

Wartość oznaczania wybranych cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów w surowicy chorych na raka szyjki macicy

The value of the cytokins and the solubility of theirs receptors in the serum of the patients with the cervical cancer

Rusiecka Małgorzata¹, Sedlaczek Paweł², Rusiecki Lesław³, Stępień Marcin¹, Harłodzińska-Szmyrka Antonina², Kornafel Jan¹

¹ Katedra Onkologii i Klinika Onkologii Ginekologicznej Akademii Medycznej we Wrocławiu

² Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej Akademii Medycznej we Wrocławiu

³ Katedra i Zakład Patofizjologii Akademii Medycznej we Wrocławiu

Streszczenie

Badaniem objęto 146 kobiety z rozpoznany inwazyjnym rakiem szyjki macicy w czterech stadiach klinicznych, leczonych w Katedrze Onkologii i Klinice Onkologii Ginekologicznej w latach 2001-2002.

Jego celem było prześledzenie związku pomiędzy stężeniem czynników prozapalnych i proangiogennych – VEGF, sTNF-R1, IL-6 w surowicy krwi chorych przed rozpoczęciem leczenia, a stadium klinicznym raka szyjki macicy i wczesnym efektem terapii.

Wykazano zależność zmienną statystycznie między stężeniem badanych parametrów w surowicy krwi chorych a stadium klinicznym nowotworu dla wszystkich badanych parametrów. Istotna statystycznie była także zależność pomiędzy przedterapeutycznym stężeniem IL-6 oraz sTNF-R1 a wczesnym efektem terapii. Dla przeprowadzonego badania VEGF nie stanowił niezależnego czynnika prognostycznego, a najmocniejszy związek z procesem terapii wystąpił w odniesieniu do IL-6.

Słowa kluczowe: **nowotwory szyjki macicy / markery nowotworowe biologiczne / cytokiny / interleukina 6 / czynnik alfa martwicy nowotworu /**

Abstract

The study encompassed 146 women with recognized invasive cervical cancer in 4 clinical stages. Patients underwent therapy in Oncologic Gynaecology Department of Wrocław Medical University in 2001 and 2002 years.

The correlation between pretreatment serum level of proangiogenic and inflammation factors – VEGF, sTNF-R1, IL-6 and clinical stage or early effects of therapy were observed. The strong and statistically significant relationship between pretreatment serum level of IL-6 and sTNF-R1 and clinical stage with early effect of treatment were found. The statistically significant correlation between serum level of all investigated parameters and clinical stage of cervix cancer was noticed.

VEGF wasn't an independent prognostic factor in the study, but the prognostic value of IL-6 was demonstrated.

Key words: **cytokines / interleukin 6 / tumor markers biological / uterine cervical neoplasms /**

Adres do korespondencji:

Małgorzata Rusiecka
Katedra Onkologii i Klinika Onkologii Ginekologicznej AM we Wrocławiu
53-413 Wrocław, Pl. Hirsfelda 11
e-mail: maru2007@tlen.pl

Otrzymano: 23.05.2007
Zaakceptowano do druku: 18.07.2007

Wstęp

Rak szyjki macicy

W makroregionie Dolnego Śląska jest trzecim pod względem zachorowalności nowotworem narządu rodnego i szóstym w populacji kobiet (po nowotworach piersi, płuca, jelita grubego, trzonu macicy oraz jajnika). Stanowi ok. 5,5% wszystkich nowotworów złośliwych u kobiet w tym rejonie, a pięć lat przeżywa zaledwie połowa chorych.

Od wielu lat nie udaje się w znaczący sposób zmniejszyć liczby zgonów z powodu raka szyjki macicy, choć ilość zachorowań na ten nowotwór maleje [4].

Cytokiny

Proces nowotworowy jest wynikiem złożonych, wielopoziomowych zaburzeń mechanizmów homeostazy na poziomie komórki, tkanki, narządu i całego ustroju.

Biorą w nim udział białka posiadające zdolność kaskadowego oddziaływania poprzez aktywny kompleks ze swoistym receptorem, noszące nazwę cytokin.

Najlepiej i najwcześniej poznany jest udział cytokin w odpowiedzi immunologicznej oraz w procesach krwiotworzenia. Cytokiny biorą również udział w regulacji namnażania się i kontroli funkcji fibroblastów, w procesach rozwoju naczyń krwionośnych, w metabolizmie i przebudowie kości, regulacji funkcji komórek glejowych i nerwowych oraz w regulacji cyklu owulacyjnego [10].

Badane cytokiny

W rzeczywistości szereg cytokin posiada wiele równoległych funkcji, a przykładem są procesy angiogenezy, w których obok naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) uczestniczą cytokiny prozapalne, takie jak IL-1 i IL-6 [15], czynniki martwicy nowotworów – TNF, które są także mediatorami reakcji zapalnej.

Interleukina 6

Charakteryzuje ją wielość oddziaływań: w odpowiedzi immunologicznej, reakcji zapalnej i krwiotworzeniu [18]. Produkowana jest przez monocyty, makrofagi, komórki śródbłonka, fibroblasty, a także limfocyty T i B oraz inne.

Ciekawe jest jej oddziaływanie na już pobudzone limfocyty B, co prowadzi do stymulacji produkcji immunoglobulin różnego typu. Wraz z IL-1 uczestniczy w aktywacji limfocytów T rozpoznających antygen oraz wpływa na ich różnicowanie w kierunku limfocytów T.

Współdziała z IL-3 w procesie krwiotworzenia: stymuluje proliferację i różnicowanie komórek macierzystych i komórek progenitorowych wielu szeregów a szczególnie różnicowanie megakariocytów oraz powstawanie kolonii granulocytów i makrofagów. Wraz z IL-1 oraz TNF alfa podnosi temperaturę ciała, wydaje się też stymulować wzrost keratynocytów i komórek nerwowych.

Obserwowano również jej produkcję przez komórki takich nowotworów, jak rak szyjki macicy i rak pęcherza moczowego, co indukowało wystąpienie zespołów paranowotworowych. Może również hamować proliferację niektórych komórek nowotworowych: raka sutka, szyjki macicy [21] a nawet niektórych białaczek [8].

Rak szyjki macicy charakteryzuje się długim okresem wzrostu loko-regionalnego, dlatego w wyższych stadiach klinicznych masa nowotworu osiąga znaczne rozmiary, a zaburzenia immunologiczne manifestują się najczęściej w fazie uogólnienia się procesu rozrostowego (stadium IVB wg FIGO) [17, 23, 24]. Natomiast od wczesnych stadiów klinicznych raka szyjki macicy obserwuje się nasilony, miejscowy odczyn zapalny, który w późnej fazie choroby przybiera nierzadko postać uogólnioną z wysoką leukocytozą i septycznym wykresem ciepłoty ciała. Celowe jest prześledzenie korelacji między stadiami klinicznymi raka szyjki macicy, odpowiedzią na leczenie oraz czynnikami prozapalnymi i proangiogennymi. [1, 11]

VEGF

Jednym z czynników regulacji angiogenezy jest naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor- Vascular permeability factor*) [19].

VEGF jest glikoproteiną wykazującą zdolność wiązania łańcucha heparyny, składającą się przynajmniej z 5 izoform oznaczonych jako VEGF 121, VEGF 165, VEGF 189 i VEGF 205. Piąta izoforma oraz jej rola w procesie angiogenezy nie są do końca zbadane. Liczby te odpowiadają ilości aminokwasów jaką dana izoforma zawiera [2]. Indukcja przenikalności zależna od VEGF wiąże się z przenikaniem poszczególnych izomerów białkowych do interstycjum, do którego następnie migrują komórki endothelium [20]. Receptor dla VEGF obecny na powyższych komórkach można podzielić na 3 podtypy: FLT-1, FLK-1/KDR oraz VEGFR-3/FLT-4. [7, 12].

Interakcja pomiędzy rodziną VEGF i jej receptorami inicjuje wiele procesów: angiogenezę naczyń chłonnych i włosowatych krwionośnych, aktywację enzymów na komórkach endothelium odpowiedzialnych za inwazję podścieliska [9], mitozę komórek śródbłonka i w konsekwencji tworzenie nowych naczyń w guzie i wokół niego na kilka różnych sposobów [3, 5]. Wiele nowotworów szyjki macicy manifestuje wysoki poziom VEGF, w tym rzadkie raki gruczołowe [6]. Jednak rola VEGF jako niezależnego czynnika prognostycznego w raku szyjki nie została jednoznacznie potwierdzona. [16, 23]

sTNF-R alfa

Istnieją podobne do siebie dwa czynniki: czynnik martwicy nowotworu, czyli kachektyna (inaczej TNF alfa) i limfotoksyna (TNF beta).

TNF alfa produkowany jest przez makrofagi i monocyty. Najsilniejszym bodźcem do jego produkcji są lipopolisacharydy – LPS – ścian bakteryjnych, zwane endotoksynami, co w ostrych stanach zapalnych może prowadzić do wstrząsu septycznego, a w stanach przewlekłych do kacheksji. TNF alfa wytwarzają również keratynocyty, neutrofile i komórki tuczne. W nowotworach TNF działa bezpośrednio na komórkę powodując jej cytolizę, hamując proliferację lub indukując jej różnicowanie [14, 22].

Na naczynia krwionośne nowotworu działa poprzez indukowanie w nich zmian oraz pobudza odpowiedź immunologiczną poprzez proliferację limfocytów T i B, proliferację i cytotoxiczność NK a także powstawanie LAK i limfocytów Tc. Oporność niektórych komórek nowotworowych na cytotoxiczne działanie TNF może się wiązać z ekspresją onkogenezu HER-2 neu przypominającego receptor dla EGF.

Wartość oznaczania wybranych cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów...

Niezależnie od zmian w śródbłonku naczyń nowotworu, może pobudzać angiogenezę [13]. Przyspiesza też odnowę hematologiczną po poddaniu organizmu działaniu promieniowania jonizującego, aktywuje osteoklasty, indukuje produkcję kolagenaz i proteaz, działa na OUN podnosząc temperaturę ciała.

Na komórkach występują 2 typy receptorów dla TNF: TNF RI – CD 120a – o masie 55 kDa, oraz TNF RII – CD 120b o masie 75 kDa. Każdy z 2 receptorów wiąże zarówno TNF alfa i beta.

Fibroblasty, limfocyty i komórki śródbłonka posiadają oba typy receptorów. Brak jest korelacji między ilością receptorów na komórce a jej odpowiedzią na TNF. W surowicy krwi człowieka obecne są rozpuszczalne, zewnątrzkomórkowe fragmenty receptorów, wiążące TNF. W małym stężeniu mogą wzmacniać działanie TNF na komórki, w dużym natomiast to działanie hamować.

Materiał i metoda

Badaniem objęto 166 kobiet:

- 146 chorych na inwazyjnego raka szyjki macicy w wieku od 31 do 80 lat, (średnia 53,12 o odchyleniu standardowym 11,04).
- 20 kobiet zdrowych stanowiących grupę kontrolną S w wieku od 30 do 76 lat, (średnia 49,7 o odchyleniu standardowym 14,10).

Wiek kobiet z grupy kontrolnej był adekwatny do badanej grupy, podobnie jak ich socjoekonomiczne warunki życia.

Rak szyjki macicy kwalifikowany był do IV stadiów zaawansowania klinicznego od IB-IVB wg kryteriów *International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO)*, skorelowanych z systemem TNM.

Stadium I obejmowało 37 przypadków (25,34%), zaś 43 chore (29,45%) zakwalifikowano do II stadium zaawansowania klinicznego. Do III i IV stadium – odpowiednio 59 (40,41%) oraz 7 (4,79%) przypadków w grupie badanej. (Tabela I).

Stopień zaawansowania klinicznego	Liczebność	%
I	37	25,34
II	43	29,45
III	59	40,41
IV	7	4,79

Budowę mikroskopową guza określano według kryteriów klasyfikacji *World Health Organisation (WHO)*.

Wśród badanych kobiet przeważał rak płaskonabłonkowy nierogowaczący, odnotowano jednak inne odmiany histologiczne guza (Tabela II).

Przed rozpoczęciem terapii onkologicznej pacjentkom pobierano 5ml. krwi z żyły łokciowej, następnie krew wirowano (przy 1200 x g), a otrzymaną surowicę zamrażano i przechowywano w temp. -20°C. Do oznaczeń poszczególnych protein używano metod immunoenzymatycznych z wykorzystaniem testów komercyjnych: Sweden, ELISA-kit, VEGF₁₆₅-R&D System, Quantikine, ELISA-kit, Human IL-6 Enzyme Immunoassay (ImmunoTech), oraz Biotech Broma-Sweden

Grupa	Wynik badania histopatologicznego	Liczność	%
A	<i>Ca planoepitheliale akeratodes</i>	52	37,14
C	<i>Ca planoepitheliale G-2 (akeratodes/keratodes)</i>	30	21,43
F	<i>Ca planoepitheliale</i> (bez określonej budowy)	24	17,14
B	<i>Ca planoepitheliale G-2 keratodes</i>	15	10,71
D	<i>Ca planoepitheliale G-3 (indifferentiatum/nondifferentiatum/maledifferentiatum)</i>	15	10,71
E	<i>Adenocarcinoma</i>	4	2,86

dla sTNF-R1. Powyższe oznaczenia wykonano w Katedrze i Zakładzie Immunologii Nowotworów AM we Wrocławiu.

Pacjentki leczone w latach 2001-2002 w Katedrze Onkologii i Klinice Ginekologii Onkologicznej AM we Wrocławiu kwalifikowano zgodnie z obowiązującymi zasadami postępowania z wykorzystaniem współcześnie dostępnych metod terapeutycznych:

- leczenie chirurgiczne (zabieg w modyfikacji Wertheim'a-Meigs'a),
- radykalna radioterapia – brachyterapia (selektronowa Cs-137 MDR/LDR) w połączeniu z teleterapią 2D lub 3D (megawoltową 4,6,9,18 MeV),
- radioterapia radykalna skojarzona z chemioterapią monolekową opartą na cisplatynie w ilości 40 mg/m², 1 x w tygodniu – 6 kursów,
- radiochemioterapia z następowym leczeniem chirurgicznym,
- radioterapia paliatywna.

Efekt terapii oceniano bezpośrednio po jej zakończeniu wg obowiązujących kryteriów: **CR, PR, SD, P**:

- całkowita remisja **CR**,
- częściowa remisja **PR**,
- stan stacjonarny **SD**,
- progresja **P**.

Dla badanych parametrów sporządzono krzywe ROC, ustalając poziomy odcięcia: VEGF – 500pg/l, TPS – 58U/l, sIL-2R alfa-1360

Analiza statystyczna

Dla wszystkich wykonywanych testów wykreślono krzywe ROC dla powyższego badania klinicznego, co przy relatywnie małej licznej grupie – 166 oznaczeń – implikowało wysokie poziomy odcięcia badanych substancji.

Do obliczeń statystycznych użyto nieparametrycznego testu U Mann'a-Whitney'a oraz test Kruskala-Wallisa.

Wyniki

Korelację ze stopniem zaawansowania klinicznego wykazały wszystkie parametry.

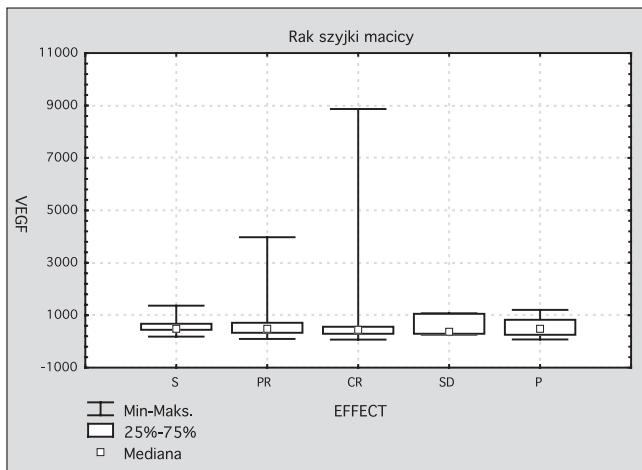
Niskie stopnie zaawansowania (I+II) vs wysokie (III+IV) wykazały następujące różnice w poziomach stężeń:

- VEGF (p=0,006063),**
- IL-6 (p=0,000029),**
- sTNF-RI (p=0,000076).**

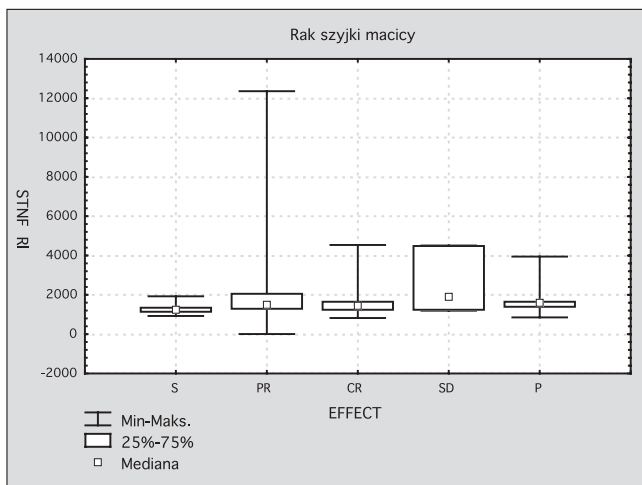
W porównaniach stopnia I vs III:

- VEGF (p=0,036715),**
- IL-6 (p=0,000069),**
- sTNF-RI (p=0,001246).**

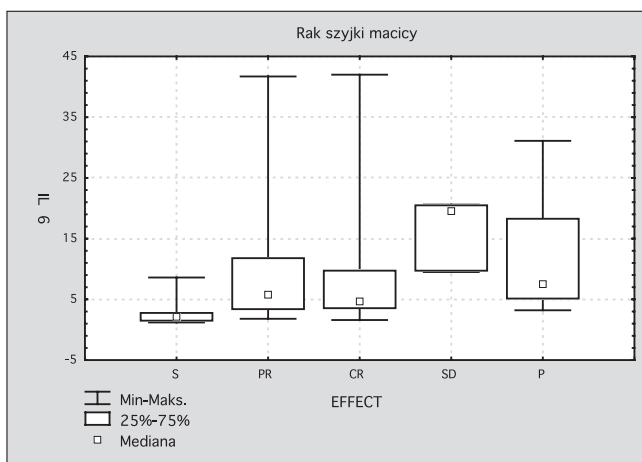
Rusiecka M, et al.



Rycina 1. Przedterapeutyczne stężenia VEGF w surowicy chorych na raka szyjki macicy a efekt terapii.



Rycina 2. Przedterapeutyczne stężenia sTNFR1 w surowicy chorych na raka szyjki macicy a efekt terapii.



Rycina 3. Przedterapeutyczne stężenia IL-6 w surowicy chorych na raka szyjki macicy a efekt terapii.

Dla II vs III:

**VEGF (p=0,021804),
IL-6 (p=0,001843),
sTNF-RI (p=0,008359).**

Jedynie poziom sTNF-RI wykazał różnice w grupach II vs IV (p=0,008949).

Różnice między stopniem I a IV zaobserwowano w poziomach sTNF-RI (p=0,002303).

W porównaniach z grupą kontrolną wykazano różnice istotne statystycznie dla IL-6 i sTNF-RI:

Dla stopnia I:

**IL-6 (p=0,000023),
sTNF-RI (p=0,121949)**

Dla stopnia II:

**IL-6 (p=0,000011),
sTNF-RI (p=0,044639)**

Dla stopnia III:

**IL-6 (p=0,000000),
sTNF-RI (p=0,000240),**

Dla stopnia IV:

**IL-6 (p=0,001947),
sTNF-RI (p=0,000739).**

Dla niskich stopni zaawansowania klinicznego (I+II):

**IL-6 (p=0,000002),
sTNF-RI (p=0,048956).**

Dla wysokich stopni zaawansowania klinicznego (III+IV):

**IL-6 (p=0,000000),
sTNF-RI (p=0,000076)**

Zaobserwowano różny poziom stężeń w grupach o odmiennych wczesnych efektach terapii.

(Rycina 1, 2, 3).

CR vs P: **IL-6 (p=0,046421).**

CR vs SD: **IL-6 (p=0,038665).**

W porównaniu grupy kontrolnej (S) z grupami utworzonymi ze względu na wczesny efekt terapii poziom IL-6 wykazał różnice istotne statystycznie (a niekiedy sTNF-RI).

CR vs S: **IL-6 (p=0,000001), sTNF-RI (p=0,012819).**

PR vs S: **IL-6 (p=0,000000), sTNF-RI (p=0,002379).**

SD vs S: **IL-6 (p=0,006173).**

P vs S: **IL-6 (p=0,000031), sTNF-RI (p=0,031810).**

Dyskusja

W raku trzonu i szyjki macicy szczególnie w wyższych stadiach klinicznych, dochodzi zarówno do rozsiewu komórek nowotworowych, ich namnażania i różnicowania, wzrasta znacząco liczba nowych naczyń, dochodzi do szeregu zmian w śródbłonku, co wiąże się ze wzrostem przepuszczalności, jak i do wystąpienia zespołów paranowotworowych.

Mogą wystąpić liczne przerzuty krwiopochodne, a nierzadko dochodzi do rozsiewu w jamie otrzewnej drogą jajowodową (np. w raku *endometrium*).

W zaawansowanych stadiach klinicznych, przy braku manifestacji rozsiewu szyjki macicy oznaczenie stężenia sTNF-R alfa może stanowić czynnik znaczący prognostycznie.

Dla 1 z wykonywanych 3 testów (VEGF), dla których wykreślono krzywe ROC dla powyższego badania klinicznego – relatywnie niska liczebność badanej grupy (166) implikowała wysokie poziomy odcięcia.

Wartość oznaczania wybranych cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów...

Wszystkie schematy terapeutyczne zawierające radioterapię wymagają uwzględnienia wczesnych i późnych odczynów popromiennych.

Mniej skomplikowane z punktu widzenia kliniki onkologicznej raka szyjki macicy wydaje się ocenianie przeżyć 2-, 3- lub 5-letnich, gdyż po upływie tego czasu wygasają odczyny popromienne, wyraźnie maleje częstość powikłań oraz praktycznie (po 5 latach), nie dochodzi do wznów nowotworu.

Mimo ścisłego powiązania ze sobą IL-6 i TNF w procesach immunologicznych, zapalnych oraz częściowo mielogenezycji i logicznie udokumentowanej roli VEGF w procesie waskularyzacji, rola powyższych czynników w raku szyjki macicy nie jest do końca jasna.

Obserwacja wzajemnych korelacji w zaawansowanym nowotworze budzi zastrzeżenia z uwagi na wielopoziomowe zaburzenia procesów immunologicznych wynikające z anemizacji, wyniszczenia, długotrwałej terapii przeciwbólowej, częstych transfuzji a nierzadko sterydoterapii umożliwiającej rozpoczęcie leczenia skojarzonego. Korzystne byłoby monitorowanie badanych cytokin na tle bardzo licznych zjawisk towarzyszących wzrostowi i rozpadowi nowotworu, które stanowią często mechanizm regulacji zwrotnej dodatniej i ujemnej.

Tylko systematycznie prowadzone badania, obserwacja zmiany parametrów w czasie trwania choroby i wybór odpowiedniej sekwencji ich oznaczania mogą dostarczyć informacji istotnych dla prognozy i terapii.

Z punktu widzenia kliniki raka szyjki macicy konieczne jest dalsze prowadzenie badań dotyczących wpływu badanych cytokin na apoptozę, wrażliwość na cytostatyki np. cisplatynę i towarzyszącą terapię trombocytopenię.

Wnioski

1. IL-6 a także sTNF-R alfa przydatne są zarówno jako czynniki diagnostyczne jak i prognostyczne w raku szyjki macicy.
2. VEGF nie stanowi niezależnego czynnika prognostycznego w badanej grupie chorych.
3. sTNF-R alfa może być przydatny jako czynnik diagnostyczny w wyższych stadiach klinicznych raka szyjki macicy.
4. IL-6 jest bardzo czułym wskaźnikiem skuteczności terapii w powyższym badaniu.

Piśmiennictwo

1. Achen M, Jeltsch M, Kukk E, [et al.]. Vascular endothelial growth factor D { VEGF-D} is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor-2 (Flk1) and VEGF receptor-3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998, 95, 548-553.
2. Berd D, Maguire H, Schuchter L, [et al.]. Autologous hapten-modified melanoma vaccine as postsurgical adjuvant treatment after resection of nodal metastases. *J Clin Oncol*. 1997, 15, 2359.
3. Bergers G, Benjamin L. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003, 3, 401-410.
4. Błaszczyk J, Pudelko M, Cisarz K. Nowotwory złośliwe w woj. Dolnośląskim w roku 2005. *Dolnośląski Rejestr Nowotworów*, Wrocław, 2007.
5. Burger R, Grosen E, Ioli G, [et al.]. Host-tumor in ovarian cancer: spontaneous release of tumor necrosis factor and interleukin-1 inhibitors by prified cells populations from human ovarian carcinoma in vitro. *Gynecol Oncol*. 1994, 55, 294.
6. De Falco S, Gigante B, Persico M. Structure and function of placental growth factor. *Trends Cardiovasc Med*. 2002, 12, 241-246.
7. Ferrara N, Gerber H, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003, 9, 669-676.
8. Gastl G, Plant M, Finstad C, [et al.]. High IL-6 levels in ascitic fluid correlat wit reactive thrombocytosis in patient with epithelial ovarian cancer. *Br J Haematol*. 1993, 83, 433.
9. Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial- pericite interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res*. 2003, 314, 15-23.
10. Hoskins W, Perez C, Young R. Principles and practice of Gynecologic Oncology, Lippincott Williams & Wilkins, 3th edition, 2000.
11. Karkkainen M, Haiko P, Sainio K, [et al.]. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol*. 2004, 5, 74-80.
12. Karkkainen M, Petrova T. Vascular endothelial growth factor receptors in thr regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene*. 2000, 19, 5598-5605.
13. Malik S, Griffin D, Fiers W, [et al.]. Paradoxical effects of tumor necrosis factor in experimental ovarian cancer. *Int J Cancer*. 1989, 44, 918.
14. Mituzani Y, Yoshida O. Overcoming tumor necrosis factor-alpha resistance of human renal and ovarian carcinoma cells by combination treatment with buthionine sulfoximine and tumor necrosis factor-alpha. Role of tumor necrosis factor-alpha mRNA downregulation in tumor cells sensitization. *Cancer*. 1994, 73, 730.
15. Motro B, Itin A, Sachs L, [et al.]. Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role of this cytokine in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990, 87, 3092.
16. Mutch D, Massad S, Kao M, [et al.]. Proliferate and antiproliferae effects of interferon-g and tumor necrosis factor-a on cell lines derived from cervical and ovarian malignancies. *Am J Obst Gynecol*. 1990, 163, 1920.
17. Padera T, Kadambi A, di Tomaso E, [et al.]. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science*. 2002, 296, 1883-1886.
18. Punnonen R, Tiesala K, Kuoppala T, [et al.]. Cytokine production profiles in the peritoneal fluids of patients with malignant or benign gynecologic tumors. *Cancer*. 1998, 83, 788.
19. Rissu W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997, 386, 671-674.
20. Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, [et al.]. Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Br J Cancer*. 1999, 80, 309-313.
21. Van Trappen P, Ryan A, Carroll M, [et al.]. A model for co-expression pattern analysis of genes implicated in angiogenesis and tumor cell invasion in cervical cancer. *BRJ Cancer*. 2002, 87, 537-544.
22. Watson J, Berek J, Martinez-Maza O. Growth inhibition of ovarian cancer cells induced by antisense IL-6 oligonucleotides. *Gynecol Oncol*. 1993, 49, 8.
23. Yokoyama Y, Charnock-Jones D, Licence D, [et al.]. Vascular endothelial growth factor ais an independent prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer*. 2003, 88, 237-244.
24. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, [et al.]. Wilde-type p53 induces apoptosis in myeloid leukaemic cellsthat is inhibited by interleukin-6. *Nature*. 1991, 352-345.