

Ekspresja markera limfangiogenezy Prox-1 w raku jajnika

Expression of lymphangiogenesis marker Prox-1 in ovarian cancer

Magdalena Mazurek¹, Wiesława Bednarek¹, Robert Jach², Józef Kotarski¹

¹Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie; kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. med. Jan Kotarski

²Katedra Ginekologii i Położnictwa, Klinika Ginekologii, Położnictwa i Onkologii *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie; kierownik Kliniki: dr hab. med., prof. nadzw. Antoni Basta

Przeгляд Menopauzalny 2009; 3: 121–126

Streszczenie

Limfangiogeneza w raku jajnika jest mało poznana. Naczynia limfatyczne wspomagają wzrost guza, a jednocześnie są główną drogą przerzutów komórek nowotworowych. Ocena ekspresji wybranych markerów śródbłonna naczyń limfatycznych może być przydatna do oceny przebiegu procesu limfoangiogenezy, oceny zezłośliwienia guza oraz zdolności do powstawania przerzutów. Szczególnie obiecujące mogą być badania nad ekspresją białek specyficznych dla limfangiogenezy, takich jak Prox-1 czy jądrowy czynnik transkrypcyjny. Ocena tych markerów być może umożliwi ich wykorzystanie w roli czynników prognostycznych użytecznych przy przewidywaniu leczenia. W niniejszej pracy badano zależności pomiędzy ekspresją Prox-1, różnymi typami histologicznymi oraz różnym stopniem zróżnicowania histologicznego raka jajnika. Ekspresja Prox-1 występowała we wszystkich badanych typach histologicznych raka jajnika. Nie uzyskano jednak różnic istotnych statystycznie ($p > 0,05$) w odniesieniu do typu i stopnia zróżnicowania histologicznego. Dalsze badania uwzględniające większą grupę chorych, zakres zabiegu chirurgicznego oraz inne wykładniki limfangiogenezy prawdopodobnie pozwolą na wykrycie innych zależności.

Słowa kluczowe: rak jajnika, limfangiogeneza, czynnik transkrypcyjny Prox-1

Summary

Lymphangiogenesis in ovarian cancer is not yet well characterised. Lymphatic vessels help tumor progression, and simultaneously represent the most important pathway for neoplastic cell dissemination. The estimation of the lymphatic endothelium markers expression can be useful in the evaluation of lymphangiogenesis, cancer progression and ability of metastatic spreading. It is especially interesting the research on specific lymphatic markers, such as Prox-1, nuclear transcription factor. We investigated correlation between expression of Prox-1, histological type and grading of ovarian cancer. Our studies show the expression of Prox-1 in all investigated histological types of ovarian cancer. We did not observe the statistical correlation ($p > 0.05$) with reference to type and grading. Further investigations taking into account bigger number of patients, spectrum of operation, and other exponents of lymphangiogenesis, probably allow to discover different correlations.

Key words: ovarian cancer, lymphangiogenesis, transcription factor Prox-1

Wstęp

Rak jajnika charakteryzuje najwyższa śmiertelność spośród wszystkich nowotworów narządu płciowego kobiet. Rocznie umiera z jego powodu więcej kobiet niż łącznie na nowotwory szyjki macicy oraz raka endometrium. Około 70% guzów jajnika jest wykrywanych w III i IV stopniu zaawansowania klinicznego [1, 2]. Po-

nad 5 lat od momentu stwierdzenia choroby żyje 85% kobiet ze zdiagnozowanym I stopniem zaawansowania klinicznego. Odsetek 5-letniego przeżycia wśród pacjentek w zaawansowanym stadium spada aż do 25% [3]. Przyczyną późnego wykrywania raka jajnika są asymptomatyczne cechy choroby oraz brak odpowiednich, powszechnie stosowanych metod skринingowych, które

Adres do korespondencji:

lek. **Magdalena Mazurek**, I Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Al. Raławickie 1, 20-059 Lublin

umożliwiłyby wykrywanie jej we wczesnych stadiach zaawansowania.

Guzy jajnika – podobnie jak inne guzy lite – mają niejednorodną budowę. Obok komórek nowotworowych i komórek zrębu są obecne fibroblasty oraz komórki śródbłonkowe, a także leukocyty. Te ostatnie, infiltrując tkankę guza, odgrywają znaczącą rolę w regulacji wzrostu, migracji komórek oraz w aktywacji angiogenezy i limfangiogenezy [4, 5]. Układ limfatyczny jest niezbędny do utrzymania homeostazy przestrzeni pozaustrojowej oraz odgrywa ważną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Naczynia limfatyczne biorą istotny i aktywny udział w patofizjologii stanów zapalnych oraz rozwoju nowotworów. Indukowana przez guz limfangiogeneza pozostawała przez długi okres w cieniu dobrze poznanych procesów angiogenezy nowotworów, głównie z powodu nieznanych specyficznych markerów pozwalających na odróżnienie śródbłonka naczyń limfatycznych od śródbłonka naczyń krwionośnych [4]. Mechanizmy molekularne regulujące limfangiogenezę są dotąd słabo poznane, chociaż wiadomo, że śródbłonkowe czynniki wzrostu naczyń (*vascular endothelial growth factor C* – VEGF-C i VEGF-D) stymulują wzrost endotelocytów i powstawanie nowych naczyń chłonnych [4, 6]. Odkrycie pierwszego czynnika limfangiogenego – VEGF-C – wykazało, jak ważną rolę odgrywają naczynia limfatyczne w rozwoju wielu nowotworów. Rozwój naczyń limfatycznych, a następnie zajęcie węzłów chłonnych przez komórki guza są jednymi z głównych etapów progresji nowotworu [6–8]. Badania nad rakiem piersi, szyjki macicy czy odbytnicy potwierdziły, że zwiększona liczba naczyń krwionośnych i limfatycznych w pierwotnej tkance nowotworowej jest czynnikiem prognostycznym i może decydować o wznowie choroby nowotworowej [4, 7].

Ostatnio zidentyfikowano wiele markerów specyficznych dla śródbłonka naczyń limfatycznych oraz opisano nowe modele badawcze wzrostu naczyń chłonnych [4, 5, 7]. Pojawiła się więc nadzieja na dokładniejsze po-

znanie procesów kierujących limfangiogenezą. Jednym z istotnych, niedawno poznanych markerów jest białko Prox-1. Jest to jądrowy czynnik transkrypcyjny, który odgrywa główną rolę w trakcie limfangiogenezy płodowej i wydaje się pożytecznym markerem w różnicowaniu komórek śródbłonka limfatycznego od innych komórek śródbłonków naczyń krwionośnych [9–11].

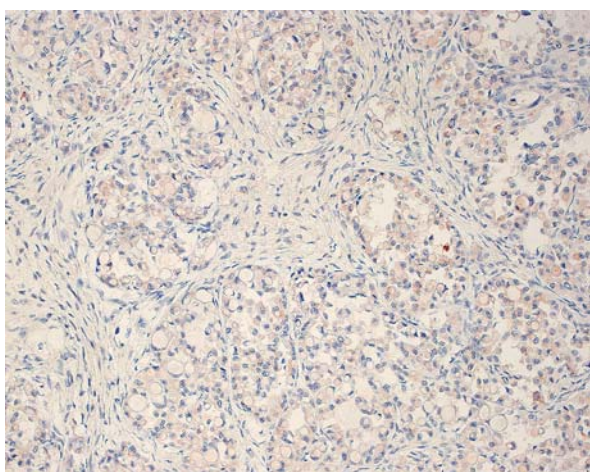
Cel pracy

Celem pracy była ocena ekspresji jądrowego czynnika transkrypcyjnego Prox-1 w materiale uzyskanym podczas operacji pacjentek z rakiem jajnika. Analiza immunohistochemiczna ekspresji Prox-1 pozwala na wyznaczenie lokalizacji określonych komórek w obrębie tkanek. Ekspresję markera oceniano w trzech typach histologicznych nowotworu oraz w różnych stopniach zaawansowania klinicznego i zróżnicowania histologicznego raka jajnika.

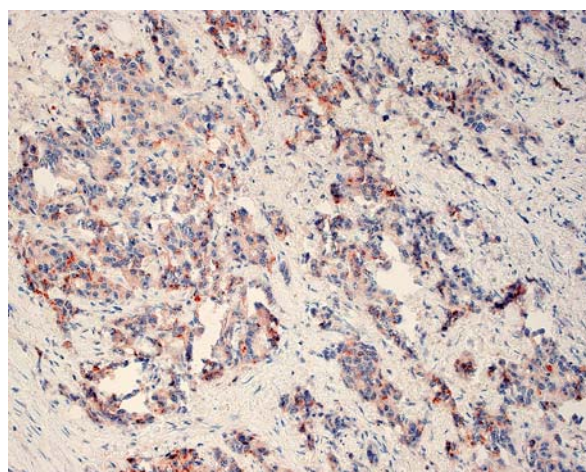
Materiał i metody

W doświadczeniu poddano analizie marker Prox-1 stanowiący białko specyficzne dla limfangiogenezy. Oceniano ekspresję Prox-1 w tkance guza metodą immunohistochemiczną u 65 kobiet operowanych w I Klinice Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie z powodu raka jajnika. Preparaty wykonano zgodnie z przepisami zawartymi w instrukcjach. Skrawki tkanek utrwalono formaldehydem i zatopiono w parafinie. Tak przygotowane do analizy związki zachowują właściwości antygenowe.

Średnia wieku operowanych pacjentek wynosiła 54,6 roku. Badano ekspresję w trzech typach histologicznych raka jajnika: surowiczym (31 pacjentek – 47,7%), śluzowym (23 pacjentki – 35,5%) i endometrialnym (11 pacjentek – 16,9%). Uwzględniano stopień



Ryc. 1. Rak jajnika typu śluzowego – słabo nasilona ekspresja Prox-1



Ryc. 2. Rak jajnika typu śluzowego – znacznie nasilona ekspresja Prox-1

Tab. I. Liczność i procent nasilenia ekspresji markera Prox-1 u pacjentek operowanych z powodu raka jajnika

Tabela liczności: nasilenie ekspresji Prox-1				
Klasa	liczba	skumulowana liczba	%	skumulowany %
0	14	14	21,53846	21,5385
1	39	53	60,00000	81,5385
2	12	65	18,46154	100,0000
braki	0	65	0,00000	100,0000

Tab. II. Liczność i procent typu histologicznego raka jajnika u operowanych pacjentek

Tabela liczności: typ histologiczny				
Klasa	liczba	skumulowana liczba	%	skumulowany %
surowiczny	31	31	47,69231	47,6923
endometrialny	11	42	16,92308	64,6154
śluzowy	23	65	35,38462	100,0000
braki	0	65	0,00000	100,0000

Tab. III. Liczność i procent stopnia zróżnicowania histologicznego operowanych guzów jajnika

Tabela liczności: zróżnicowanie histologiczne				
Klasa	liczba	skumulowana liczba	%	skumulowany %
G2	40	40	61,53846	61,5385
G1	8	48	12,30769	73,8462
G3	17	65	26,15385	100,0000
braki	0	65	0,00000	100,0000

zróżnicowania histologicznego – *grading* (G1, G2, G3) oraz stopień zaawansowania klinicznego (wg klasyfikacji FIGO). Stopień nasilenia ekspresji Prox-1 oceniano wg skali i stwierdzono brak ekspresji (0) w 14 przypadkach (2–3-stopniowej 5%), słabo nasiloną ekspresję (1) obserwowano w 39 guzach (60%), a znacznie nasiloną (2) w 12 przypadkach (18,5%). Słabo oraz znacznie nasiloną ekspresję białka Prox-1 w raku jajnika typu śluzowego przedstawiono na rycinach 1. i 2.

W tabelach I, II i III przedstawiono liczność i procent: nasilenia ekspresji Prox-1, rozpoznania histopatologicznego i stopnia zróżnicowania raka jajnika u 65 operowanych pacjentek.

Wyniki

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie, stosując test χ^2 . Ekspresję Prox-1 stwierdzono w 51 badanych

skrawkach raka jajnika. W badanej grupie analiza statystyczna związku nasilenia ekspresji Prox-1 z typem histopatologicznym raka jajnika nie wykazała istotnej zależności ($p = 0,12$). Podobnie nie stwierdzono zależności statystycznej nasilenia ekspresji Prox-1 ze stopniem zróżnicowania histologicznego ($p = 0,36$). Wyniki przedstawiono w tabelach IV i V. Dalsze badania uwzględniające większą grupę chorych, zakres zabiegu operacyjnego oraz inne wykładniki limfangiogenezy prawdopodobnie pozwolą na wykrycie innych zależności.

Dyskusja

Tworzenie naczyń układu limfatycznego wykazuje duże podobieństwo do procesu angiogenezy. Proces powstawania nowych naczyń krwionośnych często towarzyszy rozwijającym się naczyniom limfatycznym, jednakże stosunek jednych kapilar do drugich różni się w zależno-

Tab. IV. Analiza statystyczna związku nasilenia ekspresji Prox-1 z typem histopatologicznym raka jajnika

Typ histologiczny	Nasilenie ekspresji Prox-1			Analiza statystyczna
	0	1	2	
surowiczy	6 (19,4%)	21 (67,7%)	4 (12,9%)	$\chi^2 = 7,39$
śluzowy	7 (30,4%)	9 (39,2%)	7 (30,4%)	$p = 0,12$
endometrialny	1 (9,1%)	9 (81,8%)	1 (9,1%)	

Tab. V. Analiza statystyczna związku nasilenia ekspresji Prox-1 ze stopniem zróżnicowania histologicznego (G)

Stopień zróżnicowania histologicznego	Nasilenie ekspresji Prox-1			Analiza statystyczna
	0	1	2	
G1	3 (37,5%)	4 (50%)	1 (12,5%)	$\chi^2 = 4,38$
G2	10 (25%)	22 (55%)	8 (20%)	$p = 0,36$
G3	1 (5,9%)	13 (76,5%)	3 (17,6%)	

ści od rodzaju tkanki. Zależności pomiędzy naczyniami krwionośnymi i chłonnymi oraz ich skoordynowany rozwój sugerują, że pewne makrocząsteczki mogą kontrolować zarówno angiogenezę, jak i limfangiogenezę.

Istnieje wiele dowodów, które wskazują, że neoangiogeneza jest podstawowym warunkiem wzrostu nowotworów, a w jej proces zaangażowany jest cały zbiór substancji bioaktywnych [6, 12–14]. Substancje te regulują nie tylko przebieg angiogenezy, ale również limfangiogenezę, a niejednokrotnie samej tylko limfangiogenezę. Od dawna wiadomo, że przerzuty niektórych nowotworów odbywają się drogą naczyń limfatycznych. Ta progresja z lokalnie ograniczonej choroby do choroby obejmującej również węzły chłonne stanowi złą prognozę dla pacjenta [6–8, 15]. Proliferacja naczyń limfatycznych regulowana przez wiele czynników wzrostu pełniących kluczową funkcję w procesie limfangiogenezę stanowi zatem przedmiot zainteresowania licznych grup naukowców, poznanie mechanizmów jej przebiegu dałoby bowiem szansę na opracowanie metod leczniczych i być może profilaktycznych chorób nowotworowych.

Białka glikoproteinowe należące do rodziny śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF), określone jako VEGF-C i VEGF-D, są uważane za najważniejsze czynniki regulatorowe limfangiogenezę. Czynniki te są silnymi mitogenami śródbłonka limfatycznego oraz krwionośnego. Ponadto, VEGF-C powoduje wzrost przepuszczalności naczyń. Czynniki te są ligandami receptora VEGFR-3, którego ekspresja receptora jest ograniczona do śródbłonka *kietkujących* naczyń limfatycznych, a także do tworzących się w okresie embriogenezy naczyń krwionośnych. Receptory VEGF-C i VEGF-D zostały zidentyfikowane jako stymulatory limfatycznej proliferacji endotelialnej, działające poprzez aktywację receptora

3 VEGF (VEGFR-3), który funkcjonuje jako specyficzny receptor w dojrzałych tkankach i wykazuje silną ekspresję w obrębie komórek śródbłonka [6, 7, 13, 14, 16]. W wielu badaniach klinicznych wykazano korelację między ekspresją VEGF-C i VEGF-D w obrębie guza a przerzutami do węzłów chłonnych [14, 17, 18]. Nadekspresja VEGF-C i VEGF-D w komórkach raka płuc u myszy wskazuje na zwiększenie procesu limfangiogenezę i następujące przerzuty do węzłów chłonnych

Początkowe badania sugerowały, że VEGF-C i VEGF-D są jedynymi czynnikami regulującymi rozwój naczyń limfatycznych w guzach. Stwierdzono, że zwiększona ekspresja VEGF-C i VEGF-D stymuluje limfangiogenezę w nowotworach [6–8]. Późniejsze obserwacje dotyczące guzów nowotworowych, w których występowały przerzuty nowotworowe drogą naczyń limfatycznych, wykazały, że ekspresja VEGF-C i VEGF-D w tkance guza była wyraźnie zmniejszona, co sugerowało udział innych czynników wzrostu w procesie limfangiogenezę. Wśród nich wymienia się m.in. VEGF-A, ponieważ może on pośrednio indukować proces powstawania naczyń limfatycznych poprzez rekrutację i aktywację komórek wykazujących ekspresję receptora VEGFR-1 szczególnie monocytów, makrofagów i neutrofilów [13]. Komórki te są zdolne do produkcji limfangiogenych czynników VEGF-C i VEGF-D. Podobnie do VEGF-A, pośrednim induktorem jest również FGF-2, który działa poprzez szlak VEGF-C/-D i receptor VEGFR-3. Najnowsze badania wykazały, że może on również stymulować bezpośrednio wzrost komórek śródbłonka limfatycznego *in vitro*. Przydatność VEGF jako markera w identyfikowaniu naczyń limfatycznych w nowotworowych złośliwych jest jednak coraz częściej podważana [8, 14].

Tworzenie naczyń w guzach jajnika jest uzależnione od działania VEGF. Czynniki wzrostu naczyń śródbłonka

wzmaga przepuszczalność naczyń, co jest znamiennej właściwością naczyń nowotworowych. Wpływa na migrację endoteliocytów, a to wiąże się z powstawaniem przerzutów. Ze względu na swoje unikalne cechy cytokina ta stanowi potencjalne białko docelowe do diagnozowania i terapii nowotworów narządu płciowego. Wiele prac dokumentuje nadekspresję VEGF w guzach jajnika, co ma znaczenie kliniczne w prognozowaniu i dostosowywaniu odpowiedniej terapii [6]. Ocena wolnego VEGF (sVEGF) w surowicy pacjentek chorych na raka jajnika może być ponadto klinicznie przydatna do określenia tempa wzrostu guza, nawrotów i powstawania przerzutów.

Obecnie szacuje się, że odmienną ekspresję w nabłonku limfatycznym i krwionośnym wykazuje blisko 300 genów [8]. Pod koniec lat 90. XX w. wykryto jeden z najczęściej wykorzystywanych markerów śródbłonka limfatycznego – LYVE-1 [7, 8, 19]. Jest on homologiem białka CD44, które bierze udział w procesie migracji do węzłów chłonnych komórek układu immunologicznego, a także komórek nowotworowych.

Wśród istotnych markerów limfangiogenezy wymienia się także jądrowy czynnik transkrypcyjny Prox-1. Jest on najwcześniejszym markerem limfatycznym w trakcie rozwoju płodowego [9]. Ponadto, przypuszcza się, iż jest on krytycznym genem programującym fenotyp limfatyczny [20, 21]. Pomimo że jest niezbędny do wzrostu naczyń limfatycznych i jego ekspresja ma głównie miejsce w ich śródbłonku, występuje także w innych rodzajach komórek i tkanek, włączając w to hepatocyty, komórki mięśnia sercowego, komórki trzustki, neurocyty oraz tkanki soczewki [22, 23]. Podkreśla się możliwość hamowania działania proteiny Prox-1 poprzez specyficzne przeciwciała anti-Prox-1, jednakże obecnie ich zastosowanie jest bardzo ograniczone; trwają nad nim badania [8]. Wraz z innymi markerami limfangiogenezy białko Prox-1 może stanowić istotny wskaźnik postępu procesu nowotworowego. Publikacje opisujące ekspresję tego markera są mało znane i brak jest danych w literaturze odnośnie do korelacji między różnymi markerami limfangiogenezy. Badania wydają się jednakże bardzo obiecujące i powinny dostarczyć istotnych informacji do zrozumienia mechanizmów działania wzrostu naczyń limfatycznych i ich roli w rozwoju procesu neoplastycznego.

W przedstawionych badaniach podjęto próbę oceny korelacji pomiędzy ekspresją czynnika Prox-1 a niektórymi cechami fenotypowymi raka jajnika. Pacjentki podzielono ze względu na typ histologiczny występującego u nich guza jajnika, a w kolejnym zestawieniu ze względu na stopień zróżnicowania histologicznego raka jajnika. Nie uzyskano jednak zależności statystycznej pomiędzy porównywanymi grupami.

Uznany markerem limfoangiogenezy jest podopłanina, która jest przezbłonową glikoproteiną produkowaną przez śródbłonek naczyń limfatycznych [3]. Mimo jej

niejasnej funkcji stwierdzono, że myszy z defektem genu podopłaniny wykazują letalne zaburzenia układu limfatycznego. Udowodniono, że defekt ten nie wpływał jednak na prawidłowe funkcjonowanie układu krwionośnego. Ocena ekspresji podopłaniny, specyficznego markera śródbłonek naczyń limfatycznych może być przydatna do oceny limfangiogenezy i świadczyć o złośliwości guza [13, 24]. Zahamowanie tego procesu może zatrzymać jego rozprzestrzenianie do naczyń limfatycznych. Mechanizmy regulujące ekspresję podopłaniny nie zostały jednak dotąd w pełni poznane.

Najnowsze doniesienia zwracają uwagę na receptory kinaz tyrozynowych EphB2 i EphB4 oraz ich ligandy – efryny, które są regulatorami odpowiedzialnymi za przestrzenne rozmieszczenie naczyń [8, 15]. Stwierdzono, że delecja genu efryny prowadzi do nieprawidłowego rozwoju naczyń limfatycznych, a w konsekwencji do ich dysfunkcji. W raku jajnika zwiększona ekspresja receptorów efryny korelowała z krótszym przeżyciem i bardziej agresywnymi postaciami nowotworu.

Do markerów procesu limfangiogenezy należy także neuropilina 2 (Nrp2), która, działając na zasadzie koreceptora, wiąże się z czynnikiem VEGF-C. Zwiększona ekspresja Nrp2 jest związana z gorszym rokowaniem w przypadku raka płuc. Badania markerów wysoce specyficznych dla śródbłonek naczyń limfatycznych umożliwiają identyfikację i ilościową ocenę naczyń limfatycznych w przebiegu złośliwego procesu nowotworowego [25].

W celu oceny zaawansowania procesu nowotworowego, skuteczności zastosowanego leczenia oraz wyboru dalszego sposobu postępowania należałoby jednocześnie ocenić najważniejsze markery limfangiogenezy, takie jak czynniki wzrostu VEGF-C, VEGF-D, Prox-1, podopłanina, LYVE-1 i inne. Ich wzajemne korelacje mogą bowiem stanowić podstawę właściwej decyzji terapeutycznej. Oprócz odgrywania roli diagnostycznej mogą one w przyszłości stanowić punkt docelowy nowoczesnych metod terapeutycznych opierających się na wytworzeniu specyficznych dla danego markera przeciwciał.

Praca sfinansowana ze środków budżetowych na naukę; grant KBN NN407172434.

Piśmiennictwo

1. Prat J, Ribé A, Gallardo A. Hereditary ovarian cancer. *Hum Pathol* 2005; 36: 861-70.
2. Junor EJ, Hole DJ, Gillis CR. Management of ovarian cancer: referral to a multidisciplinary team matters. *Br J Cancer* 1994; 70: 363-70.
3. Decruze SB, Kirwan JM. Ovarian cancer. *Current Obst Gynaecol* 2006; 16: 161-7.
4. Priebe A, Buckanovich R. Ovarian tumor vasculature as a source of biomarkers for diagnosis and therapy. *Expert Rev Obstet Gynecol* 2008; 3: 65-72.
5. Sundar SS, Zhang H, Brown P, et al. Role of lymphangiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2006; 94: 1650-7.
6. Wissmann C, Detmar M. Pathways targeting tumor lymphangiogenesis. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6865-8.

7. Shayan R, Achen MG, Stacker SA. Lymphatic vessels in cancer metastasis: bridging the gaps. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1729-38.
8. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Onkology* 2005; 69 Suppl 3: 4-10.
9. Schacht V, Ramirez MJ, Hong YK, et al. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J* 2003; 22: 3546-56.
10. Petrova TV, Mäkinen T, Mäkelä TP, et al. Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *EMBO J* 2002; 21: 4593-9.
11. Wilting J, Papoutsis M, Christ B, et al. The transcription factor Prox-1 is a marker for lymphatic endothelial cells in normal and diseased human tissues. *FASEB J* 2002; 16: 1271-3.
12. Gombos Z, Xu X, Chu CS, et al. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early-stage squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8364-71.
13. Nadja ET, Detmar M. Tumor and lymph node lymphangiogenesis – impact on cancer metastasis. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 691-6.
14. Donoghue JF, Lederman FL, Susil BJ, Rogers PA. Lymphangiogenesis of normal endometrium and endometrial adenocarcinoma. *Hum Reprod* 2007; 22: 1705-13.
15. Joory KD, Levick JR, Mortimer PS, Bates DO. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in normal human tissues. *Lymphat Res Biol* 2006; 4: 73-82.
16. Hsieh CY, Chen CA, Chou CH, et al. Overexpression of Her-2/NEU in epithelial ovarian carcinoma induces vascular endothelial growth factor C by activating NF-kappa B: implications for malignant ascites formation and tumor lymphangiogenesis. *J Biomed Sci* 2004; 11: 249-59.
17. Ueda M, Hung YC, Terai Y, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression and invasive phenotype in ovarian carcinomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3225-32.
18. Nisato RE, Tille JC, Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Thromb Haemost* 2003; 90: 591-7.
19. Sundar SS, Zhang H, Brown P, et al. Role of lymphangiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2006; Jun 5; 94: 1650-7.
20. Wigle JT, Harvey N, Detmar M, et al. An essential role for Prox-1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J* 2002; 21: 1505-13.
21. Hong YK, Harvey N, Noh YH, et al. Prox-1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn* 2002; 225: 351-7.
22. Van der Auwera I, Cao Y, Tille JC, et al. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumors. *Br J Cancer* 2006; 95: 1611-25.
23. Del Rio-Tsonis K, Tomarev SI, Tsonis PA. Regulation of Prox-1 during lens regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 2039-45.
24. Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, et al. Up-regulation of lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *AM J Pathol* 2005; 116: 913-21.
25. Bednarek W, Wertel I, Kotarski J. Limfangiogeneza w guzach nowotworowych. *Ginekolog* 2008; 79: 625-9.