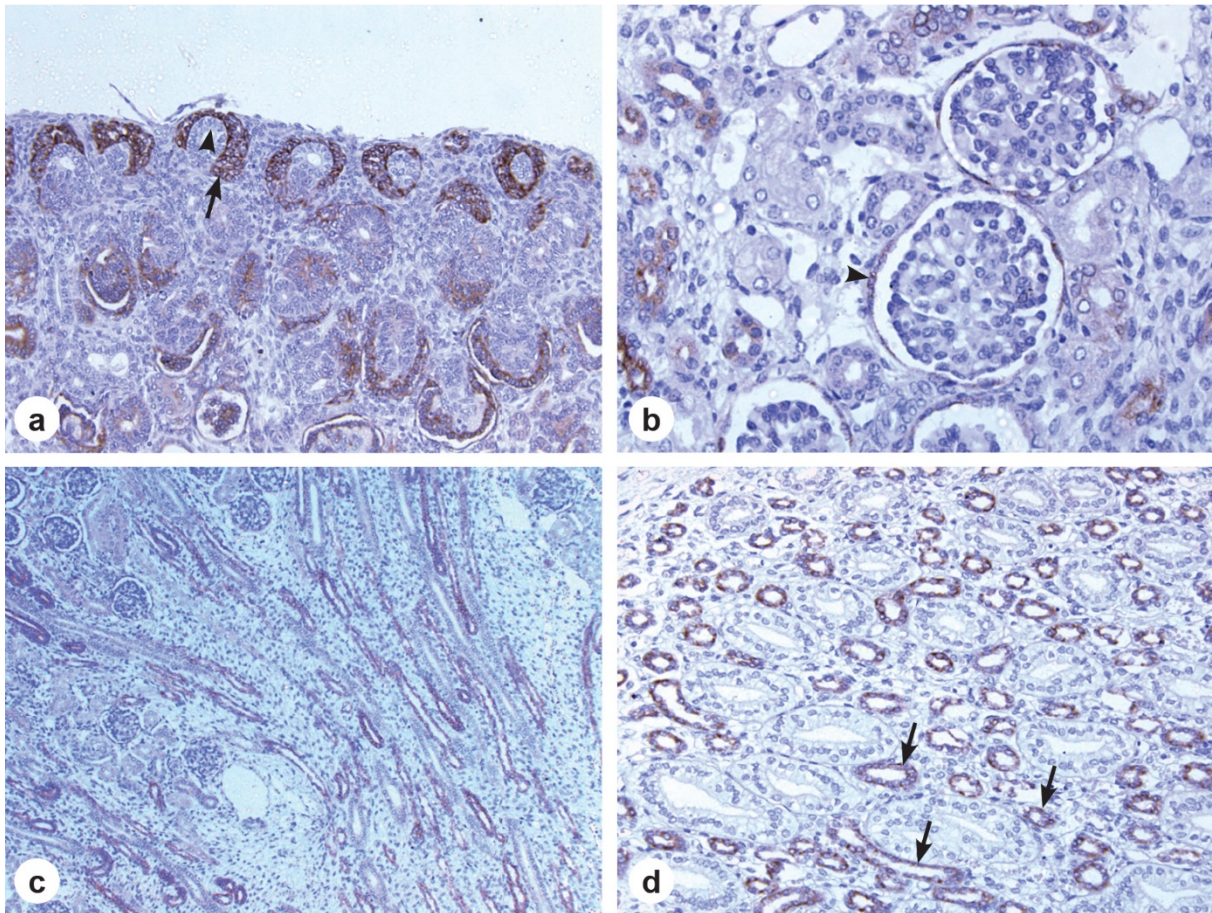
**Slika 5.15. Ekspresija Bcl-2 proteina u tkivu bubrega u 15. nedelji razvoja.** a) Intenzitet imunopozitivne reakcije se progresivno smanjuje od nefrogene zone do jukstamedularne zone korteksa i medule; x 160; b) U meduli se uočava ekspresija Bcl-2 proteina u tubularnim strukturama, dok su intersticijske mezenhimske ćelije i ćelije epitela bubrežnih čašica Bcl-2 imunonegativne; x 160.

U periodu od 15. do 19. nedelje starosti, jaka Bcl-2 imunopozitivnost prisutna je i dalje u ćelijama indukovano metanefrosnog mezenhima i manjeg intenziteta u ćelijama različitih morfoloških stadijuma razvijajućih nefrona (Slika 5.15. a). Epitelne ćelije tubularnih struktura u formirajućoj meduli su Bcl-2 imunopozitivne (Slika 5.15. b).

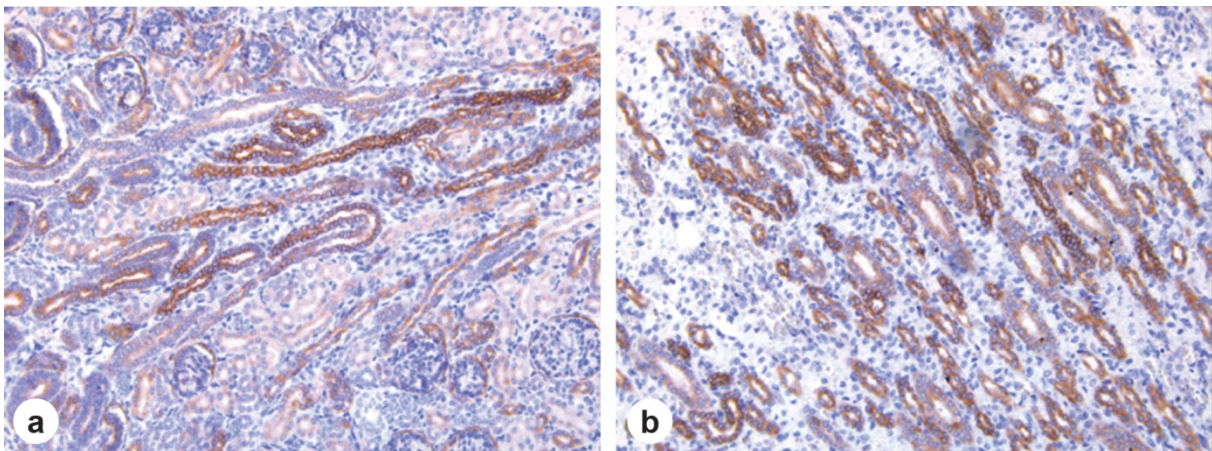
U dubljim delovima bubrežnog korteksa, gde su prisutni formirani nefroni, ćelije parijetalnog lista Boumanove kapsule renalnih korpuskula zadržavaju ekspresiju Bcl-2 proteina, dok se u visceralnom listu, samo sporadično, mogu uočiti retke Bcl-2 imunopozitivne ćelije (Slika 5.15. a).

U bubregu fetusa oko 22. nedelje razvoja, jaka imunopozitivnost se zadržava u metanefrosnom mezenhimu (Slika 5.16. a), dok dublje u korteksu, tubuli nefrona sadrže pojedinačne ćelije koje slabo ekspimiraju Bcl-2 protein (Slika 5.16. b).

Intenzivna ekspresija Bcl-2 proteina može se uočiti u pojedinim sabirnim kanalima koji formiraju medularne zrake (Slika 5.16. c). Medulu karakteriše Bcl-2 imunopozitivnost ćelija širih delova Henleove petlje, dok u sabirnim kanalima nema ekspresije Bcl-2 proteina (Slika 5.16. d). Intersticijske stromalne ćelije su, uglavnom, Bcl-2 imunonegativne.

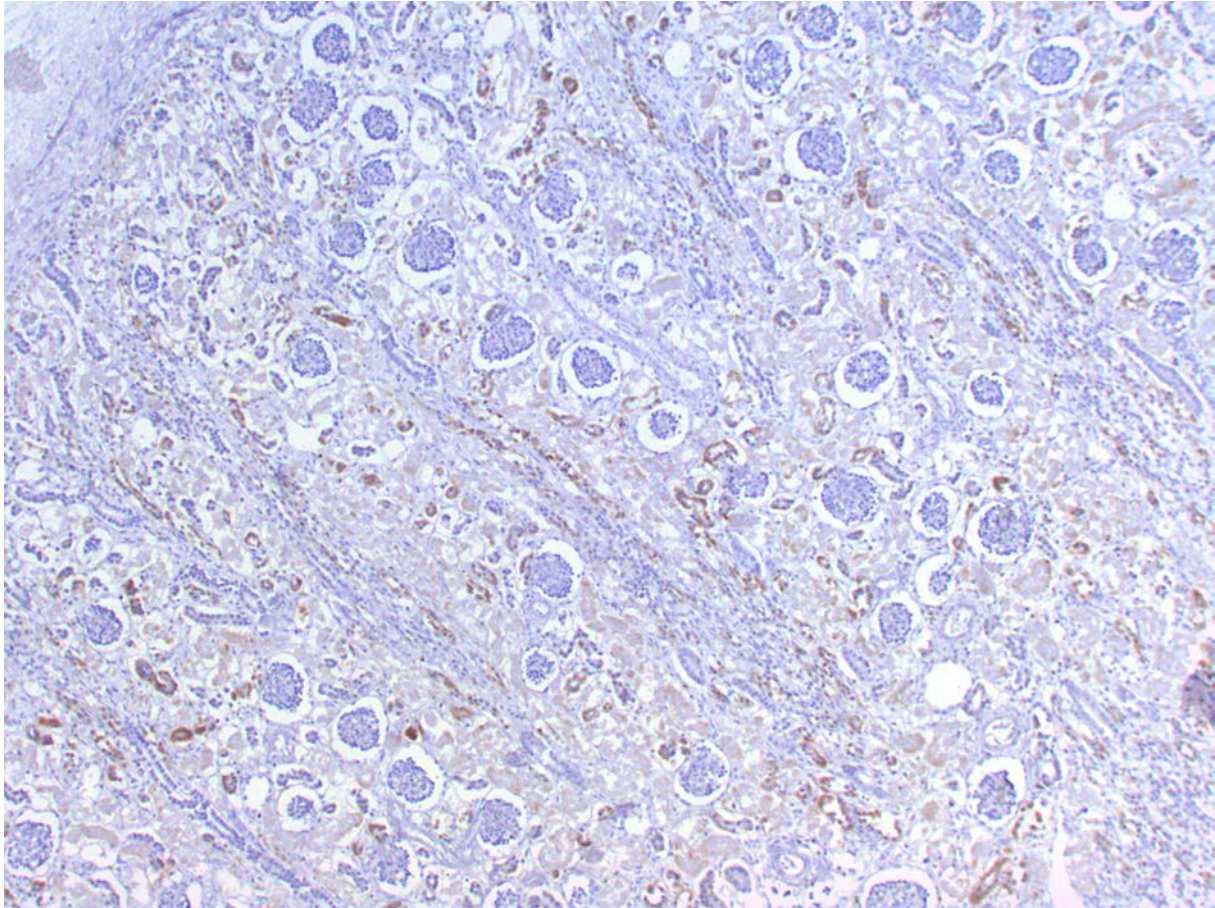


**Slika 5.16. Ekspresija Bcl-2 proteina u tkivu bubrega u 22. nedelji razvoja.** a) Jaka imunopozitivnost prisutna je u nefrogenoj zoni (strelica); ampule ureteralnog pupoljka su imunonegativne (glava strelice); x 200. b) Imunopozitivnost je karakteristična samo za parijetalni list (glava strelice) Boumanove kapsule; x 400. c) Tubularne strukture u korteksu i meduli pokazuju razlike u intenzitetu i lokalizaciji ekspresije Bcl-2 proteina; x 100. d) U meduli, Bcl-2 ekspresija se uočava u epitelnim ćelijama užih i širih delova Henleove petlje (strelice); sabirni kanali su Bcl-2 imunonegativni; x 200.



**Slika 5.17. Ekspresija Bcl-2 proteina u tkivu bubrega u 28. nedelji razvoja.** a) Umerena do slaba imunopozitivnost prisutna je u parijetalnom listu Boumanove čaure jukstamedularnih nefrona; epitel sabirnih kanala je umereno imunopozitivan; x 200. b) Epitelne ćelije sabirnih kanala pokazuju imunopozitivnu reakciju umerenog intenziteta; x 400.

Nakon 28. nedelje razvoja, a pre svega između 32. i 36. nedelje, sa nestajanjem nefrogene zone dolazi do smanjenja ekspresije Bcl-2 proteina u korteksu (Slika 5.17. a i Slika 5.18.) i u meduli (Slika 5.17. b).

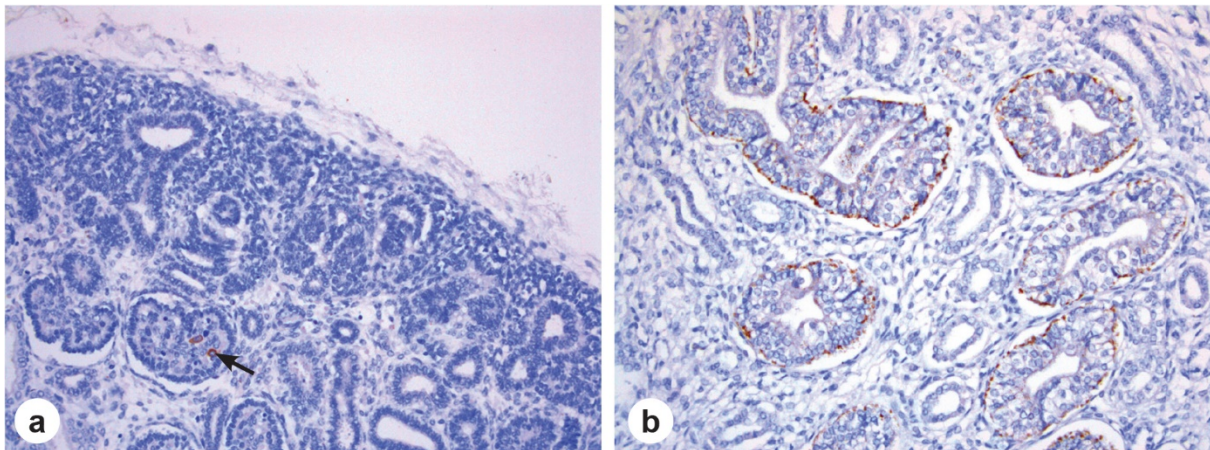


**Slika 5.18. Ekspresija Bcl-2 proteina u tkivu bubrega u 36. nedelji razvoja.** Čelije distalnih tubula i malobrojnih sabirnih tubula koji grade medularne zrake pokazuju Bcl-2 imunopozitivnu reakciju slabog intenziteta; veoma slaba imunopozitivnost prisutna je u parijetalnom listu Boumanove čaure; zapaža se odsustvo imunopozitivne reakcije u glomerulima i proksimalnim tubulima. x 100.

### 5.2.3. Imunoekspresija Bax

U 13. nedelji razvoja, veoma slaba citoplazmatska Bax imunopozitivna reakcija uočena je u retkim pojedinačnim ćelijama unutar nefrogene zone i pojedinačnim ćelijama unutar bubrežnih korpuskula i malobrojnim tubulima (Slika 5.19. a).

Na periferiji urotela formirajućih bubrežnih čašica uočena je Bax imunopozitivna reakcija (Slika 5.19. b). I u narednim periodima razvoja, u svim bubrežima kod kojih je nefrogeneza bila u toku, ćelije koje slabo ekspimiraju Bax pojedinačno su rasute kroz spoljašnji korteks u kome se nefroni razvijaju i sazrevaju.

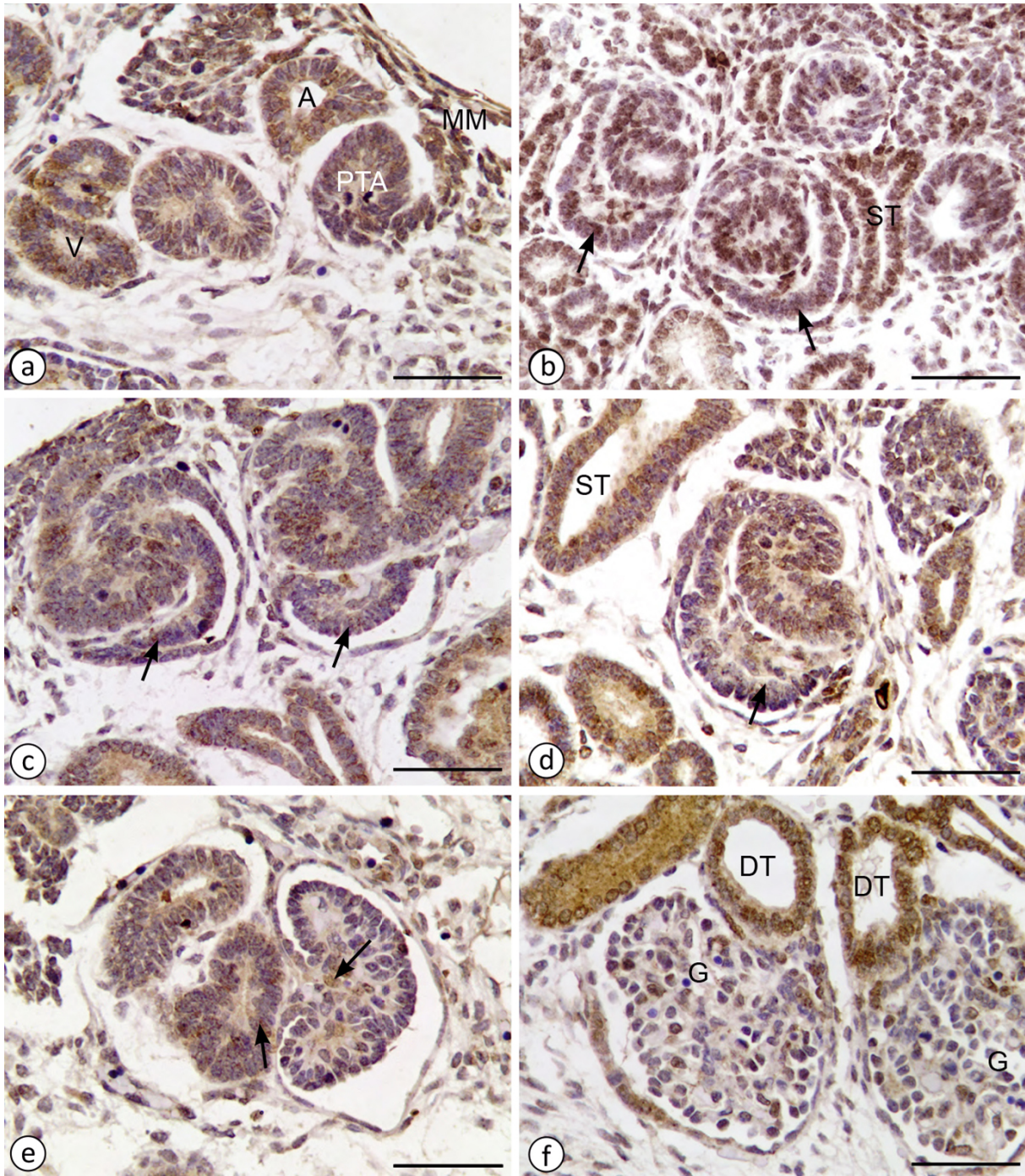


**Slika 5.19. Ekspresija Bax proteina u tkivu bubrega u 13. nedelji razvoja.** a) Čelije meta-nefrosnog mezenhima i parenhimskih struktura u spoljašnjem delu nefrogene zone su većinom Bax imunonegativne; retke rasute pojedinačne ćelije pokazuju slabu Bax imunoreaktivnost (strelica); x 200; b) Imunopozitivna reakcija u vidu sitnozrnastih depoa uočava se neposredno uz bazalni sloj urotela bubrežnih čašica; x 400.

Analiza komponenata nefrogene zone pokazala je da se Bax slabo eksprimira u ćelijama raštrkanim unutar metanefrosnog mezenhima, kako neindukovanom tako i indukovanom, pretubularnim agregatima, ali i ampulama sabirnih tubula (Slika 5.20. a). U ranim stadijuma razvijajućih nefrona, stadijumu vezikule, zapeta- i S-formama, Bax pozitivne ćelije su, takođe, prisutne pojedinačno ili u gomilicama koje sadrže dve do tri ćelije. Imunopozitivne ćelije su ravnomerno raspoređene i u korpuskularnom i tubularnom segmentu tranzitnih oblika nefrona (Slika 5.20. b i c). Tokom prostorne ekspanzije nefrona prema zoni maturacije i morfološkog uobličavanja nefrona, niski nivoi Bax ekspresije se održavaju (Slika 5.20. d i e). Samo nekoliko ćelija unutar glomerula i u blizini vaskularnog pola Boumanove čaure pokazuje slabu Bax imunoekspresiju. Iznad glomerula u razvoju, u nezrelim tubulima, slaba citoplazmatska Bax imunopozitivna reakcija još uvek je prisutna u pojedinačnim ćelijama tubularnog epitela (Slika 5.20. e).

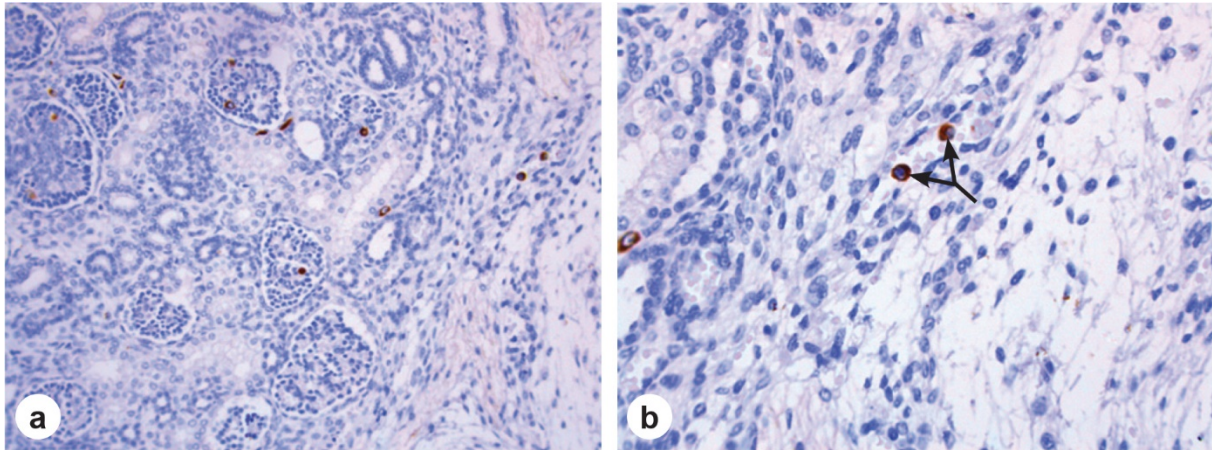
Tokom dalje diferencijacije nefrona, lokalizacija i nivoi ekspresije Bax proteina se menjaju. U unutrašnjoj, jukstamedularnoj zoni korteksa, korpuskularna i tubularna porcija nefrona pokazuju karakteristike definitivnih nefrona. Primećeno je intenzivnije citoplazmatsko Bax imunobojenje. Brojne epitelne ćelije u proksimalnim i distalnim tubulima pokazuju umerenu imunoreaktivnost. Bubežni korpuskuli su krupni, sferičnog oblika, sa razvijenim kapilarnim petljama koje okružuju podociti i izraženom lobulacijom glomerularnih kapilara. Ipak, ćelije bubrežnih korpuskula u ovom stadijumu razvoja ne ekspimiraju Bax protein.





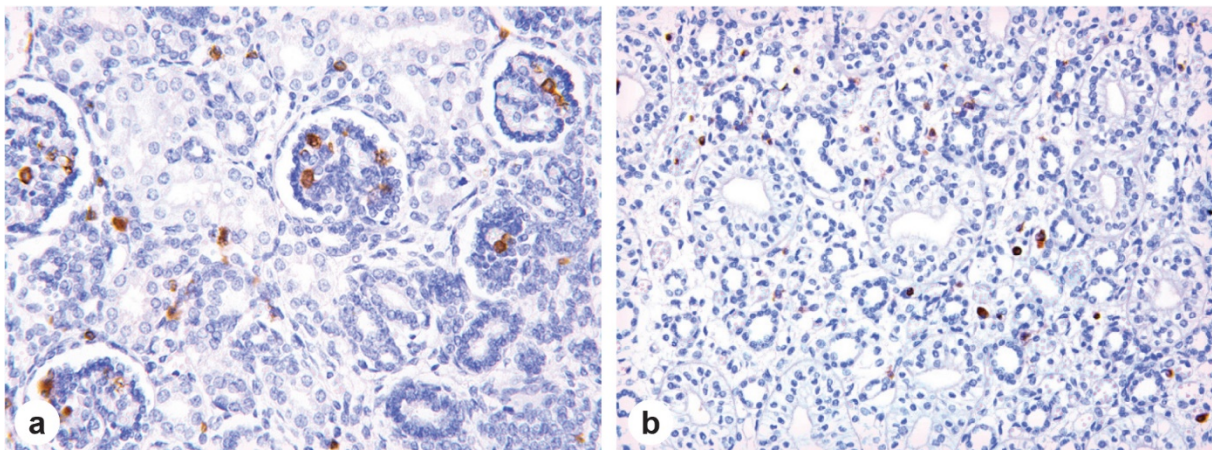
**Slika 5.20. Ekspresija Bax u različitim stadijumima razvoja nefrona (14. nedelja).** a) Veoma slaba Bax imunoreaktivnost prisutna je u pojedinačnim ćelijama raštrkanim unutar metanefrosnog mezenhima, pretubularnim agregatima, vezukulama i ampulama sabirnih tubula b) i c) S-forme nefrona; pojedinačne ćelije rasute u svim segmentima nefrona pokazuju slabu Bax imunoreaktivnost (strelice). d) i e) U fazi sazrevanja nefrona, slaba Bax imunoreaktivnost prisutna je u malobrojnim ćelijama unutar glomerula i u ćelijama tubularnog epitela (strelice). f) Na slici su prikazana dva formirana glomerula; umerena Bax imunoreaktivnost je vidljiva u epitelu okolnih tubula. ST, sabirni tubul; A, ampula; MM, metanefrosni mezenhim; PTA, pretubularni agregat; V, vezikula; G, glomerul; DT, distalni tubul; (razmera = 50 $\mu$ m).

Do 22. nedelje razvoja, distribucija Bax imunopozitivnih ćelija i nivoi ekspresije se održavaju. Ipak, zapažen je nešto veći broj diferentovanih renalnih korpuskula u unutrašnjem sloju korteksa, u poređenju sa mlađim renalnim korpuskulima u zoni maturacije (Slika 5.21. a). Bax ekspimiraju i malobrojne ćelije u kortikalnoj stromi (Slika 5.21. b).



**Slika 5.21. Ekspresija Bax proteina u tkivu bubrega u 14. nedelji razvoja.** a) Imunopozitivna reakcija uočava se samo u pojedinačnim ćelijama unutar renalnih korpuskula u zoni maturacije i jukstamedularnoj zoni korteksa; x 200. b) U kortikalnoj stromi, u lumenu krvnog suda (račvasta strelica) vide se dve imunopozitivne ćelije; x 400.

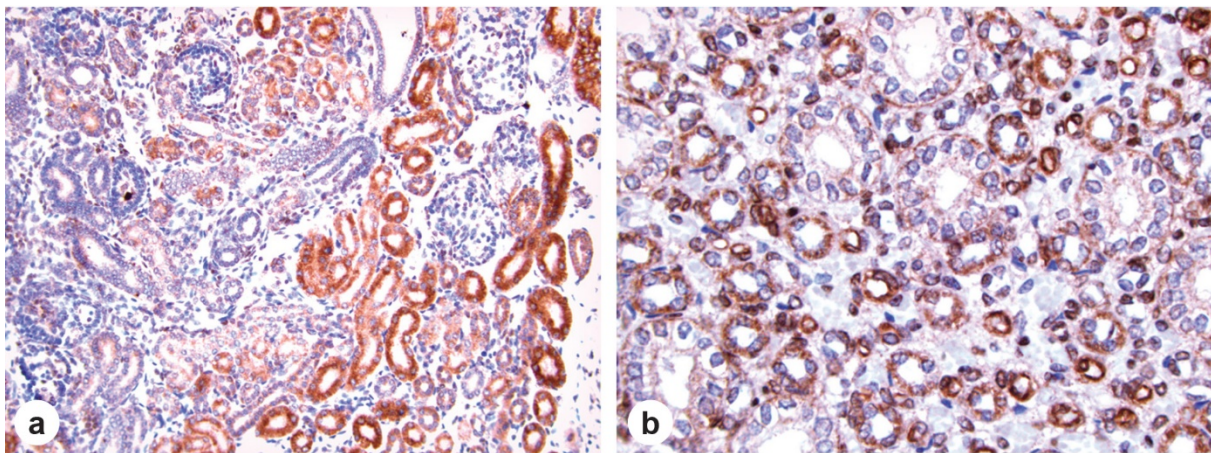
Od 22. nedelje razvoja, Bax imunopozitivne ćelije su prisutne kao pojedinačne unutar glomerula i, retko, u visceralnom listu Boumanove kapsule, dok su ćelije parijetalnog lista Boumanove kapsule Bax imunonegativne.



**Slika 5.22. Ekspresija Bax proteina u tkivu bubrega u 22. nedelji razvoja.** a) Imunopozitivnost se uočava u malobrojnim ćelijama renalnih korpuskula i retkim kortikalnim stromalnim ćelijama; x 320; b) U meduli, imunopozitivnost pokazuju retke stromalne ćelije, dok su sabirni tubuli i papilarni kanali Bax imunonegativni; x 200.

Ćelije proksimalnih i distalnih tubula nefrona pokazuju slabu do umerenu imunopozitivnost (Slika 5.22. a). U meduli bubrega, ćelije sabirnih kanala i Henleove petlje su

uglavnom Bax-imunonegativne; u pojedinačnim stromalnim ćelijama i kore i medule uočena je imunopozitivna reakcija (Slika 5.22. b).



**Slika 5.23. Ekspresija Bax proteina u tkivu bubrega u 28. nedelji razvoja.** a) Uočava se umerena do jaka imunopozitivna reakcija u epitelnim ćelijama proksimalnih i distalnih tubula nefrona; bubrežni korpuskuli su imunonegativni; x 200. b) Na preseku medule bubrega jaka imunopozitivnost je prisutna u ćelijama užih i širih delova Henleovih petlji; u ćelijama sabirnih kanala imunopozitivnost je veoma slaba ili izostaje; x 400.

Od 28. do 36. nedelje razvoja, kortikalne strukture u bubregu, čija morfologija odgovara izgledu zrelog bubrega, pokazuju umerenu do jaku Bax imunopozitivnu reakciju u vidu mrko obojenih depoa u citoplazmi epitelnih ćelija proksimalnih i distalnih tubula nefrona, dok su renalni korpuskuli Bax imunonegativni (Slika 5.23. a). U meduli, epitelne ćelije širih i užih delova Henleove petlje su jako Bax imunopozitivne, dok u sabirnim kanalima uglavnom nema, ili je prisutna slaba sitnozrnasta imunopozitivna reakcija (Slika 5.23. b). I u kori i u meduli uočene su brojne Bax imunopozitivne stromalne ćelije.

### 5.3. MORFOMETRIJSKA ANALIZA

Rezultati morfometrijskih merenja potvrđuju rezultate histološke analize o prisustvu značajno šire zone nefrogeneze kod mlađih fetusa i debljem korteksu kod starijih fetusa. Vrednosti prosečne širine nefrogene zone, broja generacija glomerula i prosečne debljine bubrežnog korteksa u različitim periodima gestacije prikazane su u Tabeli 5.2. Kod najmlađih fetusa, starosti od 13–16 nedelja, prosečna širina nefrogene zone iznosi  $253,86 \pm 19,85 \mu\text{m}$ . Sa porastom GS i napredovanjem nefrogeneze, širina nefrogene zone pokazuje tendenciju opadanja do perioda od 33–36 nedelja, kada se beleži najniža prosečna vrednost od  $114,33 \pm 10,26 \mu\text{m}$ .

**Tabela 5.2.** Varijacije prosečne širine nefrogene zone, broja generacija glomerula i debljine korteksa bubrega fetusa različite gestacijske starosti

Gestacijska starost (nedelje)	ŠNZ ( $\mu\text{m}$ )	BGG	DK ( $\mu\text{m}$ )
13–16	253,86 $\pm$ 19,85 (257,00)	3,16 $\pm$ 0,48 (3,10)	KMS nije definisan
17–20	242,88 $\pm$ 22,66 (241,00)	4,06 $\pm$ 0,47 (3,95)**	954,88 $\pm$ 58,05 (966,00)
21–24	221,75 $\pm$ 14,89 (223,50)*	4,66 $\pm$ 0,44 (4,70)**	1072,88 $\pm$ 78,89 (1070,00)**
25–28	181,00 $\pm$ 27,39 (189,00)**	5,45 $\pm$ 0,62 (5,60)**	1264,00 $\pm$ 69,80 (1277,00)**
29–32	147,33 $\pm$ 17,21 (153,00)	6,67 $\pm$ 0,71 (6,80)*	1346,00 $\pm$ 402,34 (1221,00)
33–36	114,33 $\pm$ 10,26 (117,00)*	7,53 $\pm$ 0,40 (7,60)	1395,67 $\pm$ 314,99 (1242,00)
37–40	Nema NZ	8,32 $\pm$ 0,66 (8,20)	1586,20 $\pm$ 196,12 (1557,00)

Vrednosti ispitivanih parametara prikazane su kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (medijana); \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ , statistički značajna razlika u odnosu na prethodnu starosnu grupu; ŠNZ – širina nefrogene zone; BGG – broj generacija glomerula; DK – debljina korteksa; NZ – nefrogena zona; KMS – kortikomedularni spoj.

Studentovim t-testom nezavisnih uzoraka utvrđeno je statistički značajno smanjenje širine nefrogene zone u odnosu na prethodnu starosnu grupu na nivou  $p < 0,05$  u periodu od 21–24 nedelja i na nivou  $p < 0,01$  u periodu od 25–28 nedelja, što ukazuje na veliki potencijal bubrega prema stvaranju novih nefrona u ovim gestacijskim periodima. Statistički značajno smanjenje prosečne širine nefrogene zone u odnosu na prethodnu starosnu grupu na nivou  $p < 0,05$ , ponovo je zabeleženo u periodu od 33–36 nedelja. Kod donesenih plodova, u periodu od 37–40 nedelja, nefrogena zona nije prisutna na površini korteksa što ukazuje na gubitak potencijala prema stvaranju novih nefrona.

Suprotno smanjenju širine nefrogene zone, broj generacija glomerula i debljina korteksa povećavaju se tokom razvoja. Broj generacija glomerula povećava se od  $3,16 \pm 0,48$  u periodu od 13–16 nedelja do  $8,32 \pm 0,66$  u periodu od 37–40 nedelja, statistički značajno na nivou  $p < 0,01$

u periodima od 17-20, 21-24 i 25-28 nedelja i na nivou  $p < 0,05$  u periodu od 37-40 nedelja. Prosečna debljina bubrežnog korteksa povećava se od  $954,88 \pm 58,05 \mu\text{m}$  u periodu od 17-20 nedelja do  $1586,20 \pm 196,12 \mu\text{m}$  u periodu od 37-40 nedelja. Studentovim t-testom utvrđeno je statistički značajno povećanje ( $p < 0,01$ ) prosečne debljine korteksa u odnosu na prethodnu starosnu grupu u periodu od 21-24 nedelja i periodu od 25-28 nedelja.

Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) primenjena sa ciljem da se utvrdi zavisnost vrednosti ispitivanih parametara od pripadnosti starosnim grupama pokazala je da GS predstavlja statistički značajan prediktor širine nefrogene zone ( $F(5,27) = 33,56$ ;  $p = 0,000$ ), broja generacija glomerula ( $F(6,31) = 69,48$ ;  $p = 0,000$ ) i debljine korteksa ( $F(5,25) = 10,22$ ;  $p = 0,000$ ) (Tabela 5.3).

**Tabela 5.3.** Rezultati analize varijanse vrednosti širine nefrogene zone, broja generacija glomerula i debljine bubrežnog korteksa

Parametar	F	p
<i>ŠNZ</i>	33,56	<0,001***
<i>BGG</i>	69,48	<0,001***
<i>DK</i>	10,22	<0,001***

\*\*\* –  $p < 0,001$  (ANOVA)

*ŠNZ* – širina nefrogene zone; *BGG* – broj generacija glomerula; *DK* – debljina korteksa.

Post hoc testovima obavljeni su nizovi poređenja i naknadno utvrđene razlike između svih mogućih starosnih grupa ponaosob. U tabeli 5.4. prikazani su rezultati višestrukih poređenja vrednosti širine nefrogene zone, broja generacija glomerula i debljine bubrežnog korteksa. Naknadna poređenja vrednosti širine nefrogene zone i broja generacija glomerula primenom Tukey HSD testa utvrdila su da postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima između većeg broja kombinacija, što je otkrilo velike efekte porasta GS na smanjenje širine nefrogene zone i povećanje broja generacija glomerula. Visoko signifikantne razlike ( $p < 0,001$ ) utvrđene su u starosnim grupama koje odgovaraju razvojnem periodu od 25 do 36 nedelja (25-28, 29-32, 33-36 nedelja) u odnosu na 13-16 nedelja i 17-20 nedelja, kao i između 29-32 i 21-24 nedelja.

**Tabela 5.4.** Rezultati višestrukih poređenja vrednosti širine nefrogene zone, broja generacija glomerula i debljine bubrežnog korteksa između starosnih grupa ponaosob sledstvenom Post

Hoc analizom

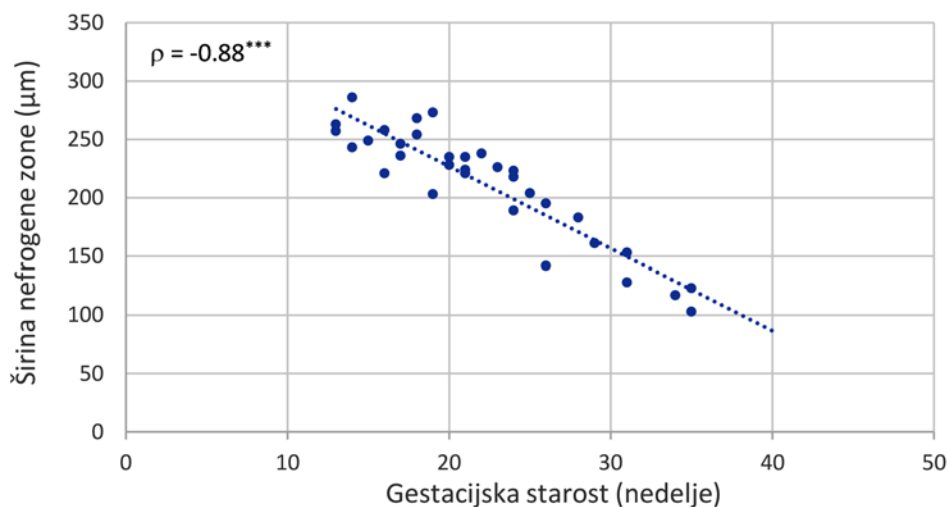
Gestacijska starost (nedelje)		ŠNZ ( $\mu\text{m}$ )	BGG	DK ( $\mu\text{m}$ )
Grupa A	Grupa B	<i>p</i>		<i>p</i>
13–16	17–20	0,8878	<sup>a</sup> 0,031 <sup>*</sup>	-
	21–24	<sup>a</sup> 0,0425 <sup>*</sup>	<sup>a</sup> <0,001 <sup>***</sup>	-
	25–28	<sup>a</sup> <0,001 <sup>***</sup>	<sup>a</sup> <0,001 <sup>***</sup>	-
	29–32	<sup>a</sup> <0,001 <sup>***</sup>	<sup>a</sup> <0,001 <sup>***</sup>	-
	33–36	<sup>a</sup> <0,001 <sup>***</sup>	<sup>a</sup> <0,001 <sup>***</sup>	-
	37–40	-	<sup>a</sup> <0,001 <sup>***</sup>	-
17–20	21–24	<sup>a</sup> 0,2997	<sup>a</sup> 0,276	<sup>b</sup> 0,0586
	25–28	<sup>a</sup> <0,001 <sup>***</sup>	<sup>a</sup> 0,002 <sup>**</sup>	<sup>b</sup> 0,0050 <sup>**</sup>
	29–32	<sup>a</sup> <0,001 <sup>***</sup>	<sup>a</sup> <0,001 <sup>***</sup>	<sup>b</sup> 0,7420
	33–36	<sup>a</sup> <0,001 <sup>***</sup>	<sup>a</sup> <0,001 <sup>***</sup>	<sup>b</sup> 0,5032
	37–40	-	<sup>a</sup> <0,001 <sup>***</sup>	<sup>b</sup> 0,0124 <sup>*</sup>
21–24	25–28	<sup>a</sup> 0,0252 <sup>*</sup>	<sup>a</sup> 0,207	<sup>b</sup> 0,0397 <sup>*</sup>
	29–32	<sup>a</sup> <0,001 <sup>***</sup>	<sup>a</sup> <0,001 <sup>***</sup>	<sup>b</sup> 0,9178
	33–36	<sup>a</sup> 0,0018 <sup>**</sup>	<sup>a</sup> <0,001 <sup>***</sup>	<sup>b</sup> 0,7131
	37–40	-	<sup>a</sup> <0,001 <sup>***</sup>	<sup>b</sup> 0,0250 <sup>*</sup>
25–28	29–32	<sup>a</sup> 0,2588	<sup>a</sup> 0,062	<sup>b</sup> 1,0000
	33–36	<sup>a</sup> 0,0018 <sup>**</sup>	<sup>a</sup> <0,001 <sup>***</sup>	<sup>b</sup> 0,9949
	37–40	-	<sup>a</sup> <0,001 <sup>***</sup>	<sup>b</sup> 0,1445
29–32	33–36	<sup>a</sup> 0,3455	<sup>a</sup> 0,415	<sup>b</sup> 1,0000
	37–40	-	<sup>a</sup> 0,002 <sup>**</sup>	<sup>b</sup> 0,708
33–36	37–40	-	<sup>a</sup> 0,398	<sup>b</sup> 0,9775

<sup>\*</sup> –  $p < 0,05$ , <sup>\*\*</sup> –  $p < 0,01$ , <sup>\*\*\*</sup> –  $p < 0,001$  (<sup>a</sup> Tukey HSD test; <sup>b</sup> Dunnett test)

ŠNZ – širina nefrogene zone; BGG – broj generacija glomerula; DK – debljina korteksa.

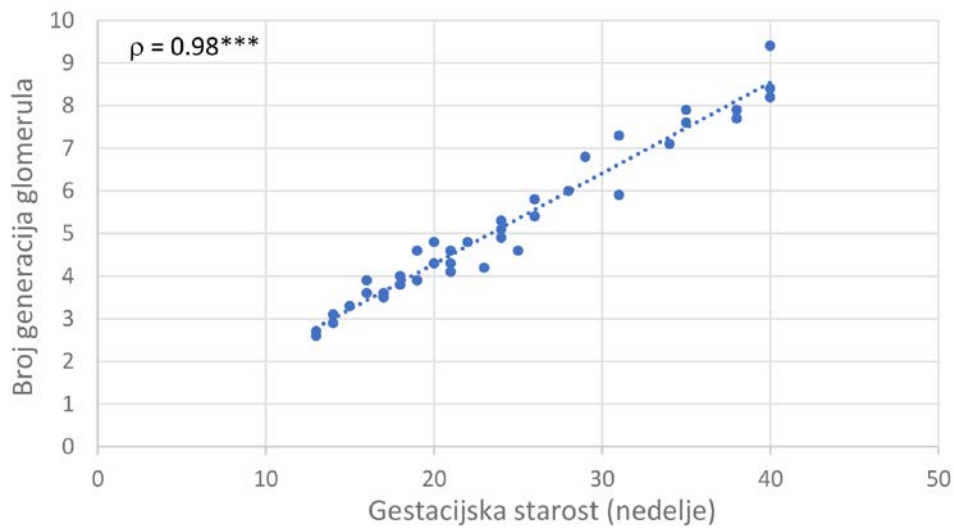
Naknadna poređenja vrednosti debljine bubrežnog korteksa primenom Dunnettovog testa utvrdila su statistički značajne razlike između perioda od 25-28 nedelje u odnosu na periode od 17-20 i 21-24 nedelja, kao i perioda od 27-40 nedelja u odnosu na periode od 17-20 i 21-24 nedelja. Statistički značajna razlika na nivou  $p < 0,01$  utvrđena je u periodu od 25-28 u odnosu na period od 17-20 nedelja.

Na osnovu Spearmanovog koeficijenta korelacije ranga utvrđena je izuzetno jaka i statistički visoko signifikantna korelacija između širine nefrogene zone i GS, broja generacija glomerula i GS, kao i između debljine bubrežnog korteksa i GS. Širina nefrogene zone pokazuje jaku i negativnu korelaciju sa GS ( $\rho = -0,88$ ;  $p < 0,001$ ) (Grafikon 5.1). Utvrđena je jaka i pozitivna korelacija ( $\rho = 0,98$ ;  $p < 0,001$ ) između broja generacija glomerula i GS (Grafikon 5.2.). Takođe, jaka i pozitivna korelacija ( $\rho = 0,88$ ;  $p < 0,001$ ) utvrđena je između debljine bubrežnog korteksa i GS (Grafikon 5.3).



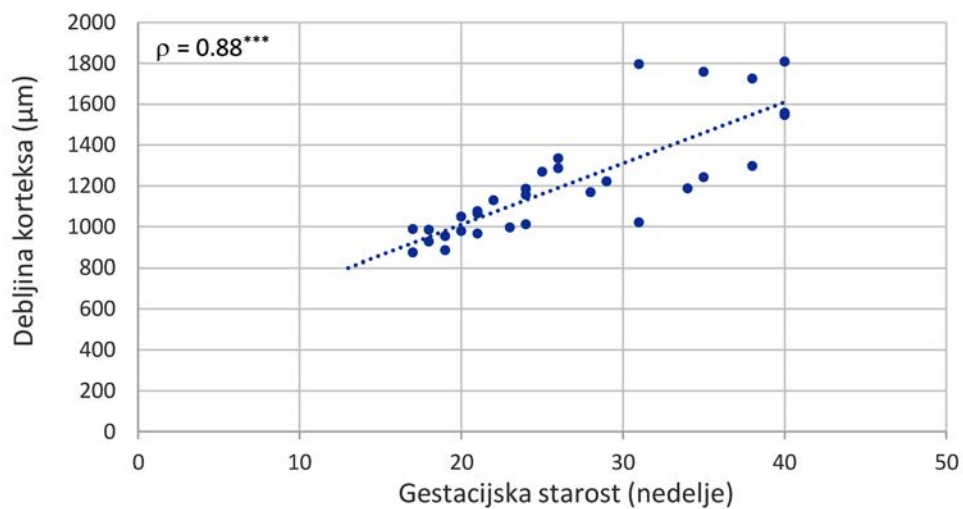
**Grafikon 5.1.** Korelacija između širine nefrogene zone i gestacijske starosti

\*\*\* –  $p < 0,001$  ( $\rho$  – Spearmanov koeficijent korelacije ranga)



**Grafikon 5.2.** Korelacija između broja generacija glomerula i gestacijske starosti

\*\*\* -  $p < 0,001$  ( $\rho$  – Spearmanov koeficijent korelacije ranga)



**Grafikon 5.3.** Korelacija između debljine bubrežnog korteksa i gestacijske starosti

\*\*\* -  $p < 0,001$  ( $\rho$  – Spearmanov koeficijent korelacije ranga)



**Tabela 5.5.** Uticaj gestacijske starosti na širinu nefrogene zone, broj generacija glomerula i debljinu bubrežnog korteksa: rezultati univarijantne linearne regresione analize

Parametar	R <sup>2</sup>	b	95% CI	p
ŠNZ	0,843	-7,02	[-8,27 – -5,91]	<0,001***
BGG	0,959	0,21	[0,20 – 0,23]	<0,001***
DK	0,672	29,96	[22,01 – 37,91]	<0,001***

R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije, β – koeficijent regresije, 95% CI – 95% interval poverenja, \*\*\* – p < 0,001.

ŠNZ – širina nefrogene zone; BGG – broja generacija glomerula; DK – debljina korteksa.

Linearna regresiona analiza (Enter metod) potvrdila je da porast GS za jednu nedelju ima statistički značajan uticaj na promenu vrednosti širine nefrogene zone -7,02 (-5,91 – -8,27;  $p = 0,000$ ), broj generacija glomerula 0,21 (0,20 – 0,23;  $p = 0,000$ ) i debljinu korteksa 29,96 (22,01 – 37,91;  $p = 0,000$ ) (Tabela 5.5). Širina nefrogene zone opada statistički značajno sa porastom GS, što se može predstaviti sledećom jednačinom regresije  $\text{ŠNZ} = 367,23 - 7,02 \times \text{GS}$ . Prema navedenom modelu, GS determiniše 84,30 % varijabilnosti ( $R^2 = 0,843$ ) vrednosti prosečne širine nefrogene zone i predstavlja veliki efekat. Suprotno, broj generacija glomerula i debljina korteksa povećavaju se statistički značajno, što se može predstaviti sledećim jednačinama regresije,  $\text{BGG} = 0,02 + 0,21 \times \text{GS}$  i  $\text{DK} = 411,30 + 29,96 \times \text{GS}$ . Prema navedenim modelima, GS determiniše 95,90 % varijabilnosti ( $R^2 = 0,959$ ) vrednosti prosečnog broja generacija glomerula i 67,20% varijabilnosti ( $R^2 = 0,672$ ) vrednosti prosečne debljine korteksa i u oba slučaja predstavlja veliki efekat veličine.

Vrednosti ispitivanih morfometrijskih parametara za bubrežne korpuskule u bubrezima fetusa različitih GS prikazani su u Tabeli 5.6. Prosečna area, perimetar i Feretov dijametar bubrežnih korpuskula pokazuju najveće vrednosti u prvoj starosnoj grupi, u periodu 13–16 nedelje gestacije. U ovom periodu razvoja prosečna area bubrežnih korpuskula iznosi  $5254,85 \pm 297,43 \mu\text{m}^2$ , perimetar  $328,49 \pm 9,59 \mu\text{m}$  i Feretov dijametar  $102,49 \pm 3,45 \mu\text{m}$ . Sa porastom GS, u periodu od 17-20 do 29-32 nedelje, beleži se trend opadanja vrednosti ovih parametra. U naredne dve starosne grupe, u periodu od 33-36 nedelja i u periodu od 37-40 nedelja, uočen je porast vrednosti. Kod najstarijih fetusa, u periodu od 37-40 nedelja, prosečna area bubrežnih korpuskula dostiže vrednost od  $5370,74 \pm 166,71 \mu\text{m}^2$ , prosečni perimetar  $339,66 \pm 10,72 \mu\text{m}$ , a prosečan Feretov dijametar  $105,31 \pm 3,68 \mu\text{m}$ .

**Tabela 5.6.** Morfometrijske karakteristike bubrežnih korpuskula u korteksu bubrega fetusa različite gestacijske starosti

Gestacijska starost (nedelje)	BK			
	A <sub>BK</sub> ( $\mu\text{m}^2$ )	B <sub>BK</sub> ( $\mu\text{m}$ )	DF <sub>BK</sub> ( $\mu\text{m}$ )	NA <sub>BK</sub> (1/mm <sup>2</sup> )
13–16	5254,85 ± 297,43 (5286,69)	328,02 ± 12,75 (327,44)	102,49 ± 3,45 (102,88)	33,84 ± 1,71 (33,80)
17–20	4818,08 ± 425,64 (4934,64) *	311,80 ± 16,88 (309,47)	96,80 ± 5,36 (98,66) *	39,18 ± 1,66 (39,23) ***
21–24	4281,87 ± 422,52 (4296,86) *	286,28 ± 16,66 (286,79) **	88,48 ± 4,84 (89,41) **	40,58 ± 1,19 (40,12)
25–28	3069,56 ± 171,21 (4030,47)	278,66 ± 9,23 (277,72)	86,04 ± 2,52 (85,58)	36,49 ± 1,65 (35,86) ***
29–32	3920,23 ± 284,58 (3839,95)	271,12 ± 16,92 (269,72)	84,33 ± 3,72 (83,35)	33,82 ± 0,71 (33,80) *
33–36	4294,09 ± 172,97 (4263,00)	293,40 ± 11,12 (292,48)	90,69 ± 2,74 (90,42)	28,58 ± 0,84 (37,01) **
37–40	5370,74 ± 166,71 (5328,75) ***	339,66 ± 10,72 (338,86) **	105,31 ± 3,68 (105,90) **	28,72 ± 0,58 (28,74)

Vrednosti ispitivanih parametara su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (medijana).

\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ , statistički značajna razlika u odnosu na prethodnu starosnu grupu.

BK – Bubrežni korpuskul, A<sub>BK</sub> – Area bubrežnih korpuskula, B<sub>BK</sub> – Perimetar bubrežnih korpuskula,

DF<sub>BK</sub> – Feretov dijametar bubrežnih korpuskula, NA<sub>BK</sub> – Numerička arealna gustina bubrežnih korpuskula.

Međusobnim poređenjem sukcesivnih starosnih grupa, starije sa mlađom, utvrđene su statistički značajno niže vrednosti aree bubrežnih korpuskula u periodu od 17-20 nedelje ( $p < 0,05$ ) i u periodu od 21-24 nedelja ( $p < 0,01$ ). Statistički značajno povećanje prosečne aree korpuskula beleži se u periodu od 37-40 nedelja ( $p < 0,001$ ). Statistički značajno niže vrednosti prosečnog perimetra bubrežnih korpuskula u odnosu na prethodnu starosnu grupu utvrđene su u periodu 21-24 nedelja ( $p < 0,01$ ), dok se u periodu od 37-40 nedelja prosečni perimetar statistički značajno povećava ( $p < 0,01$ ). Vrednosti prosečnog Feretovog dijametra bubrežnih korpuskula pokazuju sličan trend promene kao i prosečna area i perimetar, sa statistički nižim vrednostima

u periodu od 17-20 nedelja ( $p<0,05$ ) i periodu od 21-24 nedelja ( $p<0,01$ ), dok se u periodu od 37-40 nedelja beleži statistički značajno povećanje ( $p<0,01$ ).

**Tabela 5.7.** Morfometrijske karakteristike bubrežnih tubula u korteksu bubrega fetusa različite gestacijske starosti

Gestacijska starost (nedelje)	BT	
	A <sub>BT</sub> ( $\mu\text{m}^2$ )	NA <sub>BT</sub> (1/mm <sup>2</sup> )
13–16	2411,61 ± 163,79 (2402,32)	91,75 ± 11,49 (91,46)
17–20	2271,99 ± 72,32 (2260,21) *	133,82 ± 11,84 (139,04) ***
21–24	2265,31 ± 102,94 (2239,50)	179,06 ± 4,90 (179,39) ***
25–28	2407,67 ± 97,08 (2435,36) *	167,11 ± 9,39 (163,57) *
29–32	2486,47 ± 172,12 (2569,84)	166,19 ± 11,72 (169,91)
33–36	2609,33 ± 56,98 (2344,42)	163,62 ± 5,85 (159,62)
37–40	2830,02 ± 259,54 (2932,48)	191,94 ± 5,02 (192,94) ***

Vrednosti ispitivanih parametara su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (medijana).

\* –  $p<0,05$ , \*\* –  $p<0,01$ , \*\*\* –  $p<0,001$ , statistički značajna razlika u odnosu na prethodnu starosnu grupu.

BT – Bubrežni tubul, A<sub>BT</sub> – Area bubrežnih tubula, NA<sub>BT</sub> – Numerička arealna gustina bubrežnih tubula.

Prosečna numerička arealna gustina bubrežnih korpuskula pokazuje porast od  $33,84 \pm 1,71$  (1/mm<sup>2</sup>) u periodu od 13-16 nedelja do  $40,58 \pm 1,19$  (1/mm<sup>2</sup>) u periodu od 21-24 nedelja. Statistički značajno povećanje zabeleženo je u periodu od 17-20 nedelja ( $p<0,001$ ). Nakon perioda porasta, zabeležen je trend opadanja vrednosti ovog parametra sve do kraja gestacije. U periodu od 37–40 nedelja prosečna numerička arealna gustina bubrežnih korpuskula iznosi  $28,72 \pm 0,58$  (1/mm<sup>2</sup>). Statistički značajno niže vrednosti utvrđene su u periodu od 25–28 nedelja ( $p<0,001$ ), u periodu od 29-32 nedelje ( $p<0,05$ ) i u periodu od 33-36 nedelja ( $p<0,01$ ).

Vrednosti ispitivanih morfometrijskih parametara za bubrežne tubule u korteksu bubrega fetusa različitih GS prikazani su u Tabeli 5.7.

U periodu od 13–16 nedelja, prosečna area bubrežnih tubula iznosi  $2411,61 \pm 163,79 \mu\text{m}^2$ . U naredne dve starosne grupe, u periodu od 17-20 nedelje i u periodu od 21-24 nedelje, zabeležene su nešto niže vrednosti prosečne aree bubrežnih tubula, statistički značajno u periodu od 17-20 nedelja ( $p < 0,05$ ). Tokom daljeg razvoja bubrega, prosečna area bubrežnih tubula se povećava sve do kraja gestacije, kada dostiže vrednost od  $2830,02 \pm 259,54 \mu\text{m}^2$  u periodu od 37-40 nedelja. Statistički značajno povećanje u odnosu na prethodnu starosnu grupu zabeleženo je u periodu od 25-28 nedelja ( $p < 0,05$ ). Prosečna numerička arealna gustina bubrežnih tubula beleži porast od  $91,75 \pm 11,49 (1/\text{mm}^2)$  u periodu od 13-16 nedelja do  $179,06 \pm 4,90 (1/\text{mm}^2)$  u periodu od 21–24 nedelja. Statistički značajno povećanje ( $p < 0,001$ ) u odnosu na prethodnu starosnu grupu utvrđeno je u periodu od 17-20 nedelja i u periodu od 21-24 nedelja. U periodu od 25-28 nedelja prosečna numerička arealna gustina bubrežnih tubula pokazuje blagi, ali statistički značajan pad vrednosti ( $p < 0,05$ ), nakon čega se održava na približno istom nivou sve do kasne gestacije, do perioda od 33-36 nedelje. U periodu od 37-40 nedelja beleži se statistički značajan ( $p < 0,001$ ) porast vrednosti i prosečna numerička arealna gustina bubrežnih tubula dostiže  $191,94 \pm 5,02 (1/\text{mm}^2)$ .

ANOVA analiza pokazala je da GS predstavlja statistički značajan prediktor vrednosti aree ( $F(6,31) = 14,57; p = 0,000$ ), perimetra ( $F(6,31) = 15,53; p = 0,000$ ), Feretovog dijametra ( $F(6,31) = 19,31; p = 0,000$ ) i numeričke arealne gustine ( $F(6,31) = 63,46; p = 0,000$ ) bubrežnih korpuskula, kao i vrednosti aree ( $F(6,31) = 7,21; p = 0,000$ ) i numeričke arealne gustine bubrežnih tubula ( $F(6,31) = 85,41; p = 0,000$ ) (Tabela 5.8).

Sledstvenom Post hoc analizom obavljani su nizovi poređenja vrednosti svih ispitivanih parametara na osnovu kojih su praćene razvojne karakteristike bubrežnih korpuskula i bubrežnih tubula i naknadno su utvrđene razlike između svih mogućih starosnih grupa ponaosob. Rezultati višestrukih poređenja vrednosti aree, perimetra i Feretovog dijametra bubrežnih korpuskula, numeričke arealne gustine bubrežnih korpuskula, kao i aree bubrežnih tubula i numeričke arealne gustine bubrežnih tubula prikazani su u Tabeli 5.9.

Naknadna poređenja vrednosti aree, perimetra i Feretovog dijametra bubrežnih korpuskula, numeričke arealne gustine bubrežnih korpuskula, aree bubrežnih tubula i numeričke arealne gustine bubrežnih tubula primenom Tukey HSD testa pokazala su da postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima između većeg broja kombinacija merenja, što je otkrilo velike efekte GS na promene vrednosti ovih parametara u pojedinim periodima razvoja.

**Tabela 5.8.** Rezultati analize varijanse vrednosti ispitivanih morfometrijskih parametara bubrežnih korpuskula i bubrežnih tubula

Parametar	F	p
<b>A<sub>BK</sub></b>	14,57	<0,001***
<b>B<sub>BK</sub></b>	15,63	<0,001***
<b>DF<sub>BK</sub></b>	19,31	<0,001***
<b>NA<sub>BK</sub></b>	63,46	<0,001***
<b>A<sub>BT</sub></b>	7,21	<0,001***
<b>NA<sub>BT</sub></b>	85,41	<0,001***

\*\*\* –  $p < 0,001$  (ANOVA)

A<sub>BK</sub> – Area bubrežnih korpuskula, B<sub>BK</sub> – Perimetar bubrežnih korpuskula, DF<sub>BK</sub> – Feretov dijametar bubrežnih korpuskula, NA<sub>BK</sub> – Numerička arealna gustina bubrežnih korpuskula, A<sub>BT</sub> – Area bubrežnih tubula, NA<sub>BT</sub> – Numerička arealna gustina bubrežnih tubula.

Statistički značajne razlike vrednosti aree, perimetra i Feretovog dijametra bubrežnih korpuskula, na nivou  $p < 0,001$ , utvrđene su u starosnim grupama koje odgovaraju periodu od 21 do 32 nedelje (21-24, 25-28, 29-32 nedelja) u odnosu na 13-16 nedelja, kao i u periodu od 37-40 nedelja u odnosu na periode 21-24, 25-28 i 29-32 nedelje. Statistički značajne razlike numeričke arealne gustine bubrežnih korpuskula, na nivou  $p < 0,001$ , zabeležene su između većeg broja kombinacija poređenja.

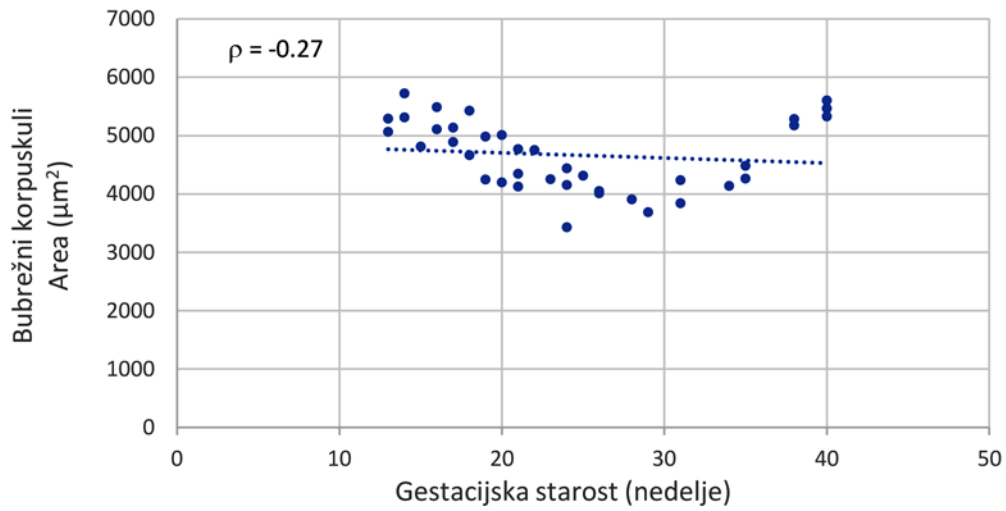
Naknadna poređenja vrednosti aree bubrežnih tubula utvrdila su statistički značajne razlike na nivou  $p < 0,001$  utvrđene su u periodu od 37-40 nedelje u odnosu na periode od 13-16, 17-20 i 21-24 nedelja, a na nivou  $p < 0,01$  u odnosu na periode od 25-28 i 29-32 nedelje. Statistički značajne razlike numeričke arealne gustine bubrežnih tubula, na nivou  $p < 0,001$ , zabeležene su svim starosnim grupama poređenim sa periodima od 13-16 i 17-20 nedelja.

**Tabela 5.9.** Rezultati višestrukih poređenja vrednosti ispitivanih morfometrijskih parametara između starosnih grupa ponaosob sledstvenom Post Hoc analizom

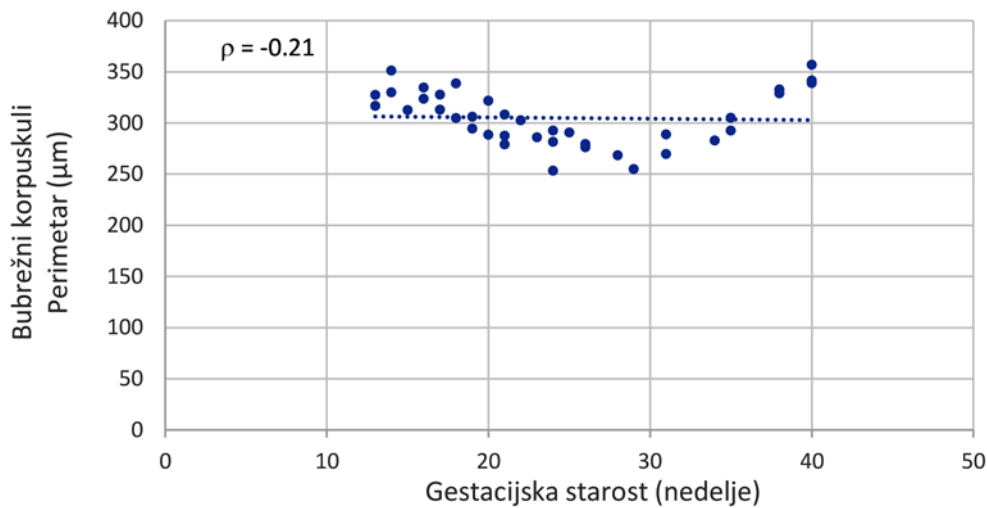
Gestacijska starost (nedelje)		<i>BK</i>				<i>BT</i>	
Grupa A	Grupa B	<i>A<sub>BK</sub></i> ( $\mu\text{m}^2$ )	<i>B<sub>BK</sub></i> ( $\mu\text{m}$ )	<i>DF<sub>BK</sub></i> ( $\mu\text{m}$ )	<i>NA<sub>BK</sub></i> ( $1/\text{mm}^2$ )	<i>A<sub>BT</sub></i> ( $\mu\text{m}^2$ )	<i>NA<sub>BT</sub></i> ( $1/\text{mm}^2$ )
		<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
13–16	17–20	0,1861	0,3382	0,2149	<0,001***	0,5049	<0,001***
	21–24	0,0001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***	0,4498	<0,001***
	25–28	0,0001***	<0,001***	<0,001***	0,0597	1,0000	<0,001***
	29–32	<0,001***	<0,001***	<0,001***	1,0000	0,9873	<0,001***
	33–36	0,0039**	0,0229*	0,0061**	<0,001***	0,4338	<0,001***
	37–40	0,9966	0,8091	0,8060	<0,001***	<0,001***	<0,001***
17–20	21–24	0,0439*	0,0197*	0,0052**	0,4173	1,0000	<0,001***
	25–28	0,0148*	0,0115*	0,0028**	0,0443*	0,7147	<0,001***
	29–32	0,0066**	0,0039**	0,0016**	<0,001***	0,3177	<0,001***
	33–36	0,2697	0,5051	0,3235	<0,001***	0,0227*	<0,001***
	37–40	0,0875	0,0285*	0,0153*	<0,001***	<0,001***	<0,001***
21–24	25–28	0,9413	0,9755	0,9558	<0,001***	0,6685	0,3717
	29–32	0,6852	0,7121	0,7437	<0,001***	0,2842	0,4025
	33–36	1,0000	0,9896	0,9836	<0,001***	0,0192*	0,2065
	37–40	0,0001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***	0,2149
25–28	29–32	0,9968	0,9926	0,9978	0,1806	0,9902	1,0000
	33–36	0,9732	0,8289	0,7499	<0,001***	0,5299	0,9988
	37–40	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***	0,0021**	0,0060**
29–32	33–36	0,8137	0,5006	0,4938	0,0010***	0,9374	0,9999
	37–40	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***	0,0363**	0,0098**
33–36	37–40	0,0020**	0,0021	0,0005***	1,0000	0,3714	0,0036**

\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  (Tukey HSD test)

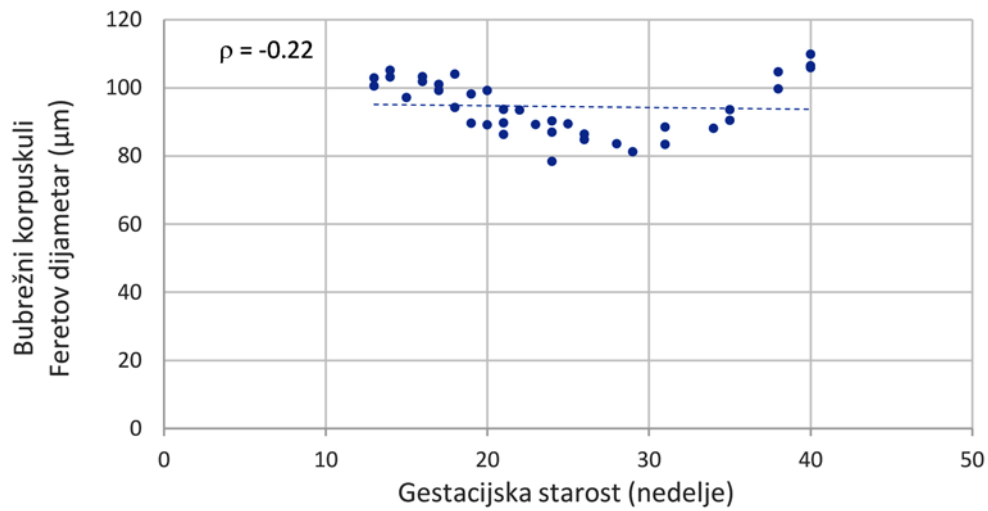
*A<sub>BK</sub>* – Area bubrežnih korpuskula, *B<sub>BK</sub>* – Perimetar bubrežnih korpuskula, *DF<sub>BK</sub>* – Feretov dijаметar bubrežnih korpuskula, *NA<sub>BK</sub>* – Numerička arealna gustina bubrežnih korpuskula, *A<sub>BT</sub>* – Area bubrežnih tubula, *NA<sub>BT</sub>* – Numerička arealna gustina bubrežnih tubula.



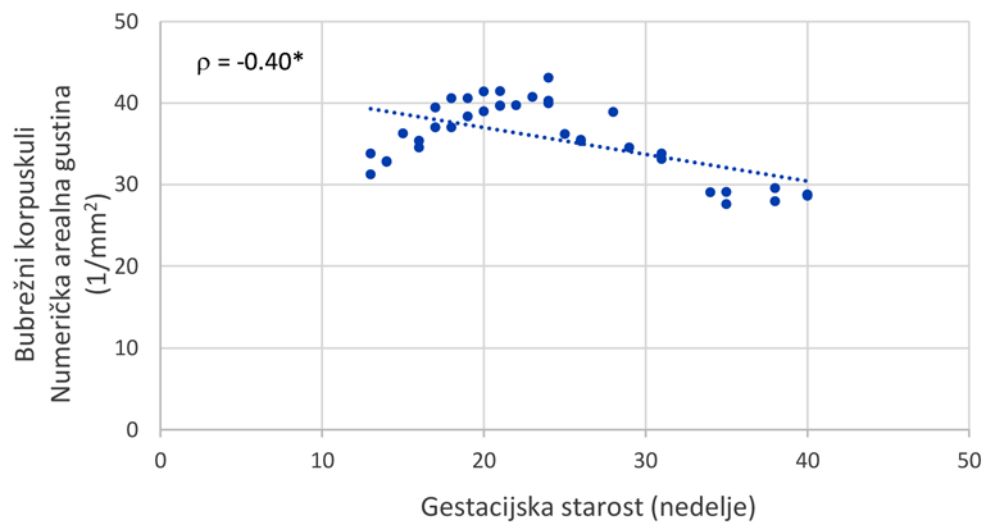
**Grafikon 5.4.** Korelacije između aree bubrežnih korpuskula i gestacijske starosti ( $\rho$  – Spearmanov koeficijent korelacije ranga)



**Grafikon 5.5.** Korelacije između perimetra bubrežnih korpuskula i gestacijske starosti ( $\rho$  – Spearmanov koeficijent korelacije ranga)



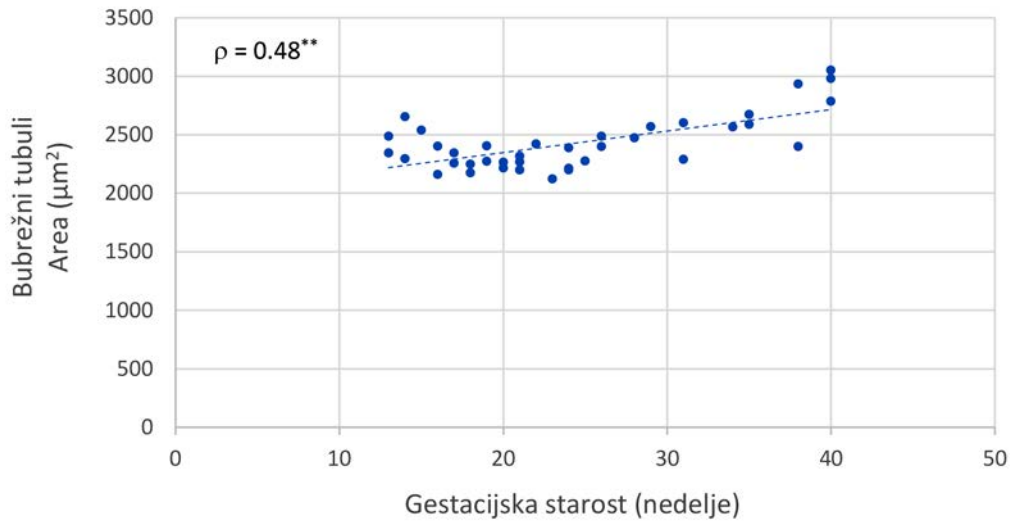
**Grafikon 5.6.** Korelacije između Feretovog dijametra bubrežnih korpuskula i gestacijske starosti ( $\rho$  – Spearmanov koeficijent korelacije ranga)



**Grafikon 5.7.** Korelacije između numeričke arealne gustine bubrežnih korpuskula i gestacijske starosti

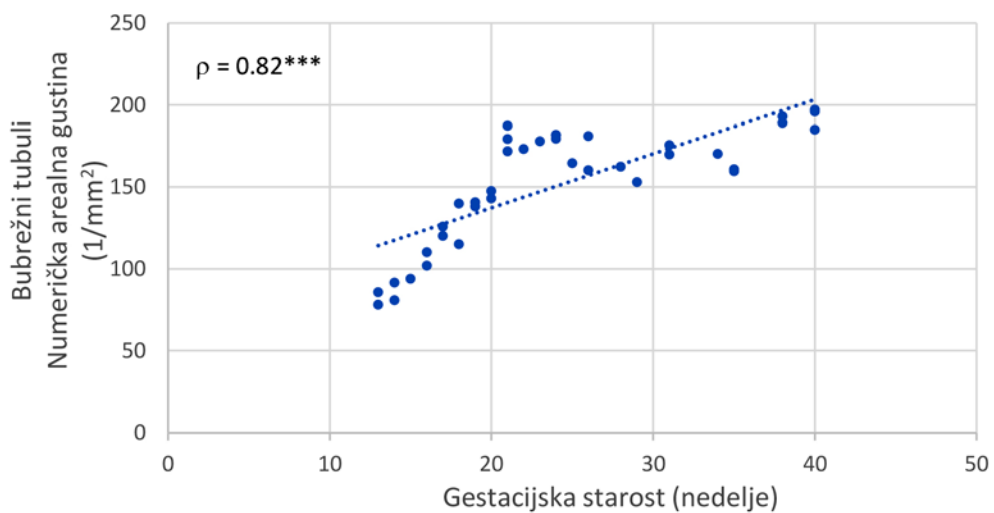
\* –  $p < 0,05$  ( $\rho$  – Spearmanov koeficijent korelacije ranga)





**Grafikon 5.8.** Korelacije između aree bubrežnih tubula i gestacijske starosti

\*\* –  $p < 0,01$  ( $\rho$  – Spearmanov koeficijent korelacije ranga)



**Grafikon 5.9.** Korelacije između numeričke arealne gustine bubrežnih tubula i gestacijske starosti

\*\*\* –  $p < 0,001$  ( $\rho$  – Spearmanov koeficijent korelacije ranga)

Spearmanov koeficijent korelacije ranga je pokazao da area, perimetar i Feretov dijametar bubrežnih korpuskula ne koreliraju statistički značajno sa GS. Area bubrežnih korpuskula korelira slabo negativno sa GS ( $\rho = -0,27$ ;  $p = 0,0978$ ) (Grafikon 5.4). Slaba negativna korelacija neznatno nižeg nivoa utvrđena je između perimetra i gestacijske starosti ( $\rho = -0,21$ ;  $p = 0,2052$ ) (Grafikon 5.5), kao i između Feretovog dijametra i GS ( $\rho = -0,22$ ;  $p = 0,1807$ ) (Grafikon 5.6). Suprotno ovome, numerička arealna gustina bubrežnih korpuskula korelira umereno negativno, ali statistički značajno sa GS ( $\rho = -0,40$ ;  $p < 0,05$ ) (Grafikon 5.7).

Na osnovu Spearmanovog koeficijenta korelacije ranga utvrđeno je da area bubrežnih tubula korelira pozitivno, umerenim intenzitetom i statistički značajno sa GS ( $\rho = 0,48$ ;  $p < 0,01$ ) (Grafikon 5.8). Numerička arealna gustina bubrežnih tubula pokazuje jaku pozitivnu i statistički značajnu korelaciju sa GS ( $\rho = 0,82$ ;  $p < 0,001$ ) (Grafikon 5.9).

**Tabela 5.10.** Uticaj gestacione starosti na ispitivane morfometrijske parametre bubrežnih korpuskula i bubrežnih tubula: rezultati univarijantne linearne regresione analize

Parametar	R <sup>2</sup>	b	95% CI	p
A <sub>BK</sub>	0,015	-8,77	[-32,82 – 15,26]	0,464
B <sub>BK</sub>	0,002	-0,13	[-1,20 – 0,94]	0,808
DF <sub>BK</sub>	0,003	-0,05	[-0,38 – 0,27]	0,751
NA <sub>BK</sub>	0,359	-0,33	[-0,48 – -0,18]	<0,001 <sup>***</sup>
A <sub>BT</sub>	0,381	22,51	[12,88 – 32,20]	<0,001 <sup>***</sup>
NA <sub>BT</sub>	0,605	3,30	[2,40 – 4,20]	<0,001 <sup>***</sup>

R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije,  $\beta$  – koeficijent regresije, 95% CI – 95% interval poverenja, <sup>\*\*\*</sup>  $-p < 0,001$ .

A<sub>BK</sub> – Area bubrežnih korpuskula, B<sub>BK</sub> – Perimetar bubrežnih korpuskula, DF<sub>BK</sub> – Feretov dijametar bubrežnih korpuskula, NA<sub>BK</sub> – Numerička arealna gustina bubrežnih korpuskula, A<sub>BT</sub> – Area bubrežnih tubula, NA<sub>BT</sub> – Numerička arealna gustina bubrežnih tubula.

Rezultati linearne regresione analize (Enter metod) potvrdili su da porast GS za jednu nedelju nema statistički značajan uticaj na promene vrednosti aree, perimetra i Feretovog dijametra bubrežnih korpuskula, ali statistički značajno utiče na vrednost njihove numeričke arealne gustine. Takođe, GS statistički značajno utiče na promene vrednosti aree i numeričke arealne gustine bubrežnih tubula (Tabela 5.10.).

Porast GS za jednu gestacijsku nedelju povezan je sa promenom vrednosti aree bubrežnih korpuskula za -8,77 (15,26 – -32,82;  $p = 0,464$ ), perimetra za -0,13 (0,94 – -1,20;  $p = 0,808$ ) i Feretovog dijametra za -0,05 (0,27 – -0,38;  $p = 0,751$ ). Porast GS determiniše 1,5% varijabilnosti ( $R^2 = 0,015$ ) vrednosti prosečne aree bubrežnih korpuskula, 0,2% varijabilnosti ( $R^2 = 0,002$ ) vrednosti prosečnog perimetra i 0,3% varijabilnosti ( $R^2 = 0,003$ ) vrednosti prosečnog Feretovog dijametra, što u sva tri slučaja predstavlja mali efekat veličine. Porast GS za jednu gestacijsku nedelju povezan je sa promenom vrednosti numeričke arealne gustine bubrežnih korpuskula za 08,33 (-0,18 – -0,48;  $p = 0,000$ ). GS determiniše 35,9% varijabilnosti ( $R^2 = 0,359$ ) vrednosti prosečne numeričke arealne gustine bubrežnih korpuskula, što predstavlja veliki efekat.

Linearna regresiona analiza je, takođe, pokazala da porast GS za jednu gestacijsku nedelju uzrokuje porast prosečne aree bubrežnih tubula za 22,51 (12,88 – 32,20;  $p = 0,000$ ), pri čemu je 38,10% varijabilnosti vrednosti ( $R^2 = 0,381$ ) ovog parametra determinisano promenama GS i predstavlja veliki efekat. Porast fetalne starosti za jednu gestacijsku nedelju dovodi do porasta numeričke arealne gustine bubrežnih tubula za 3,30 (2,40 – 4,20;  $p = 0,000$ ). Gestacijska starost determiniše 60,50% varijabilnosti ( $R^2 = 0,605$ ) vrednosti numeričke arealne gustine bubrežnih tubula i, takođe, predstavlja veliki efekat veličine.

## 6. DISKUSIJA

---

Razvoj i rast bubrega podrazumeva neprekidno i dinamično remodelovanje tkivnih komponenti. Ovaj biološki proces odvija se tokom čitavog fetusnog perioda pod uticajem brojnih genetskih i epigenetskih faktora. Rezultat su razlike u strukturi kortikalnog i medularnog tkiva, individualno prisutne razlike u broju nefrona, veličini i distribuciji segmenata nefrona i posledično svim aspektima brojnih bubrežnih funkcija. Bubrežni je organ čije se mikroanatomske karakteristike tokom razvoja *in utero* značajno razlikuju zavisno od GS. Razvoj bubrega i nefrogeneza odvijaju se radijalno sa završnim, novijim granama sabirnih tubula i novim generacijama nefrona koji se formiraju na krajnjoj periferiji korteksa označenom kao nefrogena zona. Tokom fetalnog života, bubrežni korpuskuli nefrona koji se postepeno formiraju u nefrogenoj zoni pridodaju se osnovnom korteksu u razvoju. Nefrogena zona je morfološki prepoznata kao širi ili uži pojas tkiva neposredno ispod duboke strane bubrežne kapsule, koji se na preparatima bojenim metodom HE i PAS intenzivnije prebojava. Ova zona bubrežnog korteksa predstavlja polje aktivne nefrogeneze. U njoj se prepoznaju distalni krajevi sabirnih tubula prošireni u ampulu, mezenhimne progenitorne ćelije i rani stadijumi nefrona u razvoju. Stromalne mezenhimalne progenitorne ćelije raspoređene su neposredno ispod bubrežne kapsule, dok su nefrogene mezenhimalne progenitorne ćelije orijentisane prema vrhu ampule sabirnog tubula. U nefrogenoj zoni, nefroni se postepeno oblikuju duž grana sabirnih tubula prolazeći kroz tranzitne stadijume, počevši od pretubularnih agregata, različitih stadijuma bubrežnih vezikula, zapeta- i S-oblikovanih telašaca. Nastavljajući stadijum S-oblikovanog telašca, nefroni napuštaju nefrogenu zonu i spuštaju se dublje u korteks, u zonu maturacije, gde postepeno sazrevaju. U najdubljem, jukstamedularnom delu korteksa, nefroni stiču morfološke karakteristike definitivnih nefrona. Nefrogena zona se tokom vremena progresivno istanjuje i razređuje zbog postepenog iscrpljivanja nefrogenih prekursora i definitivno nestaje kada i poslednje mezenhimne ćelije dostignu kompletnu epitelizaciju. Istovremeno se broj nefrona povećava do postizanja punog komplementa.

U našem istraživanju proučavane su razvojne karakteristike bubrega kod humanih fetusa primenom imunohistohemijskih i morfometrijskih metoda. Komparativno je analizirana ekspresija proliferativnog markera Ki-67 i markera povezanih sa apoptozom, Bcl-2 i Bax, kroz stadijume nefrogeneze. Takođe, morfometrijski su analizirane razvojne karakteristike

bubrežnog korteksa i njegovih komponenti, nefrogene zone, korpuskularne i tubularne porcije nefrona u različitim periodima gestacije. Rezultati istraživanja su pokazali prostorni i vremenski gradijent diferencijacije nefrona sa različitim nivoima ekspresije markera proliferacije Ki-67, antiapoptotskog markera Bcl-2 i proapoptotskog markera Bax u zavisnosti od stadijuma razvoja nefrona, što je ukazalo da oni mogu biti značajne determinante morfogeneze. Ki-67 se ekspresirao u brojnim mezenhimnim ćelijama, pretubularnim agregatima, bubrežnim vezikulama, zapeta- i ranim S-formama. Tokom maturacije i prostorne ekspanzije nefrona prema dubljim delovima korteksa, ekspresija Ki-67 se značajno smanjivala počevši od korpuskularne prema tubularnoj porciji nefrona. Slično, Bcl-2 se jako ekspresirao u indukovanim nefrogenim progenitornim ćelijama, pretubularnim agregatima, bubrežnim vezikulama i zapeta-formama. Kako je vaskularizacija i maturacija nefrona napredovala, Bcl-2 bojenje postalo je manje intenzivno i ograničeno na parijetalni sloj Boumanove kapsule i bubrežne tubule. Slaba Bax ekspresija zabeležena je u pojedinačnim ćelijama rasutim kroz segmente nefrona u svim razvojnim stadijumima. Bax se intenzivnije ekspresirao samo u epitelnim ćelijama bubrežnih tubula nefrona raspoređenih u dubokom delu korteksa. Sa napredovanjem nefrogeneze, širina nefrogene zone opada, uz jaku negativnu korelaciju sa GS. Suprotno, broj generacija glomerula i debljina korteksa rastu, uz jaku pozitivnu korelaciju sa GS. Morfometrijska analiza je ukazala na postepene i od GS zavisne razvojne promene korpuskularne i tubularne porcije nefrona. Utvrđene su brojne statistički značajne razlike između uzastopnih starosnih grupa. Area, perimetar i Feretov dijametar bubrežnih korpuskula nisu statistički značajno korelirali sa GS. Međutim, postojala je statistički značajna negativna korelacija između numeričke arealne gustine bubrežnih korpuskula i GS. Nasuprot tome, area i numerička arealna gustina bubrežnih tubula su statistički značajno i pozitivno korelirale sa GS.

Naše istraživanje značajno je sa više aspekata. Hipoteza da zbog relativno manjeg broja nefrona osoba postaje podložnija za razvoj hipertenzije i hronične bolesti bubrega, ili oba (Brenner i sar., 1988), potkrepljena je poslednjih godina velikim brojem eksperimentalnih podataka. Međutim, podaci o značaju oligonefronije kod ljudi bili su uglavnom posredni i indirektni. Keller i saradnici (2003) među prvima su prezentovali pažljivo izvedene dokaze koji potkrepljuju ovu hipotezu. Ovi autori su postobduktivno upoređivali bubrege osoba stradalih akcidentalno i koje su imale hipertenziju, sa bubrežima osoba sa normalnim krvnim pritiskom. Određivan je broj i volumen glomerula i procenjena morfologija glomerula i tubula. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da bubrezi osoba sa hipertenzijom imaju signifikantno manje glomerula u poređenju sa usklađenom kontrolom. U isto vreme, volumen glomerula bio je veći kod hipertenzivnih osoba, što je ukazivalo da su glomeruli kod osoba sa

hipertenzijom bili preopterećeni, odnosno da su hiperfiltrirali. Istovremeno, nisu pronađeni glomeruli sa znacima starenja, što bi eventualno ukazivalo na kontinuirani gubitak nefrona sa godinama života. Na osnovu toga izveden je zaključak da osobe sa hipertenzijom najverovatnije nisu izgubile glomerule tokom vremena, već da su verovatno imale mali broj pri rođenju. Takva zapažanja su pružila podršku konceptu da smanjen broj nefrona može sam po sebi biti povezan sa primarnom hipertenzijom.

Prenatalno programiranje, termin koji opisuje zapažanje da događaji tokom gestacije mogu imati dalekosežne posledice u odraslom dobu, je posebno značajno. Ovaj koncept su prvi razmotrili Barker i saradnici (1989) posmatrajući inverzan odnos između porođajne težine i kardiovaskularnih bolesti u kohortu muškaraca srednjih godina u Britaniji. Postoje dokazi da nepovoljno okruženje tokom intrauterinog života može biti uzrok suboptimalnog fetalnog rasta, čime se povećava rizik za niz bolesti i poremećaja u kasnijem životu (Hershkovitz i sar., 2007; Gjerde i sar., 2020). Veliki broj kliničkih i eksperimentalnih podataka sugerisali su da promene u ishrani tokom intrauterinog razvoja, posebno ograničen unos proteina, mogu programirati fetus i povećati njegovu predispoziciju za razvoj bolesti bubrega. Studije na eksperimentalnim životinjama su direktno pokazale da relativno mali insulti, kao što je ograničen unos proteina, može rezultirati manjim brojem nefrona. Dodatno, prema konceptu koji su izložili Brenner i saradnici (1988), osobe sa manjim brojem nefrona verovatno imaju relativno visoku stopu glomerularne filtracije u svakom dostupnom nefronu. Tokom vremena, hiperfiltracija vodi suptilnoj disfunkciji, oštećenju bubrega i konačno hipertenziji. Iako bi se većina složila da je esencijalna hipertenzija složen fenotip, kojoj doprinose genetske osobine i negenetski faktori, sve je više dokaza da dešavanja tokom intrauterinog života mogu imati dalekosežne posledice (Ingelfinger, 2003).

Broj nefrona u svakom bubregu ograničen je njihovim formiranim brojem tokom organogeneze. Kod ljudi, nefrogeneza se završava pre termina porođaja, najkasnije do 36. nedelje gestacije (Hinchliffe i sar., 1991; Hoy i sar., 2005; Rosenblum i sar., 2017; Ryan i sar., 2018). Bubrezi naknadno rastu primarno usled tubularnog i intersticijalnog rasta, ali ne i usled razvoja novih glomerula. Sve studije do danas, međutim, pokazuju da postoje varijacije među fenotipski normalnim osobama, pri čemu neke imaju više nefrona od drugih (Ingelfinger, 2003). U slučaju prevremenog porođaja, pre 37. nedelje gestacije, većina beba se rađa sa nefrogenezom koja je još uvek u toku. Nekoliko studija na ljudima pokazalo je da se nefrogeneza može nastaviti nakon prevremenog rođenja, ali nije dovoljna da nadoknadi oligonefroniju koja postoji na rođenju (Rodríguez i sar., 2004; Faa i sar., 2010). Ipak, nefrogeneza nakon rođenja praćena je ubrzanom sazrevanja glomerula sa zastupljenošću abnormalnih glomerula

do 13,7% (Sutherland i sar., 2011). Rodriguez i saradnici (2004) i Sutherland i saradnici (2011) utvrdili su povećanu prosečnu areu bubrežnih korpuskula u prvim danima nakon rođenja kao morfološki pokazatelj glomerularne hipertrofije. Gubhaju i saradnici (2009) su na modelu pavijana pokazali da se glomerulogeneza nastavlja nakon prevremenog porođaja sa povećanjem veličine bubrega u odnosu na telesnu težinu i istovremenim smanjenjem arealne gustine glomerula. S obzirom da je ukupan broj nefrona bio u normalnom opsegu i da veličina bubrežnih korpuskula nije bila promenjena u odnosu na kontrolnu grupu, oni su implicirali da smanjenje arealne gustine glomerula najverovatnije odražava postnatalne promene u rastu bubrežnih tubula. Koncept smanjenog komplementa nefrona je značajan, jer ukazuje na moguću prevenciju u smislu poboljšanje ishrane trudnica i druge strategije koje mogu smanjiti učestalost hipertenzije kod potomstva koje je pod rizikom kasnije tokom života. U skladu sa tim, mogući terapijski cilj za prevremeno rođene bebe i bebe rođene sa LBW mogao bi biti stimulisanje morfogene aktivnosti u nefrogenoj zoni, produžavanje rasta nefrona lekovima i kompenzacija poremećene nefrogeneze tokom ranog postnatalnog života (Fanos i sar., 2015), što zahteva dodatna istraživanja u ovoj oblasti.

Proliferacija igra veoma važnu ulogu u ranom razvoju bubrega. To je osnova dramatičnog povećanja njegove ukupne veličine i dešava se paralelno sa talasima formiranih nefrona, njihovom ekspanzijom prema dubljim delovima korteksa i terminalnom diferencijacijom (Goedbloed, 1972; Chang i sar., 2008; Lui i Baron, 2011). Nefrogeneza prestaje usled iscrpljivanja nefrogenih progenitornih ćelija prisutnih u mezenhimu metanefrosne kape (Hinchliffe, 1991; Hartman i sar., 2007; Rumballe i sar., 2011). Proliferacija u bubrezima se, međutim, nastavlja dok svi nefroni ne dostignu svoju konačnu veličinu i time organogeneza bude kompletna. Ekspresija humanog Ki-67 proteina striktno je povezana sa proliferacijom ćelija. Ki-67 je prisutan tokom svih aktivnih faza ćelijskog ciklusa ( $G_1$ , S,  $G_2$  i mitoze), ali je značajno smanjen u ćelijama u fazi mirovanja ( $G_0$ ) (Gerdes i sar., 1984). Distribucija Ki-67 proteina u ćeliji značajno se menja tokom progresije ćelijskog ciklusa. Tokom interfaze, Ki-67 antigen može se detektovati isključivo u jedru, dok se u mitozu većina proteina premešta na površinu hromozoma (Scholzen i Gerdes, 2000). Njegova lokalizacija je u korelaciji sa različitim funkcijama. Tokom interfaze, Ki-67 je neophodan za normalnu distribuciju heterohromatina u ćeliji i za kondenzovanje heterohromatina u jedru. Tokom mitoze, Ki-67 je neophodan za formiranje perihromozomskog sloja ribonukleoproteinskog omotača koji oblaže kondenzovane hromozome i čini prosečno jednu trećinu mase mitotskih hromozoma. Prisutan u ovom sloju, on deluje tako što sprečava agregaciju mitotskih hromozoma (Sun i Kaufman, 2018). Zbog svojih karakteristika, Ki-67 je odličan marker za utvrđivanje frakcije rasta

određene ćelijske populacije. Ki-67 je prvi put identifikovan kao antigen u jedrima ćelija Hočkinovog limfoma (Gerdes i sar., 1983). Njegova karakteristika da je visoko eksprimiran u ćelijama koje su u ciklusu, s toga je postao klinički važan marker proliferacije za gradiranje mnogih tipova karcinoma sa dobro utvrđenom prognostičkom vrednošću (Gerdes i sar., 1987; Dowsett i sar., 2011). Frakcija Ki-67-pozitivnih tumorskih ćelija (proliferativni indeks) često je u korelaciji sa kliničkim tokom bolesti. Priprema novih monoklonskih antitela koja reaguju sa Ki-67 ekvivalentnim proteinom glodara proširila je upotrebu Ki-67 proteina kao markera proliferacije na laboratorijske životinje koje se rutinski koriste u bazičnim istraživanjima. Uprkos dugogodišnjem kliničkom benefitu, mnogo manje pažnje je posvećeno molekularnim funkcijama Ki-67. Ono što se sada zna o Ki-67 genu i strukturi proteina, spajanju mRNK, ekspresiji kao i ćelijskoj lokalizaciji tokom ciklusa ćelijske deobe, omogućilo je da se Ki-67 protein u velikoj meri koristi kao marker proliferacije, mada njegov funkcionalni značaj i dalje ostaje nejasan. Međutim, postoje indikacije da je ekspresija proteina Ki-67 apsolutno neophodna za progresiju kroz ciklus ćelijske deobe (Scholzen i Gerdes, 2000).

U dostupnoj literaturi postoje podaci o obrascima ekspresije proteina povezanih sa proliferacijom ćelija u humanom bubregu tokom perioda razvoja. Carev i saradnici (2006) proučavali su obrazac ekspresije mitotskih, antiapoptotskih i proapoptotskih faktora tokom razvoja bubrega kod embriona i fetusa starosti od 5. do 9. nedelje gestacije. Dokazana je veoma jaka proliferativna aktivnost ćelija, procenjena ekspresijom Ki-67 markera, tokom rane metanefrogeneze. Brojne Ki-67 pozitivne ćelije bile su prisutne u tkivu metanefrosa tokom 5. i 6. nedelje, posebno u ampuli ureternog popoljka i metanefrosnom mezenhimu. Rezultati ove studije su opisali karakteristične razvojne promene u metanefrosu tokom 7., 8. i 9. nedelje razvoja. Ureterni pupoljak formira primordijum sabirnog sistema. Iz metanefrosnog mezenhima kondenzovanog oko ampule formiraju se bubrežne vezikule, S-oblici i zreliji nefroni sa korpuskulima na kojima se jasno diferencira glomerul i Boumanova čaura. Delovi mezenhima između nefrona formiraju intersticijum. Brojne Ki-67 pozitivne ćelije bile su prisutne u sabirnim kanalima, posebno u ampuli. Takođe, nefroni u razvoju i intersticijum sadržali su veliki broj Ki-67 pozitivnih ćelija. Intenzivna nefrogeneza bila je praćena signifikantnim porastom ekspresije Ki-67. Sa porastom GS, proliferativne aktivnosti u metanefrosnom mezenhimu i sabirnim tubulima signifikantno je opadala. Combs i saradnici (1988) su analizirali obrasce ekspresije markera proliferacije, Ki-67 i proliferišućeg nuklearnog antigena (PCNA), u bubrežima humanih fetusa starosti od 8. od 14. nedelje. Dokazali su da je ekspresija Ki-67 veoma izražena u nefrogenoj zoni, u ranim stadijumima diferencijacije nefrona. Mnoge epitelne ćelije vezikula i sledećih ranih stadijuma razvoja nefrona, zapeta- i S-oblikovanih



telašaca, eksprimirale su Ki-67. Ipak, S-oblikovana telašca pokazivala su manji broj Ki-67 pozitivnih ćelija u odnosu na prethodne stadijume. Uopšteno, broja ćelija koje eksprimiraju Ki-67 progresivno se smanjivao paralelno sa maturacijom nefrona. U dobro diferenciranim bubrežnim korpuskulima, proliferativna aktivnost nije bila uočena u visceralnom sloju Boumanove kapsule. U fazi pune glomerularne diferencijacije, neujednačena Ki-67 ekspresija bila je prisutna u nekim parijetalnim epitelima ćelijama i u ćelijama unutar glomerularnog kapilarnog klupka koji po lokalizaciji odgovaraju mezangijalnim ili endotelnim ćelijama. PCNA ekspresija je bila najjače koncentrisana u nefrogenoj zoni sa opadajućim gradijentom kako se maturacija glomerula povećavala. Obrasci ekspresije Ki-67 i PCNA suštinski se nisu razlikovali.

Rezultati našeg istraživanja potvrdili su da se broj ćelija koje eksprimiraju Ki-67 u humanom fetalnom bubregu progresivno smanjuje prostorno, i sa napredovanjem GS. Ki-67 pozitivne ćelije bile su najbrojnije u nefrogenoj zoni i njihova brojnost postepeno je opadala prema formirajućoj meduli. Veliki broj imunopozitivnih ćelija detektovan je u svim delovima metanefrosnog mezenhima i ampulama sabirnih tubula. Ipak, najjveća gustina ćelija koje su eksprimirale ovaj marker proliferacije uočena je u početnim stadijumima oblikovanja nefrona, bubrežnim vezikulama, zapeta-oblicima i ranim S-oblicima nefrona. Tokom daljeg razvoja nefrona, broj Ki-67 pozitivnih ćelija postepeno se smanjivao u proksimalnom segmentu S-telašca, u kome su morfološke karakteristike bubrežnih korpuskula postale vidljive. Srednji i distalni segment S-telašca, koji su se diferencirali u segmente bubrežnog tubula, sadržali su nešto veći broj imunopozitivnih ćelija. Kako su nefroni sazrevali u dubljim delovima korteksa, broj ćelija koje eksprimiraju Ki-67 se smanjivao u svim segmentima nefrona. U formiranim renalnim korpuskulima jukstamedularne zone korteksa, Ki-67 su eksprimirale samo pojedinačne ćelije lokalizovane unutar glomerula. Slaba pozitivna reakcija je i dalje bila prisutna u apikalnom delu epitelnih ćelija proksimalnih tubula, dok su ostale tubularne strukture uglavnom bile Ki-67 imunonegativne. Medula, je takođe, eksprimirala Ki-67 antigen. Pojedinačne imunopozitivne ćelije bile su prisutne u Henleovim petljama, sabirnim kanalima i intersticijumu. U bubregu donesenog novorođenčeta imunopozitivna reakcija je bila uočena samo u pojedinačnim ćelijama svih strukturnih delova bubrega.

Nekoliko studija je ukazalo da je ravnoteža između preživljavanja ćelija i apoptoze neophodna za normalnu funkciju progenitora nefrona (Grobstein, 1953; Saxén, 1987; Bard, 2002). Mehanizmi uključeni u regulaciju apoptoze intenzivno su proučavani tokom poslednjih nekoliko decenija. Centralnu ulogu u kontroli apoptoze ima porodica kaspaza proteina čija se aktivacija odvija kaskadno i regulisana je različitim faktorima uključujući i porodicu Bcl-2

proteina (Hardwick i Soane, 2013; Green i Llambi, 2015). Antiapoptotski protein Bcl-2 i proapoptotski protein Bax deluju suprotno u regulaciji apoptoze. Bcl-2 je povezan sa spoljašnjom mitohondrijalnom membranom živih ćelija i sprečava Bax da razvije propustljivost mitohondrijalne membrane i tako pospeši otpuštanje citohroma c (Marchetti i sar., 1996; Yang i sar., 1997; Mikhailov i sar., 2001; Kuwana i sar., 2002). Kada citohrom c uđe u citoplazmu, vezuje se za faktor 1 koji aktivira apoptotsku proteazu (Apaf-1) što dovodi do aktivacije kaspaze 9 i posledično do apoptoze (Li i sar., 1997; Riedl i sar., 2005). Međutim, od nedavno je evidentno da funkcija članova porodice Bcl-2 nije ograničena samo na regulisanje apoptoze, već da oni imaju ulogu u regulaciji mitohondrijalne fuzije i fisije, a time i morfogenezu (Autret i Martin, 2009; Rolland, 2010; Westermann, 2010).

Ekskretorna i regulatorna funkcija bubrega ostvaruje se filtracijom na glomerularnom nivou, selektivnom reapsorpcijom iz filtrata koji prolazi duž bubrežnih tubula i sekrecijom od strane ćelija tubula u filtrat. Ovi procesi troše energiju, posebno na nivou proksimalnih i distalnih tubula gde su epitelne ćelije bogate mitohondrijama (Williams i sar., 1995; Madsen i Tisher, 2008). Razvoj bubrega je složen proces koji se dešava kao rezultat recipročnog induktivnog delovanja ureternog pupoljka i metanefrosnog mezenhima i uključuje morfogenezu sistema sabirnih kanala i nefrona (Costantini, 2006; Rosenblum i sar., 2017). Razvojni procesi su strogo kontrolisani kako bi se osiguralo da se dogode u pravo vreme i pravilnim redosledom, sve sa ciljem da se diferenciraju i održe različite populacije ćelija u strukturama bubrega (Clarke, 1990; Hammerman, 1998; Foley i Bard, 2002). Tako, prekomerna ili nedovoljna apoptoza tokom razvoja mogu izazvati abnormalnu morfogenezu (Chen i sar., 1994). Ekspresija Bcl-2 i članovi porodice kaspaze ispitivana je *in vivo* i *in vitro* kako bi se istražila njihova antiapoptotska i proapoptotska funkciju tokom morfogeneze struktura bubrega (Novack i Korsmeyer, 1994; Hayashi i Araki, 2002; Carev i sar., 2006). Osim toga, sugerisano je da su članovi porodica Bcl-2 i kaspaza uključeni u ćelijsku adheziju, migraciju, diferencijaciju, preživljavanje i proliferaciju interakcijom sa drugim faktorima tokom razvoja bubrega (Ziehr i sar., 2004; Lamkanfi i sar., 2007; Sheibani i sar., 2007). Međutim, analiza antiapoptotske uloge Bcl-2 i proapoptotske uloge Bax proteina zahteva precizne podatke o lokalizaciji njihove ekspresije u svim stadijumima normalnog razvoja.

Proteini Bcl-2 porodice regulisani su višestrukim mehanizmima. Njihovi nivoi ekspresije se veoma razlikuju u zavisnosti od tipa tkiva, ćelijske loze, faze razvoja i starosti organizma (LeBrun i sar., 1993; Prochazkova i sar., 2004; Singh i sar., 2019). LeBrun i saradnici (1993) prvi su proučavali distribuciju Bcl-2 u različitim fetalnim tkivima u nastojanju da razjasne potencijalnu ulogu ovog proteina tokom razvoja. Distribucija ekspresije Bcl-2

proteina u fetalnim tkivima bila je u skladu sa njegovom opisanom ulogom u promovisanju preživljavanja ćelija, verovatno sprečavanjem apoptoze u limfoidnim i drugim tkivima gde ćelijska smrt predstavlja aktivan regulatorni proces. Ekspresija Bcl-2 proteina bila je rasprostranjenija u fetalnim tkivima u poređenju sa tkivima odraslih, što je važno i za bubreg. Bcl-2 je otkriven u subkapsularno raspoređenim kondenzatima nefrogenih progenitornih ćelija i nefronima u nastajanju. Glomeruli koji su pripadali zrelijim i dublje u korteksu lokalizovanim nefronima pokazivali su slabiju Bcl-2 imunoekspresiju. Rezultati ove studije su potkrepili prethodne stavove o značaju induktivnog preživljavanja ćelija kao regulatornog procesa u normalnoj homeostazi i morfogenezi mnogih fetalnih struktura i tkiva. Bilo je očigledno da je Bcl-2 uključen u morfogenezu nefrona i drugih tkiva koja se karakterišu induktivnom interakcijom između epitela i mezenhima, verovatno posredovanjem u formiranju mezenhimnih kondenzata koji su programirani da se diferenciraju u više tipova ćelija definitivnih bubrežnih struktura. Kasnije imunohistohemijske studije sprovedene na humanim fetalnim bubrežima pokazale su sličnu lokalizaciju i intenzitet imunoekspresije za Bcl-2 (Chandler i sar., 1994; Lichnovský i sar., 1999; Carev i sar., 2006).

U našem istraživanju, poređenjem imunoekspresije Bcl-2 i Ki-67 na pratećim preseccima, dokazana je približno recipročna distribucija ćelija koje ekspimiraju ova dva markera u većini strukturnih delova nefrogene zone. Ipak, Bcl-2 se nije ekspimirao u subkapsularno lokalizovanom neindukovanom mezenhimu i ampulama sabirnih tubula, gde su brojne ćelije bile Ki-67 pozitivne. Jaka Bcl-2 ekspresija bila je rasprostranjena u indukovanim nefrogenim progenitornim ćelijama, mezenhimnim agregatima, bubrežnim vezikulama i zapeta-oblicima nefrona. Tokom formiranja S-oblikovanog telašca i prostorne ekspanzije razvijajućih nefrona prema susednoj zoni maturacije, jaka Bcl-2 imunoreaktivnost dokazana je u ćelijama parijetalnog sloja Boumanove kapsule i sloju primitivnih podocita. Ćelije tubularnih segmenta nefrona slabije su ekspimirale ovaj marker. Kako su vaskularizacija i maturacija nefrona napredovali, Bcl-2 bojenje je bilo manje intenzivno i ograničeno samo na parijetalni sloj Boumanove kapsule i bubrežne tubule. Suprotno, Bax se veoma slabo ekspimirao u pojedinačnim ćelijama rasutim kroz čitav metanefrosni mezenhim, kako neindukovani tako i indukovani, u mezenhimnim agregatima, ampulama sabirnih tubula, vezikulama, zapeta-oblicima i svim segmentima S-oblikovanog telašca. U zoni maturacije, samo nekoliko ćelija unutar glomerularnog kapilarnog klubeta i okolnim tubulima bojile su se slabo na Bax. U dubokom, jukstamedularnom delu korteksa, bubrežni korpuskuli i tubuli su pokazivali morfološke karakteristike definitivnih nefrona. Intenzivnije Bax imunobojenje primećeno je u proksimalnim i distalnim tubulima.

Podaci o ekspresiji proapoptotskih članova porodice Bcl-2 proteina u ćelijskim komponentama bubrežnog tkiva tokom razvoja i dalje su veoma ograničeni, što se posebno odnosi na Bax. Do sada, ni jedno istraživanje nije sprovedeno na humanom fetusnom bubregu. Međutim, nedavna studija Song-a i saradnika (2012) na eksperimentalnim životinjama imala je za cilj da uporedi lokalizaciju imunoekspresije Bcl-2 i Bax proteina tokom razvoja bubrega. Ovi autori su analizirali fetalne bubrege pacova i bubrege štenadi postnatalno i dokazali da se Bcl-2 i Bax jako ekspimiraju u ćelijama zrelih proksimalnih tubula u svim periodima razvoja. Najjače su se bojili zreli proksimalni vijugavi tubuli jukstamedularne zone korteksa. Nešto slabija imunoekspresija dokazana je u proksimalnim pravim tubulima, medularnim zracima i u meduli, dok su se veoma slabo bojile ćelije nezrelih proksimalnih i distalnih tubula. Uporedo sa rastom i razvojem, oblasti sa jakom ekspresijom Bcl-2 i Bax postepeno su se širile od jukstamedularnog prema srednjem i konačno superficijalnom korteksu, što je odgovaralo obrascu postepenog sazrevanja nefrona. Bcl-2 i Bax su se, takođe, različito ekspimirali u proksimalnim i distalnim tubulima iako ova dva segmenta nefrona skoro podjednako sadrže mitohondrije. Nalazi ove studije su sugerisali da se funkcija mitohondrija očigledno razlikuje između zrelih proksimalnih i ostalih tubula. U skladu sa tim, funkcionalni značaj različite ekspresije Bcl-2 i Bax u proksimalnim i distalnim tubulima ostaje nepoznat i svakako zahteva dodatna istraživanja. Naši rezultati su potvrdili nalaze dobijene na prethodnom eksperimentalnom modelu da jaka imunoekspresija Bcl-2 i Bax proteina prati postepenu maturaciju tubularne porcije nefrona vremenski i prostorno u korteksu, kao i da su Bcl-2 i Bax svakako uključeni u bubrežnu morfogenezu.

Faktori spoljašnje sredine mogu delovati na specifično genetsko programiranje i uticati na rast i razvoj. Izmene genetskog obrasca tokom fetalnog razvoja nastaju u zavisnosti od prirode, vremena, trajanja i ozbiljnosti inzulta koji deluje na bubreg. Delovanje štetnih faktora u nekom od perioda gestacije pre završetka nefrogeneze može uticati na konačan broj nefrona (Hotoura i sar., 2005). Pothranjenost uzrokovana niskom proteinskom ishranom tokom intrauterinog i neonatalnog života i loše navike u ishrani u kasnijem životnom dobu ispoljavaju štetno dejstvo na bubreg (Ingelfinger, 2003; Rostand, 2003). Dodatni faktori koji utiču na strukturu i funkciju bubrega su LBW, IUGR, deficit vitamina A, malformacije urinarnog trakta kao što su opstruktivna uropatija i infekcije, kao i upotreba nefrotoksičnih lekova kod majke ili novorođenčeta. Ovi faktori mogu delovati i uzajamno da bi povećali potencijal za oštećenje nefrona (Amann i sar., 2004; Hoy i sar, 2005). Akison i saradnici (2020) su proučavali uticaj alkohola na razvoj bubrega. Efekti izloženosti umerenim količinama alkohola ispitivani su na modelu pacova. Pacovi su tokom trudnoće hranjeni tečnom hranom

koja je sadržala 6% alkohola. Bubrezi su analizirani na dan embriona (E) 20 ili postnatalni dan (PN) 30. Ukupan broj nefrona/glemerula određivan je primenom stereoloških metoda. Na E20, fetusi izloženi alkoholu imali su manje nefrona sa povećanom apoptozom. Izloženost alkoholu prouzrokovala je disregulaciju antiapoptotskih (Bcl-2) i proapoptotskih (Bax) faktora i smanjenu ekspresiju markera ćelijske proliferacije Ki-67 u bubregu. Dejstvo alkohola u prenatalnom periodu uticalo je na smanjene ekspresije Gdnf i Tgfb1, važnih regulatora morfogeneze grananja ureternog pupoljka kod muških fetusa. Kod PN30, zapremina bubrega i broj nefrona bili su manji kod potomaka koji su prenatalno bili izloženi dejstvu alkohola. Iako je uticaj na funkciju bubrega odraslih bila relativno mala, konzumacija umerenih količina alkohola tokom trudnoće imala je za posledicu trajno oštećenje bubrega i deficit nefrona. Prethodne studije su, takođe, pokazale da je apoptoza mehanizam koji preovlađuje u hronično oštećenom bubregu nakon opstrukcije i da abnormalni obrasci ćelijske kinetike mogu doprineti patogenezi bolesti u fetalnom bubregu. Liapis i saradnici (2000) su primenili potpunu opstrukciju uretera kod mladunaca oposuma, koji su žrtvovani nakon dve nedelje, da bi procenili ulogu gena ćelijske proliferacije, apoptoze i apoptoza regulatornih gena, Bcl-2 i Bax. Utvrđeno je da bubrezi fetusa nakon opstrukcije pokazuju visoku apoptozu u bubrežnoj karlici i tubulointercijumu, u poređenju sa kontrolnom grupom lažno operisanih životinja. Apoptoza je bila praćena statistički značajnim povećanjem proliferacije ćelija u intersticijumu, ali ne i u tubulima. Istovremeno, apoptozu u tubulima pratila je smanjena Bcl-2 i povećana Bax ekspresija. U nefrogenoj zoni apoptoza je bila u porastu, ali ne statistički značajno. Ekspresija Bcl-2 i Bax u nefrogenoj zoni bila je nepromenjena, dok je stopa proliferacija bila povećana.

Bubreg je organ čije se anatomske karakteristike značajno razlikuju u zavisnosti od GS. Dužina fetalnog bubrega, merena ultrazvučno, pokazuje linearni porast sa napredovanjem trudnoće i od velikog je značaja za procenu normalnog razvoja fetalnog bubrega. Kriva rasta dužine bubrega ima sličan trend kao i kriva rasta biparijetalnog dijametra i, zajedno sa ovim parametrom, od značaja je za procenu GS (Sagi, Vagman i sar., 1987). Studije realizovane sa ciljem da se utvrdi zrelosti bubrega u različitim fazama razvoja rađene su dugi niz godina. Ipak, malo je njih analiziralo razvoj u odnosu na GS u svetlu tehnološkog napretka u oblasti morfometrije. Značaj pouzdanog određivanja GS na obdukcijama dobro je utvrđeno, jer saznanja o različitim fazama razvoja fetusa omogućavaju karakterizaciju patoloških procesa koji su eventualno otkriveni (dos Santos i sar., 2006). Iako je razvoj bubrega dosta proučavan na eksperimentalnim modelima, još uvek su dosta oskudni podaci koji opisuju razvojne karakteristike bubrega kod ljudi. U protekle tri do četiri decenije objavljeno je nekoliko studija koje

su kvantifikovale razvoj segmenata nefrona u humanim fetalnim bubrežima. Glomerulogeneza je često bila predmet istraživanja ovih studija (Souster i Emery, 1980; Hinchliffe, 1991; Hinchliffe i sar., 1992; Almeida i Mandarim-de-Lacerda, 2002; Daković-Bjelaković i sar., 2006; dos Santos i sar., 2006; Takano i sar., 2007; Fonseca Ferraz i sar., 2008; Chikkannaiah i sar., 2012; Daković-Bjelaković i sar., 2018; Ryan i sar., 2018). Međutim, tubulogeneza je vrlo retko kvantifikovana (Daković-Bjelaković i sar., 2005).

Nakon prvih nekoliko generacija grananja ureternog pupoljka i istovremene indukcije nefrona iz metanefrosnog mezenhima, u bubregu koji se razvija diferencira se spoljašnji korteks i unutrašnja medula (Blake i Rosenblum, 2014; Rosenblum i sar., 2017; Daković-Bjelaković i sar., 2018). Glomeruli, proksimalni i distalni tubuli raspoređeni su u korteksu zajedno sa najdistalnijim delom nefrona, spojnim tubulom, koji se povezuje direktno sa sabirnim sistemom. Henleove petlje i ostatak sistema sabirnih tubula su epitelne strukture lokalizovane u meduli (Jacobson, 1981; Madsen i Tisher, 2008; O'Brien i McMahon, 2014). Rast bubrega i nefrogeneza se odvijaju radijalno sa novim generacijama sabirnih tubula i novim nefronima formiranim na krajnjoj periferiji, u delu korteksa koji je označen kao nefrogena zona. Sabirni kanali nastali grananjem ureternog pupoljka zrakasto se pružaju prema nefrogenoj zoni u kojoj se odvija indukcija nefrona.

Nefrogena zona je morfološki identifikovana kao uska traka bubrežnog tkiva koja leži neposredno ispod bubrežne čaure. Spoljašnja granica nefrogene zone stupa u kontakt sa dubokom stranom bubrežne kapsule. Njena unutrašnja granica, prema ostalom delu korteksa, definisana je nepravilnom linijom koja se proteže duž proksimalnog pola (orijentisan prema meduli) S-oblikovanih telašaca. Preko svoje unutrašnje granice, nefrogena zona je u odnosu sa susednom zonom maturacije. Komponente sadržane u nefrogenoj zoni su distalni krajevi sabirnih tubula prošireni u ampulu, nefrogene i stromagene progenitorne ćelije i nefroni u nastajanju kao što su pretubularni agregati, bubrežne vezikule, zapeta-oblikovana i S-oblikovana telašca.

Samo nekoliko radova u dostupnoj literaturi predstavili su morfometrijsku analizu nefrogene zone uz prikaz varijacija njene širine prema GS (Barbet i sar., 1988; Barinov i Sulaeva 2003; dos Santos i sar., 2006; Fonseca Ferraz i sar., 2008, Ryan i sar., 2018). U rezultatima svih navedenih istraživanja zabeležena je činjenica da kod donesene novorođenčadi nefrogena zona nije prisutna (Barbet i sar., 1988; Rodríguez i sar., 2004). Nefrogena zona tokom vremena progresivno postaje uža zbog postepenog iscrpljivanja nefrogenih prekursora i definitivno nestaje kada broj nefrona dostigne pun komplement. Ovaj relativno nov parametar

tar koristitan za procenu GS analiziran je kod eksperimentalnih životinja za interpretaciju podataka o brzina formiranja nefrona (Barinov i Sulaeva, 2003).

Na histološkim preparatima, stadijum nefrogeneze može pomoći u proceni GS brojanjem slojeva glomerula duž uzdužne ose, odnosno brojanjem glomerula duž prave linije koja počinje u dubokoj, jukstamedularnoj zoni korteksa i nastavlja se postepeno prema bubrežnoj kapsuli, u dobro ograničenim poljima između medularnih zraka (Hinchliffe i sar., 1992; Rodríguez i sar., 2004). Prvi nefroni se formiraju oko 9. nedelje gestacije i u 20. nedelji ima otprilike 4 generacije zrelih glomerula (Barbet i sar., 1988; dos Santos i sar., 2006). Sa početkom indukcije nefrona, formirana je nefrogena zona u kojoj nefroni počinju da se razvijaju i gde se postepeno oblikuju. Iz nefrogene zone nastaju uzastopne generacije glomerula koje postepeno sazrevaju i migriraju prema najdubljoj zoni korteksa u vidu stubova. Između 20. i 25. nedelje, nefrogena zona sadrži tri reda primitivnih glomerula dok dublje u korteksu postoje 2-4 generacije zrelih glomerula. Između 25. i 28. nedelje, u nefrogenoj zoni postoje dva reda primitivnih glomerula i 4-6 generacija zrelih glomerula u korteksu. Između 28. i 30. nedelje postoji samo jedan red primitivnih glomerula i 6-8 generacija zrelih glomerula. Nakon 30. nedelje, red primitivnih glomerula je inkompletan i konačno nestaje oko 36. nedelje (Barbet i sar., 1988).

Dos Santos i saradnici (2006) su procenjivali bubrežnu zrelost primenom kompjuterske asistirane morfometrije kod fetusa starosti od 20 do 40 nedelja gestacije i korelirali dobijene partametre sa GS koja je procenjivana merenjem dužine haluks-kalkaneus na obdukcijama. Njihovi rezultati su se razlikovali od onih koji se nalaze u literaturi, s obzirom na brzinu kojom se broj slojeva zrelih glomerula povećavao. Oni su, takođe, primetili da sa povećanjem GS dolazi do opadanja širine nefrogene zone i linearnog povećanja broja slojeva zrelih glomerula. Zabeležena je jaka negativna i statistički značajna korelacija između širine nefrogene zone i GS. Korelacija između broja slojeva zrelih glomerula i GS bila je jaka pozitivna i statistički značajna. Ipak, ovi autori su u GS fetusa od oko 22 nedelje pronašli četiri sloja glomerula i u svakom narednom periodu od više od 4 nedelje još po jedan novi sloj glomerula koji je pridodat korteksu sve do termina, kada je prosečno osam slojeva zrelih glomerula izbrojano. Signifikantne razlike u broju slojeva glomerula zabeležene su u 22., 25., 35., 36., i 39. nedelji gestacije. Kao moguće objašnjenje za dobijene razlike u odnosu na prethodna istraživanja, ovi autori su naveli metodu na osnovu koje je procenjivana GS. U studijama pronađenim u literaturi (Barbet i sar., 1988; Rodríguez i sar., 2004) podaci o poslednjem menstrualnom periodu i ultrazvučnog nalaza korišćeni su za procenu GS. U još

jednoj od prethodnih studija, u GS od oko 20 nedelja, pronađeno je šest slojeva zrelih glomerula (Rodríguez i sar., 2004).

Rezultati našeg istraživanja su potvrdili da je širina nefrogene zone u humanom fetalnom bubregu inverzno korelira sa GS. U periodu od 13-16 nedelja, prosečna širina nefrogene zone iznosila je 253,86  $\mu\text{m}$ . Sa porastom GS i napredovanjem nefrogeneze, zabeležen je statistički značajan pad prosečne širine nefrogene zone u periodu od 21-24 nedelja i periodu od 25-28 nedelja, što ukazuje na značajno iscrpljivanje potencijala bubrega prema stvaranju novih nefrona u ovim gestacijskim periodima. Statistički značajno smanjenje prosečne širine nefrogene zone u odnosu na prethodnu starosnu grupu ponovo je zabeleženo u periodu od 33-36 nedelja, kada je zabeležena najniža prosečna vrednost od 114,33  $\mu\text{m}$ . I u našem uzorku, kao i u drugim studijama, u periodu od 37-40 nedelja gestacije nefrogena zona nije bila prisutna, a ispod kapsule mogli su se videti bubrežni tubuli i vezivno tkivo. Suprotno širini nefrogene zone, broj generacija glomerula i debljina korteksa bili su u direktnoj korelaciji sa GS. Broj generacija glomerula povećavao se od 3,16 u periodu od 13-16 nedelja do 8,32 u periodu od 37-40 nedelja. Statistički značajno povećanje zabeleženo je u 17-20, 21-24, 25-28 i 37-40 nedelja. Sa razvojem parenhimskih struktura, prosečna debljina bubrežnog korteksa raste od 954,88  $\mu\text{m}$  u periodu od 17-20 nedelja do 1586,20  $\mu\text{m}$  u periodu od 37-40 nedelja. Statistički značajno povećanje u odnosu na prethodnu starosnu grupu zabeležili smo u periodu od 21-24 i 25-28 nedelja.

Ryan i saradnici (2018) su proučavali razvoj bubrega kod humanih fetusa oba pola tokom drugog i trećeg trimestra. Oni su pokazali da prosečna area bubrežnih korpuskula kod ženskog pola raste od  $3631 \pm 594 \mu\text{m}^2$  u 23. nedelji do  $5136 \pm 235 \mu\text{m}^2$  u terminu, uz signifikantnu pozitivnu korelaciju sa GS. Kod muškog pola, ovaj odnos je bio drugačiji. Prosečna area je pokazala samo blagi porast od  $4677 \pm 238 \mu\text{m}^2$  u 23. nedelji do  $5021 \pm 158 \mu\text{m}^2$  u terminu, uz veoma slabu korelaciju sa GS. Mishra i saradnici (2006) su sprovedli morfološko i morfometrijsko istraživanje razvoja bubrega kod humanih fetusa GS od 14 do 28 nedelja. Njihovi rezultati su pokazali da se prosečna area glomerula postepeno povećava u početnim stadijumima fetalnog razvoja, sve do perioda od 16-18 nedelja. Tokom daljeg razvoja i sa napredovanjem GS, vrednosti prosečne aree glomerula postepeno opadaju. U studiji koja je ovde prezentovana, analizirali smo značajno duži period fetalnog rasta. U istraživanje su uključeni fetusi starosti od 13 do 40 nedelja. Analizirali smo promene u veličini bubrežnih korpuskula određivanjem tri morfometrijska parametra. Rezultati su pokazali da nakon početnih vrednosti prosečne aree, perimetra i Feretovog dijametra bubrežnih korpuskula koje smo utvrdili u periodu od 13-16 nedelja gestacije, sva tri parametara veličine postepeno opadaju do



perioda od 29-32 nedelje, nakon čega je zabeležen porast sve do termina. Sličan nalaz je bio zabeležen u prethodnoj studiji Mishra i saradnika (2006). Naši rezultati su potvrdili da su area, perimenter i Feretov dijametar obrnuto proporcionalni GS tokom perioda eksponencijalnog rasta broja nefrona, na šta je ukazala i histološka analiza. Kod ljudi, najveći broj nefrona se formira u periodu između 18. i 32. nedelje gestacije (Hinchliffe, 1991). Smanjenje prosečne veličine bubrežnih korpuskula posledica je razvojnih promena strukture korteksa i promenom odnosa elemenata parenhima i strome. Kako nefrogeneza napreduje, novoformirani korpuskuli koja su nezreli i manji pridodaju se površnim delovima bubrežnog korteksa što dovodi do smanjenja njihove prosečne veličine. Kao rezultat ovakvog obrasca razvoja, postoje regionalne razlike u veličini glomerula unutar korteksa fetusa i donesene dece. Jukstamedularni glomeruli su značajno veći (prvo formirani) od površinskih glomerula (poslednje formirani). Naknadna diferencijacija nefrona nastavlja se posle rođenja. Glomeruli dostižu veličinu odrasle osobe u prve 3 do 5 godina života, kada glomeruli u svim zonama bubrežnog korteksa dostižu istu veličinu (Souster and Emery 1980). Ranije objavljena studija na humanim fetusima različitih GS pokazala je da se prečnik glomerula raste od superficijalne ka jukstamedularnoj zoni korteksa (Daković-Bjelaković i sar., 2006). Prečnik superficijalnih glomerula postepeno je rastao sa napredovanjem GS uz jaku i statistički značajnu korelaciju sa GS, dok je prečnik intermedijalnih i jukstamedularnih glomerula bio relativno konstantan. Ovi autori su utvrdili slabu korelaciju između prečnika intermedijalnih i jukstamedularnih glomerula i GS. Nasuprot tome, Fonseca Ferraz i saradnici (2008) su pokazali da prosečna area i prečnik glomerula superficijalne i intermedijalne zone ostaju relativno konstantni i ne koreliraju statistički značajno sa GS. U pogledu glomerula intermedijalne zone, area i prečnik glomerula rastu sa napredovanjem GS uz pozitivnu i statistički značajnu korelaciju sa GS. U literaturi je opisano da intermedijalni glomeruli trpe varijacije prema stepenu razvoja (Mañalich i sar., 2000; Rodríguez i sar., 2004; Pusztaszeri i sar., 2006). Ipak, bilo je teško uporediti rezultate našeg istraživanja sa dve prethodne studije s obzirom da nismo kvantifikovali bubrežne korpuskule prema lokaciji u korteksu. Ipak, histološka analiza preparata bojenih HE koja je prethodila kvantifikaciji, potvrdila je heterogenost veličine bubrežnih korpuskula u odnosu na zone korteksa, i bila je dominantna karakteristika u ranim fazama fetalnog razvoja.

U literaturi je pronađena samo jedna studija u kojoj su autori, slično našem istraživanju, koristili tri parametra za analizu veličine glomerula. Moore i saradnici (1993) su pratili promene veličine glomerula kod dece starosti do 16. godine. Area, perimetar i maksimalni glomerularni dijametar određivani su primenom kompjuterski asistirane morfometrije. Njihovi rezultati su pokazali da kod dece rođene u terminu, tokom prve godine života, prosečna

area glomerula iznosi  $7934 \mu\text{m}^2$ , prosečan perimetar  $362 \mu\text{m}$  i maksimalni glomerularni dijametar  $112 \mu\text{m}$ .

Proučavanje arealne gustine bubrežnih korpuskula ili samo glomerula je najpragmatičniji pristup za procenu broja nefrona. Poprečni preseki korpuskula/glomerula uočeni na histološkim presecima se broje i zatim izražavaju kao korpuskularni/glomerularni broj po jedinici površine preseka. Ipak, broj preseka korpuskula na histološkom preseku zavisi ne samo od broja prisutnih korpuskula, već i od njihove veličine i oblika (Bertram, 1995; Nyengaard, 1999). Uprkos činjenici da je numerička arealna gustina može biti informativna u određenim uslovima, ona je retko primenjivana u bazičnim istraživanjima bubrežnog razvoja. Almeida i Mandarim-de-Lacerda (2002) su među prvima kvantifikovali nefrogenezu u humanom bubregu. Njihova stereološka studija uključila je malu grupu fetusa čija se GS kretala u rasponu od 8 do 30 nedelja. Uzorci su bili raspoređeni u dve starosne grupe koje su odgovarale drugom i trećem trimestru. Kroz vrednosti tri parametra, volumenske gustine, površinske gustine i numeričke arealne gustine analiziran je odnos razvojnih oblika nefrona. Utvrđeno je smanjenje numeričke arealne gustine nefrona u stadijumu zarez a i S-oblika koji su bili prisutni u nefrogenoj zoni od drugog do trećeg trimestra. Istovremeno, postojao je porast numeričke arealne gustine vaskularizovanih glomerula koji su bili lokalizovani niže u korteksu za više od 80%. Mi smo pokušali preciznije da kvantifikujemo promene u numeričkoj arealnoj gustini bubrežnih korpuskula koristeći veći broj uzoraka, tipično raspoređenih u gestacijske periode koji odgovaraju lunarnim mesecima. Tako smo utvrdili statistički značajno povećanje numeričke arealne gustine bubrežnih korpuskula sve do perioda od 21-24 nedelje i nakon toga značajno smanjenje do perioda od 36-40 nedelja. S obzirom da je nefrogeneza aktivna sve do GS u rasponu od 32. do 36. nedelje, smanjenje numeričke arealne gustine bubrežnih korpuskula može se objasniti promenom odnosa korpuskularne i tubularne porcije nefrona u korteksu u korist tubularne porcije (Dakovic Bjelakovic i sar., 2018). Konačno, u poslednjim nedeljama gestacije, na vrednosti numeričke arealne gustine bubrežnih korpuskula/glomerula može da utiče i signifikantno povećanje njihove veličine koje je dokazano u ovom istraživanju.

Na razumevanje morfoloških karakteristika razvoja nefrona kod ljudi i pojedinačno njegovih strukturnih segmenata u velikoj meri su doprinele anatomska mikrodisekcijska istraživanja Edith Potter i Vitoon Osathanondh-a sprovedene sredinom 60-tih godina prošlog veka (Osathanondh i Potter; 1963; Potter, 1965; Osathanondh i Potter; 1966; Osathanondh i Potter, 1966, Potter i Osathanondh, 1966). Kasnije su i drugi autori bazirali svoja istraživanja na ovim odnosima (Saxén i Sariola, 1987; Song i sar., 2012; Minuth, 2019; Minuth, 2020;

Minuth, 2021; Faa i sar., 2012). Ipak, samo jedna studija je kvantifikovala razvoj bubrežnih tubula u korteksu bubrega humanih fetusa i prikazala postepen rast njihove volemenske gustine (Daković-Bjelaković i sar., 2005). Slično tome, mi smo dokazali trend rasta prosečne aree i numeričke arealne gustine bubrežnih tubula tokom celog ispitivanog perioda razvoja, uz statistički značajnu pozitivnu korelaciju sa GS. Međutim, zabeležen je različit stepen promene ovih parametara u pojedinim gestacijskim periodima. Rezultati morfometrijske analize sumirani u našoj studiji pokazali su da period postepenog opadanja vrednosti prosečne arealne gustine bubrežnih korpuskula počinje nakon perioda signifikantnog porasta arealne gustine bubrežnih tubula i nastavlja se dalje do termina. Smanjenje vrednosti prosečne numeričke arealne gustine bubrežnih korpuskula može biti povezano kako sa povećanjem bubrežnih korpuskula tako i rastom kortikalnih segmenata tubularne porcije nefrona.

Osathanondh i Potter (1966) su na osnovu rezultata svojih istraživanja podelili razvoj nefrona u tri karakteristična perioda. Prvi period započinje separacijom grupe mezenhimnih ćelija od metanefrosnog blastema koje u narednim fazama diferencijacije formiraju epitelne vezikule, zapeta- i S-oblike i završava se kada se uspostavi komunikacija između tubularne porcije razvijajućeg nefrona i ampule sabirnog tubula. Drugi period se karakteriše diferencijacijom tubularne porcije nefrona u segmente. Treći period razvoja nefrona traje dok Henle-ova petlja ne dostigne svoju punu dužinu i vijugavi tubuli svoju maksimalnu izvijuganost. Hinchliffe i saradnici (1991) su predložili tri uzastopna perioda u razvoju humanog bubrega. Populacioni period traje od 15. do 25. nedelje gestacije i dominantno se karakteriše formiranjem novih generacija nefrona i progresivno većim prisustvom nezrelih kortikalnih struktura. Period stagnacije traje od 25. do 36. nedelje. Tokom ovog perioda efekat formiranja novih, nezrelih nefrona je uravnotežen povećanjem rasta kortikalnih segmenata nefrona. Treći period je period rasta, koji traje od 36. do 40. nedelje. Ovaj period se dominantno karakteriše rastom kortikalnih segmenata nefrona u odnosu na indukciju nefrona koja je već dostigla plato. Period stagnacije i period rasta poklapaju se sa Potter-ovim drugim i trećim periodom razvoja nefrona, mada se promene u obrascu bubrežnog rasta dešavaju nešto kasnije, između 25. i 36. nedelje gestacije. U skladu sa prethodnim studijama, utvrdili smo značajno povećanje numeričke arealne gustine bubrežnih korpuskula i tubula do perioda od 21-24 nedelja što odgovara (populacioni period). Nakon toga, numerička arealna gustina bubrežnih korpuskula je opadala do perioda od 33-36 nedelja, dok je istovremeno numerička arealna gustina bubrežnih tubula održavala relativno konstantno (period stagnacije). Naši rezultati su pokazali da se period od 37-40 nedelje karakteriše značajnim povećanjem prosečne aree bubrežnih

korpuskula uz smanjenje njihove numeričke arealne gustine i značajnim porastom prosečne arealne gustine bubrežnih tubula (period rasta).

Naša studija omogućila je da se prikažu novi morfološki podaci vezani za normalan rast i razvoj bubrega u odnosu na GS. Uspostavljanje normalnih imunohistohemijskih i morfometrijskih parametara za procenu nefrogeneze i stadijuma zrelosti bubrega, mogu da posluže za poređenje sa obdukcijским materijalom bubrega kod kojih postoji sumnja na patološke promene u ispitivanim oblastima bubrežnog tkiva i povećaju dijagnostičku preciznost.

## 7. ZAKLJUČCI

---

Na osnovu dobijenih rezultata u ovom istraživanju može se zaključiti sledeće:

- Mikroanatomske karakteristike bubrega čoveka tokom razvoja značajno se razlikuju zavisno od GS. Fetalni bubrezi pokazuju prostorni i vremenski gradijent razvoja i diferencijacije sa prolaznim stadijumima novoformiranih nefrona koji se razvijaju u perifernoj nefrogenoj zoni i nefronima koji sazrevaju u susednoj zoni maturacije. U unutrašnjem delu korteksa, nefroni uspostavljaju morfološke karakteristike definitivnih nefrona.
- Nefrogena zona prisutna je u svim starosnim grupama kod kojih je nefrogeneza u toku, najkasnije do 36. nedelje gestacije. Indukcija nefrona odvija se na vrhu ampule sabirnog tubula. Nefroni se postepeno oblikuju u bliskom odnosu sa sabirnim tubulom.
- Tokom razvoja menja se odnos između elemenata parenhima i strome, kao i odnos između korpuskularne i tubularne porcije nefrona. Razvoj medularnih struktura počinje kasnije u odnosu na korteks, značajno nakon perioda od 17-20 nedelja gestacije.
- Nuklearni protein Ki-67 i apoptoza regulatorni proteini, Bcl-2 i Bax, eksprimiraju se različitim intenzitetom u ćelijskim populacijama bubrega tokom razvoja. Step eno ekspresije proporcionalan je stadijumima nefrogeneze i GS. Imunoekspresija se menja paralelno sa talasima novoformiranih nefrona, njihovom ekspanzijom prema dubljim delovima korteksa i terminalnom diferencijacijom dokazujući ulogu u morfogenezi.
- Proliferativni kapacitet ćelija, procenjen ekspresijom Ki-67 markera, jako je veliki u strukturnim komponentama nefrogene zone. U metanefrosnom mezenhimu, neindukovanom i indukovanom, i sabirnim tubulima prisutne su brojne ćelije koje eksprimiraju Ki-67. Gustina imunopozitivnih ćelija najveća je u ranim stadijumima novoformiranih nefrona, od pretubularnih agregata do ranih S-formi.

- Paralelno sa razvojem glomerula, diferencijacijom i maturacijom nefrona u dubljim delovima korteksa postoji kontinuirani trend smanjenja proliferativnog kapaciteta ćelija različitog intenziteta u pojedinim segmentima nefrona. Broj Ki-67 imunopozitivnih ćelija opada brže u bubrežnim korpuskulima u odnosu na tubule. Veći broj epitelnih ćelija koje eksprimiraju Ki-67 marker prisutan je u okolnim tubulima.
- Jaka imunoekspresija antiapoptotskog markera Bcl-2 rasprostranjena je u indukovanim nefrogenim progenitornim ćelijama i u ranim stadijumima novoformiranih nefrona od pretubularnih agregata do zapeta-oblika. U proksimalnom segmentu S-forme i nefronima koji sazrevaju dublje u korteksu jaka ekspresija prisutna je u ćelijama parijetalnog lista Boumanove kapsule i sloju primitivnih podocita. Epitelne ćelije tubularnih segmenata progresivno slabije eksprimiraju Bcl-2. Sabirni tubuli nisu imunoreaktivni za Bcl-2.
- U dobro vaskularizovanim i diferentovanim bubrežnim korpuskulima, Bcl-2 se ekspri-mira samo u epitelnim ćelijama parijetalnog sloja Boumanove kapsule. Umerena do slaba imunoekspresija prisutna je u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula i jaka do umerena imunoekspresija u ćelijama distalnih tubulija.
- Proapoptotski marker Bax slabo se ekspri-mira u pojedinačnim ćelijama nepravilno rasutim kroz metanefrosni mezenhim, sabirne tubule, pretubularne agregate, vezikule, zapeta-oblike i kroz sve segmente S-forme. U nefronima koji sazrevaju dublje u kortek-su, samo nekoliko ćelija unutar glomerularnog kapilarnog klubeta i okolnim tubulima slabo eksprimiraju Bax.
- U diferentovanim nefronima raspoređenim u unutrašnjem delu korteksa, Bax se jače ekspri-mira samo u proksimalnim i distalnim tubulima.
- Nefrogena zona se tokom vremena postepeno istanjuje i razređuje usled iscrpljivanja nefrogenih prekursora. Njena širina opada statistički značajno u periodima od 21-24, 25-28 i 32-36 nedelje i korelira jakim negativnom korelacijom sa GS.
- Nastavljajući stadijum S-forme, nefroni napuštaju nefrovenu zonu i spuštaju se dublje u korteks gde postepeno sazrevaju. Broj generacija morfološki uobličeni glomerula raste statistički značajno u periodima od 17-20, 21-24, 25-28 i 29-32 nedelje uz jaku pozitivnu korelaciju sa GS.

- Proporcionalno sa GS, talasima novoformiranih nefrona i terminalnom diferencijacijom korpuskularne i tubularne porcije, debljina korteksa kontinuirano raste. Statistički značajno povećanje utvrđeno je u periodima od 21-24 i 25-26 nedelje. Debljina bubrežnog korteksa korelira jakim pozitivnom korelacijom sa GS.
- Parametri veličine bubrežnih korpuskula, prosečna area, perimetar i Feretov dijametar, postepeno opadaju do perioda od 29-32 nedelje gestacije, nakon čega sledi značajan porast do perioda od 37-40 nedelje. Svi parametri veličine bubrežnih korpuskula koreliraju slabom negativnom korelacijom sa GS.
- Numerička arealna gustina bubrežnih korpuskula raste kontinuirano do perioda od 21-24 nedelje gestacije i zatim opada do termina, uz umerenu negativnu korelaciju sa GS.
- Prosečna area bubrežnih tubula pokazuje tendenciju blagog opadanja do perioda od 21-24 nedelje i nakon toga značajno raste do termina. Area bubrežnih tubula korelira umerenom pozitivnom korelacijom sa GS.
- Numerička arealna gustina bubrežnih tubula značajno raste do perioda od 21-24 nedelje, održava se relativno konstantno do perioda od 33-36 nedelje i ponovo značajno raste do termina, uz jaku pozitivnu korelaciju sa GS.
- U periodima eksponencijalnog povećanja broja nefrona, mlađi i manji korpuskuli pridodaju se korteksu što za posledicu ima rast prosečnih vrednosti numeričke arealne gustine bubrežnih korpuskula i smanjenje prosečnih vrednosti parametara veličine. Dužina bubrežnih tubula kontinuirano raste do termina. Odnos između korpuskularne i tubularne porcije se menja sa porastom GS u korist bubrežnih tubula što je prepoznatljivo kroz prizmu relativnog smanjenja numeričke arealne gustine bubrežnih korpuskula nakon perioda značajnog povećanja numeričke arealne gustine bubrežnih tubula.

## 8. LITERATURA

---

1. Abrahamson DR. (1987). Structure and development of the glomerular capillary wall and basement membrane. *Am J Physiol* 253(5 Pt 2):F783-94.
2. Abrahamson DR. (1991). Glomerulogenesis in the developing kidney. *Semin Nephrol* 11(4): 375-89.
3. Abrahamson DR, Robert B, Hyink DP, St John PL, Daniel TO. (1998). Origins and formation of microvasculature in the developing kidney. *Kidney Int (Suppl 67):S7-11*.
4. Aigner J, Kloth S, Jennings ML, Minuth WW. (1995). Transitional differentiation patterns of principal and intercalated cells during renal collecting duct development. *Epithelial Cell Biol* 4(3):121-30.
5. Akison LK, Probyn ME, Gray SP, Cullen-McEwen LA, Tep K, Steane SE, et al. (2020). Moderate prenatal ethanol exposure in the rat promotes kidney cell apoptosis, nephron deficits, and sex-specific kidney dysfunction in adult offspring. *Anat Rec (Hoboken)* 303(10): 2632-45.
6. Al-Awqati Q, Goldberg MR. (1998). Architectural patterns in branching morphogenesis in the kidney. *Kidney Int* 54(6):1832-42.
7. Al-Awqati Q, Oliver JA. (2002). Stem cells in the kidney. *Kidney Int* 61(2):387-95.
8. Almeida JR, Mandarim-de-Lacerda CA. (2002). Quantitative study of the comma-shaped body, S-shaped body and vascularized glomerulus in the second and third human gestational trimesters. *Early Hum Dev* 69(1-2):1-13.
9. Amann K, Plank C, Dötsch J. (2004). Low nephron number - a new cardiovascular risk factor in children?. *Pediatr Nephrol* 19(12):1319-23.
10. Ashkenazi A, Dixit VM. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281 (5381):1305-08.
11. Autret A, Martin SJ. (2009). Emerging role for members of the Bcl-2 family in mitochondrial morphogenesis. *Mol Cell* 36(3):355-63.
12. Ballermann BJ. (2005). Glomerular endothelial cell differentiation. *Kidney Int* 67(5): 1668-71.
13. Barbet JP, Houette A, Barres D, Durigon M. (1988). Histological assessment of gestational age in human embryos and fetuses. *Am J Forensic Med Pathol* 9(1):40-44.
14. Bard J. (1996). A new role for the stromal cells in kidney development. *Bioessays* 18 (9):705-07.



15. Bard JB. (2002). Growth and death in the developing mammalian kidney: signals, receptors and conversations. *Bioessays* 24(1):72-82.
16. Barinov EF, Sulaeva ON. (2003). Morphometric characteristics of the kidney nephrogenic zone in new born rats. *Morfologija* 123(2):77-80.
17. Barker DJ. (2007). The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 261(5):412-17.
18. Barker DJ, Osmond C. (1988). Low birth weight and hypertension. *BMJ* 297(6641):134-35.
19. Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. (1989). Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 298 (6673):564-567.
20. Barker DJ, Osmond C, Law CM. (1989). The intrauterine and early postnatal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis. *J Epidemiol Community Health* 43(3):237-40.
21. Barker DJ, Osmond C, Simmonds J, Wield GA. (1993). The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *BMJ* 306 (6875):422-26.
22. Bates C, H. J., Sims-Lucas, S. (2016). Embryonic Development of the Kidney. *Pediatric Nephrology*. Avner ED, Harmon WE, Niaudet P et al. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: 3-36.
23. Bell RD, Keyl MJ, Shrader FR, Jones EW, Henry LP. (1968). Renal lymphatics: the internal distribution. *Nephron* 5(6):454-63.
24. Bertram J, Douglas-Denton R, Diouf B, Hughson M, Hoy W. (2011). Human nephron number: implications for health and disease. *Pediatr Nephrol* 26(9):1529-33.
25. Bertram JF. (1995). Analyzing renal glomeruli with the new stereology. *Int Rev Cytol* 161:111-72.
26. Bertram JF, Soosaipillai MC, Ricardo SD, Ryan GB. (1992). Total numbers of glomeruli and individual glomerular cell types in the normal rat kidney. *Cell Tissue Res* 270(1):37-45.
27. Black MJ, Sutherland MR, Gubhaju L, Kent AL, Dahlstrom JE, and Moore L.(2013). When birth comes early;effects on nephrogenesis. *Nephrology (Carlton)*18(3):180-82.
28. Blake J, Rosenblum ND. (2014). Renal branching morphogenesis: morphogenetic and signaling mechanisms. *Semin Cell Dev Biol* 36:2-12.
29. Bloomfield FH. (2011). Epigenetic modifications may play a role in the developmental consequences of early life events. *J Neurodev Disord* 3(4):348-55.

30. Brennan S, Kandasamy J. (2017). Ultrasound imaging of the renal parenchyma of premature neonates for the assessment of renal growth and glomerulomegaly. *Ultrasound Med Biol* 43 (11):2546-49.
31. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. (1988). Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens* 1(4 Pt 1):335-47.
32. Brenner BM, Lawler EV, Mackenzie HS. (1996). The hyperfiltration theory: a paradigm shift in nephrology. *Kidney Int* 49(6): 1774-77.
33. Carev D, Krnić D, Saraga M, Sapunar D, Saraga-Babić M. (2006). Role of mitotic, pro-apoptotic and anti-apoptotic factors in human kidney development. *Pediatr Nephrol* 21(5): 627-36.
34. Chandler D, el-Naggar AK, Brisbay S, Redline RW, McDonnell TJ. (1994). Apoptosis and expression of the bcl-2 proto-oncogene in the fetal and adult human kidney: evidence for the contribution of bcl-2 expression to renal carcinogenesis. *Hum Pathol* 25(8):789-96.
35. Chang M, Parker EA, Muller TJ, Haenen C, Mistry M, Finkielstain GP et al. (2008). Changes in cell-cycle kinetics responsible for limiting somatic growth in mice. *Pediatr Res* 64(3):240-45.
36. Chen B, Cyr DG, Hales BF. (1994). Role of apoptosis in mediating phosphoramidate mustard-induced rat embryo malformations in vitro. *Teratology* 50(1):1-12.
37. Chikkannaiah P, Roy M, Kangle R, Patil PV. (2012). Glomerulogenesis: can it predict the gestational age? A study of 176 fetuses. *Indian J Pathol Microbiol* 55(3):303-07.
38. Chinnaiyan AM. (1999). The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1(1):5-15.
39. Clarke PG. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 181(3):195-213.
40. Cohen GM. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1):1-16.
41. Combes AN, Davies JA, Little MH. (2015). Cell-cell interactions driving kidney morphogenesis. *Curr Top Dev Biol* 112:467-508.
42. Combs HL, Shankland SJ, Setzer SV, Hudkins KL, Alpers CE. (1998). Expression of the cyclin kinase inhibitor, p27kip1, in developing and mature human kidney. *Kidney Int* 53 (4):892-96.
43. Conlon I, Raff M. (1999). Size control in animal development. *Cell* 96(2):235-44.
44. Cooper G. (2000). *The cell: A molecular Approach*. Washington, D.C., Sunderland (MA): Sinauer Associates.

45. Cooper R, Atherton K, Power C. (2009). Gestational age and risk factors for cardiovascular disease: evidence from the 1958 British birth cohort followed to mid-life. *Int J Epidemiol* 38(1):235-44.
46. Costantini F. (2006). Renal branching morphogenesis: concepts, questions, and recent advances. *Differentiation* 74(7):402-21.
47. Costantini F. (2012). Genetic controls and cellular behaviors in branching morphogenesis of the renal collecting system. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 1(5):693-713.
48. Crews FJ, He J, Hodge C. (2007). Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 86(2):189-99.
49. Crump C, Sundquist J, Winkleby MA, Sundquist K. (2019). Preterm birth and risk of chronic kidney disease from childhood into mid-adulthood: national cohort study. *BMJ* 365:11346.
50. Cullen-McEwen L, Sutherland RM, Black MJ. (2016). The human kidney: parallels in structure, spatial development, and timing of nephrogenesis. *Kidney development, disease, repair and regeneration*. L. MH. Amsterdam, Academic Press: 27-40.
51. Čukuranović R. (2019). *Anatomija čoveka*. Niš, Medicinski fakultet u Nišu.
52. Da Sacco S, Thornton ME, Petrosyan A, Lavarreda-Pearce M, Sedrakyan S, Grubbs BH, et al. (2017). Direct isolation and characterization of human nephron progenitors. *Stem Cells Transl Med* 6(2):419-33.
53. Dakovic Bjelakovic M, Vlajkovic S, Petrovic A, Bjelakovic M, Antic M. (2018). Stereological study of developing glomerular forms during human fetal kidney development. *Pediatr Nephrol* 33(5):817-25.
54. Dakovic Bjelakovic, Vlajkovic S, Bjelakovic M. (2018). Ultramorphological characteristics of podocyte development in the human fetal metanephros. *Cells Tissues Organs* 205(1):42-52.
55. Daković-Bjelaković M, Vlajković S, Čukuranović R, Antić S, Bjelaković G, Mitić D. (2005). Quantitative analysis of the nephron during human fetal kidney development. *Vojnosanit Pregl* 62(4):281-86.
56. Daković-Bjelaković M, Vlajković S, Čukuranović R, Antić S, Bjelaković G, Mitić D. (2006). Changes of the glomerular size during the human fetal kidney development. *Srp Arh Celok Lek* 134(1-2):33-39.
57. Davies, J. (2003). Development of the ureteric bud. *The kidney*. P. Vize, A. Woolf and J. Bard. Cambridge, USA, Academic Press:165-79.
58. Denic AJ, Lieske JC, Chakkerla HA, Poggio ED, Alexander MP, Singh P et al (2017). The substantial loss of nephrons in healthy human kidneys with aging. *J Am Soc Nephrol* 28(1):313-20.

59. Desai M, Beall M, Ross MG. (2013). Developmental origins of obesity:programmed adipogenesis. *Curr Diab Rep* 13(1):27-33.
60. Dorey ES, Pantaleon M, Weir KA, Moritz KM. (2014). Adverse prenatal environment and kidney development:implications for programing of adult disease. *Reproduction* 147(6): R189-98.
61. Dorph-Petersen KA, Gundersen HJ. (2001). Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *J Microscopy* 204(Pt 3):232-46.
62. dos Santos AM, Fonseca Ferraz ML, Pinto Rodriguez ML, Dos Reis MA, Miranda Corrêa RR, de Paula Antunes Teixeira V, et al. (2006). Assessment of renal maturity by assisted morphometry in autopsied fetuses. *Early Hum Dev* 82(11):709-13.
63. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. (2011). Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst* 103(22):1656-64.
64. Drenckhahn D, Schnittler H, Nobiling R, Kriz W. (1990). Ultrastructural organization of contractile proteins in rat glomerular mesangial cells. *Am J Pathol* 137(6):1343-51.
65. Dressler GR. (2008). Epigenetics, development, and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 19(11): 2060-2067.
66. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102(1):33-42.
67. Duncan RC, Bass PS, Garret PJ, Dathan JR. (1994). Weight at birth and other factors influencing progression of idiopathic membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 9(7):875.
68. El-Dahr SS, Aboudehen K, Saifudden Z. (2008). Transcriptional control of terminal nephron differentiation. *Am J Physiol Renal Physiol* 294(6):F1273-78.
69. Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35 (4):495-516.
70. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391(6662):43-50.
71. Faa G, Gerosa C, Fanni D, Monga G, Zaffanello M, Van Eyken P, Vassilios F. (2012). Morphogenesis and molecular mechanisms involved in human kidney development. *J Cell Physiol* 227(e):1257-68.
72. Faa G, Gerosa C, Fanni D, Nemolato S, Locci A, Cabras T, et al. (2010). Marked interindividual variability in renal maturation of preterm infants: lessons from autopsy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 23 (Suppl 3):129-33.

73. Fanos V, Castagnola M, Faa G. (2015). Prolonging nephrogenesis in preterm infants: a new approach for prevention of kidney disease in adulthood? *Iran J Kidney Dis* 9(3):180-85.
74. Foley JG, Bard JB. (2002). Apoptosis in the cortex of the developing mouse kidney. *J Anat* 201(6):477-84.
75. Fonseca Ferraz ML, Dos Santos AM, Cavellani CL, Rossi RC, Corrêa RR, Dos Reis MA, et al. (2008). Histochemical and immunohistochemical study of the glomerular development in human fetuses. *Pediatr Nephrol* 23(2):257-62.
76. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 25(3):486-541.
77. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 13(9):1423-33.
78. Gerdes J, Schwab U, Lemk H, Stein H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31(1):13-20.
79. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133(4):1710-15.
80. Gerdes J, Stein H, Pileri S, Rivano MT, Gobbi M, Ralfkiaer E, et al. (1987). Prognostic relevance of tumour-cell growth fraction in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Lancet* 2(8556):448-49.
81. Gilbert JS, Ford SP, Lang AI, Pahl LR, Drumhiller MC, Babcock SA, et al. (2007). Nutrient restriction impairs nephrogenesis in a gender-specific manner in the ovine fetus. *Pediatr Res* 61(1):42-47.
82. Gjerde A, Reisæter AV, Skrunes R, Marti HP, Vikse BE. (2020). Intrauterine growth restriction and risk of diverse forms of kidney disease during the first 50 years of life. *Clin J Am Soc Nephrol* 15(10):1413-23.
83. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. (2008). Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med* 359(1):61-73.
84. Godfrey KM, Barker DJ. (2001). Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr* 4 (2b):611-24.
85. Goedbloed JF. (1972). The embryonic and postnatal growth of rat and mouse. I. The embryonic and early postnatal growth of the whole embryo. A model with exponential growth and sudden changes in growth rate. *Acta Anat(Basel)* 82(3):305-06.

86. Graña X, Reddy EP. (1995). Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 11(2):211-19.
87. Green DR, Llambl F. (2015). Cell death signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7 (12).
88. Grobstein C. (1953). Morphogenetic interaction between embryonic mouse tissues separated by a membrane filter. *Nature* 172(4384):869-70.
89. Gross A, Katz SG. (2017). Non-apoptotic functions of BCL-2 family proteins. *Cell Death Differ* 24(8):1348-58.
90. Grupp C, Müller GA. (1999). Renal fibroblast culture. *Exp Nephrol* 7(5-6):377-85.
91. Guasch A, Myers BD. (1994). Determinants of glomerular hypofiltration in nephrotic patients with minimal change nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 4(8):1571-81.
92. Gubhaju L, Sutherland MR, Yoder BA, Zulli A, Bertram JF, Black MJ. (2009). Is nephrogenesis affected by preterm birth? Studies in a non-human primate model. *Am J Physiol Renal Physiol* 297(6):F1668-77.
93. Gundersen H. (1977). Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effects. *J Microscopy* 111(2):219-23.
94. Guyton AC, Hall JE (2008). *Medicinska fiziologija*. Savremena administracija.
95. Häcker G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 301(1):5-17.
96. Hales CN, Barker DJ. (2001). The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 60:5-20.
97. Hall JG. (2007). The importance of the fetal origins of adult disease for geneticists. *Clin Genet* 72(2):67-73.
98. Hallgrímsson B, B. H., Vize PD. (2003). Anatomy and histology of the human urinary system. *The kidney. From normal development to congenital disease*. W. A. Vize PD, Bard JBL. London, UK, Academic Press: 149-64.
99. Hammerman MR. (1998). Growth factors and apoptosis in acute renal injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7(4):419-24.
100. Hardwick JM, Soane L. (2013). Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(2).
101. Hartman HA, Lai HL, Patterson LT. (2007). Cessation of renal morphogenesis in mice. *Dev Biol* 310(2):379-87.
102. Hatini V, Huh SO, Herzlinger D, Soares VC, Lai E. (1996). Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2. *Genes Dev* 10(12):1467-78.

103. Hayashi M, Araki T. (2002). Caspase in renal development. *Nephrol Dial Transplant* 17 (Suppl 9):8-10.
104. HersHKovitz D, Burbea Z, Skorecki K, Brenner BM. (2007). Fetal programming of adult kidney disease: cellular and molecular mechanisms. *Clin J Am Soc Nephrol* 2(2):334-42.
105. Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ. (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J* 23(10):2134-45.
106. Hinchliffe SA, Lynch MR, Sargent PH, Howard CV, van Velzen D. (1992). The effect of intrauterine growth retardation on the development of renal nephrons. *Br J Obstet Gynaecol* 99(4):296-301.
107. Hinchliffe SA, Sargent PH, Chan YF, van Velzen D, Howard CV, Hutton JL, et al. (1992). Medullary ray glomerular counting as a method of assessment of human nephrogenesis. *Pathol Res Pract* 188(6):775-82.
108. Hinchliffe SA, Sargent PH, Howard CV, Chan YF, van Velzen D. (1991). Human intrauterine renal growth expressed in absolute number of glomeruli assessed by the disector method and Cavalieri principle. *Lab Invest* 64(6):777-84.
109. Ho J. (2014). The regulation of apoptosis in kidney development: implications for nephron number and pattern? *Front Pediatr* 2:128.
110. Hodgins JB, Rasoulopour M, Markowitz GS, D'Agati VD. (2009). Very low birth weight is a risk factor for secondary focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 4(1):71-76.
111. Hoogenboom LA, Wolfs T, Hütten MC, Peutz-Kootstra CJ, Schreuder MF. (2021). Prematurity, perinatal inflammatory stress, and the predisposition to develop chronic kidney disease beyond oligonephropathy. *Pediatr Nephrol* 36(7):1673-81.
112. Hotoura E, Argyropoulou M, Papadopoulou F, Giapros V, Drougia A, Nikolopoulos P, et al. (2005). Kidney development in the first year of life in small for gestational age preterm infants. *Pediatr Radiol* 35(10):991-94.
113. Howie AJ, Smithson N, Rollason TP. (1993). Reconsideration of the development of the distal tubule of the human kidney. *J Anat* 183(Pt 1):141-47.
114. Hoy WE, Bertram JF, Douglas-Denton RN, Zimanyi M, Samuel T, Hughson MD. (2008). Nephron number, glomerular volume, renal disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17(3):258-65.
115. Hoy WE, Douglas-Denton RN, Hughson MD, Cass A, Johnson K, Bertram JF. (2003). A stereological study of glomerular number and volume: preliminary findings in a multiracial study of kidneys at autopsy. *Kidney Int (Suppl 83)*: S31-37.

116. Hoy WE, Hughson MD, Singh GR, Douglas-Denton RN, Bertram JF. (2006). Reduced nephron number and glomerulomegaly in Australian Aborigines: A group at high risk for renal disease and hypertension. *Kidney Int* 70(1):104-10.
117. Hoy WE, Hughson MD, Bertram JF, Douglas-Denton RN, Amann K. (2005). Nephron number, hypertension, renal disease, and renal failure. *J Am Soc Nephrol* 16(9):2557-64.
118. Hoyer JR, Seiler MW. (1979). Pathophysiology of Tamm-Horsfall protein. *Kidney Int* 16(3): 279-89.
119. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81(4):495-504.
120. Hu S, Snipas SJ, Vincenz C, Salvesen G, Dixit VM. (1998). Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J Biol Chem* 273(45):29648-53.
121. Hughson M, Farris III AB, Douglas-Denton R, Hoy WE, Bertram JF. (2003). Glomerular number and size in autopsy kidneys: The relationship to birth weight. *Kidney Int* 63(6):2113-22.
122. Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A, Mugford JW, Soeung S, Duffield JS, et al. (2008). Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell Stem Cell* 2(3): 284-91.
123. Hyodo T, Naguro T, Kameie T, Iino A, Miyagawa I. (1997). Scanning and transmission electron-microscopic study of the development of the podocyte in the human fetus. *Pediatr Nephrol* 11(2):133-39.
124. Ingelfinger JR. (2003). Is microanatomy destiny?. *N Engl J Med* 348(2):99-100.
125. Ingelfinger JR, Nuyt AM. (2012). Impact of fetal programming, birth weight, and infant feeding on later hypertension. *J Clin Hypertens(Greenwich)* 14(6):365-71.
126. Jacobson HR. (1981). Functional segmentation of the mammalian nephron. *Am J Physiol* 241 (3):F203-18.
127. Jones SE, White KE, Flyvbjerg A, Marshall SM. (2006). The effect of intrauterine environment and low glomerular number on the histological changes in diabetic glomerulosclerosis. *Diabetologia* 49(1):191-99.
128. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, et al. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410(6828):549-54.
129. Kaissling B, Hegyi I, Loffing J, Le Hir M. (1996). Morphology of interstitial cells in the healthy kidney. *Anat Embryol (Berl)* 193(4):303-18.
130. Kaissling B, Kritz W. (1979). Structural analysis of the rabbit kidney. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 56:1-123.



131. Kang SJ, Wang S, Kuida K, Yuan Y. (2002). Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Cell Death Differ* 9(10):1115-25.
132. Kataoka T, Schröter M, Hahne M, Schneider P, Irmeler M, Thome M, et al. (1998). FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J Immunol* 161(8):3936-42.
133. Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. (2003). Nephron number in patients with primary hypertension. *N Engl J Med* 348(2):101-08.
134. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4):239-57.
135. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, et al. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14(22):5579-88.
136. Koenig U, Eckhart L, Tschachler E. (2001). Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem Biophys Res Commun* 285(5):1150-54.
137. Kokot F, Duława J. (2000). Tamm-Horsfall protein updated. *Nephron* 85(2):97-102.
138. Kone BC, Madsen KM, Tisher CC. (1984). Ultrastructure of the thick ascending limb of Henle in the rat kidney. *Am J Anat* 171(2):217-26.
139. Kopan R, Chen S, Little M. (2014). Nephron progenitor cells: shifting the balance of self-renewal and differentiation. *Curr Top Dev Biol* 107:293-331.
140. Kostić A. (1955). *Osnovi embriologije*. Beograd, Naučna Knjiga.
141. Krause M, Rak-Raszewska A, Pietilä I, Quaggin SE, Vainio S. (2015). Signaling during kidney development. *Cells* 4(2):112-32.
142. Kreidberg JA. (2003). Podocyte differentiation and glomerulogenesis. *J Am Soc Nephrol* 14 (3):806-14.
143. Kriz W, Dieterich HJ. (1970). The lymphatic system of the kidney in some mammals. Light and electron microscopic investigations. *Z Anat Entwicklungsgesch* 131(2): 111-47.
144. Kriz W, Elger M, Mundel P, Lemley KV. (1995). Structure-stabilizing forces in the glomerular tuft. *J Am Soc Nephrol* 5(10):1731-39.
145. Kurosaka K, Takashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. (2003). Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* 171(9): 4672-79.
146. Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneiter R, et al. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111(3):331-42.

147. Kwon EJ, Kim YJ. (2017). What is fetal programming?: a lifetime health is under the control of in utero health. *Obstet Gynecol Sci* 60(6):506-19.
148. Laitinen L, Virtanen I, Saxén L. (1987). Changes in the glycosylation pattern during embryonic development of mouse kidney as revealed with lectin conjugates. *J Histochem Cytochem* 35(1):55-65.
149. Laitinen L, Virtanen I, Saxén L, Lehtonen E. (1988). Expression of cellular glycoconjugates in transfilter-induced metanephric mesenchyme. *Anat Rec* 220(2):190-97.
150. Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenameele P. (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* 14(1):44-55.
151. Lawlor DA, Hübinette A, Tynelius P, Leon DA, Smith D, Rasmussen F. (2007). Associations of gestational age and intrauterine growth with systolic blood pressure in a family-based study of 386,485 men in 331,089 families. *Circulation* 115(5):562-68.
152. LeBrun DP, Warnke RA, Cleary ML. (1993). Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *Am J Pathol* 142(3):743-53.
153. Lee SB, Haber DA. (2001). Wilms tumor and the WT1 gene. *Exp Cell Res* 264(1):74-99.
154. Levine B, Sinha SC, Kroemer G. (2008). Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 4(5):600-06.
155. Li LY, Luo X, Wang X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412(6842):95-99.
156. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91(4):479-89.
157. Liapis H, Yu H, Steinhardt GF. (2000). Cell proliferation, apoptosis, Bcl-2 and Bax expression in obstructed opossum early metanephroi. *J Urol* 164(2):511-17.
158. Lichnovský V, Erdösová B, Punkt K, Zapletal M. (1999). Expression of BCL-2 in the developing kidney of human embryos and fetuses qualitative and quantitative study. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med* 142:61-64.
159. Lin Y, Zhang S, Tuukkanen J, Peltoketo H, Pihlajaniemi T, Vainio S. (2003). Patterning parameters associated with the branching of the ureteric bud regulated by epithelial-mesenchymal interactions. *Int J Dev Biol* 47(1):3-13.
160. Lindström NO, Guo J, Kim AD, Tran T, Guo Q, G. De Sena Brandine, et al. (2018). Conserved and divergent features of mesenchymal progenitor cell types within the cortical nephrogenic niche of the human and mouse kidney. *J Am Soc Nephrol* 29(3):806-24.

161. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104(4):487-501.
162. Lui JC, Baron J. (2011). Mechanisms limiting body growth in mammals. *Endocr Rev* 32(3):422-40.
163. Luyckx VA, Brenner BM. (2005). Low birth weight, nephron number, and kidney disease. *Kidney Int (Suppl 97)*:S68-77.
164. Luyckx VA, Brenner BM. (2010). The clinical importance of nephron mass. *J Am Soc Nephrol* 21(6):898-910.
165. Luyckx VA, Shukha K, Brenner BM. (2011). Low nephron number and its clinical consequences. *Rambam Maimonides Med J* 2(4):e0061.
166. Luyckx VA, Bertram JF, Brenner BM, Fall C, Hoy WE, Ozanne SE, et al. (2013). Effect of fetal and child health on kidney development and long-term risk of hypertension and kidney disease. *Lancet* 382(9888):273-83.
167. Luyckx VA, Brenner BM. (2015). Birth weight, malnutrition and kidney-associated outcomes-a global concern. *Nat Rev Nephrol* 11(3):135-49.
168. Luyckx VA, Perico N, Somaschini M, Manfelloto D, Valensise H, Cetin I, et al. (2017). A developmental approach to the prevention of hypertension and kidney disease: a report from the low birth weight and nephron number working group. *Lancet* 390(10092):424-28.
169. Madsen KM, B. B. (1994). Structure and function of the renal tubule and interstitium. *Renal pathology*. B. B. Tisher CC. Philadelphia, Lippincott: 651-98.
170. Madsen KM, N. S., Tisher CC. (2008). Anatomy of the kidney. *Brenner and Rector's The kidney*. B. BM. Philadelphia, Saunders Elsevier:25-90.
171. Mañalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C, Fundora I. (2000). Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study. *Kidney Int* 58(2):770-73.
172. Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, Hirsch T, Macho A, et al. (1996). Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med* 184(3):1155-60.
173. Maunsbach AB, Marples D, Chin E, Ning G, Bondy C, Agre P, Nielsen S. (1997). Aquaporin-1 water channel expression in human kidney. *J Am Soc Nephrol* 8(1):1-14.
174. McCrory WW. (1978). Embryonic development and prenatal maturation of the kidney. In: Edelmann CM Jr (ed). *Pediatric kidney disease*. Brown & Co, Boston, pp 3-25.

175. Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ, Dong Z, Venkatachalam MA, Saikumar P. (2001). Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 276(21):18361-74.
176. Minuth, W. W. (2017). Concepts for a therapeutic prolongation of nephrogenesis in preterm and low-birth-weight babies must correspond to structural functional properties in the nephrogenic zone. *Mol Cell Pediatr* 4(1):12.
177. Minuth, W. W. (2019). In search of imprints left by the impairment of nephrogenesis. *Cells Tissues Organs* 207(2):69-82.
178. Minuth WW. (2020). Shaping of the nephron - a complex, vulnerable, and poorly explored backdrop for noxae impairing nephrogenesis in the fetal human kidney. *Mol Cell Pediatr* 7(1):2.
179. Minuth WW. (2021). The mutual patterning between the developing nephron and its covering tissues-valid reasons to rethink the search for traces left by impaired nephrogenesis. *Mol Cell Pediatr* 8(1):9.
180. Minuth WW, Denk L. (2012). Cell projections and extracellular matrix cross the interstitial interface within the renal stem/progenitor cell niche:accidental, structural or functional cues? *Nephron Exp Nephrol* 122(3-4):131-40.
181. Mishra S, Dinesh A, Kaul JM. (2006). Morphological and morpho-metrical study of human renal development during mid-gestational period. *J An Soc India* 55(2):5-10.
182. Moore L, Williams R, Staples A. (1993). Glomerular dimensions in children under 16 years of age. *J Pathol* 171(2):145-50.
183. Na YW, Yang HJ, Choi JH, Yoo KH, Hong YS, Lee W et al. (2002). Effect of intrauterine growth retardation on the progression of nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 22(5-6):463-67.
184. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403(6765):98-103.
185. Naruse K, Fujieda M, Miyazak E, Hayashi Y, Toi M, Fukui T, et al. (2000). An immunohistochemical study of developing glomeruli in human fetal kidneys. *Kidney Int* 57(5):1836-46.
186. Neiss WF. (1982). Morphogenesis and histogenesis of the connecting tubule in the rat kidney. *Anat Embryol (Berl)* 165(1):81-95.
187. Nikolić R. (2010). *Embriologija čoveka*. Beograd, DataStatus.
188. Nikolić R. (2012). *Osnovna oralna histologija i embriologija*. Beograd, Data Status.
189. Novack DV, Korsmeyer SJ. (1994). Bcl-2 protein expression during murine development. *Am J Pathol* 145(1):61-73.

190. Nyengaard JR. (1993). The quantitative development of glomerular capillaries in rats with special reference to unbiased stereological estimates of their number and sizes. *Microvasc Res* 45(3):243-61.
191. Nyengaard JR, Bendtsen TF. (1992). Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *Anat Rec* 232(2):194-201.
192. Nyengaard JR. (1999). Stereologic methods and their application in kidney research. *J Am Nephrol* 10(5):1100-23.
193. O'Brien LL, Combes AN, Short KM, Lindström NO, Whitney PH, Cullen-McEwen LA, et al. (2018). Wnt11 directs nephron progenitor polarity and motile behavior ultimately determining nephron endowment. *Elife* 7.
194. O'Brien LL, McMahon AP. (2014). Induction and patterning of the metanephric nephron. *Semin Cell Dev Biol* 36:31-38.
195. Osathanondh V, Potter EL. (1963). Development of human kidney as shown by microdissection. II Renal pelvis, calyces, and papillae. *Arch Pathol* 76:277-89.
196. Osathanondh V, Potter EL. (1966). Development of human kidney as shown by microdissection. V. Development of vascular pattern of glomerulus. *Arch Pathol* 82(5):403-11.
197. Osathanondh V, Potter EL. (1966). Development of human kidney as shown by microdissection. IV. Development of tubular portions of nephrons. *Arch Pathol* 82(5):391-402.
198. Oxburgh L, Muthukrishnan SD, Brown A. (2017). Growth factor regulation in the nephrogenic zone of the developing kidney. *Results Probl Cell Differ* 60:137-64.
199. Pabst R, Sterzel RB. (1983). Cell renewal of glomerular cell types in normal rats. An autoradiographic analysis. *Kidney Int* 24(5):626-31.
200. Painter RC, Roseboom TJ, van Montfrans GA, Bossuyt PM, Krediet RT, Osmond C, et al. (2005). Microalbuminuria in adults after prenatal exposure to the Dutch famine. *J Am Soc Nephrol* 16(1):189-94.
201. Patel SR, Dressler GR. (2013). The genetics and epigenetics of kidney development. *Semin Nephrol* 33(4):314-26.
202. Patten B. (1968). Human embryology. New York, McGraw-Hill. Pole RJ, Qi BQ and Beasley SW (2002). Patterns of apoptosis during degeneration of the pronephros and mesonephros. *J Urol* 167(1):269-71.
203. Plank C, Nüsken KD, Menendez-Castro C, Hartner A, Ostreicher I, Amann K, et al. (2010). Intrauterine growth restriction following ligation of the uterine arteries leads to more severe glomerulosclerosis after mesangioproliferative glomerulonephritis in the offspring. *Am J Nephrol* 32(4):287-95.

204. Pole RJ, BQ Qi, Beasley SW. (2002). Patterns of apoptosis during degeneration of the pronephros and mesonephros. *J Urol* 167(1):269-71.
205. Popović S. (1988). *Embriologija čoveka*. Beograd, Dečje Novine.
206. Popović S, Piletić O, Mršević D, Čanković V, Đorđević-Čamba V, Japundžić M, et al. (1984). *Histologija*. Beograd, Dečje Novine.
207. Potter EL. (1965). Development of the human glomerulus. *Arch Pathol* 80:241-55.
208. Potter EL, Osathanondh V. (1966). Normal and abnormal development of the kidney. *The kidney*. Mostofi FK and Smith DE. Baltimor, The Williams & Wilkins Company: 1-16.
209. Pritchard-Jones K. (1999). The Wilms tumour gene, WT1, in normal and abnormal nephrogenesis. *Pediatr Nephrol* 13(7):620-25.
210. Prochazkova J, Lichnovsky V, Kylarov D, Erdosova B, Vranka P. (2004). Involvement of p53 and Bcl-2 family proteins in regulating programmed cell death and proliferation in human embryogenesis. *Gen Physiol Biophys* 23(2):209-29.
211. Puddy M, Fanos V, Podda F, Zaffanello M. (2009). The kidney from prenatal to adult life: perinatal programming and reduction of number of nephrons during development. *Am J Nephrol* 30(2):162-70.
212. Puelles VG, Hoy WE, Hughson MD, Diouf B, Douglas-Denton RN, Bertram JF. (2011). Glomerular number and size variability and risk for kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 20(1):7-15.
213. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. (2006). Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 54(4):385-95.
214. Quaggin SE, Kreidberg JA. (2008). Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences. *Development* 135(4):609-20.
215. Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. (2005). Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds* 4(3):138-44.
216. Ramirez-Velez R. (2012). In utero fetal programming and its impact on health in adulthood. *Endocrinol Nutr* 59(6):383-93.
217. Reidy KJ, Rosenblum ND. (2009). Cell and molecular biology of kidney development. *Semin Nephrol* 29(4):321-37.
218. Riedl SJ, Li W, Chao Y, Schwarzenbacher R, Shi Y. (2005). Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP. *Nature* 434(7035):926-33.
219. Risau W. (1998). Development and differentiation of endothelium. *Kidney Int (Suppl* 67):S3-6.

220. Rodewald R, Karnovsky MJ. (1974). Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* 60(2):423-33.
221. Rodríguez-Soriano J, Aquirre M, Oliveros R, Vallo A. (2005). Long-term renal follow up of extremely low birth weight infants. *Pediatr Nephrol* 20(5):579-84.
222. Rodríguez MM, Gómez AH, Abitbol CL, Chandar JJ, Duara S, Zilleruelo GE. (2004). Histomorphometric analysis of postnatal glomerulogenesis in extremely preterm infants. *Pediatr Dev Pathol* 7(1):17-25.
223. Rolland SG, Conradt B. (2010). New role of the BCL2 family of proteins in the regulation of mitochondrial dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 22(6):852-58.
224. Rosenblum S, Pal A, Reidy K. (2017). Renal development in the fetus and premature infant. *Semin Fetal Neonatal Med* 22(2):58-66.
225. Rostand SG. (2003). Oligonephronia, primary hypertension and renal disease: Is the child father to the man?. *Nephrol Dial Transplant* 18(8):1434-38.
226. Ruijtenberg S, van den Heuvel S. (2016). Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. *Cell Cycle* 15(2):196-212.
227. Rumballe BA, Georgas KM, Combes AN, Ju AL, Gilbert T, Little MH. (2011). Nephron formation adopts a novel spatial topology at cessation of nephrogenesis. *Dev Biol* 360(1):110-22.
228. Ryan D, Sutherland MR, Flores TJ, Kent AL, Dahlstrom JE, Puelles VG, et al. (2018). development of the human fetal kidney from mid to late gestation in male and female infants. *EBioMedicine* 27:275-83.
229. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23(16):2861-74.
230. Sainio K, Nonclercq D, Saarma M, Palgi J, Saxén L, Sariola H. (1994). Neuronal characteristics in embryonic renal stroma. *Int J Dev Biol* 38(1):77-84.
231. Sagi J, Vagman I, David MP, Van Dongen LG, Goudie E, Butterworth A, et al. (1987). Fetal kidney size related to gestational age. *Gynecol Obstet Invest* 23(1):1-4.
232. Samuel T, Hoy WE, Douglas-Denton R, Hughson MD, Bertram JF. (2005). Determinants of glomerular volume in different cortical zones of the human kidney. *J Am Soc Nephrol* 16(10):3102-09.
233. Sariola H, Holm K, Henke-Fahle S. (1988). Early innervation of the metanephric kidney. *Development* 104(4):589-99.

234. Sariola H, S. K., Bard J. (2003). Fates of the metanephric mesenchyme. *The kidney. From normal development to congenital disease*. W. A. Vize P, Bard JBL. London, Academic Press:181-93.
235. Savill J. (1997). Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* 61(4):375-80.
236. Saxén L. (1987). *Organogenesis of the kidney*. New York, Cambridge University Press.
237. Saxén L, Sariola H. (1987). Early organogenesis of the kidney. *Pediatr Nephrol* 1(3):385-92.
238. Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274(3):1541-48.
239. Schimmer AD. (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* 64(20):7183-90.
240. Schlondorff D. (1987). The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte. *FASEB J* 1(4):272-81.
241. Scholzen T, Gerdes J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182(3):311-22.
242. Schreuder MF. (2012). Safety in glomerular numbers. *Pediatr Nephrol* 27(10):1881-87.
243. Schreuder MF, Nyengaard JR, Fodor M, van Wijk JA, Delemarre-van de Waal HA. (2005). Glomerular number and function are influenced by spontaneous and induced low birth weight in rats. *J Am Soc Nephrol* 16(10):2913-19.
244. Schreuder MF, Nyengaard JR, Remmers F, van Wijk JA, Delemarre-van de Waal HA. (2006). Postnatal food restriction in the rat as a model for a low nephron endowment. *Am J Physiol Renal* 291(5):F1104-07.
245. Schuler M, Green DR. (2001). Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* 29(Pt 6):684-88.
246. Sequeira Lopez ML, Gomez RA. (2011). Development of the renal arterioles. *J Am Soc Nephrol* 22(12):2156-65.
247. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. (2013). Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(4): a008714.
248. Shankland SJ. (1997). Cell-cycle control and renal disease. *Kidney Int* 52(2):294-308.
249. Shankland SJ, Wolf G. (2000). Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 278(4):F515-29.



250. Shea SM, Morrison AB. (1975). A stereological study of the glomerular filter in the rat. Morphometry of the slit diaphragm and basement membrane. *J Cell Biol* 67 (2pt.1):436-43.
251. Sheibani N, Scheef EA, Dimaio TA, Wang Y, Kondo S, Sorenson CM. (2007). Bcl-2 expression modulates cell adhesion and migration promoting branching of ureteric bud cells. *J Cell Physiol* 210(3):616-25.
252. Simmons RA.(2012). Developmental origins of diabetes:The role of oxidative stress. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 26(5):701-708.
253. Singh R, Letai A, Sarosiek K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20(3):175-93.
254. Song XF, Ren H, Andreasen A, Thomsen JS, Zhai XY. (2012). Expression of Bcl-2 and Bax in mouse renal tubules during kidney development. *PLoS One* 7(2):e32771.
255. Souster LP, Emery JL. (1980). The sizes of renal glomeruli in fetuses and infants. *J Anat* 130 (Pt 3):595-602.
256. Stelloh C, Allen KP, Mattson DL, Lerch-Gaggl A, Reddy S, El-Meanawy A. (2012). Prematurity in mice leads to reduction in nephron number, hypertension, and proteinuria. *Transl Res* 159(2):80-89.
257. Strizke A, Thomas S, Amin H, Fusch C, Lodha A. (2017).Renal consequences of pre-term birth. *Mol Cell Pediatr* 4(1):2.
258. Sulemanji M, Vakili K.(2013). Neonatal renal physiology. *Semin Pediatr Surg* 22(4): 195-98.
259. Sun X, Kaufman PD. (2018). Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma* 127(2): 175-86.
260. Sutherland MR, Gubhaju L, Black MJ. (2011). Stereological assessment of renal development in a baboon model of preterm birth. *Am J Nephrol* 33 (Suppl 1):25-33.
261. Sutherland MR, Gubhaju L, Moore L, Kent AL, Dahlstrom JE, Horne RS, et al. (2011). Accelerated maturation and abnormal morphology in the preterm neonatal kidney. *J Am Soc Nephrol* 22(7):1365-74.
262. Taal MW, Brenner BM. (2006). Predicting initiation and progression of chronic kidney disease: Developing renal risk scores. *Kidney Int* 70(10):1694-705.
263. Takano K, Kawasaki Y, Imaizumi T, Matsuura H, Nozawa R, Tannji M, et al. (2007). Development of glomerular endothelial cells, podocytes and mesangial cells in the human fetus and infant. *Tohoku J Exp Med* 212(1):81-90.
264. Takeuchi T, Nakamura H. (2014). Cell proliferation and development. Preface. *Dev Growth Differ* 56(5):323.

265. Teeninga N, Schreuder MF, Bökenkamp A, Delemarre van de Waal HA, van Wijk JA. (2008). Influence of low birth weight on minimal change nephrotic syndrome in children, including a meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant* 23(5):1615-20.
266. Thomsson JA, Regnault TR. (2011). In utero origins of adult insulin resistance and vascular dysfunction. *Semin Reprod Med* 29(3):211-24.
267. Underwood MA, Gilber WM, Sherman MP. (2005). Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *J Perinatol* 25(5):341-48.
268. van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, et al. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* 9(1):20-26.
269. Venkatachalam MA, K. W. (1998). Anatomy. *Heptinstall's pathology of the kidney*. O. J. Jennette JC, Schwartz MM, Silva FG. Philadelphia, Lippincott-Raven:3-66.
270. Verburg BO, Geelhoed JJ, Steegers EA, Hofman A, Moll HA, Witteman JC, et al. (2007). Fetal kidney volume and its association with growth and blood flow in fetal life: The Generation R Study. *Kidney Int* 72(6):754-61.
271. Vieau D. (2011). Perinatal nutritional programming of health and metabolic adult disease. *World J Diabetes* 2(9):133-36.
272. Vogetseder A, Karadeniz A, Kaissling B, Le Hir M. (2005). Tubular cell proliferation in the healthy rat kidney. *Histochem Cell Biol* 124(2):97-104.
273. Wajant H. (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296(5573):1635-36.
274. Watanabe T, Costantini F. (2004). Real-time analysis of ureteric bud branching morphogenesis in vitro. *Dev Biol* 271(1):98-108.
275. Westermann B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(12):872-84.
276. Williams PL, B. L., Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE, Ferguson MWJ. (1995). *Grays anatomy*. New York, Churchill Livingstone.
277. Woolf AS, Welham SJ. (2002). Cell turnover in normal and abnormal kidney development. *Nephrol Dial Transplant* 17 (Suppl 9):2-4.
278. Yajnik CS. (2014). Transmission of obesity-adiposity and related disorders from the mother to the baby. *Ann Nutr Metab* 64 (Suppl 1):8-17.
279. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275(5303):1129-32.

280. Yeung EH, Robledo C, Boghossian N, Zhang C, Mendola P. (2014). Developmental origins of cardiovascular disease. *Curr Epidemiol Rep* 1(1):9-16.
281. Yu J, Carroll TJ, McMahon AP. (2002). Sonic hedgehog regulates proliferation and differentiation of mesenchymal cells in the mouse metanephric kidney. *Development* 129(22): 5301-12.
282. Zaffanello M, Bassareo PP, Cataldi L, Antonucci R, Biban P, Fanos V. (2010). Long-term effects of neonatal drugs on the kidney. *J Matern Fetal Neonatal Med* 23 (Suppl 3):87-89.
283. Zaffanello M, Brugnara M, Franchini M, Fanos V. (2008). TCF2 gene mutation leads to nephrourological defects of unequal severity: an open question. *Med Sci Monit* 14 (6):Ra78-86.
284. Zidar N, Avgustin Cavić M, Kenda RB, Ferluga D.(1998). Unfavorable course of minimal change nephrotic syndrome in children with intrauterine growth retardation. *Kidney Int* 54(4):1320-23.
285. Ziehr J, Sheibani N, Sorenson CM. (2004). Alterations in cell-adhesive and migratory properties of proximal tubule and collecting duct cells from bcl-2 <sup>-/-</sup> mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 287(6):F1154-63.
286. Zimanyi MA, Hoy WE, Douglas-Denton RN, Hughson MD, Holden LM, Bertram JF.(2009). Nephron number and individual glomerular volumes in male Caucasian and African American subjects. *Nephrol Dial Transplant* 24(8):2428-33.

## Biografija

Dr. Milorad Antić, rođen je 10.05.1987.godine u Nišu. Osnovnu školu i Gimnaziju završio je u Nišu sa odličnim uspehom. Medicinski fakultet u Nišu, odsek medicina, upisao je 2006. godine, na kome je diplomirao 2012. godine. Prosečna ocena tokom studija mu je bila 9,89. Odbranio je diplomski rad sa ocenom 10. U toku studija, bio je učesnik mnogobrojnih kongresa za studente medicine, kako u zemlji tako i u inostranstvu. Proglašen je najboljim studentom četvrte godine odseka medicine u školskoj 2009/2010. godini. U toku pete godine studija bio je stipendista Fonda za mlade talente - „Dositeja”. Pripravnički staž po okončanju studija obavio je u Kliničkom centru Niš kao i u Domu zdravlja Niš. 2013. godine je položio Stručni ispit za doktora medicine, u Ministarstvu zdravlja u Beogradu. Doktorske akademske studije na Medicinskom fakultetu u Nišu, upisao je novembra 2012. godine i nakon toga bio stipendista doktorand Republike Srbije. Jula 2015.godine zasnovao je radni odnos na UNO Anatomija Medicinskog fakulteta u Nišu, u zvanju saradnika u nastavi, da bi 2017.godine bio izabran u zvanje asistenta, u kome se trenutno nalazi. Istovremeno je član nekoliko projekata Medicinskog fakulteta u Nišu. Član je Srpskog lekarskog društva, kao i Srpskog anatomskog društva. Služi se engleskim jezikom i poseduje zavidno znanje na računaru.



## IZJAVA O AUTORSTVU

Izjavljujem da je doktorska disertacija, pod naslovom

### **KOMPARATIVNA ANALIZA IMUNOHISTOHEMIJSKIH I HISTOMORFOMETRIJSKIH KARAKTERISTIKA HUMANE METANEFROGENEZE**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da ovu disertaciju, ni u celini, niti u delovima, nisam prijavljivao na drugim fakultetima, niti univerzitetima;
- da nisam povredio autorska prava, niti zloupotrebio intelektualnu svojinu drugih lica.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci, koji su u vezi sa autorstvom i dobijanjem akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada, i to u katalogu Biblioteke, Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Nišu, kao i u publikacijama Univerziteta u Nišu.

U Nišu, 2022. godine  
Autor disertacije: **dr Milorad Antić**

Potpis autora disertacije:

---



## IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANOG I ELEKTRONSKOG OBLIKA DOKTORSKE DISERTACIJE

Naslov disertacije:

### KOMPARATIVNA ANALIZA IMUNOHISTOHEMIJSKIH I HISTOMORFOMETRIJSKIH KARAKTERISTIKA HUMANE METANEFROGENEZE

Izjavljujem da je elektronski oblik moje doktorske disertacije, koju sam predao za unošenje u **Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu**, istovetan štampanom obliku.

U Nišu, 2022. godine  
Autor disertacije: **dr Milorad Antić**

Potpis autora disertacije:

---



## IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Nikola Tesla“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu unese moju doktorsku disertaciju, pod naslovom:

### KOMPARATIVNA ANALIZA IMUNOHISTOHEMIJSKIH I HISTOMORFOMETRIJSKIH KARAKTERISTIKA HUMANE METANEFROGENEZE

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom obliku, pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju, unetu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu, mogu koristiti svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons), za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo (CC BY)

2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)

**3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade (CC BY-NC-ND)**

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)

5. Autorstvo – bez prerade (CC BY-ND)

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

U Nišu, 2022. godine

Autor disertacije: **dr Milorad Antić**

Potpis autora disertacije:

---