

# Tackling the complexity of CKD-associated cardiovascular disease

Citation for published version (APA):

Saar-Kovrov, V. (2024). *Tackling the complexity of CKD-associated cardiovascular disease: from small molecules to proteins*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20240516vs>

## Document status and date:

Published: 01/01/2024

## DOI:

[10.26481/dis.20240516vs](https://doi.org/10.26481/dis.20240516vs)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# Chapter 7

Summary

Samenvatting

Краткое Содержание

Kokkuvõte





## Summary

Cardiovascular disease (CVD) is the main cause of death worldwide. The major underlying reason for CVD development is atherosclerosis, which is accumulation of lipids and inflammatory factors within the artery wall. It can lead to near occlusion of the vessel or to thrombosis, after rupture of the diseased artery wall, resulting in stroke or a heart attack. There are several risk factors for atherosclerosis, such as high blood pressure, smoking, obesity, sedentary lifestyle, as well as kidney function decline. Kidneys fulfill numerous activities in the organism, but most notably they help sustain a healthy mineral balance and excrete toxic waste products. Therefore, it is not surprising that worsening of kidney function negatively affects that of the heart and vessels. In fact, kidney disease patients often die because of cardiovascular problems and chronic kidney disease (CKD) is an independent risk factor for CVD<sup>1</sup>. The interplay between CKD and subsequent cardiovascular complications is called the “cardiorenal syndrome”. However, the molecular processes behind this complex syndrome are not entirely understood.

This thesis is dedicated to understanding of several processes involved in cardiorenal syndrome. In **Chapter 2**, we look at small molecules and toxic waste products (the so-called protein bound uremic toxins, or PBUTs), that accumulate in the organism during kidney function decline, with the goal to identify the best approach for their reduction. In a healthy organism PBUTs are removed by the kidneys. However, with the start of CKD, the levels of these molecules begin to rise imposing severe toxicity on the cells, causing cardiovascular complications, and increasing the risk of CVD. A large part of PBUTs is strongly attached to plasma proteins making them difficult to remove with conventional dialysis that is based on filtering out small, water-soluble compounds. We conducted a systematic review of literature published between 1980 and 2020 to identify the best possible approach for reduction of PBUTs’ blood levels in patients on dialysis. Our analysis revealed that there is currently no “one-size-fits-all” technique for effective reduction of all 33 known compounds. Nevertheless, certain methods, such as use of oral supplement AST-120 (Kremezin®), or implementation of fractionated plasma separation and adsorption dialysis, showed the highest degree of reduction in long-term and single treatment trials, respectively, for such well-studied PBUTs as indoxyl sulphate and *p*-cresyl sulphate. Further research is needed to pinpoint techniques for most effective removal of PBUTs from blood in an individual CKD patient.

Next, in **Chapter 3**, we studied a common protein modification found in CKD patients, carbamylation, and its role in atherosclerosis. We used conventional and fluorescent staining to map the extent and localization of carbamylation in atherosclerotic plaque of different stages and compare staining of plaques from patients with kidney failure to those with healthy kidneys. We discovered that plaque carbamylation significantly increases with atherosclerosis progression in patients with CKD. We also identified the uptake of carbamylated low density lipoprotein (carbLDL) by plaque macrophages as a major

contributor to this increase. Our cell experiments showed, however, that the uptake of carbLDL is less toxic to the cells than oxidized LDL, a well-studied modified cholesterol carrier known to induce atherosclerosis. Further studies are required to elucidate the physiological effects of carbamylation on atherosclerosis in CKD.

In **Chapter 4** we conducted a mini literature review to discuss an important anti-calcification factor that is negatively affected by CKD, Klotho. Calcification is a major complication of kidney disease and is strongly associated with worsening of cardiovascular health. Klotho is one of the protective factors that regulates blood phosphate levels and prevents vascular calcification in a healthy organism. However, its levels are significantly reduced already at the early stages of CKD. Klotho is produced in the kidney and needs to be cleaved from the cell surface before it can enter the circulation and fulfill its functions throughout the body. Depending on the cleavage mechanism, different variants of Klotho protein can be produced which also potentially possess different functional properties. Our review identifies the knowledge gap in different Klotho protein variants research highlighting the importance of further studies that could potentially reveal new mechanisms for preventing calcification and accompanying cardiovascular complications in patients with CKD.

Thanks to the advancement in gene expression profiling and data analysis, novel players can be identified within cardiovascular field that were previously left unnoticed. Thus, in **Chapter 5**, we used a new technique, weighted gene co-expression network analysis, to discover the association of macrophage cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) with plaque calcification. CDK5 was known previously for its regulatory and proinflammatory functions, however the link with calcification has not been established. Our study demonstrated that specific deletion of CDK5 in a specific type of white blood cells (i.e. myeloid cells) resulted in less advanced atherosclerotic plaques with lower calcification levels in mice. These findings make CDK5 an attractive target for drug development for atherosclerosis.

To summarize, this thesis tackled several aspects of cardiorenal syndrome: from small molecules accumulating with kidney function decline, to protein modifications caused by these toxins and associated with CVD, to calcification-promoting proteins that hold potential for promising drug targets. It is important to understand the complexity and all the players involved in development of such multifactorial condition as cardiorenal syndrome to be able to effectively prevent and treat it in future.

## Samenvatting

Hart- en vaatziekten (HVZ) zijn wereldwijd de belangrijkste doodsoorzaak. De belangrijkste onderliggende oorzaak van hart- en vaatziekten is de ontwikkeling van atherosclerose, een ophoping van vetten en ontstekingsfactoren in de slagaderwand die kan leiden tot afsluiting van het bloedvat of trombose na openscheuren van de plaque, met een beroerte of hartaanval als gevolg. Er zijn verschillende oorzaken en verergerende factoren voor atherosclerose, zoals hoge bloeddruk, roken, obesitas, een zittende levensstijl en een verminderde nierfunctie. Nieren vervullen tal van functies in het organisme, zoals het in stand houden van een gezonde mineralenbalans en het uitscheiden van giftige afvalstoffen. Dus het is niet verwonderlijk dat een verslechtering van de nierfunctie een negatieve invloed heeft op hart en bloedvaten. Het is zelfs aangetoond dat nieraandoeningen de kans om te overlijden aan hart- en vaatziekten sterk verhoogd<sup>1</sup>. Het samenspel tussen de ontwikkeling van een chronische nierziekte (CKD) en daaropvolgende HVZ wordt het “cardiorenale syndroom” genoemd. De moleculaire mechanismen achter dit syndroom worden echter niet volledig begrepen.

Dit proefschrift is gewijd aan het begrijpen van verschillende processen die betrokken zijn bij het cardiorenale syndroom. In **Hoofdstuk 2** kijken we naar kleine moleculen, of eiwitgebonden uremische toxinen (PBUT's), die zich ophopen in het organisme tijdens de achteruitgang van de nierfunctie, met als doel het identificeren van de beste aanpak voor de vermindering ervan. PBUT's zijn een groep toxische afvalproducten die in een gezond organisme door de nieren worden verwijderd. Als gevolg van CKD zullen de bloedspiegels van deze moleculen echter stijgen, wat toxisch kan zijn voor de cellen in het lichaam en wat uiteindelijk kan bijdragen tot het ontstaan van HVZ. Een groot deel van de PBUT's is sterk gebonden aan plasma-eiwitten waardoor ze moeilijk te verwijderen zijn met conventionele nierdialyse, die gebaseerd zijn op het filtreren van kleine, in water-oplosbare verbindingen. We hebben een systematisch overzicht uitgevoerd van de literatuur die tussen 1980 en 2020 is gepubliceerd om de best mogelijke aanpak te identificeren voor het verlagen van de bloedspiegels van PBUT's bij patiënten die dialyse ondergaan. Uit onze analyse bleek dat er momenteel geen "one-size-fits-all" techniek bestaat die alle 33 bekende verbindingen effectief kan verwijderen. Niettemin bleken bepaalde methoden, zoals het gebruik van het orale supplement AST-120 (Kremezin®), of de toepassing van gefractioneerde plasmascheiding en adsorptiedialyse, op dit moment het effectiefste te zijn, bij langdurig gebruik en na eenmalige toepassing, respectievelijk, voor goed onderzochte PBUT's als indoxylsulfaat en p-cresylsulfaat. Er is ongetwijfeld verder onderzoek nodig om effectieve technieken te identificeren voor het aanpakken van de toename van PBUT's bij CKD-patiënten, die waarschijnlijk gebaseerd zouden zijn op de kenmerken van de individuele patiënt.

Vervolgens bestudeerden we in **Hoofdstuk 3** een veel voorkomende eiwitmodificatie bij CKD-patiënten, carbamylering, en de rol hiervan bij atherosclerose. Kleuring van de plaque met

behulp van (fluorescerende) antilichamen stelde me in staat om de mate en lokalisatie van carbamylering in verschillende stadia van het ziekteproces in kaart te brengen en plaques van patiënten met nierinsufficiëntie te vergelijken met die van patiënten met een behouden nierfunctie. We ontdekten dat carbamylering toeneemt met het voortschrijden van de ziekte met name in patiënten die ook aan nierfalen leiden. We hebben daarnaast de opname van gecarbamyleerd LDL, een cholesterol vervoerend eiwit in bloed (carbLDL) door macrofagen in de plaque als een belangrijke oorzaak van deze toename. Onze in vitro experimenten toonden echter aan dat de opname van carbLDL minder toxische effecten op de cellen had dan de opname van geoxideerd LDL, een goed bestudeerd gemodificeerd deeltje waarvan bekend is dat het atherosclerose induceert. Verdere studies zijn nodig om de fysiologische gevolgen van carbamylering op atherosclerose bij CKD op te helderen.

In **Hoofdstuk 4** hebben we een mini literatuuroverzicht uitgevoerd om een belangrijke antikalkfactor te bespreken die negatief beïnvloed wordt door CKD, Klotho. Verkalking is een belangrijke complicatie van nierinsufficiëntie die sterk geassocieerd is met cardiovasculaire morbiditeit. Klotho is een van de beschermende factoren die de fosfaatspiegels in het bloed reguleert en vaatverkalking voorkomt in een gezond organisme. De niveaus ervan zijn echter al in de vroege stadia van CKD aanzienlijk verlaagd. Klotho wordt geproduceerd in de nieren en moet worden gesplitst van het celoppervlak voordat het de bloedsomloop kan binnentreden om zijn rol elders in het lichaam te vervullen. Afhankelijk van het splitsingsmechanisme kunnen verschillende varianten van het Klotho eiwit geproduceerd worden die mogelijk ook verschillende functionele eigenschappen bezitten. Onze review identificeert de kennisleemte in het onderzoek naar verschillende Klotho eiwitvarianten en benadrukt het belang van verdere studies die mogelijk nieuwe mechanismen kunnen onthullen voor het tegengaan van verkalking en de bijbehorende cardiovasculaire complicaties bij patiënten met CKD.

Dankzij de recente vooruitgang in de analyse van (gen)expressieprofielen kunnen nieuwe spelers in de ontwikkeling of escalatie van HVZ worden geïdentificeerd, die voorheen onopgemerkt bleven. Zo hebben we in **Hoofdstuk 5** een nieuwe techniek, gewogen gen-coexpressienetwerkanalyse, toegepast en daarmee cycline-afhankelijk kinase 5 (CDK5) ontdekt als mogelijke speler in de aderverkalking. CDK5 was al eerder bekend om zijn regulerende en ontstekingsbevorderende functies, maar het verband met verkalking was nog niet aangetoond. Onze studie toonde aan dat specifieke verwijdering van CDK5 in bepaalde (myeloïde) witte bloedcellen in de muis resulteerde in een verminderd voortschrijden van de plaquevorming en een verlaagde verkalkingsgraad. Deze bevindingen maken CDK5 een aantrekkelijk doelwit voor de ontwikkeling van medicijnen tegen atherosclerose.

Samenvattend behandelde dit proefschrift verschillende aspecten van het cardiorenale syndroom: van kleine moleculen die zich ophopen bij een afname van de nierfunctie, tot eiwitmodificaties veroorzaakt door deze toxines en geassocieerd met CVD, tot verkalking bevorderende eiwitten die potentieel veelbelovende doelwitten voor geneesmiddelen zijn. Het is belangrijk om de complexiteit en alle spelers te begrijpen die betrokken zijn bij de

ontwikkeling van zo'n multifactoriële aandoening als het cardiorenaal syndroom om het in de toekomst effectief te kunnen voorkomen en behandelen.



## Краткое Содержание

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются первостепенной причиной смертности во всем мире. Основным источником развития ССЗ является атеросклероз - накопление липидов и воспалительных факторов в стенке артерии. Атеросклероз может вызвать закупорку сосудов или тромбоз, образованный разрывом стенки пораженной артерии, что неминуемо приводит к инсульту или инфаркту. Существует несколько факторов риска развития атеросклероза, таких как повышенное артериальное давление, курение, ожирение, малоподвижный образ жизни, а также почечная недостаточность. Почки выполняют множество функций в организме, но прежде всего они способствуют поддержанию здорового минерального баланса и выведению токсичных продуктов жизнедеятельности. Поэтому неудивительно, что ухудшение функции почек негативно сказывается на работе сердца и сосудов. Более того, пациенты с заболеваниями почек часто умирают из-за сердечно-сосудистых проблем, а хроническая болезнь почек (ХБП) является независимым фактором риска развития ССЗ<sup>1</sup>. Взаимосвязь между ХБП и последующими сердечно-сосудистыми осложнениями получила название "кардиоренальный синдром". Однако молекулярные процессы, лежащие в основе этого сложного синдрома, до конца не изучены.

Данная диссертация посвящена исследованию ряда процессов, участвующих в развитии кардиоренального синдрома. В **Главе 2** мы рассматриваем токсичные малые молекулы (так называемые связанные с белками уремические токсины, или PBUTs), которые накапливаются в организме при ухудшении функции почек, с целью определения оптимального клинического метода для выведения их из организма. В здоровом организме PBUTs выводятся почками. Однако с началом ХПН уровень этих молекул начинает расти, оказывая сильное токсическое воздействие на клетки, вызывая сердечно-сосудистые осложнения и повышая риск развития ССЗ. Значительная часть PBUTs прочно связана с белками плазмы, что затрудняет их удаление традиционным диализным методом, который основан на отфильтровывании мелких водорастворимых частиц. Мы провели систематический обзор литературы, опубликованной в период с 1980 по 2020 год, с целью выявления оптимального подхода к снижению уровня PBUTs в крови у пациентов, находящихся на диализе. Проведенный анализ показал, что в настоящее время не существует универсальной методики эффективного снижения уровня всех 33 известных токсинов. Тем не менее, некоторые методы, такие как использование пероральной добавки АСТ-120 (Кремезин®), проведение фракционированного разделения плазмы и адсорбционного диализа, показали наибольшую степень снижения уровня таких хорошо изученных PBUTs, как индоксилсульфат и *l*-крезилсульфат, в долгосрочном и однократном исследовании соответственно. Необходимы дальнейшие исследования для определения методов наиболее эффективного удаления PBUTs из крови основываясь на индивидуальных показателях пациентов с почечной недостаточностью.

В **Главе 3**, мы изучили распространенную модификацию белков, встречающуюся у больных ХПН, карбамилрование, и её роль в развитии атеросклероза. При сравнении окрашивания бляшек на разной стадии развития взятых у пациентов с почечной недостаточностью и пациентов со здоровыми почками обычным и флуоресцентным методами была определена степень и локализация карбамилрования, что в свою очередь выявило значительное увеличение карбамилрования прогрессивных бляшек у пациентов с ХПН. Мы также определили, что основной вклад в это увеличение вносит поглощение карбамилрованного липопротеина низкой плотности (carbLDL) макрофагами бляшки. Однако, клеточные эксперименты показали, что поглощение carbLDL менее токсично для клеток, чем поглощение окисленного LDL - хорошо изученного модифицированного носителя холестерина, который, как известно, вызывает атеросклероз. Для выяснения физиологических эффектов карбамилрования на развитие атеросклероза при ХПН необходимы дальнейшие исследования.

В **Главе 4** был проведён мини-обзор литературы, где обсуждается важный антикальцификационный фактор, подверженный негативному влиянию ХПН, Klotho. Кальцификация является одним из основных осложнений заболевания почек и тесно связана с ухудшением сердечно-сосудистого здоровья. Klotho - один из защитных факторов, регулирующий уровень фосфатов в крови и предотвращающий кальцификацию сосудов в здоровом организме. Однако уже на ранних стадиях ХПН его уровень значительно снижается. Чтобы попасть в кровообращение и выполнять свои функции в организме Klotho, который вырабатывается непосредственно в почках, должен пройти процесс отщепления с поверхности клетки. В зависимости от механизма отщепления могут образовываться различные варианты белка Klotho, которые также потенциально обладают различными функциональными свойствами. Наш обзор выявляет пробел в знаниях о различных вариантах белка Klotho, подчеркивая важность дальнейших исследований, которые в свою очередь могут раскрыть новые механизмы предотвращения кальцификации и сопутствующих сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с ХПН.

Благодаря последним развитиям в сфере анализа экспрессии генов появилась возможность обнаружить ранее незамеченные факторы, играющие важную роль в работе сердечно-сосудистой системы. Так, в **Главе 5** представлены результаты выявления связи макрофагальной циклин-зависимой киназы 5 (CDK5) с кальцификацией бляшек при помощи использования нового метода, такого как анализ взвешенной сети коэкспрессии генов. Ранее было известно, что CDK5 выполняет регуляторные и провоспалительные функции, однако её связь с кальцификацией не была установлена. Наше исследование на мышцах показало, что специфическая делеция CDK5 в определенном типе лейкоцитов (миелоидных клетках) приводит к образованию менее развитых атеросклеротических бляшек с более низким уровнем кальцификации. Полученные оптимистические результаты показывают необходимость продолжения исследования CDK5 и её возможном применении при разработке препаратов против атеросклероза.

Подводя итог, можно сказать, что в данной диссертации рассмотрены несколько аспектов кардиоренального синдрома: от малых молекул, накапливающихся при снижении функции почек, до модификаций белков, вызываемых этими токсинами и связанных с ССЗ, а также белков, способствующих кальцификации, потенциально являющимися целями для разработки лекарственных препаратов. Важно понимать всю сложность и характер развития такого многофакторного заболевания как кардиоренальный синдром для улучшения эффективности методов его предотвращения и повышении результативности лечения.

## Kokkuvõte

Südame-veresoonkonnahaigused (SVH) on peamine surma põhjus kogu maailmas. Südame-veresoonkonna haiguste peamiseks tekitajaks on ateroskleroos, mis on lipiidide ja põletikufaktorite kogunemine arteri seintesse. See võib viia veresoone järkjärgulise sulgumiseni või tromboosini kui haigestunud arteri sein rebeneb ning mille tulemuseks on insult või südameinfarkt. Ateroskleroosil on mitmeid riskifaktoreid, näiteks kõrge vererõhk, suitsetamine, ülekaalulisus, istuv eluviis, samuti neerufunktsiooni langus. Neerud täidavad organismis arvukaid ülesandeid, kuid eelkõige aitavad nad säilitada tervislikku mineraalide tasakaalu ja väljutada mürgiseid jääkaineid. Seetõttu ei ole üllatav, et neerufunktsiooni halvenemine mõjutab negatiivselt südame ja veresoonte funktsiooni. Paraku surevad neeruhaiged sageli SVH probleemide tõttu ja krooniline neeruhaigus on iseseisev riskifaktor südame-veresoonkonna haiguste tekkeks. Neeruhaigus ja hilisemate SVH tüsistuste vastastikust mõju nimetatakse kardiorenaalseks sündroomiks (KRS). Selle keerulise sündroomi taga olevad molekulaarsed protsessid ei ole siiani täielikult uuritud ja mõistetud.

Käesolev doktoritöö on pühendatud mitmete kardiorenaalse sündroomiga seotud protsesside mõistmisele. **Peatükis 2** vaatleme valkudega seotud väikese molekulaaluga toksilisi jääkaineid (nn valkudega seotud ureemilisi toksiine ehk PBUT), mis akumulereuvad organismis neerufunktsiooni languse tagajärjel, eesmärgiga leida parim lähenemine nende taseme alandamiseks veres. Terves organismis eemaldavad valkudega seotud ureemilisi toksiine neerud. Kui aga tekib neeruhaigus, hakkab nende molekulide tase veres tõusma, omades rakkudele tõsist toksilist toimet, suurendades südame-veresoonkonna haiguste riski ning tekitades SVH tüsistusi. Suur osa PBUT-dest on tugevalt seotud plasmavalkudega, mistõttu on neid raske eemaldada tavalise dialüüsi abil, mis keskendub väikeste, vees lahustuvate ühendite verest väljafiltreerimisele. Viisime läbi süstemaatilise kirjanduse ülevaate 1980 ja 2020 aasta vahel avaldatud materjalides, et leida parim võimalik meetod PBUT-de verest eemaldamiseks dialüüsipatsientidel. Meie analüüs näitas, et praegu ei ole olemas üht meetodit kõigi 33 teadaoleva valkudega seotud toksiini tõhusaks eemaldamiseks. Siiski näitasid teatud meetodid, nagu suukaudse toidulisandi AST-120 (Kremezin®) kasutamine või fraktsioneeritud plasma eraldamine ja adsorptsioonidialüüs, pikaajalistes ja ühekordse ravi uuringutes vastavalt kõige suuremat vere taseme alanemist selliste põhjalikult uuritud PBUT-de nagu indoksüülsulfaat ja *p*-kresüülsulfaat puhul. Täiendavad uuringud on vajalikud, et määrata kindlaks meetodid, mis võimaldavad kõige tõhusamalt eemaldada PBUT-e kroonilise neeruhaigusega patsientide verest.

Järgmisena uurisime **Peatükis 3** neeruhaigusega patsientidel tihti esinevat valkude modifikatsiooni, karbamüleerimist, ja selle rolli ateroskleroosis. Kasutasime tavapäraselt ja fluorestsentsvärvimist, et kaardistada karbamüleerimise ulatust ja lokatsiooni eri staadiumi aterosklerootilistes naastudes ning võrrelda neerupuudulikkusega patsientide ja tervete uuritavate naaste. Avastasime, et naastu karbamüleerimine suureneb oluliselt ateroskleroosi

progresseerumisega neeruhaigusega patsientidel. Samuti tuvastasime, et selle suurenemise peamiseks põhjuseks on karbamüleeritud madala tihedusega lipoproteiini (carbLDL) vastuvõtmine naastu makrofaagide poolt. Meie rakukatsed näitasid siiski, et carbLDL-i omastamine on rakkude jaoks vähem toksiline kui oksüdeeritud LDLi omastamine, mis on rohkelt uuritud modifitseeritud kolesteroolikandja, mis teadaolevalt põhjustab ateroskleroosi. On vaja täiendavaid uuringuid, et selgitada karbamüleerimise füsioloogiline mõju ateroskleroosile kroonilise neeruhaiguse korral.

**Peatükis 4** teostasime väiksemahulise kirjanduse ülevaate, et kirjeldada ja diskuteerida Klothot kui olulist kaltsifikatsioonivastast tegurit, mida neeruhaigus negatiivselt mõjutab. Kaltsifikatsioon on neeruhaiguse peamine tüsistus ja on tugevalt seotud südame-veresoonkonna olukorra halvenemisega. Klotho on üks kaitsvatest teguritest, mis reguleerib vere fosfaadi taset ja takistab veresoonte kaltsifikatsiooni terves organismis. Selle tase väheneb aga oluliselt juba kroonilise neeruhaiguse varajases staadiumis. Klothot toodetakse neerudes ja see peab raku pinnalt lahustuma, enne kui see satub vereringesse ja täidab oma funktsioone kogu organismis. Sõltuvalt lõhustumismehhanismist võivad tekkida erinevad Klotho valgu variantid, millel on potentsiaalselt ka erinevad funktsionaalsed omadused. Meie ülevaates tuuakse välja teadmiste lünk erinevate Klotho valgu variantide uurimisel, rõhutades edasiste uuringute tähtsust, mis võivad potentsiaalselt paljastada uusi mehhanisme kaltsifikatsiooni ja sellega kaasnevate SVH tüsistuste ennetamiseks neeruhaigusega patsientidel.

Tänu edusammudele geeniekspressiooni profiilide koostamisel ja andmete analüüsimisel saab SVH valdkonnas tuvastada uusi tegureid, mis varem jäid märkamatuks. Seega kasutasime **Peatükis 5** uut tehnikat, kaalutud geenide koekspressioonivõrgustiku analüüsi, et avastada makrofaagide tsükliinist sõltuva kinaasi 5 (CDK5) seos naastude kaltsifikatsiooniga. CDK5 oli varem tuntud oma regulatiivsete ja proinflammatoorsete funktsioonide poolest, kuid seost kaltsifikatsiooniga ei olnud uuritud. Meie uuring näitas, et CDK5 spetsiifiline deletsioon teatud tüüpi valgelibledes (st müeloidrakkudes) põhjustas hiirtel vähem arenenud ateroskleroosilisi naastusid, mille kaltsifikatsioonitase oli madalam. Need leiud muudavad CDK5 atraktiivseks sihtmärgiks ateroskleroosi ravimite arendamisel.

Kokkuvõttes käsitleti käesolevas väitekirjas mitmeid kardioresnaalse sündroomi aspekte: alates neerufunktsiooni langusega akumulereuvatest väikestest molekulidest ja nende toksiinide põhjustatud südame-veresoonkonna haigustega seotud valkude modifikatsioonist kuni kaltsifikatsiooni soodustavate valkudeni, millel on potentsiaal olla paljulubavate ravimite sihtmärkideks. Oluline on mõista kardioresnaalse sündroomi kui multifaktoriaalse haiguse arengu keerukust ja kõiki tegureid, et seda tulevikus tõhusalt ennetada ja ravida.

## References

1. Matsushita, K. *et al.* Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *The Lancet* **375**, 2073–2081 (2010).