

# Limfoangiogeneza w guzach nowotworowych

## Lymphangiogenesis in cancerous tumours

Bednarek Wiesława, Wertel Iwona, Kotarski Jan

Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

### Streszczenie

*Układ limfatyczny jest niezbędny do utrzymania homeostazy płynu tkankowego oraz odgrywa ważną rolę w regulacji funkcji układu immunologicznego. Naczynia limfatyczne mają istotny i aktywny udział w patofizjologii stanów zapalnych oraz rozwoju nowotworów.*

*Mechanizmy molekularne regulujące limfangiogenezę pozostają jak dotąd słabo poznane chociaż wiadomo, że śródbłonkowe czynniki wzrostu naczyń (VEGF-C i VEGF-D) stymulują wzrost endoteliocytów i powstawanie nowych naczyń chłonnych. W ostatnich latach zidentyfikowano szereg markerów specyficznych dla śródbłonka naczyń limfatycznych oraz opisano nowe modele badawcze wzrostu naczyń chłonnych.*

*Artykuł przedstawia poglądy dotyczące regulacji limfangiogenezy w guzach nowotworowych.*

Słowa kluczowe: **rak jajnika / VEGF / limfoangiogeneza / układ limfatyczny / markery /**

### Summary

*The lymphatic vasculature is essential for the maintenance of fluid homeostasis, immune surveillance and fat absorption. A role of the lymphatic vessels in the development of human diseases, such as inflammation and tumorigenesis, has proven to be both essential and active.*

*The molecular mechanisms of lymphangiogenesis are not clear, but vascular endothelial growth factors (VEGF-C and VEGF-D) within tumours may simulate endothelial cells within tumour tissues to grow and generate new lymphatics. Recently, several markers specific for lymphatic endothelium and models for lymphatic vascular research have been characterized and many critical regulators of lymphatic vessel growth have been identified.*

*This review focuses on the mechanisms of lymphangiogenesis in general, and especially on the role of lymphatic vessels in ovarian cancer*

Key words: **ovarian cancer / VEGF / lymphangiogenesis / markers /**

### Adres do korespondencji:

Wiesława Bednarek  
Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii UM w Lublinie  
20-081 Lublin, ul. Staszica 16  
tel. 081 532 78 47  
e-mail: ginonkol@am.lublin.pl

Otrzymano: 12.07.2008  
Zaakceptowano do druku: 25.08.2008

## Wstęp

Nowotwory jajnika podobnie jak i inne guzy lite mają niejednorodną budowę. Obok komórek nowotworowych i komórek zrębu obecne są fibroblasty oraz komórki śródbłonkowe a także leukocyty [1, 2, 3]. Te ostatnie infiltrując tkankę guza odgrywają znaczącą rolę w regulacji wzrostu, migracji komórek oraz w aktywacji angiogenezy i limfangiogenezy [4]. Indukowana przez guz limfangiogeneza pozostawała przez wiele lat w cieniu dobrze poznanych procesów angiogenezy nowotworowej. Główną przyczyną był brak odpowiednich specyficznych markerów pozwalających na odróżnienie śródbłonka naczyń limfatycznych od śródbłonka naczyń krwionośnych [3, 4].

Odkrycie pierwszego czynnika limfangiogenego VEGF-C wykazało jak ważną rolę odgrywają naczynia limfatyczne w rozwoju szeregu nowotworów [5]. Rozwój naczyń limfatycznych a następnie zajęcie węzłów chłonnych przez komórki guza jest jednym z głównych etapów progresji nowotworu. Badania nad rakiem piersi, szyjki macicy czy odbyticy potwierdziły, że zwiększona liczba naczyń krwionośnych i limfatycznych w pierwotnej tkance nowotworowej jest czynnikiem prognostycznym i może decydować o wznowie choroby nowotworowej [6, 7, 8]. Pomimo znacznego postępu w ocenie limfangiogenezy nowotworowej mechanizm powstawania nowych naczyń limfatycznych w tkance guza pozostaje nadal stosunkowo mało poznany w porównaniu z dokładniej opisaną rolą neoangiogenezy.

## Budowa i funkcjonowanie układu limfatycznego

Układ limfatyczny składa się z cienkościennych naczyń, węzłów chłonnych, narządów zbudowanych z tkanki limfoidalnej jak śledziona i grasica oraz krążących limfocytów. Współdziałając z układem krwionośnym odgrywa istotną rolę w perfuzji tkanek i reabsorpcji płynu międzykomórkowego [9]. Układ chłonny reguluje objętość plazmy zapobiegając wzrostowi ciśnienia śródtkankowego oraz odgrywa kluczową rolę w funkcjonowaniu systemu odpornościowego. Naczynia limfatyczne stanowią złożoną sieć otwartych kapilar zbierających limfę występującą w narządach i tkankach [10]. Różnią się one od naczyń krwionośnych pod względem funkcjonalnym i strukturalnym. Zbudowane są z pojedynczej warstwy endotelocytów. Komórki te są bardzo cienkie z wyjątkiem okolicy jądra komórkowego, która wyraźnie wybrzusza się do światła naczynia. Dodatkowo nie wykazują typowych dla naczyń krwionośnych fenestracji. Warstwa podstawna jest słabo rozwinięta lub nie występuje. Nieobecne są również perycyty. Światło włosowatych naczyń limfatycznych jest trzykrotnie większe niż światło naczyń krwionośnych włosowatych [11].

Śródbłonek naczyń limfatycznych charakteryzuje się zwiększoną przepuszczalnością wynikającą z ograniczonej liczby połączeń międzykomórkowych. Kapilary limfatyczne zakotwiczone są w macierzy zewnątrzkomórkowej dzięki pośrednim filamentom kolagenowym [12]. Włókienka wzmacniają ściany naczyń i zapobiegają ich zapadaniu. Pod wpływem zwiększonego ciśnienia włókna kolagenowe ulegają skróceniu, co otwiera światło naczyń. Kiedy światło kapilary rozszerza się, komórki śródbłonkowe rozsuwają się powodując

otwarcie kanałów międzykomórkowych i umożliwiają wniknięcie płynu pozakomórkowego oraz zawartych w nim makrocząsteczek. Dzięki temu naczynia limfatyczne pozostają drożne nawet w obszarach o podwyższonym ciśnieniu hydrostatycznym. Umożliwia to kontrolę przepuszczalności śródbłonka limfatycznego i powstawanie limfy. W zależności od miejsca występowania naczynia limfatyczne mogą różnić się budową.

W tkankach naczynia chłonne określane są jako kapilary absorbujące, które wychwytyują płyn z przestrzeni międzykomórkowej. Transport limfy odbywa się wyłącznie w kierunku naczyń określanych jako naczynia zbierające. Naczynia limfatyczne zbierające, otoczone są cienką warstwą zewnątrzkomórkową oraz perycytami, co ogranicza przesącz zwrotny chłonki. Przepływ limfy pomiędzy naczyniami absorbującymi i zbierającymi odbywa się naczyniami pośrednimi o charakterystycznym nieregularnym i krętym przebiegu [13].

Tworzenie naczyń układu limfatycznego wykazuje duże podobieństwo do procesu angiogenezy. W odpowiedzi na działanie molekularnych mediatorów angiogenych komórki śródbłonka zaczynają się dzielić. Następnie migrują w kierunku miejsca gdzie dochodzi do degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej, w wyniku czego uwalniane są czynniki stymulujące tworzenie nowych naczyń [14]. Komórki śródbłonkowe zaczynają formować struktury kapilarne.

Do rozwoju sieci naczyń limfatycznych niezbędna jest przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej oraz zmniejszenie nasilenia apoptozy komórek endotelialnych w miejscu powstawania nowych naczyń. Proces powstawania naczyń krwionośnych często towarzyszy rozwijającym się naczyniom limfatycznym, jednakże wzajemny stosunek kapilar limfatycznych i krwionośnych jest różny w zależności od rodzaju tkanki. Bogata i dobrze rozwinięta sieć naczyń krwionośnych umożliwia dostarczanie niezbędnych składników odżywczych także naczyniom limfatycznym, co jest istotne dla ich prawidłowego funkcjonowania i możliwości regeneracyjnych [15]. Zależności pomiędzy naczyniami chłonnymi i krwionośnymi oraz ich skoordynowany rozwój sugeruje, że pewne makrocząsteczki mogą kontrolować zarówno angiogenezę jak i limfangiogenezę [16].

## Limfangiogenne czynniki wzrostu

Rozwój naczyń chłonnych regulowany jest przez wiele aktywnych związków. Niektóre glikoproteiny należące do rodziny śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) określone jako VEGF-C i VEGF-D uważane są za najważniejsze regulatory limfangiogenezy [5].

Czynniki te są silnymi mitogenami śródbłonka limfatycznego oraz krwionośnego, ponadto VEGF-C powoduje wzrost przepuszczalności naczyń. Czynniki te są ligandami receptora VEGFR-3. Ekspresja tego receptora ograniczona jest do śródbłonka „kiełkujących” naczyń limfatycznych a także występujących w okresie embriogenezy w tworzeniu się naczyń krwionośnych [17]. Przydatność tego markera w identyfikowaniu naczyń limfatycznych w nowotworach złośliwych jest jednak coraz częściej podważana [18].

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 [19, 20, 21]. Późniejsze obserwacje dotyczące guzów nowotworowych, w których występowały przerzuty drogą naczyń limfatycznych, wykazały, że ekspresja VEGF-C i VEGF-D w tkance guza była wyraźnie zmniejszona, co sugerowało udział innych czynników wzrostu biorących udział w procesie limfangiogenezy. Wśród nich wymienia się między innymi VEGF-A, ponieważ może on pośrednio indukować proces powstawania naczyń limfatycznych poprzez rekrutację i aktywację komórek układu immunologicznego, szczególnie monocytów, makrofagów i neutrofilów wykazujących ekspresję receptora VEGFR-1 [22]. Komórki te są zdolne do produkcji limfangiogennych czynników VEGF-C i VEGF-D. Podobnie do VEGF-A, pośrednim induktorem jest również FGF-2, który także działa poprzez szlak VEGF-C/-D i receptor VEGFR-3 [23]. Najnowsze badania wykazały, że może on również stymulować bezpośrednio wzrost komórek śródbłonka limfatycznego *in vitro* [24].

### Markery naczyń limfatycznych

Badania markerów wysoce specyficznych dla śródbłonek naczyń limfatycznych umożliwiają identyfikację i ilościową ocenę naczyń limfatycznych w guzach nowotworowych.

Pomimo wielu podobieństw nabłonek limfatyczny różni się od nabłonka naczyń krwionośnych. Odnotowano różnice ekspresji ok. 300 genów w nabłonku limfatycznym i krwionośnym [37, 38]. Pod koniec lat 90 wykryto jeden z najczęściej wykorzystywanych markerów śródbłonek limfatycznych LYVE-1 [25, 26, 27]. Jest on homologiem białka CD44, które bierze udział w procesie migracji komórek układu immunologicznego a także komórek nowotworowych do węzłów chłonnych [26].

Uznany marker limfangiogenezy jest podoplanina, która jest przezbłonową glikoproteiną produkowaną przez śródbłonek naczyń limfatycznych [28]. Jej funkcja pozostaje nie do końca wyjaśniona. Stwierdzono, że myszy z defektem genu podoplaniny wykazują zaburzenia letalne układu limfatycznego. Jednocześnie defekt ten nie wpływał na prawidłowe funkcjonowanie układu krwionośnego [29]. Wykazano, że we wczesnych etapach rozwoju embrionalnego w procesie polaryzacji nabłonka limfatycznego i krwionośnego ważnym czynnikiem regulacyjnym jest czynnik transkrypcyjny Prox-1 [30, 31].

Najnowsze doniesienia zwracają uwagę na receptory kinaz tyrozynowych EphB2 i EphB4 oraz ich ligandy – efryny, które są regulatorami odpowiedzialnymi za przestrzenne rozmieszczenie naczyń limfatycznych [32]. Stwierdzono, że delecja genu efryny prowadzi do nieprawidłowego rozwoju naczyń limfatycznych a w konsekwencji do ich dysfunkcji [33]. W raku jajnika podwyższona ekspresja receptorów efryny korelowała z krótszym okresem przeżycia i bardziej agresywnymi postaciami nowotworu [34, 35].

Do markerów limfoangiogenezy należy także neuropilina-2 (Nrp2), która działając na zasadzie koreceptora wiąże się z czynnikiem VEGF-C. Podwyższona ekspresja Nrp2 była związana z gorszym rokowaniem w przypadkach raka płuc [36].

### Rola naczyń limfatycznych w patogenezie i progresji choroby nowotworowej

Jednym z kluczowych etapów rozwoju choroby nowotworowej pozwalającej na niekontrolowaną proliferację komórek, inwazję i powstawanie przerzutów odległych jest rozwój sieci naczyń krwionośnych [39]. Procesom angiogenym może towarzyszyć intensywny rozwój naczyń chłonnych na drodze limfangiogenezy [40]. Rozsiew komórek nowotworowych widoczny jest w badaniu histologicznym jako rozrost guza poza określony obszar graniczny pomiędzy tkanką nowotworową i zdrową. Procesowi temu towarzyszy rozrost miejscowych naczyń limfatycznych. W większości przypadków mikroprzerzuty poprzedzają wcześniej rozpoznanie guza. W chwili zdiagnozowania takiej zmiany widoczne są już przerzuty do odległych narządów i do węzłów chłonnych [41]. Obecność przerzutów w węzłach chłonnych jest istotnym czynnikiem prognostycznym dla większości nowotworów.

Mechanizmy związane z zajęciem poszczególnych węzłów chłonnych przez komórki nowotworowe jak dotąd nie zostały dokładnie poznane. Początkowo uważano, że inwazja odbywa się w sposób pasywny, niezależny od komórek nowotworowych z chwilą gdy wzrastająca część guza „przejdzie” przez ścianę napotkanego naczynia limfatycznego. (Rycina. 1A).

Najnowsze doniesienia wskazują, że migracja komórek nowotworowych do naczyń limfatycznych związana jest z bardzo złożonymi interakcjami pomiędzy komórkami nowotworowymi a śródbłonkiem naczyń limfatycznych [38, 41]. (Rycina 1B).

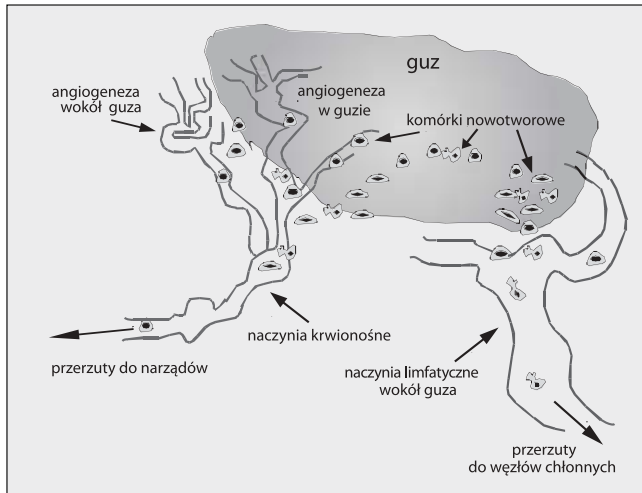
Badania immunohistochemiczne wykorzystujące markery specyficzne dla śródbłonek limfatycznych wykazały obecność proliferujących naczyń limfatycznych wewnątrz guzów nowotworowych choć ich udział w procesach rozrostowych pozostaje nadal kontrowersyjny. Sugeruje się, że naczynia te nie są zdolne do transportu komórek nowotworowych, gdyż podwyższone ciśnienie hydrostatyczne wewnątrz guza mogłoby je zniszczyć [41, 42].

Naczynia limfatyczne występujące bezpośrednio wokół zmiany nowotworowej są prawdopodobnie „zaadaptowanymi” naczyniami limfatycznymi przez rozrastający się guz [43]. Co ciekawe, zaobserwowano, że komórki śródbłonek takich „zaadaptowanych” naczyń również ulegają proliferacji, co może sugerować, że powstały one na drodze limfangiogenezy nowotworowej [38].

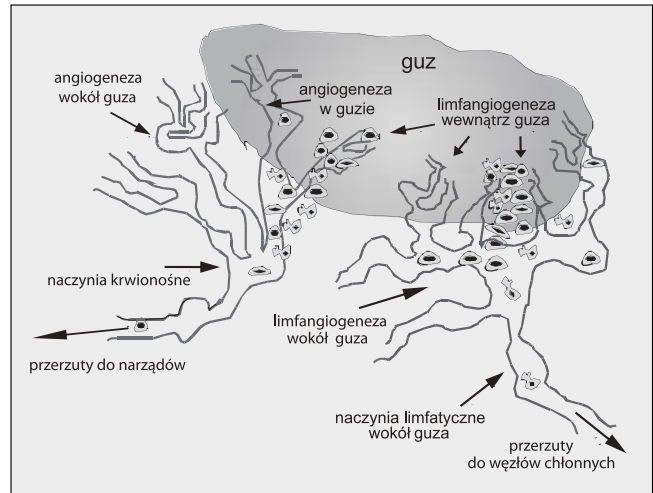
Na podstawie dotychczasowych doniesień trudno jest jednoznacznie stwierdzić jaką rolę odgrywa limfangiogeneza w powstawaniu przerzutów w raku jajnika. Badania przeprowadzone na raku piersi czy szyjki macicy udowodniły, że inwazja naczyń limfatycznych do tkanki guza jest negatywnym czynnikiem prognostycznym. Może także towarzyszyć zajęciu węzłów chłonnych i progresji choroby co wpływa na 5-letnie przeżycie a w przypadku raka jąder decyduje o wyborze terapii [6, 7, 43].

Gęstość naczyń limfatycznych wewnątrz guza określane jako LVD (*Lymphatic Vessel Density*) może być niezależnym wskaźnikiem prognostycznym w takich przypadkach nowotworów jak: czerniak, rak piersi, *endometrium*, odbytnicy, płuc, prostaty, trzustki [19, 20, 21, 41, 42].

Bednarek W, et al.



**Rycina 1A.** Klasyczny model rozszewienia komórek nowotworowych drogą naczyń krwionośnych i naczyń limfatycznych występujących wokół zmiany nowotworowej.



**Rycina 1B.** Schemat aktywnej limfangiogenezy biorącej udział w procesach przerzutowych nowotworu.

Szereg badań wskazuje na związek między podwyższonymi wartościami LVD a obecnością przerzutów do węzłów chłonnych i w konsekwencji gorszą prognozą [35, 43]. Co ciekawe, przeciwstawne wyniki otrzymano w przypadku czerniaka gdzie stwierdzono, że zwiększona gęstość naczyń limfatycznych wokół i wewnątrz guza związana była z lepszym rokowaniem [45]. Zasugerowano, że zwiększone LVD prawdopodobnie może świadczyć o lepszej odpowiedzi immunologicznej organizmu na proces nowotworowy. Równie sprzeczne wyniki dotyczące roli limfangiogenezy w procesie nowotworowym dotyczą raka sutka. Poza jednym doniesieniem [27], nie wykryto naczyń limfatycznych wewnątrz guza a jedynie w podścielisku otaczającym guz [46, 47]. Autorzy sugerują, że może to świadczyć o istnieniu różnic w lokalnym stężeniu stymulatorów i inhibitorów limfangiogenezy. Brak korelacji między gęstością naczyń limfatycznych i krwionośnych w guzach nowotworowych prawdopodobnie świadczy o odmienności mechanizmów regulujących ich rozwój [48].

Zróznicowane obserwacje dotyczą również udziału limfangiogenezy w raku jajnika. Wyniki przedstawione przez Sundara i wsp. [49] wskazują na zależność pomiędzy gęstością naczyń limfatycznych w guzie złośliwym jajnika a długością czasu wolnego od wznowy i przeżyciem pacjentek. We wcześniejszych badaniach Birnera i wsp. [50] jednak takich zależności nie stwierdzono.

Różnice wyników badań mogą wynikać z użycia różnych przeciwciał do identyfikacji markerów naczyń limfatycznych. Ponadto Sundar i wsp. [49] podczas oceny gęstości LVD nie wyodrębnili w swojej analizie naczyń występujących wewnątrz i wokół guza tłumacząc się faktem, że rak często nacieka całą torebkę jajnika.

Wydaje się zatem istotne i uzasadnione określanie całkowitej gęstości naczyń limfatycznych oraz naczyń wewnątrz guza. Badacze zasugerowali, że w przypadku raka jajnika rozwój naczyń limfatycznych nie ma znaczenia prognostycznego. Mimo braku jednoznacznych dowodów na udział naczyń limfatycznych w rozwoju raka jajnika, część badaczy potwierdza,

że podwyższona ekspresja czynnika limfangiogenego VEGF-C koreluje ze złym rokowaniem, stopniem zaawansowania klinicznego choroby oraz przerzutami do węzłów chłonnych [51].

Dalsze badania nad limfangiogenezą w nowotworach złośliwych w tym w raku jajnika oraz weryfikacja istniejących dotąd sprzecznych danych jest konieczna w celu wyjaśnienia roli naczyń limfatycznych w progresji nowotworu. Zrozumienie mechanizmów molekularnych kontrolujących ten proces pozwoli na identyfikację nowych celów terapeutycznych umożliwiających zahamowanie rozszewienia nowotworowego.

## Piśmiennictwo

1. Landis S, Murray T, Bolden S, [et al.]. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin.* 1999, 49, 8-31.
2. Bast R Jr, Brewer M, Zou C, [et al.]. Prevention and early detection of ovarian cancer: mission impossible? *Recent Results Cancer Res.* 2007, 174, 91-100.
3. Katabuchi H, Okamura H. Cell biology of human ovarian surface epithelial cells and ovarian carcinogenesis. *Med Electron Microsc.* 2003, 36, 74-86.
4. Bednarek W. Markers and modulators of angiogenesis in ovarian cancer. *Ginekol Pol.* 2007, 78, 754-763.
5. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, [et al.]. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 1996, 15, 1751.
6. Tezuka K, Onoda N, Takashima T, [et al.]. Prognostic significance of lymphovascular invasion diagnosed by lymphatic endothelium immunostaining in breast cancer patients. *Oncol Rep.* 2007, 17, 997-1003.
7. Morice P, Piovesan P, Rey A, [et al.]. Prognostic value of lymphovascular space invasion determined with hematoxylin-eosin staining in early stage cervical carcinoma: results of a multivariate analysis. *Ann Oncol.* 2003, 14, 1511-1517.
8. Yan G, Zhou X, Cai S, [et al.]. Lymphangiogenic and angiogenic microvessel density in human primary sporadic colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2008, 14, 101-107.
9. Witte M, Jones K, Wilting J [et al.]. Structure function relationships in the lymphatic system and implications for cancer biology. *Cancer Metastasis Rev.* 2006, 25, 159-184.
10. Zawieja D. Lymphatic biology and the microcirculation: past, present and future. *Microcirculation.* 2005, 12, 141-150.

## Limfoangiogeneza w guzach nowotworowych.

11. Duenne A, Werner J. Functional anatomy of lymphatic vessels under the aspect of tumor invasion. *Recent Results Cancer Res.* 2000, 157, 82-89.
12. Gashev A, Zawieja D. Physiology of human lymphatic contractility: a historical perspective. *Lymphology.* 2001, 34, 124-134.
13. Olszewski W. Contractility patterns of normal and pathologically changed human lymphatics. *Ann N Y Acad Sci.* 2002, 979, 52-63.
14. Takahashi M, Yoshimoto T, Kubo H. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis. *Int J Hematol.* 2004, 80, 29-34.
15. Saharinen P, Tammela T, Karkkainen M, [et al.]. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol.* 2004, 25, 387-395.
16. Stacker S, Baldwin M, Achen M. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J.* 2002, 16, 922-934.
17. Partanen T, Paavonen K. Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. *Microsc Res Tech.* 2001, 55, 108-121.
18. Veikkola T, Jussila L, Makinen T, [et al.]. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 2001, 20, 1223-1231.
19. Rossiochacka-Rostalska B, Gisterek I, Suder E, [et al.]. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) and vascular endothelial growth factor-D (VEGF-D) in ovarian carcinomas. *Ginekol Pol.* 2006, 77, 830-839.
20. Schoppmann S, Fenzl A, Nagy K, [et al.]. VEGF-C expressing tumor-associated macrophages in lymph node positive breast cancer: impact on lymphangiogenesis and survival. *Surgery.* 2006, 139, 839-846.
21. Skobe M, Hawighorst T, Jackson D, [et al.]. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med.* 2001, 7, 192-198.
22. Whitehurst B, Flister M, Bagaitkar J, [et al.]. Anti-VEGF-A therapy reduces lymphatic vessel density and expression of VEGFR-3 in an orthotopic breast tumor model. *Int J Cancer.* 2007, 121, 2181-2191.
23. Cao R, Eriksson A, Kubo H, [et al.]. Comparative evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. *Circ Res.* 2004, 94, 664-670.
24. Chang L, Garcia-Cardena G, Farnebo F, [et al.]. Dose-dependent response of FGF-2 for lymphangiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, 101, 11658-11663.
25. Jackson D. Biology of the lymphatic marker LYVE-1 and applications in research into lymphatic trafficking and lymphangiogenesis. *APMIS.* 2004, 112, 526-538.
26. Banerji S, Ni J, Wang S, [et al.]. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol.* 1999, 144, 789-801.
27. Bono P, Wasenius V, Heikkila P, [et al.]. High LYVE-1-positive lymphatic vessel numbers are associated with poor outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004, 10, 7144-7149.
28. Matsui K, Breitender-Geleff S, Soleiman A, [et al.]. Podoplanin, a novel 43-kDa membrane protein, controls the shape of podocytes. *Nephrol Dial Transplant.* 1999, 14, Suppl 1, 9-11.
29. Schacht V, Ramirez M, Hong Y, [et al.]. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J.* 2003, 22, 3546-3556.
30. Hong Y, Harvey N, Noh Y, [et al.]. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn.* 2002, 225, 351-357.
31. Wigle J, Harvey N, Detmar M, [et al.]. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J.* 2002, 21, 1505-1513.
32. Foo S, Turner C, Adams S, [et al.]. Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell.* 2006, 124, 161-173.
33. Guo H, Miao H, Gerber L, [et al.]. Disruption of EphA2 receptor tyrosine kinase leads to increased susceptibility to carcinogenesis in mouse skin. *Cancer Res.* 2006, 66, 7050-7058.
34. Han L, Dong Z, Qiao Y, [et al.]. The clinical significance of EphA2 and Ephrin A-1 in epithelial ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol.* 2005, 99, 278-286.
35. Herath N, Spanevello M, Sabesan S, [et al.]. Over-expression of Eph and ephrin genes in advanced ovarian cancer: ephrin gene expression correlates with shortened survival. *BMC Cancer.* 2006, 6, 144.
36. Kawakami T, Tokunaga T, Hatanaka H, [et al.]. Neuropilin 1 and neuropilin 2 co-expression is significantly correlated with increased vascularity and poor prognosis in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer.* 2002, 95, 2196-2201.
37. Hirakawa S, Hong Y, Harvey N, [et al.]. Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Am J Pathol.* 2003, 162, 575-586.
38. Tammela T, Petrova T, Alitalo K. Molecular lymphangiogenesis: new players. *Trends Cell Biol.* 2005, 15, 434-441.
39. Folkman J, Kalluri R. Cancer without disease. *Nature.* 2004, 427, 787.
40. Schoppmann S, Horvat R, Birner P. Lymphatic vessels and lymphangiogenesis in female cancer: mechanisms, clinical impact and possible implications for anti-lymphangiogenic therapies. *Oncol Rep.* 2002, 9, 455-460.
41. Alitalo K, Tammela T, Petrova T. V Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature.* 2005, 438, 946-953.
42. Pepper M, Tille J, Nisato R, [et al.]. Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cell Tissue Res.* 2003, 314, 167-177.
43. Warde P, Gospodarowicz M, Banerjee D, [et al.]. Prognostic factors for relapse in stage I testicular seminoma treated with surveillance. *J Urol.* 1997, 157, 1705-1710.
44. Beasley N, Prevo R, Banerji S, [et al.]. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res.* 2002, 62, 1315-1320.
45. Straume O, Akslen L. Independent prognostic impact of lymphatic vessel density and presence of low-grade lymphangiogenesis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res.* 2003, 9, 250-256.
46. Williams C, Leek R, Robson A, [et al.]. Absence of lymphangiogenesis and intratumoural lymph vessels in human metastatic breast cancer. *J Pathol.* 2003, 200, 195-206.
47. Vleugel M, Bos R, van der Groep P, [et al.]. Lack of lymphangiogenesis during breast carcinogenesis. *J Clin Pathol.* 2004, 57, 746-751.
48. Schoppmann S, Bayer G, Aumayr K, Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Ann Surg.* 2004, 240, 306-312.
49. Sundar S, Zhang H, Brown P, [et al.]. Role of lymphangiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer.* 2006, 94, 1650-1657.
50. Birner P, Schindl M, Obermair A, [et al.]. Lymphatic microvessel density in epithelial ovarian cancer: its impact on prognosis. *Anticancer Res.* 2000, 20, 2981-2985.
51. Ueda M, Hung Y, Terai Y, [et al.]. Vascular endothelial growth factor-C expression and invasive phenotype in ovarian carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2005, 11, 3225-3232.