TFPI2, VEGFA165 и VEGFA189, как независимые факторы прогноза локализованных форм саркомы Юинга

Л.П. Киселев, Т.В. Савицкая, Н.В. Липай, О.В. Алейникова

РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, г. Минск, Беларусь

TFPI2, VEGFA165 and VEGFA189 as independent prognostic factors for localized forms of Ewing's sarcoma

L. Kisialeu, T. Savitskaia, N. Lipay, O. Aleinikova

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

Резюме: Ранее мы установили, что среди широкого спектра маркеров ангиогенеза только уровень экспрессии TFPI2 и соотношение VEGFA165/VEGFA189 значимо отличаются у пациентов с метастатическими и локализованными формами опухолей костей и мягких тканей. Мы предположили, что эти маркеры смогут прогнозировать химиорезистентность новообразования при локализованных формах саркомы Юинга. Уровень экспрессии матричной РНК генов VEGFA165, VEGFA189 и TFPI2 определялся методом ПЦР в опухолевой ткани перед началом лечения у 25 пациентов с СЮ (20 локализованных, 5 метастатических форм заболевания). Для локализованных форм СЮ низкие значения экспрессии TFPI2 (≤0,8) и соотношения VEGFA165/VEGFA189 (≤0,1) оказались независимым фактором прогноза. 5-летняя бессобытийная выживаемость (БСВ) была 27% у пациентов с молекулярной комбинацией плохого прогноза; у остальных пациентов БСВ составила 89% (P<0,05). На основании уровня экспрессии TFPI2 и соотношения VEGFA165/VEGFA189 в ткани опухоли представляется возможным разделять пациентов на группы высокого и низкого риска возврата заболевания. Это позволяет своевременно интенсифицировать терапию СЮ у детей плохим прогнозом.

Key words: *angiogenesis, pediatric patients with Ewing's sarcoma, diagnosis and management, prognostic markers*

Abstract: Prediction of chemoresistance and early tumor recurrence at primary diagnosis can provide benefits through the timely strengthening of therapeutic options. We investigated the TFPI2 expression level and VEGFA165/VEGFA189 ratio for patients with favorable and unfavorable outcomes. The messenger RNA of VEGFA165, VEGFA189 and TFPI2 genes were examined in tumor tissue from 25 (20 localized, 5 metastatic ES forms) patients by polymerase chain reaction in real time (qRT-PCR). The low value of both, the TFPI2 expression and the VEGFA165/VEGFA189 ratio, was an independent prognostic factor for localized ES forms. For groups of favorable and unfavorable prognosis, event free survival was 27% and 89%, respectively. Known clinical markers did not differ in the groups. Levels of TFPI2 and VEGFA165/VEGFA189 ratio in tumor tissue can identify ES patients with a poor outcome and timely intensify treatment for them.

ВВЕДЕНИЕ

Саркома Юинга (СЮ) является второй по частоте встречаемости злокачественной опухолью костной ткани у детей [1–2]. Выживаемость пациентов при ее локализованных формах к настоящему моменту увеличилась с 20% до 70%. Однако, при метастатических и рецидивных формах заболевания долгосрочная выживаемость детей не превышают 15–25% [3–4]. Таким образом, наличие отдаленных метастазов на момент постановки диагноза однозначно считается признаком плохого клинического исхода. Что же касается локализованных форм СЮ, то прогнозирование раннего возврата болезни (до 30% случаев) остается актуальной задачей [5–6].

Известны клинические маркеры прогноза локализованной СЮ: пол, возраст, размер опухоли, уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ), центральная локализация и плохой ответ на индукционную химиотерапию. Однако, значения этих показателей варьирует в широком диапазоне и до настоящего времени их оценка различными исследователями не однозначна. В современных базовых клинических протоколах все пациенты с локализованными формами СЮ получают индукционную химиотерапию по аналогичным схемам, независимо от перечисленных выше критериев [7–8].

Поиск новых маркеров, прогнозирующих резистентность опухоли к базовому терапевтическому плану ведется в настоящее время [9–10]. Объектом активного изучения является ангиогенез (процесс формирования опухолью патологической сосудистой сети) и его основной компонент — фактор роста эндотелия сосудов (VEGF, vascular endothelial growth factor) [11–12]. Ранее, у детей с костными и мягкотканными саркомами, нами была изучена экспрессия широкого

спектра генов, вовлеченных в процесс ангиогенеза: VEGFA (включая изоформы 121, 165, 189), VEGFC, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, HIF-1б (фактор индукции гипоксии), TF (тканевой фактор), TFPI-1 (ингибитор путей тканевого фактора 1), TFPI-2, uPA (активатор плазминогена урокиназного типа), PAI-1 (ингибитор активатора плазминогена 1). Оказалось, что только уровни экспрессии TFPI-2 и соотношение изоформ VEGFA165/VEGFA189 значимо отличались у пациентов с локализованными и метастатическими формами СЮ, т.е. в группах с известным хорошим и плохим клиническим исходом заболевания [13]. Это дало основание полагать, что те же биологические маркеры смогут прогнозировать клинический исход заболевания в пределах группы детей с локализованными формами СЮ.

Целью настоящего исследования был сравнительный анализ уровня экспрессии гена TFPI2 и соотношения VEGFA165/VEGFA189 у пациентов с благоприятным и неблагоприятным исходом заболевания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии обследовано и пролечено 25 пациентов (граждан Республики Беларусь) с опухолями семейства СЮ с февраля 2004 г. по сентябрь 2009 г. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом учреждения. Изучался материал первичной опухоли, полученный в результате диагностического оперативного вмешательства (биопсии). Пациенты, получавшие специальное противоопухолевое лечение до получения образца опухолевой ткани, были исключены из исследования. Критерием включения пациента в научный протокол было наличие достаточного количества материала и гистологическое, иммуногистохимическое и молекулярно-биологическое подтверждение диагноза. У 2/25 пациентов диагноз опухоли семейства СЮ был подтвержден гистологическим и иммуногистохимическим методами, однако при первичном и повторном исследовании специфические транслокации EWS/Fli 1, EWS/ERG, EWS-ETV1, EWS-E1AF, EWS-FEV не были обнаружены. Пациентам проводилось программное системное лечение и осуществлялся локальный контроль (операция, операция+лучевая терапия, только лучевая терапия). Использовались 2 режима химиотерапии. Режим А базировался на схеме протокола ЕВРОЮИНГ (EuroEwing): индукционные блоки были четырехкомпонентными (винкристин, доксорубицин, ифосфамид и этопозид) [14], консолидирующая терапия была трехкомпонентной (винкристин, ифосфамид, актиномицин Д). Индукционная схема режима Б соответствовала рекомендациям американских детских онкологов и подразумевала проведение в альтернирующем режиме блоков химиотерапии: винкристин/доксорубицин/циклофосфамид и этопозид/ифосфамид [6]. Консолидирующая терапия режима Б проводилась посредством высоких доз бусульфана и мелфалана с поддержкой периферической стволовой клеткой [15]. Медиана наблюдения за пациентами составила в среднем 4,44 года [16]. Отрицательным событием считался рецидив заболевания; в исследуемой когорте не было констатировано смертей в ремиссии, новых опухолей или иных значимых событий. Длительность бессобытийиной выживаемости (БСВ) и общей выживаемости (ОВ) исчислялась от времени постановки инициального диагноза. Клинико-патологические данные пациентов приведены в таблице 1.

Образцы тканей были получены непосредственно во время операции, немедленно доставлены и заморожены в жидком азоте. Для гомогенизации использовался гомогенизатор Retsch (XX, Германмя). 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).

3 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 [17]. ПЦР в реальном времени реакции проводили в 20-мкл реакционной смеси с окончательным разведением 1× в (Taqman PCR universalmaster mix, Applied Biosystems) в соответствии с протоколом производителя и с помощью оборудования Icycler (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.

Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием пакета программы STATISTICA 6.0.

Количественные данные были представлены с определением медианы (Me [25; 75]), минимумов-максимумов, качественные данные были выражены в абсолютных величинах и процентах. Проверка гипотез о равенстве двух средних проводилась с помощью U-критерия Манна–Уитни или Фишера для количественных признаков. Кривые общей вы-

Таблица 1 — Клинико-патологические характеристики пациентов

Характеристики	Локализованные формы, n=20		Метастатические формы, n=5	
	N	%	N	%
Пол				
Мужской	11	55	4	80
Женский	9	45	1	20
Возраст, годы				
≤14	9	45	3	60
>14	11	55	2	40
ЛДГ, ед/мл				
медиана (мин.–макс.)	452 (166–733)	–	473 (323–1400)	–
Гистологический вариант				
Юинг	16	80	5	100
ПНЭО	4	20	0	0
Анатомическая локализация				
Бедро	7	35	1	20
Лучевая кость	1	5	–	–
Лопатка	1	5	–	–
Ребро	2	10	–	–
Большеберцовая кость	4	20	1	20
Малоберцовая кость	1	5	–	–
Кости таза	3	15	3	60
Позвоночник	1	5	–	–
Объем опухоли, мл				
медиана (мин.–макс.)	141 (25–430)	–	116 (62–986)	–
Локализация				
Центральная локализация	4	20	3	60
Другая	16	80	2	40
Операция				
Широкая резекция	11	55	–	–
Частичная резекция	1	5	–	–
Не выполнялась	8	40	5	100
Локальный контроль				
Только операция	11	55	–	–
Операция и облучение	1	5	–	–
Только облучение	8	40	5	100
Химиотерапия				
Режим А	5	25	2	40
Режим Б	15	75	3	60
Гистологический ответ				
Necrosis ≥ 90%	8	66	–	–
Necrosis < 90%	4	34	–	–
Опухолевый транскрипт				
EWS/FLI 1	17	85	4	80
EWS/ERG	1	5	1	20
Не обнаружены транслокации 22 хромосомы*	2	10	–	–
Метастазы				
Только легкие	–	–	1	20
Кости и костный мозг	–	–	2	40
Легкие, кости и костный мозг	–	–	2	40
Вид события				
Рецидив	9	45	5	100
Жив в ремиссии	11	55	0	0
Финальный исход				
Умер	8	40	4	80
Жив в ремиссии	12	60	1	20

Примечания. 1. Абревиатуры: ПНЭО — примитивная нейроэктодермальная опухоль; ЛДГ — лактатдегидрогеназа. 2. *Транслокации: EWS/FLI 1, EWS/ERG, EWS-ETV1, EWS-E1AF, EWS-FEV в ткани опухоли дважды не были обнаружены.

живаемости и бессобытийной выживаемости выстраивали по методу Каплана–Мейера (Kaplan–Meier); для сравнительной оценки достоверности различий использовали логранговый критерий (log-rank test). Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки менее 5% (P<0,05).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование включало образцы опухоли из первичных очагов 20 пациентов с локальными формами СЮ и 5 пациентов с IV стадией заболевания. Уровень экспрессии иРНК гена TFPI2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 оценивался в группе пациентов (n=9) развивших рецидив заболевания (на рисунке. 1 они обозначены как «Пациент с рецидивом») в течение 3-х лет от постановки диагноза и начала лечения (медиана времени до прогрессии 1,34 г.; мин. 0,77 г., макс. 2,89 г.) и в группе пациентов (n=11), находящихся в устойчивой длительной ремиссии (медиана наблюдения 4,51 г.; мин. 3,65 г., макс. 6,59 г.), на рисунке 1 обозначены как «Пациент в ремиссии».

Как представлено на Рис.1А, у 8 из 9 (89%) пациентов группы, развивших ранний рецидив заболевания значение уровня экспрессии иРНК гена TFPI2 был менее 0,8. В то же время у тех же пациентов значение соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 было менее 1,0. Данная комбинация значений исследуемых онкомаркеров была обозначена как молекулярная комбинация неблагоприятного прогноза (МКНП). Также в выделенную зону были определены 3 пациента с локальными формами СЮ, находящиеся в длительной ремиссии. Не определился в локализованную зону только 1 пациент с ранним рецидивом заболевания, у которого были установлены максимальные уровни как экспрессии TFPI2 так и соотношения VEGFA165/VEGFA189. Остальные пациенты локализовались вне выделенной условной зоны, ограниченной на основании определенных значений. В данную группу вошли 8 из 11 (73%) пациентов с длительной ремиссией и 1 из 9 (11%) пациент с рецидивом и описанными ранее максимальными показателями.

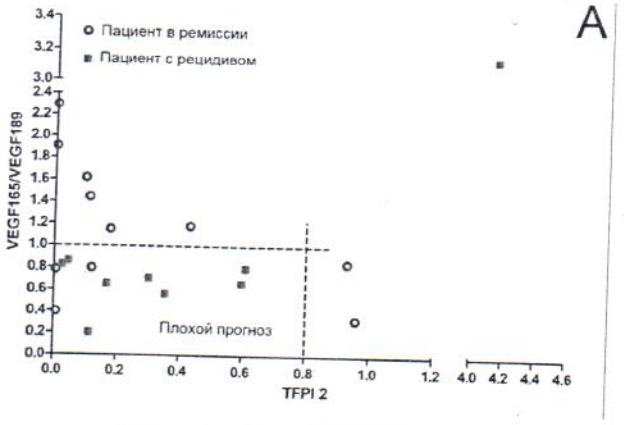
Мы исследовали как изученная нами молекулярная комбинация классифицирует пациентов с метастатическими формами СЮ и известным плохим прогнозом исхода заболевания. Как показано на Рис. 1Б, 4 из 5 (80%) пациентов с МТС были классифицированы в выделенную зону плохого прогноза, причем двое из них показали минимальные значения как экспрессии TFPI2 так и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189. 1 из 5 (20%) пациентов с IV стадией не определился в группу плохого прогноза; клиническое описание поведения его заболевания представлено ниже.

Таким образом, 12 из 14 (86%) пациентов с плохим исходом заболевания характеризовались низким (<0,8) уровнем экспрессии иРНК TFPI2 и одновременно низким (<1,0) уровнем соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 в ткани опухоли на момент постановки диагноза. Можно предположить, что нами удалось зафиксировать определенный фрагмент канцерогенеза, который характеризует уязвимость опухоли, а также может прогнозировать резистентность новообразования к системной терапии.

Для определения влияния установленной молекулярной комбинации на долгосрочные результаты лечения мы представили показатели ОВ и БСВ для всей когорты пациентов с локальными формами СЮ (рис. 2).

Как видно 5-летняя БСВ и ОВ пациентов составила 55 и 66% с устойчивым выходом кривых на плато после 3-летнего периода наблюдения.

Далее мы определили долгосрочные показатели выживаемости у пациентов в зависимости от распределения в группы хорошего и плохого исхода заболевания на основании установленной нами молекулярной комбинации неблагоприятного прогноза (рис. 3).



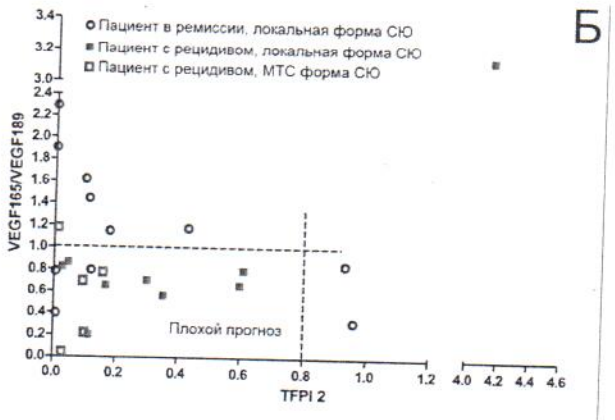


Рисунок 1 — Скаттер-плот анализ принципиальных компонентов уровней экспрессии иРНК гена TFPI-2, также соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 у пациентов только с локализованными формами СЮ (А) и в общей (локализованные и метастатические формы) группе (Б)

Как показано на рисунке 3А, 5-летняя БСВ пациентов с локальными формами СЮ и МКБП составила 89%, в то время как у пациентов с МКНП она была 27% *(P<0,05)*. ОВ в сравниваемых группах (рис. 3Б) составила 89% и 36% соответственно *(P<0,05)*.

Мы оценили известные клинические прогностические маркеры у пациентов с локальными формами СЮ, разделенных на группы благоприятного и неблагоприятного исхода на основании значений молекулярных маркеров. Данные представлены в таблице 2.

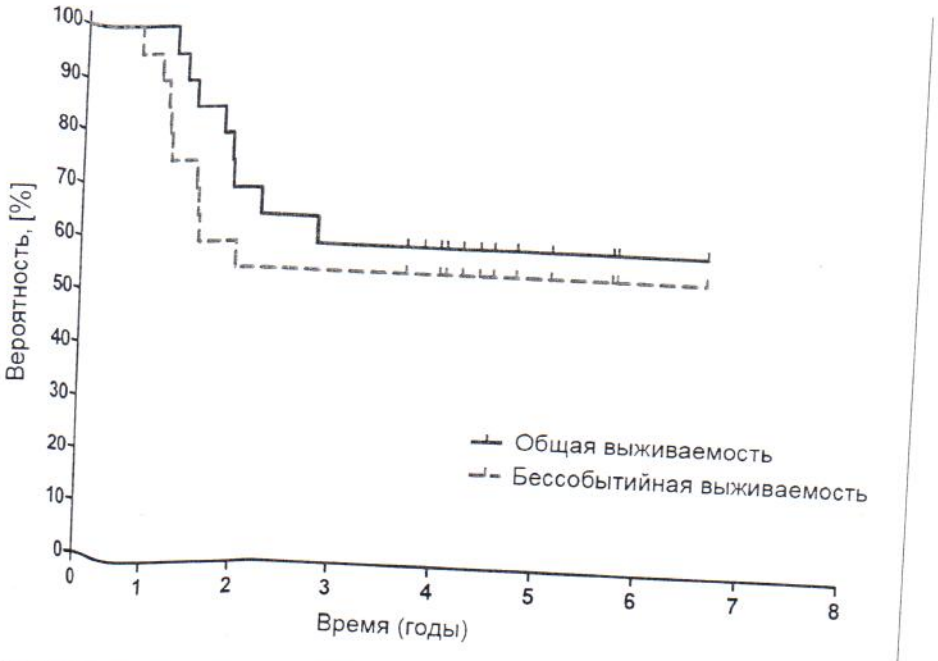
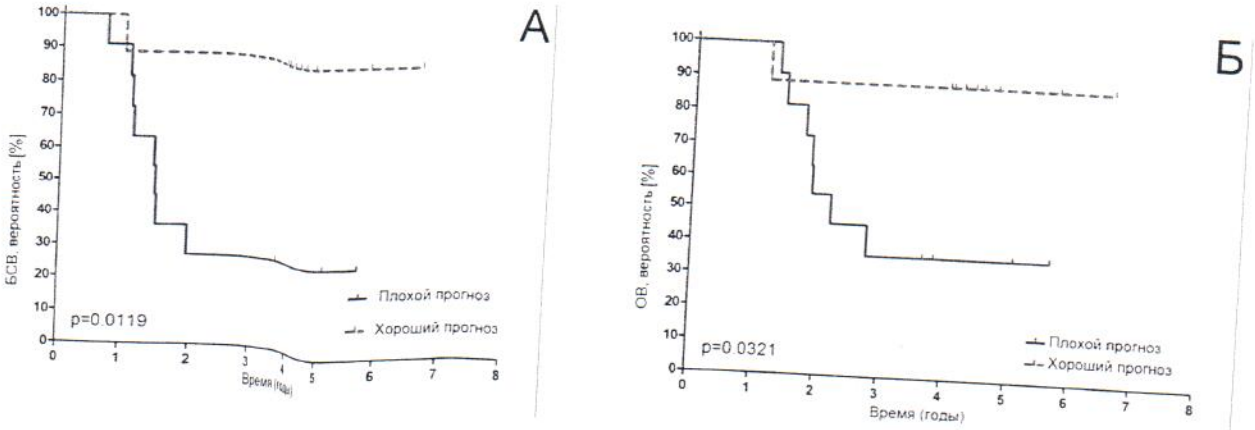


Рисунок 2 – Общая (ОВ) и бессобытийная (БСВ) выживаемость пациентов с локализованными формами СЮ. ОВ: n=20, живы 12; 60±11%. БСВ: n=20, без события 11; 55±11%



А – БСВ пациентов с молекулярной комбинацией благоприятного прогноза: n=9, без события 8; 89±10%. БСВ пациентов с молекулярной комбинацией неблагоприятного прогноза n=11, без события 3; 27±10%, (P<0,05)
Б – ОВ пациентов с молекулярной комбинацией благоприятного прогноза: n=9, живы 8; 89±10%. ОВ пациентов с молекулярной комбинацией неблагоприятного прогноза: n=11, живы 4; 36±13%, (P<0,05)

Рисунок 3 – Бессобытийная (А) и общая (Б) выживаемость пациентов с локализованными формами СЮ в зависимости от уровня экспрессии гена TFPI2 и соотношения VEGFA165/VEGFA189

На основании данных, представленных в таблице 2, констатировано отсутствие значимой разницы в сравниваемых группах при анализе таких показателей, как объем опухоли, уровень ЛДГ, пол, возраст, локализация, ответ на лечение и т.д.

При анализе группы пациентов с метастатической СЮ, констатируется, что у всех пациентов наступил рецидив и впоследствии смертельный исход, связанный с основным заболеванием (рис. 4).

Таблица 2 — Клинико-патологические характеристики пациентов с локальными формами СЮ в группах с молекулярной комбинацией благоприятного и неблагоприятного исхода

Характеристики	Группа благоприятного исхода, N=9		Группа не благоприятного исхода, N=11		P
	N	%	N	%	
Пол					
Мужской	5	56	6	55	0,9640
Женский	4	44	5	45	
Возраст, годы					
≤ 14	5	56	4	36	0,3907
> 14	4	44	7	64	
ЛДГ, ед/мл медиана (мин.–макс.)	427 (166–732)	–	474 (311–733)		0,3423
Гистологический вариант					
Юинг	6	67	10	91	0,1775
ПНЭО	3	33	1	9	
Анатомическая локализация					
Бедро	4	44	3	28	0,4231
Лучевая кость	–	–	1	9	0,3534
Лопатка	–	–	1	9	0,3534
Ребро	1	11	1	9	0,8809
Большеберцовая кость	3	34	1	9	0,1775
Малоберцовая кость	–	–	1	9	0,3534
Кости таза	1	11	2	18	0,6595
Позвоночник	–	–	1	9	0,3534
Объем опухоли, мл медиана (мин.–макс.)	125 (25–430)	–	145 (37–330)		0,9697
Локализация					
Центральная локализация	1	11	3	27	0,3687
Другая	8	89	8	73	
Операция					
Широкая резекция	5	56	6	66	0,9640
Частичная резекция	1	11	–	–	0,2567
Не выполнялась	3	33	5	44	0,5820
Локальный контроль					
Только операция	5	56	6	66	0,9640
Операция и облучение	1	11	–	–	0,2567
Только облучение	3	33	5	44	0,5820
Химиотерапия					
Режим А	7	78	8	73	0,7952
Режим Б	2	22	3	27	
Гистологический ответ					
Некроз ≥ 90%	4	80	3	50	0,3031
Некроз < 90%	1	20	3	50	
Транслокация					
EWS/Fli 1	7	78	10	91	0,4132
EWS/Erg	1	11	–	–	0,2567
Не обнаружены транслокации 22 хромосомы*	1	11	1	19	0,8809
Вид события					
Рецидив	1	11	8	73	**0,0059**
Жив в ремиссии	8	89	3	27	
Финальный исход					
Умер	1	11	7	64	**0,0171**
Жив в ремиссии	8	89	4	26	

Примечание. 1. Абревиатуры: ПНЭО, примитивная нейроэктодермальная опухоль; ЛДГ, лактатдегидрогеназа. 2. *Дважды в ткани опухоли не обнаружены транслокации EWS/Fli 1, EWS/ERG, EWS-ETV1, EWS-E1AF, EWS-FEV.

Однако необходимо отметить, что 1 пациент, который не был классифицирован в зону плохого прогноза, имел до наступления рецидива длительный, практически 3-х летний промежуток ремиссии. У данного пациента на момент постановки диагноза было констатировано массивное опухолевое метастазирование с поражением легких, костей и костного мозга. Более того, после наступления рецидива пациент ответил на 2-ую линию лечения, и общая выживаемость у него превысила 5 лет с момента постановки диагноза. С клинической точки зрение такое поведение метастатической формы является крайне благоприятной, но очень нехарактерной для СЮ и возможно определение этого пациента в зону хорошего прогноза на основании молекулярных маркеров имело биологический смысл.

ОБСУЖДЕНИЕ

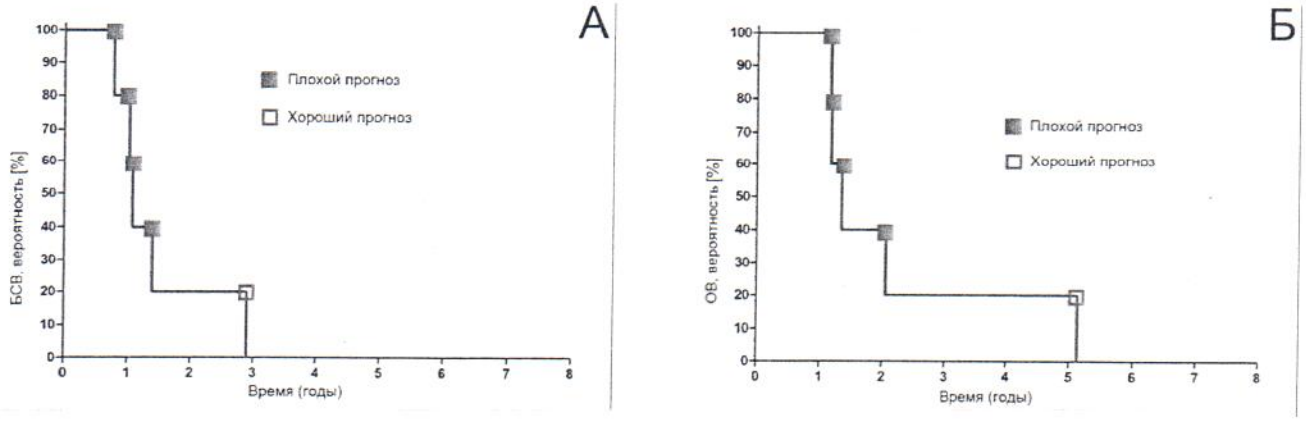
У трети пациентов с локализованными формами СЮ имеет место химиорезистентность опухоли и развивается ранний рецидив заболевания. Классические клинические характеристики не позволяют идентифицировать такие случаи для своевременной коррекции терапии, что подразумевает необходимость поиска новых прогностических маркеров [3–4, 6–8].

Полученные результаты свидетельствуют о возможности прогнозировать биологическое поведение локализованных форм саркомы Юинга на основании уровня экспрессии иРНК гена TFPI2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 в ткани опухоли.

К настоящему моменту ряд исследователей установил возможность использования опухолевого генотипа для прогноза ответа на специальное лечение и поведение СЮ. В частности, Schaefer et al определили ангиогенез, апоптоз, функцию PI3 киназы и гена p53 в качестве основных механизмов формирования химиорезистентности опухоли [18]. Luo W et al. констатировали значимую роль уровня микросомальной глютатион S-трансферазы (GSTM4, microsomal glutathione S-transferase M4) для клинического исхода пациентов с СЮ [19]. В представительном исследовании Scotlandi et al. уровень экспрессии MGST1 был изучен в 30 образцах первичной опухоли и 7 метастатических очагах. Повышенная экспрессия исследованного гена ассоциировалась с резистентностью к доксорубицину, ключевому цитостатику терапевтической схемы СЮ, и свидетельствовала о высокой вероятности раннего возврата заболевания [9]. Что касается факторов ангиогенеза, прогностическая роль его отдельных компонентов остается противоречивой и активно изучаемой на текущий момент. Имеют место противоречивые данные о влиянии степени плотности микрососудов (MVD, microvessel density) опухоли на терапевтический эффект [12, 20–21]. Также неоднозначные результаты констатированы при изучении профиля гена VEGF и его изоформ [12–13, 22–24]. В настоящем исследовании была определена комбинацию маркеров ангиогенеза, которая позволяет выделить как уязвимые так и устойчивые к цитостатической терапии новообразования.

ВЫВОДЫ

Выделение локализованных форм СЮ с неблагоприятным исходом возможно на основании низкого уровня экспрессии иРНК гена TFPI2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 в ткани опухоли. Установленные биологические



А — БСВ пациентов с метастатическими формами СЮ: n=5, без события 0; 0%
Б — ОВ пациентов с метастатическими формами СЮ: n=5, живы 0; 0%

Рисунок 4 — Бессобытийная (А) и общая (Б) выживаемость пациентов с метастатическими формами СЮ в зависимости от уровня экспрессии гена TFPI2 и соотношения VEGFA165/VEGFA189

маркеры могут на этапе первичной диагностики прогнозировать поведение опухоли и ее ответ на системное лечение, что дает основание для своевременного усиления терапевтического воздействия в группе пациентов с плохим прогнозом заболевания.

Список использованных источников

1. Суконко О.Г., Антоненкова Н.А. Организационно-методическая помощь, оказываемая государственным учреждением РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова организациям здравоохранения в Республике Беларусь. Онкологический журнал. 2011; 20: С. 42–45.

2. Демидчик Ю.Е., Писаренко А.М., Фридман М.В., Барагина З.Н., Маньковская С.В., Папок В.Е. Неоперируемый рак щитовидной железы: эффективность диагностики и выживаемость. Онкологический журнал. 2008; 8: С. 9–21.

3. Петрович С.В., Алейникова О.В. Особенности заболеваемости злокачественными новообразованиями детей первого года жизни в Республике Беларусь. Медико-биологические аспекты аварии на Чернобыльской АЭС. 2004; 1: 3–11.

4. Padhhye B., McCowage G. Chemotherapy regimens in newly diagnosed and recurrent Ewing sarcoma in children and young adults. CancerForum. 2011; 128–134.

5. Miser J.S., Goldsby R.E., Chen Z., Krailo M.D., Tarbell N.J., Link M.P. et al. Treatment of metastatic Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumour of bone: evaluation of increasing the dose intensity of chemotherapy—a report from the Children's Oncology Group. Pediatr Blood Cancer. 2007; 49: 894–900.

6. Granowetter L., Womer R., Devidas M., Krailo M., Wang C., Bernstein M. et al. Dose-intensified compared with standard chemotherapy for nonmetastatic Ewing sarcoma family of tumours: a Children's Oncology Group study. J Clin Oncol. 2009; 27: 2536–41.

7. Womer R., West D., Krailo M., Dickman P., Pawel B. Chemotherapy intensification by interval compression in localized Ewing sarcoma family tumours (ESFT). Proc Am Soc Clin Oncol. 2008; 26: abstr 10504.

8. Paulussen M., Craft A.W., Lewis I., Hackshaw A., Douglas C., Dunst J. et al. 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. 2008; 26: 4385–93.

9. Scotlandi K., Remondini D., Castellani G., Manara M.C., Nardi F., Cantiani L. et al: Overcoming resistance to conventional drugs in Ewing sarcoma and identification of molecular predictors of outcome. J Clin Oncol. 2009; 27: 2209-2216.

10. Ohali A., Avigad S., Zaizov R., Ophir R., Horn-Saban S., Cohen I.J. et al: Prediction of high risk Ewing's sarcoma by gene expression profiling. Oncogene; 2004; 23:8997-9006.

11. Kreuter M., Paulussen M., Boeckeler J., Gerss J., Buerger H., Liebscher C. et al. Clinical significance of Vascular Endothelial Growth Factor-A expression in Ewing's sarcoma. Eur J Cancer. 2006; 42(12):1904–11.

12. Mikuliж D., Iliж I., Cepuliж M., Giljeviж J.S., Orliж D., Zupanciж B. et al. Angiogenesis and Ewing sarcoma-relationship to pulmonary metastasis and survival. J Pediatr Surg. 2006; 41(3): 524–9.

13. Savitskaya T., Kisialeu L., Lipay N. The mRNA expression of various angiogenesis-related genes in pediatric sarcomas and nonmalignant lesions of tissue. Ped Hem and Onc. 2012; 29: 28–37.

14. Juergens C., Weston C., Lewis I., Whelan J., Paulussen M., Oberlin O. et al. 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. 2006; 47: 22–29.

15. Oberlin O., Rey A., Desfachelles A.S., Philip T., Plantaz D., Schmitt C. et al. Impact of high-dose busulfan plus melphalan as consolidation in metastatic Ewing tumours: a study by the Societe Francaise des Cancers de l'Enfant. J Clin Oncol. 2006; 24: 3997–4002.

16. Petrovich S, Aleinikova O, Shumikhina T. [Epidemiological aspects of childhood onco-hematological morbidity in the Republic of Belarus]. Vopr Onkol. 2002; 48(3): 301-305.

17. Gustafsson T., Ameln H., Fischer H., Sundberg C.J., Timmons J.A., Jansson E. et al. VEGF-A splice variants and related receptor expression in human skeletalmuscle following submaximal exercise. J Appl Physiol. 2005; 98: 2137–2146.

18. Schaefer K.L., Eisenacher M., Braun Y., Brachwitz K., Wai D.H., Dirksen U. et al. Microarray analysis of Ewing's sarcoma family of tumours reveals characteristic gene expression signatures associated with metastasis and resistance to chemotherapy. Eur J Cancer. 2008; 44: 699-709.

19. Luo W., Gangwal K., Sankar S., Boucher K.M., Thomas D., Lessnick S.L. et al. GSTM4 is a microsatellite-containing EWS/FLI target involved in Ewing's sarcoma oncogenesis and therapeutic resistance. Oncogene. 2009; 19; 28(46): 4126-4132.

20. Reddy K., Cao Y., Zhou Z., Yu L., Jia S.F., Kleinerman E.S.et al. VEGF165 expression in the tumor microenvironment influences the differentiation of bone marrow-derived pericytes that contribute to the Ewing's sarcoma vasculature. Angiogenesis. 2008; 11: 257-267.

21. Reddy K., Zhou Z., Schadler K., Jia S.F., Kleinerman E.S. et al. Bone marrow subsets differentiate into endothelial cells and pericytes contributing to Ewing's tumor vessels. Mol Cancer Res. 2008; 6: 929-936.

22. Lee T.H., Bolontrade M.F., Worth L.L., Guan H., Ellis L.M., Kleinerman E.S. et al. Production of VEGF165 by Ewing's sarcoma cells induces vasculogenesis and the incorporation of CD34 ю stem cells into the expanding tumor vasculature. Int J Cancer. 2006; 119: 839-846.

23. Wojtukiewicz M.Z., Sierko E., Zimnoch L., Kozlowski L., Kisiel W. Immunohistochemical localization of tissue factor pathway inhibitor-2 in human tumor tissue. Thromb Haemost. 2003; 90(1): 140-6.

24. DuBois S, Marina N, Glade-Bender J. Angiogenesis and Vascular Targeting in Ewing Sarcoma. Cancer. 2010; 1: 749-757.