

Dagmara Klasa-Mazurkiewicz<sup>1</sup>, Joanna Narkiewicz<sup>2</sup>, Tomasz Milczek<sup>1</sup>,  
Barbara Lipińska<sup>2</sup>, Janusz Emerich<sup>1</sup>, Dariusz Wydra<sup>1</sup>

Received: 02.12.2009

Accepted: 09.12.2009

Published: 31.12.2009

## Znaczenie kliniczne ekspresji neuropiliny-1 u chorych na raka jajnika

Clinical significance of neuropilin-1 expression in patients with ovarian cancer

Клиническое значение экспрессии нейропилина-1 у больных страдающих раком яичника

<sup>1</sup> Katedra i Klinika Ginekologii i Ginekologii Onkologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Kierownik Kliniki: dr n. med. Dariusz Wydra

<sup>2</sup> Wydział Biochemii Uniwersytetu Gdańskiego. Kierownik: prof. dr hab. Barbara Lipińska

Correspondence to: Dagmara Klasa-Mazurkiewicz, Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Kliniczna 1 A, 80-402 Gdańsk, tel.: 58 349 34 41

Source of financing: Department own sources

### Streszczenie

Angiogeneza to proces, który odgrywa zasadniczą rolę w rozwoju guza nowotworowego, warunkując zarówno jego wzrost, jak i tworzenie przerzutów. Najsilniejszymi stymulatorami prawidłowej oraz patologicznej angiogenezy są białka należące do rodziny naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (*vascular endothelial growth factor*, VEGF). W regulacji procesu angiogenezy, jako koreceptor VEGFR-2, uczestniczy również neuropilina-1 (NP-1). Neuropilina-1 odgrywa istotną rolę w regulacji angiogenezy podczas rozwoju embrionalnego, jak również podczas patologicznej angiogenezy w guzach nowotworowych. **Celem pracy** była ocena ekspresji NP-1 w guzach jajnika oraz analiza zależności pomiędzy ekspresją NP-1 a wybranymi czynnikami kliniczno-patologicznymi w grupie chorych na ten nowotwór. **Material i metody:** Analizie poddano względny poziom NP-1 w 168 tkankach pobranych podczas zabiegów operacyjnych wykonywanych w Klinice Ginekologii Onkologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (tkanki zdrowe – 32 próby, guzy łagodne – 42, guzy granicznej złośliwości – 10, rak jajnika – 76, guzy przerzutowe – 8). Względny poziom NP-1 oznaczano przy zastosowaniu metody Western blotting. **Wyniki:** Znamiennie częściej obserwowano występowanie wysokiej ekspresji NP-1 we wczesnych stopniach zaawansowania raka jajnika ( $p=0,01$ ), w rakach innych niż surowicze ( $p=0,04$ ) oraz u chorych z wysiękiem otrzewnowym ( $0,03$ ). Nie stwierdzono statystycznie istotnego wpływu ekspresji neuropiliny-1 na występowanie pozytywnej odpowiedzi na chemioterapię, na długość czasu wolnego od choroby oraz długość czasu całkowitego przeżycia (w teście log-rank). **Wnioski:** Podwyższony poziom NP-1 w niskich stopniach zaawansowania raka jajnika może wskazywać na istotne znaczenie neoangiogenezy na wczesnym etapie rozwoju procesu nowotworowego.

**Słowa kluczowe:** rak jajnika, angiogeneza, limfangiogeneza, czynniki prognostyczne, neuropilina

### Summary

**Background:** Angiogenesis is a key process in the development of a malignant tumor, enabling both growth of primary lesion and spread of metastases. Most potent stimulators of normal and pathological angiogenesis are proteins of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family. Regulation of angiogenesis process is also mediated by neuropilin-1 (NP-1), as coreceptor VEGFR-2. NP-1 plays a crucial role controlling both normal angiogenesis during embryonal development and pathological angiogenesis in malignant tumors. **The aim of this paper** was to assess NP-1 expression in ovarian cancer and to analyze correlations between NP-1 expression and selected clinical-pathological factors in a group of ovarian cancer patients. **Material and method:** Analyzed was the relative level of NP-1 in 168 surgical specimens collected during surgical procedures performed at the Department of Oncologic Gynecology of Medical University in Gdańsk. Tissue samples included: 32 healthy tissues, 42 benign tumors, 10 borderline tumors, 76 ovarian

cancers, 8 metastatic tumors. Relative NP-1 level was assessed using Western blotting technology. **Results:** Overexpression of NP-1 was seen significantly more often in early clinical stages of ovarian cancer ( $p=0.01$ ), in cancers other than serous ( $p=0.04$ ) and in patients with peritoneal exudate ( $p=0.03$ ). Log-rank test did not reveal any significant correlation between NP-1 expression and favorable response to chemotherapy, disease-free survival or total survival time. **Conclusions.** Elevated NP-1 level seen in initial clinical stages of ovarian cancer may indicate crucial role of neoangiogenesis in the early phase of tumor development.

**Key words:** ovarian cancer, angiogenesis, lymphangiogenesis, prognostic factors, neuropilin

## Содержание

Ангиогенез (развитие кровеносных сосудов) это процесс, который играет принципиальную роль в развитии опухоли новообразований, обуславливая как их рост, так и появление метастаз. Наиболее сильными стимуляторами правильного и патологического ангиогенеза являются белки принадлежащие к группе факторов роста эндотелия сосудов (ВЭГФ – сокращенное название на английском языке – фактор роста эндотелия сосудов). В регуляции процесса ангиогенеза, в качестве корцептора ВЭГФ-2, принимает участие также нейропилин-1 (НП-1). Нейропилин-1 играет существенную роль в регулировании ангиогенеза во время эмбрионального развития, а также во время патологического ангиогенеза при опухолях новообразований. **Цель работы** состояла в том, чтобы оценить выразительность НП-1 в опухолях яичника, а также сделать анализ взаимозависимости между экспрессией НП-1 и избранными клиническо-патологическими факторами в группе больных страдающих указанным новообразованием. **Материал и метод:** Анализировался относительный уровень НП-1 в 168 тканях, которые были взяты во время операций проведенных в Клинике Онкологической Гинекологии Медицинского Университета в Гданьске (здоровые ткани – 32 пробы, опухоли доброкачественные – 42, опухоли граничной злокачественности – 10, рак яичника – 76, опухоли метастатические – 8). Относительный уровень НП-1 обозначался при использовании метода Вестерн блоттинг. **Результаты:** Заметно чаще отмечалось появление высокой выразительности НП-1 при ранних стадиях развития рака яичника ( $p=0,01$ ), при раках иных кроме сывороточные ( $p=0,04$ ), а также у больных с брюшинным экссудатом ( $p=0,03$ ). Не было отмечено статистически существенное влияние экспрессии нейропилина-1 на появление положительного ответа на химиотерапию, на продолжительность времени свободного от болезни, а также на продолжительность времени полного сохранения жизни (в тесте лог-ранк). **Выводы:** Повышенный уровень НП-1 при невысокой степени развития рака яичника может указывать на существенное значение неоангиогенеза на раннем этапе развития процесса новообразования.

**Ключевые слова:** рак яичника, ангиогенез, лимфангиогенез, факторы прогностические, нейропилин

## WSTĘP

Rozpoznanie, a następnie leczenie raka jajnika to wielkie wyzwanie w ginekologii onkologicznej. Rak jajnika jest przyczyną najwyższej śmiertelności spośród wszystkich nowotworów narządu rodowego u kobiet. Na świecie rocznie odnotowuje się ponad 200 000 nowych zachorowań i około 115 000 zgonów z jego powodu<sup>(1)</sup>. Niekorzystne rokowanie w raku jajnika stanowi przyczynę poszukiwań skuteczniejszych i mniej toksycznych metod leczenia. Prowadzone są również badania nad nowymi biomarkerami, które pozwoliłyby na wprowadzenie skutecznego skryningu, jak też wyodrębnienie pacjentek, u których należałoby zastosować bardziej „agresywne” leczenie lub terapię celowaną.

Ангиогенеза то процес, który odgrywa zasadniczą rolę w rozwoju guza nowotworowego, warunkując zarówno jego wzrost, jak i tworzenie przerzutów<sup>(2,3)</sup>. Najsilniejszymi stymulatorami prawidłowej oraz patologicznej angiogenezy są białka należące do rodziny naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (*vascular endothelial growth factor*, VEGF). Obecnie wyróżnia się następujące podtypy VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D oraz VEGF-E (wirusowy homolog VEGF; orf wirus VEGF)<sup>(4)</sup>. Do rodziny receptorów VEGF

## INTRODUCTION

Detection and subsequent treatment of ovarian cancer still constitutes a significant challenge in oncologic gynecology. Ovarian cancer is the leading cause of mortality among all types of female genital malignancies. Each year worldwide about 200 000 new cases and 115 000 deaths due to ovarian cancer are registered<sup>(1)</sup>. Unfavorable prognosis associated with ovarian cancer spurs the search for more effective and less toxic therapeutic modalities. Studies are underway, looking for new biomarkers, enabling a more effective screening and selection of patients, who require more aggressive treatment or targeted therapy.

Ангиогенеза is a crucial process in the development of malignant tumors, enabling both growth of primary lesion and spread of metastases<sup>(2,3)</sup>. Most potent stimulators of both normal and pathological angiogenesis are proteins of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family. The following subtypes of VEGF are currently known: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D and VEGF-E (viral homolog of VEGF; orf virus VEGF)<sup>(4)</sup>. VEGF receptors include VEGFR-1 (Flt-1), its soluble form VEGFRs (sFlt-1) and VEGFR-2 (KDR/Flk-1). The third receptor, VEGFR-3 (Flt-4), mediates transmission of lymphangiogenic signals<sup>(5,6)</sup>.

należą: VEGFR-1 (Flt-1), jego rozpuszczalna forma VEGFRs (sFlt-1) oraz VEGFR-2 (KDR/Flk-1). Trzeci z receptorów: VEGFR-3 (Flt-4) pośredniczy w przekazywaniu sygnałów limfangiogennych<sup>(5,6)</sup>.

W regulacji procesu angiogenezy, jako koreceptor VEGFR-2, uczestniczy również neuropilina-1 (NP-1), która jest receptorem dla dwóch różnych ligandów: semaforiny A klasy trzeciej (Sema3A) i VEGF165<sup>(7)</sup>. Neuropilina-1 to błonowa glikoproteina o masie cząsteczkowej 130-140 kDa, występująca w komórkach śródbłonna naczyń, neuronach oraz komórkach mezenchymy otaczającej naczynia krwionośne. Odgrywa istotną rolę zarówno w regulacji angiogenezy podczas rozwoju embrionalnego, jak i podczas patologicznej angiogenezy w guzach nowotworowych. Nadekspresja tego czynnika prowadzi do powstawania nadmiernej liczby naczyń krwionośnych o nieprawidłowej budowie. Z kolei niedobór neuropiliny-1 leży u podłoża zmniejszonej waskularyzacji neuronów i pęcherzyka żółciowego, zaburzeń rozwojowych łuku aorty oraz powstawania nieprawidłowej sieci aksonów<sup>(8-10)</sup>.

### CEL PRACY

Celem pracy była ocena ekspresji neuropiliny-1 w tkankach pochodzących z guzów łagodnych jajnika, guzów o granicznej złośliwości, guzów przerzutowych, raków jajnika oraz tkanek zdrowych. W grupie chorych na raka jajnika analizie poddano zależności pomiędzy ekspresją neuropiliny-1 a wybranymi czynnikami kliniczno-patologicznymi, takimi jak: wiek pacjentek, stopień zaawansowania klinicznego choroby, wielkość choroby resztkowej, obecność wysięku w jamie otrzewnowej, stopień zróżnicowania histopatologicznego, typ histologiczny nowotworu. Określono również wpływ ekspresji neuropiliny-1 na wyniki leczenia w grupie chorych na raka jajnika (odpowiedź na chemioterapię I rzutu, czas do wznowy, całkowity czas przeżycia).

### MATERIAŁ I METODY

Analizie poddano dane dotyczące 168 chorych operowanych w Katedrze i Klinice Ginekologii i Ginekologii Onkologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego od kwietnia 2004 do czerwca 2007 roku. Fragmenty tkanek pochodzących ze zmienionych nowotworowo jajników oraz zdrowe tkanki jajnika były pobierane w trakcie zabiegów operacyjnych. Tkanki zamrażano w temperaturze ciekłego azotu, a następnie przechowywano w temperaturze -70°C. Analizowany materiał obejmował 32 tkanki zdrowe (pobrane fragmenty jajnika od chorych operowanych z powodu innych nienowotworowych zmian narządu rodowego), 42 zmiany łagodne jajnika, 10 guzów granicznej złośliwości, 76 raków jajnika, 8 guzów Krukenberga. Wszystkie pacjentki podpisały świadomą zgodę na udział w badaniu, które zostało zaaprobowane przez Niezależną Komisję Bioetyczną do spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (nr NKEBN/556/2006).

Badania histopatologiczne materiału pooperacyjnego przeprowadzono w Zakładzie Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu

Regulation of angiogenesis is also mediated by neuropilin-1 (NP-1) as coreceptor VEGFR-2, which is a receptor for two different ligands: class III semaphorin A (Sema3A) and VEGF165<sup>(7)</sup>. NP-1 is membrane glycoprotein with a molecular mass of 130-140 kDa, present in vascular endothelial cells, neurons and mesenchymal cells surrounding blood vessels. NP-1 plays also an important role in the regulation of both normal angiogenesis during embryonal development and pathological angiogenesis taking place in malignant tumors. Overexpression of this factor results in formation of excessive number of pathological blood vessels. On the other hand, deficit of NP-1 may be the underlying cause of poor vascularization of neurons and gall bladder, developmental disorders of aortic arch and formation of abnormal axonal network<sup>(8-10)</sup>.

### AIM OF PAPER

The aim of this paper was to assess the expression of NP-1 in tissues originating from benign ovarian tumors, borderline grade tumors and metastatic tumors, ovarian cancer and healthy tissues. In the group of patients with ovarian cancer, analyzed parameters included: correlation between NP-1 expression and selected clinical-pathological parameters, e.g. patients' age, clinical stage, residual tumor volume, presence of peritoneal exudate, histological grade, histological type of tumor. Another analyzed issue was correlation between NP-1 expression and treatment outcome in the group of patients with ovarian cancer, quantified by such parameters as response to first-line chemotherapy, recurrence-free survival and total survival time.

### MATERIAL AND METHOD

Analysis encompassed data obtained from 168 patients operated on at the Department and Chair of Gynecology and Oncologic Gynecology of the Medical University in Gdańsk, collected since April 2004 thru June 2007. Fragments of tissues originating from neoplastic ovaries and healthy ovaries were obtained during surgical procedures. Specimens were frozen in liquid nitrogen and stored at the temperature of -70°C. Analyzed material consisted of 32 healthy tissues (small fragments of healthy ovaries were collected from patients operated on for non-neoplastic conditions of the genital system), 42 benign ovarian lesions, 10 borderline tumors, 76 ovarian cancers and 8 Krukenberg's tumors. All patients signed an informed consent to participate in the study, which otherwise was also approved by an independent Bioethical Commission for Scientific Research at the Medical University in Gdańsk (no. NKEBN/556/2006).

Histological studies of surgical specimens were performed at the Institute of Pathology of Gdańsk Medical University (head: professor Wojciech Biernat). Biochemical studies of frozen specimens of ovarian tumors and healthy tissues were performed at the Faculty of Biochemistry of Gdańsk University (head: professor Barbara Lipińska).

Data concerning patients themselves, course of disease and treatment outcomes were collected based on medical history

Medycznego (kierownik: prof. Wojciech Biernat). Badania biochemiczne zamrożonych śródoperacyjnie fragmentów guzów jajnika i tkanek zdrowych wykonywano na Wydziale Biochemii Uniwersytetu Gdańskiego (kierownik: prof. dr hab. Barbara Lipińska).

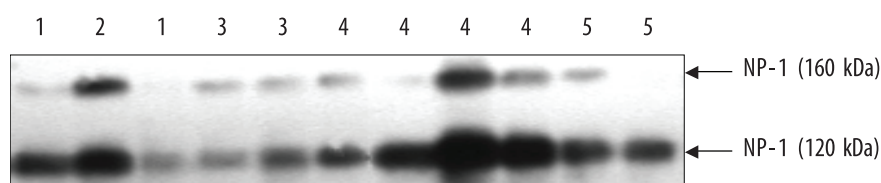
Dane dotyczące pacjentek, przebiegu ich choroby, wyników leczenia uzyskiwano z wywiadu z chorą bądź jej rodziną, z historii chorób oraz protokołów operacyjnych. Za optymalny zabieg cytoredukcyjny uznano taki, w trakcie którego w jamie otrzewnowej nie pozostawiano zmian makroskopowych podejrzanych o proces nowotworowy lub pozostawiano zmiany o średnicy poniżej 1 cm. Chemioterapię I rzutu opartą na paklitakselu i pochodnych platyny zastosowano u 67 chorych. Całkowita odpowiedź kliniczna i patologiczna określana była na podstawie zaleceń RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) z 2000 roku bądź na podstawie wyniku operacji sprawdzającej (SLL wykonano u 18 chorych). Czas wolny od choroby określany był jako czas, jaki upłynął od dnia całkowitej odpowiedzi na pierwszą linię chemioterapii do czasu stwierdzenia wznowy. Długość czasu przeżycia mierzono od daty pierwotnej operacji do daty zgonu lub zakończenia obserwacji (06.06.2008 r.).

Względny poziom neuropiliny-1 w analizowanych tkankach oznaczano przy zastosowaniu metody Western blotting. Do wykrycia i oznaczenia poziomu NP-1 w tkankach posłużono się chemiluminescencyjną metodą detekcji antygenów. Zastosowano przeciwciała monoklonalne anti-NP-1 (Abcam, Cambridge, UK) w rozcieńczeniu 1:500. Immobilon płukano przez 5 minut w roztworze substratów dla peroksydazy chrzanowej (Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche Diagnostics), po czym eksponowano na kliszę rentgenowską (Foton XR-1N, Cezal), a czas ekspozycji wynosił od 10 sekund do 2 minut, w zależności od intensywności sygnału. Kliszę rentgenowską następnie płukano w roztworze wywoływacza i utrwalacza. W celu oznaczenia względnych poziomów badanego białka we wszystkich badanych próbach wykonywano zdjęcia kliszy rentgenowskich oraz przeprowadzano densytometryczną analizę uzyskanych produktów białkowych z zastosowaniem programu 1Dscan EX 3.0 for Windows (Scanalytics, Inc.). Jednocześnie w badanych próbach wykonywano detekcję białka  $\beta$ -aktyny stanowiącego wewnętrzną kontrolę. Wartości przedstawiające względne poziomy analizowanych białek wyrażano jako stosunek świecenia prążka białkowego dotyczącego danego markera do prążka  $\beta$ -aktyny z tej samej próby. Obliczenia statystyczne wykonano przy użyciu pakietu oprogramowania statystycznego Statistica 7.1 (StatSoft, Inc., 2005)

obtained from patients or their relatives, case history and surgical protocols. Cytoreductive procedure was considered optimal, when no visible suspicious-looking lesions remained in the peritoneal cavity, or residual lesions measured less than 1 cm. First-line chemotherapy based on paclitaxel and platinum derivatives was implemented in 67 patients. Total clinical-pathological response was recognized according to RECIST criteria (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) issued in 2000, or based on the result of second-look surgery (performed in 18 patients). Disease-free survival was defined as time elapsing from day of statement of total response to first-line chemotherapy to date of detection of a recurrence. Survival time was measured from day of primary surgery to day of death or termination of the study (June, 6<sup>th</sup>, 2008).

Relative NP-1 level in analyzed tissue samples was assessed using the Western blotting technique. Detection and quantification of NP-1 in tissue samples was performed using chemiluminescence and antigen detection with monoclonal antibodies anti-NP-1 (Abcam, Cambridge, UK) at a solution 1:500. Immobilon was flushed for 5 minutes in a solution of substrates for horse-radish peroxidase (Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche Diagnostics), subsequently exposed on radiographic film (Foton XR-1N, Cezal, Poland) with exposure time ranging from 10 seconds to 2 minutes, depending on signal intensity. Next, radiographic films were flushed in a solution of developer and fixative. In order to determine relative levels of protein in question in all samples tested, pictures were taken of radiographic films and protein products obtained underwent densitometric analysis using the software 1Dscan EX 3.0 for Windows (Scanalytics, Inc.). Concomitantly, as internal quality control, samples were tested for the presence of  $\beta$ -actin. Values reflecting relative levels of proteins studied were expressed as a ratio of luminescence of protein strip corresponding to a particular marker and  $\beta$ -actin strip in the same sample.

Statistical analysis was performed using Statistica 7.1 software package (StatSoft, Inc., 2005) and Analyse-it (Microsoft Excel, Microsoft Corp.). Results of statistical analyses are presented by providing calculated level of statistical significance (p) of the "zero-hypothesis" being verified. Values of p inferior to 0.05 were interpreted as statistically significant. Cut-off value of level of a particular protein studied was determined using the receiver operating characteristic curve (ROC). Survival time was analyzed and survival curves were traced according to the Kaplan-Meier method. Survival time in particular subgroups was compared using the log-rank test and the Cox F test (due to a relatively short follow-up and modest size of subgroups analyzed). Information



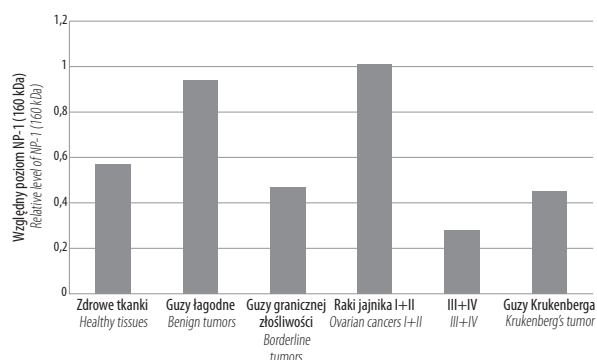
Rys. 1. Przykładowy wynik detekcji białka NRP-1 w lisatach tkankowych (1 – tkanka zdrowa, 2 – guz łagodny, 3 – guz granicznej złośliwości, 4 – rak jajnika, 5 – guz Krukenberga)

Fig. 1. An example of detection of NP-1 in tissue lysates (1 – healthy tissue, 2 – benign tumor, 3 – borderline tumor, 4 – ovarian cancer, 5 – Krukenberg's tumor)

Typ tkanek <i>Type of tissues</i>	Obecność białka/iłość tkanek <i>Number of positive samples/total number of samples</i>	%	Zakres wyniku <i>Range of result</i>	Mediana <i>Median</i>
Zdrowe tkanki <i>Healthy tissues</i>	29/32	90,6	0,14-3,93	0,57
Guzy łagodne <i>Benign tumors</i>	33/42	100	0,02-4,47	0,94
Guzy granicznej złośliwości <i>Borderline tumors</i>	10/10	100	0,02-3,96	0,47
Raki jajnika – całość <i>Ovarian cancers (total)</i>	69/76	90,8	0,05-2,05	0,38
Wczesne stopnie (I+II) <i>Early stages (I+II)</i>	17/17	100	0,13-2,01	1,01
Zaawansowane stopnie (III+IV) <i>Late stages (III+IV)</i>	52/59	88,1	0,05-2,05	0,28
Guzy Krukenberga <i>Krukenberg's tumor</i>	8/8	100	0,09-1,07	0,45

Tabela 1. Ekspresja neuropiliny-1 (izoformy 160 kDa) w poszczególnych grupach tkanek  
Table 1. Expression of neuropilin-1 (isoform 160 kDa) in particular types of tissues

oraz Analyse-it (Microsoft Excel, Microsoft Corp.). W wynikach analiz statystycznych podano obliczony poziom istotności statystycznej (p) weryfikowanej hipotezy zerowej. Wartości  $p < 0,05$  interpretowano jako znamienne statystycznie. W opracowaniu statystycznym do wyznaczenia wartości odcięcia w poziomie analizowanego białka zastosowano analizę ROC (*receiver operating characteristic curve*). W analizie czasu przeżycia oraz do wykreślenia krzywych przeżycia stosowano metodę Kaplana-Meiera. Czas przeżycia w różnych grupach porównywano z zastosowaniem testu log-rank oraz F Coksa (ze względu na stosunkowo krótki okres obserwacji i małe liczebności analizowanych podgrup). Informacje na temat całkowitego czasu przeżycia oraz czasu wolnego od choroby uznano za kompletne w przypadku, gdy punkt końcowy (zgon, wznowa procesu nowotworowego) występował przed zakończeniem okresu obserwacji. W pozostałych przypadkach obserwacje uznano za ucięte. Z uwagi na to, iż rozważane punkty końcowe występowały w niektórych analizowanych podgrupach rzadziej niż w 50% przypadków, odstąpiono od obliczania mediany czasu przeżycia. W analizie czynników rokowniczych stosowano test log-rank oraz jednoczynnikowy test Coksa.



Rys. 2. Względny poziom NP-1 (160 kDa) w poszczególnych tkankach  
Fig. 2. Relative level of NP-1 (160 kDa) in particular types of tissues

concerning total survival time and disease-free survival were considered complete only if the end-point (death, recurrence of tumor) occurred prior to termination of predefined follow-up period. In the remaining cases, observations were considered cut-off. Due to the fact, that in some subgroups these end points occurred in less than 50% of cases, calculation of median survival time was deemed useless. Prognostic factors were analyzed using the log-rank test and the single-factor Cox regression model.

## RESULTS

### EXPRESSION OF NP-1

As a result of immunodetection of protein in tissue lysates using anti-NP-1 antibodies, two protein strips were obtained corresponding to molecular masses of 120 and 160 kDa (fig. 1). The latter strip was present in 29 out of 32 healthy tissues (90.6%), whereby relative protein level ranged from 0.14 to 3.93, in all of 42 benign tumors (100%; 0.02-4.47) and in all of borderline tumors (100%; 0.02-3.96), in 69 out of 76 ovarian cancers (90.8%; 0.05-2.05) and in 7 out of 8 Krukenberg's tumors (87.5%; 0.09-1.07). Table 1 summarizes these data and median values corresponding to relative levels of long isoform of NP-1 in particular groups of tissues. Highest NP-1 level was seen in early clinical stages of ovarian cancer (median: 1.01) and in benign cancers (median: 0.94).

In the case of short isoform (120 kDa), no statistically significant differences were noticed in relative level of this protein in analyzed groups of tissues. Further analysis concerning clinical significance of NP-1 in ovarian cancer patients was performed based in results obtained with the 160 kDa isoform.

### EXPRESSION OF NP-1 REGARDING SELECTED CLINICAL-PATHOLOGICAL PARAMETERS IN OVARIAN CANCER PATIENTS

Comparison of NP-1 expression with regard to selected clinical-pathological parameters in ovarian cancer patients is summarized in table 2. Analysis of correlation between NP-1 expression and clinical stage of ovarian cancer reveals that high

Cecha <i>Variable</i>	Liczba chorych <i>Number of patients</i>	Niska ekspresja neuropiliny-1 Liczba chorych (%) <i>Low NP-1 expression Number of patients (%)</i>	Wysoka ekspresja neuropiliny-1 Liczba chorych (%) <i>High NP-1 expression Number of patients (%)</i>	p
<b>Wiek chorych</b> <i>Patients' age</i>				
≤50	25	8 (32,0)	17 (68,0)	0,09 (*)
>50	51	8 (15,7)	43 (84,3)	
<b>Stopień zaawansowania klinicznego wg FIGO</b> <i>FIGO clinical stage</i>				
I+II	17	0 (0)	17 (100)	0,01 (*)
III+IV	59	16 (27,1)	43 (72,9)	
<b>Stopień zróżnicowania histopatologicznego guza</b> <i>Histological grade</i>				
G1+G2	43	7 (16,3)	36 (83,7)	0,18 (*)
G3	33	9 (27,3)	24 (72,7)	
<b>Wysięk w jamie otrzewnej</b> <i>Peritoneal exudates</i>				
Brak <i>Absent</i>	31	10 (32,3)	21 (67,7)	0,04 (*)
Obecny <i>Present</i>	45	6 (13,3)	39 (86,7)	
<b>Typ histologiczny</b> <i>Histological type</i>				
Surowiczy <i>Serous</i>	46	13 (28,3)	33 (71,7)	0,04 (*)
Inny <i>Other</i>	30	3 (10,0)	27 (90,0)	
<b>Wielkość choroby resztkowej</b> <i>Size of residual disease</i>				
≤1 cm	38	8 (21,1)	30 (78,9)	0,6 (*)
>1 cm	38	8 (21,1)	30 (78,9)	

Tabela 2. Ekspresja neuropiliny-1 w odniesieniu do wybranych cech kliniczno-patologicznych u chorych na raka jajnika. Zależności pomiędzy badanymi cechami a poziomem ekspresji neuropiliny-1 oceniono przy zastosowaniu testu  $\chi^2$  lub dokładnego testu Fishera (\*), ROC=0,12

Table 2. Expression of neuropilin-1 depending on selected clinical-pathological variables in ovarian cancer patients. Correlation between these variables and level of neuropilin-1 expression was analyzed using the  $\chi^2$  test and the Fisher exact test (\*), ROC=0.12

## WYNIKI

### EKSPRESJA NEUROPILINY-1

W wyniku immunodetekcji białka w lizatach tkankowych z zastosowaniem przeciwciał anti-NP-1 uzyskiwano dwa prążki białkowe o masach około 120 i 160 kDa (rys. 1). Prążek białkowy odpowiadający masie 160 kDa został wykryty w 29/32 tkankach zdrowych (90,6%), a względny poziom białka wynosił od 0,14 do 3,93, w 42/42 guzach łagodnych (100%, 0,02-4,47), w 10/10 guzach granicznej złośliwości (100%, 0,02-3,96), w 69/76 rakach jajnika (90,8%, 0,05-2,05) oraz w 7/8 guzach Krukenberga (87,5%, 0,09-1,07). W tabeli 1 przedstawiono powyższe dane oraz wartości median odpowiadające względnym poziomom izoformy długiej NP-1 w poszczególnych grupach tkanek. Najwyższy poziom NP-1 odnotowano we wczesnych stopniach zaawansowania raka jajnika (mediana 1,01) oraz w guzach łagodnych (mediana 0,94).

W przypadku izoformy krótkiej (120 kDa) nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic dotyczących względnego poziomu

expression of this protein is seen significantly more often in stages I and II (p=0.01). Concerning histological types of ovarian cancer, high expression of NP-1 is seen more frequently in other-than-serous cancers (p=0.04). Significant correlation was found between high NP-1 expression and peritoneal exudate (0.03).

### CORRELATION BETWEEN NP-1 EXPRESSION AND RESPONSE TO FIRST-LINE CHEMOTHERAPY

No statistically significant difference was noticed in incidence of positive response to chemotherapy depending on NP-1 expression (fig. 3; table 3).

### PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF NP-1 EXPRESSION

Combined treatment of ovarian cancer patients provided total remission in 37 patients (55.2%). During follow-up (until 06.06.2008), recurrent disease was noticed in 35 patients

Ekspresja neuropiliny-1 NP-1 expression	Pozytywna odpowiedź na chemioterapię Favorable response to chemotherapy		p
	Tak Yes	Nie No	
Niska Low	6 (37,5%)	10 (62,5%)	0,1
Wysoka High	31 (60,8%)	20 (39,2%)	

Tabela 3. Częstość występowania pozytywnych odpowiedzi na chemioterapię w zależności od poziomu ekspresji neuropiliny-1  
Table 3. Frequency of favorable response to chemotherapy depending on the level of NP-1 expression

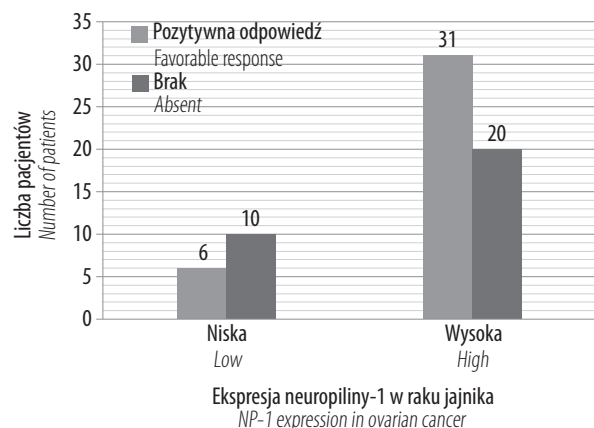
białka w badanych grupach tkanek. Dalszą analizę obejmującą znaczenie kliniczne NP-1 u chorych na raka jajnika przeprowadzono na podstawie wyników dotyczących izoformy 160 kDa.

### EKSPRESJA NEUROPILINY-1 W ODNIESIENIU DO WYBRANYCH CECH KLINICZNO-PATOLOGICZNYCH U CHORYCH NA RAKA JAJNIKA

Porównanie ekspresji neuropiliny-1 w odniesieniu do wybranych cech kliniczno-patologicznych u chorych na raka jajnika przedstawiono w tabeli 2. Oceniając zależność pomiędzy poziomem ekspresji neuropiliny-1 a zaawansowaniem klinicznym raka jajnika, znamiennie częściej obserwowano występowanie wysokiej ekspresji neuropiliny-1 w I i II stopniu ( $p=0,01$ ). Porównując typy histologiczne raka jajnika, stwierdzono częstsze występowanie wysokiej ekspresji neuropiliny-1 w rakach innych niż surowicze ( $p=0,04$ ). Znamiennie częściej obserwowano wysoką ekspresję neuropiliny-1 u chorych z wysiękiem otrzewnowym (0,03).

### ODPOWIEDŹ NA CHEMIOTERAPIĘ I RZUTU W ODNIESIENIU DO EKSPRESJI NEUROPILINY-1

Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w częstości występowania pozytywnej odpowiedzi na chemioterapię



Rys. 3. Częstość występowania pozytywnych odpowiedzi na chemioterapię w zależności od poziomu ekspresji neuropiliny-1  
Fig. 3. Frequency of favorable response to chemotherapy depending on the level of NP-1 expression

(46.1%). Data concerning time-interval between diagnosis and progression of the disease were considered complete. In the remaining 41 women (53.9%), no tumor recurrence has been noticed until termination of follow-up. Data concerning time-interval between diagnosis and termination of follow-up in this group of patients were considered as cut-off observations.

### DISEASE-FREE SURVIVAL DEPENDING ON NP-1 EXPRESSION

Differences in disease-free survival were noticed, depending on the level of NP-1 expression. Disease recurrence was delayed in the group of patients with high expression of NP-1 expression (Cox F test;  $p=0,02$ ). Nevertheless, at log-rank test, the difference did not reach statistical significance ( $p=0,09$ ) (fig. 4).

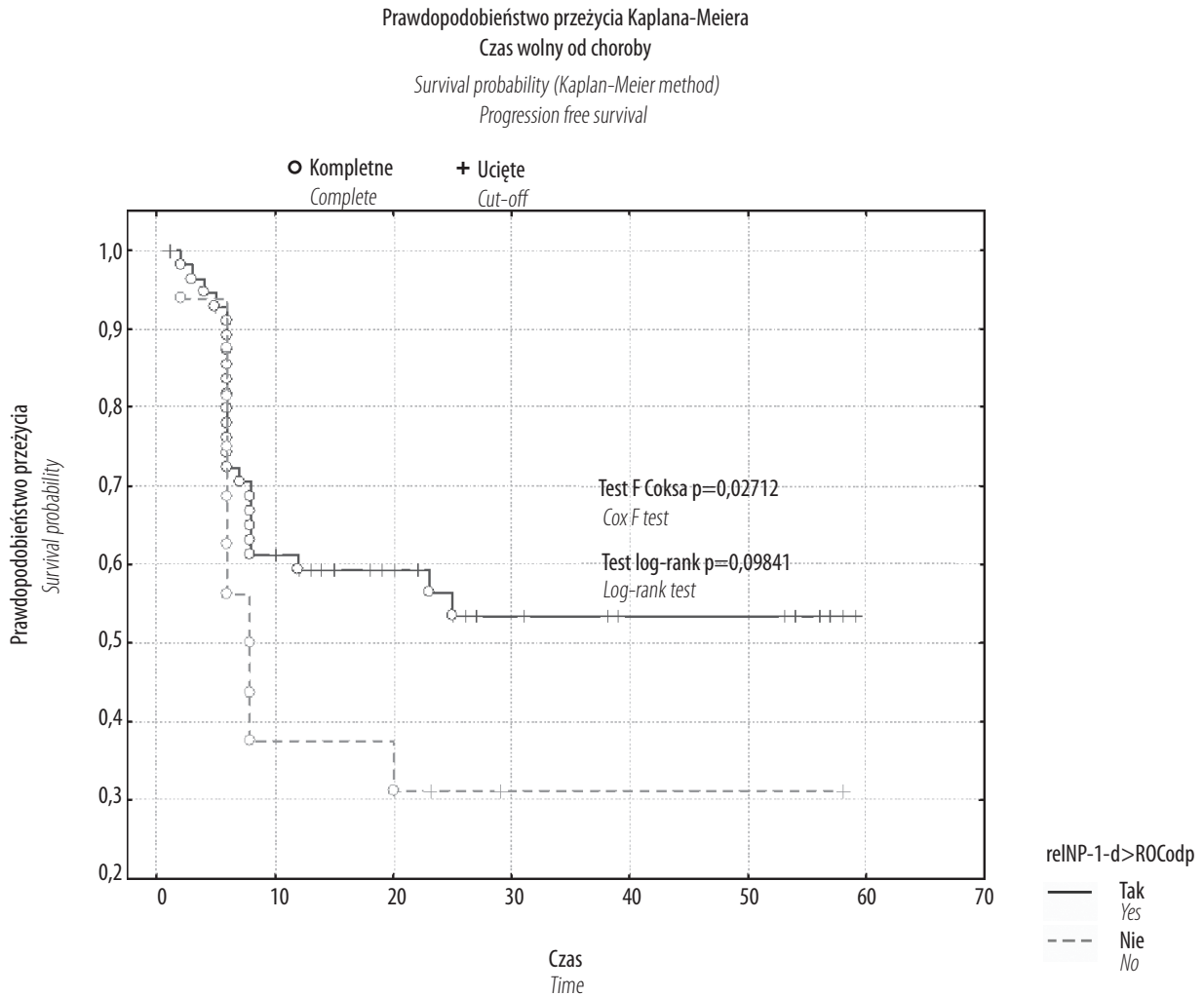
### TOTAL SURVIVAL DEPENDING ON NP-1 EXPRESSION

Differences in total survival time were noticed, depending on the level of NP-1 expression. Longer survival was seen in patients presenting high NP-1 expression (Cox F test;  $p=0,04$ ). Nevertheless, at log-rank test, the difference did not reach statistical significance ( $p=0,1$ ) (fig. 5).

### DISCUSSION

The role of angiogenesis in the development of ovarian cancer has not been fully elucidated, while the results of studies analyzing the impact of particular markers and modulators of angiogenesis on prognosis are contradictory. In this paper we attempted to explore clinical significance of NP-1 in ovarian cancer patients. In the first phase of this study, out of several proteins involved in regulation of angiogenesis, we assessed the expression of NP-1 in normal tissue, benign tumors and malignant tumors of the ovaries. In the second phase, we analyzed correlations between level of expression of the factor in question and selected clinical-pathological variables in ovarian cancer patients, probability of favorable response to chemotherapy and prognostic significance of analyzed parameters.

As a result of immune detection of the protein in tissue lysates using anti-NP-1 antibodies, two protein strips were obtained, corresponding to molecular weights of 120 and 160 kDa. According to literature data, theoretical molecular mass of



Ekspresja neuropiliny-1 <i>NP-1 expression</i>	Wysoka (TAK) <i>High (YES)</i>	Niska (NIE) <i>Low (NO)</i>
Obserwacje kompletne <i>Complete follow-up</i>	24 (40,0%)	11 (68,7%)
Obserwacje ucięte <i>Cut-off follow-up</i>	34 (60,0%)	5 (31,3%)

Rys. 4. Czas wolny od choroby (*progression free survival*) w zależności od poziomu ekspresji neuropiliny-1. Wartość odcięcia wyznaczono przez krzywą ROC=0,12

Fig. 4. Disease free survival (*progression free survival*) depending on the level of NP-1 expression. Cut-off value was determined by curve ROC=0.12

w zależności od poziomu ekspresji neuropiliny-1 (rys. 3, tabela 3).

#### **ZNACZENIE PROGNOSTYCZNE EKSPRESJI NEUROPILINY-1**

Leczenie skojarzone u chorych na raka jajnika umożliwiło uzyskanie całkowitej remisji choroby u 37 (55,2%) pacjentek. W okresie obserwacji (do 06.06.2008 r.) wznówę procesu nowotworowego stwierdzono u 35 badanych (46,1%). Dane dotyczące czasu pomiędzy rozpoznaniem a wystąpieniem progresji choroby uznano za obserwacje kompletne. U pozostałych 41 (53,9%) kobiet do czasu zakończenia

NP-1 is 120-130 kDa, while several larger proteins undergoing glycation may be also present<sup>(10)</sup>. Concerning correlation between NP-1 expression and selected clinical-pathological features in ovarian cancer patients, high level of expression was seen significantly more often in clinical stages I and II, in tumors other than serous and in patients with peritoneal exudate. No significant correlation was found between NP-1 expression and favorable response to chemotherapy, disease-free survival and total survival time (in log-rank test).

Higher NP-1 level in malignant lesions as compared with benign lesions or healthy tissues has been reported in breast cancer<sup>(11)</sup>, non-small-cell lung cancer<sup>(12)</sup>, prostate cancer<sup>(13)</sup>,



obserwacji nie stwierdzono nawrotu procesu nowotworowego. Dane dotyczące czasu od rozpoznania choroby do zakończenia obserwacji w tej grupie pacjentek uznano za obserwacje ucięte.

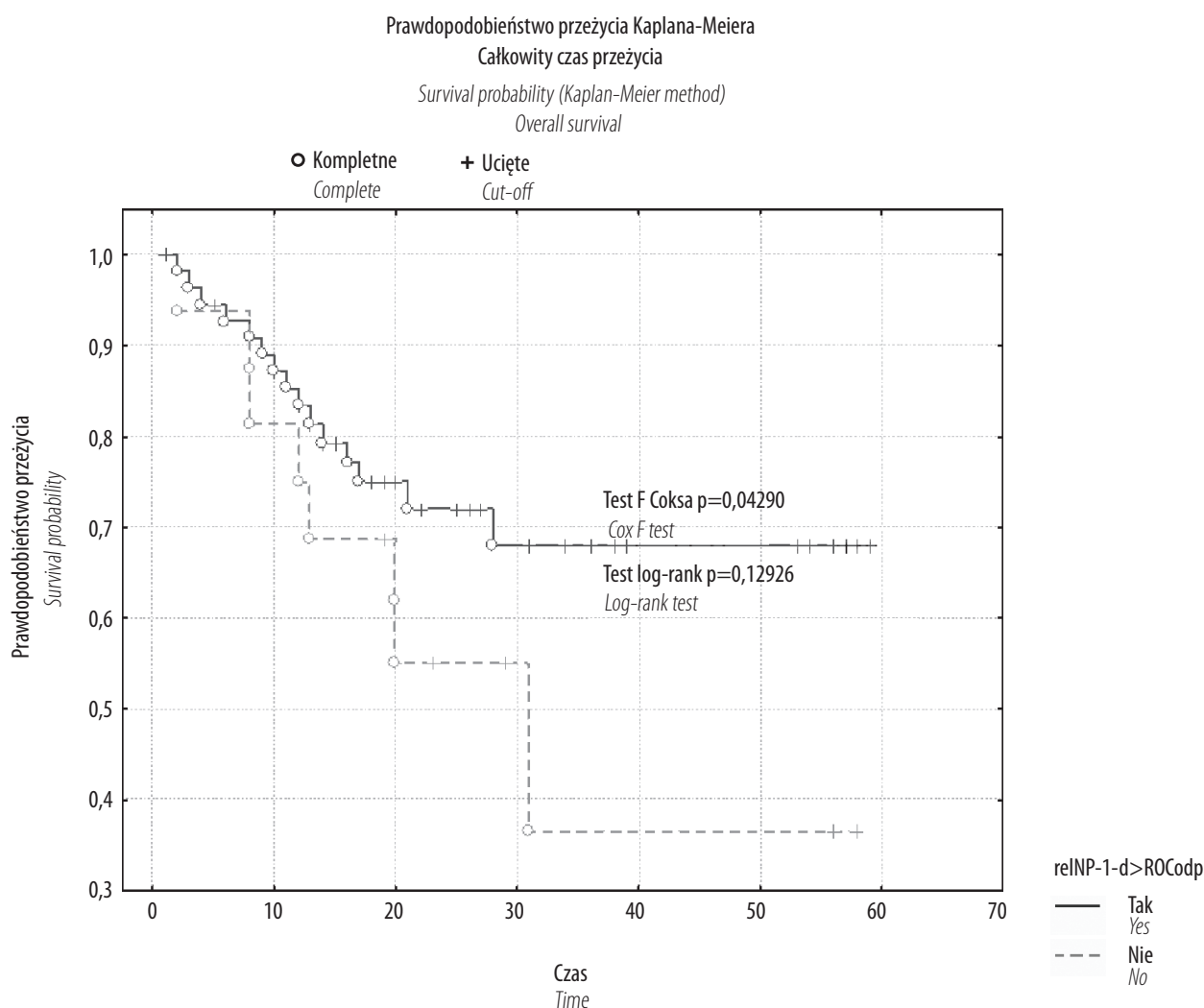
**CZAS WOLNY OD CHOROBY  
W ZALEŻNOŚCI OD POZIOMU EKSPRESJI  
NEUROPILINY-1**

Zaobserwowano różnice w długości czasu wolnego od choroby w odniesieniu do poziomu ekspresji neuropiliny-1. Nawrót choroby obserwowany był później w grupie chorych z wysoką ekspresją

pancreatic cancer<sup>(14)</sup>, brain tumors<sup>(15)</sup> and in colorectal cancer<sup>(16)</sup>.

Significantly shorter survival correlated with elevated levels of NP-1 has been documented in patients with brain tumors<sup>(15)</sup>, colorectal cancer<sup>(17)</sup>, acute myelocytic leukemia<sup>(18)</sup> and in breast cancer<sup>(19)</sup>. Divergent results were presented by Kamiya et al.<sup>(20)</sup> Assessing the level of mRNA for NP-1 in patients with colorectal cancer, they denoted significantly longer survival in the group of patients with elevated expression of that gene.

Analysis of cell lines of pancreatic cancer by Wey et al.<sup>(21)</sup> revealed that elevated level of NP-1 was associated with higher



Ekspresja neuropiliny-1 NP-1 expression	Wysoka (TAK) High (YES)	Niska (NIE) Low (NO)
Obserwacje kompletne Complete follow-up	15 (25,0%)	8 (50,0%)
Obserwacje ucięte Cut-off follow-up	45 (75,0%)	8 (50,0%)

Rys. 5. Całkowity czas przeżycia w zależności od poziomu ekspresji neuropiliny-1  
Fig. 5. Total survival time depending on level of NP-1

neuropiliny-1 (F Coksa  $p=0,02$ ). Jednak różnica ta w teście log-rank nie osiągnęła znamienności statystycznej ( $p=0,09$ ) (rys. 4).

### CAŁKOWITY CZAS PRZEŻYCIA W ZALEŻNOŚCI OD POZIOMU EKSPRESJI NEUROPIliny-1

Zaobserwowano różnice w długości całkowitego czasu przeżycia w zależności od poziomu ekspresji neuropiliny-1. Dłuższe przeżycia stwierdzono u chorych z wysoką ekspresją neuropiliny-1 (F Coksa  $p=0,04$ ). Jednak różnica ta w teście log-rank nie osiągnęła znamienności statystycznej ( $p=0,1$ ) (rys. 5).

### OMÓWIENIE

Znaczenie angiogenezy w rozwoju raka jajnika nie zostało do końca poznane, a wyniki prac analizujących wpływ poszczególnych markerów i modulatorów angiogenezy na prognozowanie u pacjentów z tym nowotworem są sprzeczne.

W prezentowanej pracy podjęto próbę oceny klinicznego znaczenia neuropiliny-1 u chorych na raka jajnika. W pierwszym etapie spośród wielu białek uczestniczących w regulacji procesu angiogenezy oceniono ekspresję NP-1 w komórkach tkanek niezmiennych, guzach łagodnych oraz guzach nowotworowych jajników. W drugiej części pracy analizie poddano zależność pomiędzy poziomem ekspresji badanego czynnika a wybranymi cechami kliniczno-patologicznymi u pacjentów z rakiem jajnika, częstością występowania pozytywnej odpowiedzi na chemioterapię oraz oceniono znaczenie prognostyczne analizowanych czynników.

W wyniku immunodetekcji białka w lizatach tkankowych z zastosowaniem przeciwciał anti-NP-1 uzyskiwano dwa prądku białkowe o masach około 120 i 160 kDa. Według piśmiennictwa teoretyczna masa NP-1 wynosi ok. 120-130 kDa, spotyka się także szereg większych białek ulegających glikozylacji<sup>(10)</sup>. Oceniając zależność pomiędzy ekspresją NP-1 a wybranymi cechami kliniczno-patologicznymi u chorych na raka jajnika, znamienne częściej obserwowano występowanie wysokiej ekspresji badanego czynnika w I i II stopniu zaawansowania klinicznego nowotworu, w rakach innych niż surowicze oraz u pacjentów z wysiękiem otrzewnowym. Nie stwierdzono statystycznie istotnego wpływu ekspresji NP-1 na występowanie pozytywnej odpowiedzi na chemioterapię, na długość czasu wolnego od choroby oraz długość czasu całkowitego przeżycia (w teście log-rank).

Wyższy poziom NP-1 w tkankach nowotworowych w porównaniu ze zmianami łagodnymi czy też tkankami zdrowymi odnotowano w raku piersi<sup>(11)</sup>, w niedrobnokomórkowym raku płuca<sup>(12)</sup>, w raku prostaty<sup>(13)</sup>, w raku trzustki<sup>(14)</sup>, w guzach mózgu<sup>(15)</sup> oraz w raku jelita grubego<sup>(16)</sup>.

Znamienne krótsze przeżycia u pacjentów z podwyższonym poziomem neuropiliny-1 wykazano w guzach mózgu<sup>(15)</sup>, raku jelita grubego<sup>(17)</sup>, w ostrej białaczkę szpikowej<sup>(18)</sup> oraz w raku piersi<sup>(19)</sup>. Odmiennie wyniki przedstawili Kamiya i wsp.<sup>(20)</sup> Oceniając poziom mRNA neuropiliny-1 u chorych na raka jelita grubego, badacze odnotowali znamienne dłuższe przeżycia

incidence of resistance to chemotherapy by gemcitabine and 5-FU.

Hall et al.<sup>(22)</sup> failed to demonstrate higher expression of NP-1 in ovarian cancers as compared with benign tumors. Using the immunohistochemical technique, presence of NP-1 was confirmed in 22 out of 35 samples of benign tumors and in 34 out of 63 samples of ovarian cancers. In their studies, Stoeck et al.<sup>(23)</sup> identified mRNA for NP-1 in 4 cell lines of ovarian cancer and in 10 neoplastic tissues, while they failed to demonstrate the presence of NP-1 itself. These authors discovered expression of NP-1 in mesothelial cells obtained both from patients with ovarian cancer and from cell cultures. They noticed that detection of NP-1 may be used as a means to isolate mesothelial cells from peritoneal exudate in ovarian cancer patients.

Osada et al.<sup>(24)</sup> studied the presence of NP-1 in benign tumors, borderline tumors and in ovarian cancer. Using the immunohistochemical technique, they confirmed the presence of this receptor both in endothelial and in tumor cells, of mainly intracytoplasmic location. High level of expression of this protein was noted in 35% of benign tumors, 28% of borderline tumors and in 45% of ovarian cancers. These authors did not find any correlation between level of NP-1 expression and clinical stage, histological type and grade in the group of ovarian cancers. Level of NP-1 correlated positively with level of VEGF in tissues studied. Nevertheless, these authors failed to demonstrate any prognostic role of NP-1 expression in ovarian cancer patients. Using the immunohistochemical technique, Baba et al.<sup>(25)</sup> demonstrated an elevated NP-1 level in a group of ovarian cancers ( $n=70$ ) as compared with borderline tumors ( $n=8$ ). They did not find NP-1 in benign ovarian tumors ( $n=6$ ) and in healthy tissues ( $n=3$ ); likewise they did not find any correlation between level of NP-1 and histological type and grade in the group of ovarian cancers.

Results of this study confirm elevation of NP-1 level in early stages of ovarian cancer, suggesting that angiogenesis may play a crucial role at initial phases of development of ovarian cancer.

### PIŚMIENNICTWO:

#### BIBLIOGRAPHY:

1. Ozols R. F.: Challenges for chemotherapy in ovarian cancer. *Ann. Oncol.* 2006; 17 suppl. 5: v181-v187.
2. Folkman J.: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 1971; 285: 1182-1186.
3. Ferrara N.: Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist* 2004; 9 suppl. 1: 2-10.
4. Hoeben A., Landuyt B., Highley M. S. i wsp.: Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol. Rev.* 2004; 56: 549-580.
5. Shibuya M., Claesson-Welsh L.: Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp. Cell Res.* 2006; 312: 549-560.
6. Veikkola T., Karkkainen M., Claesson-Welsh L., Alitalo K.: Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res.* 2000; 60: 203-212.
7. Oh H., Takagi H., Otani A. i wsp.: Selective induction of neuropilin-1 by vascular endothelial growth factor (VEGF):

w grupie pacjentów z wyższym poziomem ekspresji analizowanego genu.

Poddając analizie linie komórkowe raka trzustki, Wey i wsp.<sup>(21)</sup> wykazali, iż podwyższony poziom neuropiliny-1 wiązał się z częstszym występowaniem oporności na chemioterapię (gemcytabina, 5-FU).

Hall i wsp.<sup>(22)</sup> nie stwierdzili wyższej ekspresji neuropiliny-1 w rakach jajnika w porównaniu z guzami łagodnymi. Przy zastosowaniu metody immunohistochemicznej obecność neuropiliny-1 wykazali w 22 na 35 próbek guzów łagodnych oraz w 34 na 63 analizowane próbki raka jajnika. W swoich badaniach Stoeck i wsp.<sup>(23)</sup> zaobserwowali obecność mRNA neuropiliny-1 w 4 liniach komórkowych raka jajnika oraz w 10 tkankach nowotworowych, nie udało się im oznaczyć białka neuropiliny-1. Autorzy wykryli ekspresję neuropiliny-1 w komórkach mezotelialnych pochodzących zarówno od chorych na raka jajnika, jak i z hodowli tkankowych. Badacze zauważyli, iż można zastosować oznaczanie neuropiliny-1 w celu wyizolowania komórek mezotelialnych z wysięku otrzewnowego u pacjentów z rakiem jajnika.

Osada i wsp.<sup>(24)</sup> badali obecność neuropiliny-1 w guzach łagodnych, granicznej złośliwości oraz rakach jajnika. Stosując metodę immunohistochemiczną, autorzy stwierdzili występowanie tego receptora w komórkach endotelialnych i samych komórkach guzów o lokalizacji głównie wewnątrzcytoplazmatycznej. Wysoki poziom ekspresji tego białka odnotowali w 35% guzów łagodnych, 28% guzów granicznej złośliwości oraz w 45% raków jajnika. Badacze nie odnotowali zależności pomiędzy poziomem ekspresji neuropiliny-1 a stopniem zaawansowania klinicznego, typem histologicznym oraz stopniem zróżnicowania histologicznego w grupie raków jajnika. Poziom neuropiliny-1 wykazywał pozytywną korelację z poziomem VEGF w badanych tkankach. Niemniej jednak badacze nie dowiedli znaczenia poziomu ekspresji neuropiliny-1 jako czynnika prognostycznego w grupie chorych na raka jajnika. Posługując się metodą immunohistochemiczną, Baba i wsp.<sup>(25)</sup> wykazali wyższy poziom neuropiliny-1 w grupie raków jajnika (70 chorych) w porównaniu z guzami granicznej złośliwości (8). Badacze nie odnotowali obecności neuropiliny-1 w guzach łagodnych jajnika (6) oraz tkankach zdrowych (3), podobnie nie stwierdzili zależności pomiędzy poziomem badanego białka a typem histologicznym oraz stopniem zróżnicowania histologicznego w grupie raków jajnika.

W prezentowanej pracy stwierdzono wzrost poziomu neuropiliny-1 we wczesnych stopniach zaawansowania raka jajnika, co może świadczyć o tym, iż proces angiogenezy odgrywa główną rolę na początku rozwoju choroby nowotworowej w tym narządzie.

10. Miao H. Q., Klagsbrun M.: Neuropilin is a mediator of angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 2000; 19: 29-37.
11. Stephenson J. M., Banerjee S., Saxena N. K. i wsp.: Neuropilin-1 is differentially expressed in myoepithelial cells and vascular smooth muscle cells in preneoplastic and neoplastic human breast: a possible marker for the progression of breast cancer. *Int. J. Cancer* 2002; 101: 409-414.
12. Kawakami T., Tokunaga T., Hatanaka H. i wsp.: Neuropilin 1 and neuropilin 2 co-expression is significantly correlated with increased vascularity and poor prognosis in non-small cell lung carcinoma. *Cancer* 2002; 95: 2196-2201.
13. Vanveldhuizen P. J., Zulfiqar M., Banerjee S. i wsp.: Differential expression of neuropilin-1 in malignant and benign prostatic stromal tissue. *Oncol. Rep.* 2003; 10: 1067-1071.
14. Parikh A. A., Liu W. B., Fan F. i wsp.: Expression and regulation of the novel vascular endothelial growth factor receptor neuropilin-1 by epidermal growth factor in human pancreatic carcinoma. *Cancer* 2003; 98: 720-729.
15. Osada H., Tokunaga T., Nishi M. i wsp.: Overexpression of the neuropilin 1 (NRP1) gene correlated with poor prognosis in human glioma. *Anticancer Res.* 2004; 24: 547-552.
16. Parikh A. A., Fan F., Liu W. B. i wsp.: Neuropilin-1 in human colon cancer: expression, regulation, and role in induction of angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 2004; 164: 2139-2151.
17. Ochiuni T., Kitadai Y., Tanaka S. i wsp.: Neuropilin-1 is involved in regulation of apoptosis and migration of human colon cancer. *Int. J. Oncol.* 2006; 29: 105-116.
18. Kreuter M., Woelke K., Bieker R. i wsp.: Correlation of neuropilin-1 overexpression to survival in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006; 20: 1950-1954.
19. Ghosh S., Sullivan C. A., Zerkowski M. P. i wsp.: High levels of vascular endothelial growth factor and its receptors (VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilin-1) are associated with worse outcome in breast cancer. *Hum. Pathol.* 2008; 39: 1835-1843.
20. Kamiya T., Kawakami T., Abe Y. i wsp.: The preserved expression of neuropilin (NRP) 1 contributes to a better prognosis in colon cancer. *Oncol. Rep.* 2006; 15: 369-373.
21. Wey J.S., Gray M.J., Fan F. i wsp.: Overexpression of neuropilin-1 promotes constitutive MAPK signalling and chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Br. J. Cancer* 2005; 93: 233-241.
22. Hall G.H., Turnbull L.W., Bedford K. i wsp.: Neuropilin-1 and VEGF correlate with somatostatin expression and microvessel density in ovarian tumours. *Int. J. Oncol.* 2005; 27: 1283-1288.
23. Stoeck A., Schlich S., Issa Y. i wsp.: L1 on ovarian carcinoma cells is a binding partner for Neuropilin-1 on mesothelial cells. *Cancer Lett.* 2006; 239: 212-226.
24. Osada R., Horiuchi A., Kikuchi N. i wsp.: Expression of semaphorins, vascular endothelial growth factor, and their common receptor neuropilins and allelic loss of semaphorin locus in epithelial ovarian neoplasms: increased ratio of vascular endothelial growth factor to semaphorin is a poor prognostic factor in ovarian carcinomas. *Hum. Pathol.* 2006; 37: 1414-1425.
25. Baba T., Kariya M., Higuchi T. i wsp.: Neuropilin-1 promotes unlimited growth of ovarian cancer by evading contact inhibition. *Gynecol. Oncol.* 2007; 105: 703-711.

a mechanism contributing to VEGF-induced angiogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2002; 99: 383-388.

8. Hucz J., Szala S.: Receptor VEGFR-2 – cel terapii kierowanej w chorobach nowotworowych. *Współcz. Onkol.* 2006; 10: 506-514.
9. Petrova T. V., Makinen T., Alitalo K.: Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp. Cell Res.* 1999; 253: 117-130.