

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Dr Lejla M. Paripović

**ZNAČAJ KLINIČKIH, BIOMOLEKULARNIH
I PATOLOŠKIH PARAMETARA ZA
PROGNOZU EWING SARKOMA KOSTI
KOD DECE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Dr Lejla M. Paripović

**SIGNIFICANCE OF CLINICAL,
BIOMOLECULAR AND PATHOLOGICAL
PARAMETERS FOR OUTCOME OF
EWING'S SARCOMA OF BONE IN
CHILDREN**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

MENTOR:

- **Prof. Dr Marina Nikitović**, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

- **Prof. Dr Dragana Vujić**, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
- **Prof Dr Lidija Krivokapić Dokmanović**, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
- **VNS dr sc Radmila Janković**, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Zahvalnica

Najveću zahvalnost za izradu ove doktorske disertacije dugujem svojoj mentorki, Prof dr Marini Nikitović, na neizmernoj profesionalnoj i ljudskoj pomoći i podršci.

Takođe, zahvaljujem članovima komisije na nesebičnoj stručnoj pomoći i sugestijama tokom realizacije disertacije.

Zahvaljujem se svim kolegama, pre svega kolegama sa Instituta za ortopedsko-hirurške bolesti "Banjica", Prof dr Jeleni Sopti, patologu sa Instituta za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu kao i ostalim članovima tima iz drugih ustanova koji su na bilo koji način učestvovali u lečenju ovih pacijenata.

Veliku zahvalnost upućujem članovima tima sa Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, pre svega sa Službe za pedijatrijsku onkologiju kao i sa Klinike za radioterapiju, Klinike za radiološku dijagnostiku i Službe za naučnoistraživačku i obrazovnu delatnost, bez čije saradnje realizacija ove disertacije ne bi bila moguća.

Izuzetno sam zahvalna Dušici Gavrilović, master matematike i Ani Ivković, višem bibliotekaru, na velikoj pomoći i korisnim savetima tokom izrade disertacije.

Zahvaljujem se svim učesnicima istraživanja, kao i članovima njihovih porodica, na saglasnosti da učestvuju u studiji.

Mojoj porodici i prijateljima dugujem veliku zahvalnost na ljubavi, podršci i pomoći tokom svih ovih godina.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svojoj porodici i ćerki Mini

ZNAČAJ KLINIČKIH, BIOMOLEKULARNIH I PATOLOŠKIH PARAMETARA ZA PROGNOZU EWING SARKOMA KOSTI KOD DECE

Sažetak

Uvod: Savremenim multidisciplinarnim lečenjem Ewing sarcoma (ES) koji podrazumeva primenu hemioterapije i lokalne kontrole bolesti u vidu hirurgije i/ili zračne terapije značajno je poboljšano preživljavanje pacijenata. Cilj ove studije je da se analiziraju rezultati lečenja dece obolele od ES kosti u referentnom centru u Srbiji kao i da se definišu mogući prognostički parametri a sve u cilju selektovanja pacijenata koji pripadaju različitim prognostičkim grupama (standardni rizik, visoki rizik) i planiranja optimalnog terapijskog pristupa.

Metod: Po svom karakteru ovo je bila retrospektivno-prospektivna studija koja je obuhvatila grupu od 107 pacijenata obolelih od ES kosti koji su lečeni savremenim multidisciplinarnim pristupom na Službi za pedijatrijsku onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije (IORS) u periodu od januara 2000 godine do decembra 2014 godine. Tok i ishod bolesti su praćeni do decembra 2016 godine.

Rezultati: Od ukupno 107 pacijenata, 64 (59.81%) je bilo muškog a 43 (40.19%) ženskog pola (odnos 1.48:1). Srednji uzrast pacijenata je bio 13.07 godina (rang 3-19), oboleli pacijenti su češće uzrasta ispod 14 godina (56.7%). Najčešća lokalizacija tumora je bila u predelu ekstremiteta (48.6%) i karlice (25.23%). Tumor veći od 8 cm dijagnostikovao je kod 61.68% pacijenata. Vrednost LDH na prijemu je bila povišena kod 45.79% pacijenata. Metastatski oblik bolesti potvrđen je kod 31.78% pacijenata i to: 50% pacijenata je imalo izolovane plućne metastaze, 26.47% izolovane koštane metastaze dok je 23.53% metastatskih pacijenata imalo i koštane i plućne metastaze. Histopatološki odgovor na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju je bio dobar kod 39 /65 a loš kod 26/65 pacijenata kod kojih je učinjena hirurška intervencija nakon neoadjuvantne hemioterapije. Kao jedini modalitet lokalne kontrole bolesti, hirurgija je sprovedena kod 24 (22.43%) pacijenata, zračna terapija takođe kod 24 (22.43%) pacijenata dok su oba modaliteta lokalnog lečenja (hirurgija i zračna terapija) sprovedena kod 51.4% pacijenata. U trenutku zatvaranja studije, 43.93% pacijenata je bilo živo dok je kod 56.07% pacijenata došlo do smrtnog ishoda.

Medijana praćenja je iznosila 36.92 meseci (1.94-201.8).Ukupno 5-godišnje preživljavanje (OS) za celu grupu od 107 pacijenata iznosi 43.8%, 5-godišnje preživljavanje bez događaja (EFS) 38.0% dok petogodišnje preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) u ispitivanoj grupi od 76 pacijenata iznosi 53.4%.Pacijenti sa lokalizovanim oblikom bolesti imaju znatno bolje preživljavanje od pacijenata sa metastatskim oblikom bolesti što je potvrđeno i u našem ispitivanju (56.4% prema 17.6%, $p < 0.0001$). Naša analiza je potvrdila da pacijenti sa izolovanim metastazama pluća imaju bolje preživljavanje (5 godina OS = 35.3%) od pacijenata sa ekstrapulmonalnim metastazama ($p = 0.0014$).

Ispitivanjem uticaja pojedinih prognostičkih parametara (uzrast, lokalizacija tu promene, veličina tumora, vrednost s-LDH, stadijum bolesti, histopatološki odgovor na primenjenu neoadjuvantnu (preoperativnu) hemioterapiju na ukupno preživljavanje i na preživljavanje bez događaja utvrdili smo da su lokalizovan oblik bolesti, uzrast ispod 14 godina, normalan nivo s-LDH, veličina tumora manja od 8 cm kao i dobar histopatološki odgovor na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju prognostički pokazatelji povoljnijeg ishoda bolesti u ovoj studiji.

U studiju je uključeno i 20 pacijenta kod kojih je sprovedena analiza genskih ekspresija *TGFβ1* i *SERPINI1* gena. U odnosu na srednju vrednost i medijanu, pokazana je dvostruko viša ekspresija *TGFβ1* kod pacijenata sa lokalizovanom u odnosu na pacijente sa metastatskom bolešću (0,84 vs. 0,47 i 0,62 vs. 0,30) i viši nivo ekspresije *SERPINI1* gena u grupi pacijenata sa metastatskim oblikom (0,44 vs. 0,74).

Zaključak: Identifikacija kliničkih, biomolekularnih i patohistoloških prognostičkih parametara može dovesti do razvoja adaptiranih terapijskih protokola na osnovu procenjene grupe rizika a sve u cilju poboljšanja rezultata lečenja i smanjenja neželjenih efekata i kasnih sekvela lečenja uz očuvanje kvaliteta života pacijenata sa Ewing sarkomom.

Ključne reči: Ewing sarkom, kosti, deca, prognostički parametri, preživljavanje

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Onkologija

SIGNIFICANCE OF CLINICAL, BIOMOLECULAR AND PATHOLOGICAL PARAMETERS FOR OUTCOME OF EWING'S SARCOMA OF BONE IN CHILDREN

Abstract

Introduction: Modern multidisciplinary treatment of Ewing's sarcoma that implies usage of chemotherapy and local disease control in form of surgery and/or radiotherapy has significantly improved survival of patients. The purpose of this study was to analyze the results of treatment of children with ES of bone treated in referral centers in Serbia as well as to define possible prognostic parameters and all of it is aimed at selecting the patients that belong to different prognostic groups (standard risk, high risk) and planning of optimal treatment approach.

Method: In its character, this is a retrospective-prospective study that includes a group of 107 patients with Ewing sarcoma of bone treated according to a modern multidisciplinary approach at the Department for Pediatric Oncology of the Institute for Oncology and Radiology of Serbia (IORS) in period from January of 2000 until December of 2014. The course and the outcome of the disease were monitored until 31 of December of 2016.

Results: Out of totally 107 patients 64 (59.81%) were male and 43 (40.19%) were female (ratio 1.48:1) The median age of patients was 13.07 years (range 3-19), the patients were for the most part under the age of 14 (56,7%). The most common sites of the tumor were in the region of extremities (48.6%) and pelvis (25.23%). Tumor larger than 8cm were diagnosed in 61.68% patients. LDH at initial diagnosis was increased in 45.79% of patients. Metastatic disease was confirmed in 31.78%: 50% had isolated lung metastases, 26, 47% had isolated bone metastases while 23,53% metastatic patients had both bone and lung metastases. Histopathological response to neoadjuvant chemotherapy was "good" in 39/65 and "poor" in 26/65 patients that underwent surgery after adjuvant chemotherapy. As the only modality of local disease control, surgery was performed in 24 (22,43%) patients, radiotherapy in 24 (22,43%), as well, while both local treatment modalities (surgery and radiotherapy) were

performed in 51,4% patients. At cutoff date, 43,93% patients were alive while 56,07% patients died. Median follow up was 36,92 months (1.94-201.8). The overall 5-year survival for the whole group of 107 patients was 43,8%, 5-year event-free survival (EFS) was 38,0% while 5-year disease free survival (DFS) in the observed group of 76 patients was 53,4%.

Patients with localized disease had significantly better survival rate than the patients with metastatic disease, which was also confirmed by our study (56,4% to 17,6%, $p < 0.0001$). Our analysis confirmed that patients with isolated lung metastases had better survival rates (5-year overall survival was 35.3%) than the patients with extra pulmonary metastases ($p = 0.0014$). Analyzing the impact of respective prognostic parameters (age, tumor site, tumor size, LDH level, disease stage, histopathological response to the neoadjuvant (pre-operational) chemotherapy) to overall survival and event-free survival, we established that localized form of the disease, the age > 14 , normal s-LDH level, tumor size > 8 cm as well as good histopathological response to neoadjuvant chemotherapy are good prognostic indicators of more favorable outcome in this study. The study also includes 20 patients that underwent the analyses of gene expressions *TGF β 1* and *SERPINI* genes. As far as the mean value and median are concerned, the study showed twice as much expression of *TGF β 1* in patients with localized disease than in patients with metastatic disease (0.84 vs. 0.47 and 0.62 vs. 0.30) and higher level of *SERPINI* gene expression in the group of patients with metastatic form of the disease (0.44 vs. 0.74).

Conclusion: Identification of clinical, biomolecular and pathological prognostic parameters may result in development of adapted therapeutic protocols based on estimated risk groups all of which should help improving the results of treatment and reducing side effects and late treatment sequelae with preserving the quality of life of the patients with Ewing sarcoma.

Key words: Ewing sarcoma, bone, children, prognostic parameters, survival

Field of Science: Medicine

Narrow field of science: Oncology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA	1
1.2. NOMENKLATURA	2
1.3. GENETIČKE KARAKTERISTIKE	3
1.4. PATOHISTOLOGIJA	9
1.5. KLINIČKA SLIKA	10
1.6. DIJAGNOSTIČKE PROCEDURE	16
1.7. PROGNOŠTIČKI PARAMETRI	22
1.8. TERAPIJSKE GRUPE	27
1.9. TERAPIJSKI PRISTUP	28
1.9.1. HEMIOTERAPIJA	28
1.9.2. LOKALNA KONTROLA BOLESTI	34
1.9.3. HIRURŠKO LEČENJE	35
1.9.4. ZRAČNA TERAPIJA	42
1.9.5. VISOKODOZNA HEMIOTERAPIJA	51
1.10. METASTASKI OBLIK BOLESTI	53
1.11. RECIDIVANTI EWING SARKOM	54
1.12. KASNI EFEKTI LEČENJA	57
1.13. KVALITET ŽIVOTA	59
2. CILJEVI RADA	60
3. MATERIJAL I METODE	61
3.1. PACIJENTI	61
3.2. LEČENJE	67
3.3. TOKSIČNOST TERAPIJE	73
3.4. VREME PRAĆENJA	73
3.5. STATISTIČKA METODOLOGIJA	74

4. REZULTATI	75
4.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE PACIJENATA I OBOLJENJA	75
4.2. KARAKTERISTIKE LEČENJA	78
4.3. ISHOD LEČENJA	86
4.4. PROGNOŠTIČKI PARAMETRI, UKUPNO PREŽIVLJAVANJE I PREŽIVLJAVANJE BEZ DOGAĐAJA	90
5. DISKUSIJA	119
6. ZAKLJUČCI	142
7. LITERATURA	145

ZNAČAJ KLINIČKIH, BIOMOLEKULARNIH I PATOLOŠKIH PARAMETARA ZA PROGNOZU EWING SARKOMA KOSTI KOD DECE

1. UVOD

1.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Ewing sarkom (ES) je drugi po učestalosti primarni maligni tumor kosti u detinjstvu i adolescenciji posle osteosarkoma. Godišnja incidencija ES u populaciji mlađoj od 20 godina iznosi oko 2,9 na milion. Incidencija ES se nije menjala poslednjih trideset godina (1,2,3,4).

Ovaj tip malignog tumora češće se javlja kod belaca, retko se javlja kod Afroamerikanaca i kod Amerikanaca azijskog porekla. Takođe, ES se ređe javlja kod populacije iz Afrike i Azije u odnosu na populaciju bele rase. Incidencija ES kod belaca najmanje je devet puta veća nego kod crnaca za razliku od osteosarkoma, koji ima relativno jednaku rasnu raspodelu. U podsaharskoj Africi, incidencija Ewing sarkoma je slična onoj koja se viđa u Severnoj Americi kod osoba afričkog porekla (5).

Opisana rasna distribucija ne dovodi do povećanja sklonosti translokacije na tački prekida za Ewing sarkom 1 (eng: Ewing Sarcoma Breakpoint Region 1 - *EWSRI*) lokusu kod ljudi afričkog porekla, niti postoje razlike u pojedinačnim nukleotidnim polimorfizmima u *EWSRI* lokusu između ljudi sa i bez ES (6). Međutim, u afričkom stanovništvu postoji manje Alu elemenata u intronu 6 u blizini translokacijskih tačaka prekida *EWSRI*. S obzirom da Alu elementi mogu biti potencijalna mesta rekombinacije gena u kanceru, ovaj nalaz može objasniti razliku u učestalosti (6).

Polovina svih ES se javlja kod dece uzrasta 10-20 godina. Može se javiti i u kasnijoj životnoj dobi ali se incidencija smanjuje nakon druge decenije života. Srednja vrednost uzrasta pacijenata obolelih od ES je 15 godina a više od 50% pacijenata su adolescenti. Opisani su slučajevi ES u neonatalnom periodu kao i kod odojčadi (12,13).

Ewing sarkom ima veću učestalost javljanja kod muškog pola (odnos muškog i ženskog pola je 1.2-1.5: 1) (15).

Etiološki faktori nastanka Ewing sarkoma su nepoznati. Opisani su sporadični slučajevi gde je otkriveno da rođaci pacijenata obolelih od ES imaju povećanu incidenciju za neuroektodermalne tumore i maligne tumore želuca (1).

Faktori rizika za pojavu ES su još uvek nedovoljno jasni. Relativno retko se javlja kao sekundarni malignitet (16).

Genetska epidemiologija ES je istražena na nivou genoma i identifikovana su tri rizična lokusa. Ovaj obrazac ukazuje na genetsku komponentu bolesti. Velike genomske studije Studija asocijacije za genome identifikovale su region na hromozomu 10q21 koji je povezan sa povećanim rizikom za ES (7,8,9).

Sekvenciranje nove generacije ovog regiona identifikovalo je polimorfizam u genu *EGR2* (eng: Early Growth Response 2) koji je povezan sa genskim proizvodom fuzije *EWSR1-FLII* (eng: Friend leukemia integration 1 transcription factor-*FLII*) koji se vidi kod većine pacijenata sa ES. Polimorfizam povezan sa povećanim rizikom češći je kod belaca nego kod crnaca ili Azijata (10,11).

1.2. NOMENKLATURA

ES je prvi opisao James Ewing, 1921 godine, kao tumor koji zahvata duge kosti i koji je osetljiv na zračnu terapiju, dok je poreklo ovog tumora objašnjeno tek sredinom osamdesetih godina prošlog veka (17).

"Ewing sarkom" je zvanični termin Svetske zdravstvene organizacije (eng: World Health Organisation-WHO, SZO) za ovaj maligni tumor (18). Savremeni literaturni podaci ukazuju na postojanje deset podtipova Ewing sarkoma (14). Ranije definisane razlike zasnovane na lokalizaciji i histološkim karakteristikama koje uključuju Ewing-ov sarkom kosti, ekstraskeletni ES, Askin tumor torakalnog zida i periferni primitivni neuroektodermalni tumor (pPNET), poznat i kao periferni neuroepiteliom, više nisu aktuelne (19).

1.3. GENETIČKE KARAKTERISTIKE

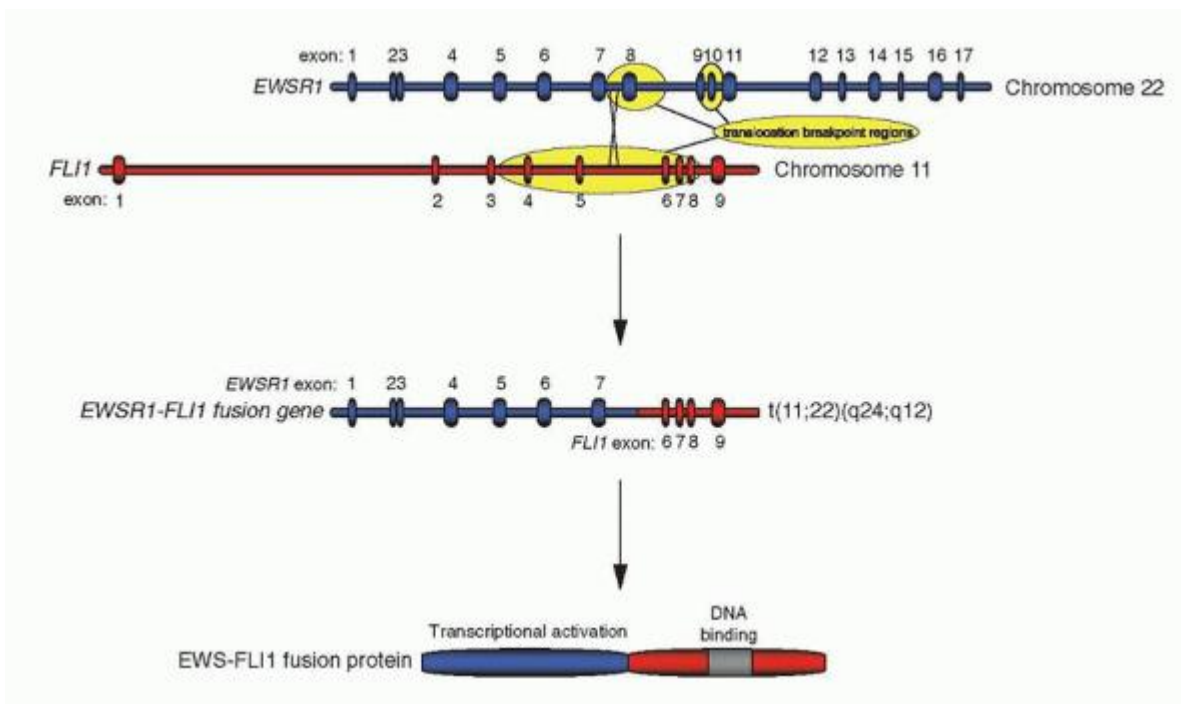
Preko 85% svih Ewing sarkoma sadrži translokaciju (11;22) koja spaja *EWSR1* gen na hromozomu 22 sa *FLII* genom na hromozomu 11. Ova genska karakteristika definiše porodicu Ewing sarkoma. Preuređivanje (translokacija) genetičkog materijala između hromozoma 22 i 11 se označava kao t(11; 22)(19). Alternativne translokacije su *EWS-ERG* t(21;22), *EWS-ETV* t(7;22), i *EWS-FEV* t(2;22), a zajedničko im je da sve uključuju *EVS* gen čiji je produkt *EVS* protein iz ETS familije proteina. U skorije vreme je otkriveno da se oko 4% ES karakteriše intrahromozomalnom X-fuzijom koja dovodi do stvaranja fuzionih produkta *BCOR* (koji kodira BCL6 represor) i *CCNB3* (koji kodira testis-specifični ciklin B3) (20,21).

ES karakteriše relativno jednostavan kariotip sa samo nekoliko numeričkih i strukturnih aberacija. Najzastupljenija je recipročna translokacija između hromozoma 11 i 22, t(11; 22) (q24;q12) koja se smatra karakterističnom za ES (19). Dodatne strukturne promene se javljaju na hromozomima 1 i 16 kod oko 20% tumora, najčešće dovodeći do povećanja 1q i gubitka 16q ili formiranja izmenjenog hromozoma der(1;16)(22). Među brojnim promenama hromozoma, trizomija 8 i/ili 12 je primećena kod oko polovine, odnosno jedne trećine slučajeva (22). Delecija hromozomskog regiona 9p21 koji sadrži *CDKN2A* gen se javlja kod oko 13% ES i najčešće se određuje citogenetskim metodama, ali se može proceniti i fluorescentnom in situ hibridizacijom (FISH metodom) (23).

Metodama polimerazno lančane reakcije u realnom vremenu (eng. Real-Time Polymerase Chain Reaction RT-PCR) i FISH, dokazuje se prisustvo t (11;22) (q24;q12) u 85% Ewing sarkoma što koreliše sa visokom ekspresijom CD99, sijaloglikoproteina na ćelijskoj površini (24). Rezultati studija na model sistemima sugerišu da CD99 može biti direktno regulisan od strane *EWS-FLII* (10).

Kod oko 15% histopatološki definisanog CD99-pozitivnog Ewing sarkoma nedostaje klasična specifična translokacija ES. Međutim, u većini ovih slučajeva, dokazi o rearanžmanu gena *EWSR1* mogu se dobiti FISH analizom korišćenjem probe koja se vezuje za ES tačku prekida na hromozomu 22. U ovim slučajevima pojavljuju se alternativne

translokacije koje povezuju 5' deo *EWSR1* sa 3' delom drugih gena koji su povezani sa *FLII* (25, 26).



Slika 1. Uzajamna translokacija između hromozoma 11 i 22 rezultira stvaranjem fuzijskog gena *EWSR1-FLII* na izmenjenom hromozomu 22 koji kodira himerni transkripcijski faktor sa N-terminalnim transkripcionim regulatornim domenom koji potiče iz *EWS*-a i *ETS*-specifičnog DNK-vezujućeg domena izvedenog iz *FLII*.

Preuzeto iz: Hawkins D, Brennan B, Bolling T, et al. Ewing sarcoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. Principles and Practice of Pediatric Oncology. ed 7. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins; 2016. pp. 855–1032.

FLII je član ES familije transkripcionih faktora, a to je i svaki od alternativnih fuzionih partnera. Najčešći alternativni fuzioni partner je *ERG* na hromozomu 21q22, koji se nalazi u 10% ES (25). Ostali partneri uključuju *ETV1* na hromozomu 7p22, *ETV4 (EIAF/PEA3)* na hromozomu 17q12 i *FEV* na hromozomu 2q33, od kojih je svaki zastupljen u manje od 1% slučajeva (Slika 1) (26). Pretpostavlja se da fuzija *EWS* u DNK-vezujućem delu članova *ETS* familije koja se odnosi na *FLII* rezultira u fuzionom proteinu sa vrlo sličnom funkcijom. Iako

su *EWSR1* i *FLII* geni orijentisani u istom pravcu na dugim kracima hromozoma 22 i 11 koji omogućavaju jednostavnu translokaciju, *ERG* je orijentisan u suprotnom pravcu na hromozomu 21q. Citogenetski ekvivalent fuzije gena *EWSR1-ERG* nije uvek lako prepoznatljiv i često uključuje intersticijske translokacije ili kompleksne rearanžmane koji uključuju i više od dva hromozoma. Noviji rezultati opisuju fuzije između *FUS (TLS)* i *ERG* ili *FEV* u ES (26). *FUS* je čvrsto vezan za *EWS*, a zajedno sa *TAF15* (TAF_{II}68 / RPB56 / TAF2N) pripada FET (*FUS, EWS, TAF15*) familiji proteina koji su uključeni u različite hromozomske rearanžmane kod malignih tumora (Tabela 1)(2).

"*FET-ETS*" fuzije su prisutne u skoro svim slučajevima ES. Nedavni izveštaji opisuju ne-*ETS* fuzije u tumorima malih okruglih ćelija sa histološkim sličnostima sa ES, kao što su *EWS-ZNF278, EWS-POU5F1, EWS-SP3* i *EWS-NFATc2*, kao i *CIC-DUKS4* i *BCOR-CCNB3* (18,26). Iako su ovi tumori histološki slični ES, dostupno je relativno malo podataka o molekularnim mehanizmima njihovog razvoja kao i terapijskom odgovoru na standardnu terapiju koja se primenjuje kod ES. Prema najnovijoj klasifikaciji SZO, ova grupa se označava kao sarkomi slični Ewingu ("Ewing like sarcoma") (18).

ES je definisan prisustvom *FET-ETS* genskog rearanžmana i CD99 (eng: Cluster of differentiation 99) kao surogat markera sa visokom ekspresijom. Pojedini članovi ove porodice tumora su definisani različitim stepenom neurogljalne diferencijacije sa slabo diferentovanim Ewing sarkomom na jednom kraju i mnogo zrelijim perifernim PNET-ovima na drugom kraju. Zahvaljujući postojanju molekularnih analiza za jasno potvrđivanje prisustva *FET-ETS* genskog rearanžmana, pokazano je da se ES može pojaviti na različitim vanskeletnim mestima. Opisani su slučajevi ES lokalizovanog u predelu pluća, dojke, gastrointestinalnog trakta, bubrega kao i nadbubrežne žlezde (2).

Rearanžman gena *EWSR1-ETS* i ređe *FUS-ETS* su patognomonični za Ewing sarkom, što ukazuje da ovi rearanžmani imaju osnovnu ulogu u pokretanju maligne transformacije povezane sa nastankom ES. Dokazano je da je ekspresija fuzijskog proizvoda glavna karakteristika u Ewing sarkomu (2). Iako većina rearanžmana gena *EWSR1-FLII* dovodi do proizvodnje himernih proteina sa *EWS* N-terminalnim delom spojenim sa karboksiterminalnim delom *FLII*, jedna trećina rearanžmana gena u ES uključuje tačke prekida u

EWSR1 egzon 8 ili intron 8, što dovodi do neuspelih fuzija sa *FLII*. U ovim slučajevima, okvir čitanja se uvek obnavlja, spajanjem iz egzona 8, što dovodi do konzistentne ekspresije kompletnog funkcionalno fuzionog proteina u tumorima. Ovaj nalaz predstavlja snažan dokaz za suštinsku ulogu *EWS-ETS* fuzionih proteina ne samo u nastanku, već i u održavanju tumora. Ovu tvrdnju podržavaju i rezultati eksperimentalnih studija. *EWS-FLII* i slični fuzionni proteini transformišu *NIH3T3* (imortalizovanu ćelijsku liniju fibroblasta) in vitro, čineći ga tumorogenim kod miševa a antagonisti *EWS-FLII* (antisens RNA, antisens oligonukleotidi, mali inhibitorni RNK) blokiraju rast ćelija ES in vitro i kod tumorskih ksenografta kod imunodeficientnih miševa (27,28,29).

Fenotip tumora dobijen kod imunodeficientnih miševa nakon transplantacije *EWS-ETS* transformisanih *NIH3T3* ćelija jasno se razlikuje od fenotipa nakon transformacije sa drugim *EWS* fuzionim transkripcionim faktorima, koji podseća na čovečiji ES sa parcijalnom neuralnom diferencijacijom. Ovo ukazuje da produkt translokacije indukuje fenotip ES, a ne fenotip koji je nastao kao posledica ćelijskog porekla tumora. Takva tvrdnja je podržana i strukturom genske fuzije koja je primećena u humanim tumorima sa *EWSR1-CHOP* i *FUS-CHOP* koji karakterišu miksoidni liposarkom, a kod *EWSR1-TEC / CHN* i *TAF15-TEC / CHN* koji se nalaze u vanskeletnom miksoidnom hondrosarkomu. S obzirom da je prisutna u malom broju akutnih mijeloidnih leukemija kao i u malom broju ES, *FUS-ERG* fuzija nije specifična (27,28).

Minimalni deo transformišućeg proteina uključuje prve 82 amino kiseline *EWS* (kodirane sa prva četiri egzona) i DNK vezujući domen *ETS* partnera (u *FLII* kodiranom poslednjem egzonu (27). Međutim, za potpuni potencijal transformacije, *EWSR1* egzonima od 1 do 7 i u *EWSR1-FLII* fuzijama, neophodno je uključivanje terminalnog C domena *FLII*. Uprkos značajnim varijacijama u arhitekturi himernih *EWS-ETS* RNK u ES, *EWSR1* egzoni 1 do 7 i DNK-vezujući domen koji kodiraju egzone *ETS* fuzionog partnera uvek su prisutni u genskim produktima translokacije ES (20).

Najčešćem fuzioniom genu u ES se pridružuje *EWSR1* egzon 7 u *FLII* egzon 6 ili egzon 5 u 51% i 27% slučajeva (30).

Tabela 1. Rearanžman povezan sa Ewing sarkomom, “Ewing like sarcoma” i ostalim tumorima koji uključuju *EWSR1*, *FUS* ili *TAF 15* gene

Tip tumora	Rearanžman	Fuzioni geni
Ewing sarkom	t(11;22)(q24;q12)	<i>EWSR1/FLI1</i>
	t(21;22)(q22;q12)	<i>EWSR1/ERG</i>
	t(7;22)(p22;q12)	<i>EWSR1/ETV1</i>
	t(17;22)(q12;q12)	<i>EWSR1/ETV4</i>
	t(2;22)(q35;q12)	<i>EWSR1/FEV</i>
	t(16;21)(p11;q22)	<i>FUS/ERG</i>
	t(2;16)(q35;p11)	<i>FUS/FEV</i>
Sarkomi slični Ewing-u	t(1;22)(p36.1;q12)	<i>EWSR1/ZNF278</i>
	t(6;22)(p21;q12)	<i>EWSR1/POU5F1</i>
	t(2;22)(q31;q12)	<i>EWSR1/SP3</i>
	Prstenasti hromozom koji sadrži deo hromozoma 20 i 22	<i>EWSR1/NFATc2</i>
	t(4;19)(q35;q13) inv(X)	<i>CIC/DUX4</i> <i>BCOR/CCNB3</i>
Svetloćelijski sarkom	t(12;22)(q13;q12)	<i>EWSR1/ATF1</i>
Dezmoplastični tumor malih okruglih ćelija	t(11;22)(p13;q12)	<i>EWSR1/WT1</i>
Ekstraskeletni miksoidni hondrosarkom	t(9;22)(q22;q12)	<i>EWSR1/NR4A3</i>
	t(9;17)(q22;q11)	<i>TAF15/NR4A3</i>
	t(9;15)(q22;q21)	<i>TCF12/NR4A3</i>
Miksoidni liposarkom	t(12;16)(q13;p11)	<i>FUS/DDIT3</i>
	t(12;22)(q13;q12)	<i>EWSR1/DDIT3</i>
Angiomatoidni fibrozni histiocitom	t(12;16)(q13;p11)	<i>FUS/ATF1</i>
Niskogradusni fibromiksoidni sarkom	t(7;16)(q33;p11)	<i>FUS/CREB3L2</i>
Akutna mijeloidna leukemija	t(16;21)(p11;q22)	<i>FUS/ERG</i>
Akutna mijeloidna, limfoblastna ili nediferentovana leukemija	t(12;22)(p13;q12)	<i>EWSR1/ZNF384</i>
	t(12;17)(p13;q11)	<i>TAF15/ZNF384</i>

Preuzeto i preuređeno iz: Hawkins D, Brennan B, Bolling T, et al. Ewing sarcoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. Principles and Practice of Pediatric Oncology. ed 7. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2016. pp. 855–1032.

Smatra se da je DNK-vezujući domen transkripcionog faktora odgovoran za njegovu onkogenu aktivnost putem neadekvatne regulacije ciljnih gena; neki ciljni geni su pojačano regulisani, dok su drugi smanjeno regulisani (28,29). Ekspresija gena *FET-ETS* fuzije dovodi do specifičnih promena transkriptoma kao i do različitih fizioloških ishoda u zavisnosti od tipa ćelija. Ćelijski model sistemi bazirani na ćelijama pacijenata obolelih od ES korišćeni su za ispitivanje funkcije *EWS-FLII* u svom izvornom ćelijskom kontekstu (28,29,31). Velike promene u profilima ekspresije gena indukovane ektopičkom ekspresijom *EWS-ETS* proteina u sistemu modela i *EWS-ETS* antagonista u ćelijama ES ukazuju na to da je maligna konverzija ćelija prekursora ES rezultat promena u aktivnostima mnoštva *EWS-ETS downstream* gena, a ne pojedinačnih gena. Neki od najbolje potvrđenih kandidata uključuju pojačano regulisane gene *NKKS2.2* i *NROB1* i smanjeno regulisane gene *IGFBP3* i *TGFBR2* (28,29,31,32). U nekim slučajevima su očigledne veze sa poznatim molekularnim putanjama važnim za onkogenezu (kao što je modulacija *Insulin-like* faktor rasta i *transforming* signalni faktor rasta). Razlika u sudbini primarnih i imortalizovanih ćelija sa ektopično ekspimirajućim *EWS-FLII*, ćelijske smrti ili preživljavanja sa izmenjenim ili blokiranim programom diferencijacije i transformacije sugerše prisustvo druge genetske alteracije u ES. Iako je pokazano u eksperimentalnim sistemima blokiranje p53 puta putem p53 mutacije ili delecije *INK4A* u saradnji sa *EWS-FLII* u transformaciji stabilizacijom ekspresije *EWS-FLII*, ove aberacije su relativno retke u Ewing sarkomu i javljaju se sa učestalošću manjom od 15% (23,33). Pokazano je da je p53 zavisni sistem popravke oštećene DNK u velikoj meri netaknut u Ewing sarkomu (34,35).

P53 protein koji ima ulogu čuvara protiv onkogenog stresa i indukovane ćelijske smrti, ovu funkciju održava putem ektopične *EWS-FLII* ekspresije u primarnim fibroblastima. Ostaje nejasno zašto većina ES toleriše ekspresiju onkogenog *EWS-ETS* u prisustvu *wild-type* p53. Inhibicija *NOTCH* signalnog puta može biti uključena ili alternativno signalni putevi autokrinih faktora rasta, kao što je *insulin-like* faktor rasta 1 (*IGF1R*) (36). Pokazano je da transformacija zečijih fibroblasta od strane *EWS-FLII* zahteva *IGF1R* ekspresiju (40). *EWS-FLII* inhibira ekspresiju *IGFBP3*, koja povećava signalizaciju *IGF1R*; inhibicija *IGF1R* ometa rast Ewing sarkoma kod miševa (28,37,38,39). Moguća uloga drugih signalnih puteva

autokrinih i parakrinih faktora rasta za koje je utvrđeno da su aktivni u ES, uključujući beta trombocitni faktor rasta, gastrin-oslobađajući peptid, neuropeptid Y i faktor matičnih ćelija, ostaju nepoznati (40,41,42,43).

1.4 PATOHISTOLOGIJA

Familija tumora Ewing sarkoma je grupa visoko agresivnih, slabo diferentovanih malignih tumora malih, okruglih, plavih ćelija, za koje se smatra da vode poreklo od ćelija neuralnog grebena. Histogeneza ES je predmet razmatranja još od prvog opisa ovog tumora kao difuznog endotelioma kosti od strane James Ewing-a 1921 godine (17,44).

Studije koje koriste imunohistohemijske markere, citogenetiku, molekularnu genetiku i kulturu tkiva ukazuju da je ES nastao iz primordijalne koštane srži porekla mezenhimalne stem ćelije (19,45,46,47,48,49). Stariji termini kao periferni primitivni neuroektodermalni tumor (pPNET), Askin tumor (ES zida grudnog koša) i ekstraosealni ES (često kombinovani sa terminom Familija Ewing sarkoma tumora) govore o istoj vrsti tumora (14,19).

Definitivna dijagnoza ES se postiže biopsijom koja podrazumeva uzimanje dovoljno materijala za konvencionalnu histologiju, imunohistohemiju i molekularnu patologiju. Studije molekularne biologije pokazale su da je zajednička osobina gotovo svih ovih tumora zajednički rearanžman gena koji uključuje *EWS* gen na hromozomu 22 (50). U većini slučajeva je prisutna recipročna translokacija t(11;22) (q24;q12), ali i t(21; 22) (q22;q12), t(17; 22), i t(2; 22) translokacije i inverzije (22,25). Iako se većina ES može prepoznati sa klasičnim hematoksilinom i eozinom (H i E) i imunohistohemijom uključujući CD99, detekcija translokacije *EWS*-a je obavezna kada je kliničko-patološka prezentacija neuobičajena ili je histološka dijagnoza nejasna. Referentna laboratorija za dijagnozu ES treba da ima mogućnost da radi i FISH i RT-PCR metode (22).

1.5. KLINIČKA SLIKA

1.5.1. Znaci i simptomi

Najčešći simptomi kod pacijenata sa ES su postojanje tumora i/ili bola. Bol može biti povremen, noćni, u slučaju lokalizacije tumora u kičmi ili karličnim kostima može biti praćen parestezijama (51). U početku je bol blagog intenziteta, ali može brzo da se intenzivira tako da je često neophodna primena analgetika i pre dobijanja definitivne dijagnoze. S obzirom da je većina pacijenata obolelih od ES u drugoj deceniji života i fizički aktivna, bol se često vezuje za "rast kostiju" ili povrede (104).

Bol bez podatka o prethodnoj traumi, bol koji traje duže od mesec dana, javlja se noću ili sa bilo kojim drugim neobičnim karakteristikama, treba da podstakne na dodatne dijagnostičke procedure kao što su radiografija (RTG), kompjuterizovana tomografija (CT) i magnetna rezonancija (MRI) (51).

Trajanje simptoma može biti od nekoliko nedelja do nekoliko meseci ili čak godina, sa srednjim vremenom trajanja od 2 do 9 meseci a sve zbog činjenice da se početni otok i bol smatraju znakom upale ili trauma (51,52). Produženo trajanje simptoma nije povezano sa prisustvom metastaza ili lošijim ishodom, češće je povezano sa karličnom lokalizacijom tumora i starijim uzrastom (51).

Fizikalnim pregledom, kod više od dve trećine pacijenata, otkriva se bezbolna palpabilna tumorska masa koja može biti praćena bolom. Tada je neophodno učiniti dopunske dijagnostičke procedure i detaljnije ispitivanje. Rast tumora dovodi do pojave vidljivog ili palpabilnog otoka na zahvaćenom mestu. Ovaj otok je najčešće napet, elastičan, tvrd, brzorastući i praćen lokalnom toplotom. Koža oko tumorske promene je obično blago crvenkasta, na njoj se može videti pojačan venski crtež (Slika 2). Febrilnost i drugi nespecifični simptomi su češći kod pacijenata sa metastatskim oblikom bolesti (52,53).



Slika 2: Ewing sarkom skapule-klinički nalaz (materijal Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije)

Tumorska masa može dugo biti neprimećena u slučaju karlične, spinalne ili femoralne lokalizacije jer su tumori u tim lokalizacijama duboko postavljeni i nepalpabilni. Kako se ES može pojaviti u bilo kojoj kosti ili mekim tkivima, dodatni simptomi, u zavisnosti od zahvaćenog mesta, mogu značajno da variraju. U slučaju infiltracije kičme i okolnih tkiva mogući su različiti motorički i neurološki poremećaji. Rast tumora može dovesti i do patološkog preloma kosti (92).

Prilikom prvog fizikalnog pregleda nakon pojave simptoma, najčešće se postavlja sumnja na tendinitis ako je promena dijagnostikovana kod adolescenata ili odraslih pacijenata, dok su sinovitis i osteomijelitis kao diferencijalne dijagnoze češće kod mlađe dece. Radiografski nalaz ES može biti sličan radiografskom nalazu osteomijelitisa.

Kod pacijenata sa metastatskim oblikom bolesti, nespecifični simptomi kao što su malaksalost, febrilnost, anoreksija i gubitak telesne težine mogu biti slični simptomima infekcije. Pacijenti uzrasta ispod pet godina mogu da imaju simptome slične neuroblastomu, međutim, ES je izuzetno redak u ovoj uzrasnoj grupi (13).

1.5.2. Laboratorijski nalazi

Uobičajene laboratorijske analize krvi, seruma i urina nisu specifične niti patognomonične za postavljanje dijagnoze Ewing sarkoma. Mogu se uočiti nespecifični pokazatelji inflamacije, kao što je ubrzana sedimentacije eritrocita (SE), umerena anemija ili leukocitoza. Povišeni nivo serumske laktat-dehidrogenaze (LDH) korelira sa tumorskom progresijom i predstavlja prognostički parametar za nepovoljniji ishod (53).

U uzorcima periferne krvi pacijenata sa ES, moguće je utvrditi prisustvo fuzionog gena *EWS-FLII* tehnikama molekularne biologije (31).

1.5.3. Lokalizacija tumora

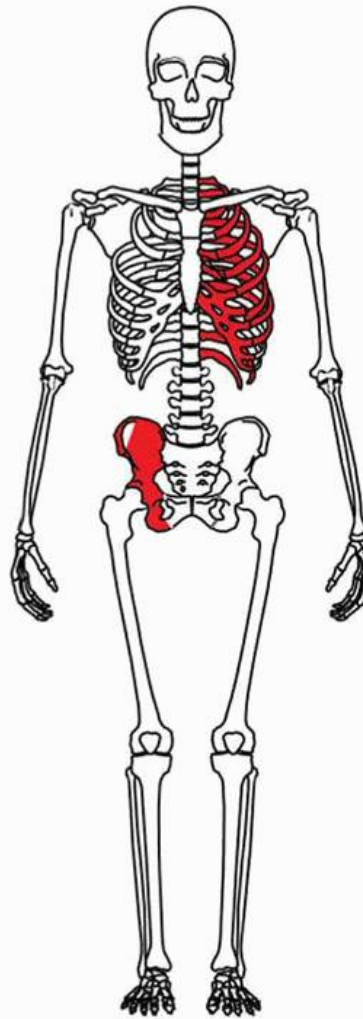
ES lokalizovan u predelu kosti se javlja kod oko 85% pacijenata obolelih od ES (2). Može biti zahvaćena bilo koja kost, pri čemu je najčešće zahvaćen dijafizealni deo kosti. Najčešća lokalizacija primarnog Ewing sarkoma su karlične kosti, dugačke kosti donjih ekstremiteta (femur, humerus, tibija) i kosti zida grudnog koša (Slika 3) (2,71).

Metastaze u plućima, kostima, koštanoj srži ili njihove kombinacije prisutne su kod oko 25% pacijenata u vreme postavljanja dijagnoze, pri čemu su pluća najzastupljenija. Metastaze u limfnim čvorovima, jetri ili centralnom nervnom sistemu su retke ali se opisuju (4).

EWING SARKOM

MEKA TKIVA 15%

KOSTI 85%



Glava i vrat 4%

Klavikula 1%

Grudni koš 23%

Humerus 4.5%

Ulna/radijus 2%

Šaka 0.5%

Karlica 23%

PRIMARNE METASTAZE:

- pluća 10%
- kosti 10%
- kombinovano/ostalo 5%
- bez metastaza 75%

Femur 11%

Tibija/fibula 15%

Stopalo 1%

Slika 3. Lokalizacija primarnih tumora i metastatskih promena kod ES

Preuzeto i preuređeno iz: Hawkins D, Brennan B, Bolling T, et al. Ewing sarcoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. Principles and Practice of Pediatric Oncology. ed 7. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins; 2016. pp. 855–1032.

1.5.4. Oblik bolesti

Na osnovu stepena proširenosti bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze, pacijenti mogu imati lokalizovan ili metastatski oblik bolesti. Postojanje ili odsustvo metastatske bolesti predstavlja pojedinačno najznačajniji prognostički parametar ishoda bolesti (71,73).

Lokalizovan oblik bolesti:

Lokalizovan oblik ES je predstavljen kada kliničkim i dijagnostičkim procedurama nije dokazano širenje bolesti izvan mesta primarnog tumora ili zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova. Širenje na susedna meka tkiva predstavlja lokalizovan oblik.

Ukoliko postoji zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova, indikovana je biopsija sa histopatološkom potvrdom (64).

Metastatski oblik bolesti:

Između 15% i 33% pacijenata se dijagnostikuje u metastatskom obliku bolesti (10% pluća, 10% kosti/koštana srž i oko 5% kombinacija ili ostalo) (4,71,73,77).

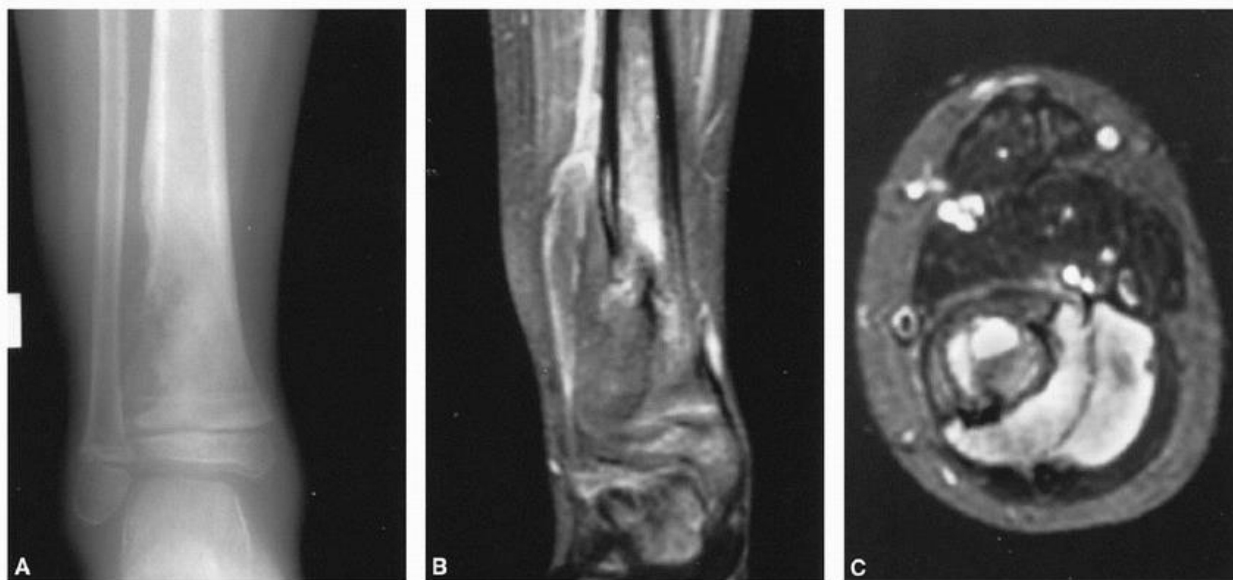
Prisustvo metastaza definisano standardnim dijagnostičkim procedurama ili morfološki pozitivnim aspiratom/biopsijom koštane srži predstavlja nepovoljan prognostički parametar.

Pacijenti sa plućnim metastazama imaju bolju prognozu u odnosu na pacijente kod kojih su dijagnostikovane vanplućne metastaze (76,77). Nije dokazano da broj plućnih metastaza korelira sa ishodom bolesti ali pacijenti sa jednostranim plućnim metastazama imaju povoljniji ishod nego oni sa obostranim plućnim metastazama (76).

Pacijenti sa dijagnostikovanim koštanim metastazama imaju bolje preživljavanje od pacijenata kod kojih su dijagnostikovane i koštane i plućne metastaze (77). Multiple koštane metastaze imaju nepovoljniji ishod od plućnih /pleuralnih metastaza (petogodišnje preživljavanje <20% vs 20%–40%) (60,103).

1.6. DIJAGNOSTIČKE PROCEDURE

Inicijalna dijagnostička procedura koja može da postavi sumnju na ES kosti i koja se radi pri pojavi prvih simptoma je radiografija kosti. Ovaj tumor na radiografiji ima karakterističan izgled (Slika 4A).



Slika br. 4: A. RTG snimak tibije pokazuje kortikalni poremećaj, "lukovicu" i sugesriše na zahvaćenost mekih tkiva. B; C: Koronarni i aksijalni presek na MR pregledu prikazuju ekstenzivnu infiltraciju mekog tkiva

Preuzeto i preuređeno iz: Marcus J. K, Yock I.T, Tarbell. Ewing sarcoma. In: Louis S. Constine, Nancy J. Tarbell, Edward C. Halperin, editors. Pediatric radiation oncology, ed. 6, Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2016.

Radi razjašnjenja dijagnoze i dobijanja detaljnijih informacija o malignom tumoru, potrebno je učiniti magnetnu rezonanciju (MRI) koštane promene pre biopsije tumora i dobijanja definitivnog histopatološkog nalaza (Slika 4B,C).

Indikovano je učiniti i ostale radiološke dijagnostičke procedure radi dijagnostikovanja i određivanja stadijuma bolesti, nakon anamneze, fizikalnog pregleda i laboratorijskih analiza

koje podrazumevaju sedimentaciju eritrocita (SE), kompletnu krvnu sliku i biohemijske analize krvi sa laktat dehidrogenazom (LDH) (Tabela 2).

MRI pregled primarnog tumora se sprovodi radi određivanja veličine primarnog tumora kao jednog od najbitnijih prognostičkih parametara pre započinjanja onkološkog lečenja ali i zbog planiranja eventualne zračne terapije. Ukoliko postoji mogućnost, radi se MR pregled celog tela (54-58).

Obavezno se radi i kompjuterska tomografija (CT) toraksa radi otkrivanja eventualnih metastaza u plućima. Pozitron emisiona tomografija (PET CT) sa Fluorin F 18-fludoxyglucose (18F-FDG PET) je opcioni modalitet za određivanje stadijuma bolesti, koji je pokazao visoku senzitivnost i specifičnost za ES i može da pruži dodatne informacije koje mogu da pomognu u planiranju terapije. U jednoj studiji, 18F-FDG PET je pokazao visoki stepen korelacije sa scintigrafijom skeleta pa istraživači ukazuju da 18F-FDG PET može da zameni scintigrafiju skeleta u ispitivanju inicijalne proširenosti bolesti. FDG se koristi kao marker tumorske vijabilnosti i pomaže u otkrivanju lezija koje nisu uočene na konvencionalnoj scintigrafiji (59).

18F-FDG PET predstavlja najsenzitivniju proceduru za praćenje terapijskog efekta i otkriva rane promene u metabolizmu tumora koje su pokazatelji efekta terapije (59).

Radi otkrivanja koštanih promena indicovana je scintigrafija skeleta.

Standardne dijagnostičke procedure su i aspiracija i biopsija koštane srži.

Metastaze koštane srži se mikroskopski otkrivaju kod manje od 10% pacijenata i povezane su sa nepovoljnom prognozom (60). Pošto se tumorske ćelije mogu fokusno raspoređivati u koštanoj srži, uzorke pomoću aspiracije i biopsije treba uzeti sa više mesta, konvencionalno oba zadnja ilijačna grebena. Ako je tumor karličnog porekla, aspirat može sadržati tumor sa primarnog mesta i to se ne definiše kao metastatski oblik bolesti.

RTG evaluacija se najčešće radi kao inicijalna dijagnostička procedura (56).

U tabeli 2 su prikazane potrebne dijagnostičke procedure.

Tabela 2: Ewing sarkom-dijagnostičke procedure:

Dijagnostička procedura	Primarni tumor	Metastatska mesta
RTG u dva pravca, cela kost i susedni zglob	++	suspektna mesta
MRI i/ili CT, zahvaćene kosti i zglob	++	suspektna mesta
Biopsija: tkivo za histologiju i molekularnu biologiju	++	suspektna mesta
CT toraxa		++
Aspirat i biopsija koštane srži: mikroskopski		++
18F-FDG-PET ili scintigrafija skeleta	++	

++: obavezno

Preuzeto i preuređeno iz: Hawkins D, Brennan B, Bolling T, et al. Ewing sarcoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. Principles and Practice of Pediatric Oncology. ed 7. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins; 2016. pp. 855–1032.

Biopsija

Definitivna dijagnostička metoda nakon uočene tumorske promene koja je potvrđena RTG i/ili CT/MRI pregledom je biopsija sa patohistološkom analizom dobijenog uzorka tkiva. Biopsija može biti **eksciziona**, kada se tumor uklanja u celini ili **inciziona**, kada se uzima samo uzorak tumora.

Kada god postoji sumnja na maligni tumor kosti, treba izvršiti incizionu biopsiju.

Bez obzira na vrstu incizione biopsije koja se izvodi, neophodno je pažljivo proceniti lokalizaciju i veličinu tumora, moguću diferencijalnu dijagnozu, uzrast pacijenta i mesto uzimanja tkiva kako bi se dobio adekvatan uzorak bez negativnog uticaja na definitivnu hiruršku proceduru.

Biopsija tkiva može se izvesti aspiracionom biopsijom, finom iglom ili “core needle” ultrazvučno vođenom biopsijom. Može se dobiti dovoljno uzoraka u dijagnostičke svrhe, prema nekim studijama sa preciznošću do 95%, dok su neke studije prijavile nešto slabije rezultate ove procedure (do 33%) (61,62). U slučajevima kada se radi slepo vođena biopsija, ponovljena ultrazvučno vođena biopsija rezultira ukupnom dijagnostičkom tačnošću od 94%. Potencijalni nedostaci ove biopsije su poteškoće u sprovođenju ovih procedura kod mlađe dece, što može da zahteva primenu opšte anestezije i moguće dobijanje nedovoljnog uzorka tkiva za neophodno ispitivanje (63).

Incizione hirurške biopsije se obično izvode pod opštom anestezijom u operacionoj sali. Postoji nekoliko hirurških principa koji se odnose na ove procedure koje su dizajnirane da minimiziraju kontaminaciju tkiva i dobiju adekvatan, održivi uzorak tumorske promene. Uobičajeno se koristi uzdužni rez, tkiva se ne razdvajaju, neurovaskularni snopovi se ne seku, sprečava se stvaranje hematoma u najvećoj mogućoj meri, a ako je prisutna masa mekog tkiva, kost se ne dira, a uzorak se uzima iz promene mekog tkiva. Ako je neophodno ući u kost u cilju dobijanja uzorka tkiva, pravi se mali kortikalni otvor kružnog oblika kako bi se umanjila mogućnost za potencijalnu patološku frakturu. Ovaj otvor se može zameniti ili se može koristiti koštani cementni čep za vraćanje mehaničkog integriteta kosti. Tkivo se zamrzava kako bi se osigurala održivost tkiva.

Bioptička trasa se mora pažljivo planirati i izvesti s obzirom da se ista mora obuhvatiti prilikom sprovođenja definitivne hirurške procedure. Takođe, uzima se u obzir i veličina tumora, njegov odnos sa susednim strukturama, vrsta planirane rekonstrukcije za definitivnu hiruršku intervenciju kao i mogućnost eventualnog sprovođenja zračne terapija.

Shodno navedenom, biopsiju suspektnog koštanog tumora treba da sprovede iskusni hirurzi koji će kasnije učiniti i definitivnu hiruršku resekciju tumora u referentnom centru (64).

Patohistološka analiza

Trenutno aktuelna klasifikacija koštanih tumora je histološko-molekularna klasifikacija, definisana od strane SZO iz 2013 godine (18).

Primarna svrha početne biopsije je da se dobije odgovarajuće tkivo za tačnu dijagnozu koje se šalje patologu radi analize. Patolog tkivo deli na više delova: otisak za FISH; deo u 10% neutralnom puferisanom formalinu za rutinsku histološku procenu, imunohistohemijske analize i eventualno za fluorescentnu in situ hibridizacijom (FISH) procenu hromozomskih translokacija; uzorak zamrznut na -70° C za molekularne, polimerazno lančane reakcije u realnom vremenu-RT-PCR i specifične imunohistohemijske studije; i deo iz kulture tkiva za citogenetiku, analizu ploidijske DNK i proliferativnu frakciju. Studije protočne citometrije retko su neophodne za dijagnozu ES i nisu deo rutinske patološke procene.

Patološka evaluacija preparata hirurške resekcije nakon neoadjuvantne hemioterapije je usmerena na procenu margina resekcije koštanog i mekog tkiva radi dokaza o postojanju makroskopske i/ili mikroskopske infiltracije i histološkog odgovora na primenjenu terapiju.

S obzirom da ES kosti ima destruktivan obrazac rasta, u trenutku dijagnostikovanja često su prisutne kortikalna infiltracija i destrukcija, kao i periostalna reakcija sa reaktivnim stvaranjem kosti i infiltracijom mekih tkiva. Na presecima, ovi tumori imaju mesnati izgled, sivo-bele boje, sjajne prebojenosti. Nekroza tumora, cistična degeneracija, hemoragija i fibroza variraju u zavisnosti od odgovora na primenjenu neoadjuvantnu terapiju (66).

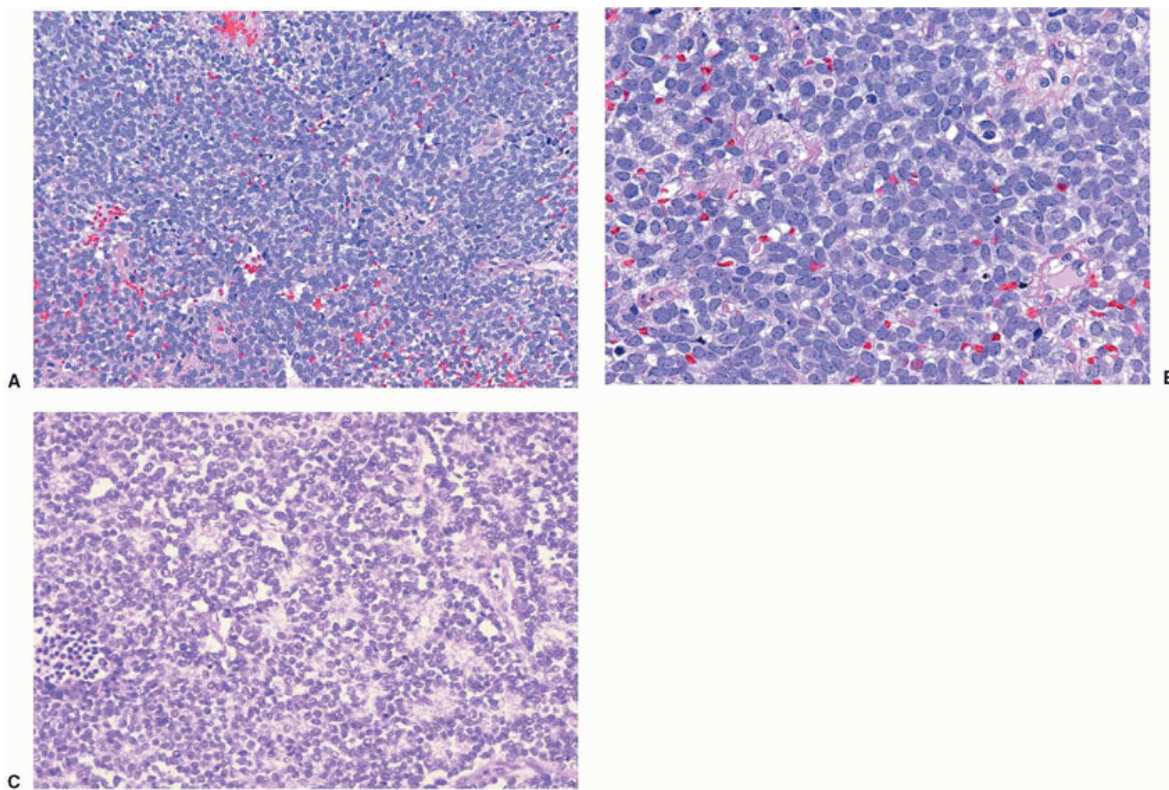
Histologija i pomoćna ispitivanja

ES obuhvata tumore sa različitim spektrom histološkog izgleda kao i ultrastrukturnih i imunohistohemijskih karakteristika. Klasičan ES je prvi opisao američki patolog James Ewing 1921 godine, kao tumor koji se sastoji iz malih okruglih ćelija sa visokim odnosom jedro-citoplazma u plažama (17) (Slika 5).

Ćelije imaju oskudnu, blago eozinofilnu citoplazmu. Jedra su glatka, nejasno ograničena i okrugla, sa neupadljivim jedarcima i hromatinom koji je ravnomerno raspoređen. Prisutan

je i citoplazmatski glikogen koji se pojavljuje kao PAS pozitivna reakcija. Polja nekroze i krvarenja su često prisutna uz postojanje mitotske aktivnosti i promenljivog broja Homer-Wright-ovih pseudorozeta (Slika 5).

Osnovni marker, koji predstavlja produkt tipične Ewing-ove translokacije je *FLII*, čija nuklearna pozitivnost ukazuje na ES. Jaka ekspresija ćelijskog površinskog glikoproteina CD99 je karakteristična za ES i jako difuzno membransko bojenje je prisutno u 95% do 100% ES sa jednim ili više monoklonskih antitela na ovaj antigen, uključujući O13, 12E7 i HBA71 (67). Pored toga, ES je imunoreaktivan na vimentin. Imunohistohemijski dokazi neuralne diferencijacije obuhvataju bojenje za neuron specifičnu enolazu (NSE), S-100 protein, Leu-7 i / ili PgP 9.5. Ne retko, u 30% slučajeva je ES fokalno pozitivan na citokeratine. S obzirom da se histološke i imunofenotipske osobine ES prepliću u različitim stepenima sa drugim tumorima malih okruglih ćelija detinjstva, često je potreban prošireni panel imunohistohemijskih ispitivanja da bi se isključili drugi histopatološki entiteti kao što su neuroblastom, limfoblastni limfom i rabdomyosarkom. Neuroblastom je imunoreaktivan na NSE, S-100 i Leu-7, ali za razliku od ES, negativan je na vimentin a imunoreaktivan na neurofilamentni protein. Takođe, limfoblastni limfom je intenzivno pozitivan na CD99 u membranskom obliku ali i na zajednički antigen leukocita (CD45) i druge limfoidne markere. Rabdomyosarkom može biti imunoreaktivan sa antitelima na CD99 (međutim prebojenost je obično fokalna, slaba i citoplazmatska), a suprotno od ES, rabdomyosarkom se intenzivno boji na desmin, kao i na miogenin, mioD1 i aktin. Retko se fokalno desminko prebojavanje može videti u ES (68). Iako sinovijalni sarkom pokazuje imunoreaktivnost na citokeratin i/ili EMA (epitelni membranski antigen), slabo diferentovana "small cell" varijanta može pokazati imunoreaktivnost na CD99 u membranskom uzorku i pokazati samo fokalno, slabo bojenje na citokeratin i na taj način ličiti na slabo diferentovani ES. Za diferencijaciju ova dva tumora najbolje je analizirati uporednu ekspresiju *TLE-1*, koji je pozitivan u SySa i *FLII* koji je karakterističan za ES.



Slika 5: Histološke i imunohistohemijske karakteristike ES: A) Klasični ES ima izgled kao listovi monotonih, okruglih ćelija. B) Ćelije imaju oskudnu citoplazmu i okrugla jedra sa ravnomerno raspoređenim fino granularnim hromatinom i neupadljivim jedarcima. C: Tumorske ćelije formiraju pseudorozete koje su morfološka karakteristika ES u korelaciji sa njegovom potencijalnom neuroendokrinom diferencijacijom.

Preuzeto i preuređeno iz: Hawkins D, Brennan B, Bolling T, et al. Ewing sarcoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. Principles and Practice of Pediatric Oncology. ed 7. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins; 2016. pp. 855–1032

Molekularne genetske studije, uključujući FISH i RT-PCR, su važni za evaluaciju tumora nediferentovanih malih okruglih ćelija detinjstva, posebno u slučajevima sa neodređenim histološkim i/ili imunohistohemijskim karakteristikama. Detekcija karakterističnih translokacija ovim metodama može omogućiti definitivnu dijagnozu ES, rhabdomyosarkoma

ili sinovijalnog sarkoma (69,70). Razlika između ovih tumora je neophodna, zbog razlike u terapijskom pristupu.

1.7. PROGNOŠTIČKI PARAMETRI

Identifikacija prognostičkih parametara može dovesti do razvoja adaptiranih terapijskih protokola na osnovu procenjene grupe rizika pacijenata sa ES (71,72,75,89,100,103).

Različiti klinički, patološki i biomolekularni parametri su ispitivani kao mogući prognostički pokazatelji koji bi uticali na kreiranje optimalnog terapijskog pristupa. Kao klinički (preterapijski) parametri definisani su uzrast, pol, lokalizacija tumora, veličina ili volumen tumora, vrednost serumske laktat-dehidrogenaze (LDH), oblik bolesti.

Na osnovu literaturnih podataka parametri povezani sa povoljnijom prognozom su lokalizovani oblik bolesti, uzrast ≤ 14 godina, ženski pol i lokalizacija tumora u predelu distalnih delova ekstremiteta (60,71,72,73,74,75,89,100,121).

Volumen tumora veći od 200 ml ili tumori veći od 8 cm kao i povišen nivo laktat-dehidrogenaze (LDH) u trenutku dijagnostikovanja bolesti su povezani sa nepovoljnom prognozom kao i inicijalno metastatski oblik bolesti, koji je opisan kao pojedinačni najjači prognostički parametar ishoda bolesti (71,72,82,83).

Prognostički parametri se mogu podeliti u dve grupe: (Tabela 3)

1. **Preterapijski** - parametri koji pokazuju karakteristike oboljenja
2. **Terapijski** - parametri koji pokazuju odgovor na inicijalnu terapiju

Tabela 3: Podela prognostičkih parametara

Prognostički parametri		Povoljna prognoza
	uzrast	≤ 14 godina
	pol	ženski
Preterapijski	LDH u serumu	normalan
	lokalizacija tumora	distalni ekstremiteti
	veličina tumora	≤ 8 cm
	oblik bolesti	lokalizovan
Terapijski	HP odgovor na preoperativnu	dobar odgovor
	HT	(<10% vijabilnih tu ćelija)

Shodno sprovedenim analizama, terapijski parametar predstavljen histopatološkom procenom odgovora na primenjenu preoperativnu hemioterapiju predstavlja važan prognostički parametar ishoda bolesti.

Ostvaren stepen tumorske nekroze >90% smatra se dobrim odgovorom, dok stepen tumorske nekroze ≤ 90% predstavlja loš odgovor na primenjenu hemioterapiju.

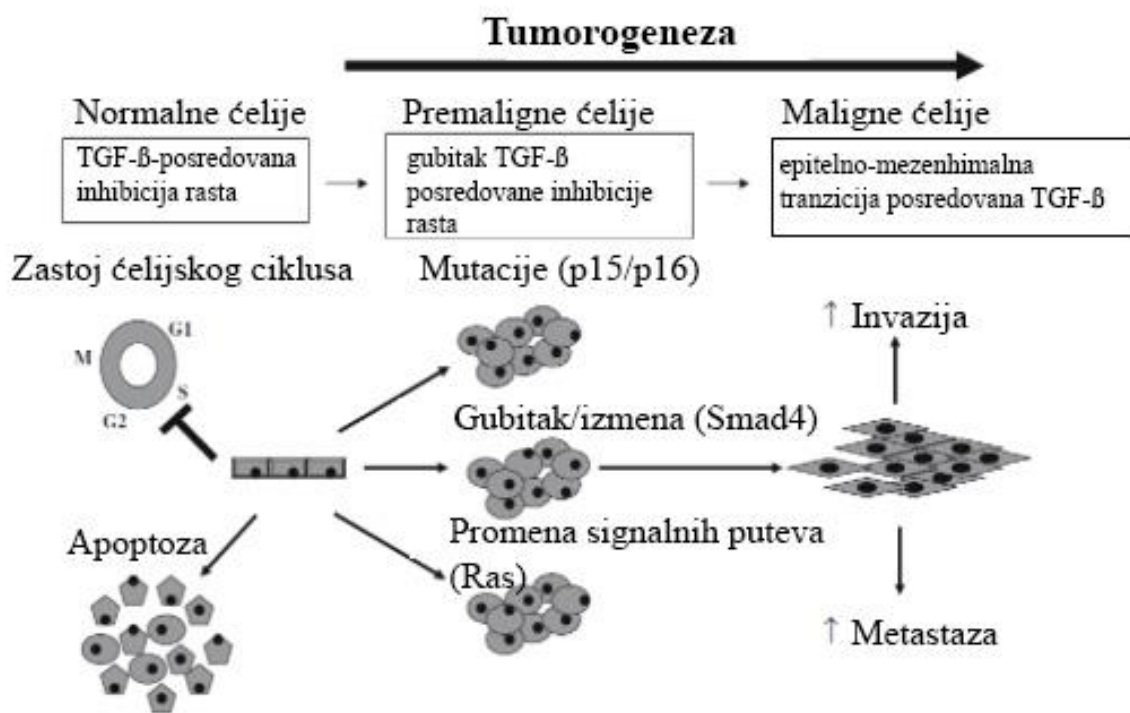
Histopatološki stepen nekroze tumora tj. procenat vijabilnosti tumora određuje se posle hirurške intervencije. Procenat nekroze tumora veći od 90% (prisustvo vijabilnih ćelija ispod 10%) se smatra povoljnim prognostičkim parametrom i ujedno predstavlja parametar efikasnosti primenjene terapije. Mnogobrojne studije su pokazale da pacijenti sa minimalnim ili bez rezidualnog vijabilnog tumora nakon neoadjuvantne (preoperativne) hemioterapije imaju signifikantno bolje preživljavanje bez događaja (eng. Event free survival-EFS) nego pacijenti sa većim procentom vijabilnih ćelija tumora. Ženski pol kao i mlađi uzrast pokazuju češće dobar histološki odgovor na preoperativnu hemioterapiju. Pacijenti sa lošim odgovorom na neoadjuvantnu (preoperativnu) hemioterapiju imaju povećan rizik za pojavu lokalnog recidiva (78,79,80,81,98,99).

Shodno objavljenim radovima, lokalna kontrola bolesti bez sprovedene hirurške procedure ili sa neadekvatnom (inkompletnom) hirurškom intervencijom predstavlja mogući nepovoljni prognostički parametar (98, 99,100).

Iako se ulažu veliki naponi, još uvek ne postoji puno utvrđenih prognostičkih biomarkera za ovu agresivnu vrstu tumora (90). S obzirom na svoje poznate uloge u različitim vrstama maligniteta, u toku su ispitivanja ekspresije različitih gena.

TGFBI gen kodira za transformišući faktor rasta beta 1 (*TGFβ1*) koji pripada familiji citokina. Transformišući faktor rasta beta kontroliše brojne ćelijske procese uključujući ćelijsku proliferaciju, migraciju, apoptozu, angiogenezu i imunološki nadzor i preživljavanje.

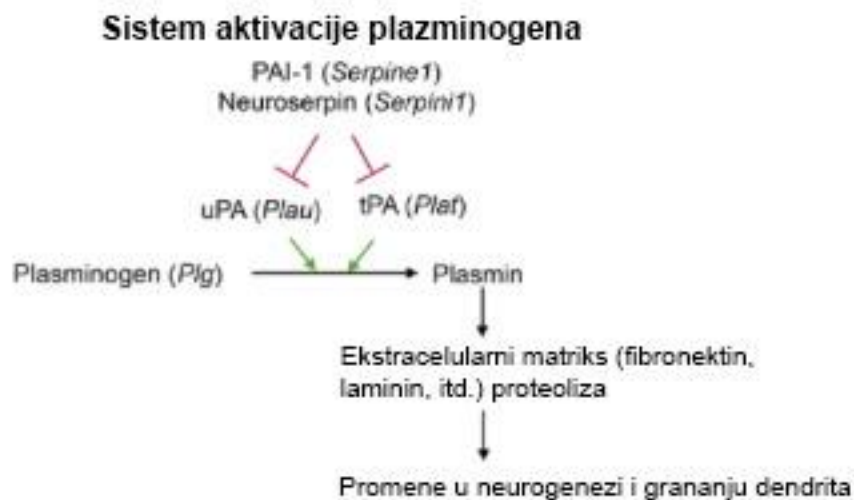
TGFβ1 ispoljava dualističku ulogu u kancerogenezi. U ranim stadijumima kancerogeneze *TGFβ1* deluje kao tumor-supresor indukujući zastoj u ćelijskom ciklusu i apoptozu. Kako razvoj tumora napreduje, ćelije tumora postaju rezistentne na *TGFβ1* posredovanu inhibiciju ćelijskog rasta usled mutacija u regulatorima ćelijskog ciklusa, kao što su P15 ili P16, izmene ili gubitka *TGFβ1* signalnih komponenata, poput *SMAD4* ili alteracija u nizvodnim signalnim putevima, poput aktivacije *RAS* onkogen (Slika 6). Shodno tome, u kasnijim stadijumima kancerogeneze *TGFβ1* deluje kao protoonkogen stimulišući invaziju, angiogenezu, metastaziranje i inhibirajući imunološki nadzor (84). Izmenjena *TGFBI* ekspresija javlja se u različitim tipovima kancera.



Slika 6: Uloga *TGFBI* u tumorogenezi

Preuzeto i preuređeno iz: Jakowlew SB. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2006; 25(3):435-57

SERPINI1 (*Serpin Family I Member 1*) gen kodira protein neuroserpin koji je serin peptidni inhibitor koji inhibira tkivno specifični plazminogen aktivator i plazmin (Slika 7). Putem redukcije proteolize serpini ometaju degradaciju ekstraćelijskog matriksa a time i invaziju kancerskih ćelija i metastaziranje. Neuroserpin se eksprimira u visokom procentu u neuronima i astrocitima (85). *SERPINI1* genska ekspresija je zapažena i u serumu i perifernoj krvi i povezana je sa različitim malignitetima poput hepatocelularnog i kolorektalnog karcinoma (86).



Slika 7: Shema proteolize plasminogen aktivatora (PA)

Preuzeto i preuređeno iz: Wilhelm CJ, Hashimoto JG, Roberts ML, Zhang X, Goeke CM, Bloom SH, Guizzetti M. Plasminogen activator system homeostasis and its dysregulation by ethanol in astrocyte cultures and the developing brain. *Neuropharmacology*. 2018; 138:193-209

Ostali biološki parametri kao što su prekomerna ekspresija p53 proteina, ekspresija Ki67 i gubitak 16q mogu biti nepovoljni prognostički parametri (89,91). Takođe, dokazano je da je visoka ekspresija mikrozomalne glutation S-transferaze, enzima povezanog sa rezistencijom na doksorubicin, povezana sa nepovoljnijim ishodom (79).

Jedan od mogućih parametara nepovoljnog ishoda bolesti koji nije dokazan kao prognostički parametar je postojanje patološke frakture. Patološka fraktura u trenutku dijagnostikovanja bolesti nije povezana sa nepovoljnim ishodom i ne isključuje hiruršku resekciju (92). Takođe, ni stepen neuralne diferencijacije nije dokazan kao prognostički parametar za ES (93, 94).

EWSR1-ETS translokacija povezana sa ES može se pojaviti na nekoliko potencijalnih prekidnih tačaka u svakom od gena koji se pridružuju da bi se formirao novi segment DNK. Nekada su se te translokacije smatrale značajnim, ali su dve velike serije pokazale da lokacija prelomnih tačaka prenosa *EWSR1-ETS* nije nepovoljan prognostički parametar (95,96).

1.8. TERAPIJSKE GRUPE

Tokom posljednje četiri decenije objavljene su analize međunarodnih kooperativnih studija koje su otkrile prognostičke parametre koji su predviđali različite ishode i pomogli u izradi prilagođenih kliničkih ispitivanja radi optimizovanja strategije lečenja u zavisnosti od grupe rizika a u cilju smanjenja neželjenih dejstava samog lečenja (71,72,73,75,100).

Shodno rezultatima do sada sprovedenih istraživanja, na osnovu procenjenog rizika u odnosu na prognostičke parametre, pacijente obolele od ES možemo podeliti u četiri grupe (Tabela 4).

Tabela 4: Grupe rizika na osnovu prognostičkih parametara

Grupe rizika	Standardni	Visoki	Nepovoljni plućni	Nepovoljni vanplućni
	lokalizovani oblik	lokalizovani	plućne	vanplućne
	uzrast < 14 godina	oblik	metastaze	metastaze
	nekarlične lokalizacije	uzrast ≥ 14 godina tumori karlice		

Potvrda ovih prognostičkih parametara, kliničko-patoloških, biomolekularnih i parametara povezanih sa lečenjem, dobijena je u daljim istraživanjima kao i u kliničkoj praksi. Studije Euro Ewing su stratifikovale pacijente u rizične grupe u zavisnosti od brojnih prognostičkih parametara, uključujući parametre nezavisne od primenjenog lečenja kao što su prisustvo i mesto metastaza (77,119,120). Kod pacijenata sa lokalizovanim oblikom bolesti, veličina/volumen primarnog tumora i/ili histopatološki odgovor na neoadjuvantnu hemoterapiju su glavni parametri za stratifikaciju u standardnu ili visoko rizične grupe.

1.9. TERAPIJSKI PRISTUP

Mnoge nacionalne i internacionalne grupe tokom poslednje četiri decenije pokušavaju da identifikuju optimalnu terapijsku strategiju radi poboljšanja višegodišnjeg preživljavanja pacijenata obolelih od ES. Pre ere hemioterapije, pacijenti oboleli od ES lečeni su samo hirurškom i/ili zračnom terapijom. Pacijenti su najčešće umirali u periodu od dve godine zbog metastaza a procenat preživljavanja je bio manji od 10%, što je ukazalo na potrebu za sistemskim lečenjem (17).

Lečenje pacijenata obolelih od ES u svetu sprovodi se u visoko specijalizovanim centrima koji imaju multidisciplinarnе timove obučene za lečenje solidnih tumora kod dece (101,105,107).

Savremenom kombinacijom multimodalnog pristupa koji obuhvata hemioterapiju, hirurško lečenje i/ili zračnu terapiju, može se postići preživljavanje veće od 60% kod pacijenata sa lokalizovanim oblikom bolesti (71,101,102,104,105,106,107,108,109,110).

S obzirom da je dokazano da je ES sistemska bolest, shodno protokolima Euro Ewing, pacijenti lečenje započinju neoadjuvantnom hemioterapijom, nakon čega sledi lokalno lečenje (120). Kod pacijenata kod kojih je sproveden hirurški modalitet lokalnog lečenja, hirurške margine i histopatološki odgovor na primenjenu neoadjuvantnu (preoperativnu) hemioterapiju se uzimaju u obzir pri odabiru i planiranju dalje postoperativne terapije (119,120).

1.9.1. HEMIOTERAPIJA

Savremeni period multimodalnog lečenja Ewing sarkoma započeo je nakon primene kombinovane terapije koja je podrazumevala primenu hemioterapije i hirurgije i/ili zračne terapije. Prvi primenjeni citotoksični lekovi bili su vinkristin, ciklofosamid, aktinomicin D (režim VAC) koji su uvedeni u terapiju sedamdestih godina prošlog veka (111,112). Uvođenje antraciklina početkom osamdesetih godina dovelo je do daljeg poboljšanja preživljavanja (53,101,102). Značajno poboljšanje preživljavanja ovih pacijenata postignuto

je uvođenjem ifosfamida, kombinacije ifosfamida i etopozida (režim IE) kao i visokih doza ifosfamida (104,106,113).

Podaci o prednosti ifosfamida nad ciklofosfamidom nisu dokazani ali postoje podaci o efikasnosti sinergističkog dejstva ifosfamida u kombinaciji sa etopozidom koji su objavljeni od strane nekoliko grupa (105,113,124).

Savremeno lečenje, shodno trenutnim protokolima, podrazumeva primenu 3-6 ciklusa početne kombinovane hemioterapije, nakon čega sledi lokalno lečenje, uz nastavak hemioterapije sa još 6-10 ciklusa. Ciklusi se obično primenjuju u intervalima od 2 do 3 nedelje. U zavisnosti od primenjenog protokola, trajanje lečenja je između 6 i 12 meseci. Lekovi koji se smatraju najaktivnijim u lečenju ES su: vinkristin (Vcr), ifosfamid (Ifo), doksorubicin (Adr, Doxo), etopozid (Eto), ciklofosfamid (Cyc) i actinomicin D (Act D). Skoro svi aktuelni protokoli lečenja zasnovani su na kombinacijama ovih šest citotoksičnih lekova (106,108,109,120,121).

Protokoli lečenja ES u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) predviđaju alternativnu primenu vinkristina, ciklofosfamida i doksorubicina sa ifosfamidom i etopozidom dok evropski protokoli obično kombinuju vinkristin, doksorubicin i ifosfamid/ciklofosfamid sa ili bez etopozida u jednom ciklusu lečenja. Trajanje primarne hemioterapije kreće se od 6 meseci do približno godinu dana (109, 110).

Actinomicin D se više ne koristi u lečenju ES u SAD, ali se i dalje primenjuje u Evropi, prvenstveno u protokolima Euro Ewing (109, 110, 119).

Intenzitet primenjene hemioterapije pozitivno korelira sa ishodom bolesti (109). Primena visokodozne hemioterapije (VDHT) sa reinfuzijom matičnih ćelija hematopoeze (RMČH) i dalje je predmet ispitivanja za lokalizovani oblik ES visokog rizika (170,171).

Za lokalizovani oblik ES, ukupno petogodišnje preživljavanje iznosi od 60-70%. To je pokazano u ES trajalima, EI-CESS-92 (eng: European Intergroup Ewing Sarcoma Study), IOR i IESS/SSG (eng: Intergroup Ewing's Sarcoma Study / Scandinavian Sarcoma Group). Pomenuti trajali su koristili vinkristin, adriamicin (doksorubicin), ciklofosfamid, aktinomicin D (režim VACA) u različitim dozama i rasporedom primene (103,108).

Prva severnoamerička studija ES (eng: North American Intergroup Ewing Sarcoma Study I, IESS I) pokazala je bolje rezultate lečenja pri primeni VACA režima u odnosu na VAC (EFS 60% vs. 24%) (102). Ovaj rezultat je potvrdio značaj doksorubicina u lečenju ES koji je kasnije potvrđen i u meta-analizi i postavio VACA režim kao standardnu terapiju (Tabela 5) (114).

Istraživači IESS-II studije su uporedili dva VACA režima davana u različitim vremenskim intervalima ali sa istom kumulativnom dozom lekova. Rezultati su bili bolji pri primeni režima intermitentne primene viših doza ciklofosfamida na svake tri nedelje u poređenju sa kontinuiranim režimom davanja nižih doza ciklofosfamida nedeljno. Pretpostavilo se da je poboljšanje preživljavanja kod pacijenata koji su bili na intermitentnom režimu bilo zbog jačeg intenziteta početnog doziranja doksorubicina (103). Takođe je ispitivana i kumulativna doza intenzifikacije alkilirajućih agenasa, ciklofosfamida i ifosfamida. U nekoliko nerandomizovanih studija je uveden i etopozid (109).

U studiji EW-92 koja je sprovedena u St. Jude's Children's Research Hospital, uvođenje ifosfamida i etopozida poboljšalo je ishod lečenja u odnosu na prethodne režime zasnovane na VACA režimu, naročito kod većih lokalizovanih tumora (73).

Grupa italijanskih istraživača iz tzv "Bolonjske grupe" iz instituta Rizzoli, objavila je rezultate petogodišnjeg EFS-a od 71% sa kombinacijom Vcr, Doxo, Cyc, ActD, Ifo i Eto (116).

Istraživači iz Velike Britanije, grupa UKCCSG (eng: The United Kingdom Children's Cancer Study Group) izvršila je dva uzastopna ispitivanja (ET-1 i ET-2), sa VACA režimom u ET-1 studiji i VAIA režimu u ET-2 studiji (53,104). Bolji rezultati su dobijeni u grupi gde je primenjen ifosfamid (petogodišnji EFS 62% vs 41%) (53,104).

GPOH, nemačko-austrijsko-holandska grupa za pedijatrijsku onkologiju i hematologiju je koristila režim VACA u studiji CESS 81 (eng. Cooperative Ewing's sarcoma study) kod pacijenata visokog rizika (zapremina tumora > 100 mL), što je rezultiralo trogodišnjim EFS-om od 31% (101). U CESS 86 studiji, u kojoj je Ifo dat kao deo VAIA režima desetogodišnji EFS od 51% je postignut u grupi pacijenata sa visokim rizikom (105).

Istraživači iz Memorial Sloan-Kettering Cancer Centra ispitivali su VAC režim intenziviranim dozama ciklofosfamida naizmenično sa IE režimom, uz povećanje doze ciklofosfamida po ciklusu do 4,2 g/m². Primena ovog intenzivnog režima dovela je do poboljšanja preživljavanja svih pacijenata (dvogodišnji EFS 77%) a za pacijente sa lokalizovanim oblikom bolesti četvorogodišnji EFS je dostigao 82% (117). Trajal Euro Ewing 99 je uključio randomizovano poređenje terapije konsolidacije (R1) sa ifosfamidom ili ciklofosfamidom nakon inicijalne terapije ifosfamidom kod svih pacijenata. Ishod lečenja je bio sličan u obe grupe, samo je hematološka toksičnost bila veća u grupi VAC dok je u VAI grupi bila češća nefrotoksičnost (119).

Prva pedijatrijska onkološka grupa (eng: Pediatric Oncology Group-Children's Cancer Group) je sprovedla studiju INT-0091 gde je randomizovala pacijente između VACA režima i VACA/IE režima, koji su ordinirani u tronedeljnim intervalima. Shodno izveštaju, bolje preživljavanje je registrovano u grani IE (petogodišnji EFS 69% vs 54%) (106). Ovo je potvrdilo da alternativna terapija drugim aktivnim lekovima može poboljšati ishod lečenja bez obzira na smanjenje doze doksorubicina s obzirom da je intenzitet doziranja doksorubicina bio manji kod pacijenata na IE režimu (106).

INT-0154 studija je proučavala mogućnost intenziviranja doze alkilišućih agenasa. Pacijenti u standardnoj grupi primali su VAC alternativno svake 3 nedelje sa IE, uz dozu hemioterapije sličnoj onoj koja se koristi u INT-0091 a u istraživačkoj grani primali su veće doze alkilišućih agenasa. Ukupne kumulativne doze pet lekova (VAC, IE) bile su gotovo identične između dve grane. Nije uočena razlika u preživljavanju između terapijskih grupa uprkos intenziviranju doza (109).

Studija dečje onkološke grupe (eng: Children's Oncology Group-COG), koristila je strategiju intervalne kompresije, tako što su VAC i IE režimi primenjivani na dve nedelje i vremenom se intenzitet doza svih lekova povećavao (110). Ova studija pokazala je značajno poboljšanje u petogodišnjem EFS u intervalno-komprimovanoj grani (73% vs 65%) tako da je ova grana i postala novi standardni režim za lečenje pacijenata sa lokalizovanim oblikom ES u Severnoj Americi (110).

Tabela 5. Rezultati lečenja pojedinih kooperativnih grupa za lokalizovani oblik ES

Studija	Režim	N	EFS	p^a
IESS I (1973-78)	VAC	342	24%	VAC/VAC + WLI: 0.001
	VAC + WLI		44%	VAC/VACD: 0.001
	VACD		60%	VAC + WLI/VACD: 0.05
IESS-II (1978-82)	VACD-HD	214	68%	0.03
	VACD-MD		48%	
INT-0091 (1988-93)	VACD	200	54%	0.005
	VACD + IE	198	69%	
INT-0154 (1995-98)	VCD + IE standardne doze	231	72%	0.57
	VCD + IE intenzivirane doze	247	70%	
AEWS0031 (2001-05)	VCD + IE / 3 nedelje	284	65%	0.048
	VCD + IE / 2 nedelje	284	73%	
SFOP/France				
EW-84 (1984-87)	VIA-VID	49	50%	
EW-88 (1988-91)	VD + VD/VA	141	58%	
EW-93 (1993-99)	Th adaptirana na osnovu odgovora, HR pacijenti dobijaju VDT	214	60%	
SSG IX (1990-99)	VID + PID	88	58%	
			(meta-FS)	
Italijansko/Skandinav- ske Sarkoma Grupe				
Joint Protocol III (1999- 2006)	Th adaptirana na osnovu odgovora, VDT za pac. sa lošim odgovorom	300	69%	
UKCCSG/MRC				
ET-1 (1978-86)	VACD	120	41%	
			Extr. 52%	
			Axial 38%	
			Pelvis 13%	
ET-2 (1987-93)	VAID	201	62%	

			Extr. 73%	
			Axial 55%	
			Pelvis 41%	
CESS Studije				
CESS-81 (1981-85)	VACD	93	<100 mL: 80%; ≥100 mL: 31%; Viable tumor <10%: 79% >10%: 31%	
EI-CESS-92 (1992-99)	<100 mL (SR): VACD	301	52%	
	≥100 mL (HR): VAID		51%	
EI-CESS Studije				
	SR: VAID/VACD	155	68%/67%	0.72
	HR: AID/EVAID	492	44%/52%	0.12
EuroEWING99				
R1 (lokalizovani sa dobrim odgovorom i malim resektovanim tu)	VIDE + VAI	425	78.2%	Hazard ratio: 1.12
	VIDE + VAI/VAC	431	75.4%	
R3 (vanplućni metastaski oblik)	VIDE with HDT	281	27%	Nonrandomized

Preuzeto i preuređeno iz: Hawkins D, Brennan B, Bolling T, et al. Ewing sarcoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. Principles and Practice of Pediatric Oncology. ed 7. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins; 2016. pp. 855–1032

U studiji evropske kooperativne intergrupe za ES 92 (eng: European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study, EI-CESS-92), dve grupe istraživača, grupa UKCCSG i grupa GPOH su procenjivali efikasnost IE režima u randomizovanim studijama (108). U studiji koja je obuhvatila pacijente sa standardnim rizikom, pacijenti su randomizovani u granu VACA i granu VAIA. U studiji za pacijente visokog rizika, dodatak Eto u VAIA šemu je randomizovan (108). U studiji standardnog rizika, nije pokazana značajna razlika u petogodišnjem EFS-u između režima VACA (67%) i VAIA (68%). Analiza podgrupe

pacijenta sa visokim rizikom pokazala je efikasnost dodavanja etopozida VAIA režimu za pacijente sa velikim lokalizovanim tumorom (108).

Trajal Euro Ewing 99 predstavlja rezultat zajedničkog istraživanja više evropskih zemalja. Svi pacijenti su primali neoadjuvantnu hemioterapiju od šest ciklusa hemioterapije u sastavu vinkristin, ifosfamid, doksorubicin i etopozid (VIDE režim), nakon čega je sledila lokalna kontrola bolesti (hirurško lečenje i/ili zračna terapija), a zatim jedan ciklus u sastavu vinkristin, aktinomicin i ifosfamid (VAI režim). Pacijenti su klasifikovani u grupu standardnog rizika ako su imali lokalizovani oblik bolesti i dobar histopatološki odgovor na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju ili ako su imali lokalizovane tumore zapremine manje od 200 mL u trenutku dijagnoze. Pacijenti sa standardnim rizikom bili su randomizovani da primaju terapiju održavanja sa sedam ciklusa VAC ili VAI režima (119,120).

Brazilska kooperativna studija izvršila je ispitivanje koje je uključilo karboplatinum u intenzivan režim prilagođen riziku kod 175 dece sa lokalizovanim ili metastatskim ES. Utvrđeno je značajno povećanje toksičnosti bez poboljšanja ishoda lečenja (122).

1.9.2. Lokalna kontrola bolesti

Uspešno lečenje ES može se postići samo kombinovanom primenom hemioterapije i dobre lokalne kontrole bolesti. Sadašnji terapijski pristupi podrazumevaju primenu neoadjuvantne (preoperativne) hemioterapije, praćene lokalnom terapijom i adjuvantnom hemioterapijom (119,120,121).

Najbolji pristup za lokalnu kontrolu bolesti se još uvek razmatra (150,210). Retrospektivne analize velikih studija su pokazale da je radikalna zračna terapija povezana sa većim procentom lokalnih recidiva i značajnim rizikom za razvoj sekundarnih maligniteta izazvanih zračnom terapijom, dok su funkcionalni defekti češći nakon hirurških intervencija (123,124). Ovi rezultati doveli su do promene u pristupu lokalnoj kontroli bolesti u smislu češće primene hirurškog lečenja kao samostalne procedure ili uz dodatak zračne terapije. Međutim, još uvek

nisu sprovedene randomizovane studije o prednosti različitih pristupa u lokalnoj kontroli bolesti.

Dokazano je da pacijenti kod kojih se lokalno lečenje sprovodi hirurškom procedurom mogu sačuvati funkcionalnost bez kompromitovanja procenta preživljavanja (72,107,123,126).

Za planiranje optimalne lokalne terapije neophodan je multidisciplinarni pristup koji podrazumeva učešće eksperata iz ovih oblasti. Efikasnost ovakvog pristupa potvrđena je u dva uzastopna evropska ispitivanja koja su pokazala smanjenje lokalnih recidiva nakon donate zajedničke, konzilijarne odluke eksperata o modalitetu lokalnog lečenja, koji je uključivao i zračni tretman (127).

1.9.3. Hirurško lečenje

Nakon neoadjuvantne (preoperativne) hemioterapije predviđeno je hirurško lečenje sa ciljem široke resekcije tumora i potvrde negativnih margina tumorskih granica a uz prihvatljiv morbiditet (128,129,130).

Poslednjih godina postignut je značajan napredak hirurških tehnika a posebno implantata u cilju rekonstrukcije nastalog defekta kosti i mekih tkiva (137,139,142,143).

Istorijski, kompletna resekcija podrazumevala je eksciziju kompletnog tumorskog tkiva sa histopatološki potvrđenim negativnim granicama resekcije. Resekcija učinjena nakon sprovedene preoperativne hemioterapije ne obuhvata prvobitne granice tumora već izmenjene granice uzrokovane dejstvom hemioterapije pa postoji mogućnost da zaostanu mikroskopski ostaci tumora. Primena postoperativne zračne terapije umanjuje rizik od pojave lokalnog recidiva (125). Ukoliko je resekcija kompletna nakon preoperativne hemioterapije i nema primene zračne terapije, smatra se da posthemioterapijske granice daju istu pouzdanost nivoa lokalne kontrole kao i negativne granice “*de novo*”. Smanjenje obima hirurške intervencije može biti povezano sa većim rizikom od lokalnog recidiva (131). Procena obima odgovora pre operacije je veoma bitna radi smanjenja obima hirurške procedure zbog očuvanja bitnih struktura i funkcija (131).

Dobra lokalna kontrola bolesti podrazumeva resekciju tumora sa histopatološki potvrđenim negativnim granicama. Ukoliko nije moguće očuvanje ekstremiteta sa adekvatnim granicama, razmatra se amputacija. Shodno objavljenim podacima, nema statistički značajne razlike preživljavanja kod grupe pacijenata gde je kao definitivna hirurška intervencija učinjena amputacija i grupe pacijenata gde je kao definitivna hirurška procedura učinjena resekcija i nadoknada defekta kosti i mekih tkiva (132,133). Prema podacima jedne nerandomizovane studije, ukupno petogodišnje preživljavanje kod pacijenata sa učinjenom resekcijom je iznosilo 71.8% u poređenju sa 63.1% kod pacijenata kod kojih je sprovedena amputacija (134).

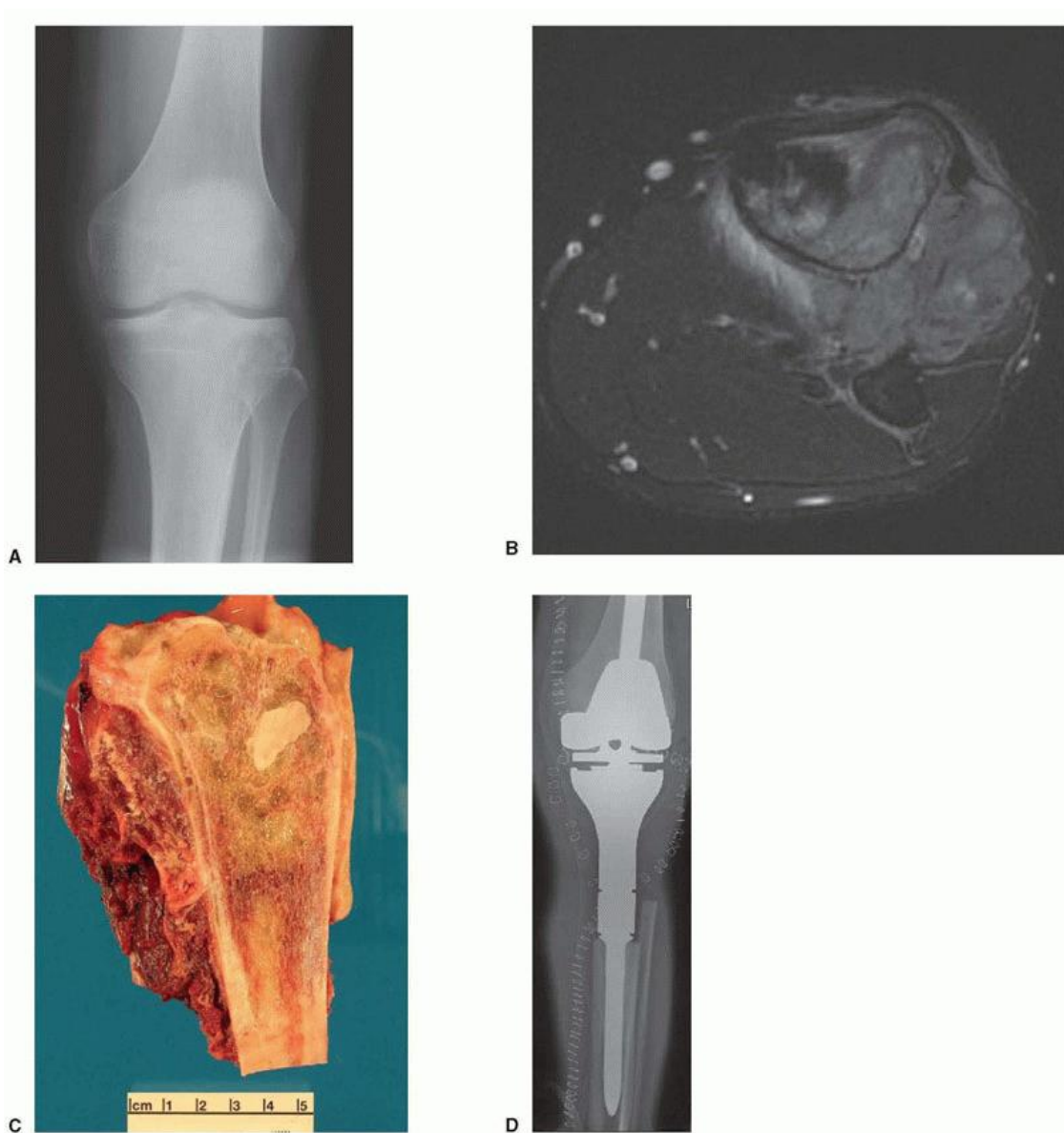
Nakon resekcije tumora neophodno je uraditi nadoknadu defekta koji nastaje u toku operacije resekcijom zahvaćene kosti i posledično mekih tkiva U zavisnosti od lokalizacije tumora, primenjuju se različite rekonstruktivne tehnike koje mogu biti pomoću koštane endoproteze, koštanih graftova i kompozitne koštane proteze. Poželjno je da se kod mlađe dece rade biološke rekonstrukcije dok se protetske rekonstrukcije preporučuju kod adolescenata i pacijenata koji su završili koštani rast (135).

Standardna hirurška tehnika koja se radi kod koštano zrelih pacijenata je resekcija i nadoknada defekta kosti endoprotezom. Prednost ove metode je očuvanje ekstremiteta kao i mogućnost ustajanja i hoda odmah nakon operacije. Najznačajnija komplikacija ove procedure je infekcija koja je izuzetno kompleksna i skupa za lečenje i najčešće se završava amputacijom. Mogu da se jave i periprotetske frakture koje su relativno česte nakon sprovedene zračne terapije operisane regije.

Tumorske proteze imaju svoj vek trajanja i u najvećem broju slučajeva je potrebna revizija pojedinih komponenti proteze što je važno kod mladih, aktivnih pacijenata (135). Dugotrajnost protetskih rekonstrukcija je, barem delom, povezana sa anatomskom lokalizacijom. Opisano je petogodišnje preživljavanje cementiranog implantata proksimalnog dela femura 90%, u poređenju sa 60% za distalne delove femura i 50% za delove proksimalne tibije. Takođe je opisano desetogodišnje trajanje endoproteza kod 75% pacijenata uzrasta iznad 11 godina i kod 25% kod pacijenata uzrasta ispod 11 godina u vreme operacije (136).

Kod pacijenata koji nisu završili koštani rast izbegava se rekonstrukcija pomoću endoproteze. Metoda izbora kod ovih pacijenata je nadoknada defekta pomoću koštanih graftova. Osnovna podela koštanih graftova je na autografte i alografte i to u zavisnosti od porekla grafta (137).

Moguće rekonstruktivne opcije koštanog grafta mogu biti autograft ili alograft i interkalarni ili osteohondralni alograftovi (Slika 9). Postoje prednosti i mane za svaku opciju, a specifičnost lokalizacije, planirani adjuvantni tretmani i faktori zavisni od pacijenta moraju se razmotriti kako bi se izabrala najbolja opcija (137). Upotreba vaskularnog fibularnog grafta za rekonstrukciju metadijafizealnih defekata nakon ekscizije tumora pokazala je dobre funkcionalne rezultate (138).



Slika 9: Ewing sarkom proksimalne tibije A: Preoperativni RTG snimak pokazuje litičnu leziju. B: Aksijalni MRI pokazuje veliku mekotkivnu masu. C. Resektovani deo proksimalne tibije. D: Postoperativni RTG snimak pokazuje prisustvo endoproteze u predelu proksimalne tibije

Preuzeto i preuređeno iz: Hawkins D, Brennan B, Bolling T, et al. Ewing sarcoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. Principles and Practice of Pediatric Oncology. ed 7. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins; 2016. pp. 855–1032

Alograft se koristi za rekonstrukciju velikih strukturnih područja, interkalarnih ili osteohondralnih i može se smatrati trajnim rešenjem iako obično zahteva duže zarastanje (139,140,141). Rekonstrukcija alograftom ima povećan rizik od nezarastanja grafta kao i povećanu mogućnost infekcije i frakture (137,139,140).

Kombinovano korišćenje vaskularnog fibularnog autografta i alografta je uspešna i funkcionalna metoda rekonstrukcije nakon ekscizije tumora oko kolena, posebno kod koštano nezrelih pacijenata. Najčešća komplikacija je fraktura alografta i nezarastanje (142,143). Druga opcija za rekonstrukciju je fuzija susednog zgloba. Poboľjšanjem protetskog dizajna i hirurških tehnika ova opcija se gotovo više ne upotrebljava, ali može da predstavlja trajnije rešenje (144,145,146).

Optimalna rekonstrukcija kostiju karlice, naročito u acetabulumu, još uvek se ispituje. Rekonstrukcija alograftovim koštanim graftom, protetičkom rekonstrukcijom ili alograft-protetskim kompozitom povezana je sa visokim rizikom od infekcije, frakture i nezarastanja (147). Funkcija nakon učinjene unutrašnje hemipelvektomije i bez rekonstrukcije je zadovoljavajuća, shodno objavljenim podacima, šest od osam pacijenata je u mogućnosti da se kreće bez pomagala a postoji i manji rizik od komplikacija (148).

Karlična lokalizacija ES predstavlja kontroverzno mesto za sprovođenje hirurške procedure. Neophodna je dobra procena koristi hirurške resekcije karlice s obzirom na širok spektar lokalizacija i veličine tumora, kao i na mogućnost dobijanja negativnih granica uz procenu mogućeg morbiditeta nakon operacije. Opisano je da kod pacijenata sa lokalizovanim oblikom ES u predelu karlice, hirurško lečenje, sa ili bez zračne terapije, ima bolju lokalnu kontrolu i to 82.6% u poređenju sa 66.7% ako se leči neoperativno, a petogodišnji EFS je 73.9 % u poređenju sa 30.3% kod pacijenata kod kojih nije sprovedeno operativno lečenje (129).

Rezultati studije iz 2012 godine o lokalnom lečenju ES karlice hirurškom procedurom, gde je ukupno petogodišnje preživljavanje iznosilo 72%, kao najznačajniji parametar ishoda označili su odgovor na preoperativnu hemioterapiju (149). COG studija nije zabeležila značajnu razliku u petogodišnjoj kumulativnoj incidenci neuspešne lokalne kontrole i

petogodišnjeg EFS kod pacijenata sa ES karlice koji su lečeni samo operacijom, samo zračnom terapijom ili primenom oba modaliteta lokalnog lečenja (151). Ove različite rezultate autori su objasnili mogućim pristrasnim izborom hirurškog lečenja kao vida lokalne kontrole bolesti.

Studija zasnovana na sklonosti za izbor određene vrste lokalne terapije, koja je dizajnirana da minimizira pristrasnost izbora, pokazala je poboljšanu lokalnu kontrolu, ali bez razlike u sistemskoj kontroli, samo operacijom u poređenju sa samo zračnom terapijom (150). Kombinovana primena hirurškog lečenja i zračne terapije nije pokazala razliku u lokalnoj ili sistemskoj kontroli u poređenju sa sprovedenom samo hirurškom procedurom (150). Imajući u vidu različite podatke, očekivani morbiditet nakon hirurške intervencije treba pažljivo razmotriti u multidisciplinarnim konzilijarnim odlukama o lokalnom lečenju ES karlice.

Kod lokalizacije primarnog tumora u predelu humerusa, hirurško lečenje je dovelo do poboljšanja krajnjeg funkcionalnog rezultata i ukupnog preživljavanja. U studiji sa petnaestogodišnjem praćenjem, lokalni recidiv se javio kod 18% pacijenata kod kojih je sprovedena samo zračna terapija, kod 7% pacijenata nakon samo hirurške intervencije i kod 19% pacijenata kod kojih su sprovedena oba modaliteta lokalnog lečenja, iako autori navode da treba razmotriti potencijalni uticaj pristrasnosti izbora modaliteta na ishod (152).

Koštano nezreli pacijenti (devojčice uzrasta ispod 14-15 godina i dečaci uzrasta ispod 16-17 godina) predstavljaju grupu pacijenata koji su najzahtevniji u hirurškom smislu. Kao krajnji rezultat rekonstrukcije može da se javi inegalitet ekstremiteta ukoliko je uklonjena i epifizna ploča rasta. Procena bioloških rekonstrukcija, bilo vaskularnim fibularnim graftom ili distrakcionom osteogenezom, u poređenju sa protetičkom rekonstrukcijom opisana je kod dece sa prosečnim uzrastom od 10.6 godina (153).

Ako se rekonstrukcija obavlja alograftom i ako je epifiza uklonjena, treba uzeti u obzir plan za prilagođavanje rasta kontralateralne ivice jer neće biti rasta kroz alograft. Ukoliko se koristi protetička rekonstrukcija, moguće je koristiti protezu koja se može produžiti. Nedostaci ove hirurške procedure su povećani procenat infekcije, veliki broj revizionih operacija i to u smislu produženja proteze sa rastom pacijenta. Funkcionalni rezultati kod ove

hirurške tehnike znatno su lošiji nego kod pacijenata koji su završili koštani rast, mada je opisana smanjena trajnost ovih implantata kod mlađe dece sa visokim rizikom od komplikacija (154,155,156). Druge opcije su distrakciona osteogeneza u cilju izjednačavanja dužine ekstremiteta i epifiziođeza kontralateralnog uda nakon nekog vremena radi izjednačavanja očekivanog odstupanja dužine ekstremiteta (156).

Druga smernica za rekonstrukciju donjih ekstremiteta je tehnika rotacione plastike, posebno za decu mlađeg uzrasta koja se sprovodi kod tumora koji zahvata distalni femur (Slika 10).



Slika 10: Tehnika rotacione plastike

(materijal Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije)

Ova tehnika podrazumeva amputacionu resekciju tumora i rekonstrukciju pomoću ostatka ekstremiteta sa distalnim segmentom rotiranim 180 stepeni, tako da zglobna površina stopala funkcioniše kao koleno a proteza se konstruiše na način da stopalo funkcioniše kao noseći zglob ostatka ekstremiteta Funkcionalni status ovih pacijenata podrazumeva manje restrikcija aktivnosti u poređenju sa protetskim rekonstrukcijama kao i dužim trajanjem (157).

1.9.4. ZRAČNA TERAPIJA

Zračna terapija, kao vid lokalne kontrole bolesti kod ES, može se primeniti kao:

- Radikalna zračna terapija
- Preoperativna zračna terapija
- Postoperativna zračna terapija

Radikalna zračna terapija

Radikalna zračna terapija se sprovodi kod pacijenata kod kojih je to jedini mogući modalitet lokalnog lečenja a to su obično pacijenti sa nepovoljnom prognozom. Ti pacijenti obično imaju velike tumore i/ili tumore lokalizovane na mestima koja se smatraju nepovoljnim za dobru lokalnu kontrolu kao što su tumori na kičmenim pršljenovima, čineći zračnu terapiju otežanom i operaciju nemogućom (2,211).

Radikalna zračna terapija je indikovana kada postoji procena da je moguće učiniti samo intralezionalnu resekciju. Na osnovu iskustva evropskih kooperativnih studija Ewing sarkoma, CESS i EICISS, pacijenti koji su imali intralezionalnu resekciju praćenu zračnom terapijom imali su isti procenat uspešnosti lokalne kontrole kao i pacijenti koji su imali samo zračnu terapiju (123). Savremeni pristup u sprovođenju lokalne kontrole bolesti favorizuje hirurško lečenje kada god je moguća široka resekcija, zbog rizika od razvoja sekundarnog maligniteta nakon zračne terapije (123,124).

U analizi EI-CESS 92 studije koja je obuhvatila pacijente sa lokalizovanim oblikom ES, kod 26% pacijenata koji su imali samo zračnu terapiju kao vid lokalne kontrole došlo je do relapsa bolesti u vidu lokalnog recidiva ili u vidu udaljenih metastaza, što je bilo lošije od grupe gde je sprovedeno hirurško lečenje sa ili bez zračne terapije (4% vs 10%) (123). Nije bilo moguće definisati podgrupu pacijenata u kojoj je sprovođenje samo zračne terapije postiglo isti procenat lokalne kontrole kao i hirurška intervencija.

U studiji INT-091 analiza pacijenata sa tumorima karlice je pokazala da je sprovođenje zračne terapije u odnosu na hirurško lečenje imalo sličan rezultat lokalne kontrole (151).

Radikalna zračna terapija može biti alternativa kod pacijenata sa malim tumorima koji bi zahtevali mutilantne hirurške procedure zbog lokalizacije. Koristeći konformalnu zračnu terapiju, uključujući intezitetom modulisanu zračnu terapiju (IMRT) ili protonsku terapiju, ovi pacijenti su kandidati za lečenje zračnom terapijom bez sprovođenja hirurške procedure (212).

Postoperativna zračna terapija

Postoperativna (adjuvantna) zračna terapija se sprovodi kod pacijenata sa rezidualnom mikroskopskom bolešću, neadekvatnim marginama ili kod onih koji imaju loš histopatološki odgovor na primenjenu neoadjuvantnu (preoperativnu) hemioterapiju tj. imaju vijabilne tumorske ćelije >10% (160).

Postoperativna zračna terapija se sprovodi obavezno nakon intralezionalnih resekcija (125). Procedure tipa “*debulking*” deblokiranja ne poboljšavaju lokalnu kontrolu i povezuju se sa dodatnim nepotrebnim morbiditetom i kašnjenjem u primeni sistemske terapije (210).

U analizi EI-CESS trajala, lokalna kontrola zahvaljujući sprovedenoj samo hirurškoj intervenciji, bila je odlična kod svih pacijenata koji su imali široku resekciju prema Enneking-ovoj klasifikaciji (Tabela 6) kao i sa dobrim histopatološkim odgovorom nakon primenjene neoadjuvantne hemioterapije (160,161,210). U podgrupi koja je imala 101 pacijenta, prijavljen je lokalni recidiv kod samo kod jednog pacijenta. Pacijenti sa učinjenom širokom resekcijom i lošim histopatološkim odgovorom bili su u većem riziku od pojave lokalnog recidiva (12%). Procenat lokalnih recidiva je bio niži kod pacijenata kod kojih je sprovedena postoperativna zračna terapija (6%) (123).

Postoperativna zračna terapija za pacijente kod kojih je sprovedena široka resekcija, ali sa lošim histopatološkim odgovorom, postala je standard u studijama EI-CESS, ali ne i u studijama Children’s Oncology Group (COG) (150).

Tabela 6: Klasifikacija hirurških procedura po Ennekingu

Tip resekcije	Opis resekcije
Intralezionalna resekcija	Tumor je otvoren tokom operacije ili je kontaminirano hirurško polje ili mikroskopski ili makroskopski ostatak tumora
Marginalna resekcija	Tumor uklonjen u celini, resekcija kroz pseudokapsulu tumora, mikroskopski ostatak tumora
Široka resekcija	Tumor uklonjen u celini sa pseudokapsulom, okružen zdravim tkivom
Radikalna resekcija	Kompletno ležište tumora uklonjeno u celini

Preuzeto i preuređeno iz: Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. Clin Orthop 1980; 153:106-120.

Preoperativna zračna terapija

Preoperativna zračna terapija se sprovodi u slučaju procenjene verovatnoće da će hirurške margine biti uske ili pozitivne. Preoperativnom zračnom terapijom postiže se smanjenje tumora i omogućava hirurška resekcija sa negativnim marginama (123).

Primena preoperativne zračne terapije bila je uključena u trajal EI-CESS 92 sa ciljem da se sterilije mesto tumora pre operacije i na taj način potencijalno smanji diseminacija tokom operacije kada se očekuju uske margine. U analizi nešto manje od polovine pacijenata kod kojih je sprovedna preoperativna zračna terapija, poboljšanje sistemske kontrole bolesti nije bilo moguće dokazati (123). Iako je procenat lokalne kontrole nakon preoperativne zračne terapije bio odličan, nije bilo poboljšanja u lokalnoj kontroli među pacijentima kod kojih je sprovedena široka resekcija (129).

Doze zračenja

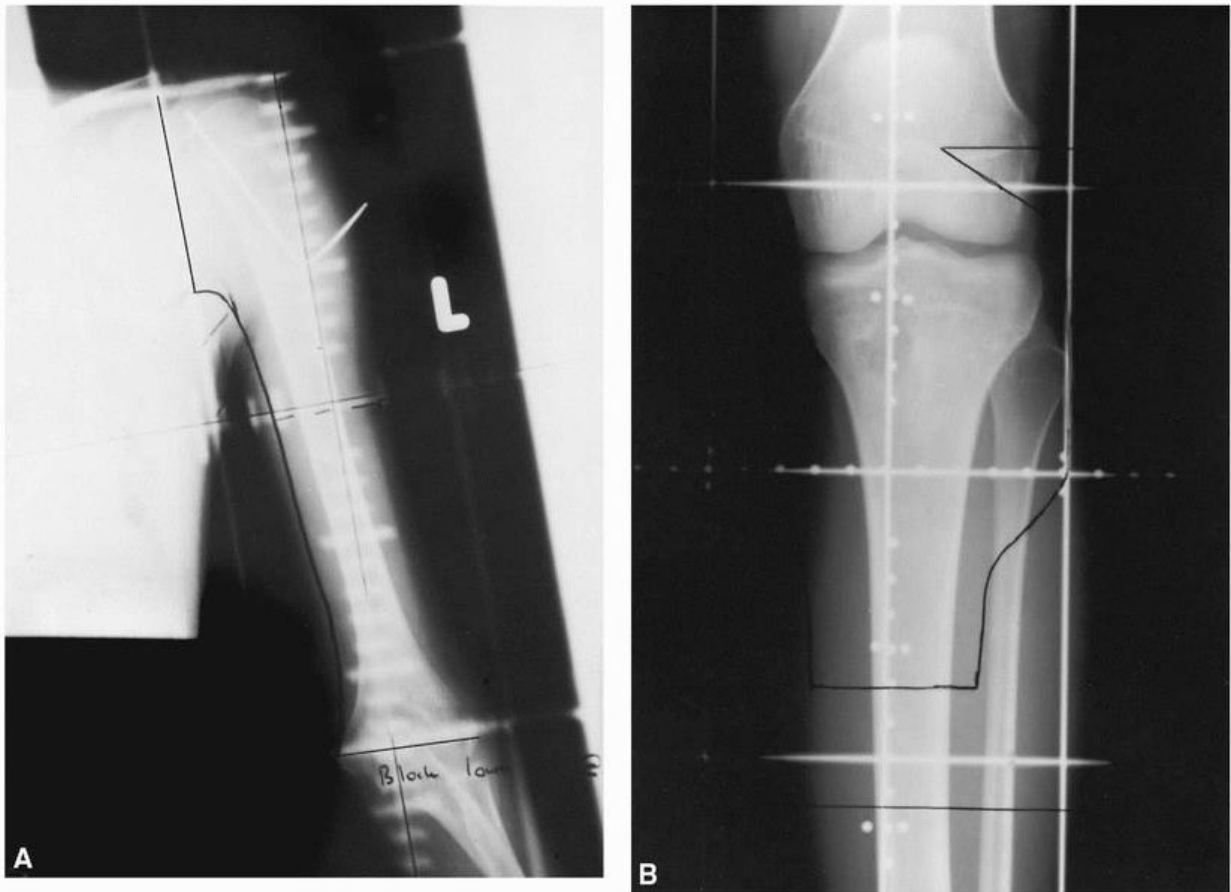
Za kontrolu ES neophodna je doza zračenja iznad 40 Gy što je dokazano na osnovu iskustva St. Jude's Children's Research Hospital, gde je primećen veći procenat lokalnih recidiva pri primeni nižih doza zračne terapije (187). Jasna korelacija između doze i odgovora na primenjenu terapiju dozama iznad 40 Gy još nije utvrđena. Za radikalnu zračnu terapiju, obično se daju doze između 55 i 60 Gy (159). Kada hirurško lečenje prethodi ili sledi zračnoj terapiji, doze se kreću između 45 Gy i 55 Gy, u zavisnosti od pojedinačnih faktora rizika (margine resekcije i histopatološki odgovor). Najčešće se primenjuje konvencionalno frakcionisanje sa pojedinačnim dnevnim frakcijama od 1.8 Gy do 2 Gy (159, 214). U studijama CESS 86 i EI-CESS 92, primenjena je hiperfrakcionirana zračna terapija sa 1.6 Gy, dva puta dnevno. Nakon primenjenih 22.4 Gy, sledila je 10-dnevna pauza a nakon toga nastavak hemioterapije. Nije potvrđena razlika u lokalnoj kontroli između dve različite grupe frakcionisanja (127,108). Randomizovana studija od 40 pacijenata sa ES kod kojih je primenjena doza od 55.8 Gy na prošireno ležište tumora sa marginom od 2 cm u poređenju sa istom ukupnom tumorskom dozom nakon 39.6 Gy na celu kost nije pokazala razliku u lokalnoj kontroli ili EFS-u (104). Takođe, nije dokazano da je hiperfrakcionirana zračna terapija povezana sa poboljšanom lokalnom kontrolom ili smanjenim morbiditetom (127). Doza zračenja može se prilagoditi u zavisnosti od veličine ostatka tumora nakon inicijalne hirurške procedure (128).

Terapija zračenjem se generalno primenjuje u frakcionisanim dozama u ukupnom iznosu od približno 55.8 Gy na inicijalnu veličinu tumora pre hemioterapije (127).

Upoređivanje planova lečenja protonskim zračenjem i intenzitetom modulisanе zračne terapije (IMRT) pokazalo je da terapija zračenjem pomoću protonskog snopa može zaštititi od zračenja više normalnih tkiva u blizini primarnog tumora od zračenja primenom tehnike IMRT (128). Praćenje je relativno kratko i nema dostupnih podataka da bi se utvrdilo da li smanjenje doze za susedna tkiva rezultira poboljšanim funkcionalnim statusom ili smanjuje rizik od pojave sekundarnog maligniteta. Zbog toga što je broj pacijenata mali i praćenje relativno kratko, nije moguće utvrditi da li se rizik od lokalnog recidiva može povećati smanjenjem doze zračenja u tkivu oko primarnog tumora (214).

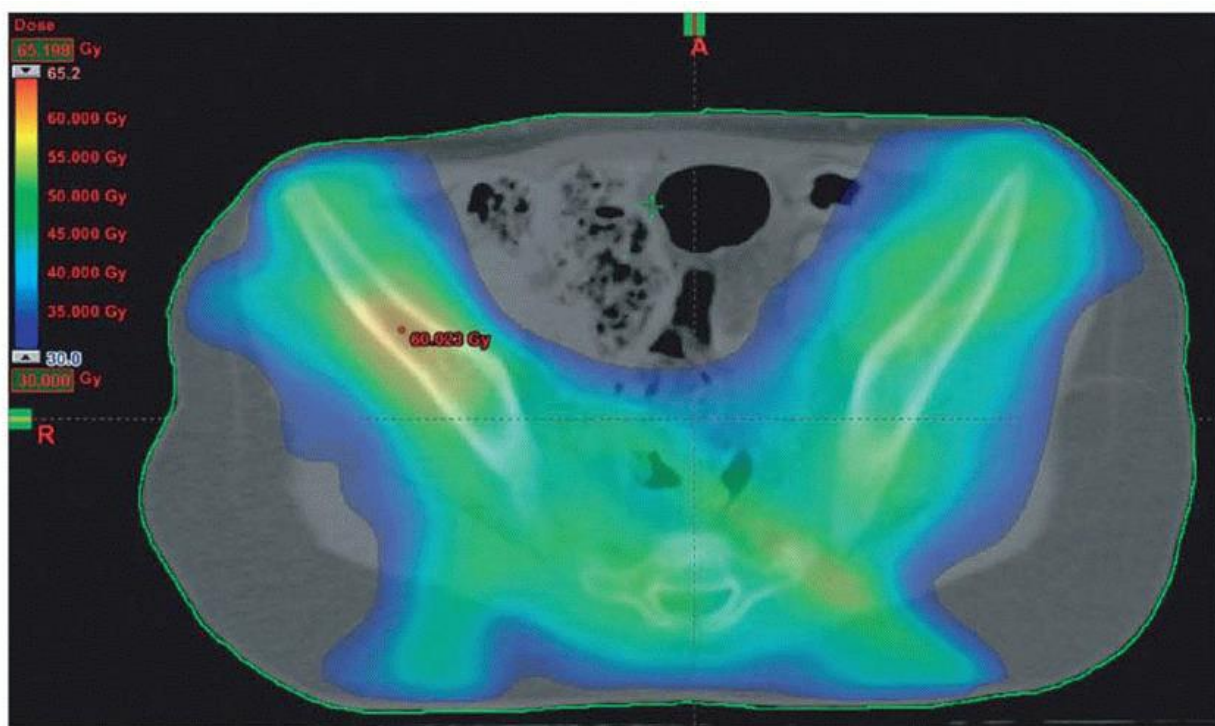
Planiranje zračnog tretmana

Zračno polje je definisano kao inicijalno prošireno ležište tumora shodno MRI nalazu uz dodatnu uzdužnu marginu od najmanje 2 do 3 cm i bočne margine od 2 cm u dugim kostima (162). Ako se koriste doze veće od 45 Gy, primenjuje se tehnika smanjivanja polja. Kod pacijenata sa aksijalnom tumorskom lokalizacijom, potrebna je minimalna margina od 2 cm oko inicijalnog ležišta tumora. Sve preporuke vezane za margine odnose se na planiranje veličine zračnog polja. Zračna terapija planirana CT simulacijom sa manjim marginama između CTV (klinički volumen mete, eng: Clinical target volume) i planiranog zračnog polja mora imati individualno planirane margine (Slika 11). Kod tumora koji se šire u telesne šupljine (grudni koš, karlica) bez infiltracije, rezidualni intrakavitarni tumorski volumen nakon hemioterapije se koristi za planiranje lečenja. Hirurški kontaminirana područja, ožiljci i drenažna mesta moraju biti uključeni u zračno polje (214). Treba izbegavati zračenje celog obima ekstremiteta kako bi se smanjio rizik od limfedema, uz poštedu jedne trećine ekstremiteta. Kod dece u fazi rasta, moraju se uzeti u obzir zone rasta. Jačina doze zračenja kroz epifizu rezultira asimetričnim rastom i može dovesti do funkcionalnih deficita. Slično tome, kičmeni pršljenovi treba da budu potpuno uključeni ili isključeni iz zračnog polja da bi se izbegla skolioza. Za optimalnu dozimetriju kod pacijenata sa ES, standardnim se smatra primena trodimenzionalne konformalne zračne terapije. U određenim slučajevima, kao što su tumori kičmenih pršljenova ili karlice, visoko konformalne tehnike, uključujući IMRT (Slika 12) ili protonska terapija, mogu biti od velike koristi (128,214).



Slika 11: Promene u volumenu zračnog polja za ES. A: Polje obuhvata celu dužinu medularne šupljine za tumor koji zahvata proksimalni deo levog humerusa. B: Prilagođeno polje obuhvata samo proksimalni deo noge za ograničeni tumor leve tibije; postoji distalna margina od 5 cm izvan zahvaćenog dela kosti na osnovu učinjenih dijagnostičkih procedura. Poslednjih godina, nacionalni protokoli preporučuju marginu od 2 do 3 cm

Preuzeto i preuređeno iz: Marcus J. K, Yock I.T, Tarbell. Ewing sarcoma. In: Louis S. Constine, Nancy J. Tarbell, Edward C. Halperin, editors. Pediatric radiation oncology, ed. 6, Philadelphia, PA : Lippincott Williams & Wilkins; 2016.



Slika 12: IMRT kod pacijenta sa multifokalnim Ewing sarkomom karlice. Pomoću ove tehnike može se ograničiti zapremina creva koja je izložena dozama zračenja preko 30 Gy. Na slici je prikazan raspon doziranja od 30 Gy do maksimalne doze od 65 Gy u primarnim lezijama tumora

Preuzeto i preuređeno iz: Hawkins D, Brennan B, Bolling T, et al. Ewing sarcoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. Principles and Practice of Pediatric Oncology. ed 7. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins; 2016. pp. 855–1032

Zračna terapija pluća

Profilaktičko zračenje pluća za pacijente sa inicijalno lokalizovanim oblikom bolesti kao deo savremenog standardnog pristupa u lečenju ovih pacijenata se ne preporučuje (102). U severnoameričkoj studiji IESS I, pacijenti sa lokalizovanim oblikom bolesti primali su jedan od tri režima: VAC, VACA ili VAC uz zračenje pluća. Primenom VACA režima dobijeni su najbolji rezultati ali je primena VAC režima uz zračenje pluća bila znatno uspešnija od

primene samo VAC režima. Neizvesno je da li bi dodatak profilaktičkog zračenja pluća poboljšao ishod koji je postignut savremenim hemioterapijskim lečenjem (102).

Rezultati IESS-a primenjeni su na pacijente sa metastazama u plućima u trenutku dijagnostikovanja bolesti. Nekoliko studija je objavilo poboljšane rezultate lečenja primenom zračenja pluća, tzv. "kupanje pluća" kod ovih pacijenata. Na osnovu ovog iskustva, "kupanje pluća" je postalo standardni pristup kod pacijenata sa metastazama pluća pri inicijalnoj dijagnozi. (60). Pacijenti obično primaju dozu od 12 Gy do 20 Gy (163). Akutne i hronične komplikacije su opisane kod malog broja pacijenata (163).

Studija Euro Ewing-99 kod pacijenata sa metastazama pluća pri inicijalnoj dijagnozi uključuje standardnu hemioterapiju i zračnu terapiju "kupanje pluća" u jednoj grani i visokodoznu hemioterapiju (VDHT) i reinfuziju matičnih ćelija hematopoeze bez sprovođenja "kupanja pluća" u drugoj grani (125).

Zračna terapija koštanih metastaza

Zračna terapija može biti indikovana kod pacijenata kod kojih su dijagnostikovane koštane metastaze i može se sprovesti na svim inicijalno zahvaćenim kostima ukoliko je broj mesta ograničen. Lokalno lečenje metastatskih promena može poboljšati ishod lečenja čak i kod pacijenata sa vanplućnim metastazama (164).

Zračenje preko 50% procenjene količine koštane srži može rezultirati značajnom mijelosupresijom i potencirati toksičnost hemioterapije. Kod pacijenata koji imaju multiple koštane metastaze, za koje nije moguće sprovesti zračenje svih metastatskih promena, zračna terapija se može sprovesti na mestima rezidualnog tumora.

Zračna terapija se primenjuje i u terapiji bola jer može imati antidolorozni efekat kao i za smanjenje neuroloških komplikacija u palijativnom pristupu (214).

Toksičnost zračne terapije

Zbog najčešće lokalizacije tumora u dugim kostima i karlici, primarni kasni efekti primenjene zračne terapije u lečenju Ewing sarkoma su promene na kostima i mekim tkivima (128). Primena zračne terapije može dovesti do deficita rasta zbog oštećenja hondroblasta sa dozama od 10 do 20 Gy potencijalno dovodeći do inhibicije rasta dok sa dozom iznad 20 Gy dolazi do zaustavljanja rasta. Obim deficita rasta zavisi od uzrasta pacijenta u vreme lečenja i prisustva epifize sa zonama rasta u zračnom polju (Slika 13). Hipoplazija mekih tkiva se može javiti nakon primene doze od najmanje 20 Gy. Pored smanjenja volumena mišića i potkožnog tkiva, nakon primene većih doza može doći do fibroze koja će rezultirati ograničenjem pokreta i kretanja (128).



Slika 13: Ewing sarkom, sedam godina nakon sprovedenog lokalnog lečenja- hirurško lečenje i zračna terapija u uzrastu od 7 godina

(materijal Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije)

Kada se primenjuje preoperativna zračna terapija, češće su komplikacije hirurške rane. Primena postoperativne zračne terapije nije pokazala značajno povećanje incidence odbacivanja i frakture alografta ali postoje dokazi da zračna terapija može negativno uticati na strukturno uključivanje alografta (165).

Kada se zračna terapija primenjuje na predeo karlice, postoji mogućnost da i gonade budu u zračnom polju, tako da se mora voditi računa o njihovoj zaštiti kad god je to moguće (213).

Visoke doze zračenja velikog volumena creva treba izbegavati zbog rizika od opstrukcije i perforacije creva. U slučaju zračenja ES zida grudnog koša, posebna pažnja mora biti usmerena na ograničavanju doza zračenja na pluća i srce, naročito u slučaju primene hemioterapije koja sadrži antracikline.

Tokom zračne terapije, aktinomicin D i doksorubicin bi trebalo da budu izostavljeni zbog moguće radiosenzitizacije. Pacijenti koji su ranije primali visokodoznu hemioterapiju sa busulfanom, zahtevaju poseban oprez zbog moguće dodatne toksičnosti uzrokovane zračenjem pluća, kičmene moždine i creva (214).

Zračna terapija je povezana sa pojavom sekundarnih maligniteta. Jedna retrospektivna studija je pokazala da je kod pacijenata koji su primili 60 Gy i više, incidenca sekundarnog maligniteta iznosila 20%. Pacijenti koji su primili dozu zračenja od 48 Gy do 60 Gy imali su incidencu od 5%, a oni koji su primili manje od 48 Gy nisu razvili drugi malignitet (115).

1.9.5. VISOKODOZNA HEMIOTERAPIJA

Primena visokodozne hemioterapije (VDHT) sa reinfuzijom matičnih ćelija hematopoeze (RMČH) predstavlja još jednu strategiju intenziviranja terapije u ES (166). Zbog značajne toksičnosti ovog pristupa, VDHT je rezervisana za pacijente koji pripadaju grupi vrlo visokog rizika, uključujući metastatsku ili recidivantnu bolest. Do sada su sprovedene dve studije a trenutno je u toku studija za primenu ovog modaliteta lečenja kod pacijenata sa lokalizovanim oblikom ES (77,167,168,169,170).

U zajedničkoj studiji sarkoma grupa iz Italije i Skandinavije (ISG/SSG III) za grupu pacijenata standardnog rizika, indukciono lečenje se sastojalo iz VAC, V, VAI i EI režima. Na osnovu histopatološkog odgovora pacijenti su podeljeni u različite grane: pacijenti sa procenjenim dobrim odgovorom su primali devet ciklusa standardne hemioterapije u sastavu VAC, VAI i EI, a pacijenti sa lošim odgovorom su primali VAC, EC i EI hemioterapiju a nakon toga VDHT u sastavu busulfan i melfalan. Rezultati su pokazali sličan ishod lečenja pacijenata sa dobrim odgovorom koji su primili konvencionalnu hemioterapiju i pacijenata sa lošim odgovorom koji su primali VDHT (171).

U francuskom EW-93 trajalu, pacijenti sa lokalizovanim ES i lošim odgovorom na inicijalnu hemioterapiju su primali VDHT. Pokazano je da su rezultati ovog pristupa bili su bolji od prethodnih studija ispitivanih bez VDHT (172).

Objavljeno je više manjih studija koje su pokazale korist od VDHT, ali su se u tim studijama razmatrali samo pacijenti koji imaju dobar početni odgovor na primenjenu standardnu hemioterapiju.

Uloga visokodozne hemioterapije praćene reinfuzijom matičnih ćelija hematopoeze ispituje se u prospektivnom, randomizovanom trajalu Euro-Ewing 99 za pacijente koji su dijagnostikovani sa metastatskim oblikom bolesti i pacijente sa lokalizovanim tumorom ali lošim odgovorom na početnu hemioterapiju (77, 120).

U Euro-EWING-99 trajalu, pacijenti sa velikim primarnim tumorima koji su lokalno lečeni operacijom i zračenjem ili malim primarnim tumorima (<200 mL) i nepovoljnim histološkim ili radiološkim odgovorom na indukcionu hemioterapiju, randomizuju se na granu sa VDHT ili konstantnu konvencionalnu hemoterapiju (grana R2 loc). Još uvek se definitivni rezultati očekuju (77,120,121).

1.10. METASTATSKI OBLIK BOLESTI

Metastatski oblik bolesti u trenutku dijagnostikovanja otkriva se kod oko 25% pacijenata (4). Pacijenti sa metastazama pri dijagnozi leče se istim terapijskim pristupom kao i pacijenti sa lokalizovanim oblikom, iako bolest ima lošiju prognozu (77,120,174,175,176).

Nekoliko nerandomizovanih studija ispitalo je značaj intenzivnijeg, vremenski komprimovanog ili visokodoznog hemioterapijskog pristupa sa RMČH, sa obećavajućim rezultatima, ali dokazi o efikasnosti se još ispituju (177,178).

Najčešća lokalizacija metastatskih promena su pluća, kosti i/ili koštana srž. Prisustvo metastaza u trenutku dijagnostikovanja bolesti predstavlja najvažniji prognostički parametar ishoda bolesti (60,76,77,106,173,174). Pacijenti sa izolovanim plućnim metastazama imaju bolju prognozu od onih sa vanplućnim metastazama. (60,76,77,175,176)

Zračna terapija “kupanje pluća” poboljšava ishod za ove pacijente (60,76). COG je pristupio Euro Ewing 99 randomizovanoj studiji upoređujući “kupanje pluća” sa VDHT za pacijente sa inicijalno izolovanim plućnim metastazama (grana R2 pulm) (120). Analiza pacijenata sa vanplućnim metastazama (grana R3) identifikovala je da su tumori zapremine > 200 ml, uzrast >14 godina i proširena metastatska bolest nezavisni prognostički parametri nepovoljnog ishoda (77). Loši rezultati lečenja metastatskog oblika bolesti doveli su do agresivnijeg pristupa u lečenju ovih pacijenata uključujući intenzivirane režime hemioterapije, mijeloablativnu VDHT sa RMČH i korišćenje novih bioloških terapija.

Povećanje i intenziviranje režima hemioterapije još uvek nije poboljšalo ishod kod pacijenata sa metastatskim bolestima. U INT-0091, dodatak IE uz VACA hemioterapiju nije poboljšao ishod (106,176). Dodatak etopozida u EI-CESS-92, takođe nije poboljšao ishod za pacijente sa metastatskim oblikom, kao ni intenzivirane doze hemioterapije za ove pacijente u studiji COG (108,175,176).

Lokalna terapija primenjena na sve lokalizacije metastatskog oboljenja povezana je sa poboljšanim preživljavanjem čak i za pacijente sa vanplućnim metastazama (164). Više studija je ispitalo dalje intenziviranje doza kao deo VDHT režima sa reinfuzijom matičnih ćelija hematopoeze (77,167,169,170,178). Iako su neke studije prikazale moguće poboljšanje

ishoda ovom strategijom, većina prospektivnih studija imala je obeshrabrujuće rezultate (169,170). Intenzivnije terapije, od kojih mnoge uključuju visokodoznu hemioterapiju sa ili bez zračenja celog tela (eng: "total body") u kombinaciji sa RMČH, nisu pokazale poboljšanje procenta EFS kod pacijenata sa koštanim i / ili metastazama koštane srži (77,167,170).

Jedna od najvećih studija Euro Ewing 99-R3 grana je uključila pacijente sa primarnim diseminovanim metastatskim ES koji su lečeni sa šest ciklusa VIDE režima a nakon toga je sprovedena visokodozna hemioterapija sa reinfuzijom matičnih ćelija hematopoeze. Trogodišnji EFS je iznosio 27% a OS 34%. Kao nezavisni prognostički parametri označeni su prisustvo i broj promena na kostima, primarni tumorski volumen veći od 200 mL, uzrast iznad 14 godina, kao i dodatne plućne metastaze i zahvatanje koštane srži. Uticaj visokodozne hemioterapije sa RMČH za pacijente sa izolovanim metastazama pluća nije poznat i proučava se u studiji Euro Ewing 99, za koji su rezultati u toku (77,170).

Irinotekan je primenjen kao pojedinačni lek u inicijalnom pristupu za novodijagnostikovane pacijente sa metastatskim oblikom Ewing sarkoma i pokazao je skromnu efikasnost (195). Nastavljeno je dodatno ispitivanje kako bi se odredilo doziranje Irinotekana i kombinacije sa drugim lekovima za pacijente sa ES.

1.11. RECIDIVANTNI EWING SARKOM

Savremeni multimodalni terapijski režimi koji kombinuju intenzivno sistemsko lečenje primenom hemioterapije, poboljšanim hirurškim pristupom i naprednim planiranjem zračne terapije doveli su do smanjene učestalosti relapsa bolesti, posebno lokalnog recidiva.

Međutim, i pored primenjene multimodalne terapije, kod oko 30% pacijenata dolazi do ponovne pojave bolesti. Većina relapsa su ili izolovani udaljeni relapsi ili kombinovani udaljeni i lokalni relapsi (183,184,185,186).

Pacijenti sa primarnim metastatskim oblikom bolesti imaju veći rizik od relapsa od onih sa lokalizovanim oblikom bolesti. (71,183) Verovatnoća dugotrajnog preživljavanja nakon

relapsa je manja od 25% (71,183,184,185).Vreme i vrsta relapsa su važni prognostički parametri. Relaps ES je najčešći u roku od dve godine od inicijalne dijagnoze (oko 80%) i ti pacijenti imaju lošiju prognozu (petogodišnje postrelapsno preživljavanje manje od 10%). Pacijenti sa kasnijim relapsom imaju petogodišnje preživljavanje od 23% do 48% (71,183,184,185).

Istovremena pojava lokalnog recidiva i udaljenih metastaza povezuje se sa agresivnijim oblikom bolesti, sa ranim relapsom i lošim ishodom (183,185,187).

Izolovani plućni recidiv nije bio važan prognostički parametar u severnoameričkoj studiji (185). U italijansko/ skandinavskoj studiji, mlađi uzrast, duži interval bez bolesti i izolovani plućni relaps su povezani sa dužim preživljavanjem. Pacijenti koji su relapsirali nakon inicijalne terapije, koja je podrazumevala primenu VDHT sa RMČH, imali su manju verovatnoću da će postići drugu potpunu remisiju (174).

Lečenje ovih pacijenata zahteva pažljivo planiranje i procenu ciljeva terapije između pacijenta, porodice i medicinskog tima s obzirom da ne postoji utvrđen režim lečenja. Opcije za drugu liniju terapije obuhvataju hemioterapiju, mere lokalne kontrole bolesti koje uključuju zračnu terapiju i hirurgiju, nove terapije ili kombinaciju ovih po potrebi.

Pacijenti sa lokalnim relapsom se obično leče hirurškom procedurom nakon čega sledi hemioterapija (187). Kod više od polovine pacijenata sa lokalnim relapsom dijagnostikuju se i metastaze na plućima i/ili kostima i to lečenje zahteva obaveznu primenu hemioterapije (183,185). Zračna terapija “kupanje pluća” može poboljšati ishod lečenja kod pacijenata sa prisutnim metastazama pluća u relapsu bolesti (187).

Opcije za sekundarnu hemioterapiju kod ovih pacijenata nisu standardizovane, ograničene su i zavise od primarno sprovedenog lečenja kao i od moguće oštećene funkcije vitalnih organa zbog prethodno primenjene terapije (srce i bubrezi) u vreme ponovne pojave bolesti. Terapija sa doksorubicinom obično više nije izvodljiva zbog prethodno primenjenih kumulativnih doza. Režim IE je imao posebno visok procenat odgovora kod pacijenata sa relapsom ES koji prethodno nisu primili ove lekove (188). Pacijenti koji su primali veću dozu

ifosfamida u odnosu na prethodno dobijenu standardnu dozu (15 g/m² vs 9 g/m²)/imali su odgovor od 34% (189).

Dve kombinacije hemioterapije zasnovane na kamptotecinu (irinotekan-inhibitor topoizomeraze) su pokazale efikasnost u narednim linijama hemioterapije. Studije su pokazale da topotekan primenjen kao pojedinačni lek ima nizak procenat odgovora u ES (190,191). Dodavanjem ciklofosfamida postiiže se bolji odgovor (35%) (192,193).

Na osnovu ovih rezultata, COG je ispitao dodavanje režima topotekan/ciklofosamid u randomizovanom trajalu za pacijente sa novodijagnostikovanim ES. Kombinacija irinotekana i temozolomida ima sličan procenat odgovora (194,195). Ispituje se i dejstvo kombinacije gemcitabin i docetaksel (209).

Postoje režimi koji pružaju osnov za dodavanje biološki ciljnih terapija u budućim kliničkim ispitivanjima. Izveštaji o monoklonskim antitelima na receptor insulinskog faktora rasta 1 (*IGFRI*) daju objektivne odgovore u metastatskom recidivu ES u približno 10% slučajeva (210). U ovim studijama se prikazuju i odgovori gde se kombinuju *mTOR* inhibitor temsirolimus sa *IGFIR* antitelom. Stratifikacija prema *IGFIR* ekspresiji imunohistohemijom u jednoj od studija nije predviđala klinički ishod kod pacijenata sa recidivom ES. Istraživači se slažu da su neophodna dalja ispitivanja da bi se identifikovali pacijenti koji će verovatno imati koristi od terapije *IGFIR* (210).

Imunoterapija sa T-ćelijama specifičnim za antigen ispitivana je kod pacijenata sa ES, jer se imunološki posredovano uništavanje tumorskih ćelija ne oslanja na puteve koje koriste konvencionalne terapije na koje su takvi tumori često otporni. Opisano je nekoliko potencijalnih himernih antigenskih receptora koji su identifikovani za ES. Oni uključuju *HER2* (human epidermalni faktor rastnog faktora, *GD2*, *CD99* (MIC2 antigeni) i *STEAP1* (šest transmembranskih epitelnih antigena prostate). Neki su još u ranoj fazi ispitivanja (210).

Trenutno se sprovode klinička ispitivanja sa sledećim lekovima za pacijente sa recidivantnim ES: pembrolizumab, nivolumab sa ili bez ipilimumaba, PARP inhibitor BMN-673 u kombinaciji sa kratkotrajnim temozolomidom u niskim dozama (210, 211).

Nekoliko studija je ispitivalo dejstvo VDHT sa autolognom reinfuzijom hematopoetskih matičnih ćelija kod pacijenata sa recidivantnim ES. Tumačenje rezultata ovih studija otežava heterogenost lečenih pacijenata, heterogenost režima kondicioniranja i nedostatak randomizovanih studija (196). VDHT sa melfalanom i etopozidom, sa hiperfrakcioniranim zračenjem celog tela uz moguć dodatak karboplatinuma, nakon čega sledi reinfuzija matičnih ćelija hematopoeze, uprkos inicijalnom odgovoru, nisu uspeli da postignu dugotrajnu remisiju nakon lečenja ranog relapsa (170,197).

Rezultati sa busulfanom i melfalanom deluju ohrabrujuće i mogu poboljšati prognozu pacijenata sa relapsom. Međutim, uloga VDHT u lečenju pacijenata sa relapsom ES ostaje još uvek nedovoljno jasna (77,166,178,184,198).

Istraživanja pacijenata kod kojih je sprovedena alogena transplantacija matičnih ćelija u ovoj fazi bolesti nisu pokazala poboljšano preživljavanje u poređenju sa autolognom transplantacijom a povezana je sa većim brojem komplikacija (166, 214).

1.12. KASNI EFEKTI LEČENJA

Preživeli pacijenti lečeni od ES suočavaju se sa brojnim potencijalnim kasnim posledicama lečenja. Shodno objavljenim podacima, ti pacijenti imaju šestostruko povećani rizik za pojavu teških, vitalno ograničavajućih i ugrožavajućih zdravstvenih stanja u poređenju sa njihovom braćom i sestrama (199). Kasni efekti lečenja najviše se vezuju za gubitak funkcije ekstremiteta, toksičnost organa i rizik od pojave sekundarnog maligniteta. Za primarne tumore gornjih ekstremiteta, očuvanje ruke je povezano sa poboljšanim funkcionalnim ishodom i boljim samopouzdanjem. Kod pacijenata sa tumorom lokalizovanim na donjim ekstremitetima, funkcionalnost i kvalitet života je zadovoljavajući čak i u slučaju distalne amputacije (200). Korišćenje proteze ili alografta se mogu komplikovati nefuncionalnošću ili infekcijom proteze, što zahteva reoperaciju a ponekad i odloženu amputaciju (200). Postoje dokazi da se ukupna funkcija i kvalitet života ne razlikuju u odnosu na primenjenu hiruršku proceduru za lokalnu kontrolu (amputacija/resekciona hirurgija) (201).

Zračna terapija primenjena kao modalitet lokalne kontrole može biti komplikovana poremećajima rasta i kostiju i mekih tkiva (214).

Kasni efekti specifični za organe su zavisni od vrste primenjenih citotoksičnih lekova. Većina efekata odnosi se na upotrebu lekova iz grupe antraciklina (doksorubicin) i alkilišućih agenasa (ciklofosfamid i ifosfamid). Kardiomiopatija je zavisna od primenjene doze antraciklina. Shodno protokolu, doze doksorubicina su ograničene od 360 do 450 mg/m². Zračna terapija predela grudnog koša koje uključuje i predeo srca može povećati kardiotsičnost antraciklina (214). Primena alkilišućih agenasa povezuje se sa muškim sterilitetom. S obzirom da primena zračne terapije na gonade dovodi do sterilnosti, pri razmatranju zračne terapije karlice treba uzeti u obzir zaštitu testisa i transpoziciju jajnika (213). Osim toga, postoji i umereni rizik za dugotrajnu nefrotoksičnost sa ifosfamidom, koja je zavisna od uzrasta pacijenta i primenjene doze (202).

Preživeli pacijenti lečeni od ES imaju dva glavna faktora rizika za razvoj sekundarnog maligniteta a to su primenjena hemioterapija i zračna terapija. Najveći broj sekundarnih tumora se javlja u predelu ozračene regije, pri čemu su najčešći karcinom dojke i osteosarkom (199,203). Za pacijente sa ES koji imaju preživljavanje od najmanje pet godina, procenjena kumulativna učestalost sekundarnih malignih tumora je 9% za 25 godina (199).

Smanjena primena zračne terapije za lokalnu kontrolu, posebno posle 1985.godine, bila je povezana sa nižim procentom sekundarnih solidnih tumora (203). Leukemija se kao sekundarni malignitet nakon lečenja ES javlja sa učestalošću od 1% do 3%, obično u roku od tri godine nakon inicijalne dijagnoze. Ovaj rizik je povezan sa primenom oba alkilišuća agensa i etopozida (204,205).

U studiji INT-0091 nije dokazana razlika u pojavi sekundarnih maligniteta između terapijskih grana sa i bez etopozida što je ukazalo na to da dodavanje etopozida nije nezavisno povećalo rizik od sekundarnog maligniteta (106). Veće doze alkilišućih agenasa mogu povećati rizik od sekundarne leukemije: grana C INT-0091 koristi veoma visoke kumulativne doze IFO (14,0 g / m²) i Cyc (17,6 g / m²), što dovodi do 11% kumulativne incidence sekundarne leukemije (204).

Shodno inicijalnoj analizi izvodljivosti Euro Ewing 99, učestalost toksičnosti se srazmerno smanjuje sa povećanjem godina (120).

U studiji sprovedenoj u Memorial Sloan Kettering Cancer Centru, kumulativna incidenca sekundarnih neoplazmi kod 300 pacijenata lečenih od ES između 1974 i 2012. godine, dvadest pet godina nakon dijagnoze, bila je 15.0% (interval pouzdanosti 4.8-25.1%). Većina ovih pacijenata imala je zračnu terapiju ali još uvek ne postoje uporedivi podaci za značajan broj pacijenata kod kojih nije primenjena zračna terapija (220).

1.13. KVALITET ŽIVOTA

Poslednjih godina, veoma važno mesto u lečenju dece sa malignim bolestima predstavlja praćenje kvaliteta života (eng: health-related quality of life, HRQL) nakon sprovedenog lečenja (201). Postoji svega nekoliko istraživanja HRQL ishoda specifičnih za ES. Uglavnom su pacijenti sa ES proučavani zajedno sa pacijentima lečenim od drugih sarkoma, najčešće osteosarkoma. U jednom objavljenom istraživanju gde je ispitivan HRQL ishod mlađih odraslih koji su izlečeni od osteosarkoma u detinjstvu, rezultat je iznosio 0,8, što odgovara odgovorima indiferentnosti između dve opcije za tretman pacijenta: jedan koji je povezan sa 100% šansom da se održi trenutno stanje zdravlja, a drugi sa 80% šansom da se dobije savršeno zdravlje, ali sa 20% šanse za smrt (206). Još jedna studija koja je obuhvatila pacijente lečene od sarkoma kosti u detinjstvu uporedila je zdravstveni status sa kontrolnim grupama koje odgovaraju uzrastu. Izlečeni pacijenti su prijavili lošiji zdravstveni status u poređenju sa kontrolnom grupom odgovarajućeg uzrasta iako su imali dugoročno preživljavanje nakon lečenog sarkoma kosti u dečjem uzrastu, što je dovelo do potrebe daljeg istraživanja kako bi se poboljšao sveobuhvatni ishod pacijenata lečenih od koštanih sarkoma u detinjstvu (207). Druga studija koja je upoređivala osobe koje su izlečene od sarkoma sa kontrolnim grupama odgovarajućeg uzrasta, takođe je pokazala lošiji zdravstveni status kod izlečenih pacijenata, naročito u vezi sa fizičkom funkcijom i kozmetološkim statusom, mada je 53% pacijenata imalo hiruršku intervenciju po tipu amputacije ili rotacione plastike kao modalitet lokalne kontrole bolesti (208).

2. CILJEVI RADA

Svrha ove studije je bila da se analiziraju rezultati lečenja ES kosti u detinjstvu koji su lečeni u referentnom centru u Srbiji kao i da se definišu mogući prognostički parametri a sve u cilju selektovanja pacijenata koji pripadaju različitim prognostičkim grupama (standardni rizik, visoki rizik) i planiranja optimalnog terapijskog pristupa.

U istraživanju se pošlo od nekoliko pretpostavki: klinički parametri kao što su uzrast deteta, pol, primarna lokalizacija tumora, veličina tumora, stepen proširenosti bolesti kao i vrednost serumske Laktat dehidrogenaze (LDH) su od značaja za ishod lečenja dece obolele od Ewing sarkoma; odgovor na primenjenu neoadjuvantnu (preoperativnu) hemioterapiju u smislu postojanja minimalno vijabilnog tumora ili bez vijabilnog tumora može uticati na ishod bolesti. Takođe i ekspresija pojedinih gena, kao potencijalnih biomarkera može imati uticaj na ishod bolesti. U zavisnosti od karakteristika kliničkih, biomolekularnih i patoloških prognostičkih parametara moguće je selektovati pacijente koji pripadaju različitim prognostičkim grupama (standardni rizik, visoki rizik) i shodno tome planirati optimalan terapijski pristup.

Na osnovu savremenih saznanja postavili smo sledeće ciljeve naše studije:

1. Određivanje prognostičkog značaja kliničkih parametara
2. Određivanje prognostičkog značaja patoloških parametara
3. Određivanje prognostičkog značaja biomarkera
4. Analiza ishoda lečenja ispitivanih pacijenata sa dijagnostikovanim Ewing sarkomom u odnosu na ukupno preživljavanje (OS), preživljavanje bez događaja (EFS) i preživljavanje bez znakova bolesti (DFS).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. PACIJENTI

Po svom karakteru ovo je bila retrospektivno-prospektivna studija koja je obuhvatila grupu od 107 pacijenata obolelih od Ewing sarkoma kosti koji su lečeni savremenim multidisciplinarnim pristupom u referentnom centru, na Službi za pedijatrijsku onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije (IORS). Pacijenti su lečeni hemioterapijom i zračnom terapijom u periodu od januara 2000 godine do decembra 2014 godine. Tok i ishod bolesti su praćeni u periodu od 01.01.2000 godine do 31.12.2016 godine.

Kriterijumi za uključivanje pacijenata u studiju bili su potvrđena patohistološka dijagnoza ES kosti i da prethodno nisu lečeni od maligne bolesti.

Inicijalna dijagnostika najčešće je sprovedena u Institutu za ortopedsko-hirurške bolesti "Banjica" (IOHB), sporadično u Univerzitetnoj dečjoj klinici (UDK), Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta "Dr Vukan Čupić" (IMD), kao i u regionalnim medicinskim centrima. Histopatološka analiza učinjene biopsije tumora rađena je u Institutu za patologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Po dobijenoj histopatološkoj potvrdi koja je podrazumevala i imunohistohemijsku potvrdu ES, pacijenti su prezentovani Sarkoma konzilijumu i na osnovu odluke konzilijuma započinjali onkološko lečenje u IORS-u kao nacionalnom referentnom centru za lečenje koštanih tumora.

Hemioterapija je najvećim delom sprovedena na Službi za pedijatrijsku onkologiju IORS-a, sporadično u IMD, dok je zračna terapija za sve pacijente primenjena u IORS-u. Hirurška intervencija nakon primenjene neoadjuvantne hemioterapije je sprovedena najčešće u IOHB "Banjica" i u zavisnosti od lokalizacije tumora u Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju, Vojno-medicinskoj akademiji i Institutu za plućne bolesti KCS.

Po dobijenom definitivnom histopatološkom nalazu, verifikovanom od strane referentnog patologa, koji je podrazumevao i određivanje granica tumora ka okolnom zdravom tkivu i

određivanje procenta nekroze tumora tj. procenta vijabilnih ćelija tumora kao odgovor na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju, shodno protokolu, pacijenti su nastavljali započeto lečenje. Dalje lokalno i sistemsko lečenje je sprovedeno u odnosu na stadijum bolesti, karakter hirurške intervencije kao i na histopatološki odgovor na primenjenu hemioterapiju.

Studijom su obuhvaćeni pacijenti uzrasta do 19 godina sa histopatološki verifikovanom dijagnozom ES koštanog porekla.

Po prijemu na Službu za pedijatrijsku onkologiju IORS-a, pacijenti su kompletno klinički obrađivani. Kliničku obradu su činili:

- Anamneza i fizikalni pregled
- SE, KKS, standardne biohemijske analize, LDH i alkalna fosfataza
- MR/CT evaluacija mesta primarnog tumora,
- CT evaluacija pluća,
- Scintigrafija skeleta,
- RTG/MR evaluacija pozitivnog scintigrafskog mesta,
- aspirat / biopsija kosne srži

Po učinjenoj kompletnoj dijagnostičkoj evaluaciji pacijente smo podelili na sledeći način:

U odnosu na uzrast, pacijenti su podeljeni u dve grupe:

- Pacijenti uzrasta ≤ 14 godina
- Pacijenti uzrasta > 14 godina

U odnosu na oblik bolesti, pacijenti su podeljeni u dve grupe:

- Pacijenti sa lokalizovanim oblikom bolesti
- Pacijenti sa metastatskim oblikom bolesti

U odnosu na lokalizaciju tumora, pacijenti su podeljeni u sledeće grupe:

- Pacijenti sa tumorom lokalizovanim u predelu ekstremiteta
- Pacijenti sa tumorom lokalizovanim u predelu karlice
- Pacijenti sa tumorom centralne lokalizacije
- Pacijenti sa tumorom druge lokalizacije

U odnosu na vrednost LDH u serumu, pacijenti su podeljeni u dve grupe:

- Pacijenti sa normalnim vrednostima s-LDH (< 460 IU /L)
- Pacijenti sa povišenim vrednostima s-LDH (> 460 IU/L)

U odnosu na veličinu tumora, pacijenti su podeljeni u dve grupe:

- Pacijenti sa veličinom tumora ≤ 8 cm
- Pacijenti sa veličinom tumora > 8 cm

U odnosu na učinjeni modalitet lokalne kontrole, pacijenti su podeljeni u tri grupe:

- Pacijenti kod kojih je sprovedeno samo hirurško lečenje
- Pacijenti kod kojih je sprovedena samo zračna terapija
- Pacijenti kod kojih su sprovedena oba modaliteta lečenja

U odnosu na histopatološki odgovor na primenjenu hemioterapiju, pacijenti su podeljeni u dve grupe:

- Pacijenti sa dobrim odgovorom na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju
- Pacijenti sa lošim odgovorom na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju

Pacijenti su lečeni primenom multimodalnog tretmana koji je podrazumevao primenu hemioterapije, hirurgije i/ili zračne terapije i bio baziran na važećim protokolima u vreme postavljanja dijagnoze. Lečenje je kod više od 90% pacijenata sprovedeno po protokolu EURO EWING 99 i EWING 2008, dok je kod manjeg broja pacijenata (10 pacijenata) lečenje sprovedeno po protokolima EICESS 92, CWS 2002, CWS 2009.

U studiju je uključeno i 20 pacijenta obolelih od Ewing-ovog sarkoma kod kojih je sprovedena analiza genskih ekspresija *TGFβ1* i *SERPINI1* gena. Krv pacijenata za navedena ispitivanja je uzimana venepunkcijom, prilikom sprovođenja obaveznih i preporučenih dijagnostičkih procedura (rutinske biohemijske analize). Nakon razgovora i detaljnog obaveštavanja roditelja pacijenata, potpisan je dobrovoljni informisani pristanak za učestvovanje u studiji. Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Izolacija limfocita

Za izolaciju limfocita korišćeni su sveži uzorci periferne krvi (10mL). Nakon centrifugiranja krvi u koju je dodat antikoagulans (etilen diamin tetra sirćetna kiselina, engl. ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) u epruveti se izdvajaju 3 sloja: na dnu su ostale ćelije krvi, iznad je prsten limfocita a na vrhu je izdvojena plazma. Za izolaciju limfocita korišćen je limfoprep (*Histopaque-1077*, *Sigma*) centrifugiranjem pomoću gradijenta gustine.

Izolacija RNK

RNK iz limfocita pacijenata izolovana je uz pomoć *TRI Reagent-a* (*Sigma*), monofaznog rastvora fenola i guanidin-izotiocijanata, a proces izolacije izvršen je klasičnim metodom izolacije RNK. Čistoća i koncentracija RNK analizirana je spektrofotometrijski uz pomoć aparata *BioSpec-nano* (*Shimadzu*).

Reverzna transkripcija

Metoda reverzne transkripcije, kojom se izolovana RNK prevodi u cDNK, izvršena je prema uputstvu proizvođača kita koji je korišćen (*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*, *Thermo Fisher Scientific*).

Reakciona smesa ukupnog volumena 20 μ l sastojala se iz:

- 2 μ g RNK
- 2 μ L 10 x RT pufera
- 2 μ L 10 x RT nasumičnih prajmera
- 0,8 μ L 25 x dNTP miksa (100 mM)
- 1 μ L *MultiScribe*TM reverzne transkriptaze (50 U/ μ L)
- 1 μ L RNaznog inhibitora
- *Nuclease-free* vode

Finalna smeša inkubirana je 10 min na 25°C, zatim 2 h na 37°C, a reakcija je zaustavljena inkubiranjem 5 min na 85°C.

Analiza genskih ekspresija uz pomoć kvantitativnog PCR-a

Za merenje nivoa ekspresije *TGF β 1* i *SERPINI1* gena u uzorcima krvi pacijenata korišćena je metoda kvantitativne polimerazne reakcije u realnom vremenu (*engl. quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR*) sa komparativnom ddCt analizom. Za normalizaciju sintetisane cDNK u uzorcima korišćena je endogena kontrola gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (*GAPDH*), a za kalibratora je odabran uzorak iz limfocita. Svi eksperimenti rađeni su u duplikatu.

Ekspresija *GAPDH*, *TGF β 1* i *SERPINI1* gena praćena je korišćenjem *TaqMan* tehnike (protokol po uputstvu *TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)*, *Thermo Fisher Scientific*). Prajmeri za ove gene komercijalno su dizajnirani i korišćeni su u okviru *TaqMan Gene Expression Assay*. Kao endogena kontrola korišćen je *GAPDH* (tabela 7).

Reakciona smeša finalnog volumena 10 μ l sastojala se od sledećih komponenti:

- 1 μ g cDNK
- 2 x *TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)*
- 20 x *TaqMan Gene Expression Assay Mix (Applied Biosystems)*
- *Nuclease-free* voda

Nivoi ekspresije navedenih gena mereni su na 7500 *Real-time* PCR aparatu (*Applied Biosystems*), a formula po kojoj je izračunata relativna vrednost količine ekspresije ciljnog gena je:

$$Q = 2^{-ddCt}, \text{ gde je } ddCt = dCt_{\text{uzorak}} - dCt_{\text{kalibrator}} = (Ct_{\text{ciljni gen}} - Ct_{\text{endogena kont.}}) - (Ct_{\text{ciljni gen, kalibrator}} - Ct_{\text{endogena kontrola, kalibrator}})$$

Temperaturni profil reakcije korišćene za amplifikaciju *GAPDH*, *TGFβ1* i *SERPINI1* gena bio je sledeći:

1. 2 min / 50°C
2. 10 min / 95°C
3. 45 ciklusa:
 - 15 s / 95°C
 - 1 min / 60°C

Tabela 7: Tag man eseji i ekspresija gena

Naziv gena	TaqMan eseji (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)
<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1
<i>TGFβ1</i>	Hs00998133_m1
<i>SERPINI1</i>	Hs01115397_m1

3.2. LEČENJE

3.2.1. Hemioterapija

Hemioterapijsko lečenje primenjeno je kao neoadjuvantno i adjuvantno. Neoadjuvantna hemioterapija primenjena je inicijalno kod skoro svih pacijenata a nakon učinjene biopsije i histopatološke potvrde ES kosti.

Neoadjuvantna hemioterapija

Shodno protokolima EURO EWING 99, 2008, EWING 2008 i EWING 2012, primenjena neoadjuvantna hemioterapija bila je po VIDE režimu u trajanju od 6 ciklusa.

VIDE

- Vincristin – 1,5 mg/m² (max. 2 mg); dan: 1 i 21
- Ifosfamid - 3000 mg/m²; dan: 1, 2, 3 i 21, 22, 23 uz mesnu
- Doxorubicin - 20 mg/m²; dan: 1, 2, 3 i 21, 22, 23
- Etoposid - 150 mg/m²; dan: 1, 2, 3 i 21, 22, 23

Ciklusi su davani u 3-nedeljnim intervalima do ukupno 6 ciklusa.

- drugi protokoli (EICESS 92, CWS 2002 i CWS 2009) su u zavisnosti od primenjenog režima u svom sastavu imali sledeće citotoksične lekove: ifosfamid/ciklofosfamid, vinkristin, doksorubicin, aktinomcin D, etopozid.

Procena terapijskog odgovora, shodno primenjenom protokolu, rađena je najčešće posle III i V ili VI ciklusa i posle XI ciklusa hemioterapije, ponavljanjem dijagnostičkih procedura relevantnih za određivanje stepena proširenosti bolesti i dimenzija tumora (MR regije primarnog tumora, RTG/ CT pluća, klinički pregled).

Mobilizacija matičnih ćelija hematopoeze rađena je najčešće nakon četvrtog ciklusa hemioterapije.

Nakon sprovedenih šest ciklusa neoadjuvantne (preoperativne) hemioterapije i učinjene hirurške ekstirpacije tumora, pacijente smo na osnovu terapijskog odgovora podelili u dve grupe:

1. **Grupa standardnog rizika** – pacijenti sa lokalizovanim oblikom bolesti, veličinom tumora ≤ 8 cm i dobrim histopatološkim odgovorom na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju.
2. **Grupa visokog rizika** – pacijenti sa lokalizovanim oblikom bolesti ali veličinom tumora > 8 cm i lošim odgovorom na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju kao i pacijenti sa metastatskim oblikom bolesti

Adjuvantna hemioterapija

Adjuvantna hemioterapija ordinirana je nakon sprovedenog lokalnog lečenja koje je podrazumevalo primenu hirurgije i/ili zračne terapije.

Shodno primenjenom protokolu, adjuvantna hemioterapija se sprovodila po sledećim režimima:

VAI

- Vinkristin – $1,5 \text{ mg/m}^2$ (max. 2 mg); dan: 1 i 21
- Aktinomicin D – $1,5 \text{ mg/m}^2$; dan: 1, 21
- Ifosfamid - 3000 mg/m^2 ; dan: 1, 2 i 21, 22 uz mesnu

Ili

VAC

- Vinkristin – $1,5 \text{ mg/m}^2$ (max. 2 mg): dan: 1 i 21
- Aktinomicin D – $1,5 \text{ mg/m}^2$; dan: 1, 21
- Ciklofosfamid - 1200 mg/m^2 ; dan: 1 i 21 uz mesnu

Ciklusi su ordinirani u 3-nedeljnim intervalima

- drugi protokoli (EICES 92, CWS 2002, CWS 2009).

Ukupan broj primenjenih ciklusa hemioterapije u zavisnosti od protokola i grane lečenja iznosio je od 7 za pacijente koji su imali VDHT i RMČH do 14 ciklusa.

Pre svakog ciklusa hemioterapije, radi procene postojećeg stanja, rađene su kontrolne laboratorijske analize i to: kompletna krvna slika i standardne biohemijske analize, LDH i alkalna fosfataza. Zbog moguće nefrotoksičnosti i hemoragijskog cistitisa zbog primanja ifosfamida rađena je analiza urina. Pre primene antraciklinske hemioterapije rađena je kardiološka obrada koja je podrazumevala EKG i inicijalni EHO pregled srca radi procene ejekcione frakcije, a u skladu sa primenjenim protokolom.

3.2.2. Hirurgija

Hirurška procedura podrazumevala je inicijalno biopsiju radi dobijanja histopatološkog nalaza. Nakon primene neoadjuvantne (preoperativne) hemioterapije i učinjenih dijagnostičkih procedura radi procene postojećeg stanja, planirano je lokalno lečenje shodno protokolu.

Hirurška intervencija je definisana kao:

- **Kompletna resekcija** - kada su histopatološke margine bile negativne, što je podrazumevalo ablativnu hirurgiju, kompartmentalnu resekciju (*“en block”* resekciju tumora i kompletnog pripadajućeg kompartmenta, gde je tumor kompletno anatomski ograničen) i široku eksciziju (*“en block”* eksciziju kroz normalno tkivo uz uklanjanje tumora sa pseudokapsulom).
- **Marginalna resekcija** - bilo koja resekcija koja dospeva izvan pseudokapsule sa suspektom mikroskopskom rezidualnom bolešću (marginalna resekcija u odnosu na Ennekingove kriterijume) i resekcija sa mikroskopski infiltrisanim marginama (intralezionalna resekcija po Ennekingu).

Histopatološka analiza je rađena posle hirurške procedure, od strane referentnog patologa dobijen je definitivni histopatološki nalaz sa određenim procentom posterapijske nekroze tumora tj. procenom vijabilnosti tumora. Određivanje procenta nekroze je vršeno na osnovu Huvosove skale, analizom minimum 15 reprezentativnih isečaka iz tumorskog tkiva, uzetih transverzalnim presecima udaljenosti od 5 cm kroz resekovanu leziju. Svaki fiksirani i ukalupljeni uzorak je sečen serijski na po tri preseka debljine 4 μ m sa razmacima od minimum 8 μ m. Na svakom uzorku je određivan procenat nekroze a potom je izračunata njegova aritmetička vrednost koja je i prikazana u zvaničnom histopatološkom izveštaju.

Procenat nekroze tumora veći od 90% (prisustvo vijabilnih ćelija ispod 10%) je smatran dobrim odgovorom na primenjenu neoadjuvantnu (preoperativnu) hemioterapiju dok je procenat nekroze tumora \leq od 90% (prisustvo \geq 10% vijabilnih ćelija) predstavljao loš odgovor na primenjenu hemioterapiju.

Po dobijanju definitivnog HP nalaza, pacijenti su nastavljali onkološko lečenje primenom ostalih modaliteta lečenja u zavisnosti od procenjenog odgovora i sprovedenog modaliteta lokalnog lečenja, shodno protokolu lečenja a nakon konzilijarne odluke.

3.2.3. Zračna terapija

Zračna terapija kao vid lokalne kontrole bolesti primenjena je kao:

- **Preoperativna zračna terapija**
- **Postoperativna zračna terapija**
- **Radikalna zračna terapija**

Rana zračna terapija sprovedena je konkomitantno tokom 5. i 6. ciklusa, ređe 3. i 4. ciklusa hemioterapije kada je procenjena indikacija za preoperativno zračenje, kao na primer, rana zračna terapija kod kompresije kičmene moždine ili u slučaju tumorske progresije tokom sprovođenja hemioterapije. Preoperativno zračenje je sprovedeno dozama od 44.8 Gy ili 54.4 Gy, u zavisnosti od primenjenog protokola.

Postoperativna zračna terapija je primenjena kod pacijenata nakon učinjene definitivne hirurške intervencije, a shodno važećem protokolu. Lečenje je sprovedeno transkutanom zračnom terapijom na Linearnom akceleratoru, fotonima energije 6, 10 ili 18 MeV-a konvencionalnim režimom frakcionisanja tokom 5 dana nedeljno. Ukupna doza primenjene zračne terapije shodno protokolu a u odnosu na hirurške granice iznosila je:

- Intralezionalna hirurgija - 54.4 Gy
- Marginalna hirurgija sa lošim histološkim odgovorom - 54.4 Gy
- Marginalna hirurgija sa dobrim histološkim odgovorom - 44.8 Gy
- Široka resekcija sa lošim histološkim odgovorom - 44.8 Gy

Najčešća dnevna doza iznosila je 1.8 Gy po frakciji, tehnikom izocentra iz dva polja: na prošireno ležište tumora i “boost” dozom na predeo ležišta tumora ili rezidualni tumor. Zračno polje je uključivalo inicijalno ležište tumora uz zahvatanje sigurnosnih granica 2-5 cm do u zdravo tkivo, a u zavisnosti od lokalizacije tumora. Planiranje zračne terapije je sprovedeno na rendgen simulatoru ili skenerskom (RTG/CT) simulatoru.

Kod pacijenata sa adekvatnim hirurškim marginama (širokim ili radikalnim) i sa dobrim histološkim odgovorom nije se sprovodila zračna terapija.

Radikalna zračna terapija je primenjena kao jedini vid lokalne kontrole bolesti kada nije bilo moguće učiniti adekvatnu hiruršku proceduru a nakon konzilijarno donete odluke. Shodno protokolu, primenjivana je doza od 44.8 Gy uz “boost”dozu na ležište tumora do najmanje 54.4 Gy. U pojedinačnim slučajevima, u zavisnosti od lokalizacije tumora i uzrasta pacijenta, doza se povećavala (do maksimalno 60.4 Gy) ili smanjivala. Kod dece uzrasta ispod 10 godina sa povoljnim prognostičkim parametrima (vrlo mali tumori <100 ml tj. potpuni odgovor na hemioterapiju prema MRI i/ili rebiopsiji), doza zračenja se smanjivala na 44.8 Gy.

Tokom zračne terapije a shodno protokolu ordinirani su ciklusi hemioterapije.

Aktinomicin D (planiran tokom VAI i VAC adjuvantne (konsolidacione) hemioterapije se izostavljao tokom zračne terapije.

Kod nekih pacijenata, shodno protokolu, umesto ActD tokom zračenja, ordiniran je etopozid u dozi od 150mg / m², dan: 1-3.

Zračna terapija “kupanje pluća”

Zračna terapija “kupanje pluća” se sprovodila kod pacijenata koji su inicijalno imali plućne metastaze a shodno konzilijarno donetoj odluci. Oba plućna krila su se zračila na Linearnom akceleratoru fotonima korišćenjem suprotnih polja, uz korektivni faktor za pluća prilikom planiranja zračne terapije, do doze od 15 Gy (kod pacijenata <14 godina) ili 18 Gy (pacijenti > 14 godina). Dnevna frakcija iznosila je 1.5 Gy, konvencionalnim režimom fracioniranja.

Pacijenti kod kojih je planirana zračna terapija pluća a kod kojih je učinjena RMČH u režimu kondicioniranja umesto busulfana primali su treosulfan i melfalan (Treo-Melfalan) prema važećem protokolu lečenja.

Palijativna zračna terapija

Palijativna zračna terapija sa 36 Gy u 12 frakcija , sa dnevnom dozom od 3 Gy konvencionalnim režimom fracioniranja sprovedena je, shodno protokolu lečenja, na metastatska mesta kod pacijenata sa diseminacijom ili progresijom bolesti.

3.2.4. Visokodozna hemioterapija

Visokodozna hemioterapija praćena reinfuzijom matičnih ćelija hematopoeze sprovedena je u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta “Dr Vukan Čupič” na Odeljenju za transplantaciju kostne srži sa laboratorijom za kriobiologiju.

Pacijenti su shodno kriterijumima protokola, a nakon učinjene evaluacije, prezentovani Komisiji za transplantaciju. Shodno odluci Komisije, prvo je sprovedena mobilizacija, separacija i kriokonzervacija matičnih ćelija hematopoeze a nakon toga, shodno protokolu, i visokodozna hemioterapija sa reinfuzijom matičnih ćelija hematopoeze. S obzirom na

planirano sprovođenje zračne terapije pluća, visokodozna hemioterapija ordinirana je u sastavu melfalan, treosulfan (umesto busulfana).

3.3. TOKSIČNOST TERAPIJE

Tokom onkološkog lečenja praćeni su parametri toksičnosti primenjene onkološke terapije. Redovno je procenjivana moguća hematološka toksičnost tako što je kontrolisana kompletna krvna slika kao i biohemijske analize radi procene nefrotoksičnosti i hepatotoksičnosti. Zbog primene antraciklinske hemioterapije redovno je praćen kardiološki status.

3.4. VREME PRAĆENJA

Posle završenog kombinovanog onkološkog lečenja pacijenti su redovno kontrolisani u IORS-u. Kontrolisanje pacijenta podrazumevalo je redovne kontrolne preglede u okviru desetogodišnjeg praćenja.

Prva kontrola je planirana nakon 6-8 nedelja, a potom u prvoj i drugoj godini na 2-3 meseca, zatim na 4-6 meseci i posle pete godine jednom godišnje, do ukupnog praćenja od 10 godina. Kontrole su podrazumevale proveru sledećih nalaza: SE, KKS, standardnih biohemijskih analiza, laktat dehidrogenaze (LDH) i alkalne fosfataze, MR/CT pregled mesta primarnog tumora, RTG/CT pregled pluća, kontrolne preglede hirurga operatora a po potrebi i druge dijagnostičke metode i preglede određenih subspecijalista u cilju praćenja ishoda lečenja i mogućih kasnih efekata primenjene onkološke terapije.

3.5. STATISTIČKA METODOLOGIJA

- Za ispitivanje saglasnosti uzoračkih raspodela sa normalnom raspodelom, korišćeni su grafici: Normal Q-Q Plot i Histogram, kao i testovi: Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk.
- Za opis parametara od značaja α u zavisnosti od njihove prirode, korišćene su mere deskriptivne statistike: frekvencije, procenti, srednja vrednost (prosek), medijana, standardna devijacija (SD) i opseg (raspon).
- Za nivo statističke značajnosti usvojena je vrednost $\alpha=0.05$. U slučaju višestrukog testiranja nad istim setom podataka, korišćena je Bonferroni korekcija α -vrednosti ($\alpha_1=0.05/3=0.0167$; $\alpha_2=0.05/6=0.0083$).
- Za prikaz OS, DFS i EFS korišćena je Kaplan-Meier product-limit metoda a za njihov opis korišćene su medijane Survival Analysis i odgovarajući 95% intervali poverenja (95%CI). Za testiranje razlika u OS, DFS i EFS u odnosu na parametre od značaja, korišćen je Log-rank test.
- Analiza podataka je rađena u statističkom programu R version 3.3.2 (2016-10-31) -- "Sincere Pumpkin Patch"; Copyright (C) 2016 The R Foundation for Statistical Computing; Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit) (dostupno na: www.r-project.org; preuzeto: 21.01.2017.)

4. REZULTATI

4.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE PACIJENATA I OBOLJENJA

4.1.1. Opšte karakteristike pacijenata

Osnovnu grupu ovog istraživanja čini 107 pacijenata obolelih od koštanog Ewing sarkoma koji su u periodu od januara 2000. do decembra 2014 godine dijagnostikovani i lečeni multidisciplinarnim pristupom i praćeni do decembra 2016 godine u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije na Službi za pedijatrijsku onkologiju.

Od ukupno 107 pacijenata uključenih u studiju, 64 (59.81%) pacijenata bilo je muškog a 43 (40.19%) ženskog pola. Odnos muškog u odnosu na ženski pol iznosio je: 1.48:1.

Najmlađi pacijent bio je uzrasta 3 godine a najstariji je imao 19 godina u trenutku dijagnostikovanja bolesti. Srednja vrednost uzrasne grupe bila je 13.07 godina a medijana 14 godina. Opšte karakteristike pacijenata prikazane su u tabeli 8.

Tabela 8. Karakteristike pacijenata

Karakteristika	N	(%)
<i>Pol</i>		
Muški	64	59.81
Ženski	43	40.19
<i>Uzrast (godine)</i>		
Srednja vrednost (SD)	13.07 (3.8)	
Medijana (opseg)	14 (3-19)	
<i>Uzrast (kategorije)</i>		
≤ 14 godina	60	56.07
> 14 godina	47	43.93

Shodno uzrastu, pacijente smo podelili u dve grupe, u grupu pacijenata uzrasta do 14 godina gde je bilo 60 pacijenata (56.07%) i u grupu uzrasta preko 14 godina gde je bilo 47 pacijenata (43.93%).

Trajanje simptoma do trenutka dijagnostikovanja bolesti iznosilo je u proseku 4.2 meseca (SD=4.45) sa medijanom od 3 meseca (1-36 meseci).

4.1.2. Karakteristike oboljenja

Pored ispitivanja uticaja opštih karakteristika pacijenata analizirana je i povezanost kliničkih karakteristika tumora, kako međusobno, tako i sa ukupnim preživljavanjem (eng. Overall survival-OS) kao i preživljavanjem bez događaja (eng. Event free survival-EFS). Terapijski odgovor na primenjenu neoadjuvantnu (preoperativnu) hemioterapiju (određivanje histopatološkog odgovora-stepena nekroze tumora) kao mogući činilac prognoze, takođe je ispitivan u ovom radu. Karakteristike oboljenja pacijenata prikazane su u tabeli 9.

Tabela 9. Karakteristike oboljenja

Karakteristike oboljenja	N=107	(%)
<i>Veličina tumora</i>		
≤ 8cm	41	38.32
>8cm	66	61.68
<i>Lokalizacija tumora</i>		
Ekstremiteti	52	48.60
Karlica	27	25.23
Centralno	23	21.50
Ostalo	5	4.67
<i>LDH-inicijalna vrednost</i>		
Normalna	53	49.53
Povišena	49	45.79
NA	5	4.67
<i>Oblik bolesti</i>		
Lokalizovan	73	68.22
Metastatski	34	31.78
<i>Metastatska lokalizacija</i>		
Pluća	17	15.89
Kosti	9	8.41
Pluća i kosti	8	7.48

Kao što se iz tabele 8 vidi, vrednost LDH na prijemu bila je povišena kod 45.79% pacijenata. Tumor veći od 8 cm dijagnostikovao je kod 61.68% pacijenata.

Primarni tumor lokalizovan na ekstremitetu dijagnostikovao je kod 48.6% pacijenata, 25.23% pacijenata imalo je karličnu prezentaciju tumora a 21.5 % pacijenata, tumor koji je bio centralno lokalizovan.

Pojedinačno najzastupljenija primarna lokalizacija tumora je femur kod 17.76% pacijenata. Pojedinačna zastupljenost svih lokalizacija predstavljena je u tabeli 10.

Tabela 10: Lokalizacija primarnog tumora (N=107)

Primarna lokalizacija tumora	N =107	(%)	N=52	(%)
Ekstremiteti	52	48.59		
Femur			19	17.76
Tibija			13	12.15
Humerus			9	8.41
Fibula i kosti stopala			5	4.67
Kosti stopala			5	4.67
Radijus			1	0.93
Karlica	27	25.23		
Centralna lokalizacija	23	21.49		
Ostalo	5	4.67		

U trenutku dijagnostikovanja bolesti, metastatski oblik bolesti potvrđen je kod ukupno 31.78% pacijenata i to: 50% pacijenata imalo je izolovane plućne metastaze, 26.47% izolovane koštane metastaze dok je 23.53% metastatskih pacijenata imalo i koštane i plućne metastaze u trenutku dijagnostikovanja bolesti (Tabela 11).

Tabela 11: Stadijum bolesti (N=107) i lokalizacija metastatskih promena (N=34)

Oblik bolesti	N (%)
Lokalizovani oblik	73 (68.22)
Metastatski oblik	34 (31.78)
Lokalizacija metastatskih promena	
Pluća	17 (50.0)
Kosti	9 (26.47)
Kombinovane promene	8 (23.53)

4.2. KARAKTERISTIKE LEČENJA

4.2.1. Karakteristike lečenja – neoadjuvantna hemioterapija

Lečenje pacijenata po protokolu Euro Ewing 99 i Ewing 2008 sprovedeno je kod 90.65 % pacijenata. Kod 9.34 % pacijenata lečenje je sprovedeno po drugim protokolima (EVAIA, VAIA, VACA, CEVAIE).

Neoadjuvantna hemioterapija po protokolu Euro Ewing 99 i Ewing 2008 podrazumevala je primenu VIDE režima.

4.2.2. Karakteristike lečenja-lokalno lečenje

4.2.2.1 Hirurško lečenje

Nakon sprovedene neoadjuvantne hemioterapije, shodno protokolu lečenja, pristupalo se lokalnoj kontroli bolesti. Modalitet lokalne kontrole primenjivan je u zavisnosti od lokalizacije tumora, veličine tumora i uzrasta pacijenta i o tome je odlučivano konzilijarno.

U inicijalnom hirurškom pristupu, kod 89 (83.18%) pacijenata učinjena je samo biopsija, dok je kod ostalih pacijenata, pored biopsije, učinjena i totalna ekstirpacija tumora kod 4.67% pacijenata, subtotalna redukcija kod 5.61% pacijenata i maksimalna redukcija tumora kod 6.54% pacijenata, što je prikazano u tabeli 12.

Tabela 12. Inicijalni hirurški pristup

Inicijalna hirurgija	N=107	%
Samo biopsija	89	83.18
Biopsija + totalna ekstirpacija	5	4.67
Biopsija + subtotalna ekstirpacija	6	5.61
Biopsija + max.redukcija	7	6.54

Hirurgija nakon neoadjuvantne hemioterapije, kao modalitet lokalne kontrole bolesti, primenjena je kod 66 (61.68%) pacijenata.

Karakter hirurške intervencije kod 9.09% pacijenata bio je amputacionog tipa, kod 80.3% pacijenata učinjena je totalna ekstirpacija tumora, kod 9.09% učinjena je subtotalna dok je kod 1.51 % pacijenata učinjena maksimalna redukcija tumora.

Karakter hirurške intervencije nakon primenjene neoadjuvantne hemioterapije i njihova procentualna zastupljenost prikazani su u tabeli 13.

Tabela 13: Karakter hirurške intervencije nakon sprovedene neoadjuvantne (preoperativne) hemioterapije:

Hirurgija nakon HT	N=66	%
<i>Vrsta intervencije</i>		
Amputacija	6	9.09
Totalna ekstirpacija	53	80.30
Subtotalna redukcija	6	9.09
Maksimalna redukcija	1	1.51

4.2.2.1.a Karakteristike lečenja - histopatološki odgovor na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju

Histopatološki odgovor na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju određen je kod 65/66 (98.48%) pacijenata kod kojih je učinjena hirurška intervencija nakon neoadjuvantne hemioterapije. Kod jednog (1.51%) pacijenta kod koga je učinjena subtotalna redukcija tumora na Vojnomedicinskoj Akademiji (VMA) ne postoji podatak o učinjenom ispitivanju.

Histopatološki odgovor tumora na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju i procentualna zastupljenost prikazana je u tabeli 14.

Tabela 14. Podela na osnovu histopatološkog odgovora na primenjenu neoadjuvantnu (preoperativnu) hemioterapiju

Histopatološki odgovor	N= 65	%
<i>Dobar</i>	39	60
<i>Loš</i>	26	40

Ukupna, definitivna hirurška procedura tokom onkološkog lečenja (inicijalna hirurgija, hirurgija nakon neoadjuvantne hemioterapije, hirurgija tokom terapije) bila je sledećeg karaktera:

- samo biopsija kod 27/107 (25.23 %) pacijenata
- biopsija sa amputacionom hirurgijom kod 6/107 (5.61%) pacijenata
- biopsija sa totalnom ekstirpacijom tumora kod 58/107 (54.21%) pacijenta
- biopsija sa subtotalnom redukcijom tumora kod 10/107 (9.35%) pacijenata
- biopsija sa maksimalnom redukcijom tumora kod 6/107 (5,61 %) pacijenata

Na kraju primarnog onkološkog lečenja kod ukupno 80 (74.77%) pacijenta sprovedena je definitivna hirurška intervencija dok je kod 27 (25.23 %) učinjena samo biopsija.

Karakteristike lokalne kontrole bolesti primenom hirurgije-ukupna hirurgija prikazane su u tabeli 15.

Tabela 15. Karakteristike lokalne kontrole bolesti-ukupna hirurgija

Vrsta ukupne hirurgije	N=107	(%)
Samo biopsija	27	25.23
Totalna ekstirpacija	64	59.81
Redukcija tumora (subtotalna + maksimalna)	16	14.95

4.2.2.2. Zračna terapija

Zračna terapija sprovedena je kod pacijenata kao modalitet lokalne kontrole bolesti. U tabeli 16 prikazani su oblici primenjene zračne terapije.

Tabela 16. Oblik primenjene zračne terapije

Primenjena zračna terapija	N	(%)
Radikalna	24	(22.42)
Preoperativna	8	(7.47)
Postoperativna	52	(48.59)

Ukupna tumorska doza (TD) iznosila je od 44 Gy do 60 Gy, sa srednjom vrednošću od 55.6 Gy i medijanom od 56 Gy (SD=5.4).

Najčešća komplikacija tokom zračne terapije bila je pojava eritema kao rane komplikacije što je lečeno simptomatski, dok kasne reakcije na primenjenu zračnu terapiju nisu uočene.

4.2.2.3. Karakteristike lečenja-ukupna lokalna terapija

Kao jedini modalitet lokalne kontrole bolesti, hirurško lečenje je sprovedeno kod 24 (22.43%) pacijenta, zračna terapija takođe, kod 24 (22.43%) pacijenata, dok su oba modaliteta lokalnog lečenja (hirurgija i zračna terapija) sprovedena kod 51.4% pacijenata. Kod 4 pacijenta nije sproveden lokalni vid kontrole bolesti zbog progresije bolesti.

Modaliteti lokalne kontrole bolesti su prikazani u tabeli 17.

Tabela 17. Sprovedeni modaliteti lokalne kontrole bolesti

Modalitet lokalne kontrole	N=107	%
<i>Vrsta terapije</i>		
Hirurško lečenje	24	22.43
Zračna terapija	24	22.43
Hirurško lečenje i zračna terapija	55	51.40
NA	4	3.74

4.2.3. Karakteristike lečenja – ukupna hemioterapija

Shodno protokolu, nakon sprovedene lokalne terapije, 102/107 pacijenata nastavilo je onkološko lečenje primenom hemioterapije. Planirana hemioterapija nije sprovedena kod 5 (4.67%) pacijenata - dvoje prekinulo terapiju na lični zahtev, kod dvoje je došlo do smrtnog ishoda a kod jednog pacijenta hemioterapija je prekinuta zbog progresije bolesti.

Režimi primenjene hemioterapije prikazani su u tabeli 18.

Tabela 18: Režimi primenjene hemioterapije

Hemioterapija	N=107	%
VIDE + VAI/VAC	97	90.65
EVAIA	5	4.67
VAIA	3	2.80
VACA	1	0.93
CEVAIE	1	0.93

Primenjena neoadjuvantna hemioterapija kod 97/107 pacijenta bila je po režimu VIDE (6 ciklusa) a nakon toga je najvećim delom bila po režimu VAI kod 90/92 pacijenta i VAC kod 2/92. Pet pacijenata koji su započeli lečenje po protokolu Euro Ewing 99 i Ewing 2008 nisu primili drugi režim hemioterapije osim režima VIDE i to dvoje zbog smrtnog ishoda, jedan pacijent zbog progresije bolesti a dva pacijenta su prekinula onkološko lečenje.

Ukupna primenjena hemioterapija iznosila je od 1 do 14 ciklusa sa srednjom vrednošću od 11.78 (SD=3.24) i medijanom od 14 ciklusa. Ukupan broj primenjenih ciklusa hemioterapije prikazan je u tabeli 19.

Tabela 19. Ukupan broj primenjenih ciklusa hemioterapije

Broj ciklusa	N=107	%
1	2	1.87
4	2	1.87
6	2	1.87
7	8	7.48
8	9	8.41
9	5	4.67
10	5	4.67
11	4	3.74
12	4	3.74
13	1	0,93
14	65	60.75

Kod dva pacijenta sa metastatskim oblikom bolesti ordiniran je samo po jedan ciklus hemioterapije, kod jednog pacijenta zbog progresije bolesti došlo je do smrtnog ishoda a drugi pacijent je prekinuo lečenje. Četiri ciklusa hemioterapije primenjeno je kod dva pacijenta, kod jednog je, zbog toksičnih efekata hemioterapije, došlo do smrtnog ishoda a drugi pacijent je nakon četvrtog ciklusa hemioterapije po režimu EVAIA, na lični zahtev, prekinuo dalju terapiju. Kod dva pacijenta primenjeno je šest ciklusa hemioterapije od toga je jedan pacijent nakon sprovedenog zračnog tretmana prekinuo dalju terapiju a kod drugog pacijenta je nakon hirurške intervencije došlo do progresije bolesti.

Od 18/107 pacijenata kod kojih je sprovedena VDHT i RMČH, ukupan broj primenjenih ciklusa hemioterapije bio je 7 ciklusa kod 8/18 pacijenata, 8 ciklusa kod 7/18 pacijenata, 9 ciklusa kod 2/18 pacijenata i kod jednog pacijenata je ordinirano svih 14 ciklusa hemioterapije.

4.2.3.1 Karakteristike lečenja- toksičnost primenjene hemioterapije

Kod 2/107 (1.86%) došlo je do smrtnog ishoda usled toksičnog dejstva hemioterapije, kod jednog pacijenta nakon četiri ciklusa hemioterapije po režimu VIDE (hepatorenalna toksičnost) a kod jednog pacijenta nakon 11 ciklusa hemioterapije po režimu EVAIA.

Najčešće rane komplikacije primenjene hemioterapije zabeležene su u smislu pojave neutropenije gr.4, često praćene febrilnim sindromom, anemije i nešto ređe trombocitopenije. Osim kod dvoje dece kod kojih je došlo do smrtnog ishoda, sve rane komplikacije su bile prolazne. Kasne komplikacije nakon primenjene hemioterapije nisu uočene.

4.2.4 Karakteristike lečenja – VDHT i RMČH

Shodno protokolu lečenja a s obzirom na oblik bolesti i veličinu i lokalizaciju tumora, kod 18 (16.82%) pacijenata je primenjena visokodozna hemioterapija sa reinfuzijom matičnih ćelija hematopoeze. Svi pacijenti su imali metastatski oblik bolesti, od toga 10/18 (55.55%) imalo je plućne metastaze, 2/18 (11.11%) koštane metastaze a 6/18 (33.33%) pacijenata je u trenutku dijagnostikovnja bolesti imalo i plućne i koštane metastaze. VDHT je sprovedena po režimu u sastavu treosulfan, melfalan, s obzirom da je najveći broj pacijenata imao plućne metastaze i planiranu zračnu terapiju “kupanje pluća”.

4.2.5. Karakteristike lečenja – zračna terapija “kupanje pluća”

Zračna terapija “kupanje pluća” sprovedena je kod 11/25 (44%) pacijenata kod kojih su inicijalno dijagnostikovane plućne metastaze. Kod 5/16 (31.25%) pacijenata kod kojih je sprovedena VDHT i autologna RMČH zbog plućnih metastaza, sprovedena je zračna terapija “kupanje pluća”.

4.3. ISHOD LEČENJA

Nakon završenog kompletnog kombinovanog onkološkog lečenja, pacijenti su praćeni od 1.94 do 201.8 meseci. Prosečno vreme praćenja iznosilo je 56.5 meseci (SD=51) dok je medijana bila 36.92 meseci.

U trenutku zatvaranja studije, 31.12.2016 godine, 47/107 (43.93%) pacijenata je bilo živo dok je kod 60/107 (56.07%) pacijenata došlo do smrtnog ishoda. Ishod ukupnog lečenja prikazan je u tabeli 20.

Tabela 20: Ishod bolesti u celoj ispitivanoj grupi (N=107)

Ishod bolesti	N	%
Živi	47	43.93
Umrli	60	56.07

Relaps bolesti uoćen je kod 63 (58.88%) pacijenata dok je kod jednog pacijenta sa metastatskim oblikom bolesti odmah nakon prvog ciklusa hemioterapije došlo do smrtnog ishoda. Kod 43/107 (40.19%) pacijenata nije došlo do relapsa bolesti. Vrsta relapsa i procentualna zastupljenost, prikazana je u tabeli 21.

Tabela 21: Lokalizacija relapsa (N=63)

Lokalizacija relapse	N	%
Lokalni relaps	7	11.11
Udaljene metastaze	32	50.79
Lokalni + udaljene metastaze	22	34.92
NA	3	4.76

Udaljene metastaze najčešće su bile lokalizovane na kostima, kod 20 pacijenata, kod 14 pacijenata dijagnostikovane su plućne metastaze, kod 12 pacijenata dijagnostikovane su i

koštane i plućne metastaze dok su kod ostalih 8 pacijenata dijagnostikovane druge udaljene metastaze.

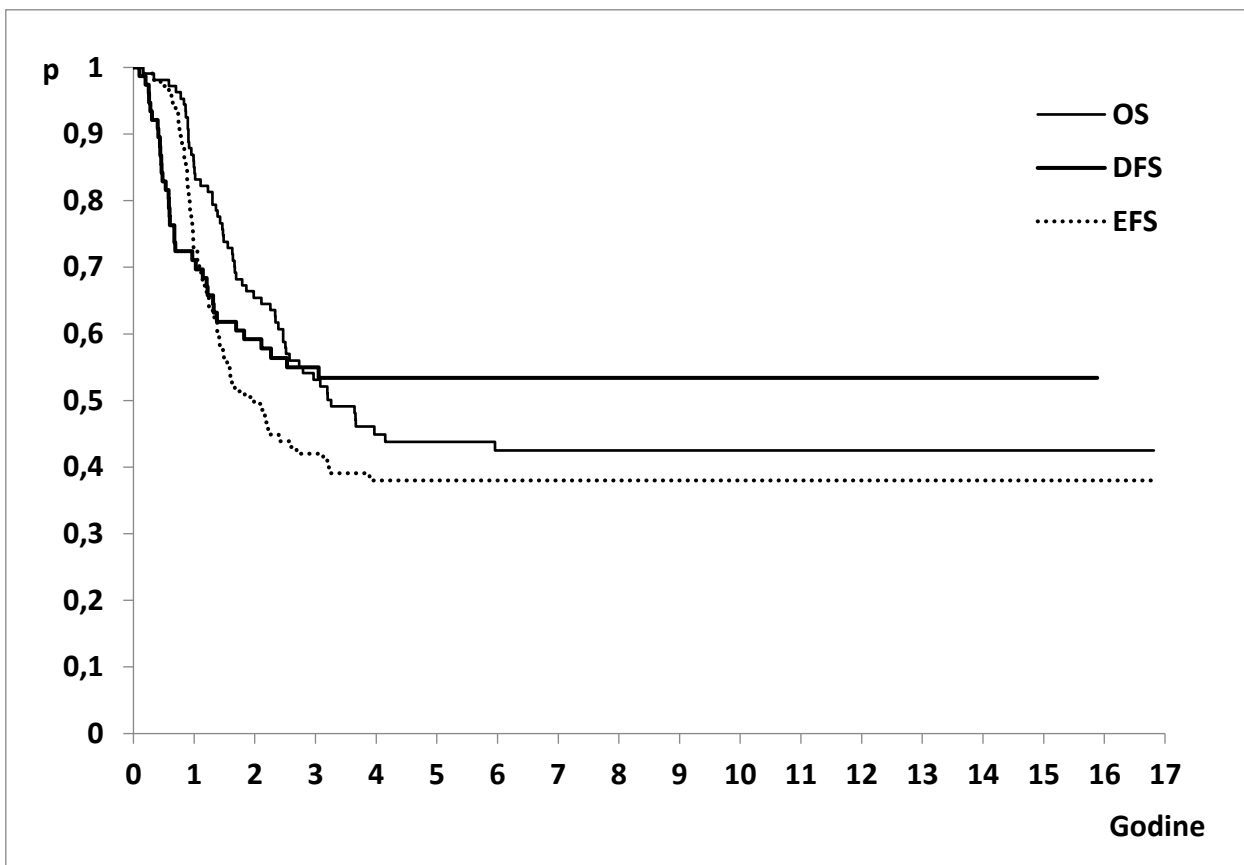
Ishod lečenja je posmatran kroz:

- Ukupno preživljavanje (OS) – vremenski period od datuma dijagnostikovanja bolesti (datum biopsije) do datuma smrtnog ishoda ili datuma poslednje kontrole.
- Preživljavanje bez događaja (EFS)-vremenski period od datuma dijagnostikovanja bolesti (biopsija) do datuma događaja (progresija, relaps, smrt) ili datuma poslednje kontrole bez postojanja događaja.
- Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) vremenski period od datuma završetka onkološkog lečenja bez znakova bolesti do datuma pojave relapsa bolesti ili datuma poslednje kontrole.

Ukupno preživljavanje (OS) i preživljavanje bez događaja (EFS) ispitivano je kod svih pacijenata dok je preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) ispitivano kod 76/107 (71.3%) pacijenata koji su završili kompletno onkološko lečenje bez znakova bolesti.

Medijana ukupnog preživljavanja za celu grupu pacijenata iznosi 39.1 meseci (95% CI: ≤ 30.1) dok medijana preživljavanja bez događaja za istu grupu iznosi 23 meseca (95%CI: 17.1-38.7).

Krive preživljavanja prikazane su na grafikonu 1.



Grafikon 1. Kaplan Meier krive ukupnog preživljavanja (OS), preživljavanja bez događaja (EFS) i preživljavanja bez bolesti (DFS)

Dinamika ukupnog preživljavanja, preživljavanje bez događaja i preživljavanja bez znakova bolesti prikazano je u tabelama 22, 23 i 24.

Tabela 22. Prikaz dinamike OS u celoj grupi u celokupnom periodu praćenja

Godina praćenja	Ukupno preživljavanje OS	
	Kumulativni %	95%CI za kumulativni %
1.godina	85.0%	78.6% - 92.1%
2.godine	65.4%	57.0% - 75.1%
3.godine	53.1%	44.4% - 63.5%
4.godine	44.9%	36.3% - 55.6%
5.godine	43.8%	35.2% - 54.5%
10.godina	42.5%	33.8% - 53.3%

Tabela 23. Prikaz dinamike EFS u celoj grupi u celokupnom periodu praćenja

Godina praćenja	EFS	
	Kumulativni %	95%CI za kumulativni %
1.godina	72.9%	64.9% - 81.8%
2.godine	49.5%	40.9% - 60.0%
3.godine	42.0%	33.6% - 52.5%
4.godine	38.0%	29.7% - 48.5%
5.godine	38.0%	29.7% - 48.5%
10.godina	38.0%	29.7% - 48.5%

Tabela 24. Prikaz dinamike DFS za 76 pacijenata u celokupnom periodu praćenja

Godina praćenja	Preživljavanje bez znakova bolesti DFS	
	Kumulativni %	95%CI za kumulativni %
1.godina	71.1%	61.6% - 82.0%
2.godine	59.2%	49.1% - 71.3%
3.godine	55.0%	44.8% - 67.5%
4.godine	53.4%	43.2% - 66.0%
5.godine	53.4%	43.2% - 66.0%
10.godina	53.4%	43.2% - 66.0%

4.4. PROGNOŠTIČKI PARAMETRI, UKUPNO PREŽIVLJAVANJE (OS) I PREŽIVLJAVANJE BEZ DOGAĐAJA (EFS)

Od interesa za ovo istraživanje bilo je ispitivanje povezanosti određenih parametara sa dužinom i verovatnoćom ukupnog preživljavanja kao i preživljavanja bez događaja. Ti parametri su podeljeni u tri grupe:

1. Klinički parametri:

- Uzrast (≤ 14 godina vs > 14 godina)
- Pol (muški vs ženski)
- Lokalizacija tumora (ekstremiteti, karlica, centralno)
- Veličina tumora (≤ 8 cm vs > 8 cm)
- Vrednost serumske LDH
- Stadijum bolesti (lokalizovan vs metastatski oblik)
- Lokalizacija metastaskog mesta (pluća, kosti, pluća i kosti)
- Modaliteti lokalne kontrole bolesti (hirurgija, zračna terapija, hirurgija i zračna terapija)

2. Patološki parametri:

- Histopatološki odgovor tumora na primenjenu neoadjuvantnu (preoperativnu) hemioterapiju (dobar vs loš odgovor)

3. Biomarkeri na molekularnom nivou:

- Nivo ekspresije TGF β 1 i SERPINI1 gena

Analiza nivoa genskih ekspresija TGF β 1 i SERPINI1 gena je prikazana u tabeli 25.

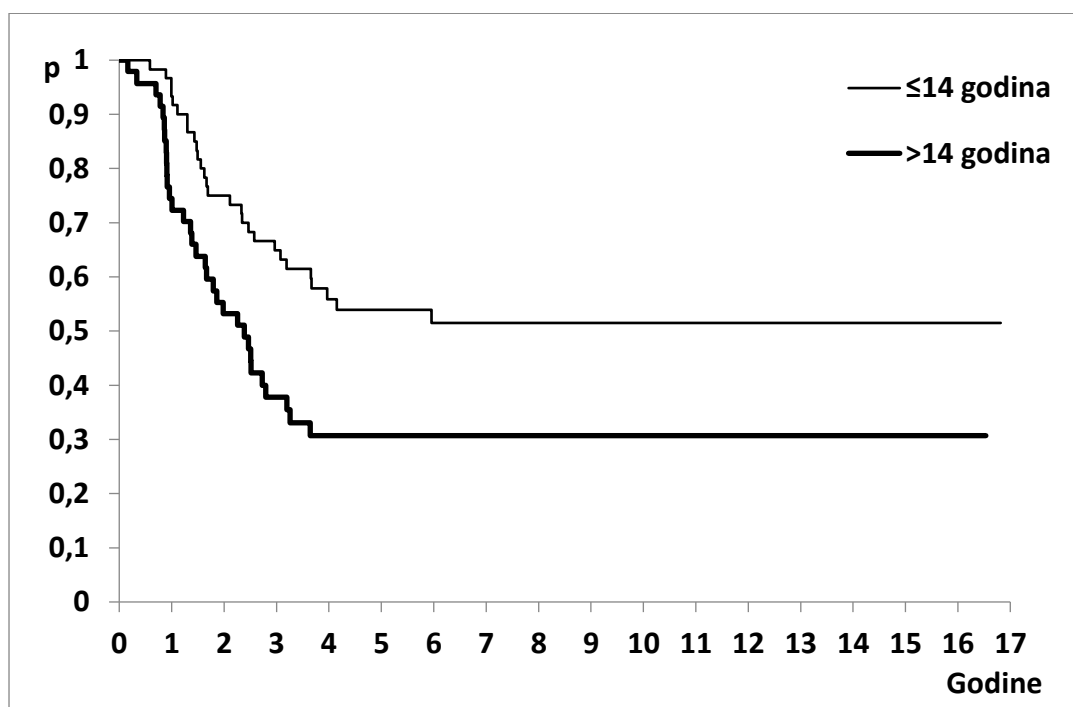
Tabela 25: Ekspresija gena TGF β 1 i SERPINI1 u odnosu na kliničko-patološke parametre Ewing-ovog sarkoma

			<i>TGFBI</i>		<i>SERPINI1</i>	
			<i>fold change</i>		<i>fold change</i>	
N=20			srednja	medijana	srednja	medijana
			vrednost		vrednost	
Uzrast	≤ 14	15	0,78	0,56	0,55	0,37
	> 14	5	0,66	0,62	0,40	0,36
LDH	normalan	12	0,75	0,58	0,49	0,36
	povišen	8	0,75	0,59	0,55	0,51
Oblik bolesti	lokalizovan	15	0,84	0,62	0,44	0,37
	metastatski	5	0,47	0,30	0,74	0,32
Lokalizacija	ekstremiteti	8	1,08	0,85	0,64	0,44
	karlica	10	0,53	0,28	0,36	0,29
	ostalo	2	0,54	0,54	0,80	0,80
Veličina tumora	tumor ≤8 cm	5	0,71	0,51	0,31	0,20
	tumor > 8 cm	15	0,76	0,62	0,58	0,37

4.4.1. UZRAST

4.4.1.a. Ukupno preživljavanje u odnosu na uzrast

Ukupno preživljavanje ispitivano je kod 60/107 pacijenata uzrasta ≤ 14 godina i kod 47/107 pacijenata uzrasta > 14 godina. Krive ukupnog preživljavanja za posmatrane grupe pacijenata prikazane su na grafikonu 2.



Grafikon 2. Kaplan Meier krive ukupnog preživljavanja u odnosu na uzrast

U grupi pacijenata uzrasta do 14 godina nije dostignuta medijana ukupnog preživljavanja dok u grupi pacijenata uzrasta preko 14 godina medijana ukupnog preživljavanja iznosi 28.6 meseci (95%CI: 19.7-43.7).

Potvrđena je statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju (Log-Rank test; $\chi^2_{21}=7.495$; $p=0.006$).

4.4.1.b. Vreme preživljavanja bez događaja u odnosu na uzrast

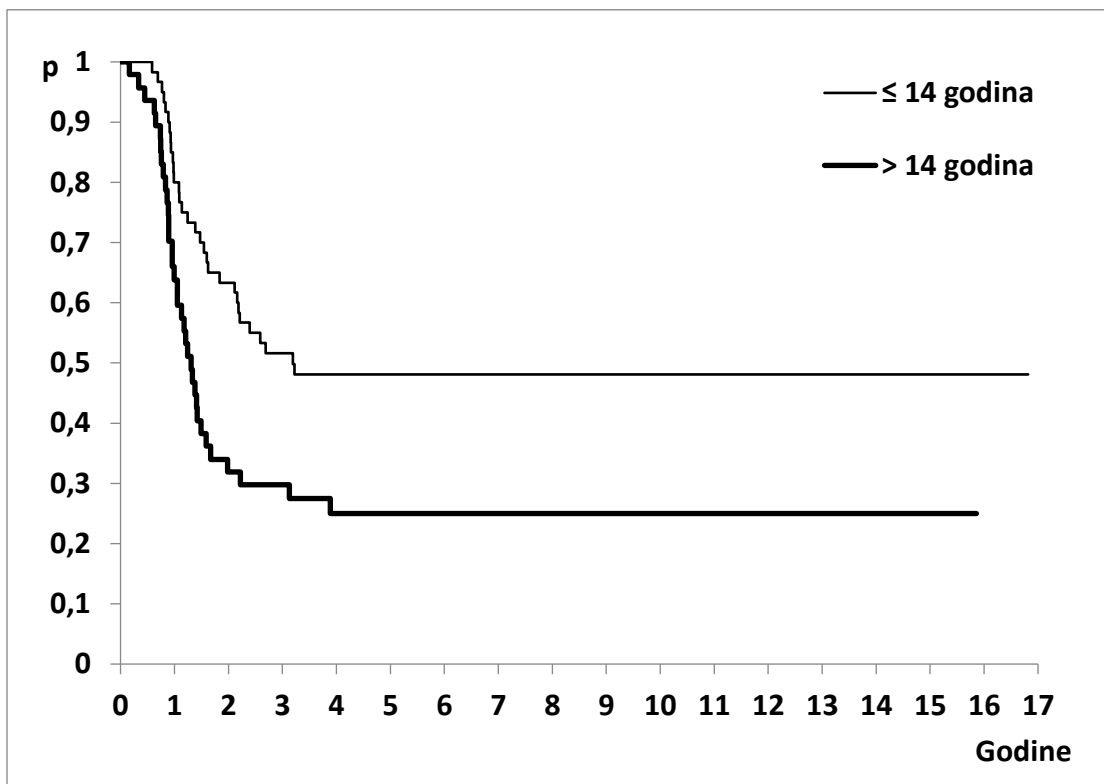
Preživljavanja bez događaja ispitivano je kod 60/107 pacijenata uzrasta ≤ 14 godina i kod 47/107 pacijenata uzrasta > 14 godina. U tabeli 26 je prikazana dinamika EFS u celoj grupi u celokupnom period praćenja.

Tabela 26. Prikaz dinamike EFS u celoj grupi u celokupnom period praćenja

Uzrast	Medijane EFS (95 % CI)					
	1.god	2.god	3.god	4.god	5.god	10.god
≤ 14 godina	80.0 (70.5-90.8)	63.33 (52.2-76.8)	51.60 (40.3-65.9)	48.10 (37.0-62.6)	48.10 (37.0-62.6)	48.10 (37.0-62.6)
> 14 godina	63.80 (51.5-79.2)	31.90 (21.0-48.5)	29.80 (19.2-46.2)	25.00 (15.1-41.3)	25.00 (15.1-41.3)	25.00 (15.1-41.3)

Medijana preživljavanja je dostignuta za obe grupe, za grupu pacijenata ≤ 14 godina iznosi 38,3 meseci (95%CI: ≥ 26.0) a za grupu pacijenata > 14 godina iznosi 15.7 meseci (95%CI:12.6-23.8)

Krive preživljavanja bez događaja u odnosu na uzrast prikazane su na grafikonu 3:



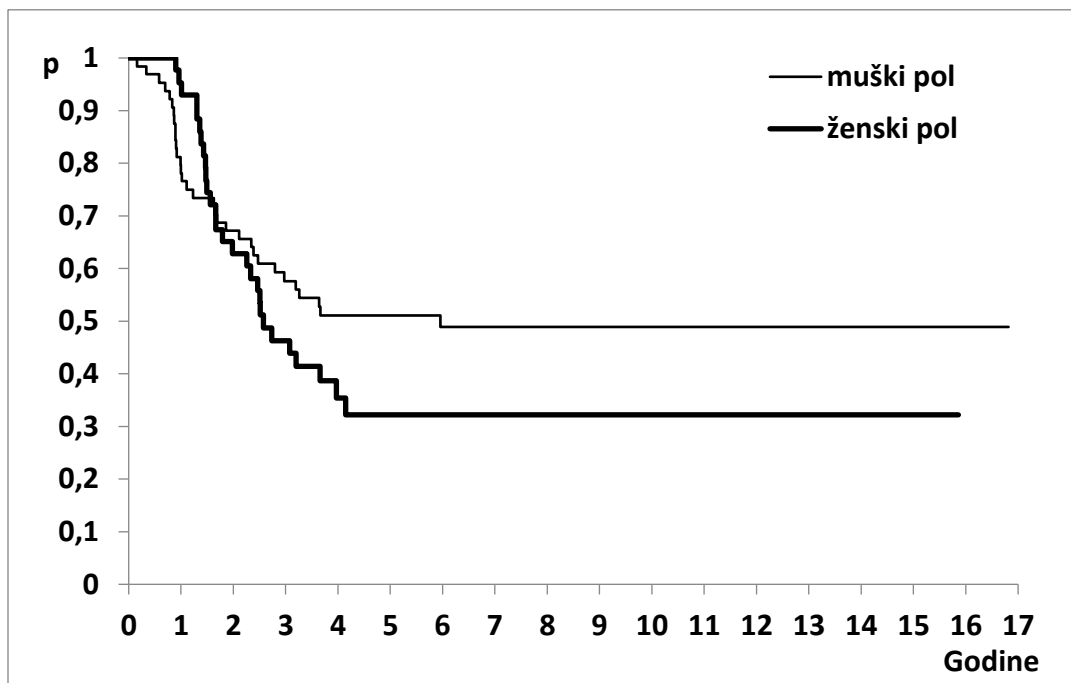
Grafikon 3. Kaplan Meier krive vremena preživljavanja bez događaja u odnosu na uzrast

Dokazano je da postoji statistički značajna razlika između vremena preživljavanja bez događaja u odnosu na uzrast (Log-Rank test; $\chi^2=8.522$; $p=0.0035$).

4.4.2. POL

4.4.2.a. Ukupno preživljavanje u odnosu na pol

Ukupno preživljavanje je ispitivano kod 64/107 pacijenata muškog pola i kod 43/107 pacijenata ženskog pola. Krive ukupnog preživljavanja za posmatrane grupe pacijenata prikazane su na grafikonu 4.



Grafikon 4. Kaplan Meier krive ukupnog preživljavanja u odnosu na pol

U grupi pacijenata muškog pola dostignuta je medijana ukupnog preživljavanja i iznosi 71.5 meseci (95%CI: ≥ 33.5 mes) dok je u grupi pacijenata ženskog pola medijana ukupnog preživljavanja znatno manja i iznosi 30.9 meseci (95%CI: ≥ 23.8 mes.).

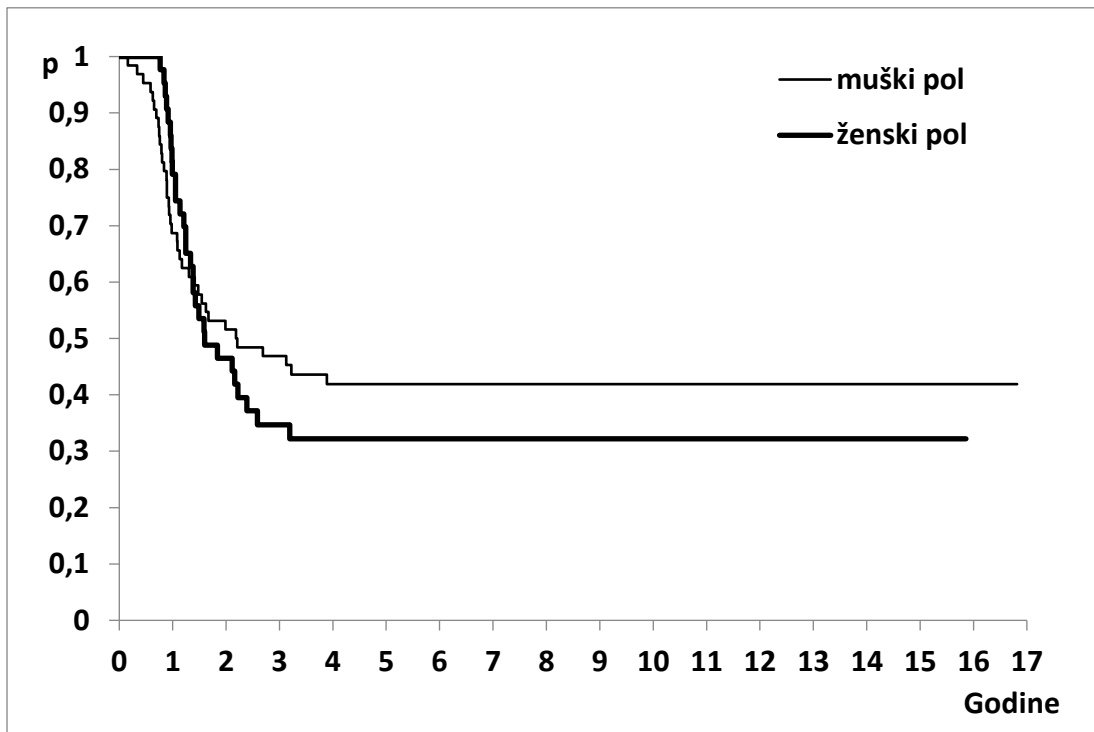
Razlika u vremenu ukupno preživljavanje po nivoima parametra pol nije potvrđena (Log Rank test; $\chi^2_1 = 1.296$; $p=0.254$).

4.4.2.b. Vreme preživljavanja bez događaja u odnosu na pol

Preživljavanja bez događaja je ispitivano kod 64/107 pacijenata muškog pola i kod 43/107 pacijenata ženskog pola.

U grupi pacijenata muškog pola dostignuta je medijana preživljavanja bez događaja i iznosi 26.4 meseci (95%CI: ≥ 16.9 mes.) dok je u grupi pacijenata ženskog pola medijana preživljavanja bez događaja 19.2 meseci (95%CI: 16.0-38.3)

Krive preživljavanja bez događaja u odnosu na pol prikazane su na grafikonu 5:



Grafikon 5. Kaplan Meier krive vremena preživljavanja bez događaja u odnosu na pol

Nije dokazana statistički značajna razlika između vremena preživljavanja bez događaja u odnosu na pol (Log-Rank test; $\chi^2_1=0.28$; $p=0.596$).

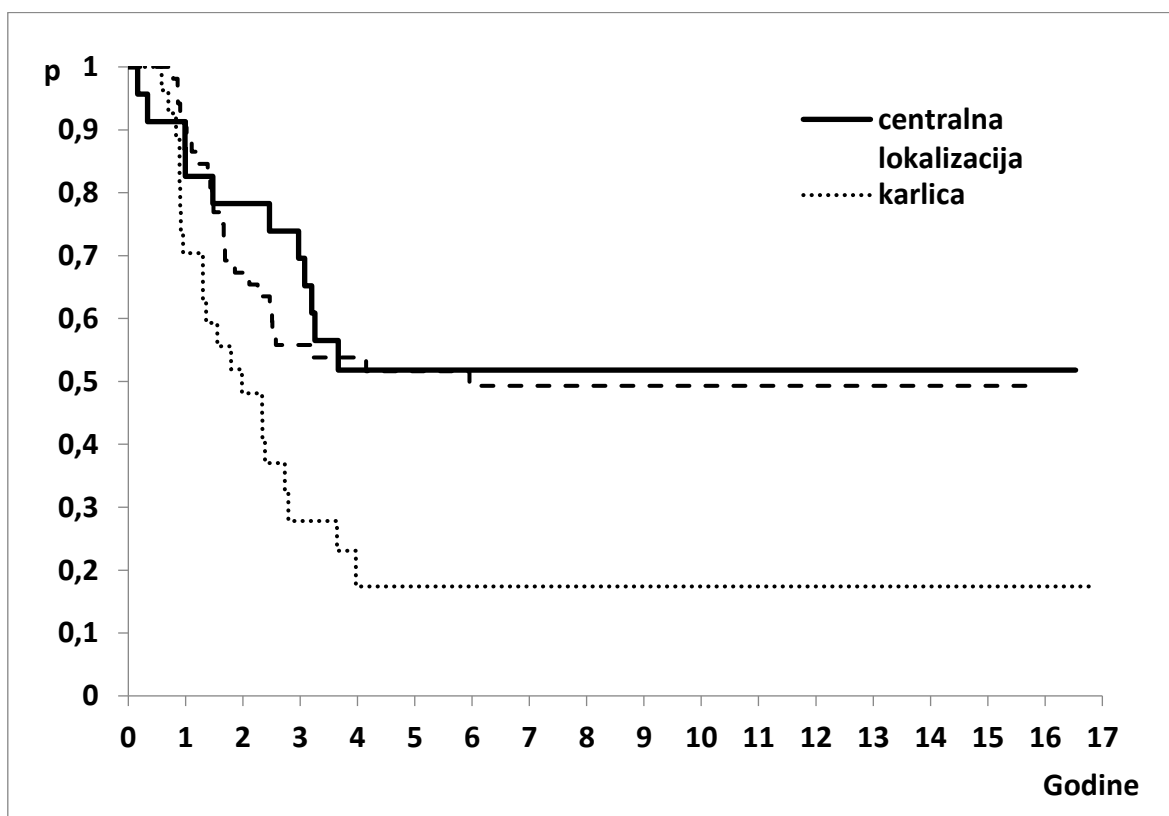
4.4.3. LOKALIZACIJA TUMORA

4.4.3.a. Ukupno preživljavanje u odnosu na lokalizaciju tumora

Ukupno preživljavanje u odnosu na kategorije po lokalizaciji primarnog tumora ispitivano je kod 52/107 pacijenata sa lokalizacijom primarnog tumora na nekom od ekstremiteta, kod 27/107 pacijenata sa karličnom lokalizacijom tumora i kod 23/107 pacijenata koji su imali centralnu lokalizaciju tumora (grudni koš, kičma).

Medijana ukupnog preživljavanja dostignuta je za lokalizaciju ekstremiteti i iznosi 71.5 meseci (95%CI: ≥ 29.6), kao i za lokalizaciju karlica gde je medijana 23.8 meseci (95%CI: 15.6-43.7), dok za lokalizaciju tumora centralno medijana nije dostignuta.

Na grafikonu 6. prikazane su odgovarajuće Kaplan-Meier krive ukupnog preživljavanja.



Grafikon 6. Kaplan Meier krive ukupnog preživljavanja u odnosu na lokalizaciju tumora

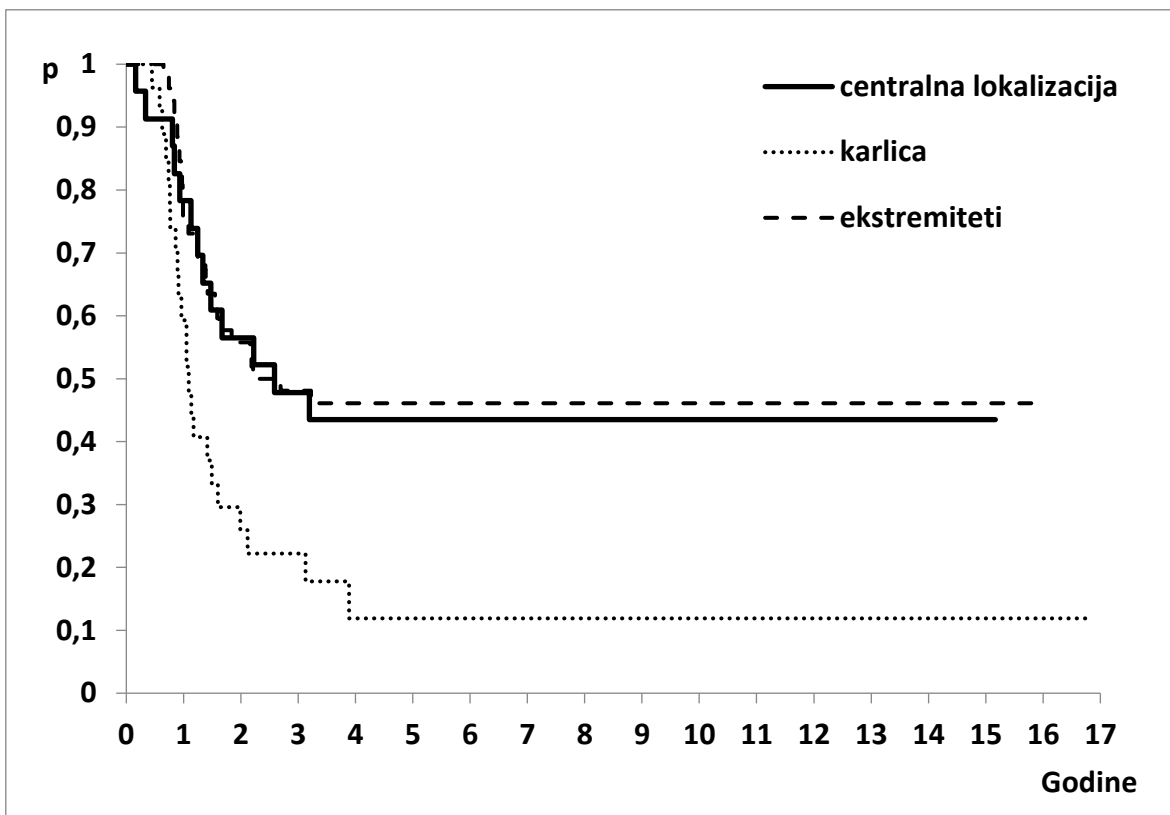
Statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju u odnosu na lokalizaciju primarnog tumora pokazana je samo u slučaju karlične lokalizacije tumora (Log-Rank test; $\chi^2_{11,125}$; $p=0.0008$), dok u slučaju drugih lokalizacija statistički značajne razlike nisu pokazane.

4.4.3.b. Preživljavanje bez događaja u odnosu na lokalizaciju tumora

Preživljavanje bez događaja u odnosu na kategorije po lokalizaciji primarnog tumora ispitivano je kod 52/107 pacijenata sa lokalizacijom primarnog tumora na nekom od ekstremiteta, kod 27/107 pacijenata sa karličnom lokalizacijom tumora i kod 23/107 pacijenata koji su imali centralnu lokalizaciju tumora (grudni koš, kičma)

Medijana preživljavanja bez događaja za lokalizaciju ekstremiteti iznosi 29.4 meseci (95%CI: ≥ 18.5), za lokalizaciju karlica iznosi 13.1 meseci (95%CI:10.9-23.8) dok za centralnu lokalizaciju iznosi 31.1 meseci (95%CI: ≥ 16 meseci).

Na grafikonu 7 su prikazane odgovarajuće Kaplan-Meier krive preživljavanja bez događaja.



Grafikon 7. Kaplan Meier krive preživljavanja bez događaja u odnosu na lokalizaciju tumora

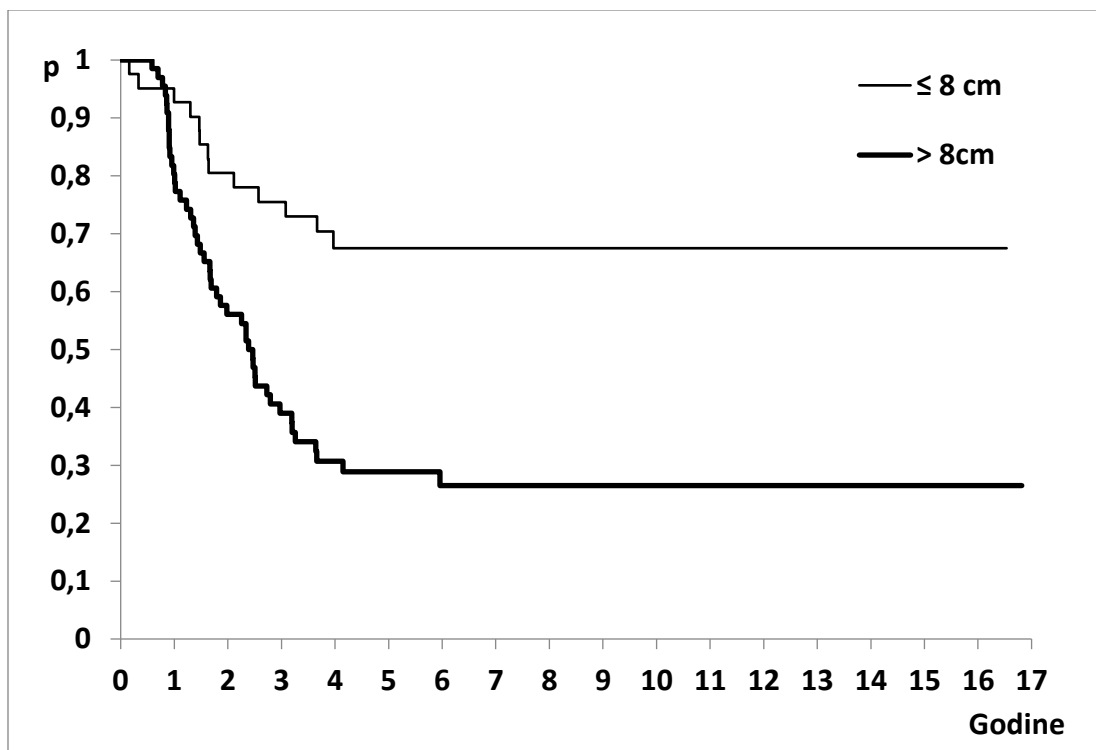
Nije pokazana statistički značajna razlika u preživljavanju bez događaja u odnosu na lokalizaciju tumora osim kod lokalizacije karlica (Log-Rank test; $\chi^2_1 = 13,116$; $p = 0.0002$).

4.4.4. VELIČINA TUMORA

4.4.4.a. Ukupno preživljavanje u odnosu na veličinu tumora

Ukupno preživljavanje u odnosu na kategoriju veličina tumora ispitivano je kod svih 107 pacijenata i to kod 41/107 pacijenata kod kojih je tumor bio ≤ 8 cm i kod 66/107 pacijenata kod kojih je tumor bio > 8 cm.

Medijana ukupnog preživljavanja (u mesecima) dostignuta je kod grupe pacijenata sa tumorom većim od 8 cm i iznosi 29.1 mesec (95%CI: 20.3-38.4) dok u grupi pacijenata sa tumorom ≤ 8 cm nije dostignuta. Na grafikonu 8 prikazane su odgovarajuće Kaplan-Meier krive.



Grafikon 8. Kaplan Meier krive ukupnog preživljavanja u odnosu na veličinu tumora

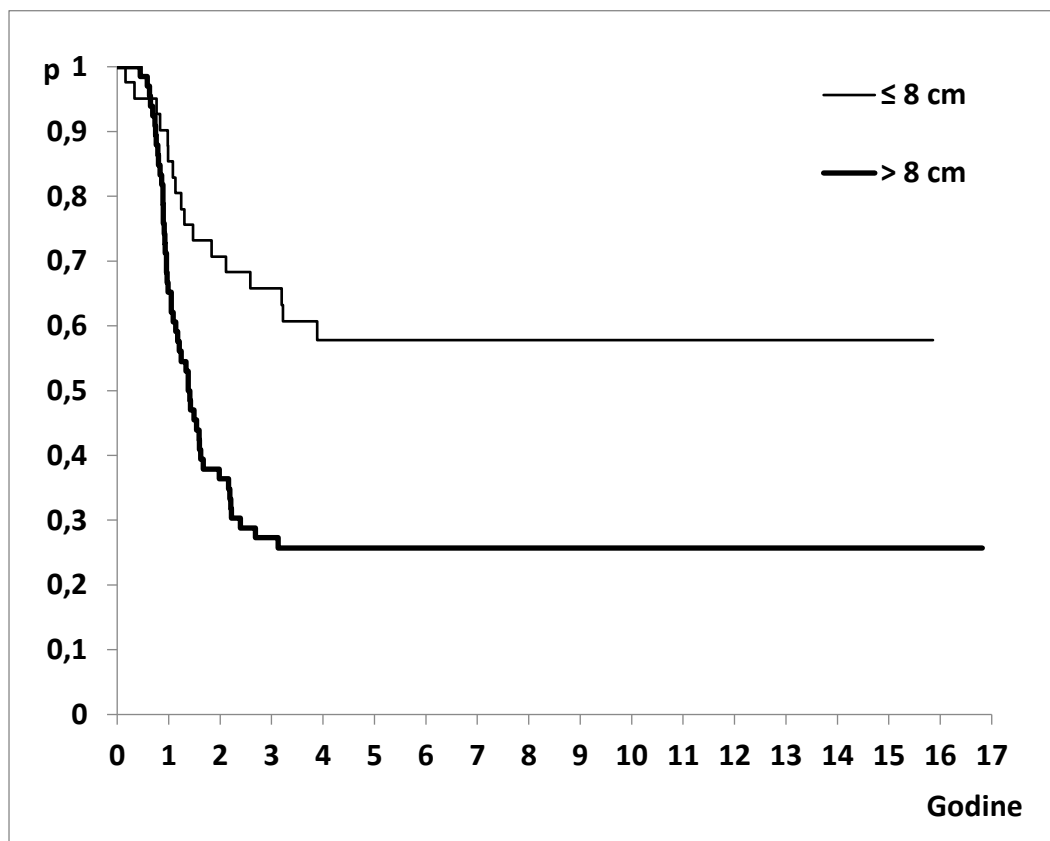
Dokazana je statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju u odnosu na veličinu primarnog tumora (Log-Rank test; $\chi^2_1 = 15.132$; $p = 0.0001$).

4.4.4.b. Preživljavanje bez događaja u odnosu na veličinu tumora

Preživljavanje bez događaja je ispitivano kod svih 107 pacijenata i to kod 41/107 pacijenata kod kojih je tumor bio ≤ 8 cm i kod 66/107 pacijenata kod kojih je tumor bio > 8 cm.

Medijana preživljavanja bez događaja nije dostignuta kod grupe čija je veličina tumora bila ≤ 8 dok je kod grupe čija je veličina tumora veća od 8 cm medijana 16.8 meseci (95%CI:13.1-26)

Na grafikonu 9 prikazane su krive preživljavanja bez događaja u odnosu na veličinu tumora.



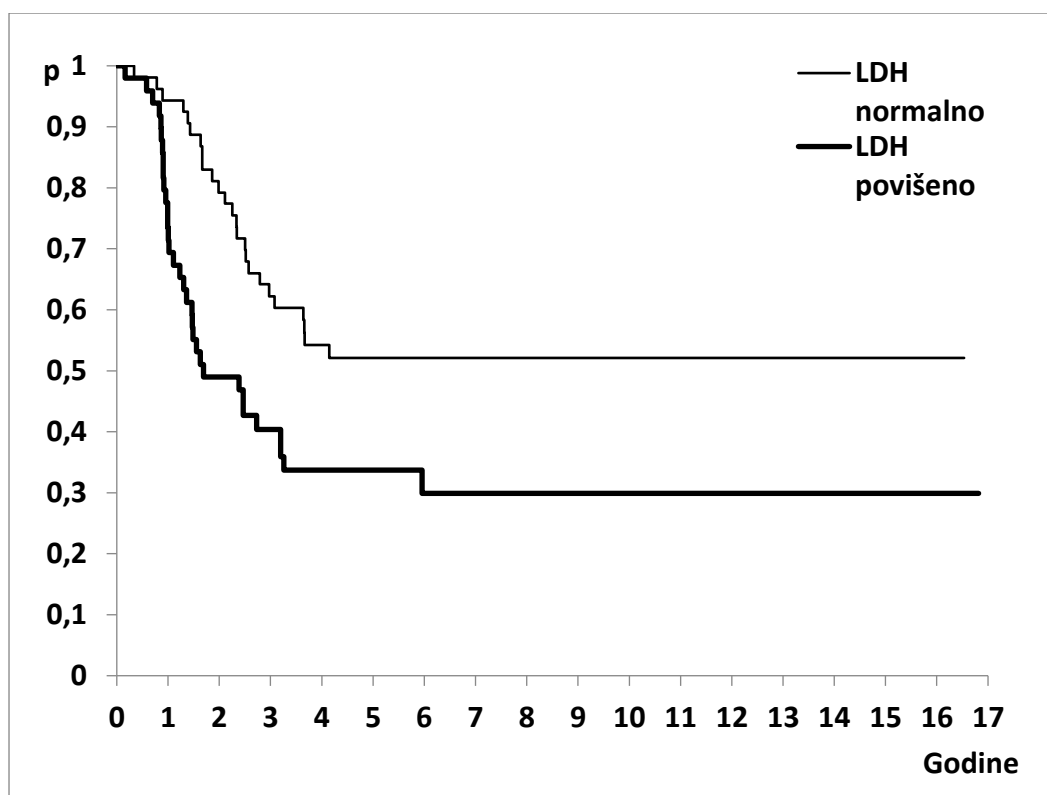
Grafikon 9. Kaplan Meier krive preživljavanje bez događaja u odnosu na veličinu tumora

Dokazano je postojanje statistički značajne razlike u preživljavanja bez događaja u odnosu na veličinu tumora (Log-Rank test; $\chi^2 = 12.057$; $p = 0.0005$).

4.4.5. VREDNOST LAKTAT-DEHIDROGENAZE U SERUMU (LDH)

4.4.5.a. Ukupno preživljavanje u odnosu na inicijalnu vrednost s-LDH

Ukupno preživljavanje ispitivano je kod 53/102 pacijenta kod kojih su registrovane normalne vrednosti LDH u serumu i kod 49/102 pacijenta kod kojih su registrovane povišene vrednosti serumske LDH. Krive ukupnog preživljavanja za posmatrane grupe pacijenata prikazane su na grafikonu 10.



Grafikon 10. Kaplan Meier krive ukupnog preživljavanja u odnosu na inicijalnu vrednost LDH

Medijana ukupnog preživljavanja nije dostignuta kod pacijenata sa normalnim vrednostima s-LDH dok u grupi pacijenata sa povišenim vrednostima s-LDH medijana ukupnog preživljavanja iznosi 20.3 meseca (95%CI: 16.3-71.5).

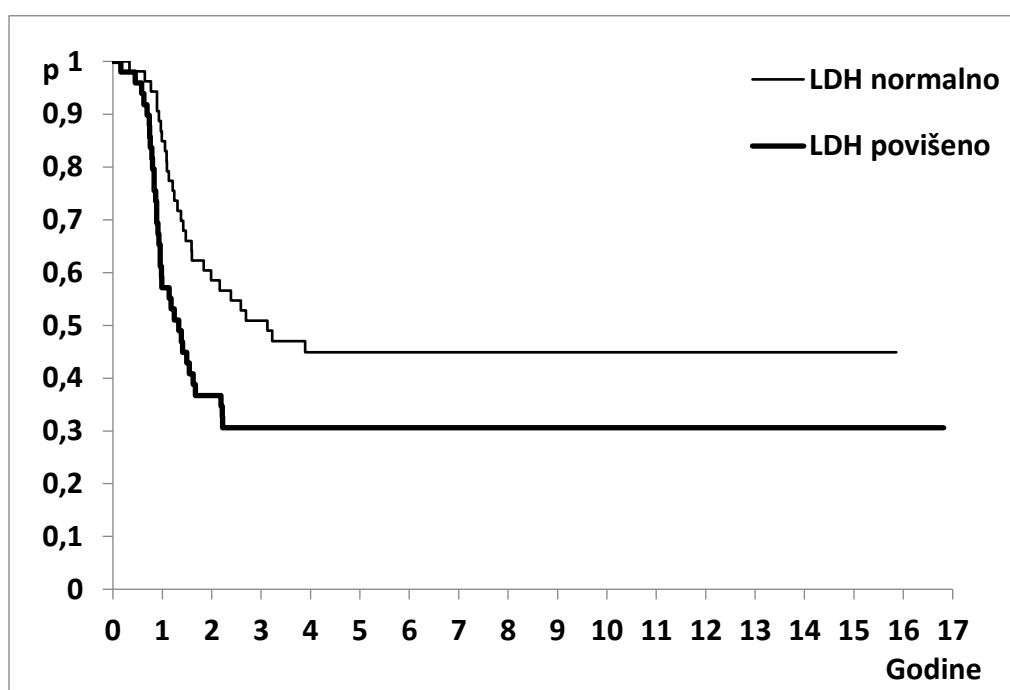
Potvrđena je statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju (Log-Rank test; $\chi^2_1=7.906$; $p=0.004$).

4.4.5.b. Vreme preživljavanja bez događaja u odnosu na inicijalnu vrednost s-LDH

Preživljavanja bez događaja ispitivano je kod 53/102 pacijenta kod kojih su registrovane normalne vrednosti LDH u serumu i kod 49/102 pacijenta kod kojih su registrovane povišene vrednosti serumske LDH.

Medijana preživljavanja bez događaja kod pacijenata sa normalnim vrednostima s-LDH iznosi 37.5 meseci (95%CI: ≥ 22 mes.) dok u grupi pacijenata sa povišenim vrednostima s-LDH medijana preživljavanja bez događaja iznosi 16.0 meseci (95%CI: 11.5-26.5 mes.).

Krive preživljavanja bez događaja u odnosu na uzrast prikazane su na grafikonu 11.



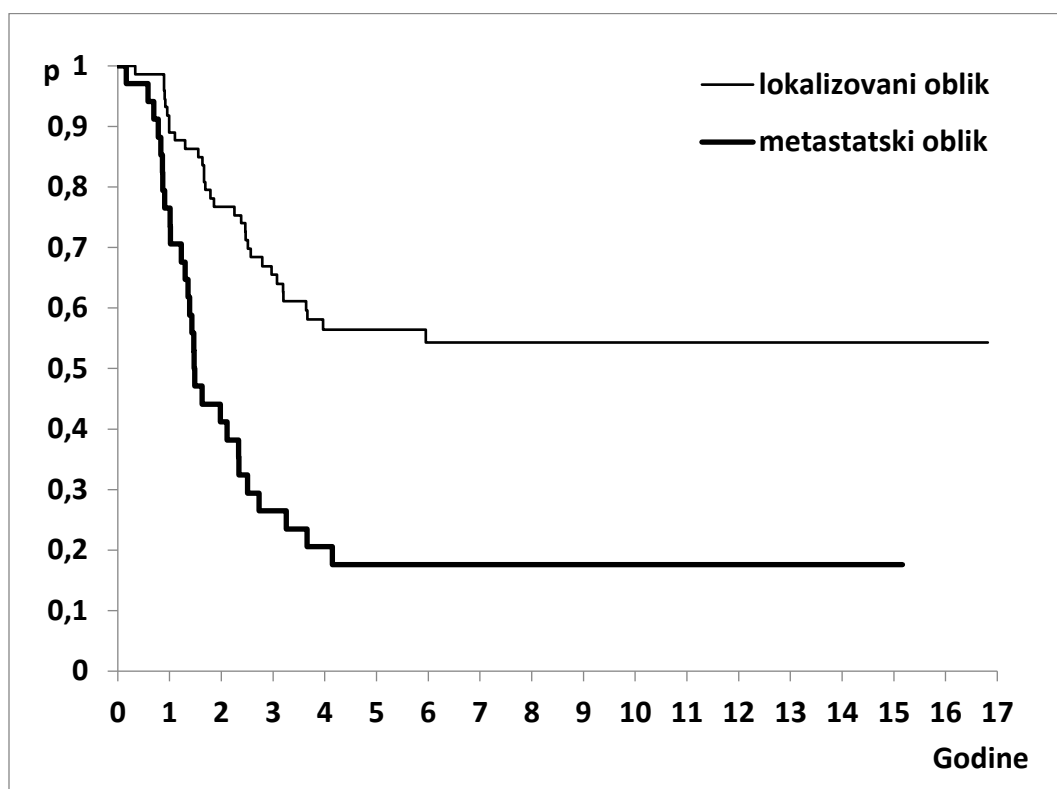
Grafikon 11. Kaplan Meier krive vremena preživljavanja bez znakova bolesti u odnosu na inicijalnu vrednost LDH

Potvrđena je statistički značajna razlika u preživljavanju bez događaja (Log-Rank test; $\chi^2_1=5.105$; $p=0.023$).

4.4.6. OBLIK BOLESTI

4.4.6.a. Ukupno preživljavanje u odnosu na oblik bolesti

Ukupno preživljavanje ispitivano je kod 73/107 pacijenata kod kojih je dijagnostikovan lokalizovan oblik bolesti i kod 34/107 pacijenta kod kojih je dijagnostikovan metastatski oblik bolesti. Krive ukupnog preživljavanja za posmatrane grupe pacijenata prikazane su na grafikonu 12.



Grafikon 12. Kaplan Meier krive ukupnog preživljavanja u odnosu na stadijum bolesti

U grupi pacijenata sa lokalizovanim oblikom bolesti medijana ukupnog preživljavanja nije dostignuta dok u grupi pacijenata sa metastatskim oblikom bolesti medijana ukupnog preživljavanja iznosi 17.8 meseci (95%CI: 16.3-30.1 mes.).

Potvrđena je statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju po nivoima parametra oblik bolesti (Log-Rank test; $\chi^2_1=20.547$; $p=5.82 \times 10^{-6}$).

Dinamika ukupnog preživljavanja za grupu pacijenata sa lokalizovanim i metastatskim oblikom bolesti prikazana je u tabelama 27 i 28.

Tabela 27. Prikaz dinamike OS u grupi pacijenata sa lokalizovanim oblikom bolesti u celokupnom periodu praćenja

Godina praćenja	Ukupno preživljavanje OS	
	Kumulativni %	95%CI za kumulativni %
1.godina	89.0%	82.2% - 96.5%
2.godine	76.7%	67.6% - 87.0%
3.godine	65.5%	55.4% - 77.4%
4.godine	56.4%	45.8% - 69.3%
5.godine	56.4%	45.8% - 69.3%
10. godina	54.3 %	43.7% - 67.6%

Tabela 28. Prikaz dinamike OS u grupi pacijenata sa metastatskim oblikom bolesti u celokupnom periodu praćenja

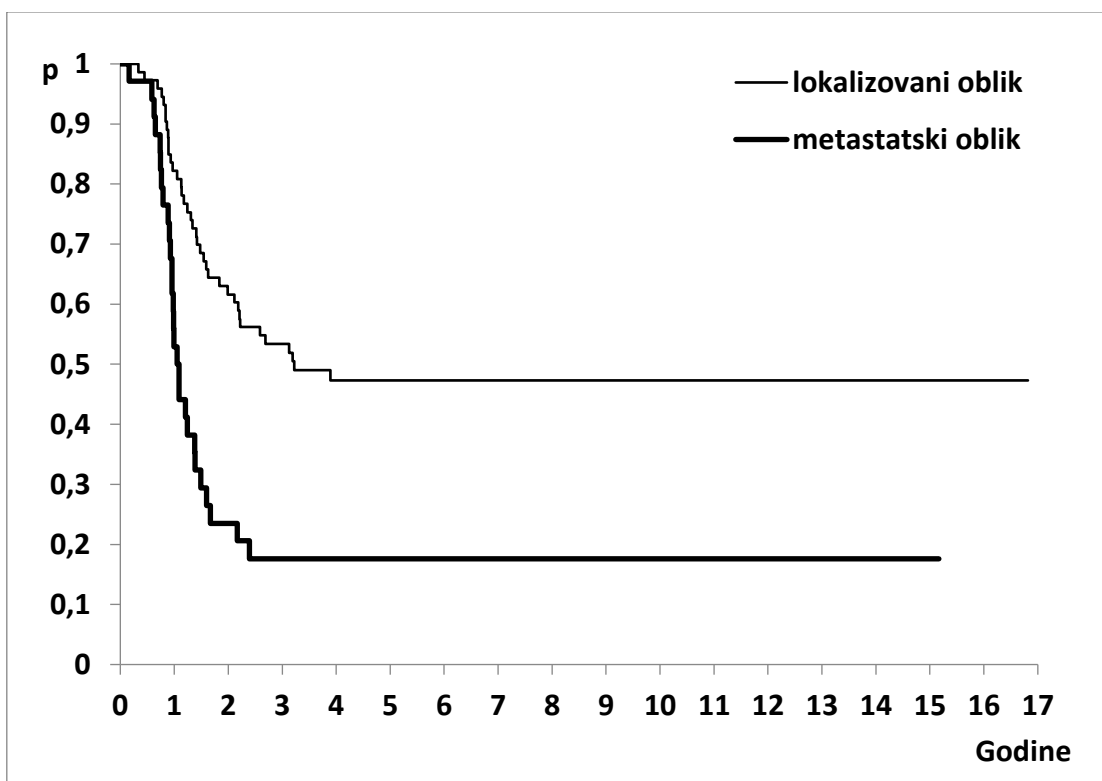
Godina praćenja	Ukupno preživljavanje OS	
	Kumulativni %	95%CI za kumulativni %
1.godina	76.5%	63.4% - 92.1%
2.godine	41.2%	27.5% - 61.5%
3.godine	26.5%	15.2% - 46.4%
4.godine	20.6%	10.6% - 39.8%
5.godine	17.6%	8.54% - 36.5%
10. godina	17.6 %	8.54% - 36.5%

4.4.6.b. Vreme preživljavanja bez događaja u odnosu na oblik bolesti

Preživljavanje bez događaja ispitivano je kod 73/107 pacijenata kod kojih je dijagnostikovan lokalizovan oblik bolesti i kod 34/107 pacijenta kod kojih je dijagnostikovan metastatski oblik bolesti.

Medijana preživljavanja bez događaja u grupi pacijenata sa lokalizovanim oblikom bolesti iznosi 38.7 (95%CI: ≥ 26.2 mes.) dok je u grupi pacijenata sa metastatskim oblikom bolesti medijana preživljavanja bez događaja znatno manja i iznosi 12.8 meseci (95%CI: 11.5-17.9).

Krive preživljavanja bez događaja u odnosu na stadijum bolesti prikazane su na grafikonu 13.



Grafikon 13. Kaplan Meier krive vremena preživljavanja bez znakova bolesti u odnosu na stadijum bolesti

Potvrđena je statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju bez znakova bolesti po nivoima parametra stadijum bolesti (Log-Rank test; $\chi^2=15.881$; $p=6.74 \times 10^{-5}$).

Dinamika preživljavanja bez događaja za grupu pacijenata sa lokalizovanim i grupu pacijenata sa metastatskim oblikom bolesti prikazana je u tabelama 29 i 30.

Tabela 29. Prikaz dinamike EFS u grupi pacijenata sa lokalizovanim oblikom bolesti u celokupnom periodu praćenja

Godina praćenja	Preživljavanje bez događaja EFS	
	Kumulativni %	95%CI za kumulativni %
1.godina	82.2%	73.9% - 91.5%
2.godine	61.6%	51.4% - 73.9%
3.godine	53.4%	43.0% - 66.1%
4.godine	47.3%	37.1% - 60.5%
5.godine	47.3%	37.1% - 60.5%
10. godina	47.3%	37.1% - 60.5%

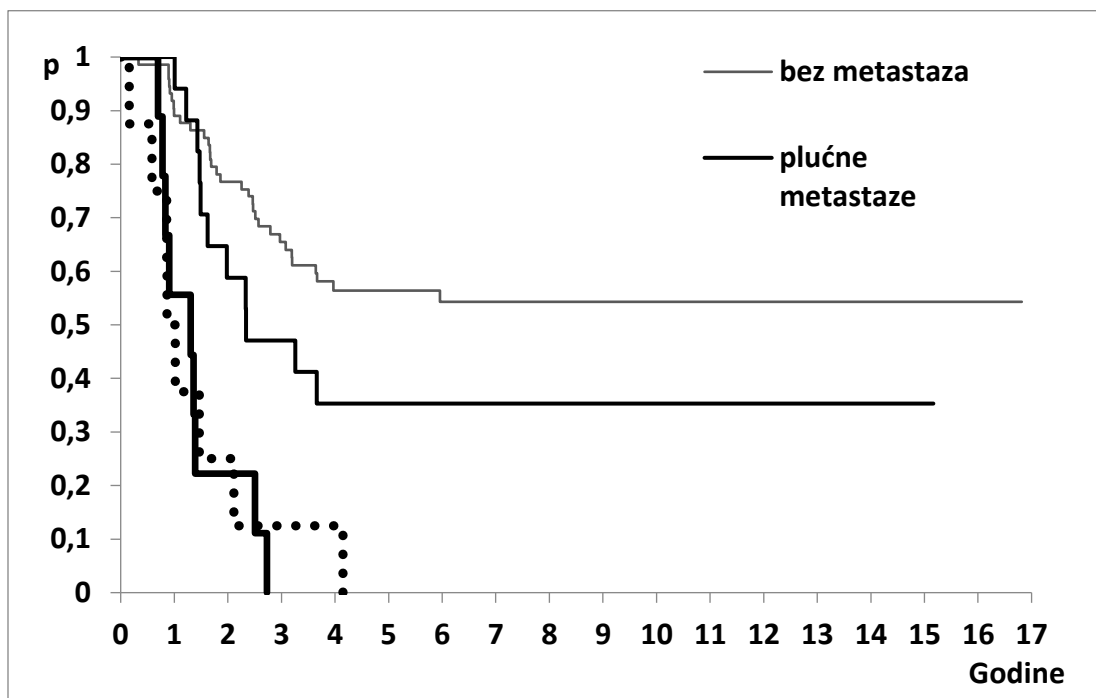
Tabela 30. Prikaz dinamike EFS u grupi pacijenata sa metastatskim oblikom bolesti u celokupnom periodu praćenja

Godina praćenja	Preživljavanje bez događaja EFS	
	Kumulativni %	95%CI za kumulativni %
1.godina	52.9%	38.5% - 72.7%
2.godine	23.5%	12.84% - 43.1%
3.godine	17.6%	8.54% - 36.5%
4.godine	17.6%	8.54% - 36.5%
5.godine	17.6%	8.54% - 36.5%
10. godina	17.6%	8.54% - 36.5%

4.4.7. Lokalizacija metastatske promene

4.4.7.a. Ukupno preživljavanje u odnosu na lokalizaciju metastatske promene

Ukupno preživljavanje je ispitivano kod 17/34 (50%) pacijenata kod kojih su dijagnostikovane plućne metastaze, kod 9/34 pacijenata kod kojih su dijagnostikovane koštane metastaze i kod 8/34 pacijenta koji su imali i plućne i koštane metastaze u trenutku dijagnostikovanja bolesti. Krive ukupnog preživljavanja za posmatrane grupe pacijenata prikazane su na grafikonu 14.



Grafikon 14. Kaplan Meier krive ukupnog preživljavanja u odnosu na lokalizaciju metastatske promene

U grupi pacijenata sa lokalizacijom metastaza na plućima dostignuta je medijana ukupnog preživljavanja od 28.1 meseci (95%CI: ≥ 19.53 mes.), kod pacijenata sa samo koštanim metastazama medijana ukupnog preživljavanja iznosi 15.6 meseci (95%CI: ≥ 9.99 mes.) dok

je u grupi pacijenata sa metastazama i na plućima i na kostima, medijana ukupnog preživljavanja znatno manja i iznosi 11.3 meseci (95%CI: ≥ 10.32 mes.).

Potvrđena je statistički značajna razlika u preživljavanju (Log-Rank test; $\chi^2=48.055$; $p=2.07 \times 10^{-10}$).

Daljom analizom, dobijeni su sledeći rezultati testiranja razlika u ukupnom preživljavanju između parova metastaska lokalizacija tumora koji su prikazani u tabeli 31.

Tabela 31. Rezultati testiranja razlika u ukupnom preživljavanju između parova lokalizacija metastatskih promena

Grupe	Log Rank test; χ^2	p[#]
Bez meta vs meta pluća	2.584	0.107
Bez meta vs meta kost	31.281	2.232×10^{-8}
Bez meta vs meta pluća i kost	27.495	1.574×10^{-7}
Meta pluća vs meta kost	10.172	0.001
Meta pluća vs meta pluća i kost	8.417	0.003
Meta kost vs meta pluća i kost	0.014	0.905

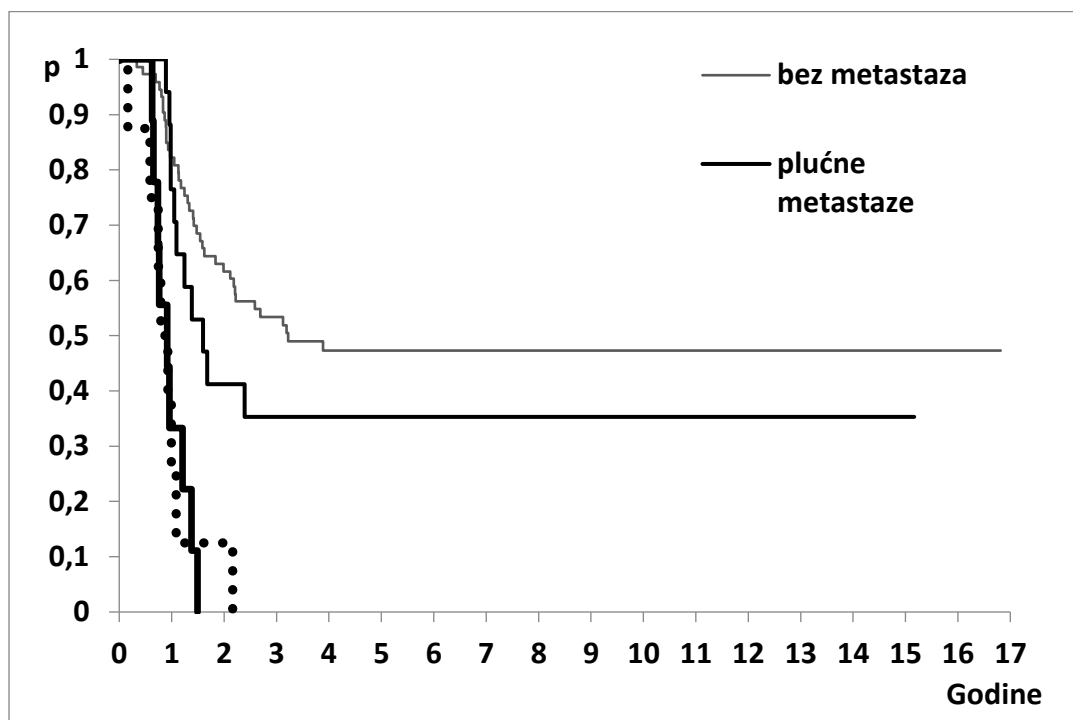
#značajnost p-vrednosti se određuje u odnosu na Bonferroni korekciju ($\alpha_1=0.05/6=0.0083$)

Iz tabele 31 se vidi da grupa sa koštanim metastazama ima lošije ukupno preživljavanje od grupe bez metastaza ili sa samo plućnim metastazama dok je grupa sa plućnim i koštanim metastazama sa najlošijim preživljavanjem u odnosu na ostale grupe.

4.4.7.b. Preživljavanje bez događaja u odnosu na lokalizaciju metastatske promene

Preživljavanje bez događaja je ispitivano kod 17/34 pacijenata kod kojih su dijagnostikovane plućne metastaze, kod 9/34 pacijenata kod kojih su dijagnostikovane koštane metastaze i kod 8/34 pacijenta koji su imali i plućne i koštane metastaze u trenutku dijagnostikovanja bolesti.

Krive preživljavanja bez događaja za posmatrane grupe pacijenata prikazane su na grafikonu 15.



Grafikon 15. Kaplan Meier krive preživljavanja bez događaja u odnosu na lokalizaciju metastatske promene

U grupi pacijenata sa lokalizacijom metastaza na plućima dostignuta je medijana ukupnog preživljavanja od 19.2 meseci (95%CI: ≥ 13.08 mes.), kod pacijenata sa samo koštanim metastazama medijana preživljavanja bez događaja iznosi 10.9 meseci (95%CI: ≥ 8.84 mes.) dok je u grupi pacijenata sa metastazama i na plućima i na kostima medijana preživljavanja bez događaja nešto manja i iznosi 10.3 meseci (95%CI: ≥ 8.94 mes.).

Potvrđena je statistički značajna razlika u preživljavanju (Log-Rank test; $\chi^2_3=45.426$; $p=7.51 \times 10^{-10}$).

Daljom analizom, dobijeni su sledeći rezultati testiranja razlika u preživljavanja bez događaja između parova metastatska lokalizacija tumora koji su prikazani u tabeli 32.

Tabela 32: Rezultati testiranja razlika u preživljavanju bez događaja između parova lokalizacija metastatskih promena

Grupe	Log Rank test; χ^2	p[#]
Bez meta vs meta pluća	1.149	0.283
Bez meta vs meta kost	27.332	1.713x 10 ⁻⁷
Bez meta vs meta pluća i kost	26.556	2.560 x 10 ⁻⁷
Meta pluća vs meta kost	10.864	0.00098
Meta pluća vs meta pluća i kost	10.063417	0.0015
Meta kost vs meta pluća i kost	0	0.996

#značajnost p-vrednosti se određuje u odnosu na Bonferroni korekciju ($\alpha_1=0.05/6=0.0083$)

Iz tabele 32 se vidi da grupa sa koštanim metastazama ima lošije preživljavanje bez događaja od grupe bez metastaza ili sa samo plućnim metastazama dok je grupa sa plućnim i koštanim metastazama sa najlošijim preživljavanjem bez događaja u odnosu na ostale grupe.

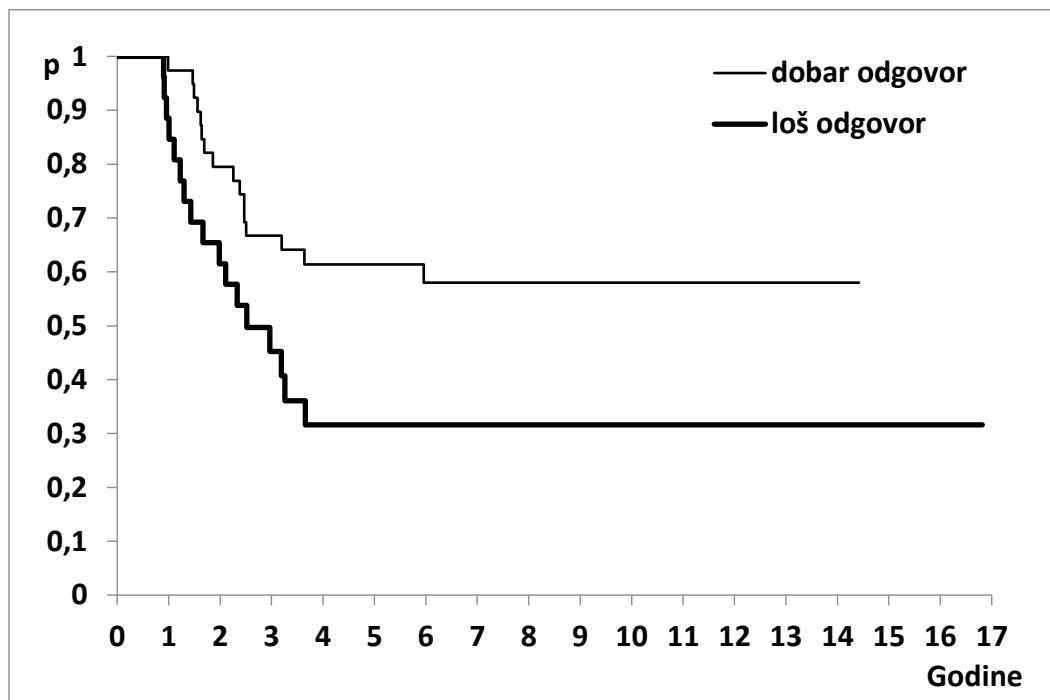
4.4.8. Histopatološki odgovor tumora na primenjenu neoadjuvantnu (preoperativnu) hemioterapiju

4.4.8.a. Ukupno preživljavanje u odnosu na histopatološki odgovor na primenjenu neoadjuvantnu (preoperativnu) hemioterapiju

Ukupno preživljavanje u odnosu na kategoriju histopatološki odgovor na primenjenu hemioterapiju ispitivano je kod 65 pacijenata kod kojih je nakon učinjene hirurške intervencije određen histopatološki odgovor na primenjenu hemioterapiju. Sa dobrim histopatološkim odgovorom bilo je 39/65 pacijenata dok je loš odgovor dijagnostikovao kod 26/65 pacijenata.

Medijana ukupnog preživljavanja nije dostignuta za pacijente sa dobrim histopatološkim odgovorom dok je medijana za pacijente za lošim histopatološkim odgovorom na primenjenu hemioterapiju dostignuta i iznosi 30.2 meseci (95%CI: ≥ 20 meseci).

Na grafikonu 16. prikazane su odgovarajuće Kaplan-Meier krive.



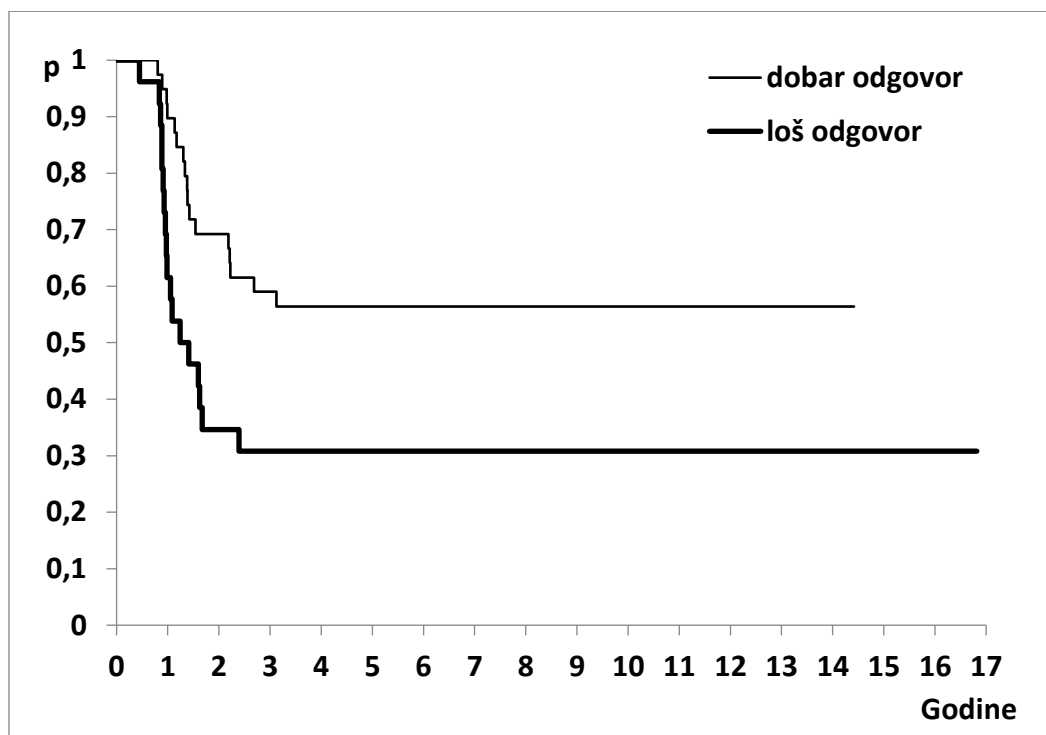
Grafikon 16: Kaplan Meier krive ukupnog preživljavanja u odnosu na histopatološki odgovor na primenjenu hemioterapiju.

Dokazano je postojanje statistički značajne razlike u ukupnom preživljavanju u odnosu na histopatološki odgovor na primenjenu hemioterapiju (Log-Rank test; $\chi^2_1 = 5.318$; $p = 0.021$).

4.4.8.b. Preživljavanje bez događaja u odnosu na histopatološki odgovor na primenjenu neoadjuvantnu (preoperativnu) hemioterapiju

Preživljavanja bez događaja ispitivano je kod 39/65 pacijenata sa dobrim histopatološkim odgovorom tumora na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju i kod 26/65 pacijenata sa lošim odgovorom na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju.

Medijana preživljavanja bez događaja nije dostignuta za pacijente sa dobrim histopatološkim odgovorom dok je medijana za pacijente sa lošim histopatološkim odgovorom na primenjenu hemioterapiju dostignuta i iznosi 15.9 meseci (95%CI: ≥ 11.6). Na grafikonu 17 su prikazane krive preživljavanja bez događaja u odnosu na HP odgovor tumora na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju.



Grafikon 17. Kaplan Meier krive preživljavanje bez događaja u odnosu na HP odgovor tumora na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju

Postoji statistički značajna razlika u preživljavanju bez događaja u odnosu na HP odgovor tumora na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju (Log-Rank test; $\chi^2_1 = 6.644$; $p = 0.0099$).

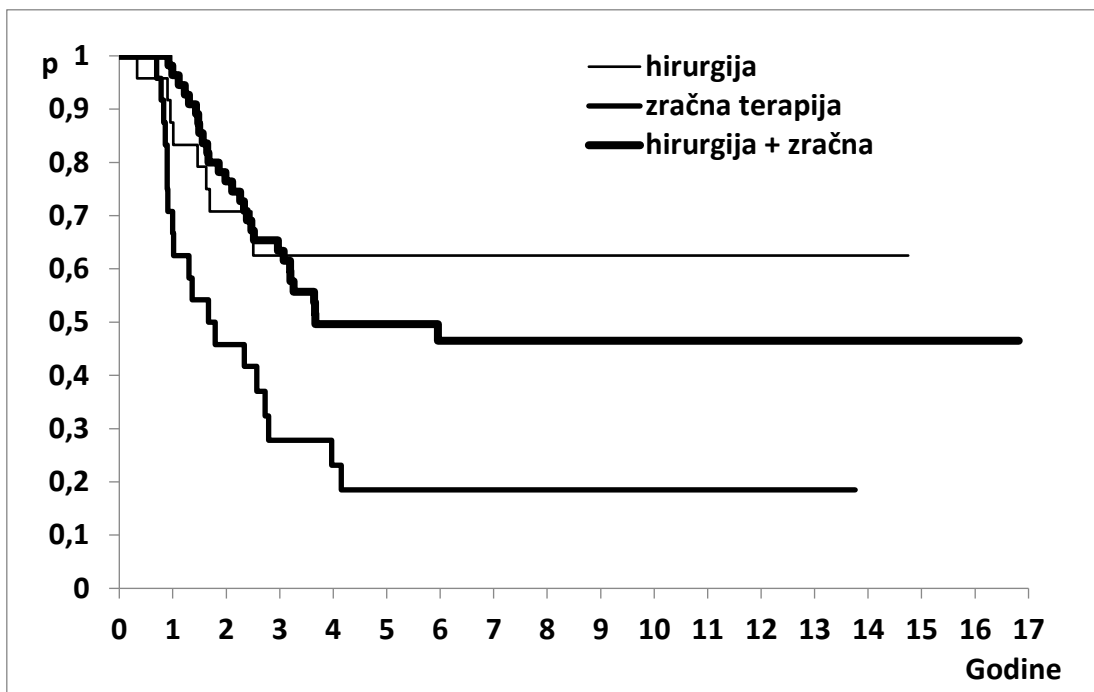
4.4.9. Lokalna kontrola bolesti

4.4.9.a. Ukupno preživljavanje u odnosu na sprovedeni modalitet lokalne kontrole bolesti

Ukupno preživljavanje u odnosu na učinjeni modalitet lokalne kontrole bolesti ispitivano je kod 103/107 pacijenta. Kod 24/103 pacijenta sprovedeno je samo hirurško lečenje kao modalitet lokalne kontrole bolesti, isti broj pacijenata imao je samo zračnu terapiju kao modalitet lokalnog lečenja, dok su kod 55/103 pacijenata kao vid lokalnog lečenja sprovedena oba modaliteta (hirurgija i zračna terapija).

Na grafikonu 18 prikazana je kriva ukupnog preživljavanja u odnosu na sprovedeni modalitet lokalne kontrole bolesti

Medijana ukupnog preživljavanja u grupi gde je sprovedeno samo hirurško lečenje nije dostignuta. Medijana ukupnog preživljavanja u grupi gde je sprovedena samo zračna terapija kao tip lokalne kontrole bolesti je dostignuta i iznosi 20.7 meseci (95%CI: 12.2- 47.6) kao i u grupi gde su sprovedena oba modaliteta lokalnog lečenja i gde iznosi 44.0 meseci (95%CI: ≥ 36.9)



Grafikon 18. Kaplan Meier krive ukupnog preživljavanja u odnosu na sprovedeni modalitet lokalne kontrole bolesti

Postoji statistički značajna razlika u vremenu (OS) po nivoima parametra tip lokalne kontrole bolesti

(Log-Rank test; $\chi^2= 13.307$; $p= 0.0012$)

Daljom analizom, dobijeni su sledeći rezultati testiranja razlika u ukupnom preživljavanju između parova modalitet lokalne kontrole bolesti koji su prikazani u tabeli 33.

Tabela 33: Rezultati testiranja razlika u ukupnom preživljavanju između parova modalitet lokalne kontrole bolesti

Grupe	Log Rank test; χ^2	p [#]
Hirurgija vs zračna terapija	8.034	0.004
Hirurgija vs hirurgija i zračna terapija	0.663	0.415
Zračna terapija vs hirurgija i zračna terapija	9.929	0.001

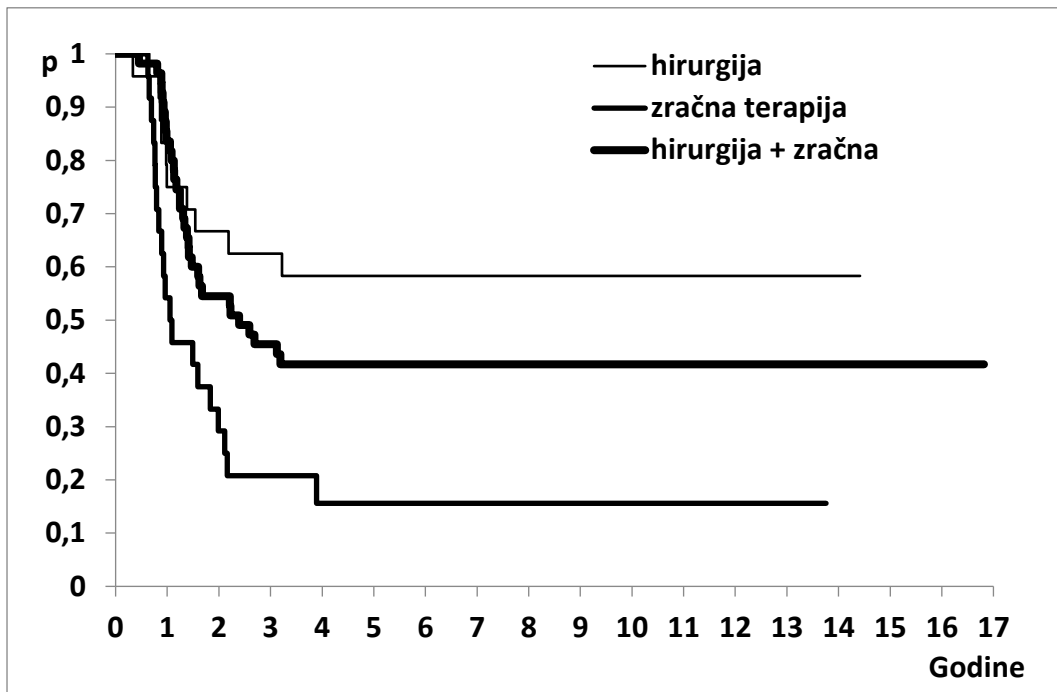
#značajnost p-vrednosti se određuje u odnosu na Bonferroni korekciju ($\alpha_1=0.05/3=0.0167$)

Analizom ukupnog preživljavanja kod ove tri grupe pacijenata uočena je razlika u ukupnom preživljavanju po nivoima tip lokalne kontrole a daljom analizom kombinacija lokalnog lečenja dobili smo da su naši pacijenti koji su operisani kao i oni koji su kao vid lokalnog lečenja imali i hirurgiju i zračnu terapiju u odnosu na one koji su samo zračeni imali značajno bolje ukupno preživljavanje kao što je pokazala i analiza preživljavanja bez događaja.

4.4.9.b. Preživljavanje bez događaja u odnosu na modalitet lokalne kontrole bolesti

Preživljavanje bez događaja u odnosu na učinjeni modalitet lokalne kontrole bolesti ispitivano je kod 103/107 pacijenta. Kod 24/103 pacijenta sprovedeno je samo hirurško lečenje kao modalitet lokalne kontrole bolesti, isti broj pacijenata imao je samo zračnu terapiju kao modalitet lokalnog lečenja, dok su kod 55/103 pacijenata kao vid lokalnog lečenja sprovedena oba modaliteta (hirurgija i zračna terapija).

Medijana preživljavanja bez događaja u grupi gde je sprovedeno samo hirurško lečenje nije dostignuta. Medijana preživljavanja bez događaja u grupi gde je sprovedena samo zračna terapija kao tip lokalne kontrole bolesti je dostignuta i iznosi 12.9 meseci (95%CI: 10.7-25.4) kao i u grupi gde su sprovedena oba modaliteta lokalnog lečenja i gde iznosi 28.7 meseci (95%CI: ≥ 17.7). Na grafikonu 19 prikazane su krive preživljavanja bez događaja u odnosu na sprovedeni modalitet lokalne kontrole bolesti.



Grafikon 19. Kaplan Meier krive preživljavanja bez događaja u odnosu na sprovedeni modalitet lokalne kontrole bolesti

Dokazana je statistički značajna razlika u preživljavanju bez događaja u odnosu na sprovedeni modalitet lokalne kontrole bolesti (Log-Rank test; $\chi^2_1=12.873$; $p=0.0016$).

Daljom analizom, dobijeni su sledeći rezultati testiranja razlika u preživljavanju bez događaja između parova modalitet lokalne kontrole bolesti koji su prikazani u tabeli 34.

Tabela 34: Rezultati testiranja razlika u preživljavanju bez događaja između parova modalitet lokalne kontrole bolesti

Grupe	Log Rank test; χ^2	p[#]
Hirurgija vs zračna terapija	9.375	0.002
Hirurgija vs hirurgija i zračna terapija	1.213	0.270
Zračna terapija vs hirurgija i zračna terapija	8.373	0.003

#značajnost p-vrednosti se određuje u odnosu na Bonferroni korekciju ($\alpha_1=0.05/3=0.0167$)

Iz tabele 34. vidi se razlika u preživljavanju bez događaja u odnosu na tip sprovedene lokalne kontrole bolesti. Pacijenti koji su operisani kao i oni koji su kao vid lokalnog lečenja imali oba modaliteta lečenja u odnosu na one koji su samo zračeni imali su značajno bolje preživljavanje bez događaja.

5. DISKUSIJA

Ewing-ov sarkom kosti predstavlja redak tumor koji zahteva kompleksan tretman, multidisciplinarni pristup i lečenje u referentnom centru. Veliki napredak u lečenju ES postignut je poslednje četiri decenije zahvaljujući pažljivo planiranom multimodalnom lečenju koje podrazumeva kombinovanu primenu intenzivne hemioterapije i individualno planiranje lokalne kontrole bolesti, a sve u cilju poboljšanja dugoročnog preživljavanja i ishoda bolesti kod pacijenata sa Ewing sarkomom (4, 216, 217, 218).

U osnovi ove retrospektivno-prospektivne studije sprovedene u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u periodu od januara 2000 godine do decembra 2016 godine je multidisciplinarni pristup u lečenju ES koštanog porekla kao i ispitivanje uticaja prognostičkih parametara na ishod bolesti i efekat lečenja. Ishod lečenja posmatran je kroz ukupno preživljavanje, preživljavanje bez događaja i preživljavanje bez znakova bolesti.

Studija je obuhvatila analizu 107 pacijenata. Najmlađi pacijent je imao 3 godine a najstariji 19 godina u trenutku dijagnostikovanja bolesti. Medijana je iznosila 14 godina što se poklapa sa literaturnim podacima. Bilo je više pacijenata muškog pola (59.81%), uz odnos polova 1.48:1 u korist muškog pola, što je takođe u korelaciji sa literaturnim podacima.

Na kraju sprovedene studije, sa prosečnim vremenom praćenja od 56.5 meseci (raspon od 1.94 do 201.8 meseci), 43.93% pacijenata je bilo živo a kod 56.07% je došlo do smrtnog ishoda. Relaps bolesti je dijagnostikovao kod 58.88% pacijenata i to u vidu lokalnog relapsa kod 11.11% pacijenata, kod 50.79% pacijenata su dijagnostikovane udaljene metastaze a kod 34.92% pacijenata i lokalni relaps i udaljene metastaze.

Rezultati naše studije su pokazali da u celokupnoj grupi od 107 pacijenata, ukupno petogodišnje preživljavanje iznosi 43.8% dok je petogodišnje preživljavanje bez događaja za istu grupu pacijenata 38%.

Preživljavanje bez znakova bolesti, za grupu od 76 pacijenata i isti period praćenja, koji su završili celokupno primarno onkološko lečenje i bili bez znakova bolesti u tom trenutku, iznosi 53.4%.

Pre ere kombinovane hemioterapije, prognoza pacijenata sa ES bila je izuzetno nepovoljna, više od 90% pacijenata umiralo je od sekundarnih metastaza (215). Tokom proteklih decenija, zahvaljujući uvođenju multimodalnog tretmana koji podrazumeva kombinovanu primenu hemioterapije, hirurgije i/ili zračne terapije, prognoza ovih pacijenata se poboljšala. Preživljavanje je drastično poboljšano od 10% koliko je iznosilo lečenjem primenom hirurgije i zračne terapije, do 65-70% koliko je sada procenat preživljavanja za pacijente sa lokalizovanim oblikom bolesti nakon uvođenja hemioterapije i multimodalnog pristupa (17,101,102,105,107,216). Ishod pacijenata sa metastatskim oblikom bolesti još uvek je nepovoljan sa rezultatima preživljavanja od 20-40% u zavisnosti od lokalizacija metastatskih promena i intenziteta sprovedenog lečenja (60,76,163,173,174).

American Cancer Society je 2015 godine u Global Cancer Facts & Figures objavio podatak da se procenat preživljavanja ES povećao sa 42% u periodu 1975-1979 na 72% u periodu 2003-2009. Prema dostupnim podacima, ukupno petogodišnje preživljavanje za 2005-2007 godinu za ES kod dece uzrasta do 14 godina bilo je 71% u severnoj Evropi, 70% u centralnoj Evropi, 74% u južnoj Evropi i 46% u istočnoj Evropi, dok je u SAD, petogodišnje preživljavanje za isti period i istu grupu pacijenata, iznosilo 75% (218).

Lee i saradnici su sproveli istraživanje koje je obuhvatilo analizu 725 pacijenata iz Kancer registra u Kaliforniji. Ukupno petogodišnje preživljavanje za sve pacijente obbolele od ES koji su obuhvatili i decu i adulte za period od 1989-2007 godine, iznosilo je 53.8% a desetogodišnje 48.3% (219).

U najvećoj studiji u Memorial Sloan Kettering Cancer centru (SAD) sprovedenoj u periodu od 1974 do 2012 godine sa uključenih 300 pacijenata uzrasta od 0.3 do 39 godina (medijana 16.8 godina) prikazano je ukupno petogodišnje preživljavanje za sve pacijente obbolele od ES od 65.2%. Za lokalizovani oblik bolesti taj procenat je iznosio 78.6%, za metastatski oblik sa izolovanim promenama u plućima 40.1% dok je za oblik sa vanplućnim metastazama ukupno petogodišnje preživljavanje iznosilo 28.1% (220).

Rodriguez-Galindo i saradnici iz St. Jude Children's Research Hospital, u radu objavljenom 2007 godine, pokazali su da je u grupi od 220 pacijenata lečenih u njihovoj ustanovi u periodu od 1979 do 2004 g, ukupno petogodišnje preživljavanje iznosilo 63.5% (73).

Studija autora iz Turske, Sari i saradnika, sprovedena na 87 pacijenata imala je petogodišnje ukupno preživljavanje od 47% (221).

Pedijatrijska onkološka grupa iz Poljske, u svom izveštaju za period od 2000 do 2009 godine, prikazala je ukupno petogodišnje preživljavanje od 59.78% dok je za isti period preživljavanje bez događaja iznosilo 48% (222).

U ET-2 studiji koja je sprovedena u Velikoj Britaniji u periodu od 1987 do 1993 godine, povećanjem doze ifosfamida na 9 g / m² po ciklusu u poređenju sa ET-1 (6g/m²) i primenom doksorubicina u svim indukcionim ciklusima značajno je poboljšano preživljavanje bez događaja sa 44% u ET-1 (1977 do 1986 g) na 62% (53,104).

Uvođenje kombinacije ifosfamida i etopozida kao i visokih doza ifosfamida značajno je poboljšalo preživljavanje ovih pacijenata što je pokazano u studiji Griera i saradnika koja je objavljena 2003 godine (106).

U studiji sprovedenoj u Japanu koja je obuhvatila 240 pacijenata svih uzrasta (medijana 16 godina), Obata i saradnici su prikazali petogodišnje ukupno preživljavanje od 48.7 % i preživljavanje bez događaja od 40.7% (223).

U našoj studiji, koja je analizirala 107 pacijenata obolelih od ES kosti koji su praćeni u periodu od 2000-2016 godine, trogodišnje ukupno preživljavanje iznosilo je 53.1%, petogodišnje 43.8% dok je desetogodišnje ukupno preživljavanje iznosilo 42.5%. Ovaj podatak koji pokazuje nešto niži procenat ukupnog preživljavanja u našoj analiziranoj grupi pacijenata u odnosu na neke studije možemo objasniti sledećim činjenicama. Pre svega, mislimo da je to posledica nešto većeg broja pacijenata u našoj studiji koji su u trenutku dijagnostikovanja imali metastatski oblik bolesti (31.8%). Takođe, značajan broj pacijenata u analiziranoj grupi imao je lokalizaciju tumora u predelu karlice (25.23%) kao i inicijalno veću dimenziju primarnog tumora (61.68%), što je sve u korelaciji sa lošim ishodom.

Preživljavanje bez događaja u pomenutoj grupi pacijenata iznosilo je: trogodišnje 42.0 %, petogodišnje 38 % i 10-godišnje 38 %.

Tokom poslednjih godina objavljeni su rezultati međunarodnih kooperativnih studija a analiza tih studija otkrila je prognostičke parametre koji su predviđali različite ishode i pomogli u izradi prilagođenih kliničkih trajala. Cilj ovih studija bio je optimizovanje strategije lečenja u zavisnosti od grupe rizika i smanjenja neželjenih dejstava koja se odnose na primenjeno lečenje. Mnogobrojne studije su identifikovale kliničke prognostičke parametre u ES (60,76,77,100,106,173,174).

U nekim od ovih studija izdvojene su grupe rizika koristeći sledeće parametre: oblik bolesti, uzrast, pol, vrednost LDH, inicijalna veličina tumora, lokalizacija tumora kao i histopatološki odgovor na primenjenu neoadjuvantnu (preoperativnu) hemioterapiju.

Kao najvažniji prognostički parametar izdvojen je oblik bolesti tj. prisustvo/odsustvo metastatske bolesti u trenutku dijagnostikovanja ES (60,76,77,106,173,174).

Shodno najnovijim dostupnim podacima, procenat ukupnog petogodišnjeg preživljavanja u lokalizovanom obliku ES iznosi od 60% do 82% (73).

Ishod lečenja pacijenata sa lokalizovanim oblikom bolesti je drastično poboljšan u odnosu na 46% kod pacijenata dijagnostikovanih i lečenih pre 1986. godine i 61% kod onih lečenih posle tog perioda. Pretpostavlja se da je uvođenje ifosfamida poboljšalo ukupno preživljavanje kod grupe pacijenata koji su lečeni posle 1986 godine (71).

U studijama sprovedenim krajem prošlog veka (CESS 81, CESS 86, EICESS 92) rezultati trogodišnjeg preživljavanja bez događaja (EFS) za lokalizovani oblik bolesti iznosili su 74%-78%, dok je petogodišnje preživljavanje bez događaja iznosilo od 55%-65%. U tim studijama su se koristili hemioterapijski režimi VAC, VACA, VAIA i EVAIA (101,105,108).

Bisvas i saradnici su objavili analiziranu seriju od 158 pacijenata i prikazali petogodišnje ukupno preživljavanje od 57.6% za pacijente za lokalizovanim oblikom bolesti (210).

Italijanska i Skandinavska sarkoma grupa (ISG/SSG III) je analizirala ishod 300 pacijenata lečenih u periodu od 1999 do 2006 godine, sa srednjim uzrastom od 15 godina i

lokalizovanim oblikom bolesti, koji su primali VACA-IE režim kao neoadjuvantnu hemioterapiju. Pacijenti su podeljeni u dve grupe, tako da su pacijenti sa dobrim odgovorom nastavili sa VACA-IE režimom dok su pacijenti sa lošim odgovorom primili tri ciklusa VAC-IE, ciklus za mobilizaciju CE i visokodoznu hemioterapiju sa busulfanom i melfalanom praćenu RMČH. Dobijeni su slični rezultati za obe grupe, petogodišnje ukupno preživljavanje u ovoj studiji je iznosilo 75% dok je preživljavanje bez događaja (EFS) iznosilo 69 % (171).

Prema rezultatima tri studije ES (EICESS 92, IOR i IESS/SSG), petogodišnje preživljavanje u lokalizovanom ES se kreće od 60-70% (108, 120, 171).

Petogodišnje ukupno preživljavanje od 69% je prijavljeno u francuskoj EW 93 studiji (172). Paulino i saradnici su prijavili petogodišnji OS od 57,5% u ovoj grupi od 76 pacijenata (124).

Shodno protokolima Euro Ewing, petogodišnje preživljavanje kod lokalizovanog oblika ES se kreće od 60 do 70% sa režimima hemioterapije VIDE, VAI/VAC (119).

U pomenutoj japanskoj studiji, Obate i saradnika, ustanovljeno je da je petogodišnji OS u lokalizovanom obliku ES bio 54,9%, dok je petogodišnji EFS u ovoj populaciji iznosio 46.6%. Kod pacijenata sa metastatskim oblikom bolesti rezultati su bili dosta lošiji. Petogodišnje ukupno i preživljavanje bez događaja iznosilo je 13.2% odnosno 6.8% (223). U studiji grupe autora sa Odeljenja kliničke onkologije iz Aleksandrije (Egipat), ukupno petogodišnje preživljavanje 74 pacijenata sa lokalizovanim oblikom bolesti iznosilo je 57%, dok je u poljskoj studiji od ukupno 132 pacijenta, 82 pacijenta sa lokalizovanim oblikom bolesti imalo ukupno preživljavanje od 68% (224, 222).

U našoj seriji, petogodišnje ukupno preživljavanje pacijenata sa lokalizovanim oblikom bolesti iznosi 56.4%. Pacijenti sa lokalizovanim oboljenjem imaju znatno bolje preživljavanje od pacijenata sa metastatskim oblikom bolesti što je potvrđeno i u našem ispitivanju (56.4% prema 17.6%, $p < 0, 0001$).

Ishod pacijenata sa metastatskim oblikom ES je još uvek vrlo nepovoljan. Metastaze najčešće nastaju u plućima i kostima. Za pacijente sa metastatskim oblikom bolesti, kao najvažniji prognostički parametar se izdvaja lokalizacija metastatskih promena. Pacijenti sa izolovanim

plućnim metastazama imaju bolju prognozu od onih sa prisutnim vanplućnim metastazama (60,76,77,175,176).

Na osnovu rezultata italijanske i skandinavske sarkoma grupe, u istraživanju Luksch i saradnika, gde je prijavljeno 102 pacijenta sa inicijalno metastatskim oblikom bolesti, najčešća lokalizacija metastaza su bila pluća (86%) i kosti (5%) (174).

Poljska grupa za pedijatrijsku onkologiju objavila je da u njihovoj grupi, procenat pacijenata sa inicijalno metastatskim oblikom bolesti iznosi 37.87%. Petogodišnje ukupno preživljavanje za ovu grupu pacijenata iznosilo je 42% i oni su dokazali da pacijenti sa izolovanim metastazama pluća imaju preživljavanje od 65% što je veoma slično rezultatu preživljavanja pacijenata sa lokalizovanim oblikom bolesti (222).

Cotterill i saradnici su objavili rezultate studije gde je od skoro 1000 pacijenata, 18,4% pacijenata bilo sa metastatskim oblikom bolesti. Prisustvo izolovanih metastaza u plućima rezultiralo je boljim preživljavanjem u poređenju sa prisutnim koštanim ili kombinovanim metastazama (71).

U našoj grupi bilo je 34 pacijenta (31, 78%) sa metastatskim oblikom bolesti, od kojih je sedamnaestoro (50%) imalo izolovane plućne metastaze, devetoro pacijenata (26.47%) imalo je koštane metastaze, a osmoro pacijenata (23.52%) je imalo dijagnostikovane kombinovane plućne i koštane metastatske promene.

Za našu grupu pacijenata sa metastatskim oblikom bolesti, petogodišnji OS iznosi 17,6%. Naša analiza je potvrdila da bolesnici sa izolovanim metastazama pluća imaju bolji ishod (petogodišnji OS iznosi 35, 3%) od pacijenata sa vanplućnim metastazama ($p=0.001$)

Studije Euro Ewing su u zavisnosti od do sada dokazanih prognostičkih parametara, stratifikovali pacijente u rizične grupe, uključujući parametre nezavisne od tretmana kao što su prisustvo i lokalizacija metastaza, praveći razliku između plućnih i vanplućnih, uglavnom koštanih metastaza (74,77). Kod pacijenata sa lokalizovanim oblikom bolesti, veličina/volumen primarnog tumora kao i histopatološki odgovor na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju su glavni parametri za stratifikaciju u standardnu ili grupu visokog rizika (74,100).

Ostali poznati prognostički parametri kod lokalizovanog oblika bolesti uključuju veličinu tj.zapreminu tumora, lokalizaciju tumora (karlična/ne-karlična, aksijalna/ekstremitet), histopatološki odgovor na primenjenu hemioterapiju i parametre vezane za izvodljivost i izbor lokalnog tretmana (73,75,78,80,123).

Sve studije su identifikovale slične prognostičke parametre. Nepovoljan ishod, pored metastatskog oblika bolesti kao najznačajnijeg prognostičkog parametra, najčešće se povezuje sa uzrastom iznad 14 godina, muškim polom, povišenim vrednostima LDH u serumu, tumorom većim od 8 cm ili 200 ml, lokalizacijom tumora u predelu karlice i lošim histopatološkim odgovorom tumora na primenjenu hemioterapiju. Osim ovih parametara, neke studije su prikazale i druge parametre koji se mogu povezati sa ishodom bolesti kao i lokalnom kontrolom bolesti. Studija EICESS 92 je pokazala da je adekvatna hirurška resekcija primarnog tumora povezana sa znatno nižim procentom pojave lokalnih recidiva (108).

Kao značajan prognostički parametar za prognozu lokalizovanog oblika bolesti ističu se i lokalna kontrola bolesti kao i sistemska terapija (73,108).

Broj ciklusa hemioterapije u različitim studijama varirao je između 12 i 16 ciklusa, bez očigledne razlike u preživljavanju bez događaja (109,110).

U našoj seriji, broj ciklusa hemioterapije iznosio je od 1 do 14 ciklusa, sa srednjom vrednošću od 11.78 (SD=3.24) i medijanom od 14 ciklusa.

Kasno lokalno lečenje, koje je podrazumevalo lokalno lečenje 15 meseci od početka terapije, bilo je povezano sa nepovoljnom prognozom (108).

U studiji St. Jude Children's Research Hospital, stariji uzrast, primarni tumor u predelu karlice, veliki tumori kao i metastatski oblik bolesti bili su povezani sa nepovoljnim ishodom ali su samo oblik bolesti i veličina tumora pokazali signifikantnu vrednost u sprovedenoj multivarijantnoj analizi (73).

Prosečan uzrast pacijenata obolelih od ES u literaturi je 15 godina (2,12,13). U izveštaju St. Jude Children's Research Hospital, srednji uzrast njihovih pacijenata bio je 13.7 godina dok je u studiji Paulussena i saradnika, prosečan uzrast pacijenata bio 15 godina (73,108).

U našoj seriji, srednji uzrast ispitivanih pacijenata iznosio je 13.07 godina a medijana 14 godina, što se uklapa sa literaturnim podacima o uzrastu pacijenata obolelih od ES, imajući u vidu da u našoj grupi lečenih pacijenata nisu bili pacijenti stariji od 19 godina. Najmlađi pacijent je imao 3 godine a najstariji 19 godina u trenutku dijagnostikovanja bolesti. Većina pacijenata je bila uzrasta ispod 14 godina (56.07%) što je u skladu sa podacima iz literature. Medijana ukupnog preživljavanja kod pacijenata mlađih od 14 godina nije dostignuta dok je medijana ukupnog preživljavanja kod pacijenata uzrasta preko 14 godina 28.6 meseci.

U do sada sprovedenim studijama, stariji uzrast je pokazao nepovoljniji ishod (13, 71, 72, 73,100,226). U jednoj od većih sprovedenih studija, Cotterill i saradnici su analizirajući podatke Evropske kooperativne ES grupe, kao nepovoljne prognostičke parametre izdvojili uzrast, primarno mesto tumora i metastatski oblik bolesti. Oni su utvrdili da je karlična lokalizacija tumora često povezana sa metastatskim oblikom bolesti kao i da je stariji uzrast povezan sa karličnom lokalizacijom i veličinom tumora što sve utiče na nepovoljan ishod bolesti (71).

Uzrast pacijenata je već neko vreme predmet rasprave s obzirom na postojanje različitih rezultata u sprovedenim studijama. U prethodnim studijama koje su rađene na malim serijama, preživljavanje adultnih pacijenata je bila lošije nego preživljavanje dece.

Iako su mnoge studije označile ovaj parametar kao nepovoljan prognostički parametar, nije precizno definisan koji je to graničan uzrast. Uzrast iznad 14 godina se najčešće koristi kao referentna granična vrednost (73,100).

Procenat petogodišnjeg preživljavanja dece lečene od ES uzrasta do 14 godina povećan je sa 59% na 78% dok je kod pacijenata uzrasta od 15-19 godina taj procenat poboljšan od 20% na 60% (225). Američko udruženje za rak i Nacionalni institut za rak objavili su podatke o petogodišnjem preživljavanju od 78% za decu uzrasta ispod 15 godina i 60% za adolescente uzrasta od 15 do 19 godina (218).

U severnoameričkim studijama pacijenti mlađi od 10 godina imali su bolji ishod bolesti od pacijenata uzrasta od 10 do 17 godina u trenutku dijagnostikovanja bolesti (106, 109). Sa odgovarajućom multimodalnom terapijom, preživljavanje je poređeno sa preživljavanjem kod adolescenata koji su bili identično lečeni. Pregled baze podataka SEER od 1973. do 2011. godine identifikovao je 1.957 pacijenata sa ES (227). Trideset devetoro ovih pacijenata (2,0%) je bilo uzrasta ispod 12 meseci u trenutku dijagnostikovanja bolesti. S obzirom na uzrast, pretpostavilo se da kod odojčadi nije primenjena zračna terapija kao i da je u toj uzrasnoj grupi tumor bio lokalizovan češće u mekim tkivima. Rana smrt bila je češća kod dece, ali se ukupno preživljavanje nije značajno razlikovalo od starijih pacijenata (13, 71, 73, 100, 226, 227).

Shodno studiji autora Galindo Rodriguez i saradnika iz St. Jude Children's Research Hospital, pacijenti starijeg uzrasta su u većem procentu imali veće tumore i češće karlične prezentacije. Kod pacijenata sa lokalizovanim oblikom bolesti iz ove studije, uzrast ispod 14 godina je signifikantno imao bolje ukupno preživljavanje u odnosu na stariji uzrast (82.7% vs.65.2%) ali se za EFS u ovoj grupi pacijenata nije dokazala statistička značajnost (73).

U pojedinim sprovedenim studijama, uzrast nije potvrđen kao parametar nepovoljnog ishoda bolesti.

U studiji Raciborska-e i saradnika, gde su analizirani prognostički parametri kod 132 pacijenta lečenih u referentnom centru u Poljskoj, nije dobijena potvrda da je uzrast pri dijagnozi značajan prognostički parametar (222). Takođe, ni francuska studija EW93 nije potvrdila uzrast kao značajan prognostički parametar (172).

Procena ishoda za adolescente ili mlade odrasle osobe sa ES je uglavnom bila nepovoljnija u ishodu u odnosu na pedijatrijsku populaciju (71,77,104,105,107,110). Za razliku od toga, neke manje serije sugerišu da stariji uzrast nije nepovoljan prognostički parameter u ES (179,180). Postoji nekoliko razloga za to. Centralni aksis kao primarno mesto ES i metastatski oblik bolesti prilikom dijagnoze su češći kod pacijenata starijeg uzrasta (71,110,179,180,181). Prisutni komorbiditeti, tolerancija na toksičnost, metabolizam hemioterapije i usklađenost tretmana može znatno da varira između dece i adultnih pacijenata

(182). Međutim, odrasli su imali lošiji ishod na INT-091 uprkos tome što je primenjen isti intenzitet doziranja hemioterapije (106) Takođe, uočeno je da se učestalost toksičnosti srazmerno smanjuje sa povećanjem godina u inicijalnoj analizi izvodljivosti Euro Ewing 99 studije (120).

U našoj grupi, od 107 analiziranih pacijenata, trogodišnje ukupno preživljavanje za 56.07% pacijenata mlađih od 14 godina iznosi 64.9%, petogodišnje iznosi 53.09%, a za 43.93% pacijenata uzrasta preko 14 godina trogodišnje preživljavanje iznosi 37.8% a petogodišnje 30.7%. Dobijeni rezultati su nešto niži nego kod većine dostupnih studija. Mislimo da je razlog taj što je u našoj studiji bio veći broj pacijenata sa metastatskim oblikom bolesti u trenutku dijagnostikovanja kao i sa tumorom većih dimenzija.

Pacijenti uzrasta ispod 14 godina imaju bolje preživljavanje u većini objavljenih studija. Analizom ukupnog preživljavanja u odnosu na uzrast kod naših pacijenata je dobijena statistički značajna razlika i time je potvrđeno da uzrast pacijenta u trenutku dijagnostikovanja bolesti može biti važan prognostički parametar.

Analiza preživljavanja bez događaja kod istih grupa pacijenata je pokazala da je medijana preživljavanja dostignuta za obe grupe, za grupu pacijenata uzrasta ispod 14 godina iznosi 38,3 meseci a za grupu pacijenata uzrasta preko 14 godina iznosi 15.7 meseci. Dokazano je da postoji statistički značajna razlika između vremena preživljavanja bez događaja u odnosu na uzrast.

Pacijenti muškog pola, shodno literaturnim podacima, češće oboljevaju od ES. Na osnovu podataka na uzorku od 1,426 pacijenata koji su bili uključeni u studije EICESS, 59% pacijenata je bilo muškog a 41% ženskog pola (108).

Odnos polova u našoj studiji iznosi 1,48:1 što predstavlja nešto veću zastupljenost muškog pola što je slično dostupnim podacima iz literature gde je taj odnos 1,2-1.5:1 (1).

Postoje dokazi da ženski pol ima bolju prognozu u odnosu na muški (5,100,121).

U nekim studijama, kao u studiji St. Jude Children Research Hospital, pol nije imao uticaja na ukupno preživljavanje (73). Takođe, ni u studiji sprovedenoj u Memorial Sloan Kettering

Cancer Center, kao ni u studiji Grier i saradnika i Lee i saradnika, pol nije predstavljen kao prognostički parameter za ishod bolesti (106,219).

Naša studija je potvrdila zaključke većine studija, nismo dokazali da je pol značajan prognostički parametar za prognozu ES.

Trajanje simptoma do dijagnostikovanja bolesti je, shodno objavljenim podacima, najčešće između 2 do 5 meseci. Duže vreme trajanja simptoma povezano je sa starijim uzrastom i karličnom lokalizacijom tumora, ali se ne povezuje sa pojavom metastatskog oblika, hirurškim ishodom ili preživljavanjem (51).

Kod naših pacijenata trajanje simptoma pre dijagnostikovanja bolesti iznosilo je u proseku 4,2 meseca (1-36 meseca) sa medijanom od 3 meseca što je, možemo reći, slično podacima iz literature.

Kao jedan od značajnih prognostičkih parametara ispituje se i inicijalna vrednost LDH u serumu. U studiji sprovedenoj u Velikoj Britaniji pokazano je da su pacijenti sa povišenim vrednostima serumske LDH imali nepovoljniju prognozu od pacijenata sa normalnim vrednostima (71). Povišena vrednost LDH korelirala je sa veličinom tumora. Pokazano je da vrednost LDH ima prognostički potencijal (71, 72, 83).

Od naših 107 ispitanika, njih 45.79% je u trenutku dijagnostikovanja bolesti imalo povišenu vrednost LDH, tj. vrednost veću od 460 U/L. Potvrđena je statistički značajna razlika u OS kao i u EFS, tako da možemo potvrditi da povišen nivo LDH može imati prognostički značaj.

Lokalizacija tumora predstavlja važan prognostički parametar. Većina studija navodi da je lokalizacija tumora u predelu ekstremiteta najčešće zastupljena lokalizacija ES. Prema dostupnim podacima, najbolju prognozu imaju pacijenti sa lokalizacijom tumora u predelu distalnih ekstremiteta (71,73, 100).

Kod pacijenata uzrasta iznad 14 godina, lokalizacija tumora u predelu karlice je često zastupljena mada se to može tumačiti na način da je karlična šupljina prostor gde tumor može da se širi a da ne bude odmah primećen, za razliku od tumora koji su lokalizovani na ekstremitetima. To se podudara sa istraživanjem gde je utvrđeno da su tumori karlice

obično veliki i da pacijenti sa karličnom primarnom lokalizacijom tumora imaju signifikatno veći procenat metastatskog oblika bolesti (71,73).

Najčešća lokalizacija ES kod naših ispitivanih pacijenata su ekstremiteti (52/107 tj. 48.6%) i to 33/52 (77,78%) kod dece uzrasta ispod 14 godina. Karlična lokalizacija tumora je zastupljena kod 27 (25.23%) pacijenata i to kod 15/27 (55.55%) pacijenata uzrasta iznad 14 godina. Lokalizacija tumora u predelu centralnog dela se opisuje kod 21.5% pacijenata dok se kod 5 (4.67%) pacijenata opisuju neke druge lokalizacije. Podaci o učestalosti ES ekstremiteta i karlice koreliraju sa podacima iz literature dok je predeo centralne lokalizacije u našoj studiji bio manje zastupljen.

U multivarijantnoj analizi, Lee i saradnici su utvrdili da su metastatski oblik bolesti kao i veliki tumorski volumen predstavljali nezavisne prognostičke parametre za nepovoljan ishod dok to nije dokazano za karličnu lokalizaciju tumora. Ipak, karlična lokalizacija tumora je povezana sa lošijim preživljavanjem zbog visoke korelacije sa metastaskim oblikom bolesti i velikim tumorom (219).

Medijana ukupnog preživljavanja za tumore lokalizovane na ekstremitetima u mesecima iznosi 71.5 meseci, za lokalizaciju karlica je medijana 23.8 meseci, dok za lokalizaciju tumora centralno, medijana nije dostignuta. Statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju u odnosu na lokalizaciju primarnog tumora u našoj grupi pacijenata pokazana je samo u slučaju karlične lokalizacije tumora.

Inicijalna veličina tumora predstavlja važan prognostički parametar u mnogim studijama. Granica od 100 ili 200 mL ili dimenzija tumora veća od 8 cm definišu se kao veliki tumori i oni imaju tendenciju da se nađu na nepovoljnim lokalizacijama (74,100).

Prema rezultatima prikazanim od autora iz St. Jude Children's Research Hospital, najznačajniji nezavisni prognostički parametar vezan za preživljavanje, pored oblika bolesti, je veličina tumora (73). Veličina tumora je opisana i kao prediktivni faktor ranog relapsa (74).

Kod naših pacijenata, tumor manji od 8 cm je dijagnostikovao kod 41/107 (38.32%) pacijenata dok je tumor veći od 8 cm dijagnostikovao kod 66 (61.68%) pacijenata. Tumor

veći od 8 cm je dijagnostikovao kod 22/27 (81.48%) pacijenata kod kojih je tumor lokalizovan u predelu karlice. Medijana ukupnog preživljavanja (kod grupe pacijenata sa tumorom većim od 8 cm iznosi 29.1 mesec dok u grupi pacijenata sa tumorom manjim od 8 cm medijana ukupnog preživljavanja nije dostignuta. Medijana preživljavanja bez događaja nije dostignuta kod grupe čija je veličina tumora bila manja od 8 cm, dok je kod grupe čija je veličina tumora veća od 8 cm medijana 16.8 meseci.

Statističkom obradom podataka dokazana je statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju kao i preživljavanju bez događaja u odnosu na inicijalnu veličinu tumora u našoj grupi pacijenata.

Pojedinačno najvažniji dokazani prognostički parametar ukupnog ishoda bolesti, po mnogim autorima, je prisustvo metastatskog oblika bolesti u trenutku dijagnostikovanja (60,71,76,77,100,173,174).

Prema literaturi, u trenutku dijagnostikovanja bolesti, metastaze se otkrivaju kod 15% do 33% pacijenata sa procentom preživljavanja od 9% do 41% za razliku od procenjenog preživljavanja od oko 70% kod pacijenata sa lokalizovanim oblikom bolesti (60,71,73,74,100,173,174).

Lokalizacija metastatskog oboljenja je, kao što je istaknuto u brojnim studijama, bitan parametar za prognozu ove bolesti.

Dokazano je da pacijenti sa lokalizovanim plućnim metastazama imaju bolje preživljavanje od pacijenata sa primarnim koštanim i/ili metastazama u koštanoj srži. Preživljavanje bez događaja kod pacijenata sa izolovanim plućnim metastazama iznosi od 29% do 52%, pogotovu ako je kao terapijski modalitet sprovedena zračna terapija "kupanje pluća" ili VDHT sa RMČH. Za pacijente sa koštanim metastazama EFS iznosi 19% a ukoliko su zahvećeni i kosti i pluća, EFS iznosi samo 8%. Međutim, i pored primenjenih različitih strategija lečenja, rezultati su i dalje nezadovoljavajući (76,77,175,176).

Shodno objavljenom rezultatu Euro Ewing 99 trajala za primarno diseminovani multifokalni oblik ES (R3) u grupi koja je obuhvatila 281 pacijenta, koji su lečeni primenom 6 ciklusa VIDE režima, jednog VAI ciklusa, sprovedenog lokalnog lečenja (hirurgija i/ili zračna

terapija) i VDHT i RMČH, trogodišnji EFS iznosi $27\% \pm 3\%$ a OS $34 \pm 4\%$. Ovom studijom je pokazano da pacijenti mogu da prežive zahvaljujući intenzivnoj multimodalnoj terapiji. Dokazani prognostički parametri bili su prisustvo metastatskog oblika bolesti, uzrast i veličina tumora (77).

U prethodnim kooperativnim ES studijama koje su primenjivale konvencionalnu hemioterapiju kod većine pacijenata, ni jedan pacijent koji je imao koštane metastaze nije preživeo. Francuska grupa je primenom Bu/Mel režima VDHT i RMČH postigla EFS od 24% kod ove grupe pacijenata. Naročito je naglašen značaj odgovora na primenjenu hemioterapiju pre primene VDHT (178). U Euro Ewing 99 studiji za pacijente koji su na primenjenu hemioterapiju imali kompletan i parcijalni odgovor pre VDHT, EFS je iznosio 57% i 25% (77).

U studiji Raciborske i saradnika iz Poljske, od 132 pacijenata, 50 je bilo sa metastatskim oblikom bolesti i to 20 sa izolovanim plućnim metastazama. Ukupno petogodišnje preživljavanje kod pacijenata sa lokalizovanim oblikom iznosilo je 68%, što je bilo slično rezultatu lečenja pacijenata sa izolovanim plućnim metastazama. Autori su to objasnili agresivnim pristupom u lečenju odmah nakon indukciono terapije sa sprovedenom metastazektomijom i zračnom terapijom, ali je to zbog malog broja pacijenata još uvek bez statističke potvrde (222).

U japanskoj studiji, Obata i saradnici, prijavljuju kod pacijenata sa metastatskim oblikom bolesti, petogodišnje ukupno i preživljavanje bez događaja od 13.2% odnosno 6.8% (223).

U našoj studiji, od uključenih 107 pacijenata, njih 34 (31.78%) je imalo metastatski oblik bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze. Dobijeni podaci ukazuju na višu incidencu metastatske bolesti u našoj grupi ispitanika u odnosu na podatke iz literature gde je metastaska bolest inicijalno prisutna kod prosečno 25% pacijenata (4). Lokalizacija karlica i metastatski oblik bolesti je bio dijagnostikovao kod 10/34 pacijenata. 27/34 pacijenata je imalo veličinu tumora veću od 8 cm.

Polovina pacijenata sa metastatskim oblikom bolesti u našoj studiji je imala izolovane metastaze na plućima, 9/34 pacijenata je imalo koštane metastaze dok je 8/34 pacijenata imalo i plućne i koštane metastazne promene.

U studijama sprovedenim do 1999 godine, procenat preživljavanja bez događaja kod pacijenata sa primarnim metastatskim oblikom bolesti prema literaturi iznosi 10-20% kod onih koji su primili konvencionalnu terapiju (77,173,175).

Prognostički parametri kod inicijalno metastatskog oblika bolesti su lokalizacija metastatske promene kao i odgovor na primenjenu hemioterapiju (77). Nije dokazano da broj plućnih metastaza utiče na ishod bolesti, ali pacijenti sa unilateralnim plućnim metastazama imaju povoljniji ishod od pacijenata sa dijagnostikovanim obostranim meta promenama (175).

U studiji CCG 7881 sprovedenoj u SAD, pacijenti sa koštanim i metastazama u koštanoj srži su imali trogodišnje preživljavanje bez događaja ispod 15% u poređenju sa 22% za drugu metastatsku lokalizaciju (103). Kušner i saradnici su objavili da su pacijenti sa primarnim plućnim metastazama imali bolje preživljavanje od pacijenata sa primarnom infiltracijom koštane srži (169). Ovi nalazi se poklapaju sa iskustvima iz prethodnih CESS i EICES studija (108,175).

Može se zaključiti da konvencionalni režimi lečenja mogu da dovedu do remisije, ali ne mogu da spreče pojavu relapsa kod pacijenata sa primarnim metastatskim oblikom ES. Klinički nedozvoljena minimalna rezidualna bolest dovodi do recidiva u srednjem vremenskom periodu od jedne do dve godine nakon završetka terapije. U cilju konsolidacije remisije smanjenjem minimalne rezidualne / metastatske bolesti (MRD / MMD), predloženi su režimi VDHT sa RMČH. Neki pacijenti imaju koristi od takve konsolidacione terapije, što potvrđuju izveštaji o trogodišnjem preživljavanju od 35% u slučaju postojanja koštanih i metastaza u koštanoj srži (166,167,169,170).

Do sada je primenjeno nekoliko mijeloablativnih režima. Pokazalo se da su efikasni režimi koji sadrže melfalan (77,166,167,170,178,196). Upotreba visokih doza busulfana u kombinaciji sa melfalanom ili drugim agensima je pokazala efikasnost kod pacijenata grupe visokog rizika (77,120,178). Uočena nekompatibilnost busulfana i primene zračne terapije

na aksijalne lokalizacije dovela je do ispitivanja novih alternativnih, manje toksičnih režima. Od 2006 godine se primenjuje treosulfan, prolek bifunkcionalnog alkilirajućeg citotoksičnog agensa koji je strukturno povezan sa busulfanom. Treosulfan se često koristi u protokolima za VDHT praćenih alogenom ili autolognom transplnatacijom matičnih ćelija hematopoeze (158). Sve studije ukazuju na izuzetnu sigurnost sa vrlo niskom nehematološkom toksičnošću kod pacijenata koji su prethodno lečeni i onih koji su pod velikim rizikom od toksičnosti povezane sa lekovima. (77). Međutim, još uvek nema studija o efektu treosulfana kod ES.

Rezultati lečenja pacijenata sa primarnim plućnim metastazama ES koji su lečeni konvencionalnom hemioterapijom su pokazali nepovoljnu prognozu tih pacijenata i preživljavanje bez događaja (EFS) u rasponu od 23% do 36% (71,73,100).

Studija IESS1 je pokazala da je "profilaktično" zračenje pluća bilo efikasno u kontroli mikroskopskih metastaza pluća kod pacijenata koji nisu dobijali doksorubicin (102). U analizi studije CESS, zračenje pluća bila je jedina opcija za pacijente sa metastazama pluća pri dijagnozi koji su postigli kompletan klinički odgovor na primenjenu hemioterapiju. U sprovedenoj multivarijantnoj analizi, "kupanje pluća" je povezano sa poboljšanim preživljavanjem (101,105).

Primena visokodozne hemioterapije praćene reinfuzijom matičnih ćelija hematopoeze je još uvek predmet ispitivanja i dilema (171).

Na osnovu rezultata nerandomizovane studije koja je uključila pacijente sa metastatskim oblikom bolesti lokalizovanim samo na plućima, korišćenje visokodozne hemioterapije, primenjenim busulfan-melfalan konsolidacionim režimom, prijavljeno je poboljšanje prognoze pacijenata sa EFS-om od 29% do 52% (76,77). Ovo je bio razlog za randomizaciju R2pulg u Euro Ewing 99 trajalu. Rezultati još nisu objavljeni a pacijenti su prevedeni u narednu Euro Ewing studiju (77).

Ferrari je sa saradnicima 2011 godine objavio rezultate studije sprovedene kod pacijenata sa lokalizovanim oblikom bolesti koji su imali loš odgovor na primenjenu hemioterapiju (VACA/IE) i kod kojih je sprovedena VDHT i RMČH. Na osnovu dobijenih rezultata

zaključili su da je VDHT dodata režimu VACA/IE izvodljiva i efikasna i da određena grupa pacijenata lečena ovim pristupom može imati korist od primenjene VDHT (171).

Prognostički parametri vezani za preživljavanje uključuju lokalizaciju metastatskog oboljenja kao i odgovor na primenjenu hemioterapiju.

U našoj grupi ispitanika koji su dijagnostikovani sa metastatskim oblikom bolesti, polovina je imala izolovane plućne metastaze. Ukupno petogodišnje preživljavanje i preživljavanje bez događaja kod tih pacijenata iznosilo je 35.3%. Daljom analizom, rezultati testiranja parova su pokazali da grupa sa koštanim metastazama ima lošije preživljavanje od pacijenata koji su imali izolovane plućne metastaze dok su najlošiju prognozu imali pacijenti koji su imali kombinovane metastaske promene (pluća i kosti).

Analiza preživljavanja pacijenata u našoj grupi je pokazala statističku značajnost u preživljavanju između grupa testiranih metastatskih lokalizacija.

Visokodozna hemioterapija sa RMČH u našoj grupi pacijenata primenjena je kod 16.82% od ukupnog broja lečenih pacijenata. To su bili pacijenti koji su imali inicijalno metastatski oblik bolesti i to nešto više od polovine pacijenata (55.55%) sa dijagnostikovanim izolovanim plućnim metastazama, 11.11% pacijenata sa koštanim metastazama, dok je 33.33% pacijenata imalo i plućne i koštane metastaze. Od ukupnog broja pacijenata kod kojih je sprovedena ova vrsta terapijskog modaliteta, troje pacijenata (16.66%) sa inicijalno prisutnim izolovanim plućnim metastazama je živo i na višegodišnjem su praćenju. Kod jednog od troje pacijenata sprovedena je zračna terapija “kupanje pluća”, koja je ukupno sprovedena kod petoro pacijenata.

Ovi naši rezultati se uklapaju u dobijene rezultate objavljenih svetskih studija koji se odnose na razliku u preživljavanju u odnosu na lokalizaciju metastatske promene pri inicijalnoj dijagnozi ES.

Najznačajniji prognostički parametar koji se odnosi na procenu terapijskog odgovora na primenjenu terapiju je procena histopatološkog odgovora na primenjenu neoajuvantnu

(preoperativnu) hemioterapiju, što se može utvrditi histopatološkim pregledom tumora nakon učinjene hirurške procedure a na osnovu određenog stepena nekroze tumora (75,78, 80,105,113).

U ISG/SSG III studiji sprovedena je analiza ishoda 300 pacijenata lečenih u periodu od 1999 do 2006 godine, sa lokalizovanim oblikom bolesti koji su primali VACAc-IE režim kao indukcionu hemioterapiju. Pacijenti su podeljeni u dve grupe tako što su oni sa dobrim odgovorom nastavili sa VACAc-IE režimom dok su pacijenti sa lošim odgovorom primili tri ciklusa VAC-IE, ciklus za mobilizaciju CE i VDH sa busulfanom i melfalanom i RMČH. Petogodišnje ukupno preživljavanje u ovoj studiji iznosilo je 75% dok je preživljavanje bez događaja iznosilo 69% (171). Petogodišnje preživljavanje bez događaja kod pacijenata sa dobrim odgovorom je iznosilo 75%, 72% kod pacijenata sa lošim odgovorom na primenjenu hemioterapiju koji su lečeni primenom VDHT i 33% kod pacijenata sa lošim odgovorom koji nisu imali VDHT (171).

U studiji autora Ferrari i saradnika iz 2007 godine koja je proučavala prediktivne faktore dobrog histopatološkog odgovora u seriji od 122 pacijenta sa lokalizovanim oblikom bolesti, koji su hirurškim putem lečeni u Institutu Rizzoli u Bolonji, kao jedini nezavisni prediktivni parametri dobrog histološkog odgovora su označeni uzrast i pol. Objavljeno je da pacijenti uzrasta ispod 15 godina imaju signifikantno bolji histopatološki odgovor na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju (79). Kao jedan od mogućih uzroka takvog rezultata pominje se farmakokinetika doksorubicina s obzirom da je u jednoj studiji pokazano da deca uzrasta do šest godina imaju veću koncentraciju doksorubicina od starije dece kod kojih je primenjena ista doza leka (98).

Ženski pol je označen kao pol koji ima bolji odgovor na primenjenu hemioterapiju ali nije utvrdjen tačan razlog tome (79).

Gaspar i saradnici su u analizi francuske EW 93 studije, takođe, potvrdili povoljan ishod lečenja kod pacijenata sa dobrim histopatološkim odgovorom (172).

U našoj studiji, odgovor na primenjenu preoperativnu hemioterapiju je ispitivan kod 65/107 pacijenata kod kojih je kao vid lokalnog lečenja, nakon neoadjuvantne hemioterapije

sprovedeno hirurško lečenje. Dobar odgovor dobijen je kod 60% pacijenata dok je loš odgovor dijagnostikovao kod 40% pacijenata. Rezultati ispitivanja ukupnog i preživljavanja bez događaja pokazali su petogodišnji OS i EFS u grupi sa dobrim odgovorom od 61.4% odnosno 56.4%. U grupi sa lošim odgovorom na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju ukupno petogodišnje preživljavanje iznosilo je 31.6% dok je preživljavanje bez događaja za isti period iznosilo 30.8%. Naši rezultati potvrđuju da je odgovor na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju signifikantan parametar za prognozu ishoda lečenja kod pacijenata sa ES.

Lokalna kontrola primarnog Ewing sarkoma može se postići hirurgijom, zračnom terapijom ili kombinacijom ova dva modaliteta. Izbor je baziran na proceni budućeg mogućeg stepena morbiditeta uslovljenog primenom određenog vida lokalnog lečenja za svakog pacijenta pojedinačno. Shodno tome, optimalni pristup za lokalnu kontrolu predstavlja predmet razmatranja i odluke multidisciplinarnog tima koji učestvuje u lečenju ovih pacijenata. Pojedinačne zasluge hirurškog lečenja i zračne terapije su i dalje predmet rasprave ali još uvek nema dovoljno randomizovanih studija za potvrdu nekih zaključaka (150). Lokalna kontrola bolesti kod pacijenata sa ES je veoma bitna komponenta multimodalnog lečenja. Izbor lokalne terapije je individualna odluka multidisciplinarnog tima bazirana na pacijentu i karakteristikama tumora. Najčešće primenjivan modalitet lokalne kontrole ES je hirurgija. (150). DuBois i saradnici su pokazali da uprkos tome što nije pokazana signifikantna razlika u preživljavanju između modaliteta lokalnog lečenja ES, zračna terapija je povezana sa većim rizikom od neuspešne lokalne kontrole (150). Istraživači Children's Oncology Group koji su analizirali 956 pacijenata, pokušali su da identifikuju pacijente sa lokalizovanim oblikom ES sa visokim rizikom za lokalni relaps. Zaključili su da je lokalna kontrola tumora najbolja i slična u slučaju primenjene hirurške intervencije i zračne terapije za aksijalne tumore i tumore kičmenog stuba. Uzrast preko 18 godina i primena zračne terapije za karlične i tumore ekstremiteta su u ovoj studiji bili povezani sa visokim rizikom za pojavu lokalnog recidiva. To je bilo u suprotnosti sa pacijentima koji su lečeni hirurškom procedurom kod kojih nije primećena razlika u uspešnosti lokalne kontrole u odnosu na lokalizaciju tumora (228). Analiza uspešnosti lokalne kontrole bolesti u studiji EE 99 je

pokazala lošu lokalnu kontrolu tumora ekstremiteta koji su lečeni zračnom terapijom u odnosu na one koji su lečeni hirurškom procedurom ili kombinovanim lečenjem (hirurgija i zračna terapija) (125).

Foulon i saradnici su u okviru Euro Ewing grupe pokušali da odgovore da li postoperativna zračna terapija može biti izostavljena u lokalizovanom ES standardnog rizika. Na osnovu analize 142/599 (24%) pacijenata koji su u periodu od 1999 do 2009 godine primali postoperativnu zračnu terapiju (medijana 45 Gy), zaključili su da zračna terapija poboljšava lokalnu kontrolu i dali preporuku da se postoperativna zračna terapija primenjuje u slučaju nekompletnog uklanjanja inicijalno tumorom zahvaćenog tkiva (125).

U poslednjoj analizi EICESS-92 studije koji je objavljen 2018 godine, dve nacionalne kliničke grupe Velike Britanije i Nemačke su pojedinačno analizirale rezultate gde su uočene neočekivane razlike u preživljavanju, OS i EFS, između dve grupe pacijenata koje su randomizovane. S obzirom na to da su svi pacijenti lečeni na osnovu zajedničkog protokola, uočene su značajne razlike u preživljavanju između nacionalnih studijskih grupa u ovoj randomizovanoj studiji. Prijavljeno je preživljavnje za celu grupu od 647 pacijenata od preko 60%, ali ovo smanjuje 14% niže petogodišnje preživljavanje grupe pacijenata regrutovanih kroz Dečju grupu za kancer i leukemiju Velike Britanije (eng: Children's Cancer and Leukaemia Group-CCLG). Lošiji ishod nije bio značajniji u odnosu na razlike u osnovnim karakteristikama, primenjenoj hemioterapiji ili praćenju. Prijavljene razlike su uočene u lečenju primarnog tumora i u procentu lokalnog recidiva koji je bio povezan sa primenom različitih terapijskih modaliteta. Autori su zaključili da ovaj rezultat pruža dokaz da varijacije u lokalnoj terapiji utiču na preživljavanje (229). Autori navode da nisu uočene razlike u odnosu na veličinu tumora i učestalost metastatskog oblika bolesti između dve studijske grupe, kao ni postojanje dokaza o evidentnom kašnjenju bilo koje vrste tretmana u dijagnostici ili terapiji u jednoj studijskoj grupi u odnosu na drugu. Takođe, nije bilo razlike u primeni hemioterapije. Pristupi lokalnoj kontroli tumora jasno su se razlikovali između dve grupe, uključujući i vremenski raspored lokalnih tretmana, ali oni nisu objasnili sve razlike, posebno kada su pacijenti imali hiruršku intervenciju (229).

Tumori koji su neoperabilni najčešće se lokalno leče samo primenom zračne terapije i ti tumori su često udruženi i sa drugim nepovoljnim parametrima kao što je npr. veličina tumora. Veća incidencija lokalnog relapsa kod pacijenata iz nemačkog trajala ukazuje na to da možda izbor pacijenata za određeni modalitet lokalnog lečenja nije bio adekvatan.

Na osnovu ovih podataka Whelan i saradnici su zaključili da su manje agresivni modaliteti lokalne kontrole bolesti doprineli pojavi većeg procenta lokalnih recidiva bolesti što je povezano sa većim rizikom od pojave metastaskog oblika bolesti i nepovoljnijim ishodom lečenja. Ovi podaci ističu važnost pažljivog planiranja terapije za lokalnu kontrolu tumora u ES kao i potrebu izbegavanja primene samo zračne terapije uvek kada je moguće sprovesti hirurško lečenje. Takođe se naglašava potreba sprovođenja internacionalnih trajala koji bi utvrdili važnost i ulogu različitih modaliteta lokalnog lečenja. Prema navodima Whelan-a, Velika Britanija je već pokrenula centralizovani nacionalni sistem za pregled i odlučivanje o lokalnom tretmanu za ES i on je trenutno u toku evaluacije (229).

Kao jedini modalitet lokalne kontrole primarnog tumora u našoj studiji, hirurško lečenje je sprovedeno kod 22.43% pacijenata što je identično procentu pacijenata kod kojih je sprovedena samo zračna terapija, dok su kod više od polovine pacijenata (51.4%) kao vid lokalnog lečenja primenjena oba modaliteta lokalnog lečenja (hirurško lečenje i zračna terapija). Lokalni relaps bolesti je dijagnostikovao kod 6.54 % od ukupnog broja pacijenata, dok je relaps bolesti koji je podrazumevao postojanje lokalnog relapsa i udaljenih metastaza dijagnostikovao kod 20.56% pacijenata.

Kod 3/7 pacijenata sa prisutnim lokalnim relapsom sprovedena je samo zračna terapija dok su kod ostalih sprovedena oba modaliteta a u grupi pacijenata sa dijagnostikovanim i lokalnim i udaljenim relapsom, samo zračna terapija je sprovedena kod osmoro pacijenata a oba modaliteta su primenjena kod 10 pacijenata.

U odnosu na karakter hirurške intervencije, kao modaliteta lokalne kontrole primarnog tumora, kod 27/107 (25.23%) pacijenata, osim biopsije u dijagnostičke svrhe, drugi hirurški modaliteti nisu sprovedeni. Kod ostalih 74.77% pacijenata, totalna ekstirpacija tumora je

učinjena kod 59.81% pacijenata a redukcija tumora (subtotalna i maksimalna) kod 14.95% od ukupnog broja pacijenata.

Analizom ukupnog preživljavanja kod ove tri grupe pacijenata, uočena je razlika u ukupnom preživljavanju po nivoima tip lokalne kontrole a daljom analizom kombinacija lokalnog lečenja dobili smo da su naši pacijenti koji su operisani kao i oni koji su kao vid lokalnog lečenja imali i hirurgiju i zračnu terapiju u odnosu na one koji su samo zračeni imali značajno bolje ukupno preživljavanje kao što je pokazala i analiza preživljavanja bez događaja.

Iako se ulažu veliki naponi, ne postoji puno utvrđenih prognostičkih biomarkera za ovu agresivnu vrstu tumora. S obzirom na svoje poznate uloge u različitim vrstama maligniteta, u ovoj studiji je urađena pilot studija ekspresije *TGFBI* I *SERPINI1* gena.

U našoj studiji, s obzirom na mali broj analiziranih pacijenata, dobijeni rezultati su prikazani kroz srednju vrednost i medijanu.

U odnosu na srednju vrednost, pokazana je dvostruko viša ekspresija *TGFBI* kod pacijenata sa lokalizovanim u odnosu na pacijente sa metastatskim oblikom bolesti (0,84 vs. 0,47) (Tabela 25). Slično se uočava i ako se posmatra medijana (0,62 vs. 0,30). Povišena ekspresija *TGFBI* u tumorima je obično povezana sa lošijom prognozom. Nasuprot tome, povišena ekspresija *TGFBI* u ćelijama periferne krvi može biti pokazatelj boljeg ishoda bolesti (87).

Poznato je da metastatske ćelije različitih solidnih tumora ekspimiraju visoke nivoe neuroserpina (kodiranog *SERPINI1* genom) u cilju sprečavanja metastaziranja indukovanog plazminogenom (88). Dobijene srednje vrednosti za lokalizovani i metastatski oblik bolesti (0,44 vs. 0,74) kao i za veličinu tumora (0,31 vs. 0,58) (Tabela 25) su u skladu sa pomenutim literaturnim podacima.

Imajući u vidu da se radi o pilot studiji rezultate treba sa oprezom tumačiti. Analiza veće grupe pacijenata je neophodna u cilju potvrde ovih rezultata.

Iako su utvrđeni tip, kombinacija i intenzitet doziranja hemioterapije, koji imaju značajan uticaj na prognozu pacijenata sa Ewing sarkomom, dužina trajanja lečenja je i dalje predmet rasprave i kontroverze. Još uvek nije sprovedeno randomizovano ispitivanje svrsishodnosti

dugoročne konsolidacije. Osim toga, visoke kumulativne doze citotoksičnih lekova su povezane sa dugotrajnom i kasnom toksičnošću.

Pojedine multicentrične studije koje su primenile konvencionalnu hemioterapiju su imale incidenciju smrtnosti od toksičnih efekata hemioterapije od 0.6% do 3% (106,108).

U našoj seriji su opisana dva smrtna ishoda (1.86%) koja su protumačena kao posledice toksičnosti primenjene hemioterapije što se poklapa sa iznetim svetskim podacima. Kod jednog pacijenta, do smrtnog ishoda je došlo u toku indukcionog VIDE tretmana zbog razvoja hepatorenalne insuficijencije a kod drugog pacijenta, nakon sprovedenog radikalnog zračnog tretmana i primenjenog ciklusa hemioterapije po protokolu EVAIA u adjuvantnom pristupu zbog hemoragije iz digestivnog trakta tokom pancitopenije.

Kod ostalih naših pacijenata, osim očekivanih, prolaznih ranih komplikacija primenjene hemioterapije (najčešće febrilna neutropenija) i zračne terapije, druge teže komplikacije nisu uočene.

Iako se često ne viđa, ES može da se javi kao sekundarni malignitet, najčešće kod pacijenata kod kojih je sprovedena zračna terapija. U studiji autora Cotterill i saradnika, kod 9/975 pacijenata je došlo do pojave sekundarnog maligniteta. To su najčešće bile akutne leukemije ili neki drugi sarkomi koji su nastali u predelu zračne regije. Pretpostavlja se da su alkilisujući agensi, ifosfamid i ciklofosfamid bili uzročnici za genezu leukemije a da su sarkomi bili indukovani zračnom terapijom (71).

U našoj seriji nismo imali pojavu sekundarnih maligniteta.

Shodno navedenom, moguće je identifikovati pacijente koji pripadaju grupi visokog ili standardnog rizika, odnosno pacijente kod kojih se može očekivati nepovoljan odnosno povoljan ishod lečenja. Od budućih protokola se očekuje da pacijenti grupe visokog rizika ciljano dobijaju intenzivniju terapiju kao i nove tipove terapije dok se za pacijente standardnog rizika očekuje modifikacija lečenja u cilju smanjenja kasnih posledica onkološkog lečenja. Zbog svega toga su neophodne nove internacionalne randomizovane studije, stratifikovane na osnovu karakteristika pacijenata.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem 107 pacijenata obolelih od Ewing sarkoma kosti, lečenih i praćenih u periodu od 2000 do 2016 godine u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Savremenim multidisciplinarnim lečenjem Ewing sarkoma poboljšani su rezultati lečenja:
 - a) Trogodišnje ukupno preživljavanje u ispitivanoj grupi od 107 pacijenata iznosi 53.1%, petogodišnje ukupno preživljavanje iznosi 43.8% i desetogodišnje ukupno preživljavanje za celu grupu iznosi 42.5%.
 - b) Trogodišnje preživljavanje bez događaja u ispitivanoj grupi od 107 pacijenata iznosi 42.0%, petogodišnje preživljavanje bez događaja iznosi 38.0% kao i desetogodišnje preživljavanje bez događaja.
 - c) Trogodišnje preživljavanje bez znakova bolesti u ispitivanoj grupi od 76 pacijenata iznosi 55.0%, petogodišnje preživljavanje bez znakova bolesti iznosi 53.4%, kao i desetogodišnje preživljavanje bez znakova bolesti za istu grupu pacijenata.
2. Relaps bolesti u ispitivanoj grupi od 107 pacijenata registrovan je kod 58.88% pacijenata i to kao lokalni relaps kod ukupno 11.11% pacijenata, kod 50.79% pacijenata su dijagnostikovane udaljene metastaze a kod 34.92% su dijagnostikovane kombinovane promene.
3. Pacijenti sa lokalizovanim oblikom bolesti imaju statistički značajno bolje preživljavanje od pacijenata sa metastatskim oblikom bolesti ($p < 0.0001$).
4. Pacijenti sa izolovanim metastazama pluća imaju statistički bolje preživljavanje u odnosu na pacijente sa vanplućnim metastazama ($p < 0.0001$).

5. Pacijenti uzrasta ispod 14 godina imaju statistički bolje preživljavanje u odnosu na pacijente starije od 14 godina ($p= 0.006$).
6. U odnosu na primarnu lokalizaciju tumora, pacijenti sa tumorom u predelu karlice imaju statistički značajno lošije preživljavanje u odnosu na druge lokalizacije ($p= 0,0008$).
7. Pacijenti sa tumorom manjim od 8 cm imaju statistički značajno bolje preživljavanje u odnosu na pacijente sa tumorom većim od 8 cm ($p=0.0001$).
8. Histopatološki odgovor na primenjenu neoadjuvantnu (preoperativnu) hemioterapiju statistički značajno utiče na preživljavanje. Pacijenti sa dobrim histopatološkim odgovorom (nekroza tumora veća od 90%) imaju statistički značajno bolje preživljavanje ($p= 0.02$).
9. Pacijenti sa inicijalno normalnim nivoom LDH u serumu imaju statistički značajno bolje preživljavanje ($p= 0.004$).
10. Pacijenti kod kojih je kao modalitet lokalne kontrole bolesti primenjeno hirurško lečenje, kao i oni kod kojih su primenjeni hirurško lečenje i zračna terapija imali su značajno bolje ukupno preživljavanje kao i preživljavanje bez događaja u odnosu na pacijente kod kojih je sprovedena samo zračna terapija ($p=0,0012$).
11. Analiza u grupi 20 pacijenata je pokazala dvostruko višu ekspresiju *TGFBI* gena kod pacijenata sa lokalizovanim oblikom bolesti u odnosu na pacijente sa metastatskim oblikom (0,84 vs. 0,47), kao i viši nivo ekspresije *SERPINI1* gena u grupi pacijenata sa metastatskim oblikom. Analiza veće grupe pacijenata je neophodna u cilju potvrde ovih rezultata.
12. Naša studija je pokazala da su lokalizovan oblik bolesti, uzrast ispod 14 godina, normalan nivo s-LDH, veličina tumora manja od 8 cm kao i dobar histopatološki odgovor na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju prognostički pokazatelji povoljnijeg ishoda bolesti.

13. Naša studija je pokazala da identifikacija kliničkih, biomolekularnih i patohistoloških parametara može dovesti do razvoja adaptiranih terapijskih protokola na osnovu procenjene grupe rizika pacijenata sa Ewing sarkomom. Ovo bi u budućnosti omogućilo primenu optimalne terapije za svakog pacijenta individualno, što predstavlja korak bliže personalizovanoj medicini, uz očekivano poboljšanje rezultata lečenja i kvaliteta života izlečenih pacijenata sa Ewing sarkomom kosti.

7. LITERATURA

1. Steliarova-Foucher E, Stiller C, Kaatsch P, Berrino F, Coebergh JW, Lacour B, Parkin M. Geographical patterns and time trends of cancer incidence and survival among children and adolescents in Europe since 1970s (the ACCIS project): an epidemiological study. *Lancet*. 2004;364:2097–105. DOI: 10.1016/S01406736(04)17550-8
2. Hawkins D, Brennan B, Bolling T, et al. Ewing sarcoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. ed 7. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2016. p. 855–1032.
3. Gurney JG, Swensen AR, Bultreys M. Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER program 1975-1995. In: Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, et al., eds. *Malignant tumors*. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 1999:99-110.
4. Esiashvili N, Goodman M, Marcus RB Jr: Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. *J Pediatr Hematol Oncol* 30 (6): 425-30, 2008. 30 (6): 425-30. DOI: 10.1097/MPH.0b013e31816e22f3
5. Jawad MU, Cheung MC, Min ES, et al.: Ewing sarcoma demonstrates racial disparities in incidence-related and sex-related differences in outcome: an analysis of 1631 cases from the SEER database, 1973-2005. *Cancer* 2009;115(15):3526-36. DOI:10.1097/MPH.0b013e31816e22f3.
6. Beck R, Monument MJ, Watkins WS, et al.: EWS/FLI-responsive GGAA microsatellites exhibit polymorphic differences between European and African populations. *Cancer Genet*. 2012; 205 (6): 304-12. DOI: 10.16/j.cancergen.2012.04.004
7. Postel-Vinay S, Veron AS, Tirode F, Pierron G, Reynaud S, Kovar H, Oberlin O et al. Common variants near TARDBP and EGR2 are associated with susceptibility to Ewing sarcoma. *Nat Genet* 2012;44:323-327. DOI: 10.1038/ng.1085

8. DuBois SG, Goldsby R, Segal M, Woo J, Copren K, Kane JP, et al. Evaluation of polymorphisms in EWSR1 and risk of Ewing sarcoma: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 59(1):52-6. DOI: 10.1002/pbc.23263
9. Zucman-Rossi J, Batzer MA, Stoneking M, Delattre O, Thomas G. Interethnic polymorphism of EWS intron 6: genome plasticity mediated by Alu retroposition and recombination. *Hum Genet* 1997; 99(3):357-63. PMID: 9050923
10. Lessnick SL, Dacwag CS, Golub TR. The Ewing's sarcoma oncoprotein EWS/FLI induces a p53-dependent growth arrest in primary human fibroblasts. *Cancer Cell* 2002;1:393-401 PMID: 12086853
11. Grünewald TGP, Bernard V, Gilardi-Hebenstreit P, et al. Chimeric EWSR1-FLI1 regulates the Ewing sarcoma susceptibility gene EGR2 via a GGAA microsatellite. *Nature genetics*. 2015;47(9):1073-1078. doi:10.1038/ng.3363.
12. Kim SY, Tsokos M, Helman LJ: Dilemmas associated with congenital ewing sarcoma family tumors. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008; 30 (1):4-7. DOI: 10.1097/MPH.0b013e31815cf71f.
13. Van den Berg H, Dirksen U, Ranft A, et al.: Ewing tumors in infants. *Pediatr Blood Cancer*. 2008; 50 (4): 761-4. DOI:10.1002/pbc.21292
14. Llombart-Bosch A. Pathology of Ewing/s Sarcoma of Bone: Problems on Differentiation Diagnosis of Classical Es versus PNET (Peripheral neuroectodermal Tumor). Supported with grants from PROTHETS CONTRACT 503036 FROM eu and FIS 04/0822 and FIS06/5176, Madrid, Spain. In: *Bone and Soft Tissue Pathology-Oncology Part 1 and 2. Ioannina University Courses in Pathology (IUCP) Series 2. 25th Silver Course, May 27-30, 2008, Ioannina, Greece. ISBN 978-960-98299-0-8*
15. Yukihide Iwamoto. Diagnosis and Treatment of Ewing's Sarcoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2007;37(2)79-89. DOI: 10.1093/jjco/hyl142

16. Applebaum MA, Goldsby R, Neuhaus J, DuBois SG. Clinical features and outcomes in patients with secondary Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60(4):611-615. DOI: 10.1002/pbc.
17. Ewing's J. Further report of endothelial myeloma of bone. *Proc N Y Pathol Soc.* 1924;24:93–100.
18. De Alava E, Lessnick SL, Sorensen PH. Ewing sarcoma. In: Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, et al, eds. *WHO classification of tumours of soft tissue and bone.* 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2013:305-309.
19. Delattre O, Zucman J, Melot T, Garau XS, Lenoir GM, Ambros PF, et al. The Ewing family of tumors—a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med* 1994;331(5):294-299. DOI:10.1056/NEJM199408043310503.
20. Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M et al: Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 1992 Sep;359(6391):162-5. DOI: 10.1038/359162a0.
21. Ben-David Y, Giddens EB, Bernstein A. Identification and mapping of a common proviral integration site Fli-1 in erythroleukemia cells induced by Friend murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(4):1332-6. PMID: 2304901
22. Hattinger CM, Zoubek A, Ambros PF. Molecular cytogenetics in Ewing tumors: diagnostic and prognostic information. *Onkologie.* 2000;23(5):416-22. DOI: 10.1159/0000272213
23. Huang HY, Illei PB, Zhao Z, Huvos AG et al. Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. *J Clin Oncol* 2005; 23(20):548-58. DOI: 10.1200/JCO.2005.02.081
24. Kovar H, Dworzak M, Strehl S, Schnell E, Ambros IM, Ambros PF et al. Overexpression of the pseudoautosomal gene MIC2 in Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. *Oncogene* 1990; 5(7):1067-70. PMID: 1695726

25. Sorensen PH, Lessnick SL, Lopez-Terrada D, Liu XF, Triche TJ, Denny CT. A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. *Nat Genet* 1994; 6(2):146-51. DOI: 10.1038/nq0294-146
26. Sankar S, Lessnick SL. Promiscuous partnerships in Ewing's sarcoma. *Cancer genetics* 2011; 204(7):351-65. DOI: 10.1016/j.cancergen.2011.07.008
27. May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, et al. Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 Jun 15;90(12):5752-6.
28. Prieur A, Tirode F, Cohen P, Delattre O. EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol* 2004; 24(16):7275-83.
29. Smith R, Owen LA, Trem DJ, Wong JS, Whangbo JS, Golub TR et al. Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma. *Cancer Cell* 2006;9(5):405-16. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.04.004 PMID: 166697960
30. Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Delattre O, et al. Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients? *J Clin Oncol* 1996;14(4):1245-1251. DOI:10.1200/JCO.1996.14.4.1245
31. Kinsey M, Smith R, Lessnick SL. NR0B1 is required for the oncogenic phenotype mediated by EWS/FLI in Ewing's sarcoma. *Mol Cancer Res*. 2006;4(11):851-859. DOI:10.1158/1541-7786.MCR-06-0090
32. Im YH, Kim HT, Lee C, et al. EWS-FLI1, EWS-ERG, and EWS-ETV1 oncoproteins of Ewing tumor family all suppress transcription of transforming growth factor beta type II receptor gene. *Cancer Res*. 2000;60(6):1536-40. PMID: 10749119
33. Deneen B, Denny CT. Loss of p16 pathways stabilizes EWS/FLI1 expression and complements EWS/FLI1 mediated transformation. *Oncogene* 2001;20 (46):6731-41. DOI: 10.1038/sj.onc.1204875.

34. Kovar H, Jug G, Printz D, et al. Characterization of distinct consecutive phases in non-genotoxic p53-induced apoptosis of Ewing tumor cells and the rate-limiting role of caspase 8. *Oncogene* 2000; 19(36):4096-4107. DOI: 10.1038/sj.onc.1203780
35. Kovar H, Pospisilova S, Jug G, et al. Response of Ewing tumor cells to forced and activated p53 expression. *Oncogene* 2003; 22(21):3193-204. DOI: 10.1038/sj.onc.1206391.
36. Ban J, Bennani-Baiti IM, Kauer M, Schaefer KL, Poremba C, Jug G, et al. EWS-FLI1 suppresses NOTCH-activated p53 in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 2008;68:7100-7109. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6145
37. Kolb EA, Gorlick R, Houghton PJ, et al. Initial testing (stage 1) of a monoclonal antibody (SCH 717454) against the IGF-1 receptor by the Pediatric Preclinical Testing Program. *Pediatr Blood Cancer* 2008;50(6):1190-7. DOI: 10.1002/pbc.21450
38. Houghton PJ, Morton CL, Gorlick R, Kolb EA, Keir ST, Reynolds CP et al. Initial testing of a monoclonal antibody (IMC-A12) against IGF-1R by the Pediatric Preclinical Testing Program. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 54(7):921-6. DOI:10.1002/pbc.22367
39. Scotlandi K, Benini S, Sarti M, Serra M, Lollini PL, Maurici D, et al. Insulin-like growth factor I receptor-mediated circuit in Ewing's sarcoma/peripheral neuroectodermal tumor: a possible therapeutic target. *Cancer Res* 1996; 56(20):4570-4. PMID: 8840962
40. Kitlinska J, Kuo L, Abe K, Pons J, Yu M, Li L, et al. Role of neuropeptide Y and dipeptidyl peptidase IV in regulation of Ewing's sarcoma growth. *Adv Exp Med Biol*; 2006;575:223-9. DOI:10.1007/0-387-32824-6-24
41. Lu C, Tilan JU, Everhart L, Czarnecka M, Soldin SJ, Mendu DR, et al. Dipeptidyl peptidases as survival factors in Ewing sarcoma family of tumors: implications for tumor biology and therapy. *J Biol Chem* 2011; 286(31):27494-505. DOI: 10.1074/jbc.111.224089.
42. Ricotti E, Fagioli F, Garelli E, et al. c-kit is expressed in soft tissue sarcoma of neuroectodermic origin and its ligand prevents apoptosis of neoplastic cells. *Blood* 1998;91:2397-2405. PMID: 9516139

43. Uren A, Merchant MS, Sun CJ, Vitolo MI, Sun Y, Tsokos M, et al. Beta-platelet-derived growth factor receptor mediates motility and growth of Ewing's sarcoma cells. *Oncogene* 2003;22(5):2334-42. DOI: 10.1038/sj.onc.1206330 PMID: 12700668
44. Mahoney JP, Alexander RW. Ewing's sarcoma. A light- and electron-microscopic study of 21 cases. *Am J Surg Pathol* 1978;2(3):283-98. PMID: 686232
45. Khan J, Wei JS, Ringner M, Seal LH, Ladanyi M, Westerman F, Berthold F, et al. Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med* 2001;7(6):673-9. DOI: 10.1038/89044.
46. Rorie CJ, Thomas VD, Chen P, Pierce HH, O Bryan JP, Weissman OB. The Ews/Fli-1 fusion gene switches the differentiation program of neuroblastomas to Ewing sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 2004;64(6):1266-1277.
47. Truong AH, Ben-David Y. The role of Fli-1 in normal cell function and malignant transformation. *Oncogene* 2000;19(55):6482-9. DOI: 10.38/sj.onc.1204042
48. Vlaeminck-Guillem V, Carrere S, Dewitte F, Stehelin D, Desbinex S, Duterque-Coquillaud M. The Ets family member Erg gene is expressed in mesodermal tissues and neural crests at fundamental steps during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 2000;91(1-2):331-5. PMID: 10704859
49. Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, Delorme B, Charbord P, Delatre O. Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell* 2007;11(5):421-429. DOI: 10.1016/j.ccr.2007.02.027
50. Riggi N, Suva ML, Suva D, Cironi L, Provero P, et al. EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res*. 2008;68(7):2176-85. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1761 .
51. Brasme JF, Chalumeau M, Oberlin O, Valteau-Couanet D, Gaspar N. Time to diagnosis of Ewing tumors in children and adolescents is not associated with metastasis or survival: a prospective multicenter study of 436 patients. *J Clin Oncol* 2014;32:1935-40. DOI: 10.1200/JCO.2013.53.8058

52. Widhe B, Widhe T. Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *J Bone Joint Surg Am* 2000;82(5):667-74. PMID: 10819277
53. Craft AW, Cotterill SJ, Bullimore JA, Pearson D. Long-term results from the first UKCCSG Ewing's Tumour Study (ET-1). United Kingdom Children's Cancer Study Group (UKCCSG) and the Medical Research Council Bone Sarcoma Working Party. *Eur J Cancer* 1997;33(7):1061-69. PMID: 9376188
54. Meyer JS, Nadel HR, Neyesa M, Wormer RB, Brown KL, Eary JF et al. Imaging guidelines for children with Ewing sarcoma and osteosarcoma: a report from the Children's Oncology Group Bone Tumor Committee. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 51(2): 163–170. DOI: 10.1002/pbc.21596
55. Kaste SC. Imaging pediatric bone sarcomas. *Radiol Clin North Am.* 2011 July; 49(4): 749–vii. DOI: 10.1016/j.rcl.2011.05.006
56. Mar WA, Taljanovic MS, Bagatell R, Graham AR, Speer DP, Hunter TB et al. Update on imaging and treatment of Ewing sarcoma family tumors: what the radiologist needs to know. *J Comput Assist Tomogr* 2008; 32: 108-18. DOI: 10.1097/RCT.0b013e31805c030f.
57. Meyer JS, Dormans JP. Differential diagnosis of pediatric muscu loskeletal masses. *Magn Reson Imaging Clin N Am.* 1998; 6(3): 561-77. PMID: 9654585
58. Wootton-Gorges SL. MR imaging of primary bone tumors and tumor-like conditions in children. *Magn Reson Imaging Clin N Am.* 2009; 17(3):469–87, vi. DOI: 10.1016/j.mric.2009.03.010
59. Walter F, Czernin J, Hall T, Allen-Auerbach M, Walter MA, Dunkelman S, et al. Is there a need for dedicated bone imaging in addition to 18F-FDG PET/CT imaging in pediatric sarcoma patients?. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2012 Mar. 34(2):131-6. DOI: 10.1097/MPH.0b013e3182282825

60. Paulussen M, Ahrens S, Burdach S, Craft A, Dockhorn-Dworniczak B, Dunst J et al. Primary metastatic (stage IV) Ewing tumor: survival analysis of 171 patients from the EICESS studies. European Intergroup Cooperative Ewing Sarcoma Studies. *Ann Oncol* 1998;9:275-281. PMID: 9602261
61. Stewart CJ, Coldewey J, Stewart IS. Comparison of fine needle aspiration cytology and needle core biopsy in the diagnosis of radiologically detected abdominal lesions. *J Clin Pathol* 2002;55:93-97. PMID: 1186500.
62. Pramesh CS, Deshpande MS, Pardiwala DN, Agarwal MG. Core needle biopsy for bone tumours. *Eur J Surg Oncol* 2001;27:668-671. DOI:10.1053/ejso.2001.1198
63. Rimondi E, Rossi G, Bartalena T, Ciminari R, Alberghini M, Ruggieri P et al. Percutaneous CT-guided biopsy of the musculoskeletal system: results of 2027 cases. *Eur J Radiol* 2011;77(1):34-42. DOI:10.1016/j.ejrad.2010.06.055
64. Malhas AM, Grimer RJ, Abudu A, Carter SR, Tillman RT, Jeys L. The final diagnosis in patients with a suspected primary malignancy of bone. *J Bone Joint Surg Br.* 2011; 93(3): 980–983. DOI: 10.1302/0301-620X.93B7.25727
65. Applebaum MA, Goldsby R, Neuhaus J, DuBois SC. Clinical features and outcomes in patients with Ewing sarcoma and regional lymph node involvement. *Pediatr Blood Cancer* 2012;59:617-620. DOI: 10.1002/pbc.24053.
66. Wunder JS, Paulian G, Huvos AG, Heller G, Meyers PV, Haelev JH.: The histological response to chemotherapy as a predictor of the oncological outcome of operative treatment of Ewing sarcoma. *J Bone Joint Surg Am.* 1998;80 (7): 1020-33. PMID : 9698007
67. Weidner N, Tjoe J. Immunohistochemical profile of monoclonal antibody O13: antibody that recognizes glycoprotein p30/32MIC2 and is useful in diagnosing Ewing's sarcoma and peripheral neuroepithelioma. *Am J Surg Pathol* 1994;18(5):486-494.
68. Folpe AL, Goldblum JR, Rubin BP, Shehata BM, Liu W. et al. Morphologic and immunophenotypic diversity in Ewing family tumors: a study of 66 genetically confirmed cases. *Am J Surg Pathol* 2005;29(8):1025-1033. DOI: 10.1097/01.pas.0000167056.13614.62

69. Hill DA, O'Sullivan MJ, Zhu X, Vollmer RT, Humphrey PA, Dehner LP et al. Practical application of molecular genetic testing as an aid to the surgical pathologic diagnosis of sarcomas: a prospective study. *Am J Surg Pathol* 2002;26(8):965-977.
70. Ladanyi M, Bridge JA. Contribution of molecular genetic data to the classification of sarcomas. *Hum Pathol* 2000;31(5):532-538. DOI: 10.1053/hp.2000.6706.
71. Cotterill SJ, Ahrens S, Paulussen M, Jurgens HF, Voute PA, Gardner H et al. Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: analysis of 975 patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group. *J Clin Oncol* 2000;18(17):3108-3114. DOI: 10.1200/JCO.2000.18.17.3108.
72. Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, Rimondini S, Longhi A, Bacchini P et al. Prognostic factors in nonmetastatic Ewing's sarcoma of bone treated with adjuvant chemotherapy: analysis of 359 patients at the Istituto Ortopedico Rizzoli. *J Clin Oncol* 2000;18(1):4-11. DOI: 10.1200/JCO.2000.18.1.4.
73. Rodríguez-Galindo C, Liu T, Krasin MJ, Wu J, Billups CA, Daw NC, et al. Analysis of prognostic factors in Ewing sarcoma family of tumors: review of St. Jude Children's Research Hospital studies. *Cancer*. 2007;110:375–84. DOI: 10.1002/cncr.22821
74. Ladenstein R, Pötschger U, Le Deley M, Whelan J, Paulussen M, Oberlin O, et al. A prognostic score at diagnosis for Ewing tumor patients with metastatic disease at extrapulmonary sites. *J Clin Oncol*. 2009;27, Suppl. 15: 10544. DOI: 10.1200/jco.2009.27.15_suppl. 10544.
75. Oberlin O, Deley MC, Bui BN, Gentet JC, Philip T, Terrier P, et al. Prognostic factors in localized Ewing's tumours and peripheral neuroectodermal tumours: the third study of the French Society of Paediatric Oncology (EW88 study) *Br J Cancer*. 2001;85(11):1646–54. DOI: 10.1054/bjoc.2001.2150.

76. Paulussen M, Ahrens S, Craft AW, Dunst J, Fröhlich B, Jabar S, et al. Ewing's tumors with primary lung metastases: survival analysis of 114 (European Intergroup) Cooperative Ewing's Sarcoma Studies patients. *J Clin Oncol*. 1998;16(9):3044–52. DOI: 10.1200/JCO.1998.16.9.3044. PMID: 9738574
77. Ladenstein R, Pötschger U, Le Deley MC, Whelan J, Paulussen M, Oberlin O et al. Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial. *J Clin Oncol* 2010;28 (20): 3284-91. DOI: 10.1200/JCO.2009.22.9864. PMID: 20547982
78. Wunder JS, Paulian G, Huvos AG, Heller G, Meyers PA, Healey JH. The histological response to chemotherapy as a predictor of the oncological outcome of operative treatment of Ewing sarcoma. *J Bone Joint Surg Am* 1998;80 (7): 1020-33 PMID: 9698007
79. Ferrari S, Bertoni F, Palmerini E, Errani C, Bacchini P, Pignotti E, et al. Predictive factors of histologic response to primary chemotherapy in patients with Ewing sarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2007;29 (6): 364-8 DOI: 10.1097/MPH.0b013e3180640d08
80. Lin PP, Jaffe N, Herzog CE, Costelloe CM, Deavers MT, Kelly JS et al.: Chemotherapy response is an important predictor of local recurrence in Ewing sarcoma. *Cancer* . 2007;109 (3): 603-11 DOI: 10.1002/cncr.22412.PMID: 17177205
81. Picci P, Rougraff BT, Bacci G, Neff JR, Sangiorgi L, Cazzola A, et al. Prognostic significance of histopathologic response to chemotherapy in nonmetastatic Ewing's sarcoma of the extremities. *J Clin Oncol* 1993;11(9):1763-9. DOI:10.1200/JCO.1993.11.9.1763.
82. da Costa CM, Lopes A, de Camargo B. A simple cost-effective lactate dehydrogenase level measurement can stratify patients with Ewing's tumor into low and high risk. *Ann Oncol*. 2003;14(4):656. DOI: 10.1093/annonc/mdg151.
83. Li S, Yang Q, Wang H, et al. Prognostic significance of serum lactate dehydrogenase levels in Ewing's sarcoma: A meta-analysis. *Molecular and Clinical Oncology*. 2016;5(6):832-838. doi:10.3892/mco.2016.1066.
84. Jakowlew SB. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2006; 25(3):435-57.

85. Wilhelm CJ, Hashimoto JG, Roberts ML, Zhang X, Goeke CM, Bloom SH, Guizzetti M. Plasminogen activator system homeostasis and its dysregulation by ethanol in astrocyte cultures and the developing brain. *Neuropharmacology*. 2018; 138:193-209
86. Matsuda Y, Miura K, Yamane J, Shima H, Fujibuchi W, Ishida K, Fujishima F, Ohnuma S, Sasaki H, Nagao M, Tanaka N, Satoh K, Naitoh T, Unno M. SERPIN11 regulates epithelial-mesenchymal transition in an orthotopic implantation model of colorectal cancer. *Cancer Sci*. 2016; 107(5):619-28.
87. Busse A, Asemissen AM, Nonnenmacher A, Ochsenreither S, Fusi A, Braun F, et al. Systemic Immune Tuning in Renal Cell Carcinoma: Favorable Prognostic Impact of TGF- β 1 mRNA Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J Immunother* 2011; 34(1):113-119
88. Valiente M, Obenauf AC, Jin X, Chen Q, Xiang H, Zhang F, et al. Serpins Promote Cancer Cell Survival and Vascular Cooption in Brain Metastasis. *Cell*. 2014;156(5):1002-1016. doi:10.1016/j.cell.2014.01.040.
89. Pinto A, Dickman P, and Parham D. Pathobiologic markers of the Ewing sarcoma family of tumors: state of the art and prediction of behaviour. *Sarcoma* 2011, 856190. doi:10.1155/2011/856190doi: 10.1155/2011/856190.
90. Shukla N, Schiffman J, Reed D, Davis IJ, Wormer RB, Lessnick SL et al. Biomarkers in Ewing sarcoma: the promise and challenge of personalized medicine. A report from the Children's Oncology Group Review. *Front. Oncol*.2013; June;3:141 DOI:10.3389/fonc.2013.00141 PMID: 23761859. PMCID:PMC3674398
91. Lerman DM, Monument MJ, McIlvaine E, Liu XQ, Huang D, Monovich L. et al.: Tumoral TP53 and/or CDKN2A alterations are not reliable prognostic biomarkers in patients with localized Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(5):759-65 DOI: 10.1002/pbc25340.
92. Bramer JA, Abudu AA, Grimer RJ, et al.: Do pathological fractures influence survival and local recurrence rate in bony sarcomas? *Eur J Cancer*. 2007;3(13):1944-51

93. Parham DM, Hijazi Y, Steinberg SM, et al.: Neuroectodermal differentiation in Ewing's sarcoma family of tumors does not predict tumor behavior. *Hum Pathol.* 1999;30(8): 911-8 PMID: 10452503
94. Luksch R, Sampietro G, Collini P, Boracchi P, Massiminio M, Lombardi F et al.: Prognostic value of clinicopathologic characteristics including neuroectodermal differentiation in osseous Ewing's sarcoma family of tumors in children. *Tumori.* 1999;85(2):101-7. PMID: 10363075
95. De Alava E, Kawai A, Healey JH, Fligman I, Meyers PA, Huvos AG et al.: EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol.* 1998, 16 (4): 1248-55. PMID: 9552022
96. van Doorninck JA, Ji L, Schaub B, Shimada JA, Wing MR, Krailo MD et al.: Current treatment protocols have eliminated the prognostic advantage of type 1 fusions in Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol .* 2010;28 (12): 1989-94, doi: 10.1200/JCO.2009.24.5845 PMID 20308669
97. Le Deley MC, Delattre O, Schaefer KL, Burchill SA, Koehler G, Hogendoorn PC, et al.: Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. *J Clin Oncol.*2010; 28 (12): 1982-8. DOI: 10.1200/JCO.2009.23.3585
98. Dobbs NA, Twelves CJ, Gillies H, James CA, Harper PG, Rubens RD. Gender affects doxorubicin pharmacokinetics in patients with normal liver biochemistry. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1995;36: 473-476 DOI:10.1007/BF00685796
99. Lin PP, Jaffe N, Herzog CE, Costelloe CM, Deavers MT, Kelly JS et al.: Chemotherapy response is an important predictor of local recurrence in Ewing sarcoma. *Cancer .*2007; 109 (3): 603-11 DOI: 10.1002/cncr.22412.
100. Karski EE, McIlvaine E, Segal MR, Krailo M, Grier HE, Granowetter L, et al.: Identification of Discrete Prognostic Groups in Ewing Sarcoma. *Pediatr Blood Cancer,* 2016; 63 (1): 47-53 DOI: 10.1002/pbc.25709.

101. Jurgens H, Exner U, Gadner H, Harms D, Michaelis J, Sauer R, et al. Multidisciplinary treatment of primary Ewing's sarcoma of bone. A 6-year experience of a European Cooperative Trial. *Cancer* 1988;61:23-32. PMID: 3334950
102. Nesbit ME, Jr, Gehan EA, Burgert EO, Jr, Vietti TJ, Cangir A, Tefft M et al. Multimodal therapy for the management of primary, nonmetastatic Ewing's sarcoma of bone: a long-term follow-up of the First Intergroup study. *J Clin Oncol* 1990;8(10):1664-74. PMID: 2203103
103. Rodriguez-Galindo C, Spunt SL, Pappo AS. Review treatment of ewing sarcoma family of tumors: current status and outlook for the future. *Medical Pediatric Oncology*. 2003;40:276–287 DOI: 10.1002/mpo.10240
104. Craft A, Cotterill S, Malcolm A, Spooner D, Grimer R, Souhami R, et al. Ifosfamide-containing chemotherapy in Ewing's sarcoma: The Second United Kingdom Children's Cancer Study Group and the Medical Research Council Ewing's Tumor Study. *J Clin Oncol*. 1998;16(11):3628-33. PMID: 9817284
105. Paulussen M, Ahrens S, Dunst J, Winkelmann W, Exner GU, Kotz R, et al. Localized Ewing tumor of bone: final results of the cooperative Ewing's Sarcoma Study CESS 86. *J Clin Oncol* 2001;19(6):1818-29. doi: 10.1200/JCO.2001.19.6.1818 PMID: 11251014
106. Grier HE, Krailo MD, Tarbell NJ, Link MP, Fryer CJ, Pritchard DJ et al. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. *N Engl J Med* 2003;348(8):694-701. PMID: 12594313
107. Bacci G, Forni C, Longhi A, Ferrari S, Donati D, De Paolis M 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. PMID: 14687792
108. 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):4385-93. doi: 10.1200/JCO.2008.16.5720.

109. Granowetter L, Womer R, Devidas M, Krailo M, Wang C, Bernstein M et al. Dose-intensified compared with standard chemotherapy for nonmetastatic Ewing sarcoma family of tumors: a Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2009;27(15):2536-41. doi: 10.1200/JCO.2008.19.1478. PMID: 19349548

110. Womer RB, West DC, Krailo MD, Dickman PS, Pawel BR, Grier HE, et al. Randomized controlled trial of interval-compressed chemotherapy for the treatment of localized Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2012;30(33):4148-54. doi: 10.1200/JCO.2011.41.5703

111. Jaffe N, Paed D, Traggis D, Salian S, Cassady JR et al. Improved outlook for Ewing's sarcoma with combination chemotherapy (vincristine, actinomycin D and cyclophosphamide) and radiation therapy. *Cancer* 1976;38(6):1925-30. PMID: 991106

112. Rosen G, Wollner N, Tan C, et al. Proceedings: disease-free survival in children with Ewing's sarcoma treated with radiation therapy and adjuvant four-drug sequential chemotherapy. *Cancer* 1974;33:384-93.

113. Rosito P, Mancini AF, Rondelli R, Abate ME, Pession A, Bedei L, et al.: Italian Cooperative Study for the treatment of children and young adults with localized Ewing sarcoma of bone: a preliminary report of 6 years of experience. *Cancer*. 1999; 86(3):421-8. PMID: 10430250

114. Smith MA, Ungerleider RS, Horowitz ME, Simon R. Influence of doxorubicin dose intensity on response and outcome for patients with osteogenic sarcoma and Ewing's sarcoma. *J Natl Cancer Inst* 1991;83(20):1460-70. PMID: 1833556

115. Burgert EO, Jr, Nesbit ME, Garnsey LA, Gehan EA, Herrmann J, Vietti TJ, et al. Multimodal therapy for the management of nonpelvic, localized Ewing's sarcoma of bone: intergroup study IESS-II. *J Clin Oncol* 1990;8(9):1514-24. doi: 10.1200/JCO.1990.8.9.1514

116. Bacci G, Mercuri M, Longhi A, Bertoni F, Barbieri E, Donati D et al. Neoadjuvant chemotherapy for Ewing's tumour of bone: recent experience at the Rizzoli Orthopaedic Institute. *Eur J Cancer* 2002;38(17):2243-51.
117. Kolb EA, Kushner BH, Gorlick R, Laverdiere C, Healey JH, LaQuaglia MP, et al. Long-term event-free survival after intensive chemotherapy for Ewing's family of tumors in children and young adults. *J Clin Oncol* 2003;21(8):3423-30. doi: 10.1200/JCO.2003.10.033 PMID: 12972518
118. Oberlin O, Habrand JL, Zucker JM, Brunat-Mentigny M, Terrier-Lacombe MJ, Dubousset J, et al. No benefit of ifosfamide in Ewing's sarcoma: a nonrandomized study of the French Society of Pediatric Oncology. *J Clin Oncol* 1992;10(9):1407-12. doi: 10.1200/JCO.1992.10.9.1407 PMID: 1517783
119. Le Deley MC, Paulussen M, Lewis I, Brennan B, Ranft A, Whelan J, et al. Cyclophosphamide compared with ifosfamide in consolidation treatment of standard-risk Ewing sarcoma: results of the randomized noninferiority Euro-EWING99-R1 Trial. *J Clin Oncol* 2014;32(23):2440-8. doi: 10.1200/JCO.2013.54.4833
120. Juergens C, Weston C, Lewis I, Whelan J, Paulussen M, Oberlin O, et al. Safety assessment of intensive induction with vincristine, ifosfamide, doxorubicin, and etoposide (VIDE) in the treatment of Ewing tumors in the EURO-E.W.I.N.G. 99 clinical trial. *Pediatr Blood Cancer* 2006;47(1):22-29. DOI: 10.1002/pbc.20820. PMID: 16572419
121. Bacci G, Longhi A, Ferrari S, Mercuri M, Versari M, Bertoni F. Prognostic factors in non-metastatic Ewing's sarcoma tumor of bone: an analysis of 579 patients treated at a single institution with adjuvant or neoadjuvant chemotherapy between 1972 and 1998. *Acta Oncol.* 2006;45:469-75. PMID 16760184
122. Brunetto AL, Castillo LA, Petrilli AS et al. Carboplatin in the treatment of Ewing sarcoma: Results of the first Brazilian collaborative study group for Ewing sarcoma family tumors-EWING1. *Pediatr Blood Cancer.* 2015; 62(5):1747-53 doi: 10.1002/pbc.25562.

123. Schuck A, Ahrens S, Paulussen M, Kuhlen M, Könemann S, Rube C et al. Local therapy in localized Ewing tumors: results of 1058 patients treated in the CESS 81, CESS 86, and EICESS 92 trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003;55(1):168-177. PMID: 12504050
124. Paulino AC, Nguyen TX, Mai WY. An analysis of primary site control and late effects according to local control modality in non-metastatic Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48(4):423-9. DOI: 10.1002/pbc.20754 PMID: 16421909
125. Foulon S, Brennan B, Gaspar N, Dirksen U, Jeys L, Cassoni A, et al. Can postoperative radiotherapy be omitted in localised standard-risk Ewing sarcoma? An observational study of the euro-E.W.I.N.G group. *Eur J Cancer*. 2016;61:128–136. DOI: 10.1016/j.ejca.2016.03.075
126. Carrie C, Mascard E, Gomez F, Habrand JL, Alapetite C, Oberlin O et al. Nonmetastatic pelvic Ewing sarcoma: report of the French society of pediatric oncology. *Med Pediatr Oncol* 1999;33(9):444-9. PMID:10531567
127. Dunst J, Sauer R, Burgers JM, Hawliczek R, Kürten R, Winkelmann W et al. Radiation therapy as local treatment in Ewing's sarcoma. Results of the Cooperative Ewing's Sarcoma Studies CESS 81 and CESS 86. *Cancer* 1991;67(11):2818-2825. PMID: 2025847
128. Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall RL, Schuck A, Teot LA, et al. Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist* 2006;11(5):503-519. DOI: 10.1634/theoncologist.11-5-503
129. Donati D, Yin J, Di Bella C, Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, et al. Local and distant control in non-metastatic pelvic Ewing's sarcoma patients. *J Surg Oncol* 2007;96(1):19-25. PMID: 17345611
130. Indelicato DJ, Keole SR, Shahlaee AH, Shi W, Morris CG, Gibbs CP Jr, et al. Long-term clinical and functional outcomes after treatment for localized Ewing's tumor of the lower extremity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;70(2):501-509. PMID: 17855013

131. Beckingsale T, Murray SA, Dildey P, et al. Surgery for Ewings sarcoma of bone: should we excise the pre or post chemotherapy tumour volume, Connective Tissue Oncology Society Annual Meeting. Prague, Czech Republic, 2012.
132. Aksnes LH, Bauer HC, Jebsen NL, Follerås G, Allert C, Haugen GS, et al. Limb-sparing surgery preserves more function than amputation: a Scandinavian sarcoma group study of 118 patients. *J Bone Joint Surg Br* 2008;90(6):786-794. doi: 10.1302/0301-620X.90B6.19805. PMID: 18539673
133. Barrera M, Teall T, Barr R, Silva M, Greenberg M. Health related quality of life in adolescent and young adult survivors of lower extremity bone tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2012;58(2):265-273. doi: 10.1002/pbc.23017.
134. Schragger J, Patzer RE, Mink PJ, Ward KC, Goodman M.. Survival outcomes of pediatric osteosarcoma and Ewing's sarcoma: a comparison of surgery type within the SEER database, 1988-2007. *J Registry Manag* 2011;38(3):153-161. PMID: 22223058
135. Jeys LM, Kulkarni A, Grimer RJ, Carter SR, Tillman RM, Abudu A. Endoprosthetic reconstruction for the treatment of musculoskeletal tumors of the appendicular skeleton and pelvis. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90:1265-1271. doi: 10.2106/JBJS.F.01324. PMID 18519320
136. van Kampen M, Grimer RJ, Carter SR, Tillman RM, Abudu A. Replacement of the hip in children with a tumor in the proximal part of the femur. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90(4):785-795. DOI: 10.2106/JBJS.F.01182. PMID: 18381317
137. Ceruso M, Taddei F, Bigazzi P, Manfrini M.. Vascularised fibula graft inlaid in a massive bone allograft: considerations on the bio-mechanical behaviour of the combined graft in segmental bone reconstructions after sarcoma resection. *Injury* 2008;39 (Suppl 3): S68-S74. DOI: 10.1016/j.injury.2008.05.014

138. Hariri A, Mascard E, Atlan F, Germain MA, Heming N, Dubousset JF, et al. Free vascularised fibular graft for reconstruction of defects of the lower limb after resection of tumour. *J Bone Joint Surg Br* 2010;92(11):1574-1579. doi: 10.1302/0301-620X.92B11.23832. PMID: 21037355
139. Muscolo DL, Ayerza MA, Aponte-Tinao L, Farfalli G. Allograft reconstruction after sarcoma resection in children younger than 10 years old. *Clin Orthop Relat Res* 2008;466(8):1856-1862. DOI: 10.1007/s11999-008-0303-7 PMID: 18506559
140. Ramseier LE, Malinin TI, Temple HT, Mnaymneh WA, Exner GU,. Allograft reconstruction for bone sarcoma of the tibia in the growing child. *J Bone Joint Surg Br* 2006;88(1):95-99. PMID: 16365158
141. Deijkers RL, Bloem RM, Kroon HM, Van Lent JB, Brand R, Taminiau AH. Epidiaphyseal versus other intercalary allografts for tumors of the lower limb. *Clin Orthop Relat Res* 2005;439:151-160. PMID: 16205154
142. Abed YY, Beltrami G, Campanacci DA, Innocenti M, Scoccianti G, Capanna R. Biological reconstruction after resection of bone tumours around the knee: long-term follow-up. *J Bone Joint Surg Br* 2009;92(10):1366-72. doi: 10.1302/0301-620X.91B10.22212
143. Aponte-Tinao L, Farfalli GL, Ritacco LE, Ayerza MA, Muscolo DL et al. Intercalary femur allografts are an acceptable alternative after tumor resection. *Clin Orthop Relat Res* 2012;470(3):728-34. DOI: 10.1007/s11999-011-1952-5 PMID: 21691906
144. Campanacci DA, Scoccianti G, Beltrami G, Mugnaini M, Capanna R. Ankle arthrodesis with bone graft after distal tibia resection for bone tumors. *Foot Ankle Int* 2008;29(10):1031-37. DOI: 10.3113/FAI.2008.1031.
145. Niimi R, Matsumine A, Kusuzaki K, Kuratsu S, Araki N, Aoki Y, et al. Usefulness of limb salvage surgery for bone and soft tissue sarcomas of the distal lower leg. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134(10):1087-95. DOI: 10.1007/s00432-008-0386-2 PMID: 18386057

146. Probyn LJ, Wunder JS, Bell RS, Griffin AM, Davis AM. A comparison of outcome of osteoarticular allograft reconstruction and shoulder arthrodesis following resection of primary tumours of the proximal humerus. *Sarcoma* 1998;2(3-4):163-170. doi: 10.1080/13577149877920.
147. Campanacci D, Chacon S, Mondanelli N, et al. Pelvic massive allograft reconstruction after bone tumour resection. *Int Orthop* 2012;6(12):2529-36. doi: 10.1007/s00264-012-1677-4. PMID: 23090357
148. Schwartz AJ, Kiatisevi P, Eilber FC, Eilber FR, Eckardt JJ. The Friedman-Eilber resection arthroplasty of the pelvis. *Clin Orthop Relat Res.* 2009;467(11):2825-30. DOI: 10.1007/s11999-009-0844-4 PMID: 19384561
149. Puri A, Gulia A, Jambhekar NA, Laskar S. Results of surgical resection in pelvic Ewing's sarcoma. *J Surg Oncol* 2012;106(4):417-422. doi: 10.1002/jso.23107 PMID: 22457213
150. DuBois SG, Krailo M., Gebhardt M., Donaldson S., Marcus K J, Dormans J.Tarbell N. Local and distant failure according to mode of local control in patients with localized Ewing sarcoma of bone: a report from the Children's Oncology Group. Presented in Connective Tissue Oncology Society Annual Meeting 2012.
151. Yock TI, Krailo M, Fryer CJ, Donaldson SS, Miser JS, Chen Z, et al. Local control in pelvic Ewing sarcoma: analysis from INT-0091—a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2006;24(24):3838-3843. DOI: 10.1200.JCO2006.05.9188. PMID: 16921035
152. Bacci G, Palmerini E, Staals EL, Longhi A, Barbieri E, Alberghini M et al. Ewing's sarcoma family tumors of the humerus: outcome of patients treated with radiotherapy, surgery or surgery and adjuvant radiotherapy. *Radiother Oncol* 2009;93(2):383-387. DOI: 10.1016/j.radonc.2009.06.009. PMID: 19576648

153. Yoshida Y, Osaka S, Tokuhashi Y. Analysis of limb function after various reconstruction methods according to tumor location following resection of pediatric malignant bone tumors. *World J Surg Oncol* 2010;8:39. DOI: 10.1186/1477-7819-8-39. PMID: 20482815
154. Baumgart R, Hinterwimmer S, Krammer M, Muensterer O, Mutschler W. The bioexpandable prosthesis: a new perspective after resection of malignant bone tumors in children. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2005;27(8):452-455. PMID 16096531
155. Gupta A, Meswania J, Pollock R, Cannon SR, Briggs TW, Taylor S, Blunn G . Non-invasive distal femoral expandable endoprosthesis for limb-salvage surgery in paediatric tumours. *J Bone Joint Surg Br* 2006;88(5):649-654. DOI: 10.1302/0301-620X.88B5.17098. PMID: 16645114
156. Neel MD, Wilkins RM, Rao BN, Kelly CM. Early multicenter experience with a noninvasive expandable prosthesis. *Clin Orthop Relat Res* 2003(415):72-81.
157. Hillmann A, Hoffmann C, Gosheger G, Krakau H, Winkelmann W. Malignant tumor of the distal part of the femur or the proximal part of the tibia: endoprosthetic replacement or rotationplasty. Functional outcome and quality-of-life measurements. *J Bone Joint Surg Am* 1999;81(4):462-468. PMID: 10225791
158. H. Juergens, A. Ranft, M. Paulussen, U. Kontny, D. Dilloo, U. Dirksen. Treosulfan-based high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation in high-risk Ewing sarcoma. *Journal of Clinical Oncology* 2009 27:15S, 10546-10546 DOI: 10.1200/jco.2009.27.15s.
159. Donaldson SS. Ewing sarcoma: radiation dose and target volume. *Pediatr Blood Cancer*. 2004 May;42(5):471-6. DOI: 10.1002/pbc.10472

160. Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop Relat Res* 1980;106-120. PMID: 7449206
161. Salzer-Kuntschik M, Delling G, Beron G, Sigmund R. Morphological grades of regression in osteosarcoma after polychemotherapy - study COSS 80. *J Cancer Res Clin Oncol* 1983;106 (Suppl):21-4. PMID: 6577010
162. Donaldson SS, Torrey M, Link MP, Glicksman A, Gilula L, Laurie F, et al. A multidisciplinary study investigating radiotherapy in Ewing's sarcoma: end results of POG #8346. Pediatric Oncology Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1998;42(1):125-35. PMID: 9747829
163. Bolling T, Schuck A, Paulussen M, Dirksen U, Ranft A, Könemann S, et al. Whole lung irradiation in patients with exclusively pulmonary metastases of Ewing tumors. Toxicity analysis and treatment results of the EICESS-92 trial. *Strahlenther Onkol* 2008;184:193-197. PMID:25035210
164. Haeusler J, Ranft A, Boelling T, Gosheger G, Braun-Munzinger G, Vieth V, et al. The value of local treatment in patients with primary, disseminated, multifocal Ewing sarcoma (PDMES). *Cancer.* 2010;116(2):443-450. doi: 10.1002/cncr.24740 PMID: 19924786
165. Ehrhart NP, Eurell JA, Constable PD, Gaddy D Nicholas RW, et al. The effect of host tissue irradiation on large-segment allograft incorporation. *Clin Orthop Relat Res* 2005 Jun (435):43-51. PMID: 15930920
166. Ladenstein R, Lasset C, Pinkerton R, Zucker JM, Peters C, Burdach S, et al. Impact of megatherapy in children with high-risk Ewing's tumours in complete remission: a report from the EBMT Solid Tumour Registry. *Bone Marrow Transplant* 1995;15(5):697-705. PMID: 7670398
167. Burdach S, Jurgens H, Peters C, Nurnberger W, Mauz Korholz C, Korholz D, et al. Myeloablative radiochemotherapy and hematopoietic stem-cell rescue in poor-prognosis Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol.* 1993;11(8):1482-8. PMID: 8101562

168. Kinsella TJ, Glaubiger D, Diesseroth A, Makuch R, Waller B, Pizzo P, et al. Intensive combined modality therapy including low-dose TBI in high-risk Ewing's sarcoma patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1983;9(12):1955-1960. PMID: 9463099
169. Kushner BH, Meyers PA. How effective is dose-intensive/myeloablative therapy against Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor metastatic to bone or bone marrow? The Memorial Sloan-Kettering experience and a literature review. *J Clin Oncol* 2001;19(3):870-880. DOI: 10.1200/JCO200119.3.810 PMID: 11157041
170. Meyers PA, Krailo MD, Ladanyi M, Chan KV, Sailer SL, Dickman PS, et al. High-dose melphalan, etoposide, total-body irradiation, and autologous stem-cell reconstitution as consolidation therapy for high-risk Ewing's sarcoma does not improve prognosis. *J Clin Oncol* 2001;19(11):2812-20. PMID: 11387352
171. Ferrari S, Sundby Hall K, Luksch R, Tienghi A, Wiebe T, Fagioli F, et al. Nonmetastatic Ewing family tumors: high-dose chemotherapy with stem cell rescue in poor responder patients. Results of the Italian Sarcoma Group/Scandinavian Sarcoma Group III protocol. *Ann Oncol*. 2011;22(5):1221-1227. doi: 10.1093/annonc/mdq573. PMID: 21059639
172. Gaspar N, Rey A, Berard PM, Michon J, Gentet JC, Tabone MD, et al. Risk adapted chemotherapy for localised Ewing's sarcoma of bone: the French EW93 study. *Eur J Cancer* 2012;48(9):1376-1385. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.03.017 PMID: 22516209
173. Cangir A, Vietti TJ, Gehan EA, Burgert EO Jr, Thomas P, Tefft M, et al. Ewing sarcoma metastatic at diagnosis. Results and comparisons of two intergroup Ewing' sarcoma Studies. *Cancer* 1990; 66:887-93. PMID: 2201433
174. Luksch R, Tienghi A, Hall KS, Fagoli F, Picci P, Barberi E, et al. Primary metastatic Ewing's family tumors: results of the Italian Sarcoma Group and Scandinavian Sarcoma Group ISG/SSG IV Study including myeloablative chemotherapy and total-lung irradiation. *Ann Oncol* 2012;23(11):2970-2976. DOI: 10.1093/annonc/mds117 PMID: 22771824

175. Miser JS, Goldsby RE, Chen Z, Krailo MD, Terbell NJ, Link MP, et al. Treatment of metastatic Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor of bone: evaluation of increasing the dose intensity of chemotherapy—a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;49(9):894-900. DOI: 10.1200/pbc.21233 PMID: 17584910
176. Miser JS, Krailo MD, Tarbell NJ, Link MP, Fryer CJ, Pritchard D, et al. Treatment of metastatic Ewing's sarcoma or primitive neuroectodermal tumor of bone: evaluation of combination ifosfamide and etoposide—a Children's Cancer Group and Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 2004;22(14):2873-2876. PMID: 15254055
177. Bernstein ML, Devidas M, Lafreniere D, et al. Intensive therapy with growth factor support for patients with Ewing tumor metastatic at diagnosis: Pediatric Oncology Group/Children's Cancer Group Phase II Study 9457—a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2006;24(1):152-159. DOI: 10.1200.JCO2005.02.1717 PMID: 16382125
178. Oberlin O, Rey A, Desfachelles AS, Philip T, Plantaz D, Schmitt C, et al. Impact of high-dose busulfan plus melphalan as consolidation in metastatic Ewing tumors: a study by the Societe Francaise des Cancers de l'Enfant. *J Clin Oncol*. 2006;24(24):3997-4002. PMID: 16921053
179. Verrill MW, Judson IR, Harmer CL, Fisher L, Thomas JM, Witshaw E. Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor in adults: are they different from Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor in children? *J Clin Oncol*. 1997;15(7):2611-2621. DOI: 10.1200JCO1997.15.7.2611 PMID: 9215832
180. Fizazi K, Dohollou N, Blay JY, Guerin S, Le Cesne A, Andre F, et al. Ewing's family of tumors in adults: multivariate analysis of survival and long-term results of multimodality therapy in 182 patients. *J Clin Oncol* 1998;16(12):3736-43. DOI: 1159/1200JCO.1998.16.12.3736. PMID: 9850016

181. Verrill MW, Judson IR, Wiltshaw E, Thomas JM, Harmer CL Fisher L. The use of paediatric chemotherapy protocols at full dose is both a rational and feasible treatment strategy in adults with Ewing's family tumours. *Ann Oncol*. 1997;8(11):1099-105. PMID: 9426329
182. Veal GJ, Hartford CM, Stewart CF. Clinical pharmacology in the adolescent oncology patient. *J Clin Oncol* 2010;28:4790-4799. DOI: 10.1200/JCO.2005.28.3473 PMID 20439647 , PMCID: PMC3018345
183. Stahl M, Ranft A, Paulussen M, Bolling M, Vieth V, Bielack S et al. Risk of recurrence and survival after relapse in patients with Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2011;57(4):549-53. PMID: 21442722
184. Barker LM, Pendergrass TW, Sanders JE, Hawkins DS, et al. Survival after recurrence of Ewing's sarcoma family of tumors. *J Clin Oncol* 2005;23:4354-4362. DOI: 10.1200/JCO.2005.05.105 , PMDI: 15781881
185. Leavey PJ, Mascarenhas L, Marina N, Chen Z, Krailo M, Miser J, et al. Prognostic factors for patients with Ewing sarcoma (EWS) at first recurrence following multi-modality therapy: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 2008;51(3):334-8. DOI: 10.1002/pbc.21618 PMID: 18506764, PMCID: PMC2728357
186. Shankar AG, Ashley S, Craft AW, Pinkerton CR. Outcome after relapse in an unselected cohort of children and adolescents with Ewing sarcoma. *Med Pediatr Oncol* 2003;40: 141-147. DOI: 10.1002/mpo.10248 PMID: 12518341
187. Rodriguez-Galindo C, Billups CA, Kun LE, Rao BN, Pratt CB, Merchant TE, et al. Survival after recurrence of Ewing tumors: the St Jude Children's Research Hospital experience, 1979-1999. *Cancer*. 2002;94(15):561-9. DOI: 10.1002/cncr.10192 PMID: 11900241

188. Miser JS, Kinsella TJ, Triche TJ, Tsokos M, Jarosinski P, Forquer R, et al. Ifosfamide with mesna uroprotection and etoposide: an effective regimen in the treatment of recurrent sarcomas and other tumors of children and young adults. *J Clin Oncol*. 1987;5(8):1191-8. DOI: 10.1200/JCO.1987.5.8.1191 PMID: 3114435
189. Ferrari S, del Prever AB, Palmerini E, Staals E, Berta M, Picci P, et al. Response to high-dose ifosfamide in patients with advanced/recurrent Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2009;52:581-4. DOI: 10.1002/pbc.21917 PMID: 19142994
190. Hawkins DS, Bradfield S, Whitlock JA, Krailo M, Franklin J, Blaney SM, et al. Topotecan by 21-day continuous infusion in children with relapsed or refractory solid tumors: a Children's Oncology Group study. *Pediatr Blood Cancer* 2006;47(6):790-794. DOI: <https://doi.org/10.1002/pbc.20739> , PMID: 16435380
191. Nitschke R, Parkhurst J, Sullivan J, Harris MB, Berstein M, Pratt C. Topotecan in pediatric patients with recurrent and progressive solid tumors: a Pediatric Oncology Group phase II study. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998;20(4):315-8. PMID: 9703003
192. Hunold A, Weddeling N, Paulussen M, Ranft A, Liebschar, Jurgens H. Topotecan and cyclophosphamide in patients with refractory or relapsed Ewing tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2006;47(6): 795-800. DOI: 10.1002/pbc.20719 PMID: 16411206
193. Saylor RL 3rd, Stine KC, Sullivan J, Kepner JL, Wall DA, et al. Cyclophosphamide plus topotecan in children with recurrent or refractory solid tumors: a Pediatric Oncology Group phase II study. *J Clin Oncol* 2001;19:3463-3469. DOI: 10.1200/JCO.2001.19.15.3463. PMID: 11481351
194. Wagner LM, McAllister N, Goldsby RE, Rausen AR, McNall-Knapp RY, Bernstein ML, et al. Temozolomide and intravenous irinotecan for treatment of advanced Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;48(2):132-9. DOI: 10.1002/pbc.20697 PMID: 16317751

195. Casey DA, Wexler LH, Merchant MS, Chou AJ, Merola PR, Price AP et al. Irinotecan and temozolomide for Ewing sarcoma: the Memorial Sloan-Kettering experience. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;53:1029-34. DOI: 10.1002/pbc.22206 . PMID: 19637327
196. Kalambakas SA, Moore TB, Feig SA. Megatherapy and stem cell transplantation for Ewing's family of tumors: a critical review of current literature. *Pediatr Transplant*. 2004;8 (Suppl 5):83-88. DOI: 10.1111/j.1398-2265.2004.00185.x PMID: 15125709
197. Burdach S, Meyer-Bahlburg A, Laws HJ, Haase R, van Kaik B, Metzner B, et al. High-dose therapy for patients with primary multifocal and early relapsed Ewing's tumors: results of two consecutive regimens assessing the role of total-body irradiation. *J Clin Oncol*. 2003;21(16):3072-8. DOI: 10.1200/JCO.2003.12.039 PMID: 12915596
198. McTiernan AM, Cassoni AM, Driver D, Michelagnoli MP, Kilby AM, Whelan JS. Improving outcomes after relapse in Ewing's sarcoma: analysis of 114 patients from a single institution. *Sarcoma*;2006; Nov6:83548. DOI: 10.1155/SRCM/2006/83548. PMID: 17496997 PMCID: PMC1698143
199. Ginsberg JP, Goodman P, Leisenring W, Ness KK, Meyers PA, Wolden SL, et al. Long-term survivors of childhood Ewing sarcoma: report from the childhood cancer survivor study. *J Natl Cancer Inst* 2010;102(16):1272-1283. DOI: 10.1093/jnci/djq278 PMID: 20656964
200. Nagarajan R, Clohisy DR, Neglia JP, Yasui Y, Mitbu PA, Sklar C, et al. Function and quality-of-life of survivors of pelvic and lower extremity osteosarcoma and Ewing's sarcoma: the Childhood Cancer Survivor Study. *Br J Cancer* 2004;91(11):1858-65. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602220 PMID: 15534610. PMCID: PMC 2410143
201. Barr RD, Wunder JS. Bone and soft tissue sarcomas are often curable—but at what cost?: a call to arms (and legs). *Cancer* 2009;115:4046-4054. DOI: 10.1002/cncr.24458 PMID: 19670445

202. Stohr W, Paulides M, Bielack S, Jurgens H, Treuner J, Rossi R et al. Ifosfamide-induced nephrotoxicity in 593 sarcoma patients: a report from the Late Effects Surveillance System. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48(4):447-452. DOI: PMID 16628552 PMID: 16628552
203. Sultan I, Rihani R, Hazin R, Rodriguez-Galindo C, et al. Second malignancies in patients with Ewing Sarcoma Family of Tumors: a population-based study. *Acta Oncol.* 2010;49(2):237-244. DOI: 10.3109/02841860903253538 PMID: 20100158
204. Bhatia S, Krailo MD, Chen Z, Burden L, Askin FB, Dickman PS, et al. Therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after Ewing sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* 2007;109(1):46-51. PMID 16985182
205. Navid F, Billups C, Liu T, et al. Second cancers in patients with the Ewing sarcoma family of tumours. *Eur J Cancer* 2008;44(7):983-91. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.02.027 PMID: 18353632
206. Shimoda S, Horsman J, Furlong W, et al. Disability and health-related quality of life in long-term survivors of cancer in childhood in Brazil. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008;30(8):563-570. 10.1097/MPH.0b013e31816e231c. PMID: 18799931
207. Aksnes LH, Bauer HC, Dahl AA, Fossa SD, Hjorth L, et al. Health status at long-term follow-up in patients treated for extremity localized Ewing Sarcoma or osteosarcoma: a Scandinavian sarcoma group study. *Pediatr Blood Cancer.* 2009;53(1):84-89. doi: 10.1002/pbc.22027 PMID: 19343771
208. Bekkering WP, Vliet Vlieland TP, Koopman HM, Schaap GM, Schreuder HW, Beishuizen A, et al. Quality of life in young patients after bone tumor surgery around the knee joint and comparison with healthy controls. *Pediatr Blood Cancer.* 2010;54:738-745. PMID 20127850

209. E, Patel S, Wathen JK, Schuetze S, Chawla S, Harmon D, Reinke D, Chugh R, Benjamin RS, Helman LJ. Phase II study of sequential gemcitabine followed by docetaxel for recurrent Ewing sarcoma, osteosarcoma, or unresectable or locally recurrent chondrosarcoma: results of Sarcoma Alliance for Research Through Collaboration Study 003. *Oncologist*. 2012;17:321. DOI: 10.1634/theoncologist.2010-0265 PMID: 22363068 PMCID: PMC3316916
210. Biswas B, Bakhshi S. Management of Ewing sarcoma family of tumors: Current scenario and unmet need. *World Journal of Orthopedics*. 2016;7(9):527-538. doi:10.5312/wjo.v7.i9.527.
211. Brenner JC, Feng FY, Han S, Patel S, Goyal SV, Bou-Maroun LM et al. PARP-1 inhibition as a targeted strategy to treat Ewing's sarcoma. *Cancer Res*. 2012;72:1608–1613. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3648 PMCID: PMC3319786
212. Schuck A, Rube C, Konemann S, Rube CE, Ahrens S, Paulussen M, Dunst J, Jürgens H, Willich N. Postoperative radiotherapy in the treatment of Ewing tumors: influence of the interval between surgery and radiotherapy. *Strahlenther Onkol*. 2002;178(1):25–31. PMID 11977388
213. Chemaitilly W, Mertens AC, Mitby P, Whitton J, Stovall M, Yasui Y et al. Acute ovarian failure in the childhood cancer survivor study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(5):1723–1728. DOI: 10.1210/jc.2006-0020 PMID 16492690
214. Marcus J. K, Yock I.T, Tarbell. Ewing sarcoma. In: Louis S. Constine, Nancy J. Tarbell, Edward C. Halperin, editors. *Pediatric radiation oncology*, ed. 6, Philadelphia, PA : Lippincott Williams & Wilkins; 2016. ISBN 9781496342867
215. Patricio MB, Vilhena M, Neves M, Raposo S, Catita J, De Sousa V, et al. Ewing's sarcoma in children: twentyfive years of experience at the Instituto Portuges de Oncologia de Francisco Gentil (I.P.O.F.G.). *J Surg Oncol*. 1991; 47(1):37-40. PMID 1902537

216. Gaspar N, Hawkins D, Dirksen U, Lewis JI, Ferrari S, Le Deley MC et al: Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration. *J Clin Oncol*. 2015;33(27):3036-3046 doi: 10.1200/JCO.2014.59.5256 PMID: 26304893
217. M Sluga, R Windhager, S Lang et al: A long-term review of the treatment of patients with Ewing's sarcoma in one institution *Eur J Surg Oncol*. 2001; 27(6): 569– 73, PMID 11520091
218. American Cancer Society. *Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition*. Atlanta: American Cancer Society; 2015
219. Lee J, Hoang BH, Ziogas A, Zell JA. Analysis of prognostic factors in Ewing sarcoma using a population-based cancer registry. *Cancer*. 2010; 116(8):1964–1973. PMID: 20151425
220. Friedman DN, Chastain K, Chou JF, Moskowitz CS, Adsuar R, Wexler LH et al. Morbidity and mortality after treatment of Ewing sarcoma: A single-institution experience. *Pediatric Blood Canc*. 2017;64(11):e26562. doi: 10.3389/fonc.2013.00141 PMID: 23761859 PMCID: 3674398
221. Sari N, Togral G, Cetindag MF et al. Treatment, Gungor BS, Ilhan IE. Treatment results of the Ewing sarcoma of Bone and Prognostic Factors: *Pediatr Blood Cancer* 2010; 54:19-24 DOI: 10.1002/pbc.22278 PMID: 19760772
222. Raciborska A, Bilska K, Drabko K, Chaber R, Sobol G, Pogorzala M et al. Validation of a Multi-Modal Treatment Protocol for Ewing Sarcoma- A report from the Polish Pediatric Oncology group. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61(12):2170-4. DOI: 10.1002/pbc.25167 PMID: 25163763
223. Obata H, Ueda T, Kawai A, Ishii T, Ozaki T, Abe S et al. Clinical outcome of Patients with Ewing sarcoma Family of tumors of bone in Japan: The Japanese Musculoskeletal Oncology Group cooperative study 2007; Feb 109;4:767-75 DOI: 10.1002/cncr.22481. PMID: 17238190

224. Nazeer A, Kandil A, Zahra O, Soliman M . Clinicopathological Features and Treatment Outcomes in Ewing's sarcoma Patients: A 10 year experience of Alexandria Clinical Oncology Department. *Indian J Med Pediatr Oncol* 2017; 38:316-20. DOI: 10.4103/ijmpo.ijmpo_107_17 . PMID: 29200681
225. Smith MA, Altekrose SF, Adamson PC, Reaman GH, Seibel NL et al. Declining childhood and adolescent cancer mortality. *Cancer*. 2014;120(16): 2497-506, DOI: 10.1002/cncr.28748 . PMID: 24853961 PMCID: PMC4136455
226. Huh WW, Daw NC, Herzog CE, Musell MF, McAleer MF, Lewis VO et al.: Ewing sarcoma family of tumors in children younger than 10 years of age. *Pediatr Blood Cancer*. 2017; 64(4): e26275 . Available from doi: 10.1002/pbc.26275 PMID: 27606711
227. Wong T, Goldsby RE, Wustrack R, Cash T, Isakoff MS, DuBois SG et al.: Clinical features and outcomes of infants with Ewing sarcoma under 12 months of age. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(11): 1947-51, PubMed PMID: 26173989
228. Ahmed SK, Randall RL, DuBois SG, Harmsen WS, Krailo M, Marcus KJ et al. Identification of Patients With Localized Ewing Sarcoma at Higher Risk for Local Failure: A Report From the Children's Oncology Group. *Int J Radiat Oncology, Biol, Phys*. 2017;99(5):1286-94. doi:10.1016/j.ijrobp.2017.08.020.
229. Whelan J, Hackshaw A, McTiernan A, et al. Survival is influenced by approaches to local treatment of Ewing sarcoma within an international randomised controlled trial: analysis of EICESS-92. *Clin Sarcoma Res*. 2018;8:6. doi:10.1186/s13569-018-0093-y.

SPISAK SKRAĆENICA:

ES- Ewing sarkom

SZO- Svetska zdravstvena organizacija

FISH -fluorescentna in situ hibridizacija

RT PCR- polimerazno lančana reakcija u realnom vremenu (eng. Real-Time Polymerase Chain Reaction)

MR- Magnetna rezonancija

CESS- Kooperativne Ewing sarcoma studije (eng.Cooperative Ewing's sarcoma studies)

EICESS- Evropske međugrupne ES studije (eng.The European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study)

UKCCSG- Studijska grupa za dečji kancer Velike Britanije (United Kingdom Children's Cancer Study Group)

IESS-međugrupna Ewing sarkoma studija (eng: Intergroup Ewing's Sarcoma Study)

IOR- Ortopedski institut Rizzoli, Italija

POG-CCG- Pedijatrijska onkološka grupa, Grupa za dečji kancer (eng:Pediatric Oncology Group-children's Cancer Group)

SFOP- Francusko udruženje za pedijatrijsku onkologiju (eng:French Society of Pediatric Oncology)

GPOH- nemačko-austrijsko-holandska grupa za pedijatrijsku onkologiju i hematologiju

SSG - Skandinaviska sarkoma grupa (eng: Scandinavian Sarcoma Group)

OS- ukupno preživljavanje (eng. Overall survival)

EFS- preživljavanje bez događaja (eng.Event free survival)

DFS- preživljavanje bez bolesti (eng. Disease free survival)

SEER- Baza epidemiološkog nadzora i baza konačnih rezultata SAD (eng.The U.S. Surveillance Epidemiology and End Results database)

HRQL-kvalitet života (eng: health-related quality of life)

BIOGRAFIJA

Dr Lejla Paripović je rođena 1964 godine u Beogradu. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu u Beogradu 1990 godine a 1997 godine završila specijalizaciju iz pedijatrije na Univerzitetskoj dečjoj klinici. Kao specijalista pedijatrije počela je da radi u Domu zdravlja „Vračar“ a od juna 1999 godine zaposlena je na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije na Službi za pedijatrijsku onkologiju.

Poslediplomske studije iz oblasti onkologije završila je 2010. godine odbranom magistarske teze pod nazivom: „Nonrabdomyosarkomi u dečjem uzrastu - izbor optimalnog terapijskog pristupa i procena prognostičkih faktora“ , mentor Prof dr Radan Džodić.

Pohađala je SIOP-ESO-ASPO kurs u Kairu 2003 godine i postala član vodećeg Međunarodnog udruženja pedijatrijske onkologije – SIOP. Autor i koautor je brojnih radova publikovanih u domaćim i stranim stručnim časopisima, čime je stekla i zvanje primarijusa 2011.godine. Učestvovala je na brojnim inostranim i domaćim kongresima i simpozijumima i izlagala radove u kojima su obrađivane teme iz dečje onkologije.

U okviru saradnji srpske i francuske vlade, obavila je studijski boravak u francuskom onkološkom centru Léon Bérard u Lionu i u pedijatrijskoj bolnici Robert Debre u Parizu 2005 godine.

Završila je više edukativnih kurseva o palijativnom zbrinjavanju dece. U organizaciji Američko-Austrijske fondacije, 2017 godine pohađala je edukativni seminar “Palijativno zbrinjavanje dece” u Salzburgu.

Član je SLD od 1992 godine kao i član Pedijatrijske sekcije SLD. Član SIOP-a (International Society of Pediatric Oncology) od 2003 godine a od 2016 godine i član EMSOS-a (European musculo-skeletal oncology society).

Rukovodilac Službe za pedijatrijsku onkologiju bila je od 2012 do 2017 godine, kada je raspoređena na mesto načelnika odeljenja stacionara Službe za pedijatrijsku onkologiju.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Lejla Paripović

broj upisa- Doktorat po starom programu

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

“Značaj kliničkih, biomolekularnih I patoloških parametara za prognozu Ewing sarkoma kosti kod dece”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 28.06.2018 g,

Potpis doktoranda

Lejla Paripović

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Lejla Paripović

Broj upisa Doktorat po starom programu

Studijski program _____

Naslov rada _“Značaj kliničkih, biomolekularnih I patoloških parametara za prognozu Ewing sarkoma kosti kod dece”

Mentor Prof dr Marina Nikitović

Potpisani _____



izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 28.06.2018 g.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

“Značaj kliničkih, biomolekularnih I patoloških parametara za prognozu Ewing sarkoma kosti kod dece”

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

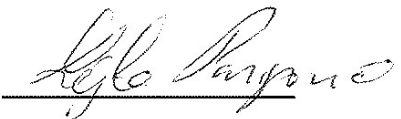
5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 28.06.2018 g.



Kyle Simpson