

Wiestawa Bednarek,
Magdalena Mazurek-Kociubowska,
Iwona Wertel

I Katedra i Klinika Ginekologii
Onkologicznej i Ginekologii Uniwersy-
tetu Medycznego w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. Jan Kotarski

Address for correspondence/
Adres do korespondencji:
I Katedra i Klinika Ginekologii
Onkologicznej i Ginekologii Uniwersy-
tetu Medycznego w Lublinie
20-081 Lublin, ul. Staszica 16
tel. 81 532-78-47, fax: 81 532-78-47
e-mail: wbed@wp.pl

Received: 18.01.2011
Accepted: 01.02.2011
Published: 30.03.2011

STATISTIC STATYSTYKA	
Word count Liczba słów	2562/2144
Tables Tabele	6
Figures Ryciny	5
References Piśmiennictwo	33

Praca finansowana z KBN NN 407 172 434
This project was financed from KBN NN
407 172 434

Expression of neuropilin-2 in ovarian cancer

Ekspresja neuropiliny-2 w raku jajnika

Original article/Artykuł oryginalny

Summary

Introduction. Neuropilin-2 (NRP2), a transmembrane receptor, plays an important role in the distribution of lymphatic vessels. Blocking the binding of VEGF-C with neuropilin-2 by using specific antibodies, inhibits *in vivo* distribution of terminal lymphatic endothelial cells.

Aim. The aim of this study was to determine the expression of neuropilin-2 in ovarian cancer and to evaluate correlations with clinical features.

Material and methods. The material was collected from 61 patients operated by the reason of ovarian cancer, between the ages of 24 to 82 (Mean 56,31±14,27). On histopathological examination 30 cases of serous carcinoma, 21 mucinous cancer and 10 endometrial cancer were found.

Results. The expression of NRP2 with a strong degree of intensity was found in 7 cases, of low-grade 30 cases. No expression was found in 24 cases. There was no significant correlation between expression of neuropilin-2 and FIGO stage, tumor type or degree of histopathological differentiation.

Conclusion. Considering the results of the study, it is hard to define the role of neuropilin-2 in lymphangiogenesis in ovarian cancer.

Key words: ovarian cancer, neuropilin-2, lymphangiogenesis, VEGF, VEGFR.

Streszczenie

Wstęp. Neuropilina-2 (*neuropilin-2*, NRP2) przez błonowy receptor, odgrywa ważną rolę w procesie podziału naczyń limfatycznych. Blokowanie wiązania VEGF-C z neuropiliną-2 przy użyciu specyficznych przeciwciał, hamuje *in vivo* podział końcowych limfatycznych komórek endotelialnych.

Cel pracy. Celem pracy było oznaczenie ekspresji markera NRP2 w raku jajnika oraz wykazanie korelacji z cechami klinicznymi.

Material i metody. Materiał pobrano od 61 pacjentek operowanych powodu raka jajnika, w wieku od 24 do 82 (średnia 56,31±14,27). W badaniu histopatologicznym stwierdzono 30 przypadków raka surowiczego, 21 przypadków raka śluzowego oraz 10 endometrialnego.

Wyniki. Ekspresję NRP2 o silnym stopniu nasilenia stwierdzono w 7 przypadkach, o słabym stopniu nasilenia-30. Brak ekspresji stwierdzono w 24 przypadkach. Nie stwierdzono istotnych korelacji między ekspresją neuropiliny-2 a stopniem zaawansowania klinicznego, typem histopatologicznym nowotworu ani stopniem jego zróżnicowania.

Wnioski. Na podstawie otrzymanych wyników trudno sądzić o roli neuropiliny-2 w procesie limfangiogenezy w raku jajnika.

Słowa kluczowe: rak jajnika, neuropilina-2, limfangiogeneza, VEGF, VEGFR.

INTRODUCTION

Neuropilins (NRP) are molecules structurally similar to each other, located on the cell surface. They have a short cytoplasmic domain devoid of enzymatic activity. Two genes encoding proteins with 47% amino acid compliance were identified: NRP1 and NRP2 [1].

Initially neuropilins were described as receptors for factors involved in neuronal conduction, belonging to the third class of semaphorins (SEMA) [2]. Numerous studies on various systems of the human body revealed a significant role of neuropilins in the development of blood and lymphatic vessels [3, 4].

In vitro studies demonstrated that neuropilins show affinity to the members of the family of vascular endothelial growth factor (VEGF) in a characteristic manner depending on isoforms. NRP1 has affinity to VEGF-A, VEGF-B, VEGF-E and PIGF (*placental growth factor*), and NRP2 to VEGF-A, VEGF-C and PIGF [5]. However, the biological relation of these interactions in human cells is not fully known. Both NRP1 and NRP2 have a long extracellular region and a short cytoplasmic fragment, having the length of about 40 amino acids, devoid of enzymatic activity. The extracellular region of neuropilins consists of five structurally different domains. These are: two CUB motifs, a1 and a2, homologous with additional components c1r/c1s, two domains homologous to coagulation factors V/VIII- b1 and b2, and one domain c, called MAM, homologous with meprin A5 [6]. The binding site of VEGF-A with high affinity is located on the b1 and b2 domains of neuropilin-1 and 2, while joining of semaphorins requires the presence of a1a2 and b1b2 domains [7].

NRP2 expression on the membrane of blood cells is limited to the venous and lymphatic capillaries. *In vitro* research revealed that NRP2 modulates the process of division of small lymphatic vessels and prevents it from slowing down. Genetic deletion of neuropilin-2 results in identical defects in the division of vessels as those observed after treatment with specific antibodies [8].

OBJECTIVES OF THE PROJECT

The objective of this project was to assess the expression of transmembrane receptor of neuropilin-2 and seek correlations with selected clinical features and histopathology in three histopathological types of ovarian cancer.

MATERIAL AND METHODS

The study included material from 61 patients operated on for ovarian cancer in the Department and the Clinic of Oncologic Gynaecology and Gynaecology of the Medical University of Lublin in the years 2005-2007. In all cases the diagnosis was confirmed histopathologically. The following factors were evaluated: patients' age, histological type of the tumour, stage of cancer differentiation, stage of the disease according to FIGO classification, concentration of marker CA-125 in the blood

WSTĘP

Neuropiliny (*neuropilins*, NRP) to cząsteczki podobne do siebie strukturalnie zlokalizowane są na powierzchni komórek. Posiadają krótką domenę cytoplazmatyczną pozbawioną aktywności enzymatycznej. Wykryto dwa geny kodujące białka o zgodności aminokwasowej 47%: NRP1 i NRP2 [1].

Początkowo neuropiliny były opisywane jako receptory dla czynników biorących udział w przewodnictwie neuronalnym, należących do trzeciej klasy semaforyn (SEMA) [2]. Liczne badania nad różnymi układami organizmu ludzkiego, wykazały znaczącą rolę neuropilin w rozwoju naczyń krwionośnych i chłonnych [3, 4].

Badania *in vitro* udowodniły, że neuropiliny wykazują powinowactwo do członków rodziny śródbłonkowego czynnika wzrostu naczyń (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) w charakterystyczny, zależny od izoformy sposób. NRP1 wykazuje powinowactwo do VEGF-A, VEGF-B, VEGF-E oraz PIGF (*placental growth factor*; łożyskowy czynnik wzrostu), natomiast NRP2 do VEGF-A, VEGF-C oraz PIGF [5]. Jednak biologiczny związek tych interakcji w ludzkich komórkach nie jest do końca poznany. Zarówno NRP1 jak i NRP2 posiadają długi region zewnątrzkomórkowy oraz krótki fragment cytoplazmatyczny, długości około 40 aminokwasów, który nie posiada aktywności enzymatycznej. Region zewnątrzkomórkowy neuropilin zawiera pięć różnych strukturalnie domen. Są to: dwa motywy CUB, a1 i a2 homologiczne z komponentami uzupełniającymi c1r/c1s, dwie domeny homologiczne z czynnikami krzepnięcia V/VIII- b1 i b2, oraz jedną domenę c, zwaną MAM homologiczną z mepryną A5 [6]. Miejsce wiązania VEGF-A o wysokim powinowactwie, zostało zlokalizowane na domenach b1 i b2 neuropiliny-1 i 2, natomiast przyłączenie semaforyn wymaga obecności domen a1a2 oraz b1b2 [7].

Ekspresja NRP2 na błonie komórek naczyń jest ograniczona do kapilar żylnych i limfatycznych. Badania *in vitro* wykazały, że NRP2 moduluje proces podziału drobnych naczyń limfatycznych i zapobiega jego spowalnianiu. Genetyczna delecja neuropiliny-2 skutkuje identycznymi defektami podziału naczyń do obserwowanych po leczeniu specyficznymi przeciwciałami [8].

CEL PRACY

Celem pracy była ocena ekspresji receptora przezbłonowego neuropiliny-2 i poszukiwanie korelacji z wybranymi cechami klinicznymi i histopatologicznymi w trzech typach histopatologicznych raka jajnika.

MATERIAŁ I METODY

Do badań włączono materiał od 61 chorych operowanych z powodu raka jajnika w I Katedrze i Klinice Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie w latach 2005-2007. We wszystkich przypadkach rozpoznanie potwierdzone zostało histopatologicznie. Oceniano wiek chorych, typ histopatologiczny guza, stopień zróżnicowania nowotworu, stopień za-

serum before surgery and the results of NRP2 expression. Representative sections of tissue from examined ovarian cancers were used for immunohistochemistry, preserved in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Following removal of paraffin and hydration of sections, antigenic determinant was uncovered. Subsequently, endogenous peroxidase was blocked and sections were incubated with mouse monoclonal antibody directed against neuropilin-2 (Abbotec, USA) overnight at 4°C. Then it was incubated with secondary antibody with complex of streptavidin/biotin conjugated with peroxidase. All reagents necessary to carry out the colour reactions came from the ImmunoCruz™ Staining System set by Santa Cruz Biotechnology, USA. Sections stained with hematoxylin were dehydrated and embedded in Canadian balm. Identical formulations prepared without primary antibody constituted negative control. To evaluate the result in the colour reaction Olympus CX41 microscope with a digital camera DP12 was used. The stage of neuropilin-2 expression in the tested formulations was evaluated according to the following scale:

- 1 point - negative or positive reaction with weak colour intensity,
- 2 points - positive reaction with medium colour intensity,
- 3 points - positive reaction with intensive colour.

Then the percentage of cells with a colour reaction from 3 fields of view was averaged. Final evaluation is the product of intensity of colour (1-3) and the percentage of cancer cells with positive colour reaction. For statistical purposes, the following *score* was assumed:

- no reaction (-) - when *score* ranged from 0 to 59,
- weak positive reaction (+) - when *score* ranged from 60 to 129,
- strong positive reaction (++) - when *score* ranged from 130 to 300.

Statistical analysis

The results were analyzed statistically. Values of the analyzed measurable parameters were shown using the mean, median, quartiles and standard deviation, and for the immeasurable using the number and percentage. For measurable features, normality for the distribution of the analyzed parameters was assessed using the W test by Shapiro-Wilk.

To compare two independent groups, the U test by Mann-Whitney was used, and for age of groups the Kruskal-Wallis test was used. The homogeneity test χ^2 was used for unrelated qualitative characteristics in order to detect the existence of differences between the compared groups. Independence test χ^2 was used to investigate the existence of a relationship between the measured traits. The significance level $p < 0.05$ indicating the existence of significant differences was assumed. The database and statistical research was based on the STATISTICA 9.0 software (StatSoft, Poland).

awansowania choroby według klasyfikacji FIGO, stężenie markera CA-125 w surowicy krwi przed operacją oraz wyniki ekspresji NRP2. Do badań immunohistochemicznych wykorzystano reprezentatywne skrawki z tkanki badanych raków jajnika, utrwalone w 10% formalinie zbuforowanej i zatopione w parafinie. Po odparafinowaniu i uwodnieniu skrawków przeprowadzono proces odsłonięcia determinanty antygenowej. Następnie zablokowano endogenną peroksydazę i inkubowano skrawki z monoklonalnym mysim przeciwciałem skierowanymi przeciwko neuropiline-2 (Abbotec, USA) przez całą noc w temperaturze 4°C. Kolejno przeprowadzono inkubację z przeciwciałem wtórnym z kompleksem streptawidyna/biotyna skoniugowane z peroksydazą. Wszystkie odczynniki niezbędne do przeprowadzenia reakcji barwnych pochodziły z zestawu ImmunoCruz™ Staining System firmy Santa Cruz Biotechnology, USA. Podbarwione hematoksyliną skrawki odwodniono i zatopiono w balsamie kanadyjskim. Identycznie przygotowane preparaty bez użycia przeciwciała pierwotnego stanowiły kontrole negatywną. Do oceny wyniku reakcji barwnej wykorzystano mikroskop Olympus CX41 z kamerą cyfrową DP12. Stopień nasilenia ekspresji neuropiliny-2 w w badanych preparatach oceniano według następującej skali:

- 1 punkt – odczyn ujemny lub dodatni o słabej intensywności zabarwienia,
- 2 punkty – odczyn dodatni o średniej intensywności zabarwienia,
- 3 punkty – odczyn dodatni o intensywnym zabarwieniu.

Następnie uśredniano odsetek komórek z reakcją barwną z 3 pól widzenia. Ocena końcowa to wynik iloczynu stopnia intensywności zabarwienia (1-3) i odsetka komórek nowotworowych z dodatnią reakcją barwną. Do celów statystycznych przyjęto wskaźnik *score*:

- brak odczynu (-) – gdy *score* wynosił od 0 do 59,
- słabo dodatni odczyn (+) – gdy *score* wynosił od 60 do 129,
- silnie dodatni odczyn (++) – gdy *score* wynosił od 130 do 300.

Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej. Wartości analizowanych parametrów mierzalnych przedstawiono przy pomocy wartości średniej, mediany, kwartyli i odchylenia standardowego, a dla niemierzalnych przy pomocy liczności i odsetka. Dla cech mierzalnych normalność rozkładu analizowanych parametrów oceniano przy pomocy testu W Shapiro-Wilka.

Do porównania dwóch grup niezależnych zastosowano test U Manna-Whitneya, zaś dla wieku grup test Kruskala-Wallisa. Dla niepowiązanych cech jakościowych do wykrycia istnienia różnic między porównywanymi grupami użyto testu jednorodności χ^2 . Do zbadania istnienia zależności między badanymi cechami użyto testu niezależności χ^2 . Przyjęto poziom istotności $p < 0,05$

RESULTS

The study included 61 patients aged from 24 to 82 years. The average age was 56.31 ± 14.27 years.

Taking into account the histopathological diagnosis, a serous cancer was present in 49.18% ($n = 30$) of patients, endometrial in 16.39% ($n = 10$), and mucinous in 34.43% ($n = 21$) (Fig. 1).

In the analyzed group, stage III of advancement was diagnosed in 28 patients (45.90%), I stage in 25 patients (40.98%), II stage in 7 patients (11.48%) and IV stage in 1 patient (1.64%) (Fig.2).

In the investigated group in 63.93% ($n = 39$) G2 histological stage of diversification G2 was identified, in 27.87% ($n = 17$) G3, and in 8.20% ($n = 5$) G1 (Fig. 3).

In the investigated group 49.18% ($n = 30$) revealed weakly positive level of neuropilin-2 expression, 39.34% ($n = 24$) showed a negative reaction and 11.48% ($n = 7$) showed a strong positive reaction (Fig. 4).

wskazujący na istnienie istotnych statystycznie różnic. Bazę danych i badania statystyczne przeprowadzono w oparciu o oprogramowanie komputerowe STATISTICA 9.0 (StatSoft, Polska).

WYNIKI

Badaniami objęto 61 pacjentek w wieku od 24 do 82 lat. Średnia wieku badanych wynosiła $56,31 \pm 14,27$ lat.

Biorąc pod uwagę wynik histopatologiczny u 49,18% ($n=30$) badanych stwierdzono nowotwór typu surowiczego, u 16,39% ($n=10$) endometrialnego i u 34,43% ($n=21$) śluzowego (Ryc.1).

W analizowanej grupie III stopień zaawansowania klinicznego stwierdzono u 28 pacjentek (45,90%), u 25 pacjentek stwierdzono I stopień zaawansowanie (40,98%), u 7 pacjentek II stopień (11,48%) i u 1 pacjentki IV stopień zaawansowania klinicznego (1,64%) (Ryc.2).

W badanej grupie w 63,93% ($n=39$) stwierdzono stopień zróżnicowania histologicznego G2, w 27,87% ($n=17$) G3 i w 8,20% ($n=5$) stopień G1 (Ryc.3).

W badanej grupie w 49,18% ($n=30$) stwierdzono słabo dodatni poziom ekspresji neuropiliny-2, w 39,34% ($n=24$) wynik był ujemny natomiast w 11,48% ($n=7$) obserwowano odczyn silnie dodatni (Ryc. 4).

Fig. 1. Percentage of patients taking into account histopathological type

Ryc. 1. Odsetek badanych z uwzględnieniem typu histopatologicznego

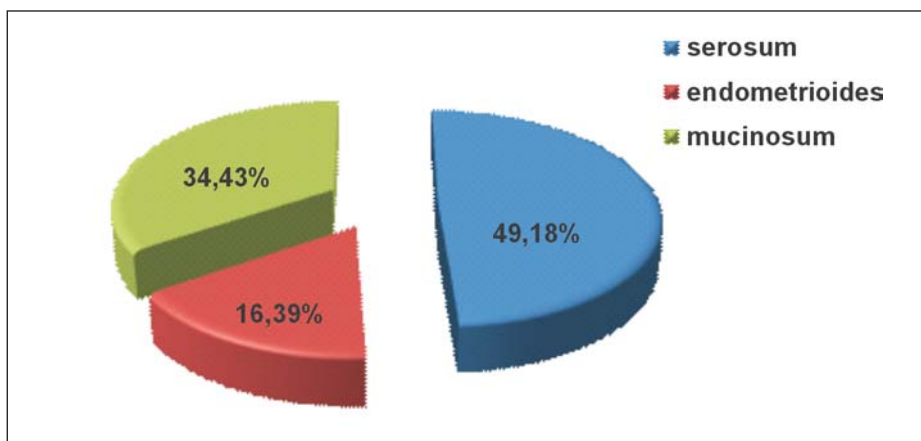
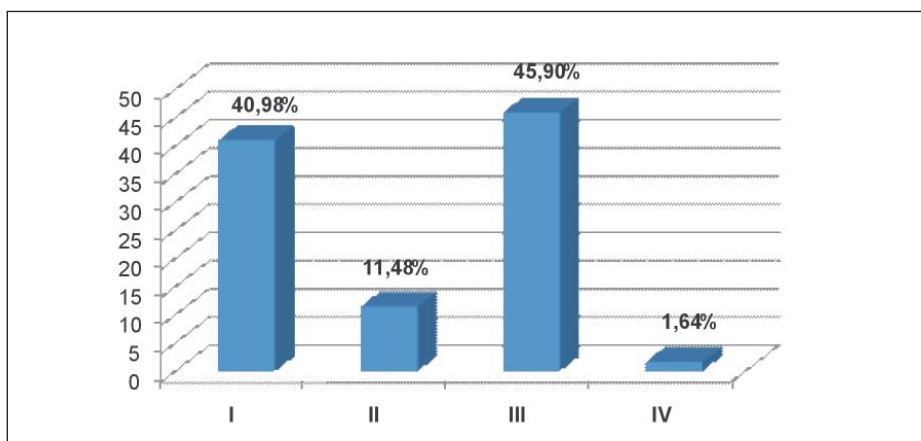


Fig. 2. Percentage of patients taking into account the clinical stage of cancer

Ryc. 2. Odsetek badanych z uwzględnieniem stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu



As a result of statistical analysis it was found that patients with clinical malignancy stage I and II, slightly more frequently revealed positive result of NRP2 expression (71.88%) compared with patients with III and IV clinical stage (48.28%). The differences were close to statistical significance ($p = 0.06$) (Table I).

Statistical analysis showed no significant correlation between the histopathological result of ovarian cancer and expression of NRP2 ($p=0.43$). It was established that positive expression was more frequent in the case of mucinous cancer (71.43%) than in the case of serous (56.67%) and endometrial cancer (50.00%). The results obtained are shown in Table II.

The statistical analysis showed no significant correlation between the stage of histological diversification of cancer and the result of NRP2 expression ($p = 0.86$) (Table III).

The analyzed study group revealed increased intensity of colour reaction in 54.10% ($n = 33$) in stage 2, in 42.62% ($n = 26$) in stage 1 and in 3.28% ($n = 2$) in stage 3 (Fig. 5).

As a result of statistical analysis it was established that in patients with clinical stage III and IV the intensity of expression of NRP2 in stage 1 was slightly more frequent (55.17%) than in the group with clinical stage

W wyniku przeprowadzonej analizy statystycznej stwierdzono, że u chorych ze stopniem złośliwości klinicznej I i II nieznacznie częściej obserwowano dodatni wynik ekspresji NRP2 (71,88%) w porównaniu z grupą chorych w III i IV stopniu zaawansowania klinicznego (48,28%). Stwierdzone różnice były bliskie istotności statystycznej ($p=0,06$) (Tabela I).

Analiza statystyczna nie wykazała istotnej korelacji pomiędzy wynikiem histopatologicznym raka jajnika a ekspresją NRP2 ($p=0,43$). Stwierdzono, że dodatnia ekspresja występowała częściej w przypadku raka śluzowego (71,43%) niż surowiczego (56,67%) i endometrioidalnego (50,00%). Otrzymane wyniki przedstawia Tabela II.

Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotnego związku pomiędzy stopniem zróżnicowania histologicznego nowotworu a wynikiem ekspresji NRP2 ($p=0,86$) (Tabela III).

W analizowanej grupie stwierdzono w 54,10% ($n=33$) nasilenie odczynu barwnego w stopniu 2, w 42,62% ($n=26$) w stopniu 1 i w 3,28% ($n=2$) w stopniu 3 (Ryc.5).

W wyniku przeprowadzonej analizy statystycznej stwierdzono, że u pacjentek w III i IV stopniu zaawansowania klinicznego nieznacznie częściej występowało nasilenie ekspresji NRP2 w stopniu 1 (55,17%), niż

Fig. 3. Percentage of patients taking into account the histological diversification stage of ovarian cancer

Ryc. 3. Odsetek badanych z uwzględnieniem stopnia zróżnicowania histologicznego raka jajnika

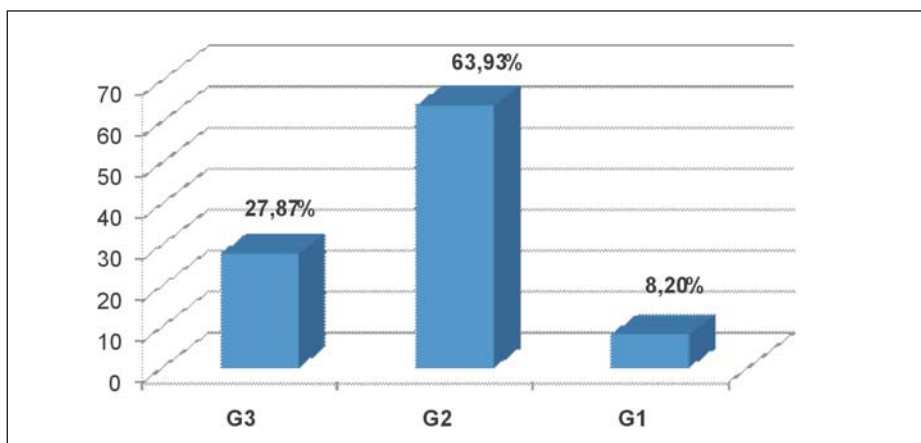
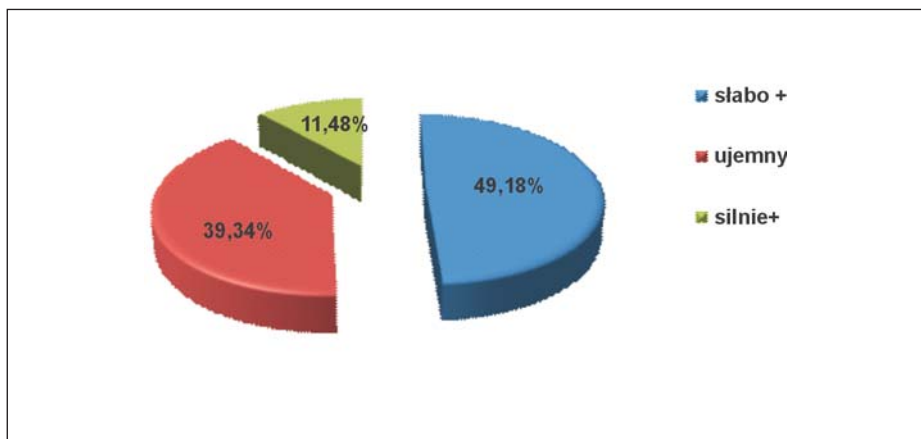


Fig. 4. Percentage of patients taking into account the level of neuropilin-2 expression

Ryc. 4. Odsetek badanych z uwzględnieniem poziomu ekspresji neuropiliny-2



Tab. 1. The result of NRP2 expression taking into account the clinical stage of cancer

Clinical stage	positive	negative	Total
	n %	n %	n %
I/II	23 71,88%	9 28,13%	32 100,00%
III/IV	14 48,28%	15 51,72%	29 100,00%
Total	37 60,66%	24 39,34%	61 100,00%

Statistical analysis: $\chi^2=3,55$, $p=0,06$

Tab. 1. Wynik ekspresji NRP2 z uwzględnieniem stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu

Stopień zaawansowania klinicznego	dodatni	ujemny	Razem
	n %	n %	n %
I/II	23 71,88%	9 28,13%	32 100,00%
III/IV	14 48,28%	15 51,72%	29 100,00%
Razem	37 60,66%	24 39,34%	61 100,00%

Analiza statystyczna: $\chi^2=3,55$; $p=0,06$

Tab. 3. The result of NRP2 expression taking into account the histopathological type of ovarian cancer

Histopathological type	positive	negative	Total
	n %	n %	n %
serosum	17 56,67%	13 43,33%	30 100,00%
endometrioides	5 50,00%	5 50,00%	10 100,00%
mucinosum	15 71,43%	6 28,57%	21 100,00%
Total	37 60,66%	24 39,34%	61 100,00%

Statistical analysis: $\chi^2=1,70$; $p=0,43$

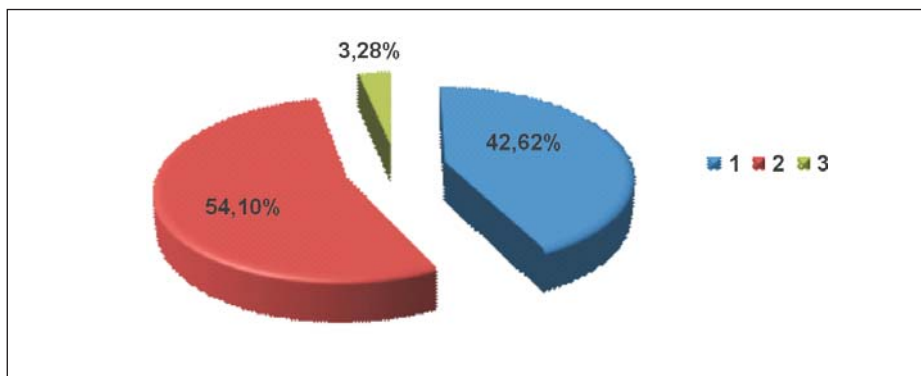
Tab. 2. Wynik ekspresji NRP2 z uwzględnieniem typu histopatologicznego raka jajnika

Typ hist-pat.	dodatni	ujemny	Razem
	n %	n %	n %
serosum	17 56,67%	13 43,33%	30 100,00%
endometrioides	5 50,00%	5 50,00%	10 100,00%
mucinosum	15 71,43%	6 28,57%	21 100,00%
Razem	37 60,66%	24 39,34%	61 100,00%

Analiza statystyczna: $\chi^2=1,70$; $p=0,43$

Fig. 5. Percentage of patients taking into account intensity of NRP2 reaction

Ryc. 5. Odsetek badanych z uwzględnieniem nasilenia odczynu NRP2



I and II (31.25%). The differences were close to statistical significance ($p = 0.06$) (Table IV).

The statistical analysis showed no significant correlation between the histopathological type of ovarian cancer and the intensity of NRP2 expression ($p = 0.85$). The results obtained are shown in Table V.

The statistical analysis showed no significant correlation between the stage of histological diversification of ovarian cancer and the intensity of NRP2 expression ($p = 0.89$) (Table VI).

w grupie ze stopniem zaawansowania klinicznego I i II, (31,25%). Stwierdzone różnice były bliskie istotności statystycznej ($p=0,06$) (Tabela IV).

Analiza statystyczna nie wykazała istotnego związku pomiędzy typem histopatologicznym raka jajnika a nasileniem ekspresji NRP2 ($p=0,85$). Otrzymane wyniki przedstawia Tabela V.

Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotnego związku pomiędzy stopniem zróżnicowania histologicznego raka jajnika a nasileniem ekspresji NRP2 ($p=0,89$) (Tabela VI).

Tab. 3. The result of NRP2 expression taking into account the stage of histopathological diversification of ovarian cancer

Stage of histological diversification	positive	negative	Total
	n %	n %	n %
G3	10 58,82%	7 41,18%	17 100,00%
G1/G2	27 61,36%	17 38,64%	44 100,00%
Total	37 60,66%	24 39,34%	61 100,00%

Statistical analysis: $Chi^2=0.03$; $p=0.86$

Tab. 3. Wynik ekspresji NRP2 z uwzględnieniem stopnia zróżnicowania histopatologicznego raka jajnika

Stopień zróżnicowania histologicznego	dodatni	ujemny	Razem
	n %	n %	n %
G3	10 58,82%	7 41,18%	17 100,00%
G1/G2	27 61,36%	17 38,64%	44 100,00%
Razem	37 60,66%	24 39,34%	61 100,00%

Analiza statystyczna: $Chi^2=0,03$; $p=0,86$

Tab. 4. Percentage of patients taking into account the stage of cancer

Clinical stage	1	2/3	Total
	n %	n %	n %
I/II	10 31,25%	22 68,75%	32 100,00%
III/IV	16 55,17%	13 44,83%	29 100,00%
Total	26 42,62%	35 57,38%	61 100,00%

Statistical analysis: $Chi^2=3.56$; $p=0.06$

Tab. 4. Nasilenie odczynu barwnego z uwzględnieniem stopnia zaawansowania nowotworu

Stopień zaawansowania klinicznego	1	2/3	Razem
	n %	n %	n %
I/II	10 31,25%	22 68,75%	32 100,00%
III/IV	16 55,17%	13 44,83%	29 100,00%
Razem	26 42,62%	35 57,38%	61 100,00%

Analiza statystyczna: $Chi^2=3,56$; $p=0,06$

DISCUSSION

The network of lymphatic vessels grows by proliferation and elongation from the centre. Members of the family of vascular endothelial growth factor are key mediators in the processes of angiogenesis and lymphangiogenesis [9]. These factors have an affinity for at least two families of receptors located on the surface of cells: tyrosine kinase and neuropilin receptors [10]. So far three kinds of tyrosine receptors were identified (*vascular endothelial growth factor receptor*, VEGFR) VEGFR1 (Flt1),

DYSKUSJA

Sieć naczyń limfatycznych powiększa się przez proliferację i odśrodkowe wydłużanie. Członkowie rodziny śródbłonkowego czynnika wzrostu naczyń są najważniejszymi mediatorami w procesach angiogenezy i limfangiogenezy [9]. Czynniki te wykazują powinowactwo do przynajmniej dwóch rodzin receptorów zlokalizowanych na powierzchni komórek: receptory kinazy tyrozynowej oraz neuropiliny [10]. Dotychczas zidentyfikowano trzy rodzaje receptorów tyrozynowych (*vascular endothelial growth*

Tab. 5. The intensity of NRP2 expression taking into account the histopathological type of ovarian cancer

Histopathological type	1	2/3	Total
	n %	n %	n %
serosum	12 40,00%	18 60,00%	30 100,00%
endometrioides	4 40,00%	6 60,00%	10 100,00%
mucinosum	10 47,62%	11 52,38%	21 100,00%
Total	26 42,62%	35 57,38%	61 100,00%

Statistical analysis: Chi²=0,33; p=0,85

Tab. 5. Nasilenie ekspresji NRP2 z uwzględnieniem typu histopatologicznego raka jajnika

Typ hist-pat.	1	2/3	Razem
	n %	n %	n %
serosum	12 40,00%	18 60,00%	30 100,00%
endometrioides	4 40,00%	6 60,00%	10 100,00%
mucinosum	10 47,62%	11 52,38%	21 100,00%
Razem	26 42,62%	35 57,38%	61 100,00%

Analiza statystyczna: Chi²=0,33; p=0,85

Tab. 6. The intensity of NRP2 expression taking into account the stage of histological diversification of ovarian cancer

Stage of histological diversification	1	2/3	Total
	n %	n %	n %
G3	7 41,18%	10 58,82%	17 100,00%
G1/G2	19 43,18%	25 56,82%	44 100,00%
Total	26 42,62%	35 57,38%	61 100,00%

Statistical analysis: Chi²=0,02; p=0,89

Tab. 6. Nasilenie ekspresji NRP2 z uwzględnieniem stopnia różnicowania histologicznego raka jajnika

Stopień różnicowania histologicznego	1	2/3	Razem
	n %	n %	n %
G3	7 41,18%	10 58,82%	17 100,00%
G1/G2	19 43,18%	25 56,82%	44 100,00%
Razem	26 42,62%	35 57,38%	61 100,00%

Analiza statystyczna: Chi²=0,02; p=0,89

VEGFR2 (Flk1/KDR) and VEGFR3 (Flt4). All three receptors are important in the formation and development of blood vessels during embryogenesis, and inactivation of one of the genes encoding these receptors disturbs the development of a network of blood and lymphatic vessels, and causes the death at the embryonic stage. Binding of VEGF factors to tyrosine receptors induces changes in them, including receptor dimerization, which leads to activation of tyrosine kinase and autophosphorylation of tyrosine residue. A receptor which was phosphorylated induces activation of many more substrates which finally cause cell permeability, migration and proliferation of endothelial cells.

After initial differentiation and budding regulated by nuclear transcription factors (Prox1 and Sox18), following subsequent migration and growth depend mainly on VEGF-C [11, 12, 13]. VEGF-C is bound to Flt4, a VEGFR3 receptor, a tyrosine kinase receptor which occurs at the early stages of formation of lymphatic vessels [14]. VEGFR3 appears to be a guiding receptor for VEGF-C activities during development of the lymphatic capillaries [15]. In addition to VEGFR3, VEGF-C is bound to other receptors such as VEGFR2, and co-receptors such as neuropilin-2, which is present in veins and lymphatic vessels. NRP2 was initially considered a receptor belonging to class 3 of semaphorins and a mediator of axonal conductance [16].

Yuan and colleagues have studied importance of NRP2 in the development of blood vessels and found a significant relationship [17]. Loss of NRP2 functions led to lack or significant limitation of development of small lymphatic vessels and capillaries in investigated tissues, such as: skin, intestine, heart, diaphragm and lungs of mouse embryos. Veins in which neuropilin expression was limited developed normally and the network of capillaries was identical as in the tissues with NRP2. Researchers' observations indicate that NRP2 has a selective influence on the development of lymphatic vessels and is not necessary in the process of lymphangiogenesis, which it only modifies. Studies by Takashima et al. showed that mice deprived of NRP1 and NRP2 functions died earlier during embryonic development than mice with a deletion of only NRP1 [18]. These observations show that neuropilins are factors involved in the early development of blood and demonstrate that both isoforms are necessary for the proper functioning of the body.

Caunt et al showed that inhibition of NRP2 with a monoclonal antibody that selectively blocks binding of VEGF-C with NRP2 reduces cancerous lymphangiogenesis and reduces the number of metastases, which is clinically a very important discovery [19]. However, studies conducted by Caunt et al have not specified the role of NRP2 in the creation of new lymphatic vessels.

Studies by Xu et al demonstrated that blocking of NRP2 using a specific antibody or a genetic reduction in the level of its expression causes selective disorders of

factor receptor, VEGFR): VEGFR1 (Flt1), VEGFR2 (Flk1/KDR) oraz VEGFR3 (Flt4). Wszystkie trzy receptory są istotne w procesie powstawania i rozwoju naczyń w trakcie embriogenezy, a inaktywacja jednego z genów kodujących te receptory prowadzi do zaburzeń rozwoju sieci naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz do śmierci na etapie zarodkowym. Przyłączenie czynników VEGF do receptorów tyrozynowych wywołuje w nich zmiany, włącznie z dimeryzacją receptora, która prowadzi do aktywacji kinazy tyrozynowej i autofosforylacji reszty tyrozynowej. Receptor, który uległ fosforylacji wywołuje aktywację wielu kolejnych substratów, które końcowo powodują przepuszczalność komórkową, migrację oraz proliferację komórek endotelium.

Po początkowym różnicowaniu i pączkowaniu regulowanym przez jądrowe czynniki transkrypcyjne (Prox1 i Sox18), następujące kolejno migracja i wzrost zależą głównie od VEGF-C [11, 12, 13]. VEGF-C przyłącza się do Flt4, czyli receptora VEGFR3, receptora kinazy tyrozynowej, który występuje we wczesnych stadiach tworzenia naczyń limfatycznych [14]. VEGFR3 wydaje się być przewodnim receptorem dla działań VEGF-C podczas rozwoju kapilar limfatycznych [15]. Oprócz VEGFR3, VEGF-C przyłącza się również do innych receptorów takich jak VEGFR2, i koreceptorów jak neuropilina-2, która jest obecna na naczyniach żylnych i limfatycznych. NRP2 była początkowo uważana za receptor 3 klasy semaforyn oraz za mediator przewodnictwa aksonalnego [16].

Yuan i wsp. badali znaczenie NRP2 w rozwoju naczyń i odkryli pewną istotną zależność [17]. Utrata funkcji NRP2 powodowała brak lub znaczne ograniczenie rozwoju małych naczyń limfatycznych i kapilar w badanych tkankach takich jak: skóra, jelito, serce, przepona i płuca zarodków mysich. Żyły, w których ograniczona była ekspresja neuropiliny rozwinęły się normalnie a sieć kapilar była identyczna jak w tkankach z obecną NRP2. Obserwacje badaczy wskazują, że NRP2 ma selektywny wpływ na rozwój naczyń limfatycznych i nie jest niezbędna w procesie limfangiogenezy a tylko go modyfikuje. Praca Takashima i wsp. wykazała, że myszy z pozbawionymi funkcji NRP1 i NRP2 umierały wcześniej w trakcie rozwoju zarodkowego niż myszy z delecją tylko NRP1 [18]. Spostrzeżenia te dowodzą, że neuropiliny są czynnikami zaangażowanymi we wczesny rozwój naczyń oraz dowodzą niezbędności obu izoform do prawidłowego funkcjonowania organizmu.

Caunt i wsp. wykazali, że zahamowanie NRP2 monoklonalnym przeciwciałem, które selektywnie blokuje wiązanie VEGF-C z NRP2 powoduje zredukowanie limfangiogenezy nowotworowej i zmniejszenie liczby przerzutów, co jest odkryciem niezwykle istotnym klinicznie [19]. Jednak przeprowadzone przez Caunta i wsp. badania nie wskazały dokładnej roli NRP2 w tworzeniu nowych naczyń limfatycznych.

W badaniach Xu i wsp. wykazano, że zablokowanie NRP2 swoistym przeciwciałem lub genetyczna redukcja poziomu jej ekspresji powoduje wybiórcze zaburzenia

sprouting of lymphatic vessels without disruption of other processes of development of a network of vessels of lymphatic system [20]. It was stressed, however, that the inhibition of sprouting of new blood vessels seems to be caused by disorders of the terminal cells of lymphatic vessels. In studies of groups by Griger and Chen it was observed that mice lacking an adequately functioning NRP2 receptor are viable and show no vascular defects [21, 22].

Neuropilins have a short intracellular domain and it is unlikely that they can function as independent receptors. This is supported by studies of Gluzman-Poltorak et al, in which there was no reaction with VEGF in cells indicating expression of both NPR1 and NRP2 and with other VEGF receptors blocked [23]. This study also demonstrated the existence of NRP2 and VEGFR1 complexes that be created before binding of VEGF or after a reaction with VEGFR1. However, this phenomenon was not fully explained in the quoted study. In spite of demonstrating the interaction of NRP2 with VEGFR1 and formation of complexes by them, their role is currently not fully known.

Neuropilins are unable to initiate a reaction of transmitting signals without the involvement of other receptors, such as plexins, transmembrane receptors of semaphorins or tyrosine kinase receptors VEGFR1, 2 and 3 in the process of vessel formation. Neuropilin-2 and VEGFR3 are found mainly in lymphatic vessels. Alam et al showed that activation of VEGFR3 requires heterodimerization with VEGFR2 which is also present in lymphatic vessels [24]. Favier et al investigated the role of neuropilin-2 in human primary endothelial cells [25]. They showed interactions of NRP2 with VEGFR2 and 3 in a ligand-dependent manner, as well as independently. It was also observed that both VEGF-A and C induce interaction of NRP2 with VEGFR2. This interaction was correlated with a reduction of the threshold value for the phosphorylation of VEGFR2, which results in increased sensitivity of endothelial cells to VEGF-A and C. The authors also noted the key role of neuropilin-2 in the optimal VEGFR2 phosphorylation and increased survival and migration of endothelial cells, which are processes dependent of VEGF-A and VEGF-C. In contrast, SEMA3F, another ligand for NRP2 was associated in the quoted publication with inhibition of survival and migration of these cells. This is the first study concerning the relationship between NRP2, VEGFR2, and VEGFR3.

In spite of the research on the role of neuropilin-2 in the development of blood and lymphatic vessels, there is very scant evidence on the impact of NRP2 on tumour cells.

NRP1 and NRP2 expression correlates with the development of a more malignant cancer in melanoma, breast cancer, prostate cancer, colorectal cancer and pancreatic cancer [26, 27, 28, 29, 30].

The results obtained from studies showed differences in the level of expression of NRP2 and the stage of

kiełkowania naczyń chłonnych bez zaburzeń innych procesów rozwoju sieci naczyń układu limfatycznego [20]. Podkreślono jednak, że zahamowanie procesu kiełkowania nowych naczyń wydaje się być skutkiem zaburzenia pracy końcowych komórek naczyń limfatycznych. W badaniach grup Grigera i Chena obserwowano, że myszy nie posiadające prawidłowo funkcjonującego receptora NRP2 są zdolne do życia i nie wykazują żadnych defektów naczyniowych [21, 22].

Neuropiliny posiadają krótką domenę wewnątrzkomórkową i jest mało prawdopodobne aby funkcjonowały jako samodzielne receptory. Potwierdzają to badania Gluzman-Poltorak i wsp., gdzie nie obserwowano reakcji z VEGF w komórkach wykazujących ekspresję zarówno NPR1 jak i NRP2 oraz z zablokowanymi pozostałymi receptorami VEGF [23]. W pracy tej wykazano również istnienie kompleksów NRP2 i VEGFR1, które mogą powstać przed przyłączeniem VEGF lub też po reakcji z VEGFR1 jednak nie wyjaśniono tego zjawiska do końca. w zacytowanej pracy. Mimo wykazania interakcji NRP2 z VEGFR1 oraz tworzenia przez nie kompleksów, ich rola nie jest w chwili obecnej do końca poznana.

Neuropiliny nie mają możliwości zapoczątkowania reakcji przekazywania sygnałów bez udziału innych receptorów takich jak plexsiny, przez błonowe receptory semaforyn czy receptory kinazy tyrozynowej VEGFR1, 2 i 3 w procesie tworzenia naczyń. Neuropilina-2 i VEGFR3 znajdują się głównie w naczyniach limfatycznych. Alam i wsp. wykazali, że aktywacja VEGFR3 wymaga heterodimeryzacji z VEGFR2, który również jest obecny w naczyniach chłonnych [24]. Favier i wsp. badali rolę neuropiliny-2 w ludzkich pierwotnych komórkach endotelialnych [25]. Wykazali interakcje NRP2 z VEGFR2 i 3 w sposób zależny od ligandów jak również w sposób niezależny. Ponadto wykazano zaobserwowano, że zarówno VEGF-A jak i C indukują interakcję NRP2 z VEGFR2. To wzajemne oddziaływanie korelowało z obniżeniem wartości progowej dla fosforylacji VEGFR2, co daje zwiększoną wrażliwość komórek endotelialnych na VEGF-A i C. Ponadto autorzy zwrócili uwagę na kluczową rolę neuropiliny-2 w optymalnej fosforylacji VEGFR2 oraz na zwiększoną przeżywalność i migrację komórek endotelialnych, procesów zależnych od VEGF-A i VEGF-C. Natomiast SEMA3F, inny ligand dla NRP2 został w cytowanej publikacji skojarzony z hamowaniem przeżycia i migracji tych komórek. Jest to pierwsza praca dotycząca badań nad zależnością między NRP2 oraz VEGFR2 oraz VEGFR3.

Pomimo prowadzonych badań nad rolą neuropiliny-2 w rozwoju naczyń krwionośnych i limfatycznych istnieje bardzo niewiele doniesień na temat wpływu NRP2 na komórki guza nowotworowego.

Ekspresja NRP1 i NRP2 koreluje z rozwojem nowotworu o większej złośliwości w przypadku czerniaka, raka piersi, prostaty, raka jelita grubego oraz raka trzustki [26, 27, 28, 29, 30].

Na podstawie przeprowadzonych badań i otrzymanych wyników wykazano bliskie istotności statystycznej róż-

ovarian cancer which were close to statistical significance. Positive result of expression occurred slightly more frequently in stage I and II. There was no significant correlation between the stage of histological differentiation of cancer and the level of expression of NRP2.

Gray et al showed in their study of colorectal cancer that neuropilin-2 regulates tumour growth and may be an important factor in a targeted therapy [29]. There are reports that some authors used mouse antibodies against NRP2, which resulted in prevention of metastases by blocking the development of lymphatic vessels associated with tumours in the model of pre-clinical lung cancer [31]. An increased expression of neuropilin-2 was indicated in lines of pancreatic cancer cells and tissue from pancreatic adenocarcinomas, as compared to ductal pancreatic epithelium without cancerous lesions [32]. Decreased expression of NRP2 in cell lines resulted in decrease of the speed of tumour growth, which indicates the importance of this glycoprotein in a targeted therapy.

In the presented studies no significant correlation was found between the expression of neuropilin-2 and the histological type of ovarian cancer. However, slightly more frequent expression was observed in the case of the mucinous type of ovarian cancer.

Yasuoka et al, like Gray et al demonstrated in their research that reduction of the activity of NRP2 in tumour cells may reduce the number of metastases [29, 33]. Yasuoka et al also concluded that the expression of NRP2 was inversely proportional to the overall survival of patients. In multivariate analysis, despite the inclusion of other prognostic factors, the expression of NRP2 is still correlated with worse overall survival results. These results indicate that the investigated glycoprotein may be a useful prognostic factor in ovarian cancer.

The presented study results may suggest lack of significant features of neuropilin-2 in the early process of lymphangiogenesis. This does not mean, however, that NRP2 does not play such a role. Perhaps other markers will prove more useful for the assessment of this process.

CONCLUSIONS

Evaluation of expression of NRP2, a marker of lymphangiogenesis, has not shown correlation with selected clinical features and histopathology of ovarian cancer.

nice w poziomie ekspresji NRP2 a stopniem zaawansowania klinicznego raka jajnika. Nieznacznie częściej dodatni wynik ekspresji występował w stopniu I i II. Nie stwierdzono istotnego związku między stopniem zróżnicowania histologicznego nowotworu a poziomem ekspresji NRP2.

Gray i wsp. w swoich badania nad rakiem jelita grubego, wykazali, że neuropilina-2 reguluje wzrost guza i może być istotnym czynnikiem w terapii celowanej [29]. Istnieją doniesienia, gdzie autorzy wykorzystali mysie przeciwciała przeciw NRP2, uzyskując zapobieganie powstawaniu przerzutów poprzez zablokowanie rozwoju naczyń limfatycznych związanych z guzem w modelu przedklinicznego raka płuc [31]. Wykazano zwiększoną ekspresję neuropiliny-2 w liniach komórek raka trzustki oraz tkance pobranej z gruczolakoraków trzustki, w porównaniu do nabłonka przewodowego trzustki bez zmian nowotworowych [32]. Zmniejszona ekspresja NRP2 w liniach komórkowych powodowała zwolnienie wzrostu guza co wskazuje na znaczenie tej glikoproteiny w terapii celowanej.

W przedstawionych badaniach nie stwierdzono istotnych zależności między ekspresją neuropiliny-2 a typem histologicznym raka jajnika. Jednak zauważono nieznacznie częstszą ekspresję w przypadku typu śluzowego raka jajnika.

Yasuoka i wsp. podobnie jak Gray i wsp. wykazali na podstawie swoich badań, że zmniejszenie aktywności NRP2 w komórkach guza może powodować zmniejszenie liczby przerzutów [29, 33]. Yasuoka i wsp. stwierdzili ponadto, że ekspresja NRP2 była odwrotnie proporcjonalna do całkowitego przeżycia pacjentek. W analizie wieloczynnikowej, pomimo uwzględnienia innych czynników prognostycznych, ekspresja NRP2 nadal korelowała z gorszymi wynikami przeżyć całkowitych. Wyniki te wskazują, że badana glikoproteina może okazać się przydatnym czynnikiem prognostycznym w raku jajnika.

Prezentowane wyniki badań mogą sugerować brak istotnej funkcji neuropiliny-2 we wczesnym procesie limfangiogenezy. Nie oznacza to jednak, że NRP2 nie odgrywa takiej roli. Być może inne markery okażą się bardziej przydatne do oceny tego procesu.

WNIOSKI

Ocena ekspresji NRP2, markera limfangiogenezy nie wykazała korelacji z wybranymi cechami klinicznymi i histopatologicznymi raka jajnika.

References/Piśmiennictwo:

1. **Markowska J, Bednarek W, Markowska A:** Wybrane czynniki prognostyczne w raku jajnika. *Curr. Gynecol. Oncol.* 2010; 8:8-20.
2. **He Z, Tessier-Lavigne M:** Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 1997; 90:739-751.
3. **Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, et al.:** Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin-2 mutant mice. *Development* 2002; 129:4797-4806.
4. **Lae P, Goishi K, Davidson AJ, et al.:** Neuropilin-1 is required for vascular development and is a mediator of VEGF-dependent angiogenesis in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:10470-10475.
5. **Neufaid D, Cohen T, Shrsge N, et al.:** The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axonal guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12:13-19.
6. **Jiang WG, Martin TA, Parr C, et al.:** Hepatocyte growth factor, its receptor and their potential value in cancer therapies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005; 53:35-69.
7. **Gu C, Limberg BJ, Whitaker GB, et al.:** Characterization of neuropilin-1 structural features that confer binding to semaphorin 3A and vascular endothelial growth factor 165. *Biol Chem.* 2002; 277:18069-18076.
8. **Moyon D, Pardanaud L, Yuan L, et al.:** Plasticity of endothelial cells during arterial-venous differentiation in the avian embryo. *Development* 2001; 128:3359-3370.
9. **Bednarek W, Wertel I, Kotarski J:** Limfangiogeneza w guzach nowotworowych. *Ginekol Pol.* 2008; 79:625-629.
10. **Bednarek W, Mazurek-Kociubowska M, Sobstyl M, et al.:** Ekspresja markera limfangiogenezy neuropiliny-1 w różnych typach raka jajnika. *Ginekol Pol.* 2010; 81:176-182.
11. **Francois M, Caprini B, Hosking F, et al.:** Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice. *Nature* 2008; 456:643-647.
12. **Wigle JT, Harvey N, Detmar M, et al.:** An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J.* 2002; 21:1505-1513.
13. **Mazurek M, Bednarek W, Jach R, et al.:** Ekspresja markera limfangiogenezy Prox-1 w raku jajnika. *Przegl Menopauz.* 2009; 3:121-126.
14. **Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al.:** A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR3) and KDR (VEGFR2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 1996; 16:3898-3911.
15. **Veikkola T, Jussila L, Makinen T, et al.:** Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 2001; 20:1223-1231.
16. **Chen H, Chedotal A, He Z, et al.:** Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaforins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron.* 1997; 19:547-559.
17. **Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, et al.:** Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin-2 mutant mice. *Development* 2002; 129:4797-4806.
18. **Takashima S, Kitakeza M, Asakura M, et al.:** Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:3652-3682.
19. **Caunt M, Mak J, Liang WC, et al.:** Blocking neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis. *Cancer Cell* 2008; 13:331-342.
20. **Xu Y, Yuan L, Mak L, et al.:** Neuropilin-2 mediates VEGF-C – induced lymphatic sprouting together with VEGFR3. *J. Cell Biol.* 2010; 1:115-130.
21. **Giger RJ, Cloutier JF, Sahay A, et al.:** Neuropilin-2 is required *in vivo* for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron* 2000; 25:29-41.
22. **Chen H, Bagri A, Zupicich JA, et al.:** Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projection. *Neuron* 2000; 25:43-56.
23. **Gluzman-Poltorak Z, Cohea T, Shibuya M, et al.:** Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 and Neuropilin-2 form complexes. *J. Biol. Chem.* 2001; 22:18688-18694.
24. **Alam A, Harsult JP, Barron P, et al.:** Heterodimerization with vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR2) is necessary for VEGFR3 activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 324:909-915.
25. **Favier B, Alam A, Barron P, et al.:** Neuropilin-2 interacts with VEGFR2 and VEGFR3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood* 2006; 108:1243-1250.
26. **Straume O, Akalen LA:** Increased expression of VEGF-receptors (FLT1, KDR, NRP1) and thrombospondin-1 is associated with glomeruloid microvascular proliferation, an aggressive angiogenic phenotype, in malignant melanoma. *Angiogenesis* 2003; 6:295-301.
27. **Starzec A, Vassy R, Martin A, et al.:** Antiangiogenic and antitumor activities of peptide inhibiting the vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1. *Life Sci* 2006; 79:2370-2381.
28. **Miao HQ, Lee P, Lin H, et al.:** Neuropilin-1 expression by tumor cell promotes tumor angiogenesis and progression. *FASEB J* 2000; 14:2532-2539.
29. **Gray MJ, Van Buren G, Dallas NA, et al.:** Therapeutic targeting of neuropilin-2 on colorectal carcinoma cells implanted in the murine liver. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100:109-120.
30. **Hansel DE, Wilentz RE, Yeo CJ, et al.:** Expression of neuropilin-1 in high-grade dysplasia, invasive cancer and metastases of the human gastrointestinal tract. *Am J Surg Pathol* 2004; 28:347-356.
31. **Caunt M, Mak J, Liang WC, et al.:** Blocking neuropilin-1 function inhibits tumor cell metastasis. *Cancer Cell* 2008; 13:331-342.
32. **Dallas NA, Gray MJ, Xia L, et al.:** Neuropilin-2 – Mediated Tumor Growth and Angiogenesis in Pancreatic Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14:8052-8060.
33. **Yasuoka H, Kodama R, Tsujimoto M, et al.:** Neuropilin-2 expression in breast cancer: correlation with lymph node metastasis, poor prognosis, and regulation of CXCR4 expression. *BMC Cancer* 2009; 9:220-226.