

## Блокада VEGF для локализованных форм саркомы Юинга при прогнозируемой на основании молекулярных маркеров ангиогенеза химиорезистентности новообразования

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

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

## VEGF-blockade for patients with non-metastatic Ewing's sarcoma based on angiogenesis markers in pretreatment tumor tissue

L. Kisialeu, T. Savitskaia, O. Aleinikova

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

Большинство пациентов с локализованными формами опухолей семейства саркомы Юинга (СЮ) успешно излечивается на сегодняшний день, но около трети случаев развивают резистентность к современным схемам системной терапии. Ранее мы показали, что прогнозирование таких пациентов возможно посредством маркеров ангиогенеза (АГ): экспрессии мРНК гена TFPI2 (ингибитор путей тканевого фактора) и соотношения изоформ фактора роста сосудов VEGFA165/VEGFA189 в ткани опухоли перед началом лечения. Целью настоящего исследования была интенсификация терапии посредством анти-VEGF терапии для пациентов с прогнозируемым на основании уровня маркеров АГ неблагоприятным исходом заболевания. 123 пациентов детского возраста с локализованными формами СЮ (29 основной и 94 контрольной группы) включены в исследование. Для пациентов основной группы в проспективном режиме определялись маркеры АГ, и при неблагоприятном прогнозе стандартный терапевтический план был интенсифицирован посредством использования препарата бевацизумаб. Для основной группы констатированы лучшие показатели 5-летней БСВ (82,8% vs 60,1%,  $p < 0,05$ ), ОВ (84,4% vs 64,8%,  $p < 0,05$ ) и КЧР (13,8% vs 37,1%,  $p < 0,05$ ) по сравнению с пациентами, у которых данная технология не применялась (контрольная группа). Использование антиангиогенной терапии персонально для случаев с прогнозируемой на основании молекулярных маркеров АГ химиорезистентностью новообразования позволяет улучшить показатели 5-летней выживаемости для пациентов детского возраста с локализованными формами СЮ.

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

More than a third of patients with non-metastatic Ewing's sarcoma 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. 123 patients (29 of the main group, 94- comparison group) with non-metastatic forms ES included in the study. For patients of the main group angiogenesis markers were determined, and for patients with poor prognosis standard therapeutic plan has been strengthened through bevacizumab (VEGF inhibitor). 5-year event-free survival (82,8% vs 60,1%,  $p < 0,05$ ), overall survival (84,4% vs 64,8%,  $p < 0,05$ ) and cumulative incidence of recurrence (13,8% vs 37 1%,  $p < 0,05$ ) was better for the basic group compared with patients in whom this technology has not been applied (control group). The use of anti-angiogenic therapy personally for cases with predicted (based on molecular angiogenesis markers) chemoresistance can improve 5-year survival rate for pediatric patients with non-metastatic Ewing's sarcoma.

### ВВЕДЕНИЕ

Термин опухоли семейства саркомы Юинга (СЮ) объединяет классическую костную СЮ, экстраскелетную СЮ, опухоль Аскина грудной стенки и периферическую примитивную нейроэктодермальную опухоль. Все эти саркомы происходят из общего мезенхимального источника, имеют общие генетические поломки и являются высоко агрессивными новообразованиями с высоким потенциалом развития и метастазирования [1-4]. Локализованные (не метастатические) формы составляют более 70% всей СЮ, но около

трети случаев демонстрируют резистентность опухоли, не смотря на использование различных вариантов полихимиотерапии на протяжении последних десятилетий [5-6]. Классические клинические характеристики (пол, возраст, локализация и размер опухоли, уровень лактатдегидрогеназы и др.) характеризуются широким диапазоном параметров и не используются в актуальных клинических протоколах для стратификации плана инициальной терапии [7-8]. Молекулярные маркеры неопластического процесса на сегодняшний день рассматривается как в качестве прогностических факторов, так и в качестве объектов целевой (таргетной)

терапии. Ангиогенез (АГ) — процесс формирования опухоли собственной сосудистой сети, является безусловным условием развития и распространения новообразования [9-10]. Ранее мы установили (Онкологический журнал, 1 (37), том 10, 2016), 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]. Целью настоящего исследования была интенсификация лечения посредством блокады АГ для пациентов с прогнозируемым на основании уровня маркеров АГ неблагоприятным исходом заболевания.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 123 пациента с локализованными опухолями семейства СЮ, которые с 1999 по 2015 гг. проходили диагностический комплекс и получали лечение в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии (РНПЦДОГИ), Республика Беларусь [12]. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом учреждения. Изучался 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. Контрольную группу составили пациенты ( $n=94$ ) с локализованными формами СЮ, лечившиеся в РНПЦДОГИ с 1999 по 2010 гг., в основную вошли 29 пациентов за временной промежуток с 2011 по 2015 гг. Всем пациентам осуществлялся локальный контроль (операция, операция + лучевая терапия, только лучевая терапия). Режим химиотерапии контрольной группы предусматривал использование винкристина, доксорубина, ифосфамида, циклофосфамида, этопозиды, актиномицина D, бусульфана, мелфалана [10]. Для пациентов основной группы ( $n=29$ ) режим химиотерапии включал четырехкомпонентные блоки индукции (винкристин, доксорубин, ифосфамид и этопозид); консолидирующая терапия была трехкомпонентной (винкристин, ифосфамид, актиномицин D) [10]. При постановке диагноза пациентам основной группы, уровень экспрессии мРНК TFPI2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 в ткани опухоли исследовались в проспективном режиме. В качестве молекулярной комбинации неблагоприятного прогноза (МКНП) нами 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 нали-

чия МКНП стандартная терапия была усилена посредством назначения препарата бевацизумаб в дозе 7,5 мг/кг в день 1 каждого блока химиотерапии. Для пациентов с молекулярной комбинацией благоприятного прогноза антиангиогенная терапия не проводилась. Длительность бессобытийной выживаемости (БСВ), общей выживаемости (ОВ) и кумулятивной частоты рецидива (КЧР) исчислялась от времени постановки инициального диагноза.

## 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).

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 [15]. Реакции проводилась в 20-мкл реакционной смеси с окончательным разведением  $1\times$  в (Taqman PCR universalmaster mix, Applied Biosystems) в соответствии с протоколом производителя и с помощью оборудования Icyler (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 ко-

личественными показателями проводилась критерием U-тестом Манна-Уитни. Сравнение в группах по индивидуальным параметрам проводилось с помощью  $\chi^2$  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

Пациентам основной группы 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, представлена на рисунке 1.

Как представлено на рисунке 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.

Показатель 5-летней БСВ пациентов без наличия МКНП составил 100%. Показатель 5-летней БСВ пациентов с наличием МКНП был 66,7%. 5-летняя БСВ пациентов объединенной когорты составила 82,8%.

Показатель 5-летней ОВ пациентов без наличия МКНП и составил 100%. Показатель 5-летней ОВ пациентов с наличием МКНП был 70,0%. Показатель 5-летней ОВ пациентов объединенной когорты составил 84,4%.

Показатель КЧР за 5-летний период наблюдения пациентов без наличия МКНП составил 0%. Показатель КЧР пациентов с наличием МКНП был 26,7%. Показатель КЧР всех пациентов объединенной когорты составил 13,8%.

Далее мы сравнили показатели выживаемости показатели БСВ, ОВ и КЧР у пациентов с локализованными формами опухолей семейства СЮ до (контрольная группа) и после (основная группа) использования стратегии VEGF-блокады в зависимости от уровня молекулярных маркеров ангиогенеза.

Показатели 5-летней БСВ пациентов основной и контрольной группы представлены на рисунке 2.

Как представлено на рисунке 2, показатель 5-летней БСВ основной группы составил 82,8%, у пациентов контрольной группы он был 60,1% ( $P < 0,05$ ).

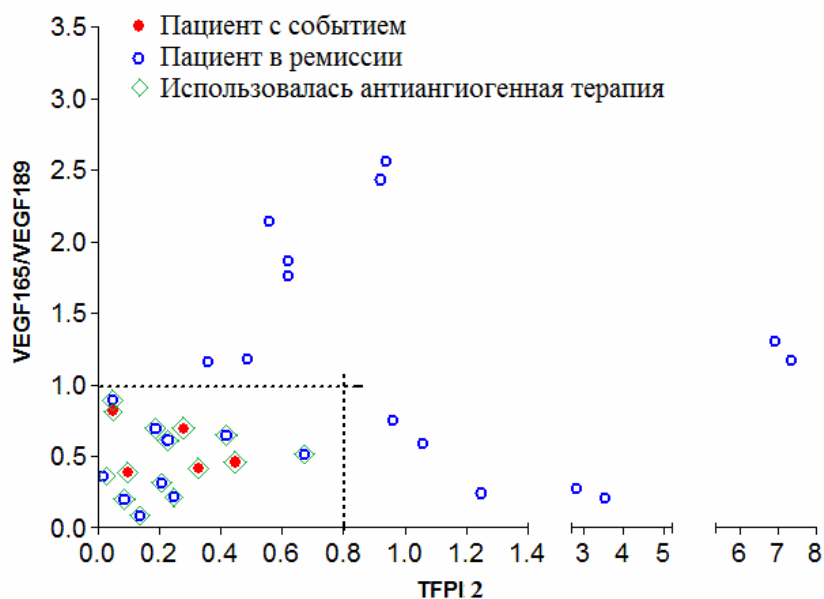


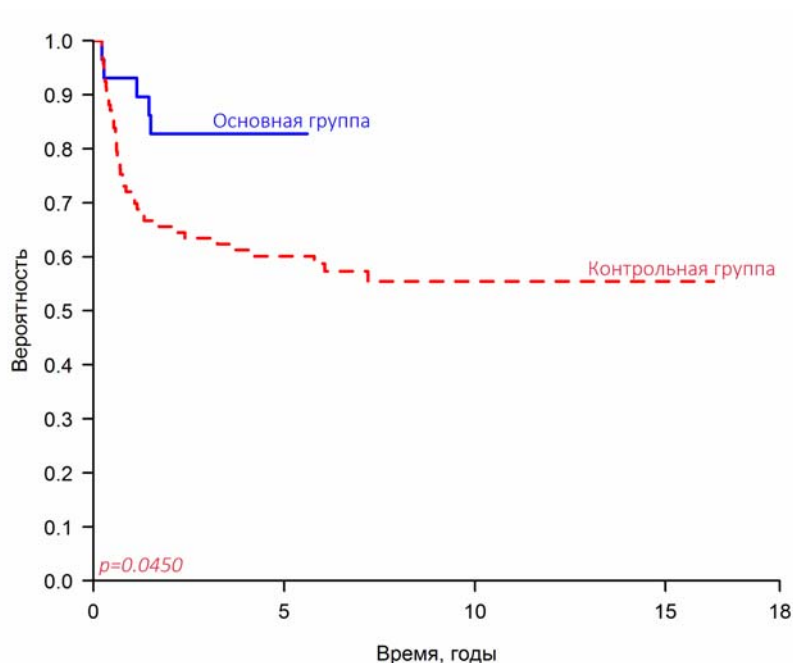
Рисунок 1 — Экспрессия мРНК гена TFPI-2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 у пациентов с локализованными формами СЮ в зависимости от клинического исхода заболевания

Показатели 5-летней ОВ пациентов основной и контрольной группы представлены на рисунке 3.

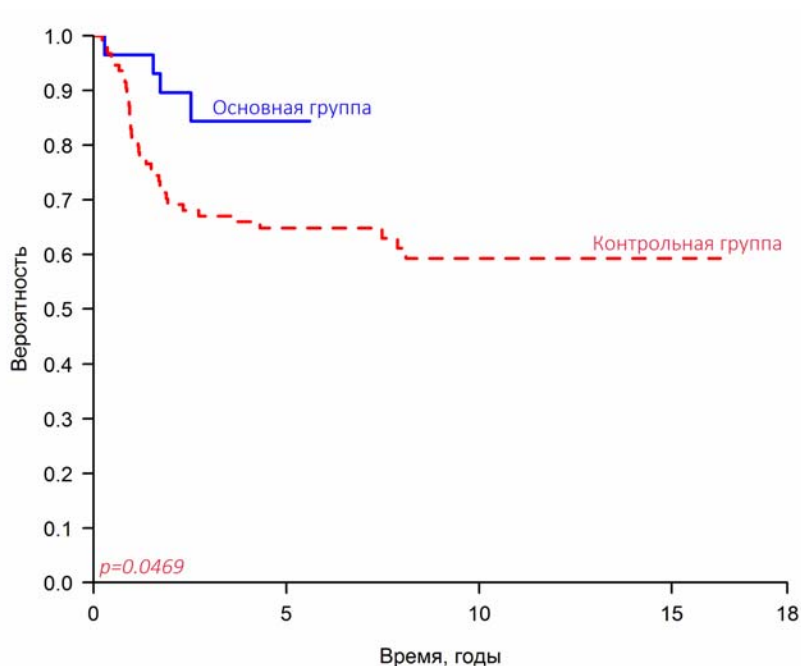
Как представлено на рисунке 3, показатель 5-летней ОВ основной группы составил 84,4%, у пациентов контрольной группы он был 64,8% ( $P<0,05$ ).

Показатели КЧР пациентов основной и контрольной группы за 5-летний период наблюдения представлены на рисунке 4.

Как представлено на рисунке 4, показатель КЧР за 5-летний период наблюдения основной группы составил 13,8%, у пациентов контрольной группы он был 37,1% ( $P<0,05$ ).



**Рисунок 2 — БСВ пациентов основной и контрольной группы. Основная группа:  $n=29$ , 24 без события [82,8%±7,0%]; контрольная группа:  $n=94$ , 54 без события [55,5%±5,4%], на отсечке 5 лет [60,1%±5,1%]**



**Рисунок 3 — ОВ пациентов основной и контрольной группы. Основная группа:  $n=29$ , 25 живы [84,4%±7,0%]; контрольная группа:  $n=94$ , 58 живы [59,3%±5,5%], на отсечке 5 лет [64,8%±4,9%]**

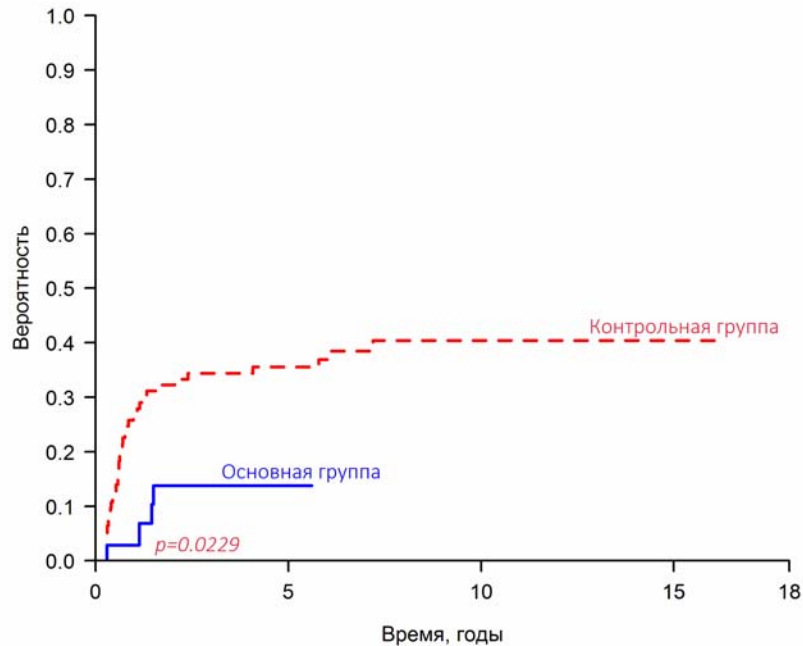


Рисунок 4 — КЧР пациентов основной и контрольной группы. Основная группа:  $n=29$ , 4 рецидива [13,8%±6,5%]; контрольная группа:  $n=94$ , 38 рецидивов [42,4%±5,4%], на отсечке 5 лет [37,1%±5,1%]

## ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование сообщает о возможности персональной интенсификации терапии пациентам с локализованными формами СЮ. На сегодняшний день около трети пациентов с локализованными формами 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 лечение было интенсифицировано посредством использования антиангиогенной терапии.

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, Североамериканские исследователи из Children's Oncology Group (COG) использовали метронормную 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 [17,18]. В одном из них, с 2007 года, американские исследователи предложили использовать бевацизумаб в режиме рандомизации вместе со стандартной химиотерапевтической схемой для пациентов, рефрактерных к индукционной полихимиотерапии (N протокола NCT00516295) [18]. Кооперативная мультицентровая студия, в 2008 году стартовавшая 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 (N протокола NCT00643565) [18].

В нашем исследовании бевацизумаб дополнил 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, 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%. 5-летняя ОВ пациентов с прогнозируемым благоприятным исходом была 100%. Показатель 5-летней ОВ пациентов с неблагоприятным исходом для которых была применена VEGF-блокада составил 70,0%.

У всей когорты пациентов с локализованной СЮ, для которой осуществлялась антиангиогенная терапия на основании уровня маркеров АГ констатированы лучшие показатели 5-летней БСВ (82,8% vs 60,1%,  $p<0,05$ ), ОВ (84,4% vs 64,8%,  $p<0,05$ ) и КЧР (13,8% vs 37,1%,  $p<0,05$ ) по сравнению с пациентами, у которых данная технология не применялась.

Таким образом продемонстрировано, что антиангиогенная терапия может быть эффективна при персональном назначении пациентам с прогнозируемым (на основании уровня маркеров АГ в ткани опухоли) неблагоприятном исходе заболевания.

## ВЫВОДЫ

Использование антиангиогенной терапии персонально для случаев с прогнозируемой на основании молекулярных маркеров АГ химиорезистентностью новообразования позволяет улучшить показатели 5-летней выживаемости для пациентов детского возраста с локализованными формами СЮ.

## Список использованных источников

1. Алейникова О.В., Потапнев М.П., Сыцкевич О.Н., Петрович С.В., Исмаил-заде Р.С., Стронгин Ю.С. и др. Достижения детской онкологии и гематологии в Республике Беларусь. Актуальные вопросы детской онкологии и гематологии: Материалы VIII междунар. симп. Минск. 2000; 3-8.
2. Сукошко О.Г., Антоненкова Нат.А. Организационно-методическая помощь, оказываемая государственным учреждением РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова организациям здравоохранения в Республике Беларусь. Онкологический журнал. 2011; 20: 42-45.
3. Демидчик Ю.Е., Писаренко А.М., Фридман М.В., Барагина З.Н., Маньковская С.В., Папок В.Е. Неоперабельный рак щитовидной железы: эффективность диагностики и выживаемость. Онкологический журнал. 2008; 8: 9-21.
4. Жаврид Э.А., Антоненкова Н.Н., Прохорова В.И., Лаппо С.В. Роль молекулярных часов в патогенезе и терапии злокачественных новообразований. Медицинская панорама. 2011; 7: 19-23.
5. 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.
6. Bhavna Padhye and Geoffrey McCowage. Chemotherapy regimens in newly diagnosed and recurrent ewing sarcoma in children and young adults. CancerForum Volume 34 Number 3 Nov 2010; 34: 3.
7. 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.
8. 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.
9. J. L. Ordonez, D. Osuna, D. Herrero, E. De A lava, and J. Madoz-G urpide, «Advances in Ewing's sarcoma research: where are we now and what lies ahead?» Cancer Research, 2009 69/18, 7140-7150.
10. Киселев Л.П., Локализованные формы опухолей семейства саркомы Юинга в Республике Беларусь: анализ клинических исходов у 115 пациентов за 15-летний период наблюдения. Киселев Л.П., Алейникова О.В Онкопедиатрия (Москва, РФ). 2016; 3(3): 182-187
11. Киселев Л.П., Савицкая Т.В., Липай Н.В., Алейникова О.В. TFP12, VEGFA165 и VEGFA189 как независимые факторы прогноза локализованных форм саркомы Юинга. Онкологический журнал. 2016; 10:93-100.
12. 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.
13. 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.
14. 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 skeletal muscle following submaximal exercise. J Appl Physiol. 2005; 98: 2137-2146.
15. 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.
16. Glade Bender J.L., Adamson P.C., Reid J.M., Xu L., Baruchel S., Shaked Y. «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, 2008; 26(3), 399-405.
17. V. Subbiah, P. Anderson, A. Lazar, E. Burdett, K. Raymond, and J. Ludwig, «Ewing's sarcoma: standard and experimental treatment options», Current Treatment Options in Oncology, 2009; 10(1-2): 126-140.
18. DuBois S, Marina N, Glade-Bender J. Angiogenesis and Vascular Targeting in Ewing Sarcoma. Cancer. 2010; 1: 749-757.