

Untersuchungen über die Invasion von Tumorzellen des malignen Melanoms in die dermalen Lymph- und Blutgefäße

A. DEUTSCH*, D. LUBACH** u. S. NISSEN**

* Abteilung für Funktionelle und Angewandte Anatomie,
Medizinische Hochschule Hannover

** Hautklinik Linden, Hannover

In dieser Mitteilung sollen weiterführende Untersuchungen über die Invasion von Melanomzellen in Blut- und Lymphgefäße der menschlichen Haut dargestellt werden. Dieser Bericht soll die Befunde, die an einer kleineren Anzahl von Tumoren ermittelt und bereits früher als Kongreßbeiträge publiziert wurden, ergänzen [1, 2].

Es wurden Stichproben (ca. 1 mm dicke Tumorscheiben) aus 60 Melanomen untersucht, deren maligne Zellen bereits das Korium infiltriert haben (Clark Level III-V). Um eine Beeinträchtigung der exakten histologischen Befundung zu vermeiden, erfolgte die Probeentnahme nicht aus dem Zentrum des Melanoms und ist somit nicht repräsentativ für den Gesamtumor. Die Proben entstammten von 27 Frauen und 33 Männern mit einem Durchschnittsalter von 58 Jahren (26-85). Nach einer Diffusionsfixierung mit Glutaraldehyd (3 % in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer pH 7,4) und Osmierung der Proben (1 % Osmiumtetroxyd in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer) erfolgte eine Einbettung in EPON 812. Toluidinblau gefärbte Semidünnschnitte (0,5 µm) wurden im Lichtmikroskop sorgfältig durchgemustert. Eine elektronenmikroskopische Aufarbeitung erfolgte von den Präparaten, in denen sich Melanomzellen unmittelbar an oder bereits in den dermalen Lymph- und Blutgefäßen befanden (55 Präparate aus 40 Melanomen).

Von insgesamt 60 untersuchten Melanomen konnten bei 20 Proben Einbrüche von Tumorzellen in die Lymphgefäße nachgewiesen werden. In drei Fällen, in denen die Lymphgefäße massiv invadiert sind, fanden wir außerdem Melanomzellen im Lumen postkapillärer Venolen. Innerhalb von Melanomen sind meist sowohl die initialen Lymphgefäße als auch die Blutgefäße stark dilatiert. Dabei ist das Lymphgefäßendothel verdickt.

Intraendothelial befinden sich zahlreiche elektronendichte rundliche Partikel, die bis zu 2 µm groß sein können. Bei diesen „schwarzen Kügelchen“ handelt es sich vermutlich um phagozytierte Melaninsyntheseprodukte, die lymphpflichtig sind [3]. Mitochondrien werden deutlich vermehrt gebildet und die Golgizonen sind gut ausgeprägt. Diese Befunde deuten auf eine gesteigerte Stoffwechsellaktivität der Lymphgefäßendothelien hin. Außerdem scheint der subendotheliale Faserfilz der initialen Lymphgefäße in vielen Proben besonders stark ausgeprägt zu sein. Da jedoch die physiologischen Schwankungen in der menschlichen Haut sehr groß sind, gibt es keine eindeutigen Vergleichswerte für die Breite und die Struktur des subendothelialen Faserfilzes. Die Wände der postkapillären Venolen sind proportional zur Gefäßdilatation verdünnt. Es finden sich keine morphologischen Hinweise für eine Veränderung* des Zellstoffwechsels.

Wie wir bereits gezeigt haben [2], bilden Melanomzellen in unmittelbarer Nähe von initialen Lymphgefäßen Zytoplasmaausläufer in Richtung auf den subendothelialen Faserfilz aus und durchdringen diesen. Anschließend schiebt sich der Zellausläufer zwischen Endothel und subendothelialen Faserfilz vor und bildet nun seinerseits Pseudopodien aus, die auf das Endothel hin gerichtet werden. Nach direktem Kontakt von Melanom- und Endothelzelle verschmelzen diese punktuell. Innerhalb dieser Areale bilden sich filamentöse Brücken aus. Nach Zerstörung des Endothels gelangen die Melanomzellen durch die so entstandene Öffnung auf direktem Weg in das Lymphgefäß. Die noch erhaltenen Endotheljunctionen in unmittelbarer Nachbarschaft der Einbruchstelle sowie intraluminale Endothelfragmente weisen auf ein gezieltes destruktives Einwanderungsverhalten der Melanomzellen hin (Abb. 1). Es muß

von einer Eigenbeweglichkeit der Melanomzellen ausgegangen werden, die auch von anderen Tumorzellen bekannt ist [4]. Die Ausbreitung der Melanomzellen aus dem Tumorzentrum in das Gewebe hinein erfolgt häufig entlang der Blutgefäße. Dabei nutzen die Melanomzellen wie Entzündungszellen die perivaskulären Räume, indem sie anscheinend außen an der Gefäßwand entlang gleiten.

In den Wandstrukturen der Blutgefäße waren in keinem Präparat Tumorzellen zu finden. Auch in den Präparaten, in denen sich Tumorzellen im Lumen einzelner Venolen befanden, sind keine Anhaltspunkte für eine Aktivierung (z.B. Zytoplasmaausläufer) einzelner Zellen gegenüber intakten Kapillaren zu erkennen. Die Melanomzellen scheinen regelrecht die äußeren Wandstrukturen zu umfließen, ohne jedoch morphologische Anzeichen für eine Invasionsbereitschaft zu zeigen (Abb. 2).

Wie können Melanomzellen dennoch in die Blutgefäße gelangen? Der Invasionsweg in die Venolen ist anhand der vorliegenden Befunde noch nicht rekonstruierbar, doch haben wir einige Hinweise dafür gefunden, daß vorgeschädigte Venolen einen Weg in das Blutgefäß darstellen. So fanden wir in einem Melanom, das sonst keine invadierten Blutgefäße aufwies, im Lumen einer intakten Kapillare Endothelzellen, denen Wandstrukturen der äußeren Gefäßwand (Basalmembranen) anhafteten. In einem anderen Tumor waren Melanomzellen innerhalb einer Venole zu erkennen, deren Endothel sich an einer Stelle von den äußeren noch teilweise vorhandenen Wandstrukturen abgelöst hatte (Abb. 3). Melanomzellen gelangen durch die Vasodilatation nahe an diese Defekte (Abb. 4). Eine andere theoretische Möglichkeit für die Melanomzellen in Blutgefäße zu gelangen, könnte darin bestehen, den Weg der Entzündungszellen zu kreuzen. Diese treten zahlreich in einem größeren Gefäßabschnitt aus den postkapillären Venolen aus. Dabei wird das Endothel über eine weite Strecke abgehoben. Die Venolen sind häufig so stark dilatiert, daß ihre Wand nur noch 1–2 µm dünn ist. Das Durchtreten von Entzündungszellen könnte eine partielle Zerstörung der Schutzfunktion der verdünnten äußeren Wandstrukturen verursachen und unmittelbar benachbarten Melanomzellen ein Eindringen ermöglichen (Abb. 5).

Bei den Blutgefäßen, die von Melanomzellen invadiert waren, handelte es sich bei unseren Untersuchungen stets um postkapilläre Venolen. Auffallend war, daß die intraluminalen Melanomzellen der Venolen fast alle starke Zellmembrandefekte aufwiesen, wogegen die Lymphgefäße größtenteils morphologisch vital erscheinende Tumorzellen enthielten (Abb. 3). Als Indiz dafür, daß möglicherweise die Lymphflüssigkeit eine relativ günstige Matrix für die Tumorzellen darstellt, werten wir den Befund einer intraluminalen mitotisch teilenden Melanomzelle. Außerdem fanden wir direkt vor einer

Lymphgefäßklappe lokalisiert ein Tumorzellkonglomerat in einem entzündlichen Randsaum eines Melanoms. Obwohl die Anzahl der Melanosomen in den Zellen stark variierte, war die morphologische Strukturierung der Zellen identisch. Die einzelnen Zellgrenzen der Tumorzellen waren ultrastrukturell kaum voneinander zu trennen. Ergänzt man diese Befunde durch ältere histologische Nachweise von bevorzugt an Lymphgefäßklappen lokalisierten solitären subklinischen Mikrometastasen [5, 6], so ergeben sich Hinweise, daß in einzelnen Fällen die Melanomzellen intralymphatisch zellteilungsfähig sind. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß bei der Invasion von Tumorzellen des malignen Melanoms initiale Lymphgefäße deutlich höher beteiligt sind als Blutgefäße. Bei steigender Tumordicke ist die Wahrscheinlichkeit größer, daß Gefäßinvasionen vorliegen:

Vertikale Tumordicke nach Breslow	Anzahl der Melanome	Einbrüche in Lymphgefäße	Einbrüche in Blutgefäße	Einbr. in %
„low risk“ < 0,75 mm	7	0	0	0
„medium risk“ 0,75–1,49 mm	25	3	0	12
„high risk“ 1,5–2,99 mm	15	8+2*	1	53
> 3,0 mm	13	9+1*	2	69
Summe > 1,5 mm	28	17+3*	3	61
Summe insgesamt	60	20+3*	3	33

*Melanomzellen stehen in direktem Kontakt zu dem Endothel der initialen Lymphgefäße, haben diese jedoch nicht invadiert.

Es handelt sich typischerweise um einzelne Melanomzellen, die aktiv in ein initiales Lymphgefäß, das zentral im Tumor lokalisiert ist, invadieren. Während Entzündungszellen über geöffnete interendotheliale Fugen in die Lymphgefäße gelangen [7], zerstören die Tumorzellen das Endothel an der Invasionsstelle. In fünf Präparaten enthielt ein Großteil der initialen Lymphgefäße zahlreiche Tumorzellen, während sich in anderen lediglich ein oder zwei betroffene Gefäßabschnitte auffinden ließen. In den Melanomen mit Gefäßinvasionen befinden sich immer mehrere Tumorzellen im Lumen eines Lymphgefäßes, die untereinander keinen Kontakt haben. Einen intraluminalen Zellverband konnten wir lediglich einmal vor einer Lymphgefäßklappe nachweisen.

Die deutliche Bevorzugung der initialen Lymphgefäße bei der vaskulären Invasion von Melanomzellen in die Haut könnte physiologisch begründet sein. Die initialen Lymphgefäße übernehmen die Entsorgung des Interstitiums von zahlreichen Abfallprodukten des lokalen Stoffwechsels. Größere korpuskuläre Bestandteile und

Zellen scheinen das Korium ausschließlich über die initialen Lymphgefäße zu verlassen (s. Kongreßbeitrag Lubach et al). Experimentell konnte durch von Hauk et al. nachgewiesen werden, daß fluoreszenzmarkierte Moleküle aus den Blutgefäßen über Leitstrukturen im Gewebe zu den Lymphgefäßen gelangen [8]. Auch die Entzündungszellen scheinen bevorzugte Wege durch das Interstitium zu haben [9]. Obwohl die Melanomzellen ein anderes Invasionsverhalten in die initialen Lymphgefäße aufweisen, ist es denkbar, daß sie in der Lage sind, diese physiologischen Wege zu nutzen. Gegenüber dem subendothelialen Faserfilz zeigen sowohl Entzündungszellen als auch Melanomzellen eine Aktivität (Zytoplasmaausläufer). Dieses weist darauf hin, daß hier Moleküle vorhanden sind, die direkt auf die Zellen wirken. Dagegen sind physiologische Zelleinwanderungen in die Blutgefäße der Haut nicht bekannt. Die äußeren Wandstrukturen der Blutgefäße bieten weder für Entzündungs- noch für Melanomzellen Anreize zur Aktivierung. Vermutlich fehlen hier die notwendigen Strukturen, um eine Invasion von Zellen zu ermöglichen.

Literatur

[1] Deutsch, A., Neukam, D., Lubach, D., Berens von Rautenfeld, D., Nissen, S. (1989): Transmissionselektronenmi-

kroskopische Untersuchungen über das Verhalten von Lymph- und Blutgefäßen in Melanomexzisaten. *Zbl Haut*: 156; 571.

- [2] Platschek, H., Lubach, D., Deutsch, A., Nissen, S. (1990): Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen über das Verhalten von Lymph- und Blutgefäßen in Melanomexzisaten. In: Baumeister R. G. H. (Hrsg.) *Lymphologica - Jahresband 1990*. Medikon Verlag München; S. 96-97.
- [3] Ohkuma, M., Seiji, M. (1973): Lymphatic transport of Melanosomes to the lymph node. *Tokio J Exp Med*: 111, 271-279.
- [4] Fasse, E., Fetting, R., Ruhland, D., Schubert, T., Theumaun (1975): Die Kolonisation transplantierte virusbildender Leukämiezellen in der Leber der Maus. *Z Krebsforsch*: 84; 257-269.
- [5] Herzberg, J. J. (1964): Das Verhalten der kutanen Lymphgefäße beim malignen Melanom. *Arch Klin Exp Derm*: 220; 120-141.
- [6] Nödl, F. (1970): Die Lymphbahnen beim malignen Melanom. *Arch Klin Exp Derm*: 238; 169-178.
- [7] Buchholz, T. (1990): Der Zelltransfer in das initiale Lymphgefäßsystem. Diss. Med. Hochschule Hannover.
- [8] Hauk, G., Bröcker, W., Weigelt, H. (1978): The prelymphatic transinterstitial pathway. *J Lymphology*: 2; 70-74.
- [9] Buchholz, T., Lubach, D., Berens v. Rautenfeld, D. (1990): Der Zelltransfer in das initiale Lymphgefäßsystem. In: Baumeister R. G. H. (Hrsg.) *Lymphologica-Jahresband 1990*. Medikon Verlag München.

Legenden zu den Abbildungen:

Abb. 1: Schematische Rekonstruktion der Invasionsschritte einer Melanomzelle in ein initiales Lymphgefäß.

1. Annäherung an die äußeren Wandstrukturen (MC = Melanomzelle; SF = subendothelialer Faserfilz; En = Endothel; EF = elastische Faser).

2. Nach Erreichen des subendothelialen Faserfilzes werden Zytoplasmaausläufer ausgebildet.

3. Zellausläufer schieben sich unter den subendothelialen Faserfilz an das Endothel.

4. Punktuelle Verschmelzung von Melanom- und Endothelzelle.

5. Invasion der Melanomzelle durch Destruktion der Endothelzelle.

6. Die vitale Tumorzelle befindet sich nun im Lumen der initialen Lymphgefäße.

Abb. 2: Zahlreiche Melanophagen und Melanomzellen (→) legen sich um die äußeren Blutgefäßwände, ohne diese zu infiltrieren. Balken = 1 µm

Abb. 3: Melanomzellen eines Tumors befinden sich im Lymphgefäß (Ly) und in einer postkapillären Venole (Ve). Das Endothel der Venole ist streckenweise destruiert (→ ←). In den äußeren Wandstrukturen dieses Gefäßes befinden sich lediglich Lymphozyten. Die Tumorzellen sind im Gegensatz zu den Zellen im Lymphgefäß morphologisch nicht vital.

Balken = 1 µm

Abb. 4: Melanomzelle (MZ) in unmittelbarer Nähe eines Areals, in dem das Blutgefäßendothel (En) destruiert ist.

Balken = 10 µm

Abb. 5: Melanomzelle (MZ) in unmittelbarer Nähe eines Lymphozyten (Lz), der gerade eine postkapilläre Venole verläßt.

En = Endothel; P = Perizyt; Balken = 10 µm

Offizielles Organ der Gesellschaft
Deutschsprachiger Lymphologen

Lymphologica

Jahresband 1992

Ausgewählte Vorträge der Lymphologica '91
Hannover, 7. - 10. März 1991

Herausgeber:
D. Berens v. Rautenfeld
H. Weissleder

R. G. H. Baumeister
L. Clodius
E. Conradi
E. Földi
E. Kaiserling
C. Poulsen Nautrup
K. U. Tiedjen

KAGERER  KOMMUNIKATION

Bonn 1992