

UPDATE SULLA PATOGENESI E SUL POSSIBILE APPROCCIO TERAPEUTICO ALLE CALCIFICAZIONI VASCOLARI NEL PAZIENTE CON INSUFFICIENZA RENALE

Marzia Pasquali, Lida Tartaglione, Silverio Rotondi, Maria Luisa Muci, Giuliana Pirrò, Sandro Mazzaferro

Dipartimento di Scienze Cardiovascolari, Respiratorie, Nefrologiche e Geriatriche dell'Università Sapienza di Roma, Roma

Update on the pathogenesis and possible therapeutic approach to vascular calcifications in patients with chronic renal failure

Chronic renal failure is a well-known risk condition for cardiovascular disease and in particular vascular calcifications. In fact, with respect to the normal population, where only "classic" risk factors have been described, kidney patients also have non-classic risk conditions. Among these, alterations in divalent ions, parathyroid hormone and vitamin D are of utmost importance. Further, several substances are recognized to have inhibitory or inductive effects in the pathogenesis of vascular calcifications, affecting either the calcium salts precipitation phenomenon or the phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells into osteoblast-like cells (the latter phenomenon being regarded as a determinant of calcification of the tunica media).

Given that vascular calcifications are irreversible, therapeutic strategies are aimed at preventing their formation or at blunting their progression (which is especially accelerated in renal patients). For this purpose it is essential to pursue optimal biochemical control of secondary hyperparathyroidism, but we must consider that in the individual patient the choice of drugs and their dosage can be essential for the development of calcifications. Given the physiological importance of inhibitory substances, we can hypothesize their future use in this setting. Finally, we must consider that by administering drugs known to interfere with inhibitors (like warfarin) or with the normal process of mineralization (like bisphosphonates), we can hypothetically favor or respectively prevent vascular calcifications.

Conflict of interest: None

KEY WORDS:

Vascular calcifications, CKD-MBD, Calcification Inhibitors, Chronic renal failure, Vitamin K dependent Proteins

PAROLE CHIAVE:

Calcificazioni vascolari, CKD-MBD, Inibitori delle calcificazioni, Insufficienza renale cronica, Proteine Vitamino K Dipendenti

Indirizzo degli Autori:

Prof. Sandro Mazzaferro
Dipartimento di Scienze Cardiovascolari, Respiratorie, Nefrologiche e Geriatriche
Viale del Policlinico 155
00161 Roma
e-mail: sandro.mazzaferro@uniroma1.it

INTRODUZIONE

Nei pazienti con insufficienza renale cronica (IRC) la prevalenza delle calcificazioni vascolari è maggiore rispetto alla popolazione generale (1) e rappresenta un fattore di rischio indipendente di mortalità cardiovascolare e per tutte le cause. Nell'ambito dell'IRC, il legame stretto tra alterazioni del metabolismo minerale, turnover osseo e insorgenza di calcificazioni vascolari viene compreso all'interno di una nuova sindrome descritta di recente: la "chronic kidney disease-mineral and bone disorders" o CKD-MBD.

Le calcificazioni vascolari sono il risultato di un processo attivamente regolato che si sviluppa in risposta a condizioni sia fisiologiche che patologiche. In

base alla sede della lesione se ne possono distinguere due tipi: della tonaca intima e della tonaca media (quest'ultima nota come Sclerosi di Moenckeberg).

Istologicamente, la calcificazione della tonaca intima è caratterizzata dalla deposizione di calcio nelle placche aterosclerotiche la cui formazione, nei pazienti con IRC, risulta accelerata rispetto alla popolazione generale. In queste lesioni fibroateromasiche, ricche di macrofagi e lipidi, localizzate nelle grosse arterie, elastiche e prossimali, il calcio si deposita sotto forma di lamine sia dure e friabili che spesse e resistenti. Alcuni Autori sostengono che l'interfaccia tra due zone di diversa densità della placca rappresenti la sede più frequente di rottura della lesione e, quindi,

il punto di partenza di eventuali emboli.

La calcificazione della tonaca media, non è esclusiva dell'IRC, ma è molto frequente in questi pazienti ed è caratterizzata dalla deposizione di cristalli di idrossiapatite, a livello delle arterie muscolari distali di medio e piccolo calibro, in assenza di depositi lipidici e fenomeni infiammatori. La deposizione del calcio può coinvolgere la parete vasale in forma continua (lunghi tratti del vaso) o segmentaria (quasi anulare) determinandone una progressiva rigidità, ma senza restringimento del lume vasale (2). Una variante particolarmente grave di calcificazione della tonaca media, che interessa le arteriole ed è causa di ulcerazioni cutanee, è la calcifilassi (*calcific uremic arteriopathy*).

Secondo alcuni Autori, le calcificazioni della tonaca media e dell'intima, descritte nei pazienti con IRC, sono da considerare entità distinte con conseguenze cliniche differenti e altrettanto differenti implicazioni prognostiche e terapeutiche (3). Altri, invece, sostengono che tale distinzione sia puramente accademica e che le calcificazioni vascolari in corso di IRC siano solo un'amplificazione del processo aterosclerotico e non un evento "non aterogenico" (4).

FATTORI PATOGENETICI DELLE CALCIFICAZIONI VASCOLARI

La patogenesi della malattia cardiovascolare, con particolare riguardo alle calcificazioni vascolari, è più complessa nell'IRC rispetto alla popolazione generale. Infatti, nell'ambito del rischio cardiovascolare, nei pazienti con insufficienza renale cronica, oltre ai fattori "classici" si associano fattori "non classici" specifici di questa popolazione (5) (Fig. 1).

I fattori "classici" sono legati soprattutto all'attivazione endoteliale e possono essere divisi in: a) non modificabili (età, sesso maschile, familiarità), b) controllabili (iperlipemia, ipertensione, diabete, stile di vita) e c) vari (omocisteinemia, carenza di estrogeni, lipoproteina A) (6). Rispetto alla popolazione generale, nei pazienti con IRC i fattori di rischio "classici" mostrano sia una maggiore prevalenza (7) che una maggiore importanza patogenetica. L'IRC, per esempio, favorisce l'aterosclerosi (8); infatti, la riduzione della funzione renale comporta lo sviluppo di uno stato infiammatorio sistemico (aumentati livelli di proteina C reattiva e altre proteine della fase acuta associate a riduzione di albumina e fetuina) e di alterazioni lipidiche che contribuiscono al danno endoteliale e alle calcificazioni vascolari.

I fattori "non classici" sono sostanzialmente costituiti dalle alterazioni elettrolitiche e ormonali derivate dalla perdita di funzione renale. Di particolare rilievo sono quelle che riguardano l'omeostasi del fosforo e

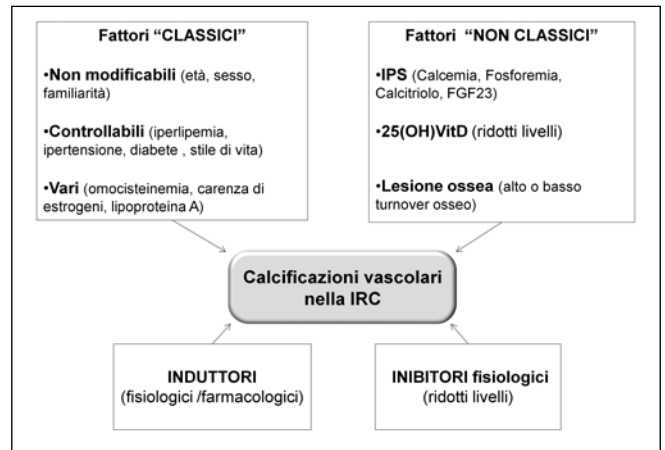


Fig. 1 - Principali fattori coinvolti nella patogenesi delle calcificazioni vascolari.

del calcio, che coinvolgono il paratormone e la Vitamina D e che sono genericamente definite iperparatiroidismo secondario (IPS) (9). Questa condizione metabolica è associata a un aumento delle calcificazioni vascolari e della mortalità cardiovascolare (10). Negli anni recenti, è emerso che anche le terapie dell'IPS (chelanti del fosforo a base di calcio, alte dosi di Vitamina D, elevate concentrazioni di Ca nel dialisato) possono contribuire a un bilancio positivo del calcio e/o del fosforo, tali da favorire le calcificazioni vascolari. Anche il tipo di malattia ossea presente può essere importante, dato che sia un *turnover* basso che uno alto sono considerati come condizioni di rischio (11). Infine, l'occorrenza di ipovitaminosi D, assai frequente nei nefropatici, risulta associata a un aumento della calcificazione coronarica (*Coronary Artery Calcification score* o CAC) (12).

ASPETTI BIOCHIMICI NELLA PATOGENESI DELLE CALCIFICAZIONI VASCOLARI

Anche dal punto di vista biochimico, la patogenesi delle calcificazioni è complessa e non ancora completamente chiarita. Fisiologicamente, i fluidi extracellulari sono soprassaturi di ioni calcio e fosforo, che non precipitano in forma cristallina perché la mineralizzazione dei tessuti è normalmente modulata da proteine, enzimi e strutture cellulari che, di volta in volta, facilitano o inibiscono il processo stesso. (Tab. I)

INDUTTORI FISIOLGICI DELLE CALCIFICAZIONI VASCOLARI

Il meccanismo patogenetico delle calcificazioni non prevede solamente la semplice precipitazione di sali di calcio, ma anche processi attivi che coinvolgono l'attività delle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC

TABELLA I - SCHEMA RIASSUNTIVO DEGLI INIBITORI E DEGLI INDUTTORI DEL PROCESSO DI CALCIFICAZIONE VASCOLARE

Induttori della calcificazione		Inibitori della calcificazione
	Fisiologici	
Calcio		Fetuna
Fosfato		Matrix Gla Protein
Pit 1		Gas 6
Cbfa 1		Pirofosfato
Osterix		Osteoprotegerina
Lipidi		Osteopontina
BMP2		BMP7
Matrix vesicles		Magnesio
Corpi apoptotici		Calciprotein particles
	Farmacologici	
Vitamina D		Bisfosfonati
Chelanti del fosforo a base di calcio		Pirofosfati
Warfarin		Acido Fosfonofornico
		Calcio-antagonisti
		Vitamina K

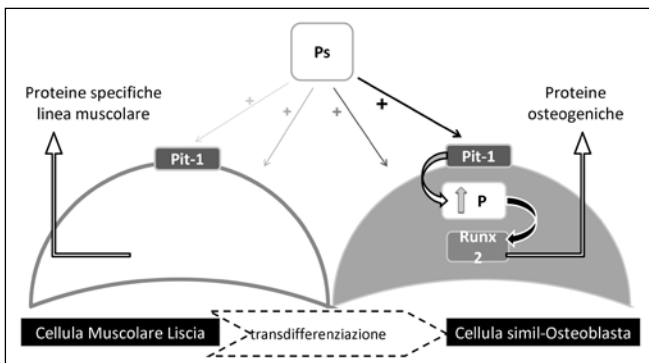


Fig. 2 - Ruolo degli elevati livelli di fosforemia nella trans differenziazione delle cellule muscolari lisce verso un fenotipo simil-osteoblasta. L'accumulo di fosforo intracellulare determina, nelle cellule muscolari lisce, l'attivazione di un fattore di trascrizione, il Cbfa-1/runx2, che regola l'espressione di proteine osteogeniche quali l'osteocalcina, l'osteopontina e l'osteoprotegerina; contemporaneamente, viene down-regolata l'espressione di proteine specifiche per la linea muscolare. L'esposizione a elevati livelli di fosforo ne favorisce l'ingresso nella cellula tramite up-regolazione dell'espressione di pit-1 (cotrasportatore Na/P di tipo III) generando un feedback positivo.

- *Vascular Smooth Muscle Cells*) (13).

Il fosforo è direttamente implicato. L'esposizione *in vitro* di VSMC ad alte concentrazioni di fosforo ne determina la trasformazione fenotipica in cellule simil osteoblastiche. L'accumulo di fosforo intracellulare determina, nelle VSMC, l'attivazione di un fattore di trascrizione, il Cbfa-1/runx2, che regola l'espressione di proteine osteogeniche quali l'osteocalcina, l'osteopontina e l'osteoprotegerina; contemporanea-

mente viene *down-regolata* l'espressione di proteine specifiche della linea muscolare (14) (Fig. 2). Studi su pazienti uremici hanno mostrato che le VSMC di vasi calcifici esprimono una serie di proteine osteoblastiche come l'osteopontina, le sialoproteine e la fosfatasi alcalina (15). Indipendentemente dai livelli di fosforemia, l'esposizione al siero uremico rappresenta uno stimolo per l'espressione da parte delle VSMC di Cbfa1 (16).

Anche il calcio può essere considerato un induttore fisiologico. Negli studi sperimentali, infatti, l'ambiente ricco di calcio, al pari del fosforo, aumenta i processi di calcificazione (17).

INDUTTORI FARMACOLOGICI DELLE CALCIFICAZIONI VASCOLARI

Varie terapie, correntemente impiegate nell'IRC, possono facilitare con meccanismi differenti le calcificazioni vascolari. L'aumentato assorbimento intestinale di calcio e fosforo indotto dall'uso del calcitriolo per la cura dell'IPS può costituire un fattore di sviluppo o peggioramento delle calcificazioni. L'uso di chelanti del fosforo a base di sali di calcio e le concentrazioni elevate di calcio nel bagno dialisi possono determinare bilanci positivi dello ione, teoricamente favorevoli alla calcificazione.

Tra i farmaci non implicati nel metabolismo degli

ioni divalenti occorre ricordare il Warfarin, la cui azione è quella di inibire l'attivazione, Vitamina K dipendente, dei fattori della coagulazione, specificamente inibendo il processo di gamma carbossilazione di queste proteine a livello epatico. Tuttavia, essendo questa inibizione aspecifica, si realizza anche su una serie di altre proteine genericamente definite Vitamina K dipendenti (VKDP) quali la *Matrix gla protein* (MGP), la *Growth arrest specific gene 6 protein* (Gas6) e l'Osteocalcina (o *Bone gla protein* - BGP). Tra queste, la MGP e la Gas6 sono inibitori fisiologici del processo di calcificazione, mentre la BGP, oltre che nel processo di mineralizzazione, è coinvolta anche nel metabolismo energetico (18). L'attività di queste proteine è legata alla loro carbossilazione Vitamina K dipendente, che avviene a livello periferico a opera della Vitamina K2 (menachinone), al contrario della carbossilazione epatica dei fattori della coagulazione che è catalizzata principalmente dalla Vitamina K1 (fillochinone). Esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che il Warfarin inibisce la carbossilazione di queste proteine (19) e che il suo uso *in vivo* comporta lo sviluppo di calcificazioni molto estese negli animali trattati. Poiché l'uso di basse dosi di Warfarin inibisce prevalentemente la carbossilazione delle proteine inibitrici della calcificazione piuttosto che quelle della coagulazione, è stata suggerita una particolare suscettibilità vascolare a questo tipo di terapia (20). In pazienti in emodialisi, il lungo trattamento con warfarin sembra associato alla severità delle calcificazioni della valvola aortica. D'altra parte, tali pazienti sembrano avere un deficit subclinico di Vitamina K come mostrato dai bassi livelli di fillochinone (21). Infine, le segnalazioni di aumento delle fratture con l'uso del Warfarin lasciano ipotizzare un possibile ruolo per l'inibizione della carbossilazione delle proteine coinvolte nei normali processi di mineralizzazione (22).

INIBITORI FISIOLGICI DELLA CALCIFICAZIONE

Come già accennato, la calcificazione dei tessuti extraossei è un processo che viene fisiologicamente inibito sia a livello locale che sistemico da numerose proteine che vale la pena di ricordare per sottolineare la complessità del fenomeno calcificazione.

Fetaina - Proteina negativa della fase acuta prodotta dal fegato, è un potente inibitore circolante delle calcificazioni. La sua azione non riguarda il semplice legame ionico con gli ioni calcio, ma è determinata dalla transitoria formazione di "sfere colloidali" contenenti Fetaina, Calcio e Fosfato chiamate "*Calciprotein Particles*" (CPP). Fisiologicamente, le particelle di calcio-fosfato si formano quando la concentrazione degli ioni supera il prodotto di solubilità. In questa

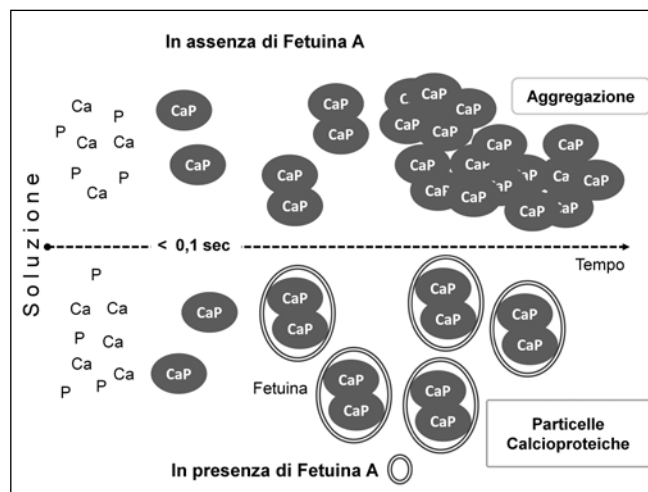


Fig. 3 - Ruolo della Fetaina-A nel processo di mineralizzazione. Una volta che la concentrazione degli ioni calcio e fosforo ha superato il prodotto di solubilità in brevissimo tempo si generano particelle di calcio-fosfato. In presenza di Fetaina-A queste particelle vengono stabilizzate per evitare un'ulteriore aggregazione, attraverso la formazione di particelle calcio proteiche (Calciprotein Particles). In assenza di Fetaina-A si formeranno, invece, grossi aggregati.

prima fase, che è molto rapida (<0.1 sec), la fetaina non sembra avere influenza ma, dopo l'aggregazione di queste prime particelle, essa interviene stabilizzando le particelle primarie attraverso la formazione di CPP. Queste ultime sono particolarmente stabili rispetto a ulteriori aggregazioni (Fig. 3). La capacità inibitoria della fetaina sulle calcificazioni è basata, quindi, sull'efficiente stabilizzazione di nuclei minerali nascenti (23). In termini biologici, ciò suggerisce che la fetaina, ricoperta di nuclei di calcio-fosfato, ritarderà la crescita di cristalli insolubili abbastanza a lungo da assicurare la mobilizzazione e la rimozione di sali di calcio altrimenti insolubili. Questo modello è meccanicisticamente simile alle ben conosciute particelle di lipoproteine, necessarie a solubilizzare i grassi nell'acqua plasmatica (24).

MGP - La *matrix gla protein* (MGP) è una proteina della matrice extracellulare che appartiene alla famiglia delle proteine con residui γ -carbossilati di acido glutammico (Gla). La γ -carbossilazione, Vitamina K dipendente, è importante per la sua azione. Inizialmente isolata dal tessuto osseo, la MGP è presente anche in circolo, ma è solo la produzione locale da parte delle VSMC che blocca la calcificazione (25). Il preciso meccanismo con il quale inibisce le calcificazioni vascolari non è del tutto chiaro, ma sembra consistere nell'impedire la supersaturazione del calcio, la cristallizzazione e l'aggregazione dei cristalli di idrossiapatite. Come la fetaina, anche la MGP partecipa alla formazione di complessi circolanti (costituiti da calcio, fosforo, fetaina e MGP) che prevengono la precipitazione, l'aggregazione e la crescita di componenti minerali (26). La MGP può, inoltre, legare

la BMP2 (*Bone Morphogenetic Protein*), un potente fattore osteoinduttivo, modulandone l'attività (27).

Gas-6 - La proteina *Growth arrest specific gene 6* (*Gas-6*) è prodotta, oltre che dalle piastrine, anche dalle cellule muscolari lisce vascolari. *Gas-6* è attiva, come la MGP, solo nella forma carbossilata Vitamina K dipendente e svolge un'azione antiapoptotica. Dato che i corpi apoptotici costituiscono dei nuclei per l'inizio dei processi di calcificazione, l'azione del *Gas-6* nei riguardi delle cellule VSMC è efficace nella prevenzione della calcificazione vascolare (28).

Pirofosfato Inorganico (PPi) - È il maggiore inibitore fisiologico delle calcificazioni vascolari. La sua azione è quella di inibire la formazione di cristalli di idrossiapatite. Si genera dall'idrolisi di un nucleotide trifosfato ad opera di una pirofosfatasi (*Nucleotide PyroPhosphatase* - NPP). La perdita della generazione di pirofosfato, come avviene in caso di inattivazione di NPP, provoca una calcificazione delle tonaca media (29). Anche un alterato trasporto intracellulare del pirofosfato, come si osserva nei topi nulli per *Ank*, un trasportatore intracellulare del pirofosfato, comporta lo sviluppo di calcificazioni. È stato dimostrato che, nei pazienti in dialisi, i livelli sierici di pirofosfato sono ridotti (30). Inoltre, gli elevati livelli di fosforemia, con la trasformazione fenotipica delle VSMC, inducono anche l'espressione di fosfatasi alcalina che è in grado di idrolizzare il PPi privandolo, così, delle sue proprietà inibitorie (31).

Osteoprotegerina (OPG) - Fa parte della famiglia dei recettori per *Tumor Necrosis Factor* ed è stata identificata per la prima volta come inibitore dell'osteoclastogenesi. Oltre che dall'osso, l'OPG è prodotta da differenti tessuti, inclusi il rene, il polmone e alcune cellule del sistema immunitario e cardiovascolare (32). Alcuni studi suggeriscono il ruolo dell'OPG come inibitore delle calcificazioni vascolari, ma i suoi effetti biologici non sono comunque ancora del tutto chiariti; probabilmente, una sua funzione importante nell'ambito delle calcificazioni vascolari è quella antiapoptotica. È possibile, inoltre, che l'OPG inibisca il processo di calcificazione vascolare *down-regolando* l'attività della fosfatasi alcalina (33).

L'OPG viene considerata sia un fattore di regolazione delle calcificazioni vascolari che un indicatore della malattia vascolare. Livelli circolanti di OPG sono, infatti, associati alla severità delle calcificazioni coronariche e sono un fattore di rischio indipendente per la progressione delle lesioni aterosclerotiche. Nei pazienti nefropatici, livelli elevati di OPG sono correlati con calcificazioni coronariche tanto nei pazienti in dialisi che nei trapiantati (34).

Osteopontina (OPN) - È una proteina ricca di acido aspartico la cui espressione è geneticamente ristretta all'osso, al rene e all'epitelio di rivestimento. Molti studi mostrano che il suo ruolo fisiologico più impor-

tante è il controllo della biomineralizzazione. L'OPN appare, comunque, un importante modulatore delle calcificazioni vascolari. Lega i cristalli di mineralizzazione inibendo il processo di calcificazione delle VSMC (35) e, per tale effetto, è necessaria la sua fosforilazione. È, in generale, ammesso che l'OPN abbia un ruolo multifunzionale nella fisiologia vascolare (36). Infatti l'OPN è una citochina proinfiammatoria che, dopo clivaggio ad opera di metalloproteinasi (MMP), aumenta il rimodellamento vascolare e regola l'angiogenesi. Inibitori a largo spettro delle MMP riducono l'accumulo di calcio nei vasi in modelli pre-clinici. Sembra, così, che l'attivazione o il clivaggio dell'OPN facilitino la deposizione di calcio e la mineralizzazione vascolare, mentre l'OPN non clivata e fosforilata ha un ruolo di inibizione.

Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP7) - Un ruolo particolare nella patogenesi delle calcificazioni vascolari è quello svolto dalla BMP-7, coinvolta nel mantenimento del fenotipo delle cellule muscolari lisce della parete vasale (37), effetto che potrebbe influenzare le calcificazioni vascolari. Dati sperimentali sono compatibili con l'ipotesi che la carenza di BMP-7, come descritta nell'insufficienza renale, sia una condizione favorente la calcificazione e che, al contrario, la sua somministrazione possa avere un ruolo terapeutico preventivo (38). La somministrazione sperimentale di BMP-7 è risultata in grado di prevenire le calcificazioni e di normalizzare il *turnover* osseo e la fosforemia (38).

Magnesio - *In vitro* il magnesio inibisce le calcificazioni vascolari (39) e interviene nella sintesi, rilascio e sensibilità tissutale al PTH. L'ipermagnesemia inibisce la secrezione di PTH. Numerosi studi clinici in pazienti nefropatici suggeriscono un'associazione inversa tra livelli sierici di magnesio e calcificazioni vascolari (40, 41); tuttavia, il ruolo terapeutico del magnesio deve ancora essere definito.

INIBITORI FARMACOLOGICI DELLE CALCIFICAZIONI VASCOLARI

Bisfosfonati - Sono analoghi non idrolizzabili del più potente inibitore fisiologico, il pirofosfato. In studi su animali sono stati usati con successo nel prevenire le calcificazioni vascolari (42). Sebbene ci possa essere un *link* diretto tra formazione ossea e calcificazione vascolare, studi *in vitro* hanno mostrato come l'effetto preventivo sulle calcificazioni vascolari sia legato all'azione inibitoria dei bisfosfonati a livello vasale, indipendentemente dal ruolo antiriassorbitivo sull'osso (43). La diversa efficacia posseduta dai differenti tipi di bisfosfonati nel prevenire le calcificazioni è stata evidenziata in modelli sperimentali di insufficienza renale. Tuttavia, l'effetto protettivo sulle CV si associa a un'inibizione della formazione e della mineralizzazione os-

see (44) certamente non desiderabile nei nefropatici.

Pirofosfati - L'uso farmacologico dei pirofosfati potrebbe essere ideale in quanto, oltre alla loro potente azione inibitrice sulle calcificazioni vascolari, non avrebbero un'influenza negativa sul metabolismo osseo. Infatti, la diffusa distribuzione della fosfatasi alcalina a livello osseo ne permette la pronta inattivazione a livello locale. In uno studio su ratti uremici, la somministrazione intraperitoneale di pirofosfati ha inibito le calcificazioni vascolari senza effetti negativi sull'osso (45).

Tuttavia, il pirofosfato non è al momento disponibile per l'uso nell'uomo.

Acido Fosfonofornico (PFA) - È un analogo non idrolizzabile del pirofosfato ma anche un inibitore del cotrasportatore Na/P tipo II, intestinale e renale (46). Il meccanismo con cui previene le CV è puramente fisicochimico e indipendente da ogni attività cellulare, compreso il trasporto di Pi.

Calcio-antagonisti - Le VSMC esprimono diversi tipi di canali ionici, alcuni dei quali sono fondamentali nel processo di calcificazione vascolare e nella formazione delle *matrix vesicles* (MVs). L'importanza dei flussi del calcio è stata dimostrata da studi in cui, bloccando l'attività dei canali del calcio annessina dipendenti, si osservava una diminuita attività della fosfatasi alcalina e una ridotta capacità delle MVs nell'iniziare il processo di mineralizzazione (47).

Il verapamil, inibitore dei canali del calcio tipo-L voltaggio dipendenti, inibisce la calcificazione di VSMC bovine, mentre i calcio-antagonisti diidropiridinici (nifedipina e nimodipina) non hanno mostrato tale effetto. Il pretrattamento delle cellule bovine con il verapamil determina una diminuzione dell'attività della fosfatasi alcalina nelle MVs e una ridotta capacità di tali ve-

scicole nella mineralizzazione del collagene di tipo I. Poiché sia il verapamil che le diidropiridine bloccano i canali del calcio tipo-L, il meccanismo con cui il verapamil inibisce le calcificazioni vascolari sembra essere diverso dal semplice blocco dell'attività dei suddetti canali. Il verapamil potrebbe, in maniera simile a quanto osservato anche per l'annexina, determinare nelle VSMC un'alterazione della struttura dello strato lipidico e, di conseguenza, alterare la formazione delle MVs e il processo di calcificazione (48).

Vitamina K - Le recenti scoperte sulle proteine γ -carbossilate e sul ruolo svolto dalla Vitamina K hanno stimolato studi sugli animali che hanno mostrato l'efficacia della supplementazione di questa vitamina nel ridurre le calcificazioni vascolari (49). In particolare, la Vitamina K2 (Menachinone), coinvolta nell'attivazione di proteine inibitrici della calcificazione, potrebbe rappresentare il composto ideale per la prevenzione delle calcificazioni, specialmente nelle isoforme a emivita più lunga. Tuttavia, gli studi attualmente disponibili sull'uomo non dimostrano un risultato certo.

MANIFESTAZIONI CLINICHE NELLE CALCIFICAZIONI VASCOLARI

L'impatto clinico delle calcificazioni vascolari può essere diverso a seconda del tipo e della localizzazione (3, 50) (Tab. II); in ogni caso, il risultato è un impatto importante su morbilità e mortalità, specialmente cardiovascolare.

Le calcificazioni intimali, o subendoteliali, si localizzano, con una distribuzione irregolare, nelle sedi in cui vi sono le tipiche alterazioni strutturali e funzionali dell'aterosclerosi con infiltrati di macrofagi e cellule

TABELLA II - MANIFESTAZIONI CLINICHE E CARATTERISTICHE ISTOPATOLOGICHE DELLE CALCIFICAZIONI VASCOLARI

Istotipo	Sede	Aspetti Anatomopatologici	Aspetti Fisiopatologici	Manifestazioni Cliniche
Calcificazioni intimali	Arterie di grosso e medio calibro elastiche, prossimali	Fibroateroma: macrofagi, lipidi + depositi di calcio sotto forma di lamine	Progressivo restringimento del lume vasale	Ischemia tissutale, ridotta perfusione delle coronarie, infarto
Calcificazioni tonaca media	Arterie di medio e piccolo calibro, muscolari, distali	Depositati di calcio in forma continua o segmentaria, in assenza di lipidi e infiammazione	Progressiva rigidità vasale per ridotta compliance vasale	LVH, insufficienza ventricolare sinistra, ipoperfusione delle coronarie
Calcifilassi	Arterie di piccolo calibro distali	Precipitazione di fosfato di calcio nei tessuti molli	Fibrosi endovascolare, trombosi e necrosi, progressivo restringimento del lume vasale	Noduli dolenti sottocutanei e placche, infarti cute e sottocute, ischemia e necrosi, setticemia

infiammatorie (51). Sono coinvolti numerosi mediatori dell'infiammazione che favoriscono fenomeni di vasospasmo, trombosi e proliferazione intimale, con possibili ulcerazioni o emorragie della placca fino all'occlusione del lume vasale. La manifestazione clinica tipica è rappresentata, pertanto, dall'ischemia tissutale e/o dall'infarto (52).

Le calcificazioni della tonaca media (sclerosi di Mönckeberg) sono caratterizzate da diffusi depositi minerali che coinvolgono l'intero albero arterioso, anche se tipicamente colpiscono le arterie elastiche di medio e piccolo calibro. Si tratta di lesioni frequenti nell'invecchiamento, particolarmente evidenti nei soggetti affetti da disordini metabolici, come la sindrome metabolica, il diabete o l'IRC (50, 51). Differentemente dalle calcificazioni intimali, quelle della tonaca media sono responsabili dell'irrigidimento della parete arteriosa e della progressiva perdita dell'efficienza vasale in termini di *compliance* e distensibilità (50). Le conseguenze cliniche sono lo sviluppo di ipertensione arteriosa sistolica, con aumento della pressione differenziale (o pressione pulsata), ipertrofia ventricolare sinistra e ipoperfusione coronaria, responsabili di insufficienza ventricolare sinistra (1, 51, 53).

La calcifilassi o CUA (*calcific uremic arteriolopathy*) rappresenta una grave forma sistemica di precipitazione di fosfato di calcio nei tessuti molli e nei relativi vasi. A differenza degli altri tipi di calcificazioni vascolari, interessa la tonaca media delle arterie di calibro più piccolo e si associa a trombosi vasale con successiva necrosi del tessuto adiposo sottocutaneo (54). Clinicamente, si manifesta con la comparsa di noduli dolenti sottocutanei e placche di colore rosso-astro o violaceo che possono provocare dolore intenso e progredire verso l'ischemia e la necrosi di ampie zone di tessuto. Le lesioni ulcerative possono infettarsi e causare setticemia fino alla morte. Le lesioni da calcifilassi vengono distinte in prossimali (addome, cosce e glutei) oppure distali (estremità). È anche possibile considerare: - le lesioni primarie caratterizzate da calcificazione delle arteriole, ispessimento dell'intima e stenosi del lume ma con manifestazione silente e a lenta evoluzione (anche diversi anni); - le lesioni secondarie caratterizzate da infarti della cute e del sottocute, responsabili dei quadri clinici acuti e severi. Si ritiene che le lesioni primarie, da sole, non siano in grado di produrre infarti, per i quali la trombosi e/o l'ipoperfusione sarebbero determinanti. Le lesioni secondarie sarebbero infatti favorite da alcune condizioni di ipoperfusione sistemica e/o locale come lo *shock*, le condizioni di ipotensione cronica e la compressione della cute (54). Fattori di rischio di calcifilassi sono: il sesso femminile, l'obesità, l'uso di farmaci anticoagulanti o immunosoppressori e le condizioni di ipercoagulabilità.

TERAPIA DELLE CALCIFICAZIONI VASCOLARI

Le calcificazioni vascolari sono considerate irreversibili e le segnalazioni di regressione sono perlopiù aneddotiche.

Molto rilevante è invece il problema della progressione delle calcificazioni vascolari che risulta particolarmente veloce nei nefropatici, specialmente se dializzati, e che viene spesso collegata a specifici atteggiamenti terapeutici (55).

Pertanto, le attuali strategie terapeutiche delle calcificazioni vascolari sono in buona sostanza rivolte alla prevenzione della loro insorgenza e/o della loro progressione. In tal senso, si ritiene fondamentale concentrare gli sforzi terapeutici per ottimizzare la cura della CKD-MBD, in modo da evitare quelle scelte terapeutiche considerate a rischio aumentato.

PREVENZIONE E TRATTAMENTO DELLA CKD-MBD

Chelanti del fosforo - La correzione dell'iperfosforemia mediante somministrazione orale di chelanti capaci di ridurre l'assorbimento intestinale dei fosfati è oggi considerata importante non tanto e non solo per prevenire l'IPS, quanto per limitare lo sviluppo e la progressione delle CV, innescata con il meccanismo diretto ricordato in precedenza. Tuttavia, negli ultimi anni, è stato segnalato il rischio di incrementare le calcificazioni vascolari con l'uso di chelanti a base di calcio, dato il loro effetto positivo sulla calcemia e sul bilancio di calcio. La produzione di nuovi chelanti privi di calcio, primo in ordine temporale il sevelamer, ha, pertanto, stimolato studi di confronto con chelanti classici. A parità di controllo dei livelli di fosforemia, la superiorità del nuovo farmaco rispetto al vecchio nella progressione delle calcificazioni vascolari non è ancora dimostrata con certezza. Infatti, mentre in due studi su pazienti incidenti (56) e prevalenti (57) in emodialisi il sevelamer (una resina che lega selettivamente il fosfato) ha mostrato di rallentare significativamente la progressione di CAC rispetto al trattamento con chelanti a base di calcio, altri due studi su pazienti prevalenti in emodialisi (58, 59) non hanno mostrato differenze significative. Invece, in pazienti in fase conservativa si sono osservate una progressione delle calcificazioni coronariche nei pazienti trattati con dieta ipofosforica o con chelanti a base di calcio e una sostanziale stabilità in quelli trattati con sevelamer (60). Per quest'ultimo farmaco occorre anche menzionare i cosiddetti effetti pleiotropici, quali la riduzione dei livelli di LDL colesterolo (61) o l'effetto favorevole sul *turnover* osseo, descritti in modelli animali (62), entrambi potenzialmente associati a un esito migliore delle calcificazioni vascolari.

Per altri chelanti privi di calcio quali il carbonato di lantanio non vi sono studi analoghi che ne valutino l'effetto sulle calcificazioni vascolari, mentre la loro efficacia nel controllo della fosforemia non si associa a un rischio aumentato di ipercalcemia (63, 64).

Pertanto, al momento della scelta del chelante del fosforo, diventa importante avere informazioni sulla presenza di calcificazioni vascolari e/o di fattori predisponenti. Infatti, malgrado la non certa superiorità dei chelanti senza calcio, in alcuni pazienti non sembra ragionevole aggiungere strategie terapeutiche considerate a rischio; in particolare nei soggetti che, sulla base di parametri clinici quali età, sesso, diabete, *turnover* osseo, presenza o meno di calcificazioni vascolari o valvolari e stato infiammatorio, possono essere giudicati a maggior rischio, sembra ragionevole usare chelanti privi di calcio (65).

Calciomimetici - I calciomimetici sono farmaci che aumentano la sensibilità del recettore per il calcio ai livelli circolanti dello ione, inibendo in tal modo la secrezione del PTH. Il cinacalcet, unico calciomimetico disponibile per l'uso clinico, è impiegato nei pazienti in dialisi per il trattamento dell'IPS. L'efficace (66) soppressione paratiroidea si associa, in genere, alla riduzione dei livelli sia di calcio che di fosforo (67), lasciando supporre un'influenza favorevole sulle CV (68). Studi sperimentali recenti indicano che i calciomimetici possono modulare l'attività metabolica delle VSMC influenzando così il processo di CV (69, 70). In modelli animali di IRC e di IPS il calciomimetico previene o riduce lo sviluppo di calcificazioni vascolari indotto dall'uso di alte dosi di Vitamina D.

Il ruolo del cinacalcet sulla progressione delle calcificazioni è stato valutato in uno studio prospettico condotto in una popolazione di pazienti in emodialisi con IPS. Rispetto al gruppo in terapia convenzionale, i pazienti randomizzati all'uso di cinacalcet più basse dosi di vitamina D avevano una non significativa riduzione della progressione delle CV (valutata con *Tc multi slice*) (71).

Vitamina D e analoghi - Il ruolo principale della vitamina D nella terapia delle CV è prevalentemente quello di correggere l'iperparatiroidismo secondario (IPS). L'attività del calcitriolo sui recettori intestinali ne limita l'uso, poiché l'incremento eccessivo dell'assorbimento intestinale del calcio e del fosforo comporta un aumento del rischio di CV. Per tale motivo, sono stati prodotti composti analoghi, come il Paricalcitol, con maggiore selettività recettoriale per le cellule paratiroidi e minore azione intestinale. È prevedibile che il controllo dell'IPS, senza aumento del rischio di ipercalcemia e iperfosforemia, non aumenti il rischio di calcificazioni.

Va anche segnalato che l'ubiquitarità dei recettori della vitamina D nell'organismo consente di ipotizzare significativi effetti pleiotropici, tra i quali alcuni, per

esempio quelli diretti sui macrofagi, sarebbero potenzialmente favorevoli rispetto alle CV (72).

INIBITORI DELLE CALCIFICAZIONI VASCOLARI

L'importante ruolo degli inibitori delle CV è stato già descritto nel capitolo della patogenesi ed è intuibile che l'uso di tali sostanze sarebbe di estrema utilità soprattutto nella prevenzione e nelle condizioni di aumentato rischio. Per quanto riguarda gli inibitori fisiologici, non vi sono, attualmente, studi di utilizzo terapeutico nell'uomo.

Tra gli inibitori farmacologici, i bisfosfonati hanno mostrato in studi nell'uomo dati contrastanti. Infatti non erano evidenti effetti sulla progressione della CAC in soggetti con funzione renale normale (73) né in soggetti con insufficienza renale 3°-4° stadio (74), mentre, nei soggetti con insufficienza renale in dialisi, l'uso dell'Etidronato è risultato efficace nella riduzione dell'estensione e della progressione delle calcificazioni coronariche (CAC) (75). Tuttavia, occorre ricordare che i bisfosfonati, data la loro *clearance* renale, possono accumularsi nell'insufficienza renale ed essere responsabili di effetti negativi sull'osso (inibizione della mineralizzazione e del *turnover*) con una possibilità concreta di sviluppo di osso adinamico (44), che è ritenuto una condizione di rischio di sviluppo di calcificazioni.

TERAPIA DELLA "CALCIFIC UREMIC ARTERIOLOPATHY" – CUA

Il trattamento della CUA merita una menzione a parte essendo una terapia prevalentemente sintomatica, basata sulla gestione ottimale delle lesioni cutanee, un'adeguata terapia antibiotica e il controllo del dolore, necessari per cercare di evitare ulteriori complicanze e migliorare la tolleranza del paziente (54).

La terapia eziologica è empirica e prevede l'uso isolato o simultaneo di sodio tiosolfato, bisfosfonati e cinacalcet, oltre all'impiego della camera iperbarica.

Il *Sodio tiosolfato* favorirebbe la solubilizzazione dei depositi di calcio oltre ad avere potenziali effetti antiossidanti (attraverso la rigenerazione del glutatione) e di miglioramento della funzione endoteliale. Somministrato per via endovenosa a fine trattamento emodialitico, può presentare vari effetti collaterali (nausea, vomito, cefalea, rinorrea, acidosi metabolica, allucinazioni, confusione mentale, disturbi muscoloscheletrici, ipo- o ipertensione arteriosa) (76).

I *Bisfosfonati*, sia il pamidronato per via e.v. che l'etidronato p.o., sono stati usati con successo in alcuni pazienti. Il meccanismo d'azione non è chiaro, ma prevede l'inibizione del processo di calcificazione e la riduzione dell'attività macrofagica e della secrezio-

ne di citochine pro-infiammatorie (IL-6 e IL-1). Nei casi trattati, le reazioni avverse sono, in genere, modeste.

Il *Cinacalcet* potrebbe migliorare il quadro clinico delle calcificazioni per il rapido effetto soppressivo della secrezione paratiroidea associato alla contemporanea riduzione dei livelli di calcemia e fosforemia (77).

In effetti, fino a pochi anni fa, la *Paratiroidectomia* era considerata la terapia di elezione della calcifilassi nella cui patogenesi si riteneva fosse determinante l'ipersecrezione paratiroidea. Tuttavia, negli anni più recenti, la descrizione di casi associati con l'osso adinamico o con l'uso di farmaci (*Warfarin*) ha ridimensionato l'ipotesi patogenetica e il ruolo terapeutico della chirurgia (78).

Occorre, infine, ricordare la terapia di ossigenazione iperbarica che verosimilmente non interviene sui processi di calcificazione, ma, piuttosto, su quelli di trofismo dei tessuti necrotici (79).

CONCLUSIONI

Da quanto esposto, emerge che il fenomeno della calcificazione è molto complesso e regolato da numerosi fattori sia favorevoli che inibenti. È interessante considerare la presenza di particelle proteiche che servono a trasportare il Ca nel sangue per non farlo precipitare e che è verosimile un'interazione di queste calcio-proteine con il turnover osseo. Pertanto, le alterazioni del metabolismo minerale, oggetto principale dei nostri sforzi terapeutici, rappresentano solo una parte di un complesso meccanismo di regolazione del trasporto e della deposizione minerale nei tessuti. Non abbiamo ancora terapie in grado di far regredire le lesioni già stabilite. Tuttavia, gli sforzi tendenti a comprendere la patogenesi sono fondamentali per indirizzare le ricerche future. Al momento, la migliore strategia è quella preventiva e prevede la correzione delle alterazioni biochimiche note per essere associate con le calcificazioni (in termini sia di sviluppo che di progressione). In tal senso, le scelte terapeutiche per la cura dell'IPS possono avvantaggiarsi delle conoscenze fisiopatologiche attualmente disponibili.

RIASSUNTO

L'insufficienza renale cronica rappresenta una condizione di rischio per lo sviluppo di malattie cardiovascolari e, in particolare, di calcificazioni vascolari. Infatti, rispetto ai soggetti normali, nei quali si riconoscono fattori di rischio "classici", nei nefropatici esistono fattori "non classici", peculiari della condizione uremica. Tra questi, le alterazioni degli ioni divalenti, del paratormone e della Vitamina D giocano un ruolo ritenuto oggi determinante. Di rilievo, nella patogenesi delle calcificazioni vascolari, è anche il ruolo svolto da varie sostanze dotate di azione induttrice o inibitrice sia del fenomeno di precipitazione dei sali di calcio che del fenomeno di trasformazione fenotipica delle cellule muscolari lisce della parete vasale (da cellula muscolare a cellula simil-osteoblastica), fenomeno, questo, ritenuto decisivo nella degenerazione calcifica della tunica media vasale.

Poiché le calcificazioni vascolari sono sostanzialmente irreversibili e i casi di regressione sono perlopiù aneddotici, le strategie terapeutiche sono rivolte alla prevenzione della loro formazione e al rallentamento della loro progressione (che risulta particolarmente veloce nei nefropatici). A tale scopo, è certamente prioritario cercare di conseguire un controllo ottimale dell'iperparatiroidismo secondario, ma occorre tenere presente che, nel singolo paziente, la scelta dei farmaci e delle dosi di impiego può essere critica ai fini dell'evoluzione delle calcificazioni. L'importante ruolo fisiologico riconosciuto agli inibitori della calcificazione lascia ipotizzare un loro possibile impiego, sia preventivo che terapeutico; tuttavia, al momento attuale, questa è solo una possibilità teorica. Va infine ricordato che, impiegando farmaci interferenti con gli inibitori delle calcificazioni (per esempio, gli anticoagulanti) o con i normali processi di mineralizzazione ossea (come i bisfosfonati), è teoricamente possibile rispettivamente favorire o prevenire le calcificazioni vascolari.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

BIBLIOGRAFIA

1. London GM, Guerin AP, Marchais S, Metivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: Impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1731-40.
2. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res* 2006; 99: 1044-59.
3. Amann K. Media Calcification and Intima Calcification Are Distinct Entities in Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2008; 3: 1599-605.
4. Mc Cullough PA, Agrawal V, Danielewicz E, Abela GS. Accelerated atherosclerotic calcification and Monckeberg's sclerosis: a continuum of advanced vascular pathology in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3 (6): 1585-98.
5. William G, Goodman MD, Gerard London MD, on behalf of the Vascular Calcification Work Group. Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis* 2004; 43: 572-9.

6. Neaton JD, Wentworth D. Serum cholesterol, blood pressure, cigarette smoking, and death from coronary heart disease: overall findings and differences by age for 316,099 white men. *Arch Intern Med* 1992; 152 (1): 56-64.
7. Zoccali C, Tripepi C, Mallamaci F. Predictors of cardiac death in ESRD. *Semin Nephrol* 2005; 25: 358-62.
8. Kennedy R, Case C, Fathi R, et al. Does renal failure cause an atherosclerotic milieu in patients with end-stage renal disease? *Am J Med* 2001; 110: 198-204.
9. Mazzaferro S, Pasquali M, Tartagliola L, Rotondi S, Pirrò G. Fisiopatologia dell'iperparatiroidismo secondario: ruolo di fgf23. [Pathophysiology of secondary hyperparathyroidism: the role of FGF23 and Klotho]. *G Ital Nefrol* 2009; 26 (Suppl. 49): S11-7.
10. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, et al. Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med* 2000; 342: 1478-83.
11. London GM, Marty C, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F, De Vernejoul MC. Arterial Calcifications and Bone Histomorphometry in End-Stage Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15 (7): 1943-51.
12. London GM, Guérin AP, Verbeke FH, et al. Mineral metabolism and arterial functions in end-stage renal disease: potential role of 25-hydroxyvitamin D deficiency. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18 (2): 613-20.
13. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, et al. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: muscle cell phenotypic transition associated with calcification: Upregulation of Cbfa1 and Downregulation of Smooth Muscle Lineage Markers. *Circ Res* 2001; 89 (12): 1147-54.
14. Jono S, McKee MD, Murry CE, et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell. *Circ Res* 2000; 87 (7): E10-7.
15. Moe SM, O'Neill KD, Duan D, et al. Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix protein. *Kidney Int* 2002; 61 (2): 638-47.
16. Moe SM, Duan D, Doehle BP, O'Neill KD, Chen NX. Moe, Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney Int* 2003; 63 (3): 1003-11.
17. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, et al. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15 (11): 2857-67.
18. Idelevich A, Rais Y, Ornan EM. Bone Gla Protein Increases HIF-1[alpha]-Dependent Glucose Metabolism and Induces Cartilage and Vascular Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 14 [Epub ahead of print].
19. Schurgers LJ, Spronk HM, Skepper JN, et al. Posttranslational modifications regulate matrix Gla protein function: importance for inhibitions of vascular smooth muscle cell calcification. *J Thromb Haemost* 2007; 5 (12): 2503-11.
20. Hara K, Kobayashi M, Akiyama Y. Comparison of inhibitory effects of warfarin on gamma-carboxylation between bone and liver in rats. *J Bone Miner Metab* 2005; 23 (5): 366-72.
21. Pilkey RM, Morton AR, Boffa MB, et al. Subclinical vitamin K deficiency in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2007; 49 (3): 432-9.
22. Gage BF, Birman-Deych E, Radford MJ, Nilasana DS, Binder EF. Risk of osteoporotic fracture in elderly patients taking warfarin, results from the nationale registry of atrial fibrillation 2. *Arch Intern Med* 2006; 166 (2): 241-6.
23. Rochette CN, Rosenfeldt S, Heiss A, et al. A Shielding Topology Stabilizes the Early Stage Protein-Mineral Complexes of Fetuin-A and Calcium Phosphate: A Time-Resolved Small-Angle X-ray Study. *Chem Bio Chem* 2009; 10 (4): 735-40.
24. Heiss A, DuChesne A, Denecke B, et al. Structural Basis of Calcification Inhibition by α 2-HS Glycoprotein/Fetuin-A Formation of colloidal calciprotein particles. *J Biol Chem* 2003; 278 (15): 13333-41.
25. Murshed M, Schinke T, McKee MD, Karsenty G. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol* 2004; 165 (5): 625-30.
26. Price PA, Thomas GR, Pardini AW, et al. Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix Gla protein in the serum of etidronate-treated rats. *J Biol Chem* 2002; 277 (6): 3926-34.
27. Zebboudj AF, Imura M, Boström K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Cell Biochem* 2002; 277 (6): 4388-94.
28. Melaragno MG, Cavet ME, Yan C, et al. Gas6 inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cell: role of axl kinase and akt. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37 (4): 881-7.
29. Johnson K, Polewski M, van Etten D, Terkeltaub R. Chondrogenesis mediated by PPI depletion promotes spontaneous aortic calcification in NPP -/- null mice. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2005; 25 (4): 686-91.
30. Lomashvili KA, Khawandi W, O'Neill WC. Reduced plasma pyrophosphate levels in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2004; 16 (8): 2495-500.
31. Lomashvili KA, Garg P, Narisawa S, Millan JL, O'Neill WC. Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: potential mechanism for uremic vascular calcification. *Kidney Int* 2008; 73 (9): 1024-30.
32. Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Cir Res* 2004; 95 (11): 1046-57.
33. Orita Y, Yamamoto H, Kohno N, et al. Role of opg in arterial calcification. Development of new animal model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27 (9): 2058-64.
34. Mazzaferro S, Pasquali M, Pugliese F, et al. Serum levels of calcification inhibition proteins and coronary artery calcium score: comparison between transplantation and dialysis. *Am J Nephrol* 2007; 27 (1): 75-83.
35. Wada T, McKee MD, Steitz S, Giachelli CM. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: Inhibition by osteopontin. *Cir Res* 1999; 84 (2): 166-78.
36. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2007; 27 (11): 2302-9.
37. Dorai H, Vukicevic S, Sampath TK. Bone morphogenetic protein-7 (Osteogenic protein-1) inhibits smooth muscle cell proliferation and stimulates the expression of markers that are characteristic of SMC phenotype in vitro. *J Cell Physiol* 2000; 184 (1): 37-45.
38. Lund KJ, Davies MR, Brown AJ, Hruska KA. Successful treatment of an adynamic bone disorder with bone morphogenetic protein-7 in a renal ablation model. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15 (2): 359-69.
39. Boskey AL, Posner AS. Effect of magnesium on lipid-induced calcification. An in vitro model for bone mineralization. *Calcif Tissue Int* 1980; 32: 139-43.
40. Tzanakis I, Virvidakis K, Tsomei AA, et al. Intra- and extracellular magnesium levels and atheromatosis in haemodialysis patients. *Magnes Res* 2004; 17: 102-8.
41. Ishimura E, Okuno S, Kitatani K, et al. Significant association between the presence of peripheral vascular calcification and lower serum magnesium in hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 2007; 68 (4): 222-7.
42. Francis MD, Russell RG, Fleisch H. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathologic calcification in vivo. *Science* 1969; 165 (899): 1264-6.
43. Lomashvili KA, Monier-Faugere MC, Wang X, Malluche HH, O'Neill WC. Effect of bisphosphonates on vascular calcification and bone metabolism in experimental renal failure. *Kidney Int* 2009; 75 (6): 617-25.
44. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 1998; 19 (1): 80-100.
45. O'Neill WC, Lomashvili KA, Malluche HH, Faugere MC, Ri-

- ser BL. Treatment with pyrophosphate inhibits uremic vascular calcification. *Kidney Int* 2011; 79 (5): 512-7.
46. Villa-Bellosta R, Sorribas V. Role of rat sodium/phosphate co-transporters in the cell membrane transport of arsenate. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 232 (1): 125-34.
 47. Chen NX, O'Neill KD, Chen X, Moe SM. Annexin mediated matrix vesicle calcification in vascular smooth muscle cells. *J Bone Miner Res* 2008; 23 (11): 1798-805.
 48. Chen NX, Kircelli F, O'Neill KD, Chen X, Moe SM. Verapamil inhibits calcification and matrix vesicle activity of bovine vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 2009; 77 (5): 436-42.
 49. Schurgers LJ, Teunissen KJ, Hamulyák K, Knapen MH, Vik H, Vermeer C. Vitamin K containing dietary supplements: comparison of synthetic vitamin K1 and natto derived menaquinone-7. *Blood* 2007; 109 (8): 3279-83.
 50. London GM. Cardiovascular Calcification in Uremic Patients: Clinical Impact on Cardiovascular Function. *J Am Nephrol* 2003; 14 (9 Suppl. 4): S305-9.
 51. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular Calcification: Pathobiological Mechanism and Clinical Implication. *Circ Res* 2006; 99: 1044-59.
 52. Cannata-Andia JB, Rodriguez-Garcia M, Carrilo-López N, Naves-Díaz M, Díaz-López B. Vascular Calcification: Pathogenesis, Management, and Impact on Clinical Outcomes. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: S267-73.
 53. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM. Arterial Calcification, Arterial Stiffness, and Cardiovascular Risk in End-Stage Renal Disease. *Hypertension* 2001; 38 (4): 938-42.
 54. Janigan DT, Hirsch DJ, Klassen GA, MacDonald AS. Calcified Subcutaneous Arterioles With Infarcts of the Subcutis and Skin ("Calciophilaxis") in Chronic Renal Failure. *Am J Kidney Dis* 2000; 4 (35): 588-97.
 55. Mazzaferro S, Pasquali M, Taggi F, et al. Progression of Coronary Artery Calcification in Renal Transplantation and the Role of Secondary Hyperparathyroidism and Inflammation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4 (3): 685-90.
 56. Block GA, Spiegel DM, Ehrlich J, et al. Effects of sevelamer and calcium on coronary artery calcification in patients new to hemodialysis. *Kidney Int* 2005; 68 (4): 1815-24.
 57. Chertow GM, Burke SK, Raggi P. Treat to Goal Working Group: Sevelamer attenuates the progression of coronary and aortic calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2002; 62 (1): 245-52.
 58. Qunibi W, Moustafa M, Muenz LR, et al. A 1-year randomized trial of calcium acetate versus sevelamer on progression of coronary artery calcification in emodialysis patients with comparable lipid control: The Calcium Acetate Renagel Evaluation-2 (CARE-2) study. *Am J Kidney Dis* 2008; 51 (6): 952-65.
 59. Barreto DV, Barreto Fde C, de Carvalho AB, et al. Phosphate binder impact on bone remodeling and coronary calcification: Results from the BRIC study. *Nephron Clin Pract* 2008; 110 (4): c273-83.
 60. Russo D, Miranda I, Ruocco C, et al: The progression of coronary artery calcification in predialysis patients on calcium carbonate or sevelamer. *Kidney Int* 2007; 72 (10): 1255-61.
 61. Boaz M, Katzir Z, Schwartz D, et al. Effect of Sevelamer Hydrochloride Exposure on Carotid Intima Media Thickness in Hemodialysis Patients. *Nephron Clin Pract* 2011; 117 (2): c83-8.
 62. Mathew S, Lund RJ, Strebeck F, et al. Reversal of the Adynamic Bone Disorder and Decreased Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease by Sevelamer Carbonate Therapy. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18 (1): 122-30.
 63. Noto L. Lanthanum Carbonate Provides Control of Phosphorus Levels in Patients New to Phosphate Binder Therapy and Patients Changed From Other Phosphate Binders. *J Ren Nutr* 2010; 21 (3): 277-82.
 64. Arenas MD, Rebollo P, Malek T, et al. A comparative study of 2 new phosphate binders (sevelamer and lanthanum carbonate) in routine clinical practice. *J Nephrol* 2010; 23 (6): 683-92.
 65. Cozzolino M, Mazzaferro S, Brandenburg V. The treatment of hyperphosphataemia in CKD: calcium-based or calcium-free phosphate binders? *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26 (2): 402-7.
 66. Block GA, Martin KJ, de Francisco AL, et al. Cinacalcet for secondary hyperparathyroidism in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med* 2004; 350 (15): 1516-25.
 67. De Francisco AL, Piñera C, Palomar R, et al. Impact of treatment with calcimimetics on hyperparathyroidism and vascular mineralization. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(12 Suppl. 3): S281-5.
 68. Henley C, Colloton M, Cattley RC, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 but not cinacalcet HCl (Sensipar/Mimpara) treatment mediates aortic calcification in a rat model of secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20 (7): 1370-7.
 69. Ivanovski O, Nikolov IG, Joki N, et al. The calcimimetic R-568 retards uremia-enhanced vascular calcification and atherosclerosis in apolipoprotein E deficient (apoE-/-) mice. *Atherosclerosis* 2009; 205 (1): 55-62.
 70. Lopez I, Mendoza FJ, Guerrero F, et al. The calcimimetic AMG 641 accelerates regression of extraosseous calcification in uremic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296 (6): F1376-85.
 71. Raggi P, Chertow GM, Torres PU, et al. On behalf of the ADVANCE Study Group. The ADVANCE study: a randomized study to evaluate the effects of cinacalcet plus low-dose vitamin D on vascular calcification in patients on hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26 (4): 1327-39.
 72. Li X, Speer MY, Yang H, et al. Vitamin D receptor activators induce an anticalcific paracrine program in macrophages: requirement of osteopontin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30 (2): 321-6.
 73. Tankó LB, Qin G, Alexandersen P, Bagger YZ, Christiansen C. Effective doses of ibandronate do not influence the 3-year progression of aortic calcification in elderly osteoporotic women. *Osteoporos Int* 2005; 16 (2): 184-90.
 74. Toussaint ND, Lau KK, Strauss BJ, Polkinghorne KR, Kerr PG. Effect of alendronate on vascular calcification in CKD stages 3 and 4: a pilot randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis* 2010; 56 (1): 57-68.
 75. Nitta K, Akiba T, Suzuki K, Uchida K, Watanabe R, Majima K, Aoki T, Nihei H. Effects of cyclic intermittent etidronate therapy on coronary artery calcification in patients receiving long-term hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2004; 44 (4): 680-8.
 76. Cicone JS, Petronis JB, Embert CD, Spector DA. Successful treatment of calciophylaxis with intravenous sodium thiosulfate. *Am J Kidney Dis* 2004; 43 (6): 1104-8.
 77. Raymond CB, Wazny LD. Sodium thiosulfate, bisphosphonates, and cinacalcet for treatment of calciophylaxis. *Am J Health Syst Pharm* 2008; 65 (15): 1419-29.
 78. Giroto JA, Harmon JW, Ratner LE, Nicol TL, Wong L, Chen H. Parathyroidectomy promotes wound healing and prolongs survival in patients with calciophylaxis from secondary hyperparathyroidism. *Surgery* 2001; 130 (4): 645-50.
 79. Dean SM, Werman H. Calciophylaxis: a favourable outcome with hyperbaric oxygen. *Vasc Med* 1998; 3 (2): 115-20