

# Význam lymfangiogenézy a ultraštruktúry lymfatických kapilár pri metastázovaní malígneho melanómu

Eva Rovenská

*Klinika chirurgickej onkológie Slovenskej zdravotníckej univerzity a Národného onkologického ústavu, Bratislava, Slovenská republika, prednosta prof. MUDr. Juraj Pechan, CSc.*

## Súhrn

Lymfangiogenéza – tvorba lymfatických kapilár – v malígnom melanóme a v jeho blízkom okolí zohráva dôležitú úlohu pri metastázovaní tumorózných buniek z malígneho melanómu do organizmu. Malígny melanóm produkuje epidermálny rastový faktor EGF, ktorý indukuje tvorbu cievneho rastového endotelového faktora VEGF-C, a tým spúšťa lymfangiogenézu. Je veľmi pravdepodobné, že malígne bunky z melanómu vstupujú do lymfatických kapilár aj cez špecializované inter-endotelové spojenia (endotelové mikročlopne, primárne chlopne) situované v ich stenách. Po vstupe malígnych buniek do lymfatických kapilár putujú tieto bunky v lymfe do sentinelovej lymfatickej uzliny. Malígne bunky môžu pravdepodobne lymfogénne metastázovať priamo aj do distálnych spádových lymfatických uzlín. Vo včasnom štádiu malígneho melanómu sa nevylučuje ani hematogénna cesta metastázovania.

**Kľúčová slova:** lymfangiogenéza – malígny melanóm – sentinelová uzlina

## Importance of lymphangiogenesis and ultrastructure of lymphatic capillaries in metastasis of malignant melanoma

### Summary

Lymphangiogenesis – proliferation of lymphatic capillaries – in melanoma and in its vicinity plays an important role in metastatic process of malign melanoma cells in organism. Melanoma produces epidermal growth factor EGF which induces vascular endothelial growth factor VEGF-C and thereby starts lymphangiogenesis. It is very probable that malignant melanoma cells enter lymphatic capillaries also through specialized inter-endothelial junctions (endothelial microvalves, primary valves) situated in their walls. After entry of malign cells into lymphatic capillaries, these cells travel in lymph to the sentinel lymph node. Malign cells metastasize through lymphatic vessels probably also directly into distal regional lymphatic nodes. Metastasizing through blood vessels is suggestible also in early stage melanoma.

**Key words:** lymphangiogenesis – malignant melanoma – sentinel lymph node

### Lymfatické cievy

Metastatické šírenie malígnych buniek cestou lymfatického systému postihuje ročne tisíce pacientov. Úloha lymfatických ciev v podpore šírenia metastatického malígneho ochorenia si za posledných 15 rokov vyžiadala zvýšenú vedeckú a klinickú pozornosť [1]. Pri metastázovaní malígneho melanómu (aj iných nádorov) do sentinelovej lymfatickej uzliny a tiež do spádových lymfatických uzlín putujú malígne nádorové bunky cez lymfatické cievy. Ako sentinelovú lymfatickú uzlinu označujeme tú uzlinu alebo skupinu uzlín, ktoré by nádorové bunky pri svojej migrácii nemali obísť, a preto sú najpravdepodobnejšie postihnuté metastázami,

pričom sa nemusí jednať o uzliny, ktoré sa nachádzajú k tumoru anatomicky najbližšie [2].

Anatomické územie lymfatického systému je veľmi rozsiahle. Podľa Olszowskeho k lymfatickému systému patria: interstícium, lymfatické cievy, lymfatické orgány a ich pohybliví poslovia – migrujúce bunky imunitného systému [3,4]. Lymfatické cievy tvoria v tele drenážny systém, ktorý pozostáva z lymfatických kapilár, prenodálnych lymfatických ciev a postnodálnych lymfatických ciev. Postnodálne lymfatické cievy sa zbiehajú do väčších lymfatických ciev, ktoré privádzajú lymfu do ductus thoracicus a do ductus lymphaticus dexter, ktoré ústia do sútokov veľkých vén. Systém

lymfatických ciev tvorí funkčný celok s prelymfatickými tkanivovými kanálkami v interstíciu spojivového tkaniva. Tkanivové kanálky, ktoré zobrazila pomocou transmisnej elektrónovej mikroskopie Casley-Smithová, sú ohraničené vláknami spojivového tkaniva, ale nie sú vystlané endotelom [5,6].

Veľký pokrok vo výskume lymfatického systému nastal v 20. storočí. Nové nálezy boli publikované o recirkulácii lymfocytov a proteínov, o ultraštruktúre lymfatických kapilár, o spontánnej kontraktilite lymfatických ciev a o transporte mikroorganizmov lymfou. Objavy umožnili, že lymfatické cievy je možné vizualizovať in vivo pomocou vitálnych farbív, kontrastných látok, radionuklidových lymfangiogramov a pomocou molekúl špecifických pre endotel lymfatických kapilár [7].

Dôležité poznatky o drenážnej funkcii lymfatických ciev získali už pomocou svetelnej mikroskopie Pullinger a Florey v roku 1937. Títo autori zistili, že pri zápale v interstíciu spojivového tkaniva lymfatické cievy proliferujú, nastáva lymfangiogenéza a tieto cievy odvádzajú z postihnutého tkaniva debris [8]. Steny lymfatických kapilár sa skladajú z endotelových buniek, ktoré nie sú lemované súvislou bazálnou membránou. Pullinger a Florey v roku 1935 pri štúdiu kože s edémom u experimentálnych zvierat zistili, že vlákna z okolitého spojivového tkaniva sú zakotvené na niektorých miestach priamo do bunkovej membrány endotelových buniek, takže lymfatické kapiláry ani počas edému nekolabujú [9]. Až v roku 1966 opísali Leak a Burke pomocou transmisnej elektrónovej mikroskopie ultraštruktúru špecializovaných spojení medzi endotelovými bunkami lymfatických kapilár [10].

### Lymfangiogenéza indukovaná malígnym melanómom

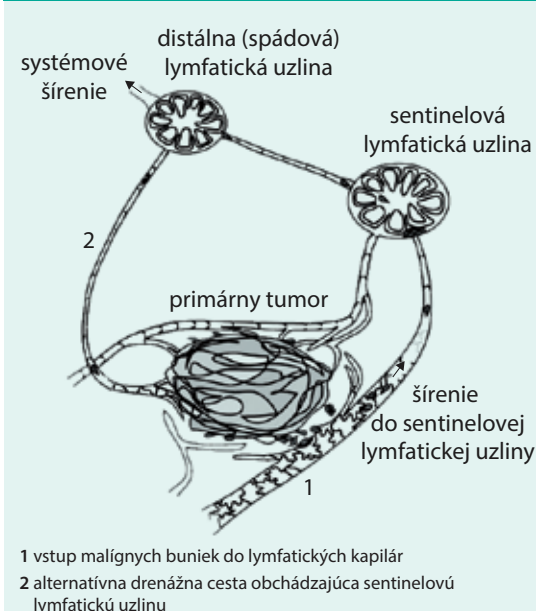
Blížšie skúmanie lymfangiogenézy, teda rastu nových lymfatických ciev, ktorú môžu spustiť patologické procesy ako napr. zápal a zhubný nádor, významne prispelo aj k pochopeniu princípu metastázovania buniek malígneho melanómu do sentinelovej uzliny [11,12]. Dôležitým spúšťačom lymfangiogenézy je cievny endotelový rastový faktor (vascular endothelial growth factor – VEGF-C), ktorý pôsobí väzbou na hlavný lymfangiogénny receptor (vascular endothelial growth factor receptor – VEGFR-3) [1]. Štúdia Cianfarani et al preukázala zvýšenú expresiu VEGF-C v primárnom ložisku malígneho melanómu, ktorá bola štatisticky významne spojená s pozitívnou biopsiou sentinelovej uzliny najmä u tenkého melanómu ( $p < 0,001$ ) [13]. Práca Brachera z roku 2013 priniesla poznatok, že sérová hladina z tumoru derivovaného epidermálneho rastového faktora (epidermal growth factor – EGF), ktorý je induktorom VEGF-C, je preukázane zvýšená u pacientov s metastatickým melanómom postihnutím sentinelovej uzliny. Táto skutočnosť poukazuje na aktívnu spoluprácu lymfatických ciev na metastatickom šírení malígnych buniek [14]. Lymfatické cievy teda už dnes nie sú považované len za štruktúry

pasívne napadnuté infiltrujúcimi malígnymi bunkami, ale zhubnou lymfangiogenézou sa stávajú aktívnym činiteľom v procese metastázovania malígneho melanómu do sentinelových uzlín [15].

### Metastázovanie malígneho melanómu

V súčasnosti sa v odborných prácach diskutuje o niekoľkých kľúčových cestách šírenia buniek malígneho melanómu do lymfatickej a krvnej cirkulácie (obr.). Podľa tradičnej sekvenčnej hypotézy vzniku systémového šírenia malígneho ochorenia vstupujú metastatické bunky do lymfatických ciev, ktoré drénujú oblasť tumoru, pokračujú do sentinelovej uzliny, odkiaľ nastáva diseminácia do distálnych spádových lymfatických uzlín, krvnej cirkulácie a vzdialených orgánov. Sentinelová uzlina sa teda stáva určitou dočasnou bariérou pre metastaticky sa šíriace melanómové bunky [1]. Podľa inkubátorovej hypotézy primárny melanóm vysiela do sentinelovej uzliny imunosupresívne signály, ktoré pripravujú mikropredstredie v sentinelovej lymfatickej uzline na uchytenie a rast metastatických melanómových buniek [16,17]. Dadrás et al v svojej práci dokázali, že metastatické bunky z primárneho tumoru si zachovávajú svoju lymfangiogénnu aktivitu naďalej aj v lymfatických uzlinách, ktoré napadli [18]. Metastatické postihnutie sentinelovej uzliny je významným prognostickým faktorom pre prežívanie pacientov s malígnym melanómom [19]. V multicentrickej štúdii Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial-I (MSLT-I) bolo 5-ročné prežívanie u pacientov s negatívnym výsledkom biopsie sentinelovej uzliny (90,2 %) podstatne vyššie ako u pacientov s pozitívnou biopsiou sentinelovej uzliny (72,3 %;  $p < 0,001$ ).

**Obr. Šírenie buniek malígneho melanómu do lymfatických ciev. Upravené podľa [1].**



Vychádzajúc z údajov potvrdených v MSLT-I štúdiu, že v celkovom prežívaní ramena pacientov, ktorí sa pri excízii primárneho ložiska podrobili biopsii sentinelovej uzliny a ramena pacientov, ktorí boli po excízii len klinicky monitorovaní na príznaky ochorenia sa nepreukázal rozdiel, je potrebné mať na zreteli, že pri šírení malígneho melanómu od počiatku ochorenia zohráva úlohu zrejme aj priama hematogénna cesta [20].

Pri hematogénnom metastázovaní malígneho melanómu Alitalo a Detmar predpokladajú, že malígne bunky vstupujú do krvnej cirkulácie priamo v primárnom tumore, ďalej cestou venúl s vysokým endotelom (high endothelial venules – HEV) situovaných v lymfatických uzlinách alebo až cestou lymfatickej drenáže do sútoku veľkých vén. Pri lymfogénnom metastázovaní sa transport metastatických buniek melanómu uskutočňuje cestou intra- alebo peritumorálnych lymfatických ciev [1]. Štúdia Dadrása et al z roku 2005 zistila imuno fluorescenčným vyšetrením zvýšenú hustotu lymfatických ciev v tumore a v okolí hranice tumoru v preparátoch melanómov od pacientov s pozitívnou biopsiou sentinelovej uzliny, zatiaľ čo u melanómov od pacientov s negatívnou biopsiou sentinelovej uzliny bolo v týchto lokalitách prítomných len veľmi málo lymfatických ciev. Naproti tomu bola distribúcia krvných ciev v tumoroch rovnaká u oboch skupín [18].

### Vstup malígnych buniek do lymfatických kapilár

Odpoveď na otázku, akým spôsobom vstupujú metastatické bunky do lymfatického systému, nie je doposiaľ jednoznačná. Jedným predpokladaným mechanizmom je priama indukcia dier do endotelovej vrstvy buniek lymfatických kapilár a tiež invázia v miestach medzi ich endotelovými bunkami [1]. Ďalej do úvahy prichádza aj vstup cez špecializované medzibunkové spojenia. Tieto medzibunkové spojenia pozostávajú z dvoch navzájom sa prekrývajúcich výbežkov (cípov) endotelových buniek. Vlákna z okolitého spojivového tkaniva sa zakotvujú len do vonkajšieho výbežku, takže vnútorný výbežok môže fungovať ako chlopňa, ktorá sa preklopí do lúmena lymfatickej kapiláry a umožní jednosmerný transport intersticiálnej tekutiny, veľkých molekúl a buniek imunitného systému z interstícia do lymfatickej kapiláry [10]. V špecializovaných inter-endotelových spojeniach v stenách lymfatických kapilár sa môže vytvoriť otvor široký až niekoľko mikrometrov [21]. Je veľmi pravdepodobné, že cez špecializované inter-endotelové spojenia vstupujú do lymfy lymfatických kapilár aj nádorové bunky. Pre tieto špecializované medzibunkové spojenia sa začalo používať aj pomenovanie endotelové mikrochlopne [22]. Neskôr tieto endotelové mikrochlopne lymfologovia pomenovali ako primárne chlopne [23]. Tieto primárne chlopne v spolupráci so sekundárnymi (klasickými) chlopňami situovanými v lúmenoch lymfatických ciev umožňujú jednosmerný tok lymfy počas spontánnej kontraktility lymfatických ciev.

Princíp premiestnenia tumorózných buniek lymfatickou cievnou do sentinelovej uzliny nie je dostatočne preskúmaný. Na tejto translokácii sa zrejme uplatňuje zvýšený tlak v interstíciu v oblasti tumoru, ktorý vytvára gradient, pozdĺž ktorého sú tieto bunky pasívne premiestňované do sentinelovej lymfatickej uzliny [1]. Popri tomto gradiente sa však pravdepodobne uplatňuje aj spontánna kontraktilná aktivita lymfatických ciev [24]. V tejto časti cesty lymfatickým systémom môže nastať aj dočasná stagnácia toku, ktorá zapríčini rast tumorózných buniek v lymfatickej cieve a vznik intranzitných alebo satelitných metastáz [1,25]. Metastázy vzdialené do 2 cm od primárneho tumoru sa nazývajú satelitné metastázy a metastázy lokalizované v oblasti vzdialenej viac ako 2 cm od miesta primárneho tumoru po spádovú lymfatickú oblasť sa označujú ako intranzitné metastázy [26,27]. Alitalo navyše predpokladá existenciu alternatívnych lymfatických drenážnych ciest z oblasti tumoru, ktoré obchádzajú sentinelové uzliny a drénujú tumorózne bunky priamo do distálnych (spádových) lymfatických uzlín [1].

### Záver

Záverom je možné zdôrazniť, že v procese lymfogénneho metastázovania malígneho melanómu sa významne podieľa lymfangiogenéza, ktorá je spúšťaná malígnym melanómom. Najdôležitejšie rastové faktory indukujúce tento proces sú EGF a VEGF-C. Vstup malígnych buniek do lymfatických kapilár nastáva pomocou indukcie dier v ich endotelových bunkách a pravdepodobne aj vstupom cez primárne chlopne v týchto cievnach.

### Literatúra

1. Alitalo A, Detmar M. Interaction of tumor cells and lymphatic vessels in cancer progression. *Oncogene* 2012; 31(42): 4499–4508.
2. Neoral Č, Bohanes T et al. Biopsie sentinelové uzliny. Galén: Praha 2012. ISBN 9788072628827.
3. Olaszewski WL. Interrelationships within the lymphatic system. In: Olaszewski WL (ed.) *Lymph Stasis: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment*. CRC Press: Boca Raton 1991: 5–12. ISBN 0–8493–6499-X.
4. Rovenská E, Rovenská E, Štvrtina S. Štruktúra a funkcia lymfatických ciev. In: Štvrtinová V (ed.) *Choroby ciev. SAP*. Bratislava 2008: 821–829. ISBN 978–80–8095–025–5.
5. Casley-Smith JR. The fine structure and functioning of tissue channels and lymphatics. *Lymphology* 1980; 13(4): 177–183.
6. Földi M, Staubesand J Die Lymphgefäße. In: Benninghoff A (ed) et al. *Makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Urban & Schwarzenberg: München-Wien-Baltimore 1985: 39–44.
7. Witte MH, Ohkuma M, Anrade M et al. Nature's historic gap: the 20th century of lymphology. *Lymphology* 2005; 38(4): 157–158.
8. Pullinger BD, Florey HW. Proliferation of lymphatics in inflammation. *J Pathol* 1937; 45(1): 157–170.
9. Pullinger BD, Florey HW. Some observations on the structure and functions of lymphatics: their behaviour in local oedema. *Brit J Pathol* 1935; 16(1): 49–61.
10. Leak LV, Burke JF. Fine structure of the lymphatic capillary and the adjoining connective tissue area. *Am J Anat* 1966; 118(3): 785–810.
11. Das S, Skobe M. Lymphatic vessel activation in cancer. *Ann NY Acad Sci* 2008; 1131: 235–241.

12. Tammela T, Alitalo K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell* 2010; 140(4): 460–476.
13. Cianfarani F, Mastroeni S, Odorisio T et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C in primary cutaneous melanoma predicts sentinel lymph node positivity. *J Cutan Pathol* 2012; 39(9): 826–834.
14. Bracher A, Cardona AS, Tauber S et al. Epidermal growth factor facilitates melanoma lymph node metastasis by influencing tumor lymphangiogenesis. *J Invest Dermatol* 2013; 133(1): 230–238.
15. Dadras SS. An unexpected role for EGF in lymphangiogenesis-mediated melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *J Invest Dermatol* 2013; 133(1): 14–16.
16. Morton DL. Overview and update of the phase III Multicenter Selective Lymphadenectomy Trials (MSLT-I and MSLT-II) in melanoma. *Clin Exp Metastasis* 2012; 29(7): 699–706.
17. Grotz TE, Mansfield AS, Jakub JW et al. Regional lymphatic immunity in melanoma. *Melanoma Res* 2012; 22(1): 9–18.
18. Dadras SS, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P et al. Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Mod Pathol* 2005; 18(9): 1232–1242.
19. Moehrl M, Schnippert W, Rassner G et al. Micrometastasis of a sentinel lymph node in cutaneous melanoma is a significant prognostic factor for disease-free survival, distant-metastasis-free survival, and overall survival. *Dermatol Surg* 2004; 30(10): 1319–1328.
20. Baldwin BT, Cherpelis BS, Sondak V et al. Sentinel lymph node biopsy in melanoma: facts and controversies. *Clin Dermatol* 2010; 28(3): 319–323.
21. Ikomi F, Hunt J, Hanna G et al. Interstitial fluid, plasma protein, collagen and leukocyte uptake into initial lymphatics. *J Appl Physiol* 1996; 81(5): 2060–2067.
22. Trzewick J et al. Evidence for a second valve system in lymphatics: endothelial microvalves. *FASEB J* 2001; 15(10): 1711–1717.
23. Schmid-Schönbein GW. The second valve system in lymphatics. *Lymphat Res Biol* 2003; 1(1): 25–29.
24. Sjöberg T, Steen S. Contractile properties of lymphatics from human lower leg. *Lymphology* 1991; 24(1): 16–21.
25. Krajsová I. *Melanom*. Maxdorf: Praha 2006. ISBN 80–7345–096–8.
26. Garbe C, Peris K, Hauschild A et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline-update 2012. *Eur J Cancer* 2012; 48(15): 2375–2390.
27. Wong SL, Balch CM, Hurley P et al. Sentinel lymph node biopsy for melanoma: American society of clinical oncology and society of surgical oncology joint clinical practice guideline. *J Clin Oncol* 2012; 30(23): 2912–2918.

**MUDr. Eva Rovenská**

✉ [rovenska@yahoo.com](mailto:rovenska@yahoo.com)

Národný onkologický ústav, Bratislava

[www.nou.sk](http://www.nou.sk)

*Doručeno do redakce 3. 3. 2014*

*Přijato po recenzi 13. 5. 2014*