



Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский
университет им. акад. И.П. Павлова

Гистологические и молекулярные особенности костного обмена на ранних стадиях экспериментальной ХБП

Богданова Евдокия Олеговна, к.биол.н.

*н.с. лаборатории биохимического гомеостаза
НИИ нефрологии НКИЦ*

«XXII Северо-Западная нефрологическая школа РДО»

27 мая 2023
Санкт-Петербург

Сердечнососудистые события являются преобладающей причиной смерти пациентов с ХБП, в том числе С1-3

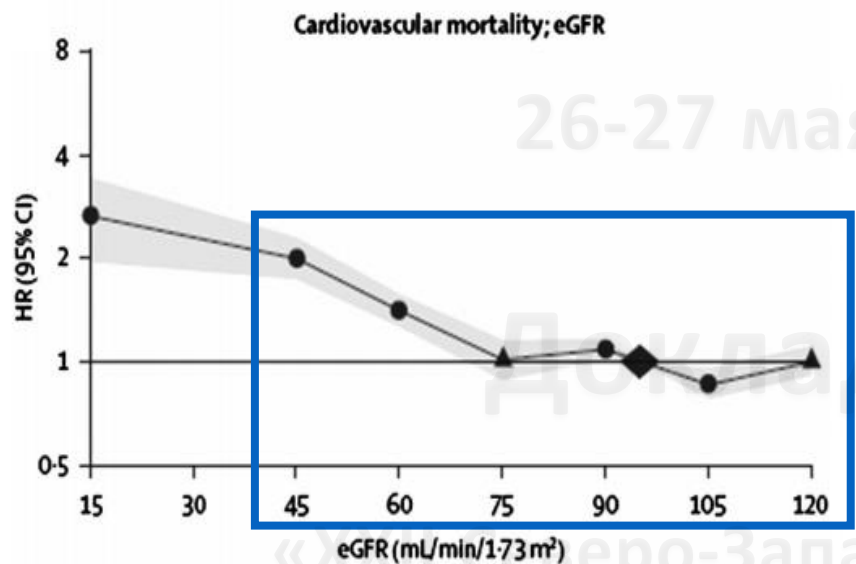


KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease

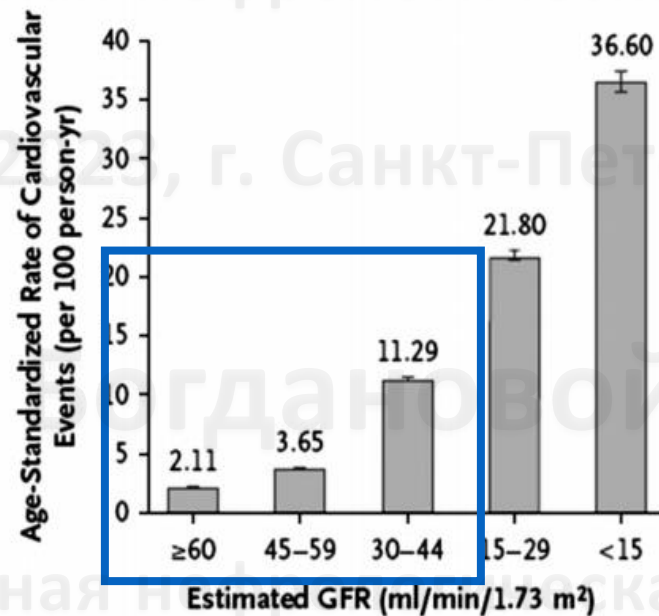
THE LANCET

Volume 382, Issue 9889, 27 July–2 August 2013, Pages 339–352

Смертность от сердечно-сосудистых (СС) событий на разных стадиях ХБП

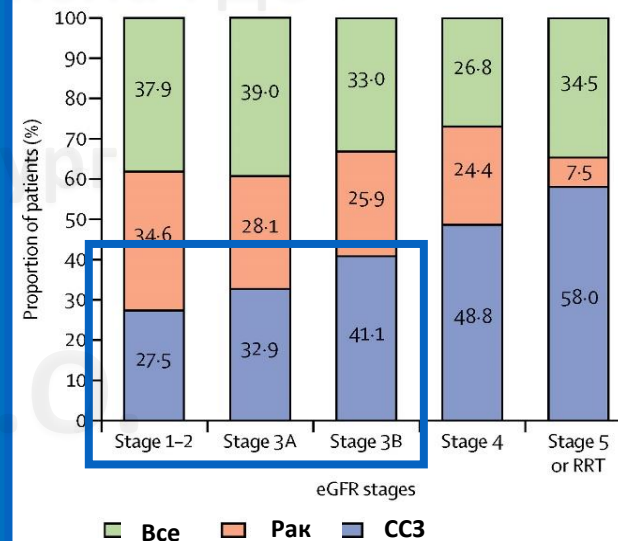


K. Matsushita et al., 2011



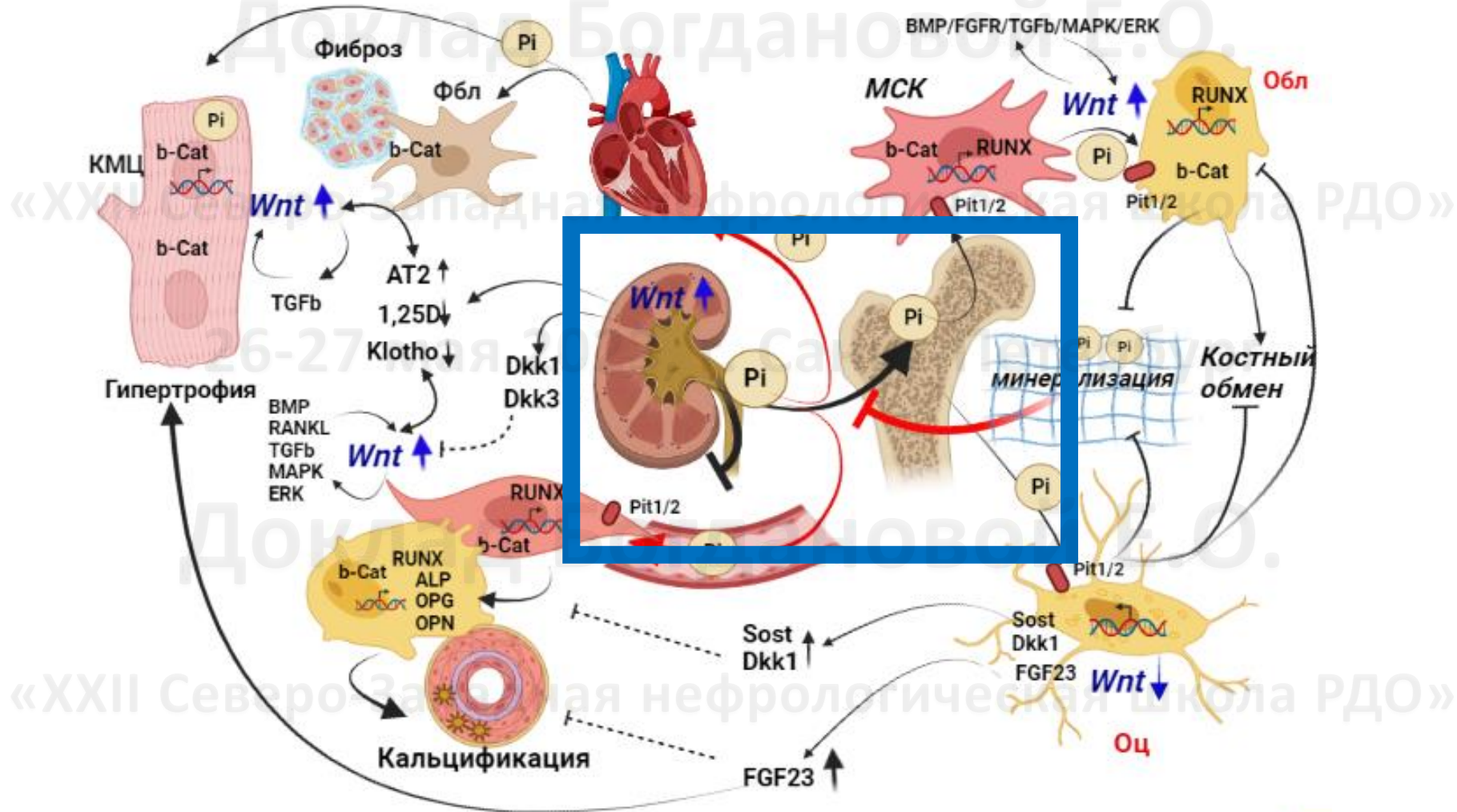
A. S. Go et al. 2004

Смертность vs онкология vs СС события (%) при ХБП



Совместно с ремоделированием миокарда и сосудистой кальцификацией, ХБП ассоциирована с прогрессированием изменений скелета

В фокусе сегодняшнего доклада – *костный ответ* на ранних стадиях экспериментальной ХБП

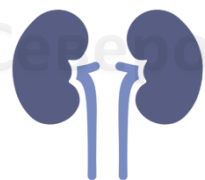


Регуляторная ось почка/скелет при МКН-ХБП

Доклад Богдановой Е.О.

Преимущественно
ХБП С3-5*:
5/6НЭ, генетические
модели

↓CCr > 50%, ↑Pi



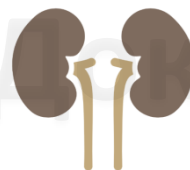
Pi



- Фиброзный остеит (высокий костный обмен)
- Адинамическая кость (низкий костный обмен)
- Комбинация высокого и низкого обмена
- ↑ПТГ
- ↑FGF23
- ↑Склеростин, Dickkopf-1
- ↓Кальцитриол
- ↓ Кальцитонин

ХБП С1-2

↓CCr < 30%
↔↑Pi



Pi?



Ретенция Pi (внутриклеточная?) и
возможный
Pi-зависимый сигналинг
↔FGF23, iWnt

Только одно исследование C2-3:
Iwasaki-Ishizuka Y, *Nephrol Dial Transplant* 2005

* Sabbagh Y, *J Bone Miner Res* 2012
Ferreira JC, *PLoS One* 2013
Carrillo-López N, *Calcif Tissue Int* 2021
Iwasaki-Ishizuka Y, *Nephrol Dial Transplant* 2005
Fang Y, *J Am Soc Nephrol* 2014

Magnusson P, *Kidney Int* 2001
Nickolas TL, *J Bone Miner Res* 2013
Tasnim N, *Cureus* 2021
Malluche HH, *Kidney Int* 1976
Coen G, *Nephrol Dial Transplant* 1996

Barreto FC, *J Bras Nefrol* 2014
Gracioli FG, *Kidney Int* 2017
Misof BM, *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2019
Ha SW, *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017
Bon N, *J Biol Chem*, 2018

Модели костных нарушений при ХБП

Источник	Модель (эквивалент стадии ХБП)	Экспериментальное воздействие	Животное	Срок эксперимента, недели	Статические/ динамические параметры	Фосфат, ПТГ, FGF23	Костный обмен
Iwasaki-Ishizuka et al., 2005	1/2 Nx (C2) 3/4 Nx (C3) 5/6 Nx (C3-4)	ТРТх + инфузия ПТГ	Крыса (Спрег-Дули)	10	+/+	Pi↔ PTH↔ FGF23?	Низкий – во всех моделях снижена скорость образования костей (BFR), параметры остеокластов у 5/6Nx
Mathew et al., 2007	LDLr ^{-/-} (C3)	Nx (электрокоагуляция), диета с высоким содержанием жиров	Мышь	10	+/+	Pi↑ PTH↑ FGF23?	Низкий – снижена BFR, количество остеобластов
Moe et al., 2009	Cy/+ (кистоз) (C3-4)	Диета с 0,2 и 0,7% фосфата	Крыса	14	+/+	Pi↑ PTH↑ FGF23↑	Высокий (0,7% Pi) – увеличены значения параметров остеобластов, остеокластов, фиброз
Nikolov et al., 2010	ApoE ^{-/-} vs. WT (C3-4)	-	Мышь	8	+/+	Pi↔ PTH↔ FGF23?	При ХБП костная масс и объем трабекулярной кости выше, чем у дикого типа
Sabbagh et al., 2012	Jck (кистоз) (C2-5)	-	Мышь	20	+/+	Pi↑ PTH↑ FGF23↑	Высокий – повышены BFR, минерализация, трабекулярная кость, количество остеобластов
Stubbs et al., 2012	Col4a3 ^{+/+} FGF23 ^{+/eGFP} (C3)	-	Мышь	12	+/-	Pi↑ PTH↑ FGF23↑	Высокий – повышены параметры резорбции
Ferreira et al., 2013	5/6 Nx (C3-4)	ТРТх + инфузия ПТГ Диета с 0,6 и 1,2% фосфата	Крыса (Вистар)	8	+/+	Pi↑ PTH↓ FGF23↓	Низкий – снижена BFR и объем кости, апоптоз остеобластов и остеоцитов, снижены показатели остеобластов и остеокластов
Fang et al., 2014	LDLr ^{-/-} (C2-3)	Nx, диета с высоким содержанием жиров	Мышь	16	+/+	Pi↑ PTH↔ FGF23↑	Низкий – снижена BFR; снижен объем трабекулярной кости и толщина трабекул
Fang et al., 2014	LDLr ^{-/-} (C2-3)	Nx, диета с высоким содержанием жиров	Мышь	10	+/+	Pi↑ PTH↔ FGF23↑	Низкий – снижена BFR, объем остеоида, количество остеобластов и остеокластов
Liao et al., 2019	5/6 Nx (C3)	-	Крыса (Спрег-Дули)	8	+/+	Pi↑ PTH↔ FGF23↑	Высокий – повышены BFR, минерализация,
Hsu et al., 2022	0.2% аденин C57BL/6 (C3)	-	Мышь	5	+/+	Pi↑ PTH↑ FGF23↑	Низкий - снижен объем трабекулярной кости и толщина трабекул

Гистологические характеристики костного обмена у пациентов

Jørgensen H.S. Bone 2021:



Full Length Article

Static histomorphometry allows for a diagnosis of bone turnover in renal osteodystrophy in the absence of tetracycline labels

Hanne Skou Jørgensen^{a,b}, Geert Behets^c, Liesbeth Viaene^d, Bert Bammens^{a,e}, Kathleen Claes^{a,c}, Bjorn Meijers^{a,e}, Maarten Naesens^{a,e}, Ben Sprangers^{a,e}, Dirk Kuypers^{a,e}, Patrick C. D'Haese^c, Pieter Evenepoel^{a,e,*}

^a Department of Microbiology, Immunology and Transplantation, Nephrology and Renal Transplantation Research Group, KU Leuven, Belgium
^b Department of Kidney Diseases, Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark
^c Laboratory of Pathophysiology, University of Antwerp, Wilrijk, Belgium
^d Department of Nephrology, Ziekenhuis Groeninge, Kortrijk, Belgium
^e Department of Medicine, Division of Nephrology, University Hospitals Leuven, Belgium

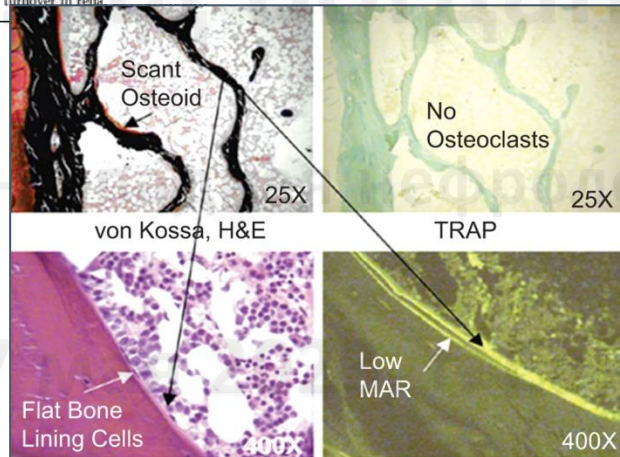
ARTICLE INFO

Keywords:
 Bone histomorphometry
 Chronic kidney disease – mineral and bone disorder
 Chronic kidney disease
 Kidney transplantation

ABSTRACT

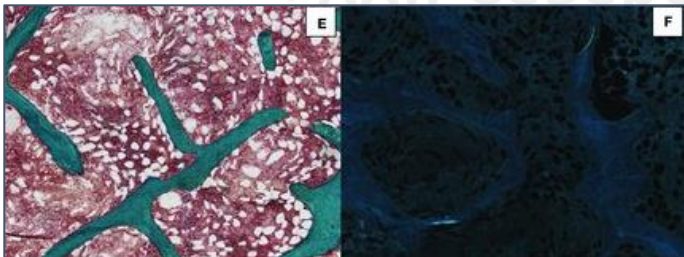
A bone biopsy with prior tetracycline labeling is the gold standard to diagnose renal osteodystrophy. In cases of missing tetracycline labels, it is still paramount to gain clinically relevant information from the extracted bone sample, by evaluating the static histomorphometry. This study investigates the diagnostic performance of static histomorphometry for the evaluation of high and low bone turnover. Transilial bone biopsies taken pre- or post-kidney transplantation, of sufficient quality for a full histomorphometric analysis were included (n = 205). The cohort was randomly split to provide separate exploration and validation subsets. Diagnostic performance was evaluated by area under the receiver operator characteristics curve (AUC). All histomorphometric parameters were significantly different across categories of low (24%), normal (60%), and high (16%) bone turnover, and all were significant predictors of both high and low bone turnover (AUC 0.71–0.84). Diagnostic performance was very good for high turnover, as a combination of static parameters (NPV and PPV) of 80% and 96%, respectively. For low 71% and NPV of 82%. We conclude that in the absence of tetracycline labels, static histomorphometry is an acceptable alternative for a diagnosis of bone turnover in renal osteodystrophy.

Низкообменные состояния



Miller P. Bone Res (2014)

Адинамическая кость (adynamic bone disorder)



Chavassieux P. Frontiers in Endocrinology (2022)

H.S. Jørgensen et al.

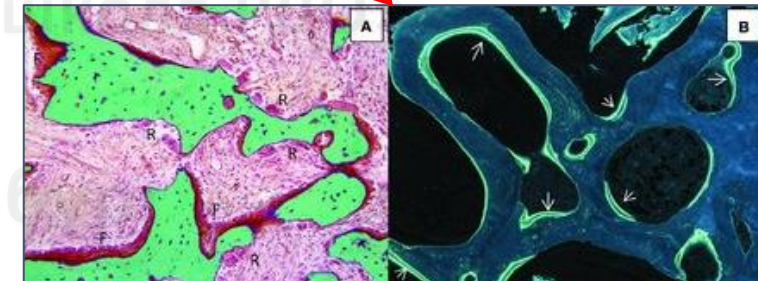
Table 1
 Bone histomorphometric variables of remodeling across categories of bone turnover.

	Low (n = 49)	Normal (n = 123)	High (n = 33)	p
Bone formation rate, $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2/\text{day}$	31 (1; 52) [†]	209 (137; 379)	830 (606; 1176) [†]	<0.001
Adjusted apposition rate, $\mu\text{m}/\text{day}$	0.1 (0.0; 0.3) [†]	0.3 (0.2; 0.6)	0.6 (0.4; 1.3) [†]	<0.001
Mineralization lag time, days	80 (24; 139) [†]	27 (14; 46)	15 (9; 27)	<0.001
Mineral apposition rate, $\mu\text{m}/\text{day}$	0.6 (0.5; 0.9) [†]	0.8 (0.7; 1.0)	1.1 (0.9; 1.4) [†]	<0.001
Osteoid/bone area, %	0.9 (0.4; 2.0) [†]	2.8 (1.3; 5.5)	5.4 (3.4; 10.4) [†]	<0.001
Osteoid/bone perimeter, %	9.3 (4.6; 19.9) [†]	22.4 (12.1; 39.1)	43.4 (23.3; 56.3) [†]	<0.001
Osteoid width, μm	5.5 (4.8; 6.5) [†]	8.3 (6.4; 10.5)	10.7 (8.0; 13.6) [†]	<0.001
Fibrosis, any, n (%)	1 (2.0)	12 (9.8)	25 (75.8)	<0.001
Fibrosis >5%, n (%)	0 (0.0)	3 (2.4)	15 (45.5)	<0.001
Eroded/bone perimeter, %	1.3 (0.6; 2.6) [†]	3.3 (1.3; 6.0)	6.9 (4.7; 11.1) [†]	<0.001
Osteoblast/bone perimeter, %	0.6 (0.0; 1.7) [†]	3.0 (0.5; 10.2)	12.2 (5.9; 27.3) [†]	<0.001
Osteoblast/osteoid perimeter, %	7.0 (0.0; 18.1) [†]	16.7 (0.0; 33.4)	33.3 (23.9; 54.7) [†]	<0.001
Osteoclast/bone perimeter, %	0.0 (0.0; 0.7) [†]	0.5 (0.0; 1.5)	2.0 (1.1; 3.0) [†]	<0.001
Osteoclast/eroded perimeter, %	0.0 (0.0; 32.1)	18.3 (0.0; 30.7)	28.8 (16.9; 34.4) [†]	0.005

Data are median (IQR) with n by the Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test.

[†] p < 0.05 compared to the "Normal" category.

Состояния с высоким обменом



Chavassieux P. Frontiers in Endocrinology (2022)

Молекулярные механизмы регуляции костного обмена

Протокол систематического поиска данных:



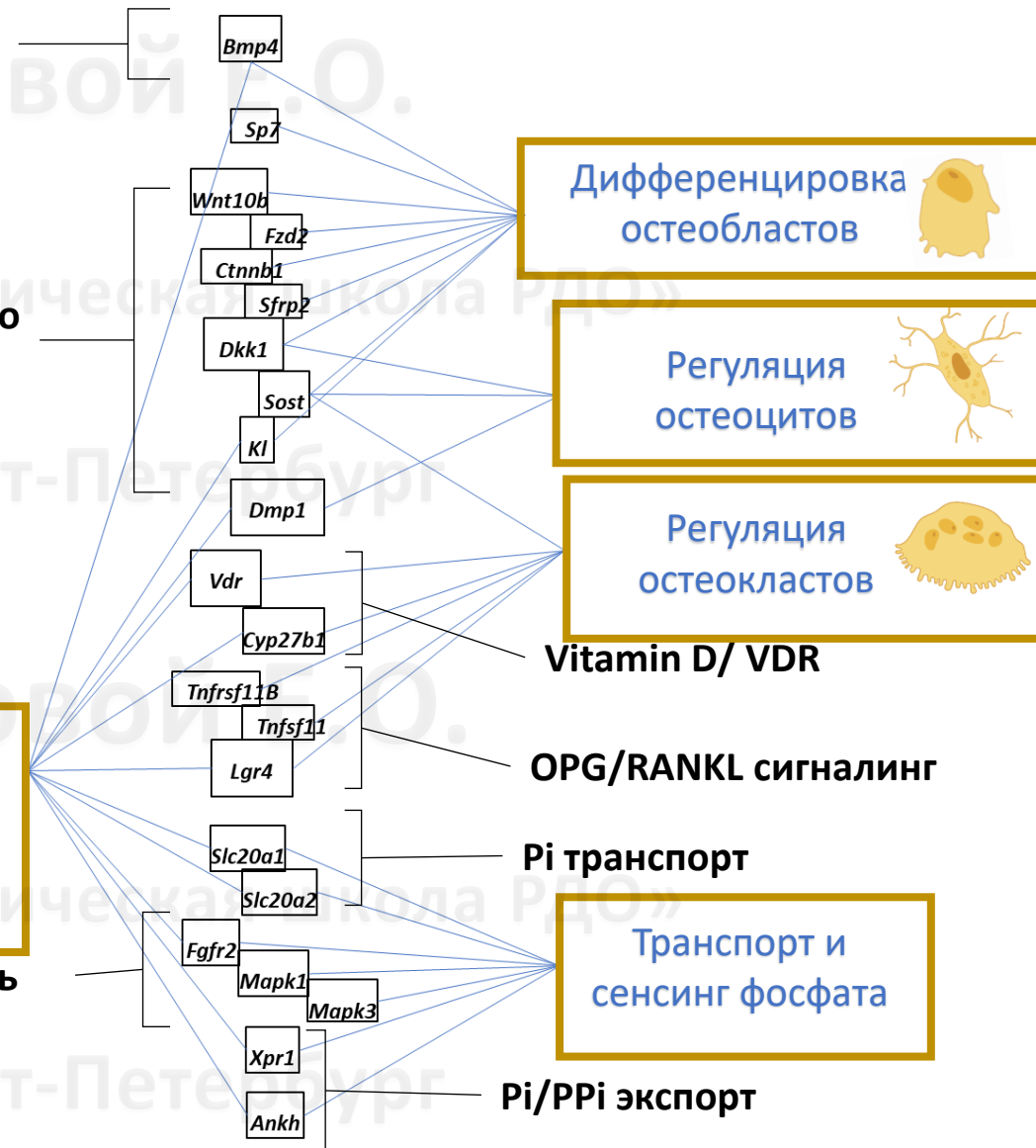
Добронравов В.А., Богданова Е.О., 2019

Сигнальный путь BMP

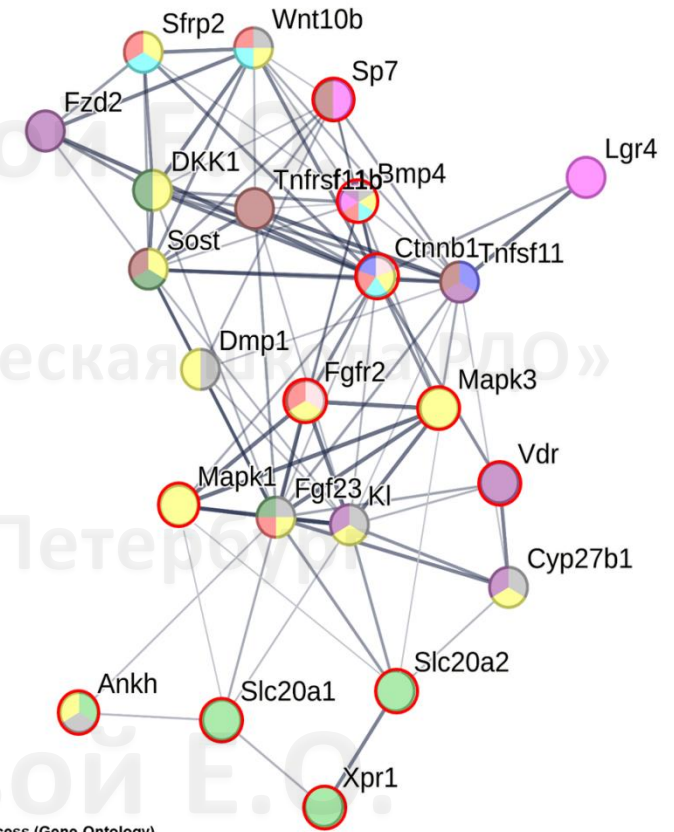
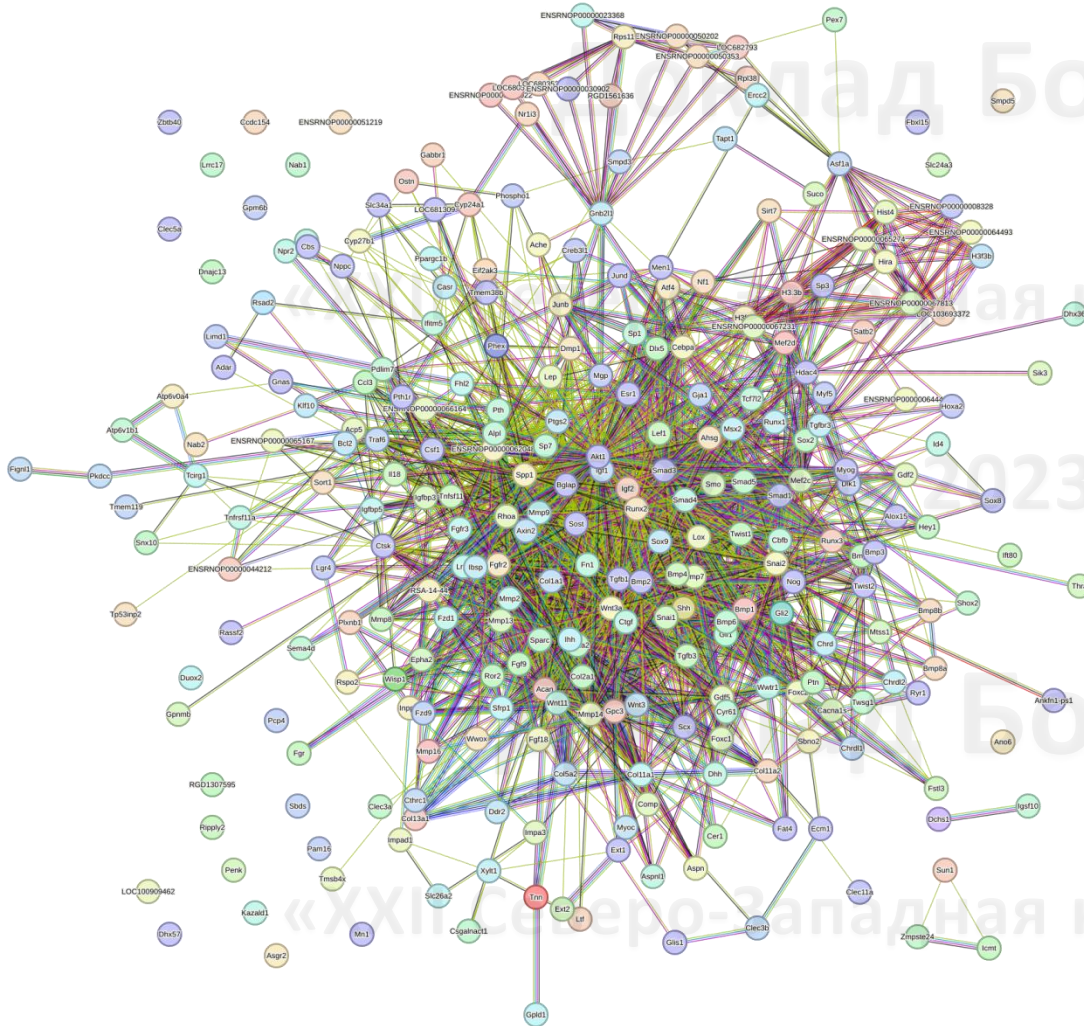
Wnt путь и его регуляция



MAPK путь



Предсказанные взаимодействия между продуктами генов-регуляторов костного обмена



Biological process (Gene Ontology)

- Positive regulation of osteoblast differentiation
- Regulation of osteoblast differentiation
- Osteoblast differentiation
- Osteoclast differentiation
- Regulation of osteoclast
- Regulation of bone mineralization
- Regulation of ossification
- Negative regulation of ossification
- Phosphate ion transmembrane transport
- Calcium ion homeostasis

● Down-regulated genes

Edge Confidence

- highest (0.900)
- medium (0.400)
- low (0.150)

Figure S4. Predicted interaction between studied genes products (STRING Database: <https://string-db.org/>); a network for studied gene profile: genes products are involved in major biological processes of bone regulation, including osteoblasts and osteoclasts differentiation, bone mineralization, and ossification, phosphorus transport, and calcium homeostasis; red circles indicate the down-regulated genes involved in regulation of cell differentiation, bone mineralization, ossification, calcium and phosphorus homeostasis;

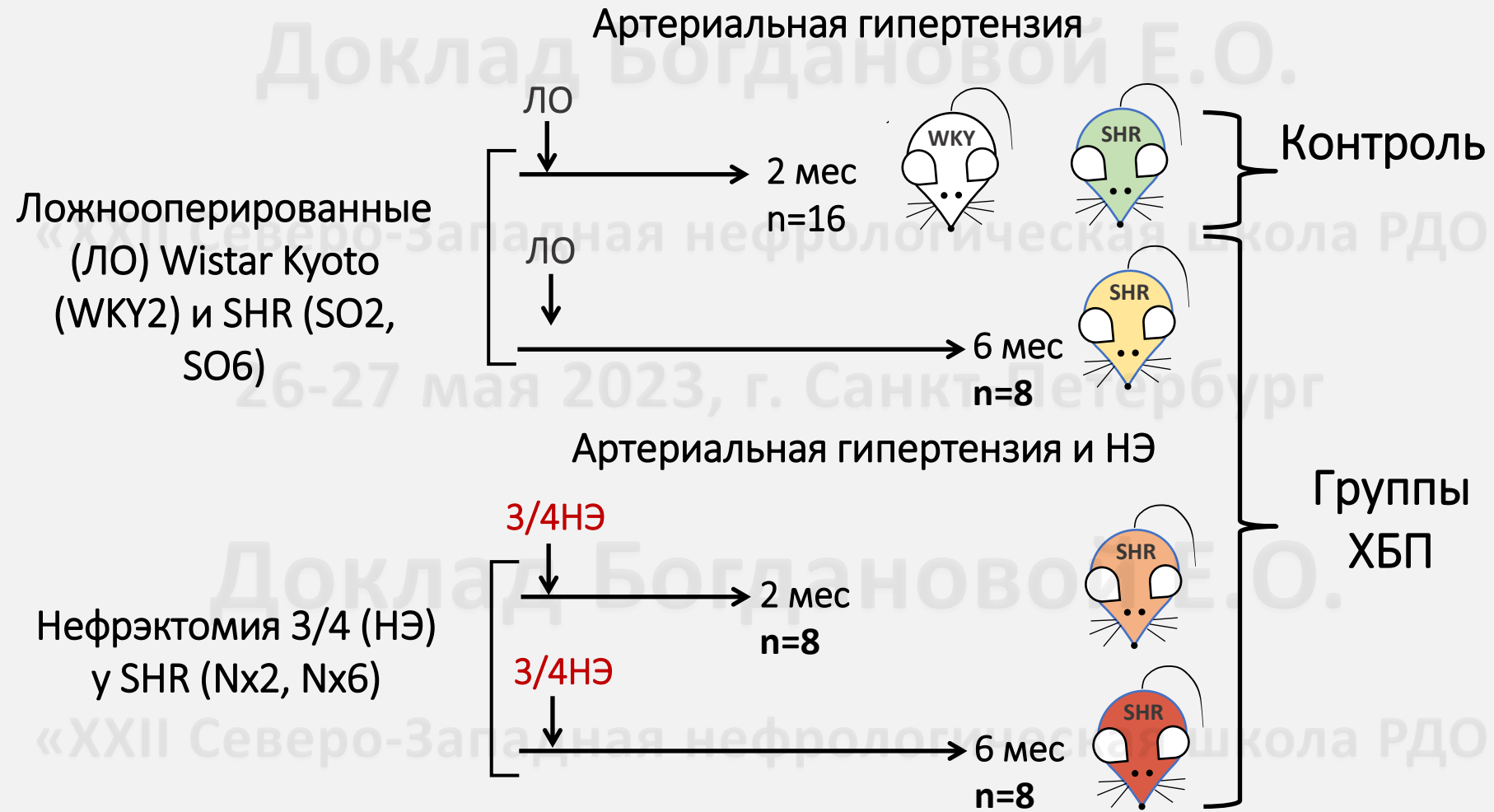
Slc20a1 – solute carrier family 20 member 1 (Pit-1), *Slc20a2* – solute carrier family 20 member 2 (Pit2), *Xpr1* – xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1, *Ankh* – ANKH PPI transport regulator, *Mapk3* – mitogen activated protein kinase 3 (Erk1), *Mapk1* – mitogen activated protein kinase 1 (Erk2), *KL* – Klotho, *Fgf23* – fibroblast growth factor 23, *Fgfr2* – fibroblast growth factor receptor 2, *Ctnnb1* – catenin beta 1, *Sfrp2* – secreted frizzled-related protein 2, *Fzd2* – frizzled class receptor 2, *Wnt10b* – Wnt family member 10B, *Sost* – sclerostin, *Dkk1* – dickkopf 1, *Vdr* – vitamin D receptor, *Cyp27b1* – cytochrome P450, family 27, subfamily b, polypeptide 1 (1-alpha-(OH)ase), *Tnfrsf11b* – TNF receptor superfamily member 11 B (OPG), *Tnfsf11* – TNF superfamily member 11 (RANKL), *Lgr4* – leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4, *Sp7* – Sp7 transcription factor (osterix), *Bmp4* – bone morphogenetic protein 4, *Dmp1* – dentin matrix acidic phosphoprotein 1, *Gapdh* – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Accession GO:0001503
Ontology biological_process

Name bone biosynthesis, bone formation, osteogenesis

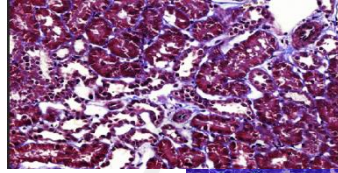
26-27 мая 2023, г. Санкт-Петербург

Модели ХБП и контрольные группы

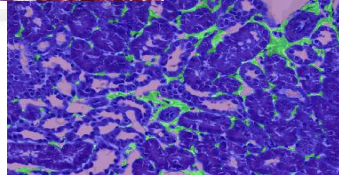


26-27 мая 2023, г. Санкт-Петербург

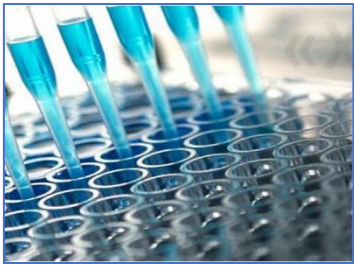
2 – Гистология и количественная морфометрия почки



- Интерстициальный фиброз
- Тубулярная атрофия
- Гломерулярные изменения

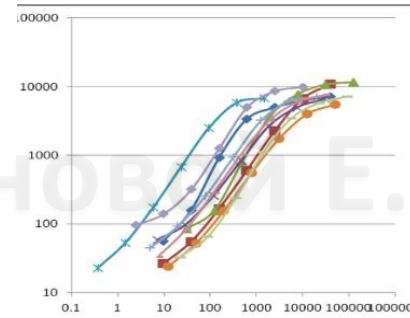


1 - Биохимический и иммуноферментный анализ



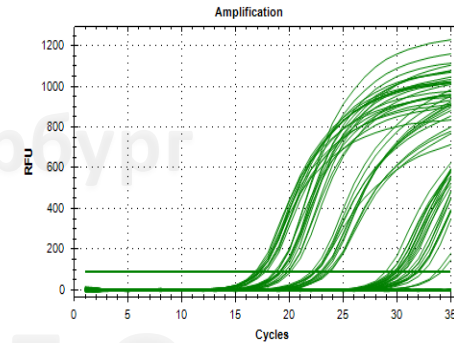
- Альбуминурия
- Klotho в сыворотке
- Клиренс креатинина
- Фосфат в сыворотке

3 - Мультиплексный флуоресцентный анализ xMAP



- Dickkopf-1
- Склеростин
- Остеопротегерин
- Паратгормон
- Фактор роста фибробластов 23

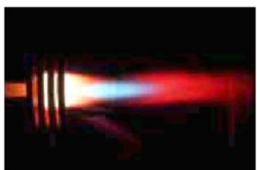
4 - Исследование экспрессии генов в кости



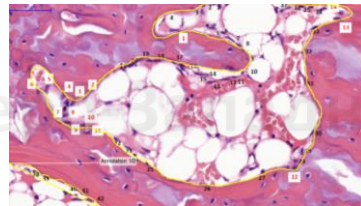
Sp7, Ctnnb1, Bmp4, Vdr, Slc20a1, Slc20a2, Xpr1, Ankh, Fgfr2, Mapk1/3, Tnfrsf11B, Tnfsf11, Lrg4, Dmp1, Wnt10b, Dkk1, Sost, Sfrp2, Fzd2, Kl

Методы валидации и анализа МКН-ХБП в полученных моделях

7 – АЭС-ИСП, ААС

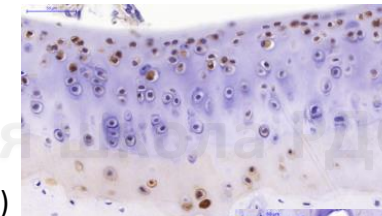


6 - Гистоморфометрия кости

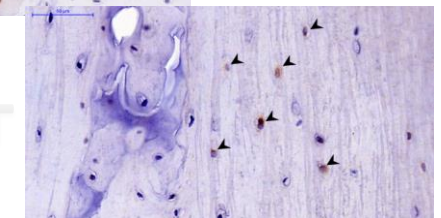


- Трабекулярная кость (B.Ar%T.Ar)
- Остеоциты (N.Oc/V.Pm)
- Активные остеобласты (N.Ob/ V.Pm)
- Остеокласты (N.Oc/V.Pm)
- Периметр резорбции (E.Pm%V.Pm)

5 – Иммуногистохимия кости

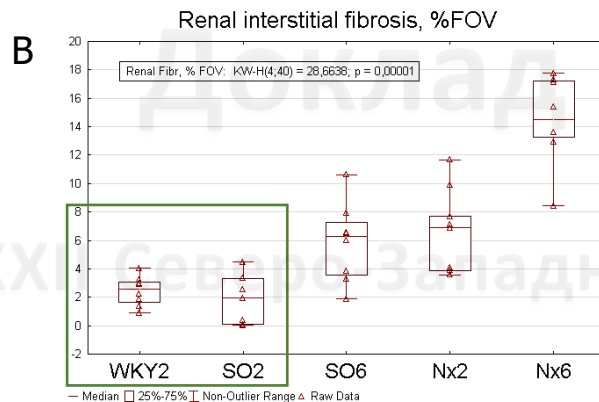
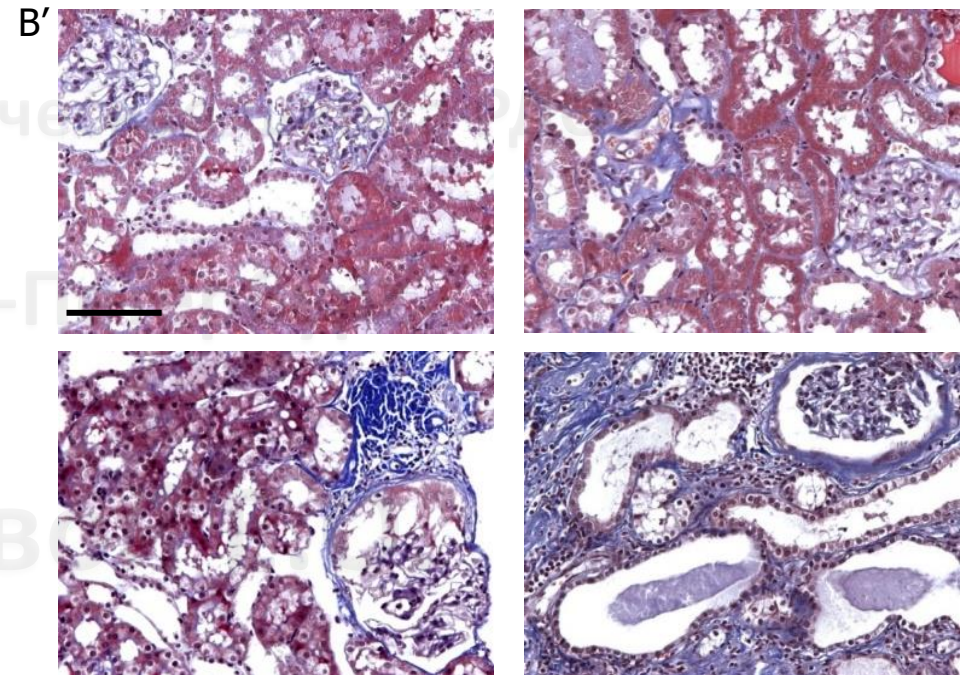
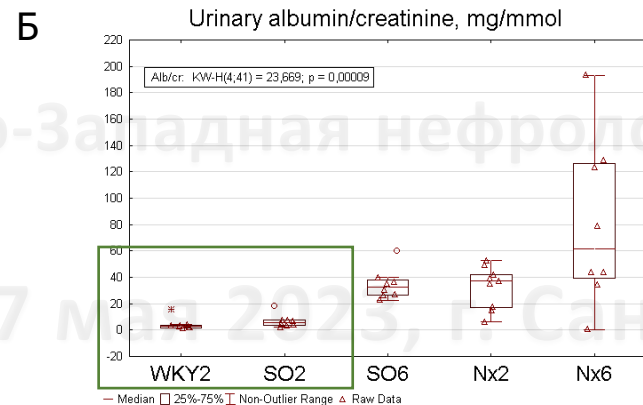
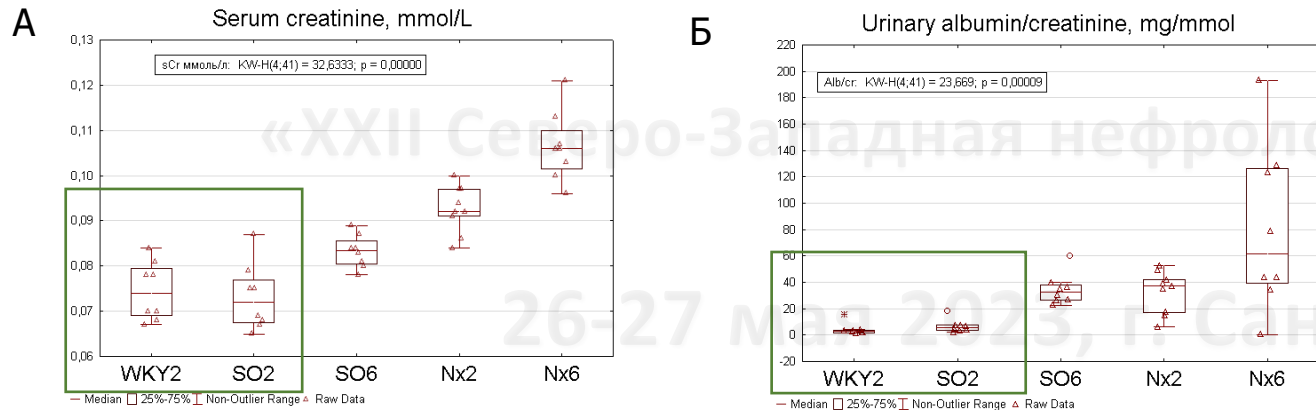


- Dickkopf-1
- Склеростин



Полученные модели хронической дисфункции почек соответствовали ХБП С1-2

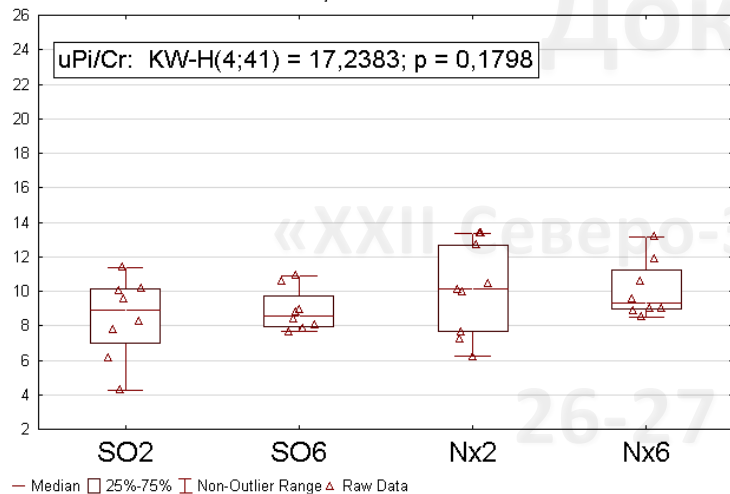
Доклад Богдановой Е.О.



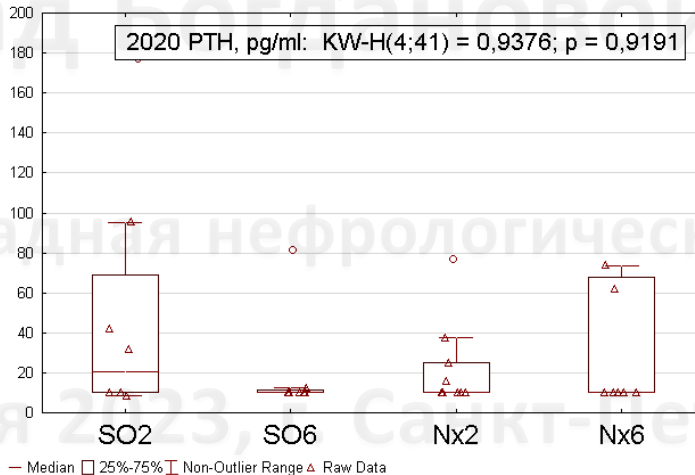
26-27 мая 2023, г. Санкт-Петербург

Неорганический фосфат и его регуляторы в полученных моделях

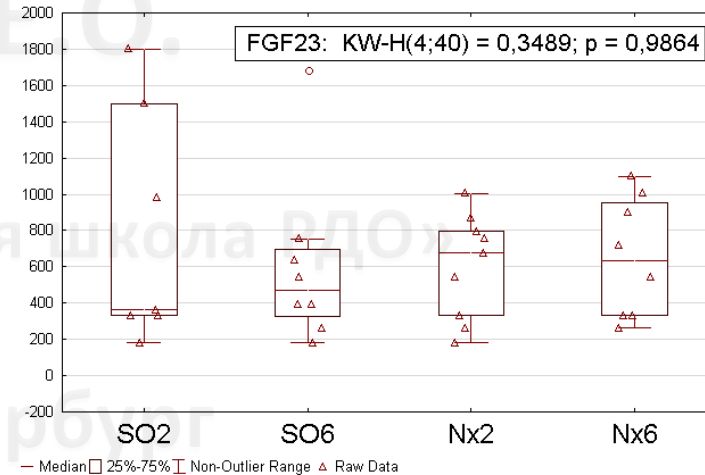
UPi/Cr, mmol/mmol



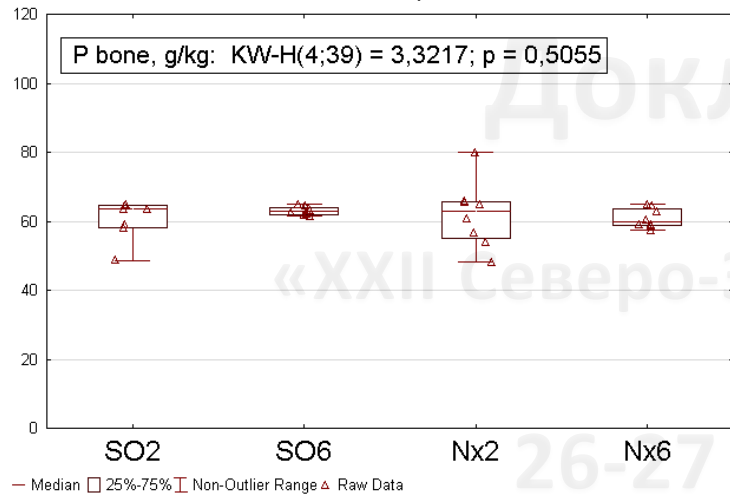
ПТГ, пг/мл



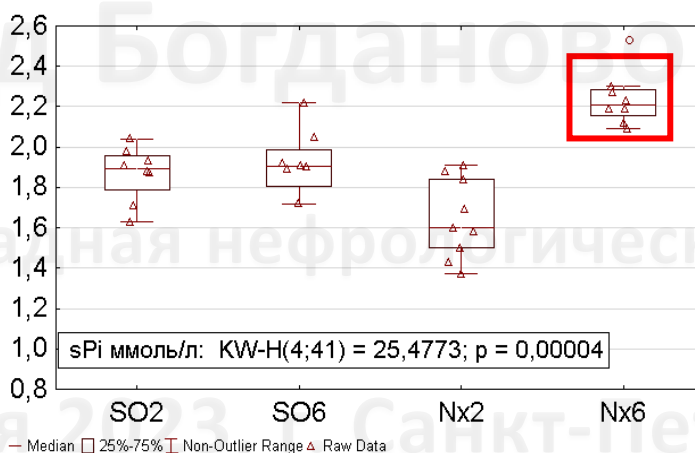
FGF23, пг/мл



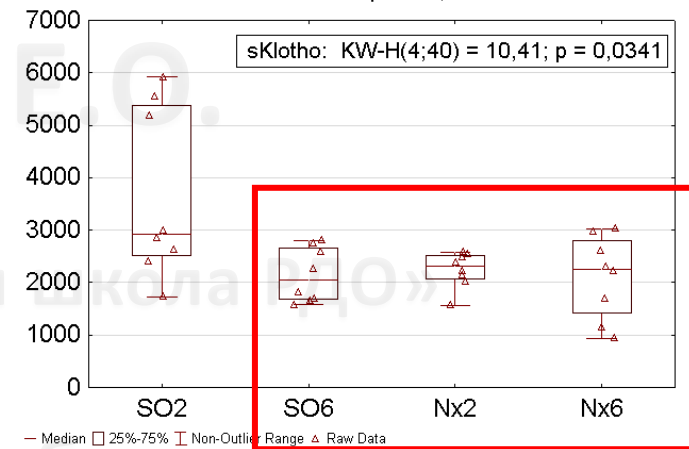
P в кости, г/кг



Неорганический фосфат в сыворотке, ммоль/л



Klotho в сыворотке, пг/мл



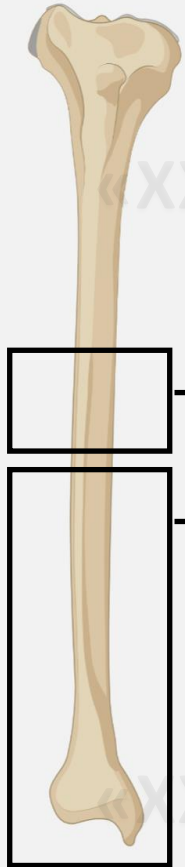
Полученные модели хронической дисфункции почек соответствовали
ХБП С1-2

Исследуемые параметры	SO2 	SO6 	Nx2 	Nx6 
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	↑	↑	↑	↑
Клиренс креатинина, мл/мин/100г	↔	↔	↓29%	↓29%
Альбуминурия, мг/мг креатинина	↔	x6	x8	x12
Интерстициальный фиброз почки, %	↔	↔	10%	20%
Klotho в сыворотке, пг/мл	↔	↓	↓	↓
Фосфат в сыворотке, ммоль/л	↔	↔	↔	↑
Экскреция фосфата, мг/мг креатинина	↔	↔	↔	↔
Интактный паратиреоидный гормон, пг/мл	↔	↔	↔	↔
Интактный фактор роста фибробластов 23, пг/мл	↔	↔	↔	↔

Стадии, эквивалентные ХБП С1-2
до повышения уровней FGF23, PTH

Представлены различия - SO2 vs WKY2, SO6-Nx6 vs SO2

Гистологические и молекулярные исследования кости



ПЦР-РВ (диафиз большеберцовой кости без костного мозга)

Формирование кости и регуляция остеобластов - *Sp7, Ctnnb1, Bmp4, Dmp1*

Wnt-путь и его регуляция - *Wnt10b, Dkk1, Sost, Sfrp2, Fzd2, Kl*

VDR/OPG/RANKL, регуляция остеокластов - *Vdr, Cyp27b1, Tnfrsf11B, Tnfsf11, Lgr4*

Транспорт и сенсинг фосфата - *Slc20a1, Slc20a2, Xpr1, Ankh, Fgf23, Fgfr2, Mapk3, Mapk1*

Гистология кости, гистоморфометрия и иммуногистохимия

(дистальный метафиз и диафиз большеберцовой кости)

1) Гистоморфометрия кости

Площадь трабекулярной кости (B.Ar%T.Ar) – среднее значение площади для трех оцифрованных стеклопрепаратов для каждого животного; количество измерений всего N=96, n=8 для группы

Количество активных остеобластов (N.Ob/ V.Pm) – в 10 полях зрения для одного гистопрепарата от каждого животного; количество измерений всего N=320, n=80 для каждой группы

Количество остеоцитов (N.Ot/T.Ar) - количество измерений всего N=261, n(SO2)=72, n(SO6)=74, n(Nx2)=73, n(Nx6)=72

Количество остеокластов (N.Oc/V.Pm) - количество измерений всего N=299, (SO2)=74, n(SO6)=76, n(Nx2)=72, n(Nx6)=77

Периметр резорбции (E.Pm%V.Pm) - количество измерений всего N=320, n=80 для группы

2) Иммуногистохимия кости

Proportion of Dickkopf-1-positive Ot (N.Ot^{Dkk1+}/N.Ot) - N=160, n=40 for each group

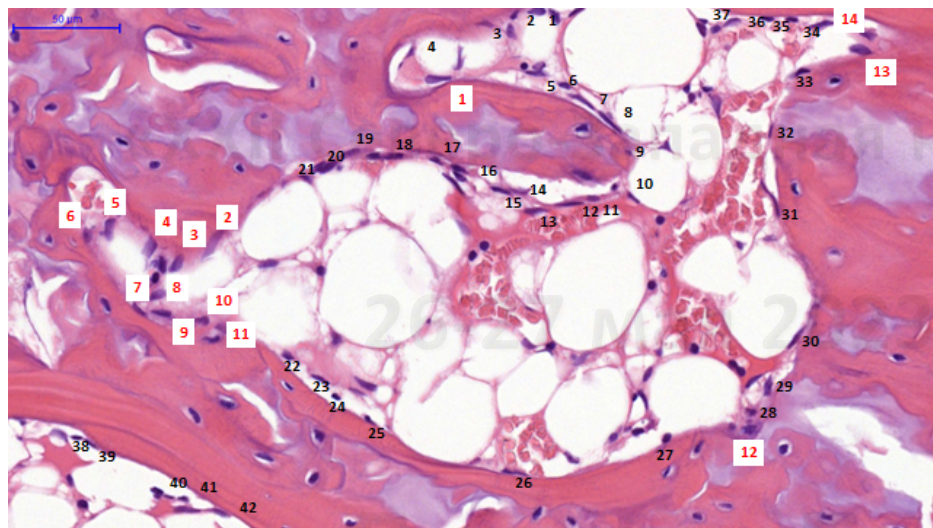
Proportion of Sclerostin-positive Ot (N.Ot^{Sost+}/N.Ot) - N=160, n=40 for each group

Для показателей N.Ob/ V.Pm, N.Ot/T.Ar, N.Oc/V.Pm, E.Pm/V.Pm N.OtDkk1+/N.Ot, N.OtSost+/N.Ot, значения каждого поля зрения были использованы для статистических тестов

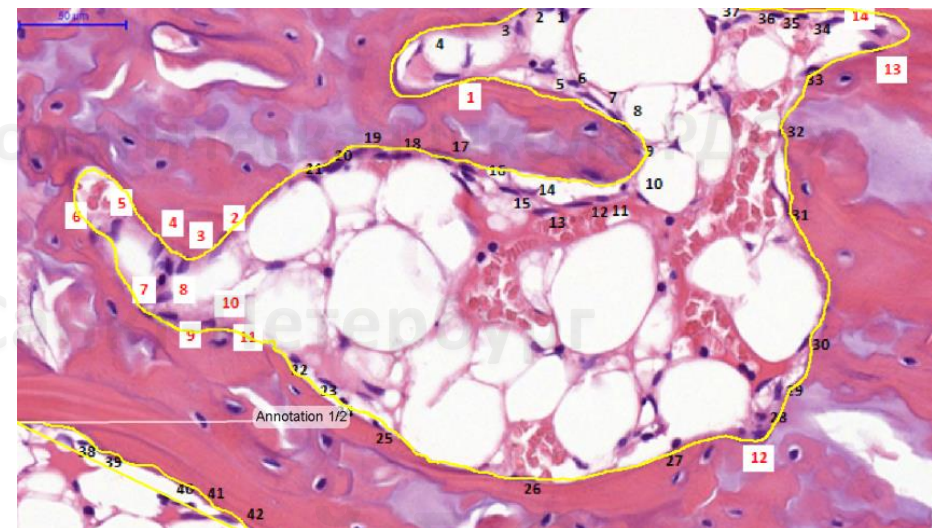
1 - Histomorphometry in Rodents. Bone Research Protocols. Methods in Molecular Biology (2019)

2 - Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee

Измерение количества активных остеобластов:



14 Активные остеобласты (N.Ob) 42 Клетки, выстилающие костную балку



Периметр кости (B.Pm)

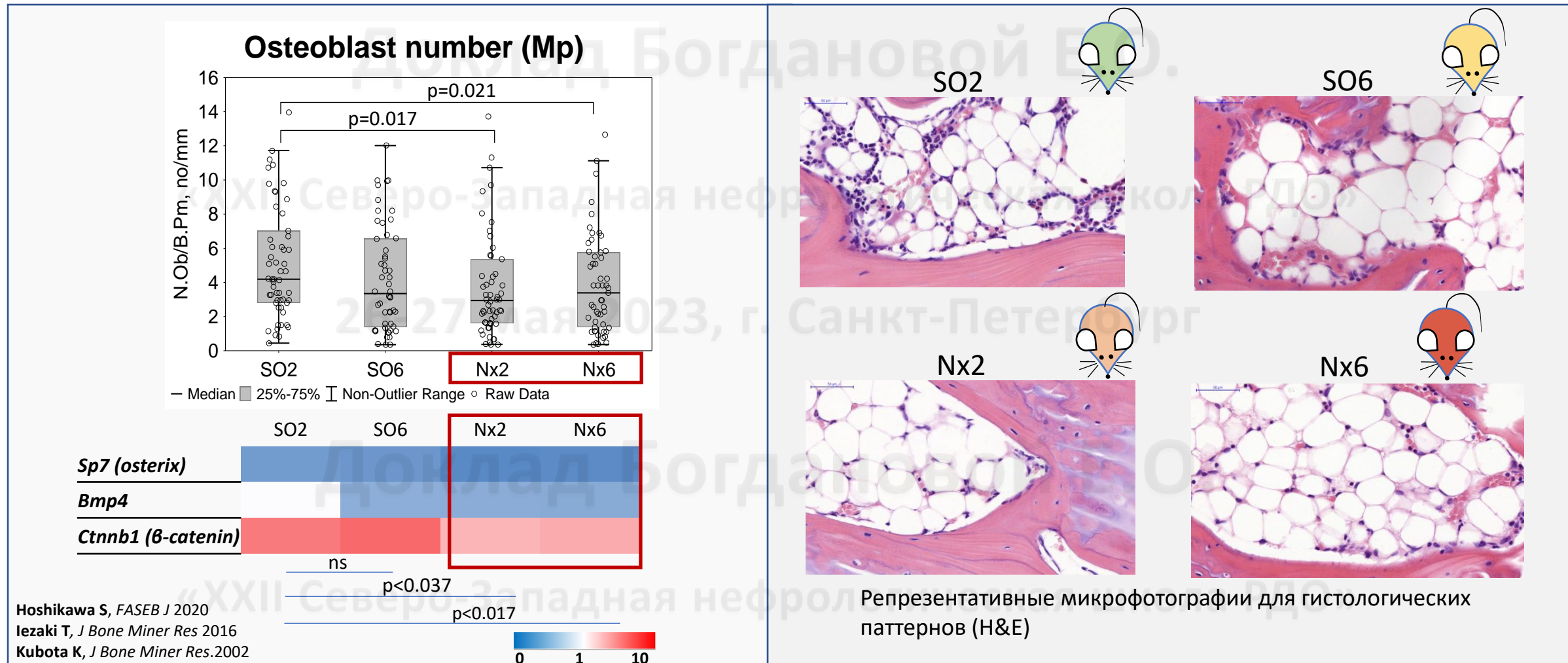
$$\text{Количество остеобластов} = N.Ob/V.Pm \text{ (no/mm)}$$

N.Ob – количество активных остеобластов на поверхности балки;

V.Pm – периметр поверхности костной балки

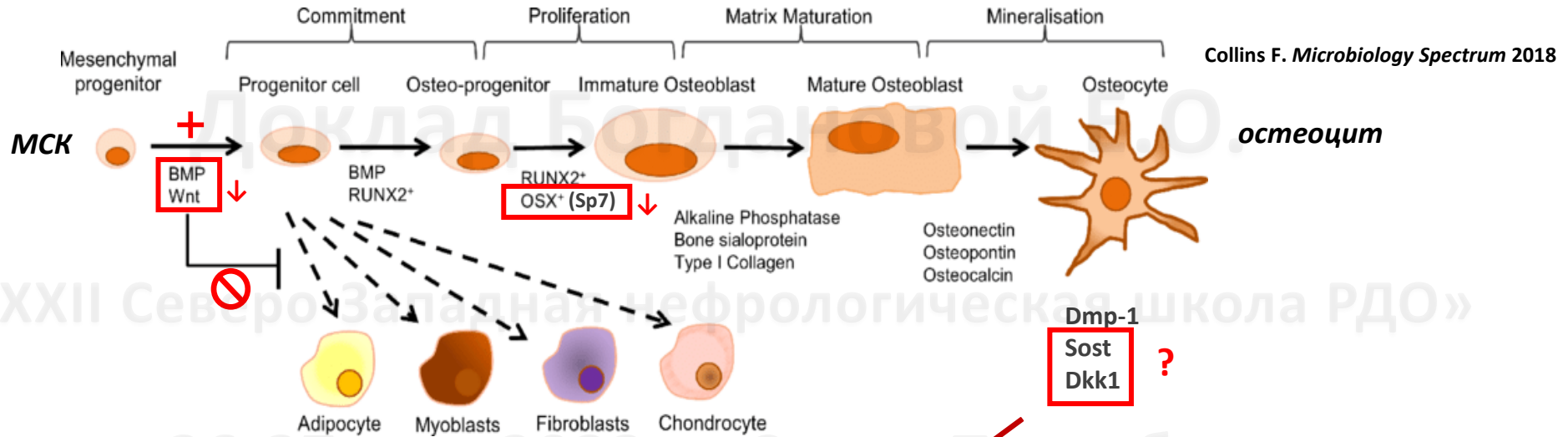
Анализ изображений выполняли с использованием Orbit Image Analysis Version 3.64

Количество активных остеобластов и экспрессия генов дифференцировки ниже в моделях ХБП

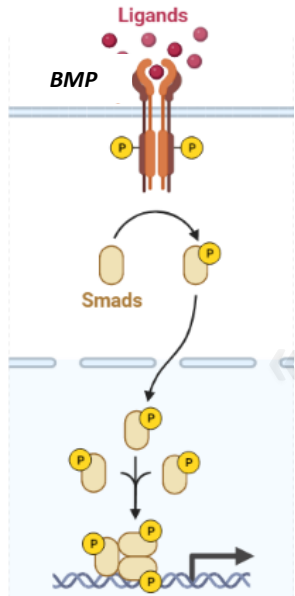


Количество остеобластов в метафизе (N.Ob/B.Pm, no/mm; N=320, n=80 для каждой группы)

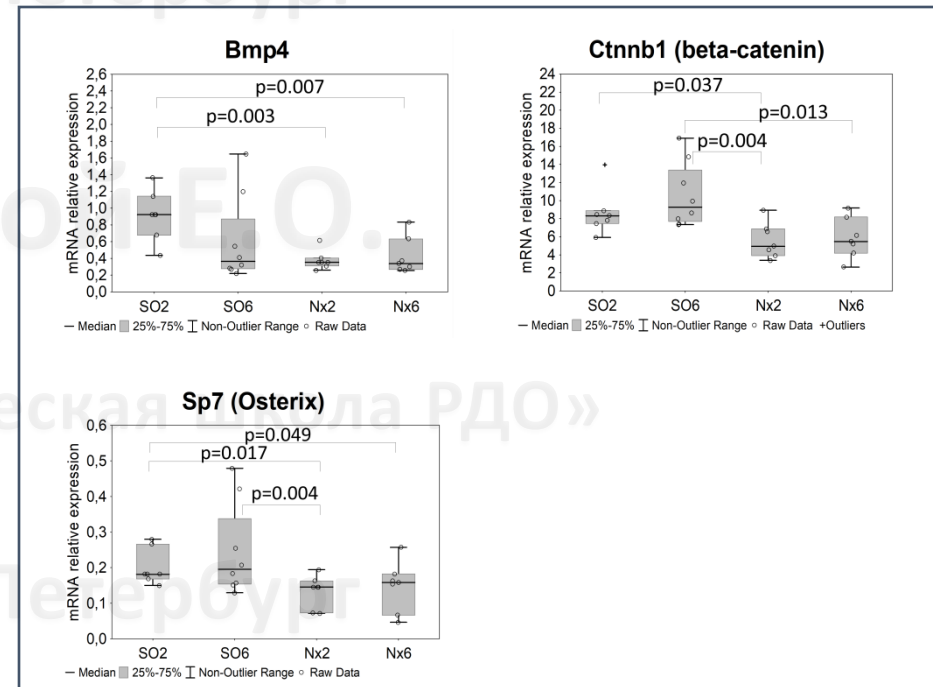
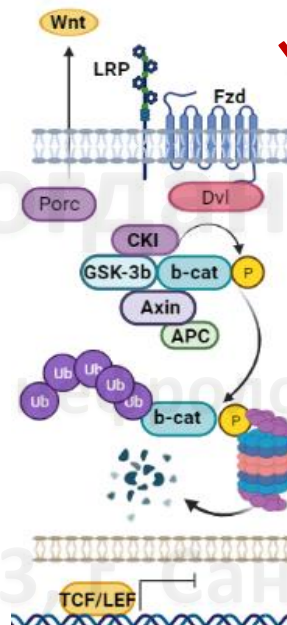
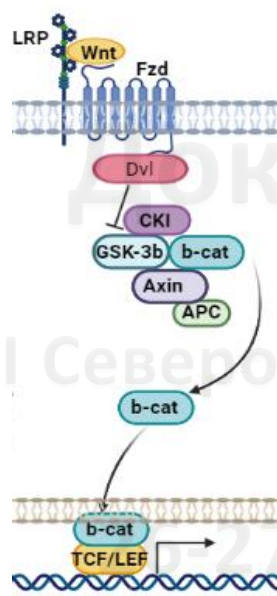
Регуляция дифференцировки остеобластов



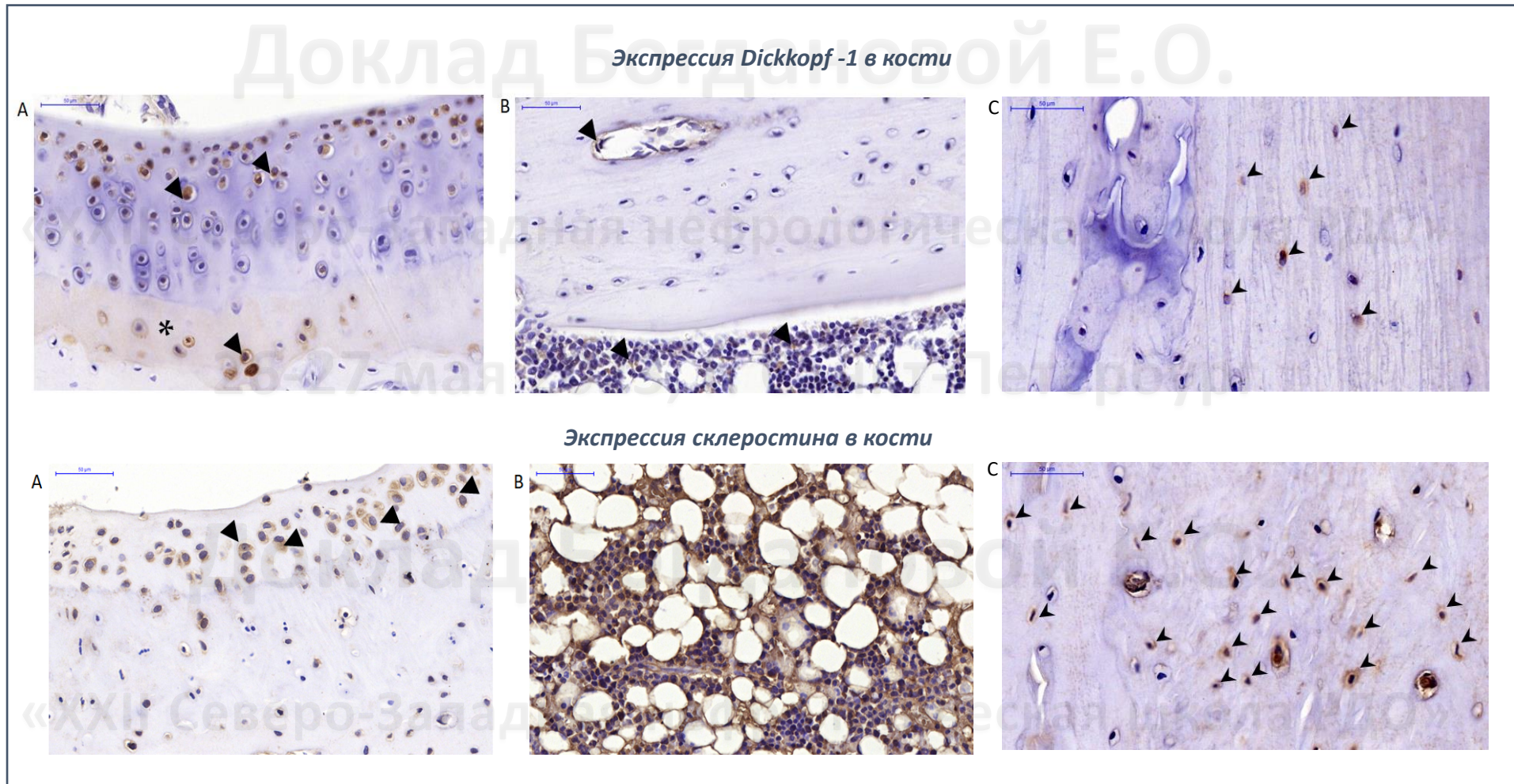
Сигнальный путь BMP



Wnt путь



Иммунорфологическое исследование экспрессии Dickkopf-1 и склеростина в кости



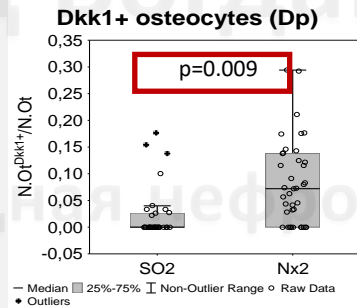
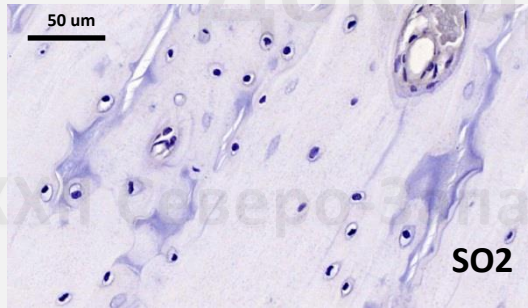
А – экспрессия в хряще, В – экспрессия в костном мозге и эндотелии сосудов, С – экспрессия в остеоцитах диафиза

26-27 мая 2023, г. Санкт-Петербург

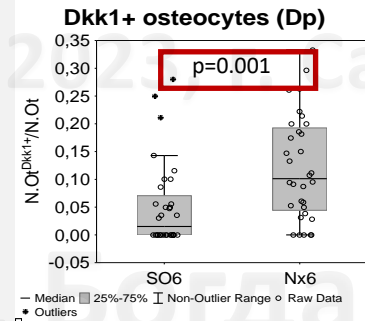
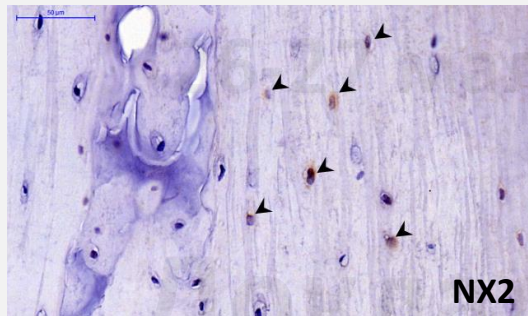
Экспрессия Dickkopf-1 в остеоцитах и концентрация в сыворотке повышаются в моделях ранней ХБП

Иммуноморфологическое исследование экспрессии Dickkopf-1

2 мес

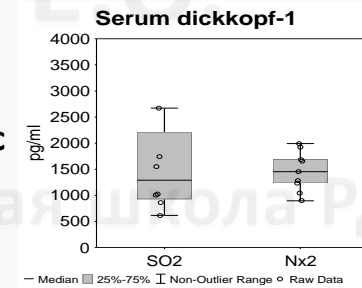


6 мес

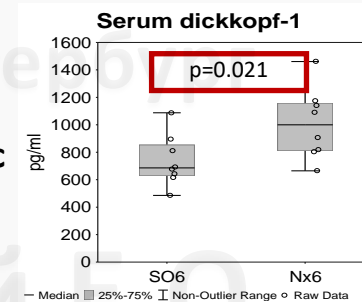


Dickkopf-1 в сыворотке

2 мес

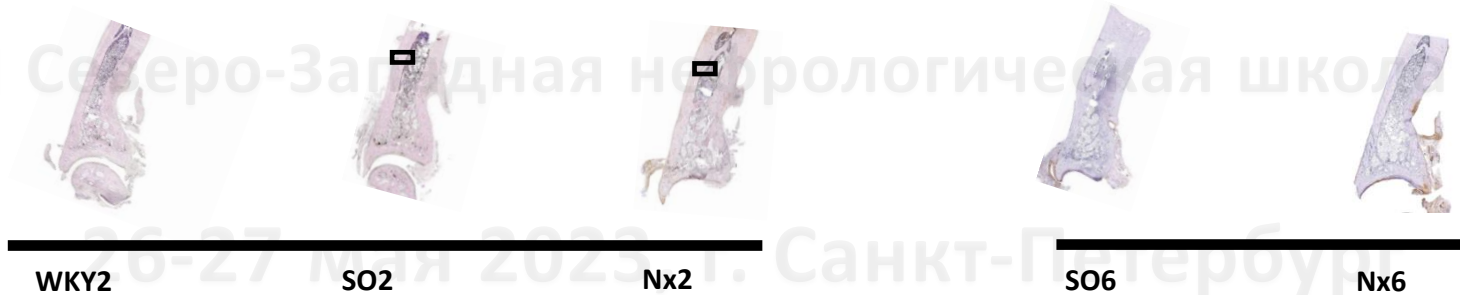


6 мес



5 mm

Dickkopf-1



WKY2

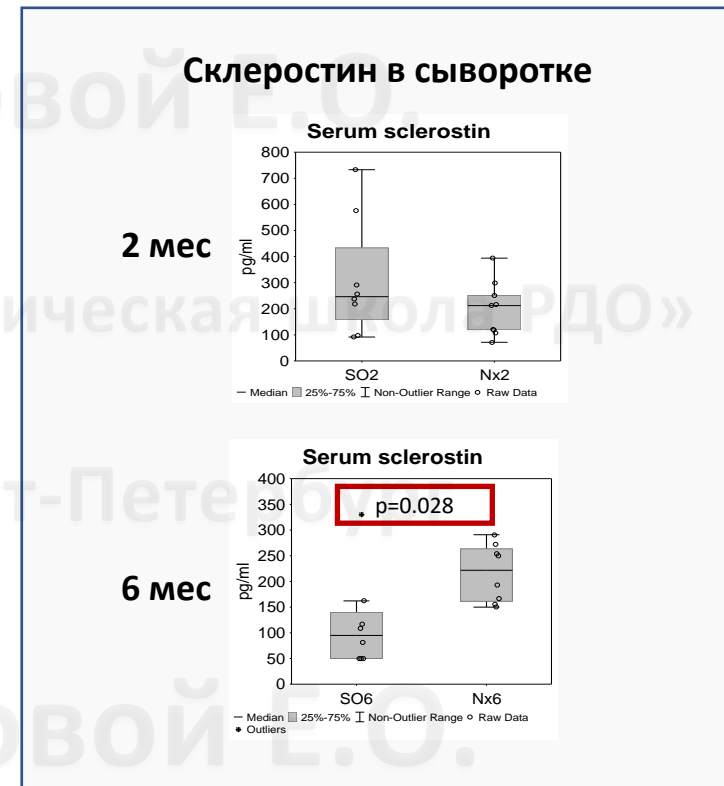
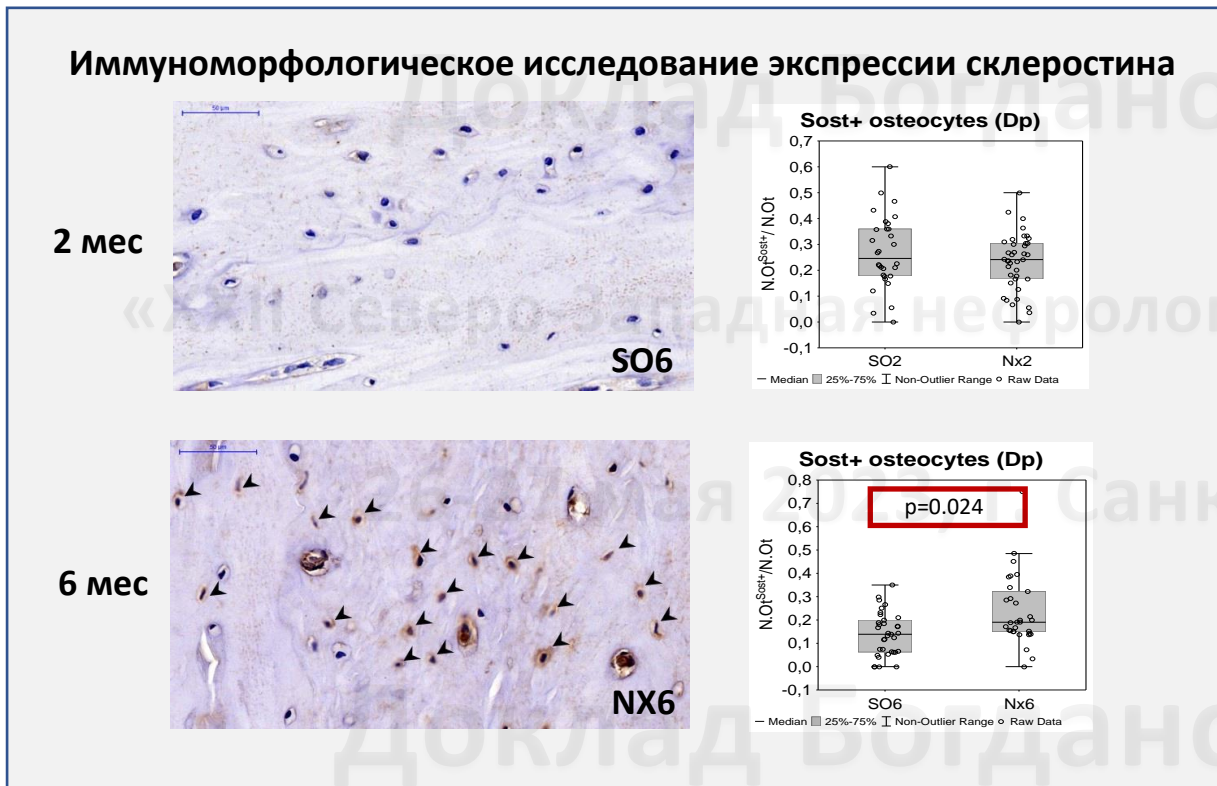
SO2

Nx2

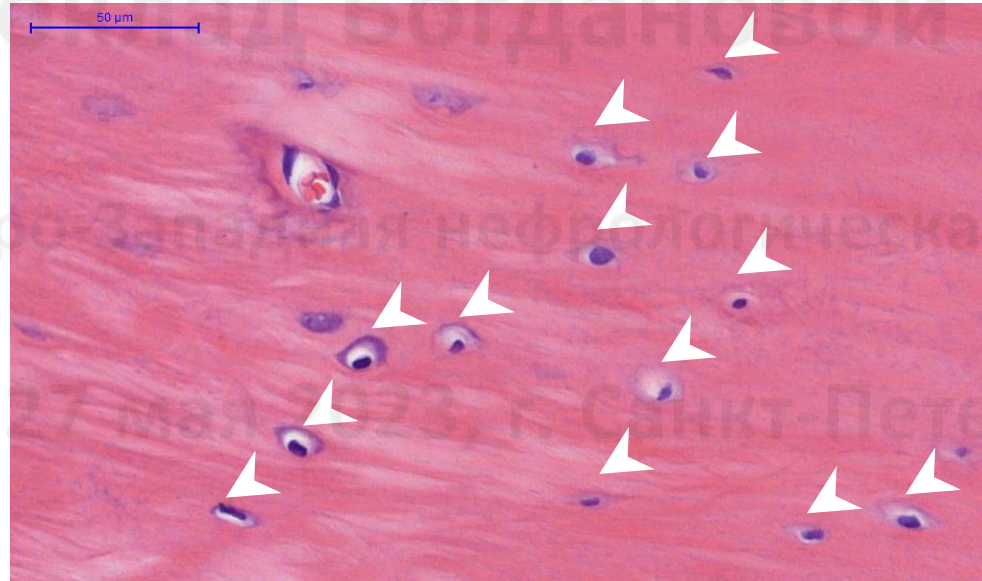
SO6

Nx6

Экспрессия склеростина в остеоцитах и концентрация в сыворотке повышаются в моделях ранней ХБП



Измерение количества остеоцитов:



Стрелки – остеоциты

$$\text{Количество остеоцитов} = N.Ot/T.Ar \text{ (n/mm}^2\text{)}$$

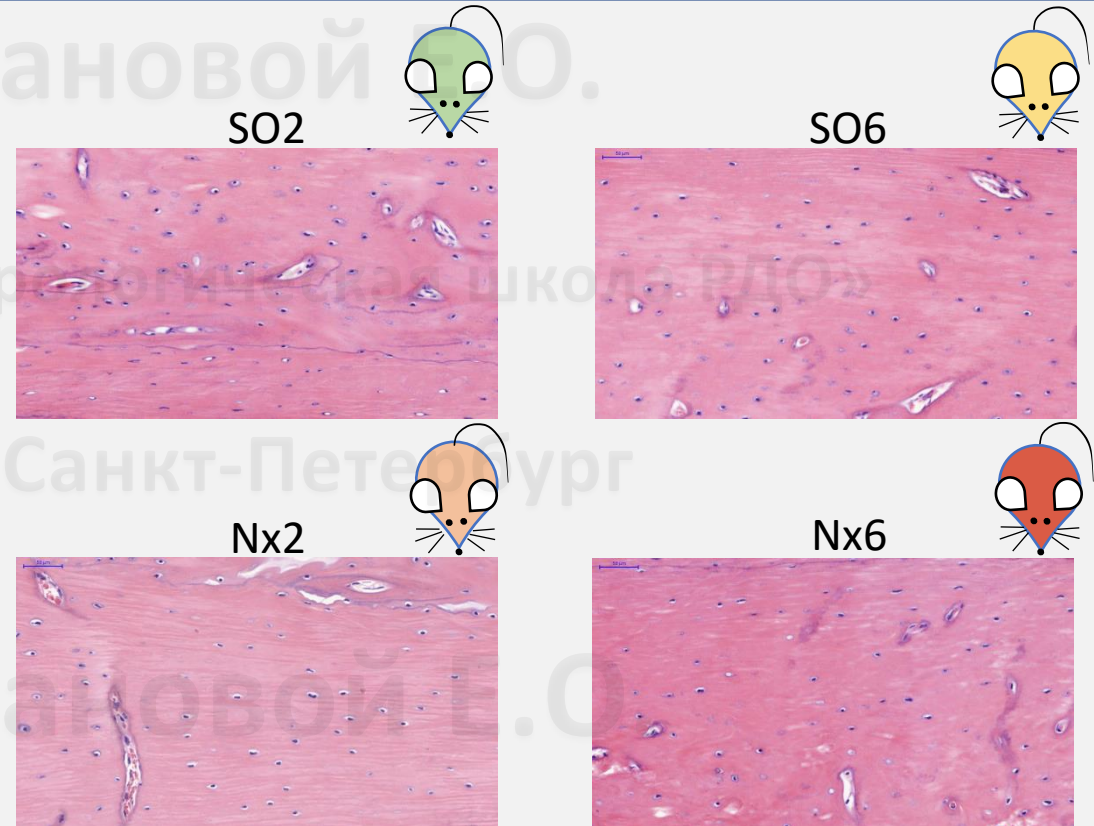
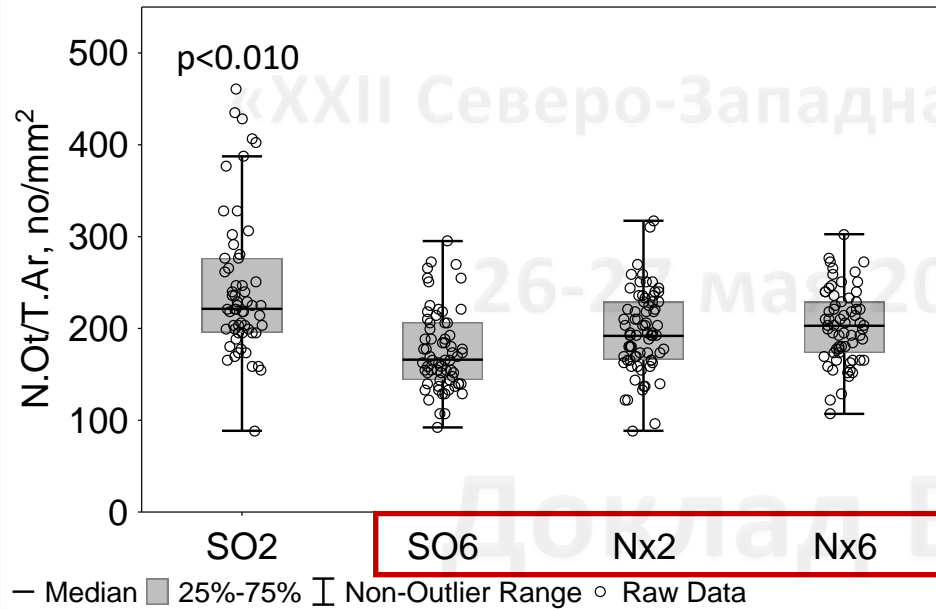
N.Ot – количество остеоцитов;

T.Ar – площадь костной ткани

Анализ изображений выполняли с использованием Cell profiler, Orbit Image Analysis
Version 3.64

Модели ХБП С1-2 характеризовались сниженным количеством остеоцитов

Osteocyte number (Dp)

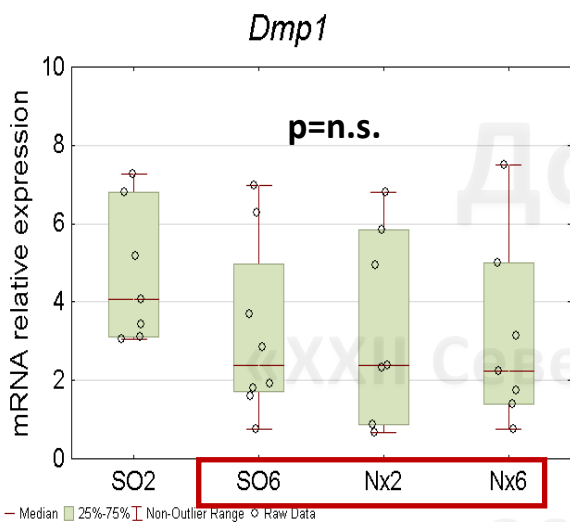
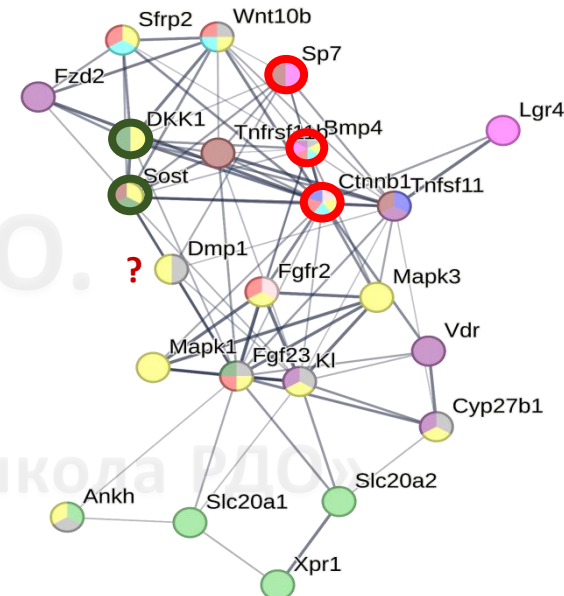
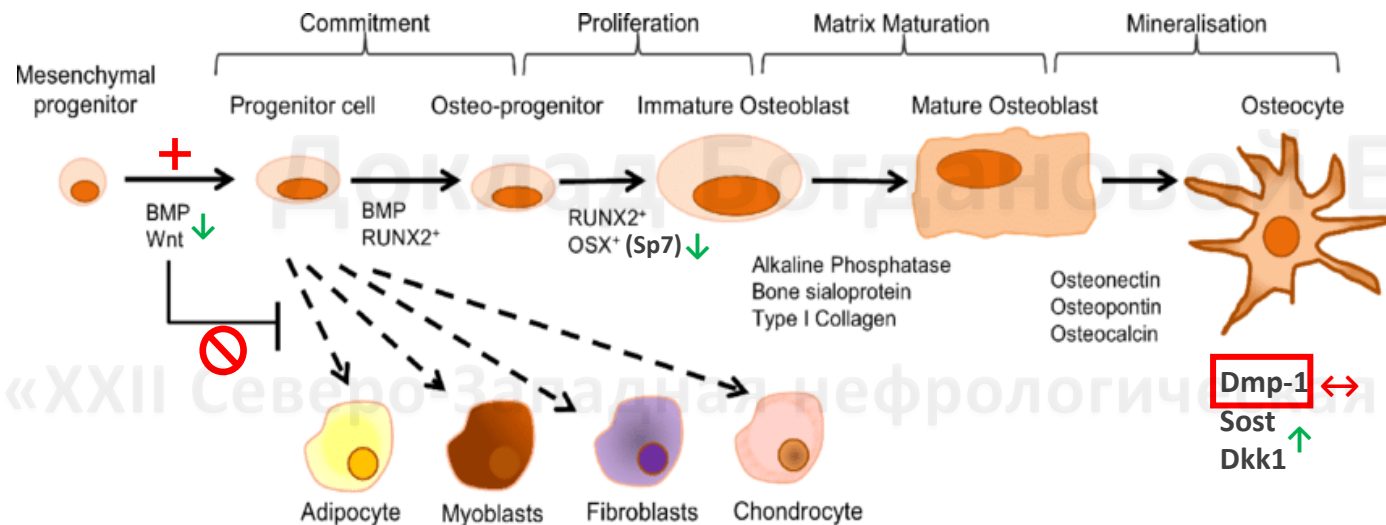


Репрезентативные микрофотографии для гистологического паттерна (H&E)

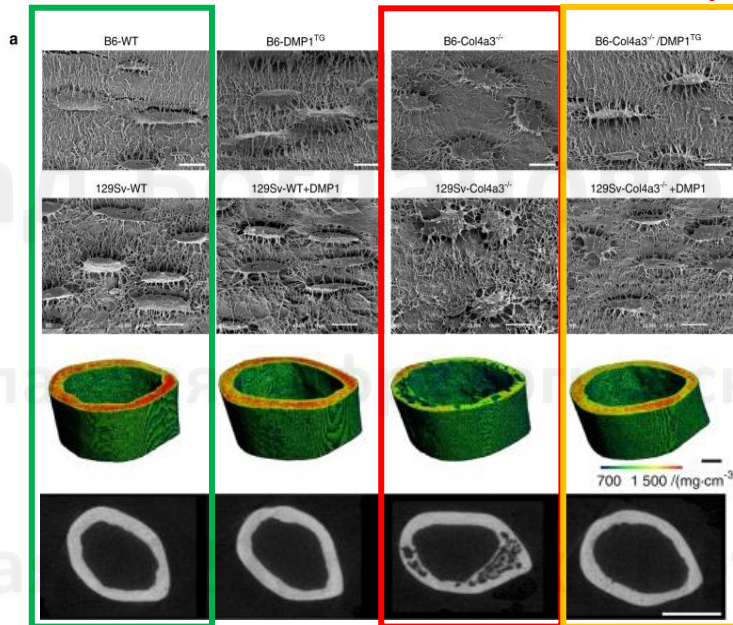
Количество остеоцитов в диафизе (N.Ot/T.Ar, no/mm²; N=291, n(SO2)=72, n(SO6)=74, n(Nx2)=73, n(Nx6)=72)

*p<0.010 vs SO6, Nx2, Nx6

Роль Dmp-1 в регуляции остеоцитов

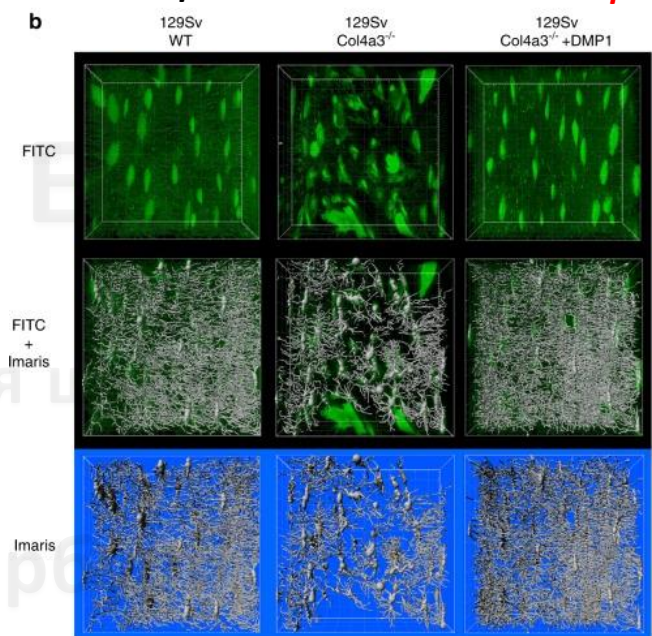


Контроль ХБП ХБП+Dmp1 Tg



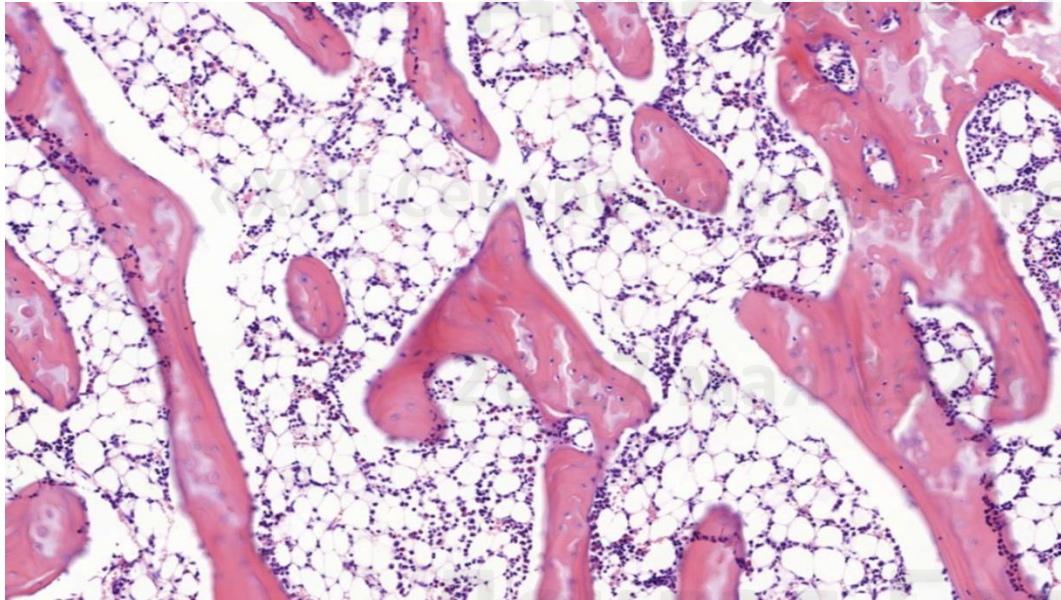
Dussold C. et al., Bone Res 2019

Контроль ХБП ХБП+Dmp1 Tg



Dussold C. et al., Bone Res 2019

Измерение площади трабекуляроной кости:



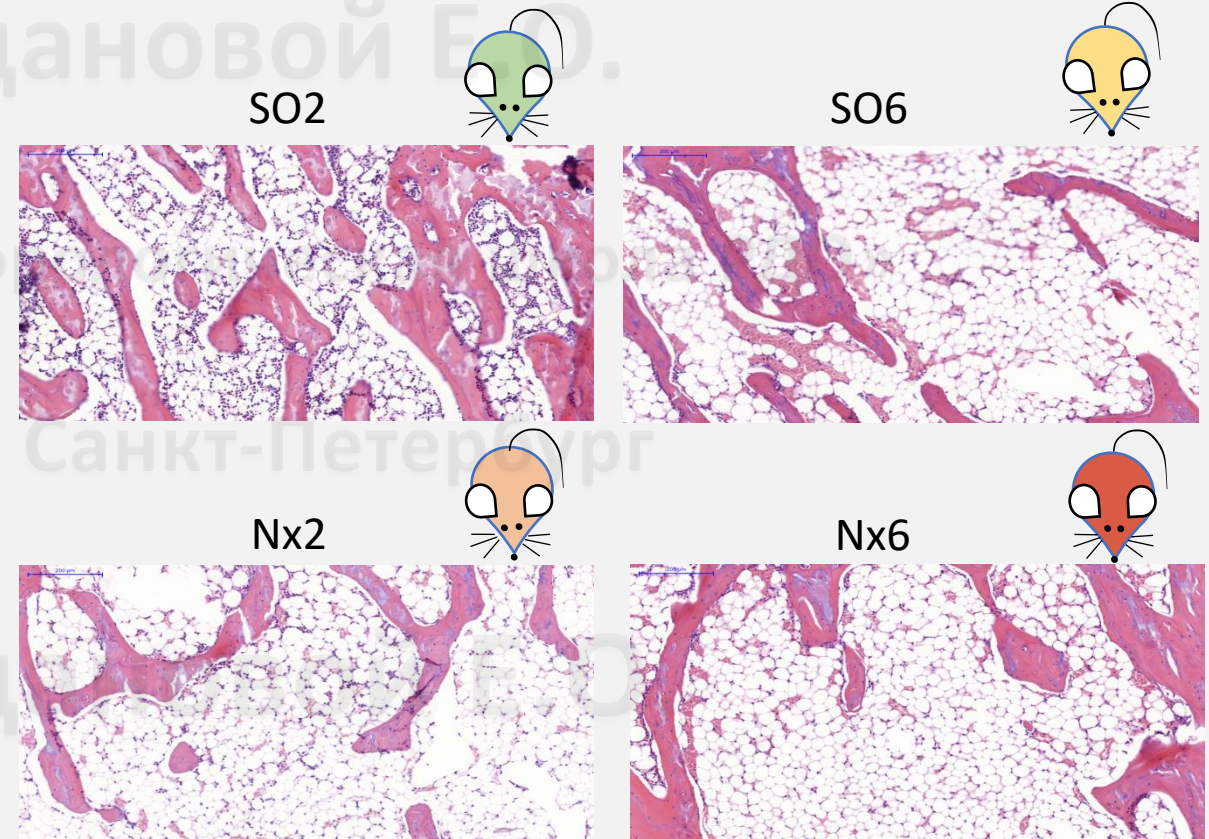
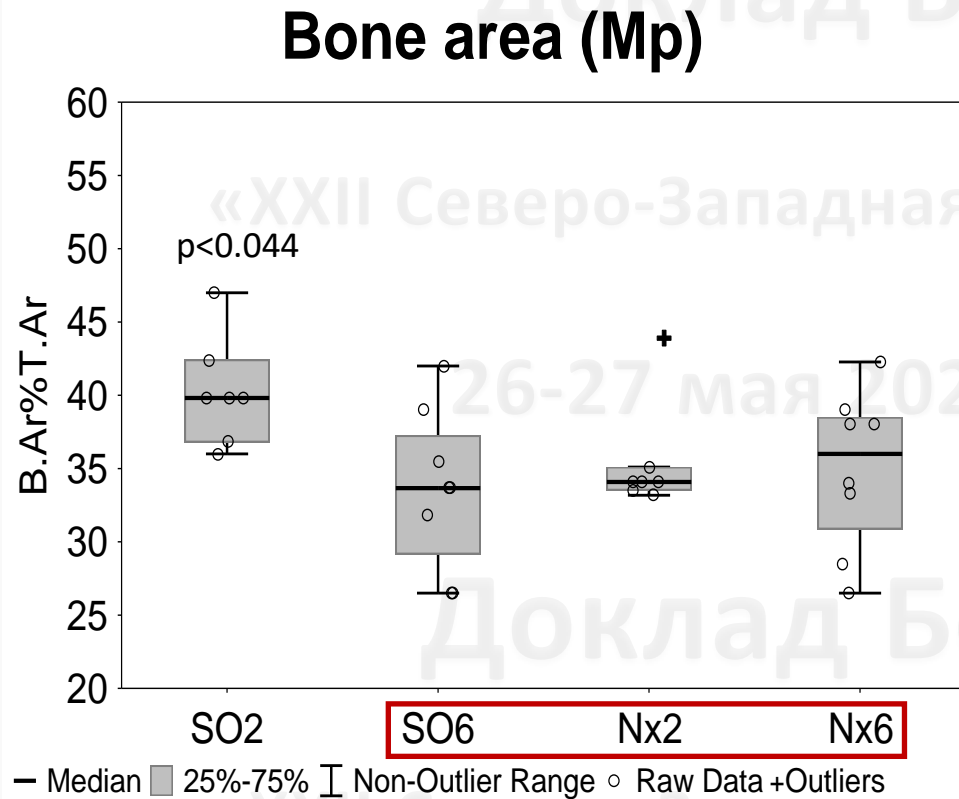
Количество остеоцитов = $V.Ar / T.Ar$ (%)

$V.Ar$ – площадь трабекуляроной кости

$T.Ar$ – площадь костной ткани

Наложение масок выполнено в программе анализа изображений
Orbit Image Analysis Version 3.64

Площадь трабекулярной кости снижена в моделях ХБП С1-2

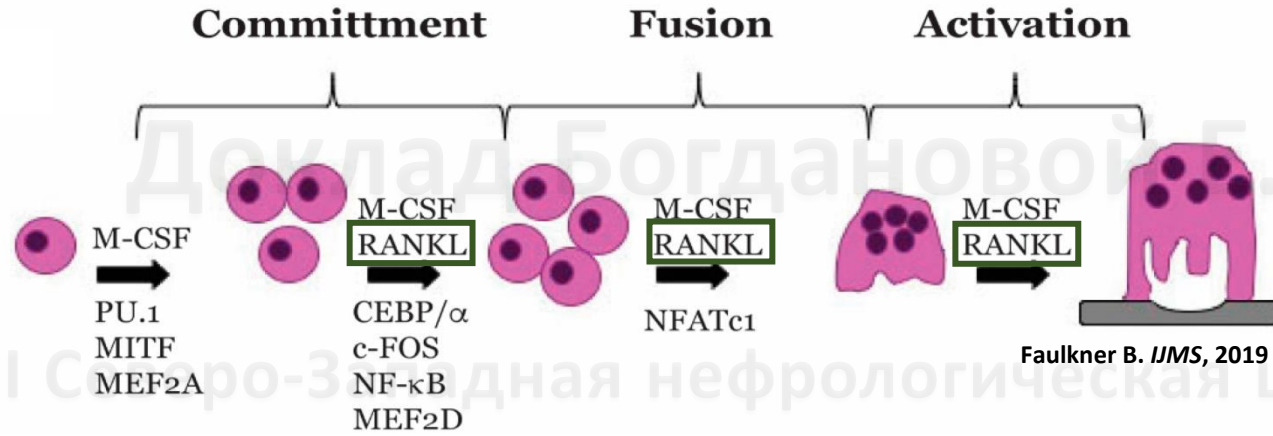


Репрезентативные микрофотографии для гистологического паттерна (H&E)

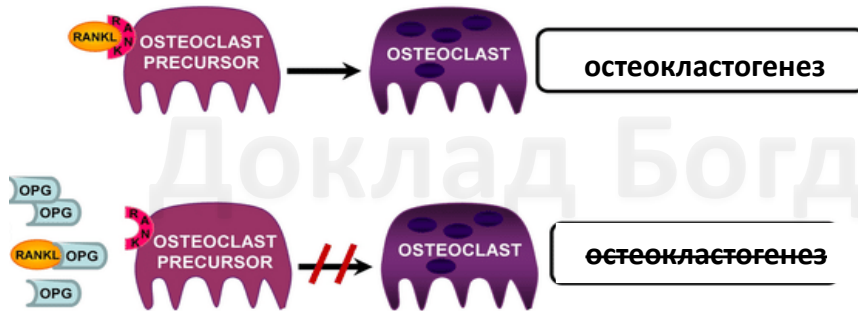
Площадь трабекулярной кости (B.Ar%T.Ar; N=96, n=8 для каждой группы)

26-27 мая 2023, г. Санкт-Петербург

Регуляция дифференцировки остеокластов



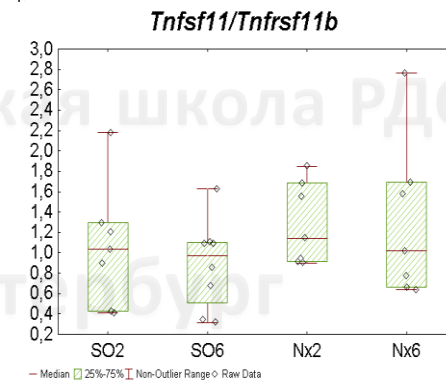
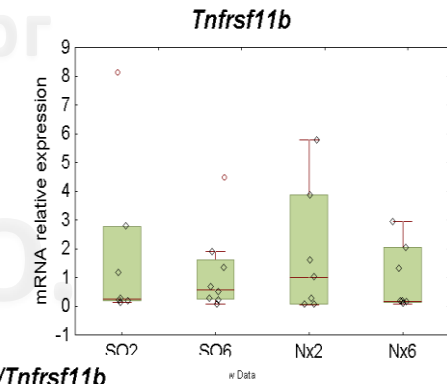
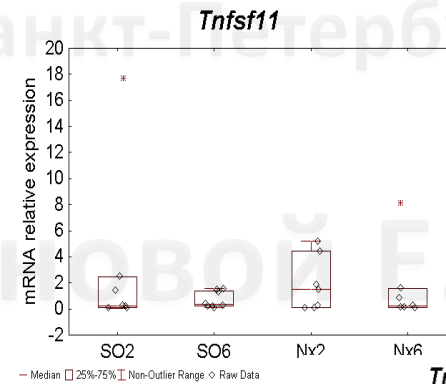
A) RANKL (*Tnfsf11*) ↔



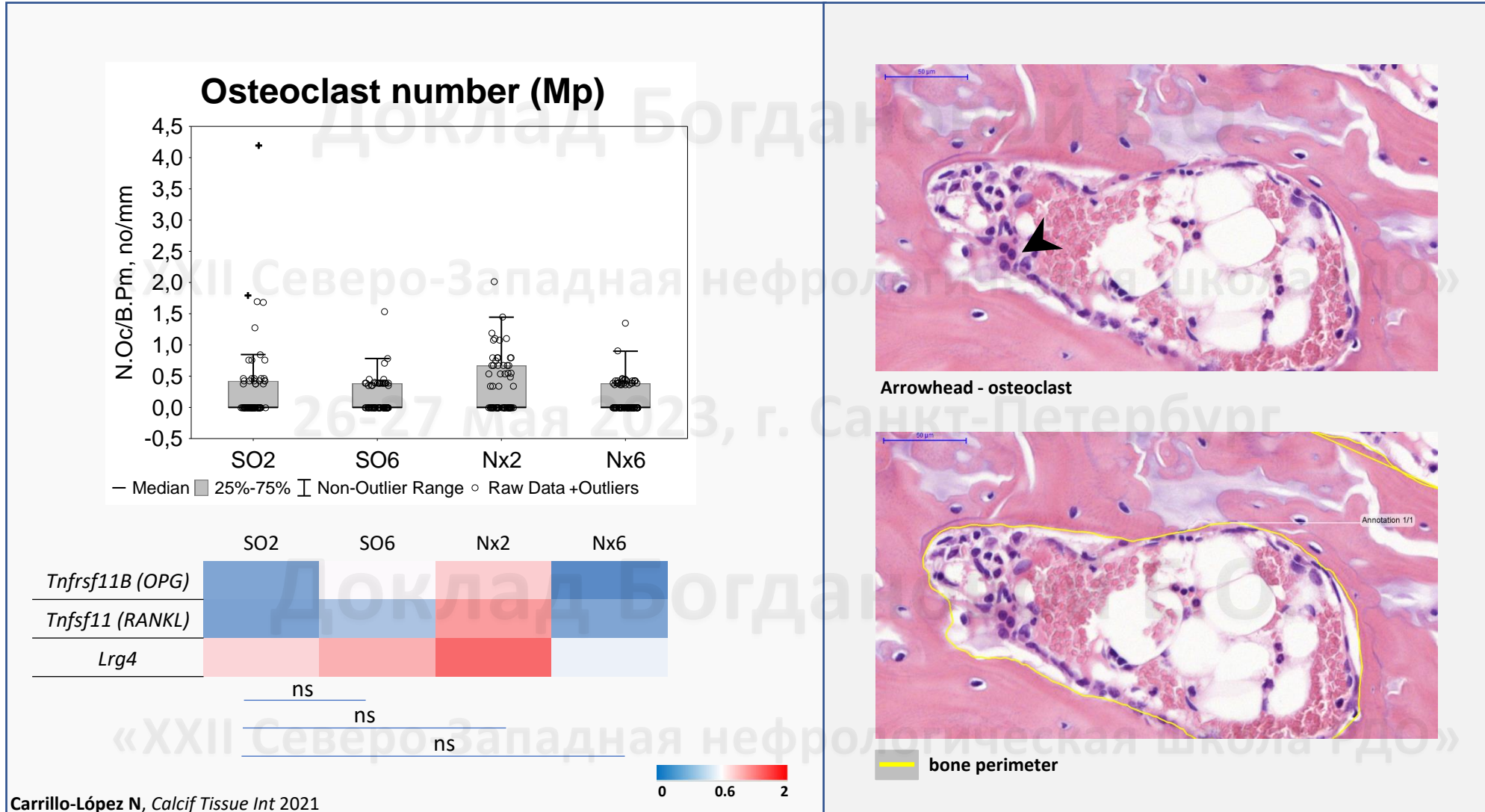
B) OPG (*Tnfrsf11b*) ↔



Carrillo N. Calcif Tiss Int 2021



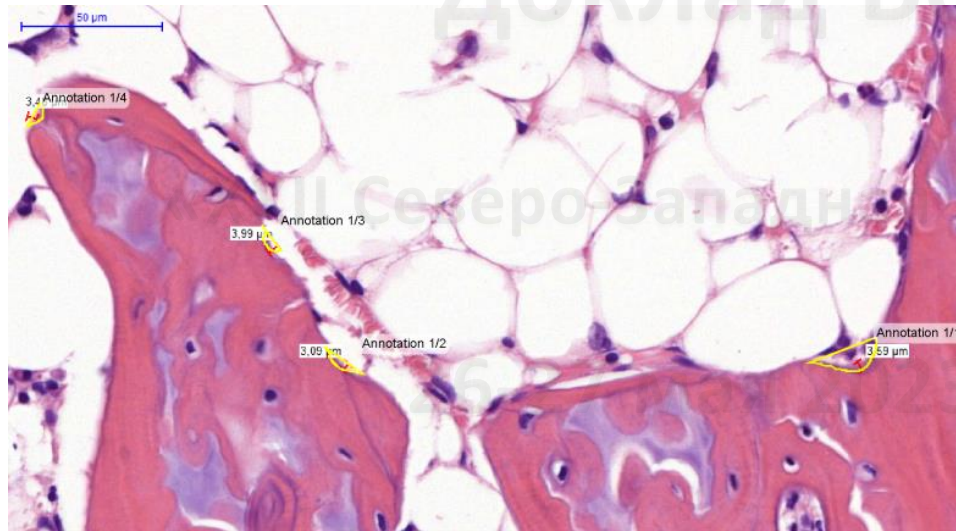
Количество остеокластов не различалось в моделях начальной ХБП и контроле



Carrillo-López N, *Calcif Tissue Int* 2021

Количество остеокластов (N.Oc/B.Pm, no/mm; N=299, n(SO2)=74, n(SO6)=76, n(Nx2)=72, n(Nx6)=77) и репрезентативные микрофотографии (H&E), анализа изображений выполнен с использованием Orbit Image Analysis Version 3.64

Измерение периметра резорбции:



— Периметр участков резорбции



— Периметр кости

$$\text{Периметр резорбции} = \text{E.Pm} / \text{B.Pm} (\%)$$

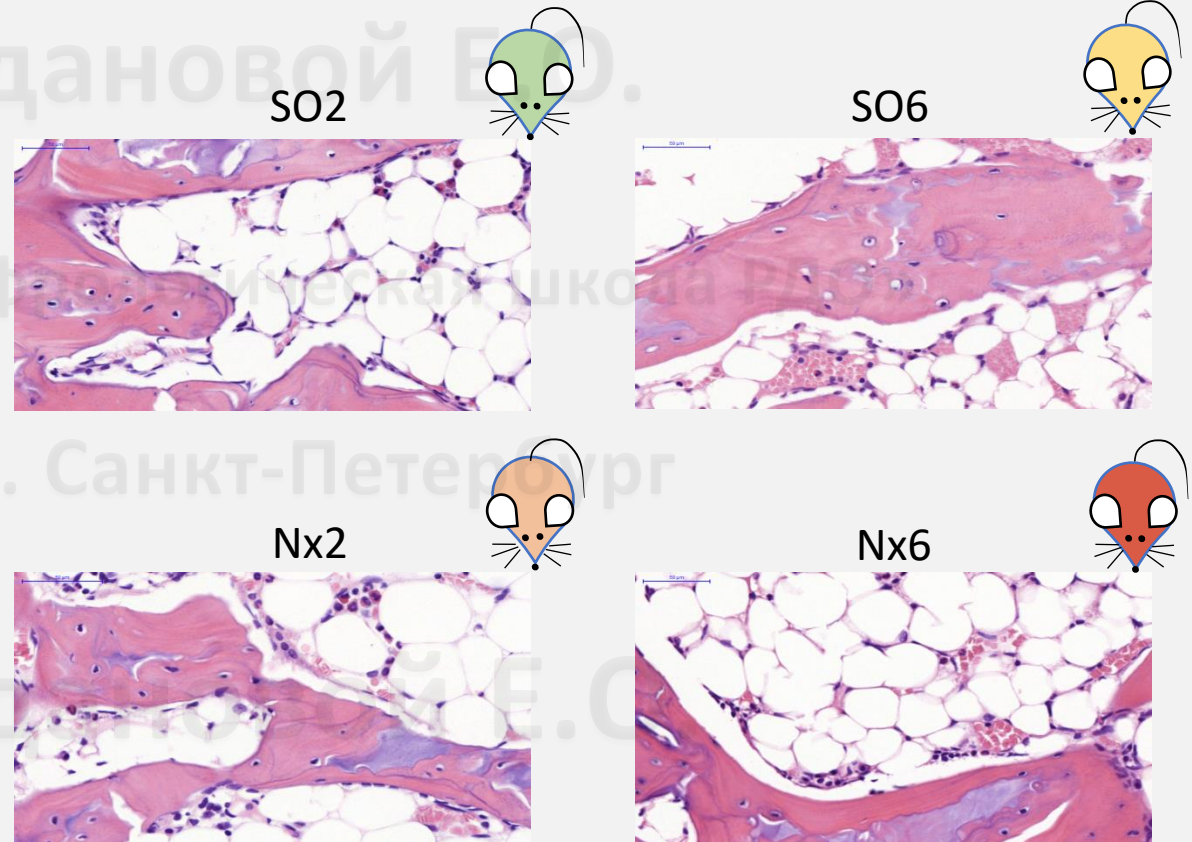
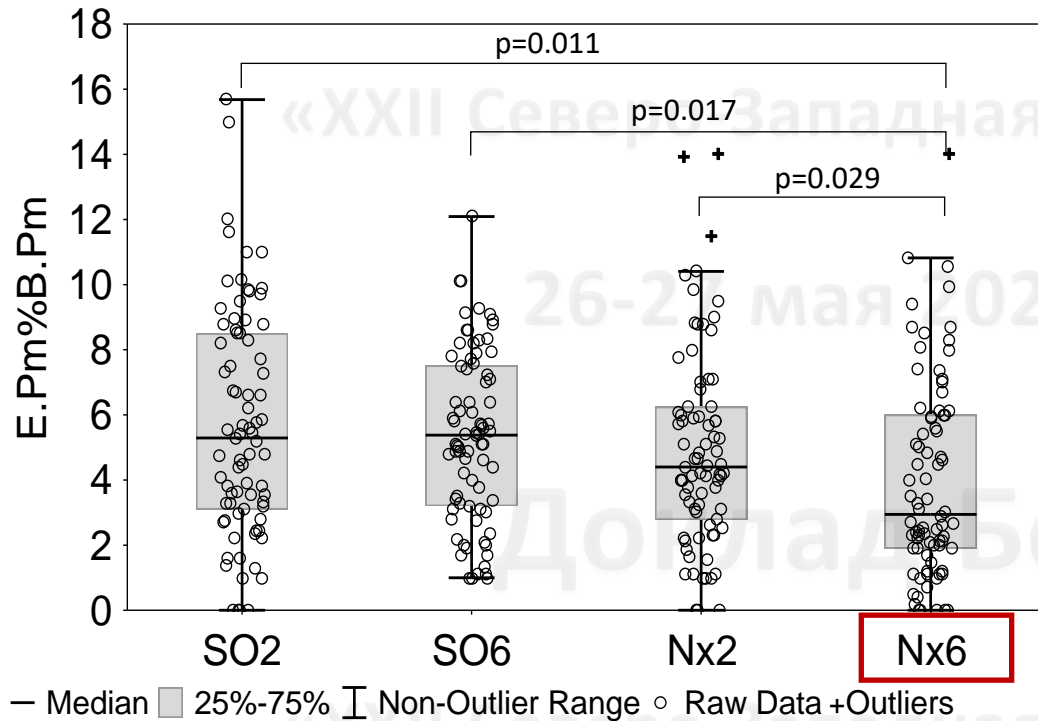
E.Pm – периметр резорбции

B.Pm – периметр поверхности костных балочек, периметр трабекулярной кости

Анализ изображений выполнен в Orbit Image Analysis Version 3.64

Периметр резорбции ниже в модели Nx6

Eroded perimeter (Mp)

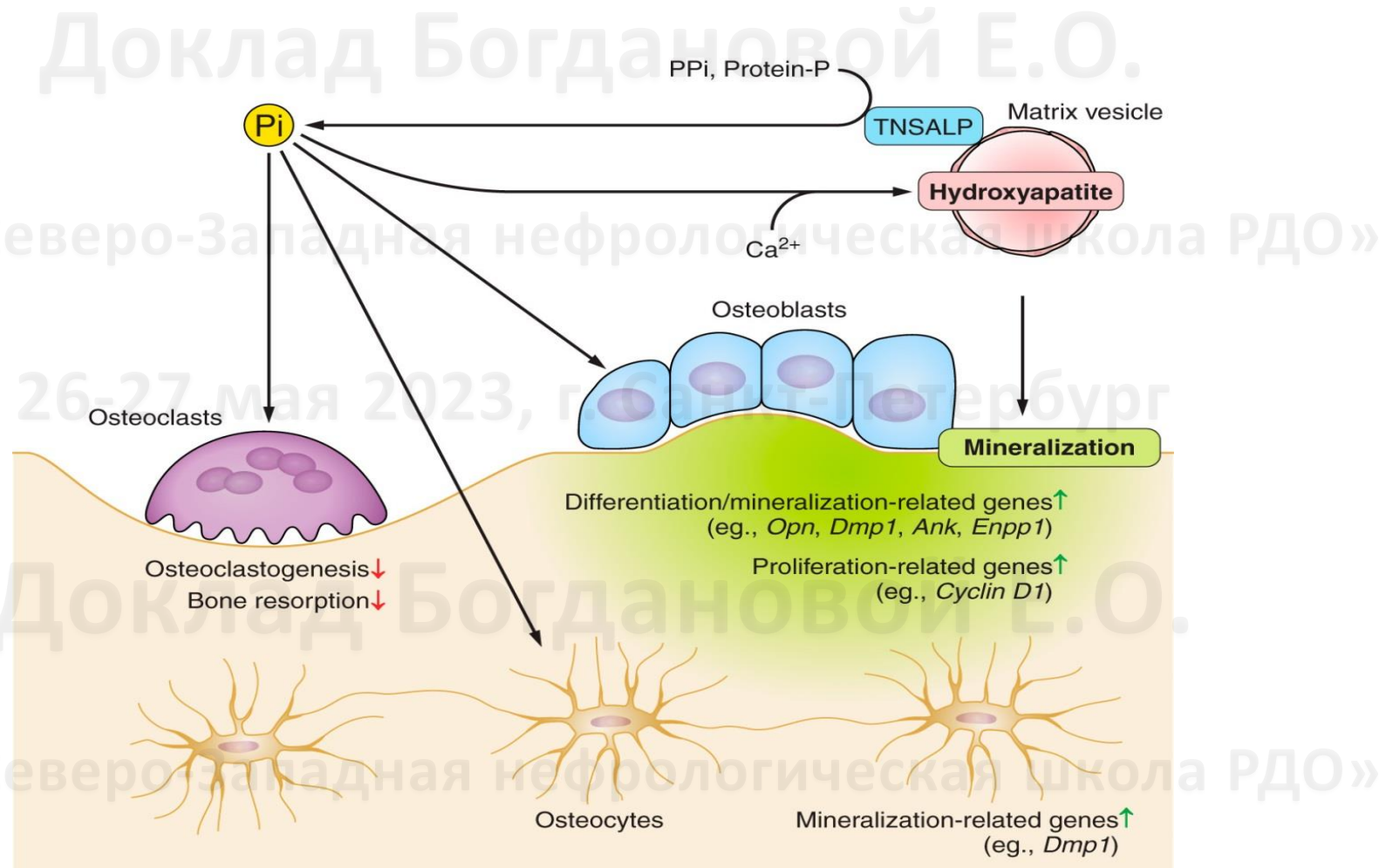


Репрезентативные микрофотографии для гистологического паттерна (H&E)

Периметр резорбции (E.P.m%B.P.m; N=400, n=80 для каждой группы);

26-27 мая 2023, г. Санкт-Петербург

Неорганический фосфат как сигнал?



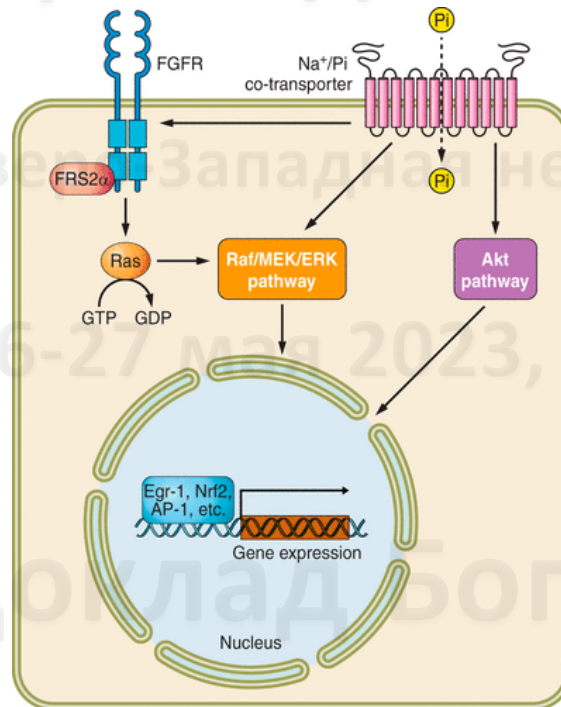
Michigami et al., 2018

Beck et al., 2020

26-27 Мая 2023, г. Санкт-Петербург

Предполагаемый механизм сигнальной трансдукции

Доклад Богдановой Е.О.



Bon N. et al. 2018:

- 1) PiT1/PiT2 связаны с ERK1/2
- 2) оба PiT1 и PiT2 необходимы для передачи сигнала Pi
- 3) связывание Pi с PiT (а не транспорт Pi), может быть ключевым событием в передаче сигналов Pi

Michigami et al., 2018

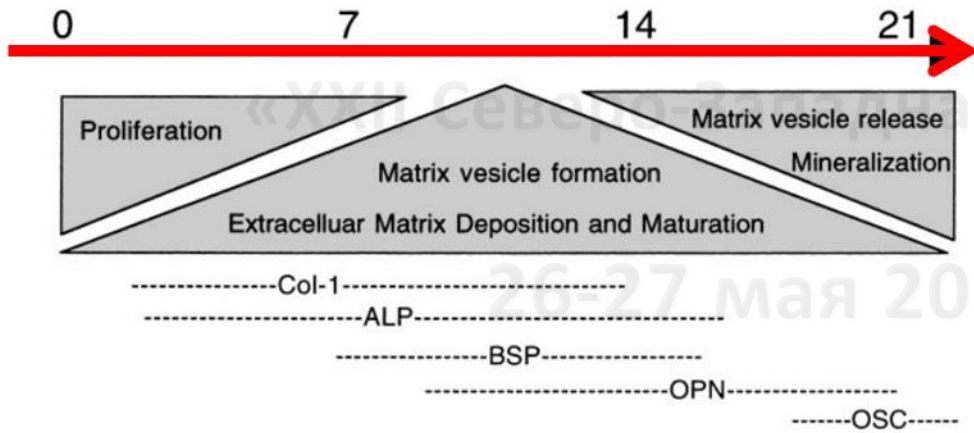
Beck et al., 2020

«XXII Северная Западная нефрологическая школа РДО»

26-27 мая 2023, г. Санкт-Петербург

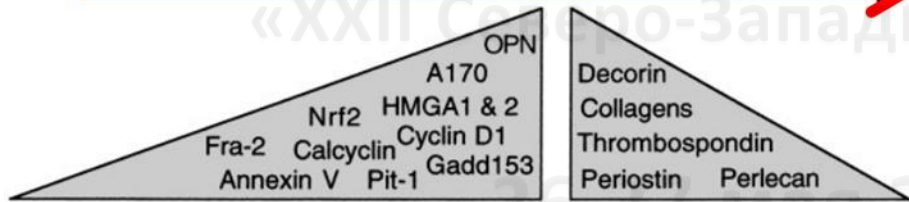
Влияние внеклеточного фосфата на дифференцировку остеобластов и профили экспрессии генов

Схематическая диаграмма трех основных стадий дифференцировки остеобластов и генов, регулируемых фосфатом согласно George R. Beck, Jr. (2003)



Пролиферация -> формирование матрикса-> минерализация

Повышение концентрации неорганического фосфата



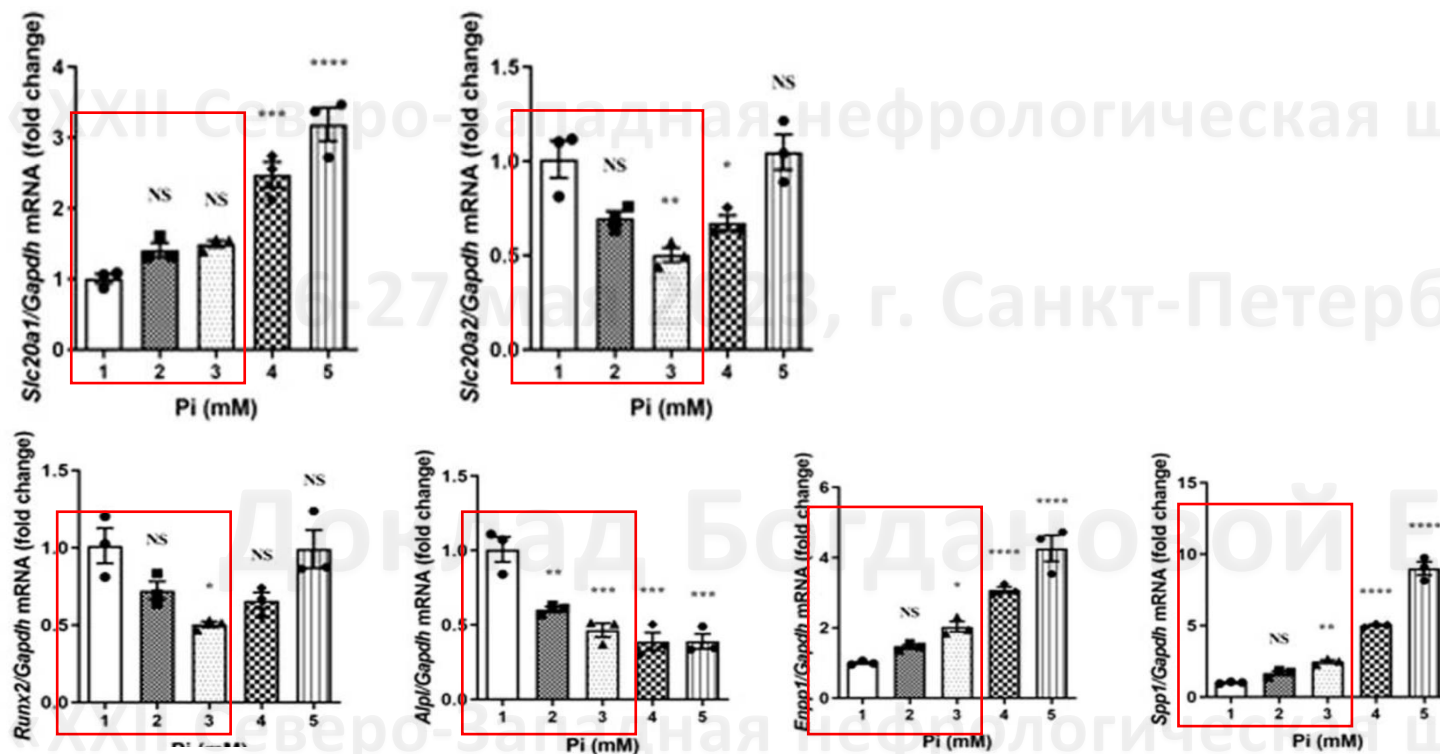
Ранние → поздние гены

Early	L-link	AVG	Delayed	L-link	AVG	Intermed.	L-link	AVG	Late	L-link	AVG
Egr3	13655	13.0	Ereg	13874	14.4	Egr3	13655	12.4	Spp1	20750	11.1
Egr1	13653	12.2	Serpine1	18787	14.0	Egr1	13653	8.9	Itga6	16403	9.1
Nr4a1	15370	10.8	Irlr1	17082	9.0	Hmga2	15364	8.3	Hmga2	15364	8.8
Btg2	12227	7.8	Ctgf	14219	7.8	Prkg2	19092	6.5	Sgk	20393	7.6
Egr2	13654	6.8	Ier3	15937	7.1	Dusp6	67603	6.3	Slc20a1	20515	6.5
Nxph1	18231	6.7	Sgk	20393	6.7	Sgk	20393	5.7	Dmp1	13406	6.3
Fos	14281	6.6	F3	14066	6.6	Spp1	20750	5.7	Grcm1	23892	5.7
Ier3	15937	6.1	Timp1	21857	6.6	Itga6	16403	5.5	Hmga1	15361	5.5
Serpine1	18787	6.0	Dusp6	67603	6.1	Klf10	21847	5.3	Prkg2	19092	5.3
Cyr61	16007	5.1	Ier5	15939	5.7	Timp1	21857	5.2	Fut8	53618	5.0
Slamf6	30925	4.5	Odc1	18263	4.9	Ereg	13874	5.0	Timp1	21857	4.7
Rtn	246102	4.3	Egr2	13654	4.3	Foxc2	14234	4.9	Rasa1	218397	4.7
Sgk	20393	4.3	Ptgs2	19225	4.3	Hmga1	15361	4.4	Dusp6	67603	4.6
Ifngr1	15979	3.9	Hbegf	15200	4.0	Ier3	15937	4.3	Ank	11732	4.5
Ptgs2	19225	3.4	Tnfrsf12a	27279	4.0	Foxm2	14235	3.7	Anxa1	16952	4.3
Fgfr1op2	67529	3.3	Nxph1	18231	3.9	Csfl	12977	3.4	Bdnf	12064	4.2
Akp5	11650	3.3	Itga6	16403	3.9	Pena	18538	3.3	Irlr1	17082	4.0
Ctgf	14219	3.3	Prkg2	19092	3.9	Bra1	12189	3.2	Ereg	13874	3.6
Slc24a2	76376	3.0	Btg2	12227	3.8	Rasa1	218397	3.2	Lbh	77889	3.4
Zfp36	22695	3.0	Vegfa	ND	3.6	Cdc20	107995	3.2	Egr3	13655	3.3
Folr2	14276	2.9	Fosl2	14284	3.4	Cdc6	23834	3.0	Egr1	13653	3.3
Dusp6	67603	2.9	Cyr61	16007	3.0	Odc1	18263	3.0	Mmp13	17386	2.9
Gnas	14683	2.8	Slc20a1	20515	2.9	E2f1	13555	3.0	Csfl	12977	2.9
Phlda1	Phlda1	2.8	Dusp1	19252	2.8	Cenb2	12442	2.8	Hgf	15234	2.8
Dgkz	104418	2.7	Srf	20807	2.8	Ier5	15939	2.8	Odc1	18263	2.7
Fosl2	14284	2.7	Csfl	12977	2.6	Cenb1	52415	2.7	Egr2	13654	2.7
Csf3	12985	2.6	Ets2	23872	2.6	Runx1	12394	2.6	Tnfrsf12a	27279	2.7
Sost	74499	2.5	Cav1	12389	2.5	Hes3	15207	2.6	Ier3	15937	2.7
Irlr1	17082	2.4	Slamf6	30925	2.5	Tnfrsf12a	27279	2.5	Vegfa	ND	2.5
Thbs1	21825	2.4	Anxa1	16952	2.4	Vegfa	ND	2.4	Pena	18538	2.4
Igf1	16000	2.4	Sost	74499	2.4	Ecml	13601	2.4	Ecml	13601	2.2
Srf	20807	2.3	Akp5	11650	2.3	Folr2	14276	2.4	Prkca	18750	2.1
Fgt22	67112	2.1	E2f1	13555	2.3	Sost	74499	2.1	Lrp1	16971	2.1
Fgf4	14175	2.0	Nfe2l2	18024	2.2	Itgb5	16419	2.1	Akap9	13121	2.0
Decrease											
Hoxc12	15421	0.2	Myo6	17920	0.3	Slco1a4	28250	0.2	Mest	17294	0.2
Traf6	22034	0.3	Rbbp4	19646	0.3	Ikbkg	16151	0.2	Npnt	114249	0.2
Slc4a4	54403	0.3	Csfr1	12978	0.4	Rbbp4	19646	0.2	Aspn	66336	0.3
Aqp7	11832	0.3	F2rl3	14065	0.4	Myo6	17920	0.3	Ogn	18295	0.3
Ptgifm	19221	0.3	Tnfrsf18	240873	0.4	Traf6	22034	0.3	Ncald	52589	0.3
Rbbp4	19646	0.3	Syt1	20979	0.4	Vlrc24	171197	0.3	Dcn	13179	0.3
Uts2	24111	0.3	Csnk1e	27373	0.4	Aspn	66336	0.3	Camk1g	215303	0.3
Cart1	216285	0.3	Vlrc24	171197	0.4	Fabp5	16592	0.3	Enpep	13809	0.3
Pth	19226	0.3	Apoc3	11814	0.4	Ogn	18295	0.4	Fmod	14264	0.4
Tcf2	21410	0.4	Ptgifm	19221	0.5	Ibsp	15891	0.4	Fgfr2	14183	0.4
Fabp5	16592	0.4	Ilf7	16197	0.5	Npnt	114249	0.4	Thbs1	21825	0.4
Csfr1	12978	0.4	Irlr1	16362	0.5	Pth	19226	0.4	Caeb2	12296	0.4
Creb1	12912	0.4	Clgn	12745	0.5	Aqp7	11832	0.4	Postn	50706	0.4
Bcl2	12043	0.4	Tns4	217169	0.5	Tcf2	21410	0.4	Bmp4	12159	0.4
Ibsp	15891	0.5	Ace	11421	0.5	Csfr1	12978	0.5	Col2a1	12824	0.5
Ilf7	16197	0.5	Pth	19226	0.5	Myf6	17878	0.5	Col1a1	12842	0.5

L-Link: Locus Link, AVG: average ratio across time points, ND=No data

Влияние внеклеточного фосфата на дифференцировку остеобластов и профили экспрессии генов

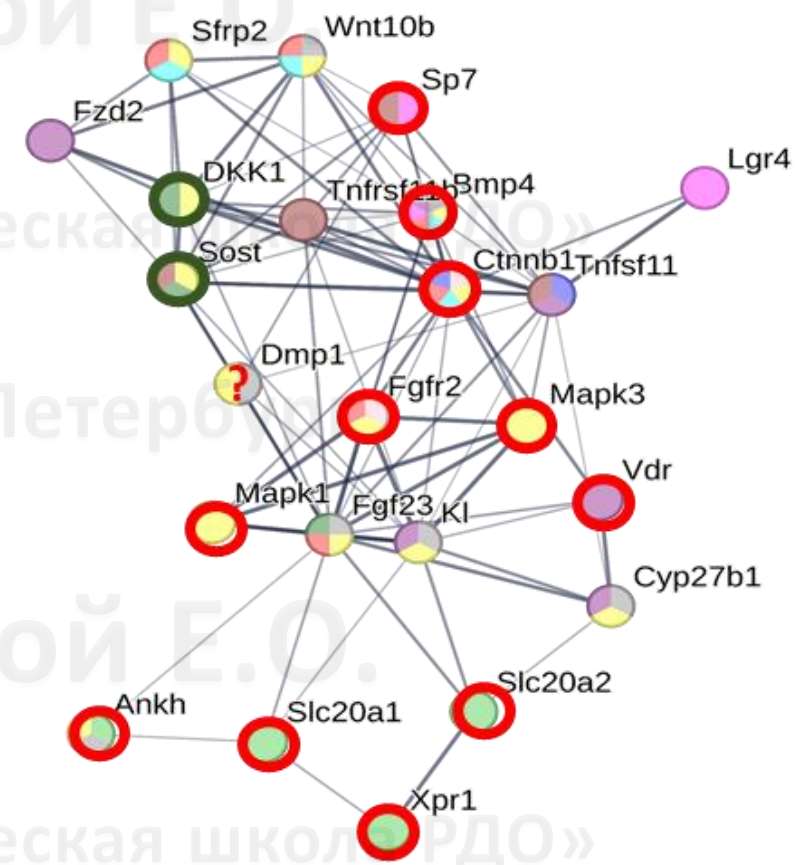
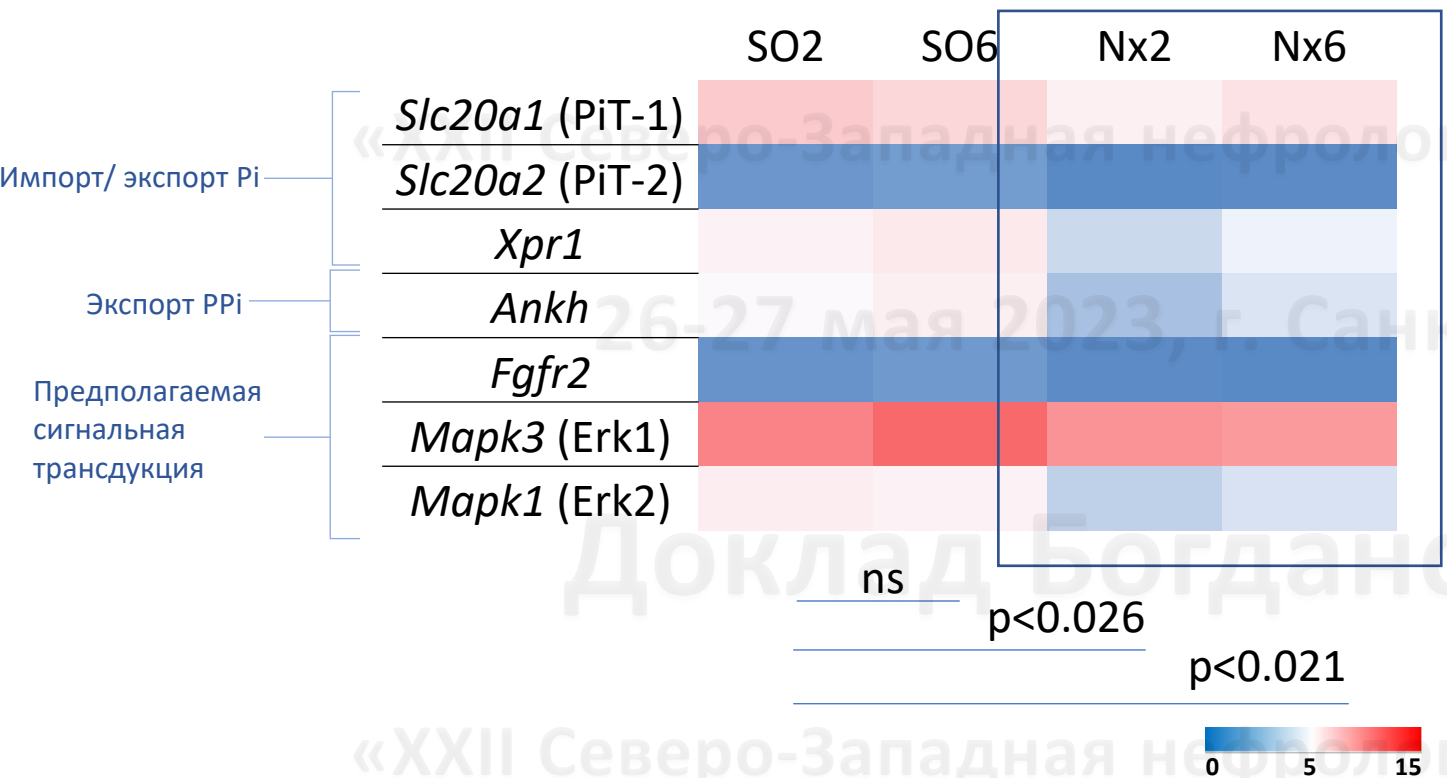
Alpl, *Enpp1*, *Spp1*, *Slc20a1*, *Slc20a2*, *Bglap*, и *Runx2* в остеобластах в ответ на воздействие Pi (1–5 mM)



Hsu et al. *J Endocrinol*, 2022

Ранняя ХБП характеризуется подавлением генов, связанных с транспортом и сигналингом Pi в кости

Доклад Богдановой Е.О.



26-27 мая 2023, г. Санкт-Петербург




Доклад Богдановой Е.О.

«XXII Северо-Западная нефрологическая школа РДО»

Slc20a1, solute carrier family 20 member 1, *Slc20a2*, solute carrier family 20 member 2, *Xpr1*, xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1, *Ankh*, ANKH pyrophosphate transport regulator, *Fgfr2*, fibroblast growth factor receptor 2, *Mapk3*, mitogen activated protein kinase 3, *Mapk1*, mitogen activated protein kinase 1

Гистологические и молекулярные изменения костной ткани пропорциональны степени хронического повреждения почек при ранней ХБП

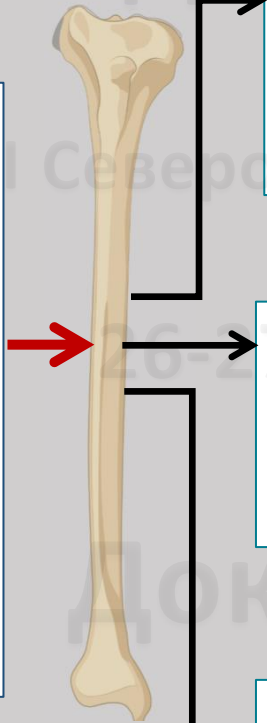


Гистоморфометрия кости	S06 	Nx2 	Nx6 
Трабекулярная кость	↓	↓	↓
Остеоциты	↓	↓	↓
Активные остеобласты	↔	↓	↓
Периметр резорбции	↔	↔	↓
Остеокласты	↔	↔	↔
Профиль экспрессии генов <i>Sp7, Ctnnb1, Bmp4, Vdr, Slc20a1, Slc20a2, Xpr1, Ankh, Fgfr2, Mapk1/3</i>	↔	↓	↓

Заключение:

ХБП С1-2

Альбуминурия ↑ х6-12
Klotho в сыворотке ↓
Интерстициальный фиброз почек ↑ <30%
Клиренс креатинина ↓ <30%
Фосфат в сыворотке ↔ ↑
FGF23 ↔
PTH ↔
Dickkopf-1 в сыв ↔ ↑
Sclerostin в сыв ↔ ↑



Костный обмен ↓
• Остеоциты ↓
• Активные остеобласты ↓
• Трабекулярная кость ↓
• Периметр резорбции ↓

Экспрессия генов ↓
• Остеобластогенез
• Транспорт фосфата
• Сигнальная трансдукция

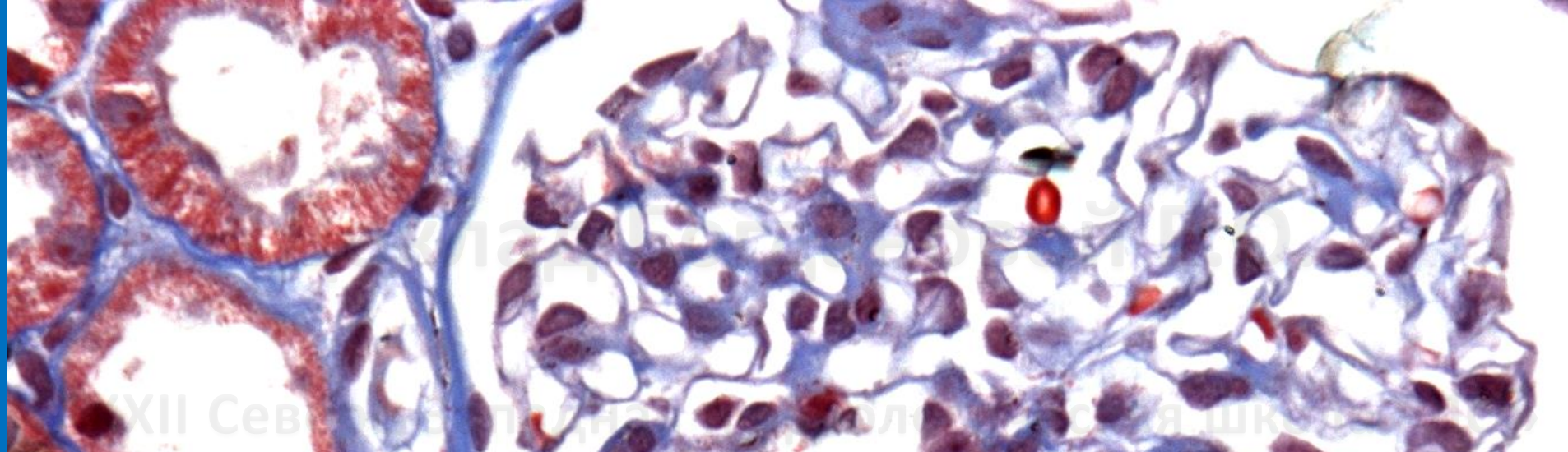
Dkk1+ и Sost+ остеоциты ↔ ↑
Бета-катенин (Cttnb1) ↓

1 – При моделировании ранней ХБП, ответ скелета проявляется гистологическими признаками, предполагающими более низкий костный обмен (депопуляция остеоцитов и остеобластов, снижение площади трабекулярной кости)

2 – Изменения гистологии сопровождаются подавлением экспрессии ряда генов, что может быть молекулярной основой сниженного остеосинтеза

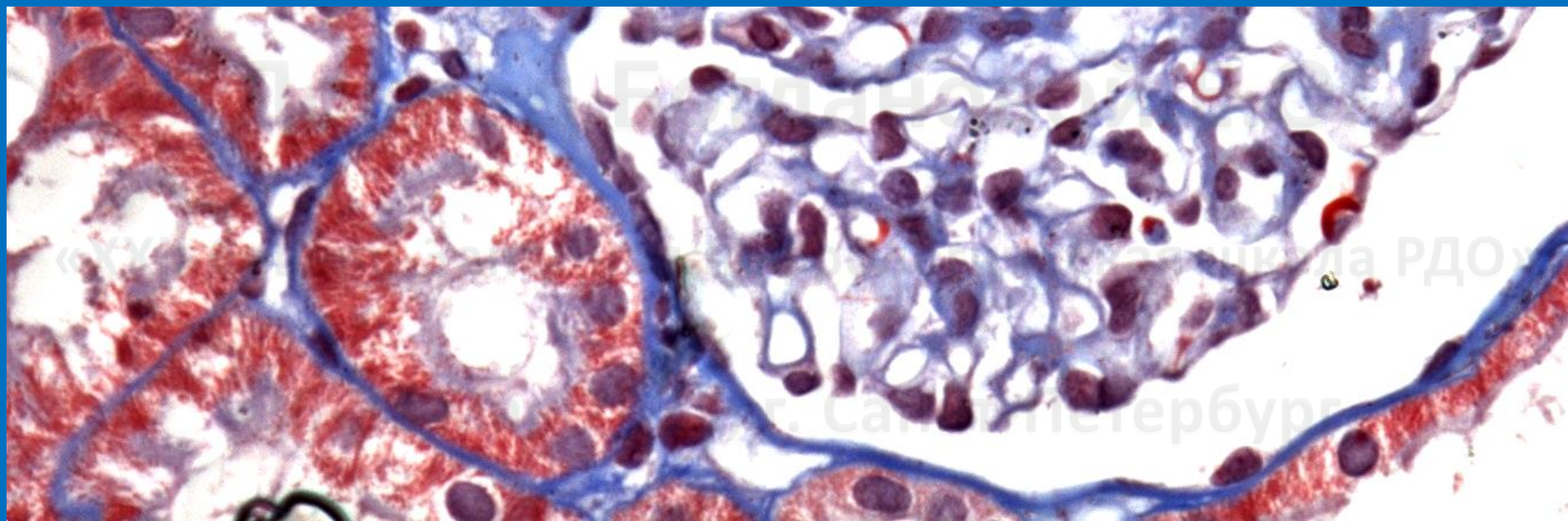
3 – Снижение экспрессии β-катенина в кости (Cttnb1), ассоциировано с повышением доли Dkk1- и Sost-позитивных остеоцитов и концентрации Dickkopf-1 и склеростина в сыворотке крови

4 – Клеточный и молекулярный ответ кости пропорционален моделируемой стадии ХБП и возникает до формирования гиперфосфатемии и повышения концентрации традиционных фосфат-регулирующих факторов (PTH, FGF23)



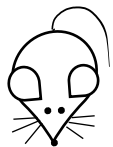
Спасибо за внимание

Работа выполнена при поддержке
РОССИЙСКОГО ФОНДА ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ, КНВШ Санкт-Петербурга
и неравнодушных коллег – Садыков А.М., Зубина И.М., Семенова Н.Ю., Береснева О.Н., Иванова Г.Т., Добронравов В.А.



Группы исследования

Normotensive control (WKY2) for kidney function in sham SHR with 2-month follow-up (SO2)



Control (SO2)



Mild CKD-MBD models



SO6



Nx2



Nx6

Albuminuria ↑
 Serum Klotho ↓
 Renal fibrosis ↔ ↑
 Creatinin clearance ↔ ↓
 Serum phosphate ↔ ↑
 Dickkopf-1, Sclerostin ↔ ↑
 PTH, FGF23 ↔

Bone histology:

Bone area (B.Ar/T.Ar) ↓
 Osteocytes (N.Ot/T.Ar) ↓
 Osteoblasts (N.Ob/B.Pm) ↔ ↓
 Eroded perimeter (E.Pm/B.Pm) ↔ ↓



Экспрессия генов

BONE FORMATION:

	SO2	SO6	Nx2	Nx6
<i>Sp7 (osterix)</i>		↔	↓	↓
<i>Bmp4</i>		↔	↓	↓
<i>Ctnnb1 (β-catenin)</i>		↔	↓	↓

□ BMP signaling
 □ Canonical WNT signaling

PHOSPHATE SENSING AND SIGNALING:

	SO2	SO6	Nx2	Nx6
<i>Slc20a1 (PiT-1)</i>		↔	↓	↓
<i>Slc20a2 (PiT-2)</i>		↔	↓	↓
<i>Xpr1</i>		↔	↓	↓
<i>Ankh</i>		↔	↓	↓
<i>Mapk3 (Erk1)</i>		↔	↓	↓
<i>Mapk1 (Erk2)</i>		↔	↓	↓

□ Pi/PPi transport

□ MAPK signaling

OSTEOCYTE REGULATION:

	SO2	SO6	Nx2	Nx6
<i>Dmp1</i>		↔	↔	↔

OSTEOCLAST REGULATION:

	SO2	SO6	Nx2	Nx6
<i>Tnfrsf11B (OPG)</i>		↔	↔	↔
<i>Tnfsf11 (RANKL)</i>		↔	↔	↔
<i>Lrg4</i>		↔	↔	↔

□ OPG/RANKL signaling

Footnote: ↑ or ↓ - statistically significant increase or decline, ↔ - not significant