

OFFICIAL ORGAN
OF THE



EUROPEAN GROUP
OF LYMPHOLOGY

GROUPEMENT EUROPÉEN
DE LYMPHOLOGIE

LATINO-MEDITERRANEAN
CHAPTER OF LYMPHOLOGY

THE EUROPEAN JOURNAL OF lymphology and related problems

VOLUME 5 • No. 19 • 1995

INDEXED IN EXCERPTA MEDICA.

SUMMARY

BASIC SCIENCES

Original articles

- Development of lymphovenous anastomoses (LVA) in the heart and pericardium. - Développement des anastomoses lymphoveineuses dans le cœur et le péricarde. (article in english and french) — M. ELISKOVA and O. ELISKA p. 49
- The peripheral absorbing lymphatics vessels of the diaphragm. Les lymphatiques périphériques absorbants du diaphragme. (article in english, summary and legends in english and french) — G. AZZALI, D. GRANDI and M.L. ARCAR p. 55
- The lymphatic vessels in the pathology of the large and small intestine. Morphological and immunohistochemical findings. - Die Lymphgefäß in der Pathologie des Dünnd- und Dickdarmes. Morphologische und immunhistochemische Befunde. - Les vaisseaux lymphatiques dans la pathologie de l'intestin grêle et du colon. Résultats morphologiques et immunohistologiques. (article in german, summary and legends in german, english and french) — S. KRÖBER and E. KAISERLING p. 67
- Neue Erkenntnisse zur immunobiologischen Bedeutung des Endothels initialer Lymphbahnen mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie. - New insights into the immunobiological significance of the endothelium of initial lymphatic vessels by means of confocal laser scanning microscopy. - Résultats nouveaux sur l'importance de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques au moyen de la microscopie rayon laser. (article in german, summary and legends in german, english and french) — A. CASTENHOLZ and H. ZÖLTZER p. 75
- Intermittent pneumatic compression of lymphedema: evaluation of two clinical methods. (article in english, summary and legends in english and french) — R.T. POHJOLA, K. PEKANMÄKI and P.J. KOLARI p. 87

Lymphology in the past

- Dimitri Gerota, an anatomist and a surgeon, a pioneer in the study of lymphatics - Dimitri Gerota, anatomiste et chirurgien, un pionnier dans l'étude des lymphatiques. — A. KAUFMANN p. 91

CALENDAR

XXIIth Congress of the European Group of Lymphology
20th, 21th September 1996 - Paris - France

XXIth Congrès du Gel
24th, 25th May 1996 - Roma - Italie
IVth Meeting du Chapitre Latin-Méditerranéen
23th May 1996 - Roma - Italie

Développement des anastomoses lympho-veineuses (LVA) dans le cœur et dans le péricarde.

Development of lymphovenous anastomoses (LVA) of the heart and pericardium.

Miloslava ELISKOVA and Oldrich ELISKA

Department of Anatomy, First Medical Faculty, Prague

RÉSUMÉ

Des anastomoses lympho-veineuses (LVA) ne sont pas trouvées dans le cœur et dans le péricarde de l'homme et du chien dans les conditions physiologiques, mais seulement en cas de circulation détériorée impliquant le drainage lymphatique de volumes importants. Des LVA ont été trouvées chez les personnes âgées de plus de soixante ans. Le diamètre des anastomoses ne dépassait pas 30 µm. Chez les chiens au cours de la stagnation de la lymphe après la ligature expérimentale des troncs principaux lymphatiques du cœur, le diamètre des LVA atteignait 60 µm. Les anastomoses lympho-veineuses se forment en structures de fonctionnement à titre temporaire ou à long terme, mais eu égard à leur petit diamètre et à leur petit nombre, elles ne sont pas capables de compenser pleinement la circulation lymphatique interrompue.

INTRODUCTION

Nous savons de la littérature qu'il existe deux types d'anastomoses lympho-veineuses (LVA). L'une se crée spontanément dans le tissu (2-11), l'autre est réalisée par le chirurgien au cours de l'intervention. Ce qui est commun pour les deux types des LVA, c'est qu'elles rendent plus facile l'écoulement de la lymphe des vaisseaux lymphatiques dans le système veineux.

Key words :

Lymphovenous anastomoses - heart - pericardium - development

Request to :

ELISKOVA M., MD
Dept. of Anatomy, First Medical Faculty
U nemocnice 3
128 00 Prague 2
Czech Republic

ABSTRACT

Lymphovenous anastomoses in the heart and pericardium of the human and dog were not found under physiological conditions but only under deteriorated circulatory conditions requiring a high volume of lymphatic drainage. LVA were found in persons over 60 years of age. The LVA diameter was not greater than 30 µm. In dogs during stagnation of lymph flow after experimental ligation of the main lymphatic trunks of the heart, the LVA diameter was not over 60 µm. Lymphovenous anastomoses develop as a temporary or permanent assisting structures but due to their small diameter and rare occurrence they are not sufficient to fully compensate interrupted lymphatic circulation.

INTRODUCTION

From the literature, it is known that two types of lymphovenous anastomoses (LVA) exist. The first type of LVA develops in tissues spontaneously (2-11), the second type is made by the surgeon. Both types of LVA have in common that they facilitate the drainage of lymph from lymphatics to veins.

For many years, we have concentrated on the problem of spontaneously developing anastomoses. This article is written as a compendium based on our findings regarding the lymphatic circulation of the heart and pericardium (2, 3) and our present knowledge.

From our point of view we would like to answer some questions :

1. Are LVA present in the tissue under physiological conditions ?
2. From the morphological point of view are LVA sufficient to drain the whole amount of lymph from the corresponding organ ?
3. How long does the drainage of lymph by the LVA last ?

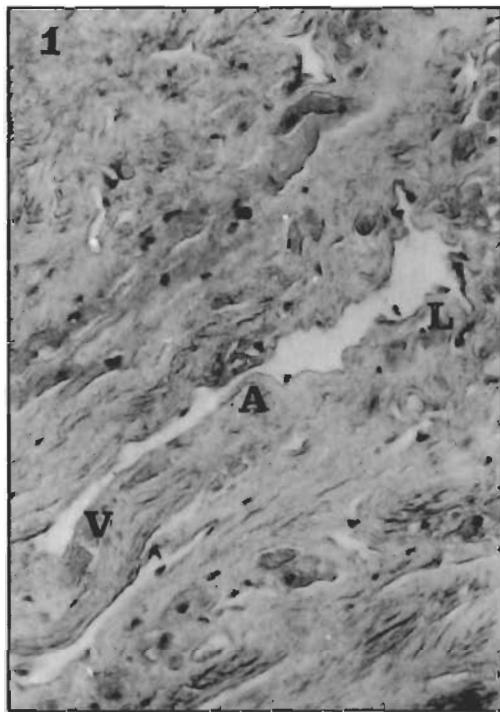


FIGURE 1.

Anastomose lympho-veineuse dans le muscle papillaire du cœur de l'homme. $\emptyset = 6 \mu\text{m}$.

Coloration par le trichrome bleu ($\times 60$)

L = lymphatique, V = veine, A = anastomose.

Lympho-venous anastomosis in the human papillary muscle, 6 μm in calibre. Trichrom stain. (Orig. magn. $\times 60$) - A = anastomosis, L = lymphatic, V = Vein.

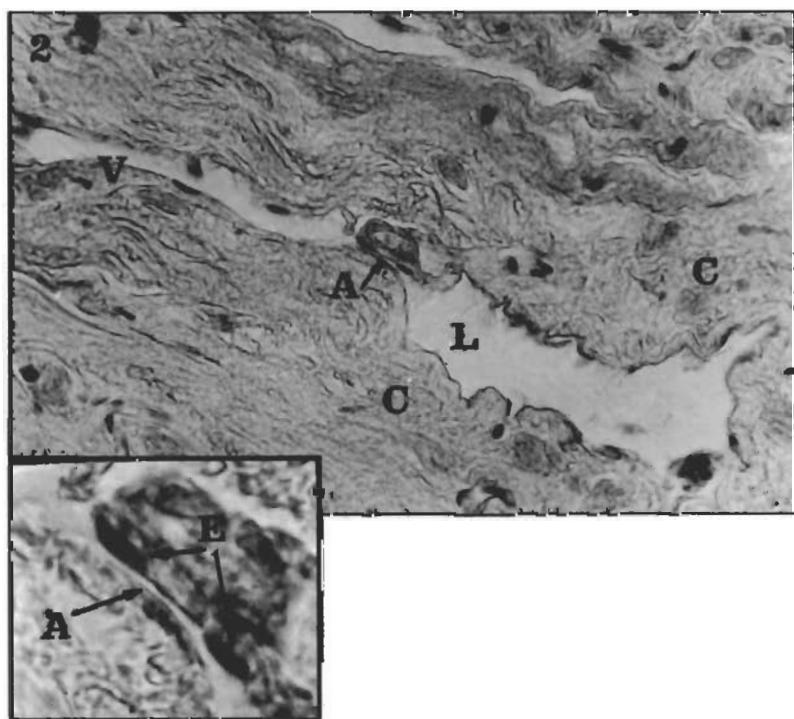


FIGURE 2.

LVA du muscle papillaire du cœur de l'homme. Une autre coupe de la série.

Coloration par le trichrome bleu ($\times 100$) - L = lymphatique, V = veine, A = anastomose.

On peut voir des changements fibreux dans le muscle = C.

Le détail avec les cellules endothéliales = E.

The course of the lympho-venous anastomosis in another section . Trichrom stain. (Orig. magn. $\times 100$) - A = anastomosis, L = lymphatic, V = Vein.

In set - detail of anastomosis lined by endothelial cells = E. (Orig. magn. $\times 200$)
Myocardial cells underwent to degenerative changes and partly are replaced by connective tissue = C.

Depuis nombre d'années, notre intérêt se concentre sur le développement et l'existence des LVA spontanées. Cet article représente l'ensemble de nos découvertes concernant les lymphatiques et la circulation de la lymphe dans le cœur et dans le péricarde, le résumé de nos connaissances actuelles.

Nous nous sommes posés les questions suivantes :

1. Est-ce que les LVA sont présentes dans le tissu dans les conditions physiologiques ?
2. Est-ce que les LVA existantes sont morphologiquement capables d'emporter toute la quantité de la lymphe de l'organe considéré ?
3. Pendant combien de temps le drainage de la lymphe peut-il durer par l'intermédiaire des LVA ?

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1. Muscles papillaires du cœur humain.

Les lymphatiques ont été étudiés sur 42 muscles papillaires des deux ventricules du cœur chez les personnes qui ne sont pas mortes des suites de maladies cardio-vasculaires. Après le chauffage préalable des coeurs dans de l'eau chaude à 40°, les vaisseaux ont été visualisés par l'injection sous-endocardique d'une suspension aqueuse d'encre de Chine avec de la gélatine de 2 pour cent (1:1). Après fixation (formalin 10 %), les prélèvements ont été éclaircis dans le salicylate de méthyle et examinés sous le microscope de dissection. Vingt des muscles papillaires injectés ont été ensuite examinés à l'aide du microscope. Les blocs de tissu ont été découpés en séries, de coupes épaisses de 8 - 10 µm, tantôt transversalement, tantôt longitudinalement, parallèlement au long axe du muscle papillaire. Les coupes ont été colorées par le trichrome bleu.

2. Le péricarde de l'homme.

Les lymphatiques du péricarde ont été étudiés sur 35 cadavres humains. Le mélange de la suspension de l'encre de Chine dans l'eau et de la gélatine de deux pour cent (1:1) a été injecté dans l'interstitium de la paroi péricardique de telle façon que l'aiguille d'injection atteigne la couche du tissu submesothéliale. Après injection et visualisation des lymphatiques, l'aiguille a été introduite dans leur lumière et on a continué l'injection par la voie intralymphatique.

3. Coeur de chien.

Dans le cadre de thoracotomies et sous anesthésie générale, les lymphatiques ont été visualisés chez 35 chiens expérimentaux par l'injection de «patent blue». Les collecteurs lymphatiques principaux du cœur entre les oreillettes du cœur, l'aorte et le tronc de l'artère pulmonaire ont été ensuite ligaturés et coupés à ces endroits. Les animaux ont été divisés en deux groupes. 12 animaux ont été sacrifiés 30 minutes après la ligature des troncs lymphatiques. Les 23 animaux restants furent sacrifiés après 2 à 132 jours de survie. Immédiatement après la mise à mort des animaux des deux groupes, les lymphatiques ont été visualisés par l'injection de «patent blue» et ensuite injectés par la suspension d'encre de Chine et de gélatine à quatre pour cent.

RÉSULTATS

1. Le muscle papillaire de l'homme.

Nous avons trouvé des LVA dans 3 des 42 cas des muscles papillaires injectés. Le diamètre des anastomoses variait de 5 à

MATERIALS AND METHODS

1) Human papillary muscles.

Lymphatic vessels were observed in 42 papillary muscles of both cardiac ventricles obtained from individuals who did not die of cardiovascular disease. The vessels were visualized by subendocardial injections of aqueous India ink suspension with 2 % gelatin (1:1) after previous warming of the hearts in water of 40°C. After fixation in 10 % formalin, the samples were cleared in methylsalicylate and examined under a dissecting microscope. Twenty injected papillary muscles were thereafter processed for microscopic study. Individual tissue blocks were serially sectioned at 8 - 10 µm, either transversally or parallel with the long axis of the respective muscle. The sections were stained with the blue trichrome stain.

2) Human pericardium.

Pericardiac lymphatic vessels were visualized in 35 human cadavers by injection. A suspension of India ink in 2 % gelatine was injected into the interstitium of the pericardial wall so that the cannula reached the fibrous and submesothelial layer of the pericardium. After the lymphatic vessels had been visualized, the needle was introduced into their lumen and the injection was continued intralymphatically.

After fixation in 10 % formalin solution, 35 samples were dehydrated, cleared in methylsalicylate and studied under a dissecting microscope.

3) Dogs heart.

In 35 dogs after thoracotomy under anesthesia, we visualized lymphatics of the heart by injection of patent blue. Then the main lymphatic trunks between the cardiac atria, the aorta and the pulmonary trunk were ligated and severed.

The dogs were divided into two groups : 12 animals of the acute group were sacrificed 30 minutes after ligation of the lymphatics. The remaining 23 dogs were left to survive for 2 to 132 days. Immediately after death, a suspension of India ink in 4 % gelatine was injected into the lymphatics which were visualized by patent blue.

RESULTS

1) Human papillary muscle :

From 42 injected muscles, we found LVA in 3 cases. Their diameter was 5 to 30 µm across (Figs. 1, 2). In all cases where LVA were present, the part of papillary muscle underwent fibrosis. In our opinion, the presence of anastomoses relates to deviation in arterial morphological patterns of papillary muscles. These alterations start at the age of 12 years (1).

2) Human pericardium :

We failed to find LVA in the pericardium of a healthy man, that is a man without cardiovascular diseases. We demonstrated them in cases where the cause of death was acute myocardial infarction (Fig.3) and the pericardium was hyperaemic, containing an increased amount of pericardial fluid. The diameter of LVA was 25 to 30 micrometers.

Probably, the possibility of the appearance of LVA increases with age. We found them both in persons of the papillary muscle group (3) and those of human pericardium group aged more than 60 years.

3) Dogs heart :

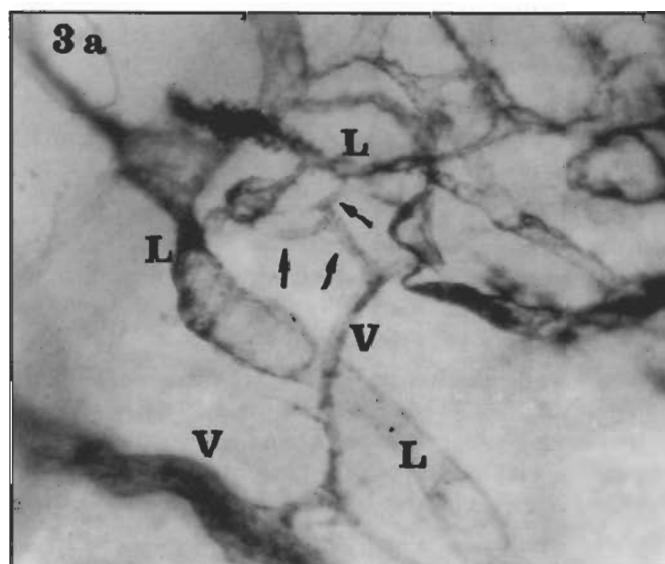
Such facts support our hypothesis that LVA would occur under deteriorated circulatory conditions, requiring a high volume of lymphatic drainage. We verified our hypothesis through

30 µm (Figs. 1,2) Dans tous les cas où les LVA étaient présentes, nous avons trouvé des changements fibreux dans les muscles papillaires. Nous supposons que la présence des anastomoses dépend d'anomalies d'approvisionnement artériel du muscle papillaire. De telles anomalies ont été décrites dès l'âge de 12 ans (1).

Le péricarde de l'homme.

Nous n'avons pas trouvé de LVA dans le péricarde de personnes saines, c'est-à-dire de personnes sans maladies cardio-vasculaires. Mais, nous avons trouvé les LVA dans les cas où la cause de la mort était l'infarctus aigu du myocarde (Fig.3). Ici, nous avons trouvé le péricarde hyperémique et avec une quantité élevée de liquide péricardique. Le diamètre des LVA variait de 25 à 30 µm.

Il est probable que la possibilité de développement des LVA augmente avec l'âge (3). Tant les anastomoses dans le muscle papillaire que les anastomoses dans le péricarde ont été trouvées chez les personnes âgées de plus de soixante ans.



experiments (2).

After acute ligation of coronary lymphatic channels, no lymphatic anastomoses could be found. In the prolonged experiments, lympho-lymphatic anastomoses had developed by the 7th to 14th day :

a) between the interrupted channels,

b) very thin channels at the sites of adhesions between the epicardium and pericardium.

In five out of 23 dogs, LVA of a size of 40 to 60 micrometers were found between the 7th and 28th day after ligation. After one month these LVA could no longer be found. Both forms of anastomoses, i.e. lympholymphatics and lymphovenous may be present at same time.

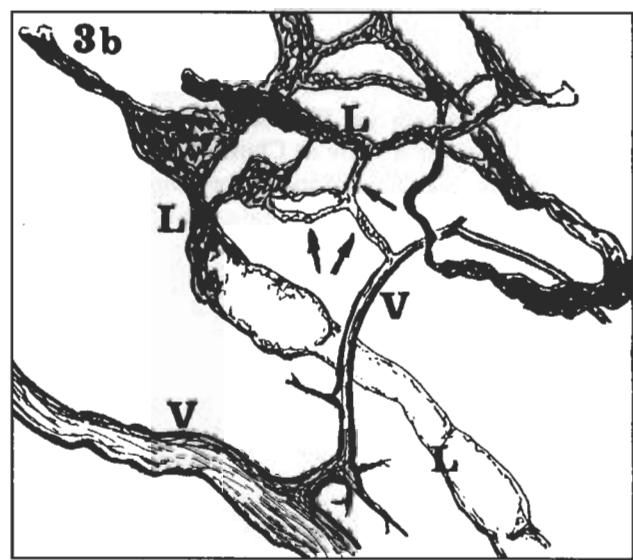


FIGURE 3.

LVA ($\varnothing = 20 \mu\text{m}$) dans un péricarde humain (péricardite après infarctus myocardique aigu)

a) Pièce «clarifiée»

b) Schéma correspondant

L = lymphatiques, V = veines, flèches = l'anastosome

Lympho-venous anastomoses 20 µm in calibre

a) in the clarified human pericardium (pericarditis after myocardial infarction)

b) scheme

L = lymphatics, V = vein, arrows = anastomoses

3. Coeur de chien.

Nos résultats soutiennent l'hypothèse que les LVA se développent en cas de détérioration de la circulation impliquant le drainage lymphatique volume augmenté. Nous avons vérifié cette hypothèse expérimentalement (2).

Après ligature des troncs lymphatiques chez le chien, aucune anastomose n'a été trouvée en phase «aigüe». Au cours des expériences chroniques, on trouve entre le 7e et le 14e jour de la survie de l'animal des anastomoses lympho-lymphatiques tant entre les moignons des collecteurs interrompus que sous la forme des vaisseaux très minces dans les adhésions de l'épicarde avec le péricarde.

Chez 5 des 23 chiens, on a trouvé entre le 7^e et le 28^e jour des anastomoses lympho-veineuses dont le diamètre était de 40 à 60 µm. Cependant, ces anastomoses n'ont pas duré plus d'un mois.

DISCUSSION

Lymphovenous anastomoses have been demonstrated in many types of mammals, including man, for several years. It has been postulated that the communications are normal only in certain species and that, in most species, they are anomalous or acquired under pathological circumstances (4 - 11).

Our observations permit us to draw the conclusions that LVA develop under deteriorated circulatory conditions and by increasing age.

To the question of methods of finding LVA.

We injected the lymphatics of the heart, pericardium, limbs and other organs in man and dogs. According to our experience, it is very difficult to find LVA in the specimens. The best method for us was to observe the passage of the injection mass from the lymphatics to the veins. Therefore, the best results were found on injected and cleared specimens.

Les deux types d'anastomoses (lympho-lymphatiques et lympho-veineuses) peuvent être présentes en même temps.

DISCUSSION

Les anastomoses lympho-veineuses ont été démontrées chez différents types des mammifères y compris l'homme. On peut supposer que les anastomoses soient normalement, physiologiquement présentes seulement chez certaines espèces et qu'elles sont anormales ou acquises dans des conditions pathologiques chez la plupart des animaux (4-11).

Nos observations nous permettent de conclure que ces LVA se développent en cas de détériorations circulatoires et augmentent avec l'âge.

A propos de la méthode de démonstration des LVA.

Dans notre pratique, nous avons injecté les lymphatiques du cœur, du péricarde, des extrémités et beaucoup d'autres organes. Nous pouvons dire de notre expérience que la preuve des LVA dans les pièces est très difficile. La meilleure méthode, pour nous, consiste en l'observation du passage de la masse d'injection à partir des lymphatiques jusqu'au réseau veineux, à savoir sur des pièces clarifiées. Lors de la méthode d'injection que nous avons utilisée, nous avons trouvé des LVA seulement dans le cas d'injection de lymphatiques, jamais par injection du réseau veineux. En aucun cas, nous n'avons observé le passage de la masse injectée des veines au réseau lymphatique.

La preuve histologique des LVA est très difficile :

1. Les LVA ne peuvent être trouvées que dans le matériel «en série», ce qui est très exigeant d'un point de vue temporel tant à cause du traitement technique que pour l'évaluation du matériel proprement dit.

2. Le constat des LVA dépend de la position de la veine et du vaisseau lymphatique. Pour une confirmation, il faut que l'anastomose et ses extrémités veineuse et lymphatique soient parallèles avec le plan de la coupe. Nous pouvons dire que la preuve histologique des LVA est extrêmement rare.

De l'expérience sur les animaux, nous tirons les conclusions que la genèse et la constitution des LVA dépendent indirectement de la genèse et de la constitution des anastomoses lympho-lymphatiques. Si les anastomoses lympho-lymphatiques se forment au cours des 7 premiers jours, le drainage de recharge de la lymphe et du liquide interstitiel par la voie des LVA n'est pas nécessaire et les LVA ne se créent pas, et inversement. Si le drainage de la lymphe par la voie des anastomoses est insuffisant, les deux formes d'écoulement peuvent exister en même temps.

Eu égard au petit diamètre des LVA (5 - 60 µm) et à leur présence rare, nous supposons que les LVA ne sont pas capables d'emmener toute la quantité de la lymphe au système veineux. Elles servent de dispositif auxiliaire à titre temporaire ou permanent pour le drainage de la lymphe et en même temps pour l'amélioration de la situation dans l'interstitium. La question reste ouverte de savoir pourquoi la lumière des LVA n'augmente pas jusqu'à la grandeur de celle des collecteurs lymphatiques et pourquoi les LVA ne se créent pas en plus grand nombre même dans les conditions de pression élevée dans les lymphatiques, comme c'est le cas du lymphoedème.

In accordance with the injection methods used, we discovered LVA by injection through the lymphatics only. But we were unable to reveal them by injection via the veins. There was no visible passage of the injection mass from veins to lymphatics. Histological proof of LVA is very difficult for many reasons :

1) Lymphovenous anastomoses can be estimated on serial histological sections only, which is very laborious.

2) It depends on the position of the vein and the lymphatic, they both have structures placed parallel to the plane of the section. We can say that the finding of LVA histologically is exceptionally rare.

From our experiments on dogs heart, we assume that development of LVA is indirectly dependent on the development of the anastomoses lympholymphatic. If lympholymphatic anastomoses have developed by the 7th day, a substituting drainage of lymph and interstitial fluid via the LVA is not required and LVA do not develop. If however the drainage of lymph by the lympho-lymphatic anastomoses is insufficient, both forms of lymph drainage may exist simultaneously.

Due to the small diameter of LVA (5-60 µm) and their rare occurrence, we assume that LVA are not able to transport all the lymph into the venous system. LVA function as a temporary or permanent assisting structures for the drainage of lymph and thereby for improvement of interstitial relations. The question remains why the LVA lumen does not increase to the lumen size of the lymphatic collectors (0,5 - 2 mm) and why LVA do not develop in abundance even in situations when the pressure in lymphatics is greatly increased, as in the case of lymphoedema.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Mrs. L. Jechova for technical assistance.

This work is in part funded by a grant of Czech Republic GACR 304/93/0846.

REFERENCES

1. BOUCEK R.J., TAKESHITA R., BRADY A.H. (1965) – Intimal hypertrophy in coronary arteries and considerations of the papillary muscle arteries (man). *Anat. Rec.* 153 : 243 - 254.
2. ELISKA O., ELISKOVA M. (1975) – Contribution to the solution of the question of lympho-venous anastomoses in heart of dog. *Lymphology*, 8:11 - 15
3. ELISKOVA M., ELISKA O. (1992) – How lymph is drained away from the human papillary muscle : Anatomical conditions. *Cardiology*, 81:371 - 377
4. ENGESET A. (1959) – Lymphatico-venous communications in albino rats. *J. ANAT.* 93:380 - 383
5. GEYSELS Y., LIEVENS P., BOURGEOIS P., LEDUC A., (1990) – Morphological study of the vascular regeneration processes in the case of free skin grafts : experimental approach. *European J. Lymphology*, 1:23 - 28

6. JOHNSON R.A., BLAKE T.M. (1968) – Vasa vasorum of the heart.
Amer. Heart J., 76:79 - 89
7. MALEK P., BELAN A., KOLC J. (1965) – In vivo evidence of lymphovenous communications in the popliteal region.
Acta Radiol. 3:344 - 349
8. PRESSMAN J.J., SIMON, M.B., HAND K., MILLER J. (1962) – Passage of fluids, cells, and bacteria via direct communications between lymph nodes and veins.
Surg. Gynec. Obst. 115:207 - 214
9. THREEFOOT S.A. (1983) – Lymphovenous anastomoses. In Foldi M., Casley-Smith J.R. (eds) *Lymphangiology*, Stuttgart, Schattauer, pp 177 - 184
10. VAJDA., TOMCSIK M., van DOORENMAALEN W.J. (1972) – Connections between the venous system of the heart and the epicardiac lymphatic network.
Acta Anat., 83:262 - 274
11. ZERBINO D.D., GAVRISH A.S. (1970) – Lympho-venous shunts in lymph outflow from obstruction the heart. (Experimental morphological research). (Russ)
Bulleten Experimentalnoj Biologii i Med. 8:106 - 109.

The peripheral absorbing lymphatic vessels of the diaphragm Les lymphatiques périphériques absorbants du diaphragme

G. AZZALI, D. GRANDI and M. L. ARCA

Institute of Anatomy - School of Medicine - University - PARMA 43100 - ITALY

SUMMARY

The aim of our study was to examine the lymphatic vascularization of the diaphragm in hibernating bats (*Pipistrellus pipistrellus*, *Rhinolophus ferrumequinum*) and the ultrastructural characteristics of the absorbing peripheral lymphatic vessels of the pleural and peritoneal surface, and also to determine how far and with which mechanisms these vessels participate in the mobilization of liquids and particles (China ink and polystyrene latex spherules) from the abdominal cavity. Deep lymphatic vessels forming networks and superficial lymphatic vessels were observed draining at the diaphragm's peripheral margin into valved pre-lymph node precollectors and collectors; the ventral precollectors principally terminate into the sternal lymph nodes or into the anterior mediastinal lymph nodes, while the dorsal precollectors terminate into the internal or para-aortic lymph nodes. The superficial lymphatic vessel undergoes significant seasonal changes, and as in other organs, has peculiar absorbing properties characterized by the membrane diffusion phenomena, the „vesicular pathway”, and the „intraendothelial channel pathway”.

We demonstrated and discussed the ultrastructural aspects of the mesothelial stoma and the lower mesothelial connective channel, which are important components of the drainage unit. The peritoneal or abdominal contents drain indiscriminately first into the lymphatic vessel lumen and then into the valved precollectors by means of the intraendothelial channel, a dynamic entity organized by and according to the requirements of the endothelial wall. The valves block back flow during the rhythmic contractions of the diaphragm. Three-dimensional models and serialized thin slices of the lymphatic vessels and

drainage unit components, have not confirmed the „lymphatic stomata” hypothesis or direct continuity between the abdominal cavity and the lumen of the lymphatic vessels.

RÉSUMÉ

Le but de notre étude est d'examiner la vascularisation lymphatique du diaphragme de chauve-souris hibernantes (*Pipistrellus pipistrellus*, *Rhinolophus ferrumequinum*) et les caractéristiques ultrastructurales des vaisseaux lymphatiques périphériques absorbant des surfaces pleurales et péritonéales afin de déterminer dans quelle mesure et par quel mécanisme ces vaisseaux prennent part à la mobilisation des liquides et des parcelles macromoléculaires (encre de Chine et sphérules de polystyrène latex) à partir de la cavité abdominale. Des vaisseaux lymphatiques profonds formant des réseaux et les réseaux lymphatiques superficiels furent observés qui drainaient la périphérie du diaphragme dans des collecteurs et précollecteurs valvulés. Les précollecteurs ventraux se terminent principalement dans les ganglions sternaux ou dans les ganglions médiastinaux antérieurs alors que les précollecteurs dorsaux se terminent dans les ganglions rénaux latéro-aortiques. Le vaisseau lymphatique superficiel montre des variations saisonnières significatives et, comme celui d'autres organes, il possède des propriétés absorbantes particulières caractérisées par les processus de diffusion de la membrane plasmique, par la "voie vésiculaire" et la "voie des canalicules intraendothéliaux".

On a souligné et discuté les aspects ultrastructuraux du stoma du mésothélium et des canaux dans le tissu conjonctif sous-mésothélium qui représentent les composantes importantes de l'unité de drainage. Le contenu abdominal ou péritonéal à travers les canalicules intraendothéliaux (entité dynamique organisée selon les besoins de la paroi endothéliale) se draine de manière aveugle, premièrement dans la lumière du vaisseau lymphatique, puis dans les précollecteurs valvulés. Ces valvules empêchent le reflux de la lymphe pendant les contractions rythmiques du diaphragme. Des modèles tridimensionnels et des coupes fines séries des vaisseaux lymphatiques et des unités de drainage n'ont pas confirmé l'hypothèse de "stoma lymphatique" entendu comme la continuité directe entre la cavité abdominale et le lumen du vaisseau lymphatique.

Key words :

Lymphatic vessel - diaphragm - ultrastructure
three dimensional model - bat - hibernation

Request to:

G. AZZALI Ph. D. M.D.

Institute of Anatomy

Medical School

University of Parma

Via A. Gramsci 14 - 43100 Parma - Italy -

Tel. and Fax ++39 521 290359

INTRODUCTION

The function of the lymphatic vascular system is to collect the cellular products and filtrate of the arterial capillary from the interstitium and return them to the blood circulation. Regarding what occurs during the transendothelial passage of liquids, particles and cells, unanimous agreement has been reached about the role played by membrane permeability, the hydrostatic and oncotic pressure (Casley-Smith, 1988) and the vesicular pathway (Dobbins and Rollins, 1970; O'Morchoe, 1984; Casley-Smith, 1985). Perplexity still remains forever, concerning the phagocytosis and interendothelial openings understood as the „open junction inlet valves” (Palay and Karlin, 1959; Leak and Burke, 1966; Casley-Smith, 1976, 1980; Huth and Bernhardt, 1977; Kato, 1966; Kalima et al., 1977). Moreover, the accepted „intraendothelial” channel (Azzali 1977, 1988 and 1990a) which permits indiscriminate passage of substances from the interstitium to the lymphatic vessel lumen now generally. Starling and Tubby (1894), Stewart and Burgen (1958), Allen (1936), Yoffey and Curtice (1970), French et al. (1960) believe that the peripheral absorbing lymphatic vessels (Ottaviani and Azzali, 1965) of the peritoneal surface of the diaphragm -also called capillary vessels or initial lymphatic- (Casley-Smith, 1964; Castenholz, 1988), play a fundamental role in the removal of liquids and particles from the peritoneal cavity. During the last thirty years, morphological and experimental research on many mammals, has demonstrated the presence of superficial and deep lower mesothelial lymphatic vessels at the pleural and peritoneal surface of diaphragm muscular and tendon portions, which present varying morphological aspects of different physiological significance (Mazza and Ottaviani, 1955). Fukuo et al., (1990) described the presence of lymphatic vessels exclusively at the lower abdominal surface in the diaphragms of golden hamsters, which are numerically superior in the tendon portion than in the muscular portion. Leak and Rahil (1978), Simer (1948), Bettendorf (1978), French et al. (1460), Odor (1956), Szabò et al. (1975), Tsilibary and Wissig (1983), Wang

(1975), assert that when colloidal particles (biological co-marked proteins, tannic acid, China ink, latex particles, ecc.) are injected in peritoneal cavities, they are quickly removed by the von Recklinghausen stomata (1863) and the „body type” presented exclusively in the muscular, and not in the tendon portion of the diaphragm (Tsilibary and Wissig, 1977).

We studied the morphological characteristics of the absorbing peripheral lymphatic vessels, and the pleural and peritoneal stomata which make up the drainage unit, - fundamental to substance removal and emission from the abdominal cavity into the lymphatic circulation -, in order to more completely understand on the physiological and clinical doubts concerning the absorbing power of the mesothelial surfaces of the diaphragm.

MATERIALS AND METHODS

We studied 42 bats (*Pipistrellus pipistrellus* and *Rhinolophus ferrumequinum*), captured in the provinces of Parma and Brescia (Paitone), during different seasons (hibernation and summer). The bats were divided as follows: group I, 15 bats captured during hibernation with abdominal temperatures of 8°C; group II, 6 bats kept in laboratory for 24 h and killed after 1 and 2 hours following abdominal injection of 1cc water-polystyrene latex (0.577 mm diameter particles) solution (Dow Chemical Company, Midland, Michigan); group III, 15 summer season bats, 5 of which were intraperitoneally injected with 1cc of 10% China ink saline solution; and group IV, 6 non treated summer season bats.

Upon ether anesthesia the animals were perfused for 10 minutes firstly with thyrode solution and secondly for 20 min with sodium cacodylate buffer and 0.5% osmotic acid at pH 7.4. Diaphragm pieces of 2-3mm were fixed with 1% osmotic acid-sodium cacodylate pH 7.4 for 2 h. After buffer washing, the pieces were dried in acetone and embedded in Durcupan. Following SEM, following osmotic acid fixing and critical point drying (Balzers), several 1-2 mm pieces were gold coated using

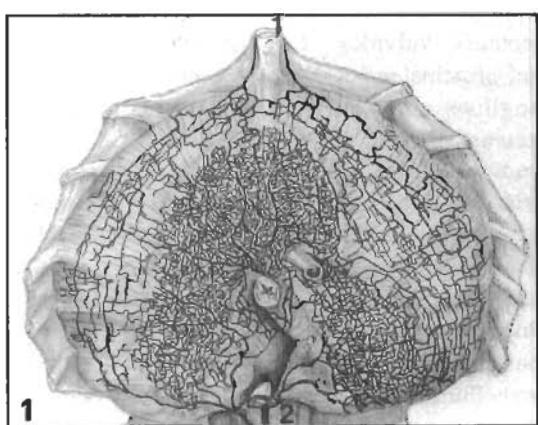


FIGURE 1

Pipistrellus pipistrellus diaphragm.
Topographical distribution of deep and superficial lymphatic vessels of the peritoneal surface draining into ventral (1) and dorsal (2) precollector vessels.

Diaphragme de *Pipistrellus pipistrellus*. Distribution topographique des vaisseaux lymphatiques superficiels et profonds de la paroi péritonéale se drainant dans les vaisseaux précollecteurs antérieurs (1) et postérieurs (2).

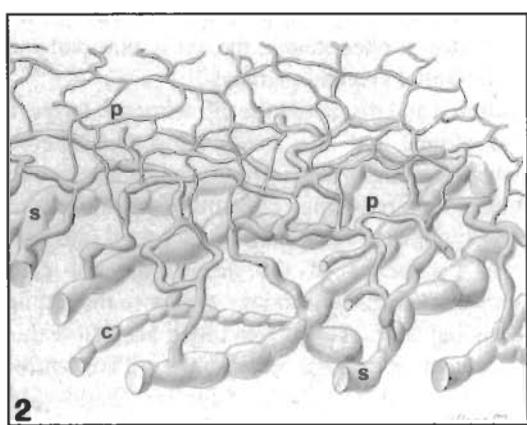


FIGURE 2

Outline of superficial (s), deep (p) network intertwined lymphatic vessels, and of the valved precollector (c).

Schéma des vaisseaux lymphatiques superficiels (s) et profonds (p) "tressés" en réseaux et du précollecteur valvulé (c).

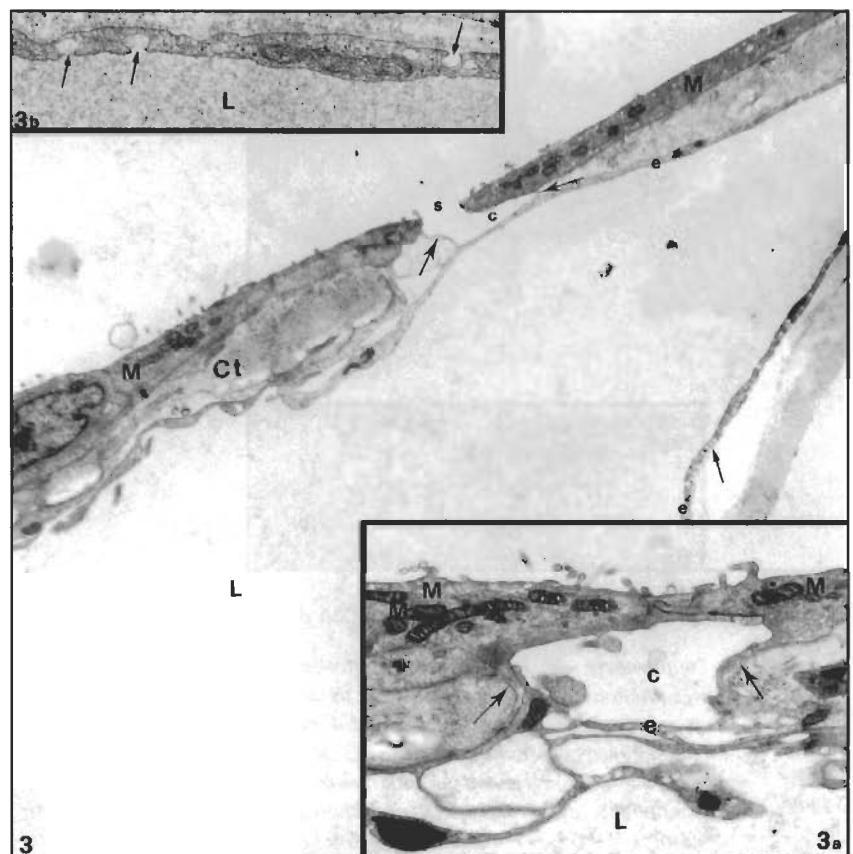
sputtering device and subsequently observed under Philips 501 electron microscope.

Thick slices of 1 micron were stained with 5% calcium carbonate in Toluidine blue solution, while the thin slices were stained with lead citrate according to Reynolds (1963) and with acid phosphatase according to Evans et al. (1966). After observing the lymphatic vessels under TEM (Phillips 300) serial thin slices were reconstructed in three-dimensional models according to the Born (1883) wax disc technique modified by Werner (1975). Diaphragms from hibernating and summer season animals were injected with Prussia blue according to the Gerota technique (1896) modified by Ottaviani (1937) evidence the lymphatic vessels. Large diaphragm parts with China ink filled lymphatic vessels were fixed in 10 % formaldehyde, dehydrated in ethyl alcohol and then diaphanized in xilolo or in methyl salicylate and fixed between 2 glass sheets with Canada balsam (Azzali, 1990b).

RESULTS

Injecting Prussia blue directly into the lymphatic vessels and introducing China ink into the abdominal cavity allows us to observe, both the presence of large superficial lymphatic vessels and smaller calibre deep lymphatic vessels forming linked networks which drain into ventral and dorsal pre-collecting lymphatic vessels (Figs. 1 and 2). When the ventral pre-collectors reach the periphery of the diaphragm muscle, they drain into right and left pre-lymph node collectors (Fig. 1,1) which after being cranially directed, make contact with the internal mammal vein, and terminate in the sternal lymph node on its own side, or, if this is non-existent, in the anterior mediastinic lymph-nodes. The dorsal precollectors collect the lymph from the tendon centre, escluding a small part of tributary portion of the ventral precollectors. The left dorsal

precollectors drain into the thoracic duct. The right dorsal precollectors follow the aorta and usually fuse into one trunk (Fig. 1,2) drain into the posterior mediastinic lymph nodes or, when these are absent, into the para-aortic or inter-renal lymph nodes. In both bat species, the superficial lymphatic vessels are rather dilated and are distributed between the lower mesothelial connective tissue and the muscle portion, while the intramuscular deep lymphatic vessels are of smaller calibre and round or oval shaped. The topographic distribution of the absorbing peripheral lymphatic vessels is similar for the pleural and peritoneal surfaces. With the M.O. and more vividly with TEM we can see the peculiar morphologic aspects of the superficial lymphatic vessels. They are separated from the peritoneal and pleural mesothelium by a layer of loose connective tissue (collagen and elastic fibers and fibroblasts). In correspondence with the stomata of von Recklinghausen (1863), the connective layer interrupts, leaving an optically empty area (or „channel”) in its place, extending for 7 to 8 μ m to the abluminal endothelial wall of a peripheral absorbing lymphatic vessel (Figs. 3 and 3a). The margins of this area in the connective tissue are covered by thin abdominal secondary expansions of the peripheral cytoplasm of the lymphatic vessels’ adjacent endothelial cells. These rather secondary expansions (Figs 3 and 3a, arrows), often make contact directly or with short cytoplasm expansions of the mesothelial cells’ basal portion without attaching through specialized junction complexes. The mostly rectangular mesothelial cells, (Figs. 4 and 5) are instead, rather globose, in animals killed during summer and after hibernation. Their abdominal surfaces have many microvilli and in animals from groups II and III, the cytoplasm is rich in polystyrene latex spherules (Figs 5 and 5a). The plasma membrane of the adjacent cells is fixed in several areas by specialized tight and gap junction complexes (Fig. 7. insert 1).



FIGURES 3, 3a & 3b

Diaphragm of Pipistrellus pipistrellus captured during hibernation.
Absorbing peripheral lymphatic vessel separated from the peritoneal mesothelium (M) by a thick layer of connective tissue (Ct). s=stoma; c=connective channel coated by secondary cytoplasm expansions (big arrows) of two adjacent endothelial cells, also clearly visible in Fig. 3a; e=endothelial wall rich in invaginations (small arrows) more evident in Fig. 3b; L=lumen of the vessel. X10000 ; X17500 ; X41500.

FIGURES 3, 3a & 3b

Diaphragme de Pipistrellus pipistrellus capturée pendant sa période d'hibernation. Le vaisseau lymphatique périphérique absorbant est séparé du mésothélium péritonéal (M) par une couche épaisse de tissu conjonctif (Ct). s = stomate ; c = canal dans le tissu conjonctif revêtu par des expansions cytoplasmiques secondaires (flèches épaisses) de deux cellules endothéliales adjacentes, également clairement visibles sur la figure 3a; e = paroi endothéliale riche en invaginations (petites flèches) plus évidentes sur la figure 3b ; l = lumière du vaisseau.
X10000 ; X17500 ; X41500.

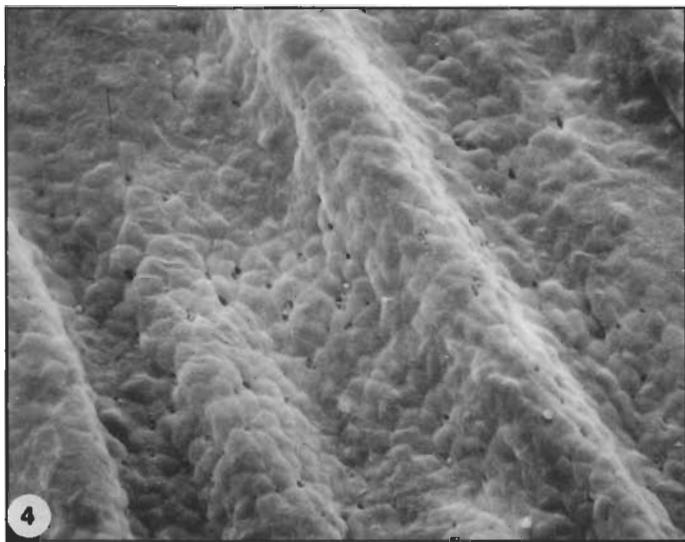


FIGURE 4

*Diaaphragm of Rhinolophus ferrumequinum in summer.
Wavy peritoneal surface with many stoma. SEM-X320.*

*Diaphragme de Rhinolophus ferrumequinum capturé en été.
Surface péritonéale ondulée avec de nombreux stomates.
SEM-X320.*

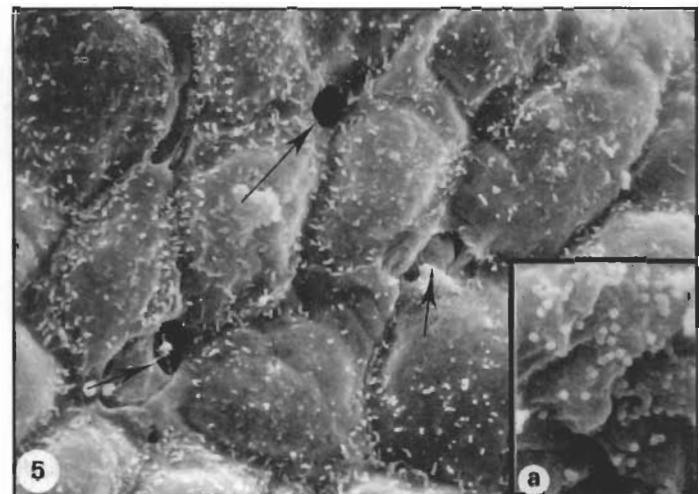
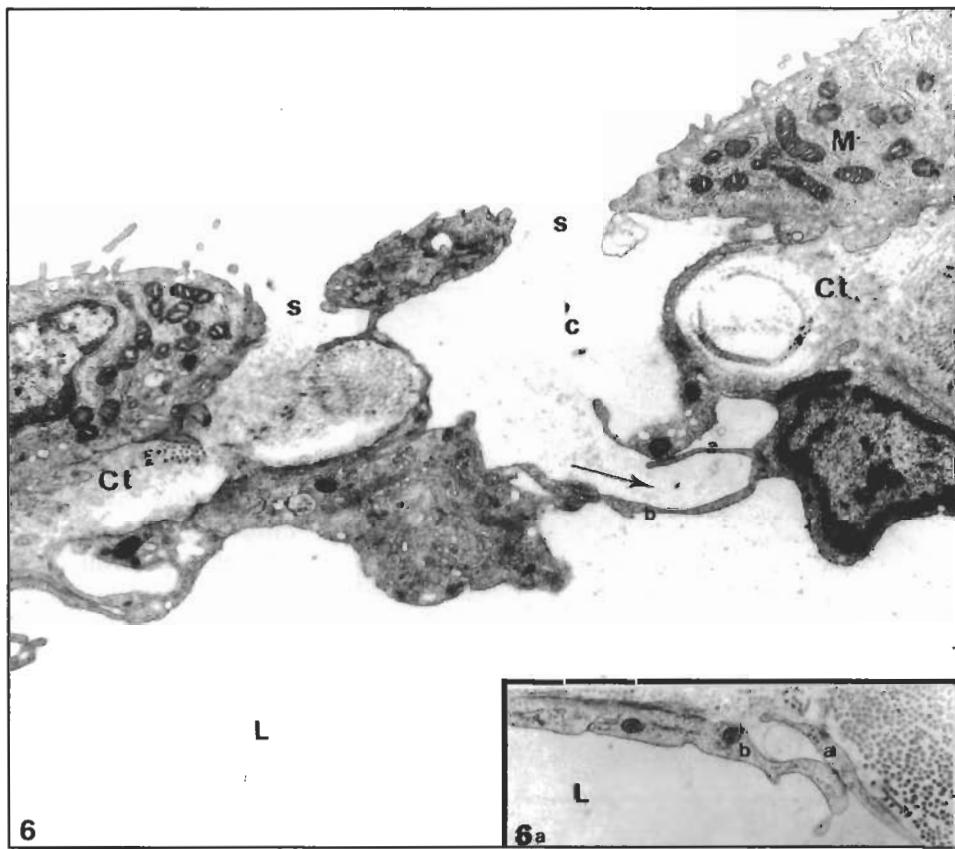


FIGURE 5

*Rhinolophus ferrumequinum's diaphragm.
Mesothelial cells delimiting stoma (arrows) with the surface rich in
microvillous. Insert a to show polystyrene latex spherules on cell
surface. SEM-X2500.*

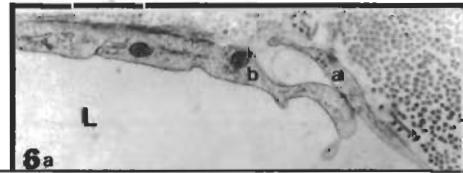
*Diaphragme de Rhinolophus ferrumequinum. Cellules mésothéliales
délimitant un stoma (flèches) avec une surface riche en
microvillosités.*

*La figure a montré des sphérules de polystyrène de latex
à la surface cellulaire.*



FIGURES 6 & 6a

Diaphragm of Pipistrellus Pipistrellus captured in summer. Mesothelial stoma (s) and channel (c) of the connective (Ct) which continues in depth with the abdominal orifice (arrow), containing polystyrene spherules (Fig. 6a), of an intraendothelial channel formed by the a and b endothelial cytoplasm expansions. M=mesothelial cells; L=lymphatic vessel lumen. X17500; X16000.



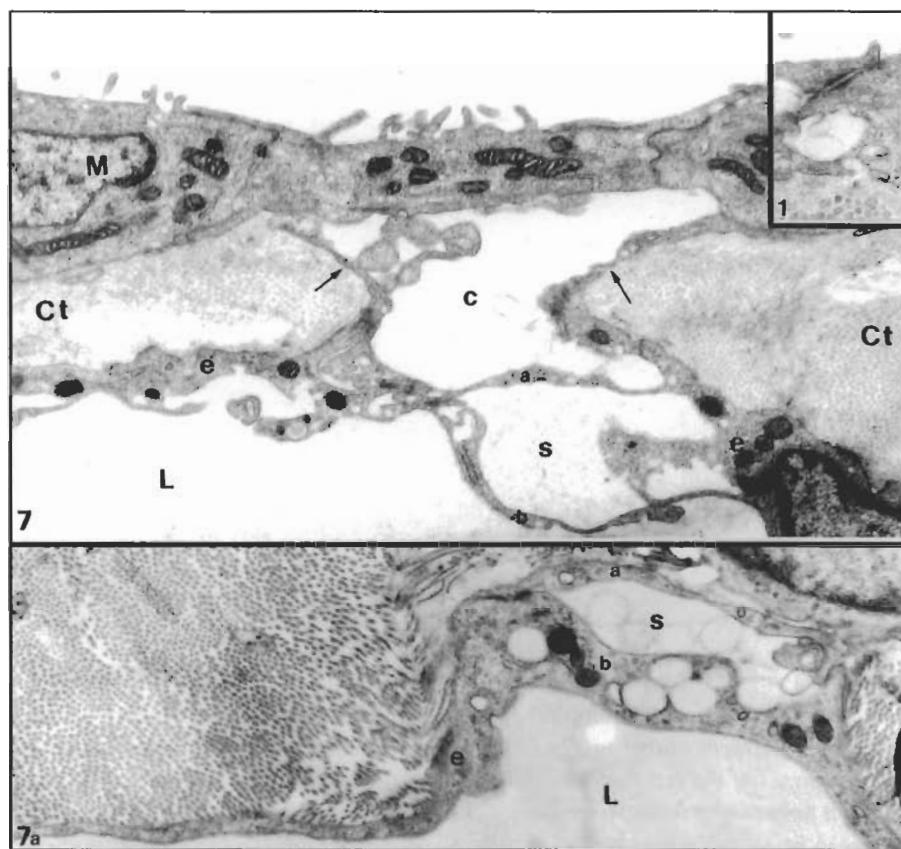
FIGURES 6 & 6a

*Diaphragme de Pipistrellus pipistrellus capturé en été. Stomates
mésothéliaux (s) et canal (c) dans le tissu conjonctif (Ct) qui se continue
en profondeur avec l'orifice abdominal (flèches) du vaisseau
lymphatique contenant des sphérules de polystyrène latex (fig. 6a). De
plus, il est aussi présent un canalicule intraendothélial formé par les
expansions cytoplasmiques endothéliales a et b. M = cellules
mésothéliales. L = lumière du vaisseau lymphatique. X17500; X16000.*

In some areas of the peritoneal mesothelium, the adjacent cell margins are clearly separated, determining a round space or von Reckinghausen stoma with a diameter of 3-5 µm. For animals captured during the summer season and for those killed after hibernation these stoma are more abundant at the wavy muscular portions than at the flat portions (Fig. 4). The mesothelial cells (Figs. 6 and 7) reveal cytoplasm matrix rich in ribosomes and highly developed endocytoplasm organelles; while many endocytotic vesicles are present at the surface plasma membrane. Numerous China ink and polystyrene spherical particles introduced for phagocytosis were observed in the mesothelial cytoplasm of treated animals. The deep plasma membrane is regular, resting upon a continuous basal lamina of 80-90 nm thickness, completely absent at the stoma level. This interruption is represented by a 1.4-1.8. µm diameter optically empty space which continues in the canal of the lower mesothelial connective (Figs. 3,6).

Both the pleural and peritoneal superficial lymphatic vessels are constituted by a monolayer of endothelial cells resting upon a discontinued basal lamina (Fig. 3). The endothelial wall of the lymphatic vessel which leans on the lower mesothelial connective tissue, is generally linear, except in laboratory animals killed during hibernation waking and summer season for which its course is more irregular with tattered profile caused by many small intertwined secondary cytoplasm

expansions (Fig. 7). The deep endothelial wall adhering to the muscular tissue, appears lightly wavy. The endothelial cells are made of globose central parts containing the nucleus surrounded by abundant cytoplasm and an extensive peripheral portion. The perinuclear cytoplasm contains common endocytoplasm organelles and several large lisosomes containing acid phosphatase positive heterogeneous body. The usually medium thick (300-350 nm) of the peripheral cytoplasm, in animals killed during hibernation, is notably reduced, with 30-32 nm thick wall segments where abluminal and luminal membranes are separated by a very thin layer of amorphous cytoplasm matrix. During the summer period, the cytoplasm matrix contain many free ribosomes, a few mitochondria, and non coated, 60-80 nm diameter, free vesicles, which are scarce during hibernation. Endo and exocytotic invaginations of the abluminal and luminal plasma membranes are particularly evident owing to thin peripheral cytoplasm of the matrix (Fig. 3b) during this period. The endothelial cells are united together by simple intercellular contacts (end to end), for overlapping or interdigitating, fixed by specialized tight and gap junction complexes. The presence of „intraendothelial channels” has been evidenced on the endothelial wall of the superficial and deep lymphatic vessel. These channels are characterized by a central portion or tunnel (s in the Figs. 7 and 7a) which persists for 30-40 thin slices.

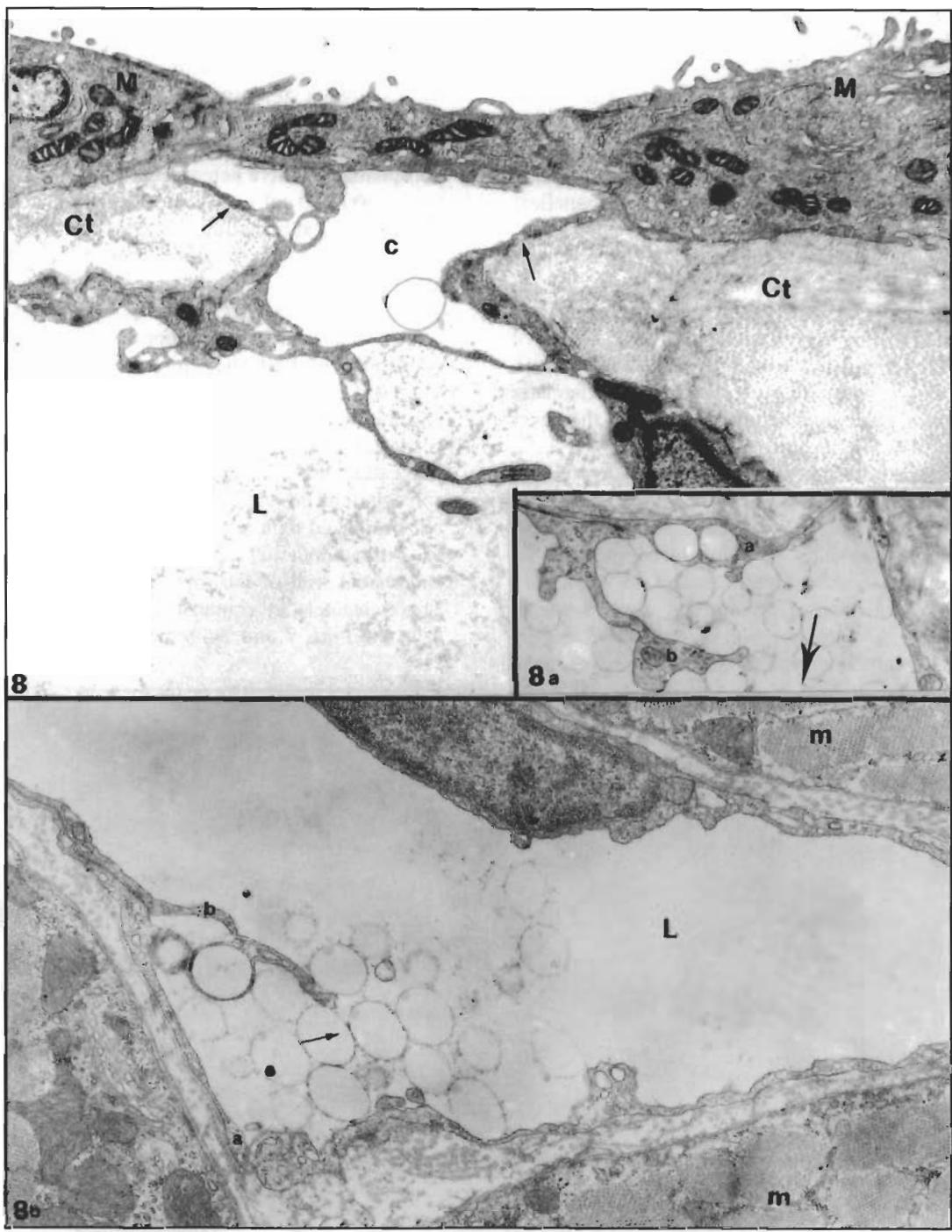


FIGURES 7 & 7a

Diaphragm of Pipistrellus pipistrellus and Rhinolophus ferrumequinum captured in summer. M = mesothelial cells fixed by tight and gap junctions (insert 1); c = channel of the lower mesothelial connective (Ct) coated by thin secondary expansions (arrow) of adjacent endothelial cells (e) whose principal expansions a and b delimit the central part (s) of an intraendothelial channel, which in Fig. 7a appears filled with polystyrene spherules. L = lumen of the lymphatic vessel. X17500; X18000.

FIGURES 7 & 7a

Diaphragme de Pipistrellus pipistrellus et de Rhinolophus ferrumequinum capturés en été. M = cellules mésothéliales fixées par des jonctions intercellulaires "tight and gap" (insert 1); c = canal dans le tissu conjonctif sous-mésothélial (Ct) revêtu par de fines expansions secondaires (flèches) de cellules endothéliales adiacentes (e) dont les principales expansions a et b délimitent la partie centrale (s) d'un canalicule intraendothélial, qui dans la figure 7a apparaît rempli par des sphérolites de polystyrène latex. L = lumière du vaisseau lymphatique. X17500; X18000.



FIGURES 8 & 8a

Diaphragm of *Pipistrellus pipistrellus* and *Rhinolophus ferrumequinum* captured in summer. Deeper layer of Fig. 7 to show the luminal orifice (big arrow) of the intra-endothelial channel in Fig. 8a filled with polystyrene latex spherules. L = lumen of the vessel; M = mesothelial cells; c = channel of the lower-mesothelial connective (Ct) coated by secondary cytoplasm expansions (small arrows). X17500; X18000.

FIGURE 8b

Diaphragm of *Pipistrellus pipistrellus* captured during hibernation-winter season. Intra-muscular lymphatic vessel supplied with an intraendothelial channel (a and b) with polystyrene spherules drained into the lumen (L). m = muscular fibers. X21000.

FIGURES 8 & 8a

Diaphragme de *Pipistrellus pipistrellus* et *Rhinolophus ferrumequinum* capturés en été. Membrane plus profonde de la figure 7a pour montrer l'orifice de la lumière (flèches épaisses) du canal intra-endothélial en figure 8a rempli par des sphérules de polystyrène de latex. L = lumière du vaisseau ; M = cellules mésothéliales ; c = canal du conjonctif mésothélial inférieur (Ct) revêtu par des expansions cytoplasmiques secondaires (petites flèches).

FIGURE 8b

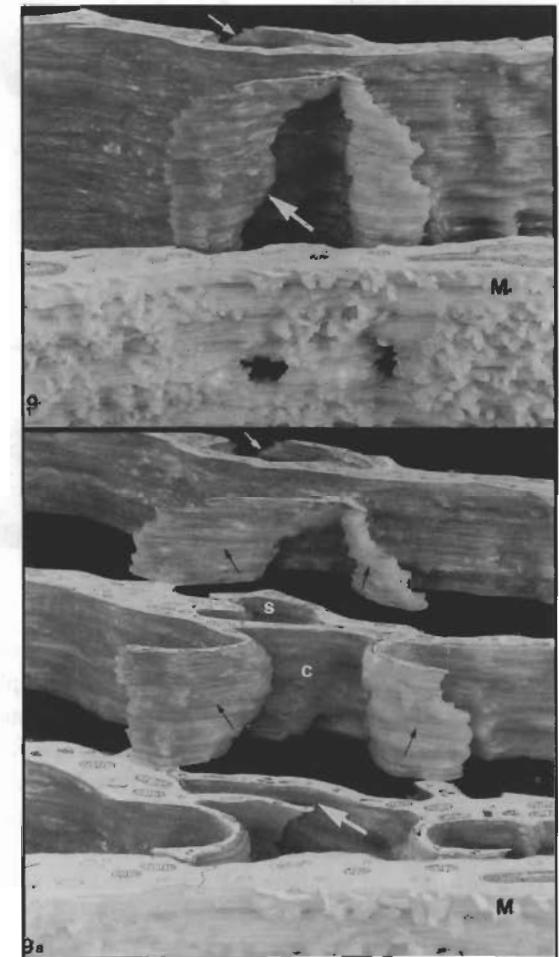
Diaphragme de *Pipistrellus pipistrellus* capturée durant la période d'hibernation. Vaisseau lymphatique intramusculaire "fourni de canalicules intraendothéliaux" (a et b) avec des sphérules de polystyrène latex drainées dans la lumière (L). m = cellules musculaires lisses. X21000.

This formation is made of the **a** and **b** cytoplasm expansions of two adjacent cells and two orifices, which are the abluminal and luminal openings (Figs. 6 and 8) of the channel itself. The abluminal orifice, in which (Fig. 6a) contains polystyrene spherules is formed following a secondary cytoplasm expansion of the endothelial cell **a** (Fig. 6) which, for 22-25 progressively serialized slices, as clearly seen in Figs. 9 and 9a. This reaches the abluminal surface of an adjacent endothelial cell where it remains, attaching exclusively to the peripheral margins by tight and gap junctional complexes. The luminal opening results from normal finishing of a terminal portion of the **b** cell's peripheral cytoplasm. From the serial thin slices and from their three-dimensional model reconstruction (Figs 9 and 9a), this morphologic behaviour can be compared to a mountain tunnel: the central part constitutes the tunnel of the intraendothelial channel filled with polystyrene latex spherules in Fig. 7a, while the entrance and the exit of the tunnel are represented respectively, by the abluminal and luminal orifices. The formation of this luminal orifice permits the central part of the channel to communicate with the lymphatic vessel lumen, where the polystyrene latex spherules drain (Figs. 8a and 8b). All of this helps us to better grasp the pathway the spherules follow after migration through the drainage unit components, namely: the stomata and the lower mesothelial connective channel. Polystyrene spherules have also been accidentally found inside the cytoplasm of the endothelial cells (phagocytosis). However, their flow into the lymphatic vessel lumen has never been documented. Therefore, phagocytosis does not seem to figure as a means of transendothelial transport. We should also note that, in physiological conditions, the intraendothelial channels originate from a rather limited expansion of the peripheral cytoplasm's end portion, and never from the cell body of an endothelial cell.

Up until now, open junctions between endothelial cells caused by the dissolution of tight and gap junctions with consequent direct continuity between the interstitium and the lymphatic vessel lumen have never been observed. Rare cases of this type continuity result from endothelial wall ruptures due to incorrect technical manipulations or the outcome of a longitudinal cut of the intraendothelial channels. This affirmation is based on the study of three-dimensional wax models of serialized slices of many lymphatic vessels. We should again underline, that the lower mesothelial connective tissue channel, joins the lumen of the stoma and the lymphatic endothelial wall, but does not freely communicate directly with the lumen of the lymphatic vessel. Continuity occurs only through the abluminal orifice of an intraendothelial channel which is normally found at a deeper level of 4-5 μm , than the stomata giving particles access to the central portion of the channel (of 6-8 μm length), thereby permitting their passage into the lumen of the lymphatic vessel through the luminal orifice (Figs. 8 and 8b). The mesothelial stomata, the connective channel and the intraendothelial channel, have never been observed at the same cutting site. On the contrary, they have only ever been seen on different spatial planes. Together these morphologic entities make up a 7-8 μm length, optically empty formation, where liquids, particles (China ink and polystyrene spherules) have been found during their migrations. All of the above described morphological aspects, although limited in number, have also been found at the superficial lymphatic vessels, distributed throughout the lower pleural connective tissue.

Although they are smaller and contain a fewer number of intraendothelial channels, the intramuscular or deep lymphatic vessels, share the same ultrastructural characteristics of the

superficial lymphatic vessels. Bicuspid valves have been observed both in the absorbing peripheral lymphatic vessels (Figs. 10 and 11) and in the precollector vessels. The valvular hemis are formed by an invagination of the endothelial wall, including the underlying connective which forms its stroma or central axis. The stroma is coated by a single layer of endothelial cells which rest on a continuous basal lamina, while endothelial cells are united with the **peripheral margin** by end to end and overlapping type contacts, fixed by tight and gap junctions. In the central and basal parts of the valvular hemis, the endothelial cell cytoplasm presents evident endo-exocytotic invaginations and bundles of thin actinomimetic filaments (Fig. 11a) which attest to intrinsic contractile activity. These valves do not undergo relevant qualitative and quantitative seasonal changes.

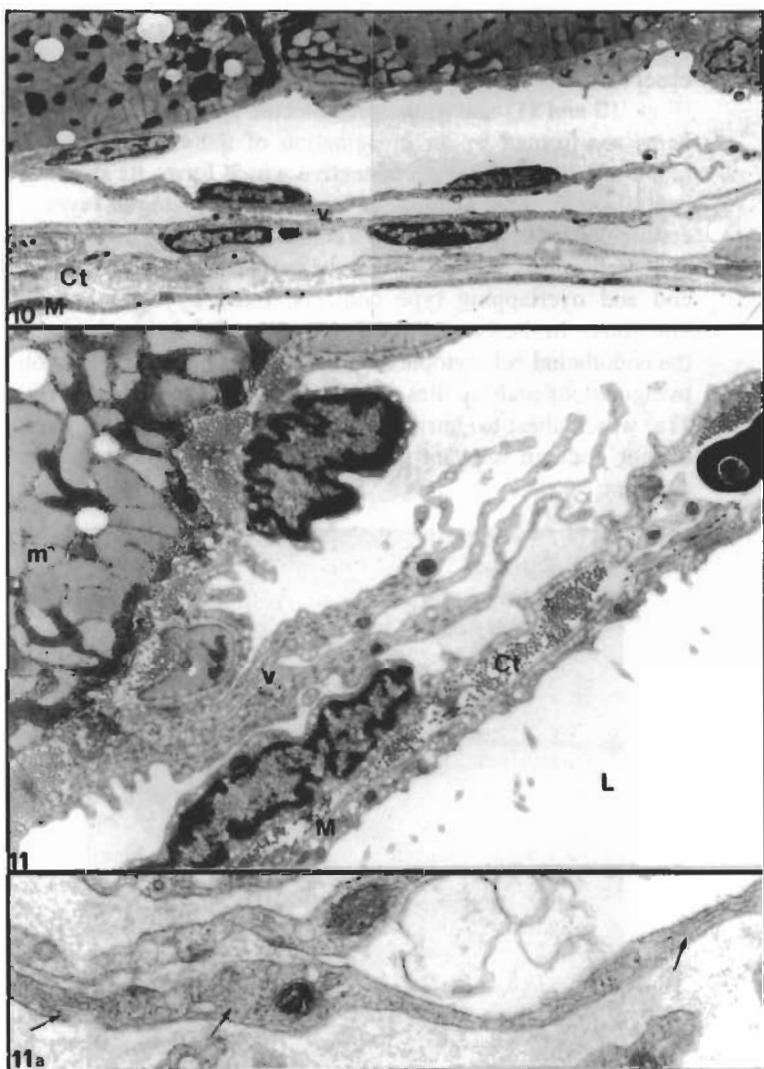


FIGURES 9 & 9a

Three-dimensional model of a lymphatic vessel of figs. 7, 8 and 8b supplied with intraendothelial channel revealing the central part of the channel (s) and the abluminal (big arrows) and luminal (small arrows) orifices. Black arrows = secondary cytoplasm expansions of adjacent endothelial cells delimiting the "drainage channel" (c) laying on the mesothelial cells' basal portion (M).

FIGURES 9 & 9a

Modèle tridimensionnel du vaisseau lymphatique des fig. 7,8 et 8b fourni du canalicule intraendothélial pour démontrer la partie centrale (s) et les orifices abluminaux (flèches épaisses) et luminaux (petites flèches). Flèches noires = expansions cytoplasmiques secondaires des cellules endothéliales adjacentes délimitant le canal de drainage (c) reposant sur la portion basale des cellules mésothéliales (M).



FIGURES 10, 11 & 11a

Diaphragm of Pipistrellus pipistrellus captured during hibernation. Superficial absorbing lymphatic vessel with bicuspid valve (v). M=peritoneal mesothelium; Ct = lower-mesothelial connective tissue; m=muscular fibers.

FIGURES 11a = sheafs of actinosimilar filaments (arrows) in the cytoplasm of a valvular hem. L=lymphatic vessel lumen.X4500; X18000; X53000.

FIGURES 10, 11 & 11a.

Diaphragme de Pipistrellus pipistrellus capturé durant la période d'hibernation. Vaisseau lymphatique superficiel absorbant avec valve bicuspidé (v).

M = mésothélium péritonéal ; Ct = tissu conjonctif sous-mésothélial ; M = cellules musculaires lisses.

FIGURE 11a = faisceaux de filaments actine-similaires (flèches) dans le cytoplasme d'une cellule du bord valvulaire. L = lumière du vaisseau lymphatique. X4500 X18000 ; X53000.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The purpose of this study is to extend the knowledge of the morphologic characteristics of the diaphragm's lymphatic vessels which absorb particles and liquid substances contained in the thoracic and abdominal cavities (Ottaviani, 1958) and involving in important physiological (peritoneal dialysis, transfusion of hematic cells in foetus and new-born) and pathological (ascites, bacteria transport, virus, tumor cells) processes. The study was conducted using classical (blue of Prussia) and experimental methods. We traced the pleural and the peritoneal vascular planes, composed of superficial lymphatic vessels (lower peritoneal and lower pleural) and deep interwoven intramuscular lymphatic vessel networks, whose lymph drains into dorsal and ventral valved precollecting vessels. At the diaphragm's peripheral margin, the ventral precollectors drain into the pre-lymph node collector, - a tributary of the sternal lymph node - or, when this is non existent, drains into the anterior mediastinic lymph nodes, while the dorsal precollectors primarily flow into the inter-renal or para-aortic lymph nodes. These findings complete previous research of Ottaviani (1933), and underline behaviour which is similar to that of human diaphragm lymphatic vessels (Mazza and Ottaviani, 1955), demonstrating that morphologic variability is tightly related to the amount of connective tissue, rather than to the absorbing phenomenon. The voluminous superficial lymphatic vessels (also called lacunae) with their linear order, are present both at the muscular portion and at the tendon center. They are separated by the pleural or peritoneal

mesothelial epithelium by a layer of connective tissue made of collagen and elastic fibers and fibroblasts. In correspondence of the mesothelial stoma (von Recklinghausen stomata), connective tissue layer interrupts and appears as optically empty space, or „channel”, whose peripheral margins are coated by thin secondary cytoplasm expansions of adjacent cells of lymphatic vessel's abluminal endothelial wall. According to Wang (1975), this channel is delimited also by mesothelial cell expansions which, when united with endothelial cells expansions, create a direct continuity between the abdominal cavity and the lymphatic vessel lumen. In three-dimensional models and the thin serialized slices reveal a continuous endothelial wall of the lymphatic vessel which follows the stomata and channel, as already reported for man (Azzali 1995, in press); the open abluminal intraendothelial channels were found only on deeper cut levels of the stoma and channel. Contrary to what Tsilibary and Wissig (1987) describe, fibroblasts do not take part in delimiting the draining channel; however, since they are metabolically active, they could play a role in the channel formation, after the liberation of dissolving enzymes of the connective tissue. Moreover, although the elastic fibers of the lower mesothelial connective tissue are fewer in number than collagen fibers, they probably contribute to the emptying of the channel and, furthermore, preventing the contracted diaphragm from expanding during inspiration (Tsilibary and Wissig, 1987). The stoma of pleural and peritoneal surfaces are formed after a separation of adjacent mesothelial cells, under which the basal lamina of the mesothelial epithelium is totally absent. Contrary

to what König et al. (1981), Leak and Rahil (1978), described, for rats and mice, these cells represent the only cell population which undergoes few seasonal morphological modifications. Moreover, they present microvilli and are joined together by simple contact with plasma membrane fixed by complex specialized tight and gap junctions. They are capable of pinocytosis (Allen, 1936) and intense phagocytosis for China ink and polystyrene spherules which, however, do not enter the lower mesothelial connective. The cells activity, as also demonstrated by Bettendorf (1978), does not constitute proof of transcellular transport (Odor, 1956). The stomata share the same morphologic characteristics already described for other mammals (Wang, 1975; Casley-Smith, 1964; Leak, 1986; Tsilibary and Wissig, 1983; Florey, 1927; Nakatani et al., 1988; French et al., 1960) and with the lower mesothelial connective channel, constitutes the „drainage unit”. We think that this structure plays an important role in determining clinical implications such as ascites and the emission of tumor cells, bacteria and viruses into the blood circulation. The stomata definitely react to the peritoneal contents during experimental and physiological conditions and permit the passage of intraabdominal substances to the endothelial wall of the lymphatic vessels which, according to Tsilibary and Wissig (1983) is protected by a valvular mechanism which blocks back flow. According to Allen (1936) and Bettendorf (1979), this mechanism opens and closes the stomata during the rhythmic movements of the diaphragm. It should be underlined that the stomata freely continues into the „drainage channel” of the connective, but not directly into the lymphatic vessel lumen as described by Chung-Mochung (1937), Wang (1975), Pinchon et al. (1980), Mariassy and Wheeldon (1983) at the pleural parietal, in rabbits and rats, nor as described by Shinohara et al. (1985) in the ovarian sac of golden hamsters. For Fukuo et al. (1990), the stoma is formed simply by an external mesothelial margin and by a lymphatic endothelial internal orifice. On the basis of three-dimensional models and thin serialized slices, we think that finding of any one of the above mentioned morphologic aspects, must be attributable to the rupturing of an endothelial wall or to the longitudinal cutting of an intraendothelial channel (Azzali, 1988), not to a morphologic entity. We agree that the periodic movements of the diaphragm influence the organization of the „drainage unit” (French et al., 1960) and that the absorbing peripheral lymphatic vessel compression and dilation (Schmid-Schönbein, 1990). As far as the stoma are concerned, we have no evidence to confirm if they are stable (Von Recklinghausen, 1863), transitory (Mc Callum 1903; Florey, 1927) or valved structures capable of opening and closing in response to local conditions. We can however demonstrate their peculiar constant presence of stomata in areas with lymphatic lacuna or vessels (Leak and Rahil, 1978) and their greater numerical quantity in muscular portions, than in tendon areas, where, according to Fukuo et al. (1990), although not functionally active they are 1.5 times more numerous. Contrasting with the assertions of Tsilibary and Wissig (1983), we found no substantial morphological differences in the diaphragm mesothelial cells in the areas where superficial lymphatic vessels are or not present. The bundles of actinomimilar filaments been found in mesothelial cytoplasm, which means that the filament's role in maintaining normal stomata structure can not be established. On the other hand we agree with the hypothesis that mesothelial cell size can vary due to different conditions in the abdominal cavity. Like deep lymphatic vessels, the superficial vessels consist of a

monolayer of endothelial cells which lay upon a discontinuous basal lamina, characteristics shared by other animals (Casley-Smith, 1964; Leak and Burke, 1966; Yamagishi, 1961; Fukuo et al., 1990; Wang, 1975; Azzali, 1992) and in other anatomic districts (O'Morchoe, 1984; Azzali, 1982, 1990a). The peculiar seasonal modifications of the lymphatic endothelium such as the quantitative and qualitative variations in the endo cytoplasm organelles, and the endothelial wall profile which is wavy during the summer months and linear during hibernation, clearly indicate functional states of differing capacity and absorbing activity. The physiologic movements of the diaphragm play a definite role in the absorbing activity of the lymphatic vessels (Cocchetti, 1951; Mazza and Ottaviani, 1955). In this regard, Florey (1927) affirms that during anaesthesia or any other condition which diminishes contraction activity, the absorption of endoperitoneal substances is reduced or even blocked, and the slowed and reduced respiratory activity of animals during hibernation (Kayser, 1953) may create the same effect. The clearly visible endo-exocytotic invaginations at the plasma level and the small free vesicles of the cytoplasm matrix are not organized into vesicular channels for endothelial transport.

The intraendothelial channels are formed (Azzali, 1982, 1988), by peripheral cytoplasm expansions of adjacent endothelial cells. In some areas, instead of adhering together by the peripheral margins that permit normal intercellular contact, the secondary extension of one of these expansions, proceeds to the abluminal surface of the adjacent cell, fixing by specialized complex junctions exclusively to peripheral margins. Consequently, the two endothelial cells delimit an 8-11 μm length optically empty space (filled with spherules, or China ink particles in treated animals), which includes a central portion, tunnel, and the abluminal and luminal orifices. The movement of a secondary cytoplasm extension of an endothelial cell can be identified in the luminal and abluminal morphologic outline revealed with SEM as intercellular pockets or clefts (Castenholtz, 1984; Hunneshagen et al., 1988). These latters are in continuity with the vessel lumen and the interstitium rarely. According to the in vitro studies of Ottaviani (1958) the endothelial cells are particularly plastic. They can flow one upon the other, modify the topographical position of their cellular limits, and influence the opening and closing of the secondary cytoplasm extensions carrying high speed currents of interstitial liquid determined by histocyte movements and contractions. Further multidisciplinary studies could clarify and shed more light on these points. The changing seasonal number of the intraendothelial channels found in superficial and deep lymphatic vessels, in an expression of endothelial active movement. Therefore, the channels must be considered as dynamic units closely related to the physiological conditions of the interstitium. The intraendothelial channels, together with the stomata and the lower mesothelial channel, can provide answers to the questions posed by Mazza and Ottaviani (1955) concerning the existence and the consistency of a secure anatomical base for uncontrolled passage of bacteria, toxic substances and cells into the lymphatic circulatory system, and probably to the questions of Casley-Smith (VIIth International Congress of Lymphology - Firenze 1979) regarding the existence of openings in the absorbing lymphatic endothelial wall in quantities of 1-2 % based on the mathematical model elaborated with Elhay (1976). These affirmations are sustained also by the results obtained during the last fifteen years from the study of serialized slices and three-dimensional models, of the

absorbing lymphatic vessels of the diaphragm and also from other organs in same small mammals. All of these constitute a solid morphologic basis for Adair and Guyton's hypothesis (1985) that regards the absorbing lymphatic vessel as a „lymphatic pump". Regarding the „open junction inlet valve" our findings do not sustain Leak and Rahil's hypothesis (1978), that endothelial wall openings are formed following the distancing of cytoplasm hems of adjacent cells caused by the fleetingness of intercellular junctions or, the dissolution of specialized junction complexes (French et al. 1960; Bettendorf, 1978; Tsilibary and Wissig, 1987), or, anchoring fiber stretching in normal conditions (Leak and Burke, 1968; Castenholtz, 1988) primarily in the edema (Casley-Smith, 1980) or in the lower endothelial connective system (Castenholtz, 1991). These open junctions result from ruptures of the lymphatic endothelial wall following incorrect technical manipulation or a longitudinal cut on an intraendothelial channel as previously stated by Azzali (1980, 1988) and Azzali et al., (1989). These morphological aspects are discernible after careful observation of Figs. 10 and 13 from Tsilibary and Wissig (1987).

The results of the present study therefore, demonstrate the fundamental role played by the superficial lymphatic vessels, together with the intraendothelial channels, in the reabsorption of liquid and particles of the abdominal cavity. This aspects was also proposed by Starling and Tubby (1894), Curtice and Simmond (1954), Burke (1959), Stewart and Burgen (1958) and in clinical procedures such as kidney dialysis in patients with kidney insufficiency and in blood transfusions of the foetus and the new-born (Liley, 1963; Queenan, 1977). The deep and superficial lymphatic vessels and the pre-collecting vessels of bats' diaphragms, probably owing to species variations, unlike those of rats and mice (Tsilibary and Wissig, 1987), are provided with valves made of two contracting hems. The valves are not segmentar arrangement (Lymphangion) as in other muscular organs (Azzali and Romita, 1992), moreover, they facilitate lymph flow and block its return during the rhythmic contractions of the diaphragm (Azzali, 1992; Tsilibary and Wissig, 1987).

REFERENCES

- ADAIR T.H. and GUYTON A. C. (1985) – Lymph formation and its modification in the lymphatic system. In: "Experimental biology" of the lymphatic circulation. Johnston Ed., Elsevier Science B. V., Amsterdam, pp 13-42.
- ALLEN L. (1936) – The peritoneal stomata. *Anat. Rec.* 67: 89-103
- AZZALI G. (1977) – Il capillare linfatico. *Arch. Ital. Anat. Embriol.*, 82 suppl.: 220-221.
- AZZALI G. (1980) – Il vaso linfatico assorbente del villo intestinale in alcuni studi funzionali e sperimentali. *Arch. Ital. Anat. Embriol.*, 85: 391-407.
- AZZALI G. (1982) – Transendothelial transport of lipids in the absorbing lymphatic vessel. *Experientia* 38: 275-277.
- AZZALI G. (1988) – The "intraendothelial channels" of the peripheral absorbing lymphatic vessel. In : "Progress in Lymphology"; XI, H. Partsch ed., Elsevier Science B. V., Amsterdam, pp 187-192.
- AZZALI G. (1990a) – Bases morphologiques et ultrastructurales du système vasculaire lymphatique. *Acta-Biomedica-Ateneo Parmense* 61 : 1-40.
- AZZALI G. (1990b) – Méthodes pour la mise en évidence des vaisseaux lymphatiques. *Acta-Biomedica-Ateneo Parmense* 61 : 41-56.
- AZZALI G. (1992) – Morpho-functional features in the absorbing peripheral lymphatic vessels of diaphragm. *Congr. European Group of Lymphology*, Prague, pp 15-16. (Abstract).
- AZZALI G. (1995) – The transendothelial passage in the absorbing peripheral lymphatic vessel of rodent diaphragm. *It. J. Anat. Embryol.* (in press).
- AZZALI G., ORLANDINI G., BUCCI G. (1989) Morphological characters of the absorbing peripheral lymphatic vessel by TEM, SEM and three-dimensional models. In «Cells and Tissues : A Three-Dimensional approach by Modern Techniques in Microscopy» P.M. Motta ed., Alan Liss, New-York, pp 487-492.
- AZZALI G. and ROMITA G. (1992) – Topographic and ultrastructural feature of valves of absorbing peripheral lymphatic vessels. In: «Progress in Lymphology»; R.V. Cluzan et al. ed., Elsevier Science B. V., Paris, pp 99-102.
- BETTENDORF U. (1978) – Raster und transmissions elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Resorption korpuskulärer Partikel aus der Peritonealhöhle der Ratte. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 62 : 344
- BETTENDORF U. (1979) – Electronmicroscopic studies on the peritoneal resorption of intraperitoneally injected latex particles via the diaphragmatic lymphatics. *Lymphology* 12 : 66-70.
- BORN G. (1883) – Die Plattenmodellmethode. *Arch Mikrosk. Anat. Entw. Mech* 22 : 584-586.
- BURKE H.E. (1959) – The lymphatics which drain the potential space between the visceral and the parietal pleura. *Am. Rev. Tuberc.* 79 : 52-56.
- CASLEY-SMITH J.R. (1964) – Endothelial permeability; the passage of particles into and out of diaphragmatic lymphatics. *Q. J. Exp. Physiol.* 49 : 365-383.
- CASLEY-SMITH J.R. (1976) – Functional fine structure. *Experientia* 32 : 818-820.
- CASLEY-SMITH J.R. (1980) – The fine structure and functioning of tissue channels and lymphatics. *Lymphology* 12 : 177-183.
- CASLEY-SMITH J.R. (1985) – Vesicular Form and Fusion-As Revealed by Freeze-Immobilization and Stereoscopy of Semi-thin sections: Implications for Permeation via these Structures. *Prog. appl. Microcirc.* 9 : 6-20.
- CASLEY-SMITH J.R. (1988) – The two modes of initial lymphatic filling : colloidal osmotic pressure, hydrostatic pressure, or both ? . In «Progress in Lymphology». H. Partsch ed., Elsevier Sc. Publ., pp 173-177.
- CASTENHOLTZ A. (1984) – Morphological characteristics of initial lymphatics in the tongue as shown by scanning electron microscopy. In «Scanning electron microscopy», O. Johari ed., p 1343.
- CASTENHOLTZ A. (1988) – Histomechanical mechanism controlling fluid enter initial lymphatics. In : «body type»; XI; H. Partsch ed. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp 179-182.
- CASTENHOLTZ A. (1991) – The histomechanical role of the lymphatic endothelium for lymph formation and lymph transport. In: «body type», XIII, R.V. Cluzan et al. ed., pp 125-129.
- CHUN-MOCHUNG L. (1937) – Die Stomata in der Peritonealen Fläche des Zwerchells und ihre Beziehung den Lymphgefäßsen. *Arch. Jap. Chir.*, 15 : 877-883.

- COCCHETTI E. (1951) – Osservazioni anatomo-funzionali sui vasi linfatici del diaframma. *Mon. Zool. Ital.*, 60 suppl.: 130-132.
- COURTICE F.C. and SIMMOND W.J. (1954) – Physiological significance of Lymph Drainage of the Serous Cavities and Lungs. *Physiol. Rev.*, 34 : 419-448.
- DOBBINS W.O. and ROLLINS E.L. (1970) – Intestinal mucosal lymphatic permeability: an electron microscopic study of endothelial vesicles and cell junctions. *J. Ultrastruct. Res.* 33: 29-59.
- ELHAY S. and CASLEY-SMITH J.R. (1976) – Mathematical model of the initial lymphatics. *Microvasc. Res.* 12 : 121.
- EVANS G., WHINNEY C., TSOU K.C. (1966) – A new histochemical method for acid phosphatase. *F. Histochem. Cytochem.* 14 : 171-176.
- FLOREY H. (1927) – Reaction of lymphatics and absorption by lymphatics with special reference to those of the diaphragm. *Brit. J. Exp. Path.* 8 : 479-491.
- FRENCH J.E., FLOREY H.W., MORRIS B. (1960) – The absorption of particles by the lymphatics of the diaphragm. *Q.J. Exp. Physiol.* 45 : 88-103.
- FUKUO Y., SHINOHARA H., MATSUDA T. (1990) – The distribution of lymphatic stomata in the diaphragm of the golden hamster. *J. Anat.* 169 : 13-21.
- GEROTA D. (1896) – Zur Technik der Lymphgefäßinjektion. Eine neue Injektionsmasse für Lymphgefäß. *Anat. Anz.* 12 : 216.
- HUNNESHAGEN C., DEUTSCH A., WENZEL-HORA B.I., BERENS v., RAUTENFELD D. (1988) – Lymphatics of the turtle (*Pseudemys scripta elegans*) SEM, TEM and radiological investigations. In : «body type», XI, H. Partsch ed., pp 61-64
- HUTH F. and BERNHARDT D. (1977) – The anatomy of lymph vessels in relation to function. *Lymphology* 10 : 54-61.
- KALIMA T.V., COLLAN Y., KALIMA S.H. (1977) – Variations of lymphatic endothelial cell junctions in experimental condition. In : «body type»; V., R.C. Majall, H. M. Witte eds., Plenum Press, New-York, p 7.
- KATO F. (1966) – The fine structure of the lymphatic and the passage of China ink particles through their walls. *Nagoya Medical Journal* 12 : 221-246.
- KAYSER C. (1953) – L' hibernation des mammifères. *Ann. Biol.* 29 : 109-121.
- KÖNIG B., DE CAMARGO A.M., FERRAZ de CARVALHO C.A. (1981) – Morphological aspects and observations about the permeability of the rat mesentery to the lanthanum nitrate. Some comparisons with the morphology of the human mesentery. *Anat. Anz.* 149 : 365-374.
- LEAK L.V. (1986) – Distribution of cell surface charges on mesothelium and lymphatic endothelium. *Microvasc. Res.* 31 : 18-30.
- LEAK L.V. and BURKE J.F. (1966) – Fine structure of lymphatic capillaries and the adjoining connective tissue area. *Am. J. Anat.* 118 : 785-810.
- LEAK L.V. and BURKE J.F. (1968) – Ultrastructural studies on the lymphatic anchoring filaments. *J. Cell Biol.* 36 : 129-149.
- LEAK L.V. and RAHIL K.S. (1978) – Permeability of the diaphragmatic mesothelium. The ultrastructural basis for stomata. *Am. J. Anat.* 151 : 557-594.
- LILEY A.W. (1963) – Intrauterine transfusion of foetus in haemolytic disease. *Br. Med. J.* 2 : 1107-1109.
- MARIASSY A.T. and WHEELDON E.B. (1983) – The pleura: a combined light microscopic, scanning, and transmission electron microscopic study in the sheep. I. normal pleura. *Exp. Lung Res.* 4 : 293-313.
- MAZZA E. e OTTAVIANI G. (1955) – Ricerche anatomo-microscopiche sui vasi linfatici del diaframma. *Ateneo Parmense* 26 Suppl. : 151-222.
- McCALLUM W.G. (1903) – On the mechanism of absorption of granular materials from the peritoneum. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 14 : 105-115.
- NAKATANI T., SHINOHARA H., FUKUO Y., MORISAWA S., MATSUDA T. (1988) – Pericardium of rodents : pores connect the pericardial and pleural cavities. *Anat. Rec.* 220 : 132-137.
- ODOR D.L. (1956) – Uptake and transfer of particulate matter from the peritoneal cavity of the rat. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2 (suppl.) : 105-108.
- O'MORCHOE C.C.C. (1984) – Lymphatic system. In : «Blood Vessel and Lymphatic in Organ System». (D. I. Abramson, P.B. Dobrin eds.), Academic Press Inc., London, pp 532-539; 126-133.
- OTTAVIANI G. (1933) – Ricerche sul sistema linfatico dei Chiroterri. *Atti Soc. Ital. Progr. Scienze*, II : 104-122.
- OTTAVIANI G. (1937) – Contributi al sistema linfatico dei roditori. *Arch. Ital. Biochim.* 3 : 3-30.
- OTTAVIANI G. (1958) – Istobiologia dei vasi linfatici. *Folia Angiologica* 5 : 3-7.
- OTTAVIANI G. and AZZALI G. (1965) – Ultrastructure des capillaires lymphatiques. *Simp. Int. Morphologie et Histochemistry de la paroi vasculaire*. Fribourg 1965, Karger-Basel. 11 : pp 156-151.
- PALAY S.L. and KARLIN K.J. (1959) – An electron microscopic study of the intestinal villus. II. The pathway of fat absorption. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5 : 373-384.
- PINCHON M.C., BERNAUDIN J.F., BIGNON J. (1980) Pleural permeability in the rat. I. Ultrastructural basis. *Biologie cellulaire* 37 : 269-272.
- QUEENAN J. (1977) – Intrauterine transfusion. In : Modern Management of the Rh Problem. Hoeber Medical Division, Harper and Row, New-York, pp 149-190.
- REYNOLDS E.S. (1963) – The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17 : 208-212.
- SCHMID-SCHÖNBEIN G.W. (1990) – Microlymphatics and lymph flow. *Physiol. Rev.* 70 : 987-1021.
- SHINOHARA H., NAKATANI T., MATSUDA T. (1985) – The presence of lymphatic stomata in the ovarian bursa of the Golden Hamster. *Anat. Rec.* 213 : 44-52.
- SIMER P. H. (1948) – The passage of particulate matter from the peritoneal cavity into the lymph vessels of the diaphragm. *Anat. Rec.* 101 : 333-351.
- STARLING E.H. and TUBBY A.H. (1894) – On the paths of absorption from the peritoneal cavity. *J. Physiol.* 16 : 140-145.
- STEWART P.B. and BURGEN A.S.V. (1958) – The turnover of fluid in the dog's pleural cavity. *J. Lab. Clin. Med.* 52 : 212-220.
- SZABÓ G., ZSUZSA MAGYAR, SERENYI P. (1975) Lymphatic drainage of the peritoneal cavity in experimental ascites. *Acta Med. Ac. Sc. Hung.* 32 : 337-348.
- TSILIBARY E.C. and WISSIG S.L. (1977) – Absorption from the peritoneal cavity : SEM study of the mesothelium covering the peritoneal surface of the muscular portion of the mouse diaphragm. *Am. J. Anat.* 149 : 127-133.
- TSILIBARY E.C. and WISSIG S.L. (1983) – Lymphatic absorption from the peritoneal cavity : regulation of potency of Mesothelial stomata. *Microvasc. Res.* 25 : 22-39.
- TSILIBARY E.C. and WISSIG S.L. (1987) – Light and electron

microscope observations of the lymphatic drainage units of the peritoneal cavity of rodents. *Am. J. Anat.* 180 : 195-207.
VON RECKLINGHAUSEN F. (1863) — Zur Fettresorption. *Virchows Arch. Path. Anat.* 26 : 172-208.
WANG N.S. (1975) — The preformed stomas connecting the pleural cavity and lymphatics in the parietal pleura. *Am. Rev. Resp. Dis.* 111 : 12-20.

WERNER G. (1975) — Räumliche Rekonstruktion. *Meth-Elm* 7 : 4-15.
YAMAGISHI T. (1961) — Fine structure of lymph vessels in the abdominal wall of the diaphragm of dogs, and their attitude following absorption of China ink. *Nagoya Med. J.* 7 : 1-6.
YOFFEY J.M. and COURTICE C.C. (1970) — Lymphatic lymph and the lymphomyeloid complex. *Academic Pres.* London-New-York.

Die Lymphgefäß in der Pathologie des Dünn- und Dickdarmes. Morphologische und immunhistochemische Befunde.

The lymphatic vessels in the pathology of the large and small intestine. Morphological and immunhistochemical findings.

Les vaisseaux lymphatiques dans la pathologie de l'intestin grêle et du colon. Résultats morphologiques et immunohistologiques.

Stefan KRÖBER und Edwin KAISERLING

Institut für Pathologie der Universität Tübingen

ZUSAMMENFASSUNG

Die Frage nach Alterationen der Lymphgefäß bei Erkrankungen des Dünn- und Dickdarmes ist ein in der Literatur wenig beachtetes Thema. Aus diesem Grund haben wir über den Zeitraum von ca. 2 Jahren bei der histopathologischen Bearbeitung von Routinebiopsien und autopsischem Material in besonderem Maße auf Auffälligkeiten des Lymphgefäßsystems im Bereich von Dünn- und Dickdarm geachtet. Das Untersuchungsgut umfaßt Lymphangiekasien, Lymphzysten, Tumoren des Lymphgefäßsystems, Fälle mit Lymphangiosis carcinomatosa, M. Crohn, Colitis ulcerosa und M. Whipple sowie Dickdarmpolypen, -adenome und Karzinome. Des Weiteren soll die Mitbeteiligung von Lymphgefäßen bei Amyloidose untersucht werden.

Die bislang schwierige Identifikation von Lymphgefäßen und Lymphgefäßtumoren ist heute durch Verwendung des

Antikörpers CD34, mit dem Blutgefäßendothelien nicht aber Lymphgefäßendothelien markiert werden, eindeutig und in allen von uns untersuchten Fällen möglich. Die Lymphangiosis carcinomatosa führt nach unseren Beobachtungen in der Regel nicht zu einer Insuffizienz des Lymphgefäßsystems des Intestinaltraktes. Nur in einem Fall waren Zeichen der Lymphgefäßinsuffizienz zu belegen. Beim M. Whipple sind die Ektasie mukosaler Lymphgefäß und das zellreiche interstitielle Infiltrat Ausdruck eines stark alterierten Lymphgefäßsystems. Der M. Crohn und insbesondere die Colitis ulcerosa gehen im Dickdarm mit einer Vermehrung und teils angiomartiger Ektasie der Lymphgefäß einher. Diese Befunde sprechen für einen gestörten Lymphabfluß, der auch in der interstitiellen Fibrose und in dem makrophagenreichen Ödem seinen Ausdruck findet. Die Metastasierungsneigung von Karzinomen, die auf dem Boden einer Colitis ulcerosa entstanden sind, ist möglicherweise auf die Lymphgefäßvermehrung in Submukosa und Mukosa zurückzuführen. In zahlreichen Fällen lässt sich demonstrieren, daß normale Dickdarmschleimhaut in der Muscularis-mucosae-nahen Zone Lymphgefäß aufweist. Insofern ist es nicht überraschend, daß auch Adenome, juvenile Polypen und chronisch entzündlich veränderte Schleimhautareale bei Colitis ulcerosa zumindest partiell von Lymphgefäß versorgt werden, ein in der Literatur wenig oder nicht beachteter Befund. Bei fortgeschrittenen generalisierten Amyloidose kann eine Lymphbahnamyloidose ganz erhebliche Ausmaße annehmen, wobei bei der teils exzessiven Ablagerung von Amyloid im Bereich von Lymphbahnen zu vermuten ist, daß hier die lymphpflichtigen Lasten nur noch in verminderter Umfang resorbiert werden können.

Key words :

Lymphatic vessel - Crohn's disease - ulcerative colitis - Whipples's disease - adenoma - carcinoma - amyloidosis.

Request to :

KAISERLING E.
Institut für Pathologie der Universität
Liebermeisterstrasse 8
72076 Tübingen
Germany
Tel. (0) 7071 292991
Fax. (0) 7071 292258

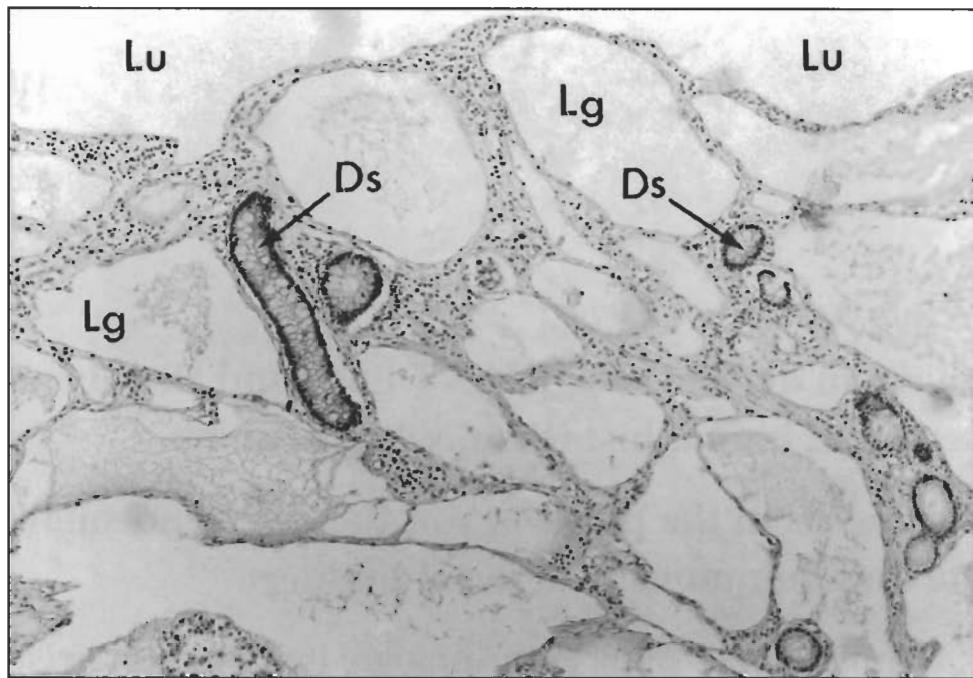


ABBILDUNG 1 - FIGURE I

Lymphangioma des Dickdarmes mit hochgradig ektatischen Lymphbahnen bis in oberste Schichten der Mukosa. Lu = Darmlumen, Lg = Lymphgefäße, Ds = Drüsenschläuche. Vergrößerung 180×.

Lymphangioma of the large intestine with marked ectasia of the lymphatics extending into the uppermost layers of the mucosa. Lu = intestinal lumen, Lg = lymphatic vessels, Ds = glands. Magnification ×180.

Lymphangiome du gros intestin avec une ectasie importante des vaisseaux lymphatiques jusqu'à la couche supérieure de la muqueuse. Lu = lumen intestinal, Lg = vaisseaux lymphatiques, Ds = glandes. Grossissement ×180.

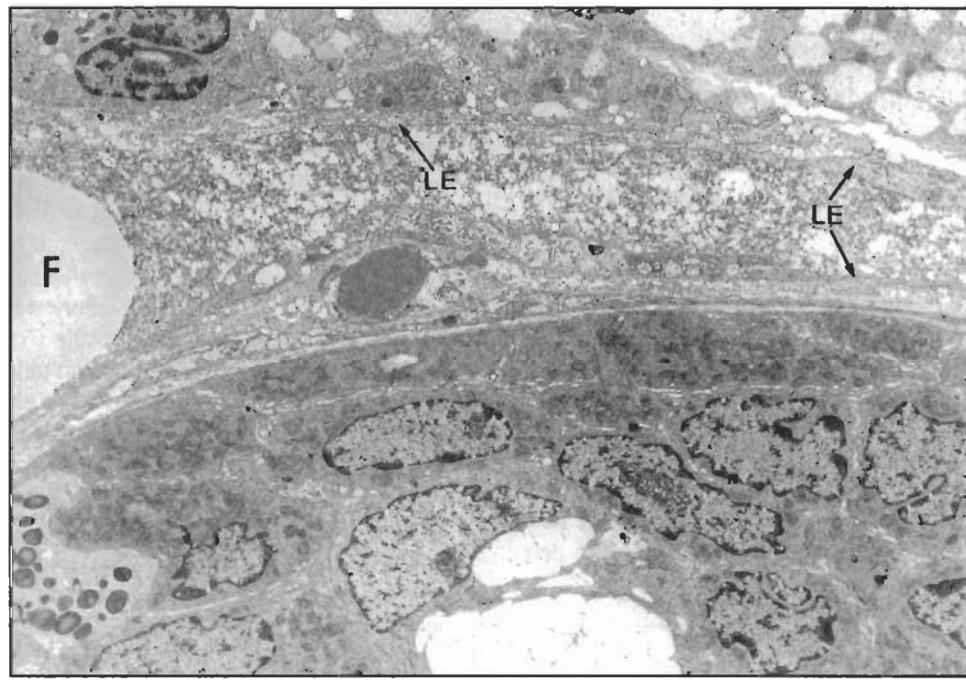


ABBILDUNG 2 - FIGURE 2

M. Whipple : Elektronenmikroskopie einer hochgradig ektatischen Lymphbahn (LE = Lymphendothel) mit schaumig-vakuolärem Material und Fett (F) angefüllt. Vergrößerung 4000×.

Whipple's disease. Electron micrograph of a severely ectatic lymphatic vessel (LE = lymphatic endothelial cell) that contains foamy vacuolated material and fat (F). Magnification ×4000.

La maladie de Whipple : L'examen au microscope électronique d'une importante lymphangiectasie (LE = Endothélium lymphatique) qui contient de la matière spumeuse vacuolée et la graisse (F). Grossissement ×4000.

EINLEITUNG

Das Lymphbahnsystem in Dünnd- und Dickdarm findet trotz seiner klinischen Bedeutung in Publikationen der letzten 10 Jahre unverhältnismäßig wenig Beachtung. Ziel der von uns durchgeführten Untersuchungen sollte es sein, die Bedeutung der Lymphgefäß bei verschiedenen Erkrankungen aus der Sicht histomorphologischer Befunde herauszustellen. Außer den eigentlichen Lymphgefäßtumoren wollten wir insbesondere chronisch entzündliche Erkrankungen des Dünnd- und Dickdarms, verschiedene Amyloidosetypen sowie Präkanzerosen und maligne epitheliale Tumoren des Dickdarmes hinsichtlich der Veränderungen von Lymphgefäßen untersuchen.

MATERIAL UND METHODEN

Untersucht wurden Dünndarmlbiopsate mit Lymphangiekasien ($n = 4$), Lymphzysten ($n = 7$) und Lymphangiome ($n = 3$), die sich im biotischen Untersuchungsgut der letzten 2 Jahre fanden. Die Lymphangiosis carcinomatosa des Dünndarms bei metastasierten Karzinomen untersuchten wir in 6 Fällen. In einem Fall standen uns Gewebsproben des Dünndarms bei M. Whipple für eine licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung zur Verfügung. Autopsisch gewonnene Dünndarm ($n = 3$) und Dickdarmgewebeproben ($n = 6$) bei generalisierter Amyloidose wurde lichtmikroskopisch und immunhistochemisch analysiert. In zwei Fällen von generalisierter Amyloidose standen uns biotische Darmresektate für eine elektronenmikroskopische Untersuchung zur Verfügung. Amyloid wurde mit der Kongorotfärbung in Kombination mit der Polarisationstechnik dargestellt. Eine Differenzierung zwischen primären und sekundären Amyloidosen wurde mit Kaliumpermanganat (Modifikation der Romhanyi-Färbung; Wright et al., 1977) und mit einer Immunfärbung mit Anti-kappa- und Anti-lambda-

Serum und Antikörpern gegen Amyloid A Protein (Dakopatts) durchgeführt. Weiterhin wurden Dickdarmresektate bei 2 Fällen von M. Crohn und 10 Fällen von Colitis ulcerosa lichtmikroskopisch untersucht. Aus dem biotischen Untersuchungsgut der letzten 2 Jahre wählten wir uns geeignet erscheinende Fälle von Dickdarmadenomen, Dickdarmkarzinomen und nichtpräkanzerösen Polypen. Zur Darstellung von Blutgefäßen diente der Antikörper CD34 (Dianova, Hamburg, Deutschland).

ERGEBNISSE

Bei den untersuchten Lymphangiekasien, Lymphzysten und Lymphangiomen finden sich ektatische und von CD34-negativen Endothelien ausgekleidete Lymphgefäße (Abb. 1). Die Mukosa und Submukosa sind frei von pathologischen Veränderungen und zeigen insbesondere keine Vermehrung von Makrophagen oder Schaumzellen.

Bei der Lymphangiosis carcinomatosa sieht man an den untersuchten Dünndarmresektaten wechselnde Bilder. In einem Fall findet man eine hochgradige Vermehrung von Schaumzellen im Bereich von Mukosa und Submukosa. In 2 Fällen ist selbst bei Befall der mukosalen Lymphgefäße kein nennenswerter pathologischer Befund der Mukosa zu verzeichnen. In 3 Fällen ist eine hochgradige Fibrose und Vermehrung von Makrophagen und Lymphozyten im Bereich der Submukosa und *Muscularis propria* (bei unauffälliger Mukosa) zu verzeichnen. Die Untersuchungen eines Dünndarmlbiopsates beim M. Whipple zeigt, daß außer den intrazellulären Bakterien, eine massive Vermehrung auch im Interstitium zu verzeichnen ist. Weiterhin sieht man ein interstitielles Ödem, sowie Fettropfen und Zelldetritus. Elektronenmikroskopisch sieht man hochgradig ektatische Lymphbahnen mit abgeflachten Endothelien (Abb. 2), sowie teils intra-, teils extraphagosomally gelegene Bakterien (Abb. 3).

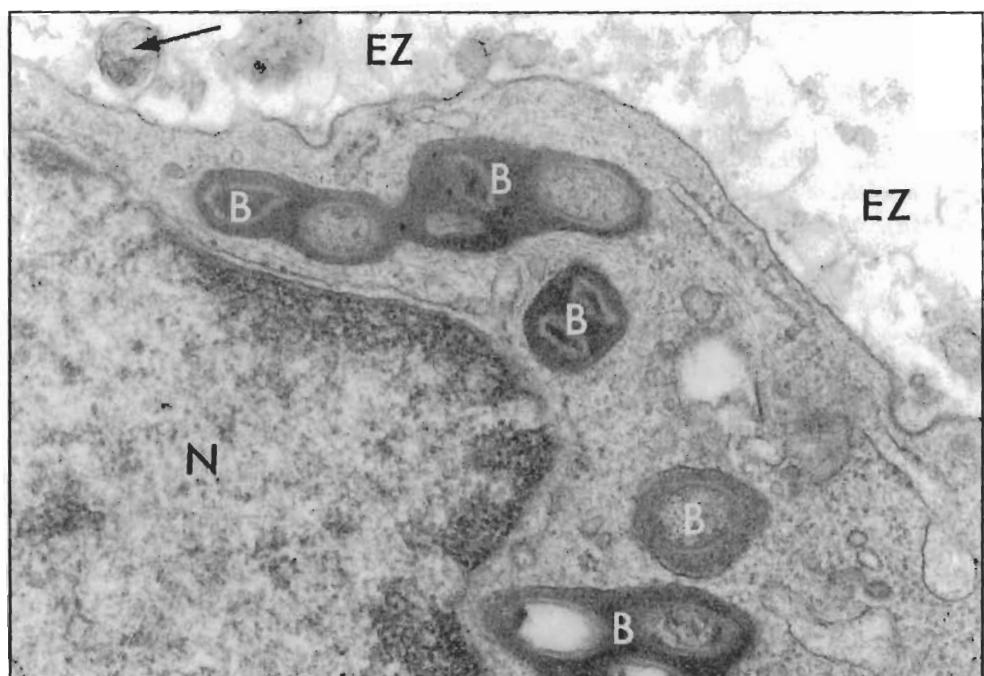
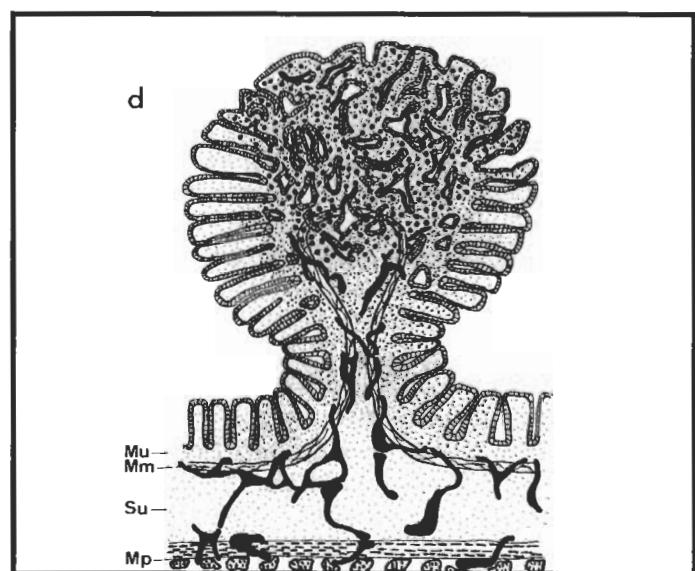
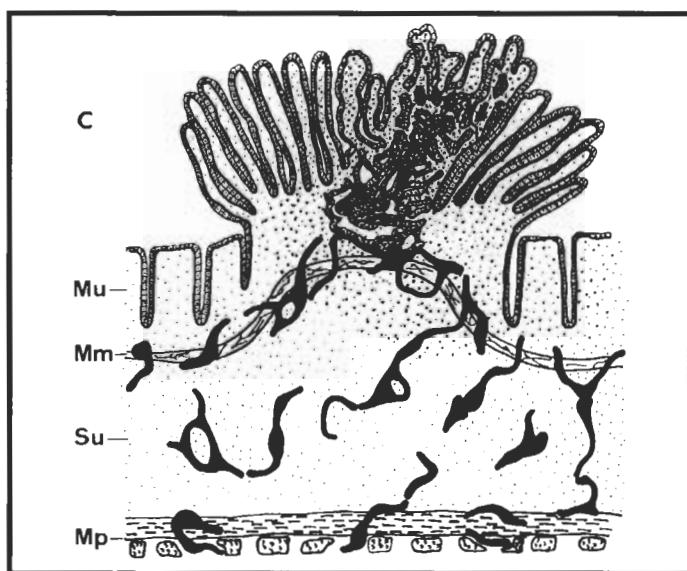
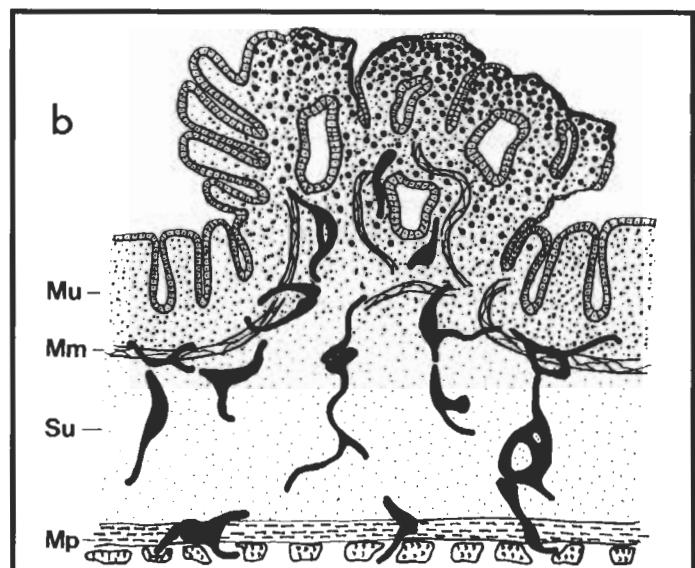
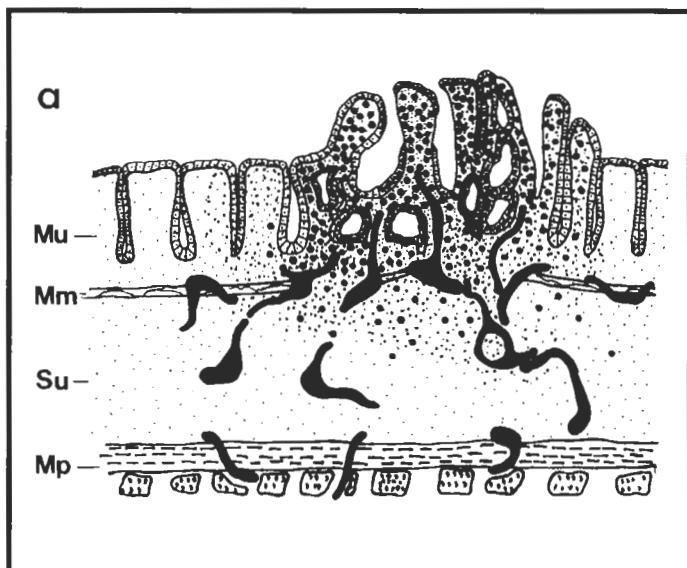


ABBILDUNG 3 - FIGURE 3

M. Whipple : Elektronenmikroskopie eines Makrophagen mit intraphagosonalen Bakterien (B) und im Extrazellularraum (EZ) gelegenen degenerativ veränderten Bakterien(r). N = Zellkern. Vergrößerung ×40000.

Whipple's disease. Electron micrograph showing a macrophage with intraphagosomal bacteria (B) and degenerate bacteria (r) in the extracellular space (EZ). N = nucleus. Magnification ×40000.

La maladie de Whipple : L'examen au microscope électronique montre un macrophage avec une bactérie intraphagosomale (B) et des bactéries dégénératives (r) dans l'espace extracellulaire (EZ). N = noyau. Grossissement ×40000.



Schema

- a) Lymphgefäßverhältnisse beim sog. *in-situ* Karzinom des Dickdarms.
 b) Die Lymphgefäße Tumorlevel I (nach Haggitt et al.) eines gestielten Adenoms mit schwerer Dysplasie : der Tumor durchbricht die *Muscularis mucosae*, bleibt aber auf den Polypenkopf beschränkt.
 c) Colitis ulcerosa : In der Mukosa etabliert sich ein Granulationsgewebe, welches mit Lymphbahnen und neugebildeten Blutgefäßen ausgestattet ist.
 d) Juveniler Schleimhautpolyp : Neugebildete und ektatische Lymgefäße in oberen Schleimhautschichten.
 Lymphgefäßsystem (schwarz), Mukosa (Mu), Submukosa (Su), Muscularis mucosae (Mm), Muscularis propria (Mp).

Diagram.

- a) Lymphatics in so-called carcinoma *in situ* of the large intestine.
 b) Lymphatics at tumour level I (according to Levine and Haggitt, 1989) of a pedunculated adenoma with severe dysplasia. The tumour has penetrated the *muscularis mucosae* but is still confined to the head of the polyp.
 c) Ulcerative colitis. There is granulation tissue with lymphatics and newly-formed blood vessels in the mucosa.
 d) Juvenile mucosal polyp. newly-formed ectatic lymphatic vessels are present in the upper layers of the mucosa. Lymphatic system (black), mucosa (Mu), submucosa (Su), muscularis mucosae (Mm), muscularis propria(Mp).

Schéma.

- a) Les vaisseaux lymphatiques dans le carcinome *in situ* du gros intestin.
 b) Les vaisseaux lymphatiques dans la tumeur du niveau I (selon Levine and Haggitt, 1989) d'un adénome collé à une dysplasie grave. La tumeur a pénétré la musculaire-muqueuse, mais elle est encore seulement dans la tête du polype.
 c) Colite ulcéreuse. Il y a dans la muqueuse du tissu granuleux avec des vaisseaux lymphatiques et des vaisseaux sanguins néo-formés.
 d) polype juvénile de la muqueuse. Il y a des vaisseaux lymphatiques ectatiques néo-formés dans la couche supérieure de la muqueuse. Système lymphatique (noir), Muqueuse (Mu), Sous-muqueuse (Su), Musculaire-muqueuse (Mm), Musculaire propre (Mp).

Bei der Colitis ulcerosa (Schema a) und beim M. Crohn findet man bei der Mehrzahl der Fälle eine Vermehrung und teils hochgradige Ektasie submuköser Lymphgefäß im Dickdarm, wobei teils angiomartige Formationen ausgebildet sind. Im Randbereich ulcerierter Schleimhautläsionen sind vereinzelt Lymphgefäß auch in mittleren Schichten der Mukosa selbst nachweisbar. Bei tubulären und villösen Adenomen sind in einzelnen Fällen (4 von 15 Fälle) innerhalb der der Muscularis mucosae naheliegenden Anteile der Mukosa Lymphkapillaren zu finden. Beim juvenilen Schleimhautpolypen (Schema b) können Lymphkapillaren bisweilen auch im mittleren Polypenabschnitt angetroffen werden. Bei mehreren Fällen finden sich bei Dickdarmkarzinomen, die noch auf die Mukosa beschränkt sind (Adenom mit schwerer Dysplasie, Tis; Schema c), in direkter Nachbarschaft zum Tumor Lymphgefäß. Die Lymphgefäßlichtungen sind frei von Tumorzellen. Karzinomatös entartete Adenome mit beginnender Invasion der Submukosa (Schema d), zeigen häufig bereits eine fortgeschrittene Lymphangiosis carcinomatosa.

Immunhistochemisch reagieren die Lymphgefäßendothelien CD34 negativ, Blutgefäßendothelien hingegen positiv. Dies gilt auch bei einer kombinierten Darstellung von Amyloid mit der Kongorotreaktion bei anschließender Färbung mit Anti-CD34. Bei der Lymphgefäßamyloidose des Darms (5 von 9 Fälle) sind,

wie in einem Fall auch elektronenmikroskopisch zu belegen ist, bevorzugt die Lymphkapillaren und Kollektoren der Submukosa und Subserosa betroffen. Auch die Lymphgefäß der Dünndarmzotten können eine Amyloidose aufweisen. Perilymphangische Amyloidablagerungen sind nach unseren Befunden häufiger, als man dies nach rein lichtmikroskopischen Befunden vermuten würde. Unsere vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung belegt, daß auch bei negativer Kongorotreaktion kleine Amyloidpräzipitate ultrastrukturell nachweisbar sein können. In der Dickarmschleimhaut ist perivasales Amyloid in 4 Fällen von autoptisch nachgewiesener sekundärer und primärer (Typ AL lambda) Amyloidose zu finden. Elektronenmikroskopisch sind die Lymphgefäß von Amyloidfibrillen teils manschettenartig umgeben (Abb.4), teils sind den Lymphgefäßendothelien, die in typischer Weise Basalmembranen vermissen lassen, kleinere Amyloiddepositionen angegliedert.

Die Ultrastruktur der Lymphgefäßendothelien ist weitgehend unauffällig. In einzelnen Endothelien sind zahlreiche Pinozytosevesikel angeschnitten. Einzelne Endothelien zeigen fokale degenerative Zytoplasmaveränderungen. In allen Fällen ist die Lymphbahnamyloidose mit einer massiven Amyloidose der Blutgefäße kombiniert.

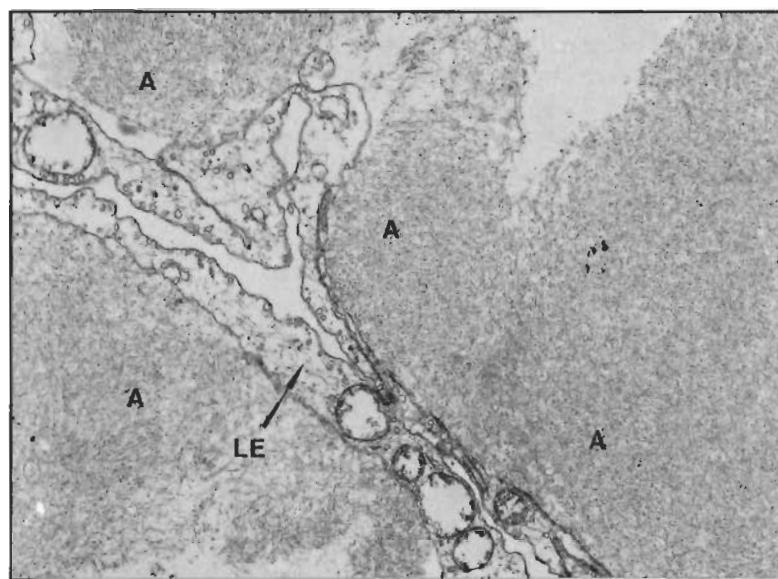


ABBILDUNG 4 - FIGURE 4

Elektronenmikroskopische Darstellung manschettenartiger Amyloidablagerungen (A) im Bereich einer Lymphbahn der Submukosa des Dickdarms bei generalisierter Amyloidose (medulläres Plasmozytom).

LE = Lymphgefäßendothelien. Vergrößerung ×20000.

Electron micrograph showing a sleeve of amyloid deposits (A) around a lymphatic vessel in the submucosa of the large intestine in a case of generalized amyloidosis (medullary plasmacytoma). LE = lymphatic endothelial cells. Magnification ×20000.

Le microscope électronique montre des dépôts de l'amyloïde qui ressemblent à une manchette (A), dans la région des vaisseaux lymphatiques de la sous-muqueuse colique dans une amyloïdose généralisée (plasmocytome médullaire). LE = Endothélium lymphatique. Grossissement ×20000.

KONKLUSIONEN

Die normale Anatomie des Lymphgefäßsystems im Dünndarm mit seinen Zottengefäßen, Kollektoren in Submukosa und Subserosa (Levine und Haggitt, 1989) bedarf keiner besonderen Erwähnung. Verwiesen sei auf die umfangreichen Studien von Grau und Schlüns aus dem Jahre 1962 und die erste elektronenmikroskopische Beschreibung der Zottengefäße von Papp et al. (1962). Immerhin erscheint es bemerkenswert, daß noch im Jahre 1957 (Renyi-Vamos und Szinay) die Existenz von Lymphkapillaren in Dünndarmzotten bestritten wurde. Von den Lymphgefäßen, die im Zentrum der Dünndarmzotten beginnen und die der Aufnahme von Nahrungsstoffen dienen, sind die Lymphbahnen abzugrenzen, die der Drainage des lymphatischen Gewebes, der Lymphfollikel und Peyerschen Plaques dienen. Letztere stehen im Dienste der Immunreaktionen des mukosaassoziierten lymphatischen Gewebes.

Zur Darstellung der Lymphgefäße verwendeten wir die Färbung mit Anti-CD34, ein Verfahren, mit dem sich positiv markierte Blutgefäßendothelien gegen negative Lymphgefäßendothelien abgrenzen lassen (Regezi et al. 1992; Kaiserling und Kröber, 1994). Die Identifikation der Lymphgefäße war hiermit in allen von uns untersuchten Fällen möglich.

Bei Untersuchungen zur Pathologie des Lymphgefäßsystems in Dünn- und Dickdarm ist davon auszugehen, daß unter physiologischen Verhältnissen der Dünndarm sowohl in der Mukosa wie auch in den submukösen und tieferen Abschnitten stark vaskularisiert ist. Aus diesem Grunde ist es nicht verwunderlich, daß selbst bei ausgeprägter Lymphangiosis carcinomatosa des Dünndarms, Fälle zu finden sind, bei denen sich keine Zeichen einer Lymphgefäßinsuffizienz (Ödem, interstitielle Makrophagenvermehrung, Sklerose) nachweisen lassen. So stellt der von uns beobachtete Befund mit einer massiven Schaumzellvermehrung in der Mukosa des Dünndarms, einen eher selten zu beobachtenden Befund dar. Er ist u.E. im Sinne einer Dekompensation des Lymphgefäßsystems bei massiver Lymphangiosis carcinomatosa zu interpretieren. Im Falle des von uns untersuchten M. Whipple finden sich alle Zeichen eines nicht mehr hinreichend funktionstüchtig resorbierenden Lymphgefäßsystems. Die Lymphgefäße sind hochgradig ektatisch und dilatiert, wohl infolge eines Lymphgefäßverschlusses oder einer Stenose. Die Mukosa ist ödematos geschwollen und reich an interstitiellen Makrophagen. In der Literatur wird die hochgradige Ektasie und wohl auch Vermehrung von Lymphgefäßen bei idiopathischer Colitis (*Colitis ulcerosa* und M. Crohn) wenig beachtet. In zahlreichen Fällen sieht man nach unseren Befunden hochgradig ektatische und angiomartige Formationen, insbesondere in der Submukosa. Fibrose und interstitielles entzündliches Infiltrat sind wohl Folge einer gestörten Lymphresorption. Die Ektasie und Lymphgefäßvermehrung in der Submukosa dürfte reaktiver Natur und/oder Folge einer Lymphgefäßproliferation sein. Bei einer chronischen Colitis ist darüberhinaus davon auszugehen, daß auch die Mukosa in vermehrtem Umfang von Lymphgefäßen versorgt wird, da man voraussetzen kann, daß innerhalb eines Granulationsgewebes, welches sich nach einer Ulceration ausbildet, Lymphgefäßneubildungen stattfinden.

Die vielfach vertretene Ansicht, daß die Dickdarmschleimhaut keine Lymphgefäße aufweist, ist nicht richtig. Die tieferen Schichten der Mukosa sind, wie schon Levine und Haggitt

(1989) berichten, durchaus mit Lymphkapillaren ausgestattet. Insofern ist es nicht überraschend, daß auch Adenome und juvenile Polypen Lymphgefäße enthalten können. Dies gilt auch für Schleimhauthyperplasien (mit oder ohne Dysplasien) bei der Colitis ulcerosa. Diese Lymphgefäße sind mögliche Orte einer Tumorinvasion, wenngleich wir an unserem Untersuchungsgut bislang in keinem Fall Karzinominfiltrate im Bereich intramukosaler oder intraadenomatöser Lymphgefäße fanden.

Der Begriff «Lymphbahnamyloidose» umschreibt einen bislang nicht beachteten, nach unseren Daten aber keineswegs seltenen morphologischen Befund, der keineswegs nur in Dünn- und Dickdarm, sondern von uns auch in Lunge, Herz und Niere nachgewiesen wurde (Kaiserling und Kröber, 1994). Die klinische Bedeutung der Lymphgefäßamyloidose ist im einzelnen noch nicht geklärt. Zu den Substanzen, die via Lymphgefäßsystem abtransportiert werden, zählen bekanntlich vornehmlich die extravasalen Proteine, im Falle einer Amyloidose auch Amyloid-Proteine bzw. Amyloidvorstufen (SAA-Protein, Immunglobulinketten). Man kann daher annehmen, daß das Amyloid in Umgebung der Lymphbahnen mit einer gesteigerten und schließlich dekompensierenden Resorption von Amyloidvorstufen in Zusammenhang steht. Die Lymphgefäßamyloidose, die immer in Kombination mit einer schweren allgemeinen Amyloidose auftritt, kann daher wohl auch als ein ungünstiges Zeichen im Verlaufe einer Amyloiderkrankung gelten.

LITERATUR

- GRAU H., SCHLÜNS I. (1962) - Experimentelle Untersuchungen zum zentralen Chylusraum der Darmzotten. *Anat. Anz.*, 111 : 241-249.
- KAISERLING E., KRÖBER S. (1994) - Lymphatic amyloidosis, a previously unrecognized form of amyloid deposition in generalized amyloidosis. *Histopathology*, 24 : 215-221. Siehe auch *Histopathology* 25, 597-600.
- LEVINE D.S., HAGGITT R.C. (1989) - Normal histology of the colon. *Am. J. Surg. Pathol.* 13 : 966-984.
- PAPP M., RÖHLICH M., RUSZNIAK I., TÖRÖ I., (1962) Ultrastructure of central chylous vessel in intestinal villus. *Arch. Anat. Cistol. Embryol.*, 42 : 24-29.
- REGEZI J.A., NICKOLOFF B.J., HEADINGTON J.T. (1992) Oral submucosal dendrocytes : factor XIIIa + and CD34 + dendritic cell populations in normal tissue and fibrovascular lesions. *J. Cutan. Pathol.*, 19 : 398-406.
- WRIGHT J.R., CALKINS E., HUMPHREY R.L. (1977) Potassium permanganate reaction in amyloidosis : a histologic method to assist in differentiating forms of this disease. *Lab. Invest.* 36 : 274-281.

SUMMARY

Lymphatic involvement in diseases of the large and small intestine appears, from the literature, to have received little attention. Our study, which was performed on biopsy specimens submitted routinely to an institute of pathology, was undertaken to assess pathological changes and morphological characteristics of the lymphatics of the small and large intestine and to evaluate their pathophysiological significance. Lymphatics in lymphangiectasia, lymphatic cysts, tumours of the lymphatic system, lymphangiosis carcinomatosa, Crohn's disease, ulcerative colitis, Whipple's disease and polyps, adenomas and carcinomas of the large intestine were investigated. The involvement of lymphatics in amyloidosis was also assessed. The identification of lymphatic vessels and related tumours, which was possible in all our specimens, is nowadays facilitated by the use of the antibody anti-CD34, with which blood vessel endothelium reacts but lymphatic vessel endothelium does not. Our findings suggest that lymphangiosis carcinomatosa leads to lymphatic insufficiency in only some cases. In Whipple's disease, ectasia of the mucosal lymphatics and a highly cellular interstitial infiltrate reflect severe changes in the lymphatic system. Crohn's disease and ulcerative colitis, particularly the latter, are associated with ectasia, which is sometimes angioma-like, and proliferation of the lymphatics in the large intestine. These findings suggest a disturbance of lymph drainage, which is also reflected in the interstitial fibrosis and macrophage-rich oedema. It is possible that the metastatic tendency of carcinomas that develop in association with ulcerative colitis may be related to this lymphatic vessel proliferation. In numerous specimens, lymphatics were seen in the area near the muscularis mucosae of normal large intestinal mucosa. It is therefore not surprising that adenomas, juvenile polyps and chronically inflamed areas of mucosa in ulcerative colitis are also at least partly supplied by lymphatics, a finding that has received little attention in the literature. Involvement of lymphatics in advanced generalized amyloidosis may be severe, and it is probable that this is associated with impairment of resorption of substances that are normally removed by the lymphatics.

RÉSUMÉ

L'atteinte des vaisseaux lymphatiques dans les maladies de l'intestin grêle et du côlon est un domaine peu étudié dans la littérature. Les modifications, les atteintes des vaisseaux lymphatiques de l'intestin grêle et du côlon ont donc été étudiées sur des préparations histologiques de prélèvements de routine et autopsiques. L'étude s'intéressait aux lymphangiectasies, aux kystes lymphatiques, aux tumeurs du système lymphatique, aux cas de lymphangite carcinomateuse, à la maladie de Crohn, à la colite ulcéreuse, à la maladie de Whipple et aux polypes ainsi qu'aux adénomes et carcinomes coliques. L'atteinte des lymphatiques dans l'amyloïdose a également été étudiée. On peut maintenant identifier des vaisseaux lymphatiques et ses tumeurs en utilisant les anticorps CD34 qui marquent les endothéliums des vaisseaux sanguins, mais ne marquent pas ceux des vaisseaux lymphatiques. Notre travail suggère que la lymphangite carcinomateuse ne conduit généralement pas à une insuffisance lymphatique des intestins et l'on a documenté une insuffisance lymphatique dans un seul cas. Dans la maladie de Whipple, des lymphangiectasies au niveau de la muqueuse et un infiltrat cellulaire intersticiel abondant reflètent l'atteinte sévère

du système lymphatique. La maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, particulièrement cette dernière, sont associées avec des lymphangiectasies parfois pareilles à des angiomes et à une prolifération des lymphatiques dans le gros intestin. Ces résultats suggèrent une altération du drainage lymphatique qui se reflète également dans la fibrose intersticielle et dans un œdème riche en macrophages. Il est possible que la tendance métastatique des carcinomes qui se développent en association avec une colite ulcéreuse puisse être liée à cette prolifération vasculaire lymphatique. Dans de nombreux prélèvements, les lymphatiques sont observés dans la zone proche de la muqueuse musculaire du gros intestin normal.

Il n'est pas surprenant que les adénomes, les polypes juvéniles et les zones muqueuses chroniquement enflammées en cas de colites ulcéreuses, soient également pourvues, du moins partiellement, de vaisseaux lymphatiques, une observation qui a reçu peu d'attention dans la littérature. L'atteinte des lymphatiques dans l'amyloïdose généralisée avancée peut être sévère et l'on observe des dépôts excessifs d'amyloïdes dans la région des vaisseaux lymphatiques. Il est probable que ceci est associé avec une diminution de la résorption des substances qui sont normalement drainées par les lymphatiques.

DANKSAGUNG

Die Autoren danken Professor Dr. med. R.P. Linke, Institut für Immunologie der Universität München, für die immunohistochemische Charakterisierung der Amyloiddepositionen einiger Gewebeproben und Dr. E. Földi (Hinterzarten), Professor M. Földi (Freiburg), Dr. M. Ruck (Tübingen) und Dr. A. Sammoun (Tübingen) für konstruktive Kritik und die freundliche Hilfe bei der Erstellung des Manuskripts.

IBLANKO

Neue Erkenntnisse zur immunbiologischen Bedeutung des Endothels initialer Lymphbahnen mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (*).

New result on the immunobiological significance of the endothelium
of initial lymphatics by means of confocal laser scanning microscopy.

Résultats nouveaux sur l'importance de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques
par le moyen de la microscopie rayon laser.

A. CASTENHOLZ und H. ZÖLTZER

Universität Gesamthochschule Kassel

ZUSAMMENFASSUNG

Über die Abwehrfunktion des Lymphendothels im Initialbereich der Lymphbahn ist bisher wenig bekannt geworden. In der vorliegenden Studie wurden am Modell der Rattenzunge unter Einsatz eines Laser-Scanning-Mikroskops und fluoreszierender Standardpartikel die Frage des Partikel- und Zelltransportes durch die periphere Lymphe untersucht. Vorgänge wie der Transport freier Partikel im Gewebe, ihre Aufnahme durch Gewebsmakrophagen, deren Anreicherung im Gebiet initialer Lymphgefäß, schließlich der lymphogene Transport von Partikeln und markierten Zellen konnten so erstmals sichtbar gemacht werden. Die hierbei auftretenden Phänomene, wie die zelluläre Interaktion mit dem lymphatischen Endothel, endotheliale Adsorption und Phagozytose von Mikropartikeln kennzeichnen Vorgänge, die in ihrer qualitativen und quantitativen Ausprägung bereits im pränodalen Abschnitt der Lymphbahn als besondere immunbiologische Leistungen anzusehen sind.

SUMMARY

Up to now, little has been known of the defensive functions of the lymphatic endothelium within the initial zone of the lymphatic vascular system. Based on the model of the rat tongue, this study examined the question of the transport of particles and cells within the peripheral lymph by means of a laser scanning microscope and fluorescent standard particles. Processes like the transport of free particles in the tissue, their uptake by macrophages, their accumulation within in the zone of initial lymphatics and finally the lymphogenous transport of particles and marked cells could be visualized for the first time. Phenomena as the cellular interaction with the lymphatic endothelium, endothelial adsorption and phagocytosis of microparticles stand for the process, which, in respect to their qualitative and quantitative extent, characterize the prenodal section of the lymphatic vascular system as an area provided with special immunobiological activities.

Reprints request to :

Prof. Dr. med. A. CASTENHOLZ
Universität Gesamthochschule Kassel
Fb 19, Humanbiologie - 34109 Kassel
Fax 0561 - 804 4735

RÉSUMÉ

Jusqu'ici, les fonctions défensives de l'endothélium lymphatique dans la zone initiale du système vasculaire lymphatique étaient peu connues. Basée sur le modèle de la langue du rat et utilisant des particules fluorescentes standardisées et la microscopie au laser, ce travail étudie la question du transport de particules et de cellules au sein de la lymphe périphérique.

Des processus comme le transport de particules libres dans le tissu, leur captation par les macrophages, leur accumulation au niveau de la zone des lymphatiques initiaux et finalement le transport lymphogénique des particules et des cellules marquées purent être visualisés pour la première fois.

Ces phénomènes, comme l'interaction cellulaire avec l'endothélium lymphatique, l'adsorption endothéliale et la phagocytose de micro-particules caractérisant la partie pré-nodale du système vasculaire lymphatique donnent à cette région une importance immuno-biologique particulière.

Key words : initial lymphatics immunobiology, macrophages, endothelial phagocytosis, rat, tongue, laser scanning microscope (CLSM).

Die Strukturverhältnisse des Endothels initialer Lymphgefäß konnten vor allem durch elektronenmikroskopische Untersuchungen weitgehend aufgeklärt werden (CASLEY-SMITH, 1983). Während jedoch transmissionselektronenmikroskopisch die Unterschiede zwischen dem Endothel initialer Lymphbahnen und dem der Blutkapillaren gering sind, zeichnet sich das lymphatische Endothel im Rasterbild durch *besondere Strukturmerkmale* aus (CASTENHOLZ, 1991a, 1991b, 1992a, 1993). So besteht dieses bei initialen Lymphgefäß aus verhältnismäßig großen, unregelmäßigen Zellformen mit geschwungen verlaufenden Grenzen. Zahlreiche Öffnungen (open junctions) kennzeichnen den Interzellularbereich, der durch zytoplasmatische Überlappungen der beteiligten Zellen auch

(*) Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG).

klappenartige Funktionen erhält. Die endotheliale Permeabilität wird hierdurch im Zuge der *Lymphbildung* in starkem Maße kontrolliert. Auf das Wirkungsprinzip der hierbei maßgebenden Histomechanik von seiten des umgebenden Faserbindegewebes wurde bereits an anderen Stellen hingewiesen (CASTENHOLZ, 1990, 1992b, 1992c). Ein weiteres Merkmal des Endothels initialer Lymphgefäß besteht in der Existenz einzelner, vorspringender Zellelemente, die mit ihren langen Fortsätzen auch auf entferntere Bereiche übergreifen und so ein durch Nischen und Vorsprünge geprägtes unregelmäßiges Lumenprofil erzeugen. Auch echte Klappenstrukturen sind bereits im Anfangsbereich der Lymphbahn nachzuweisen.

In vorausgehenden Studien zur *Rheologie* der peripheren Lymphe wurden die innerhalb initialer Lymphgefäß und Präkollatoren herrschenden Strömungsverhältnisse an der lebenden Rattenzunge untersucht (CASTENHOLZ, 1991c; CASTENHOLZ und RÜHLING, 1991; CASTENHOLZ, 1992d). Das Einströmen der interstitiellen Flüssigkeit durch das interendotheliale Spaltensystem selbst ließ sich an einem geeigneten hydraulischen Modell zur Darstellung bringen (CASTENHOLZ, 1992e, 1992f). Als allgemeines Ergebnis zeigte sich hierbei, daß die periphere Lymphe ihre eigenen rheologischen Gesetzmäßigkeiten aufweist und so durch besondere Strömungsmuster, stark schwankende Strömungsintensitäten und durch Atmung und Kollektorenaktivität beeinflußte Rhythmen gekennzeichnet ist (CASTENHOLZ und RÜHLING, 1993).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Funktionen des Endothels initialer Lymphbahnen näher charakterisiert werden, die für eine *immunbiologische Bedeutung* sprechen. Schon bei vitalmikroskopischen Beobachtungen hatte sich gezeigt, daß sich das Endothel sowohl durch adsorbierende Eigenschaften für feine, in der Lymphe bewegte Partikel als auch durch Phagozytoseaktivität in bezug auf dieses Material auszeichnet. Das Endothel hatte sich auch als ein besonderer Durchgangsort für Zellen aus dem Geweberaum bei verschiedenen reaktiven Zuständen erwiesen. Diese Phänomene sollten nunmehr am fixierten Präparat mit Hilfe der neuen konfokalen *Laser-Scanning-Mikroskopie* näher analysiert werden. In Verbindung hiermit wurden, wie in den vorausgegangenen rheologischen Untersuchungen, wieder fluoreszierende Standardpartikel verwendet. Sie sind im Präparat leicht nachweisbar und eignen sich als Indikatoren sowohl für freie, zellungebundene Flüssigkeitsbewegungen innerhalb des Gewebes und der Lymphbahn als auch für phagozytotische Vorgänge.

MATERIAL UND METHODIK

An insgesamt 25 adulten Wistar Ratten eigener Zucht wurden in Äthernarkose 0,1 ml fluoreszierende Standardpartikel (Fluoresbrite®, Polyscience, Oregon, USA) mit Durchmessern von 0,1 - 1,0 μm in die Zungenspitzenregion injiziert. In einigen Fällen wurden 2 verschiedene Chargen, z. B. eine mit Durchmessern von 0,1 und eine andere mit 1,0 μm an zwei verschiedenen Orten im Zungengewebe plaziert. Nach 30, 60 und 90 Minuten sowie nach 6 Std., 24 Std. bzw. am 3., 6. und am 60. Tag wurden die Zungen in tiefer Trapanalnarkose des Tieres für 30 Minuten mit gekühlter 2,5 %iger Glutardialdehy-Lösung interstitiell perfundiert, so vitalfixiert und nach Töten der Tiere durch eine Überdosis des Narkotikums zusammen mit den Halslymphknoten entnommen. Im Anschluß an die Nachfixierung wurden die Präparate zunächst in der aufsteigenden Alkoholreihe bis in die 80 % Fraktion teilentwässert. 0,1 - 0,2 mm dicke Quer- und Tangentialschnitte wurden mit der Rasierklinge per Hand von der Präparaten angefertigt. Um im Laser-Scanning-Mikroskop hinreichende Informationen über alle Strukturen zu erhalten, wurde eine Grundfluorochromierung des Gewebes vorgenommen, wobei folgendermaßen verfahren wurde: Überführung der Schnittpräparate in Sörensenpuffer L (pH 6,2) und Anfärbung mit einem Gemisch bestehend aus Rhodamin (20 ng / ml) und Acridinorange (2 ng / ml) für 30 - 60 Minuten.

Abspülen des Farbstoffüberschusses in Sörensen Puffer, Übergang der Präparate auf einen Objektträger und Abdeckung durch ein am Rande mit Merckglas versiegeltes Deckglas.

Die Durchmusterung der Präparate erfolgte am CLSM (E. Leitz Benzheim). Zur Herstellung feiner optischer Schnitte nach dem Prinzip der konfokalen Abbildung (Abb. 1) wurden hochauflösende Leitz-Objektive (22x/0,65, 50x/1,0 und 63x/1,3) benutzt. Von strukturellen Details wurden optische Schnittserien aufgenommen und zur Unterscheidung des von den Standardpartikeln ausgehenden Fluoreszenzsignals von unspezifischen Fluorochromierungseffekten des Gewebes wurden von der 2-Kanaltechnik des CLSM Gebrauch gemacht. So konnten die FITC enthaltenden Standardpartikel im Kanal mit einem Anregungsmaximum bei 488 nm am besten dargestellt werden, während der zweite Kanal mit einem Anregungsmaximum von 514 nm das von den Partikeln ausgehende Signal unterdrückte und die durch die Rhodaminbehandlung verursachte Grundfluoreszenz des Gewebes umso deutlicher zeigte.

Herrn. Ing. RÜHLING sind wir für seine wertvolle Mithilfe bei der Durchführung der Experimente und bei der Mikroskopie und Bildanalyse am CLSM zu besonderem Dank verpflichtet (Abb. 1).

ERGEBNISSE DER KONFOKALEN LASER-SCANNING-MIKROSKOPIE

Schon früher hatte sich bei vitalmikroskopischen und histologischen Untersuchungen an der Rattenzunge gezeigt, daß nach interstitieller Applikation einer *Tuschesuspension* sich die rasch innerhalb des lockeren Bindegewebes ausbreitet und bevorzugt in der Umgebung initialer Lymphbahnen ansammelt. Der Abtransport der Tusche partikel mit der Lymphe war ebenfalls zu beobachten. Einzelne Partikel hafteten am Endothel und wurden hier zum Teil durch endozytotische Vorgänge inkorporiert. In der weiteren Folge eines solchen Versuches traten bald als Ausdruck einer allgemeinen Gewebsreaktion mit Tusche partikel beladene Makrophagen im Zungengewebe auf.

In der vorliegenden Studie, in der *fluoreszierende Standardpartikel* verwandt wurden, sind diese Phänomene in ähnlicher Weise vitalmikroskopisch zu erkennen. In der *akuten Phase* des Versuchs zeigt das Laserbild fixierter Präparate die Latexpartikel vielfach in reihenförmigen Anordnungen innerhalb offenbar präformierter Bindegewebesräume der Rattenzunge. Ein Muster, in sich vernetzter feiner Kanäle tritt vor allem bei den kleinsten Partikeln der Größenordnung 0,1 - 0,5 μm in Erscheinung (Abb. 2). Auffallend viele Partikel konzentrieren sich in unmittelbarer Nähe von Lymphbahnen und sind auch innerhalb dieser zu finden (Abb. 2).

Die in die Lymphbahn übergetretenen fluoreszierenden Partikel stehen vielfach in direktem Kontakt mit der lumenseitigen *Endotheloberfläche* (Abb. 3). So erklärt sich das Phänomen der Markierung der Lymphgefäß im lebenden Gewebe. Vitalmikroskopisch sind viele Partikel in ihrer Position fixiert und können dann selbst durch Massage der Zunge nicht mehr mobilisiert werden. Das Laserbild läßt erkennen, daß die Standardpartikel auch nischenartige Räume, die durch Überlappungszonen und Klappenstrukturen des Lymphendothels entstehen kommen, auffüllen und in dieser Weise festgehalten werden. Andere Partikel hingegen können in ihrer Position eindeutig auf den *intrazellulären Bereich* bezogen werden, so daß sie als Bestandteil von Phagosomen der Endothelzellen anzusehen sind (Abb. 3).

Die Fixierung von Partikeln an der Endotheloberfläche und endotheliale Phagozytose sind auch im *subakuten Stadium*, d. h. noch nach einigen Tagen nachzuweisen. Nach längeren Zeiträumen, etwa ab dem 10. Tag nach der interstitiellen Applikation, finden sich Standardpartikel in der Regel nur noch in Form phagozytierten Materials in den Endothelzellen, während sie als adsorbierte Elemente der Endotheloberfläche weitgehend verschwunden sind (Abb. 4).

Bereits eine Stunde nach der interstitiellen Injektion ist die Aktivität von Makrophagen im Faserbindegewebe zu erkennen. Die Anzahl partikelbeladener Makrophagen pro Flächeneinheit nimmt dann innerhalb kurzer Zeit stark zu. Nach 1 - 2 Tagen ist der größte Anteil des injizierten Materials von den Gewebsmakrophagen aufgenommen worden. Zwei Typen von Makrophagen lassen sich fluoreszenzmikroskopisch im Zungengewebe unterscheiden : ein mehr kugelförmiger Zelltyp, der den mobilen Makrophagen entspricht und ein schlanker und verzweigter Zelltyp, der für seßhafte Makrophagen charakteristisch ist (Abb. 5a). Die Zahl der aufgenommenen Standardpartikel ist besonders bei dem ersten Zelltyp hoch, wobei sich die einzelnen Partikel in dichten Formationen innerhalb des Zytosplasmas anordnen (Abb. 5 a + b).

Auch die Unterscheidung zwischen Standardpartikel verschiedener Größenordnung und verschiedenen Fluoreszenzeigenschaften ist mit Hilfe des CLSM gut möglich (Abb. 5b). So lassen sich in den beiden Kanälen mit Anregungsmaxima von 488 nm bzw. 515 nm FITC und Phycoerythrin gekoppelte Partikel jeweils mit Betonung der einen Komponente zur Darstellung bringen. Auf diese Weise ist auch ein Kombinationsbild zu erhalten, das mittels von Falschfarben der einzelnen Partikelkomponente einen besonderen Farbwert verleiht. Die Zweikanaltechnik kann so eingesetzt werden, um z. B. die Wanderung von Standardpartikeln innerhalb des Gewebes von zwei getrennten Depots aus zu untersuchen. Unter einer anderen Fragestellung läßt sich so auch klären, inwieweit Makrophagen des Blutes am Zellverkehr in der Zunge beteiligt sind, wenn eine Partikelfraktion lokal, die andere dagegen intravenös injiziert wird. Die Untersuchungen auf der Ebene beider Gefäßsysteme sind noch nicht abgeschlossen, so daß über ihr Ergebnis erst in einer nachfolgenden Publikation berichtet wird (Abb. 6).

Die späten Studien eines Versuches sind durch folgende Phänomene gekennzeichnet : In den ersten Tagen nach der interstitiellen Injektion von Standardpartikeln in die Zunge ist im fixierten Präparat die Abwanderung von Makrophagen aus der Depotzone zu erkennen. Wie bei den freien Partikeln ist hierbei auch eine bevorzugte Orientierung dieser Zellen in der Nähe von Lymphbahnen festzustellen (Abb. 6). Im weiteren Verlauf, mit einem Häufigkeitsmaximum um den 5. Tag nach der Injektion, findet man viele Makrophagen im Inneren der Lymphbahnen, wo sie meistens der lumenseitigen Oberfläche anliegen. Um diese Zeit sind daher viele Diapedesestadien mit Hilfe der konfokalen Laser-Mikroskopie nachzuweisen (Abb. 7).

Die regionalen Lymphknoten der Zunge im vorderen Halsbereich, die in den akuten Phase eines Versuches freie Latexpartikel in großer Anzahl, vor allem im Bereich des Marginalsinus aufnehmen, sind nunmehr mit zahlreichen Makrophagen besetzt. In späteren Phasen finden sich Makrophagen in dichten Formation vor allem in den kortikalen Bereichen, weniger im marginalen Sinusbereich und im Markabschnitt der Lymphknoten (Abb. 8).

DISKUSSION

Das Endothel initialer Lymphgefäß zeichnet sich durch eine Reihe funktionsmorphologischer Merkmale aus, die ihm unter den Gefäßendothelen zweifellos eine Sonderstellung verschaffen. Die formalen Eigenschaften, wie das charakteristische Zellmuster, die verschiedenen Zellformen und ihre Verbindung untereinander sind in erster Linie im Zusammenhang mit der Lymphbildungsfunktion zu sehen. Sie sind aber auch, wie die vitalmikroskopische Analyse zeigt, mitentscheidend für das Strömungsverhalten der peripheren Lymphe und für immunbiologische Leistungen. Der Gesichtspunkt der endothelialen Abwehrfunktion ist bisher weniger beachtet worden. In der vorliegenden Studie wurde der Versuch unternommen, mit Hilfe differenzierter Technik unter Einsatz eines Laser-Scanning-

Mikroskops und fluoreszierender Standardpartikel die Frage des Partikel- und Zelltransports durch die periphere Lymphe sowie die der Phagozytoseaktivität des lymphatischen Endothels zu beantworten. Dabei konnten Vorgänge wie die Konzentrierung von freien Partikeln und Makrophagen im Gewebe, deren Konzentrierung im Bereich der Lymphgefäß und schließlich ihr Übertritt in die Lymphbahn, wie sie aus früheren Untersuchungen bekannt waren, erneut bestätigt werden. Das Phänomen der Markierung initialer Lymphgefäß und der Präkollektoren mit fluoreszierenden Partikeln, das bei der Vitalmikroskopie im Vordergrund steht, ließ sich auf die Haftung von Partikeln an der lumenseitigen Endotheloberfläche und die Ansammlung von Partikeln im Bereich nischenartiger Räume oder leistenartiger Vorsprünge des Endothels zurückführen. Andererseits konnte auch die phagozytotische Einlagerung dieses Materials innerhalb der Endothelzelle durch das Laserbild bewiesen werden.

Offenbar verfügt die Endotheloberfläche über besondere Adsorptionseigenschaften für Standardpartikel der benutzten Größenordnung, die normalerweise in ähnlicher Weise auch für korpuskuläre Fremdstoffe, Bakterien und Zellteile bestehen dürften. Das Abfangen der Partikel, ihre Anlagerung an der Endotheloberfläche und schließlich die Aufnahme in das Zytosplasma der Endothelzelle kann bereits als ein wichtiger Filterungsprozeß der peripheren Lymphe verstanden werden. Durch eine solche Vorkontrolle der peripheren Lymphe im Sinne einer mechanischen Clearance (CASTENHOLZ, 1992g) zwischen Gewebe und der ersten Lymphknotenstation wird das nodale System in seiner Abwehrleistung zweifellos unterstützt. Obwohl das einzelne initiale Lymphgefäß gegenüber dem Sinusystem im Lymphknoten über eine schwächere Aufnahmekapazität für Fremdmaterialien verfügen dürfte, muß die immunbiologische Leistung dieser Gefäße insgesamt doch als sehr hoch eingeschätzt werden, wenn man die starke Verbreitung initialer Lymphgefäß vor allem in Haut und Schleimhäuten berücksichtigt.

Unsere Studie gibt weiterhin einen Hinweis für einen gerichteten Strom von Gewebsmakrophagen zur Lymphbahn hin. Unter den gewählten Versuchsbedingungen mit interstitiellen Applikationen fluoreszierender Standardpartikel in das Zungengewebe wird eine starke zelluläre Reaktion ausgelöst, in deren Verlauf aktivierte Makrophagen bereits nach kurzer Zeit in die Lymphbahn überreten. So wird der verbleibende Teil des gewebebefindlichen Materials mittels dieser Zellen lymphogen abtransportiert. Weiterhin sprechen die Beobachtungen dafür, daß das Lymphendothel auch für andere Zelltypen, z. B. Granulozyten, ein ähnlicher, gut passierbarer Durchgangsort darstellt. Das System der offenen interendothelialen Spalten (open junctions) bildet hierbei die Grundlage für eine rasche Einschleusung von Zellen im Zuge der Diapedese.

Es scheint an der Zeit, unsere Vorstellungen von der besonderen immunbiologischen Leistung des retikulo-endothelialen Systems (ASCHOFF, 1924), die sich bisher vor allem an den Sinusoïden von Leber, Milz und Knochenmark orientierten, auch auf die initialen Endothelstrukturen der Lymphbahn auszudehnen. Gewebs-Flüssigkeitsdrainage, endotheliale Phagozytose und Adsorption sowie Mikrorheologie der peripheren Lymphe sind dynamische Prozesse, die in ihrer qualitativen und quantitativen Ausprägung und Wechselwirkung für immunologische Leistungen bisher zu wenig beachtet wurden. Erst unter diesem Aspekt werden uns die Endothelfunktionen der initialen Lymphbahn in ihrer vollen biologischen Bedeutung erkennbar.

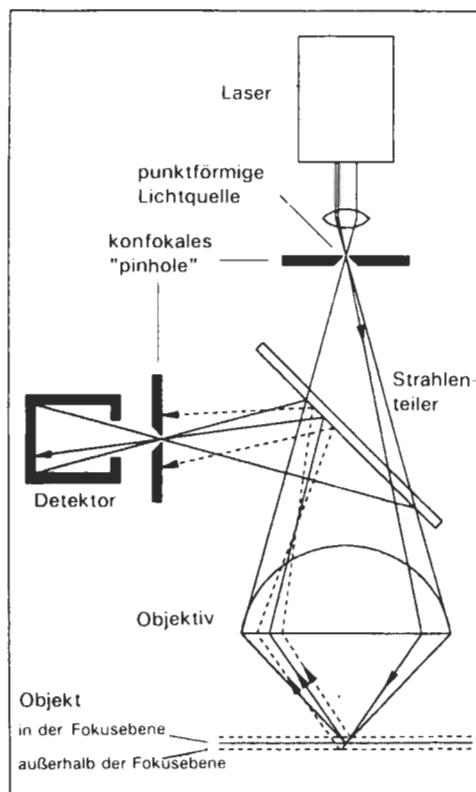


ABB. 1

*Prinzip der konfokalen
Laser-Scanning-Mikroskopie*
(aus : *User Manual, CLSM, E. LEITZ*).

FIGURE 1

*Principle of confocal
laser scanning microscopy*
(from : *Manual CLSM* by E. LEITZ).

*Principe de microscopie confocale
de rayon laser (CLSM)*

(de : *User Manual, CLSM, E. LEITZ*).

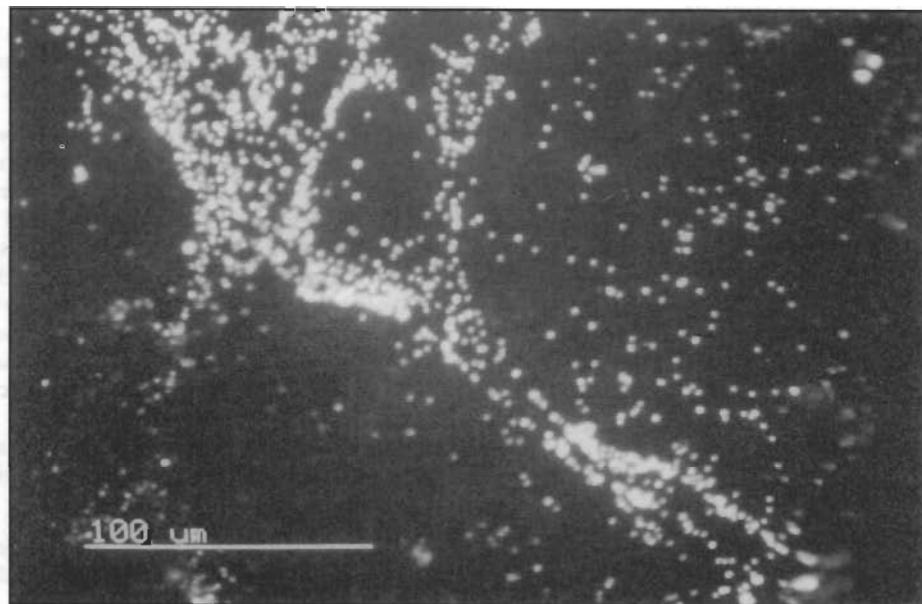


ABB. 2

Netzförmige Muster mit reihenförmiger Anordnung freier fluoreszierender Standardpartikel (0,5 μm) entstehen in der Peripherie der Depotzonen in der Zunge. In dieser Weise markieren sich im CLSM-Bild die für eine freie Flüssigkeitsbewegung im Gewebe verfügbaren Räume.

FIG. 2

Arrays of isolated fluorescent particles (0.5 μm) form reticular systems near the site of injection. By this, the spaces available for free fluid passages through the tissue are indicated in the CLSM image.

Les particules fluorescentes isolées de dimensions standardisées (0,5 micromètres) apparaissent sous forme d' " arrangement ", de forme réticulaire à la périphérie d'injection. Les espaces disponibles pour les mouvements liquidiens sont ainsi démontrés sur cette image de CLSM.

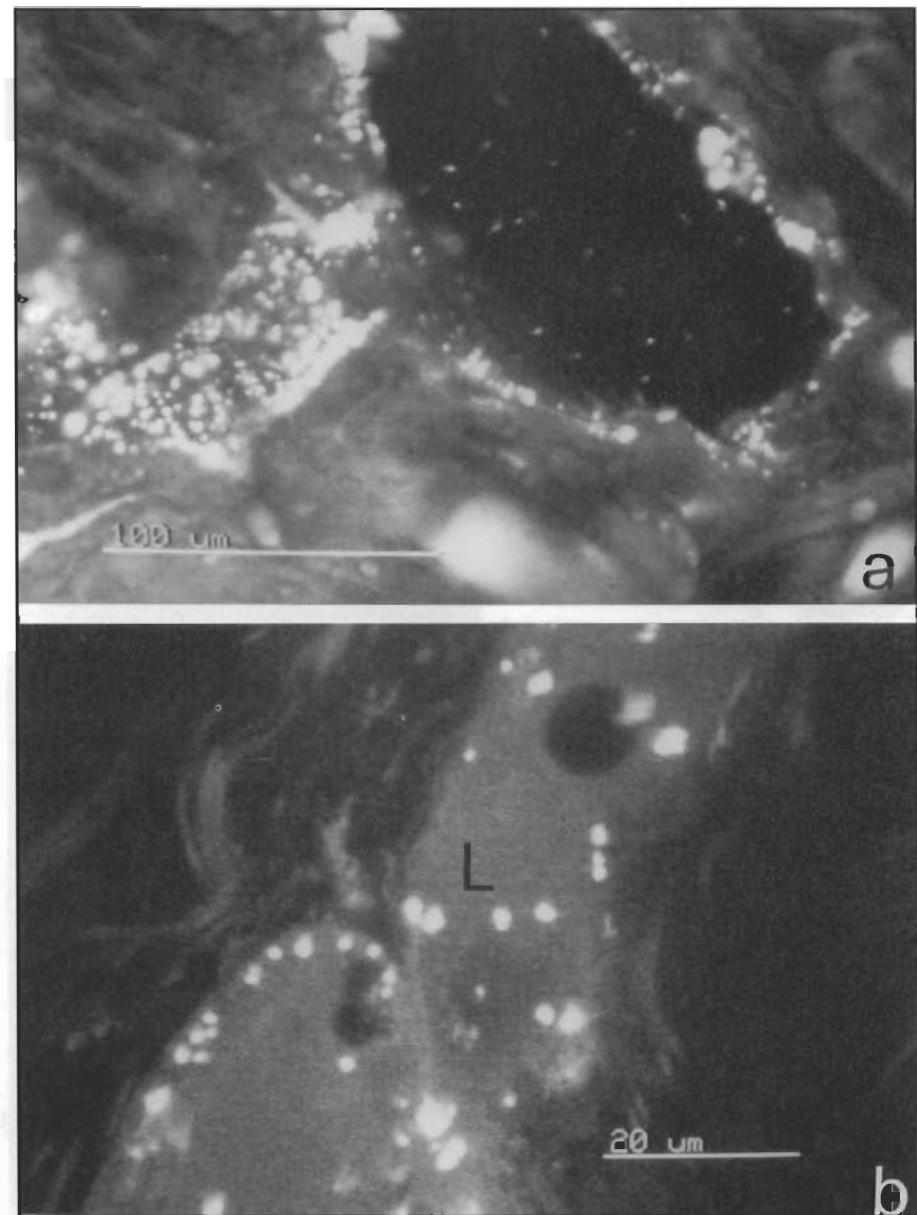


ABB. 3

- a) Lymphgefäß der Rattenzunge fluoreszenzmikroskopisch markiert durch Standardpartikel (Fluoresbrite®, 0,5 μm), 60 Minuten nach interstitieller Injektion (CLSM-Aufnahme).
- b) Einzelne fluoreszierende Standardpartikel werden bei stärkerer Vergrößerung in der durch das initiale Lymphgefäß laufenden optischen Schnittebene sichtbar. Ein Teil der Partikel befindet sich in der Lymphe (L), andere sind an der lumenseitigen Endotheloberfläche lokalisiert.

FIGURE 3

- a) Marking of the lymphatics of the tongue with standard particles (Fluoresbrite®, 0,5 μm) in the fluorescence microscope 60 minutes after interstitial injection (CLSM image).
- b) At higher magnification, single fluorescent standard particles become visible within an optical plain of an initial lymphatic. Some particles are located in the lymph, others touch the luminal surface of the endothelium.

- a) Vaisseaux lymphatiques de la langue du rat marqués en fluorescence microscopique par des particules standardisées (Fluoresbrite®, 0,5 μm), 60 minutes après l'injection interstitielle (image CLSM).
- b) Sur le plan optique de l'image du vaisseau lymphatique, des particules isolées fluorescentes standardisées se présentent à un fort grossissement. Une partie des particules se trouve dans la lymphe (L), l'autre se localise à la surface de l'endothélium.

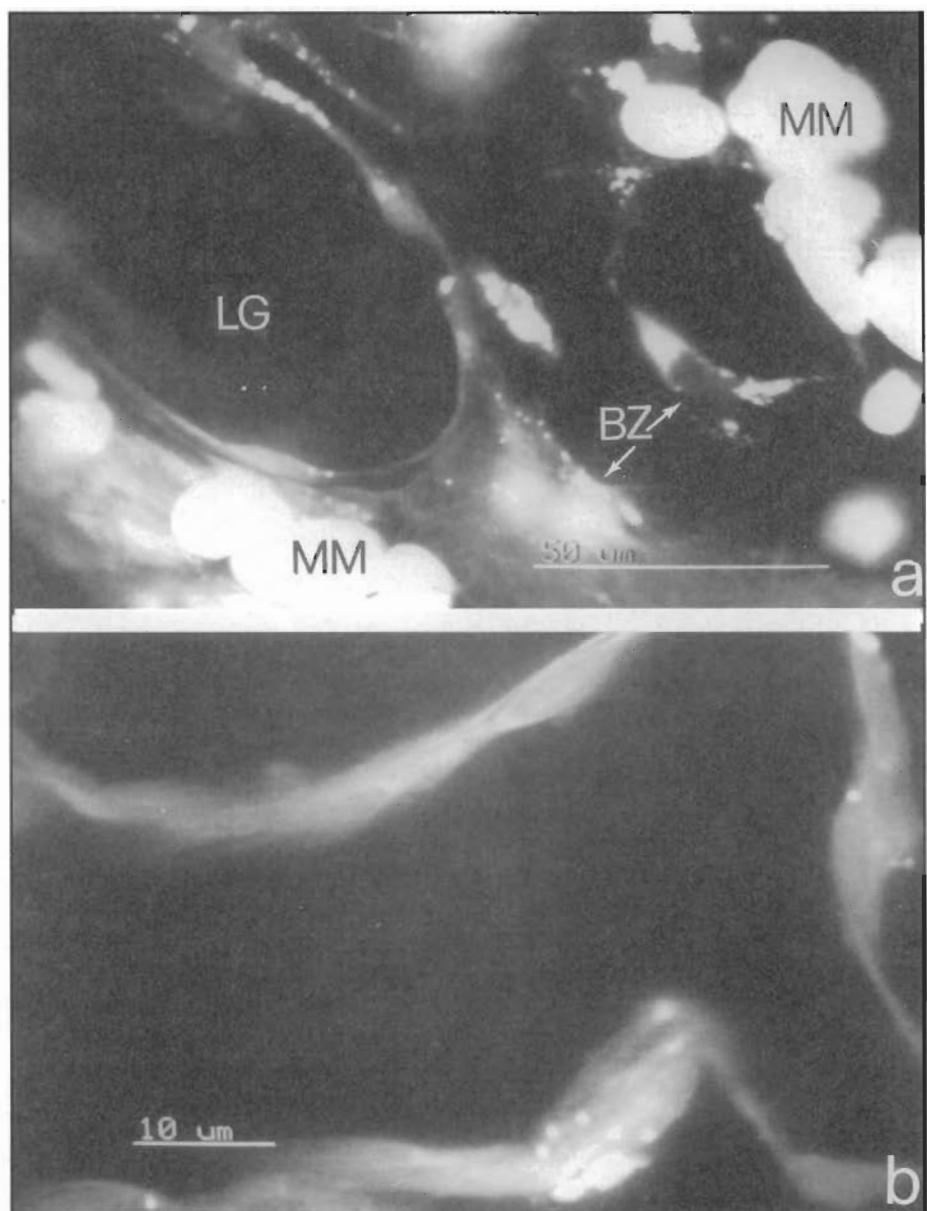


ABB. 4

- a) 10 Tage nach der interstitiellen Injektion sind freie fluoreszierende Partikel innerhalb der Gewebsräume und Lymphgefäße (LG) nicht mehr nachweisbar. Das lymphatische Endothel zeigt nunmehr eine deutliche Phagozytoseaktivität (CLSM-Aufnahme). In der Umgebung des Gefäßes finden sich viele Makrophagen (MP).
- b) Die intrazelluläre Lage der fluoreszierenden Standardpartikel im Lymphendothel ist bei starker Vergrößerung und Wahl einer entsprechenden optischen Schnittebene des CLSM-Bildes gut erkennbar.

FIGURE 4

- a) 10 days after interstitial injection, free fluorescent particles are no longer detectable within the tissue spaces and lymphatic vessels (L). In that stage of experiment, the lymphatic endothelium exhibits high phagocytotic activity (CLSM image). In the vicinity of the vessel, many macrophages (MP) have been collected.
- b) The intracellular position of fluorescent standard particles within the lymphatic endothelium is well recognizable using high magnification and an appropriate optical plain of the CLSM image.

- a) 10 jours après l'injection interstitielle, aucune particule libre fluorescente n'est plus détectable dans les espaces tissulaires et les vaisseaux lymphatiques (LG). L'endothélium lymphatique montre alors une activité de phagocytose bien définie (image CLSM) et beaucoup de macrophages (MP) se trouvent aux alentours des vaisseaux.
- b) A fort grossissement, en choisissant le plan optique de l'image CLSM correspondante, les particules fluorescentes peuvent être bien localisées dans l'endothélium.

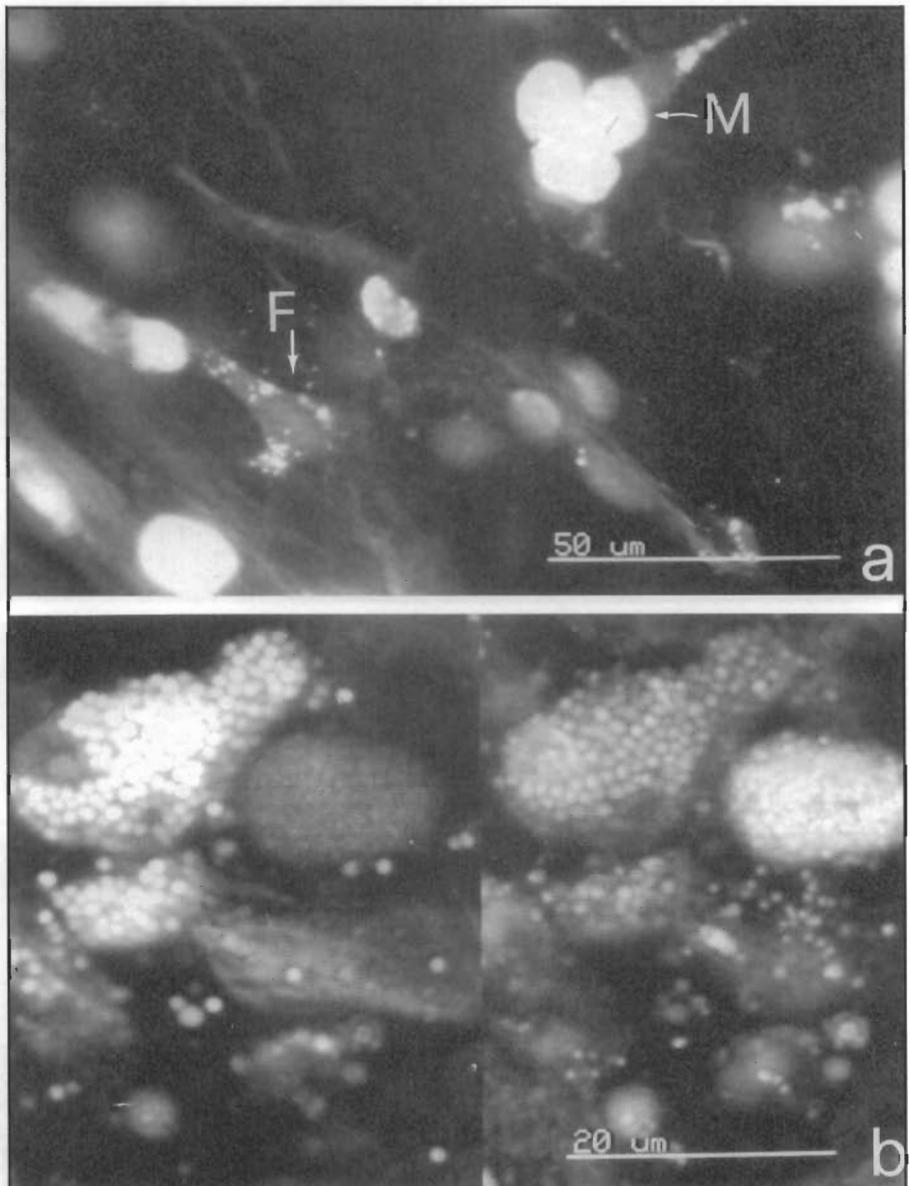


ABB. 5

- a) Phagozytose-Aktivitäten zeigen nach interstitieller Injektion von fluoreszierenden Standardpartikeln sowohl mobile Makrophagen (M) mit abgerundeten Formen sowie mit langen Fortsätzen versehene ortsständige Zellelemente (F) (CLSM-Aufnahme).
- b) Die Unterscheidung von Standardpartikeln mit verschiedenen Fluoreszenzeigenschaften ist mit Hilfe der Zweikanaltechnik des CLSM möglich. Beachte die starke Fluoreszenz der mit PC-Red Partikel beladenen Zelle im Kanal mit einem Anregungsmaximum bei 514 nm gegenüber der FITC-Partikel enthaltenden Zelle (links). Umgekehrte Verhältnisse in bezug auf die Fluoreszenzintensität zeigt der Kanal mit Anregungsmaximum bei 488 nm (rechts).

FIGURE 5

- a) After interstitial injection of fluorescent standard particles both mobile macrophages (M) with roundish shapes as well as those cells provided with long processes (F) exhibit phagocytic activity (CLSM image).
- b) The distinction of standard particles showing different fluorescence characteristics can be achieved using the two-detection technique of the CLSM. Note the bright fluorescence of the PC-red laden cell in the channel with excitation maximum at 514 nm in contrast to the cell of weak fluorescence, which contains FITC particles (left). Reverse conditions concerning the fluorescence intensity of these cells are obvious in the channel with excitation maximum of 488 nm (right).

- a) Après l'injection interstitielle des particules fluorescentes standardisées, des macrophages mobiles (M) de forme ronde, ainsi que des cellules avec de longs prolongements (F) présentent une activité de phagocytose (image CLSM).
- b) La différenciation de particules standardisées mais montrant des caractéristiques fluorescentes différentes peut être obtenue au moyen de la détection "double" de la CLSM. A noter la fluorescence large de la cellule chargée de particules PC en rouge avec une excitation maximum à 514 nanomètres par opposition à la cellule avec une fluorescence plus faible qui contient des particules de FTC (à gauche). La situation inverse d'intensité de fluorescence de ces cellules est évidente dans le canal avec excitation maximum à 488 nanomètres (à droite).

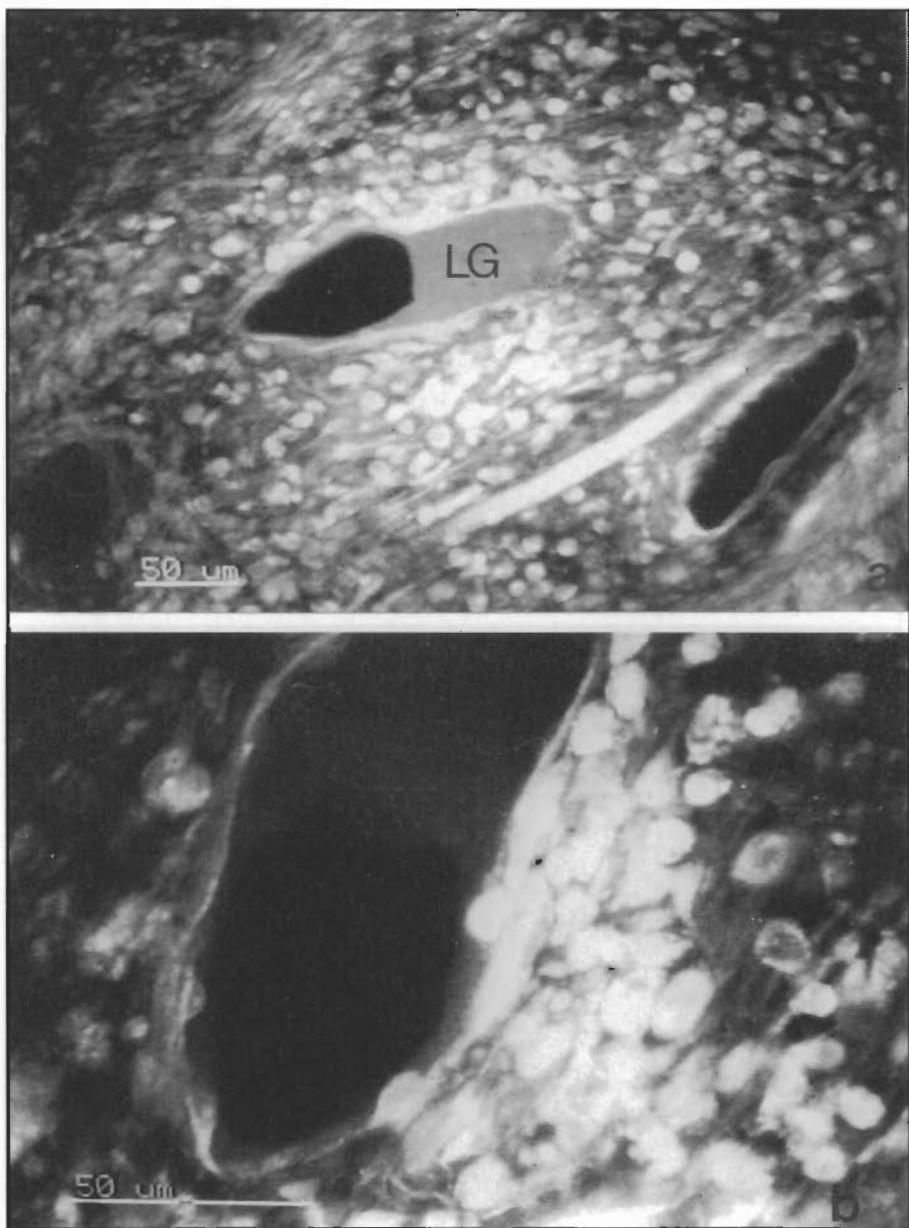


ABB. 6

- a) Starke phagozytäre Reaktion des Gewebes am 2. Tag nach interstitieller Injektion von fluoreszierenden Standardpartikeln. Im Bereich des Lymphgefäßes (LG) kommt es zu starker Konzentrierung von Makrophagen (CLSM-Aufnahme, Rattenzunge).
- b) Mehrere Makrophagen haben die Wand des Lymphgefäßes erreicht ; einige Zellen befinden sich bereits im Stadium der Diapedese (↓).

FIGURE 6

- a) Intense phagocytotic reaction of the tissue occurs at the second day of interstitial application of fluorescent standard particles. Around the lymphatic (LG) macrophages have been crowded (CLSM image, rat tongue).
- b) Some macrophages are already in immediate contact to the vessel's wall, while others are entering the vessel by diapedesis (↓).
- a) Une intense réaction phagocytaire tissulaire survient dès le deuxième jour de l'injection intersticielle des particules fluorescentes. Autour du lymphatique (LG), les macrophages se sont concentrés (image CLSM - langue de rat).
- b) Quelques macrophages sont déjà en contact immédiat de la paroi des vaisseaux tandis que d'autres pénètrent celle-ci par diapédèse (flèches).

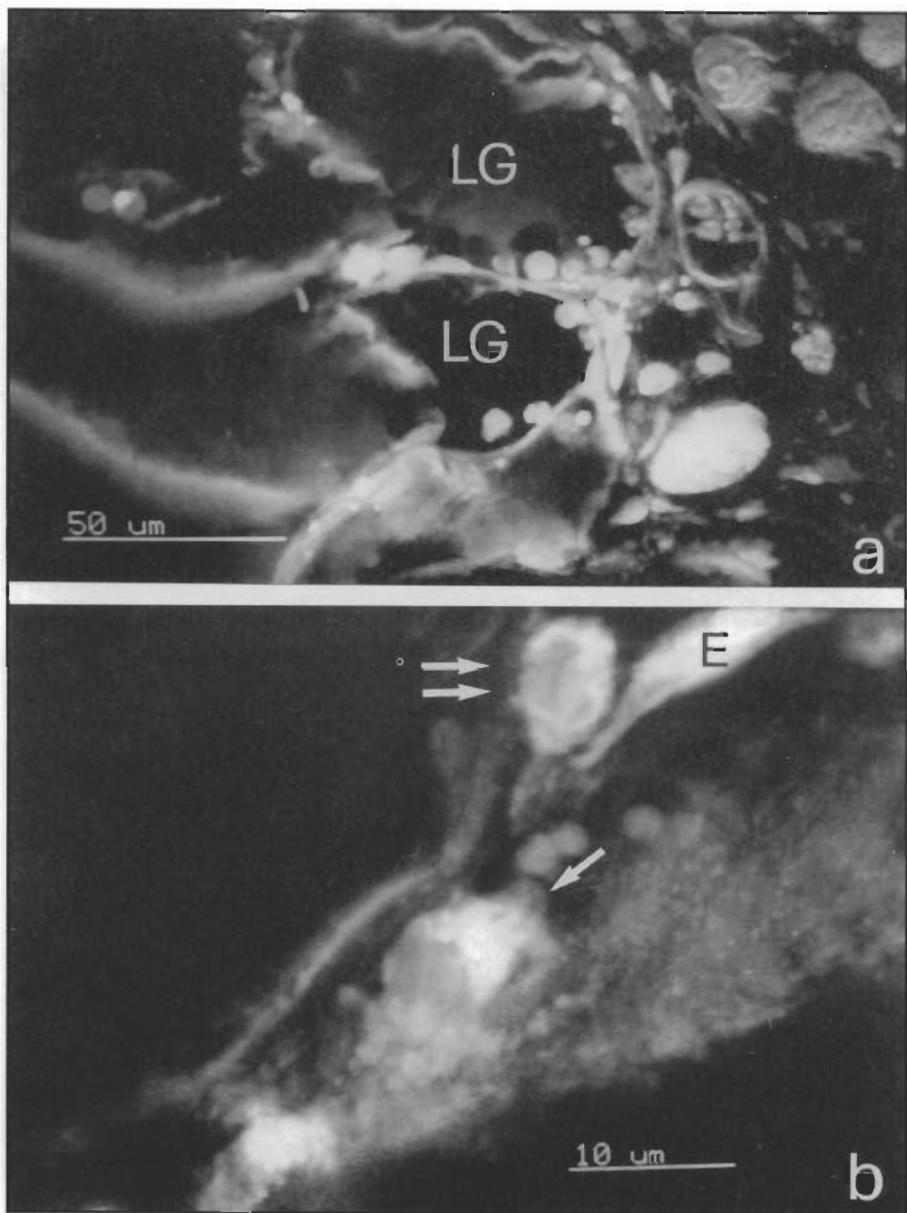


ABB. 7

- a) Viele fluoreszierende und nicht fluoreszierende Zellen treten am 7. Tage nach der interstitiellen Injektion von fluoreszierenden Standardpartikeln in die Lymphbahnen (LG) der Rattenzunge ein (CLSM-Aufnahme).
- b) In der optischen Schnittebene des CLSM-Bildes erscheinen hier zwei dieser Zellen, eine befindet sich bereits im Inneren des Lymphgefäßes (\downarrow), die andere in der Phase des Durchtritts (Diapedese) durch das Gefäßendothel ($\downarrow\downarrow$).

FIGURE 7

- a) Many fluorescent and non-fluorescent cells enter the lymphatic pathway (LG) of the rat tongue 7 days after interstitial injection of fluorescent standard particles (CLSM image).
- b) Two passing cells appear in the optical plain of the CLSM image. One of them has already reached the lumen (\downarrow), whereas the other is found in a phase of diapedesis through the vascular endothelium ($\downarrow\downarrow$).

- a) Sept jours après l'injection interstitielle de particules fluorescentes standardisées, beaucoup de cellules fluorescentes et non-fluorescentes entrent dans le vaisseau lymphatique (LG) de la langue du rat (image-CLSM).
- b) Deux cellules se montrent sur la section optique de l'image-CLSM. L'une a déjà atteint la lumière (\downarrow), l'autre est en train de passer l'endothélium (diapédèse) ($\downarrow\downarrow$).

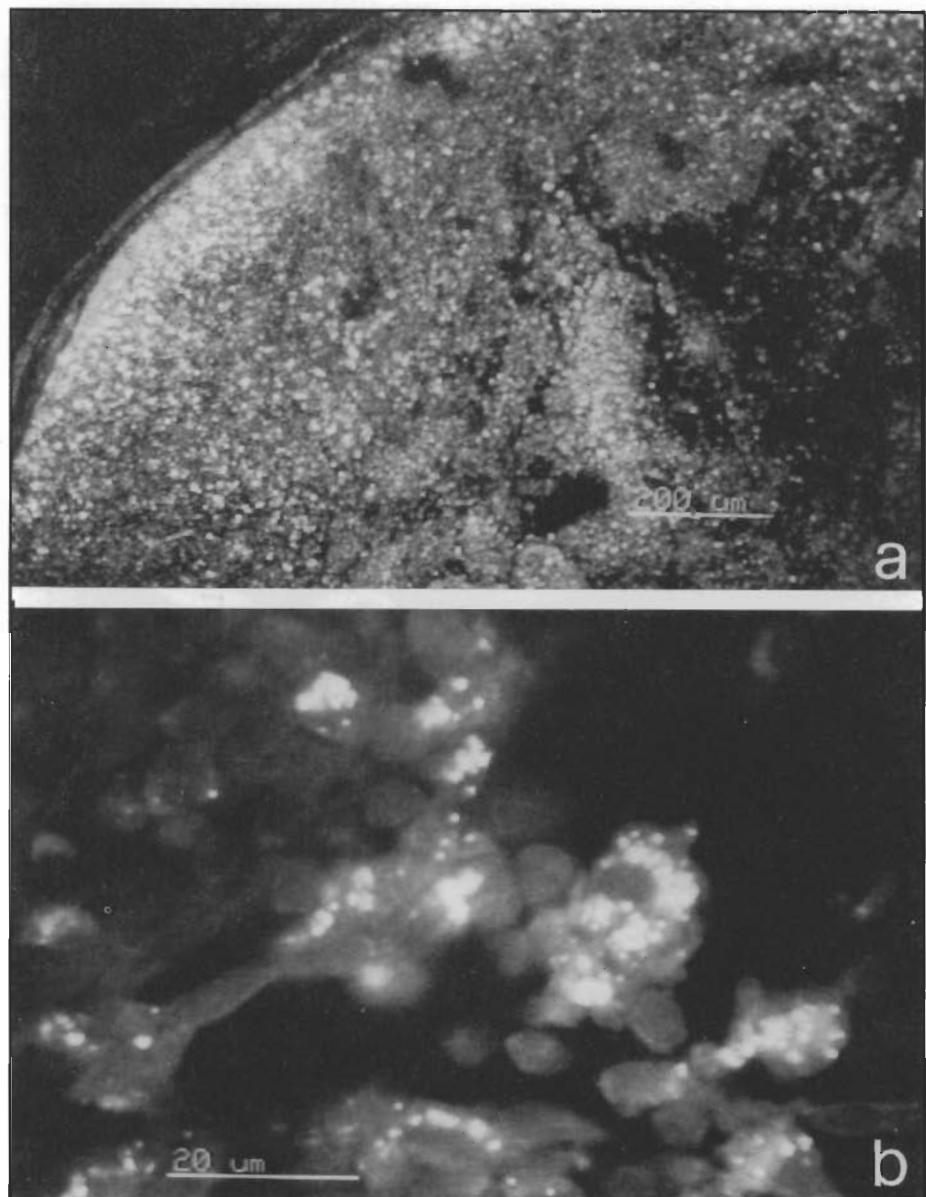


ABB. 8

- a) Deutliche Fluoreszenz weist die Zone des Marginalsinus und die sich anschließende Kortex des Halslymphknotens am 1. Tag nach interstitieller Injektion fluoreszierender Standardpartikel in die Zunge der Ratte auf (CLSM-Aufnahme).
- b) Zellen des Lymphknotenparenchyms am Übergang von Rinde zur Markzone dicht angefüllt mit phagozytierten Standardpartikeln.

FIGURE 8

- a) Bright fluorescence is recognizable in the zone of the subcapsular sinus and the related cortical area of a lymph node of the neck, 1 day after interstitial injection of fluorescent standard particles in the rat tongue (CLSM image).
- b) Cells of the nodal parenchyma at the transition from the cortex to the medulla have been densely filled up with standard particles by phagocytosis.
- a) Un jour après l'injection interstitielle de particules fluorescentes standardisées dans la langue du rat, une réaction de fluorescence brillante est visible dans la zone du sinus sous-capsulaire, ainsi que dans la région corticoïde du nœud lymphatique (image CLSM).
- b) Les cellules du parenchyme nodal, qui sont de passage du cortex à la cavité médullaire, sont richement remplies de particules phagocytées.

LITERATUR

1. ASCHOFF L. (1924) — Das reticulo-endothiale System. — *Ergebn. in Med. und Kinderheilkd.*, 26, 1-844.
2. CASLEY-SMITH J.R. (1983) — The structure and functioning of the blood vessels, interstitial tissues and lymphatics. — In : *Lymphangiology*, FÖLDI M., CASLEY-SMITH J.R. (eds.), Schattauer, 27-164.
3. CASTENHOLZ A. (1991) — Morphological and functional characterization of the endothelium of initial lymphatics. — *Proc. 5th World Congress Microcirculation*, abstract 82, p. 14.
4. CASTENHOLZ A. (1991) — Structure of initial and collecting lymphatic vessels. — In : OLSZEWSKI W.L. (ed.) - *Lymphstasis - pathophysiology, diagnosis and treatment*. - CRC Press Inc., Boca Raton, USA, 15-42.
5. CASTENHOLZ A. (1992) — Wandstrukturen und funktionelle Sonderstellung initialer Lymphgefäße. — In : *Interzellulärsubstanz in der Gefäßwand*. - Wilhelm-Schneider-Symposium. - Attempto Verlag, Tübingen, 143-154.
6. CASTENHOLZ A. (1993) — Neue Erkenntnisse zur Anatomie und Funktion der Blut- und Lymphgefäße der Haut. — In : *Venenleiden und Haut*, E. SCHÖPF, J. STAUBESAND (Hrsg.) - Vasomed, Kargerer, Bonn, 9-22.
7. CASTENHOLZ A. (1990) — Funktionsmorphologische Aspekte zur Lymphbildung und Ödemgenese. *Perfusion*, W. Zuckschwerdt Verlag, München, 2 : 50-61.
8. CASTENHOLZ A. (1992) — The initial lymphatic as an integrate part of the connective tissue fiber organization. A systemic-morphological analysis. - *Biorheology, Abstracts 8th Int. Congress of Biorheology*, Yokohama, vol. 29, no. 1, Pergamon Press, New York, p. 14.
9. CASTENHOLZ A. (1992) — The histomechanical role of the lymphatic endothelium for lymph formation and lymph transport. — In : *Progress in Lymphology*, XII, R.V. CLUZAN et al. (eds.), Elsevier Science Publishers B.V. : 125-129.
10. CASTENHOLZ A. (1991) — Rheological phenomena in blood and lymphatic microvessels using fluorescent microspheres (Fluoresbrite ®). — *Proc. 5th World Congress Microcirculation*, abstract 83, p. 14.
11. CASTENHOLZ A., RÜHLING H. (1991) — Fluorescence microscopic representation of micro-lymphrheologic phenomena. *Int. Journal of Microcirculation Clinical and Experimental*, 10 : 246.
12. CASTENHOLZ A. (1992) — Representation of flow phenomena in terminal blood vessels and initial lymphatics using fluorescent microbeads. — Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands.
13. CASTENHOLZ A. (1992) — Physical model of the tissue-lymph-interface. — *Pergamon Press*, New York, vol. 29 / 1 : 152.
14. CASTENHOLZ A. (1992) — Strömungscharakteristik initialer Lymphbahnen. — *Abstraktenband Jahrestagung Ges. für Mikrozirkulation*, Heidelberg, Abstrakt Nr. 73.
15. CASTENHOLZ A. und RÜHLING H. (1993) — Rheologie der peripheren Lymphe. — *Vortrag und Videodemonstration anl. Lymphologica '93*, Berlin, 01.-04.04.1993.
16. CASTENHOLZ A. (1992) — The initial lymphatic - a microvesSEL provided with special morphological as well as functional features. — *Vortrag anl. 16th World Congress of the Intern. Union of Angiology*, 12.-18.09.1992, Paris.

IBLANKO

Compression pneumatique intermittente et lymphœdème : évolution de 2 méthodes cliniques.

Intermittent pneumatic compression of lymphoedema : evaluation of two clinical methods.

RISTO T. POHJOLA¹, MD, KALLE PEKANMÄKI², MD, Ph.D., PERTTI J. KOLARI², M.Sc.

¹ Department of Public Health, University of Tampere, FIN-33520 Tampere

Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Päijät-Häme Central Hospital, FIN-15850 Lahti, Finland

² Department of Dermatology, Päijät-Häme Central Hospital, FIN-15850 Lahti, Finland.

ABSTRACT

Reduction of lymphoedema commonly involves time-consuming pneumatic compression methods combined with various physical treatments to maintain the results. Optimized treatment protocol for pneumatic compression was sought in a comparative treatment trial. The results obtained by using a multichamber unit adapting pressure from inflatable bags to the working pressures of the lymphatic system were compared with those obtained by using a single-chambered unit. Two hour compression was used in the multichamber unit, six hour treatment in the single-chamber unit. In most regions, the new treatment mode proved to be significantly better on hourly basis. No statistical difference was found at any level even when compression time was not considered (Wilcoxon two-way rank sum test, $p < 0.05$). The results suggest that compression times can be shortened. In the short term, two hour compression with a multichamber device seems to equal or exceed the value of six hour treatments with single-chamber machines in reducing limb oedema.

RÉSUMÉ

La réduction du lymphœdème implique d'ordinaire des techniques de compression pneumatique de longue durée combinées avec des traitements physiques variés permettant le maintien des résultats. Un protocole optimal de traitement pour la compression pneumatique fut recherché à travers un essai comparatif. Les résultats obtenus au moyen d'une unité multi-chambres adaptant la pression des manchons gonflables aux pressions de travail du système lymphatique ont été comparés à ceux obtenus grâce à une unité mono-chambre.

Deux heures de compression furent utilisées pour le système multi-chambres et six heures de traitement pour système mono-chambre. Dans la plupart des régions, le nouveau mode de traitement se montra significativement meilleur sur base horaire. Aucune différence statistique ne fut trouvée à aucun niveau quand le temps de compression n'était pas pris en considération. Les résultats suggèrent que le temps de compression peut être raccourci. A court terme, une compression pendant deux heures avec un système multi-chambres semble égale ou meilleure que ce qui est obtenu par six heures de traitement d'une machine mono-chambre pour réduire l'œdème d'un membre.

Key words : lymphoedema, edema, lymphatic system, microcirculation, intermittent pneumatic compression.

Reprints request to :

Pertti J. Kolari MSc.
Koivutie 20
FIN-54850 Kuukanniemi
Finland
Fax : 358 53 412 5352

INTRODUCTION

Limb lymphoedema can lead to disabling pain and reduced mobility. Limb dysfunction may even compromise psychic stability. Physical methods are widely considered to be the most effective treatment available. Normal use of the limb, guidance, and gentle exercise play an important role in primary prevention. Lymphotherapy, bandaging, intermittent pneumatic compression (IPC), and muscle activity together with elastic sleeves or stockings and elevation can be combined in treatment (2, 5, 6, 13).

Intermittent pneumatic compression with a single inflatable chamber to treat lymphoedema was introduced in 1955 having previously been used mainly as treatment for other vascular diseases (2, 3). Because the pressure generated by a single chamber is transmitted evenly, high pressures are unpleasant during the commonly used 50 second duty cycles.

Treatment periods up to 6-8 hours have usually been recommended (7). In the previous studies, we have applied IPC in treating venous insufficiency with leg ulcers and post-traumatic oedema (1, 10).

The comparative treatment carried out in this study used a novel multichamber device, Ventipress® (Ventipress Ltd, Lappeenranta, Finland), which can be triggered for graded sequential limb compression at pressures up to 150 mmHg for any length of time needed (10). The study focused on whether daylong compression treatments are really needed. Pressure wave form was employed in impulse mode, with considerable shortening of the initial treatment duration (fig. 1).

There is a distinct need in primary care to make the treatment easier and to increase its availability especially for patients with leg ulcers and oedemas (5, 10).

MATERIAL AND METHODS

This trial included patients with high-protein, low lymph flow oedema, which is commonly caused by lymphatic malfunction (4). Each clinical diagnosis had been verified before referral for rehabilitation. Twenty patients, 18 female and 2 male, with mean age of 63 years (range : 46 - 88 years), were studied. All upper extremity oedemas were due to surgery for a malignant condition. Low extremity oedemas were caused either by infection, a congenital defect or a malignant condition. All the referrals were given the multichamber treatment, as were those who sought renewal of IPC on their own initiative. The previous treatment records with the single-chamber apparatus for those seeking renewed treatment were used as controls. The upper and lower limb circumferences were measured at three levels in the standard way with soft tailor's tape, as is the accepted clinical practice. Measurements made in this way have also been proven to correlate well with those obtained in voluminometric studies (15).

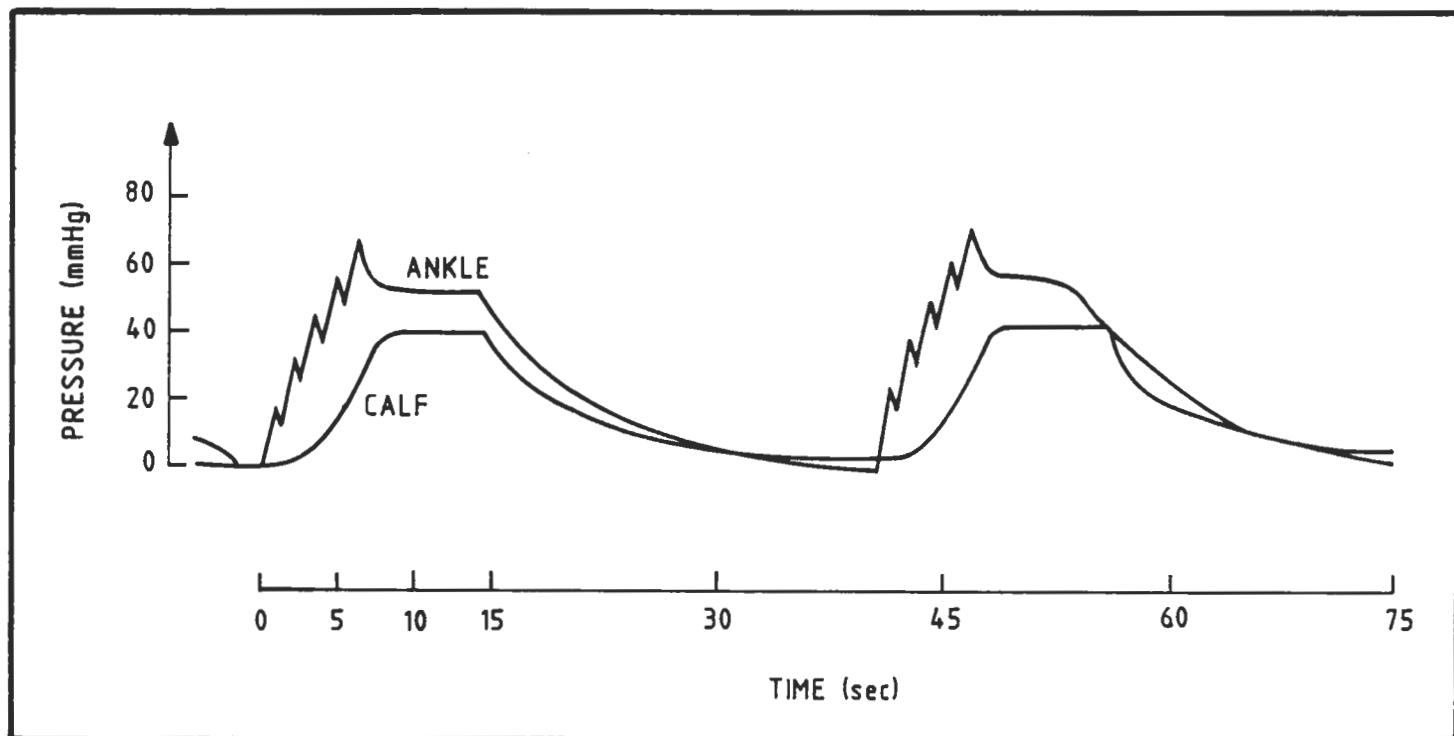


FIGURE 1

The pressure curves for the graded sequential rise in pressure of the multichamber system.

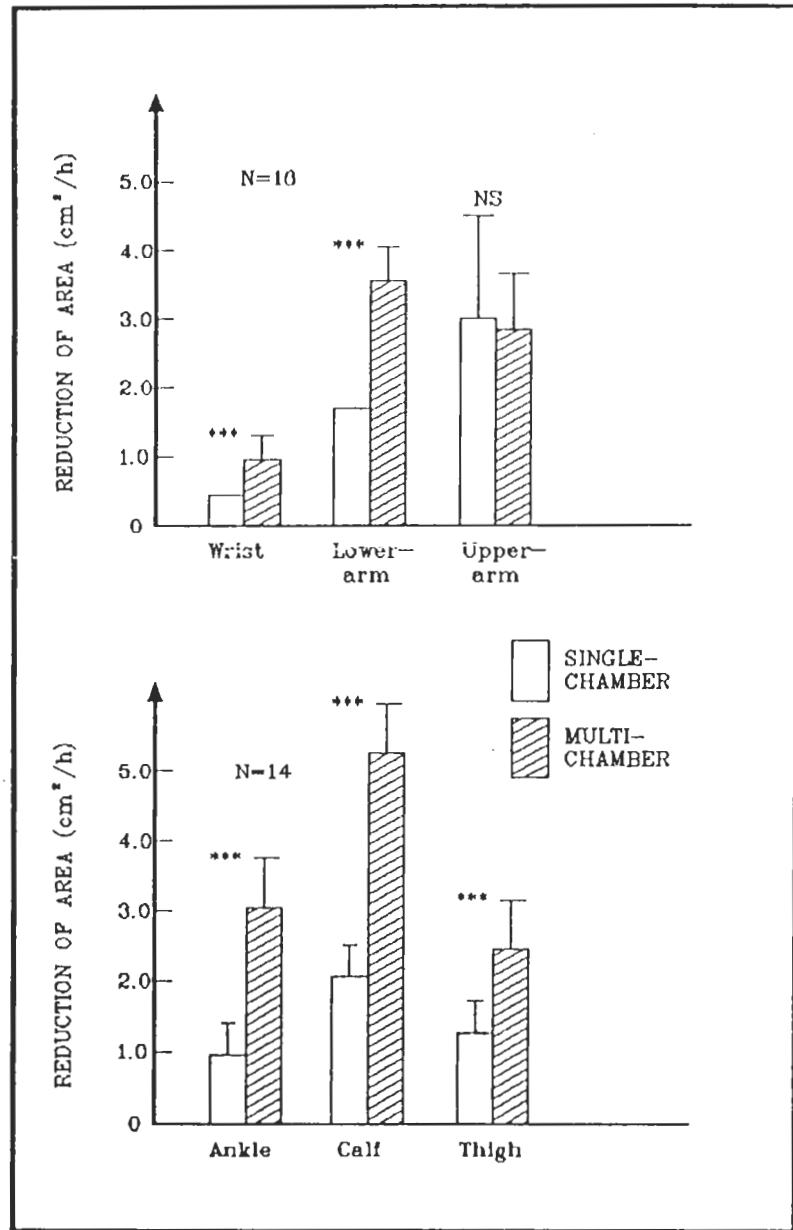


FIGURE 2

Slopes of area reduction in the upper extremity and in the lower extremity, respectively ($p < 0.001$, ***).

The same contraindications were respected in both treatment modes. No other selective conditions were applied. For nonpaired observations there was no previous recording of IPC treatment. Standard treatment with the single-chambered unit comprised six hours of IPC for five consecutive days. Treatment with the multichamber unit was given daily and lasted two hours a day for five consecutive days.

The physiotherapists carrying out the treatment were not aware that a treatment trial being carried out, as they had been instructed that shorter treatments are needed with multichamber devices. The same therapist carried out each treatment, and took all measurements during its course.

Multichamber treatment records ($N = 10$ for the arm and $N = 14$ for the leg) were compared to the results obtained with single-chamber treatment ($N = 16$ for the arm and $N = 9$ for the leg). Statistical comparisons were made with the nonparametric Wilcoxon two-sample rank sum test fit for small samples.

A standard Jobst® apparatus (Toledo, Ohio, USA) and a Ventipress® device Model 14 (Ventipress Ltd., Lappeenranta, Finland) were used. The latter consists of a pressure control element, which allows compressed air, at a pressure of about 0,7 bar, to enter into a multichamber boot (sleeve).

The maximal pressure of about 60 mmHg was applied for 15 seconds. Inflating the bag took 15 seconds, deflating it 25 seconds. The compression pressures on the ankle were measured using a 5×5 square cm pressurized air bag connected to a Honeywell® Micro Switch 142 PCO5G transducer placed over the medial malleoli to obtain the pressure curves for the graded sequential rise in pressure (fig. 1).

RESULTS

Reductions of the cross-sectional limb circumference areas were assumed to be exponential as a function of time, i. e. expecting more reduction at the beginning of the treatment sessions, two or six hours respectively (3). The slopes of the area reductions were calculated according to the formula

$$A(t) = A_0 e^{-bt}$$

where $A(t)$ (cm^2) is the residual area after the five times of two, respectively six hours treatment sessions. In the log-linear transformation A_0 (cm^2) is the initial area, the slope (b) being $1/\text{h}$.

The results obtained with graded sequential multichamber IPC were at least equal in most regions to those reached with conventional single chamber treatment (fig. 2). Statistically significant differences were observed in a number of regions favouring the shorter treatment. If the treatment time is not taken into consideration, there was no statistical difference at any level between these two methods. Yet, purely on the basis of time this mean a saving of two-thirds for both the patient and the unit.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Early nonpitting oedema, with a high protein content, can often be changed into pitting oedema, which is better tolerated. The function of lymphatics is to dispose of foreign cells and large molecules unable to re-enter the capillaries. There is every reason to suppose that all molecules can enter the lymphatics (4, 8). According to JOHNSON and PFLUG, the lymphatics act like millions of ultramicroscopic oedema syringes that are repeatedly being compressed and released (8).

Pressure rises gradually and higher proximally. The system resembles a continuous row of tiny pumps, each stepping up the pressure a little more. The graded sequential multi-chamber devices seem in theory to function ideally in augmenting the lymphatic pumps (fig. 1). Rapid inflation of the boot sharply increases the pulsatile venous flow component (11).

Grading or sequencing is an improvement over uniform compression measured by the maximal volumetric flow index (11). Studies of hydraulic models indicate that the zig-zag mode inflation of multiple chambers diminishes the occlusive throat otherwise residing in the proximal portion of veins under uniform compression, and thus also tends to promote lymphatic filling and emptying (9).

In view of the reduction of high interstitial protein content and the resulting fluid shift, it seems essential to assist the lymphatics within their working pressure in clearing protein from interstitial fluid (8). High pressures may not be uncomfortable for short periods, but do they accomplish their purpose.

According to a radioactive nuclide clearance study, 75 mmHg is probably the closing pressure above which external pressure collapses the lymphatics, at least in dogs. In some individuals this pressure may be lower, about 60 mmHg (12). In our study 60 mmHg was the upper limit.

The effectiveness of pneumatic compression has been shown to depend on the mobility of oedematous fluid that is tissue viscoelasticity, rather than the degree of swelling measured by volumetry (14).

It is concluded that the greatest benefit was obtained during the first two hours of compression. Theoretical calculations indicate that excess fluid decreases exponentially with time, more so initially (14).

No solid scientific data about optimal pressures or the timing of duty and rest cycles are available; there are only some hypotheses (2, 3). It has been suggested that the site and type of oedema have an influence and call for more exact treatment monitoring (14). We suggest the above guidelines as the basis for further investigation of treatment protocols.

REFERENCES

1. AIRAKSINEN O., KOLARI P.J., HERVE R., HOLOPAINEN R. (1988) — Treatment of posttraumatic oedema in lower legs using intermittent pneumatic compression. *Scand. J. Rehabil. Med.*, 20 : 25-28.
2. AIRAKSINEN O., KOLARI P.J., PEKANMÄKI K. (1992) — Intermittent pneumatic compression therapy. Critical review. *Phys. Rehabil. Med.*, 3 : 219-237.
3. BENINSON J. (1975) — Lymphedema : patho-physiologic and clinical concepts. *Angiology*, 26 : 661-664.
4. CASLEY-SMITH J.R. (1984) — The pathophysiology of lymphedema. *Immunol. Haematol. Res.*, 2 : 125-130.
5. EDITORIAL (1986) — Compression for lymphoedema. *Lancet*, I : 896.
6. FÖLDI E., FÖLDI M., WEISSLEDER H. (1985) — Conservative treatment of primary lymphoedema of the limbs. *Angiology*, 35 : 171-180.
7. Instructions for operation. Jobst® Extremity Pump™ (1968). *Jobst Institute Inc.*, Box 653, Toledo, Ohio, U.S.A.
8. JOHNSON H.D., PFLUG J. (1975) — The swollen leg. Heinemann, London, pp. 56-64.
9. KAMM R., BUTCHER R., FOELICH J., JOHNSON M., SALZMAN E., SHAPIRO A., STRAUSS H.W. (1986) — Optimisation of indices of external pneumatic compression for prophylaxis against deep vein thrombosis : radionuclide gated imaging studies. *Cardiovasc. Res.*, 20 : 588-596.
10. KOLARI P.J., PEKANMÄKI K., POHJOLA R.T. (1988) — Transcutaneous oxygen tension in the patients with postthrombotic leg ulcers : treatment with intermittent pneumatic compression. *Cardiovasc. Res.*, 22 : 138-141.
11. LEE B., TRAINOR F.S., KAVNER D., MADDEN J.L., DRATZ H.M., EJERCITO E.M. (1976) — Noninvasive prevention of thrombosis of deep veins of the thigh using intermittent pneumatic compression. *Surg. Gyn. Obst.*, 142 : 705-715.
12. MILLER G.E. (1984) — The effects of varying total tissue pressure on lymphatic transport. *Int. J. Microcir. Clin. Exp.*, 3 : 367.
13. MORTIMER P., REGNARD C. (1986) — Lymphostatic disorders. *Br. Med. J.*, 293 : 347-348.
14. MRIDHA M., ÖDMAN S. (1989) — Fluid translocation measurement. A method to study pneumatic compression treatment of postmastectomy lymphoedema. *Scand. J. Rehabil. Med.*, 21 : 63-69.
15. STRANDEN E. (1981) — A comparison between surface measurements and water displacement volumetry for the quantification of leg edema. *J. Oslo City Hosp.*, 31 : 153-155.



Dimitri GEROTA

Dimitri GEROTA, Anatomiste et Chirurgien, Précurseur dans l'Etude des Lymphatiques.

Prof. Dr. Aurel KAUFMANN

Université de Médecine et Pharmacie de Cluj Napoca

De multiples références à la méthode d'étude des lymphatiques décrite par Dimitri GEROTA ont été faites et sont encore faites dans la littérature spécialisée. Rares sont ceux qui, à part cette technique, connaissent la personnalité et l'activité complexe de ce distigué chercheur roumain, anatomiste et chirurgien. C'est la raison pour laquelle j'ai considéré nécessaire la présentation de ses recherches d'anatomie en général et surtout de celles sur le système lymphatique dans une revue spécialisée.

Né le 17 juillet 1868 à Craiova, en Roumanie, il suit les cours du lycée et obtient en 1886 le baccalauréat en lettres et sciences. Etudiant à la Faculté de Médecine de Bucarest, il devient, le 16 janvier 1892, Docteur en Médecine et Chirurgie, soutenant la thèse «Le Violet de Methyl comme agent thérapeutique». Depuis qu'il était étudiant, il manifeste son affinité pour l'étude de l'anatomie, en travaillant comme préparateur au Musée d'Anatomie de Bucarest. Peu après avoir fini ses études (1893), il obtient par concours la bourse du Ministère de l'Instruction Publique pour se perfectionner en France et en Allemagne (1893-1897), où il a l'occasion de travailler sous la direction des grands anatomistes Poirier et Farabeuf à Paris et Bandeleben, Bergman, König et Hahn à Berlin. En 1897, on lui demande d'être assistant à la Faculté de Médecine de Jena, au cathédre d'anatomie du Professeur Fürbringer.

Lors de son retour dans le pays, il devient assistant dans la Section de Chirurgie et Pathologie Expérimentale, résident dans la spécialité de chirurgie, et en 1899, assistant de l'Institut d'Anatomie Topographique et Chirurgicale de Bucarest, docent et puis agrégé provisoire de médecine (1900) dans la spécialité d'anatomie topographique et chirurgicale.

En 1913, il est nommé professeur titulaire de la II^{me} Cathédre d'anatomie topographique et clinique chirurgicale de Bucarest, où il travaille jusqu'en 1937.

Sa conception de la chirurgie qui est nécessairement liée à l'étude approfondie de l'anatomie peut être illustrée par quelques phrases extraites de son exposé pour l'obtention du poste d'agrégé en chirurgie.

L'auteur présente au début plusieurs possibilités d'injection des lymphatiques du cadavre. Parmi ceux-ci, il remarque les résultats obtenus par F. Meckel et J. Hunter, qui ont utilisé comme substance d'injection le mercure. Il souligne les inconvénients de l'injection de ce produit, fait qui a conduit à chercher une nouvelle masse d'injection pour les lymphatiques.

Voici sa composition, telle que l'a décrite GEROTA: « La couleur que je trouve très fine, et que je recommande en solution, est la couleur bleue d'huile, qui se trouve en tube de feuille mince d'étain, connue des peintres comme le Bleu de Berlin (dans son ouvrage, il va aussi recommander l'utilisation du Bleu de Prusse). A deux grammes de cette couleur (que l'on écrase pendant cinq minutes dans une soucoupe), on ajoute trois grammes d'huile claire de térébenthine. Puis on ajoute 15 grs. d'éther sulfurique puis on filtre au moyen d'une peau de biche ou gaze double. Le mélange est gardé dans une bouteille fermée par un bouchon de verre. La pâte se prépare au moment de l'utilisation. Elle est inflammable, raison pour laquelle on ne va pas travailler avec elle près du feu ».

L'auteur décrit d'autres colorants qui peuvent être inclus dans la composition de la pâte (noir absolu, rouge, jaune de cadmium, chrome, violet, etc), raison pour laquelle il l'appelle polychrome.

Les avantages de ces mélanges sont soulignés par l'auteur :

- ils peuvent injecter des vaisseaux lymphatiques fins
- la finesse des colorants (particulièrement du bleu) permet d'injecter les plus fins capillaires et de pénétrer les ganglions lymphatiques
- le mélange pénètre mieux que les autres masses d'injection et avec une pression minime
- il permet l'étude au microscope
- l'utilisation des différentes couleurs permet l'injection polychrome des pièces anatomiques pour qu'elles soient démonstratives
- les masses d'injection sont faciles à préparer, les couleurs n'imprégnant pas les tissus et la préparation peut être facilement nettoyée avec la térébenthine, tout en étant inoffensives pour la santé.

L'injection des vaisseaux lymphatiques est une opération délicate qui demande de l'expérience. Les meilleurs résultats sont obtenus sur des pièces anatomiques fraîches (24 heures post mortem). Les pièces d'injection peuvent être tenues un temps dans l'eau ou l'on peut induire un oedème artificiel par l'injection des vaisseaux sanguins avec de l'eau.

L'instrumentation décrite par GEROTA comprend, outre les instruments habituels (pinces, aiguilles, ciseaux, etc) un appareil qui injecte sous la pression d'une colonne de mercure. Aujourd'hui son utilisation est exclue.

L'injection proprement dite est conditionnée par le calibre des vaisseaux. Pour injecter les petits vaisseaux lymphatiques (injection interstitielle), on va introduire une canule fine, aussi parallèle que possible avec la surface (la couche supérieure du derme). On injecte avec une pression réduite et égale pour éviter une extravasation majeure. Si on se limite à cette zone, on lave le reste du colorant à jet d'eau. On laisse la pièce quelques heures ; on fixe longtemps au formol 10 %.

L'injection des collecteurs lymphatiques se fait en disséquant la région et en isolant un vaisseau assez grand pour être cannulé. Après l'injection, on laisse la pièce quelques heures et puis on peut disséquer. Les pièces injectées avec la masse GEROTA peuvent se conserver par fixation en alcool et formol 10 %.

Dans l'article publié en 1896, GEROTA dit dans le final : « Je serais heureux si ces mélanges pouvaient aider quelqu'un. Je souhaite que ceux qui s'occupent de recherches semblables puissent les modifier, améliorer la technique et en faire connaître les résultats ».

«Il existe une liaison très étroite et naturelle entre l'anatomie chirurgicale et la clinique chirurgicale (...) tous les chirurgiens et professeurs de chirurgie en France, par exemple Tillaux, Tuffier, Poirrier, Delbet, Pejars, Quénu, Guyon, etc, ont été d'abord des anatomistes ou ont du débuter par des travaux d'anatomie. Le meilleur traité de chirurgie opératoire fut accompli par un anatomiste (Farabeuf). Que le chirurgien débute par l'anatomie et soit anatomiste avant d'être chirurgien».

Son activité de recherche dans le domaine de l'anatomie et de la chirurgie est riche, autant expérimentale que clinique. Accomplie dans le pays ou les laboratoires de France où d'Allemagne, elle est centrée sur les problèmes généraux de l'anatomie chirurgicale.

Avec le Professeur Thoma Ionesco, il publie «L'anatomie du sympathique cervical», et en 1929, paraît l'étude anatomo-clinique «L'Appendicite», l'ouvrage le plus complexe de ce genre dans la littérature médicale de l'époque. Remarquables sont les études qui regardent les rapports anatomiques du rein, et surtout celles qui font référence à la valeur du formol dans l'anatomie topographique, ouvrage considéré comme le plus complet du temps.

Les recherches entreprises par le Professeur D. GEROTA portèrent particulièrement sur l'étude des voies lymphatiques de drainage des différents organes. On rappelle celles-ci :

«Les lymphatiques mammaires du point de vue clinique» (1899) présente les voies de drainage lymphatique des téguments thoraco-abdominaux et la possibilité de métastaser dans le cancer mammaire. Il décrit les routes lymphatiques vers le sein opposé, attirant l'attention sur la possibilité de propagation cancéreuse d'un sein à l'autre et de métastases vers les ganglions mammaires internes. Intéressante est l'observation regardant l'ouverture de voies collatérales comme possibilité de drainage lymphatique dans le blocage tumoral ou cicatriel, avec comme conséquences la propagation rétrograde des métastases.

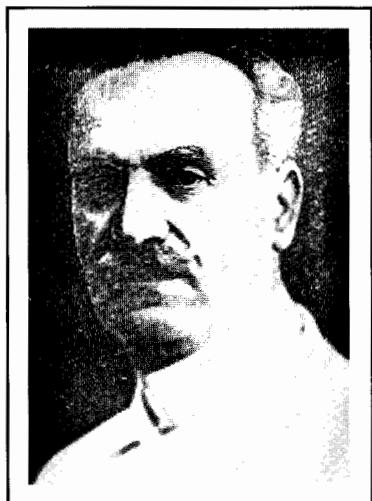
Dans son ouvrage 'Ueber die Anatomie und Physiologie der Harnblase» (1897), D. GEROTA a poursuivi de façon expérimentale chez le cadavre et chez l'animal, deux objectifs - la présence et l'emplacement des lymphatiques, et la possibilité d'absorption médicamenteuse à ce niveau. De ses recherches macro et microscopiques, il tire la conclusion que la muqueuse vésicale ne possède pas de vaisseaux lymphatiques, ceux-ci étant abondamment représentés dans la tunique musculaire, le drainage lymphatique ayant lieu dans des ganglions qu'il a appelés «Lymphoglandulae vesicales anteriores, laterales et prevesicales». Dans la même recherche, il aboutit à la conclusion que la voie vésicale ne peut pas être employée pour l'administration de médicaments étant donné l'absorption très faible à ce niveau. Depuis 1895, D. GEROTA insiste sur la lymphadénectomie associée dans le cancer rectal, en soulignant la nécessité de connaître l'anatomie et les voies de drainage lymphatique de cette région («Die Lymph-gefässe des Rectum und des Anus» 1895). Sur base de cet ouvrage original, il est reçu comme assistant à l'Institut d'Anatomie de Berlin. Les conclusions présentées dans cet ouvrage sont reproduites dans plusieurs traités classiques (Das Becken de Waldeyer - page 274; Rauber Menschl Anatome - Aufl. 1897).

De nombreuses autres recherches dans le domaine des vaisseaux lymphatiques le font connaître et reconnaître par les grandes personnalités de l'époque. Le 30 juillet 1896, le Professeur Waldeyer, dans la séance de l'Académie des Sciences de Berlin, attire l'attention sur l'ouvrage de GEROTA «Ueber Lymphscheiden des Auerbachschen Plexus Myentericus der Darmwand», où il décrit l'enveloppe lymphatique mise en évidence par le procédé qui porte son nom (et qui ne doit pas être confondue avec le plexus lymphatique de la musculature intestinale).

Celui qui s'est préoccupé de l'étude des vaisseaux lymphatiques connaît les difficultés qui interviennent. Depuis l'observation de Asseli restée dans l'histoire de l'année 1627 et jusqu'à la lymphographie directe de Kinmonth en 1952, plus de trois siècles et demi ont été nécessaires. Même si les dernières décennies apportent des moyens modernes d'investigation du système lymphoganglionnaire, la méthode d'injection des lymphatiques décrite en 1896 par D. GEROTA reste encore aujourd'hui dans l'arsenal du chercheur en ce domaine.

Citer les auteurs et les ouvrages qui annoncent dans le titre où la bibliographie «avec la méthode d'injection de GEROTA» dépasserait de beaucoup l'espace de cette présentation. Je vais la reproduire de mon mieux ainsi que l'a présentée son auteur (in Anatomischen Anzeigen XII Bd N8/1896) sous le titre : «Zur Technik der Lymphgefäßinjektion-Eine Neue Injektion-Masse für Lymphgefäßse».

IBLANKO



Dimitri GEROTA

Dimitri GEROTA, an Anatomist and a Surgeon, a pioneer in the Study of Lymphatics.

Prof. Aurel KAUFMANN

University of Medicine and Pharmacy, Cluj

Multiple references to the method of study of the lymphatic vessels described by GEROTA have been and are still done in specialized litterature.

Few are those who besides this technique know the personality and complex activity of this distinguished Romanian researcher, anatomist and surgeon. It is the reason why I considered necessary to present his anatomical researches, with a highlight of those concerning the lymphatic system, in this special review.

Born on the 1th of July 1868 in Craiova (Romania), he followed his studies and in 1886 , he obtains a Bachelor degree in letters and sciences. He becomes a student of the Faculty of Medicine in Bucharest, where he graduates on the 16th of January 1892 as a Doctor of Medecine ans Surgery, sustaining the thesis „The Methyl Violet as a Therapeutic Agent”.

Since being a student, he manifests his affinity for the study of Anatomy - working as a junior assistant of the discipline and Museum of Anatomy in Bucharest. Shortly after graduation (1893), he obtains through contest the scholarship of the Ministry of Public Instruction to perfect his studies in France and Germany (between 1893 and 1897) where he has the opportunity to work under the guidance of the great anatomists Poirier and Farabeuf in Paris, and Bandeleben, Bergman, König and Hahn in Berlin. In 1897, he is called as assistant at the Faculty of Medicine in Jena, to join the Anatomy board of Professor Fürbringer.

Upon his return to Romania, he becomes an assistant of the Section for Surgery and Experimental Pathology, resident in the specialty of Surgery, and, since 1899, an assistant of the Institute of Topographic and Surgical Anatomy in Bucharest, docent and then provisional agrégé at the Faculty of Medicine (1900) in the speciality of topographic and surgical Anatomy.

At the beginning of the year 1913, he is nominated as a titular professor of the Board for Topographic Anatomy and Surgical Clinics II, of Bucharest, where he has worked until 1937.

His conception of surgery as being essentially related to the profound study of Anatomy could be illustrated by certain phrases drawn from his statement of reasons upon obtaining the nomination as a Surgery agregé.

„There exists a very close, natural tie between surgical Anatomy and surgical clinics (...) - all surgeons and surgical professors in France, for example Tillaux, Tuffier, Poirrier, Delbet, Pejars, Quenu, Guyon, a.s.o., have been prior anatomists or have had to commence through works of Anatomy. The best tome of operative surgery was accomplished by an anatomist (Farabeuf)“.

„The surgeon should start with the Anatomy and be an Anatomist before he is a Surgeon“.

His research in the field of Anatomy and Surgery is ample, both clinical and experimental. It was undertaken in Romania and in the French and German laboratories, and its mainstay was surgical Anatomy. Together with Professor Thoma Ionescu, he published «The Anatomy of the Cervical Sympathetic», and in 1929, there appears the anatomo-clinical study «The Appendicitis», the most complex work of this kind in the medical litterature of the time. Remarkable are the studies regarding the anatomical rapproches of the kidney, and mostly those underlining the value of formalin in topographic anatomy - a work considered to be the most complete to that date.

A special focus was given in Professor's GEROTA researches to the study of lymphatic pathways which drain various organs. We underline the following ones :

„Lymphatics of the Mammary Gland - A Clinical Point of View“ (1899) - concerning lymphatic pathways draining thoraco-abdominal skin and the possibility of metastasizing in mammary cancer. He describes the lymphatic pathways to the opposite breast, drawing attention to the possible occurrence of cancerous spread from one breast to the other and of metastasizing to the internal mammary lymph nodes. An interesting observation points to the opening of collateral pathways for lymphatic drainage in the tumoral or cicatriceal blocking, with consequences regarding retrograde metastasizing.

In his work „Über die Anatomie und Physiologie der Harnblase“ (1897), D. GEROTA followed experimentally in cadavers and in laboratory animals two objectives - the presence and emplacement of lymphatics and the possibility for absorption of medicaments at this level. From macro and microscopic examinations, he concludes that the urinary bladder mucosa does not possess lymphatic vessels, those being abundant in the muscular sheet, the lymphatic drainage occurring into nodes he named „Lymphoglandulae vesicales anteriores, laterales et prevesicales“. In the same research, he draws the conclusion that the bladder pathway cannot be employed for administering medications, given the very scarce absorption at this level.

Ever since 1895, D. GEROTA insisted on associated lymphadenectomy in rectal cancer - underlining the necessity of a knowledge of anatomy and lymphatic drainage pathways from this region - „Die Lymphgefässe des Rectum und des Anus“ - (1895). Based upon this original work, he is received as an assistant of the Berlin Institute of Anatomy. The conclusions exposed in this work are reproduced in more classic tomes (Das Becken de Waldeyer, page 274; Rauber Menschl Anatomie - aufl. 1897). Numerous other researches in the field of lymphatic vessels made him recognized by the great personalities of the time. On the 30th of July 1896, Professor Waldeyer, in the session of the Academy of Sciences in Berlin, called to attention the work of GEROTA - „Über Lymphscheiden des Auerbachschen Plexus Myentericus dere Darmwand“, where he describes the lymphatic sheath delineated by the procedure which bears his name (and which is not identical to the lymphatic plexus of the intestinal musculature).

One who was preoccupied with the study of lymphatic vessels knows the impending difficulties. Since the observation of Aselli remained in the history of the year 1627 and until the direct lymphography of Kinmonth in 1952, more than three centuries and a half have been necessary. Even though the last decades have brought modern means of lymphoganglionar investigation, the procedure for injection of the lymphatics described in 1896 by D. GEROTA remains currently in the researcher's arsenal.

To quote the works and authors which announce in the title or references the GEROTA procedure of injection would greatly exceed the space of this présentation. I will attempt instead to convey this procedure, as the author exposed it in Anatomischen Anzeigen XII Bd N 8/1896 under the title : „Zur Technik der Lymphgefäßinjektion - Eine Neue Injektion - Masse für Lymphgefässe“.

The author presents in the beginning more possibilities for injection of the lymphatics in the cadaver. Among these, he underlines the results obtained by F. Meckel and J. Hunter which employed

mercury as an injection medium. He stresses the shortcomings of mercury injection, a fact which led to the development of a new injection mass for lymphatics.

Here is its composition as described by GEROTA :

„The color that I find to be very fine and which I recommend as a solute, is the blue colored oil available in stannum tubes, known by painters as Berlin Bue” (in his work he also recommends the employment of Prussian Blue). „To two grams of this color (which is crushed for five minutes in a porcelain plate), one adds three grams of pure terebentin oil. One also adds fifteen grams of sulfuric ether and one filters them through a piece of deer’s leather (or double cotton gaze). The mixture is kept in a bottle enclosed with a glass cork.

The paste is prepared at the moment it is used. It is flammable, the reason why one should not work in the proximity of a flame”.

The author also describes other coloring agents which may be included in the composition of the paste (absolute black, red, cadmium-chromium yellow, violet, a.s.o.), the reason why he describes it as polychrome.

The advantages of these mixtures are emphasized by the author :

- Fine lymphatic vessels can be injected.
- The fineness of coloring agents (especially the blue one) allows for the injection of the smallest capillaries and the passage through the lymph nodes.
- The mixture penetrates better than the other injection masses and under a minimal pressure.
- It can be microscopically examined.
- The employment of various colors allows the polychrome injection of anatomic pieces for demonstrations.
- The injection masses are easy to prepare, the colors do not leak into the tissues and the piece can be easily cleaned up with terebentin, being innocuous to the health.

Injection of the lymphatics is a delicate operation which requires experience. The best results are obtained with fresh anatomic pieces (24 hours post mortem). The pieces for injection can be kept for some time in water or one can induce an artificial edema through injection of the blood vessels with water.

The instrumentality described by GEROTA requires, besides ordinary instruments (clamps, needles, scissors), a device which injects due to the pressure provided by a mercury column. To date, it is no longer feasible to be employed.

The injection itself is conditioned by the caliber of the vessels. To inject the small lymphatics (interstitial injection), a fine cannula will be introduced as parallel as possible to the surface (the superficial layer of the dermis). One injects with a low, constant pressure in order to avoid massive extravasation. As we delimit the zone, we wash the excess color with water. After a few hours the piece is introduced for a long time in 10 % formalin.

Injection of lymphatic collectors is performed by dissecting the zone and isolating a vessel large enough to be incannulated. After injection, the piece is left for a few hours and then it can be dissected. Pieces injected with the mass described by GEROTA can be conserved by fixation in alcohol and 10 % formalin.

In his article published in 1896, GEROTA concludes : „I would be glad if these admixtures were of benefit to someone. I am looking forward to the ones involved in similar researches modifying them, improving the technique, and communicating the results”.

IBLANKO