

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CHIRURGICHE

Ciclo XXX

Settore Concorsuale: 06/E1

Settore Scientifico Disciplinare: MED22

PLACCHE ATEROSCLEROTICHE CALCIFICHE:
CARATTERIZZAZIONE DEL PROCESSO OSTEOGENICO

Presentata da: Claudio Bianchini Massoni

Coordinatore Dottorato

Prof.ssa Annalisa Patrizi

Supervisore

Prof. Mauro Gargiulo

Esame finale anno 2018

INDICE

ABSTRACTpag. 2

INTRODUZIONE

- Inquadramento delle calcificazioni vascolari.....pag. 6
- Pattern istologico della calcificazione vascolarepag. 7
- Calcificazione vascolare e cellule staminalipag. 8
 - Cellule staminali circolanti.....pag. 8
 - Cellule staminali residenti.....pag. 9
- Calcificazioni vascolari ed arteriopatia ostruttiva cronica perifericapag.13
- Calcificazioni vascolari e aspetto radiologicopag. 14

OBIETTIVO DELLA RICERCA.....pag. 15

MATERIALI E METODI.....pag. 16

RISULTATIpag. 19

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....pag. 21

TABELLE.....pag. 25

LEGENDE DELLE FIGURE.....pag. 28

BIBLIOGRAFIApag. 32

ABSTRACT

Obiettivo

Obiettivo è quello di studiare la calcificazione del distretto femorale valutandone istologia e aspetto radiologico, confrontandola anche con l'aspetto radiologico del distretto carotideo.

Materiali e metodi

Pazienti con arteriopatia ostruttiva cronica periferica e trattati mediante endoarterectomia della arteria femorale comune da giugno 2015 a giugno 2017 sono stati raccolti prospettivamente. Sono stati raccolti dati demografici, clinici (classificazione di Rutherford). Istologicamente le lesioni aterosclerotiche sono state classificate in due tipi: I)placca aterosclerotica "classica"; II)placca calcifica "atipica". Altre variabili istologiche raccolte includono: osso metaplastico, noduli calcifici eruttivi. La valutazione della calcificazione è stata effettuata sulla base della tomografia assiale computerizzata utilizzando la classificazione di Babiarz. La comparazione radiologica con il distretto carotideo è stato effettuato con 19 placche carotidee calcifiche.

Risultati

Sono state prelevate 38 placche aterosclerotiche in 38 pazienti (età media: 73 ± 8 anni; maschi: 79%). Placche aterosclerotiche "classiche" e calcifiche "atipiche" sono state individuate rispettivamente in 12(32%) e 26(68%) casi. Metaplasia ossea e noduli calcifici eruttivi sono stati riscontrati rispettivamente in 15(40%) e 20(53%) casi. La presenza di metaplasie ossee è più frequente con placche calcifiche "atipiche" rispetto a quelle aterosclerotiche "classiche" (rispettivamente 54% vs 8%, $p=.012$). La presenza di noduli calcifici eruttivi è più rara con dislipidemia($p=.004$) e con diabete mellito($p=.016$). Radiologicamente, la placca femorale è stata classificata come moderatamente calcifica(grado 0-5) e fortemente calcifica(grado 6-8) rispettivamente in 8(21%) e 30(79%) casi. Le placche istologicamente definite calcifiche

“atipiche” presentano un aspetto radiologico più calcifico rispetto a quelle ateromasiche “classiche”(p=.007). Le placche femorali sono più calcifiche rispetto alle carotidee, sia in termini di spessore(p=.001) che di circonferenza(p<.001).

Conclusione

Le placche istologicamente definite come calcifiche “atipiche” ed i noduli calcifici eruttivi non sembrano essere dipendenti dai fattori di rischio classici per aterosclerosi. Le placche calcifiche “atipiche” risultano radiologicamente più calcifiche delle ateromasiche “classiche”. Le placche femorali risultano essere più calcifiche rispetto al distretto carotideo.

ABSTRACT

Aim

Aim is to evaluate histological and radiological aspects of femoral calcification and to compare them with radiological characteristics of carotid district.

Methods

Patients treated from June 2015 to June 2017 for peripheral arterial occlusive disease (PAOD) with endarterectomy of common femoral artery and its bifurcation were prospectively collected. Demographics and clinical data, including Rutherford classification, were gathered.

According to histology, the arterial plaque was classified in two types: I)“classic” atherosclerotic plaque; II)“atypical” calcific plaque. Presence of osseous metaplasia and eruptive calcified nodule was also registered. Radiological assessment of arterial calcification was performed on the basis of computed tomography angiography (CTA) according to Babiarz classification. Radiological comparison with carotid calcification was performed with 19 calcified carotid plaques.

Results

Thirty-eight atherosclerotic plaques in 38 patients (mean age: 73 ± 8 years; male: 79%) were collected. “Classic” atherosclerotic and “atypical” calcified plaque were identified in 12 (32%) and 26 (68%) cases, respectively. Osseous metaplasia and eruptive calcified nodule were observed in 15 (40%) e 20 (53%). Osseous metaplasia is more frequent in patient with “atypical” calcified plaque than “classic” atherosclerotic plaque (54% vs 8% respectively; $p=.012$).

Presence of eruptive calcified nodule is more rare in patient with dyslipidemia ($p=.004$) and diabetes mellitus ($p=.016$) and insulin-dependent diabetes mellitus ($p=.027$). Femoral plaque was radiologically classified as moderate (grade 0-5) and heavy calcified (grade 6-8) in 8 (21%) and

30 (79%), respectively. “Atypical” calcified plaques are radiologically more calcified than “classic” atherosclerotic plaque ($p=.007$). Femoral plaques are more calcified than carotid lesions, both in terms of thickness ($p=.001$) and circumference ($p<.001$).

Conclusion

Femoral plaques histologically defined as “atypical” calcified plaque and eruptive calcified nodules seems to be not associated with classical atherosclerotic clinical risk factors. “Atypical” calcified plaques are radiologically more calcified than “classic” atherosclerotic plaques. Femoral plaques results to have heavier calcification in comparison with carotid ones.

INTRODUZIONE

Inquadramento delle calcificazioni vascolari

La calcificazione vascolare è stata considerata in passato un processo passivo e degenerativo, mentre ora è riconosciuta come un processo attivo con aspetti simili alla formazione dell'osso embrionale[1]. La differenziazione delle cellule vascolari risponde a segnali microambientali e meccanici. Per esempio substrati di grande rigidità come la fibronectina, promuovono la differenziazione osteocondrogenica, mentre substrati distensibili, come la laminina, promuovono la differenziazione in senso muscolare liscio o adipogenico[2].

Durante la calcificazione vascolare sono attivi dei processi simili a quelli della biomineralizzazione dell'osso. Sia nei depositi della tonaca intima che in quelli della media, sono state infatti identificate delle vescicole extracellulari uguali a quelle descritte nei processi di osteogenesi e dentinogenesi fisiologica [3,4]. Studi post-mortem hanno mostrato che la parete vascolare può contenere osso tipico, cartilagine o tessuto adiposo con osso come predominante tipo di metaplasia (10-15% dei campioni), comparando in varie forme morfologiche (depositi di calcio amorfo o tessuto osseo maturo) [4].

L'interesse sempre maggiore nelle calcificazioni vascolari deriva dal fatto che esse sono considerate come uno stadio terminale del processo aterosclerotico. Per di più la calcificazione vascolare è comunemente riscontrata in associazione a patologie sistemiche, come il diabete mellito, l'insufficienza renale e la calcifilassi ed è generalmente considerata un fattore predittivo per cattivo outcome[5]. Per esempio, in ambito coronarico l'estensione e le dimensioni della calcificazione sembrano giocare un ruolo chiave: piccole deposizioni incrementano la probabilità della rottura della placca aterosclerotica, soprattutto alla sue estremità, mentre con un focus di calcificazione largo, tale rischio è diminuito[5,6]. Un altro studio[7] ha descritto come la

calcificazione dell'arco aortico è associata con il rischio di coronaropatia sia nei maschi che nelle femmine. Pertanto la calcificazione dell'arco aortico può riflettere il generale carico della patologia o essere a marker di una patologia più aggressiva.

Pattern istologico della calcificazione vascolare

Istologicamente le calcificazioni arteriose possono essere classificate in calcificazioni della tonaca intima, principalmente correlate con l'aterosclerosi e calcificazioni della tonaca media, non correlate con l'aterosclerosi (calcificazione di Monckeberg)[4,8].

Le calcificazioni della tonaca intima sono la forma più comune di calcificazione. L'accumulo di calcio è scatenato da un aumento nella placca di lipidi modificati, citochine proinfiammatorie, fosfati e complessi lipoproteici così come foci di necrosi [4,9]. Studi in vitro hanno mostrato che le citochine proinfiammatorie, le lipoproteine a bassa densità (LDL) o altre sostanze rilasciate dai macrofagi, promuovono l'osteogenesi e l'accumulo di calcio [10,11,12], mentre altri studi correlano la calcificazione vascolare con la durata della ipercolesterolemia[13] e con l'infiammazione in vivo[14]. I cosiddetti depositi puntiformi iniziano nelle zone più profonde dell'intima, adiacente alla media, ma possono essere riscontrati anche depositi molto vasti che coinvolgono l'intera intima[8]. In questo tessuto, sono state descritte cellule emopoietiche, osteoblast-like e osteoclast-like[15,16].

La calcificazione della tonaca media fu descritta per la prima volta da Monckberg più di un secolo fa[17]. Da allora l'aspetto a "binario" della calcificazione della media è stato osservato nei pazienti diabetici e con insufficienza renale cronica[18,19], così come in pazienti giovani senza evidenti disordini metabolici[20,21]. Con l'invecchiamento, la calcificazione della media può svilupparsi da causa sconosciuta o risultare da condizioni associate come l'insufficienza renale

cronica, il diabete mellito, neuropatie e denervazioni[8,9,22]. In tutti i casi, queste calcificazioni insorgono frequentemente in segmenti arteriosi non aterosclerotici[23].

Calcificazione vascolare e cellule staminali

Sono stati proposti differenti modelli per ipotizzare il meccanismo della formazione ed inibizione della calcificazione[16]: il modello attivo, il modello passivo fisico-chimico, ed il modello arterioso osteoclast-like. Un modello non esclude l'altro.

Uno dei più recenti meccanismi proposto è quello relativo al possibile ruolo delle cellule staminali/progenitrici residenti nella parete vascolare o delle cellule circolanti derivanti dal midollo osseo. Inoltre, nelle arterie calcifiche sono state trovate cellule chondrocyte-like, tipicamente non espresse nelle arterie normali, cellule osteoblast-like e cellule osteoclast-like multinucleate[15,16]. Queste cellule sono riconoscibili grazie alla loro peculiare morfologia e positività per specifici marker istologici; osteoprotegerina, osteopontina, osteocalcina, matrix glutamyl protein (MGP) e proteina morfogenetica ossea(BMP)[24].

– Cellule staminali circolanti

Le cellule staminali mesenchimali derivanti dal midollo osseo hanno la capacità di differenziarsi in molti tipi di cellule stromali, come monociti, fibroblasti, astrociti, adipociti, ed anche condrociti e osteociti, riportati come cellule osteoprogenitrici[24].

Le cellule progenitrici sono cellule proliferanti con una capacità limitata di auto-rinnovamento e sono spesso unipotenti. L'evidenza accumulata indica che la mobilitazione ed il reclutamento delle cellule progenitrici circolanti o residenti nei tessuti che danno origine a cellule endoteliali e cellule muscolari lisce possono partecipare all'aterosclerosi, all'iperplasia miointimale dopo un danno arterioso e arteriosclerosi dopo trapianto d'organo[25]. Più specificatamente le cellule

progenitrici possono contribuire alla calcificazione: il midollo osseo contiene sia osteoblasti che precursori degli osteoclasti chiamati “osteoprogenitori associati con il rimodellamento osseo”[26]. Questo meccanismo nuovo è stato chiamato “teoria delle cellule circolanti”: la popolazione cellulare derivante dal midollo osseo può nutrire le arterie e contribuire alla malattia od alla riparazione[27]. La mobilitazione è il processo sotto la regolazione di citochine nel quale cellule immature dal midollo osseo sono reclutate nel sangue[28].

Un altro meccanismo comune che può spiegare il reclutamento delle cellule osteoprogenitrici nelle arterie è il cosiddetto “homing”[29]; in risposta a segnali di stress, danno, infiammazione, riparazione o segnalazione abnorme di citochine, le cellule circolanti superano l’endotelio ed invadono il tessuto target [30]. Il fenotipo endoteliale modula selettivamente l’”homing” delle cellule staminali derivanti dal midollo osseo: infatti differenti fenotipi endoteliali mantengono differenti funzioni. Un esempio è dato dall’endotelio delle coronarie che permette la più veloce integrazione delle cellule stromali del midollo osseo. La transmigrazione richiede l’interazione delle vascular cell adhesion molecule-1, very late antigen-4, beta1 integrine, metalloproteinasi e citochine[30].

– **Cellule staminali residenti**

Cellule staminali mesenchimali

Le “cellule staminali mesenchimali derivanti dal midollo osseo” che risiedono nella parete arteriosa possono differenziarsi in diversi tipi cellulari, quali osteoblasti, condrociti e cellule endoteliali. [31-35].

Recentemente è stato ipotizzato che le “cellule staminali mesenchimali” possano giocare un ruolo nella patogenesi dell’aterosclerosi ed è stato dimostrato che in condizioni particolari, queste

cellule staminali in cultura acquistino un fenotipo osteoblastico attraverso l'attivazione della via di Wnt[36]. In ratti iperlipidemici trattati con angioplastica per indurre un danno vascolare, le cellule staminali mesenchimali hanno iniziato il rimodellamento della parete vascolare ed hanno innescato il processo di calcificazione mediato da BMP-2 paracrino[37], che è considerato uno dei principali mediatori nella differenziazione delle cellule staminali mesenchimali (e di altri) lungo la linea cellulare osteoblastica[38,39]. E' interessante notare che le cellule staminali mesenchimali, coltivate in siero uremico per un mese (mimando parzialmente lo stimolo dell'insufficienza renale) hanno iperespresso la fosfatasi alcalina, l'osteopontina, Runx2 e hanno mostrato una up-regolazione di BMP-2[40].

Cellule muscolari lisce (SMC)

Le SMC della parete arteriosa umana mostra un grande plasticità fenotipica, dato che è stato dimostrato che in cultura possono differenziarsi in quasi tutte le linee cellulari mesenchimali (eccetto gli adipociti), ed in particolare condizioni possono calcificarsi[41,42]. Queste cellule sono state originalmente descritte come cellule vascolari calcificanti (CVC), cioè SMC che sotto lo stimolo di AMP ciclico vanno incontro a differenziazione osteoblastica (con espressione di fosfatasi alcalina, collagene di tipo I e matrix glutamyl protein), si aggregano e formano noduli mineralizzanti[10]. I topi privati di matrix carboxyglutamic acid protein (MGP) sono modelli animali caratterizzati da una calcificazione progressiva delle arterie non aterosclerotiche: in questi topi le cellule muscolari lisce vascolari sono sostituite da “cellule simil-condrociti mineralizzanti”[43]. La possibilità di una transizione fenotipica dalle cellule della parete arteriosa ha aperto nuove possibilità nelle teorie del modello di calcificazione attiva.

Neoangiogenesi e cellule endoteliali

In accordo con numerose osservazioni, la neoangiogenesi e la calcificazione vascolare sono strettamente correlate: prima di tutto, i neovasi sono mezzi di trasporto per cellule progenitrici nel tessuto; inoltre le cellule endoteliali sono in grado di produrre citochine che possono stimolare cellule osteoprogenitrici in vitro ed in vivo. Per di più, molti fattori di crescita (come FGF-2 e VEGF) possono stimolare sia l'angiogenesi che l'attivazione degli osteoblasti ed osteoclasti[5]. Cellule endoteliali coltivate sotto stimoli pro-aterogeni producono fattori pro-osteogenici, come BMP-2[44]. Questo è particolarmente interessante, considerando che la maggior parte dell'angiogenesi della placca deriva dai vasa vasorum della avventizia che possono traghettare cellule progenitrici, periciti, e stimoli infiammatori, incluso citochine, nella tonaca media ed avventizia[45,46].

Cellule giganti simil-osteoclasti

Come nel tessuto osseo normale, la calcificazione della parete vascolare e/o la placca ateromastica è probabile che dipenda da un bilancio tra stimoli pro-osteogenici ed anti-osteogenici. In questa regolazione le cosiddette "cellule giganti simil-osteoclasti" giocano un ruolo nel riassorbimento del calcio. E' stato dimostrato che topi knockout per apoE e mancanti anche del gene per il "macrophage colony stimulating factor" (M-CSF, una citochina coinvolta nella sopravvivenza degli osteoclasti) hanno sviluppato calcificazioni arteriose massive[47]. L'origine delle cellule simil-osteoclastiche nella parete arteriosa non è ancora chiara, ed è ancora da chiarire se esse derivano da cellule staminali residenti, da precursori circolanti emopoietici, da una differenziazione di cellule mononucleati o da altre cellule non ancora stabilite. Le cellule mononucleate comunemente trovate nelle placche ateromastiche condividono molte

caratteristiche fenotipiche e genetiche con gli osteoclasti ed hanno una origine ematopoietica, mentre molte cellule precursori circolanti esprimono recettori per RANK e M-CSF, entrambi essenziali per l'attività osteoclastica [8].

Cellule progenitrici pericitiche e macrofagiche

I periciti condividono numerosi marker fenotipici con CVC, incluso alfa-actina, beta-actina, e l'epitopo 3G5, definito antigene ganglioside NG2[5]. Il ruolo putativo dei periciti come un "reservoir" di cellule progenitrici, e il loro potenziale di differenziazione in differenti tipi cellulari, incluso osteoblasti, è ben noto[48,49,50]. Nelle ultime tre decadi, usando differenti modelli, sono state addotte molte prove che i periciti possono andare incontro a differenziazione condro- ed osteogenica[34,51,52]. Dopo 8 settimane di coltura, i periciti hanno mostrato di proliferare e formare gruppi multicellulari con una matrice mineralizzata contenente collagene di tipo I, proteina G1a, osteocalcina e osteopontina[53,54]. Per di più, coltivando queste cellule in un mezzo condrogenico (TGF-beta3: fattore di crescita trasformante beta3) i periciti vanno incontro a differenziazione condrogenica[34]. Altri autori ipotizzano che i periciti avventiziali (esprimenti Msx2 e altri fattori trascrizionali osteoblastici) possano essere capaci di stimolare la produzione di fosfatasi alcalina, l'attivazione della via Wnt e l'attivazione nucleare della beta-catenina nelle cellule della media (SMC)[55]. Questo rappresenta un interessante esempio di stimolo indiretto verso la calcificazione mediata dal sinergico "cross-talk" tra differenti cellule della parete vasale. Infatti, la tonaca avventizia arteriosa contiene differenti cellule progenitrici, come è stato dimostrato nella aorta murina, dove una popolazione di cellule progenitrici macrofagiche Sca-1+/CD45+ sono state recentemente descritte, che rappresentano a "reservoir" di cellule precursori non circolanti[56].

Il ruolo delle cellule avventiziali nella regolazione delle funzioni dei vasi arteriosi, sia in condizioni fisiologiche che in condizioni patologiche, sicuramente merita future analisi approfondite.

Calcificazioni vascolari ed arteriopatìa ostruttiva cronica periferica

Non è ben noto quale sia la prevalenza delle calcificazioni vascolari nell'arteriopatìa ostruttiva cronica periferica (AOCP), ma dati estrapolati da altri distretti vascolari evidenziano che il 30-50% dei pazienti può manifestare un certo grado di calcificazione vascolare[57]. Huang et al. riportano un più alto grado di calcificazione, correlato con una più elevata gravità della patologia, con elevato rischio di amputazione maggiore e mortalità[58].

La presenza di calcificazioni vascolari ha sempre rappresentato e rappresenta tuttora una sfida per quanto riguarda il trattamento endovascolare dell'AOCP, limitandone il successo tecnico e la durabilità nel tempo. Nuovi materiali e tecniche si sono sviluppate negli ultimi anni per tentare la ricanalizzazione endovascolare di occlusioni calcifiche nel distretto infrainguinale[59,60]. Iida ed al., analizzando pazienti con arteriopatìa sottogenicolare isolata sottoposti ad angioplastica tibiale, hanno riportato che la calcificazione della lesione è un fattore di rischio per l'amputazione maggiore o il reintervento[61]. Inoltre l'entità della calcificazione vascolare limita l'assorbimento di farmaco rilasciato durante angioplastica transluminale utilizzando palloni rivestiti di paclitaxel[62,63].

La calcificazione delle arterie periferiche rappresenta quindi un fenomeno determinante dal punto di vista clinico.

Calcificazioni vascolari ed aspetto radiologico

In letteratura sono riportati differenti metodi per identificare, misurare e classificare le calcificazioni vascolari. L'incomprimibilità delle arterie con lo sfigmomanometro durante la misurazione dell'indice caviglia-braccio (ankle-brachial index, ABI) suggerisce la presenza di calcificazioni a livello della tonaca media[64]. Un esame radiografico è spesso sufficiente per individuare calcificazioni vascolari in pazienti con insufficienza renale cronica[65]. La fluoroscopia ad alta intensità e la angiografia in sottrazione sono comunemente utilizzate per quantificare le calcificazioni vascolari[57]. L'esame angioTC e la risonanza magnetica (RM) forniscono informazioni più dettagliate sulla localizzazione e l'entità della calcificazione vascolare, sottoponendo però il paziente a rischio di nefrotossicità da mezzo di contrasto ed a radiazioni ionizzanti. Le classificazioni che si basano sulla TC[58,62] ci permettono di determinare in maniera più accurata l'estensione della calcificazione, analizzandone parametri spaziali come lo spessore e la distribuzione nella circonferenza.

Sulla base di queste metodiche, esistono differenti sistemi di quantificazione della calcificazione vascolare. Le più conosciute ed utilizzate sono la classificazione PARC (Peripheral Academic Research Consortium)[66] e quella PACSS (Peripheral Arterial Calcium Scoring Scale)[57].

La classificazione di Babiarz[67], originalmente ideata per il distretto coronarico, è stata recentemente utilizzata anche a livello carotideo[68]. Tale classificazione, utilizzando i dati della TC, valuta l'entità della calcificazione vascolare calcolando lo spessore e l'estensione circonferenziale della calcificazione nella sezione TC di maggiore calcificazione. Ciascuno di questi due parametri è valutato con uno score da 0 a 4.

OBIETTIVO DELLA RICERCA

L'obiettivo della ricerca è quello di studiare la calcificazione del distretto femorale valutandone l'istologia e l'aspetto radiologico TC, effettuando anche un confronto con l'aspetto radiologico del distretto carotideo.

MATERIALI E METODI

Criteria di inclusione e di esclusione

I pazienti trattati per AOCP presso l'Unità Operativa di Chirurgia Vascolare (Prof. Andrea Stella) del Policlinico S.Orsola-Malpighi sono stati raccolti prospetticamente in un database. Per questo studio sono stati considerati i pazienti trattati da giugno 2015 a giugno 2017 mediante endoarterectomia della femorale comune e della sua biforcazione. Criteri di esclusione sono stati la contemporanea presenza di patologia arteriosa aneurismatica a livello del segmento trattato.

Raccolta dati

I dati raccolti riguardanti i pazienti sono stati classificati in dati demografici (età, genere) e dati clinici (ipertensione arteriosa, diabete mellito in terapia orale o insulinica, cardiopatia ischemica cronica, insufficienza renale cronica, trattamento emodialitico cronico, valore di creatininemia pre-operatoria, dislipidemia, abitudine tabagica, broncopneumopatia cronica ostruttiva). L'AOCP è classificata secondo la classificazione di Rutherford[69].

Analisi istologica

Il campione chirurgico relativo alla placca dell'arteria femorale comune o della sua biforcazione (origine dell'arteria femorale profonda e/o superficiale) è stata inviata alla U.O. di Anatomia Patologica e campionata come di routine, eventualmente previa decalcificazione con EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) o derivati, in caso di marcata calcificazione della parete. I tessuti sono stati fissati in formalina, imbevuti in paraffina e processati automaticamente come di routine. Dal blocchetto sono state eseguite sezioni da 2 µm per le colorazioni con Ematossilina-Eosina e Tricromica di Masson.

L'analisi istologica è stata eseguita valutando l'estensione e la natura della calcificazione: una prima suddivisione riguarda la presenza o meno di residui lipidici accompagnati da infiltrato infiammatorio nell'ambito della lesione intimale.

Di conseguenza la lesione viene classificata in due tipi: I) placca aterosclerotica "classica": placca ateromasica diffusamente calcifica in cui sono individuabili flogosi, depositi lipidici e calcificazioni; II) placca calcifica "atipica": placca con massivo deposito calcifico non ateromasico, senza lipidi e flogosi. Altre variabili istologiche raccolte includono la presenza di osso metaplastico e la presenza di noduli calcifici eruttivi.

Analisi radiologica mediante tomografia assiale (TC)

Le immagini assiali della TC od angioTC preoperatoria sono state valutate prospetticamente da un operatore indipendente, non a conoscenza dell'istologia delle placche raccolte. La valutazione della calcificazione è stata effettuata a livello dell'arteria femorale comune in base alla sua estensione circonferenziale ed al suo spessore. Ciascuno di questi due parametri è stato quantificato da 0 a 4 secondo la classificazione di Babiarz[67,68]. Il valore ottenuto (da 0 a 8) è stato suddiviso in due gruppi: basso grado di calcificazione (da 0 a 5) ed alto grado di calcificazione (da 6 a 8).

Comparazione con aspetto radiologico TC di placche carotidee

Come campione di controllo sono state utilizzate 19 placche calcifiche rimosse mediante endoarterectomia della biforcazione carotidea durante lo stesso intervallo di tempo. Sono state utilizzate placche carotidee ateromasiche con estesa calcificazione, con o senza complicanze istologiche.

Analisi statistiche

Le variabili categoriche sono riportate come conta e percentuale, quelle quantitative come media e deviazione standard o come mediana e range a seconda della loro distribuzione (rispettivamente normale o non normale). Le distribuzioni delle caratteristiche demografiche, dei fattori di rischio e della presentazione clinica e gli aspetti istologici sono state valutate con il test del chi-quadrato od il test esatto di Fisher (nel caso in cui un valore della tavola di contingenza sia <5). Per variabili quantitative a distribuzione normale (per esempio l'età) è stata valutata la significatività statistica con il t-test, mentre per quelle a distribuzione non normale (per esempio la creatininemia) con il Mann-Whitney U test.

Il paragone tra le caratteristiche radiologiche delle placche carotidee e femorali è stato ottenuto mediante il Mann-Whitney U test per i parametri quantitativi a distribuzione non normale e con il test del chi-quadrato od il test esatto di Fisher in caso di variabili nominali.

RISULTATI

Pazienti

Sono state prelevate 38 placche aterosclerotiche in 38 pazienti (età media 73 ± 8 anni; maschi 79%). I fattori demografici, i fattori di rischio e la clinica dei pazienti sono riportati in Tabella 1.

Istologia

L'aspetto istologico delle placche analizzate è riportato in Tabella 2. Placche aterosclerotiche "classiche" (Figura 1) e placche calcifiche "atipiche" (Figura 2) sono state individuate rispettivamente in 12 (32%) e 26 (68%) casi. Metaplasia ossea (Figura 3) e noduli calcifici eruttivi (Figura 4) sono stati riscontrati rispettivamente in 15 (40%) e 20 (53%) casi.

La presenza di metaplasie ossee è più frequente nei pazienti con placche calcifiche "atipiche" rispetto a quelli con placche aterosclerotiche "classiche" (rispettivamente 54% vs 8%, $p=.012$), mentre la distribuzione dei noduli calcifici eruttivi tra i due gruppi non è statisticamente significativa (rispettivamente 58% vs 42%, $p=.358$).

La distribuzione delle caratteristiche demografiche, dei fattori di rischio e della presentazione clinica in base alle caratteristiche istologiche è riportata in Tabella 3.

La presenza di noduli calcifici eruttivi è più rara nei pazienti con dislipidemia ($p=.004$), e con diabete mellito ($p=.016$) [anche nel sottogruppo con diabete insulino-dipendente ($p=.027$)].

Anche i pazienti con cardiopatia ischemica cronica hanno più raramente noduli calcifici eruttivi a livello della placca femorale, anche se la differenza non è statisticamente significativa ($p=.054$).

Aspetto radiologico TC

L'entità della calcificazione femorale in base alla classificazione di Babiarz[67] è riportata in Tabella 4. La placca femorale è stata classificata come moderatamente calcifica (grado 0-5) e fortemente calcifica (grado 6-8) rispettivamente in 8 (21%) e 30 (79%) casi.

Le placche istologicamente definite calcifiche "atipiche" presentano un aspetto radiologico più calcifico rispetto a quelle ateromasiche "classiche" ($p=.007$).

Confronto tra calcificazioni femorali e carotidee

Le placche femorali sono risultate più calcifiche rispetto a quelle carotidee, sia in termini di spessore della calcificazione ($p=.001$), sia di circonferenza ($p<.001$). Nelle placche femorali ed in quelle carotidee, l'entità della calcificazione è fortemente calcifica (grado 6-8 della classificazione di Barbiarz[67]) rispettivamente in 30 (79%) e 13 (68%) ($p=.384$).

DISCUSSIONE

Lo studio riporta importanti dati sull'istologia ed il processo osteogenico delle placche femorali, argomento poco studiato in letteratura[70,71].

I dati istologici confermano la presenza di due tipi di placche nel distretto femorale. Il primo tipo (aterosclerotica “classica”) è caratterizzato dalla presenza di componenti lipidiche, infiltrato infiammatorio e calcificazioni, tutte componenti del processo aterosclerotico “classico”. Nel secondo tipo è invece assente la componente ateromasica, senza depositi lipidici e flogosi, ma con massive calcificazioni che si sviluppano nel contesto della tonaca intima e della media (placche calcifiche “atipiche”).

Dalla distribuzione dei fattori di rischio, risulta evidente che le placche calcifiche “atipiche” non siano correlate ai fattori di rischio tradizionalmente associati al “classico” processo aterosclerotico. Ad esempio, l'età e l'ipertensione arteriosa sistemica sono pressoché uguali tra i due gruppi (Tabella 3). Il diabete mellito è più frequente nel gruppo con placche ateromasiche “classiche” rispetto a quello con placche calcifiche “atipiche”, benché la differenza non sia statisticamente significativa (42% vs 31%, $p=.510$). La presenza di insufficienza renale cronica ed elevati valori di creatininemia sono meno frequenti nel gruppo con placche calcifiche “atipiche”, ricche di depositi calcifici. Questo risulta contrastante con la fisiopatologia dell'insufficienza renale, da cui deriva una diminuita escrezione di calcio ed una più elevata calcemia.

I noduli calcifici eruttivi consistono in massive calcificazioni eruttive che protrudono nel lume e sono stati descritti per la prima volta nelle coronarie[72]. Nel distretto coronarico rappresentano la causa meno frequente di trombosi (dal 2% al 5% delle morti improvvise)[73], ed anche a livello carotideo, sebbene siano più frequenti, sembrano rimanere una delle cause meno frequenti di

trombosi[74]. L'attuale studio ricerca la presenza dei noduli calcifici eruttivi a livello femorale e la loro distribuzione fornisce dati inattesi. La loro presenza è inversamente proporzionale al diabete mellito ($p=.016$), al diabete mellito insulino-dipendente ($p=.027$) ed alla dislipidemia ($p=.004$). Sebbene non significativo dal punto di vista statistico, anche la cardiopatia ischemica cronica è meno frequente nei pazienti con noduli calcifici eruttivi ($p=.054$). Anche in questo caso l'insufficienza renale cronica ed i valori di creatininemia non sono statisticamente correlati alla presenza di noduli calcifici eruttivi.

La distribuzione delle placche calcifiche "atipiche" e dei noduli calcifici eruttivi mette in evidenza che il processo osteogenico risulta essere in gran parte ancora misconosciuto. Accanto ad un processo calcifico tipico dell'aterosclerosi, sembra esservi una tipologia di calcificazione vascolare dalla fisiopatologia non chiara.

Una delle ipotesi è che questa calcificazione sia in qualche modo correlata con il processo di calcificazione della media di Monckeberg. Tale condizione viene istologicamente definita come la presenza di calcificazione distrofica localizzata nella tonaca media e/o adiacente alla lamina elastica interna in assenza di cambiamenti evidenti dell'intima[75]. Un recente studio[76] che analizza 143 vasi arteriosi di altrettanti donatori multiorgano (età media $38 \text{ anni} \pm 13$), ha riportato che la calcificazione della tonaca media di Monckeberg è presente nel 25% dei casi. Anche in questo caso nessun fattore di rischio tipico dell'aterosclerosi è risultato significativamente correlato con la calcificazione di Monckeberg. La scarsa conoscenza della fisiopatologia della calcificazione di Monckeberg non ci fa escludere che possa essere in qualche modo correlata con le calcificazioni atipiche riscontrate nel nostro studio.

La quantificazione della calcificazione a livello degli arti inferiori è sempre stata di difficile valutazione. Lo studio TC a nostro avviso riesce a fornire informazioni più dettagliate rispetto ad

altre metodiche (eco-color-Doppler o radiografia), come per esempio l'estensione della calcificazione in senso circonferenziale. La classificazione di Babiarz[67] prevede la quantificazione della calcificazione nella sezione TC più interessata dal processo calcifico e ne quantifica l'estensione circonferenziale e lo spessore. A nostro avviso, questa classificazione risulta utile per valutare le calcificazioni nei segmenti brevi come il distretto carotideo o la biforcazione femorale.

L'entità della calcificazione radiologica ha un'associazione con i risultati istologici. Le placche calcifiche "atipiche" risultano essere radiologicamente più calcifiche rispetto a quelle aterosclerotiche "classiche". Ad una calcificazione istologicamente più sviluppata corrisponde un aspetto radiologico più calcifico.

Comparando il gruppo di placche femorali con il gruppo di controllo di placche carotidee, la calcificazione femorale risulta essere significativamente più spessa e più circonferenziale. Questo dato corrisponde anche all'aspetto intraoperatorio. Eseguendo una endoarterectomia femorale spesso si rimuovono placche con calcificazione così sviluppata ed estesa da rendere difficoltosa la loro sezione. Anche nel distretto carotideo la calcificazione è facilmente riscontrabile, ma la sua entità e la sua estensione non è sicuramente pari al distretto femorale.

CONCLUSIONI

Nel distretto femorale l'entità delle calcificazioni arteriose delle placche aterosclerotiche è maggiore rispetto al distretto carotideo. Istologicamente placche femorali estremamente calcifiche non sono correlate ai fattori di rischio tradizionali dell'aterosclerosi, ipotizzando la presenza di un altro processo fisiopatologico coinvolto nella formazione di calcificazioni

vascolari femorali. Ulteriori studi sono necessari per poter comprendere a pieno il processo di calcificazione femorale.

TABELLE

Tabella 1. Caratteristiche demografiche, fattori di rischio e presentazione clinica dei pazienti

Fattori demografici	
Età media (anni)	73±8
Maschi, n (%)	30 (79%)
Fattori di rischio	
Iperensione arteriosa, n (%)	37 (97%)
Diabete mellito tipo 2, n (%)	13 (34%)
- terapia orale, n (%)	3 (8%)
- terapia insulinica, n (%)	10 (26%)
Cardiopatia ischemica cronica, n (%)	17 (45%)
Insufficienza renale cronica, n (%)	16 (42%)
- trattamento dialitico cronico, n (%)	5 (13%)
Creatininemia, mg/dl (mediana, range)	1 (0.4-6.5)
Dislipidemia, n (%)	18 (47%)
Fumatori, n (%)	26 (68%)
- attivo, n (%)	11 (29%)
- ex fumatore, n (%)	15 (39%)
Classificazione di Rutherford	
- categoria 3, n (%)	4 (11%)
- categoria 4, n (%)	10 (26%)
- categoria 5, n (%)	13 (34%)
- categoria 6, n (%)	11 (29%)

DS: deviazione standard

Tabella 2. Caratteristiche istologiche delle placche femorali

Tipo di placca	
- aterosclerotica “classica”	26 (68%)
- placca calcifica “atipica”	12 (32%)
Reperti aggiuntivi	
- osso metaplastico	15 (40%)
- noduli calcifici eruttivi	20 (53%)

Tabella 3. Distribuzione delle caratteristiche demografiche, fattori di rischio e presentazione clinica in base agli aspetti istologici

Fattori demografici	Placca ateromasiatica "classica" (n=12)	Placca calcifica "atipica" (n=26)	P	Metaplasia ossea SI (n=15)	Metaplasia ossea NO (n=23)	P	Noduli calcifici eruttivi SI (n=20)	Noduli calcifici eruttivi NO (n=18)	P
Età media (anni)	73±8	74±9	.865	74±7	73±9	.478	75±6	71±10	.196
Maschi, n (%)	10 (83%)	20 (77%)	1	12 (80%)	18 (78%)	1	15 (75%)	15 (83%)	.697
Fattori di rischio									
Iperensione arteriosa, n (%)	12 (100%)	25 (96%)	1	14 (93%)	23 (100%)	.395	19 (95%)	18 (100%)	1
Diabete mellito tipo 2, n (%)	5 (42%)	8 (31%)	.510	4 (27%)	9 (39%)	.501	3 (15%)	10 (56%)	.016
- terapia orale, n (%)	1 (8%)	2 (8%)	1	2 (13%)	1 (4%)	.550	1 (5%)	2 (11%)	.595
- terapia insulinica, n (%)	4 (33%)	6 (23%)	.694	2 (13%)	8 (35%)	.259	2 (10%)	8 (44%)	.027
Cardiopatia ischemica cronica, n (%)	6 (50%)	11 (42%)	.658	6 (40%)	11 (48%)	.653	6 (30%)	11 (61%)	.054
Insufficienza renale cronica, n (%)	6 (50%)	10 (39%)	.503	5 (33%)	11 (48%)	.376	8 (40%)	8 (44%)	.782
- trattamento dialitico cronico, n (%)	3 (25%)	2 (8%)	.142	1 (7%)	4 (17%)	.630	2 (10%)	3 (17%)	.653
Creatininemia, mg/dl (mediana, range)	1 (0.4-5.7)	1.1 (0.4-6.5)	.312	0.9 (0.5-2.1)	1.2 (0.4-6.5)	.121	1 (0.4-6.2)	1.2 (0.4-6.5)	.478
Dislipidemia, n (%)	7 (58%)	11 (42%)	.358	6 (40%)	12 (52%)	.463	5 (25%)	13 (72%)	.004
Fumatori, n (%)	7 (58%)	19 (73%)	.363	10 (67%)	16 (70%)	.851	15 (75%)	11 (61%)	.358
- attivo, n (%)	5 (42%)	6 (23%)	.240	3 (20%)	8 (35%)	.470	7 (35%)	4 (22%)	.485
- ex fumatore, n (%)	3 (25%)	12 (46%)	.294	7 (47%)	8 (35%)	.464	9 (45%)	6 (33%)	.463
Classificazione di Rutherford									
- categoria 3, n (%)	1 (8%)	3 (12%)	.130	2 (13%)	2 (8%)	.441	3 (15%)	1 (6%)	.690
- categoria 4, n (%)	3 (25%)	7 (27%)		4 (27%)	6 (26%)		6 (30%)	4 (22%)	
- categoria 5, n (%)	7 (58%)	6 (23%)		3 (20%)	10 (44%)		6 (30%)	7 (39%)	
- categoria 6, n (%)	1 (8%)	10 (39%)		6 (40%)	5 (22%)		5 (25%)	6 (33%)	

Tabella 4. Caratteristiche radiologiche della calcificazione femorale in basse alla classificazione di Babiarz[67]

Spessore della calcificazione	mm	n (%)
- Grado 0	0	0 (-)
- Grado 1	1	1 (3%)
- Grado 2	2	6 (16%)
- Grado 3	3	14 (37%)
- Grado 4	>3	17 (45%)
Circonferenza della calcificazione		
- Grado 0	No	0 (-)

- Grado 1	Puntiforme	1 (3%)
- Grado 2	<90° della circonferenza	2 (5%)
- Grado 3	90°-270° della circonferenza	22 (58%)
- Grado 4	>270° della circonferenza	13 (34%)
Entità della calcificazione		n (%)
- placca moderatamente calcifica (grado 0-5)		8 (21%)
- placca fortemente calcifica (grado 6-8)		30 (79%)

FIGURE

Figura 1. Placca ateromasica “classica”, con diffuso deposito lipidico sede di calcificazione (asterisco). A) colorazione Ematossilina-Eosina; B) colorazione Tricromica di Masson.

Ingrandimento 10x.

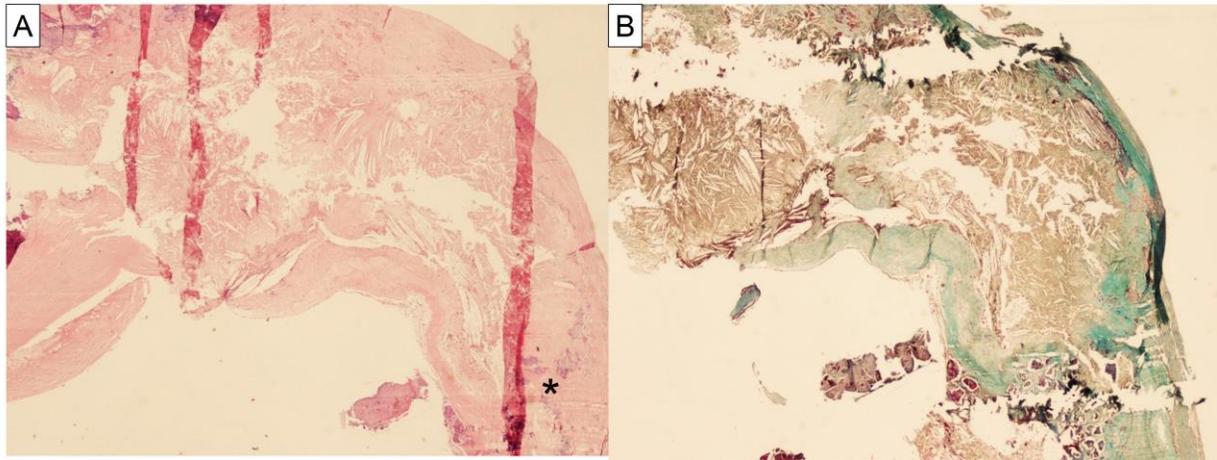


Figura 2. Massivo deposito calcifico in assenza di residui lipidici o infiammazione, coinvolgente tutto lo spessore parietale. Ematossilina-Eosina; ingrandimento 10x.

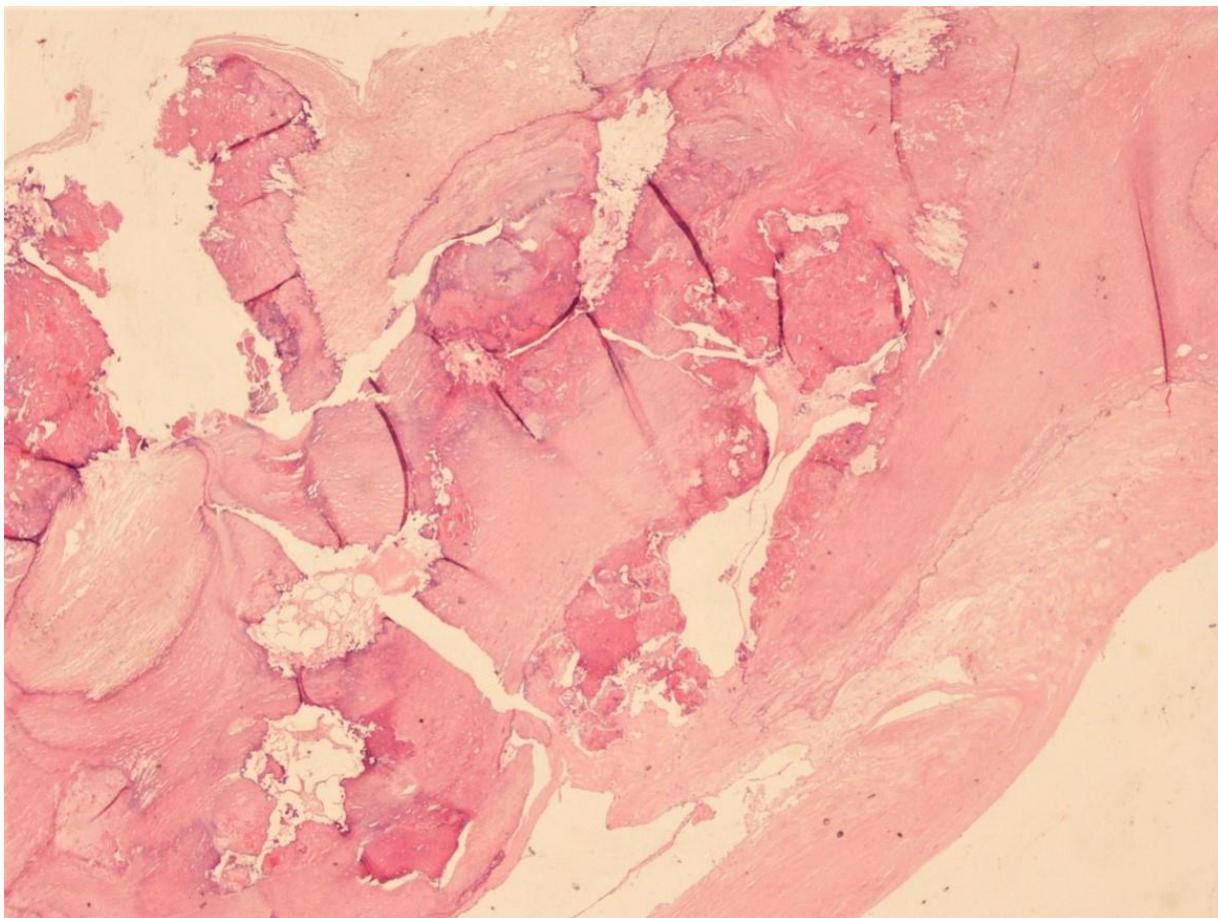


Figura 3. Placca fibro-calcifica sede di metaplasia ossee (freccia), nel contesto della parete arteriosa. Ematossilina-Eosina; ingrandimento 10x.

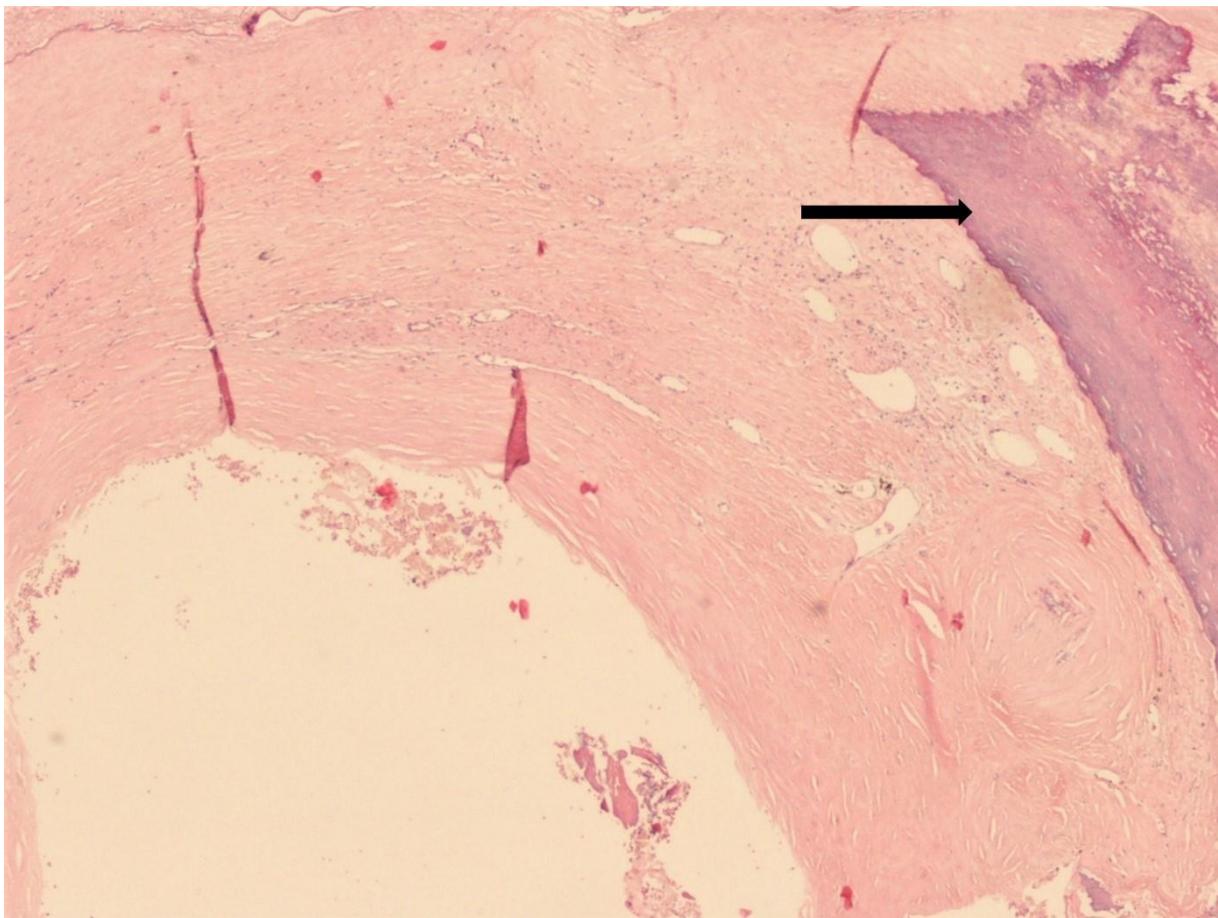
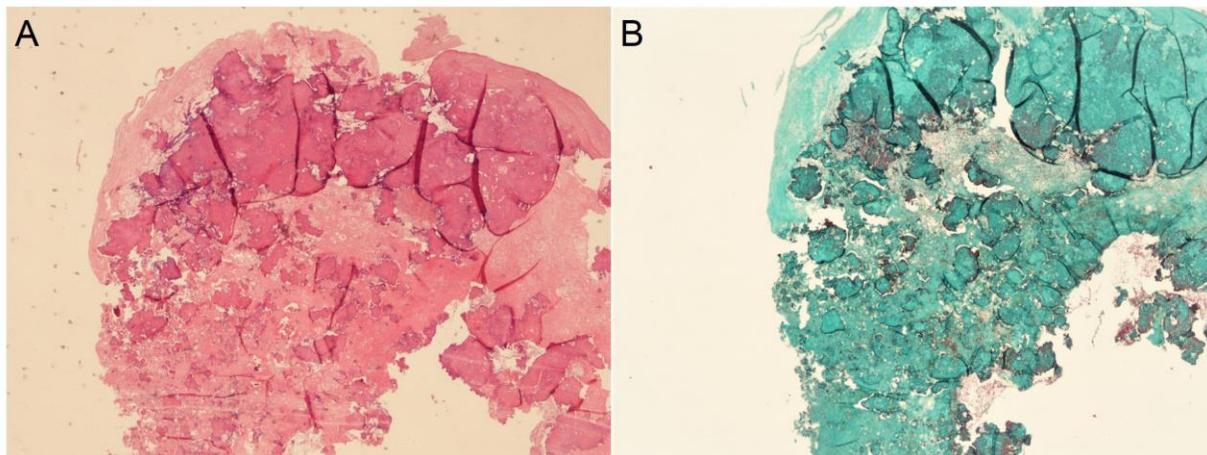


Figura 4. Noduli calcifici eruttivi. A) colorazione Ematossilina-Eosina; B) colorazione Tricromica di Masson. Ingrandimento 10x.



BIBLIOGRAFIA

1. Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation*. 2008 Jun 3;117(22):2938-48. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.743161.
2. Yip CY, Chen JH, Zhao R, Simmons CA. Calcification by valve interstitial cells is regulated by the stiffness of the extracellular matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Jun;29(6):936-42. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.182394. Epub 2009 Mar 19.
3. Tanimura A, McGregor DH, Anderson HC. Matrix vesicles in atherosclerotic calcification. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1983 Feb;172(2):173-7.
4. Karwowski W, Naumnik B, Szczepański M, Myśliwiec M. The mechanism of vascular calcification - a systematic review. *Med Sci Monit*. 2012 Jan;18(1):RA1-11.
5. Collett GD, Canfield AE. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ Res*. 2005 May 13;96(9):930-8.
6. Vengrenyuk Y, Carlier S, Xanthos S, Cardoso L, Ganatos P, Virmani R, Einav S, Gilchrist L, Weinbaum S. A hypothesis for vulnerable plaque rupture due to stress-induced debonding around cellular microcalcifications in thin fibrous caps. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 3;103(40):14678-83. Epub 2006 Sep 26.
7. Iribarren C, Sidney S, Sternfeld B, Browner WS. Calcification of the aortic arch: risk factors and association with coronary heart disease, stroke, and peripheral vascular disease. *JAMA*. 2000 Jun 7;283(21):2810-5.
8. Doherty TM, Fitzpatrick LA, Inoue D, Qiao JH, Fishbein MC, Detrano RC, Shah PK, Rajavashisth TB. Molecular, endocrine, and genetic mechanisms of arterial calcification. *Endocr Rev*. 2004 Aug;25(4):629-72.

9. Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation* 2008; 117: 2938-2948.
10. Tintut Y, Parhami F, Boström K, Jackson SM, Demer LL. cAMP stimulates osteoblast-like differentiation of calcifying vascular cells. Potential signaling pathway for vascular calcification. *J Biol Chem*. 1998 Mar 27;273(13):7547-53.
11. Tintut Y, Patel J, Territo M, Saini T, Parhami F, Demer LL. Monocyte/macrophage regulation of vascular calcification in vitro. *Circulation*. 2002 Feb 5;105(5):650-5.
12. Proudfoot D, Davies JD, Skepper JN, Weissberg PL, Shanahan CM. Acetylated low-density lipoprotein stimulates human vascular smooth muscle cell calcification by promoting osteoblastic differentiation and inhibiting phagocytosis. *Circulation*. 2002 Dec 10;106(24):3044-50
13. Schmidt HH, Hill S, Makariou EV, Feuerstein IM, Dugi KA, Hoeg JM. Relation of cholesterol-year score to severity of calcific atherosclerosis and tissue deposition in homozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol*. 1996 Mar 15;77(8):575-80.
14. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo JL, Swirski FK, Shtatland T, Kohler RH, Jaffer FA, Aikawa M, Weissleder R. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation*. 2007 Dec 11;116(24):2841-50. Epub 2007 Nov 26.
15. Doherty TM, Uzui H, Fitzpatrick LA, Tripathi PV, Dunstan CR, Asotra K, Rajavashisth TB. Rationale for the role of osteoclast-like cells in arterial calcification. *FASEB J*. 2002 Apr;16(6):577-82.
16. Doherty TM, Shah PK, Rajavashisth TB. Cellular origins of atherosclerosis: towards ontogenetic endgame? *FASEB J*. 2003 Apr;17(6):592-7.

17. Mönckeberg JG. Über die reine Mediaverkalkung der Extremitätenarterien und ihr Verhalten zur Arteriosklerose. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 1903;171:141-167.
18. Reaven PD, Sacks J; Investigators for the VADT. Coronary artery and abdominal aortic calcification are associated with cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2005 Feb;48(2):379-85. Epub 2005 Feb 2.
19. Okuno S, Ishimura E, Kitatani K, Fujino Y, Kohno K, Maeno Y, Maekawa K, Yamakawa T, Imanishi Y, Inaba M, Nishizawa Y. Presence of abdominal aortic calcification is significantly associated with all-cause and cardiovascular mortality in maintenance hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2007 Mar;49(3):417-25.
20. Mori H, Yamaguchi K, Fukushima H, Oribe Y, Kato N, Wakamatsu T, Uzawa H. Extensive arterial calcification of unknown etiology in a 29-year-old male. *Heart Vessels*. 1992;7(4):211-4.
21. Top C, Cankir Z, Silit E, Yildirim S, Danaci M. Mönckeberg's sclerosis: an unusual presentation--a case report. *Angiology*. 2002 Jul-Aug;53(4):483-6.
22. Goebel FD, Füessl HS. Mönckeberg's sclerosis after sympathetic denervation in diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetologia*. 1983 May;24(5):347-50.
23. Proudfoot D, Shanahan CM. Biology of calcification in vascular cells: intima versus media. *Herz*. 2001 Jun;26(4):245-51.
24. Pal SN, Golledge J. Osteo-progenitors in vascular calcification: a circulating cell theory. *J Atheroscler Thromb*. 2011;18(7):551-9. Epub 2011 May 6.

25. Campagnolo P, Wong MM, Xu Q. Progenitor cells in arteriosclerosis: good or bad guys? *Antioxid Redox Signal*. 2011 Aug 15;15(4):1013-27. doi: 10.1089/ars.2010.3506. Epub 2010 Nov 23.
26. Kassem M, Mosekilde L, Rungby J, Mosekilde L, Melsen F, Eriksen EF. Formation of osteoclasts and osteoblast-like cells in long-term human bone marrow cultures. *APMIS*. 1991 Mar;99(3):262-8.
27. Sata M, Tanaka K, Nagai R. Circulating osteoblast-lineage cells. *N Engl J Med*. 2005 Aug 18;353(7):737-8; author reply 737-8.
28. Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I, Kollet O, DiPersio JF, Link D, Devine S. Stem cell mobilization. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003:419-37.
29. Pignolo RJ, Kassem M. Circulating osteogenic cells: implications for injury, repair, and regeneration. *J Bone Miner Res*. 2011 Aug;26(8):1685-93. doi: 10.1002/jbmr.370. Epub 2011 May 2.
30. Pourrajab F, Forouzannia SK, Hekmatimoghadam SH, Kord MT. Molecular strategies contributing to efficient homing of bone marrow stem cells *Int J Cardiovasc Res* 2012;1:3.
31. Boström KI, Rajamannan NM, Towler DA. The regulation of valvular and vascular sclerosis by osteogenic morphogens. *Circ Res*. 2011 Aug 19;109(5):564-77.
32. Torsney E, Xu Q. Resident vascular progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2011 Feb;50(2):304-11. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.09.006. Epub 2010 Sep 17.
33. Hirschi KK, Goodell MA. Hematopoietic, vascular and cardiac fates of bone marrow-derived stem cells. *Gene Ther*. 2002 May;9(10):648-52.

34. Farrington-Rock C, Crofts NJ, Doherty MJ, Ashton BA, Griffin-Jones C, Canfield AE. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation*. 2004 Oct 12;110(15):2226-32. Epub 2004 Oct 4.
35. Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P, McGonagle D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum*. 2002 Dec;46(12):3349-60.
36. Xin H, Xin F, Zhou S, Guan S. The Wnt5a/Ror2 pathway is associated with determination of the differentiation fate of bone marrow mesenchymal stem cells in vascular calcification. *Int J Mol Med*. 2013 Mar;31(3):583-8. doi: 10.3892/ijmm.2013.1242. Epub 2013 Jan 15.
37. Liao J, Chen X, Li Y, Ge Z, Duan H, Zou Y, Ge J. Transfer of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells influences vascular remodeling and calcification after balloon injury in hyperlipidemic rats. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:165296. doi: 10.1155/2012/165296. Epub 2012 May 14.
38. Shao JS, Cai J, Towler DA. Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Jul;26(7):1423-30. Epub 2006 Apr 6.
39. Hruska KA, Mathew S, Lund RJ, Memon I, Saab G. The pathogenesis of vascular calcification in the chronic kidney disease mineral bone disorder: the links between bone and the vasculature. *Semin Nephrol*. 2009 Mar;29(2):156-65. doi: 10.1016/j.semnephrol.2009.01.008.

40. Kramann R, Couson SK, Neuss S, Kunter U, Bovi M, Bornemann J, Knüchel R, Jahnen-Dechent W, Floege J, Schneider RK. Exposure to uremic serum induces a procalcific phenotype in human mesenchymal stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Sep;31(9):e45-54. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.228601.
41. Balica M, Boström K, Shin V, Tillisch K, Demer LL. Calcifying subpopulation of bovine aortic smooth muscle cells is responsive to 17 beta-estradiol. *Circulation.* 1997 Apr 1;95(7):1954-60.
42. Tintut Y, Alfonso Z, Saini T, Radcliff K, Watson K, Boström K, Demer LL. Multilineage potential of cells from the artery wall. *Circulation.* 2003 Nov 18;108(20):2505-10. Epub 2003 Oct 27.
43. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature.* 1997 Mar 6;386(6620):78-81.
44. Cola C, Almeida M, Li D, Romeo F, Mehta JL. Regulatory role of endothelium in the expression of genes affecting arterial calcification. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jul 23;320(2):424-7.
45. Zhang Y, Cliff WJ, Schoefl GI, Higgins G. Immunohistochemical study of intimal microvessels in coronary atherosclerosis. *Am J Pathol.* 1993 Jul;143(1):164-72.
46. Guzman RJ. Clinical, cellular, and molecular aspects of arterial calcification. *J Vasc Surg.* 2007 Jun;45 Suppl A:A57-63.
47. Qiao JH, Tripathi J, Mishra NK, Cai Y, Tripathi S, Wang XP, Imes S, Fishbein MC, Clinton SK, Libby P, Lusis AJ, Rajavashisth TB. Role of macrophage colony-

- stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol.* 1997 May;150(5):1687-99.
48. Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Mar 1;23(3):489-94. Epub 2003 Jan 30.
49. Doherty MJ, Canfield AE. Gene expression during vascular pericyte differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1999;9(1):1-17.
50. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Mönckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation.* 1999 Nov 23;100(21):2168-76.
51. Sato K, Urist MR. Induced regeneration of calvaria by bone morphogenetic protein (BMP) in dogs. *Clin Orthop Relat Res.* 1985 Jul-Aug;(197):301-11.
52. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Lopez-Alonso A, Gonzalez R, Varela H. Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res.* 1992 Feb;(275):280-6.
53. Schor AM, Allen TD, Canfield AE, Sloan P, Schor SL. Pericytes derived from the retinal microvasculature undergo calcification in vitro. *J Cell Sci.* 1990 Nov;97 (Pt 3):449-61.
54. Brighton CT, Lorch DG, Kupcha R, Reilly TM, Jones AR, Woodbury RA 2nd. The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop Relat Res.* 1992 Feb;(275):287-99.

55. Shao JS¹, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest*. 2005 May;115(5):1210-20. Epub 2005 Apr 14.
56. Psaltis PJ, Puranik AS, Spoon DB, Chue CD, Hoffman SJ, Witt TA, Delacroix S, Kleppe LS, Mueske CS, Pan S, Gulati R, Simari RD. Characterization of a resident population of adventitial macrophage progenitor cells in postnatal vasculature. *Circ Res*. 2014 Jul 18;115(3):364-75.
57. Rocha-Singh KJ, Zeller T, Jaff MR. Peripheral arterial calcification: prevalence, mechanism, detection, and clinical implications. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2014 May 1;83(6):E212-20. doi: 10.1002/ccd.25387. Epub 2014 Feb 10.
58. Huang CL, Wu IH, Wu YW, Hwang JJ, Wang SS, Chen WJ, Lee WJ, Yang WS. Association of lower extremity arterial calcification with amputation and mortality in patients with symptomatic peripheral artery disease. *PLoS One*. 2014 Feb 26;9(2):e90201. doi: 10.1371/journal.pone.0090201. eCollection 2014.
59. Maniwa N, Kawarada O, Noguchi T, Yasuda S. Parallel Wire Technique With 40-g Tip-Load Guidewire for Severely Calcified Chronic Total Occlusion in the Infringuinal Artery: Heaviness Makes the Difference. *JACC Cardiovasc Interv*. 2016 Aug 22;9(16):e159-61. doi: 10.1016/j.jcin.2016.05.014. Epub 2016 Jul 27.
60. Laird J, Joye J, Sachdev N, Huang P, Caputo R, Mohiuddin I, Runyon J, Das T. Recanalization of infringuinal chronic total occlusions with the crosser system: results of the PATRIOT trial. *J Invasive Cardiol*. 2014 Oct;26(10):497-504.
61. Iida O, Soga Y, Yamauchi Y, Hirano K, Kawasaki D, Tazaki J, Yamaoka T, Suematsu N, Suzuki K, Shintani Y, Miyashita Y, Takahara M, Uematsu M. Anatomical predictors

- of major adverse limb events after infrapopliteal angioplasty for patients with critical limb ischaemia due to pure isolated infrapopliteal lesions. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2012 Sep;44(3):318-24.
62. Fanelli F, Cannavale A, Gazzetti M, Lucatelli P, Wlderk A, Cirelli C, d'Adamo A, Salvatori FM. Calcium burden assessment and impact on drug-eluting balloons in peripheral arterial disease. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2014 Aug;37(4):898-907. doi: 10.1007/s00270-014-0904-3. Epub 2014 May 9.
63. Tzafiriri AR, Garcia-Polite F, Zani B, Stanley J, Muraj B, Knutson J, Kohler R, Markham P, Nikanorov A, Edelman ER. Calcified plaque modification alters local drug delivery in the treatment of peripheral atherosclerosis. *J Control Release*. 2017 Oct 28;264:203-210. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.08.037. Epub 2017 Sep 1.
64. Weinberg I, Giri J, Calfon MA, Hawkins BM, Weinberg MD, Margey R, Hannon K, Schainfeld RM, Jaff MR. Anatomic correlates of supra-normal ankle brachial indices. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2013 May;81(6):1025-30. doi: 10.1002/ccd.24604. Epub 2013 Feb 12.
65. Ketteler M, Block GA, Evenepoel P, Fukagawa M, Herzog CA, McCann L, Moe SM, Shroff R, Tonelli MA, Toussaint ND, Vervloet MG, Leonard MB. Executive summary of the 2017 KDIGO Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Guideline Update: what's changed and why it matters. *Kidney Int*. 2017 Jul;92(1):26-36. doi: 10.1016/j.kint.2017.04.006.
66. Patel MR, Conte MS, Cutlip DE, Dib N, Geraghty P, Gray W, Hiatt WR, Ho M, Ikeda K, Ikeno F, Jaff MR, Jones WS, Kawahara M, Lookstein RA, Mehran R, Misra S, Norgren L, Olin JW, Povsic TJ, Rosenfield K, Rundback J, Shamoun F, Tcheng J, Tsai

- TT, Suzuki Y, Vranckx P, Wiechmann BN, White CJ, Yokoi H, Krucoff MW. Evaluation and treatment of patients with lower extremity peripheral artery disease: consensus definitions from Peripheral Academic Research Consortium (PARC). *J Am Coll Cardiol*. 2015 Mar 10;65(9):931-41. doi: 10.1016/j.jacc.2014.12.036.
67. Babiarz LS, Yousem DM, Bilker W, Wasserman BA. Middle cerebral artery infarction: relationship of cavernous carotid artery calcification. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2005 Jun-Jul;26(6):1505-11.
68. Pini R, Faggioli G, Fittipaldi S, Vasuri F, Longhi M, Gallitto E, Pasquinelli G, Gargiulo M, Stella A. Relationship between Calcification and Vulnerability of the Carotid Plaques. *Ann Vasc Surg*. 2017 May 4. pii: S0890-5096(16)31293-6. doi: 10.1016/j.avsg.2017.04.017. [Epub ahead of print]
69. Rutherford RB, Baker JD, Ernst C, Johnston KW, Porter JM, Ahn S, et al. Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: revised version. *J Vasc Surg* 1997;26:517-38.
70. Herisson F, Heymann MF, Chétiveaux M, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, Rouillon T, Krempf M, Lemarchand P, Heymann D, Gouëffic Y. Carotid and femoral atherosclerotic plaques show different morphology. *Atherosclerosis*. 2011 Jun;216(2):348-54. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.02.004. Epub 2011 Mar 1.
71. Heymann MF, Herisson F, Davaine JM, Charrier C, Battaglia S, Passuti N, Lambert G, Gouëffic Y, Heymann D. Role of the OPG/RANK/RANKL triad in calcifications of the atheromatous plaques: comparison between carotid and femoral beds. *Cytokine*. 2012 May;58(2):300-6. doi: 10.1016/j.cyto.2012.02.004. Epub 2012 Mar 7.

72. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 May;20(5):1262-75.
73. Falk E, Nakano M, Bentzon JF, Finn AV, Virmani R. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *Eur Heart J.* 2013 Mar;34(10):719-28. doi: 10.1093/eurheartj/ehs411. Epub 2012 Dec 13.
74. Kolodgie FD, Yahagi K, Mori H, Romero ME, Trout HH Rd, Finn AV, Virmani R. High-risk carotid plaque: lessons learned from histopathology. *Semin Vasc Surg.* 2017 Mar;30(1):31-43. doi: 10.1053/j.semvascsurg.2017.04.008. Epub 2017 Apr 27. Review.
75. Micheletti RG, Fishbein GA, Currier JS, Fishbein MC. Mönckeberg sclerosis revisited: a clarification of the histologic definition of Mönckeberg sclerosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2008 Jan;132(1):43-7. doi: 10.1043/1543-2165(2008)132[43:MSRACO]2.0.CO;2.
76. Vasuri F, Fittipaldi S, Pacilli A, Buzzi M, Pasquinelli G. The incidence and morphology of Monckeberg's medial calcification in banked vascular segments from a monocentric donor population. *Cell Tissue Bank.* 2016 Jun;17(2):219-23. doi: 10.1007/s10561-016-9543-z. Epub 2016 Jan 12.