

© Коллектив авторов, 1998
УДК 616-006.83-037

Б. Б. Тайлаков, В. Н. Богатырев, П. А. Синоков,
Н. А. Макрецов, В. К. Соколова, Е. Е. Ковалевский

ПЛОИДНОСТЬ ДНК И ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК САРКОМЫ ЮИНГА, ИХ ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

НИИ клинической онкологии

В сообщениях последних лет отмечена взаимосвязь содержания ДНК (ploidy) в опухолевых клетках и клинического течения злокачественных новообразований. Имеются данные о том, что опухоли с анеуплоидным содержанием ДНК имеют худший прогноз по сравнению с диплоидными, однако проявляют высокую чувствительность к химиолучевому воздействию [1, 2]. Изучение ploidy ДНК при новообразованиях костей показало, что для доброкачественных опухолей (энхондрома, остеоэнхондрома, фиброма и др.) характерно диплоидное содержание ДНК, а для злокачественных опухолей (остеосаркома, хондросаркома и др.) в большинстве случаев — анеуплоидное содержание ДНК [8, 11].

До настоящего времени гистогенез саркомы Юинга остается невыясненным. Тем не менее накопилось достаточно убедительных данных, позволяющих отнести данную опухоль к группе кругломелкоклеточных сарком, конкретнее — к нейроэктодермальным новообразованиям [3, 5—7]. Однако продолжается поиск в области выявления дифференциально-диагностических критериев нозологических форм нейроэктодермальных опухолей — саркомы Юинга, PNET и опухоли Аскина. В этом контексте изучение содержания ДНК в опухолевых клетках саркомы Юинга может быть весьма полезно для определения характера и степени ее злокачественности, прогноза заболевания и возможного выбора адекватных методов терапии.

В настоящее время совершенствование методик подготовки тканей к ДНК-проточной цитофлуориметрии позволяет использовать не только свежий нефиксированный материал, но и материал парафиновых блоков. Необходимо отметить, что при этом лучшие результаты получают при фиксации в формалине [9]. Данная методика позволяет ретроспективно оценить прогноз заболевания спустя много лет.

Изложенное выше послужило поводом для изучения таких фундаментальных биологических характеристик злокачественных клеток, как ploidy ДНК и пролиферативная активность при саркоме Юинга.

Материалы и методы. В период с 1987 по 1996 г. у 31 больного (8 женщин и 23 мужчин) саркомой Юинга в возрасте от 15 до 34 лет (средний возраст $19,9 \pm 1,1$ года) исследованы опухолевые образцы, полученные путем трепан- и операционной биопсии и из парафиновых блоков.

Опухоли локализовались в костях верхних и нижних конечностей (у 26, 83,9%), таза (у 3, 9,7%) и в ребрах (у 2, 6,4%). Диагноз во всех случаях был морфологически верифицирован (цитологически и гистологически).

Содержание ДНК в ядрах опухолевых клеток исследовали в материале, по которому в дальнейшем проводили цитологическую

B.B. Tailakov, V.N. Bogatyrev, P.A. Sinyukov,
N.A. Makretsov, V.K. Sokolova, E.E. Kovalevsky

CELL DNA PLOIDY AND PROLIFERATIVE ACTIVITY IN EWINGS SARCOMA: PROGNOSTIC SIGNIFICANCE

Research Institute of Clinical Oncology

As discovered over the last years DNA content (ploidy) in tumor cells is related to cancer course. There is much evidence of the fact that tumors with aneuploid DNA content have poorer prognosis as compared to diploid ones while being highly responsive to chemoradiotherapy [1,2]. Study of DNA ploidy in bone neoplasms showed that benign tumors (enchondroma, osteochondroma, fibroma etc.) were mainly diploid while most malignant tumors (osteosarcoma, chondrosarcoma etc.) were characterized by aneuploid DNA content [8,11].

Histogenesis of Ewings sarcoma remains unclear. However, there is convincing evidence of the tumor belonging to round small-cell sarcomas, or more specifically to neuroectodermal neoplasms [3-5]. Research for diagnosis criteria to differentiate neuroectodermal tumor types (Ewings sarcoma, PNET, Askins tumor) is in progress. Study of DNA content in Ewings sarcoma is therefore of much importance to determine disease type and malignancy, prognosis and adequate treatment.

Modern methods of tissue specimen preparation for DNA flow cytometry allow both non-fixed material and paraffin blocks to be used in the study. Of note that better results are obtained with formalin-fixed specimens [9]. This methodology permits retrospective evaluation of disease prognosis several years later.

The above-mentioned considerations were a rationale for study of cancer cell fundamental biological characteristics such as DNA ploidy and proliferative activity in Ewings sarcoma.

Materials and Methods. Tumor specimens from 31 patients (8 females, 23 males) with Ewings sarcoma aged 15 to 34 years (mean 19.3 ± 1.1 years) were studied during 1987-1996. The specimens were obtained by punch and open biopsy or from paraffin blocks.

Tumor sites were upper and lower limb bones (26, 83.9%), pelvic bones (3, 9.7%) and ribs (2, 6.4%). Diagnosis was verified histologically (by cytology and histology) in all the cases.

DNA content in tumor cell nuclei was studied in specimens which were further used for cytological verification of diagnosis. Ewings sarcoma mainly consisted of monomorphous cells located separately or as clusters and rosettes. The nuclei occupied almost the whole cell, were round and not always had nucleoli. Beaker structures were seen in some specimens (fig. 1). Cytologic control is of much importance for correct interpretation of DNA histograms. Ploidy analysis was performed in specimens with a more than 30% tumor cell content.

Cell suspension for flow cytometry was prepared both from fresh material (15 cases) and from paraffin blocks (16). To make the suspension a piece of tissue was placed in saline solution and minced. After centrifugation 0.1-0.2 ml tris-buffer pH 7.4 was added, the suspension was thoroughly pipetted, filtered through nylon grid (70 mesh), and ethanol 96% was added by drops up to a concentration 70%. The cells were fixed for 24 hours at a temperature -15 to -20°C .

Before study of specimens from paraffin blocks quantification of tumor cellularity, evaluation of necrosis and stromal elements were

верификацию диагноза. Саркома Юинга была представлена довольно мономорфными клетками, расположенными разрозненно, скоплениями и в виде розеток. Ядра занимают почти всю клетку, округлой формы и не всегда имеют ядрышки. В отдельных случаях встречаются сосуды (рис. 1). Следует подчеркнуть важность цитологического контроля для правильной трактовки ДНК-гистограмм. Для анализа ploидности ДНК выбирались препараты, где в мазках-отпечатках опухолевые клетки составляли больше 30%.

Клеточную суспензию для проточной цитофлюорометрии изготавливали как из свежего материала (15 случаев), так и из парафиновых блоков (16). Для приготовления суспензии клеток кусочек ткани, предназначенной для исследования, помещали в изотонический раствор хлорида натрия и измельчали бритвой. После этого суспензию центрифугировали, к осадку добавляли 0,1—0,2 мл трис-буфера pH 7,4, тщательно пипетировали, фильтровали через нейлоновую сетку (70 мкм) и добавляли по каплям 96° этанол до концентрации 70%. Клетки фиксировали в течение 24 ч на холоде (–15—20 °C).

При использовании материала из парафиновых блоков предварительно в гистологическом препарате количественно (в процентах) оценивали клеточность опухоли, наличие некроза и стромальных элементов. Затем на микротоме изготавливали по 3 среза по 50 мкм с каждого блока. Срезы депарафинировали в 3 порциях ксилола. Затем осуществляли регидратацию в спиртах нисходящей концентрации. После регидратации тканевые фрагменты дезагрегировали с помощью 0,5% раствора пепсина (активность 2500 ЕД/мл) при pH 1,5 и температуре 37—38°C в течение 45 мин. После центрифугирования осадок ресуспендировали в 0,5 мл трис-буфера pH 7,4 и окрашивали 1,0 мл раствора пропидиума йодида (50 мг/мл, «Sigma», США) с 500 ед/мл рибонуклеазы А («Sigma», США).

Образцы исследовали на лазерном проточном анализаторе FACScan («Becton Dickinson», США). В каждом образце анализировали не менее 25 000 клеток. С помощью встроенной в прибор ЭВМ полученные данные записывали на дискеты и анализировали с помощью программы Multicycle («Phoenix Flow systems», США).

В полученной гистограмме процент клеточных ядер с различным содержанием ДНК вычисляли по отношению к общему числу исследованных клеток. Коэффициент вариации (CV) не превышал 10%. В качестве диплоидного стандарта использовали лимфоциты человека, а в качестве внутреннего стандарта — эритроциты кур.

Для характеристики степени анеуплоидии применяли индекс (И-ДНК), который вычисляли как соотношение интенсивности флуоресценции пика анеуплоидных клеток к пику диплоидных. И-ДНК диплоидных клеток (2c) соответствовал 1,0. Анеуплоидные саркомы Юинга имели И-ДНК более 1,0 и представляли разнородную по содержанию ДНК группу опухолей (рис. 2).

Результаты и обсуждение. Полученные данные демонстрируют высокую степень злокачественности саркомы Юинга, о чем свидетельствуют высокая частота выявления анеуплоидных клонов клеток. Так, опухолевые ткани 25 (80,6%) больных имели анеуплоидное содержание ДНК, только у 6 (19,4%) больных в опухолевых клетках выявлено диплоидное содержание ДНК (см. таблицу). Среди анеуплоидных опухолей И-ДНК варьировал от 1,2 до 2,91. В зависимости от И-ДНК опухоли распределялись следующим образом: диплоидные (19,3%), анеуплоидные с И-ДНК = 1,1—1,8 (29%), тетраплоидные — И-ДНК = 1,9—2,1 (9,7%). В 6,5% случаев выявлены гиперанеуплоидные — И-ДНК > 2,1 и в 35,5% — многокლოновые анеуплоидные опухоли, характеризовавшиеся наличием в новообразованиях нескольких клонов анеуплоидных клеток с различными показателями И-ДНК (см. рис. 2).

Анализ индекса пролиферации (количество опухолевых клеток, находящихся в S + G2 + M-фазах клеточного цикла) свидетельствует о том, что для анеуплоидных опухолей (см. таблицу) характерна статистически достоверно более высокая пролифера-

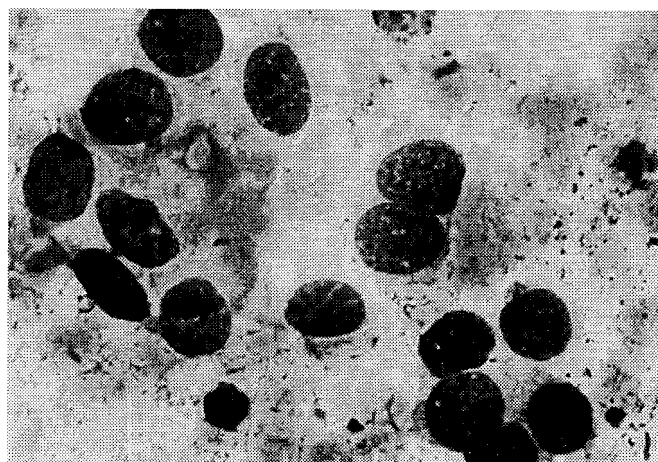


Рис. 1. Цитологическая картина опухоли Юинга
Fig. 1. Ewings sarcoma cytology

performed in the histological preparations. Three sections 50 micrometers each were made from every block to be further deparaffined in 3 xylene portions. The sections were then rehydrated in alcohols with descending concentrations. After the rehydration the tissue fragments were desaggregated using 0.5% pepsin solution (potency 2,500 U/mg) at pH 1.5 and a temperature 37-38°C for 45 min. After centrifugation the precipitate was resuspended in 0.5 ml tris-buffer pH 7.4 and stained with 1.0 ml propidium iodide (50 mg/ml, Sigma, USA) with 500 U/ml ribonuclease A (Sigma, USA).

The specimens were studied by a laser flow FACScan analyzer (Becton Dickinson, USA). At least 25,000 cells were analyzed in each specimen. Analysis of the findings was performed using the Multicycle program (Phoenix Flow Systems, USA).

Percentage of cell nuclei with different DNA content was calculated with respect to the total of cells studied. Coefficient of variation (CV) was not higher than 10%. Human lymphocytes were used as diploid standard and chicken erythrocytes as internal standard.

Aneuploidy was evaluated by I-DNA index which was calculated as the ratio of aneuploid to diploid cell peak fluorescence intensities. Diploid cell (2c) I-DNA was 1.0. Aneuploid Ewings sarcomas had an I-DNA index more than 1.0 and demonstrated DNA content heterogeneity (fig.2).

Results and Discussion. Our findings demonstrated high malignancy of Ewings sarcoma as evidenced by high rate of aneuploid cell clones. DNA aneuploidy was discovered in 25 (80.6%) of the patients versus 6 (19.4%) cases with diploid DNA content (see the table). In the aneuploid tumors I-DNA was varying from 1.2 to 2.91. The tumors showed the following distribution with respect to I-DNA: diploid (19.3%), aneuploid with I-DNA 1.1-1.8 (29%), tetraploid with I-DNA 1.9-2.1 (9.7%). 6.5% of the cases presented with hyperaneuploid tumors with I-DNA more than 2.1 and another 35.5% had multiclonal aneuploid neoplasms, i.e. tumors demonstrating several clones of aneuploid cells with different I-DNA values (see fig.2).

Analysis of proliferation index (the number of tumor cells in S + G2+M phases) showed the aneuploid tumors to have higher proliferative potential as compared to the diploid neoplasms (21.7+2.7 vs 13.1+4.0, respectively, $p < 0.05$). Aneuploid tumors with high proliferative activity were encountered in 14 (45.2%) cases against only 1 case (3.2%) among diploid tumors.

тивная активность по сравнению с диплоидными новообразованиями ($21,7 \pm 2,7$ и $13,1 \pm 4,0$ соответственно; $p < 0,05$). Анеуплоидные опухоли с высокой пролиферативной активностью встречались в 14 (45,2%) случаях, тогда как среди диплоидных опухолей этот показатель зафиксирован только в 1 (3,2%) случае.

Наличие диплоидного пика на гистограммах анеуплоидных опухолей свидетельствует о присутствии различных клонов клеток. Этот факт подчеркивает гетерогенность опухоли и необходимость исследования методом ДНК-проточной цитофлюорометрии как можно большего числа клеток опухоли из разных участков, чтобы избежать возможных ошибок.

В зависимости от степени пролиферативной активности опухолевые образцы разделены на две группы:

1. Саркома Юинга с высокой пролиферативной активностью, т. е. больше 15% опухолевых клеток, находящихся в S- и G2 + M-фазах клеточного цикла.

2. Саркома Юинга с низкой пролиферативной активностью, т. е. меньше 15% клеток, находящихся в S- и G2-фазах клеточного цикла.

Такая детализация, на наш взгляд, имеет принципиальное значение, поскольку по степени пролиферативной активности можно судить об активности деления клеток, что важно для оценки клинического поведения конкретной опухоли. Так, при диплоидных опухолях только в 1 (3,2%) случае выявлена высокая пролиферативная активность, в то время как при анеуплоидной саркоме Юинга она наблюдалась в 14 (45,2%) случаях ($p < 0,05$).

Анализ клеточного цикла опухолей показывает, что по мере увеличения степени злокачественности в опухолевой популяции наблюдается увеличение числа клеток в S-фазе клеточного цикла. Эта зависимость соответствует данным, полученным в нашем исследовании. Так, выявлено статистически достоверное (см. таблицу) увеличение числа клеток, находящихся в S-фазе в анеуплоидных по сравнению с диплоидными опухолями Юинга ($10,6 \pm 1,2$ и $5,8 \pm 1,9$ соответственно; $p < 0,05$).

В клинической практике любая биологическая характеристика клеток опухоли получает прогностическую оценку. В ряде солидных опухолей показатели пло-

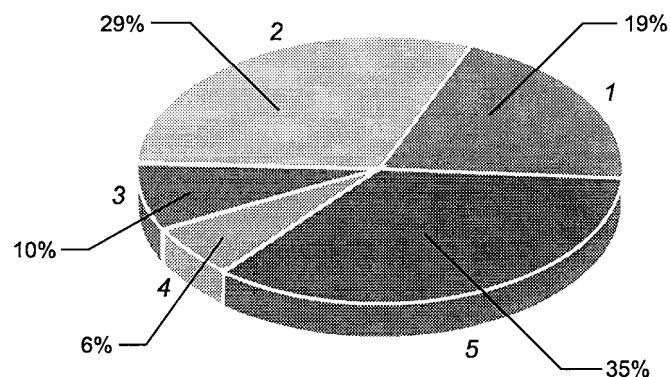


Рис. 2. Распределение опухолей в зависимости от индекса ДНК.

1 — диплоидная, 2 — анеуплоидная, 3 — тетраплоидная, 4 — гиперанеуплоидная, 5 — многокლოновая опухоль.

Fig. 2. Distribution of tumors with respect to DNA index. 1, diploid tumor; 2, aneuploid tumor; 3, tetraploid tumor; 4, hyperaneuploid tumor; 5, multiclonal tumor.

The presence of a diploid peak in aneuploid tumor histograms suggests the existence of several cell clones. This finding is evidence of tumor heterogeneity and suggests that DNA flow cytometry should be performed for as many tumor cells as possible from different tumor segments to avoid erroneous diagnosis.

The tumor samples were divided into two groups with respect to proliferative activity as follows.

1. Ewings sarcomas with high proliferative activity, i.e. having more than 15% of tumor cells in S and G2+M phases;

2. Ewings sarcomas with low proliferative activity, i.e. having less than 15% of tumor cells in S and G2+M phases.

This classification is of principal importance since degree of cell proliferation is a valuable characteristic for analysis of clinical behavior of an individual tumor. There was only one case (3.2%) with high proliferative activity among the diploid tumors versus 14 (45.2%) for the aneuploid Ewings sarcomas ($p < 0.05$).

The number of cells in S phase is known to increase with rise in tumor population malignancy. Our findings

Таблица

Плоидность ДНК и пролиферативная активность опухолевых клеток саркомы Юинга
Cell DNA ploidy and proliferative activity in Ewings sarcoma

Плоидность ДНК-опухоли	Число больных	Фаза клеточного цикла			Индекс пролиферации G2 + M + S
		G0 + G1	S	G2 + M	
Анеуплоидная опухоль Aneuploid tumors	25	79,5 ± 2,5	10,6 ± 1,2	10,8 ± 1,6	21,7 ± 2,8
Диплоидная опухоль Diploid tumors	6	85,2 ± 4,2	5,8 ± 1,9	7,4 ± 2,1	13,1 ± 4,0
p		> 0,05	< 0,05	> 0,05	< 0,05
Tumor DNA ploidy	No. of patients	G0 + G1	S	G2 + M	Proliferation index G2 + M + S
		Cell cycle phases			

Table

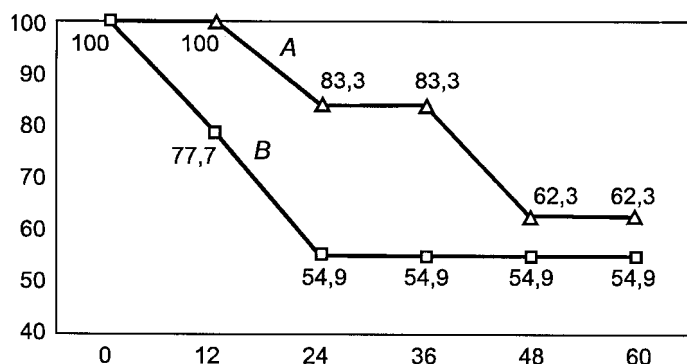


Рис. 3. Выживаемость больных саркомой Юинга в зависимости от пloidности ДНК опухолевых клеток.

Здесь и на рис. 4—5: по оси абсцисс — продолжительность наблюдения, мес; по оси ординат — выживаемость больных, %; А — диплоидная, В — анеуплоидная.

Fig. 3. Survival of patients with Ewings sarcoma with respect to tumor cell DNA ploidy.

Here and in figs.4-5 numbers on the x axis show months of follow-up; numbers on the y axis show percentage of patients survival. A, diploid tumor; B, aneuploid tumor.

идности и пролиферативной активности рассматриваются в качестве одного из важных прогностических факторов [10]. С этих позиций мы оценивали их значимость.

Как известно, одним из существенных критериев прогноза при саркоме Юинга являются схемы комбинированной терапии. В данном исследовании больные получали специфическую терапию по схемам протокола II [4], то есть они представляли одинаковую по схеме лечения группу пациентов. Больные наблюдались от 9 до 98 мес.

При анализе на основе фактических данных отдаленных результатов лечения (рис. 3) диплоидных опухолей 3- и 5-летняя выживаемость оказалась на уровне $83,3 \pm 6,7$ и $62,3 \pm 1,7\%$, тогда как при анеуплоидных опухолях эти показатели соответствовали $54,9 \pm 15,3$ и $54,9 \pm 15,3\%$. Полученные данные свидетельствуют о тенденции к худшему прогнозу заболевания при наличии анеуплоидных клонов клеток по сравнению с диплоидными.

При анализе безметастатической выживаемости (БВ) всей группы больных в зависимости от степени пролиферативной активности выявлено, что через 1,5—2 года имела статистически достоверная разница по этому показателю между опухолями с высокой и низкой пролиферативной активностью ($70,3 \pm 12,4$ и $85,5 \pm 9,5\%$ соответственно; $p < 0,05$). Как видно на рис. 4, хотя и соблюдается подобная тенденция в 3- и 5-летних сроках наблюдения ($58,2 \pm 12,4$ и $67,2 \pm 12,0\%$ соответственно), однако данные различия не носят статистически достоверного характера ($p > 0,05$). Подобная картина наблюдается и при анализе отдаленных результатов среди анеуплоидных сарком Юинга (рис. 5). Так, при анеуплоидных опухолях с высокой пролиферативной активностью 3-летняя выживаемость соответствовала $52,5 \pm 15,4\%$, а с низкой пролифе-

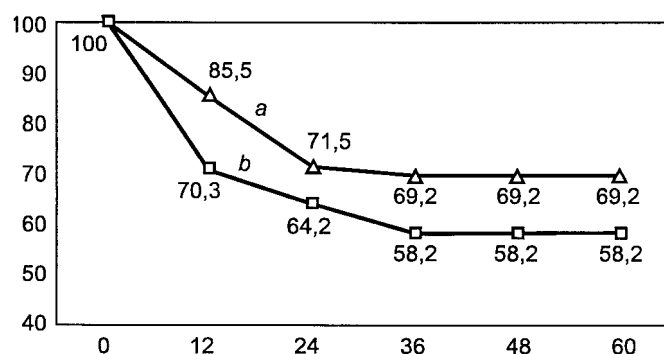


Рис. 4. Выживаемость больных саркомой Юинга в зависимости от пролиферативной активности (ПА) опухолевых клеток (общая группа больных).

Здесь и на рис. 5: а — низкая ПА, b — высокая ПА.

Fig. 4. Survival of patients with Ewings sarcoma with respect to tumor cell proliferative activity (PA) (common group).

Here and in fig.5: a, low PA; b, high PA.

are in agreement with this observation. There was a statistically significant increase in S-phase cells in the aneuploid as compared to the diploid Ewings sarcomas (10.6 ± 1.2 vs 5.8 ± 1.9 , respectively; $p < 0.05$).

Any biological characteristic is of a certain prognostic value for clinicians. Ploidy and proliferative activity of some solid tumors are thought most important prognostic factors [10]. We also evaluated their significance from this standpoint.

Schedules of combined therapy are an important criterion of prognosis for Ewings sarcoma. In our study the patients received specific therapy by protocol II [4], i.e. belonged to a common group with respect to treatment received. The patients were followed-up for 9 to 98 months.

Analysis of follow-up results (fig.3) showed that the patients with diploid tumors demonstrated 3- and 5-year survivals $83.3 \pm 6.7\%$ and $62.3 \pm 1.7\%$, for the aneuploid cases the respective rates were $54.9 \pm 15.3\%$ and $54.9 \pm 15.3\%$. These findings are evidence of poorer disease

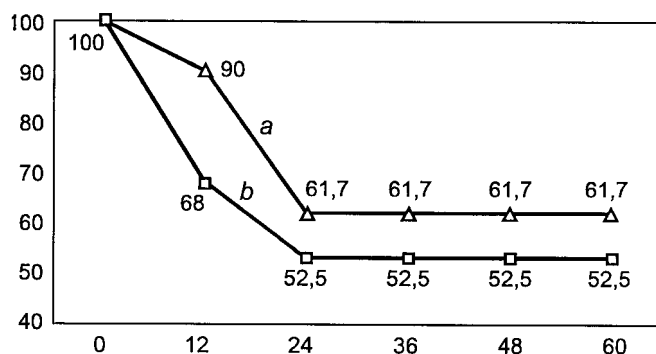


Рис. 5. Выживаемость больных при анеуплоидной саркоме Юинга.

Fig. 5. Survival of patients with aneuploid Ewing's sarcoma

ративной активностью с аналогичным содержанием ДНК — $61,7 \pm 14,2\%$ ($p > 0,05$).

Результаты проведенного исследования подчеркивают необходимость изучения пролиферативной активности популяций опухолевых клеток и их плоидности для прогнозирования течения заболевания, а также для выявления новых биологических параметров в оценке степени злокачественности опухоли Юинга и соответствуют тенденциям и зависимостям, выявленным при других онкологических заболеваниях. К настоящему времени имеются вполне обоснованные данные, позволяющие отнести показатель плоидности ДНК в категорию независимого прогностического фактора. Для солидных злокачественных новообразований яичника и молочной железы на большом клиническом материале показана взаимосвязь анеуплоидии клеток опухоли и плохого прогноза [1, 2, 5]. По данным Herzberg A. и соавт. [10], ДНК-анеуплоидия имеет тесную связь со степенью злокачественности («Tumor grade») и распространенностью опухоли. Так, опухоли мягких тканей с Grade III чаще анеуплоидны (до 83%), в то время как при Grade I и II анеуплоидия клеток опухоли наблюдается только в 33% случаев. Проллиферативная активность (индекс пролиферации — ИП) также связана с плоидностью и Grade опухоли: она увеличивается при анеуплоидии (ИП $> 20\%$ в 73% опухолей), чем при нормальном распределении ДНК (диплоидные опухоли), когда ИП $> 20\%$ наблюдался только в 30% опухолей.

Что касается костных сарком, то пока имеются лишь единичные сообщения. Заслуживают внимания данные о том, что выживаемость больных саркомой Юинга при наличии диплоидной опухоли достоверно выше, чем при анеуплоидной. В первом случае 58% больных прожили 5 лет и более, во втором — все больные в вышеуказанные сроки имели отдаленные метастазы или умерли [8].

В заключение хотелось бы подчеркнуть перспективность изучения плоидности ДНК в опухолевых клетках саркомы Юинга для оценки степени злокачественности и течения данного новообразования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Богатырев В. Н. Значение количественных методов исследования (морфометрии, проточной цитофлюорометрии, сканирующей микрофотометрии) в клинической онкоцитологии: Дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1991.
2. Николаева Т. Г., Добрынин Я. В., Басов Б. Н. и др. // Вестн. ОНЦ РАМН. — 1994. — № 1. — С. 30—37.
3. Соловьев Ю. Н. // Там же. — 1995. — № 1. — С. 3—6.
4. Трапезников Н. Н., Еремича Л. А., Амтрасланов А. Т. и др. // Тр. арх. — 1988. — № 9. — С. 132—136.
5. Becrossian C. W., Rader M., Barlogie B. // Ann. Quant. Cytol. — 1981. — N 3. — P. 112—116.
6. Cavazzana A., Triche T. I. // Prosp. pediatr. — 1988. — N 18. — P. 37—48.

prognosis in cases with aneuploid cell clones as compared to those with diploid ones.

Analysis of disease-free survival of all the patients with respect to proliferative activity discovered a statistically significant difference between cases with high and low proliferative activity at 1.5-2 years ($70.3 \pm 12.4\%$ vs $85.5 \pm 9.5\%$, respectively; $p < 0.05$). Fig. 4 shows the difference in the 3- and 5-year survivals which is however not statistically significant ($58.2 \pm 12.4\%$ vs $67.2 \pm 12.0\%$, respectively; $p < 0.05$). A similar situation is observed as concerns aneuploid Ewings sarcomas (fig. 5). The 3-year survival of cases with aneuploid tumors and high cell proliferation activity was $52.5 \pm 15.4\%$ versus $61.7 \pm 14.2\%$ for those with low cell proliferation activity ($p < 0.05$).

Our findings prove necessary evaluation of tumor cell proliferation activity and ploidy to make disease prognosis as well as to find new biological parameters for assessment of Ewings sarcoma malignancy; they are also in agreement with tendencies and regularities discovered for other malignancies. There is much reason to consider DNA ploidy an independent factor of prognosis. There is also much clinical evidence to demonstrate that tumor cell aneuploidy correlates with poor prognosis in solid ovarian and breast tumors [1, 2, 5]. According to [10] DNA aneuploidy is closely related to tumor grade and advance. Grade III soft-tissue tumors are often aneuploid (up to 83%), while the portion of cell aneuploidy among grade I and II neoplasms is 33% only. Proliferative activity (proliferation index, PI) is also related to tumor ploidy and grade: it increases in aneuploid cells (PI $> 20\%$ in 73% of tumors) as compared to diploid cells (PI $> 20\%$ in 30% of tumors).

As concerns bone sarcomas there are but scarce reports. Of interest are findings of [8] demonstrating that survival of patients with diploid Ewings sarcoma was significantly higher as compared to aneuploid ones: 58% of the first category patients survived 5 years and more while all cases of the second category died or had distant metastases within this period.

In conclusion we should like to emphasize that analysis of DNA ploidy in Ewings sarcoma cells is a promising method to evaluate Ewings sarcoma malignancy and course.

7. Denher L. // Am. J. Surg. Path. — 1993. — Vol. 17, N 1. — P. 1—14.
8. Dieterick F. M., Langlois M., Van-Oosterveldt. et al. // Histopathology. — 1993. — Vol. 23, N 4. — P. 333—339.
9. Hedley D. W. // Diagn. Oncol. — 1991. — N 1. — P. 2—4.
10. Herzberg A., Kerns B., Honcanen J. // Am. J. clin. Pathol. — 1992. — N 102. — P. 61—67.
11. Fukunaga M., Nikaido T., Shimoda T. et al. // Cancer. — Vol. 70, N 7. — P. 1886—1894.