

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ
И МЕДИЦИНСКОЙ РАДИОЛОГИИ ИМ. Н.Н. АЛЕКСАНДРОВА»

УДК 616-006.83:577.29] (476)

КИСЕЛЕВ
Леонид Петрович

**ОПУХОЛИ СЕМЕЙСТВА САРКОМЫ ЮИНГА:
ДИАГНОСТИКА, ПРОГНОЗИРОВАНИЕ И ЛЕЧЕНИЕ
С УЧЕТОМ МОЛЕКУЛЯРНОГО ПРОФИЛЯ
НОВООБРАЗОВАНИЯ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук
по специальности 14.01.12 – онкология

Минск, 2019

Научная работа выполнена в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

Научный консультант:

Алейникова Ольга Витальевна, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси, директор государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

Официальные оппоненты:

Портянко Анна Сергеевна, доктор медицинских наук, доцент, заведующая Республиканской молекулярно-генетической лабораторией канцерогенеза государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

Литвинова Татьяна Михайловна, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры онкологии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Карачунский Александр Исаакович, доктор медицинских наук, профессор, директор института онкологии, радиологии и ядерной медицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева»

Оппонирующая организация:

Учреждение образования «Витебский государственный орден Дружбы народов медицинский университет»

Защита состоится 12 июня 2019 г. в 14 ч. на заседании совета по защите диссертаций Д 03.12.01 при государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» (223040, Минский р-н, агр. Лесной, e-mail: N.Artemova@omr.by, тел. +375173899561).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова».

Автореферат разослан «19» апреля 2019 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций
доктор медицинских наук, доцент

Н.А. Артемова

ВВЕДЕНИЕ

Саркома Юинга (СЮ) является второй по частоте встречаемости злокачественной опухолью костной ткани у детей [Алейникова О.В. с соавт. 2000; Суконко О.Г. с соавт., 2011; Жаврид Э.А. с соавт., 2011; Gaspar N. et al., 2015; Lawlor E.R. et al., 2015]. Локализованные (неметастатические) формы составляют до 70%, частота встречаемости случаев с метастазами (легкие, кости, костный мозг, лимфатические узлы) – около одной трети [Ferrari A. et al., 2016; Kovar H. et al., 2016]. Примитивная нэйроэктодермальная опухоль (ПНЭО) отличается от классической СЮ (КСЮ) наличием маркеров нейрональной дифференцировки (протеинов нейрофиломента, нейрон-специфической енолазы, синаптофизина, экспрессии CD57, S100). После обнаружения общих генетических транслокаций, связанных с 22-й хромосомой, эти нозологии рассматриваются как общая группа – опухоли семейства саркомы Юинга (ОССЮ) [Gaspar N. et al., 2015; Mascarenhas L. et al., 2016]. Однако до сегодняшнего дня ряд авторов ассоциируют морфологию ПНЭО с худшим клиническим исходом, и для терапии пациентов с этими новообразованиями используются как протоколы, разработанные для мягкотканых сарком (обычно, рабдоидного генеза), так и системная терапия КСЮ, соответственно, оптимальная стратегия лечения не определена по настоящее время [Miser J. et al., 2007; Mascarenhas L. et al., 2016; Merchant M.S. et al., 2016].

Результаты лечения ОССЮ остаются практически неизменными (с выживаемостью 60-65% для локализованных и 15-25% для метастатических форм) на протяжении последних десятилетий, несмотря на использование всего спектра современных достижений в системной терапии, хирургии, лучевой терапии и сопроводительном лечении заболевания [Womer R. et al., 2007; Paulussen M. et al., 2007; Heinen T.E. et al., 2016; Cash T. et al., 2016]. Можно констатировать, что стандартные подходы в терапии ОССЮ достигли пределов эффективности, однако, новые лекарственные агенты постоянно вводятся в клиническую практику, и их инкорпорация в актуальные схемы системного лечения представляется многообещающей [Uyeturk U. et al., 2016; Goedhart L.M. et al., 2016]. Большинство (около 2/3 случаев) ОССЮ представлены локализованными формами и у 40% пациентов из этой когорты развивается рецидив заболевания [Elzi D.J. et al., 2015; Kim S.K. et al., 2016; Livingston J.A. et al., 2016]. Прогнозирование неблагоприятного клинического исхода на этапе инициальной диагностики с целью интенсификации терапии именно таким пациентам представляется актуальной задачей, решение которой позволит улучшить результаты лечения ОССЮ.

Традиционно, для попытки стратификации пациентов на группы риска использовались такие клинические маркеры, как пол, возраст, уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ), размер и локализация новообразования и др. Однако в контексте большинства современных исследований, этот подход остается

дискутабельным, вследствие того, что ожидаемые результаты не достигнуты из-за значительной вариабельности клинических проявлений патологии [Lee J. et al., 2010; Albergo J.I. et al., 2016; Molina-Ruiz A. et al., 2016; Kaatsch P. et al., 2016].

Персонализацию терапевтического плана связывают с новыми технологиями прогнозирования, ассоциирующимися с пониманием биологии опухоли и поиском молекулярных маркеров, характеризующих жизнедеятельность и поведение новообразования. В качестве перспективных молекулярных маркеров при ОССЮ рассматривается микросомальная глутатион-S-трансфераза (обеспечивает детоксикацию опухолевых клеток), рецепторы инсулиноподобного фактора роста (контролируют энергетический обмен опухоли), а также маркеры, ассоциированные с ангиогенезом (АГ), процессом образования новой патологической сосудистой сети, который является критически важным для развития новообразования и в тоже время представляет мишень для терапевтического воздействия [Shukla N. et al., 2013; Aggerholm-Pedersen N. et al., 2016; Mathias M.D. et al., 2016; Goss K.L. et al., 2016; Vanden H. et al., 2016].

Разработка и клиническое использование новых технологий молекулярной диагностики и прогнозирования для персонализированной коррекции терапевтического воздействия ассоциируется с дальнейшим прогрессом в curaции пациентов, страдающих ОССЮ.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016-2020 годы (Указ Президента Республики Беларусь от 22.04.2015 № 166, раздел 4 «Медицина, фармация, медицинская техника: технологии профилактики, диагностики и лечения заболеваний»), а также приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2011-2015 гг., отраженному в пункте 4.2 «Новые технологии профилактики, диагностики, лечения и реабилитации сердечно-сосудистых, онкологических и других социально значимых заболеваний» Постановления Совета Министров Республики Беларусь от 19 апреля 2010 г. № 585.

Работа выполнена в рамках заданий, осуществленных на базе ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»:

1. «Разработать и внедрить комплексный метод диагностики ангиогенеза у детей с солидными опухолями для назначения таргетной терапии» Государственной научно-технической программы «Лечебные и диагностические технологии», подпрограмма «Онкология», номер госрегистрации 20091665 (2009-2011 гг.).

2. «Разработать и внедрить комплексный метод раннего распознавания прогностически неблагоприятных форм сарком костной ткани для усиления терапии на основании индивидуальных биологических характеристик опухолевого процесса» Государственной научно-технической программы «Новые технологии диагностики, лечения и профилактики», подпрограмма «Онкология», номер госрегистрации 20130969 (2013-2017 гг.).

Цель и задачи исследования

Цель исследования: повысить эффективность лечения пациентов, страдающих опухолями семейства саркомы Юинга путем применения антиангиогенной терапии при прогнозировании развития рецидива заболевания на основании молекулярных маркеров ангиогенеза.

Задачи исследования:

1. На основании отдаленных результатов лечения пациентов, страдающих ОССЮ, установить прогностическое значение морфологии опухоли (КСЮ или ПНЭО), распространенности процесса и вариантов использованной системной терапии.

2. Оценить прогностическое значение классических клинко-патологических характеристик (пол, возраст, уровень ЛДГ, размер и локализация новообразования, вид системной терапии, вариант локального контроля и др.) пациентов, страдающих ОССЮ, в зависимости от клинических исходов заболевания за 15-летний период наблюдения.

3. Установить уровни экспрессии генов рецепторов инсулиноподобного фактора роста в ткани новообразования у пациентов, страдающих саркомами костей и мягких тканей, в зависимости от нозологии, распространенности процесса и клинического исхода заболевания.

4. Охарактеризовать экспрессию генов микросомальной глутатион-S-трансферазы в ткани новообразования у пациентов с саркомами, в зависимости от нозологии, распространенности процесса и клинического исхода заболевания.

5. Выявить молекулярные маркеры АГ с максимальной клинической значимостью для стратификации пациентов с локализованными формами ОССЮ на группы благоприятного и неблагоприятного исхода заболевания перед началом системной терапии.

6. Изучить результаты лечения пациентов с локализованными формами ОССЮ при прогнозировании благоприятного исхода заболевания на основании молекулярных маркеров АГ в ткани опухоли.

7. Оценить отдаленные результаты персонализированного использования антиангиогенной терапии для пациентов, страдающих

локализованными формами ОССЮ, при раннем прогнозировании рецидива заболевания на основании молекулярных маркеров АГ в ткани опухоли.

Научная новизна

По результатам сравнительного анализа долгосрочных результатов лечения пациентов Республики Беларусь, страдающих ОССЮ, констатировано отсутствие значимой разницы в показателях выживаемости у пациентов с ПНЭО по сравнению с КСЮ. Продемонстрирована невысокая результативность использования классических клиничко-патологических характеристик (пол, возраст, уровень ЛДГ, размер и локализация новообразования, вид системной терапии (до 2011 г.), способ локального контроля и др.) в качестве прогностических маркеров клинического исхода заболевания для пациентов, страдающих ОССЮ, при сравнительном анализе за 15-летний период наблюдения.

Изучена клиническая значимость экспрессии широкого спектра генов, включая VEGFA165, VEGFA121, VEGFA189, VEGFC, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, TF, TFPI-1, TFPI-2, HIF-1 α , PAI-1, uPA, MGST1, GSTM4, IGF1R, IGF2R для пациентов, страдающими саркомами костей и мягких тканей и установлено прогностическое значение экспрессии гена MGST1 для пациентов с ОССЮ, а также значимость активности генов MGST1 и GSTM4 при дифференциальной диагностике сарком.

Впервые разработан способ прогнозирования развития рецидива заболевания у пациентов с локализованными формами ОССЮ на основании экспрессии молекулярных маркеров АГ (TFPI-2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189) в ткани новообразования на этапе первичной диагностики (патент № 18697 от 30.06.2013).

Впервые доказана эффективность персонализированного использования антиангиогенной терапии для пациентов, страдающих локализованными формами ОССЮ, при раннем прогнозировании развития рецидива заболевания на основании экспрессии молекулярных маркеров АГ в ткани опухоли.

Положения, выносимые на защиту

1. Отдаленные результаты лечения пациентов с ОССЮ в Республике Беларусь соответствуют международным стандартам с 15-летней общей выживаемостью (ОВ) $52,8 \pm 4,5\%$ для всей когорты, $67,0 \pm 4,7\%$ для локализованных и $19,9 \pm 6,0\%$ для метастатических форм. У пациентов, страдающих локализованными формами ПНЭО результаты лечения в зависимости от вида системной терапии статистически значимо не различаются ($p=0,1034$) с тенденцией к лучшим показателям выживаемости при использовании протоколов

системной терапии КСЮ (15-летняя БСВ=62,8±9,4%) по сравнению с протоколами рабдоидных опухолей (15-летняя БСВ=50,0±13,4%).

2. Гиперэкспрессия гена MGST1 свидетельствует о худшем клиническом исходе заболевания у пациентов, страдающих локализованными формами ОССЮ. Показатель 7-летней БСВ пациентов с низким ($\leq 0,25$) уровнем экспрессии гена MGST1 составил 93,4±7,6%, для случаев с высокой ($> 0,25$) экспрессией, значение показателя БСВ было 48,3±13,4% ($p=0,0107$). Уровни экспрессии генов GSTM4, IGF1R и IGF2R при локализованных формах ОССЮ прогностического значения не демонстрируют.

3. Ткани сарком костей и мягких тканей характеризуются значимо большими уровнями экспрессии генов VEGFA121 ($p=0,0166$), VEGFA165 ($p=0,0228$), VEGFA189 ($p=0,0228$) и соотношения VEGFA165/VEGFA189 ($p=0,0166$), в то время как экспрессия генов VEGFC ($p=0,0006$), VEGFR-1 ($p=0,0009$), VEGFR-2 ($p=0,0011$), VEGFR-3 ($p=0,0004$), HIF-1 α ($p=0,0002$) и uPA ($p=0,0006$), TFPI-1 ($p=0,0003$), TFPI-2 ($p=0,0004$) является прерогативой иной (незлокачественной) патологии. Концентрации растворимых форм маркеров АГ sVEGFR1, sVEGFR2, VEGFA165 и VEGFC в плазме и сыворотке крови пациентов с саркомами и иной патологией статистически значимого отличия ($p>0,05$) не демонстрируют.

4. Разработанный способ прогнозирования развития рецидива на основании уровня экспрессии маркеров АГ в ткани опухоли на этапе первичной диагностики является основанием для интенсификации терапии, поскольку при экспрессии гена TFPI-2 ($< 0,8$) и соотношении изоформ VEGFA165/VEGFA189 ($< 1,0$) показатели 5-летней БСВ при локализованных формах ОССЮ статистически значимо меньше (27,2±10,6% vs 89,4±10,6%; $p=0,0119$).

5. Антиангиогенная терапия показана для случаев с высоким риском развития рецидива, спрогнозированном на основании уровня экспрессии молекулярных маркеров АГ в ткани опухоли, так как использование разработанного нового способа прогнозирования и лечения позволяет увеличить 5-летнюю БСВ пациентов, страдающих локализованными формами ОССЮ, на 22,7% ($p=0,0450$), 5-летнюю ОВ на 19,6% ($p=0,0469$).

Личный вклад соискателя ученой степени

Автором лично обоснована целесообразность проведения исследования, выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы, определены состояние проблемы и круг нерешенных вопросов. Совместно с научным консультантом сформулированы цели, задачи, объект и предмет исследования. Соискателем проведен анализ медицинских карт амбулаторного и стационарного пациента с формированием компьютерной базы данных и ее эксплуатация. Автор проводил от-

бор, обследование и лечение пациентов, вел динамическое наблюдение. Автор самостоятельно сформировал банк биологических тканей, вел их учет. Исследование уровня экспрессии мРНК изученных генов АГ у обследованных пациентов выполнено совместно с зав. лабораторией молекулярной биологии ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии» к.б.н. Т.В. Савицкой. Автором подобраны пациенты и обработаны полученные результаты. Методическое решение исследования, статистическая обработка результатов, интерпретация полученных данных с формулированием выносимых на защиту научных положений, заключения, содержащего выводы и практические рекомендации, также сделаны соискателем лично. Автор являлся ответственным исполнителем тем НИР, в рамках которых выполнено настоящее исследование. Соискатель осуществил внедрение разработанных методик в практику. В 90% публикаций выступал первым автором.

Апробация результатов диссертации

Материалы и основные положения диссертации доложены на следующих международных и республиканских съездах, симпозиумах, конференциях: IV Съезд онкологов Беларуси 3-5 ноября 2011 г. (г. Минск, Беларусь), VII Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии 5-7 сентября 2012 г. (г. Астана, Казахстан), V Межрегиональное совещание НОДГО «Достижения и перспективы детской гематологии-онкологии» 3-6 июня 2014 г. (г. Москва, Российская Федерация), VIII Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии 16-18 сентября 2014 г. (г. Казань, Российская Федерация), 42-й Конгресс международного общества онкологии и биомаркеров «Онкология в эру биомаркеров: Биология-Диагностика-Терапия» 3-7 октября 2015 г. (Закопане, Польша), XII международная конференция «Актуальные проблемы детской онкологии, гематологии и иммунологии» 23 октября 2015 г. (г. Минск, Беларусь), республиканская научно-практическая конференция с международным участием «Диагностика и лечение опухолей опорно-двигательного аппарата и кожи» 30 марта 2016 г. (г. Минск, Беларусь), 10-й Конгресс Азиатского подразделения Международного общества детской онкологии (SIOP Asia) 25-28 мая 2016 г. (г. Москва, Российская Федерация), IX Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии 15-17 июня 2016 г. (г. Минск, Беларусь), практический семинар «Актуальные вопросы и перспективы организации медицинской помощи пациентам Минской области с онкологическими и гематологическими заболеваниями» 24 мая 2017 г. (г. Минск, Беларусь), XIV международная конференция «Актуальные проблемы детской онкологии, гематологии и иммунологии» 12-13 октября 2017 г. (г. Минск, Беларусь), IX Межрегиональное совещание НОДГО «Перспективы детской гематологии-онкологии: мультидисциплинарный подход – 2018» 26-28 апреля 2018 г. (г. Санкт-Петербург, Российская Федерация).

Разработанные методы прогнозирования внедрены в практику в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», онкогематологическом отделении Могилевской областной детской больницы, государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», используются в клинических протоколах диагностики и лечения, разработанных по заданию Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Опубликование результатов диссертации

По материалам диссертации опубликованы 43 научные работы, в том числе 30 статей в журналах, рекомендованных ВАК для публикаций диссертационных исследований, составляющих 21,6 авторских листа (из них - 8 публикаций в странах СНГ и 1 в США), 10 тезисов докладов международных научных конференций. Без соавторов опубликовано 6 статей в журналах, включенных в перечень ВАК. Получен 1 патент на изобретение. Разработаны и утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь 2 инструкции по применению, по которым получено 8 актов внедрения.

Структура и объем диссертации

Диссертация представлена на 206 страницах текста и иллюстрирована 28 таблицами и 50 рисунками. Работа изложена на русском языке и состоит из введения, общей характеристики, обзора литературы, описания материала и методов исследования, пяти глав с изложением результатов собственных исследований, заключения и указателя использованной литературы. Библиографический список включает 338 источников, в том числе 43 собственные публикации соискателя.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В исследовании были использованы данные Детского суб-канцер регистра, в котором зарегистрированы пациенты ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», который является единственным учреждением для лечения детей и подростков с саркомами костей и мягких тканей в Республике Беларусь. Для постановки диагноза использовался гистологический, иммуногистохимический и молекулярно-биологический методы. Группу пациентов, пролеченных с 1999 по 2014 гг. составил 161 пациент с

ОССЮ. Половозрастные характеристики пациентов с ОССЮ в зависимости от морфологии процесса, пролеченных с 1999 по 2014 гг., представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Половозрастные характеристики пациентов с ОССЮ в зависимости от морфологии процесса

Характеристики	Морфология		
	ОССЮ (N=161) N (%)	КСЮ (N=108) N (%)	ПНЭО(N=108) N n (%)
Мужской пол	80 (49,7%)	55 (50,1%)	25 (47,2%)
Женский пол	81 (50,3%)	53 (49,9%)	28 (52,8%)
Медиана возраста, годы (мин – макс)	13,4 (0,27 – 22,36)	12,94 (0,28 – 19,81)	12,36 (0,27 – 22,36)

Пациентам осуществлялась системная полихимиотерапия и локальный контроль (операция, операция + лучевая терапия, только лучевая терапия). Системная терапия проводилась согласно 5 режимам (N – число пациентов, пролеченных согласно описанному режиму).

- Режим А. Полихимиотерапия осуществлялась по протоколу мягкотканых опухолей рабдоидного генеза: использовались винкристин, доксорубин, алкилирующие агенты, этопозид, препараты платины; N=20.

- Режим В. Полихимиотерапия базировалась на рекомендациях Европейского общества онкологов после 1992 г.: использовались винкристин, доксорубин, дактиномицин, этопозид, а также алкилирующие агенты ифосфамид и циклофосфамид в режиме рандомизации; N=8.

- Режим С. Индукционная схема соответствовала рекомендациям Американского общества детских онкологов для КСЮ и подразумевала проведение в альтернирующем режиме блоков винкристин / доксорубин / циклофосфамид и этопозид / ифосфамид. Консолидирующая терапия режима С проводилась посредством высоких доз бусульфана и мелфалана с поддержкой периферической стволовой клеткой; N=61.

- Режим Д. Полихимиотерапия базировалась на рекомендациях Европейского общества онкологов после 1999 г.: индукционные блоки были четырехкомпонентными (винкристин, доксорубин, ифосфамид и этопозид), консолидирующая терапия была трехкомпонентной (винкристин, ифосфамид, актиномицин Д); N=38.

- Режим Е: для отобранных на основании молекулярных маркеров АГ пациентов с локализованными формами ОССЮ наряду с четырехкомпонентной

индукцией и трехкомпонентной консолидацией (как описано при режиме D), применялась блокада АГ лекарственным средством бевацизумаб (7,5 мг/кг внутривенно в день 1 каждого курса полихимиотерапии); N=29.

Объектом исследования были результаты диагностики, а также комбинированного, комплексного и многокомпонентного лечения пациентов, страдающих саркомами костей и мягких тканей. Основными оцениваемыми результатами терапии определены показатели бессобытийной выживаемости (БСВ), общей выживаемости (ОВ) и кумулятивной частоты рецидива (КЧР).

Предметом исследования послужили плазма, сыворотка крови и ткань новообразования пациентов с саркомами костей и мягких тканей, а также пациентов с иной (незлокачественной) патологией, практически здоровых детей и взрослых.

Основу настоящей работы составили исследования результатов терапии и изучения клинической значимости молекулярных маркеров. Данные о количестве пациентов в зависимости от вида исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Число пациентов в зависимости от вида исследования

Вид исследования	N
Ретроспективное сравнение отдаленных результатов терапии и прогностической роли клинико-патологических характеристик пациентов с ОССЮ (1999-2014 гг.)	161
Ретроспективное исследование результатов лечения пациентов, страдающих локализованными формами ОССЮ (1999-2010 гг.)	94
Проспективное исследование локализованных форм ОССЮ с антиангиогенной терапией на основании уровня экспрессии маркеров АГ (2011-2016 гг.)	29
Исследование концентрации маркеров АГ в плазме и сыворотке крови (2004-2010 гг.)*	88
Исследование экспрессии маркеров АГ в ткани сарком (2004-2010 гг.)**	62
Исследование прогностической роли маркеров АГ при ОССЮ (2004-2010 гг.)	25
Исследование экспрессии рецепторов инсулиноподобного фактора роста и микросомальной глутатион-S-трансферазы в ткани сарком (2006-2015 гг.)***	73
Исследование сравнительной эффективности персонализированного использования антиангиогенной терапии при локализованных формах ОССЮ (1999-2016 гг.)****	123

* – включая саркомы (N=32); иную патологию (N=20); практически здоровых детей (N=23); практически здоровых взрослых (N=13);

** – включая саркомы (N=39); незлокачественную патологию (N=23);

*** – включая пациентов с ОССЮ (N=38), пациентов с остеосаркомой (N=25);

**** – включая пациентов ретроспективной (N=94) и проспективной (N=29) групп.

Как представлено в таблице 2, суммарно в работу включены данные о 260 индивидуумах: 201 пациент с саркомами (169 с ОССЮ, 25 с остеосаркомой (ОС), 7 с рабдомиосаркомами); 23 пациента с иной (незлокачественной) патологией (5

пациентов с доброкачественными образованиями кости – остеод-остеома (2 случая), остеобластокластома, остеобластома, хондрома, у 3 – фиброзная дисплазия кости, у 1 – аневризмальная киста, у 6 – посттравматические изменения, у 5 – остеомиелит, у 1 – гранулематозное воспаление, у 1 – фиброматоз мягких тканей, у 1 – оссифицирующий миозит бедра); 23 случая – практически здоровые дети, у которых онкопатология исключена на этапе клинко-лабораторной диагностики; 13 случаев – практически здоровые взрослые, которые проходили ежегодное поликлиническое обследование в условиях Центра детской онкологии, гематологии и иммунологии.

Методы определения уровня экспрессии мРНК исследуемых генов в биологическом материале пациентов

Исследуемым материалом послужили плазма, сыворотка периферической крови и ткань новообразований.

Экспрессия 18 генов была исследована в оригинальных образцах тканей новообразований: VEGFA (включая изоформы VEGFA121, VEGFA165 и VEGFA189), VEGFC, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, HIF-1 α , TF, TFPI-1, TFPI-2, uPA, PAI-1, MGST1, GSTM4, IGF1R, IGF2R.

Выделение РНК и синтез кДНК

РНК из образцов исследуемых тканей выделялась с использованием метода фенольной экстракции. Количественные показатели концентрации РНК оценивались посредством спектрофотометрии. Методом обратной транскрипции выделенную РНК (1-4 мкг) конвертировали в комплементарную цепь ДНК с использованием случайных праймеров и обратной транскриптазы MMLV (Invitrogen, США).

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (РТ-ПЦР) проводилась в 10-мкл реакционной смеси TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technology) в соответствии с протоколом производителя и с помощью оборудования Icycler (Bio-Rad, Hercules, США). Для определения относительной количественной экспрессии генов использовали метод построения относительной стандартной кривой и метод $\Delta\Delta Ct$.

Количественное определение уровней циркулирующих факторов в плазме и сыворотке крови осуществлялось посредством метода построения стандартной калибровочной кривой, согласно прилагаемой инструкции.

Статистический анализ

Анализ количественных показателей включал расчет основных показателей описательной статистики: медиана, 25%-75% процентиля, минимум, максимум. Для подтверждения гипотезы о наличии статистических различий между двумя независимыми выборками применялся непараметрический критерий Манна-

Уитни (Mann-Whitney U-test). Для сравнения категориальных данных в группах применялся критерий χ^2 . При графическом представлении квантильно-медианного распределения количественных данных использовалась диаграмма размаха ("ящик с усами"). Горизонтальные линии диаграммы размаха представляют собой (снизу в верх): минимум, 25%-ый процентиль, медиана, 75%-ый процентиль, максимум. Выживаемость пациентов рассчитывалась методом Каплан-Маера (Kaplan-Meier); статистическая значимость различий в выживаемости считалась с помощью теста log-rank. Кумулятивная частота возникновения рецидивов рассчитывалась методом конкурирующих рисков, статистические различия кумулятивных частот оценивались с использованием критерия Gray. Все статистические различия считались значимыми при $p < 0,05$. Значимость классификации исходов оценивалась с помощью ROC-анализа, классификация считалась значимой при AUC (площадь под кривой) более 0,8. Для расчетов использовалось программное обеспечение «R-statistics» версия 3.2.0, R Foundation for Statistical Computing, лицензия GNU GPL.

Результаты собственных исследований

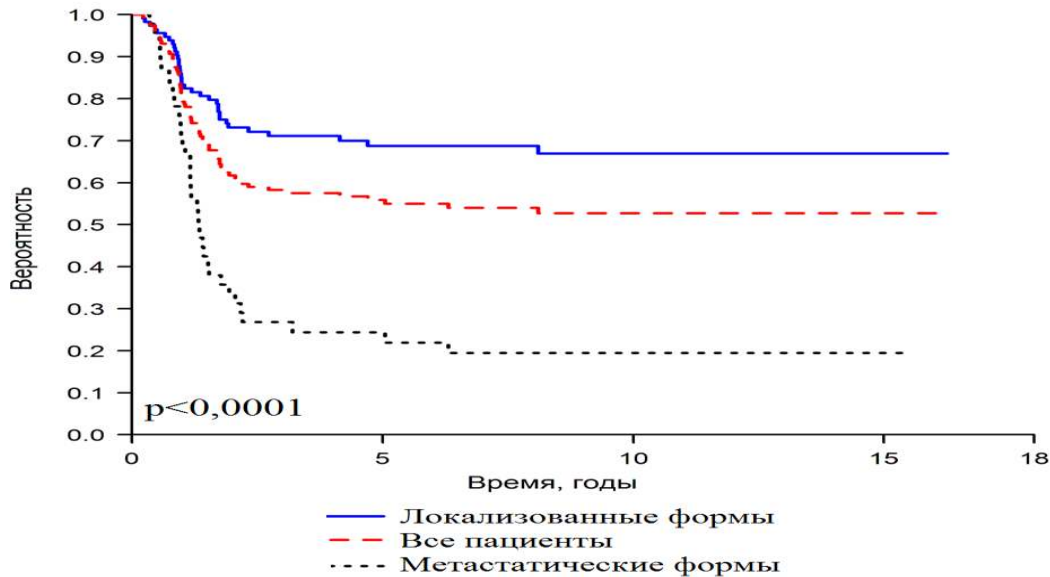
Сравнительный анализ долгосрочных результатов терапии пациентов с ОССЮ

Наблюдаемая 15-летняя БСВ пациентов с ПНЭО оказалась равной $50,4 \pm 7,1\%$, для случаев с метастатическими и локализованными формами показатели составили $20,0 \pm 12,7\%$ и $57,9 \pm 7,9\%$, соответственно.

ОВ за соответствующий временной период была несколько выше – $60,2 \pm 7,0\%$ ($20,0 \pm 12,7\%$ для метастатических; $70,3 \pm 7,2\%$ – для локализованных форм). КЧР пациентов с ПНЭО составила $43,8 \pm 7,2\%$ ($70,0 \pm 8,1\%$ для метастатических; $37,4 \pm 7,9\%$ – для локализованных форм). Для КСЮ наблюдаемая 15-летняя БСВ пациентов оказалась $49,2 \pm 5,1\%$, для случаев с наличием отдаленного метастазирования она составила $19,5 \pm 6,9\%$. При отсутствии отдаленных метастазов БСВ была $64,5 \pm 6,0\%$. Показатель ОВ при КСЮ составил – $49,5 \pm 5,3\%$ ($19,7 \pm 6,8\%$ для метастатических; $64,8 \pm 6,0\%$ – для локализованных форм). КЧР пациентов с КСЮ составила $45,2 \pm 5,0\%$ ($68,6 \pm 8,1\%$ для метастатических; $33,9 \pm 6,0\%$ – для локализованных форм).

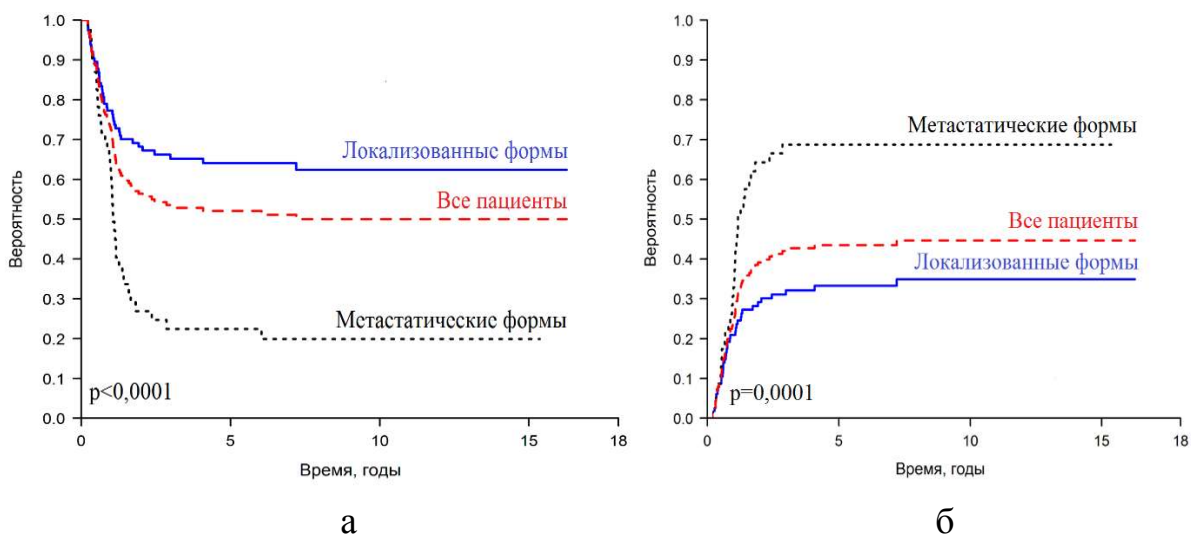
Таким образом, морфологический диагноз ПНЭО не явился фактором худшего прогноза заболевания. Показатели БСВ, ОВ и КЧР при КСЮ были $49,2 \pm 5,1\%$, $49,5 \pm 5,3\%$ и $45,2 \pm 5,0\%$. У пациентов, страдающих ПНЭО они оказались несколько выше и составили $50,4 \pm 7,1\%$, $60,2 \pm 7,0\%$ и $43,8 \pm 7,2\%$, соответственно. Это послужило основанием для дальнейшего анализа объединенной (КСЮ и ПНЭО) когорты ОССЮ.

Для пациентов с ОССЮ наблюдаемая 15-летняя ОВ пациентов оказалась равной $52,8 \pm 4,5\%$, для случаев с наличием и отсутствием отдаленных метастазов она была $19,9 \pm 6,0\%$ и $67,0 \pm 4,7\%$ ($p < 0,0001$) соответственно (рисунок 1).



**Рисунок 1. – ОВ пациентов с ОССЮ
в зависимости от распространенности процесса**

БСВ пациентов с ОССЮ (рисунок 2а) была $50,1 \pm 4,1\%$, для пациентов с метастатическими и локализованными формами она составила $19,9 \pm 6,0\%$ и $62,5 \pm 4,7\%$ ($p < 0,0001$). КЧР (рисунок 2б) была $44,7 \pm 4,1\%$, для пациентов с метастатическими и локализованными формами она составила $68,8 \pm 7,1\%$ и $34,9 \pm 4,7\%$ ($p = 0,0001$), соответственно.



**Рисунок 2. – БСВ (а) и КЧР (б) пациентов с ОССЮ в зависимости от
распространенности процесса**

Проведен сравнительный анализ результатов лечения пациентов с локализованными формами ПНЭО в зависимости от вида использованной системной терапии. Показатели БСВ и ОВ для лечившихся по протоколам рабдоидных опухолей составили $50,0 \pm 13,4\%$ и $64,3 \pm 12,8\%$, для пациентов, получавших системную терапию по протоколам КСЮ они оказались выше: $62,8 \pm 9,4\%$ ($p=0,1034$) и $72,9 \pm 8,8\%$ ($p=0,9362$). Разница в показателях была статистически не значима.

Анализ результатов лечения за 15-летний период свидетельствует, что уровень достигнутых в РБ долгосрочных показателей выживаемости для пациентов с ОССЮ соответствует мировым стандартам. Около трети пациентов с локализованными и большинство с метастатическими формами заболевания имеют резистентность к системной терапии и требуют поиска новых подходов для своевременной диагностики и коррекции терапевтического плана. При проведении системного лечения по протоколам КСЮ для пациентов с локализованными формами ПНЭО имеет место тенденция к лучшим показателям выживаемости.

Прогностическое значение клинико-патологических характеристик пациентов с ОССЮ

С целью анализа прогностической значимости, изучены клинико-патологические характеристики 112 пациентов с локализованными формами ОССЮ в зависимости от исхода заболевания: 38 (33,9%) случаев с рецидивом и 74 (66,1%) - находившихся в ремиссии (таблица 3).

Таблица 3. – Клинико-патологические характеристики пациентов с локализованными формами ОССЮ

Характеристики	Статус пациентов				P
	пациенты с рецидивом N=38		пациенты без рецидива N=74		
	N	%	N	%	
<i>Пол</i>					
Мужской	21	55,3	30	40,5	0,1385
Женский	17	44,7	44	59,5	
<i>Возраст, годы</i>					
≤ 14	24	63,2	45	61,9	0,8089
> 14	14	36,8	29	39,1	
ЛДГ, ед/мл медиана (мин.-макс.)	427 (166-732)	-	474 (311-733)		0,3423
<i>Анатомическая локализация</i>					
Бедро	7	18,2	12	15,6	0,7685
Большеберцовая кость	4	10,4	10	13,0	0,6508
Малоберцовая кость	3	7,8	0	0	0,0143
Стопа	2	5,2	2	2,6	0,4894
Ключица	0	0	2	2,6	0,3065

Продолжение таблицы 3

Лопатка	1	2,6	1	1,3	0,6281
Ребро	8	21,2	16	24,6	0,9446
Плечо	1	2,6	7	9,1	0,1840
Предплечье	2	5,2	0	0	0,0464
Кисть	0	0	1	1,3	0,4716
Череп	5	8,6	3	3,9	0,0765
Позвонки	3	7,8	9	11,7	0,4893
Газ	2	5,2	11	14,3	0,1331
<i>Гистология</i>					
Классическая СЮ	23	60,5	48	64,9	0,6518
ПНЭО	15	39,5	26	35,1	
Размер опухоли, см медиана (мин.-макс.)	6,7 (2,3-17,2)	-	5,8 (3,4-18,6)	-	0,9697
Объем опухоли, мл медиана (мин.-макс.)	125 (25-430)	-	145 (37-330)	-	0,4547
<i>Операция</i>					
Широкая резекция	12	31,6	26	34,1	0,7066
Частичная резекция	8	21,1	17	20,1	0,8172
Не выполнялась	18	47,3	31	45,8	0,5801
<i>Локальный контроль</i>					
Только операция	15	39,5	26	35,1	0,6518
Операция и облучение	9	23,7	19	25,7	0,8177
Только облучение	14	36,8	29	39,2	0,8089
<i>Гистологический ответ</i>					
Некроз $\geq 90\%$	7	53,9	26	76,5	0,0662
Некроз $< 90\%$	6	46,1	8	23,5	
<i>Режим химиотерапии</i>					
Режим А	7	18,4	7	9,5	0,1745
Режим В	3	7,9	3	4,1	0,3927
Режим С	13	34,2	19	25,7	0,3438
Режим D	11	28,7	26	35,0	0,8177
Режим E	4	10,8	19	25,7	0,0319

Согласно полученным результатам, отмечена статистическая значимость ($p=0,0319$), свидетельствующая об эффективности режима системной терапии E. Обращает на себя внимание факт того, что у всех пациентов с поражением мало-берцовой кости констатирован возврат заболевания ($p=0,0143$). Данный результат нами отмечен, как требующий дальнейшего наблюдения. Для остальных проанализированных признаков статистически значимых отличий констатировано не было. Мужской пол несколько преобладал в группе рецидивов (55,3% vs 40,5%), однако относительные значения количества пациентов старшей возрастной группы были практически идентичными (36,8% vs 39,1%). Уровень ЛДГ, наряду с размерами опухолевого очага варьировали в широких диапазонах как в группе рецидивов, так и у пациентов в ремиссии и значимо не отличались при оценке медианных значений. Наиболее частой локализацией (около половины случаев) в обеих группах были конечности. Тазовое расположение при локализованных фор-

мах чаще встречалось у пациентов, находящихся в ремиссии. Анализируя этап локального контроля можно отметить, что практически идентичными были относительные значения таких показателей как процент широких резекций опухоли и использования только лучевой терапии в качестве местного лечения. Отмечен большой удельный вес случаев применения протоколов для мягкотканых рабдоидных опухолей в группе с неблагоприятными исходами заболевания. Для этой же группы констатирован меньший процент случаев с выраженным патоморфозом опухоли ($\geq 90\%$). Морфологический диагноз КСЮ и ПНЭО встречался в сопоставимом числе случаев и составил 39,5% и 35,1% в сравниваемых группах. По результатам анализа клинико-патологических характеристик пациентов за 15-летний период, продемонстрировано, что такие показатели как пол ($p=0,1385$), возраст ($p=0,8089$), объем опухоли ($p=0,4547$), уровень ЛДГ ($p=0,3423$), вид локального контроля ($p=0,8177$) не показали статистически значимых отличий в зависимости от клинического исхода заболевания.

Наличие отдаленных метастазов остается неоспоримым фактором плохого клинического исхода заболевания и эта ситуация практически неизменна в течение нескольких десятилетий курации пациентов с ОССЮ. Возраст старше 14 лет и морфология КСЮ характеризовали группу крайне неблагоприятного прогноза для пациентов с наличием отдаленных метастазов. У всех (100%) пациентов в этой когорте констатирован рецидив заболевания, приведший к летальному исходу (выживаемость=0%). В группе пациентов с ремиссией большинство (60,0%) оказалось с изолированными метастазами в легких, что свидетельствовало о несколько лучшем прогнозе выживаемости для этой когорты по сравнению с наличием метастазов других локализаций.

По результатам анализа клинических исходов пациентов с ОССЮ за 15-летний период наблюдения можно сделать вывод, что классические клинико-патологические характеристики (пол, возраст, уровень ЛДГ, размер и локализация новообразования и др.) демонстрировали широкий разброс параметров и схожие медианные значения, что не позволило прогнозировать резистентность к системной терапии и развитие рецидива заболевания.

Около трети пациентов с локализованными и большинство с метастатическими формами заболевания показали невысокую чувствительность к стандартной системной терапии, что подразумевает поиск новых маркеров для своевременного предсказания факта развития рецидива и коррекции терапевтического плана. Поскольку новые препараты постоянно вводятся в практику, важным является выделение когорт пациентов, для которых терапевтическая коррекция будет максимально рациональной.

В этой связи, изучение молекулярно-биологических аспектов опухолевого процесса рассматривается как наиболее перспективное направление для поиска новых прогностических маркеров.

Активность генов семейства глутатион-S-трансферазы и рецепторов инсулиноподобного фактора роста в ткани новообразования у пациентов с саркомами

У пациентов с саркомами костей и мягких тканей (ОССЮ и ОС) проанализированы значения экспрессии генов MGST1, GSTM4, IGF1R и IGF2R в зависимости от нозологии, наличия отдаленных метастазов, а также клинического исхода заболевания.

По результатам исследования установлен более чем на порядок значимо ($p < 0,0001$) низкий уровень экспрессии исследуемых генов семейства глутатион-S-трансферазы при ОС (0,09 для MGST1; 0,53 для GSTM4) по сравнению с ОССЮ (0,38 для MGST1; 1,54 для GSTM4), и констатирована возможность использования этого критерия при дифференциальной диагностике ОССЮ и ОС. У пациентов с ОС медиана экспрессии гена MGST1 была выше при метастатических формах заболевания по сравнению с локализованными (0,33 vs 0,07; $p = 0,1741$). Схожий результат получен для гена GSTM4 при ОССЮ (1,59 vs 2,89; $p = 0,3414$). Статистической значимости в оценке разницы показателей в обоих случаях установлено не было.

Наибольший клинический интерес представляло изучение прогностической роли исследуемых генов в когорте пациентов только с локализованными формами, где для пациентов с ОССЮ констатированы значимые ($p = 0,0428$) отличия в экспрессии гена MGST1 в зависимости от клинического исхода заболевания. В качестве уровня высокой экспрессии гена MGST1 было определено значение $> 0,25$, которое выделяет 75,0% пациентов с неблагоприятным клиническим исходом. БСВ пациентов с локализованными формами ОССЮ в зависимости от уровня мРНК гена MGST1 в ткани опухоли перед началом терапии представлена на рисунке 3.

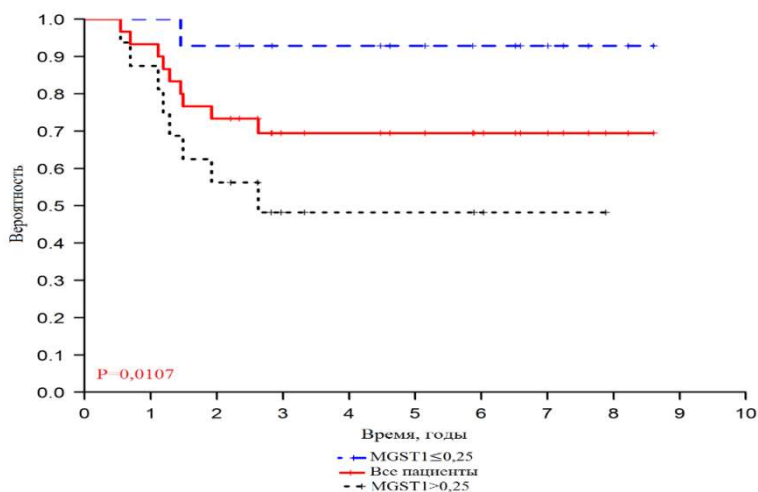


Рисунок 3. – БСВ пациентов с локализованными формами ОССЮ в зависимости от уровня экспрессии мРНК гена MGST1

По результатам анализа выживаемости, показатель 7-летней БСВ всей когорты пациентов с локализованными формами ОССЮ составил $70,2 \pm 9,2\%$. У пациентов с низким ($\leq 0,25$) уровнем экспрессии мРНК гена MGST1 он был $93,4 \pm 7,6\%$, а для случаев с высокой ($> 0,25$) экспрессией составил $48,3 \pm 13,4\%$ ($p=0,0107$).

Отличия в уровнях экспрессии гена GSTM4 как для пациентов с ОССЮ, так и для ОС прогностического значения не продемонстрировали.

По результатам анализа экспрессии генов рецепторов инсулиноподобного фактора роста IGF1R и IGF2R установлено отсутствие статистически значимых отличий медианных уровней экспрессии изучаемых генов в зависимости от нозологии (ОССЮ vs ОС) и распространенности (локализованные формы vs метастатические) онкологического процесса.

Для пациентов с локализованными формами ОС высокий ($> 0,38$) уровень экспрессии гена IGF2R в ткани опухоли ассоциировался с худшим (7-летняя БСВ= $50,2 \pm 18,1\%$ vs $92,3 \pm 8,4\%$, $p=0,0487$) клиническим исходом, что продемонстрировало возможность прогнозирования ответа к системной терапии для пациентов с ОС.

Таким образом, активность генов MGST1 и GSTM4 может служить компонентом дифференциальной диагностики ОССЮ и ОС, а уровень экспрессии гена MGST1 прогнозирует ответ к системной терапии для пациентов с локализованными формами ОССЮ.

Активность генов IGF1R и IGF2R не демонстрирует значения для дифференциальной диагностики ОССЮ и ОС, однако высокий ($> 0,38$) уровень экспрессии гена IGF2R прогнозирует худший исход при локализованных формах ОС.

Молекулярные маркеры АГ в плазме и сыворотке крови пациентов с саркомами и иной патологией

При планировании исследования по изучению прогностической роли молекулярных маркеров, ассоциированных с формированием патологической сосудистой сети, учитывалось, что процесс формирования сосудистой сети обусловлен функционированием широкого спектра генов, но в тоже время, исследуемый спектр генов является фундаментальным медиатором как патологического, так и физиологического АГ.

Вследствие этого группы сравнения для когорты с саркомами составили случаи с иной (незлокачественной) патологией, а также группы практически здоровых детей и взрослых.

Наряду с плазмой, медианные значения уровней концентрации маркеров АГ (VEGFA165, VEGF, VEGFC, растворимых форм рецепторов sVEGFR1 и sVEGFR2) были изучены в сыворотке крови (таблица 4).

Таблица 4. – Уровни маркеров АГ (пг/мл) в крови пациентов при саркомах и иной патологии

Маркер АГ	Группы пациентов и обследованных			
	саркомы, Ме, мин-макс	иная патология, Ме, мин-макс	дети без онкопатологии, Ме, мин-макс	здоровые взрослые, Ме, мин-макс
VEGFA165 в плазме крови	34,7 23,3–108,7	31,8 24,0–120,2	31,7 20,8–52,5	30,9 27,4–32,2
VEGFA165 в сыворотке крови	312,5 31,2–1464,0	369,7 32,2–3146,0	320,5 61,3–502,0	219,3 100,0–564,9
VEGFC в сыворотке крови	1666,0 922,0–3961,0	1458,5 1367,0–1789,0	1635,5 922,0–4656,0	Не определялся
sVEGFR1 в сыворотке крови	186,0 129,0–508,0	171,0 150,0–2694,0	175,0 150,0–2315,0	Не определялся
sVEGFR2 в сыворотке крови	1761,0 563,0–2409,0	1894,0 1330,0–3159,0	1748,0 525,0–2540,0	Не определялся

Статистически значимые различия для сравниваемых когорт в концентрациях форм VEGF и его рецепторов, представленных в таблице 4, отсутствовали. В сыворотке крови концентрация VEGFA165 ожидаемо была на порядок выше по сравнению с плазмой: Ме в группе пациентов со злокачественными новообразованиями при исследовании в плазме - 34,7 пг/мл (мин 23,3 пг/мл – макс 108,7 пг/мл) в то время как в сыворотке – 312,5 пг/мл (мин 31,2 пг/мл – макс 1464,0 пг/мл). Обращает на себя внимание тот факт, что уровень VEGFA165 в плазме практически здоровых взрослых находился в сравнительно узком диапазоне: от 27,4 пг/мл до 32,2 пг/мл при Ме 30,9 пг/мл. Схожие данные получены в когорте практически здоровых детей: от 20,8 пг/мл до 52,5 пг/мл при Ме 31,7 пг/мл. Максимальный разброс концентраций VEGFA165 в плазме констатирован для когорты с иной (незлокачественной) патологией: от 32,2 пг/мл до 3146,0 пг/мл, при Ме 369,7 пг/мл. Сравнительный анализ уровней концентрации маркеров АГ в когорте пациентов с саркомами в зависимости от наличия метастатического поражения показал статистически значимую ($p=0,0220$) разницу в значениях медианных сывороточных концентраций рецептора sVEGFR1 (180,5 пг/мл при локализованных vs 210,0 пг/мл при метастатических). Для sVEGFR2 (1773,5 пг/мл vs 1712,0 пг/мл), VEGFA165 (276,2 пг/мл vs 482,4 пг/мл) и VEGFC (1682,5 пг/мл vs 1606,0 пг/мл) статистически значимой разницы в значениях концентрации получено не было.

Таким образом, не было констатировано статистически значимой разницы между медианными уровнями концентраций крови у пациентов с саркомами и иной патологией для VEGFA165, VEGFC, также как и уровнем растворимых форм

рецепторов sVEGFR1 и sVEGFR2. Разница в уровнях концентрации растворимой формы рецептора sVEGFR1 оказалась статистически значимо больше при метастатических саркомах по сравнению с локализованными формами заболевания и может рассматриваться в качестве фактора оценки вероятности метастазирования новообразования. Концентрации sVEGFR2, VEGFA165 и VEGFC в зависимости от наличия отдаленных метастазов статистической разницы не продемонстрировали.

Маркеры АГ в ткани новообразования пациентов с саркомами и иной патологией

Проанализирована экспрессия мРНК широкого спектра генов, вовлеченных в процесс АГ (таблица 5): VEGFA (включая изоформы 121, 165, 189), VEGFC, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, HIF-1 α (фактор индукции гипоксии), TF (тканевой фактор), TFPI-1 (ингибитор путей тканевого фактора 1), TFPI-2 (ингибитор путей тканевого фактора 2), uPA (активатор плазминогена урокиназного типа), PAI-1 (ингибитор активатора плазминогена 1).

Таблица 5. – Факторы АГ при саркомах и иной патологии

Факторы	Вид патологии		P
	саркомы (n=38) Медиана мин - макс	иная патология (n=23) Медиана мин - макс	
TF	1,106 0,037 – 38,021	3,114 0,047 – 102,000	0,0509
TFPI-1	0,516 0,007 – 21,486	2,070 0,382 – 16,105	0,0003
TFPI-2	0,117 0,001 – 8,704	0,543 0,052 – 10,881	0,0004
uPA	0,418 0,006 – 15,829	3,016 0,002 – 18,782	0,0006
PAI-1	1,877 0,037 – 38,021	2,553 0,0382 – 26,287	0,2043
HIF-1 α	2,028 0,088 – 98,021	12,861 0,534 – 111,111	0,0002
VEGFR-1	4,937 0,003 – 135,803	21,865 0,034 – 118,684	0,0009
VEGFR-2	5,794 0,009 – 44,589	24,488 0,000 – 193,158	0,0011
VEGFR-3	18,574 0,163 – 390,741	81,181 3,159 – 905,263	0,0004
VEGFA	4,007 0,032 – 113,095	3,311 0,620 – 24,959	0,9414
VEGFC	0,782 0,011 – 321,143	2,244 0,419 – 50,425	0,0006
VEGFA121	3,425 0,215 – 20,390	1,500 0,015 – 81,642	0,0166

Продолжение таблицы 5

VEGFA165	2,516 0,126 – 127,451	1,124 0,017 – 7,360	0,0228
VEGFA189	4,195 0,087 – 297,059	2,859 0,026 – 79,208	0,4271
VEGFA165/ VEGFA 189	0,720 0,172 – 213,093	0,400 0,093 – 1,085	0,0034

Установлено, что для сарком по сравнению с иной патологией характерны более высокие уровни экспрессии мРНК генов VEGFA121 (3,425 vs 1,500, $p=0,0166$), VEGFA165 (2,516 vs 1,124, $p=0,0228$), и соотношения VEGFA165/VEGFA189 (0,720 vs 0,400, $p=0,0166$). Для большей части маркеров АГ исследованного спектра уровень экспрессии оказался значимо больше не при саркомах, а при иной патологии: TFPI-1 (2,070 vs 0,516; $p=0,0003$), TFPI-2 (0,543 vs 0,117; $p=0,0004$), uPA (3,016 против 0,418; $p=0,0006$), HIF-1 α (12,861 vs 2,028; $p=0,0002$), VEGFR-1 (21,865 vs 4,937; $p=0,0009$), VEGFR-2 (24,488 vs 5,794; $p=0,0011$), VEGFR-3 (81,181 vs 18,574; $p=0,0004$) и VEGFC (2,244 vs 0,782; $p=0,0006$).

Уровни только двух компонентов из исследованного спектра факторов АГ значимо отличались в группах пациентов, выделенных в зависимости от наличия отдаленных метастазов на момент постановки диагноза. Экспрессия TFPI-2 (0,094 vs 0,178; $p=0,0405$) и соотношение изоформ VEGFA165/189 (0,676 vs 0,823; $p=0,0073$) были ниже при распространенном онкологическом процессе по сравнению с локализованными формами заболевания.

Таким образом, определены молекулярные маркеры АГ, активность которых характерна для сарком костей и мягких тканей. В тоже время установлен спектр маркеров АГ, характеризующихся значимо большей экспрессии при иной (незлокачественной) патологии.

Маркеры АГ как независимый фактор прогноза при локализованных формах ОССЮ

Ранее нами было установлено, что среди широкого спектра молекулярных маркеров АГ только уровень экспрессии гена TFPI2 и соотношение VEGFA165/VEGFA189 статистически значимо отличаются у пациентов с метастатическими и локализованными формами опухолей костей и мягких тканей.

Мы предположили, что эти же маркеры смогут прогнозировать клинический исход заболевания только в когорте локализованных форм ОССЮ.

Исследование включало образцы опухоли из первичных очагов 20 пациентов с локализованными формами ОССЮ и 5 пациентов с отдаленными метастазами (IV стадией заболевания). Основным объектом интереса были пациенты с локализованными формами заболевания. Уровень экспрессии мРНК гена TFPI-2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 в этой группе оценивался как для

пациентов (N=9) развивших рецидив заболевания (на рисунке 4а 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.), так и для пациентов (N=11), находящихся в устойчивой длительной ремиссии (медиана наблюдения 4,51 г.; мин. 3,65 г., макс. 6,59 г.) (на рисунке 4а обозначены как «Пациент в ремиссии»).

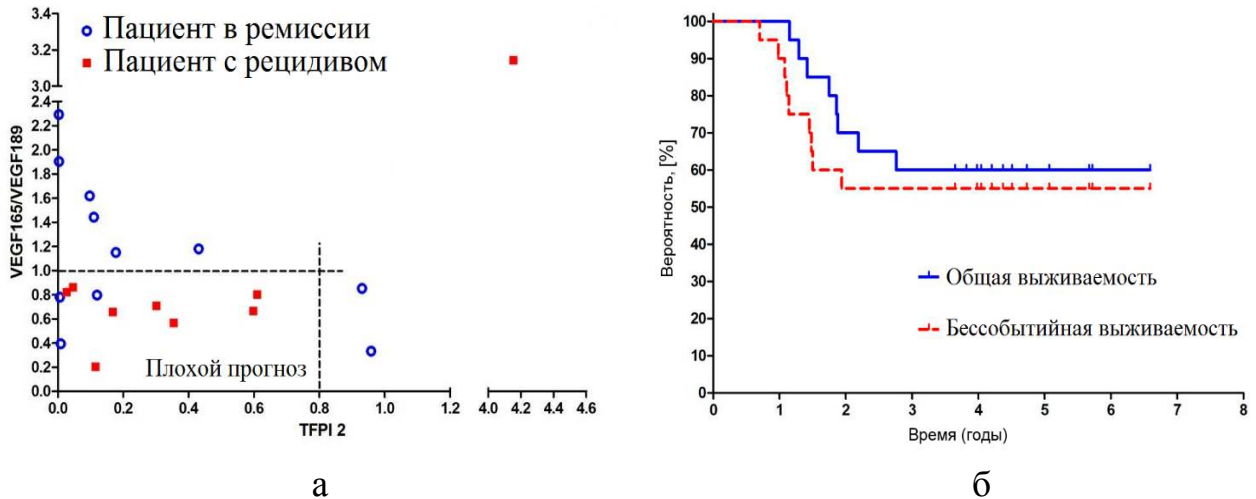


Рисунок 4. – Диаграмма рассеивания значений экспрессии мРНК гена TFPI-2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 у пациентов с локализованными формами ОССЮ в зависимости от клинического исхода заболевания (а) и выживаемость (б) пациентов с локализованными формами ОССЮ

Анализ диаграммы рассеивания (рисунок 4а) показал, что случаи с плохим клиническим исходом локализованы в области: соотношение изоформ VEGFA165/VEGFA189 менее 1,0 и уровень экспрессии мРНК гена TFPI-2 менее 0,8. Данная комбинация уровней экспрессии исследуемых генов была обозначена как молекулярная комбинация неблагоприятного прогноза (МКНП). Также в выделенную зону были определены 3 пациента с локализованными формами ОССЮ, находящиеся в ремиссии. Не распределился в установленную область только 1 пациент с ранним рецидивом заболевания, у которого были отмечены максимальные уровни как экспрессии TFPI-2, так и соотношения VEGFA165/VEGFA189. Остальные пациенты локализовались вне установленной области, ограниченной на основании определенных значений. В данную группу вошли 8 из 11 (72,7%) пациентов с ремиссией и 1 из 9 (11,1%) пациент с рецидивом и описанными ранее максимальными показателями.

Проведен ROC-анализ прогностического значения экспрессии исследуемых генов в зависимости от нахождения указанных параметров в выделенной области диаграммы рассеивания. По результатам ROC-анализа значений экспрессии исследуемых генов площадь под операционной кривой составила $0,854 \pm 0,078$

($p=0,0079$), чувствительность и специфичность были равны 89,8% и 72,3%, соответственно, точность метода составила 80,0%.

Таким образом, результаты ROC-анализа констатировали возможность прогнозирования клинического исхода заболевания для пациентов с локализованными формами ОССЮ на основании экспрессии мРНК гена TFPI-2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 в ткани новообразования на этапе первичной диагностики.

Для определения влияния установленной молекулярной комбинации на долгосрочные результаты лечения были оценены показатели БСВ и ОВ для всей когорты пациентов с локализованными формами ОССЮ. Как представлено на рисунке 4б, 5-летняя БСВ всей когорты пациентов с локализованными формами ОССЮ составила $55,3\pm 11,3\%$, ОВ была $60,1\pm 11,2\%$ с устойчивым выходом на плато после 3-х летнего периода наблюдения.

Далее были установлены долгосрочные показатели выживаемости у пациентов в зависимости от распределения в группы благоприятного и неблагоприятного исхода заболевания на основании установленной МКНП.

Показатели БСВ пациентов с локализованными формами ОССЮ в зависимости от наличия МКНП представлены на рисунке 5.

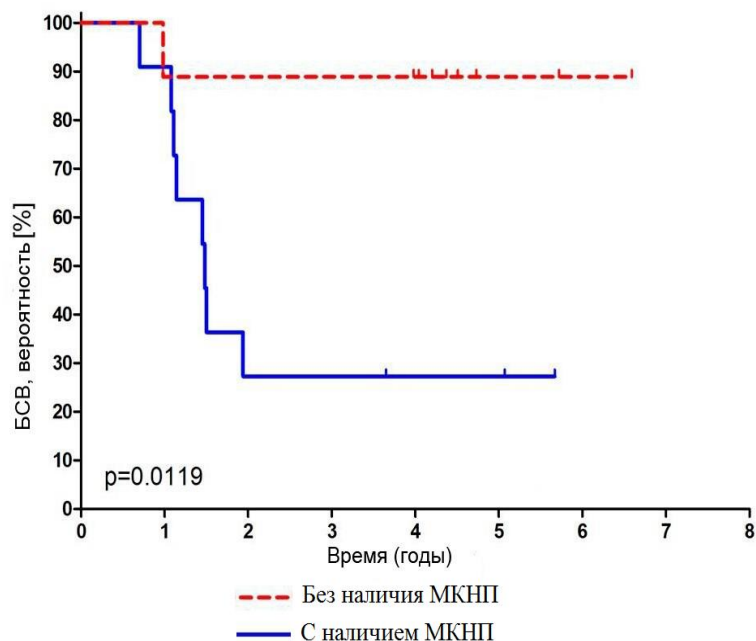


Рисунок 5. – БСВ пациентов с локализованными формами ОССЮ в зависимости от наличия МКНП

Как представлено на рисунке 5, 5-летняя БСВ пациентов с локализованными формами ОССЮ и отсутствием МКНП составила $89,4\pm 10,6\%$, в то время как у

пациентов с МКНП она была $27,2 \pm 10,6\%$ ($p=0,0119$). 5-летняя ОВ пациентов с локализованными формами ОССЮ и без наличия МКНП составила $89,4 \pm 10,6\%$; у пациентов с МКНП она была $36,3 \pm 10,6\%$ ($p=0,0321$). Констатировано отсутствие статистически значимой разницы в группах благоприятного и неблагоприятного исхода заболевания при сравнительном анализе таких показателей, как объем опухоли, уровень ЛДГ, пол, возраст, локализация, вид системной терапии и локального контроля.

При анализе результатов лечения группы пациентов с метастатическими формами ОССЮ констатировано, что у всех пациентов наступил рецидив и впоследствии смертельный исход, связанный с основным заболеванием. Однако необходимо отметить, что 1 пациент, который не был классифицирован в зону плохого прогноза (без МКНП), имел до наступления рецидива длительный, практически 3-х летний промежуток ремиссии. На момент постановки диагноза у него было констатировано массивное опухолевое метастазирование с поражением легких, костей и костного мозга. Более того, после наступления рецидива для пациента была эффективна 2-я линия системного лечения, и продолжительность жизни у него превысила 5 лет с момента постановки диагноза. С клинической точки зрения такое поведение метастатической формы является крайне благоприятной, но очень нехарактерной для ОССЮ и, вероятно, определение этого пациента в зону благоприятного прогноза на основании молекулярных маркеров АГ имело биологический смысл.

Таким образом, установлена комбинация маркеров АГ, позволяющая выделить как чувствительные, так и резистентные к цитостатической терапии новообразования и констатирована возможность прогнозирования клинического исхода заболевания для локализованных форм ОССЮ на основании уровня экспрессии мРНК гена TFPI2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 в ткани опухоли на этапе первичной диагностики.

Антиангиогенная терапия пациентов с локализованными формами ОССЮ на основании маркеров АГ

С 2011 по 2016 гг. у всех пациентов с локализованными формами ОССЮ уровень экспрессии мРНК гена TFPI2 и соотношение изоформ VEGFA165/VEGFA189 в ткани опухоли исследовались в проспективном режиме при инициальной диагностике; 29 пациентов составили основную (проспективную) группу. В случае наличия МКНП стандартная системная терапия интенсифицировалась посредством назначения лекарственного средства бевацизумаб в дозе 7,5 мг/кг в день 1 каждого блока химиотерапии, для остальных пациентов (без МКНП) антиангиогенная терапия не проводилась.

Уровень экспрессии мРНК генов TFPI-2 и соотношения VEGFA165/VEGFA189 у пациентов основной группы представлены на рисунке 6.

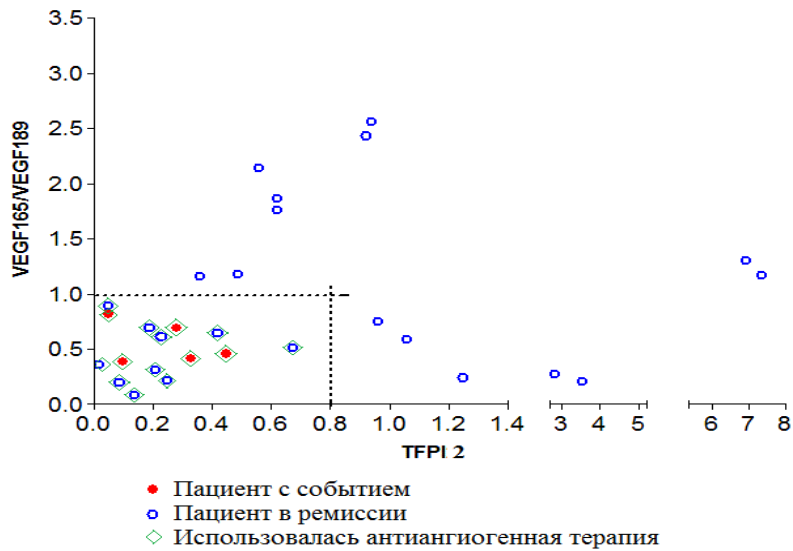


Рисунок 6. – Диаграмма рассеивания значений экспрессии мРНК гена TFPI-2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 у пациентов основной группы с локализованными формами ОССЮ

Как представлено на рисунке 6, 14/29 (48,3%) пациентов основной группы были локализованы вне области МКНП; у них констатирован благоприятный исход заболевания (все пациенты живы без событий) после проведения стандартной системной терапии. 15/29 (51,7%) пациентов основной группы перед началом системной терапии были локализованы в область МКНП. Отрицательные события и неблагоприятный исход заболевания (4 рецидива, 1 токсическая смерть) констатированы только у пациентов, локализованных в область МКНП.

Для пациентов основной группы были оценены показатели БСВ, ОВ и КЧР в зависимости от наличия МКНП (рисунок 7).

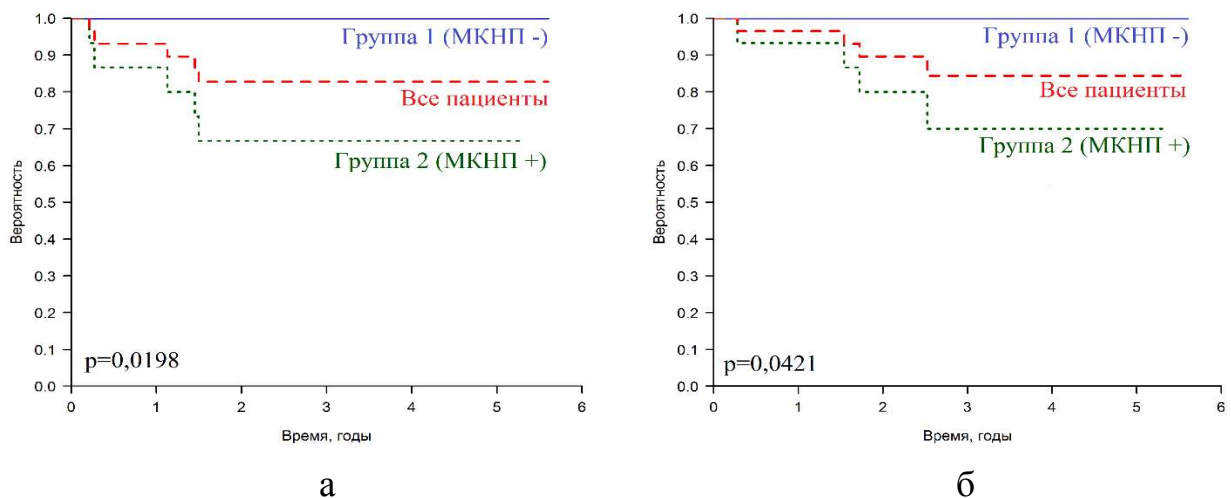


Рисунок 7. – БСВ (а) и ОВ (б) пациентов с локализованными формами ОССЮ основной группы в зависимости от наличия МКНП

Показатель 5-летней БСВ (рисунок 7а) пациентов без наличия МКНП (группа 1) составил 100%. Показатель 5-летней БСВ пациентов с наличием МКНП (группа 2) был $66,7 \pm 12,2\%$ ($p=0,0198$). Показатель 5-летней БСВ всех пациентов основной группы оказался $82,8 \pm 7,0\%$. Показатель 5-летней ОВ (рисунок 7б) пациентов без наличия МКНП (группа 1) составил 100%. Показатель 5-летней ОВ пациентов с наличием МКНП (группа 2) был $70,0 \pm 13,0\%$ ($p=0,0421$). Показатель 5-летней ОВ всех пациентов основной группы оказался $84,4 \pm 7,4\%$. Показатели КЧР за 5-летний период для пациентов без наличия МКНП (группа 1) составили 0% (рецидивов не было). Показатели КЧР при наличии МКНП (группа 2) составили $26,7 \pm 11,9\%$ ($p=0,0414$). КЧР для всех пациентов основной группы оказалась $13,8 \pm 4,1\%$.

Таким образом, на основании экспрессии маркеров АГ констатирована возможность выделения около половины (48,3%) пациентов с отличными (БСВ, ОВ=100%) результатами лечения, интенсификация терапии которым не показана. Дополнительное использование антиангиогенной терапии для пациентов с наличием МКНП позволило достигнуть показателей БСВ и ОВ проспективной группы $82,8 \pm 7,0\%$ и $84,4 \pm 7,4\%$, соответственно.

Сравнительный анализ эффективности антиангиогенной терапии для пациентов с локализованными формами ОССЮ и наличием МКНП

Проведено сравнение показателей КЧР пациентов с локализованными формами ОССЮ МКНП в зависимости от факта использования антиангиогенной терапии (рисунок 8).

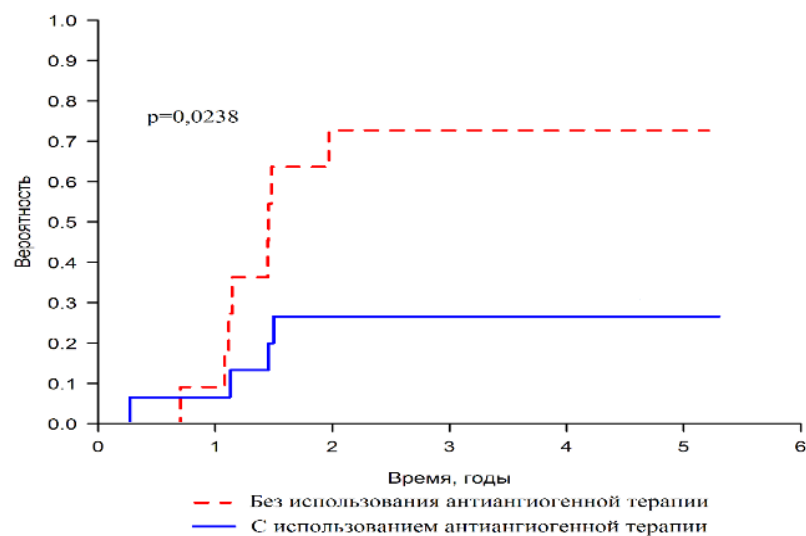


Рисунок 8. – КЧР пациентов с МКНП в зависимости от использования антиангиогенной терапии

Как представлено на рисунке 8, КЧР пациентов с МКНП и без использования антиангиогенной терапии за 5-летний период наблюдения составила $72,7 \pm 14,9\%$. У пациентов основной группы с МКНП, но с использованием антиангиогенной терапии она оказалась $26,7 \pm 11,9\%$. Таким образом, констатировано значимое ($p=0,0238$) снижение количества рецидивов при использовании антиангиогенной терапии у пациентов с МКНП.

Полученные данные свидетельствуют об эффективности использования антиангиогенной терапии для случаев с неблагоприятным прогнозом, установленным на основании маркеров АГ.

Результаты терапии пациентов с локализованными формами ОССЮ и известным уровнем маркеров АГ в зависимости от наличия МКНП

Уровень экспрессии мРНК генов TFPI-2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 в ткани опухоли (рисунок 9а) были установлены у 49 пациентов с локализованными формами ОССЮ и известным уровнем маркеров АГ: 20 пациентов из группы лечившихся до 2011 г. и 29 пациентов составивших основную группу (после 2011 г.).

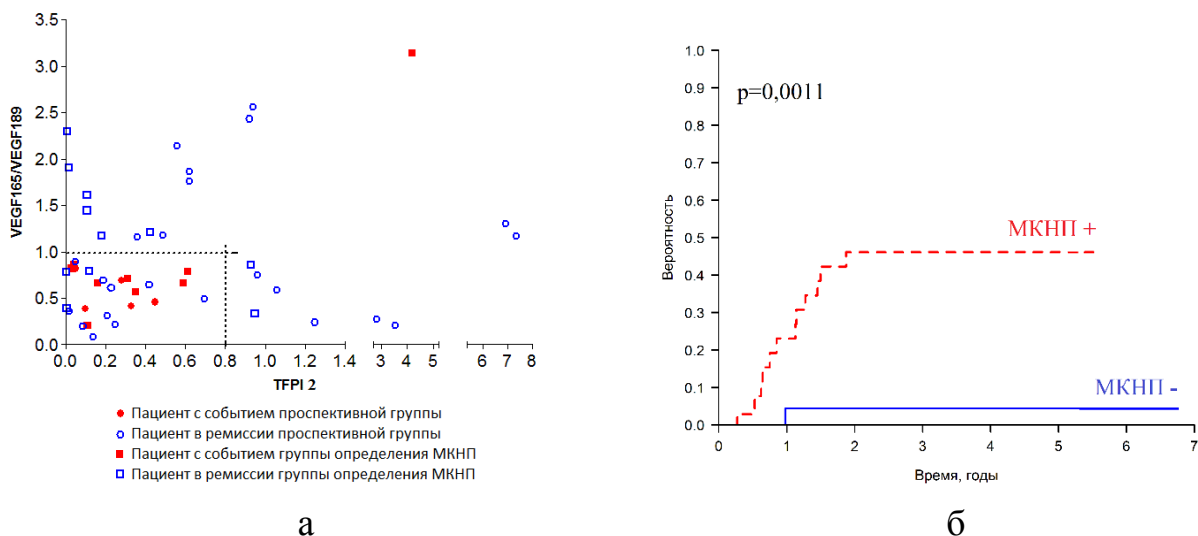


Рисунок 9. – Диаграмма рассеивания значений экспрессии мРНК гена TFPI-2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 (а) и КЧР (б) пациентов с локализованными формами ОССЮ и известным уровнем маркеров АГ

Благоприятный исход (пациенты без МКНП) был спрогнозирован у 23/49 (46,9%) пациентов (9 из группы до 2011 г., 14 – из основной группы). Группу с МКНП составили 26/49 (53,1%). 11 из них были из группы до 2011 г. (без использования антиангиогенной терапии), 15 – из основной группы, с использованием антиангиогенной терапии.

Показатель КЧР за 5-летний период наблюдения всех пациентов исследования с локализованными формами ОССЮ без наличия МКНП составил $4,35 \pm 4,35\%$, у пациентов с наличием МКНП он был $46,2 \pm 10,1\%$ ($p=0,0012$) (рисунок 9б).

Таким образом, отсутствие МКНП позволяет прогнозировать около половины ($48,3\%$ - в основной группе, $46,9\%$ - для всех пациентов исследования без МКНП) случаев с благоприятным исходом заболевания и незначительной вероятностью возникновения рецидива заболевания.

Результаты персонализированного использования антиангиогенной терапии на основании уровня экспрессии маркеров АГ у пациентов с локализованными формами ОССЮ

Суммарно по режиму Е (основная (проспективная) группа), с 2011 по 2016 гг. пролечено 29 пациентов с локализованными формами ОССЮ (из них 15 пациентам на основании молекулярных маркеров АГ была назначена антиангиогенная терапия лекарственным средством бевацизумаб).

Проведен сравнительный анализ показателей БСВ, ОВ и КЧР у пациентов с локализованными формами ОССЮ основной (2011-2016 гг.) и контрольной (1999-2010 гг.) групп (рисунок 10).

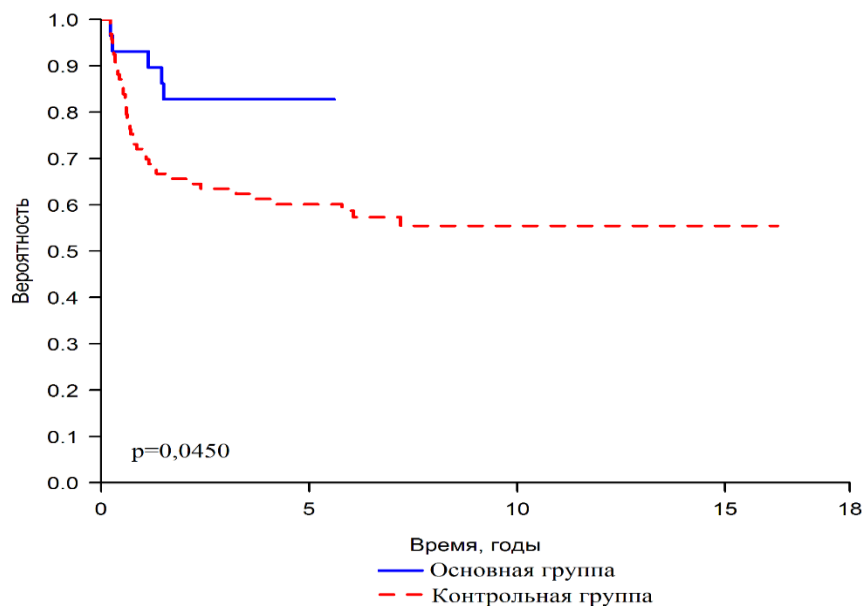


Рисунок 10. – БСВ пациентов с локализованными формами ОССЮ основной и контрольной групп

Как представлено на рисунке 10, показатель 5-летней БСВ основной группы составил $82,8 \pm 7,0\%$, у пациентов контрольной группы на пятилетней отсечке он был $60,1 \pm 5,1\%$ ($p=0,0450$).

Показатель 5-летней ОВ (рисунок 11а) основной группы составил $84,4 \pm 7,4\%$, у пациентов контрольной группы на пятилетней отсечке он был $64,8 \pm 4,9\%$ ($p=0,0469$).

Показатель КЧР за 5-летний период наблюдения (рисунок 11б) основной группы составил $13,8 \pm 6,5\%$, для пациентов контрольной группы он оказался $37,1 \pm 5,1\%$ на пятилетней отсечке ($p=0,0229$).

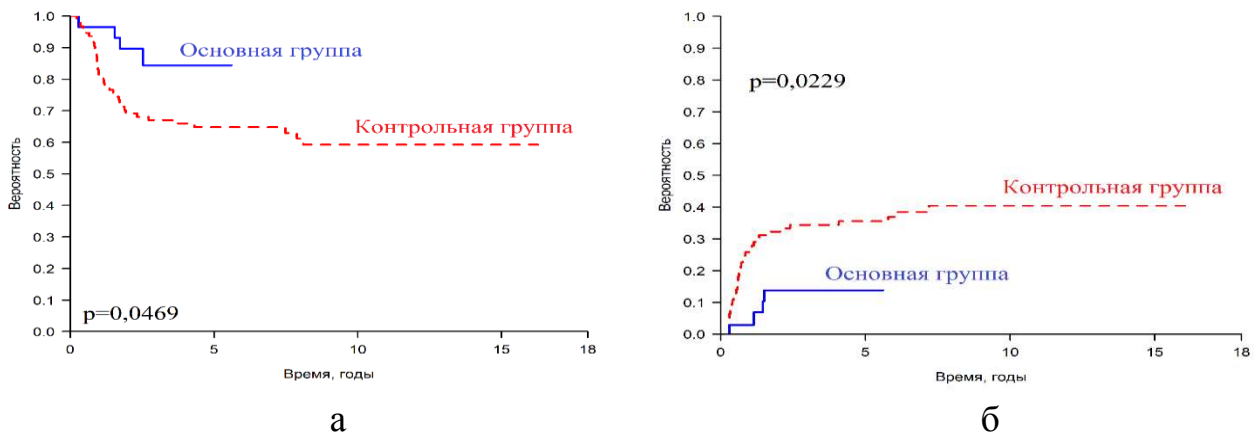


Рисунок 11. – ОВ (а) и КЧР (б) пациентов с локализованными формами ОССЮ основной и контрольной групп

Продемонстрировано, что персонализированное назначение антиангиогенной терапии при прогнозируемом (на основании уровня маркеров АГ в ткани опухоли) неблагоприятном исходе заболевания статистически значимо улучшает (на 22,7% ($p=0,0450$) для БСВ; на 19,6% ($p=0,0469$) для ОВ, на 23,3% ($p=0,0229$) для КЧР) результаты терапии пациентов с локализованными формами ОССЮ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Наличие морфологии ПНЭО не ассоциировалось с худшими результатами лечения. Показатели БСВ, ОВ и КЧР при КСЮ составили $49,2 \pm 5,1\%$, $49,5 \pm 5,3\%$ и $42,5 \pm 5,0\%$. У пациентов, страдающих ПНЭО, они оказались несколько выше: $50,4 \pm 7,1\%$, $60,2 \pm 7,0\%$ и $43,8 \pm 7,2\%$, соответственно. Имела место тенденция к лучшим результатам лечения для пациентов, страдающих локализованными формами ПНЭО при использовании протоколов системной терапии КСЮ (15-летняя БСВ= $62,8 \pm 9,4\%$) по сравнению с протоколами рабдоидных опухолей (15-летняя БСВ= $50,0 \pm 13,4\%$), однако разница в значениях показателей на момент анализа не являлась статистически значимой ($p=0,1023$) [3, 10, 14, 15, 17, 20].

2. Анализ результатов лечения за 15-летний период продемонстрировал, что уровень достигнутых в Республике Беларусь долгосрочных показателей БСВ, ОВ и КЧР для пациентов с ОССЮ соответствует международным стандартам. Показатели БСВ, ОВ и КЧР пациентов, страдающих ОССЮ составили $50,1 \pm 4,1\%$, $52,8 \pm 4,5\%$ и $44,7 \pm 4,1\%$, соответственно. Наличие отдаленных метастазов является статистически значимым фактором прогноза. При локализованных и метастатических формах ОССЮ показатели БСВ были $62,5 \pm 4,7\%$ vs $19,9 \pm 6,0\%$ ($p < 0,0001$), ОВ $67,0 \pm 4,7\%$ vs $19,9 \pm 6,0\%$ ($p < 0,0001$), КЧР $34,9 \pm 4,7\%$ vs $68,8 \pm 7,1\%$ ($p = 0,0001$) соответственно [7, 10, 11, 20, 21, 25, 30, 31, 38].

3. Анализ классических клинико-патологических характеристик у пациентов с локализованными формами ОССЮ за 15-летний период не показал возможности прогнозирования развития рецидива заболевания. Такие показатели как пол ($p = 0,1385$), возраст ($p = 0,8089$), объем опухоли ($p = 0,4547$), уровень ЛДГ ($p = 0,3423$), вид системной терапии до 2011 г. ($p = 0,3438$) и локального контроля ($p = 0,8177$) не продемонстрировали статистически значимых отличий в зависимости от клинического исхода заболевания. При возрасте старше 14 лет и морфологии КСЮ констатированы крайне неблагоприятные исходы заболевания для пациентов с отдаленными метастазами. Для всех случаев в этой когорте констатирован рецидив заболевания, приведший к летальному исходу (ОВ=0%) [3, 7, 10, 14, 17, 21, 30].

4. Уровень экспрессии гена MGST1 в ткани новообразования продемонстрировал возможность прогнозирования клинического исхода для локализованных форм ОССЮ на этапе инициальной диагностики. У пациентов с локализованными формами ОССЮ 7-летняя БСВ была статистически значимо выше при уровне экспрессии гена MGST1 $\leq 0,25$ ($93,3 \pm 7,6\%$) vs $48,3 \pm 13,4\%$, $p = 0,0107$). Уровни экспрессии мРНК генов MGST1 и GSTM4 в ткани сарком демонстрировали значимость в качестве компонентов дифференциальной диагностики между ОССЮ и ОС. Установлен значимо ($p < 0,0001$) низкий уровень экспрессии исследуемых генов при ОС (0,09 для MGST1; 0,53 для GSTM4) по сравнению с ОССЮ (0,38 для MGST1; 1,54 для GSTM4). Высокий ($\geq 0,38$) уровень экспрессии гена IGF2R свидетельствовал о худшем (7-летняя БСВ $50,2 \pm 18,1\%$ vs $92,3 \pm 8,4\%$, $p = 0,0487$) клиническом исходе для пациентов с локализованными формами ОС [24, 28, 29, 39, 40, 42].

5. Установленные уровни активности маркеров АГ в плазме и сыворотке крови не продемонстрировали значимых отличий при сравнении когорт пациентов с саркомами и незлокачественными процессами. Медианы концентрации факторов АГ в сыворотке крови для когорт сарком и пациентов с незлокачественным процессом значимо не различались и составили для VEGFA165 ($312,5$ пк/мл vs $369,8$ пк/мл), VEGFC ($1666,0$ пк/мл vs $1458,5$ пк/мл), sVEGFR1 ($186,0$ пк/мл vs $171,0$ пк/мл) и sVEGFR2 ($1761,0$ пк/мл vs $1894,0$ пк/мл).

Медианные уровни концентрации VEGFA165 в плазме крови в сравниваемых когортах также значимого отличия не продемонстрировали [1, 5, 9, 33].

6. Значимо больший уровень экспрессии в ткани опухоли генов VEGFA121 (3,425 vs 1,500, $p=0,0166$), VEGFA165 (2,516 vs 1,124, $p=0,0228$), VEGFA189 (4,195 vs 2,859, $p=0,0228$) и соотношения VEGFA165/ VEGFA189 (0,720 vs 0,400, $p=0,0034$) характеризовал группу сарком костей и мягких тканей, в то время как значительная часть спектра маркеров ангиогенеза (VEGFC ($p=0,0006$), VEGFR-1, VEGFR-2 ($p=0,0011$), VEGFR-3 ($p=0,0004$), TFPI-1 ($p=0,0003$), TFPI-2 ($p=0,0004$), HIF-1 α ($p=0,0002$) и uPA ($p=0,0006$)) демонстрировала большую активность при иной (незлокачественной) патологии. Установлены статистически значимые отличия в уровне экспрессии гена TFPI-2 (0,0939 vs 0,1783; $p=0,0405$) и соотношении экспрессии изоформ генов VEGFA165/VEGFA189 (0,6765 против 0,8235; $p=0,0073$) для пациентов с метастатическими саркомами по сравнению с локализованными формами заболевания, что свидетельствует о целесообразности использования полученных результатов в качестве прогностических маркеров при саркомах костей и мягких тканей [2, 6, 9, 12, 29, 32].

7. Уровень экспрессии гена TFPI2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 в ткани опухоли у пациентов с локализованными формами ОССЮ прогнозировали неблагоприятный исход заболевания на этапе первичной диагностики. Низкий ($<0,8$) уровень экспрессии гена TFPI2 и одновременно низкий ($<1,0$) уровень соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 в ткани опухоли на момент постановки диагноза выделили когорту пациентов с неблагоприятным (5-летняя БСВ= $27,2\pm 10,6\%$) и благоприятным (5-летняя БСВ= $89,4\pm 10,6\%$, $p=0,0190$) исходами терапии локализованных форм ОССЮ [4, 8, 13, 18, 22, 34, 36, 37, 41, 43].

8. Установленные молекулярные маркеры АГ позволили выделить 48,3% пациентов с благоприятным исходом заболевания (БСВ=100%) при локализованных формах ОССЮ, интенсификация лечения для которых не показана. Использование персонализированного назначения антиангиогенной терапии при прогнозируемом на основании молекулярных маркеров АГ неблагоприятном исходе заболевания позволило улучшить результаты лечения пациентов с локализованными формами ОССЮ. В основной (проспективной) группе пациентов (2011-2016 гг.), где была осуществлена биологическая стратификация (на основании маркеров АГ) и интенсифицирована терапия при неблагоприятном прогнозе, констатированы лучшие показатели 5-летней выживаемости и кумулятивной частоты рецидива по сравнению с контрольной (1999-2010 гг.): БСВ ($82,8\pm 7,0\%$ vs $60,1\pm 5,1\%$, $p=0,0450$), ОВ ($84,4\pm 7,4\%$ vs $64,8\pm 4,9\%$, $p=0,0469$) и КЧР ($13,8\pm 6,5\%$ vs $37,1\pm 5,1\%$, $p=0,0229$) [16, 18, 19, 22, 23, 26, 27, 36].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Персонализированная антиангиогенная терапия пациентов, страдающих локализованными формами ОССЮ, на основании уровня экспрессии маркеров АГ при инициальной диагностике

У пациентов с локализованными формами ОССЮ до начала системной терапии в материале опухоли методом РТ-ПЦР определяется уровень экспрессии мРНК генов VEGFA165, VEGFA189 и TFPI-2.

Низкий уровень экспрессии мРНК гена TFPI-2 ($<0,8$) и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 ($<1,0$) свидетельствует о неблагоприятном прогнозе заболевания. Таким пациентам показано использование терапии бевацизумабом в дозировке 7,5 мг/кг в день внутривенно в день 1 каждого из 6 блоков 4-х компонентной индукционной химиотерапии (винкристин, доксорубин, ифосфамид и этопозид) и каждого из 8 блоков 3-х компонентной консолидирующей терапии (винкристин, ифосфамид, актиномицин Д) [41, 43].

Прогнозирование распространенности процесса и клинического исхода заболевания пациентов, страдающих ОССЮ

Для персонализации плана терапии локализованных форм ОССЮ необходимо стратифицировать пациентов на основании экспрессии молекулярных маркеров в ткани опухоли перед началом терапии. У пациентов с локализованными формами ОССЮ до начала системной терапии в материале опухоли методом РТ-ПЦР целесообразно определить уровень экспрессии мРНК гена MGST1. Высокий уровень экспрессии гена MGST1 ($>0,25$) свидетельствует о неблагоприятном исходе заболевания и необходимости интенсификации терапии [42].

Диагностика сарком с применением уровней экспрессии молекулярных маркеров

Уровни экспрессии мРНК генов MGST1 и GSTM4 в ткани новообразования перед началом системной терапии (значимо больше при ОССЮ) могут быть использованы в качестве критериев дифференциальной диагностики ОС и ОССЮ. При дифференциальной диагностике сарком с незлокачественной патологией необходимо учитывать, что для тканей сарком характерны более высокие уровни экспрессии генов VEGFA121, VEGFA165, соотношения VEGFA165/ VEGFA189 и TFPI-2, в то время как экспрессия генов VEGFC, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, HIF-1 α и uPA является прерогативой иной (незлокачественной) патологии [42, 43].

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в журналах, включенных в перечень ВАК

1. Биологические маркеры ангиогенеза при онкопатологии у детей / Т. В. Савицкая, Л. П. Киселев, Н. В. Липай, Т. В. Райко // *Здравоохранение*. – 2011. – № 6. – С. 11–15.
2. Savitskaya, T. V. The mRNA expression of various angiogenesis-related genes in pediatric sarcomas and nonmalignant lesions of tissue / T. V. Savitskaya, L. P. Kisialeu, N. V. Lipay // *Pediatr. Hematol. and Oncol.* – 2012. – Vol. 29, № 1. – P. 28–37.
3. Киселев, Л. П. Локализованные формы примитивной периферической нейроэктодермальной опухоли костей и мягких тканей у детей в Республике Беларусь: анализ результатов терапии за 15-летний период наблюдения / Л. П. Киселев, О. В. Алейникова // *Евраз. онколог. журн.* – 2016. – Т. 4, № 1. – С. 56–63.
4. TFPI2, VEGFA165 и VEGFA189 как независимые факторы прогноза локализованных форм саркомы Юинга / Л. П. Киселев, Т. В. Савицкая, Н. В. Липай, О. В. Алейникова // *Онколог. журн.* – 2016. – Т. 10, № 1. – С. 93–100.
5. Киселев, Л. П. Факторы роста сосудистой сети в плазме и сыворотке крови у педиатрических пациентов с саркомами и незлокачественными заболеваниями опорно-двигательного аппарата / Л. П. Киселев, Т. В. Савицкая, О. В. Алейникова // *Онкопедиатрия*. – 2016. – Т. 3, № 2. – С. 113–119.
6. Экспрессия факторов ангиогенеза в саркомах у детей / Л. П. Киселев, Т. В. Савицкая, Н. В. Липай, О. В. Алейникова // *Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук*. – 2016. – № 3. – С. 99–106.
7. Киселев, Л. П. Локализованные формы опухолей семейства саркомы Юинга в Республике Беларусь: анализ клинических исходов у 115 пациентов за 15-летний период наблюдения / Л. П. Киселев, О. В. Алейникова // *Онкопедиатрия*. – 2016. – Т. 3, № 3. – С. 182–187.
8. Киселев, Л. П. Экспрессия факторов роста эндотелия сосудов VEGF в качестве прогностического маркера биологического поведения онкологического процесса у пациентов детского возраста с костными и мягкоткаными саркомами / Л. П. Киселев, Т. В. Савицкая, О. В. Алейникова // *Евраз. онколог. журн.* – 2016. – Т. 4, № 3. – С. 629–635.
9. Киселев, Л. П. Саркома Юинга: перспективные биомаркеры и современные возможности персонализации терапии / Л. П. Киселев // *Евраз. онколог. журн.* – 2016. – Т. 4, № 3. – С. 652–664.
10. Киселев, Л. П. Долгосрочные показатели выживаемости детей и подростков с неметастатическими формами саркомы Юинга в Республике

Беларусь / Л. П. Киселев, О. В. Алейникова // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2016. – № 4. – С. 7–14.

11. Киселев, Л. П. Современные режимы химиотерапии при саркоме Юинга у детей и молодых взрослых / Л. П. Киселев // Онколог. журн. – 2016. – Т. 10, № 4. – С. 106–117.

12. Ингибитор тканевого фактора TGF β -2 как потенциальный прогностический маркер онкологического процесса при саркомах костей и мягких тканей у пациентов детского возраста / Л. П. Киселев, Т. В. Савицкая, Н. В. Липай, О. В. Алейникова // Мед. новости. – 2016. – № 12. – С. 56–59.

13. Киселев, Л. П. Молекулярные маркеры ангиогенеза как основание к использованию VEGF-блокады при локализованных формах саркомы Юинга / Л. П. Киселев, Т. В. Савицкая, О. В. Алейникова // Онкопедиатрия. – 2017. – Т. 4, № 1. – С. 25–30.

14. Киселев, Л. П. Примитивная нейроэктодермальная опухоль костей и мягких тканей у пациентов детского возраста Республики Беларусь: клинические исходы и показатели выживаемости за 15-летний период / Л. П. Киселев, О. В. Алейникова // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 1. – С. 38–45.

15. Киселев, Л. П. Эффективность вариантов системной терапии у пациентов детского возраста с примитивной нейроэктодермальной опухолью костей и мягких тканей / Л. П. Киселев // Мед. новости. – 2017. – № 1. – С. 58–61.

16. Киселев, Л. П. 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 // Онколог. журн. – 2017. – Т. 11, № 2. – С. 15–20.

17. Киселев, Л. П. Результаты терапии сарком Юинга в Республике Беларусь / Л. П. Киселев, О. В. Алейникова // Вопр. гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2017. – Т. 16, № 2. – С. 26–32.

18. Киселев, Л. П. Прогнозирование клинического исхода и антиангиогенная терапия у пациентов детского возраста с нематастатическими формами саркомы Юинга / Л. П. Киселев, Т. В. Савицкая, О. В. Алейникова // Онкопедиатрия. – 2017. – Т. 4, № 2. – С. 105–114.

19. Киселев, Л. П. Результаты применения антиангиогенной терапии для локализованных форм саркомы Юинга при прогнозируемой на основании молекулярных маркеров ангиогенеза химиорезистентности новообразования / Л. П. Киселев, Т. В. Савицкая, О. В. Алейникова // Евраз. онколог. журн. – 2017. – Т. 5, № 2. – С. 180–188.

20. Киселев, Л. П. Результаты терапии опухолей семейства саркомы Юинга у детей Республики Беларусь / Л. П. Киселев // Гематология. Трансфузиология. Вост. Европа. – 2017. – Т. 3, № 3. – С. 318–328.

21. Киселев, Л. П. Анализ 108 клинических исходов саркомы Юинга у детей Республики Беларусь за 15-летний период наблюдения / Л. П. Киселев, О. В. Алейникова // Евраз. онколог. журн. – 2017. – Т. 5, № 3. – С. 373–382.
22. Киселев, Л. П. Маркеры ангиогенеза и антиангиогенная терапия у пациентов с локализованными формами саркомы Юинга / Л. П. Киселев, Т. В. Савицкая, О. В. Алейникова // Евраз. онколог. журн. – 2017. – Т. 5, № 3. – С. 383–392.
23. Киселев, Л. П. Антиангиогенная терапия локализованных форм саркомы Юинга у пациентов детского возраста / Л. П. Киселев // Гематология. Трансфузиология. Вост. Европа. – 2017. – Т. 3, № 3. – С. 399–407.
24. Клиническое значение экспрессии мРНК генов MGST1 и GSTM4 в ткани опухоли при саркоме Юинга и остеосаркоме / Л. П. Киселев, Т. В. Савицкая, А. Г. Жуковец, О. В. Алейникова // Онколог. журн. – 2017. – Т. 11, № 4. – С. 23–30.
25. Киселев, Л. П. Опухоли семейства Юинга: результаты лечения пациентов детского возраста в Республике Беларусь / Л. П. Киселев // Вопр. гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2017. – Т. 16, № 4. – С. 43–50.
26. Киселев, Л. П. VEGF-блокада локализованных форм сарком Юинга при прогнозируемой на основании молекулярных маркеров ангиогенеза химиорезистентности новообразования / Л. П. Киселев, Т. В. Савицкая, О. В. Алейникова // Рос. журн. дет. гематологии и онкологии. – 2017. – Т. 4, № 4. – С. 49–55.
27. Киселев, Л. П. Блокада фактора роста эндотелия сосудов у пациентов с локализованными формами саркомы Юинга на основании уровня экспрессии маркеров ангиогенеза в опухолевой ткани / Л. П. Киселев, Т. В. Савицкая, О. В. Алейникова // Мед. новости. – 2017. – № 4. – С. 57–61.
28. Молекулярные маркеры генов инсулиноподобных факторов роста при новообразованиях костных тканей / О. В. Алейникова, Л. П. Киселев, Т. В. Савицкая, А. Г. Жуковец // Онколог. журн. – 2017. – Т. 11, № 4. – С. 87–94.
29. Киселев, Л. П. Уровень экспрессии факторов ангиогенеза в ткани сарком и незлокачественных образований у пациентов детского возраста: результаты одномоментного исследования / Л. П. Киселев, Т. В. Савицкая, О. В. Алейникова // Онкопедиатрия. – 2017. – Т. 4, № 4. – С. 260–268.
30. Киселев, Л. П. Опухоли семейства саркомы Юинга у детей Республики Беларусь: анализ клинических исходов за 15-летний период наблюдения / Л. П. Киселев, О. В. Алейникова // Онколог. журн. – 2018. – Т. 12, № 1. – С. 69–76.

Статьи в журналах, материалы конференций и тезисы докладов

31. Киселев, Л. П. Результаты лечения пациентов группы стандартного риска саркомы Юинга/ПНЭО у детей в Республике Беларусь / Л. П. Киселев, О. В. Алейникова // Материалы IV съезда онкологов Республики Беларусь, Минск, 3–5 ноября 2011 г. – [Опубл. в журн.] Онколог. журн. – 2011. – Т. 5, № 3. – С. 165–166.
32. Савицкая, Т. В. Полиморфизм ARG72PRO в гене TP53 у детей со злокачественными саркомами / Т. В. Савицкая, Н. В. Липай, Л. П. Киселев // Материалы IV съезда онкологов Республики Беларусь, Минск, 3–5 ноября 2011 г. – [Опубл. в журн.] Онколог. журн. – 2011. – Т. 5, № 3. – С. 166.
33. Активатор плазминогена урокиназного типа UPA и его рецептор UPAR в плазме здоровых детей и пациентов с саркомами / Т. В. Савицкая, Н. В. Липай, Л. П. Киселев, Т. В. Райко // Материалы IV съезда онкологов Республики Беларусь, Минск, 3–5 ноября 2011 г. – [Опубл. в журн.] Онколог. журн. – 2011. – Т. 5, № 3. – С. 166–167.
34. Киселев, Л. П. Прогнозирование резистентных форм саркомы Юинга по профилю маркеров ангиогенеза для ранней коррекции плана терапии / Л. П. Киселев, Т. В. Савицкая, О. В. Алейникова // Достижения и перспективы детской гематологии-онкологии : материалы V межрегион. совещания нац. о-ва дет. гематологов и онкологов, Москва, 5–8 июня 2014 г. – [Опубл. в журн.] Рос. журн. дет. гематологии и онкологии. – 2014. – № 2. – С. 52.
35. Киселев, Л. П. Определение резистентности опухолей семейства саркомы Юинга по профилю маркеров ангиогенеза для ранней коррекции терапевтического плана / Л. П. Киселев, Т. В. Савицкая, О. В. Алейникова // Материалы педиатрической секции VIII съезда онкологов и радиологов стран СНГ. Часть 2, Казань, 16–18 сентября 2014 г. – [Опубл. в журн.] Онкопедиатрия. – 2014. – Т. 1, № 4. – С. 58–59.
36. Kisialeu, L. Inhibition of vascular endothelial growth factor for patients with Ewing's sarcoma selected based on angiogenesis markers in pretreatment tumor tissue / L. Kisialeu, T. Savitskaia, O. Aleinikova // Oncology in the biomarker era: Biology–Diagnostics–Therapy. ISOBM 2015 : abstr. 42nd Congress of the Int. Soc. of Oncol. and Biomarkers. – [Publ.] Tumor Biol. – 2015. – Vol. 36, suppl. 1. – P. S63–S64.
37. Level of the TFPI-2 mRNA expression and VEGF-A165/VEGF-A189 ratio in pretreatment tumour tissue is an independent predictor of poor prognosis for pediatric patients with nonmetastatic Ewing's sarcoma / L. Kisialeu, T. Savitskaya, N. Lipay, O. Aleinikova // 10th SIOP Asia Congress : abstr. book, Moscow, 25–28 may 2016 / Int. Soc. of Paediatr. Oncol., The National Soc. of Pediatr. Hematologists and Oncologists. – M., 2016. – P. 70.

38. Киселев, Л. П. Саркома Юинга у детей Республики Беларусь: результаты терапии за 15-летний период / Л. П. Киселев, О. В. Алейникова // IX Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии : тез., Минск, 15–17 июня 2016 г. – [Опубл. в журн.] Евраз. онколог. журн. – 2016. – Т. 4, № 2. – С. 181–182.

39. Экспрессия молекулярных маркеров в ткани опухоли в качестве прогностического фактора при саркомах костной ткани [Электронный ресурс] / Л. П. Киселев, Т. В. Савицкая, А. Г. Жуковец, О. В. Алейникова // Достижения мед. науки Беларуси. – 2017. – Режим доступа: http://med.by/dmn/book.php?book=17-18_1. – Дата доступа: 02.08.2018.

40. Киселев, Л. П. Экспрессия генов MGST1 и GSTM4 в ткани опухоли при остеосаркоме и саркоме Юинга в зависимости от нозологии, распространенности процесса и клинического исхода заболевания / Л. П. Киселев, Т. В. Савицкая, О. В. Алейникова // Перспективы детской гематологии-онкологии: мультидисциплинарный подход – 2018 : сб. материалов IX межрегион. совещания НОДГО, С.-Петербург, 26–28 апр. 2018 г. – [Опубл. в журн.] Рос. журн. дет. гематологии и онкологии. – 2018. – Спец. номер. – С. 38–39.

Инструкции по применению, утвержденные Министерством здравоохранения Республики Беларусь

41. Комплексный метод определения молекулярных маркеров ангиогенеза как факторов прогноза рецидива у детей со злокачественными опухолями : инструкция по применению № 110-1111 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 23.12.2014 / ГУ «Респ. науч.-практ. центр дет. онкологии, гематологии и иммунологии» ; сост. Т. В. Савицкая, Л. П. Киселев, Н. В. Липай, О. В. Алейникова. – Минск, 2011. – 9 с.

42. Метод прогнозирования эффективности лечения пациентов моложе 31 года, страдающих саркомами костей : инструкция по применению № 128-1217: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 22.12.2017 / ГУ «Респ. науч.-практ. центр дет. онкологии, гематологии и иммунологии», «Респ. науч.-практ. центр онкологии и мед. радиологии им. Н.Н. Александрова» ; сост. Л. П. Киселев, Т. В. Савицкая, А. Г. Жуковец, О. В. Алейникова. – Минск, 2017. – 8 с.

Патент на изобретение

43. Способ прогнозирования риска рецидива злокачественной опухоли: пат. ВУ 18697 / Т. В. Савицкая, Л. П. Киселев, Н. В. Липай, О. В. Алейникова. – Опубл. 30.06.2013.

РЭЗІЮМЭ

Кісялёў Леанід Пятровіч

Пухліны сямейнасці саркомы Юінга: дыягностыка, прагназаванне і лячэнне з улікам малекулярнага профілю наватворы

Ключавыя словы: саркома Юінга, прымітыўная нейраэктадэर्मальная пухліна, прагназаванне, малекулярныя фактары прагнозу, гены, ангиогенез, рэцэптары інсулінападобнага фактару росту, мікрасамальная глютатыён-S-трансфераза, персаналізацыя лячэння, антыангіагенная тэрапія.

Мэта даследавання: павялічыць эфектыўнасць лячэння пацыентаў, пакутуючых на пухліны сямейнасці саркомы Юінга шляхам ужывання антыангіагеннай тэрапіі пры раннім прагназаванні развіцця рэцыдыву наватворы на падставе малекулярных маркераў ангіягенезу.

Аб'ект даследавання: дадзеныя аб 260 пацыентах, якім з 1999 па 2016 гг. праведзены дыягнастычны комплекс і лячэнне з нагоды сарком костак і мяккіх тканін.

Метады даследавання: анамнестычныя, клінічныя, інструментальныя, марфалагічныя, малекулярна-біялагічныя, статыстычныя.

Атрыманыя вынікі і іх навуковая навізна: Аддаленыя вынікі лячэння пацыентаў, пакутуючых на пухліны сямейнасці саркомы Юінга ў Рэспубліцы Беларусь, складаюць 52,8% для ўсёй кагорты, 67,0% для лакалізаваных і 19,9% для метастатычных формаў, што адпавядае стандартам краін з развітой сістэмай аховы здароўя. Класічныя клініка-паталагічныя характарыстыкі пацыентаў не дазваляюць прагназаваць рэзістэнтнасць наватворы да сістэмнай тэрапіі і развіццё рэцыдыву захворвання пры лакалізаваных формах анкалагічнага працэсу. Клінічная важлівасць шырокага спектру генаў, уключаючы VEGFA165, VEGFA121, VEGFA189, VEGFC, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, TF, TFPI-1, TFPI-2, HIF-1 α , PAI-1, uPA, MGST1, GSTM4, IGF1R, IGF2R даследавана для пацыентаў з саркомамі костак і мяккіх тканін. Распрацавана мадэль прагназавання вынікаў тэрапіі пацыентаў на падставе экспрэсіі малекулярных маркераў ангіягенезу ў тканіны наватворы пры першаснай дыягностыцы. Выкарыстанне антыангіагеннай тэрапіі для пацыентаў, якія пакутуюць на лакалізаваныя формы пухлін сямейнасці саркомы Юінга эфектыўна (павялічвае 5-гадовую безпадзейную выжывальнасць на 22,7% ($p = 0,0450$)) пры персанальным прагназаванні хіміярэзістэнтнасці наватворы на падставе экспрэсіі малекулярных маркераў ангіягенезу ў тканіны пухліны

Рэкамендацыі па выкарыстанні: вынікі даследавання магчыма выкарыстоўваць ва ўстановах аховы здароўя, якія аказваюць медыцынскую дапамогу пацыентам, пакутуючых на пухліны сямейства саркомы Юінга.

Галіна ўжывання: анкалогія

РЕЗЮМЕ

Киселев Леонид Петрович

Опухоли семейства саркомы Юинга: диагностика, прогнозирование и лечение с учетом молекулярного профиля новообразования

Ключевые слова: саркома Юинга, примитивная нейроэктодермальная опухоль, факторы прогноза, гены, ангиогенез, рецепторы инсулиноподобного фактора роста, микросомальная глутатион-S-трансфераза, персонализация лечения, антиангиогенная терапия.

Цель исследования: повысить эффективность лечения пациентов, страдающих опухолями семейства саркомы Юинга (ОССЮ) путем применения антиангиогенной терапии при прогнозировании развития рецидива новообразования на основании молекулярных маркеров ангиогенеза (АГ).

Объект исследования: данные о 260 пациентах, которым с 1999 по 2016 гг. проведен диагностический комплекс и лечение по поводу сарком костей и мягких тканей.

Методы исследования: анамнестические, клинические, инструментальные, морфологические, молекулярно-биологические, статистические.

Полученные результаты и их новизна: Отдаленные результаты лечения пациентов, страдающих ОССЮ в Республике Беларусь, составляют 52,8% для всей когорты, 67,0% для локализованных и 19,9% для метастатических форм, что соответствует стандартам стран с развитой системой здравоохранения. Классические клинико-патологические характеристики пациентов не позволили прогнозировать резистентность новообразования к системной терапии и развитие рецидива заболевания при локализованных формах онкологического процесса. Клиническая значимость активности широкого спектра генов, включая VEGFA165, VEGFA121, VEGFA189, VEGFC, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, TF, TFPI-1, TFPI-2, HIF-1 α , PAI-1, uPA, MGST1, GSTM4, IGF1R, IGF2R исследована для пациентов с саркомами костей и мягких тканей. Разработана модель прогнозирования результатов терапии пациентов на основании экспрессии молекулярных маркеров АГ в ткани новообразования при первичной диагностике. Использование антиангиогенной терапии для пациентов, страдающих локализованными формами ОССЮ эффективно (увеличивает 5-летнюю бессобытийную выживаемость на 22,7% ($p=0,0450$)) при персональном прогнозировании химиорезистентности новообразования на основании экспрессии молекулярных маркеров АГ в ткани опухоли.

Рекомендации по использованию: результаты исследования могут быть использованы в учреждениях здравоохранения, занимающихся оказанием помощи пациентам, страдающим опухолями семейства саркомы Юинга.

Область применения: онкология

SUMMARY

Kisialeu Leanid P.

**Ewing sarcoma family tumors: diagnosis, prognosis
and treatment based on the molecular profile of the neoplasm**

Keywords: Ewing's sarcoma, primitive neuroectodermal tumor, prognosis factors, genes, angiogenesis, insulin-like growth factor receptors, microsomal glutathione-S-transferase, personalization of treatment, antiangiogenic therapy.

Aim: to improve the treatment result for patients with Ewing's sarcoma family tumors through the antiangiogenic therapy personally for cases with chemoresistance (predicted by angiogenesis markers).

Patients and methods: data from 260 patients whom diagnostic and treatment performed from 1999 to 2016. Clinical, instrumental, morphological, molecular biological, statistical methods of investigation were used.

Results and their novelty: The long-term treatment results for patients with Ewing's sarcoma family tumors in the Republic of Belarus are 52.8% for the whole cohort, 67.0% for the localized and 19.9% for the metastatic forms; these values are comparable to worldwide standards. Classical clinical and pathological characteristics of patients do not allow surely predict the resistance to systemic therapy and the development of a relapse for localized forms of disease. The clinical significance of a wide range of genes, including VEGFA165, VEGFA121, VEGFA189, VEGFC, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, TF, TFPI-1, TFPI-2, HIF-1 α , PAI-1, uPA, MGST1, GSTM4, IGF1R, IGF2R has been studied for patients with bone and soft tissue sarcomas. A forecasting model based on molecular angiogenesis markers expression in the tumor tissue has been developed. The use of anti-angiogenic therapy for patients with localized forms of Ewing's sarcoma family tumors is effective (increases 5-year event-free survival by 22.7% ($p = 0.0450$)) for personal appointment for patients with a poor prognosis (based on the expression of molecular markers angiogenesis in the tumor tissue).

Recommendations for the use of the results: results of this study can be applied in health care facilities providing care to patients with Ewing's sarcoma family tumors.

Field of application: oncology.

Киселев Леонид Петрович

**ОПУХОЛИ СЕМЕЙСТВА САРКОМЫ ЮИНГА:
ДИАГНОСТИКА, ПРОГНОЗИРОВАНИЕ И ЛЕЧЕНИЕ
С УЧЕТОМ МОЛЕКУЛЯРНОГО ПРОФИЛЯ
НОВООБРАЗОВАНИЯ**

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук
по специальности 14.01.12 – онкология

Ответственный за выпуск Л.П. Киселев

Подписано в печать 17.04.2019г. Формат 60×80 1/16

Бумага офсетная. Печать цифровая.

Усл. печ. 3,16 л. Уч.-изд. 2,8 л. Тираж 60 экз. Заказ 77.

Отпечатано в типографии РУП «НПЦ НАН Беларуси

по механизации сельского хозяйства»

220049, г. Минск, ул. Кнорина, 1, корп. 3.

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/341 от 02.06.2014г.

