

8. Lewis C.E., Pollard J.W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. In: Cancer Res. 2006, vol. 66, nr. 2, p. 605-612.
9. Lin E.Y. et al. Vascular endothelial growth factor restores delayed tumor progression in tumors depleted of macrophages. In: Mol Oncol. 2007, vol. 1, nr. 3, p. 288-302.
10. Martinez F.O. et al. Transcriptional profiling of the human monocyte-to macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. In: J Immunol. 2006, nr. 199, p. 7303–7311.
11. Mazuru V. Rolul pivotal al macrofagelor in progresia tumorală. In: Curierul medical. 2010, nr. 4 (316), p. 5-61.
12. Nelson D., Ganss R. Tumor growth or regression: powered by inflammation. In: J Leukoc Biol. 2006, vol. 80, nr. 4, p. 685-690.
13. Schoppmann S.F. et al. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. In: Am J Pathol. 2002, vol. 161, nr. 3, p. 947-956.
14. Tang Y. et al. Tumor-stroma interaction: positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN. In: Mol Cancer Res. 2004, vol. 2, nr. 2, p. 73-80.
15. Tjiu J.W. et al. Tumor-associated macrophage-induced invasion and angiogenesis of human basal cell carcinoma cells by cyclooxygenase-2 induction. In: J Invest Dermatol. 2009, vol. 129, nr. 4, p. 1016-1025.
16. Watkins S.K. et al. IL-12 rapidly alter the functional profiles of tumor-associated and tumor-infiltrating macrophages in vitro and in vivo. In: J Immunol. 2007, nr. 178, p. 1357–1362.
17. Быков В.Л. Цитология и общая гистология (функциональная морфология клеток и тканей человека). In: Изд. СОТИС, Санкт-Петербург, 2001, 520с.

PROLIFERAREA LIMFOVASCULARĂ ÎN NEOPLAZIA SCUAMO- CELULARĂ DE CERVIX UTERIN

Vitalie Mazuru, Veaceslav Fulga, Oxana Mazuru, Tatiana Globa, Lilian Șaptefrați
Catedra Histologie, Citologie și Embriologie

Summary

Lymphovascular proliferation within the squamous cell neoplasia of uterine cervix

The aim of this research was the study of proliferative lymphatics microvascular density in preneoplastic and neoplastic lesions of uterine cervix. *Material:* squamous metaplasia – (n=22) cases, CIN I – (n=16), CIN II – (n=14), CIN III – (n=6), microinvasive carcinoma – (n=15), invasive carcinoma – (n=32). *Methods:* for histopathologic diagnosis and lesion's stadialisation hematoxilin&eosin staining has been used. For identification of general LMVD and density of proliferative lymphatics the LSAB+/HRP Double Stain technique were performed. Two monoclonal antibodies have been used: anti D2-40 and anti Ki-67. Weidner hot spot modified method was used for lymphatic vessels quantification. *Results:* proliferative lymphatic vessels density in squamous metaplasia was equal with 0,93; CIN I – 1,4; CIN II – 3,33; CIN III – 4,56; microinvasive carcinoma – 3,01; invasive carcinoma – 2,14. Intratumoral lymphatics were small, flattened, without lumen. Peritumoral lymphatics were large, with distinct lumen. In peritumoral area were found 21 lymphatic vessels with tumor emboli inside, 8 of them were proliferative lymphatics. *Conclusions:* preneoplastic and neoplastic lesions of uterine cervix determine active formation of new lymphatic vessels. Lymphangiogenic switch begins in CIN I stage. In CIN III stage the LMVD is the highest. The intensity of tumor lymphangiogenesis is not smaller than in CIN stages. The spreading of tumor cells occurs through both types of lymphatic vessels: preexisting and newly formed.

Rezumat

Scopul lucrării a fost studierea densității microvasculare limfatice proliferante în leziunile preneoplazice și neoplazice de cervix uterin. *Material:* metaplazie scuamoasă – (n=22) cazuri, CIN I – (n=14), CIN II – (n=12), CIN III – (n=6), carcinom microinvaziv – (n=15), carcinom invaziv – (n=32). *Metode:* hematoxină și eozină pentru diagnosticul histopatologic și stadializarea leziunilor; dublă imunocolorare utilizând tehnica LSAB+/HRP Double Stain. Au fost utilizați pentru cercetare anti D2-40 și anti Ki-67. Numărarea vaselor limfatice s-a făcut prin metoda hot spot modificat a lui Weidner. *Rezultate:* densitatea vaselor limfatice proliferante în metaplazia scuamoasă este egală cu 0,93; CIN I – 1,4; CIN II – 3,33; CIN III – 4,56; carcinom microinvaziv – 3,01; carcinom invaziv – 2,14. Limfaticile intratumorale au fost mici, colabate, iar cele peritumorale – medii sau mari, cu lumen evident. Au fost depistate 8 vase limfatice proliferante cu emboli tumorali în lumen. *Concluzii:* leziunile preneoplazice și neoplazice determină activ formarea limfaticelor de neoformație, switch-ul limfangiogen începe în CIN I și atinge apogeul în CIN III. Intensitatea limfangiogenezei tumorale în carcinoamele invazive nu este mai mică decât în CIN. Metastazarea celulelor neoplazice are loc atât prin limfaticile preexistente, cât și prin cele de neoformație.

Actualitatea

Carcinomul de cervix uterin reprezintă una din cele mai frecvente afecțiuni maligne umane. Pe parcursul ultimelor decenii a fost demonstrat caracterul evident infecțios a acestei maladii. Este cunoscut nu numai agentul etiologic (papilomavirusul uman), dar și serotipurile cu potențial cancerigen marcat, a fost introdusă în practica medicală vaccinarea împotriva acestui agent. Aceste evenimente au avut drept efect micșorarea dramatică a incidenței neoplaziei de cervix uterin. Există, însă, regiuni cum ar fi Africa ecuatorială (Uganda, Rwanda), America Centrală (Mexic, Honduras, Costa Rica), America de Sud (Columbia, Bolivia, Brazilia, Peru), Țările Europei de Sud-est, în care morbiditatea și mortalitatea prin carcinomul de col uterin ocupă poziții de top în patologia oncologică[1]. Astfel, este absolut firesc interesul față de această afecțiune în rândul cercetătorilor de specialitate.

Pe parcursul ultimelor decenii a fost demonstrat faptul, că pentru progresia tumorală au importanță nu numai evenimentele ce se petrec în celulele tumorale (indiferent de tumoră), ci și care au loc în stroma intratumorală și peritumorală. Este bine cunoscut faptul că orice tumoră, la etapa inițială de dezvoltare, își satisface necesitățile nutritive, plastice și respiratorii din contul rețelei vasculare preexistente. Pe parcursul creșterii, intervine un moment critic, când aceste necesități nu mai pot fi acoperite de către rețeaua vasculară preexistentă. În acest moment tumoră și celulele stromei (celulele rezidente, celulele inflamatorii recrutate din sângele periferic) încep o colaborare coordonată în vederea formării unei rețele vasculare noi[2] prin remodelarea stromală și sinteza factorilor de creștere (mitogeni pentru endoteliul atât vascular, cât și limfatic). Angiogeneza tumorală a fost studiată cu lux de amănunte. Se cunosc bine circumstanțele, mecanismele moleculare și consecințele acestui fenomen. În schimb, fenomenul de formare al vaselor limfatice, sub acțiunea tumorii, este mult mai puțin studiat. Limfangiogeneza tumorală este un fenomen biopatologic ce decurge paralel sau secundar angiogenezei [3]. Este bine cunoscut faptul că tumorile solide metastazează prin câteva căi: per continuă, prin vasele sangvine și prin cele limfatice. Răspândirea celulelor neoplazice pe cale limfatică este calea primară de metastazare pentru un șir de neoplazii cum ar fi: carcinomul cervical, ovarian, mamar, gastric, pulmonar[4]. În rezultatul acestei metastazări sunt implicați în proces ganglionii limfatici regionali, aspect care corelează cu înrăutățirea prognosticului de supraviețuire la pacienții respectivi[5]. Descoperirea markerilor specifici pentru endoteliul limfatic a constituit un salt important în studiul limfangiogenezei fiziologice și tumorale. Una din întrebările la care nu există un răspuns echivoc până în prezent este originea vaselor limfatice prin intermediul cărora are loc metastazarea celulelor neoplazice: prin vasele limfatice preexistente sau prin rețeaua vasculară limfatică formată de tumoră[6].

Scopul

Reieșind din cele expuse, scopul lucrării, a fost studiul limfangiogenezei în leziunile colului uterin prin depistarea proliferării endoteliocitelor limfatice cu ajutorul anticorpului monoclonal anti Ki-67.

Material și metode

Au fost supuse studiului speciemenle obținute prin biopsii țintite și conizație de la pacientele cu leziuni macroscopic decelabile. Materialul biologic a fost fixat în soluție de formol tamponat. După spălarea în apă de robinet, dehidratarea în soluții descrescânde de alcool și clarefierea în soluție de xilen, speciemenle au fost incluzionate în parafină. Întreaga prelucrare preliminară a materialului a fost efectuată în conformitate cu prevederile tehnicii histologice convenționale. Secțiunile, cu grosimea de 3mkm, au fost făcute la microtomul de tip „sliding” ERMA Japan. Diagnosticul histopatologic și gradarea leziunilor au fost efectuate prin colorarea cu hematoxilină și eozină. Au fost identificate următoarele tipuri de leziuni: metaplazie scuamoasă (n=22), CIN I (n=14), CIN II (n=12), CIN III (n=6), carcinom microinvaziv (n=15) și carcinom invaziv (n=32). Am efectuat dublă imunocolorare a secțiunilor, utilizând 2 anticorpi monoclonali: anti Ki-67 clona MIB1 Dako Cytomation (Carpinteria, CA, USA) și anti D2-40 clona D2-40 DakoCytomation (Danemarca). Anti Ki-67 a fost utilizat pentru evidențierea endoteliocitelor limfatice proliferante, iar anti D2-40 pentru a pune în evidență vasele limfatice și, astfel, de a diferenția anume endoteliul limfaticelor pozitiv la anti Ki-67 de alte elemente celulare ale tumorii aflate în proliferare (*Ex* endoteliul vaselor sangvine). Tehnica imunohistochimică utilizată a fost *LSAB+ /HRP Double Stain*. Demascarea antigenică s-a făcut în soluție Target Retrieval pH6, la temperatura 97°C, timp de 20 minute. Primul anticorp aplicat a fost anti D2-40, cu timpul de incubare 30 minute, apoi s-a aplicat sistemul avidin-biotin HRP, iar vizualizarea s-a făcut cu 3,3'-diaminobenzidin (DAB) în calitate de cromogen. Al doilea anticorp aplicat a fost anti Ki-67 cu perioada de incubare 30 minute. După aplicarea sistemului avidin-biotin HRP, vizualizarea s-a făcut cu cromogenul amino-etilcarbazon (AEC). Pentru contracolorarea nucleilor a fost utilizată hematoxilina Lille modificată. Speciemenle histologice colorate imunohistochimic au fost montate în mediu apos. Procedura de imunocolorare a fost efectuată cu ajutorul DakoCytomation Autostainer. Examinarea lamelor histologice s-a făcut la microscopul Nikon Eclipse E600.

Cuantificarea densității microvasculare limfatice (LMVD) s-a efectuat în conformitate cu metoda modificată a câmpurilor fierbinți (hot spot) a lui Weidner[7]. Ea constă în examinarea, la amplificarea X200, a trei câmpuri de stromă localizate în imediata vecinătate a neoplaziei sau a epiteliului normal, în care expresia anticorpului mai puternic exprimă. Suma primită în rezultatul identificării structurilor țintă se împarte la 3, iar media aritmetică obținută este rezultatul final al examinării unui caz. Au fost numărate doar acele vase limfatice, pozitive la D2-40, la care s-a depistat cel puțin o celulă endotelială Ki-67 pozitivă.

Rezultate

LMVD Ki-67 pozitive în metaplaziile scuamoase. În 8 cazuri nu a fost depistat nici un vas limfatic (VL) cu endoteliocite proliferante. Densitatea maximală a fost de 2,8 VL, valoarea medie fiind de 0,93 VL.

LMVD Ki-67 pozitive în leziunile preneoplazice. S-a constatat o creștere stabilă a numărului de VL proliferante o dată cu progresia gradului de leziune intraepitelială. În CIN I numărul VL cu endoteliocite proliferante a variat între 0 (în 2 cazuri) și 2,4. Media a fost de 1,4. În CIN II rezultatele au variat între 0 (într-un singur caz) și 3,8. Media a constituit 3,33 VL. În CIN III, în toate cazurile au fost detectate VL Ki-67 pozitive. Densitatea lor a variat între 4 și 5,2 cu medie de 4,56. E de menționat faptul că în leziunile intraepiteliale de grad înalt (CIN II și mai ales CIN III) vasele limfatice se depistau deja nu numai în stroma profundă, dar și în imediata vecinătate cu membrana bazală a epiteliului exocervical. Majoritatea VL Ki-67 pozitive aveau un lumen bine definit (erau perfuzabile).

LMVD Ki-67 pozitive în carcinoamele microinvazive și invazive. În carcinoamele scuamocelulare microinvazive și frank invazive, densitatea microvasculară a VL D2-40 pozitive, și a VL proliferante (Ki-67 pozitive) scade. Cu cât este mai avansat procesul tumoral, cu atât mai mică este această densitate. În carcinoamele microinvazive numărul de VL Ki-67+ a variat între 0 (un caz) și 5,2 (media 3,01). În cele invazive, numărul vaselor limfatice a fost între 0 (2 cazuri) și 3,4 (media 2,14). Majoritatea VL proliferante erau localizate în stroma peritumorală, VL intratumorale Ki-67 pozitive constituind aproximativ $\frac{1}{4}$ din toate vasele identificate. Limfatice intratumorale, indiferent de statutul lor de proliferare, erau non-funcționale, având o structură aplatisată, sinuoasă, lipsite de lumen. VL din zona peritumorală erau mari, perfuzabile, cu un lumen evident. Majoritatea VL proliferante aveau lumen mediu, mult mai rar, lumen lumen mare. Remarcăm faptul, că embolii tumorali au fost depistați atât în limfaticele neactivate, cât și în cele activate (Ki-67 pozitive).

Tabelul 1

Densitatea vaselor limfatice Ki-67 pozitive în leziunile preneoplazice și neoplazice ale colului uterin

Tipul leziunii	Nr. total de cazuti	Valoarea minimă	Valoarea maximă	Valoarea medie
Metaplazia scuamoasă	22	0	2,8	0,93
CIN I	14	0	2,4	1,4
CIN II	12	0	3,8	3,33
CIN III	6	4	5,2	4,56
Carcinom microinvaziv	15	0	5,2	3,01
Carcinom invaziv	32	0	3,4	2,14

Discuții

Importanța sistemului vascular limfatic în răspândirea la distanță a celulelor tumorale este bine cunoscută. Există o serie de tumori solide la care calea limfatică de metastazare este cea primară[8]. Prin intermediul acestei căi are loc afectarea metastatică a ganglionilor limfatici regionali. Acest fapt are o importanță majoră în evoluția ulterioară a neoplaziei, în tratamentul antitumoral și asupra termenului de supraviețuire al pacienților. Implicarea în proces a ganglionilor limfatici corelează cu un pronostic nefavorabil.

Apariția markerilor specifici pentru endoteliului limfatic a făcut posibilă elucidarea mecanismelor moleculare ale limfangiogenezei, mai ales în cazul limfangiogenezei tumorale. În pofida succeselor marcate obținute pe parcursul ultimelor două decenii, mai există încă o serie de întrebări ce planează asupra acestui fenomen asociat proceselor tumorale.

Au fost efectuate mai multe cercetări axate pe studiul LMVD cu ajutorul diferitor markeri specifici cum ar fi: LYVE-1[9], VEGFR3[10], Prox-1 [11]. În baza rezultatelor obținute a fost stabilit faptul că tumorile determină formarea unei rețele limfovaskulare din vasele preexistente. „Switch-ul limfangiogenic” (formarea masivă a VL, dictată de tumoare), în neoplaziile scuamocelulare de cap și gât, ale cavității bucale, esofagiene și cervicale începe la stadiul de leziune intraepitelială CIN I și își atinge apogeul în stadiul de CIN III [12]. Densitatea VL în leziunile preneoplazice a fost corelată și cu gradul de expresie al VEGFC[13] - mitogen foarte puternic și specific al endoteliului limfatic. Densitatea VL, odată cu momentul invaziei tumorale, începe să descrească. Acest fenomen poate fi explicat prin liza proteolitică a VL de către celulele neoplazice din frontul invaziv al tumorii. VL aflate inițial la periferia tumorii, ulterior, o dată cu creșterea ei în volum, sunt racolate în aria plajei tumorale[14]. Rezultatele noastre vin să confirme acest lucru și în cazul neoplaziei de cervix uterin. Este evident că VL intratumorale sunt limfatice de neoformație, pe când cele peritumorale au o origine mai mult sau mai puțin obscură. Cu toate că studiile LMVD cu markeri specifici pentru endoteliului limfatic indică o creștere evidentă a densității microvasculare în progresia neoplaziilor cervicale, densitatea VL

rămâne totuși un indiciu indirect, de constatare, al neoformării acestor vase. Din această cauză am decis să studiem densitatea vaselor limfatice proliferante, utilizând markerul proliferării nucleare Ki-67.

Ki-67 este o proteină nucleară, care se exprimă preferențial pe parcursul fazelor active ale ciclului celular (G_1 , S, G_2 și M), dar nu se expresează în celulele aflate în G_0 [15]. În interfază, antigenul este depistat exclusiv în nucleu, în timp ce pe parcursul mitozei markerul se localizează pe suprafața cromozomilor. În celulele ce intră în faza non-proliferativă, antigenul este rapid supus degradării[16].

Rezultatele acestei cercetări indică faptul, că pe parcursul evoluției neoplaziei de col uterin are loc formarea de VL tumoral-derivate. Rata limfaticelor proliferante are o dinamică comparabilă cu densitatea generală de vase limfatice, curbele lor de creștere și descreștere fiind identică.

Marea majoritate a studiilor axate pe morfologia VL din zonele intratumorală și peritumorală pledează pentru ideea că limfaticele din plaja tumorii nu sunt funcționale[17; 18], rolul în răspândirea celulelor neoplazice revenind limfaticelor de la periferia tumorii[19]. Totuși există date, foarte puține, despre unele tumori în care limfaticele intratumorale sunt funcționale[20]. Aceste rezultate stau la baza conceptului conform căruia anume limfaticele peritumorale asigură răspândirea celulelor neoplazice pe cale limfovasculară. Rezultatele noastre confirmă aceste date. În carcinoamele invazive, limfaticele intratumorale, atât VL D2-40+, cât și Ki-67+ sunt mici și colabate, lipsite de lumen. Limfaticele din aria peritumorală, însă, sunt medii sau mari cu un lumen evident. Mai mult, au fost depistate VL cu emboli tumorali doar în ariile peritumorale. Prezența embolilor tumorali și în limfaticele activate indică faptul că, în carcinoamele cervicale invazive, sunt implicate în metastazarea limfovasculară atât limfaticele preexistente, cât și cele de neoformație.

Concluzii

Limfangiogeneza tumorală este unul din evenimentele cheie care se produce în cadrul progresiei neoplaziei de col uterin. În baza rezultatelor despre densitatea microvasculară limfatică generală, dar mai ales cea proliferantă, corelată la stadiul de progresie al leziunii cervicale am constatat că debutul formării de vase limfatice, condiționată de leziune, începe la nivelul de CIN I și crește progresiv, atingând apogeul său la nivelul de CIN III. O dată cu apariția invaziei densitatea limfaticelor scade, ajungând în carcinoamele frank invazive să fie la un nivel comparabil cu nivelul LMVD din CIN II. Acest aspect denotă faptul că pe parcursul evoluției neoplaziei cervicale are loc formarea unei rețele vasculare limfatice de neoformație. În opinia noastră, datorită faptului că raportul LMVD general/LMVD proliferant rămâne același, în carcinoamele invazive are loc o limfangiogenază tumorală tot atât de intensă ca și în leziunile preneoplazice, chiar dacă densitatea VL este simțitor în descreștere. Prezența embolilor tumorali și în interiorul VL proliferante ne face să concluzionăm că metastazarea limfovasculară în carcinoamele cervicale invazive are loc atât prin limfaticele preexistente, cât și prin cele apărute în rezultatul limfangiogenezei tumorale.

Bibliografie

1. Ferlay J, Parkin DM, Pisani P. GLOBOCAN 1: cancer incidence and mortality worldwide. IARC CancerBase no 3. Lyon: IARC Press; 1998.
2. Oliver G. Lymphatic vasculature development. *Nature Rev Immunol.* 4, 35-45 (2004).
3. Alitalo K, Tammela T, Petrova V. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 438, 946-953 (2005).
4. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the „seed and soil” hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer*, 3, 453-458 (2003).
5. Alitalo K, Mohla S, Ruoslahti E. Lymphangiogenesis and Cancer: Meeting Report. *Cancer Research* 64, 9225-9229 (2004).

6. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, 2, 573-583 (2002).
7. Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density with breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat*, 36, 169-180 (1995).
8. Skobe M, Hawighorst T, Jackson D et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat. Med.*, 7, 192-198 (2001).
9. Trojan L, Michel MS, Rensch F, Jackson DG, Alken P, Grobholz R. Lymphangiogenesis in prostate carcinoma assessed with novel lymphatic marker, lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor (LYVE-1). *J. Urol*, 172, 103-107 (2004).
10. He Y, Rajante I, Pajusola K et al., Vascular endothelial cell growth factor receptor 3 – mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res*, 65, 6901-6909 (2005).
11. Yuanming L, Feng G, Lei T, Ying W. Quantitative analyses of lymphangiogenic markers in human gastroenteric tumor. *Archives of Medical Research*, 38, 106-112 (2006).
12. Saptefrati L, Cimpean AM, Ciornii A, Ceausu R, Esanu N, Raica M. Identification of lymphatic vessels and prognostic value of lymphatic microvessel density in lesions of the uterine cervix. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 50(4), 589-594 (2009).
13. Gombos Z, Xu X, Chu CS, Zhang PJ, Acs G., Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res*, 11(23), 8367-8371 (2005).
14. Roma AA, Magi-Galluzzi C, Kral MA, Jin TT, Klein EA, Zhou M., Peritumoral lymphatic invasion is associated with regional lymph node metastasis in prostate adenocarcinoma., *Mod Pathol*, 19(3), 392-398 (2006).
15. Gerdes J, Lemke H, Baisich H, Wacker HH, Schwab U, Stein H., Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, 133, 1710-1715 (1984).
16. Scholzen T, Gerdes J., The Ki-67 protein: from the unknown to known. *J Cell Physiol* 182, 311-322 (2000).
17. Padera PT, Kadambi A, di Tomaso E., Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science*, 296, 1883-1886 (2002).
18. Leu AJ, Berk DA, Lymboussaki A, Alitalo K, Jain RK., Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res.*, 60, 4324-4327 (2000).
19. Schopman SF, Birner P, Stockl 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*, 16(3), 947-956 (2002).
20. Sipos B, Klapper W, Kruse ML, Kalthoff H, Kerjaschki D, Kloppel G., Expression of lymphangiogenic factors and evidence of intratumoral lymphangiogenesis in pancreatic endocrine tumors. *Am. J. Pathol.*, 165, 1187-1197 (2004).