

Podstawy teoretyczne i plan badania VIFCAD – terapii genowej choroby wieńcowej u pacjentów bez możliwości zabiegowej rewaskularyzacji z zastosowaniem podawanego transendokardialnie plazmidu bicistronowego VEGF/FGF

Theoretical base and investigational plan of the VIFCAD study – gene therapy for refractory coronary artery disease in no-option patients using transendocardial bicistronic VEGF/FGF plasmid injections

Krzysztof Kukuła¹, Maciej Dąbrowski¹, Lidia Chojnowska¹, Zbigniew Chmielak¹, Adam Witkowski¹, Mirosław Skwarek¹, Jacek Kądziera¹, Przemysław Janik³, Maciej Małecki³, Anna Teresińska¹, Łukasz Kownacki^{2,4}, Dorota Piotrowska-Kownacka^{2,4,5}, Witold Rużyłło¹

¹Institut Kardiologii, Warszawa

²I Katedra i Klinika Kardiologii, Akademia Medyczna, Warszawa

³Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii, Warszawa

⁴I i II Zakład Radiologii Klinicznej, Akademia Medyczna, Warszawa

⁵Zakład Medycyny Nuklearnej, Akademia Medyczna, Warszawa

Postępy w Kardiologii Interwencyjnej 2006; 2, 1 (3): 116–123

Słowa kluczowe: terapia genowa, angiogeneza, plazmid, choroba wieńcowa, VEGF, FGF.

Key words: gene therapy, angiogenesis, plasmid, coronary artery disease, VEGF, FGF.

Wstęp

Terapia genowa jako metoda leczenia różnych chorób budzi od wielu już lat duże emocje i ciągle wiąże się z nią duże nadzieje. Jak dotąd nadzieje te pozostają w dużej mierze niespełnione. Główny nurt badań nad terapią genową w kardiologii dotyczy leczenia zaawansowanej choroby niedokrwiennej serca z zastosowaniem genów dla czynników wzrostu naczyń. Wynika to z faktu, że pomimo rozwoju technik rewaskularyzacji i postępu w zakresie leczenia farmakologicznego, ok. 5–12% pacjentów z chorobą wieńcową nie można skutecznie leczyć żadną ze standardowych metod z powodu zbyt dużego zaawansowania procesu chorobowego. Terapeutyczne wzmocnienie procesu angiogenezy w obrębie mięśnia sercowego mogłoby polepszyć krążenie oboczne, prowadząc do ustąpienia objawów dławicowych [1]. We wcześniejszych próbach doświadczalnych wykazano, że stymulacja tkanek czynnikami wzrostu naczyń, takimi jak VEGF (naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu),

FGF (czynnik wzrostu fibroblastów), HGF (czynnik wzrostu hepatocytów) stymuluje proces angiogenezy [2–4]. Aktywne formy czynników wzrostu naczyń mają krótki okres półtrwania we krwi, charakteryzują się też działaniami niepożądanymi przy zastosowaniu ogólnoustrojowym. Dlatego obecne badania koncentrują się na próbach wywołania angiogenezy w wyniku transfekcji komórek mięśnia sercowego różnymi rodzajami genów dla czynników wzrostu naczyń.

Ze względu na spodziewaną skuteczność, w badaniach najczęściej wykorzystuje się VEGF, a zwłaszcza jego najaktywniejszą formę, zawierającą 165 aminokwasów (VEGF-A165) oraz FGF, a głównie zasadową formę FGF (bFGF, czyli FGF-2). Aby doszło do transfekcji, geny podaje się albo w postaci plazmidu (najmniejsza skuteczność transfekcji, ale prawdopodobnie największe bezpieczeństwo), w sprzężeniu z wektorem wirusowym lub w postaci liposomalnej. Prowadzone są również prace nad innymi, nowymi metodami transfekcji.

Adres do korespondencji/Corresponding author: dr n. med. Krzysztof Kukuła; I Klinika Choroby Wieńcowej; Instytut Kardiologii, ul. Alpejska 42; 04-628 Warszawa, tel. +48 22 343 42 67; faks +48 22 613 38 19; e-mail: kris@mp.pl

Generalnie można też wyróżnić 5 różnych metod podania genów do mięśnia sercowego. Pierwsza z nich, najprostsza, to podanie dowieńcowe. Druga to podanie poprzez układ żylny serca za pomocą odwrotnej perfuzji. Trzecia polega na bezpośrednim podaniu do mięśnia sercowego od strony epikardium (najczęściej operacyjnie, ale również np. przez cewnik z igłą wprowadzony do układu żylnego, z wykorzystaniem nakłucia mięśnia od strony zewnętrznej poprzez żyłę). Czwarta to podanie bezpośrednie do mięśnia od strony endokardium za pomocą specjalistycznego cewnika. Wreszcie piąta to podanie roztworu zawierającego geny do światła lewej komory podczas operacji kardiologicznej przy zamkniętym odpływie krwi z lewej komory [5].

Jakkolwiek pierwsze próby tego typu leczenia były zachęcające, dotychczas opublikowane badania kontrolowane nie wykazały jednoznacznie skuteczności terapii genowej. Poniżej przedstawiamy krótki przegląd

danych będących podstawą i inspiracją prowadzonego przez nas obecnie programu badawczego.

Badania eksperymentalne

Badania kliniczne poprzedziło wiele prób eksperymentalnych w hodowlach tkankowych i na zwierzętach. Pierwsze badania dotyczyły hodowli komórkowych bądź tkankowych, preparatów kończyn lub serc [6–9]. Wykazano, że stymulacja za pomocą czynników wzrostu prowadzi do rozwoju drobnych naczyń krążenia obocznego lub przypominających je struktur.

Badania kliniczne

Kolejnym krokiem w badaniach nad terapeutyczną angiogenezą w sercu były pilotażowe próby kliniczne. Większość badań klinicznych dotyczących terapii genowej i wywołania angiogenezy w chorobie niedokrwiennej serca to badania bez grupy kontrolnej, bez randomizacji. Niektóre z nich scharakteryzowano w tab. 1.

Tabela 1. Wybrane badania kliniczne bez randomizacji, w których wykazywano potencjalną skuteczność terapeutycznej angiogenezy w chorobie niedokrwiennej serca
Table 1. Selected non-randomized studies showing potential therapeutic effect of angiogenesis in coronary artery disease

Badanie	Czynnik wzrostu i wektor	Sposób podania	Główne kryterium włączenia	Czas obserwacji	Efekty
Losordo i wsp., Circulation 1998; 98	VEGF-A165, plazmid	od zewnątrz do miokardium	choroba wieńcowa bez możliwości rewaskularyzacji	10 tygodni	poprawa w SPECT, spadek zapotrzebowania na nitraty
Rosengart i wsp., Circulation; 1999; 100	VEGF 121, wektor adenowirusowy	od zewnątrz do miokardium	choroba wieńcowa bez możliwości rewaskularyzacji	miesiąc	poprawa w SPECT, klasy CCS i tolerancji wysiłku
Laham i wsp., J Am Coll Cardiol. 2000; 36	FGF-2	podanie dowieńcowe	choroba wieńcowa bez możliwości rewaskularyzacji	1–6 mies.	poprawa tolerancji wysiłku, wzrost grubości i lokalnej kurczliwości mięśnia sercowego w NMR, poprawa jakości życia
Symes i wsp., Ann Thorac Surg. 1999; 68	VEGF-A 165, plazmid	od zewnątrz do miokardium	choroba wieńcowa bez możliwości rewaskularyzacji, klasa CCS III i IV	3 mies.	poprawa w SPECT, spadek zapotrzebowania na nitraty
Hedman i wsp., Circulation 2003; 107	VEGF 121, wektor adenowirusowy	dowieńcowo	choroba wieńcowa, podanie w czasie angioplastyki	6 mies.	zmniejszenie odsetka restenozy
Unger i wsp., Am J Cardiol. 2000; 85	FGF-2	bolus dowieńcowy	stabilna choroba wieńcowa	miesiąc	wzrost średnicy tętnic nasierdziowych
Schumacher i wsp., Circulation 1998; 97	FGF-1	od zewnątrz do miokardium	trójnaczyńcowa choroba wieńcowa z istotnymi zmianami w obwodowym odcinku GPZ	od 12 tyg. do 3 lat	nasilenie angiogenezy w okolicy dystalnej GPZ, poprawa w SPECT, zmniejszenie zapotrzebowania na nitraty
Seiler i wsp., Circulation 2001; 104	GM-CSF	podskórnym i dowieńcowo	choroba wieńcowa bez możliwości rewaskularyzacji	2 tyg.	wzrost wskaźnika przepływu wieńcowego; zmniejszenie zmian w EKG po inflacji balonu w tętnicy wieńcowej

VEGF – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu; FGF – czynnik wzrostu fibroblastów; CCS – klasa czynnościowa wg Kanadyjskiego Towarzystwa Kardiologicznego; NMR – magnetyczny rezonans jądrowy; GM-CSF – czynnik wzrostu linii granulocytarnej i mieloidalnej; SPECT – badanie izotopowe metodą tomografii emisyjnej (single proton emission tomography)

Dotychczas przeprowadzono niewiele klinicznych badań kontrolowanych, dotyczących terapii genowej i leczenia choroby wieńcowej czynnikami wzrostu naczyń. Poniżej wymieniono większość z nich:

- FIRST [10] – w tym badaniu z randomizacją, przeprowadzonym metodą podwójnie ślepej próby podawano dowieńcowo rekombinowany FGF-2. Nie wykazano istotnych różnic pomiędzy grupami. Pacjenci leczeni FGF-2 wykazywali tendencję do hipotensji;
- AGENT [11] – badanie z randomizacją przeprowadzone metodą podwójnie ślepej próby, do którego włączono 79 pacjentów. Stosowano gen dla FGF-4 połączony z wektorem adenowirusowym (Ad5-FGF4) podawany dowieńcowo. W grupie badanej zaobserwowano polepszenie tolerancji wysiłku;
- AGENT-2 [12] to badanie podobne do poprzedniego, do którego włączono 52 pacjentów. Poprawę ukrwienia oceniano w badaniu SPECT. Nie uzyskano istotnej statystycznie poprawy w zakresie globalnej perfuzji;
- AGENT-3 i AGENT-4 [13] to kolejne badania z wektorem adenowirusowym, dołączonym do FGF-4, podawanym dowieńcowo, do których planowano włączyć po kilkuset pacjentów. Rekrutację przerwano, gdy okazało się, że nie ma szans na osiągnięcie istotnych statystycznie różnic w zakresie głównych punktów końcowych;
- badanie Vale i wsp. [14], w którym wzięło udział jedynie 6 pacjentów, ale było to pierwsze badanie z zastosowaniem transendokardialnego podania plazmidu u ludzi;
- badanie Losordo i wsp. [15], w którym stosowano plazmid VEGF-2 transendokardialnie (NOGA). Wzięło w nim udział 19 pacjentów. Zaobserwowano tendencję do poprawy w zakresie klasy CCS, wydłużenia czasu wysiłku oraz poprawę wyniku *Seattle Angina Questionnaire*;
- *Euroinject One* [16] to jedyne jak dotąd badanie z randomizacją, przeprowadzone metodą podwójnie ślepej próby, w którym zastosowano transendokardialne podanie plazmidu kodującego VEGF-A165 przy użyciu systemu NOGA. Do badania włączono 80 pacjentów. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w zakresie głównych punktów końcowych, ale wykazano regionalną poprawę kurczliwości w obszarze podania plazmidu. Zarówno w ocenie badaniem SPECT, jak i systemem NOGA zaobserwowano też regionalną poprawę perfuzji mięśnia w tym obszarze [17];
- VIVA [18] to badanie z randomizacją przeprowadzone metodą podwójnie ślepej próby, w którym zastosowano aktywny rekombinowany VEGF (rhVEGF – białko, a nie gen) u 178 pacjentów. Zastosowano podanie dowieńcowe, a następnie dożylnie. Do 60. dnia nie zaobserwowano różnic między grupą badaną a grupą placebo. Po 120 dniach obserwacji wystąpiła tendencja do poprawy tolerancji wysiłku w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej.
- badanie Kleimana i Califfa [19] – stosowano FGF-2 podawany dowieńcowo u pacjentów z chorobą wieńcową

bez możliwości rewaskularyzacji. W ciągu 6 mies. obserwacji nie zaobserwowano różnicy w porównaniu z grupą placebo;

- GENESIS to nie zakończone jeszcze badanie, w którym stosuje się VEGF podawany za pomocą nowego rodzaju cewnika.

Jak widać z powyższych danych, nie ma jak dotąd jasnej odpowiedzi na pytanie, czy terapia genowa choroby wieńcowej może być skuteczna przy użyciu obecnie stosowanych metod, stąd idea przeprowadzenia badania przedstawionego wstępnie w niniejszej pracy. Nie jest to nasze pierwsze doświadczenie tego typu. W Instytucie Kardiologii w Warszawie, jako jednym z ośrodków, prowadzone było zakończone kilka lat temu wieloośrodkowe badanie z randomizacją *Euroinject One* oraz badanie *Agent-4*. Obecne, polskie badanie VIFCAD finansowane jest przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji oraz Fundację na rzecz Wspierania Rozwoju Polskiej Farmacji i Medycyny.

W naszym badaniu zaproponowaliśmy zastosowanie plazmidu dwucistronowego [20] kodującego naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) oraz czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF), ponieważ we wcześniejszych pracach stwierdzono, że najsilniejsze działanie angiogenne wywiera właśnie zasadowy FGF (bFGF) oraz VEGF, zwłaszcza jego postać zawierająca 165 aminokwasów.

W badaniach nad chorobą niedokrwinną serca wykazano, że wielkość ubytku perfuzji mięśnia sercowego oceniana w scyntygrafii izotopowej jest ważnym czynnikiem predykcyjnym niekorzystnego przebiegu choroby wieńcowej. Poza tym metoda ta pozwala na dokładną i powtarzalną ocenę perfuzji mięśnia sercowego. Dlatego, podobnie do innych autorów, również w naszym badaniu ocena SPECT jest głównym sposobem, umożliwiającym zlokalizowanie docelowego obszaru mięśnia sercowego dla podania genu oraz monitorowanie zmian perfuzji mięśnia sercowego po leczeniu dla oceny wyniku terapii. Dla weryfikacji wyników SPECT oraz dla poszerzenia diagnostyki o ocenę segmentalnej kurczliwości lewej komory, która powinna ulec zwiększeniu w następstwie poprawy ukrwienia, zaproponowaliśmy równoległą ocenę wymienionych parametrów metodą rezonansu magnetycznego.

Dotąd nierozstrzygnięty pozostaje też problem, która droga podania genów jest najlepsza, a także jaki wektor jest najskuteczniejszy przy zachowaniu bezpieczeństwa dla pacjenta.

Bezpośrednie podanie do mięśniówki serca wydaje się najskuteczniejszym dla czynników wzrostu sposobem podania genów, gdyż straty są wtedy najmniejsze. Metoda transfekcji komórek miokardium genami kodującymi

czynniki wzrostu wywołujące angiogenezę wydaje się być tą najbardziej obiecującą. Za pomocą tej strategii usiłuje się wywołać ekspresję genu dla danego czynnika wzrostu w kardiomiocytach, a co za tym idzie angiogenezę i powstawanie nowych kolaterali w obszarze niedokrwionego mięśnia sercowego. Strategia ta wydaje się szczególnie atrakcyjna w przypadku VEGF, ponieważ pierwszy ekson genu dla VEGF zawiera również sekwencję sygnałową umożliwiającą wydzielanie czynnika wzrostu na zewnątrz komórki.

Jak wcześniej wspomniano, stosowane są 3 metody transfekcji komórek: podawanie nagiego plazmidu zawierającego odpowiedni fragment DNA, kompleksu liposomalnego zawierającego plazmid lub użycie wektora wirusowego. Pierwsze dwie metody są stosunkowo proste technicznie, ale mało skuteczne – przy ich użyciu do komórek dociera poniżej 1% podanego DNA. Jednak DNA wprowadzone w ten sposób do komórek nie integruje się z genomem, co podnosi bezpieczeństwo transfekcji i sprawia, że wprowadzony gen dla czynnika wzrostu podlega ekspresji jedynie przez pewien ograniczony czas, z reguły 4–6 tyg. Bardziej efektywne jest użycie wektora wirusowego. W przypadku komórek nie proliferujących, takich jak kardiomiocyty, w grę wchodzi głównie użycie wektora adenowirusowego lub AAV (*adeno-associated virus*). Wektor adenowirusowy może jednak powodować efekt cytotacyjny, reakcję zapalną i wywoływać odpowiedź immunologiczną. Z tego względu w naszym badaniu zdecydowaliśmy o zastosowaniu plazmidu.

Material i metodyka

Pacjenci

W badaniu prowadzonym obecnie w Instytucie Kardiologii docelowo weźmie udział 52 pacjentów, z których 35 zrandomizowanych zostanie do grupy leczonej, a 17 otrzyma plazmid-placebo (grupa kontrolna).

Główne kryteria włączenia

Do badania włączani są pacjenci z nasiloną chorobą wieńcową (\geq CCS III) pomimo optymalnego leczenia farmakologicznego, niekwalifikujący się do rewaskularyzacji metodami standardowymi. Frakcja wyrzucania lewej komory u chorych włączanych do badania musi wynosić powyżej 35%. W badaniu SPECT z dipirydamolem muszą zostać wykazane istotne odwracalne zaburzenia perfuzji. Pacjenci muszą zrozumieć i podpisać zgodę na uczestnictwo w badaniu. Pacjenci muszą być pełnoletni.

Główne kryteria wyłączenia

Charakter zmian w naczyniach musi wykluczać możliwość dalszej rewaskularyzacji za pomocą angioplastyki lub pomostowania naczyń wieńcowych. Z badania wyku-

zeni będą chorzy ze złą funkcją skurczową lewej komory (EF <35% stwierdzoną w echokardiografii lub wentrykulografii), po świeżo przeżytym zawale mięśnia sercowego (<3 tyg.), niepełnoletni, z chorobą nowotworową, ciężką towarzyszącą chorobą ogólną (w tym przede wszystkim z cukrzycą i jednocześnie retinopatią, nieswoistą chorobą zapalną jelit) oraz chorobami autoimmunologicznymi, pacjentki w wieku rozrodczym, jak również chorzy niewyrażający zgody na udział w badaniu. Pacjenci otrzymują możliwie stałe, optymalne leczenie farmakologiczne.

Metodyka

Pacjentów spełniających główne kryteria włączenia i wyrażających zgodę na udział w badaniu hospitalizujemy i wykonujemy badania, potwierdzające kryteria włączenia oraz wykluczające kryteria wyłączenia. Następnie wykonywane jest badanie izotopowe serca metodą SPECT z dipirydamolem oraz obciążeniowy rezonans magnetyczny serca z zastosowaniem adenozyyny.

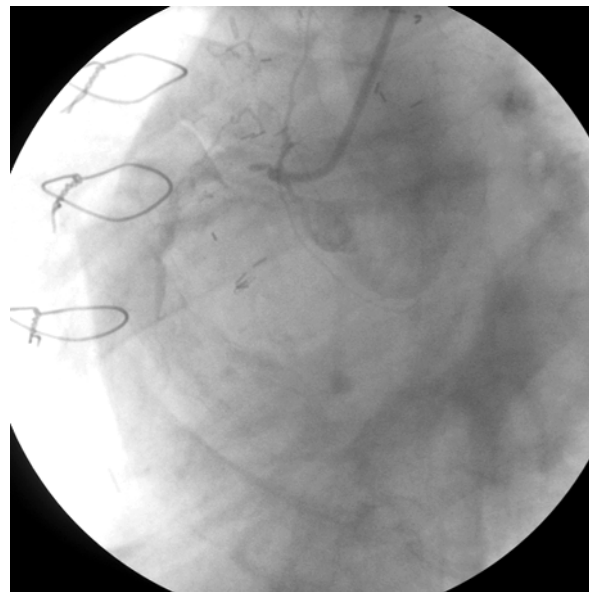
Badanie perfuzji mięśnia sercowego Tc-99m-MIBI SPECT (w spoczynku i podczas wysiłku/po dipirydamolu)

Badanie techniką SPECT wykonywane jest w spoczynku (po nitroglicerynie) i podczas wysiłku (po dipirydamolu), przy zastosowaniu protokołu 2-dniowego (0,3 mCi/kg w spoczynku i 0,3 mCi/kg w wysiłku) lub 1-dniowego (0,11 mCi/kg w spoczynku i 0,3 mCi/kg w wysiłku). Warunki akwizycji badań SPECT: matryca 64 x 64, kąt rotacji γ kamery 180°, liczba projekcji 68, kolimator – niskoenergetyczny wysokorozdzielczy. Czas akwizycji jednej projekcji w protokole 2-dniowym wynosi 25 s, w protokole 1-dniowym 52 s w spoczynku i 13 s w wysiłku. Warunki rekonstrukcji badań SPECT: filtr przed-rekonstrukcyjny Butterwortha o częstotliwości odcięcia równej 0,4 częstotliwości Nyquista i o rzędzie równym 7. Stosowane jest MIBI produkcji OBRI-POLATOM (Świerk, Polska).

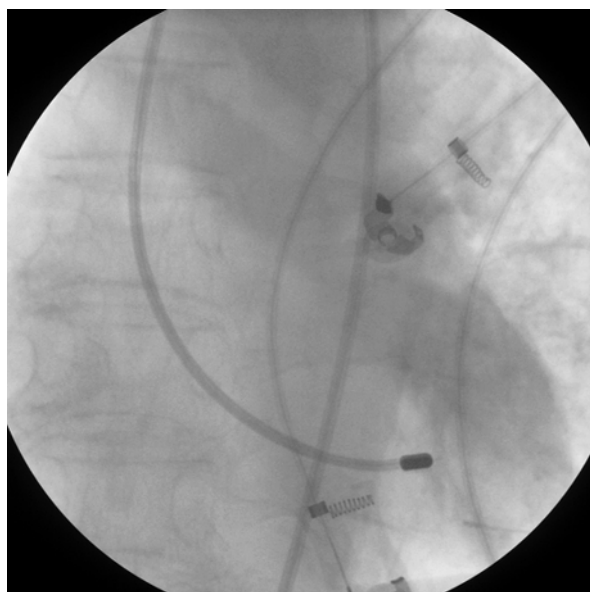
Kryterium kwalifikującym do zastosowania terapii genowej jest stwierdzenie w SPECT odwracalnych zaburzeń perfuzji w co najmniej 2 segmentach danego regionu (np. region dorzecza gałęzi przedniej zstępującej lewej tętnicy wieńcowej składa się z 4 segmentów ściany przedniej, 2 przednio-przegrodowej i 1 z koniuszka), co przy podziale mięśnia lewej komory na 17 segmentów daje wymóg występowania odwracalnych zaburzeń perfuzji w min. 12% mięśnia sercowego.

Obciążeniowy rezonans magnetyczny serca

Wszystkie badania wykonywane są w obecności lekarza, przy pełnym monitorowaniu. Obrazowanie wykonywane jest za pomocą tomografu MR Philips Gyroscan ACS 1,5T. Oceniane są: funkcja skurczowa i rozkurczowa lewej komory przy użyciu trójwymiarowej analizy ilo-



Ryc. 1. Obraz angiograficzny tętnic wieńcowych u jednego z chorych włączonych do badania
Fig. 1. Coronary angiography of one of the patients included in the study



Ryc. 2. Obraz rentgenowski cewnika iniekcyjnego (MyoSTAR) w lewej komorze z wysuniętą do mięśnia igłą
Fig. 2. An X-ray photograph of the MyoSTAR injection catheter inside the left ventricle with the needle protruding from the tip into the muscle

ściowej (oprogramowanie MASS, MEDIS), perfuzja tkankowa z wykorzystaniem efektu pierwszego przejścia paramagnetycznego środka kontrastowego oraz efekt późnego kontrastowania. Badania perfuzyjne wykonywane są w spoczynku i po obciążeniu farmakologicznym adenozyzną (Adenocor, Sanofi Winthrop, wlew dożylny 140 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$. przez 4,5 min); środek kontrastowy (Magne-

vist, Schering, 0,1 mmol/kg masy ciała, 4 ml/s) podawany jest 2-krotnie – po 4 min wlewu adenozyzny oraz w spoczynku. Akwizycje bramkowane są sygnałem EKG. Wyniki badań opracowywane są niezależnie przez dwóch opisujących lekarzy.

Plazmid pVIF

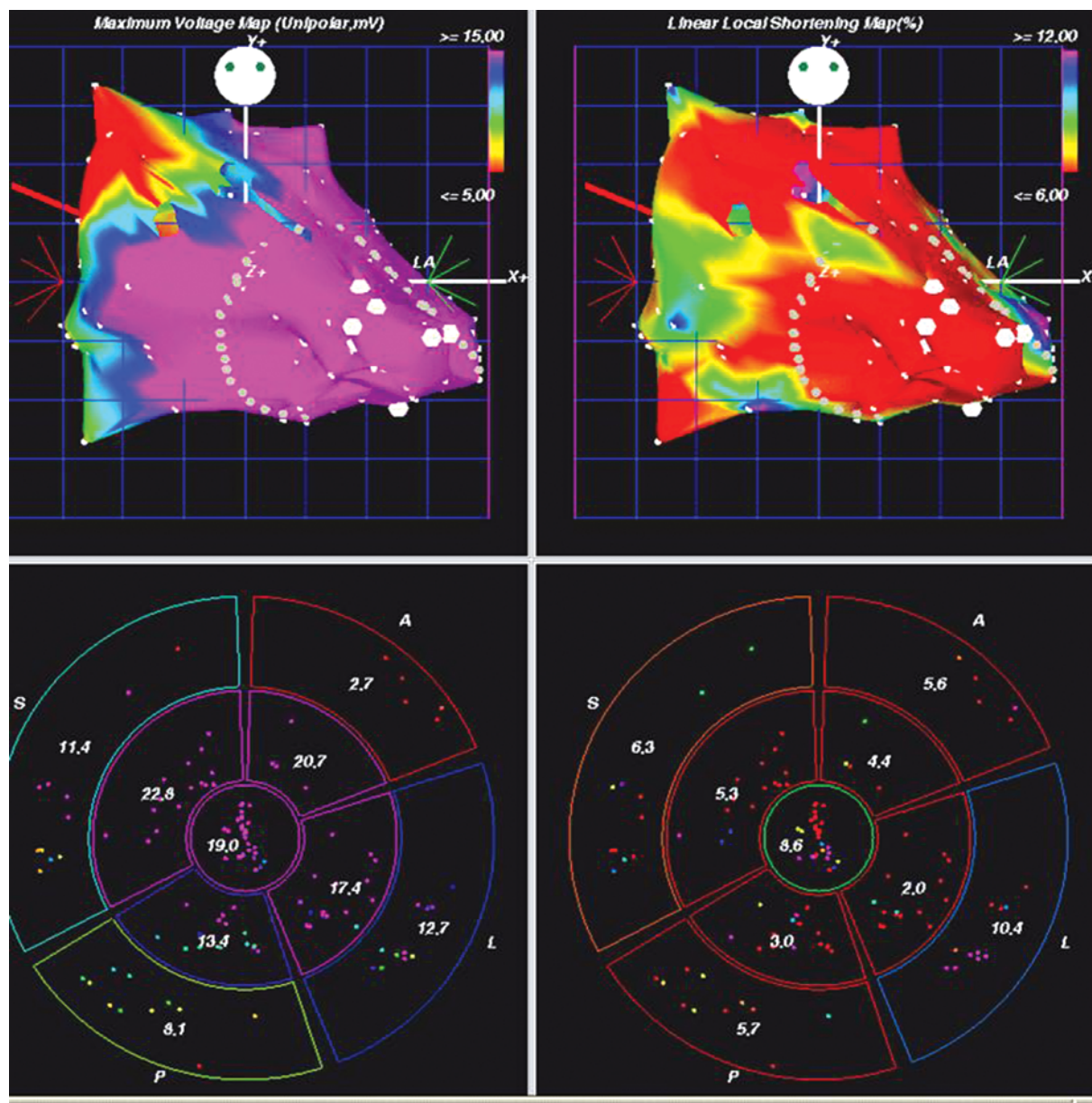
W badaniu stosowany jest plazmid kodujący ludzki VEGF-A i bFGF (pVIF) oraz plazmid *placebo* (nieulegający ekspresji). Plazmidy dostarczone są przez Zakład Biologii Komórki Instytutu Onkologii w Warszawie. Konstruktor pVIF jest plazmidowym wektorem ekspresyjnym kodującym 2 czynniki o charakterze angiogennym. Wklonowana kasetka jest dwucistronowa. Zawiera ona: gen kodujący VEGF165 (Pubmed X62568), sekwencję IRES (na podstawie matrycy wklonowanej do wektora pIRES-EGFP, clontech, cat. #6064-1) oraz sekwencję kodującą bFGF (Pubmed E02544). Sekwencja IRES pochodzi z wirusa *encephalomyocarditis* (ECMV) i zapewnia translację dwóch wklonowanych genów na bazie jednej bicistronowej sekwencji mRNA. W kasecie sekwencje VEGF i FGF poprzedzane są przez sekwencję sygnałową umożliwiającą sekrecję powstałych białek VEGF i FGF. Plazmid bicistronowy pVIF objęty jest procedurą patentową (nr zgłoszenia P355354).

Zabieg podania plazmidu i mapowanie serca metodą NOGA

Przed podaniem plazmidu wykonywana jest koronarografia i wentrykulografia. Przykładowe obrazy angiograficzne pacjenta włączanego do badania przedsta-

wiono na ryc. 1. Następnie, przy użyciu systemu NOGA (Biosense) [21, 22] cewnikiem NOGA-STAR wykonuje się mapę lewej komory w celu określenia jej geometrii oraz potwierdzenia określonego poprzednio w badaniu SPECT obszaru, do którego powinien być wstrzyknięty plazmid. Mapa powinna zawierać co najmniej 60 punktów. Następnie cewnik mapujący wymieniany jest na cewnik infuzyjny MYO-STAR (średnica 8F) z dodatko-

wym kanałem, zakończonym cienką wysuwaną igłą (27G). Pozycja igły w miokardium monitorowana jest fluoroskopowo oraz na podstawie rejestracji dodatkowych pobudzeń komorowych. Obraz rentgenowski cewnika z wysuniętą igłą znajdującego się w lewej komorze przedstawia ryc. 2. Plazmid podawany jest do wyznaczonego wcześniej obszaru w całkowitej dawce 0,5 mg w 2 ml, w 10 porcjach o objętości 0,2 ml każda. Jed-



Ryc. 3. Mapa lewej komory wykonana systemem NOGA. Obrazy trójwymiarowe (górną) i typu Bull's-eye (dół). Po stronie lewej mapy voltazu, po prawej – miejscowego skracania. Szare markery ograniczają docelowe pole wstrzyknięć plazmidu do fragmentu ściany przednio-bocznej. Większe białe markery oznaczają punkty wstrzyknięć

Fig. 3. An electromechanical NOGA map of the left ventricle. Three-dimensional (above) and bull's-eye (below) presentations. Left- unipolar voltage maps; right- linear local shortening maps. Grey markers delineate the area of interest into which injections (white markers) were made

norazowo przez cewnik infuzyjny podawane jest więc do pojedynczego miejsca nakłucia 0,2 ml roztworu plazmidu. Proces pojedynczego wstrzyknięcia plazmidu do niedokrwionego mięśnia sercowego trwa ok. 20–40 s. Podobna technika i dawki podawanego plazmidu stosowane były w badaniu Euroinject One. Przykładową mapę lewej komory wykonaną systemem NOGA z zaznaczonym obszarem docelowym podania plazmidu oraz punktami wykonanych iniekcji przedstawia ryc. 3.

Czas obserwacji w badaniu wynosi rok. Skuteczność terapii oceniana będzie wg przedstawionego poniżej schematu:

- w 1., 2., 4. i 8. tyg. po podaniu plazmidu pobrane zostaną próbki krwi, w których oznaczone będzie stężenie cytokin angiogennych VEGF i FGF;
- główna wizyta kontrolna odbywa się 5 mies. od zabiegu;
- po 5 i 12 mies. od zabiegu zostaną powtórzone badania markerów nowotworowych, test na krew utajoną w stolcu oraz u kobiet po 12 mies. mammografia;
- przed terapią genową, po zabiegu oraz podczas wizyt kontrolnych po 5 i 12 mies. oceniane są parametry laboratoryjne, wykonywane jest EKG, badanie echokardiograficzne i próba wysiłkowa;
- po 5 mies. dodatkowo wykonywane jest badanie scyntygraficzne (SPECT) z dipirydamolem i obciążeniowy rezonans magnetyczny (MR) z adenozyzną, jak również kontrolna koronarografia z wentrykulografią.

Główny punkt końcowy badania

Głównym punktem końcowym badania są zmiany ukrwienia mięśnia sercowego, oceniane w badaniach SPECT i MR, wykonanych po 5 mies. od zabiegu, w porównaniu do wyników badań wyjściowych.

Drugorzędne punkty końcowe badania

- Drugorzędnymi punktami końcowymi badania są:
- zmiana wydolności wieńcowej oceniana w teście wysiłkowym EKG;
 - zmiana ukrwienia miokardium lub powstanie nowych kolaterali widocznych w badaniu angiograficznym;
 - poprawa kliniczna w zakresie tolerancji wysiłku i jakości życia;
 - wystąpienie poważnych sercowych objawów niepożądanych (MACE), tj. zgonu, zawału serca oraz hospitalizacji z powodów kardiologicznych – ocena wyników obserwacji odległej;
 - zmiana stężenia FGF, VEGF w surowicy;
 - monitorowanie ewentualnych działań niepożądanych związanych z podaniem plazmidu;
 - monitorowanie zdarzeń mogących mieć związek z nadmiernym działaniem VEGF lub FGF w miejscu i poza miejscem podania.

Postęp badania

Odsetek pacjentów spełniających kryteria włączenia do badania wynosi ok. 50% osób wstępnie zgłaszanych. Do końca lutego 2006 r. do badania włączono 36 chorych (26 mężczyzn, średnia wieku $62 \pm 8,8$ lat). 24 włączonych pacjentów (66%) ma w wywiadzie co najmniej jeden zabieg pomostowania tętnic wieńcowych. U wszystkich pacjentów wykonano zabieg elektromechanicznego trójwymiarowego mapowania lewej komory systemem NOGA, jak opisano powyżej. Po mapowaniu metodą NOGA wykonano zabieg iniekcji plazmidu/placebo (10 wstrzyknięć po 0,2 ml do zdefiniowanego wcześniej obszaru, czas pojedynczego wstrzyknięcia 20–40 s). Średni czas mapowania i iniekcji wyniósł 44 ± 13 min. Aby uzyskać miarodajną mapę elektromechaniczną lewej komory, średnio niezbędne było naniesienie na nią 70 ± 20 punktów. Przy mapowaniu systemem NOGA i iniekcjach występuje zwykle niewielki wzrost stężenia troponiny I. Po 24 godz. od zabiegu stężenie troponiny I w surowicy wyniosło $0,41 \pm 0,64$ ng/ml. Nie stwierdzono różnic w stężeniach troponiny I po zabiegu w grupie pacjentów po pomostowaniu tętnic wieńcowych w stosunku do pozostałych pacjentów włączonych do badania.

Obecnie kończy się obserwacja pierwszych pacjentów. Jak dotąd nie stwierdzono zgonów ani poważnych zdarzeń niepożądanych. Za takie zdarzenia w badaniu tym nie uważamy zaostżenia objawów choroby wieńcowej, jest to bowiem jeden z punktów końcowych badania. Jest to badanie kontrolowane metodą podwójnie ślepej próby, dlatego nie można jeszcze nawet wstępnie oceniać skuteczności leczenia.

Wnioski

Na podstawie dotychczasowych obserwacji sądzimy, że przyjęty protokół jest racjonalny, wystarczająco bezpieczny i technicznie możliwy do wykonania. Pozwala też na wyselekcjonowanie pewnej grupy pacjentów, którym można zaproponować klasyczną rewaskularyzację pomimo wcześniejszej dyskwalifikacji.

Piśmiennictwo

1. Buschmann I, Schaper W. The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol* 2000; 190: 338-342.
2. Freedman SB, Isner JM. Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *Ann Intern Med* 2002; 136: 54-71.
3. Morishita R, Aoki M, Hashiya N i wsp. Therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor (HGF). *Curr Gene Ther* 2004; 4: 199-206.
4. Ware JA, Simons M. Angiogenesis in ischemic heart disease. *Nature Med* 1997; 3: 158-164.
5. Melo LG, Pachori AS, Kong D i wsp. Gene and cell-based therapies for heart disease. *FASEB J* 2004; 18: 648-663.
6. Satake S, Kuzuya M, Ramos MA i wsp. Angiogenic stimuli are essential for survival of vascular endothelial cells in three-dimensional collagen lattice. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244: 642-646.

7. Mooradian DL, Diglio CA. Effects of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta 1 on rat heart endothelial cell anchorage-dependent and -independent growth. *Exp Cell Res* 1990; 186: 122-129.
8. Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest* 1993; 69: 508-517.
9. Yue X, Tomanek RJ. Effects of VEGF(165) and VEGF(121) on vasculogenesis and angiogenesis in cultured embryonic quail hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H2240-H2247.
10. Simons M, Annex BH, Laham RJ i wsp. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomised, controlled clinical trial (FIRST). *Circulation* 2002; 105: 788-793.
11. Grines CL, Watkins MW, Helmer G i wsp. Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 2002; 105: 1291-1297.
12. Grines CL, Watkins MW, Mahmarian JJ i wsp. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of Ad 5 FGF-4 gene therapy and its effect on myocardial perfusion in patients with stable angina. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1339-1347.
13. Grines CL. The AGENT clinical trials programme. *Eur Heart J* 2004; 6 (supl. E): E18-E23.
14. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE i wsp. Randomized, single-blind, placebo-controlled pilot study of catheter-based myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electromechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103: 2138-2143.
15. Losordo DW, Vale PR, Hendel RC i wsp. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2002; 105: 2012-2018.
16. Kastrup J, Jorgensen E, Ruck A i wsp. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 982-988.
17. Gyongyosi M, Khorsand A, Zamini S i wsp. NOGA-guided analysis of regional myocardial perfusion abnormalities treated with intramyocardial injections of plasmid encoding vascular endothelial growth factor A-165 in patients with chronic myocardial ischemia: subanalysis of the EUROINJECT-ONE multicenter double-blind randomized study. *Circulation* 2005; 112: 9 (supl. I): 1157-1165.
18. Henry TD, Annex BH, McKendall GR i wsp. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 2003; 107: 1359-1365.
19. Kleiman NS, Califf RM. Results from late-breaking clinical trials sessions at ACCIS 2000 and ACC 2000. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 310-325.
20. Malecki M, Swoboda P, Jastrzębski Z i wsp. In vivo study of angiogenic plasmid preparations-the bicistronic plasmid as a new type of drug for vascular diseases. *Acta Pol Pharm* 2004; 61: 289-95.
21. Kornowski R, Hong MK, Haudenschild C i wsp. Feasibility and safety of percutaneous direct myocardial revascularization using Biosense system in porcine heart. *Coron Artery Dis* 1998; 9: 535-540.
22. Joergensen E, Kastrup J, Thuesen L i wsp. Direct percutaneous transluminal intramyocardial injection therapy. *Circulation* 2002; 106 (supl. II): 3236, p11-656.