

RELEVANȚA D2-40 ÎN DETERMINAREA INVAZIEI LIMFATICE VASCULARE

**Lucian Rudico^{1,2} – asist. univ., cercet. șt.,
Valeriu David^{1,2} – conf. univ., dr. șt. med.,
Veaceslav Fulga^{1,2} – conf. univ., dr. șt. med.,
Lilian Șaptefrați¹ – conf. univ., dr. hab. șt. med.**

¹Catedra de histologie, citologie și embriologie,

²Laboratorul de morfologie,

IP USMF „Nicolae Testemițanu”

tel.: +373 22 205 229, lucian.rudico@usmf.md

Rezumat

Statutul metastatic al nodurilor limfatice este unul din factorii primordiali de diagnostic și pronostic în carcinomul mamar invaziv. Procesul de metastazare se realizează atât prin intermediul vaselor limfatice preexistente, cât și celor neoformate la nivelul tumorii primare, spre nodurile limfatice regionali (axilari în cele mai dese cazuri). Astfel, determinarea invaziei limfatice vasculare (ILV) intra- și peri-tumoral, pe speciemenle histologice devine extrem de utilă. *Scopul studiului.* Analiza comparativă a distribuției vaselor limfatice la nivelul plajelor peritumorale și celei intratumorale cu determinarea gradului ILV; și compararea datelor obținute prin metoda histologică (hematoxilina și eozină), cu cele determinate imunohistochimic (aplicarea markerului limfatic D2-40). *Materiale și metode.* Material morfologic prelevat de la 74 pacienți, diagnosticați cu carcinom mamar ductal invaziv de tip NOS, colectate la IMSP Institutul Oncologic din Republica Moldova în perioada anilor 2012-2014. Determinarea gradului histologic de diferențiere celulară a fost realizat prin metoda histologică. Prin metoda imunohistochimică a fost studiată expresia D2-40 în ariile intra și peritumorale. *Rezultate.* Analiza statistică a numărului de vase din aria periferică a tumorii (D2-40p.tum) cu cele intra-tumorale (D2-40 i.tum) a scos în vizor o corelație statistic semnificativă (PCC-0.52; $p < 0.001$). Altă corelație semnificativă a fost evidentă dintre numărul vaselor D2-40 pozitive invadate (D2-40-ILV) cu densitatea vaselor limfatice intra-tumorale (D2-40i.tum) (PCC-0.51; $p < 0.001$) și peri-tumorale (D2-40 p.tum) (PCC-0.63; $p < 0.001$). Aceeași procedură de analiză statistică a ILV evaluat prin metoda histologică cu ILV determinat prin aplicarea D2-40 nu au prezentat corelație statistică veridică. *Concluzii.* D2-40 este un marker limfangiogenic selectiv, foarte util în stabilirea calitativă și cantitativă a gradului de ILV. Interpretarea ILV prin metoda clasică poartă caracter ambiguu și necesită minuțiozitate în diagnostic. Densitatea limfatică intratumorală este cu atât mai intensă cu cât crește densitatea peri-tumorală. Gradul de invazie limfatică vasculară este cu atât mai acerb cu cât densitatea vaselor limfatice este mai mare.

Cuvinte-cheie: carcinom mamar ductal, D2-40, limfangiogeneza

Summary. The relevance of D2-40 in the determination of the lymphovascular invasion

The status of metastatic lymph nodes is one of the primary diagnostic and prognostic factors in the invasive breast carcinoma. The process of metastasis is achieved through the pre-existing lymphatic vessels and by the new one formed at the level of the primary tumor, to the regional nodes (axillary in the most of cases). So the determination of the intra-tumoral and peri-tumoral lymphatic vascular invasion (ILV) on the histological specimens is extremely useful. *Objective of the study.* The comparative analysis of the lymphatic vessels distribution in peri-tumoral and intra-tumoral areas with the determination of the ILV degree, as well the comparison of the data obtained by the histological method (hematoxylin and eosin) with those determined by the immunohistochemical method (application of the lymphatic marker D2-40). *Materials and methods.* The morphological material, collected from IMSP Oncological Institute of the Republic of Moldova during the 2012-2014 years was taken from 74 patients. All cases were morphologically described as invasive ductal breast carcinoma of NOS type. The determination of histological differentiation of the tumors was performed with the histological method. The D2-40 in the intra- and peritumoral areas was studied by immunohistochemical method. *Results.* Statistical data of peri-tumoral and intra-tumoral concentration of D2-40 revealed a significant correlation. (PCC-0.52; $p < 0.001$). Another significant correlation was obvious in case of invaded vessels (which are D2-40 positive) (D2-40-ILV), intra-tumoral density of lymphatic vessels (PCC-0.51; $p < 0.001$) and peri-tumoral density of lymphatic vessels (PCC-0.63; $p < 0.001$). The same analysis of ILV by histological and immunohistochemical methods didn't reveal a statistical correlation. *Conclusions.* The D2-40 is a selective lymphangiogenic marker, which is very useful in determining the qualitative and quantitative degree of the ILV. The interpretation of the classical method for ILV is ambiguous and requires a thorough diagnosis. The intratumoral lymphatic density is higher simultaneously with the increasing of the peri-tumoral one. The lymphatic invasion becomes much more intense when the vascular density is higher.

Key words: ductal breast carcinoma, D2-40, lymphangiogenesis

Резюме. Уместность D2-40 в определении инвазии лимфатических сосудов

Наличие метастаз в лимфатических узлах является наиболее важным фактором диагноза и прогноза инвазивного рака молочной железы. Метастазирование происходит как за счет существующих, так и за счет новообразованных лимфатических сосудов. Таким образом, определение инвазии лимфатических сосудов (ILV), интра- и перитуморальных, на гистологических срезах становится чрезвычайно полезным. Цель исследования. Сравнительный анализ распределения интра- и перитуморальных лимфатических сосудов с определением степени ILV; и сравнение данных, полученных при помощи гистологического метода (окраска гематоксилином и эозином) с данными иммуногистохимического метода (маркер D2-40). Материалы и методы. Первичные опухоли, извлеченные у 74 пациенток с установленным морфопатологическим диагнозом: протоковый инвазивный рак молочной железы NOS, собранные в онкологическом институте Молдовы на протяжении 2012–2014 годов; определение степени клеточной дифференцировки производилось при помощи гистологического метода. Иммуногистохимическим методом была изучена экспрессия D2-40 в интра- и перитуморальных участках опухоли. Результаты. Статистический анализ перитуморальных лимфатических сосудов (D2-40 p.tum) с интратуморальными (D2-40 i.tum) выявило статистически значимую корреляцию (PCC-0.52; $p < 0.001$). Другая значимая корреляция проявляется при D2-40 положительных инвазированных сосудах (D2-40-ILV) между плотностью интратуморальных лимфатических сосудов (D2-40i.tum) (PCC-0.51; $p < 0.001$) и перитуморальных (D2-40p.tum) (PCC-0.63; $p < 0.001$). Анализ ILV (по интерпретации гистологическим методом) и ILV при применении D2-40 не выявило статистическую корреляцию. Выводы. D2-40 является селективным маркером лимфангиогенеза, очень полезным при качественном и количественном определении ILV. Интерпретация ILV гистологическим методом требует скрупулезности и является двусмысленным. Чем выше плотность перитуморальных лимфатических сосудов, тем выше плотность интратуморальных лимфатических сосудов. Степень ILV зависит от плотности лимфатических сосудов.

Ключевые слова: молекулярные подтипы, лимфангиогенез

Introducere. Statutul metastatic al nozior limfatici este unul din factorii primordialii diagnostici și pronostici în carcinomul mamar invaziv [1]. Procesul de metastazare se realizează prin intermediul vaselor limfatice preexistente cât și celor neformate la nivelul tumorii primare, spre nozii limfatici regionali (axilar în cele mai dese cazuri). Astfel determinarea invaziei limfatice vasculare (ILV) intra și peritumorală, pe speciemenle histologice devine extrem de utilă. La consensusul internațional de la St.Gallen din 2005 [2], a fost stabilită importanța gradului de invazie limfovaculară peritumorală, drept factor pre-

dictiv în carcinomul mamar invaziv la pacientele care au suportat eseu chirurgical [3],[7]. În mod curent invazia limfovaculară este determinată prin metoda histologică cu aplicarea hematoxilinei și eozinei. Embolii metastatice sunt vizualizați ca niște cuiburi de celule delimitate de un spațiu gol care „plutesc” în limitele unor structuri tubulare căptușite de celule fusiforme, ce amintesc forma celulelor endoteliale. Pentru confirmarea autenticității vasului respectiv, sunt aplicați markerii limfatici, folosindu-se metoda imunohistochimică. Astfel pentru analiza scrupuloasă a gradului de ILV, mai recent se folosesc markeri ca:

D2-40, LYVE-1, Prox-1, [6],[3],[17]. Densitatea limfovaculară a fost corelată cu pronosticul pacientelor cu diferite forme de carcinoame inclusiv carcinom mamar invaziv. În urma acestor cercetări s-a conchis că ILV reprezintă un indicator determinativ în stabilirea pronosticului în aceste maladii [6],[11],[15]. Cu toate acestea, elucidarea caracterului pronostic a ILV în carcinomul mamar invaziv, nu a fost pe deplin realizată.

Scopul lucrării. Analiza comparativă a distribuției vaselor limfatice la nivelul plăjelor peritumorale și celei intratumorale cu determinarea gradului ILV. Compararea datelor obținute prin metoda histologică (hematoxilina și eozină), cu cele determinate imunohistochemic (aplicarea markerului limfatic D2-40).

Material și metode

Pacienți. Pentru realizarea studiului au fost selectate 74 cazuri. Materialul morfologic a fost prelevat din tumoarea primară a pacientelor cu carcinom mamar ductal invaziv de tip NOS. (*not otherwise specified*), colectate la IMSP Institutul Oncologic din Republica Moldova în perioada anilor 2012 - 2014. Vârsta pacientelor a variat între 33-86 ani (56.6 ± 1.3 ; mediana 56.5). Pacientele nu au fost supuse tratamentului chimio/radioterapeutic anterior eselui chirurgical.

Procesarea primară. Procesarea primară a materialului a fost efectuată prin fixarea timp de 24 ore în formalină tamponată 10%, pH 7.2-7.4, cu includere ulterioară în parafină conform procedurii standard.

Secțiunile au fost realizate cu microtomul Shandon, HM355S Automatic Microtome, Thermo Scientific, USA, cu grosimea de 3 μm și etalate pe lame silanate (S3003, Dako, Denmark).

Metoda histologică. Toate secțiunile au fost colorate inițial prin metoda clasică convențională cu hematoxilina-eozină, utilizând hematoxilina Harris (HHS32, Sigma Aldrich) și eozina CS701 (Dako, Denmark). Specimenele tisulare au fost evaluate histologic (tipul, gradul de diferențiere după Scarff-Bloom-Richardson). Utilizând această metodă s-a determinat prezența vaselor limfatice care centrau emboli tumorali. Am considerat pozitive cazurile în care erau prezente structuri vasculare cu emboli tumorali.

Metoda imunohistochemică. Toate procedeele de deparafinare, demascare și vizualizare au fost efectuate automat, utilizând Leica Bond-Max (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) autostainer: *deparafinarea* în două băi de Bond Dewas Solution (cod AR9222, Leica Biosystem) a 5 minute fiecare, urmată de 3 băi în alcool de 100%, 90%, 70% de 2 minute fiecare, urmate cu rehidratare de 5 minute în apă; *demascarea* cu Bond epitope Retrieval Solution2 (cod AR9640); blocarea activității peroxidazei endo-

gene a fost efectuată prin tratarea secțiunilor timp de 5 minute cu Dako Real Peroxidase-Blocking Solution (cod S2023, Dako); *vizualizarea* cu Bond Polymer Refine Detection System (cod DS9800). Contracolorarea nucleilor s-a efectuat cu hematoxilina Mayer, modificată după Lille (cod HMM500, ScyTek Laboratories, Inc). Ulterior, testele histologice au fost deshidratate manual în serii crescute de alcool etilic (70%-100%), clarificate cu xilen și montate cu soluția Leica Mount (Leica Biosystems, cod 14046430011).

Toate speciemenle au fost studiate imunohistochemic, prin aplicarea anticorpului limfangiogenic D2-40.

Evaluare microscopică. Expresia vaselor D2-40 pozitive a fost evaluată în corespundere cu ghidul Dako, EGFR PharmDX™ (Dako, Denmark). Folosind metoda „Hot-spot”, am cuantificat vasele limfatice în ariile peritumorale (p.tum) și intratumorale (i.tum). Utilizând aceeași metodă de cuantificare am determinat vase D2-40 pozitive invadate cu emboli tumorali. Cuantificarea celulelor pozitive s-a efectuat la microscopul Nikon Eclipse 80i, cu cameră video Nikon DS-Fi1 (Nikon Instruments Europe BV).

Metode statistice. Rezultatele studiului au fost stocate și grupate în baza de date Access 2007 (Microsoft Office4 2007). Prelucrarea statistică a fost efectuată prin intermediul soft-ului Winstat 2012.1 (R. Titch Software, Bad Krozingen, Germany). Pentru evidențierea gradului de asociere dintre valorile analizate în studiu, au fost efectuate teste de corelație a rangurilor (coeficientul de corelare Pearson (PCC)). Gradul asocierii a fost analizat în corespundere cu recomandările lui Evans J.D (1996): 0-0.19 – corelație foarte slabă; 0.20-0.39 – corelație slabă; 0.40-0.59 – corelație rezonabilă; 0.60-0.79 – corelație înaltă; 0.80-1.0 – corelație foarte înaltă. Valoarea de prag pentru rezultatele semnificativ statistice a fost stabilită la un $p \leq 0.05$.

Aspecte etice. Studiul a fost aprobat de către Comitetul de Etică a Cercetării al Universității de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova (numărul de omologare 21/13 din 31.03.2014).

Rezultate. La analiza speciemenelor în hematoxilina și eozina, vasele limfatice au fost determinate cu greu, relevante fiind cele cu lumen mare, și endoteliul vaselor net vizibil. Prezența ILV a fost desemnată în prezența cuiburilor de celule canceroase circumscrise endoteliului D2-40 pozitiv. Cele mai multe vase limfatice au fost determinate în aria peritumorale (maxim 46, mediana 7), pe când în zona centrală a tumorii ele au constituit o pondere numerică mult mai mica (maxim 7, mediana 0) în multe cazuri fiind chiar absentă (23 cazuri-30.6%). În adaos analiza statistică

Tabelul 1

	HE-ILV	D2-40-ILV	D2-40i.tum	D2-40p.tum
HE-ILV				
PCC		-0.10	0.07	-0.03
p		0.21	0.28	0.39
D2-40-ILV				
PCC	-0.10		0.51	0.63
p	0.21		0.001	0.001
D2-40i.tum				
PCC	0.07	0.51		0.52
p	0.28	0.001		0.001
D2-40p.tum				
PCC	-0.03	0.63	0.52	
p	0.39	0.001	0.001	

a vaselor din aria periferică a tumorii (D2-40p.tum) cu cele intratumorale (D2-40i.tum) a scos în vizor o corelație statistic semnificativă (PCC-0.52; $p < 0.001$) (Tabelul 1). O corelație semnificativă este evidentă în cazul analizei statistice a vaselor D2-40 pozitive invadate (D2-40-ILV) a densității limfatice vasculare intratumorale (D2-40i.tum) (PCC-0.51; $p < 0.001$) și peritumorale (D2-40p.tum) (PCC-0.63; $p < 0.001$). Aceeași analiză a ILV (evaluată prin metoda histologică) și ILV prin aplicarea D2-40 (Tabelul 1) nu au prezentat corelație statistică ceea ce ne direcționează să constatăm că gazda embolilor tumorali sunt vasele peritumorale cu lumen larg. Aceste vase embolizate sunt destul de precis observate prin metoda histologică doar că cea imunohistochimică este mult mai selectivă. Rata de ILV în colorație standard hematixilină și eozină a constituit 91.8%, pe când a ILV prin aplicarea D2-40 a fost 39.2%. Țin să menționez că discrepanța apărută reprezintă existența artefactelor de retracție în hematoxilină/eozină, supraestimarea formelor morfologice papilar invazive de carcinom mamar și nu în ultimul rând strecurarea erorilor în cazul analizării specimenelor în secțiuni diferite.

Discuții. Semnificația pronostică a prezenței metastazelor în ganglionii regionali, este cunoscută și mult studiată [1]. Prezența metastazelor unice la nivelul acestor organe, și rolul lor predictiv este puțin elucidată de cercetători, dar cu certitudine se cunoaște faptul că tumorile secundare mai mari de 2 mm, precum și prezența de nozi limfatici invadați presupun un pronostic nefavorabil și un parcurs clinic delicent [2],[19].

ILV precum și DVL (densitatea vaselor limfatice), urmează să fie analizați ca factori secundari determinanți în procesele evolutive ale carcinomului mamar invaziv ambii fiind considerați indici cu semnificație pronostică în această maladie [6],[8],[10],[14]. Cu

toate acestea densitatea vaselor D2-40 pozitive intratumoral (D2-40i.tum), sunt mult mai puține, în majoritatea cazurilor absentă [8]. Prezența vaselor D2-40i.tum în număr mic denotă un indice de proliferare minim comparativ cu leziunile benigne non-neoplazice ale glandei mare [8].

Cele mai multe vase limfatice au fost vizualizate în zona periferică a tumorii primare. Cu toate acestea în zona peritumorală erau prezente un număr impunător de vase limfatice invadate. Acest fenomen poate fi observat inclusiv în formele maligne inflamatorii, doar că în acest caz apar zone cu infiltrat leucocitar fără ILV și arii peritumorale ce conțin vase limfatice invadate fără infiltrat exudativ.

În stabilirea autenticității vaselor pe larg în practica morfologică se utilizează markerii limfatici. Este specificat că D2-40, se exprimă în exclusivitate pe endoteliul vascular limfatic, măcar că ultimele cercetări denotă caracterul ambiguu a exprimării acestuia în raport cu endoteliul vaselor sanguin [6],[8],[11],[13],[15],[17],[20].

Concluzii

1) D2-40 este un marker limfangiogenic selectiv, foarte util în stabilirea calitativă și cantitativă a gradului de ILV. Interpretarea ILV prin metoda clasică poartă caracter ambiguu și necesită minuțiozitate în diagnostic.

2) Densitatea limfatică intratumorală este cu atât mai intensă cu cât crește cea peritumorală.

3) Gradul de invazie limfatică vasculară este cu atât mai acerb cu cât densitatea limfatică vasculară este mai mare.

Bibliografie

1. Cody H.S.; Borgen P.I.; Tan L.K.;; *Redefining prognosis in node-negative breast cancer can sentinel lymph node biopsy raise the threshold for systemic adjuvant therapy?* *Ann Surg Oncol* 11(3 Suppl): 227S-230S, 2004.

2. Goldhirsch A.; Glick J.H.; Gelber R.D.; Coates A.S.; Thurlimann B.; Senn H.J.;: *Meeting highlights. International Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005. Ann of Oncology* 16:1569-1583, 2005.
3. Pinder S.E.; Ellis I.O.; Galea M.; O'Rourke S.; Blamey R.W.; Elston C.W.;: *Pathological prognostic factors in breast cancer. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. Histopathology* 24: 41-47, 1994.
4. Kato T.V.; Kameoka S.; Kimura T.; Nishikawa M.; Kobayashi.;: *The combination of angiogenesis and blood vessel invasion as a prognostic indicator in primary breast cancer. Br J Cancer* 88: 1900-1908, 2003.
5. Hasebe T.; Sasaki S.; Imoto S.; Ochiai A.;: *Histological characteristics of tumor in vessels and lymph nodes are significant predictors of progression of invasive ductal carcinoma of the breast. A prospective study. Hum Pathol* 35: 298-308, 2004.
6. Schoppmann S.F.; Bayer G.; Aumayr K.; Taucher S.; Geleff S.; Rudas M.; Kubista E.; Hausmaninger H.; Samonigg H.; Gnant M.; Jakesz R.; Horvat R.;: Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group: *Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. Ann Surg* 240: 306- 312, 2004.
7. de Mascarel I.; Bonichon F.; Durand M.; Mauriac L.; MacGrogan G.; Soubeyran I.; Picot V.; Avril A.; Coindre J.M.; Trojani M.;: *Obvious peritumoral emboli: an elusive prognostic factor reappraised. Multivariate analysis of 1320 node-negative breast cancers. Eur J Cancer* 34: 58-65, 1998.
8. Agarwal B.; Saxena R.; Moriyama A.; Mehrtra S.; Bades S.;: *Lymphangiogenesis does not occur in breast cancer. Am J Surg Pathol* 29: 1449-1455, 2005.
9. Nakamura Y.; Yasuoka H.; Tsujimoto M.; Imabun S.; Nakahara M.; Nakao K.; Nakamura M.; Mori I.; Kakudo.;: *Lymph vessel density correlates with nodal status, VEGF-C expression and prognosis in breast cancer. Breast Cancer Res Treat* 91: 125-132, 2005.
10. Chunnick G.H.; Jiang W.G.; Gomez K.F.; Mansel R.E.;: *Lymphangiogenesis and breast cancer metastasis. Histol Histopathol* 17: 863-870, 2002.
11. Zeng Y.; Opeskin K.; Horvath L.G.; Sutherland R.L.; Williams E.D.;: *Lymphatic vessel invasion and lymph node metastasis in prostatic cancer. Prostate* 65: 222-230, 2005.
12. Kyzas P.A.; Geleff S.; Batistatou A.; Agnantis N.J.; Stefanou D.;: *Evidence of lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. J Pathol* 206: 170-177, 2005.
13. Schmid K.; Birner P.; Gravenhort V.; End A.; Geleff S.;: *Prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in neuroendocrine tumors of the lung. Am J Surg Pathol* 29: 324-328, 2005.
14. Schloppmann S.F.; Birner P.; Studer P.; Breitenecker- Geleff S.;: *Lymphatic microvessel density and lymphovascular invasion assessed by anti-podoplanin immunostaining in human breast cancer. Anticancer Res* 21: 2351-2355, 2001.
15. Birner P.; Obermair A.; Schindl M.; Kowalski H.; Breitenecker G.; Oberhber G.;: *Selective immunohistochemical staining of blood and lymphatic vessels reveals independent prognostic influence of blood and lymphatic vessel invasion in early-stage cervical cancer. Clin Cancer Res* 7: 93-97, 2001.
16. Renyi-Vamos F.; Tovari J.; Filinger J.; Timer J.; Paku S.; Kenessey T.; Ostoros G.; Agoes L.; Soltesz I.; Dame B.;: *Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res* 11: 7344-7353, 2005.
17. Nakamura Y.; Yasuoka H.; Tsujimoto M.; Kurozumi K.; Nakahara M.; Nakao K.; Kakudo K.;: *Importance of lymph vessels in gastric cancer. A prognostic indicator in general and a predictor for lymph node metastasis in early stage cancer. J Clin Pathol* 59: 77-82, 2006.
18. Elston E.W.; Ellis I.O.;: *Method for grading breast cancer. J Clin Pathol* 46: 189-190, 1993.
19. Moriya T.; Usami S.; Tada H.; Kasajima A.; Ishida K.; Kariya Y.; Ohuchi N.; Sasano H.;: *Pathological evaluation of sentinel lymph nodes for breast cancer. Asian J Surg* 27:256-261, 2004.
20. Evangelou E.; Kyzas P.A.; Trikalinos T.A.;: *Comparison of the diagnostic accuracy of lymphatic endothelial markers. Bayesian approach. Mod Pathol* 18: 1490-1497, 2005.
21. Ishida T.; Ohuchi N.;: *The degree of the completion for of breast conserving surgery. J Clin Surg* 57: 283-288, 2003. (In Japanese).