
Киселёв Л.П., Савицкая Т.В., Алейникова О.В.

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

Kisialeu L., Savitskaia T., Aleinikova O.

Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Результаты применения антиангиогенной терапии для локализованных форм саркомы Юинга при прогнозируемой на основании молекулярных маркеров ангиогенеза химиорезистентности новообразования

Antiangiogenic therapy for patients with localized Ewing's sarcoma based on angiogenesis markers in pretreatment tumor tissue

Резюме

У 30–40% пациентов с локализованными формами опухолей семейства саркомы Юинга (СЮ) имеет место резистентность к современным схемам системной терапии, что приводит к развитию рецидива заболевания. Прогнозирование и интенсификация лечения для таких случаев возможны посредством понимания биологии опухолевого процесса и, в частности, ангиогенеза (АГ) – процесса формирования опухолью собственной сосудистой сети. Ранее мы установили, что уровень маркеров АГ (экспрессии мРНК гена *TFPI2* (ингибитор путей тканевого фактора) и соотношения изоформ фактора роста сосудов *VEGFA165/VEGFA189*) в ткани опухоли перед началом лечения позволяют дифференцировать пациентов с локализованной СЮ на группы благоприятного и неблагоприятного исхода заболевания. Целью настоящего исследования была интенсификация лечения посредством блокады АГ для пациентов с прогнозируемым на основании уровня маркеров АГ неблагоприятным исходом. 29 пациентов детского возраста с локализованными формами СЮ включены в исследование. Для пациентов (51,7%), которым в проспективном режиме был спрогнозирован неблагоприятный исход заболевания на основании уровня маркеров АГ, стандартный терапевтический план был интенсифицирован посредством использования препарата бевацизумаб. 5-летняя бессобытийная выживаемость (БСВ) для них составила 66,7%. БСВ пациентов (48,3%) с спрогнозированным благоприятным исходом была 100%. БСВ объединенной когорты пациентов составила 82,8%. Показано, что антиангиогенная терапия может быть эффективна у пациентов с локализованными формами СЮ при прогнозируемом (на основании уровня маркеров АГ) неблагоприятном исходе заболевания.

Ключевые слова: саркома Юинга, прогностические маркеры, ангиогенез, диагностика и лечение.

Abstract

More than a third of patients with localized Ewing's sarcoma (ES) develop chemoresistance to standard treatment. Previously we have established the ability to predict poor outcome based on mRNA expression levels of both TFPI2 (tissue factor pathway inhibitor 2) and VEGFA165/VEGFA189 (vascular endothelial growth factor isoforms) ratio in pretreatment tumor tissue. Angiogenesis blockade strategy was used to enhance the therapeutic effects for patients with poor prognosis. 29 patients with localized forms ES included in the study. For patients with poor prognosis (51.7%) standard chemotherapy has been strengthened through bevacizumab (VEGF inhibitor). Event-free survival (EFS) for patients with poor prognosis was 66.7% for patients with good prognosis – 100%, for all patients EFS rate was 82.4%. VEGF blockade may be effective for patients with poor (based on angiogenesis markers in pretreatment tumor tissue) prognosis.

Keywords: angiogenesis, pediatric patients with Ewing's sarcoma, diagnosis and management, prognostic markers.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день термин «опухоли семейства саркомы Юинга (СЮ)» объединяет классическую костную СЮ, экстраклетную СЮ, опухоль Аскина грудной стенки и периферическую примитивную нейроэктодермальную опухоль. Все эти саркомы являются высоко агрессивными новообразованиями с высоким потенциалом развития и метастазирования [1–4]. Подавляющее большинство метастатических форм заболевания имеют неблагоприятный исход, а при локализованных (неметастатических) формах около трети пациентов развивают ранний рецидив заболевания; стандартный план системной химиотерапии является для них малоэффективным [5, 6]. Пол, возраст, размер опухоли, уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ), центральная локализация характеризуются широким диапазоном параметров, и степень их влияния на клинический исход часто пересматривается. В современных базовых клинических протоколах все пациенты с локализованными формами СЮ получают индукционную химиотерапию по идентичным планам, независимо от перечисленных выше критериев [7, 8]. Достижения в понимании биологии неопластического процесса рассматриваются в настоящий момент в качестве возможностей прогнозирования пациентов с неблагоприятным исходом заболевания перед началом системной терапии. Ангиогенез (АГ) – процесс формирования опухолью собственной сосудистой сети, является безусловным условием развития и распространения новообразования [9, 10]. Ранее установили, что уровень маркеров АГ (экспрессии мРНК гена TFPI2 (ингибитор путей тканевого фактора) и соотношения изоформ фактора роста сосудов VEGFA165/VEGFA189) в ткани опухоли перед началом лечения позволяют дифференцировать пациентов с локализованной СЮ на группы благоприятного и неблагоприятного исхода заболевания [11].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Интенсификация лечения посредством блокады АГ для пациентов с прогнозируемым на основании уровня маркеров АГ неблагоприятным исходом заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 29 пациентов с локализованными опухолями семейства саркомы Юинга, которые с 2011 по 2015 г. проходили диагностический комплекс и получали лечение в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии (РНПЦ ДОГИ) [12]. Исследовался материал первичной опухоли, полученный в результате диагностического оперативного вмешательства (биопсии) до начала специального лечения. Пациенты, получавшие противоопухолевое лечение до взятия образца ткани, были исключены из исследования. Критерием включения пациента в исследование было гистологическое, иммуногистохимическое и молекулярно-биологическое подтверждение диагноза. Пациентам проводилось программное системное лечение, осуществлялся локальный контроль (операция, операция + лучевая терапия, только лучевая терапия). Режим химиотерапии включал четырехкомпонентные блоки индукции (винкристин, доксорубин, ифосфамид и этопозид) [13]; консолидирующая терапия была трехкомпонентной (винкристин, ифосфамид, актиномицин Д). При постановке диагноза СЮ уровень экспрессии мРНК TFPI2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 в ткани опухоли исследовались в проспективном режиме. В качестве молекулярной комбинации неблагоприятного прогноза (МКНП) ранее был определен уровень экспрессии мРНК гена TFPI2 $\leq 0,8$ и соотношение изоформ VEGFA165/VEGFA189 $\leq 1,0$ в ткани опухоли перед началом терапии [11]. В случае наличия МКНП стандартная терапия была усилена посредством назначения препарата бевацизумаб в дозе 7,5 мг/кг в день 1 каждого блока химиотерапии ($n=15$). Для пациентов с молекулярной комбинацией благоприятного прогноза терапия была стандартной. Длительность бессобытийной выживаемости (БСВ), общей выживаемости (ОВ) и кумулятивной частоты рецидива (КЧР) исчислялась от времени постановки инициального диагноза. При сравнительном анализе КЧР были использованы данные выживаемости 11 пациентов с прогнозируемым неблагоприятным исходом предыдущего исследования [11].

Молекулярно-биологические методы

Образцы тканей были получены непосредственно во время операции, немедленно доставлены и заморожены в жидком азоте. Использовался гомогенизатор Retsch (XX, Германия). Для приготовления РНК и обратной транскриптазы-полимеразной цепной реакции в реальном времени (Реал-тайм ПЦР), тотальная РНК выделялась с использованием RNeasy Mini Kit (Qiagen, xx, Germany) согласно инструкции производителя. Количественные показатели концентрации РНК оценивались посредством спектрофотометрии. Тотальную РНК (1,5 мкг) из ткани конвертировали в первую цепь ДНК с использованием случайного праймера (0,3 мкг) и обратной транскриптазы 200 U мышиного вируса лейкемии (Moloney murine leukemia virus, M-MLV; Promega, XX, USA).

Три гена были исследованы в оригинальных образцах: VEGFA165, VEGFA189 и TFPI-2. В качестве внутреннего контрольного гена использовалась глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH). Количественное определение генов осуществлялось посредством использования метода флуоресценции на основе реального времени (Taqman).

ПЦР в реальном времени для генов VEGFA и TFPI-2 проводилась с использованием коммерческих систем (TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems, Foster City, CA, ID Hs00900054 мл и Hs00197918 мл соответственно). Праймеры и зонды для количественной оценки VEGF изоформ в ПЦР в реальном времени были использованы, как описано в публикации Gustafsson et al. [15]. Реакция проводилась в 20 мкл реакционной смеси (Taqman PCR universalmaster mix, Applied Biosystems)



в соответствии с протоколом производителя и с помощью оборудования Iqcyler (Bio-Rad, Hercules, CA) в режиме реального времени. Относительные величины иРНК генов в образцах были рассчитаны по показателям стандартных кривых, полученных путем амплификации серийного разведения обратно транскрибированной тотальной РНК. Значения исследованных показателей были представлены в виде относительных величин.

Статистический анализ данных проводился с использованием программы R-statistics, версия 3.2.0, R Foundation for Statistical Computing, лицензия GNU GPL. Оценка статистической значимости различий между сравниваемыми количественными показателями проводилась U-критерием теста Манна – Уитни. Сравнение в группах по индивидуальным параметрам проводилось с помощью χ^2 теста. Для оценки выживаемости пациентов применялся метод Kaplan-Meier. Различия в выживаемости оценивались с использованием log-rank теста. Кумулятивная частота возникновения событий рассчитывалась методом конкурирующих рисков, различия кумулятивных частот оценивались с использованием теста Gray. Все различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пациентам с локализованными формами СЮ при инициальной диагностике в проспективном режиме определялся уровень экспрессии мРНК генов TFPI-2 и соотношения VEGFA165/VEGFA189 в ткани опухоли.

Результаты экспрессии мРНК генов TFPI-2 и соотношения VEGFA165/VEGFA189 в ткани опухоли проспективной группы пациентов с локализованными формами СЮ, представлены на рис. 1.

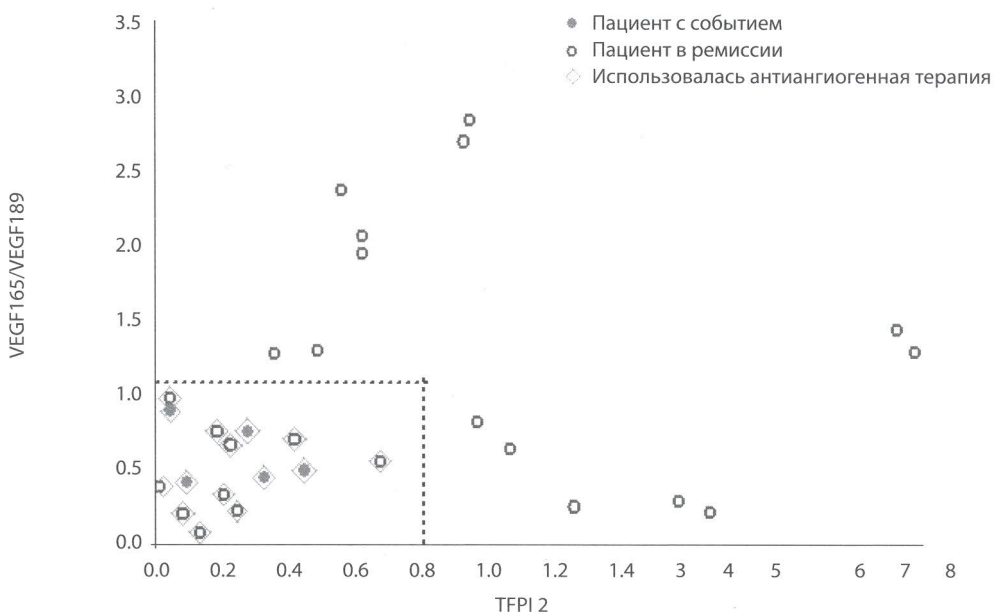


Рис. 1. Экспрессия мРНК гена TFPI-2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 у пациентов с локализованными формами СЮ в зависимости от клинического исхода заболевания

Как представлено на рис. 1, 14/29 (48,2%) пациентов были локализованы вне области МКНП; у них констатирован благоприятный исход заболевания (все пациенты живы без событий) после проведения стандартной системной терапии. 15/29 (51,8%) пациентов перед началом системной терапии были локализованы в область МКНП; для них лечение было интенсифицировано посредством использования антиангиогенной терапии. Отрицательные события и неблагоприятный исход заболевания (4 рецидива, 1 токсическая смерть) констатированы только у пациентов, локализованных в область МКНП. На момент анализа 1 пациент с рецидивом жив и находится во второй ремиссии.

Были оценены показатели БСВ, ОВ и КЧР у пациентов в зависимости от наличия МКНП.

Показатели 5-летней БСВ пациентов в зависимости от наличия МКНП представлены на рис. 2.

Как представлено на рис. 2, показатель 5-летней БСВ пациентов без наличия МКНП (группа 1) составил 100%. Показатель 5-летней БСВ пациентов с наличием МКНП (группа 2) был 66,7%. 5-летняя БСВ пациентов объединенной когорты составила 82,8%.

Показатели 5-летней ОВ пациентов в зависимости от наличия МКНП представлены на рис. 3.

Как представлено на рис. 3, показатель 5-летней ОВ пациентов без наличия МКНП (группа 1) составил 100%. Показатель 5-летней ОВ пациентов с наличием МКНП (группа 2) был 70,0%. Показатель 5-летней ОВ пациентов объединенной когорты составил 84,4%.

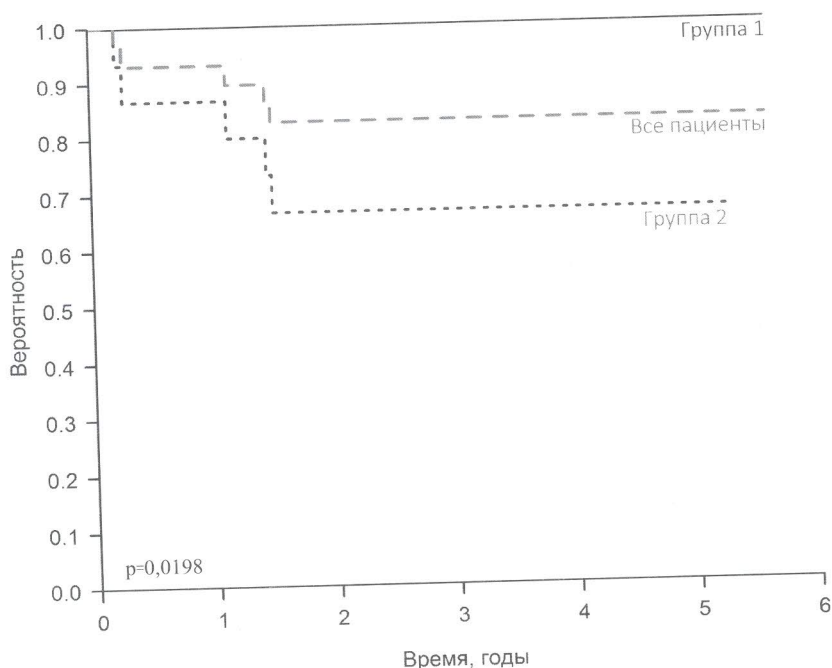


Рис. 2. БСВ пациентов (n=29) в зависимости от наличия МКНП. Группа 1 (без наличия МКНП): n=14, 14 без события (100%); все пациенты: n=29, 24 без события (82,8±7,0%); группа 2 (с наличием МКНП): n=15, 10 без события (66,7±12,2%)

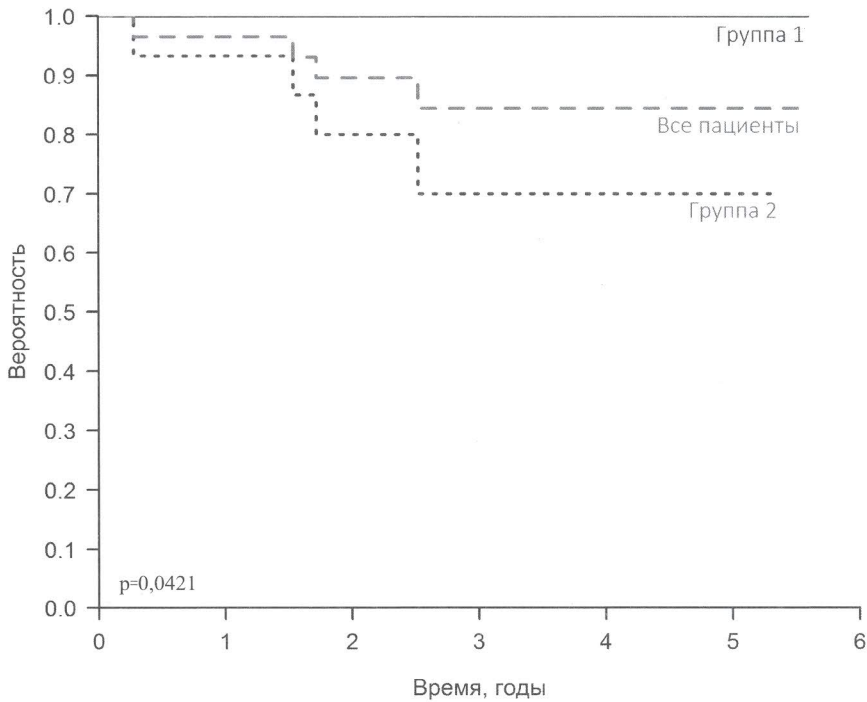


Рис. 3. ОВ пациентов (n=29) в зависимости от наличия МКНП. Группа 1 (без наличия МКНП): n=14, 14 живы (100%); все пациенты: n=29, 25 живы (84,4±7,4%); группа 2 (с наличием МКНП): n=15, 11 живы (70,0±13,0%)

Показатели КЧР пациентов за 5-летний период наблюдения представлены на рис. 4.

Как представлено на рис. 4, показатель КЧР за 5-летний период наблюдения пациентов без наличия МКНП (группа 1) составил 0%. Показатель КЧР пациентов с наличием МКНП (группа 2) был 26,7%. Показатель КЧР всех пациентов объединенной когорты составил 13,8%.

Таким образом, настоящее исследование сообщает о возможности персональной интенсификации терапии пациентам с локализованными формами СЮ.

На сегодняшний день около трети пациентов с локализованной СЮ имеют химиорезистентность опухоли и развивают ранний рецидив заболевания. Ранее мы установили маркеры ангиогенеза, которые позволяют на этапе инициальной диагностики прогнозировать случаи с неблагоприятным ответом опухоли на системную терапию [11]. Для таких пациентов было интенсифицировано лечение посредством блокады ангиогенеза.

Современные таргетные препараты, направленные на подавление роста опухолевых сосудов, вызывают несомненный интерес в качестве варианта усиления антинеопластического воздействия [14–15]. В качестве первого опыта для СЮ северо-американские исследователи из Children's Oncology Group (COG) использовали метроную антиангиогенную терапию: винбластин и целекоксиб совместно с базовой схемой [16, 18]. В настоящий момент в Европейском союзе и Соединенных Штатах Америки проводятся несколько исследований эффективности блокады АГ при СЮ [17, 20]. В одном из них, с 2007 г., американские исследователи предложили использовать бевацизумаб в режиме рандомизации вместе со стандартной химиотерапевтической схемой для пациентов, рефрактерных

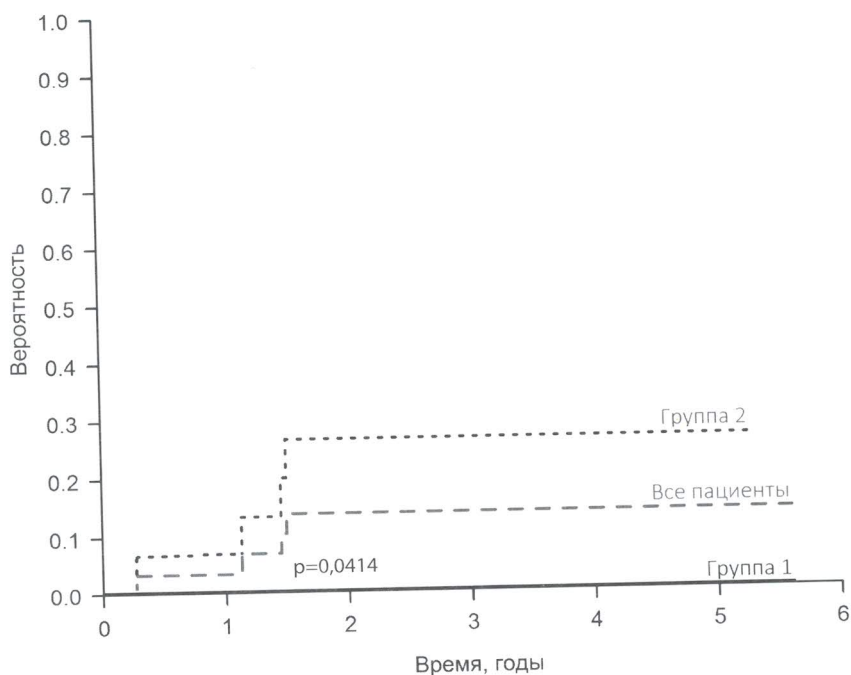


Рис. 4. КЧР пациентов (n=29) в зависимости от наличия МКНП. Группа 1 (без наличия МКНП): n=14, 0 рецидивов (0±4,7%); все пациенты: n=29, 4 рецидива (13,8±4,1%); группа 2 (с наличием МКНП): n=15, 4 рецидива (26,7±11,9%)

к индукционной полихимиотерапии (№ протокола NCT00516295) [18]. Кооперативное мультицентровое исследование, в 2008 г. стартовавшее в странах Западной Европы (Франция, Нидерланды, Италия, Великобритания), также основной своей целью заявляет оценку эффективности применения ингибитора роста сосудов опухоли – бевацизумаба, но уже в первую линию лечения, для детей от 2 до 17 лет с первично-метастатическими формами СЮ (№ протокола NCT00643565) [18]. В нашем исследовании бевацизумаб дополнял стандартную цитостатическую терапию пациентам с локализованными формами СЮ, у которых был спрогнозирован высокий риск возврата заболевания на основании уровней маркеров ангиогенеза в опухолевой ткани перед началом лечения.

Для пациентов (51,7%), которым в проспективном режиме был спрогнозирован неблагоприятный исход заболевания на основании уровня маркеров АГ, стандартный терапевтический план был интенсифицирован посредством блокады ангиогенеза препаратом бевацизумаб. 5-летняя БСВ для них составила 66,7%. БСВ пациентов (48,3%), у которых был спрогнозирован благоприятный исход, была 100%. БСВ объединенной когорты пациентов составила 82,8%. 5-летняя ОВ пациентов без наличия МКНП (с прогнозируемым благоприятным исходом) составила 100%. Показатель 5-летней ОВ пациентов с наличием МКНП и использованием антиангиогенной терапии составил 70,0%. 5-летняя ОВ всех пациентов объединенной когорты составила 84,4%.

Показатели КЧР за 5-летний период для пациентов без наличия МКНП (с прогнозируемым благоприятным исходом) составили 0%. КЧР пациентов с наличием МКНП и использованием антиангиогенной терапии была 26,7%. КЧР всех пациентов составила 13,8%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антиангиогенная терапия может быть эффективна для пациентов с локализованными формами СЮ при прогнозируемом (на основании уровня маркеров АГ) неблагоприятном исходе заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aleinikova O., Potapnev M., Syckevich O., Petrovich S., Ismail-zade R., Strongin Y. (2000) Dostizhenia detskoj onkologii i hematologii v respublike Belarus' [Achievements for Pediatric Oncology and Hematology in the Republic of Belarus]. *Aktualnye voprosy detskoj onkologii i hematologii: Materialy VIII mejdunarodnogo simpoziuma*. Minsk, pp. 3–8.
2. Sukonko O., Antonenkova N. (2011) Organizazionno-metodicheskaia pomoshh', okazyvaemaya gosudarstvennym uchrezhdeniem RNPC OMR im. N.N. Aleksandrova organizacijam zdavooohranenia v Respublike Belarus' [Organizational and methodological assistance provided by a public institution RSPC OMR named Centre of MPAs them. N.N. Alexandrova health organizations in the Republic of Belarus]. *Onkologicheskij zhurnal*, vol. 20, pp. 42–45.
3. Demidchik Yu., Pisarenko A., Fridman M., Baragina Z., Man'kovskaya S., Papok V. (2008) Neoperiruemyj rak shhitovidnoj zhelezy: e'ffektivnost' diagnostiki i vyzhivaemost' [Thyroid cancer: diagnostic performance and survival]. *Onkologicheskij zhurnal*, vol. 8, pp. 9–21.
4. Javrid E., Antonenkova N., Prohorova V., Lappo S. (2011) Rol molekuliarnych chasov v patogeneze i terapii zlokachestvennyh novoobrazovaniy' [Role of molecular hours in pathogenesis and therapy of malignant tumors]. *Medicinskaya panorama*, vol. 7, pp. 19–23.
5. Padhye B., McCowage G. (2011) Chemotherapy regimens in newly diagnosed and recurrent Ewing sarcoma in children and young adults. *CancerForum*, pp. 128–134.
6. Granowetter L., Womer R., Devidas M., Krailo M., Wang C., Bernstein M. (2009) Dose-intensified compared with standard chemotherapy for nonmetastatic Ewing sarcoma family of tumours: a Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol.*, vol. 27, pp. 2536–41.
7. Bhavna Padhye and Geoffrey McCowage. (2010) Chemotherapy regimens in newly diagnosed and recurrent ewing sarcoma in children and young adults. *CancerForum*, vol. 34, no 3, pp. 34: 3.
8. Paulussen M., Craft A.W., Lewis I., Hackshaw A., Douglas C., Dunst J. (2008) Results of the EICESS-92 Study: two randomized trials of Ewing's sarcoma treatment – cyclophosphamide compared with ifosfamide in standard-risk patients and assessment of benefit of etoposide added to standard treatment in high-risk patients. *J Clin Oncol.*, vol. 26, pp. 4385–93.
9. Scotlandi K., Remondini D., Castellani G., Manara M.C., Nardi F., Cantiani L. (2009) Overcoming resistance to conventional drugs in Ewing sarcoma and identification of molecular predictors of outcome. *J Clin Oncol.*, vol. 27, pp. 2209–2216.
10. Ordonez J.L., Osuna D., Herrero D., De A 'lava E., Madoz-G' urpide J. (2009) Advances in Ewing's sarcoma research: where are we now and what lies ahead? *Cancer Research*, vol. 69/18, pp. 7140–7150.
11. Kiselyov L., Savitskaya T., Lipai N., Aleinikova O. (2016) TFPI2, VEGFA165 i VEGFA189 kak nezavisimie faktori prognoza lokalizovannyh form sarkomi Yuinga. *Onkologicheskii zhurnal*, vol. 10, pp. 93–100.
12. Petrovich S, Aleinikova O, Shumikhina T. (2002) [Epidemiological aspects of childhood onco-hematological morbidity in the Republic of Belarus]. *Vopr Onkol.*, vol. 48(3), pp. 301–305.
13. Juergens C., Weston C., Lewis I., Whelan J., Paulussen M., Oberlin O. (2006) Safety assessment of intensive induction with vincristine, ifosfamide, doxorubicin and etoposide (VIDE) in the treatment of Ewing tumours in the EURO-E.W.I.N.G. 99 clinical trial. *Pediatr Blood Cancer.*, vol. 47, pp. 22–29.
14. Gustafsson T., Ameln H., Fischer H., Sundberg C.J., Timmons J.A., Jansson E. (2005) VEGF-A splice variants and related receptor expression in human skeletal muscle following submaximal exercise. *J Appl Physiol.*, vol. 98, pp. 2137–2146.

15. Schaefer K.L., Eisenacher M., Braun Y., Brachwitz K., Wai D.H., Dirksen U. (2008) Microarray analysis of Ewing's sarcoma family of tumours reveals characteristic gene expression signatures associated with metastasis and resistance to chemotherapy. *Eur J Cancer*, vol. 44, pp. 699–709.
16. Glade Bender J.L., Adamson P.C., Reid J.M., Xu L., Baruchel S., Shaked Y. (2008) Phase I trial and pharmacokinetic study of bevacizumab in pediatric patients with refractory solid tumors: a Children's Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 26, no 3, pp. 399–405.
17. Subbiah V., Anderson P., Lazar A., Burdett E., Raymond K., Ludwig J. (2009) Ewing's sarcoma: standard and experimental treatment options. *Current Treatment Options in Oncology*, vol. 10, no 1–2, pp. 126–140.
18. DuBois S., Marina N., Glade-Bender J. (2010) Angiogenesis and Vascular Targeting in Ewing Sarcoma. *Cancer*, vol. 1, pp. 749–757.

Поступила/Received: 06.03.2017

Контакты/Contacts: leonslight@mail.ru, t.savitskaia@mail.ru