

Received: 2012.06.28  
Accepted: 2012.10.17  
Published: 2012.11.19

## Morfogeneza, budowa i właściwości naczyń limfatycznych\*

### Morphogenesis, structure and properties of lymphatic vessels

Anna Ratajska<sup>1</sup>, Ewa Jankowska-Steifer<sup>2</sup>, Elżbieta Czarnowska<sup>3</sup>,  
Aleksandra Flaht<sup>1</sup>, Dorota Radomska-Leśniewska<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Katedra i Zakład Patomorfologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego,

<sup>2</sup> Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego,

<sup>3</sup> Zakład Patologii Instytutu „Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie

#### Streszczenie

W pracy przedstawiono współczesne wyniki badań dotyczące budowy systemu naczyń chłonnych, sposobów powstawania naczyń podczas rozwoju osobniczego oraz w warunkach patologicznych, takich jak nowotworzenie, gojenie się ran i innych zmian chorobowych. Najważniejszą funkcją układu naczyń chłonnych jest zbieranie płynów, które przedostały się z układu krążenia do tkanek, przenikanie lipidów i witamin rozpuszczalnych w tłuszczach z przewodu pokarmowego i ich dalszy transport, udział w przemieszczaniu się antygenów, komórek dendrytycznych i limfocytów. Tą drogą następuje też przemieszczanie się komórek nowotworowych i komórek zapalenia do węzłów chłonnych. Prawidłowe limfatyczne naczynia kapilarne różnią się od włosowatych naczyń krwionośnych obecnością nieciągłej błony podstawnej, brakiem pericytów, nieregularnym ukształtowaniem światła naczynia z silnym zakotwiczeniem komórek śródbłonna za pomocą filamentów z fibryliny i emiliny do macierzy pozakomórkowej. Komórki śródbłonna naczyń limfatycznych wykazują ekspresję antygenów powierzchniowych: Lyve-1, podoplanina, VEGFR3 (Flk-4) oraz czynnika transkrypcyjnego Prox-1, a także cząsteczek, które są wspólne dla śródbłonna naczyń krwionośnych i limfatycznych (CD31, CD34, Flk-1, Tie-1, Tie-2, neuropilina 2). Powstawanie naczyń chłonnych podczas rozwoju osobniczego rozpoczyna się wytworzeniem wreczków limfatycznych odpączkowujących z systemu pierwotnych żył oraz/lub odbywa się przez dołączenie komórek o cechach limfangioblastów (lub komórek pochodzenia hematopoetycznego). Może także być wynikiem odróżnicowania się śródbłonnków żylnych w wyniku ich odszczepienia od systemu krążenia, migracji do miejsc docelowych i formowania światła naczyń chłonnych. Mechanizmy rządzące powstawaniem naczyń podczas rozwoju osobniczego oraz w stanach chorobowych, np. nowotworzenie, gojenie się ran i inne, są sterowane czynnikami wzrostu, z których dominującą rolę pełnią VEGF-C i VEGF-D, a także HGF, FGF, kwas retinowy, IL-3, IL-7. Wydaje się, że makrofagi oraz komórki o fenotypie CD45 biorą udział w powstawaniu naczyń limfatycznych. Udział makrofagów polega na wyzwalaniu czynników wzrostu podczas limfangiogenezy oraz/lub regulowaniu średnicy naczyń limfatycznych. W pracy omówiono najważniejsze choroby układu naczyń chłonnych, ich podłoże molekularne oraz nowotwory wywodzące się z naczyń limfatycznych.

**Słowa kluczowe:** naczynia limfatyczne • limfangiogeneza • Lyve-1 • Prox-1 • podoplanina • neuropilina 2 • angiopoetyny

\* Praca finansowana z projektu Narodowego Centrum Nauki (#2701/B/P01/2010/39).

## Summary

In this paper, we present literature results related to structure and various manners of lymphatic vessel formation during embryonic development and in pathological events, such as tumorigenesis, wound healing, and other diseases. The functions of the lymphatic system include the collection of fluids that enter tissues from the circulation, absorption of lipids and lipid-soluble vitamins from the intestine and their subsequent transport, participation in antigen, dendritic cell, and lymphocyte migration. The lymphatic system is also a route for tumor cell and inflammatory cell transport. Native lymphatic capillaries differ from blood capillaries by having an irregular lumen, a discontinuous basement membrane, absence of pericytes, and a strong anchorage of their endothelial cells to the extracellular matrix via microfibrils built of emilin and fibrillin. Lymphatic endothelial cells express surface antigens such as Lyve-1, podoplanin, VEGFR3 (Flk4) and transcription factor Prox-1, as well as molecules which are common for blood endothelial cells and lymphatic endothelial cells (CD31, CD34, Flk-1, Tie-1, Tie-2, neuropilin 2). Lymphatic vessel formation during embryonic development starts with the occurrence of lymphatic sacs sprouting from systemic jugular veins and/or by co-option of lymphangioblasts or hematopoietic-derived cells. It can also proceed by dedifferentiation of venous endothelial cells after their detachment from the venous system, migration to the target places within the body and assembly in the lymphatic lumen. Mechanisms of lymphatic vessel formation during embryonic development and in pathological conditions, such as tumorigenesis, wound healing, and metastasis, is regulated by a plethora of growth factors and molecules, among which the most important are VEGF-C, VEGF-D, HGF, FGF, retinoic acid, IL-3, and IL-7. Macrophages and cells bearing CD45 phenotype seem to take part in the formation of lymphatics. Macrophages might act as a source of growth factors and/or as modulators playing a role in vessel caliber regulation during lymphangiogenesis. We discuss the most important diseases of the lymphatic system, their molecular basis and tumors derived from lymphatic vessels.

**Key words:** lymphatic vessels • lymphangiogenesis • Lyve-1 • Prox-1 • Podoplanin • neuropilin-2 • angiopoietins

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1020753>

**Word count:** 4901

**Tables:** –

**Figures:** –

**References:** 102

**Adres autorki:** dr hab. med. Anna Ratajska, Katedra i Zakład Patomorfologii, Centrum Biostruktury, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. T. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa; e-mail: anna.ratajska@wum.edu.pl

**Wykaz skrótów:** **BEC** – komórka śródbłonna naczyń krwionośnych (blood endothelial cell); **CCBE1** – domeny EGF łączące kolagen i wapń (collagen and calcium binding EGF domains 1); **CLEVER-1** – receptor-1 wspólny dla śródbłonek naczyń krwionośnych i limfatycznych (common lymphatic endothelial and vascular endothelial receptor-1); **COUP-TFII** – czynnik transkrypcyjny II kontrolujący promotor ovalbuminy kurczęcia położony w górę ścieżki sygnałowej (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II); **CRSBP-1** – białko 1 wiążące sekwencję retencji powierzchni komórki (cell surface retention sequence [CRS] binding protein-1); **dpc** – *dies post copulatione* (days post coitus); **FGF** – czynnik wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor); **Foxc2** – czynnik transkrypcyjny z domeną forkhead (forkhead box transcription factor); **HARE** – receptor hialuronianu dla endocytozy (HA receptor for endocytosis, HA scavenger receptor on endothelial cells = stabilin-2); **HA** – kwas hialuronowy (hyaluronic acid); **HGF** – czynnik wzrostu hepatocytów (hepatocyte growth factor); **IL-3, IL-7** – interleukiny 3, 7; **LEC** – komórka śródbłonna naczyń limfatycznych (lymphatic endothelial cell); **Lyve-1** – receptor endocytozowy dla hialuronianu-1 (hyaluronic acid endocytic receptor); **MIP-3 $\alpha$**  – białko zapalne makrofagów-3 (macrophage inflammatory protein-3); **Nrp1, Nrp2** – neuropilina 1, 2; **NF- $\kappa$ B** – czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B; **PECAM-1** – cząsteczka adhezyjna płytkowo-śródbłonkowa (platelet endothelial cell adhesion molecule-1 = CD31); **PIGF** – łożyskowy czynnik wzrostu (placental growth factor); **Prox-1** – czynnik transkrypcyjny typu homeobox związany z Prospero-1 (prospero-related homeobox transcription factor 1);

**SLC** – wtórna chemokina tkanki limfatycznej (secondary lymphoid tissue chemokine);  
**Sox18** – czynnik transkrypcyjny box 18 regionu Y determinującego płeć (transcription factor sex-determining region Y box18); **TNF- $\alpha$**  i **TNF- $\beta$**  – czynnik martwicy nowotworów- $\alpha$ ,  $\beta$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\beta$ ); **VEGF-C**, **VEGF-D** – śródbłonkowy czynnik wzrostu C, D (vascular endothelial growth factor-C, -D); **VEGFR3** – receptor 3 dla śródbłonkowego czynnika wzrostu (vascular endothelial growth factor receptor 3).

## WPROWADZENIE

Krążenie płynów ustrojowych możliwe jest dzięki wzajemnie uzupełniającym się funkcjom układów: limfatycznego (chłonnego) i krwionośnego. Rola naczyń limfatycznych jest związana z wieloma procesami, takimi jak:

- reabsorpcja płynów oraz białek z przestrzeni śródmiąższowej do układu krążenia;
- transport antygenów, komórek dendrytycznych i limfocytów, które przedostały się z tkanek do ich światła. Dzięki temu w węzłach chłonnych dochodzi do prezentowania antygenów przez komórki dendrytyczne limfocytom T i B oraz zainicjowania pierwotnej odpowiedzi immunologicznej;
- absorpcja lipidów z jelita, a następnie transport długocząściuchowych triglicerydów oraz substancji lipofilnych, np. witaminy rozpuszczalne w tłuszczach, do krążenia wrotnego, a większych cząsteczek, np. chylomikrony i białka uwalniane przez enterocyty, do naczyń limfatycznych kosmków jelita cienkiego;
- utrzymywanie homeostazy kwasu hialuronowego (hyaluronic acid -HA), dużej cząsteczki macierzy pozakomórkowej, podlegającej stałemu obrotowi, tj. transportowi przez naczynia chłonne i degradacji w węzłach oraz poza układem limfatycznym;
- transport transformowanych komórek z ognisk nowotworzenia oraz rozprzestrzenianie się komórek z ognisk zapalenia.

Mimo znaczącej roli układu chłonnego w organizmie, przez długie lata z powodu braku swoistych metod uwidaczniania naczyń limfatycznych w tkankach, jego budowa i funkcje były znacznie mniej poznane niż budowa i funkcje systemu krwionośnego [17]. Ponadto, nieliczne obserwacje dostarczały ogólnych informacji o powstawaniu naczyń limfatycznych, ich fizjologii w życiu zarodkowym/płodowym, zjawiskach naprawczych oraz nowotworzeniu.

## BUDOWA I WYSTĘPOWANIE NACZYŃ LIMFATYCZNYCH

Układ krążenia perfunduje tkanki dostarczając składniki odżywcze i tlen oraz zabierając zbędne produkty metabolizmu komórkowego. Podczas krążenia krwi pewna ilość płynu z osocza przedostaje się do tkanek. Płyn ten trafia z powrotem do układu krążenia za pomocą systemu naczyń chłonnych. Ślepo zaczynające się naczynia limfatyczne włosowate obecne są we wszystkich tkankach żywego organizmu, z wyjątkiem centralnego układu nerwowego, szpiku kostnego i tkanek nieunaczynionych: chrząstka, rogówka i naskórek [4]. W narządach o budowie płatowej, np. wątroba, czy gruczoł mlekowy włosowate naczynia limfatyczne jedynie drenują ich części obwodowe. W mięśniach szkieletowych naczynia chłonne są ograniczone do obszaru powięzi. Większość płynu śródtkankowego (90%) zbierana przez limfatyczne kapilary terminalne jest transportowana

naczyniami zbiorczymi, a następnie pniami i przewodami limfatycznymi do tzw. kąta żylnego, czyli miejsca połączenia przewodu piersiowego z systemem żylnym (ujęście żyły szyjnej wewnętrznej do żyły podobojczykowej lewej) oraz prawego przewodu limfatycznego, uchodzącego do prawego kąta żylnego (tj. miejsca połączenia żyły szyjnej z żyłą podobojczykową prawą). Dodatkowe połączenia systemu limfatycznego z żylnym znajdują się w żyłach: nerkowej, wątrobowej i nadnerczowej oraz w innych umiejscowieniach obwodowych [1]. W ciągu doby wytwarza się około 2 l chłonki, która trafia do układu krążenia przez przewód piersiowy, powstały z połączenia naczyń chłonnych w jamie brzusznej. W czasie transportu przez naczynia limfatyczne chłonka jest filtrowana przez węzły chłonne. Obecnie w niej cząsteczki, które dostały się wraz z płynem śródmiąższowym, są rozpoznawane przez komórki prezentujące antygen. Wynaczone leukocyty aktywnie przedostają się do naczyń limfatycznych, skąd wraz z chłonką są transportowane do krwi [5]. Zarówno płyn śródtkankowy, jak i pośrednio krew są stosunkowo skutecznie filtrowane przez węzły chłonne. Obliczono, że w ciągu doby około 50% całkowitej ilości białek osocza przechodzi przez system limfatyczny.

Naczynia limfatyczne włosowate są cienkościenne, o średnicy większej niż naczynia krwionośne włosowate (tj. w granicach 10–60  $\mu\text{m}$ ). Dojrzałe włosowate naczynia chłonne są sfałdowane, zbudowane z pojedynczej warstwy komórek śródbłonka, którym nie towarzyszą pericyty. Naczynia chłonne nie mają błony podstawnej lub jest ona nieciągła [83]. Powierzchnia zewnętrzna komórek śródbłonka naczyń limfatycznych (LEC – lymphatic endothelial cell) jest zakotwiczona w otaczającej tkance łącznej za pomocą delikatnych filamentów o średnicy 60–80 Å. W ostatnich latach wykazano, że filamente te są zbudowane z emiliny i fibryliny [2,20]. „Zakotwiczanie” ściany naczynia limfatycznego do otaczającej tkanki łącznej ma duże znaczenie podczas zapalenia i obrzęku tkanek, bowiem naprężone filamente odsuwają od siebie komórki ściany naczynia, co pozwala na bierne otwieranie się połączeń międzykomórkowych i przepływ płynu do światła naczynia [2]. Komórki śródbłonka naczyń limfatycznych ząbnią się wzajemnie swymi wypustkami tworząc typowe połączenia międzykomórkowe: obwódki zamykające (łac. *zonula occludens*, ang. tight junction), obwódki zwierające (*zonula adherens*) i desmosomy (*macula adherens*). Niektórzy autorzy twierdzą jednak, że w naczyniach chłonnych nie występują obwódki zamykające [62]. Badania wykazały, że komórki śródbłonka naczyń limfatycznych mają kształt liści dębu. Wnikają w siebie i łączą się małymi i nieciągłymi połączeniami. Gradient ciśnienia może łatwo otwierać połączenia, dzięki czemu płyn śródtkankowy może szybko przenikać z przestrzeni pozakomórkowej do naczynia chłonnego [7,83]. Podczas powstawania nowych naczyń limfatycznych połączenia międzykomórkowe mają

charakter ciągły, co odróżnia je od połączeń dojrzałych, funkcjonujących naczyń [7]. W hodowli *in vitro* izolowane LEC ludzkiej skóry tworzą „liniowe”, dobrze odgraniczone połączenia międzykomórkowe zawierające cząsteczki adhezyjne CD31 (PECAM-1 – platelet endothelial cell adhesion molecule) i VE-kadherynę. Natomiast komórki śródbłonna naczyń krwionośnych (BEC – blood endothelial cell), mające na powierzchni te same cząsteczki, tworzą połączenia komórkowe określane jako: „pomarszczone” (ruffled) i „powcinane” (indented) [59]. Ultrastruktura połączeń komórek śródbłonna naczyń limfatycznych odpowiada połączeniom występującym między komórkami śródbłonna naczyń krwionośnych: a więc obecne są obwódki zamykające, połączenia zwierające i połączenia jonowo-metaboliczne (*nexus*, gap junctions). W komórkach włosowatych naczyń limfatycznych, podobnie jak w komórkach naczyń krwionośnych, są obecne kaweoole i ciała Weibela-Palade’a [59].

Naczynia limfatyczne włosowate nie mają właściwości kurczenia się. Przepływ chłonki jest w nich możliwy dzięki ruchom otaczających je mięśni szkieletowych, a także pulsacji otaczających tętnic oraz stymulacji wywoływanej ruchami oddechowymi.

Naczynia chłonne zbiorcze zawierają warstwę miocytów gładkich, błonę podstawną i zastawki. Mają zdolność kurczenia się, a obecne w nich zastawki zapobiegają ruchowi wsteczemu chłonki [5]. W naczyniach zbiorczych połączenia między komórkami śródbłonna mają charakter ciągły („zipper-like”-junctions) i są różnych typów: adherens junctions, tight junctions i gap junctions. Zarówno w naczyniach limfatycznych włosowatych, jak i w naczyniach zbiorczych występują białka połączeń międzykomórkowych: VE-kadheryna, zonulina, okludyna i klaudyna [4,83].

## LIMFANGIOGENEZA

### Powstawanie i rozwój naczyń limfatycznych podczas rozwoju zarodka/płodu

Około 100 lat temu Florence Sabin zaobserwowała, że układ limfatyczny powstaje z naczyń żylnych [78]. Obecnie wiadomo, że komórki śródbłonna naczyń chłonnych powstają przez odpączkowanie z żył zasadniczych przednich w miejscu ich połączenia z żyłami podobojczykowymi. Towarzyszy temu wytworzenie pierwotnych woreczków limfatycznych, zwanych szyjnymi woreczkami limfatycznymi. U człowieka pierwsze takie struktury pojawiają się w 6–7 tygodniu rozwoju, natomiast u myszy w 9,5–10 dobie życia zarodkowego. W późniejszych etapach rozwoju zarodkowego pojawiają się woreczki pochodzące z żył śródnercza (*mesonephros*), a zwłaszcza z żył grzbietowo-środkowej krawędzi śródnercza. Stąd komórki woreczków limfatycznych migrują dalej i w wyniku rozgałęziania się oraz proliferacji komórek śródbłonna powstaje pierwotny splot limfatyczny, który składa się z naczyń podobnych do kapilar [5,92]. Taki sposób powstawania naczyń chłonnych nosi nazwę pączkowania lub wzrostu odśrodkowego.

Inną koncepcją powstawania naczyń jest wzrost dośrodkowy, który polega na powstawaniu naczyń chłonnych, z niezależnych od żył, prekursorowych komórek mezenchymatycznych [44]. U ptaków wykazano podwójne

pochodzenie naczyń limfatycznych: z systemu głębokich żył oraz z rozrzuconych komórek prekursorowych mezodermy [96]. Stosując marker śródbłonna limfatycznego (Prox-1 – Prospero-related homeobox transcription factor 1) wykazano obecność komórek prekursorowych w miejscach pozaembrionalnych (mezoderma omocznia).

Trzecia teoria powstawania naczyń chłonnych opiera się na obserwacjach rozwoju osobniczego ryby *Danio* (zebrafish) i zakłada, że komórki śródbłonna limfatycznego głównego przewodu piersiowego powstają ze śródbłonek odległych żył przystrunowych (*parachordal veins*). W tym procesie odsznurowane komórki śródbłonna naczyń żylnych, po odróżnicowaniu w komórki mezenchymalne, migrują do obszarów limfangiogenezy i uczestniczą w tworzeniu naczyń chłonnych z jednoczesnym różnicowaniem się w śródbłonna naczyń limfatycznych [100]. Nie jest pewne, czy taki sposób powstawania naczyń chłonnych występuje także u ssaków, w tym u człowieka.

Ostatnie badania sugerują udział makrofagów w rozwoju naczyń limfatycznych. Jedne obserwacje wskazują, że makrofagi tkankowe wnikają do ściany naczyń i mogą się przekształcać w komórki śródbłonna [48]. Jednak inne, prowadzone z użyciem genetycznie zmodyfikowanych makrofagów, nie potwierdzają występowania takiego mechanizmu, wskazując raczej na rolę makrofagów w regulacji średnicy nowo powstających naczyń [32]. Ponadto wydaje się, że makrofagi przez łączenie wytwarzanych przez LEC wypustek biorą udział w organizacji przestrzennej formujących się naczyń chłonnych [27,48]. Jednocześnie wiadomo, że makrofagi tkankowe są źródłem czynników wzrostu i cytokin pobudzających rozwój naczyń chłonnych.

Regulacja różnicowania się komórek prekursorowych naczyń limfatycznych znajduje się pod kontrolą określonych czynników transkrypcyjnych. W czasie poprzedzającym formowanie się pierwszych woreczków limfatycznych populacja śródbłonek żył zasadniczych, predestynowanych do różnicowania się w naczynia chłonne, wykazuje ekspresję czynnika transkrypcyjnego Sox18 (transcription factor sex-determining region Y box18), pełniącego nadrzędną rolę w stosunku do Prox-1 [28]. Dalsze różnicowanie się i dojrzewanie naczyń limfatycznych znajduje się pod kontrolą czynników transkrypcyjnych: Prox1 i Foxc2 (Forkhead box transcription factor) [74].

Zaobserwowano również, że wiele cząstek, m.in. czynniki wzrostu VEGF-C i -D (vascular endothelial growth factor) [70], angiopoetyna 2 [6], ligand transbłonowy efryna B2 [64], białko receptorowe neuropilina 2 [101] oraz transbłonowa glikoproteina podoplanina [81] wpływają na różnicowanie się komórek.

Podczas rozwoju układu limfatycznego dochodzi do oddzielenia się powstających naczyń chłonnych od naczyń żylnych. Istotną rolę w tym procesie pełnią płytki krwi. Występujący na ich powierzchni receptor Clec-2 (C-type lectin-like receptor) jest aktywowany wiązaniem liganda – podoplaniny, błonowej glikoproteiny komórek śródbłonna naczyń limfatycznych. To uruchamia szlak przekazywania receptora, w którym kinaza tyrozynowa Syk fosforyluje białko adaptorowe SLP-76 prowadząc w dalszych etapach do agregacji płytek i tworzenia strefy izolacji pierwotnych naczyń limfatycznych [12,70,89].

Ostatnie badania powstawania systemu naczyń chłonnych z komórek macierzystych ciałek embrjonalnych (EB) zarodka myszy wykazały istnienie nowego szlaku regulacji limfangiogenezy z udziałem kwasu retinowego wraz z cAMP. Witamina ta dodana do podłoża inkubacyjnego, zawierającego komórki EB, powoduje wyodrębnianie się komórek oraz tubul o fenotypie CD31<sup>+</sup>/Lyve-1<sup>+</sup>/Prox-1<sup>+</sup>, charakterystycznym dla śródbłonka limfatycznego [66].

### **Powstawanie i rozwój naczyń limfatycznych u dorosłych podczas nowotworzenia oraz gojenia się ran**

Limfangiogeneza towarzyszy angiogenezie aktywowanej m.in. w przebiegu procesu nowotworowego oraz zapaleń i gojenia się ran. Powstawanie naczyń limfatycznych jest opóźnione względem rozwoju naczyń krwionośnych.

Obecnie wiadomo, że proces formowania naczyń limfatycznych podczas rozplemu nowotworowego może być aktywowany przez makrofagi tkankowe umiejscowione w pobliżu nowo powstałych naczyń. Makrofagi są źródłem czynników wzrostu oraz cytokin niezbędnych do stymulowania limfangiogenezy [19,82], podobnie jak podczas powstawania naczyń w okresie prenatalnym. Nadal jednak nie wiadomo, czy przerzuty nowotworów do węzłów chłonnych odbywają się przez formowanie i inwazję nowych naczyń limfatycznych w/i wokół guza, czy przez ekspansję i inwazję już istniejących naczyń na obwodzie guza. Jeśli limfangiogeneza w pierwotnych guzach jest przyczyną wczesnych przerzutów, wtedy jej wykrycie mogłoby być czynnikiem prognostycznym, wskazującym na wysokie ryzyko przerzutów i użytecznym kryterium do planowania dalszego leczenia radio- i chemioterapią.

Regulacja limfangiogenezy podczas rozplemu tkanki zapalnej, czy w procesie gojenia się ran odbywa się za pomocą tych samych czynników wzrostu, które są istotne w rozwoju osobniczym, tj. VEGF-C i VEGF-D, ligandów receptora VEGF-R3. Oba czynniki mają także powinowactwo do receptora naczyń limfatycznych – neuropiliny 2 (Np2), poprzez który dodatkowo stymulują limfangiogenezę. Oprócz rodziny śródbłonkowych czynników wzrostu za stymulację limfangiogenezy odpowiedzialne są: FGF2 (fibroblast growth factor), PDGF BB (platelet-related growth factor), HGF (hepatocyte growth factor) oraz interleukina 3 i 7. Cytokiny prozapalne stymulują proliferację naczyń limfatycznych poprzez aktywację mRNA dla VEGF-C, która zachodzi z udziałem czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B [16,53,98].

### **CZĄSTECZKI CHARAKTERYZUJĄCE FENOTYPY LEC**

Komórki śródbłonka naczyń krwionośnych i chłonnych w warunkach *in vitro* pod wpływem stymulacji czynnikami wzrostu lub interleukinami mogą się wzajemnie przekształcać. Dlatego nie dziwi, że niektóre markery są dla nich wspólne: CD31, CD34, podokaliksyna i czynnik von Willebranda. Na obu typach komórek – izolowanych ze skóry ludzkiej występują również receptory dla angiopotytn Tie-1 i Tie-2 [59].

Obecnie znamy wiele markerów ściany naczyń chłonnych, dzięki którym możliwe jest badanie tego systemu, a nawet odróżnienie naczyń limfatycznych od krwionośnych. Należą

do nich receptory, takie jak: VEGF-R3 [51], neuropilina 2 [101], „makrofagowy” receptor mannozowy, które odgrywają rolę w działaniu naczyń chłonnych. Receptor mannozowy 1 wraz z wspólnym receptorem-1 śródbłonków naczyń limfatycznych i krwionośnych (common lymphatic endothelial and vascular endothelial receptor-1, CLEVER-1) kontrolują transport limfocytów w naczyniach chłonnych [79]. Ponadto komórki śródbłonka naczyń limfatycznych charakteryzuje ekspresja czynnika transkrypcyjnego Prox1 [95] oraz obecność cząsteczek: LYVE-1 (receptor dla hialuronianu) [10,77] i podoplaniny [14,94]. Wiadomo jednak, że wszystkie markery komórek śródbłonka naczyń limfatycznych mogą się znajdować także w innych komórkach, nie są więc swoiste dla naczyń chłonnych.

W szczególnych przypadkach brak błony podstawnej w naczyniach limfatycznych oraz wiązanie przeciwciała dla kolagenu IV i lamininy błon podstawnych może służyć do ich odróżnienia od naczyń krwionośnych. Dostępne są również przeciwciała – B27 i mAbD znakujące naczynia limfatyczne, zwłaszcza gdy stosuje się je w skojarzeniu z przeciwciałami dla błony podstawnej charakterystycznej dla naczyń krwionośnych [80].

### **LYVE-1**

Cząsteczkę Lyve-1 opisano po raz pierwszy jako receptor kwasu hialuronowego (HA) wykazujący ekspresję na śródbłonkach naczyń chłonnych [10]. Marker ten występuje na obu powierzchniach komórek śródbłonka naczyń limfatycznych: skierowanej do światła naczynia i do tkanek [77,87], zarówno u dorosłych, jak i w zarodkach ludzi oraz różnych gatunków zwierząt [10,46,77]. Ekspresję LYVE-1 znaleziono także na powierzchni śródbłonka naczyń krwionośnych, m.in. pewnej populacji kapilar płuc [77], w naczyniach rosnącego zarodka i w naczyniach pęcherzyka żółtkowego [31] oraz w innych komórkach, np. na powierzchni niektórych makrofagów tkankowych i śródbłonka zatokowego wątroby [33,67].

Lyve-1 bardzo słabo wiąże HA *in vitro*, sugerując istnienie precyzyjnej regulacji tego łączenia *in vivo*. W świetle współczesnych badań hipoteza, że Lyve-1 jest głównym receptorem HA, biorącym udział w jego obróbce metabolicznej, nie została potwierdzona, ponieważ myszy pozbawione genów Lyve-1 wykazują prawidłowy poziom i metabolizm HA oraz niezaburzoną migrację komórek [29,42,49]. Obecnie trwają prace nad identyfikacją cytokin zapalnych lub innych czynników, które stymulują łączenie HA do LYVE-1 na komórkach naczyń chłonnych. Znany jest mechanizm modyfikacji tego receptora za pomocą przyłączania reszt sialinowych, co powoduje „wyciszenie” jego aktywności związanej z łączeniem HA [69].

Cząsteczka LYVE-1, wykazuje znaczny stopień homologii do cząsteczki powierzchniowej leukocytów – CD44, która również wiąże kwas hialuronowy. W hodowli LEC wykazano, że LYVE-1 wspomaga endocytozę HA, zależną od receptora, co sugeruje udział Lyve-1 w transcytozie tej makrocząsteczki [77]. Dawniej uważano, że Lyve-1 bierze udział w transporcie HA z otaczających tkanek do światła naczynia limfatycznego, tj. w poprzek komórek śródbłonka. Zakładano, że Lyve-1 przyczynia się do degradacji HA, w węzłach limfatycznych oraz tkankach poza układem limfatycznym, takich jak wątroba.

W naczyniach zatokowych węzłów chłonnych oraz naczyniach zatokowych wątroby i śledziony, gdzie umiejscowiony jest LYVE-1, występuje również inny receptor HA – oligomeryczny HARE (HA receptor for endocytosis, HA scavenger receptor on endothelial cells), zwany też stabiliną 2 [77,93]. Z porównania kinetyki i swoistości wobec liganda wynika, że HARE pełni rolę bardziej efektywnego receptora dla HA w porównaniu z Lyve-1. Ponadto HARE jest głównym receptorem HA zaangażowanym w degradację tego glikozaminoglikanu w węzłach chłonnych [77]. To, że LYVE-1 ulega koekspresji z HARE w zatokach wątroby i śledziony wskazuje na rolę LYVE-1 w metabolizmie HA w tych szczególnych narządach.

Inną, proponowaną na podstawie ostatnich badań, funkcją Lyve-1 jest pośredniczenie w przyleganiu leukocytów do powierzchni śródbłonka naczyń limfatycznych przez wiązanie HA obecnego na powierzchni tych komórek. Odbywa się to prawdopodobnie pośrednio, poprzez wiązanie HA do CD44 – receptora powierzchniowego leukocytów, który następnie „prezentuje” HA receptorowi Lyve-1 [9]. Lyve-1 działa w tym układzie jako koreceptor.

Niedawno opisano, że Lyve-1 jest identyczny z częścią CRSP-1 (cell surface retention sequence [CRS] binding protein-1) [43], tworzącą kompleksy z PDGFβR. Czynniki wzrostu, należące do rodziny PDGF: PDGFAA, PDGFBB, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, PIGF (placental growth factor) i niektóre cytokiny wykazujące obecność ugrupowania CRS, tak jak kwas hialuronowy, są ligandami Lyve-1. Pod wpływem łączenia liganda (zawierającego ugrupowanie CRS) do Lyve-1/CRSP-1, PDGFβR w kompleksie z CRSP-1 ulega fosforylacji rozpoczynając kaskadę sygnałową prowadzącą do rozsuwania się połączeń międzykomórkowych w naczyniach limfatycznych. Fosforylacja tyrozyny w PDGFβR, prowadzi w dół ścieżki sygnałowej receptora. Jego cytoplazmatyczna domena o aktywności kinazy tyrozynowej fosforyluje tyrozinę w cząsteczce VE-kadheryny oraz w cząsteczkach katenin (β-kateniny i p120 kateniny) wywołując wzajemną dysocjację tych białek i w konsekwencji odłączenie VE-kadheryny od cytoszkieletu aktynowego. Destabilizacja VE-kadheryny prowadzi do jej internalizacji. W ten sposób połączenia międzykomórkowe rozdzielają się rozsuwając komórki, co sprzyja zwiększonemu przechodzeniu płynu oraz komórek z przestrzeni śródtkankowej do wnętrza naczyń limfatycznych [41]. Część cząsteczki Lyve-1 ma zatem znaczący udział w regulacji przepuszczalności ściany naczyń chłonnych.

Podczas zapalenia toczącego się w tkankach, receptor Lyve-1 ulega internalizacji oraz degradacji w lizosomach [49]. Stymulatorami tego procesu są cytokiny prozapalne: TNF-α i TNF-β. Wydaje się, że proces ten nie ma związku z internalizacją HA i jego transportem przezkomórkowym. Stosując Lyve-1 jako marker w badaniu limfangiogenezy towarzyszącej, np. procesom nowotworowym należy pamiętać o możliwości jego degradacji w stanie zapalenia, który może towarzyszyć nowotworom.

Użycie LYVE-1 jako markera naczyń chłonnych nowotworów wykazało, że stymulowana indukcja limfangiogenezy w guzach rzeczywiście sprzyja tworzeniu przerzutów do węzłów limfatycznych.

Zastosowanie przeciwciał dla LYVE-1, VEGF-R3 oraz podoplaniny celem izolacji śródbłonka limfatycznego przyczyniło się znacznie do poznania biologii naczyń chłonnych w warunkach *in vitro* [37,59,65,76].

### Prox1

U myszy komórki śródbłonka wykazujące ekspresję Prox1 pojawiają się w 10 dobie życia zarodkowego w pobliżu żyły szyjnej, skąd migrują tworząc pierwsze odgałęzienia limfatyczne [95]. Z badań prowadzonych na modelach transgenicznych wynika, że myszy o genotypie *prox1<sup>+/-</sup>* giną w okresie perinatalnym, a delecja *prox1* prowadzi do braku naczyń limfatycznych. Komórki śródbłonka odgałęziają się od żyły zasadniczej, jednak nie wykazują ekspresji markerów limfatycznych i ich migracja zostaje zatrzymana. Natomiast nadekspresja *PROX1* w ludzkich komórkach śródbłonka naczyń krwionośnych hamuje ekspresję wielu genów związanych z tymi naczyniami i stymuluje transkrypty swoiste dla naczyń chłonnych [39,75]. Ekspresja Prox1 jest niezbędna zarówno do zróżnicowania komórek śródbłonka naczyń limfatycznych, jak i do utrzymania charakteru dojrzałych naczyń chłonnych [50]. Czynnikiem Prox1 jest odpowiedzialny również za proliferację i różnicowanie się innych typów komórek, np. nerwowych [34] czy progenitorowych siatkówki [23]. Bierze udział w migracji hepatocytów podczas rozwoju. W komórkach raka wątroby, które wykazują wysoką ekspresję Prox1, czynnik ten, paradoksalnie, hamuje różnicowanie i proliferację hepatocytów [84].

Do aktywacji Prox1 niezbędne są: Sox18 i receptor jądrowy Coup-TFII (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II) [28,85]. Prox1 bierze udział w indukcji ekspresji cykliny E1, która reguluje przejście komórki z fazy G1 do fazy S [99]. Dokładny mechanizm działania Prox1 nie został jeszcze poznany. Ciężar molekularny tej cząsteczki wynosi 83 kDa lub więcej (np. do 103 kDa), ponieważ Prox-1 zawiera wiele miejsc ulegających fosforylacji [57]. Fosforylacja może mieć znaczenie dla aktywacji ścieżki sygnałowej Prox-1.

Należy podkreślić, że delecja *prox-1* w komórkach śródbłonka częściowo rekapitułuje fenotyp otyłości, wskazując na zależność między nieprawidłowym wzrostem naczyń limfatycznych, osłabionym drenażem limfy i tkankową obecnością komórek tłuszczowych [35].

W regulacji ekspresji genu *PROX1* uczestniczy miRNA-181 (MIR181). U myszy Mir181a hamuje translację i powoduje degradację transkryptu. Wzajemna ekspresja Mir181a i Prox1 występuje w komórkach śródbłonka naczyń chłonnych i krwionośnych dorosłych oraz podczas rozwoju. Nadekspresja Mir181a w zarodkowych komórkach śródbłonka naczyń limfatycznych powoduje przeprogramowanie ich na fenotyp śródbłonka naczyń krwionośnych. Wyciszenie zaś Mir181a w śródbłonku naczyń krwionośnych powoduje wzrost poziomu mRNA dla Prox1 [58].

### Receptor VEGF-R3 i czynniki VEGF

Receptor VEGF-R3, znany także jako Flt4 (Fms-related tyrosine kinase 4) jest obecny wybiórczo na powierzchni komórek śródbłonka naczyń limfatycznych, choć ulega również ekspresji na powierzchni śródbłonka naczyń

krwionośnych, zwłaszcza niedojrzałych, nowo utworzonych. Produkt genu *VEGF-R3* po raz pierwszy wykryto właśnie na powierzchni komórek śródbłonna naczyń chłonnych [52]. Delecja *Vegfr3* prowadzi do defektów przebudowy naczyń krwionośnych i śmierci zarodków. VEGF-R3 odgrywa główną rolę w regulacji limfangiogenezy. Służy jako receptor sygnałowy czynników wzrostu swoistych dla naczyń limfatycznych – VEGF-C i VEGF-D. Stymulacja receptora aktywuje proliferację i migrację komórek śródbłonna naczyń chłonnych, a także chroni te komórki przed apoptozą [63]. Początkowo, podczas rozwoju osobniczego myszy (E8,5 do E12,5), VEGF-R3 ulega ekspresji w komórkach śródbłonna żyły zasadniczej i w angioblastach mezenchymy głowy [52]. Ekspresja VEGF-R3 jest regulowana przez sygnał receptora Notch, który pełni istotną rolę w powstawaniu tętnic i żył [61,88]. W dalszych etapach rozwoju VEGF-R3 staje się swoisty dla naczyń limfatycznych, a jego ekspresja w żyłach stopniowo ulega wyciszeniu. Jednak niektóre nowo powstałe naczynia krwionośne, towarzyszące rozwojowi guzów oraz pojawiające się podczas gojenia się ran, ponownie wykazują ekspresję VEGF-R3 [60]. Stymulacja rozrostu naczyń limfatycznych wzmagają przerzuty nowotworowe. Istnieje dodatnia korelacja między ekspresją VEGF-C i VEGF-D, a inwazją naczyń, odległymi przerzutami i złą prognozą kliniczną [5].

Wykazano, że VEGF-C i -D pełnią aktywną rolę w pobudzaniu wzrostu i różnicowania naczyń chłonnych [55]. Delecja *Vegfc* prowadzi do całkowitego braku naczyń limfatycznych u zarodków mysich, zaś myszy o genotypie *Vegfc<sup>+/-</sup>* wykazują nasiloną ich hipoplazję. U myszy pozbawionych genu *Vegfc* komórki śródbłonna naczyń limfatycznych początkowo pączkują z żyły zasadniczej, ale nie migrują i nie tworzą woreczków limfatycznych. VEGF-C jest istotnym czynnikiem chemotaktycznym wpływającym na przeżywalność komórek śródbłonna podczas zarodkowej limfangiogenezy [55]. Delecja *Vegfd* nie zmienia rozwoju naczyń limfatycznych, choć egzogenny VEGF-D wzmacnia osłabione pączkowanie naczyń u zarodków o genotypie *Vegfc<sup>+/-</sup>*. Wysoka ekspresja VEGF-C występuje w mezenchymie nerki ostatecznej (metanephros) oraz w pobliżu żył szyjnych, w miejscu powstawania pierwszych woreczków limfatycznych. U zarodków przepiórki i kurczęcia VEGF-C ulega ekspresji w rejonach, które obfitują w śródbłonek naczyń limfatycznych [24,25]. Zmodyfikowane proteolitycznie VEGF-C i -D aktywują także VEGF-R2 i mogą indukować wzrost naczyń krwionośnych. Natomiast VEGF-A, stymulujący rozwój naczyń krwionośnych, łącząc się do receptora VEGF-R2 może także indukować wzrost naczyń limfatycznych, ale nie zastępuje w pełni VEGF-C w regulacji rozwoju tych naczyń [55,68].

### Neuropilina 2 (Nrp2)

Neuropilina – cząsteczka charakterystyczna dla komórek układu nerwowego występuje w dwóch odmianach NRP-1 i NRP-2. Należy do receptorów z grupy semaforyn. Nrp2 ulega ekspresji w naczyniach chłonnych włosowatych, gdzie pełni istotną rolę w biologii budujących je komórek [56]. Myszy pozbawione genu dla *Nrp-2* wykazują prawidłową budowę układu krwionośnego, ale mają zdeformowane naczynia limfatyczne [101]. Badania na myszach transgenicznym pozbawionych ekspresji *Nrp1* i *Nrp2* wskazują, że genu neuropilin działają na wczesnych

etapach tworzenia naczyń krwionośnych. Pęcherzyk żółtkowy tych zwierząt jest nieunaczyniony, zarodki dożywiają do 8,5 dpc (days post coitus) [86].

Ligandami neuropiliny 2 są czynniki wzrostu – VEGF-C i VEGF-D.

### Podoplanina

Jest to białko transbłonowe (38 kDa) znajdujące się na powierzchni komórek śródbłonna naczyń limfatycznych. Pierwotnie opisano tę cząsteczkę na podocytach [13], a następnie na powierzchni pneumocytów typu I, w komórkach mioepitelialnych, ependymocytach, osteocytach, komórkach ziarnistych jajnika, komórkach dendrytycznych [8]. Podoplanina występuje w komórkach śródbłonna naczyń limfatycznych pochodzących z ludzkiej skóry, hodowanych *in vitro*. Komórki te mają fenotyp podoplanina<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> oraz CD45<sup>-</sup>. Natomiast komórki śródbłonna naczyń krwionośnych nie zawierają podoplaniny ani CD45, ale mają fenotyp CD31<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>. Obie populacje komórek tworzą niemieszające się ze sobą warstwy jednokomórkowe na powierzchni płytek pokrytych fibronektyną i tworzą odrębne tubule w żelu kolagenowym [59].

Podoplanina znajduje się przede wszystkim na powierzchni LEC zwróconej do światła naczynia, a na powierzchni zwróconej do tkanek występuje w śladowych ilościach. Podczas rozwoju zarodkowego myszy (10 dpc) podoplanina pojawia się po raz pierwszy w komórkach śródbłonna naczyń limfatycznych, które wykazują ekspresję Lyve-1, Prox-1 [95], VEGF-R3 [72] oraz czynnika transkrypcyjnego Sox18 [28;40].

### Efryna – B2 i jej receptor (EphB4)

Efryna B2 jest ligandem, który w postaci białka transbłonowego występuje w dużych ilościach w komórkach śródbłonna tętnic. Cząsteczka ta ulega ekspresji w okresie rozwoju, kiedy sieć kapilar nie jest jeszcze zróżnicowana w określony typ naczynia. Receptorem dla efryny B2 jest EphB4, występująca przede wszystkim w komórkach śródbłonna żył. Receptor EphB4, należący do największych cząsteczek rodziny kinazy tyrozynowej ulega także ekspresji w śródbłonkach wczesnych etapów rozwoju żył [91]. Zarówno ligand, jak i receptor są powiązane z błoną komórkową. Białka z rodziny Efryn B działają zatem nie w postaci rozpuszczalnych mediatorów, lecz muszą być związane z błoną komórkową, aby aktywować swoje dla nich receptory (EphB). Oddziaływanie między ligandem a receptorem odbywa się w konfiguracji *trans* lub *cis*. W pierwszym przypadku oddziaływanie odbywa się na powierzchni zazębiających się (przeplatających się ze sobą) komórek śródbłonna dużych naczyń żylnych i tętniczych. Oddziaływanie w konfiguracji *cis* odbywa się natomiast pomiędzy sąsiadującymi ze sobą komórkami śródbłonna kapilar systemu żylnego i tętniczego. Efryny klasy A są zakotwiczone w błonie poprzez glikozylofosfatydyloinozitol, a efryny B za pośrednictwem pojedynczej przezbłonowej domeny zawierającej krótki cytoplazmatyczny motyw wiążący PZD. Aktywacja ścieżki sygnałowej odbywa się jedynie przez bezpośrednie oddziaływanie komórka-komórka. Efryna B2 występuje w komórkach śródbłonna limfatycznych naczyń zbiorczych, podczas gdy receptor

EphB4 ulega ekspresji w LEC naczyń chłonnych włosowatych i zbiorczych [64]. Postnatalna przebudowa naczyń chłonnych polega na tworzeniu pączkujących naczyń włosowatych z istniejącego splotu naczyń limfatycznych, podczas gdy głębiej leżące naczynia, poprzez rekrutację miocytów gładkich oraz formowanie się w ich świetle zastawek, przyjmują morfologię naczyń zbiorczych. Procesy różnicowania się oraz przebudowy naczyń chłonnych zależą od regulacji przez efrynę B2 za pomocą domeny białkowej PZD. Myszy wykazujące mutację genu efryny B2, która polega na braku końca karboksylowego z deficytem domeny PZD, łączącej HA (80–90-aminokwasowa sekwencja białek sygnałowych, oddziałująca z innymi swoistymi białkami) mają prawidłowe naczynia krwionośne, ale wykazują nieprawidłowości w postnatalnej przebudowie naczyń chłonnych. Prowadzi to do przerostu limfatycznych naczyń zbiorczych, nieprawidłowej budowy, mniejszej liczby zastawek oraz braku warstwy miocytów gładkich w ścianie tych naczyń [64]. Efryny i ich receptory są także związane ze wzrostem aksonów w układzie nerwowym, gdzie zostały po raz pierwszy opisane oraz biorą udział w kontroli przebudowy naczyń krwionośnych.

### Angiopoetyny (Ang) i receptory Tie

Angiopoetyny, czynniki wzrostu swoiste dla komórek śródbłonna, odgrywają zasadniczą rolę w późnej fazie angiogenezy. Natomiast ich funkcja w rozwoju naczyń limfatycznych nie jest znana. Receptory angiopoetyn Tie-1 i Tie-2 podlegają ekspresji w naczyniach chłonnych, choć niektórzy autorzy podają, że Tie-2 jest nieobecny w śródbłonku naczyń limfatycznych [5]. Myszy pozbawione genu dla Ang2 (*Angpt2*-gene-targeted mice) wykazują hipoplazję naczyń chłonnych [30].

### CCBE1 (collagen and calcium binding EGF domains 1)

Badania skryningowe genów związanych z powstawaniem i różnicowaniem hemangioblastów oraz rozwojem serca kurczęcia wykazały udział w tych procesach genu *Ccbe1* [11]. Cząsteczka CCBE1 jest niezbędna w początkowych etapach pączkowania i migracji limfangioblastów z żył zasadniczych przednich [13] oraz w początkowych stadiach rozwoju serca [26]. Brak tego genu u myszy powoduje nieprawidłowe formowanie się sieci naczyń chłonnych, obfite obrzęki oraz śmierć w okresie perinatalnym. Obserwuje się też zmniejszoną ekspresję Prox-1 i Lyve-1 we wczesnych woreczkach limfatycznych. Mutacja tego genu u ludzi jest przyczyną zespołu Hennekama – ciężkiej niewydolności systemu limfatycznego z obrzękami obwodowymi, poszerzeniem naczyń limfatycznych ściany jelita, wadami serca oraz różnym stopniem zaburzeń rozwoju umysłowego [3,18]. Przypuszcza się, że białko CCBE1 działa jako cząsteczka macierzy pozakomórkowej stanowiąca rusztowanie dla pączkowania i migracji limfangioblastów z żył zasadniczych [26].

### ROLA NACZYŃ LIMFATYCZNYCH W ZAPALENIACH

Naczynia chłonne uczestniczą w regulacji odpowiedzi zapalnej przez udział w transporcie limfocytów do węzłów. Zarówno limfocyty, jak i komórki Langerhansa skóry oraz monocyty i inne leukocyty o fenotypie CD44<sup>+</sup> migrują do

naczyń limfatycznych w odpowiedzi na stymulatory zapalenia oraz wiążą HA.

Komórki śródbłonna naczyń limfatycznych skóry w hodowli *in vitro* wydzielają wtórną chemokinę tkanki limfoidalnej SLC (secondary lymphoid tissue chemokine – CCL21), przyciągającą limfocyty. Chemokina CCL21 jest wydzielana zarówno samoistnie, jak i po stymulacji TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ . Pod wpływem stymulacji przez TNF- $\alpha$  lub IL-1 $\beta$  zarówno komórki LEC jak i BEC wydzielają MIP-3 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein-3 – CCL20) oraz czynnik chemotaktyczny monocytów MCP-1 (monocyte chemoattractant protein – CCL2), które odpowiednio indukują migrację CCR7-pozytywnych i CCR6-pozytywnych (receptory 7 i 6 dla CCL) limfocytów i komórek dendrytycznych do T- zależnych obszarów węzłów chłonnych. Większość CCL20 jest wydzielana w kierunku powierzchni światła LEC i BEC, podczas gdy CCL21 na powierzchnię podstawnoboczną LEC [17,59].

Migracja komórek dendrytycznych jest zależna od receptora CCR7 (CD197), którego ligand CCL21 podlega ekspresji w komórkach naczyń limfatycznych [71].

### NIEWYDOLNOŚĆ NACZYŃ LIMFATYCZNYCH

Oslabienie zdolności transportowych systemu naczyń chłonnych, z powodu zaburzeń ich rozwoju lub wtórnego uszkodzenia, powoduje zatrzymanie białek i związanej z nimi wody w przestrzeni tkankowej i prowadzi do obrzęku limfatycznego. Bogaty w białka płyn śródtkankowy inicjuje proces zapalny, prowadząc do zwłóknienia, osłabienia odpowiedzi immunologicznej i atrofii tkanki tłuszczowej. Obrzęk limfatyczny jest zwykle wynikiem wrodzonych nieprawidłowości rozwojowych systemu limfatycznego. Wtórny obrzęk limfatyczny może być skutkiem zatkania światła naczyń chłonnych filariozą lub uszkodzenia systemu limfatycznego w wyniku terapii radiologicznej, zabiegów chirurgicznych lub zakażenia. Filarioza jest rezultatem zakażenia pasożytniczymi obleńcami, takimi jak *Wuchereria bancrofti* lub *Brugia malayi*, przenoszonymi przez ukąszenia komarów.

Obrzęk brzuszny limfatyczny i limfa w jamie opłucnej pojawiają się w wyniku gromadzenia chłonki lub płynu zawierającego tłuszcz w jamie brzusznej i/lub w jamie klatki piersiowej, jako skutek uszkodzenia bądź zatkania naczyń limfatycznych lub nieprawidłowego ich rozwoju [1]. Prowadzi to do nadciśnienia limfatycznego, wynacynienia chłonki i utraty białek, lipidów i leukocytów, a w konsekwencji do zapalenia otrzewnej.

Przyczyną obrzęku limfatycznego w chorobie Milroya (OMIM 153100), rzadkiej autosomalnej dominującej chorobie charakteryzującej się hipoplazją naczyń limfatycznych skóry [54] jest mutacja punktowa „missense” genu *VEGFR3*, której skutkiem jest inaktywacja receptorowej kinazy tyrozynowej.

W rzadkim zespole, zwanym obrzękiem limfatycznym z podwójnym rzędem rzęs (lymphedema-distichiasis syndrome) (OMIM #153400) nieprawidłowo rozwijają się naczynia chłonne; polega to na rekrutacji pericytów do ściany naczyń kapilarnych, zwiększonej rekrutacji pericytów



(komórek mięśni gładkich) do ściany naczyń zbiorczych, niewłaściwie uformowanych zastawkach w naczyniach zbiorczych, a także odmiennym kształtowaniu się naczyń włosowatych, których rezultatem jest obrzęk kończyn. Kształty naczyń limfatycznych wykazują zwiększoną nieregularność w porównaniu z prawidłowymi oraz mają nadmiernie poszerzone światło. Klinicznie mogą się pojawiać inne zmiany, takie jak wrodzone wady serca, opadanie powiek (ptosis), żylaki, rozszczep podniebienia oraz torbiele pozaoponowe rdzenia kręgowego. Zespół ten jest związany z nieprawidłową ekspresją genu *FOXC2* (*Foxc2* u myszy) [15,22,74].

Nieprawidłowa funkcja układu chłonnego może się objawiać fenotypowo w zespole obrzęku z brakiem owłosienia i poszerzeniem naczyń chłonnych (hypotrichosis-lymphedema-teleangiectasia) (OMIM #607823) [36]. U dzieci z tą rzadką chorobą dochodzi do obrzęków oraz szybkiej utraty włosów głowy, braku rzęs i brwi. Przyczyną jest mutacja genu kodującego czynnik transkrypcyjny *SOX18*, którego ekspresja zależy od czynnika Prox-1. Zespół ten dzie dziczy się w sposób dominujący lub recesywny [40,45].

#### NOWOTWORY WYWODZĄCE SIĘ Z NACZYŃ LIMFATYCZNYCH

W porównaniu z układem sercowo-naczyniowym znacznie mniej zagrażających życiu nowotworów wywodzi się z naczyń limfatycznych. Należą do nich naczyniak limfatyczny (*lymphangioma*) i naczyniak torbielowy szyi (*hygroma colli cysticum*), w większości łagodne guzy o nieznanej etiologii powodujące choroby malformacyjne u dzieci [73,97]. Nowotworem złośliwym, najczęściej

pojawiającym się w wyniku obrzęku po mastektomii jest naczyniak limfatyczny mięsakowy (*lymphangiosarcoma* – Stevard-Treves syndrome) [47]. Wykazano, że mięsak naczyniowy (*angiosarcoma*), który pochodzi z komórek śródbłonka naczyń krwionośnych wykazuje mieszaną charakterystykę swoistą dla BEC i LEC. Na powierzchni komórek guza występuje podoplanina. Nowotworem wywodzącym się prawdopodobnie tylko z naczyń limfatycznych jest mięsak Kaposiego, składający się z komórek wrzecionowatych, które wykazują ekspresję markerów śródbłonka naczyń krwionośnych i limfatycznych [5,21]. Profil transkrypcyjny komórek wrzecionowatych mięsaka Kaposiego przypomina profil transkrypcyjny prawidłowych komórek śródbłonka naczyń limfatycznych [38,90].

#### PODSUMOWANIE

Znajomość budowy, funkcji oraz charakterystyki molekularnej układu limfatycznego jest niezbędna do terapeutycznego oddziaływania na ten system w wielu schorzeniach, takich jak: obrzęki, zakażenia pasożytnicze, zapalenia, choroby autoimmunologiczne, czy nowotwory.

Przypuszcza się, że badania z użyciem mikromacierzy DNA ujawnią molekularne różnice, które umożliwią odróżnienie naczyń limfatycznych od krwionośnych nie tylko na podstawie ich anatomicznego usytuowania w tkankach oraz pozwolą odpowiedzieć na pytania, czym naczynia chłonne przerzutów nowotworowych różnią się od naczyń prawidłowych tkanek i czym śródbłonek aferentnych naczyń limfatycznych różni się od śródbłonka zatok węzłów chłonnych.

#### PIŚMIENICTWO

- [1] Aalami O.O., Allen D.B., Organ C.H. Jr.: Chylous ascites: a collective review. *Surgery*, 2000; 128: 761–778
- [2] Albrecht I., Christofori G.: Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in development and cancer. *Int. J. Dev. Biol.*, 2011; 55: 483–494
- [3] Alders M., Hogan B.M., Gjini E., Salehi F., Al-Gazali L., Hennekam E.A., Holmberg E.E., Mannens M.M., Mulder M.F., Offerhaus G.J., Prescott T.E., Schroor E.J., Verheij J.B., Witte M., Zwijnenburg P.J., Vikkula M., Schulte-Merker S., Hennekam R.C.: Mutations in CCBE1 cause generalized lymph vessel dysplasia in humans. *Nat. Genet.*, 2009; 41: 1272–1274
- [4] Alitalo K., Carmeliet P.: Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*, 2002; 1: 219–227
- [5] Alitalo K., Tammela T., Petrova T.V.: Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*, 2005; 438: 946–953
- [6] Bäckhed F., Crawford P.A., O'Donnell D., Gordon J.L.: Postnatal lymphatic partitioning from the blood vasculature in the small intestine requires fasting-induced adipose factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 606–611
- [7] Baluk P., Fuxe J., Hashizume H., Romano T., Lashnits E., Butz S., Vestweber D., Corada M., Molendini C., Dejana E., McDonald D.M.: Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. *J. Exp. Med.*, 2007; 204: 2349–2362
- [8] Baluk P., McDonald D.M.: Markers for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2008; 1131: 1–12
- [9] Banerji S., Hide B.R., James J.R., Noble M.E., Jackson D.G.: Distinctive properties of the hyaluronan-binding domain in the lymphatic endothelial receptor LYVE-1 and their implications for receptor function. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 10724–10735
- [10] Banerji S., Ni J., Wang S.X., Clasper S., Su J., Tammi R., Jones M., Jackson D.G.: LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J. Cell Biol.*, 1999; 144: 789–801
- [11] Bento M., Correia E., Tavares A.T., Becker J.D., Belo J.A.: Identification of differentially expressed genes in the heart precursor cells of the chick embryo. *Gene Expr. Patterns*, 2011; 11: 437–447
- [12] Bertozzi C.C., Schmaier A.A., Mericko P., Hess P.R., Zou Z., Chen M., Chen C.Y., Xu B., Lu M.M., Zhou D., Sebzda E., Santore M.T., Merianos D.J., Stadfeld M., Flake A.W., Graf T., Skoda R., Maltzman J.S., Koretzky G.A., Kahn M.L.: Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2-SLP-76 signaling. *Blood*, 2010; 116: 661–670
- [13] Bos F.L., Caunt M., Peterson-Maduro J., Planas-Paz L., Kowalski J., Karpanen T., van Impel A., Tong R., Ernst J.A., Korving J., van Es J.H., Lammert E., Duckers H.J., Schulte-Merker S.: CCBE1 is essential for mammalian lymphatic vascular development and enhances the lymphangiogenic effect of vascular endothelial growth factor-C *in vivo*. *Circ. Res.*, 2011; 109: 486–491
- [14] Breiteneder-Geleff S., Matsui K., Soleiman A., Meraner P., Poczewski H., Kalt R., Schaffner G., Kerjaschki D.: Podoplanin, novel 43 kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am. J. Pathol.*, 1997; 151: 1141–1152
- [15] Brice G., Mansour S., Bell R., Collin J.R., Child A.H., Brady A.F., Sarfarazi M., Burnand K.G., Jeffery S., Mortimer P., Murday V.A.: Analysis of the phenotypic abnormalities in lymphoedema-distichiasis syndrome in 74 patients with *FOXC2* mutations or linkage to 16q24. *J. Med. Genet.*, 2002; 39: 478–483
- [16] Cao R., Björndahl M.A., Religa P., Clasper S., Garvin S., Galter D., Meister B., Ikomi F., Tritsaris K., Dissing S., Ohhashi T., Jackson D.G., Cao Y.: PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *Cancer Cell*, 2004; 6: 333–345
- [17] Choi I., Lee S., Hong Y.K.: The new era of the lymphatic system: no longer secondary to the blood vascular system. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2012; 2: a006445
- [18] Connell F., Kalidas K., Ostergaard P., Brice G., Homfray T., Roberts L., Bunyan D.J., Mitton S., Mansour S., Mortimer P., Jeffery S., Lymphoedema Consortium: Linkage and sequence analysis indicate that CCBE1 is mutated in recessively inherited generalised lymphatic dysplasia. *Hum. Genet.*, 2010; 127: 231–241

- [19] Cursiefen C., Chen L., Borges L.P., Jackson D., Cao J., Radziejewski C., D'Amore P.A., Dana M.R., Wiegand S.J., Strellein J.W.: VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J. Clin. Invest.*, 2004; 113: 1040–1050
- [20] Danussi C., Spessotto P., Petrucco A., Wassermann B., Sabatelli P., Montesi M., Doliana R., Bressan G.M., Colombatti A.: Emilin1 deficiency causes structural and functional defects of lymphatic vasculature. *Mol. Cell. Biol.*, 2008; 28: 4026–4039
- [21] Dimaio T.A., Lagunoff M.: KSHV induction of angiogenic and lymphangiogenic phenotypes. *Front. Microbiol.*, 2012; 3: 102
- [22] Duong T., Koopman P., Francois M.: Tumor lymphangiogenesis as a potential therapeutic target. *J. Oncol.*, 2012; 2012: 204946
- [23] Dyer M.A., Livesey F.J., Cepko C.L., Oliver G.: Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina. *Nat. Genet.*, 2003; 34: 53–58
- [24] Eichmann A., Corbel C., Jaffredo T., Breat C., Joukov V., Kumar V., Alitalo K., le Douarin N.M.: Avian VEGF-C: cloning, embryonic expression pattern and stimulation of the differentiation of VEGFR2-expressing endothelial cell precursors. *Development*, 1998; 125: 743–752
- [25] Eichmann A., Marcelle C., Bréant C., Le Douarin N.M.: Two molecules related to the VEGF receptor are expressed in early endothelial cells during avian embryonic development. *Mech. Dev.*, 1993; 42: 33–48
- [26] Facucho-Oliveira J., Bento M., Belo J.A.: Ccbe1 expression marks the cardiac and lymphatic progenitor lineages during early stages of mouse development. *Int. J. Dev. Biol.*, 2011; 55: 1007–1014
- [27] Fantin A., Vieira J.M., Gestri G., Denti L., Schwarz Q., Prykhodzhiy S., Peri F., Wilson S.W., Ruhrberg C.: Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood*, 2010; 116: 829–840
- [28] Francois M., Caprini A., Hosking B., Orsenigo F., Wilhelm D., Browne C., Paavonen K., Karnezis T., Shayan R., Downes M., Davidson T., Tutt D., Cheah K.S., Stacke S.A., Muscat G.E., Achen M.G., Dejana E., Koopman P.: Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice. *Nature*, 2008; 456: 643–647
- [29] Gale N.W., Prevo R., Espinosa J., Ferguson D.J., Dominguez M.G., Yancopoulos G.D., Thurston G., Jackson D.G.: Normal lymphatic development and function in mice deficient for the lymphatic hyaluronan receptor LYVE-1. *Mol. Cell. Biol.*, 2007; 27: 595–604
- [30] Gale N.W., Thurston G., Hackett S.F., Renard R., Wang Q., McClain J., Martin C., Witte M., Witte M.H., Jackson D., Suri C., Campochiario P.A., Wiegand S.J., Yancopoulos G.D.: Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev. Cell*, 2002; 3: 411–423
- [31] Gordon E.J., Gale N.W., Harvey H.L.: Expression of the hyaluronan receptor LYVE-1 is not restricted to the lymphatic vasculature; LYVE-1 is also expressed on embryonic blood vessels. *Dev. Dyn.*, 2008; 237: 1901–1909
- [32] Gordon E.J., Rao S., Pollard J.W., Nutt S.L., Lang R.A., Harvey N.L.: Macrophages define dermal lymphatic vessel calibre during development by regulating lymphatic endothelial cell proliferation. *Development*, 2010; 137: 3899–3910
- [33] Grant A.J., Goddard S., Ahmed-Choudhury J., Reynolds G., Jackson D.G., Briskin M., Wu L., Hübscher S.G., Adams D.H.: Hepatic expression of secondary lymphoid chemokine (CCL21) promotes the development of portal-associated lymphoid tissue in chronic inflammatory liver disease. *Am. J. Pathol.*, 2002; 160: 1445–1455
- [34] Griffiths R.L., Hidalgo A.: Prospero maintains the mitotic potential of glial precursors enabling them to respond to neurons. *EMBO J.*, 2004; 23: 2440–2450
- [35] Harvey N.L., Srinivasan R.S., Dillard M.E., Johnson N.C., Witte M.H., Boyd K., Sleeman M.W., Oliver G.: Lymphatic vascular defects promoted by Prox1 haploinsufficiency cause adult-onset obesity. *Nat. Genet.*, 2005; 37: 1072–1081
- [36] Hennekam R.C., Geerdink R.A., Hamel B.C., Hennekam F.A., Kraus P., Rammelo J.A., Tillemans A.A.: Autosomal recessive intestinal lymphangiectasia and lymphedema, with facial anomalies and mental retardation. *Am. J. Med. Genet.*, 1989; 34: 593–600
- [37] Hirakawa S., Hong Y.K., Harvey N., Schacht V., Matsuda K., Libermann T., Detmar M.: 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] Hong Y.K., Foreman K., Shin J.W., Hirakawa S., Curry C.L., Sage D.R., Libermann T., Dezube B.J., Fingerth J.D., Detmar M.: Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Nat. Genet.*, 2004; 36: 683–685
- [39] Hong Y.K., Harvey N., Noh Y.H., Schacht V., Hirakawa S., Detmar M., Oliver G.: Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev. Dyn.*, 2002; 225: 351–357
- [40] Hosking B., Francois M., Wilhelm D., Orsenigo F., Caprini A., Svingen T., Tutt D., Davidson T., Browne C., Dejana E., Koopman P.: Sox7 and Sox17 are strain-specific modifiers of the lymphangiogenic defects caused by Sox18 dysfunction in mice. *Development*, 2009; 136: 2385–2391
- [41] Hou W.H., Liu I.H., Tsai C.C., Johnson F.E., Huang S.S., Huang J.S.: CRSBP-1/LYVE-1 ligands disrupt lymphatic intercellular adhesion by inducing tyrosine phosphorylation and internalization of VE-cadherin. *J. Cell Sci.*, 2011; 124: 1231–1244
- [42] Huang S.S., Liu I.H., Smith T., Shah M.R., Johnson F.E., Huang J.S.: CRSBP-1/LYVE-1-null mice exhibit identifiable morphological and functional alterations of lymphatic capillary vessels. *FEBS Lett.*, 2006; 580: 6259–6268
- [43] Huang S.S., Tang F.M., Huang Y.H., Liu I.H., Hsu S.C., Chen S.T., Huang J.S.: Cloning, expression, characterization, and role in auto-crine cell growth of cell surface retention sequence binding protein-1. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 43855–43869
- [44] Huntington G.S.: The genetic interpretation of the development of the mammalian lymphatic system. *Anat. Rec.*, 1908; 2: 19–45
- [45] Irrthum A., Devriendt K., Chitayat D., Matthijs G., Glade C., Steijlen P.M., Frys J.P., Van Steensel M.A., Vikkula M.: Mutations in the transcription factor gene SOX18 underlie recessive and dominant forms of hypotrichosis-lymphedema-telangiectasia. *Am. J. Hum. Genet.*, 2003; 72: 1470–1478
- [46] Jackson D.G.: The lymphatics revisited: new perspectives from the hyaluronan receptor LYVE-1. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2003; 13: 1–7
- [47] Janse A.J., van Coevorden F., Peterse H., Keus R.B., van Dongen J.A.: Lymphedema-induced lymphangiosarcoma. *Eur. J. Surg. Oncol.*, 1995; 21: 155–158
- [48] Ji R.C.: Macrophages are important mediators of either tumor- or inflammation-induced lymphangiogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2012; 69: 897–914
- [49] Johnson L.A., Prevo R., Clasper S., Jackson D.G.: Inflammation-induced uptake and degradation of the lymphatic endothelial hyaluronan receptor LYVE-1. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 33671–33680
- [50] Johnson N.C., Dillard M.E., Baluk P., McDonald D.M., Harvey N.L., Frase S.L., Oliver G.: Lymphatic endothelial cell identity is reversible and its maintenance requires Prox1 activity. *Genes Dev.*, 2008; 22: 3282–3291
- [51] Jussila L., Alitalo K.: Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol. Rev.*, 2002; 82: 673–700
- [52] Kaipainen A., Korhonen J., Mustonen T., van Hinsbergh V.W., Fang G.H., Dumont D., Breitman M., Alitalo K.: Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 3566–3570
- [53] Kajiji K., Hirakawa S., Ma B., Drinnenberg I., Detmar M.: Hepatocyte growth factor promotes lymphatic vessel formation and function. *EMBO J.*, 2005; 24: 2885–2895
- [54] Karkkainen M.J., Ferrell R.E., Lawrence E.C., Kimak M.A., Levinson K.L., McTigue M.A., Alitalo K., Finegold D.N.: Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphoedema. *Nat. Genet.*, 2000; 25: 153–159
- [55] Karkkainen M.J., Haiko P., Sainio K., Partanen J., Taipale J., Petrova T.V., Jeltsch M., Jackson D.G., Talikka M., Rauvala H., Betsholtz C., Alitalo K.: Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat. Immunol.*, 2004; 5: 74–80
- [56] Karkkainen M.J., Saaristo A., Jussila L., Karila K.A., Lawrence E.C., Pajusola K., Bueler H., Eichmann A., Kauppinen R., Kettunen M.I., Yla-Herttua S., Finegold D.N., Ferrell R.E., Alitalo K.: A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 12677–12682
- [57] Karunamuni G., Yang K., Doughman Y.Q., Wikenheiser J., Bader D., Barnett J., Austin A., Parsons-Wingter P., Watanabe M.: Expression of lymphatic markers during avian and mouse cardiogenesis. *Anat. Rec.*, 2010; 293: 259–270
- [58] Kazenwadel J., Michael M.Z., Harvey N.L.: Prox1 expression is negatively regulated by miR-181 in endothelial cells. *Blood*, 2010; 116: 2395–2401

- [59] Kriehuber E., Breiteneder-Geleff S., Groeger M., Soleiman A., Schoppmann S.F., Stingl G., Kerjaschki D., Maurer D.: Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. *J. Exp. Med.*, 2001; 194: 797–808
- [60] Kubo H., Cao R., Brakenhielm E., Mäkinen T., Cao Y., Alitalo K.: Blockade of vascular endothelial growth factor receptor-3 signaling inhibits fibroblast growth factor-2-induced lymphangiogenesis in mouse cornea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 8868–8873
- [61] Lawson N.D., Scheer N., Pham V.N., Kim C.H., Chitnis A.B., Campos-Ortega J.A., Weinstein B.M.: Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development*, 2001; 128: 3675–3683
- [62] Liersch R., Detmar M.: Lymphangiogenesis in development and disease. *Thromb. Haemost.*, 2007; 98: 304–310
- [63] Lohela M., Bry M., Tammela T., Alitalo K.: VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2009; 21: 154–165
- [64] Mäkinen T., Adams R.H., Bailey J., Lu Q., Ziemiecki A., Alitalo K., Klein R., Wilkinson G.A.: PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature. *Genes Dev.*, 2005; 19: 397–410
- [65] Mäkinen T., Veikkola T., Mustjoki S., Karpanen T., Catimel B., Nice E.C., Wise L., Mercer A., Kowalski H., Kerjaschki D., Stacker S.A., Achen M.G., Alitalo K.: Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J.*, 2001; 20: 4762–4773
- [66] Marino D., Dabouras V., Brändli A.W., Detmar M.: A role for all-trans retinoic acid in the early steps of lymphatic vasculature development. *J. Vasc. Res.*, 2011; 48: 236–251
- [67] Mouta Carreira C., Nasser S.M., di Tomaso E., Padera T.P., Boucher Y., Tomarev S.I., Jain R.K.: LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Res.*, 2001; 61: 8079–8084
- [68] Nagy J.A., Vasile E., Feng D., Sundberg C., Brown L.F., Detmar M.J., Lawitts J.A., Benjamin L., Tan X., Manseau E.J., Dvorak A.M., Dvorak H.F.: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J. Exp. Med.*, 2002; 196: 1497–1506
- [69] Nightingale T.D., Frayne M.E., Clasper S., Banerji S., Jackson D.G.: A mechanism of sialylation functionally silences the hyaluronan receptor LYVE-1 in lymphatic endothelium. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 3935–3945
- [70] Norrmén C., Tammela T., Petrova T.V., Alitalo K.: Biological basis of therapeutic lymphangiogenesis. *Circulation*, 2011; 123: 1335–1351
- [71] Ohl L., Mohaupt M., Czeloth N., Hintzen G., Kiafard Z., Zwirner J., Blankenstein T., Henning G., Förster R.: CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*, 2004; 21: 279–288
- [72] Oliver G.: Lymphatic vasculature development. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004; 4: 35–45
- [73] Orvidas L.J., Kasperbauer J.L.: Pediatric lymphangiomas of the head and neck. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 2000; 109: 411–421
- [74] Petrova T.V., Karpanen T., Norrmén C., Mellor R., Tamakoshi T., Finegold D., Ferrell R., Kerjaschki D., Mortimer P., Ylä-Herttua S., Miura N., Alitalo K.: Defective valves and abnormal mural cell recruitment underlie lymphatic vascular failure in lymphedema distichiasis. *Nat. Med.*, 2004; 10: 974–981
- [75] Petrova T.V., Mäkinen T., Mäkelä T.P., Saarela J., Virtanen I., Ferrell R.E., Finegold D.N., Kerjaschki D., Ylä-Herttua S., Alitalo K.: Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *EMBO J.*, 2002; 21: 4593–4599
- [76] Podgrabińska S., Braun P., Velasco P., Kloos B., Pepper M.S., Skobe M.: Molecular characterization of lymphatic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 16069–16074
- [77] Prevo R., Banerji S., Ferguson D.J., Clasper S., Jackson D.G.: Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 19420–19430
- [78] Sabin F.R.: On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. *Am. J. Anat.*, 1902; 1: 367–389
- [79] Salmi M., Koskinen K., Henttinen T., Elima K., Jalkanen S.: CLEVER-1 mediates lymphocyte transmigration through vascular and lymphatic endothelium. *Blood*, 2004; 104: 3849–3857
- [80] Sawa Y., Mukaida A., Suzuki M., Yoshida S.: Identification of lymphatic vessels by using a monoclonal antibody specific for the human thoracic duct. *Microvasc. Res.*, 1997; 53: 142–149
- [81] Schacht V., Ramirez M.I., Hong Y.K., Hirakawa S., Feng D., Harvey N., Williams M., Dvorak A.M., Dvorak H.F., Oliver G., Detmar M.: T1 $\alpha$ /podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J.*, 2003; 22: 3546–3556
- [82] Schoppmann S.F., Birner P., Stöckl J., Kalt R., Ullrich R., Caucig C., Kriehuber E., Nagy K., Alitalo K., Kerjaschki D.: Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am. J. Pathol.*, 2002; 161: 947–956
- [83] Schulte-Merker S., Sabine A., Petrova T.V.: Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease. *J. Cell Biol.*, 2011; 193: 607–618
- [84] Shimoda M., Takahashi M., Yoshimoto T., Kono T., Ikai I., Kubo H.: A homeobox protein, Prox1, is involved in the differentiation, proliferation, and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2006; 12: 6005–6011
- [85] Srinivasan R.S., Geng X., Yang Y., Wang Y., Mukatira S., Studer M., Porto M.P., Lagutin O., Oliver G.: The nuclear hormone receptor Coup-TFII is required for the initiation and early maintenance of Prox1 expression in lymphatic endothelial cells. *Genes Dev.*, 2010; 24: 696–707
- [86] Takashima S., Kitakaze M., Asakura M., Asanuma H., Sanada S., Tashiro F., Niwa H., Miyazaki J., Hirota S., Kitamura Y., Kitsukawa T., Fujisawa H., Klagsbrun M., Hori M.: Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 3657–3662
- [87] Teriete P., Banerji S., Noble M., Blundell C.D., Wright A.J., Pickford A.R., Lowe E., Mahoney D.J., Tammi M.I., Kahmann J.D., Campbell I.D., Day A.J., Jackson D.G.: Structure of the regulatory hyaluronan binding domain in the inflammatory leukocyte homing receptor CD44. *Mol. Cell*, 2004; 13: 483–496
- [88] Torres-Vázquez J., Kamei M., Weinstein B.M.: Molecular distinction between arteries and veins. *Cell Tissue Res.*, 2003; 314: 43–59
- [89] Uhrin P., Zaujec J., Breuss J.M., Olcaydu D., Chrenek P., Stockinger H., Fuertbauer E., Moser M., Haiko P., Fässler R., Alitalo K., Binder B.R., Kerjaschki D.: Novel function for blood platelets and podoplanin in developmental separation of blood and lymphatic circulation. *Blood*, 2010; 115: 3997–4005
- [90] Wang H.W., Trotter M.W., Lagos D., Bourboulia D., Henderson S., Mäkinen T., Elliman S., Flanagan A.M., Alitalo K., Boshoff C.: Kaposi sarcoma herpesvirus-induced cellular reprogramming contributes to the lymphatic endothelial gene expression in Kaposi sarcoma. *Nat. Genet.*, 2004; 36: 687–693
- [91] Wang Y., Nakayama M., Pitulescu M.E., Schmidt T.S., Bochenek M.L., Sakakibara A., Adams S., Davy A., Deutsch U., Lüthi U., Barberis A., Benjamin L.E., Mäkinen T., Nobes C.D., Adams R.H.: Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature*, 2010; 465: 483–486
- [92] Waś H.: Charakterystyka antygenów i czynników wzrostu śródbłonna limfatycznego. *Postępy Biochem.*, 2005; 51: 209–214
- [93] Weigel J.A., Raymond R.C., McGary C., Singh A., Weigel P.H.: A blocking antibody to the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE) inhibits hyaluronan clearance by perfused liver. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 9808–9812
- [94] Weninger W., Partanen T.A., Breiteneder-Geleff S., Mayer C., Kowalski H., Mildner M., Pammer J., Stürzl M., Kerjaschki D., Alitalo K., Tschachler E.: Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 and podoplanin suggests a lymphatic endothelial cell origin of Kaposi's sarcoma tumor cells. *Lab. Invest.*, 1999; 79: 243–251
- [95] Wigle J.T., Oliver G.: Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell*, 1999; 98: 769–778
- [96] Wilting J., Becker J.: Two endothelial cell lines derived from the somite. *Anat. Embryol.*, 2006; 211(Suppl.1): 57–63
- [97] Witte M.H., Bernas M.J., Martin C.P., Witte C.L.: Lymphangiogenesis and lymphangiodysplasia: from molecular to clinical lymphology. *Microsc. Res. Tech.*, 2001; 55: 122–145
- [98] Yamashita J.K.: Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from vascular progenitors. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2007; 17: 59–63
- [99] Yamazaki T., Yoshimatsu Y., Morishita Y., Miyazono K., Watabe T.: COUP-TFII regulates the functions of Prox1 in lymphatic endothelial cells through direct interaction. *Genes Cells*, 2009; 14: 425–434

[100] Yaniv K., Isogai S., Castranova D., Dye L., Hitomi J., Weinstein B.M.: Live imaging of lymphatic development in the zebrafish. *Nat. Med.*, 2006; 12: 711–716

[101] Yuan L., Moyon D., Pardanaud L., Bréant C., Karkkainen M.J., Alitalo K., Eichmann A.: Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development*, 2002; 129: 4797–4806

---

Autorki deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.