

DOI: 10.15690/onco.v4i2.1704

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

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

Прогнозирование клинического исхода и антиангиогенная терапия у пациентов детского возраста с неметастатическими формами саркомы Юинга

Обоснование. Для 1/3 пациентов детского возраста с неметастатическими формами опухолей семейства саркомы Юинга (СЮ) стандартная системная химиотерапия оказывается малоэффективной, что в короткие сроки приводит к развитию рецидива заболевания. Важной задачей является ранняя констатация этих неблагоприятных случаев с целью попытки своевременной коррекции терапевтического плана. **Цели исследования** — прогнозирование для пациентов с резистентностью опухоли и интенсификация лечения у них. **Методы.** В исследование включены 45 педиатрических пациентов с диагнозом СЮ. На первом этапе методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в ткани опухоли были определены уровни экспрессии мРНК генов, участвующих в процессе ангиогенеза, характеризующие неблагоприятный исход заболевания: группа 1; n=25, из них 20 пациентов с неметастатическими, 5 — с метастатическими формами. На втором этапе для пациентов с неметастатической СЮ и прогнозируемым неблагоприятным исходом для усиления стандартного плана терапевтического воздействия была осуществлена блокада ангиогенеза: группа 2; n=20, из них 11 с 2011 по 2014 г. на основании уровня экспрессии маркеров ангиогенеза, прогнозирующих неблагоприятный исход заболевания, дополнительно был назначен препарат бевацизумаб. **Результаты.** Уровень экспрессии мРНК генов ангиогенеза в ткани опухоли позволяет прогнозировать клинический исход для пациентов с неметастатической СЮ. С использованием блокады ангиогенеза для пациентов с прогнозируемым неблагоприятным исходом бессобытийная выживаемость у всей когорты с локализованными формами СЮ за трехлетний период наблюдения составила 85%, общая выживаемость — 95%. **Заключение.** Блокада ангиогенеза при неблагоприятном прогнозе заболевания, установленном на основании уровня маркеров ангиогенеза в ткани опухоли, может быть эффективной у пациентов с неметастатическими формами опухолей семейства СЮ.

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

(Для цитирования: Киселёв Л.П., Савицкая Т.В., Алейникова О.В. Прогнозирование клинического исхода и антиангиогенная терапия у пациентов детского возраста с неметастатическими формами саркомы Юинга. *Онкопедиатрия*. 2017;4(2):105–114. Doi: 10.15690/onco.v4i2.1704)

105

ОБОСНОВАНИЕ

Наличие общих генетических поломок позволило объединить классическую саркому Юинга (СЮ) с нозологиями, ранее рассматриваемыми отдельно (экстраскелетная СЮ, опухоль Аскина грудной стенки и периферическая примитивная нейроэктодермальная опухоль), в общую группу — опухоли семейства саркомы Юинга [1–4]. Достижения в хирургии, химио- и лучевой терапии позволили добиться значимых результатов в выживаемости пациентов с локализованными формами заболевания: с 10% несколько десятилетий назад до 60–70% к настоящему времени. Для метастатических и рецидивных форм, к сожалению, показатели долгосрочной выживаемости остаются неудовлетворительными и не превышают 15–25% [3, 4].

Соответственно, наличие отдаленных метастазов на момент постановки диагноза является классическим признаком плохого клинического исхода, однако при неметастатических (локализованных) формах прогнозирование для той 1/3 пациентов, которые не ответят на стандартное лечение и разовьют ранний рецидив, является актуальной задачей. Более того, стандартный химиотерапевтический план обладает достаточно высокой токсичностью, что увеличивает риск развития как индукционной смертности, так и количества вторичных индуцированных заболеваний; в связи с этим снижение цитотоксической нагрузки для пациентов с прогнозируемым благоприятным исходом поможет уменьшить число этих отдаленных неблагоприятных событий [5, 6].

Размер опухоли, пол, возраст, уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ), центральная локализация и плохой ответ на индукционную химиотерапию рассматриваются как известные прогностические маркеры для неметастатической СЮ. Однако значения этих показателей имеют достаточно широкие диапазоны и на их основе сложно предопределить клинический исход заболевания на момент постановки диагноза. В современных базовых клинических протоколах все пациенты с локализованными формами СЮ получают индукционную химиотерапию по идентичным планам независимо от перечисленных выше критериев [7, 8]. Таким образом, новые подходы, подразумевающие изучение биологии опухоли посредством молекулярных маркеров, необходимы для стратификации пациентов перед системным лечением на группы неудовлетворительного и положительного исхода заболевания [9, 10].

Одним из таких направлений является ангиогенез — процесс формирования опухолью патологической сосудистой сети — и его центральный компонент — фактор роста эндотелия сосудов

(Vascular endothelial growth factor, VEGF) [11, 12]. Ранее у педиатрических пациентов с костными и мягкоткаными саркомами мы исследовали широкий спектр генов, вовлеченных в процесс формирования сосудистой сети. Была изучена экспрессия генов *VEGFA* (включая изоформы 121, 165, 189), *VEGFC*, *VEGFR1*, *VEGFR2*, *VEGFR3*, *HIF1 α* (фактор индукции гипоксии), *TF* (тканевой фактор), *TFPI1* (ингибитор путей тканевого фактора 1), *TFPI2*, *uPA* (активатор плазминогена урокиназного типа), *PAI1* (ингибитор активатора плазминогена 1) [13]. Из этого спектра только уровни экспрессии *TFPI2* и соотношение изоформ *VEGFA165/VEGFA189* значимо отличались у пациентов с неметастатическими и метастатическими формами сарком, т.е. в группах с известным хорошим и плохим клиническим исходом заболевания [13]. Мы предположили, что эти биологические маркеры будут также прогнозировать клинический исход только для случаев с локализованными формами СЮ, и использование блокады ангиогенеза уменьшит вероятность рецидива для пациентов группы с плохим прогнозом.

L. Kisialeu, T. Savitskaia, O. Aleinikova

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

Prediction of Clinical Outcome and Antiangiogenic Therapy for Pediatric Patients with Non-Metastatic Ewing's Sarcoma

Background. The standard systemic therapy is ineffective in one-third of patients with Ewing's sarcoma (ES) which leads to a relapse. An important objective is the early detection of any adverse events to correct the therapy plan in time. **Objective.** The aim of the study was to predict tumor resistance in patients and focus on timely treatment intensification. **Methods.** Data of 45 pediatric patients with ES was analyzed. During the first stage (group 1), we identified the mRNA expression levels of genes involved in the angiogenesis process which characterize an unfavorable outcome (Method: real-time PCR; Subject: tumor tissue prior to treatment). 25 patients were included in the first group: 20 — with non-metastatic, 5 — with metastatic forms of cancer. In the second phase (group 2), the strategy of the angiogenesis blockade was used in patients with predicted poor outcome. 20 patients with non-metastatic ES were included in the second group. From 2011 to 2014, the drug bevacizumab was administered with standard chemotherapy in 11 patients of the group with predicted adverse outcome. **Results.** The mRNA expression level of genes associated with angiogenesis can predict the clinical outcome for patients with non-metastatic ES. Angiogenesis blockade as a therapeutic approach was applied in patients with predicted poor outcome; event-free survival in the overall cohort with non-metastatic forms of ES for the 3-year follow-up was 85%, overall survival — 95%. **Conclusion.** Application of antiangiogenic therapy in patients with poor (based on angiogenesis markers in pretreatment tumor tissue) prognosis may be efficient for pediatric patients with non-metastatic ES.

Key words: angiogenesis, pediatric patients, Ewing's sarcoma, prognostic markers.

(For citation: Kisialeu L, Savitskaia T, Aleinikova O. Prediction of Clinical Outcome and Antiangiogenic Therapy for Pediatric Patients with Non-metastatic Ewing's Sarcoma. *Onkopediatria*. 2017;4(2): 105–114. Doi: 10.15690/onco.v4i2.1704)

Целями исследования были поиск маркеров ангиогенеза, предсказывающих неблагоприятный исход при локализованных формах СЮ, и использование блокады ангиогенеза для таких пациентов.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Группа 1 (пациенты при определении молекулярной комбинации неблагоприятного исхода заболевания)

С февраля 2004 по октябрь 2011 г. была сформирована когорта из 25 пациентов (20 с локализованными, 5 с метастатическими формами) с СЮ, которые проходили диагностический комплекс и получали лечение в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии Минздрава Республики Беларусь (далее 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 наличие достаточного количества материала и гистологическое, иммуногистохимическое и молекулярно-биологическое подтверждение диагноза. 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, доксорубин, ифосфамид и этопозид) [13], консолидирующая терапия — трехкомпонентной (винкристин, ифосфамид, актиномицин D). Индукционный *режим Б* в соответствии с рекомендациями американских детских онкологов предусматривал альтернирующие блоки винкристина/доксорубина/циклофосфамида и этопозид/ифосфамида [6], консолидирующая терапия — высокие дозы бусульфана и мелфалана с поддержкой периферическими стволовыми клетками [14]. Клинико-патологические данные пациентов приведены в табл. 1.

Таблица 1. Клинико-патологические характеристики пациентов группы 1

Характеристики	Локализованные формы, n=20		Метастатические формы, n=5	
	n	%	n	%
Пол				
Мужской	11	55	4	80
Женский	9	45	1	20
Возраст, лет				
≤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	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

Таблица 1. Клинико-патологические характеристики пациентов группы 1 (Окончание)

Характеристики	Локализованные формы, n=20		Метастатические формы, n=5	
	n	%	n	%
Гистологический ответ				
Некроз ≥90%	8	66	-	-
Некроз <90%	4	34	-	-
Опухолевый транскрипт				
EWS/FLI1	17	85	4	80
EWS/ERG	1	5	1	20
Не обнаружены транслокации 22-й 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

Примечание. * — дважды в ткани опухоли не обнаружены транслокации EWS/FLI1, EWS/ERG, EWS-ETV1, EWS-E1AF, EWS-FEV. ПНЭО — примитивная нейроэктодермальная опухоль, ЛДГ — лактатдегидрогеназа.

Группа 2 (проспективные пациенты с усилением терапии на основании наличия молекулярной комбинации неблагоприятного исхода заболевания)

С ноября 2011 по 2014 г. для пациентов с локализованными формами СЮ уровень экспрессии мРНК гена *TFPI2* и соотношения изоформ *VEGFA165/VEGFA189* в ткани опухоли исследовались в проспективном режиме. В случае наличия молекулярной комбинации неблагоприятного прогноза стандартная терапия (режим А) была усилена посредством назначения препарата бевацизумаба 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 (БСВ) и общей выживаемости (ОВ) 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 компании Retsch (Германия). При приготовлении РНК и обратной транскриптазы-полимеразной цепной реакции в реальном времени (реал-тайм ПЦР) тотальная РНК выделялась с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) 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, США).

Три гена были исследованы в оригинальных образцах — *VEGFA165*, *VEGFA189* и *TFPI2*. 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 *TFPI2* проводилась с использованием коммерческих систем TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems (Foster City, Калифорния), ID Hs00900054 и Hs00197918 мл соответственно.

Праймеры и зонды для количественной оценки *VEGF*-изоформ в реал-тайм ПЦР были использованы в соответствии с описанием T. Gustafsson и соавт. [15].

ПЦР реал-тайм проводили в 20 мкл реакционной смеси с окончательным разведением 1× (Applied Biosystems, Калифорния) в соответствии с протоколом производителя и с помощью оборудования Icyler (Bio-Rad, Hercules, Калифорния) в режиме реального времени. Относительные величины информационной РНК 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

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

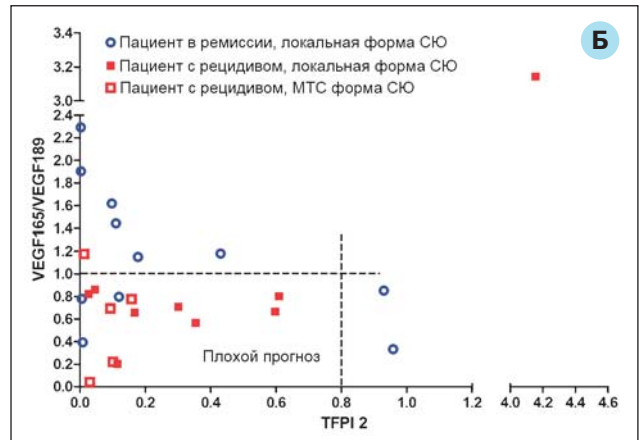
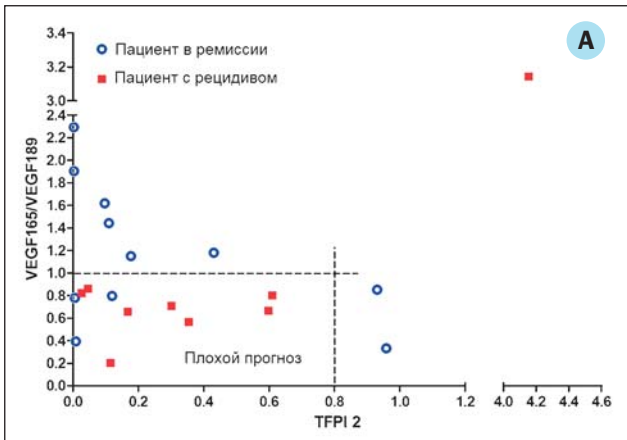


Рис. 1. Уровни экспрессии иРНК гена *TFPI2* и соотношения изоформ *VEGFA165/VEGFA189* у пациентов только с локализованными формами саркомы Юинга (А) и в общей (локализованные и метастатические формы) группе (Б)
Примечание. МТС — метастатическая форма.

ми показателями проводилась с использованием теста Манна–Уитни (U-критерий); сравнение в группах по индивидуальным параметрам — с помощью теста Пирсона (χ^2 -критерий). Для оценки выживаемости пациентов применялся метод Каплана–Мейера. Различия в выживаемости оценивались с использованием логрангового теста (log-rank). Кумулятивная частота возникновения событий рассчитывалась методом конкурирующих рисков, различия кумулятивных частот оценивались по тесту Грея (Gray). Все различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Группа 1

Исследование пациентов группы 1 подразумевает изучение образцов опухоли из первичных очагов у 20 пациентов с неметастатическими формами СЮ и 5 пациентов с IV стадией заболевания.

Уровни экспрессии иРНК гена *TFPI2* и соотношения изоформ *VEGFA165/VEGFA189* оценивались в группе пациентов (n=9), развивших рецидив заболевания (на рис. 1 обозначены как «Пациент с рецидивом») в течение 3 лет от постановки диагноза и начала лечения (медиана времени до прогрессии 1,34 года; мин. 0,77 года, макс. 2,89 года), и в группе пациентов (n=11), находящихся в устойчивой длительной ремиссии (медиана наблюдения 4,51 года; 3,65– 6,59; на рис. 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* было 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. 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 заболева-

ния, 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 (73%) из 11 пациентов с длительной ремиссией и 1 (11%) из 9 пациентов 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 (80%) из 5 пациентов с IV стадией заболевания были классифицированы в выделенную зону плохого прогноза, причем двое из них показали минимальные значения как экспрессии *TFPI2*, так и соотношения изоформ *VEGFA165/VEGFA189*; 1/5 (20%) не определился в группу плохого прогноза; клиническое описание развития его болезни представлено ниже.

Таким образом, 12 (86%) из 14 пациентов с плохим исходом заболевания характеризовались низким (<0,8) уровнем экспрессии иРНК

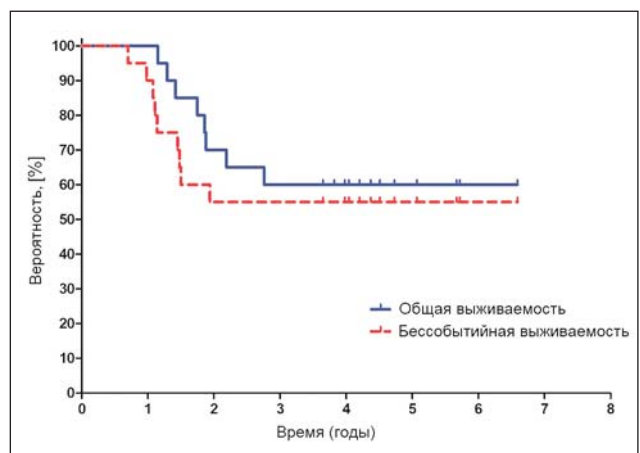


Рис. 2. Общая (ОВ) и бессобытийная (БСВ) выживаемость пациентов с неметастатическими формами саркомы Юинга (группа 1)

Примечание. ОВ (60±11%): n=20, живы 12; БСВ (55±11%): n=20, без события 11.

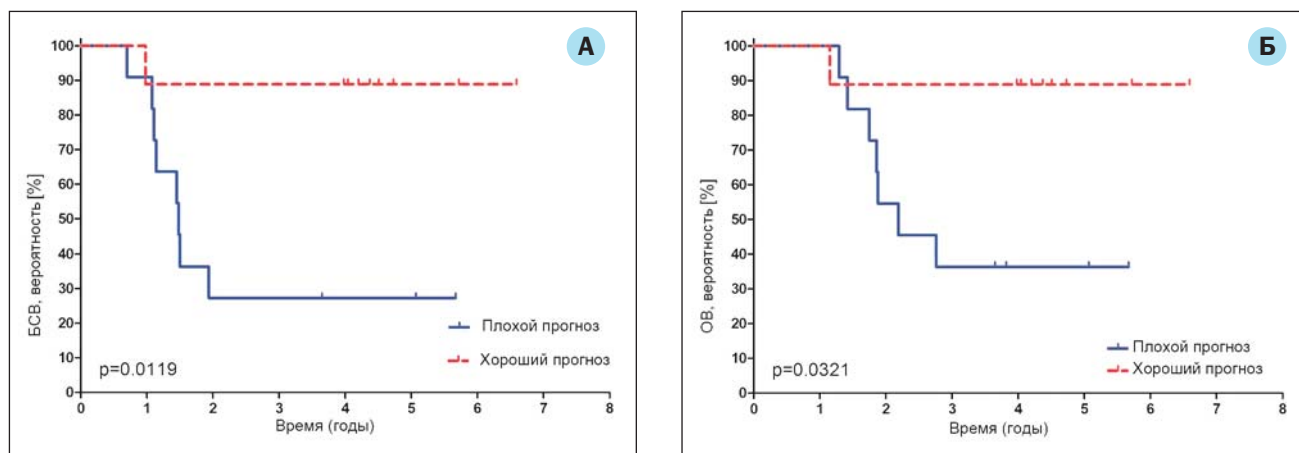


Рис. 3. Бессобытийная (А) и общая (Б) выживаемость пациентов с неметастатическими формами саркомы Юинга (группа 1) в зависимости от уровня экспрессии гена *TFPI2* и соотношения *VEGFA165/VEGFA189*

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

TFPI2 и одновременно низким ($<1,0$) уровнем соотношения изоформ *VEGFA165/VEGFA189* в ткани опухоли на момент постановки диагноза. Можно предположить, что нам 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, пятилетняя БСВ и ОВ пациентов составила 55 и 66% с устойчивым выходом кривых на плато после трехлетнего 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).

Как показано на рис. 3А, пятилетняя БСВ пациентов с локальными формами СЮ и молекулярной комбинацией благоприятного прогноза составила 89%, в то время как у пациентов с молекулярной комбинацией неблагоприятного прогноза 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 табл. 2.

Таблица 2. Клинико-патологические характеристики пациентов группы 1 с неметастатическими формами СЮ в группах с молекулярной комбинацией благоприятного и неблагоприятного прогноза

Характеристики	Группа благоприятного прогноза, $n=9$		Группа неблагоприятного прогноза, $n=11$		<i>p</i>
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Пол					
Мужской	5	56	6	55	0,9640
Женский	4	44	5	45	
Возраст, лет					
≤ 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

Таблица 2. Клинико-патологические характеристики пациентов группы 1 с метастатическими формами СЮ в группах с молекулярной комбинацией благоприятного и неблагоприятного прогноза (Окончание)

Характеристики	Группа благоприятного прогноза, n=9		Группа неблагоприятного прогноза, n=11		p
	n	%	n	%	
Объем опухоли, мл медиана (мин.–макс.)	125 (25–430)	-	145 (37–330)	-	0,9697
Локализация					
Центральная	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/Fli1	7	78	10	91	0,4132
EWS/Erg	1	11	-	-	0,2567
Не обнаружены транслокации 22-й 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. * — дважды в ткани опухоли не обнаружены транслокации EWS/Fli1, EWS/ERG, EWS-ETV1, EWS-E1AF, EWS-FEV. ПНЭО — примитивная нейроэктодермальная опухоль, ЛДГ — лактатдегидрогеназа.

На основании представленных данных 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 констатировано, что у всех пациентов наступил рецидив и впоследствии смертельный исход, связанный с основным заболеванием (рис. 4).

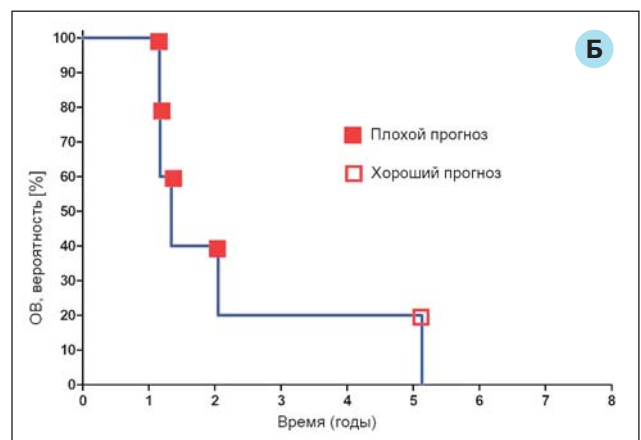
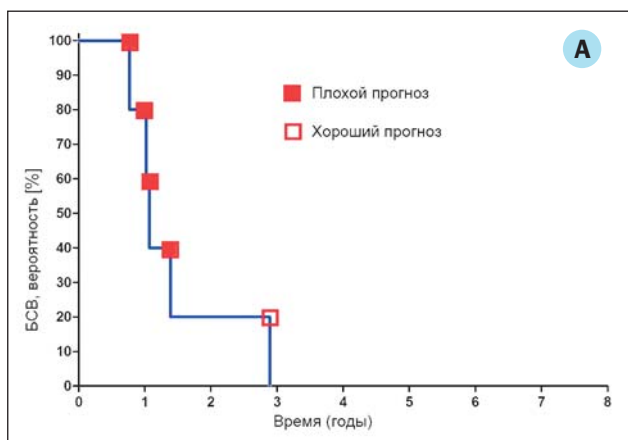


Рис. 4. Бессобытийная (А) и общая (Б) выживаемость пациентов с метастатическими формами саркомы Юинга (группа 1) в зависимости от уровня экспрессии гена *TFPI2* и соотношения *VEGFA165/VEGFA189*

Примечание. А — БСВ пациентов с метастатическими формами саркомы Юинга: n=5, без события 0; 0%. Б — ОБ пациентов с метастатическими формами саркомы Юинга: n=5, живы 0; 0%.

Однако необходимо отметить, что 1 пациент, который не был стратифицирован в зону неблагоприятного прогноза, имел до наступления рецидива длительный, практически трехлетний 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-ю линию лечения, и общая выживаемость у него превысила 5 лет с момента постановки диагноза. С клинической точки зрения, такое течение метастатической формы заболевания является крайне благоприятной, но очень нехарактерной для СЮ, и, возможно, определение этого пациента в зону хорошего прогноза на основании молекулярных маркеров имело биологический смысл.

Группа 2

Для 11 (55%) из 20 пациентов группы 2 с прогнозируемым неблагоприятным исходом заболевания наряду со стандартной полихимиотерапией был использован бевацизумаб в дозе 7,5 мг/кг в день 1 каждого блока. У 9/20 пациентов с прогнозируемым благоприятным исходом использовалась только стандартная полихимиотерапия, все они живы без событий. Показатели БСВ и ОВ были изучены для всей когорты пациентов с локализованной СЮ, в том числе для части пациентов, в которой антиангиогенная терапия была использована на основании уровня маркеров ангиогенеза.

Как представлено на рис. 5, за трехлетний период наблюдения показатели БСВ и ОВ составили 85 и 95% соответственно.

Из трех неблагоприятных исходов рецидив произошел у 2 пациентов, в одном случае констатирована смерть от сепсиса. Обращает на себя внимание тот факт, что оба рецидива были местными; пациентам проведен повторный локальный контроль (операция и лучевая терапия) и химиотерапия 2-й линии. Оба пациента живы без признаков рецидива на момент анализа.

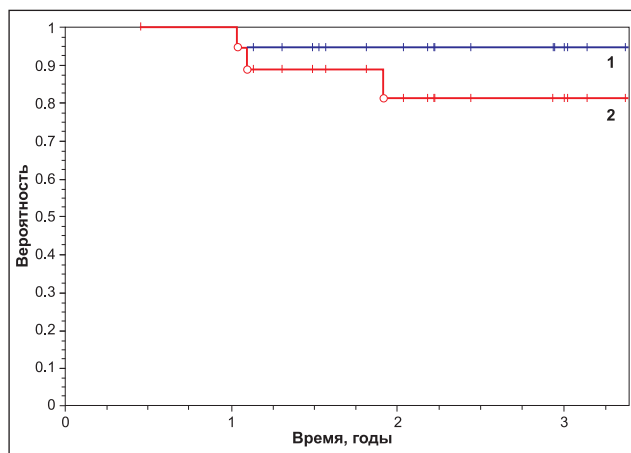


Рис. 5. Общая (1) и бессобытийная (2) выживаемость пациентов с неметастатическими формами саркомы Юинга (группа 2)

Примечание. 1 — ОВ (95±11%): n=20, живы 19; 2 — БСВ (85±11%): n=20, без события 3.

ОБСУЖДЕНИЕ

В течение последних десятилетий около 1/3 пациентов с неметастатическими формами опухоли семейства СЮ развивают химиорезистентность опухоли и, как следствие, ранний рецидив заболевания [5–7]. Классические клинические факторы прогноза (пол, возраст, размер опухоли, уровень ЛДГ и др.) характеризуются широким диапазоном и не влияют на стратификацию инициального лечения большинства современных протоколов терапии, что подразумевает поиск новых маркеров, связанных с пониманием молекулярной биологии опухоли [3, 4, 6–8].

Настоящее исследование сообщает о возможности прогнозирования клинического исхода заболевания и усиления терапевтического плана для пациентов с неметастатическими формами СЮ на основании маркеров, ассоциированных с процессами ангиогенеза, — уровнем экспрессии мРНК гена *TFPI2* и соотношения изоформ *VEGFA165/VEGFA189* в ткани опухоли перед началом терапии.

Прогностическая роль различных компонентов процесса ангиогенеза активно изучается на текущий момент при злокачественных новообразованиях. Первые исследования маркеров этого процесса свидетельствовали как о влиянии степени плотности микрососудов (Microvessel density, MVD) опухоли на терапевтический эффект, так и отрицали данный факт [16, 17]. Исследования профиля гена *VEGF* и его изоформ также показали противоречивые результаты [17, 18]. Существующие данные о роли изоформы *VEGFA165* свидетельствуют как о повышенном ее уровне в клетках СЮ, так и о большей ее эффективности для опухоли по сравнению с *VEGFA189*. Обе изоформы потенцируют деление и миграцию эндотелиоцитов, но для *VEGFA165*-дефицитных опухолей отмечается уменьшение интенсивности миграции клеток в костный мозг [18, 20]. В нашем исследовании больший уровень соотношения *VEGFA165* к *VEGFA189* свидетельствовал о более благоприятном клиническом исходе заболевания. Функции *TFPI2* заключаются в контроле и стабилизации опухолевого процесса посредством ингибирования ангиогенеза и индукции апоптоза [19]. В соответствии с установленной биологической ролью высокий уровень экспрессии *TFPI2* в нашем исследовании ассоциировался с лучшими показателями долгосрочной выживаемости пациентов с локализованными формами СЮ. Можно констатировать, что нам удалось зафиксировать комбинацию маркеров ангиогенеза, которая может выделить как уязвимые новообразования, так и устойчивые к цитостатической терапии.

Современные таргетные препараты, направленные на подавление роста опухолевых сосудов, вызывают несомненный интерес в качестве варианта усиления антинеопластического воздействия [16–18]. В качестве первого опыта для СЮ североамериканские исследователи Детской

онкологической группы (Children's Oncology Group, COG) использовали метронормную антиангиогенную терапию — винбластин и целекоксиб совместно с базовой схемой [18, 20]. В настоящий момент в Европейском союзе и Соединенных Штатах Америки проводятся несколько исследований эффективности блокады ангиогенеза при СЮ [17, 20]. В одном из них с 2007 г. американские исследователи используют бевацизумаб в режиме рандомизации вместе со стандартной химиотерапевтической схемой для пациентов, рефрактерных к индукционной полихимиотерапии (№ протокола NCT00516295) [20]. Кооперативная мультицентровая группа по изучению детской онкологии и гематологии, стартовавшая в 2008 г. 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) [20]. 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. Более чем за трехлетний период наблюдения только у 2 пациентов констатирован продолженный рост опухоли в группе благоприятного прогноза (оба изначально классифицированы в группу неблагоприятного прогноза); все пациенты (n=9) находятся в ремиссии. Необходимо отметить, что в обоих случаях имел место местный, но

не системный рецидив заболевания. Пациентам проведен повторный локальный контроль (операция, лучевая терапия) и полихимиотерапия 2-й линии: оба живы на момент анализа. Можно предположить, что благодаря примененной тактике в значительной степени был блокирован процесс микрометастазирования, и манифестация возврата заболевания не была выраженной. Показатели ОБ и БСВ для всей когорты составили 95 и 85% соответственно. Полученные результаты рассматриваются как предварительные, и исследование будет продолжено с целью увеличения количества пациентов и сроков наблюдения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выделение локализованных форм СЮ с неблагоприятным исходом возможно на основании уровня экспрессии маркеров ангиогенеза в ткани опухоли перед началом терапии. Блокада ангиогенеза у пациентов с плохим прогнозом заболевания может быть эффективной при неметастатических формах СЮ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование осуществлено при финансовой поддержке Государственного научно-технического комитета Республики Беларусь. Государственная регистрация № 20090665. Государственная научно-техническая программа «Лечебные и диагностические технологии», подпрограмма «Онкология».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петрович С.В., Алейникова О.В., Лапотентова Е.С., и др. Особенности заболеваемости злокачественными новообразованиями детей первого года жизни в Республике Беларусь // *Медико-биологические аспекты аварии на Чернобыльской АЭС*. — 2004. — №1 — С. 3–11. [Petrovich SV, Aleinikova OV, Lapotentova ES, et al. Osobennosti zaboлеваemosti zlokachestvennyimi novoobrazovaniyami detei pervogo goda zhizni v Respublike Belarus'. *Mediko-biologicheskie aspekty avarii na Chernobyl'skoi AES*. 2004;1:3–11. (In Russ).]
2. Мень Т.Х., Поляков В.Г., Алиев М.Д. Эпидемиология злокачественных новообразований у детей в России // *Онкопедиатрия*. — 2014. — Т.1. — №1 — С. 7–12. [Men TKh, Polyakov VG, Aliev MD. Epidemiology of childhood cancer in Russia. *Oncopediatrics*. 2014;1(1):7–12. (In Russ).]
3. Bacci G, Forni C, Longhi A, et al. Long-term outcome for patients with non-metastatic Ewing's sarcoma treated with adjuvant and neoadjuvant chemotherapies. 402 patients treated at Rizzoli between 1972 and 1992. *Eur J Cancer*. 2004;40(1):73–83. doi: 10.1016/j.ejca.2003.08.022.
4. Padhhye B, McCowage G. Chemotherapy regimens in newly diagnosed and recurrent Ewing sarcoma in children and young adults. *CancerForum*. 2010;34(3):128–134.
5. Miser JS, Goldsby RE, Chen Z, 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(7):894–900. doi: 10.1002/pbc.21233.
6. Granowetter L, Womer R, Devidas 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(15):2536–2541. doi: 10.1200/JCO.2008.19.1478.
7. Shukla N, Schiffman J, Reed D, et al. Biomarkers in Ewing sarcoma: the promise and challenge of personalized medicine. A report from the Children's

- Oncology Group. *Front Oncol.* 2013;3:141. doi: 10.3389/fonc.2013.00141.
8. Paulussen M, Craft AW, Lewis I, 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(27):4385–4393. doi: 10.1200/JCO.2008.16.5720.
 9. Scotlandi K, Remondini D, Castellani G, et al. Overcoming resistance to conventional drugs in Ewing sarcoma and identification of molecular predictors of outcome. *J Clin Oncol.* 2009;27(13):2209–2216. doi: 10.1200/JCO.2008.19.2542.
 10. Ordycey JL, Osuna D, Herrero D, et al. Advances in Ewing's sarcoma research: where are we now and what lies ahead? *Cancer Res.* 2009;69(18):7140–7150. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4041.
 11. Savitskaya TV, Kisialeu LP, Lipay NV. The mRNA expression of various angiogenesis-related genes in pediatric sarcomas and nonmalignant lesions of tissue. *Pediatr Hematol Oncol.* 2012;29(1):28–37. doi: 10.3109/08880018.2011.628366.
 12. Petrovich S, Aleinikova O, Shumikhina T. [Epidemiological aspects of childhood onco-hematological morbidity in the Republic of Belarus. (In Russ).] *Problems in oncology.* 2002;48(3):301–305.
 13. Juergens C, Weston C, Lewis I, 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(1):22–29. doi: 10.1002/pbc.20820.
 14. Oberlin O, Rey A, Desfachelles AS, 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(24):3997–4002. doi: 10.1200/JCO.2006.05.7059.
 15. Gustafsson T, Ameln H, Fischer H, et al. VEGF-A splice variants and related receptor expression in human skeletal muscle following submaximal exercise. *J Appl Physiol (1985).* 2005;98(6):2137–2146. doi: 10.1152/jap-physiol.01402.2004.
 16. Schaefer KL, Eisenacher M, Braun Y, 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(5):699–709. doi: 10.1016/j.ejca.2008.01.020.
 17. Reddy K, Cao Y, Zhou Z, 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(3):257–267. doi: 10.1007/s10456-008-9109-1.
 18. Reddy K, Zhou Z, Schadler K, et al. Bone marrow subsets differentiate into endothelial cells and pericytes contributing to Ewing's tumor vessels. *Mol Cancer Res.* 2008;6(6):929–936. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2189.
 19. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Zimnoch L, et al. Immunohistochemical localization of tissue factor pathway inhibitor-2 in human tumor tissue. *Thromb Haemost.* 2003; 90(1):140–146.
 20. DuBois S, Marina N, Glade-Bender J. Angiogenesis and vascular targeting in Ewing sarcoma: a review of pre-clinical and clinical data. *Cancer.* 2010;116(3):749–757. doi: 10.1002/cncr.24844.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Киселёв Леонид Петрович, кандидат медицинских наук, заведующий онкогематологическим отделением № 3 Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии (РНПЦ ДОГИ) Минздрава РБ

Адрес: 223053, Республика Беларусь, Минский р-н, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, д. 43,
тел.: +375 (17) 265-40-84, **e-mail:** leonslight@mail.ru, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2071-8143>

Савицкая Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией молекулярной биологии РНПЦ ДОГИ

Адрес: 223053, Республика Беларусь, Минский р-н, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, д. 43,
e-mail: t.savitskaia@mail.ru, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-0761-5254>

Алейникова Ольга Витальевна, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси, директор РНПЦ ДОГИ

Адрес: 223053, Республика Беларусь, Минский р-н, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, д. 43,
e-mail: aleinikova2004@mail.ru, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-0143-1921>