

EARLY EVIDENCE OF GLOBAL DNA METHYLATION AND HYDROXYMETHYLATION CHANGES IN RAT KIDNEYS CONSEQUENT TO HYPEROXALURIA-INDUCED RENAL CALCIUM OXALATE STONES

Y. MEHRA, P. VISWANATHAN*

Renal Research Lab, Centre for Bio-Medical Research,
School of Bio-Sciences and Technology, Vellore Institute of Technology,
Vellore, Tamil Nadu 632014, India

E-mail: pragasam.v@vit.ac.in

Calcium supersaturation in urine during hyperoxaluria can lead to renal calcium oxalate (CaOx) stone deposition; a condition termed as nephrolithiasis. Recent genetic studies indicate the possibility of epigenetic alterations during nephrolithiasis. We aimed to study the influence of renal CaOx stone formation on the global levels of 5-methylcytosine (5 mC) and 5-hydroxymethylcytosine (5 hmC) in hyperoxaluric rat kidney. In this study, twelve male Wistar rats were divided equally into two groups (control and experimental). Animals in the experimental group received 2.5 % (w/v) sodium oxalate in 5 ml of sterile water, every day, orally for four weeks to induce hyperoxaluria. At the end of four weeks, urine parameters, serum biochemistry and renal histopathological changes were evaluated. Global 5mC and 5hmC levels were analysed using enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA), and renal mRNA expression of DNMTs and TET genes were also determined. Urine parameters and serum biochemistry showed that rats fed with 2.5 % (w/v) sodium oxalate orally for four weeks developed hyperoxaluria ($p < 0.05$). Histopathological evaluation of hyperoxaluric rat kidneys showed the deposition of CaOx crystals and marked tubular injury. ELISA showed significantly high levels of 5 hmC ($p < 0.0001$) in the kidneys of rats with renal CaOx stones, whereas 5 mC was only slightly significant ($p < 0.05$) as compared to the control rats. mRNA expression of TET 2, a regulator of DNA demethylation process, was found to be significantly upregulated ($p < 0.01$) in the rats with CaOx kidney stones. This preliminary study showed some early evidence of epigenetic modifications being influenced by hyperoxaluria-induced renal CaOx stones, which may likely contribute to the transcriptional regulation during CaOx nephrolithiasis.

Key words: Hyperoxaluria; kidney stones; DNA methylation; 5-methylcytosine; 5-hydroxymethylcytosine.

© Y. MEHRA, P. VISWANATHAN, 2022

ПОПЕРЕДНІ ДОКАЗИ ЗМІН У МЕТИЛЮВАННІ ТА ГІДРОМЕТИЛЮВАННІ ДНК У НИРКАХ ЩУРІВ ВНАСЛІДОК УТВОРЕННЯ РЕНАЛЬНИХ КАЛЬЦІЙ-ОКСАЛАТНИХ КАМЕНІВ, ІНДУКОВАНИХ ГІПЕРОКСАЛУРІЄЮ

Надлишковий вміст кальцію в сечі внаслідок гіпероксалурії може призводити до утворення ренальних кальцій-оксалатних каменів (CaOx), тобто нефролітіазу. Нещодавні генетичні дослідження виявили вірогідність епігенетичних змін під час нефролітіазу. Наша мета полягала у вивченні впливу утворення ренальних CaOx каменів на загальні рівні 5-метилцитозину (5 mC) і 5-гідрометилцитозину (5 hmC) у нирках щурів, уражених гіпероксалурією. У цьому дослідженні дванадцять самців щурів лінії Вістар поділили порівну на дві групи (контрольну і експериментальну). Тварини в експериментальній групі отримували 2,5 % (м/об) оксалату натрію в 5 мл стерильної води перорально щодня протягом чотирьох тижнів для індукції гіпероксалурії. Наприкінці чотирьох тижнів провели оцінку параметрів сечі, біохімічних показників сироватки та ренальних гістопатологічних змін. Було проаналізовано загальні рівні 5 mC та 5 hmC за допомогою імуноферментного аналізу (ELISA) та встановлено ренальну мРНК експресію генів DNMTs та TET. Параметри сечі і біохімічні показники сироватки продемонстрували, що після перорального отримання 2,5 % (м/об) оксалату натрію протягом чотирьох тижнів у щурів розвинулась гіпероксалурія ($p < 0,05$). Гістопатологічна оцінка нирок щурів, вражених гіпероксалурією, показала відкладення кристалів CaOx та виражене враження канальців нирок. Результати ELISA продемонстрували значно вищі рівні 5hmC ($p < 0,0001$) у нирках щурів з ренальними CaOx каменями у той час, як рівні 5mC були менш значними ($p < 0,05$) порівняно з щурами у контролі. Було виявлено, що рівень експресії мРНК TET 2, регулятора процесу деметилювання ДНК, був значно підвищений ($p < 0,01$) у щурів з CaOx каменями в нирках. Це попереднє дослідження продемонструвало ранні докази епігенетичних модифікацій під впливом індукованих гіпероксалурією ренальних CaOx каменів, що може сприяти транскрипційній регуляції під час CaOx нефролітіазу.

Ключові слова: гіпероксалурія, камені у нирках, метилювання ДНК, 5-метилцитозин, 5-гідроксиметилцитозин.

REFERENCES

- Agodi A, Barchitta M, Maueri A et al. (2019) Unveiling the role of DNA methylation in kidney transplantation: Novel perspectives toward biomarker identification *Biomed Res Int* 2019;1602539. <https://doi.org/10.1155/2019/1602539>

- Alelign T and Petros B. (2018) Kidney Stone Disease: An Update on Current Concepts *Adv Urol* 2018 :3068365 <https://doi.org/10.1155/2018/3068365>
- Baumann and Affolter (2014) From crystalluria to kidney stones, some physicochemical aspects of calcium nephrolithiasis *World J Nephrol* 3:256–267. <https://doi.org/10.5527/wjn.v3.i4.256>
- Bell CG, Teschendorff AE, Rakyan VK et al. (2010) Genome-wide DNA methylation analysis for diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus *BMC Med Genomics* 3:33. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-3-33>
- Bhasin B, Ürekli HM, Atta MG. (2015) Primary and secondary hyperoxaluria: Understanding the enigma *World J Nephrol* 4:235–44. <https://doi.org/10.5527/wjn.v4.i2.235>
- Bushinsky DA, Bashir MA, Riordon DR et al. (1999) Increased dietary oxalate does not increase urinary calcium oxalate saturation in hypercalciuric rats *Kidney Int* 55:602–612. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00281.x>
- Chakraborty A, Viswanathan P. (2018) Methylation-demethylation dynamics: Implications of changes in acute kidney injury *Anal Cell Pathol*. 2018
- Del Pozo CH, Garreta E, Belmonte JCI et al. (2018) Modeling epigenetic modifications in renal development and disease with organoids and genome editing *Dis Model Mech* 11:035048. <https://doi.org/10.1242/dmm.035048>
- Devarajan P. (2011) Biomarkers for the early detection of acute kidney injury *Curr Opin Pediatr* 23:194–200. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e328343f4dd>
- Hamidi T, Singh AK, Chen T. (2015) Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases *Epi-genomics* 7:247–265. <https://doi.org/10.2217/epi.14.80>
- Hodgkinson A, Williams A. (1972) An improved colorimetric procedure for urine oxalate *Clin Chim Acta* 36:127–132. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(72\)90167-2](https://doi.org/10.1016/0009-8981(72)90167-2)
- Joshi S, Wang W, Khan SR. (2017) Transcriptional study of hyperoxaluria and calcium oxalate nephrolithiasis in male rats: Inflammatory changes are mainly associated with crystal deposition *PLoS One* 12 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185009>
- Kaushik J, Tandon S, Bhardwaj R et al. (2019) Delving into the Antiurolithiatic Potential of *Tribulus terrestris*. Extract: Through *In Vivo* Efficacy and Preclinical Safety Investigations in Wistar Rats *Sci Rep* 9:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52398-w>
- Khandrika L, Koul S, Meacham RB et al. (2012) Kidney Injury Molecule-1 Is Up-Regulated in Renal Epithelial Cells in Response to Oxalate *In Vitro* and in Renal Tissues in Response to Hyperoxaluria *In Vivo* *PLoS One* 7(9):e44174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044174>
- Koul S, Khandrika L, Meacham RB et al. (2012) Genome Wide Analysis of Differentially Expressed Genes in HK-2 Cells, a Line of Human Kidney Epithelial Cells in Response to Oxalate *PLoS One* 7:e43886. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043886>
- Mahalingaiah PKS, Ponnusamy L, Singh KP. (2017) Oxidative stress-induced epigenetic changes associated with malignant transformation of human kidney epithelial cells *Oncotarget* 8:11127–11143. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12091>
- Mcfadden B, Heitzman-powell L. (2015) Recent Developments in Epigenetics of Acute and Chronic Kidney Diseases *Kidney Int* 8:1699–1712. <https://doi.org/10.1016/j.rasd.2014.08.015>
- McMartin K. (2009) Are calcium oxalate crystals involved in the mechanism of acute renal failure in ethylene glycol poisoning. Ethylene glycol renal toxicity mechanism *Clin Toxicol* 47:859–869. <http://doi.org/10.3109/15563650903344793>
- Moe OW. (2006) Kidney stones: pathophysiology and medical management. *Lancet* 367:333–344. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68071-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68071-9)
- Molitoris BA. (2012) Measuring glomerular filtration rate in acute kidney injury: Yes, but not yet *Crit Care* 16:158. <https://doi.org/10.1186/cc11482>
- Morgado-Pascual JL, Marchant V, Rodrigues-Diez R et al. (2018) Epigenetic modification mechanisms involved in inflammation and fibrosis in renal pathology *Mediators Inflamm* 2018:2931049. <https://doi.org/10.1155/2018/2931049>
- Okada A, Yasui T, Hamamoto S et al. (2009) Genome-wide analysis of genes related to kidney stone formation and elimination in the calcium oxalate nephrolithiasis model mouse: Detection of stone-preventive factors and involvement of macrophage activity *J Bone Miner Res* 24:908–924. <https://doi.org/10.1359/jbmr.081245>
- Oksay T, Yunusoglu S, Calapoğlu M et al. (2017) Protective impact of resveratrol in experimental rat model of hyperoxaluria *Int Urol Nephrol* 49:769–775. <https://doi.org/10.1007/s11255-017-1534-x>
- Ratkalkar VN, Kleinman JG. (2011) Mechanisms of stone formation *Clin Rev Bone Miner Metab* 9:187–197. <https://doi.org/10.1007/s12018-011-9104-8>
- Sayer JA. (2017) Progress in understanding the genetics of calcium-containing nephrolithiasis *J Am Soc Nephrol* 28:748–759. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016050576>
- Zhang Y, Sun X, Zhang L et al. (2017) Testicular Dnmt3 expression and global DNA methylation are down-regulated by gonadotropin releasing hormones in the ricefield eel *Monopterus albus* *Sci Rep* 7:1–13. <https://doi.org/10.1038/srep43158>
- Zhao YT, Fasolino M, Zhou Z. (2016) Locus- and cell type-specific epigenetic switching during cellular differentiation in mammals *Front Biol (Beijing)* 11:311–322. <https://doi.org/10.1007/s11515-016-1411-5>
- Zoghbi HY, Beaudet AL. (2016) Epigenetics and human disease *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8:a019497. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019497>

Received April 29, 2021

Received May 27, 2022

Accepted September 18, 2022