

ارجحیت تشخیصی رنگ آمیزی آلیزارین رداس برای تشخیص کلسیفیکاسیونهای عروقی ناشی از مونکبرگ اسکروزیس

محمد افشار، Ph.D.*، ناصر طیبی، Ph.D.**، سکینه عمویی، Ph.D.**، محمد جعفر گلعلی پور، Ph.D.**

* گروه بافت شناسی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند

** گروه پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

*** بخش بافت شناسی و جنین شناسی دانشگاه علوم پزشکی گرگان

تاریخ وصول: آبان ماه ۸۴، تاریخ پذیرش: دی ماه ۸۴

چکیده

هدف: معرفی روش آلیزارین رداس به منظور تشخیص اولیه کلسیفیکاسیون عروقی به جای رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین روی برشهای بافتی

مواد و روشها: مقاطع پارافینی رحم مربوط به ۲۰ خانم بامیانگین سنی 53 ± 4 سال که هیستریکتومی شده بودند با استفاده از دو تکنیک هماتوکسیلین - ائوزین (H & E) و آلیزارین رداس (ARS) رنگ آمیزی شدند. برای H&E برشها با هماتوکسیلین مایر (pH 2.3) به مدت ۵ دقیقه و ائوزین الکلی (pH 4.1) به مدت ۱ دقیقه رنگ آمیزی شدند. برای ARS از محلول آبی آلیزارین رداس ۱ درصد با pH تنظیم شده $6/4$ به همراه رنگ زمینه آبی آنیلین استفاده شد. برای هر نمونه ۴ برش به صورت تصادفی مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت.

یافته‌ها: کریستالهای ظریف ناشی از کلسیفیکاسیون در جدار مدیای عروقی که توسط ARS رنگ آمیزی شده بودند به راحتی قابل تشخیص بودند ولی این کریستالها در رنگ آمیزی H&E تشخیص داده نمی شدند. میانگین تعداد عروق کلسیفیه در رنگ آمیزی ARS ($1/34 \pm 1/18$ Mean \pm SD) از میانگین عروق کلسیفیه ناشی از رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین ($1/42 \pm 1/10$ Mean \pm SD) به طور معنی داری $P < 0.00$ بیشتر بود.

نتیجه گیری: روش رنگ آمیزی H&E تعداد کریستالهای کلسیم موجود در دیواره عروق را احتمالاً به علت اسیدیته قوی هر دو محلول هماتوکسیلین و ائوزین کاهش می دهد، در حالی که رنگ آمیزی آلیزارین رداس به همراه رنگ زمینه آبی آنیلین کریستالهای کلسیم را خوب حفظ می نماید و به همین دلیل برای تشخیصهای دقیق و زودرس کلسیفیکاسیون عروقی این روش توصیه می شود.

کلیدواژه‌ها: آلیزارین رداس، مونکبرگ اسکروزیس، کلسیفیکاسیون عروقی

آدرس مکاتبه: گرگان، کیلومتر ۲ جاده گرگان به ساری، ابتدای جاده شصتکلا
دانشگاه علوم پزشکی گرگان (بنیاد فلسفی)، گروه بافت شناسی و جنین شناسی

E-mail: mjgolalipour@yahoo.com

مقدمه

کلسیفیکاسیون مدیای شریانهای محیطی، اسکروز مونکبرگ (Mönckeberg's Sclerosis)، اغلب با افزایش سن و در افراد مبتلا به دیابت و نارسایی مزمن کلیه بروز می‌نماید. ظهور این علامت می‌تواند پیش آگهی حوادث قلبی عروقی و قطع پا در بیماران دیابتی باشد. کلسیفیکاسیون موجود در عروق خونی یکی از شایعترین اشکال کلسیفیکاسیونهای دیستروفیک است که ممکن است در دو محل مختلف در داخل دیواره عروق، انیما و مدیا، ایجاد شود. کلسیفیکاسیون انیمایی که در قالب آترواسکلروزیس اتفاق می‌افتد، در ارتباط با لیپید، ماکروفاژها و سلولهای عضلات صاف عروقی است، در حالی که کلسیفیکاسیون مدیا یا بیماری مونکبرگ اسکروزیس به صورت مستقل از آترواسکلروز و در ارتباط با الاستین و سلولهای عضلات صاف دیواره عروق است [۱]. مطالعات مختلف نشان داده است که در هر دو شکل این کلسیفیکاسیون، رسوب کلسیم اغلب به صورت کریستالهای هیدروکسی آپاتیت است [۲ و ۳]. در بیماری آترواسکلروزیس، ظهور کریستالهای کلسیم در دیواره انیمای رگ، نیاز به عبور از طی مراحل خاصی دارد و تقریباً در انتهایی ترین مرحله این بیماری بعد از تشکیل fatty streak این کریستالها در داخل پلاک آترومی تشکیل می‌شود [۳]. اما در بیماری مونکبرگ اسکروزیس، ظهور کریستالها در دیواره مدیای رگ بدون هیچگونه علامت مشخصی از نظر پاتولوژیک اتفاق می‌افتد. با اینکه پاتوژنز این بیماری هنوز به درستی مشخص نیست، اما افزایش سن، دیابت، نارسایی مزمن کلیه و استئوپوروز از عوامل خطر مرتبط با این بیماری است [۹-۴]. تا یک دهه پیش، با توجه به اینکه در این بیماری، بر خلاف آترواسکلروزیس، انسداد رگ ایجاد نمی‌شود، از اهمیت تشخیصی و بالینی خاصی برخوردار نبود، ولی مطالعات اخیر نشان داد که این بیماری به عنوان یک نشانگر مهم برای پیش آگهی بسیاری از حوادث قلبی عروقی و مرگ و میر ناشی از آن، انفارکتوس مغزی و آمپوتاسیونهای

اندام تحتانی در بیماران دیابتی غیر وابسته به انسولین می‌تواند ارزشمند باشد [۱۰]. بنابراین تشخیص زودرس و اولیه این بیماری که اغلب در اکثر عروق محیطی مثل عروق اندام تحتانی، سر و گردن، پستان، لگن و مخصوصاً رحم اتفاق می‌افتد [۱۰]؛ از اهمیت به سزایی برخوردار است [۱۱]. با توجه به اینکه، رنگ آمیزی معمول استفاده شده در آزمایشگاههای پاتولوژی و بافت شناسی، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (Hematoxylin & Eosin) بوده و این روش قادر به تشخیص زودرس این بیماری نیست هدف از این مطالعه معرفی روش آلیزارین رداس به عنوان یک روش برتر در تشخیص اولیه این بیماری و مقایسه قدرت تشخیصی آن با رنگ آمیزی معمول H&E است. مطالعه حاضر نشان داد که روش آلیزارین رداس در تشخیص رسوبات کلسیم نسبت به روش معمول H & E بسیار دقیق تر و کارآمدتر است.

مواد و روشها

نمونه‌های مورد بررسی تعداد ۲۰ عدد بلوک پارافینی متعلق به رحم خانمهایی با میانگین سنی 53 ± 4 سال بود که به علل مختلف هیستریکتومی شده بودند. از بلوکهای پارافینی، برشهایی به صورت سریال به ضخامت ۴ تا ۵ میکرومتر تهیه شد و بعد به صورت تصادفی ۴ عدد برش از هر بلوک انتخاب و برای رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و آلیزارین رداس مورد استفاده قرار گرفت.

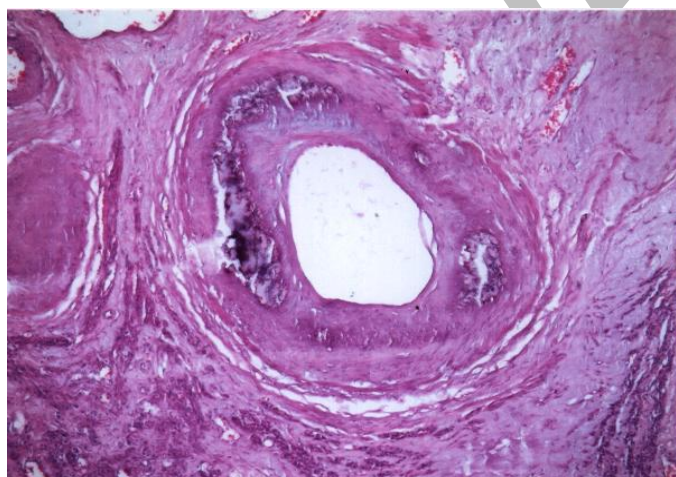
در رابطه با روش H&E از روش معمول رنگ آمیزی در آزمایشگاههای بافت شناسی و پاتولوژی استفاده شد، بدین ترتیب که بعد از دپارافینه کردن نمونه‌ها توسط گزین، آب دهی توسط الکل با درجات نزولی انجام شد. سپس رنگ آمیزی با هما توکسین مایر با pH حدود ۲/۳ به مدت ۵ دقیقه، شستشو زیر آب جاری و رنگ آمیزی توسط ائوزین الکلی با pH حدود ۴/۱ به مدت ۱ دقیقه صورت گرفت و در نهایت مراحل آب گیری و شفاف سازی و چسبانیدن صورت

گرفت.

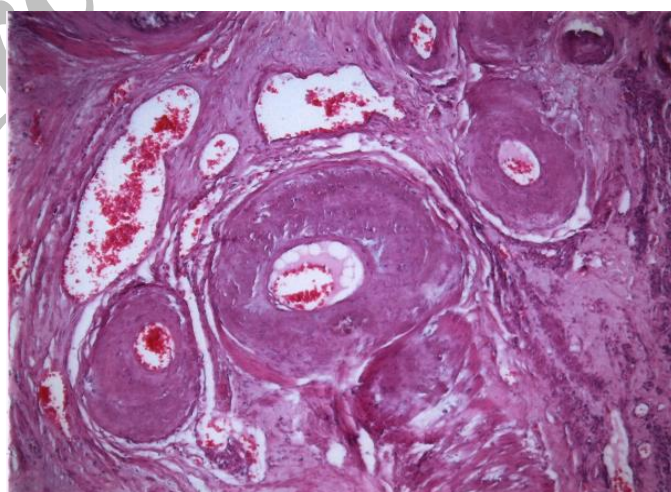
بعد از خشک شدن، برشها توسط میکروسکوپ تحقیقاتی Olympus BX41 ساخت ژاپن مطالعه شدند. نمونه‌ها با بزرگنمایی $\times 200$ بررسی شد. تعداد عروقی که دچار کلسیفیکاسیون شده بودند در هر برش توسط دو پاتولوژیست که اطلاعی نسبت به مطالعه نداشتند شناسایی و شمارش شدند.

اطلاعات جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS (Ver10) و آزمون آماری paired-sample t test مورد مقایسه قرار گرفتند. سطح معنی‌دار بودن $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

در نمونه‌هایی که توسط روش آلیزارین رداس رنگ آمیزی شد، ابتدا توسط گزینن نمونه‌ها، دیپارافینه شد و سپس توسط الکل‌های ۱۰۰، ۹۰، ۷۰ درجه آب دهی صورت گرفت. بعد از یک شستشوی سریع در آب مقطر نمونه‌ها توسط محلول ۱ درصد آلیزارین رداس با pH حدود $6/4$ به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شد و بعد از شستشو با آب مقطر با رنگ آنیلین بلو ۵ درصد به مدت ۱ دقیقه رنگ آمیزی شد. سپس برشها از محلولهای استون خالص، استون - گزینن و گزینن خالص عبور کرده و در نهایت توسط کانادابالزام چسبانیده شد.



شکل ۱. نواحی کلسیفیه شده در مدیای رگ به صورت نواحی آمورف بازوفیل قابل مشاهده است. (رنگ آمیزی: H & E، بزرگنمایی: $\times 200$)



شکل ۲. نواحی کلسیفیه شده در مدیای رگ به خوبی قابل مشاهده نیست. (رنگ آمیزی: H & E، بزرگنمایی: $\times 200$)

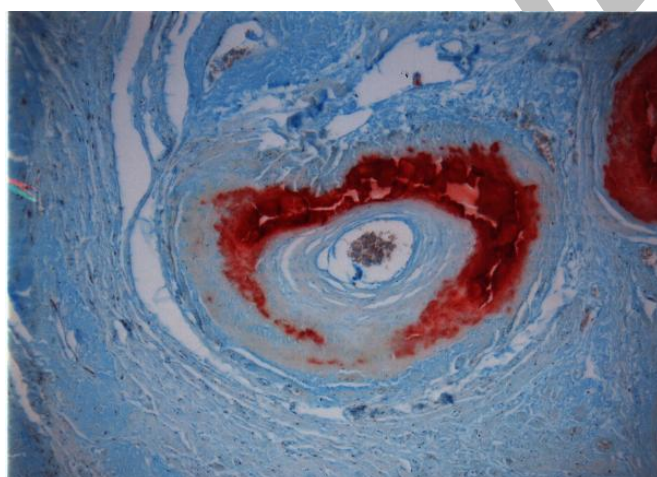
یافته‌ها

قابل تشخیص بودند (شکل ۲) و عروقی که تعداد رسوبات کریستالهای کلسیمی در آنها کم و پراکنده بود قابلیت تشخیصی با این نوع رنگ آمیزی را نداشتند (شکل ۲).

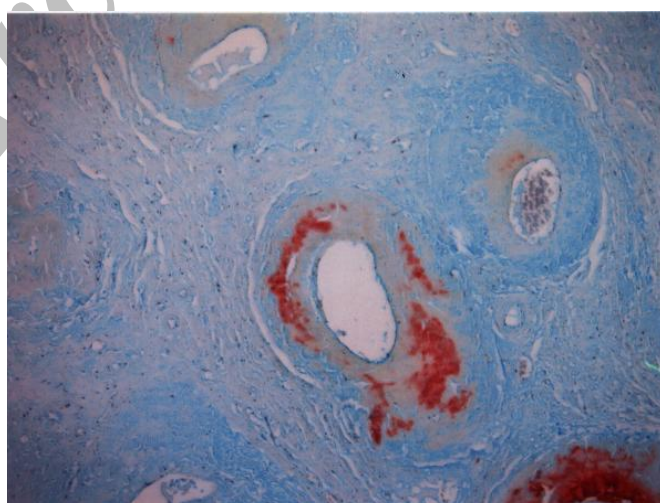
در برشهایی که توسط روش رنگ آمیزی آلیزارین رداس رنگ آمیزی شده بودند، به راحتی عروق دچار کلسیفیکاسیون قابل شناسایی بودند. در دیواره مدیای این عروق، رسوبات کریستالهای کلسیم با ظاهر نارنجی متقابل به قرمز در بین سلولهای عضلات صاف جدار مدیا قابل تشخیص بودند (شکل ۳).

این تحقیق نشان داد که میانگین تعداد عروق دچار کلسیفیکاسیون که توسط روش معرفی شده آلیزارین رداس رنگ آمیزی شده بودند (18.4 ± 1.34) به طور معنی داری ($p < 0.000$) از میانگین تعداد عروق دچار کلسیفیکاسیون که توسط روش H&E رنگ آمیزی شده بودند (10.4 ± 1.42) بالاتر بود.

در برشهایی که به روش معمول H&E رنگ آمیزی شده بودند، تنها عروقی که کلسیفیکاسیون فراوانی در قسمت مدیای خود داشتند به صورت نواحی با ظاهر آمورف بازوفیل



شکل ۳. نواحی کلسیفیه شده در مدیای رگ به صورت نواحی آمورف به رنگ نارنجی متمایل به نارنجی قابل مشاهده است. (رنگ آمیزی: Alizarin red، بزرگنمایی: $\times 200$)



شکل ۴. کریستالهای کوچک در مدیای رگ به صورت نقاط نارنجی قابل رویت است. (رنگ آمیزی: Alizarin red، بزرگنمایی $\times 200$)

کریستالهای هیدروکسی آپاتیت $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ هستند [۳ و ۲]. بنابراین به نظر می‌رسد که روند ایجاد و نشست این کریستالها در این دو لایه از دیواره رگ متفاوت است. در بیماری آترواسکلروزیس، روند رسوب کریستالهای کلسیم مستلزم عبور از مراحل شناخته شده خاصی است و در نهایت در مراحل پیشرفته انتهایی این بیماری بعد از تشکیل fatty streak زمینه برای تشکیل کریستالها در داخل پلاک آترومی فراهم می‌شود [۱۵ و ۱۶]. ولی در بیماری مونکبرگ اسکلروزیس، هیچ‌گونه تغییرات قابل سنجش پاتولوژیکی در دیواره رگ قبل از تشکیل کریستالها وجود ندارد؛ از این رو تشخیص اولیه و سریع این بیماری بسیار مهم است. با اینکه پاتوژنز این بیماری به خوبی مشخص نیست ولی افزایش سن، دیابت، اختلالات مزمن کلیوی و استئوپوروز از عوامل خطر این بیماری محسوب می‌شوند [۴، ۵، ۶، ۷ و ۸]. این بیماری اکثراً عروق محیطی را درگیر می‌نماید و بیشترین عروق دچار کلسیفیکاسیون عروق مربوط به به اندام تحتانی، لگن، سروگردن، پستان و مخصوصاً رحم هستند. رسوب کریستالهای کلسیم اغلب به صورت حلقه‌ای در اطراف رگ در ضخامت مدیا در مقاطع میکروسکوپی قابل مشاهده است [۱۷]. در هنگامی که این بیماری پیشرفته است تشخیص این کریستالهای کلسیمی توسط رنگ‌آمیزی معمول هماتوکسیلن - ائوزین به راحتی قابل تشخیص است، در این عروق که عمدتاً شریانهای متوسط و کوچک هستند رسوبات کلسیمی به صورت نواحی آمورف بازفیل در ضخامت مدیا قابل تشخیص هستند. این رسوبات حتی در رادیوگرافیهای ساده از پستان و عروق محیطی بدن نیز قابل تشخیص هستند [۱۸]. اما در هنگامی که میزان این کریستالها کم باشد، روش رنگ‌آمیزی H&E و رادیوگرافی قادر به تشخیص کریستالها نیستند، یکی از علل اینکه کریستالهای ظریف نمی‌توانند در رنگ‌آمیزی H&E مشخص گردند، می‌تواند مربوط به pH اسیدی رنگهای مورد استفاده در این رنگ‌آمیزی معمول باشد، چرا که مطالعات مختلف نشان داده‌اند که کریستالهای کلسیمی هیدروکسی آپاتیت در محیطهای اسیدی حل

در عروق کوچکتر کریستالهای کوچک پراکنده در داخل مدیا به صورت نقاط نارنجی رنگ قابل مشاهده بودند. همچنین عروقی وجود داشتند که هنوز در آنها کریستالها تشکیل نشده بود ولی به رنگ زرد کهربایی دیده می‌شدند که نواحی مربوط به تجمعات کلسیمی در مدیای عروق قبل از کلسیفیکاسیون است (شکل ۴). بافت همبند اطراف عروق و ساختمان مدیای عروق در این روش به رنگ آبی روشن رنگ‌آمیزی شده بودند.

در تمامی عروق رنگ‌آمیزی شده به هر دو روش H&E و آلیزارین رداس، اثری از تنگی مجرای عروق و ضخیم شدگی انتیما دیده نشد و اکثریت عروق دچار کلسیفیکاسیون در پریتر رحم قرار داشتند.

بحث

کلیفیکاسیونهای عروقی یکی از انواع شایع‌ترین کلسیفیکاسیونهای دیستروفیک است که در قالب دو بیماری آترواسکلروزیس و مونکبرگ اسکلروزیس تظاهر پیدا می‌کند [۱۲]. با توجه به اهمیت کلسیفیکاسیون عروقی ایجاد شده در آترواسکلروزیس که موجب ضخامت انتیما، تغییر قطر داخلی رگ، پارگی عروق و ترومبوز طی پیشرفت این بیماری می‌شود، تا کنون اکثر مطالعات روی این نوع از کلسیفیکاسیون متمرکز بوده است و بیماری مونکبرگ اسکلروزیس به علت اینکه تغییرات انسدادی رگ را به دنبال ندارد از اهمیت کمتری برخوردار بوده است. اما با توجه به اینکه مطالعات اخیر نشان داده است که بیماری مونکبرگ اسکلروزیس می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر مهم تشخیصی در پیش‌آگهی‌های سایر بیماریهای قلبی عروقی، انفارکتوس مغزی آمپوتاسیون پا در بیماران دیابتی و مرگ و میرهای متعاقب این بیماریها مورد استفاده قرار گیرد [۱۰، ۱۳ و ۱۴]. از این رو اهمیت تشخیص این بیماری روز به روز در حال گسترش است. علی‌رغم اینکه در هر دو نوع از کلسیفیکاسیون عروقی، انتیما در آترواسکلروز و مدیا در مونکبرگ اسکلروزیس، کریستالهای رسوب کرده در دیواره رگ اغلب از نوع

سلولها می‌توان مشاهده نمود [۲۱ و ۲۲].

۲- تغییرات تمایزیک سلولهای عضلات صاف مدیا یا سلولهای اطراف عروقی (pericyte) و تبدیل شدن آنها به سلولهای استخوان ساز یا استئوبلاستی [۲۳ و ۲۴].

به هر صورت اینکه کدامیک از مکانیزمهای یاد شده در تشکیل کریستالهای کلسیم از اهمیت بیشتری برخوردار هستند و اینکه تحت تاثیر چه شرایطی این پدیده‌های غیر طبیعی در داخل دیواره رگها اتفاق می‌افتند، نیاز به بررسیهای گسترده تر و دقیق تری دارد، ولی آنچه مسلم به نظر می‌رسد این است که تجمع یون کلسیم در دیواره مدیای رگ یک امر ضروری و اولیه برای شکل گیری کریستالها در داخل دیواره رگ محسوب می‌شود.

بنابراین روش ارائه شده در این مطالعه در حین سادگی، توانایی تشخیص تجمعات کلسیمی را داراست و از این نظر بسیار مهم است. بنابراین اجرای رنگ آمیزی اختصاصی فوق را برای تشخیص رسوبات کلسیمی در دیواره رگها یا هر مقطع بافتی دیگر که احتمال کلسیفیکاسیون در آن وجود دارد، توصیه می‌شود.

References

1. **Proudfoot D, Shanahan CM.** Biology of calcification in vascular cells: intima versus media. *Herz* 2001; 26(4):245-51.
2. **Stary HC.** Phase of advanced atherosclerotic disease. In: stary HC, (ed). Atlas of atherosclerosis: progression and regression. New York, Parthenon, 1999, pp 8-27.
3. **Farzaneh-Far A, Proudfoot D, Shanahan C, Weissberg PL.** Vascular and valvar calcification: recent advances. *Heart* 2001; 85(1):13-7.
4. **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.
5. **London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Metivier**

می‌شوند [۱۹ و ۲۰]. هدف از این مطالعه معرفی روش رنگ آمیزی هیستوشیمی دقیق تری با اندکی تغییرات نسبت به روش اصلی تشخیص سریع این بیماری است. دو مزیت این روش نسبت به رنگ آمیزی معمول H&E این است که اولاً در این روش کوچکترین کریستالهای تشکیل شده در دیواره رگ به راحتی قابل تشخیص هستند و ثانیاً با این روش حتی می‌توان عروق مستعد به کلسیفیکاسیون (دارای تجمعات زیاد یون Ca^{+2}) را قبل از تشکیل کریستالها مشخص نمود. از روش فوق مخصوصاً می‌توان در زمینه تحقیقاتی که مرتبط با تشکیل کریستالها در داخل رگها یا هر نقطه دیگر از بدن (غفرونهای دژنره شده، کبد، پستان، دریچه‌های قلبی ...) است به‌طور مناسبی استفاده نمود. با وجود اینکه تشکیل کریستالهای کلسیم در دیواره مدیای رگ با هیچ‌گونه تغییرات مرفولوژیکی بارز قابل تشخیص میکروسکوپی همراه نیست ولی مطالعات الکترونی و هیستوکیمیستری دقیق تر دو عامل را در رابطه با علت احتمالی شروع کلسیفیکاسیون عروقی موجود در مدیا مطرح می‌نمایند:

۱- آپتوزیس در سلولهای عضلات صاف مدیا که متعاقب آن تشکیل کریستالها را در اجسام آپتوتیک حاصل از تجزیه این

F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* 2003 Sep; 18(9):1731-40.

6. **Moe SM, O'Neill KD, Duan D, Ahmed S, Chen NX, Leapman SB, Fineberg N, Kopecky K.** Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney Int* 2002; 61(2):638-47.
7. **Reid JD, Andersen ME.** Medial calcification (whitlockite) in the aorta. *Atherosclerosis* 1993; 101(2): 213-24.
8. **Spina M, Garbin G.** Age-related chemical changes in human elastins from non-atherosclerotic areas of thoracic aorta. *Atherosclerosis* 1976; 24 (1-2): 267-79.

9. **Edmonds ME.** Medial arterial calcification and diabetes mellitus. *Z Kardiol.* 2000; 89:101-4.
10. **Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Ronnema T, Laakso M.** Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16(8): 978-83.
11. **Young MJ, Adams JE, Anderson GF, Boulton AJ, Cavanagh PR.** Medial arterial calcification in the feet of diabetic patients and matched non-diabetic control subjects. *Diabetologia* 1993; 36(7): 615-21.
12. **Doherty TM, Fitzpatrick LA, Inoue D, Qiao JH, Fishbein MC, Detrano RC, Shah PK, Rajavashisth TB.** Molecular, endocrine, and genetic mechanisms of arterial calcification. *Endocrinol Rev* 2004; 25(4):629-72.
13. **Niskanen L, Siitonen O, Suhonen M, Uusitupa MI.** Medial artery calcification predicts cardiovascular mortality in patients with NIDDM. *Diabetes Care* 1994; 17(11): 1252-6.
14. **Maser RE, Wolfson SK Jr, Ellis D, Stein EA, Drash AL, Becker DJ, Dorman JS, Orchard TJ.** Cardiovascular disease and arterial calcification in insulin-dependent diabetes mellitus: interrelations and risk factor profiles. Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study-V. *Arterioscler Thromb* 1991; 11(4): 958-65.
15. **Libby P, Aikawa M.** Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat Med* 2002; 8(11):1257-62.
16. **Lusis AJ.** Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407(6801): 233-41.
17. **Mohr W, Gorz E.** Morphogenesis of media calcinosis in Monckeberg disease. Light microscopy, scanning electron microscopy and roentgen microanalysis findings. *Z Kardiol* 2002; 91(7):557-67.
18. **Saxena A, Waddell IC, Friesen RW, Michalski RT.** Monckeberg medial calcific sclerosis mimicking malignant calcification pattern at mammography. *J Clin Pathol* 2005; 58(4):447-8.
19. **Schwarz N, Schlag G, Thurnher M, Eschberger J, Zeng L.** Decalcified and undecalcified cancellous bone block implants do not heal diaphyseal defects in dogs. *Arch Orthop Trauma Surg* 1991;111(1):47-50.
20. **Costantino PD, Friedman CD, Jones K, Chow LC, Pelzer HJ, Sisson GA Sr.** Hydroxyapatite cement. I. Basic chemistry and histologic properties. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991; 117(4):379-84.
21. **Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM.** Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1995; 95(5):2266-74.
22. **Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL.** Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* 2000; 87(11):1055-62.
23. **Collett GD, Canfield AE.** Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ Res* 2005; 96(9):930-8.
24. **Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C.** Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 2005 Sep 16; 97(6):512-23.