

RESTENOS – KÄRLBIOLOGISNS GÄCKANDE SKUGGA

Nya rön ger hopp om framtida terapi

Rekonstruktion av aterosklerotiska blodkärl med endovaskulära eller konventionella kirurgiska metoder medför alltid en skada på kärnväggen. Denna skada initierar en läkningsprocess och ärrbildning i vävnaden som på sikt kan orsaka en ny förträngning, restenos, och stopp i det rekonstruerade kärlsegmentet.

Fenomenet har under de senaste 15 åren utmanat kärlbiologisk forskning, men trots att kunskaperna om reparationsmekanismer i kärnväggen nu är mycket goda saknas metoder att motverka processen hos människor. Nya resultat tyder på att restenosens patofysiologi i humana kärl är långt mer komplicerad än vi tidigare trott. Alternativa synsätt på denna process måste prövas i relevanta djurmodeller innan gåtan kan nå sin lösning.

Ateroskleros betraktades länge som en skadereaktion i kärnväggen [1]. Antagandet byggde på att man fann likheter mellan fibrösa aterosklerotiska plack och lesioner som uppkommit efter kärlskada i djurmodeller. Dessa lesioner utmärks av glatta muskelceller som prolifererat och bildat stora mängder extracellulär matrix i kärlets intima, en vävnadsreaktion kallad intimal hyperplasi. Senare stod det klart att intimal hyperplasi var ett separat patofysiologiskt fenomen som även återfanns i restenos.

Författare

ULF HEDIN

docent, ST-läkare, kärlkirurgiska sektionen, kirurgkliniken, Karolinska sjukhuset, Stockholm. Vid artikelns tillkomst gästforskare, Department of Surgery, University of Washington, Seattle, USA.

Under många år betraktades intimal hyperplasi som den huvudsakliga orsaken till restenos, men idag vet vi att fler komponenter bidrar till lumenförträngning efter kärlingrepp hos människor. Kärlets elastiska egenskaper, spasm och en omorganisation av kärnväggens struktur är andra faktorer i denna process [2]. Mekanismerna bakom dessa faktorer är ännu oklara, men en mer komplex bild av händelseförloppet kan delvis förklara att man hittills inte lyckats hämma restenos med farmaka som effektivt blockerat intimal hyperplasi i försöksdjur. Trots detta måste intimal hyperplasi, som är ett av de mest välutredda fenomenen i kärnväggen, betraktas som en central komponent i restenosutveckling, och de mekanismer som reglerar denna process kan komma att leda oss närmare en lösning av problemet.

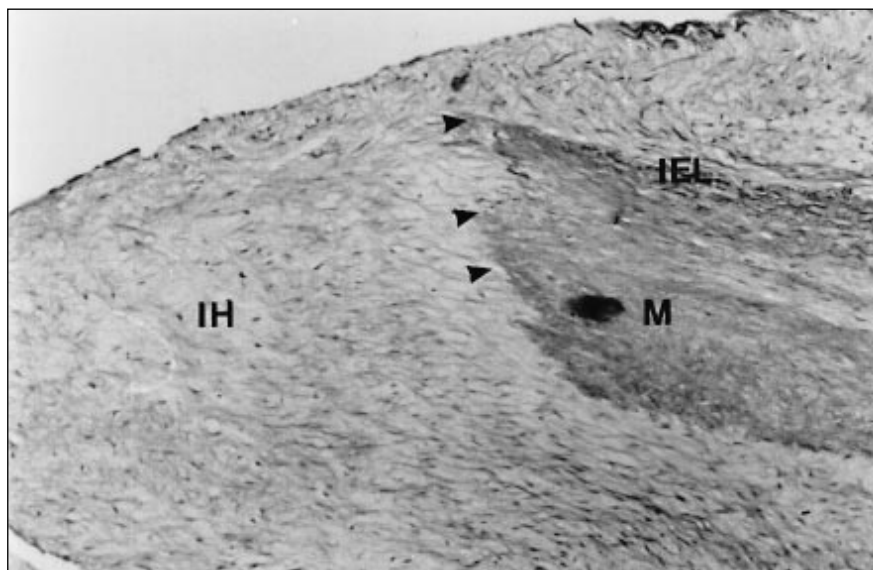
Fenomenets många ansikten

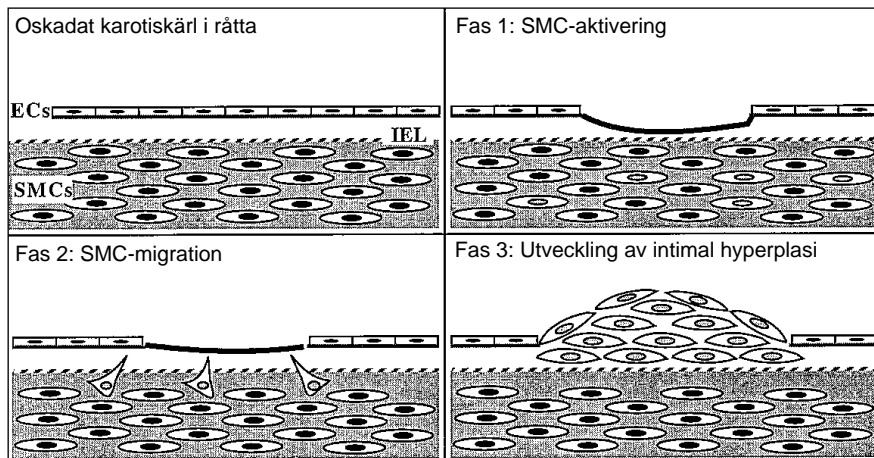
Restenos utvecklas efter ingrepp där kärnväggen utsatts för skada av exempelvis en angioplastikballong eller ett kirurgiskt instrument. Någon enhetlig definition finns inte, och efter koronar angioplastik talar man ibland om restenos som en ny förträngning på platsen för en tidigare aterosklerotisk lesion, medan man ibland menar de fall där kärllumendiametern minskat i jämfö-

relse med diametern omedelbart efter angioplastik. Lumenförträngning, som kanske är en bättre term, kan uppkomma efter trauma mot en aterosklerotisk lesion i ett kärl (t ex efter angioplastik), efter resektion av en lesion (t ex efter endartarektomi), men också i tidigare helt friska kärl (t ex i bypass-graft där ven använts). Symtom på restenos uppkommer mellan en och sex månader efter ingreppet, och efter mer än ett år kan man inte skilja en restenos från en progress av den underliggande kärlsjukdomen [3, 4]

Kärlets storlek avgör graden av lumenförträngning och kliniska symtom. Exempelvis ger restenos efter angioplastik i iliaca-kärl sällan symtom, medan endovaskulär intervention i små koronarartärer associeras med restenos och recidiv av angina pectoris hos mellan 30 och 50 procent av alla patienter [4]. Efter endartarektomi av karotisstenoser ger restenos däremot sällan upphov till nya cerebrovaskulära isch-

Figur 1. Intimal hyperplasi i koronar restenos sex månader efter behandling av det ursprungliga placket med perkutan atarektomi. Intimal hyperplasi (IH) ses som en lucker bindväv omgivande den mer organiserade median (M). Skadan av atarektomien i inre elastiska membranet (IEL) och i median är markerad med pilhuvuden. Preparatet erhållet genom upprepad perkutan atarektomi.





Figur 2. Utveckling av intimal hyperplasi. Efter att endotelet (ECs) skadats med en ballongkateter sker en aktivering och proliferation av glatta muskelceller (SMCs) i median (fas 1). Efter några dagar migrerar glatta muskelceller genom lamina elastica interna (IEL) ut på den skadade ytan (fas 2). Intimal hyperplasi utvecklas sedan genom proliferation av glatta muskelceller som deponerar stora mängder extracellulär matrix (fas 3).

emiska symtom. Detta samband beror delvis på den benigna strukturen hos dessa lesioner. Restenosen har typiskt en slät yta över en fibrös, lucker bindväv med glatta muskelceller och extracellulär matrix, utan de förkalkade, trombogena partier och de inflammatoriska komponenter som utmärker det ursprungliga placket (Figur 1).

Vener som används som bypass-graft eller i arteriovenösa fistlar för hemodialys utvecklar stenoser, framför allt nära anastomoserna, och förtjockning av median efter en tid i den arteriella cirkulationen. Denna reaktion är relaterad till både mekaniska skador och förändrade hemodynamiska förhållanden. Stenoser begränsar livslängden på vengraft, och mer än 20 procent av alla aortokoronara bypass-graft samt ca 40 procent av alla perifera vengraft måste revideras inom de första fem åren. I syntetiska kärlgraft uppstår liknande stenoser i anastomosområdena. Huruvida uppkomsten av graftstenoser styrs av samma mekanismer som stenoser i aterosklerotiska kärl är ännu oklart.

Experimentella modeller

Kunskaperna om kärlväggens reparationsmekanismer är uteslutande hämtade från djurmodeller. Oftast innefattar dessa en mekanisk skada, t ex genom att en uppblåst embolektomikateter dras genom kärlet så att endotelet och underliggande vävnad skadas. Kärlskada med denna metod i a carotis på råtta har varit den mest använda modellen. Här följs skadan av trombocyttaggregation på den blottade bindväven, utan att någon mer omfattande trombos av kärlet inträffar. I median sker samtidigt en ak-

tivering av glatta muskelceller. Efter ett par dagar vandrar dessa celler ut i intiman där fortsatt proliferation och deposition av extracellulär matrix leder till utvecklingen av lesionen i intiman, den intimala hyperplasin (Figur 2) [5].

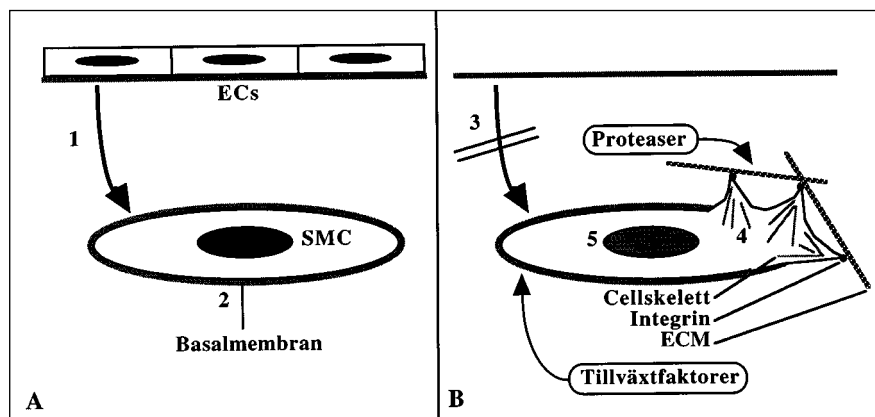
Omfattande studier av skadereaktionen i råtta har gett mycket detaljerade kunskaper om de molekylära mekanismer som reglerar denna process. I den första fasan, aktiveringen och proliferationen av glatta muskelceller i median, har tillväxtfaktorn bFGF (basic fibroblast growth factor) en central roll. I samband med skadan frisätts denna faktor från depåer i heparansulfat i bindväven och stimulerar cellernas DNA-syntes. Genom att behandla djuren med heparin i samband med skadan kan man binda upp det bFGF som frisätts och motverka denna cellaktivering.

Migrationen av glatta muskelceller ut i intiman under den andra fasan tros framför allt vara beroende av tillväxt-

faktorn PDGF (platelet derived growth factor), vilken frisätts från degranulerade trombocyter på den skadade kärlytan [1, 6]. I trombocytopena djur ses också en dämpad migration av celler. Vävnadsnedbrytande proteaser tillhörande matrixmetalloproteinaser och plasminfamiljen medverkar också till migrationen av glatta muskelceller, och proteas-hämmare kan hämma intimal hyperplasi i råttmodellen.

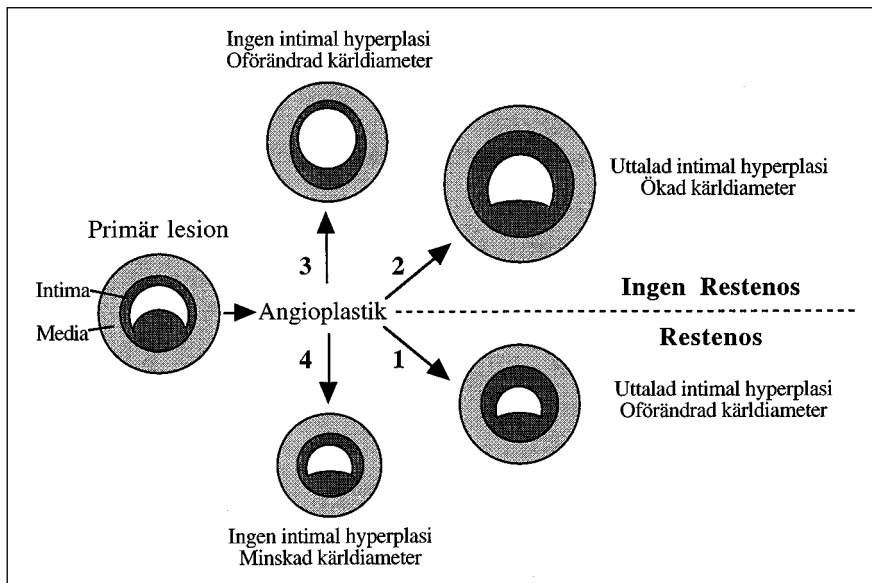
I den avslutande fasan då den intimala lesionen utvecklas tror man att ett samspel mellan autokrina faktorer, dvs tillväxtmediatorer utsöndrade av de intimala glatta muskelcellerna, styr den återstående cellproliferationen. Faktorer som t ex angiotensin II, TGF β (transforming growth factor β) och PDGF kan alla medverka i denna fas. Efter några veckor avstannar utvecklingen av den intimala hyperplasin och vävnaden antar likheter med median, proliferationen av glatta muskelceller upphör och dessa återfår de egenskaper som utmärker celler i median [7]. I de partier av kärlet där endotelet snabbt växer tillbaka över ytan bromsas den intimala hyperplasin. Endotelcellens förmåga att motverka tillväxt av glatta muskelceller kan bero på kontinuerlig produktion av NO (kväveoxid), och man har visat att såväl syntetiska NO-donatorer som gentransferering med NO-syntetasgenen hämmar utvecklingen av intimal hyperplasi [5].

Trots dessa mycket detaljerade kunskaper om reparationsprocessen i råttans kärlvägg har modellen varit otillräcklig för att ta fram farmaka mot stenoser och graftstenos i humana kärl. Denna paradox kan i viss mån förklaras



Figur 3. Hypotetisk modell för hur funktionen hos kärlväggens glatta muskelceller (SMC) kontrolleras. (A) Normalt hålls dessa celler i differentierade tillstånd genom påverkan av NO (1) och genom kontakt med basalmembranet som omger cellerna och understödjer cellens kontraktila struktur (2).

(B) Efter skada på endotelet (ECs) förloras den hämmande effekten av NO (3), och genom effekten av proteaser frisätts från skadade celler bryts basalmembranet ned och nya kontakter mellan andra matrixproteiner (ECM) och integriner ger en förändring av cellens egenskaper (4). Tillsammans gör förlusten av dessa kontrollerande faktorer att cellerna aktiveras och blir känsliga för stimulering med tillväxtfaktorer som bFGF (5).



Figur 4. Faktorer vid lumenförträngning efter kärlorekonstruktion, här exemplifierat med angioplastik. Restenos kan uppkomma direkt som en följd av ökad intimal massa, intimal hyperplasi (1), men om detta kompenseras genom en ökad kärldiameter (»remodellering») sker ingen lumenförträngning (2). I de fall där den intimala reaktionen saknas sker ingen förträngning av lumen om kärldiametern består (3), men om kärldiametern samtidigt minskar kan likafullt en restenos uppkomma (4).

av att råttor ej utvecklar ateroskleros och att modellen innefattar skada av friska kärl. Det föreligger troligen stora biologiska skillnader mellan en sådan process och restenos i en inflammerad, aterosklerotisk kärilvägg med författade och förkalkade partier. För att undvika dessa skillnader utvecklas skademodeller i kärilsjuka djur. Sedan länge kan exempelvis hyperlipemiska kaniner användas, och vissa förhoppningar finns om att kunna studera reparationsmekanismer i kärilväggen på transgena möss där kärilsjukdom orsakas av definierade genetiska defekter. Hyperkolesterolemiska grisar har använts för att studera koronar restenos, och inledande studier har gjorts i apor uppfödda på fettrik föda. I bägge dessa modeller har man sett likheter med restenosuppkomst hos människa [8].

Kärilväggens glatta muskelceller

Gemensamt för många delar av restenosutvecklingen är den centrala roll kärilväggens glatta muskelceller spelar. Dessa celler ger upphov till intimal hyperplasi och medverkar till strukturella förändringar i kärilväggen genom kontraktion och nysyntes av extracellulär matrix. Att förstå hur funktionen av dessa celler regleras och hur de aktiveras i samband med kärilskada kan således vara nyckeln till att finna förebyggande farmaka.

Under normala förhållanden kontrollerar glatta muskelceller käriltonus. I motsats till många andra differentierade celltyper tycks dessa celler vara lätta att aktivera vid exempelvis en skada, då de genomgår en förändring till en mindre differentierad fenotyp kapabel att reparera den skadade kärilväggen [9]. Orsaken till denna aktivering kan vara att de mekanismer som gör att glatta muskelceller behåller sina differentierade egenskaper sätts ur spel. Man kan urskilja åtminstone två mekanismer som kan medverka och bibehålla den differentierade fenotypen hos glatta muskelceller: ett samspel mellan å ena sidan endotelceller och å andra sidan omgivande extracellulär matrix (Figur 3) [10, 11].

Aktivering av glatta muskelceller efter kärilskada är intimt sammankopplad med förlusten av ett täckande endotelcellslager. I de beskrivna djurmodellerna bromsas denna process så snart endotelcellerna växt tillbaka på den skadade ytan. Denna förmåga kan hänga samman med endotelcellens produktion av NO, vilket är en effektiv antiproliferativ faktor för glatta muskelceller [12]. Tillväxt av glatta muskelceller kan även ske under ett intakt endotel. Ett normalt kärl dilateras som svar på en ökning av blodflödet till följd av en ökad NO-frisättning från kärilendotelet.

I grovmaskiga polytetrafluoretan (PTFE)-graft som inopererats i babianer bildas en intimal hyperplasi på kärilprotesens insida med ett täckande lager av endotelceller. Genom att ändra på blodflödet i dessa graft kan tjockleken på intiman påverkas. Intiman tillväxer under förhållanden med lågt blodflöde till följd av glatt muskelcellsproliferation, och tjockleken minskar vid ökat flöde [13]. Eftersom PTFE-graftet saknar kärlets flexibilitet, ändras lumen-diametern genom ändrad intimatjock-

lek. Sammantaget kan endotelcellen, delvis genom NO, medverka till att hålla kärilväggens glatta muskelceller i ett kontraktilt, icke-proliferativt tillstånd, och förlusten av denna kontroll, antingen genom att endotelet skadas eller genom störda flödesförhållanden, kan orsaka en cellulär aktivering.

Ett annat förhållande som reglerar de kontraktila egenskaperna hos kärilväggens glatta muskulatur är interaktioner med omgivande extracellulär matrix. I normal kärilmedia omges dessa celler av ett skyddande basalmembran. Glatta muskelceller som odlas i kultur på eller i en matrix av basalmembranskomponenter behåller också sina kontraktila egenskaper och svarar inte på stimulering med tillväxtfaktor [14]. Kontakten med proteiner i basalmembranet medieras av matrixreceptorer, integriner. Dessa receptorer kan signalera till cellkärnan och medverka i kontrollen av cellulära processer som t ex celltillväxt [11]. Förändringar i kärilväggens extracellulära matrix efter skada, exempelvis genom proteaser frisatta från skadade celler, kan därmed ändra cellens funktion och göra den mottaglig för stimulans den normalt inte skulle reagera på.

Efter skada kan kärilväggens matrix också förändras genom deposition av nya matrixkomponenter som osteopontin och tenascin [15, 16]. Dessa proteiner kan underlätta migration av celler eller bidra till kontraktion av vävnaden. Kliniska data tyder också på att interaktioner mellan glatta muskelceller och kärilväggens extracellulära matrix medverkar i restenosprocessen hos människa. I den s k EPIC-studien utvärderades en antagonist mot trombocytintegrinen GpII_bIII_a efter koronar angioplastik. I studien noterades en minskad restenosfrekvens som möjligen kan förklaras med att substansen också binder till integrinen $\alpha_3\beta_3$ vilken anses vara betydelsefull för migration av glatta muskelceller [17].

Den humana restenosprocessen

Hämning av intimal hyperplasi i råttor med olika farmaka har ej gått att upprepa i kliniska försök. Detta nedslående faktum pekar på de biologiska skillnader som sannolikt råder mellan en intimal reparationsprocess i en frisk kärilvägg och den komplexa reaktionen i ett förkalkat kärl. Även om intimal hyperplasi förekommer i de flesta undersökningar av restenos från människa, är reaktionen och den ökade intimala massa den åstadkommer inte nödvändigtvis associerad med förträngning av kärllumen.

Undersökningar av primära aterosklerotiska lesioner i humana koronar- och karotiskärl har visat att ökad intimal massa åtföljs av en förstoring av kärlet

så att lumenarean bibehålls [2]. Detta »remodelleringsfenomen» gör att kärlet kan behålla ett oförändrat blodflöde, och det innebär att vi måste räkna med att andra processer än intimal hyperplasi är viktiga i restenosutveckling (Figur 4). Restenos efter angioplastik i kanin, gris och apa innefattar både ökad intimal massa och strukturell reorganisation av kärlväggen, och undersökningar med intravaskulärt ultraljud tyder på samma fenomen i humana koronarkärl. Intressant nog tycks intimal hyperplasi vara en mer pålitlig orsak till restenos efter anläggande av stentar, där stenten motverkar »remodellering». Stentar tycks också minska restenosfrekvensen i koronarkärl, vilket ger en indikation om betydelsen av dessa processer i sjukdomsförloppet [18].

Varken intimal hyperplasi eller en av dess centrala cellulära processer, tillväxt av glatta muskelceller, tycks alltså vara framträdande vid restenosutveckling hos människor [19]. Vad som från början sågs som ett elegant mål för farmakologisk behandling eller genterapi kan därmed vara fel process att rikta terapin mot. Inhibition av intimal hyperplasi kan tvärtom vara direkt olämpligt [20]. I aterosklerosens slutfas går placket sönder och trombotiserar så att kärlet ockluderar. Denna instabilitet beror på att bindvävskappan tunnas ut och bryts ned av proteaser frisatta från inflammatoriska celler, särskilt i plackets kanter. När ett sådant plack blir föremål för angioplastik spricker vävnaden och en trombos uppkommer som dock begränsas av den antikoagulantibehandling man använder vid dessa åtgärder.

Den reparationsmekanism som intimal hyperplasi representerar tillför sedan placket strukturell stabilitet genom nysyntes av extracellulär matrix. Placket förändras på detta sätt från en instabil struktur som kan frakturera och orsaka ocklusion av kärlet till en stabil lesion, och vävnadsreaktionen är därmed gynnsam.

Om intimal hyperplasi inte är den process vi ska motverka för att kupera restenos, vad ska vi då rikta terapin mot? För tillfället kan vi urskilja omstruktureringen av kärlväggen, »remodellering», och trombosen efter skadan som potentiella behandlingsmål. Vi vet dock litet om mekanismerna bakom »remodellering». I råtta kan man hämma kontraktion av kärlet med vasorelaxantia tidigt efter skadan men ej senare. Processen kan bestå av två faser där den tidiga orsakas av elastiska och kontraktila egenskaper, medan den senare innefattar en ändring av bindvävens struktur genom nysyntes och degradation av extracellulär matrix. Här kan farmaka som motverkar aktivering av glatta muskelceller eller proteashäm-

mare vara möjliga behandlingsalternativ. Genom plackets trombogena egenskaper kan skadan generera trombos i och utanför vävnaden, vilket bidrar till en ändrad vävnadsstruktur av betydelse för den slutliga lumendiametern, en process som också kan vara ett bra terapeutiskt mål.

Slutsatser

Trots de framsteg som gjorts inom kärlobiologisk forskning på senare år återstår att finna en lösning av restenosproblemet. Vi vet mer om de cellulära och molekylära mekanismer som är inblandade i utvecklingen av intimal hyperplasi än om någon annan biologisk process i kärlväggen, men vi måste lika fullt lära oss mer om hur en aterosklerotisk kärlvägg reagerar på trauma vid kärkirurgisk intervention.

Framtida studier i relevanta djurmodeller, t ex apor med fullt utvecklade ateroskleros, kan utöka våra kunskaper, och i kombination med de vi redan har om intimal hyperplasi kan vi kanske slutligen finna attraktiva behandlingsmetoder mot denna irriterande process.

Referenser

1. Nilsson J. Ateroskleros – den molekylära bakgrunden. *Läkartidningen* 1991; 88: 127-9.
2. Glagov S. Intimal hyperplasia, vascular modeling, and the restenosis problem. *Circulation* 1994; 89: 2888-91.
3. Johansson SR, Emanuelsson H, Hansson GK, Holm J. Restenos efter koronar angioplastik. *Kärlväggforskning ger hopp om profylax*. *Läkartidningen* 1993; 90: 3310-3.
4. Berk BC, Harris K. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: new therapeutic insights from pathogenic mechanisms. *Adv Intern Med* 1995; 40: 445-501.
5. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ERM. The intima: soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 1995; 77: 445-65.
6. Fredholm BB, Heldin CH. Tillväxtfaktorer – mekanismerna klarnar. *Läkartidningen* 1995; 92: 1459-62.
7. Thyberg J, Blomgren K, Hedin U, Dryjski M. Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: an electronic – microscopic and stereological study. *Cell Tissue Res* 1995; 281: 421-8.
8. Geary RL, Williams JK, Golden D, Brown DG, Benjamin ME, Adams MR. Time course of cellular proliferation, intimal hyperplasia, and remodeling following angioplasty in monkeys with established atherosclerosis. A nonhuman primate model of restenosis. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 34-43.
9. Thyberg J. Differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells in culture. *Int Rev Cytol* 1996; 169: 183-265.
10. Hedin U, Clowes AW. Biology of vascular reconstructions: mechanisms of intimal hyperplasia, stenosis and restenosis. In: Yao JT, Pearce WT, eds. *Progress in vascular surgery*. Chicago, Ill, USA: Appelton and Lange, 1996: 37-50.

11. Assoian RK, Marcantonio EE. The extracellular matrix as a cell cycle control element in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest* 1996; 98: 2436-9.
12. Scott-Burden T, Vanhoutte PM. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation* 1993; 87: V51-V55.
13. Geary RL, Kohler TR, Vergel S, Kirkman TR, Clowes AW. Time course of flow-induced smooth muscle cell proliferation and intimal thickening in endothelialized baboon vascular grafts. *Circ Res* 1994; 74: 14-23.
14. Hedin U, Bottger BA, Forsberg E, Johansson S, Thyberg J. Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1988; 107: 307-19.
15. Hedin U, Holm J, Hansson GK. Induction of tenascin in rat arterial injury; relationship to altered smooth muscle cell phenotype. *Am J Pathol* 1991; 139: 649-56.
16. Giachelli C, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1993; 92: 1686-96.
17. Lefkovits J, Ivanhoe RJ, Califf RM, Bergelson BA, Anderson KM, Stoner GL et al. Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade by a chimeric monoclonal antibody (abciximab) on acute and six-month outcomes after percutaneous transluminal coronary angioplasty for acute myocardial infarction. EPIC investigators. *Am J Cardiol* 1996; 77: 1045-51.
18. Mintz GS, Popma JJ, Hong MK, Pichard AD, Kent KM, Satler LF et al. Intravascular ultrasound to discern device-specific effects and mechanisms of restenosis. *Am J Cardiol* 1996; 78: 18-22.
19. O'Brien ER, Alpers CE, Stewart DK, Ferguson M, Tran N, Gordon D et al. Proliferation in primary and restenotic coronary atherectomy tissue: implications for anti-proliferative therapy. *Circ Res* 1993; 73: 223-31.
20. Weissberg PL, Clesham GJ, Bennett MR. Is vascular smooth muscle cell proliferation beneficial? *Lancet* 1996; 347: 305-7.