

Bo Risberg, professor, överläkare (bo.risberg@surgery.gu.se)

Sepideh Hagvall och **Gisela Helenius**, doktorander;
samtliga vid kärl–thoraxkirurgiska kliniken, Sahlgrenska Universitetssjukhuset, Göteborg

Intensiv forskning om konstgjorda blodkärl inom hjärt–kärlkirurgin

■ Kardiovaskulära sjukdomar svarar för den i särklass största dödligheten och sjukligheten hos människor över 40 år. Aterosklerosen är den vanligaste orsaken till för tidig död och invaliditet. Olika kirurgiska och andra interventionella metoder som idag används för att ge symtomlindring och förhindra kardiovaskulära komplikationer som hjärtinfarkt, slaganfall eller amputation kommer att vara av stor vikt för lång tid framöver.

Ett principiellt annat sätt att minska den ischemiska skadan är att påskynda naturens egen läkningsprocess genom att inducera bildning av nya blodkärl in situ, angiogenes. Lokal instillation av tillväxtstimulerande faktorer såsom VEGF, »vascular endothelial growth factor«, eller genetiskt material för att därigenom inducera en lokal produktion av motsvarande faktorer har använts både experimentellt och kliniskt med uppmuntrande resultat. En mer detaljerad beskrivning av detta intressanta forskningsfält ligger dock utanför ramen för denna artikel.

Vid rekonstruktiv kärlkirurgi finns ett behov av att ha kroppsegna reservdelskärl. Syntetiska graft har en långtidsfunktion som är klart underlägsen biologiska alternativ såväl vid bypasskirurgi på hjärtats kranskärl som vid perifer kärlkirurgi på extremiteterna. En del patienter saknar egna reservdelskärl, exempelvis vena saphena magna, som är det viktigaste reservdelskärl i kroppen. När det gäller ersättning av små blodkärl finns ett stort behov av artificiella biologiska graft. Vid rekonstruktion på stora kärl som t ex aorta eller dess grenar fungerar syntetiska graft tillfredsställande.

Konstgjorda biologiska kärl

Den cellbiologiska utvecklingen med möjligheter att odla endotelceller och glatta muskelceller banade vägen för försök under tidigt 1980-tal att ta fram blodkärl baserade på »tissue engineering«, dvs konstgjorda biologiska kärl, TEBV, »tissue engineered blood vessels«.

Det första försöket att göra ett biologiskt kärlgraft publicerades 1986 av Weinberg och Bell [1]. De använde kollagen som stödjevävnad men noterade en dålig hållfasthet. Kollagen användes dock av flera grupper i efterföljande rapporter [2, 3]. Förnyat intresse kring biologiska kärlgraft uppstod när två olika grupper rapporterade framgångsrika försök att odla fram blodkärl i odlingskammare [4, 5].

L'Heureux och medarbetare producerade TEBV baserat

SAMMANFATTAT

Det finns ett stort behov av konstgjorda blodkärl inom såväl hjärtkirurgi som perifer kärlkirurgi.

Framgångsrika experiment under de senaste åren har drivit fram olika varianter av konstgjorda biologiska blodkärl.

Fältet är i dynamisk utveckling, bl a med applicering av stamcellsteknologi, men det torde dröja flera år innan kliniskt användbara kärl finns tillgängliga.

på samodling av endotelceller, glatta muskelceller och fibroblaster i en sandwichliknande uppbyggnad i ett statiskt system. Kärlen hade en kärlliknande struktur, matrix och god hållfasthet. Preliminära in vivo-studier på hundar visade att graften under kort tid delvis stod öppna. Humana celler användes, varför man fick en xenograftsituation vid implantation på hund.

Niklasons grupp utvecklade TEBV från bovina celler men under dynamiska betingelser i speciella bioreaktorer där kärlen var utsatta för pulsattillt flöde. De kärl som implanterades på gris var öppna i två veckor. Även dessa kärl hade god hållfasthet och visade dessutom farmakologisk stimulerbar vaskulär reaktivitet.

Flera forskningsgrupper har framgångsrikt fortsatt utvecklingen av TEBV.

Tre utvecklingslinjer

Principiellt finns tre utvecklingslinjer för TEBV:

- Preformerade kärl
- Hybridkärl
- Fullodlade kärl

Preformerade kärl. Med preformerade kärl menas kärl som tagits fram genom att en mall, t ex ett rör eller en stav, lagts in i kroppen. Kärlbildas genom att vävnad växer i och runt mallen. Den första typen av dylika kärl, s k Sparks mandrill,



Foto: S HAGVALL, G HELENUS

Figur 1. Biologiskt konstgjort kärl baserat på polyglykolsyra.

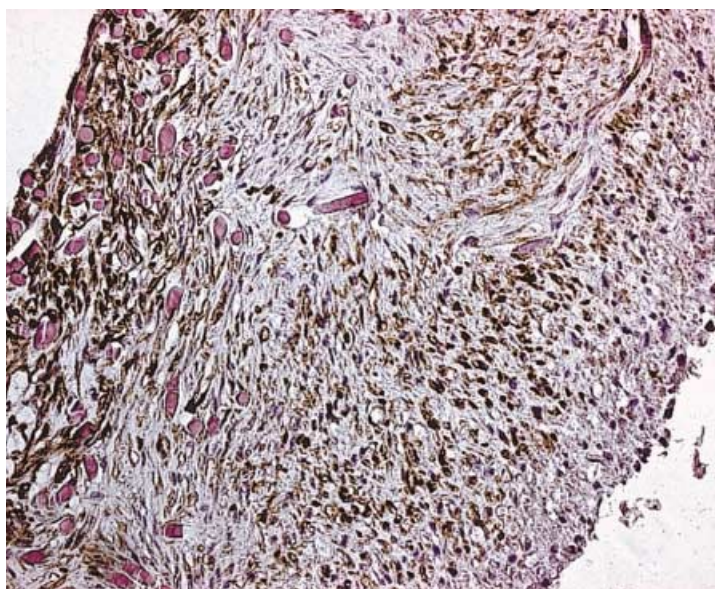


Foto: S HAGVALL, G HELENUS

Figur 2. Fullständig inväxt av α -aktinpositiva glatta muskelceller (brunfärgade) i stödjevåvnaden av polyglykolsyra (violett färgad).

fanns för många år sedan. En stav implanterades i underhuden. Ett rör av granulationsvävnad bildades, som därefter opererades ut. Tyvärr hade dessa kärl både dålig hållfasthet och otillfredsställande öppetstående frekvens [6].

En modern variant, som i varje fall på experimentstadiet förefaller intressant, är ett kärl utvecklat i peritoneum [7]. En silikon slang läggs in i peritonealhålan på experimentdjur. Slangen bekläds av myofibroblaster, kollagen och ett lager av mesotelceller ytterst. När röret tas ut efter ett par veckor tas silikonslangen bort och röret vänds ut och in. Mesotelcellslagret kommer då att motsvara endotelcellslagret i ett vanligt kärl. Man har även visat att det är fullt möjligt att med laparoskopisk teknik framställa dylika kärl. Dessa kärl har vasoreaktivitet, dvs myofibroblasterna utvecklar kontraktile egenskaper. Efter implantation i artärcirkulationen på hund stod dessa kärl öppna efter 16 månader [8].

Hybridkärl. Med hybridkärl avses kärl som består av en syntetisk och en biologisk komponent. Denna forskningslinje har fått mycket uppmärksamhet. De första försöken gjordes i mitten av 1980-talet med sk endotelcellsutsädd i syntetiska graft. Tanken var att kunna reducera trombogeniciteten hos dessa graft genom att så ut autologa endotelceller. Trots en stor satsning fick tekniken dock aldrig något kliniskt genomslag. En orsak till detta kan vara att proceduren var komplicerad.

Det finns idag mycket intressanta kliniska data avseende patienter efter åtta till tio års uppföljning. De indikerar att öppetstående frekvensen hos dessa hybridgraft är fullt i klass med den som erhålls med vena saphena magna-graft [9]. Denna studie har inspirerat till en stor multicenterstudie, där bypass till kärl under knäledsspringan utförs randomiserat med antingen vena saphena magna- eller PTFE-graft med en inre endotelcellsbeklädnad.

Flera grupper utnyttjar hybridkärl genom att låta glatta muskelceller, fibroblaster (myofibroblaster) och/eller endotelceller växa in i en syntetisk stödjevåvnad. Någon form av polyuretan används ofta. Detta material har fördelen av att vara elastiskt och tryckeftergivligt, vilket troligen är värdefullt [10]. De flesta polyuretaner bryts ned så småningom, även om vissa stabila varianter har tagits fram [11]. Genom att manipulera odlingsbetingelser såsom cellkoncentration

och inkubationstid kan endotelialiseringen optimeras, liksom förmågan hos endotelet att motstå hydrodynamisk stress [11].

Ett annat nedbrytningsbart material som är mycket användbart är polyglykolsyra (PGA). Materialet bryts ned genom hydrolysis. Den biologiska vävnaden kan dock, som visats i djurförsök [5], överta hållfastheten i väggen och ge en god biologisk styrka. PGA tillåter cellinväxt av t ex glatta muskelceller eller fibroblaster.

Att använda nedbrytningsbar stödjevåvnad kan hypotetiskt vara en fördel, då kärlet till slut består endast av autolog vävnad. Tyvärr kan flera nedbrytningsbara material ge upphov till toxiska substanser som kan ha en hämmande effekt på celltillväxt och funktion. Tidigare erfarenheter med degraderbara graft har inte varit helt positiva, varför det kommer att bli mycket intressant att följa hur denna nya typ av material klarar långtidsstudier. Kliniska studier är nära förestående för en del grafttyper.

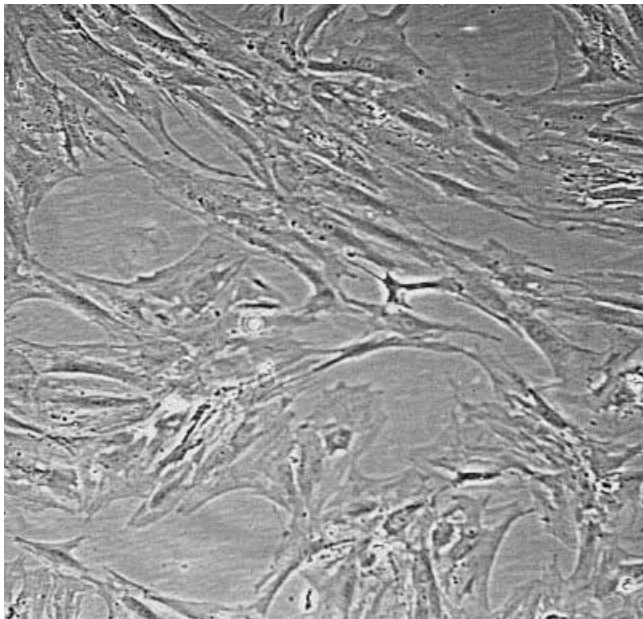
Figur 1 visar ett kärl efter åtta veckors odling i bioreaktor i vårt laboratorium. Positiv färgning för glatta muskelceller (α -aktin) visar fullständig inväxt av dessa celler (Figur 2).

Interaktionen mellan celler och syntetmaterialet är ett hett forskningsområde. Man eftersträvar ett inert material som inte inducerar en inflammatorisk reaktion och där samtidigt cellerna kan växa in i materialets porer och ge en god biologisk förankring.

En tanke med att använda en syntetisk mall för cellerna att växa i och på är att ha en kärlvägg med god mekanisk styrka under lång tid. För att förbättra adhesionen av celler till stödjevåvnaden har olika slags förbehandling använts. Kollagen, fibrin, poly-L-lysin, fibronectin eller extracellulär matrix har visat sig kunna öka cellretentionen [12-15]. Även sk RGD-peptider (arginin-glycin-aspartat) har visat sig kunna förbättra cellernas adhesionsförmåga [16].

Fullodlade kärl. Med fullodlade kärl avses kärl helt baserade på biologisk vävnad och framodlade från enskilda celler. Man kan ha biologiska stödjevåvnader som t ex kollagen eller elastin, i vilka cellerna får växa. Stödjevåvnaden formas som ett rör. Djurexperimentella studier har visat att dessa vävnader fungerar tillfredsställande på kort tid med god hållfasthet [17].

I de ursprungliga studierna från L'Heureux och medarbe-



Figur 3. Adulta mesenkymala stamceller som används för konstruerande av konstgjorda biologiska kärl.

tare [4] varvades de olika lagren enligt sandwichteknik. Man lyckades simulera intima, media och adventitia. Genom s k elektrospinning av t ex kollagen testas om man kan få en bättre matrix [18].

Varifrån tas endotelcellerna?

I princip finns två källor för autologt endotel:

- Vener
- Omentfett eller subkutant fett

Venkällan är oftast v jugularis externa, v brachialis eller v saphena magna. I de flesta kliniska studier som hittills publicerats rörande endotelcellsutsädd i syntetiska graft har venendotel använts [19]. I den enda långtidsstudie som finns används endotel från v jugularis externa [9].

Fett innehåller förutom fettceller även mikrokärl med endotelceller. Endotel från dessa kan isoleras, men en kvarstående fråga är hur pass ren fraktionen är. Sannolikt är den en blandning av endoteliala och mesoteliala celler [20, 21]. Båda celltyperna har liknande antitrombotiska egenskaper, varför differentieringen emellan dem kanske är mindre intressant. Subkutant fett kan användas som endotelkälla. Möjligheten att utnyttja fett från fett sugning öppnar nya perspektiv [22].

Ett hett område är stamceller, och hur de kan utnyttjas för differentiering till de i kärlväggen ingående cellslagen. Många frågetecken finns kring denna typ av forskning. Kan odling under mekanisk stress, t ex pulsilitet eller sjukkrifter, »shear stress«, ge en differentiering? I första hand torde adulta stamceller bli aktuella. Forskning pågår på flera olika laboratorier. Figur 3 visar mesenkymala stamceller som vår grupp börjat använda för framställning av TEBV.

Genom att använda autologa celler slipper man immunologiska problem. En nackdel är dock att det tar en viss tid från det att cellerna skördats från t ex en ven tills ett färdigt kärl finns tillgängligt. Det rör sig sannolikt om mellan en och fyra månader, vilket innebär att patienter med akuta problem inte kan komma in i fråga.

Djurexperimentella studier

Det finns ett begränsat antal djurexperimentella studier gjorda med TEBV. Korttidsstudier (sju dagar) av L'Heureux och

medarbetare [4] visade att tre av sex kärl var öppetstående efter implantation i femoralisartären. Hanterlighet och suturbarhet liknade dem hos naturliga kärl. Noteras bör att dessa författare använde humana celler i kärl som planterades på hund. Niklasons grupp använde kärl baserade på autologa celler som planterades i gris. Ett autologt kärl sattes in och stod öppet efter fyra veckor. Kärl som inte odlats under pulsatile betingelser hade kortare öppetstående tid.

De preformerade kärl som Campbells grupp drivit fram har testats i olika kärl på rått, kanin och hund. De har rapporterat stå öppna efter 16 månader [23]. Intressant är att dessa kärl rapporteras ha strukturer som ser ut som elastinlameller.

Andra grupper har rapporterat goda långtidsresultat med TEBV. Sotoudeh och medarbetare använde glatta muskelceller och endotelceller från hund på en teflonmatrix. De rapporterade goda resultat efter tolv veckors implantation i carotis på hund [24]. I samma djurslag har goda resultat visats efter 36 månader med ett TEBV-baserat på icke nedbrytbart polyuretan [25].

Några aktuella problemställningar inom TEBV-forskning

- Hur skall man få optimal interaktion mellan stödjevävnad och celler?
- Vilken form av stödjevävnad är bäst?
- Hur får man bäst interaktion mellan cellerna?
- Hur reducerar man trombogeniciteten?
- Hur är hållfastheten på sikt?
- Vad är stamcellernas roll?

Forskningen sker, som framgått ovan, på flera fronter, och man kan tänka sig att olika varianter av TEBV kommer att tas fram.

När blir TEBV kliniskt tillgängliga?

Vissa hybridgraft är redan ute på preklinisk testning. Någon enstaka fallbeskrivning finns rapporterad [26]. Med tanke på de många basala problem som ännu inte är lösta är det realistiskt att vänta sig att att kärlen kan lanseras relativt snart. Ett exempel kan tas ifrån endotelutsädda graft. De första kliniska studierna påbörjades för mer än 15 år sedan. Det stod dock klart tämligen snart att basala problem väntade på sin lösning, varför tekniken inte blivit någon klinisk rutinmetod. Först nu påbörjas en randomiserad studie.

Sannolikt kommer det att ta mellan fem och tio år innan TEBV blir använda i klinisk rutin.

*

Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.

Referenser

1. Weinberg CB, Bell E. A blood vessel constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* 1986;231:397-400.
2. Hirai J, Kanda K, Oka T, Matsuda T. Highly oriented, tubular hybrid vascular tissue for a low pressure circulatory system. *ASAIO Journal* 1994;40:383-8.
3. Ziegler T, Alexander RW, Nerem RM. An endothelial cell-smooth muscle cell co-culture for use in the investigation of flow effects on vascular biology. *Ann Biomed Eng* 1995;23:216-25.
4. L'Heureux N, Paquet S, Labbé R, Germain L, Auger FA. A completely tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J* 1998;12:47-56.
5. Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R, et al. Functional arteries grown in vitro. *Science* 1999;284:489-93.
7. Campbell JH, Efendy JL, Campbell GR. Novel vascular graft grown within recipient's own peritoneal cavity. *Circ Res* 1999;85:1173-8.
8. Chue WL, Campbell JH. Development of an artificial blood vessel. *Cardiovasc Pathol* 2002;11:5.
9. Deutsch M, Meinhart J, Fischlein T, Preiss P, Zilla P. Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in

- 100 patients: a 9-year experience. *Surgery* 1999;126:847-55.
10. Tai NR, Salacinski HJ, Edwards A, Hamilton G, Seifalian AM. Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction. *Br J Surg* 2000;87:1516-24.
 11. Salacinsky HJ, Tai NR, Punshon G, Guidiceandrea A, Hamilton G, Seifalian AM. Optimal endothelialisation of a new compliant poly(carbonate-urea)urethane vascular graft with effect of physiological shear stress. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;20:342-52.
 12. Zilla P, Fasol R, Preiss P. Use of fibrin glue as a substrate for in vitro endothelialization of PTFE vascular grafts. *Surgery* 1989;105:515-22.
 14. Stansby G, Berwanger C, Shuykla N, Hamilton G. Endothelial cell seeding of vascular grafts: status and prospects. *Cardiovasc Surg* 1994;2:543-8.
 15. Ye Q, Zund G, Jockenhoevel S, Schoberlein A, Hoerstrup SP, Grunfelder J, et al. Scaffold precoating with human autologous extracellular matrix for improved cell attachment in cardiovascular tissue engineering. *ASAIO J* 2000;46:730-3.
 17. Berglund JD, Nerem RM. Towards the development of a biological tissue engineered vascular graft: incorporating intact elastin scaffolds into collagen-based constructs. *Cardiovasc Pathol* 2002;11:35.
 19. Tiwari A, Salacinski HJ, Hamilton G, Seifalian AM. Tissue engineering of vascular bypass grafts: role of endothelial cell extraction. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001;21:193-201.
 20. Stansby G, Shukla N, Fuller B, Hamilton G. Cells derived from omental fat tissue and used for seeding vascular prostheses are not endothelial in origin. *J Vasc Surg* 1992;15:583-5.
 21. Chung-Welch N, Patton WF, Shepro D, Cambria RP. Human omental microvascular endothelial and mesothelial cells: characterization of two distinct mesodermally derived epithelial cells. *Microvasc Res* 1997;54:108-220.
 23. Campbell J, Chue WL, Campbell GR. Development of artificial blood vessel. *Cardiovasc Pathol* 2002;11:5.
 25. Salacinsky HJ, Tiwari A, Carson RJ, Edwards A, Bowald S, Seifalian AM, et al. In vivo biocompatibility and biostability of a novel compliant microporous poly(carbonate-urea)urethane vascular graft. *Cardiovasc Pathol* 2002;11:24.
 26. Shinoka T, Imai Y, Kashiwagi J, Watanabe M, Matsamura G, Kosaka Y, et al. Successful clinical application of tissue engineered blood vessel. *Cardiovasc Pathol* 2002;11:59.

I Läkartidningens elektroniska arkiv
<http://lartarkiv.lakartidningen.se>
 är artikeln kompletterad med fullständig referenslista.



SK RIVSÅ ATTDETSYNS - OCH BLIR LÄST

Läkartidningen och **BMJ (British Medical Journal)** arrangerar tre endagskurser för medicinska skribenter, 20, 21 och 22 november 2002.

Kursledare är Tim Albert, vetenskapsjournalist på BMJ. Kurserna har gått flera år i Storbritannien och rönt stor uppskattning.

Kursavgiften är 2500 kronor och inkluderar frukost, lunch, kaffe och förfriskningar.

Så här anmäler Du Dig: Skicka in Dina fullständiga adressuppgifter, och ett kort CV (max 200 ord) till inga-maj.lagerholm@lakartidningen.se

Din anmälan måste vara hos oss senast den 30 oktober.

Josef Milerad
 docent, medicinsk chefredaktör