

Вплив проангіогенних цитокінів на проліферативну активність та виживання ендотеліальних клітин

Л. В. Гарманчук, О. М. Пяковська¹, Г. І. Соляник¹

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, Україна, 01033

¹Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України
Вул. Васильківська, 45, Київ, Україна, 03022

liudmylagarmanchuk@rambler.ru; gis@onconet.kiev.ua

Пухлинний ангіогенез на відміну від фізіологічного характеризується високим рівнем продукування пухлинними клітинами проангіогенних цитокінів, які по-різному діють на функціональну активність ендотеліальних клітин. Мета роботи – провести порівняльний аналіз впливу фактора росту ендотеліальних клітин (VEGF) та епідермального фактора росту (EGF) на проліферативну активність і виживання ендотеліальних клітин за їхнього експоненційного та конфлюентного росту. Методи. Проліферативну активність і виживання ендотеліальних клітин лінії МАЕС під впливом EGF та VEGF визначали за MTT-тестом і підрахунком живих клітин з використанням трипанового синього. Результати. EGF (незалежно від рівня сироваткових факторів) у концентраціях, більших за 10 нг/мл, активує проліферативну активність ендотеліоцитів за умов конфлюентного росту на 18–36 % ($p < 0,05$) ефективніше порівняно з контролем, тоді як при експоненційному рості ендотеліоцитів суттєвого впливу зазначеного цитокіну на проліферацію клітин не виявлено. VEGF у широкому діапазоні концентрацій не проявляє мітогенного ефекту на ендотеліоцити за умов як конфлюентного, так і експоненційного росту. Більше того, у концентраціях, вищих за 100 нг/мл, VEGF на 12 % ($p < 0,05$) інгібує проліферативну активність ендотеліальних клітин в умовах конфлюентного росту. У разі дефіциту сироваткових факторів обидва цитокіни сприяють виживанню ендотеліальних клітин, суттєво зменшуючи їхню загибель. Висновки. EGF на відміну від VEGF стимулює як проліферацію ендотеліальних клітин, так і їхнє виживання, тоді як VEGF сприяє лише виживанню ендотеліоцитів.

Ключові слова: епідермальний фактор росту (EGF), фактор росту ендотеліальних клітин (VEGF), проліферативна активність, ендотеліальні клітини з аорти мишей лінії МАЕС.

Вступ. У наш час цілою низкою досліджень підтверджено двохфазність ангіогенезу: перший етап включає активацію ендотеліоцитів, підвищення проникності судин, деградацію базальної мембрани, міграцію і інвазію ендотеліальних клітин в екстрацелюлярний матрикс, активну проліферацію ендотеліоцитів та формування «люменів», другий етап – диференціацію з утворенням мікроваскулярної сітки [1–3].

Перший етап ангіогенезу моделюється *in vitro* експоненційним ростом ендотеліоцитів, другий – мімікрується «стаціонарним» (конфлюентним) ростом [2, 4, 5].

Проліферація, міграція та диференціація ендотеліальних клітин опосередковуються багатьма специфічними проангіогенними цитокінами. Визначення активності останніх, рівень продукування яких пухлинними клітинами за умов неоангіогенезу (на відміну від фізіологічного) є дуже високим, може вказувати на інструментарій щодо механізму

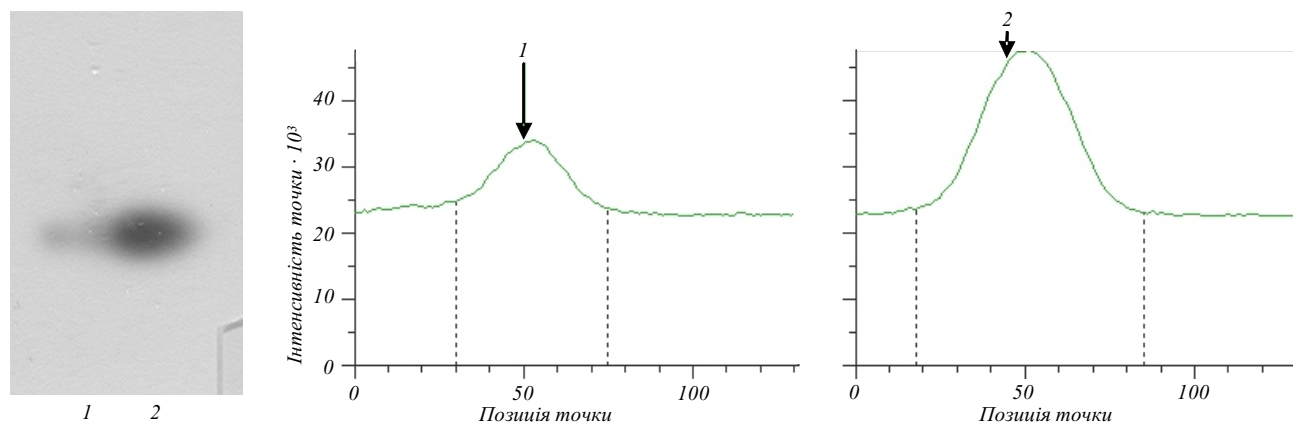


Рис. 1. Вестерн-блот-аналіз нативного VEGF (1) (10 мкг тотального білка на одну пробу) та VEGF рекомбінантного (10 мкг на пробу) («Sigma») (2). Детекцію проводили з використанням козячих анти-VEGF-антитіл («Sigma»), візуалізацію – антикозячими антитілами, міченими пероксидазою хрому та системою фоточутливих реактивів ECL («Amersham»)

дії конкретних агентів або ж на шляхи терапевтичної корекції їхнього впливу [4, 6, 7].

Виходячи з вищезазначеного, основна мета даного дослідження полягала в проведенні порівняльного аналізу впливу основних проангіогенних цитокінів EGF і VEGF на проліферативну активність та виживання ендотеліальних клітин за їхнього конфлюентного та експоненційного росту, а також за умов дефіциту в ростовому середовищі факторів сироватки.

В задачі дослідження входило: напрацювання та очищення нативних EGF і VEGF; моделювання експоненційного та конфлюентного росту ендотеліальних клітин *in vitro*; визначення впливу цитокінів на проліферативну активність ендотеліоцитів у широкому діапазоні концентрацій; порівняння дії цитокінів на проліферативну активність ендотеліальних клітин залежно від часу інкубації з EGF і VEGF, а також за умов відсутності сироватки в ростовому середовищі.

Матеріали і методи. У роботі використано VEGF («Sigma», США), поліклональні козячі антитіла проти VEGF («Sigma»), гепарин-сефароза («Amersham», США), поліклональні кролячі антикозячі імуноглобуліни, мічені пероксидазою хрому («Dako Cytomation», США), МТТ (тетразолій синій) та трипановий синій («Sigma»).

Клітинні лінії та умови культивування. МАЕС (ендотеліальні клітини з аорти мишей [8]) інкубували в середовищі DMEM («Sigma») з додаванням 10 % ембріональної сироватки теляти (FBS) («Sigma») та в безсироваткових умовах. Час інкубації

для ендотеліальних клітин становить 3–96 год за умов 100 %-ї вологості, $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ та 5 % CO_2 .

Очищення нативних EGF і VEGF. Нативний EGF з підщелепних слинних залоз нелінійних мишей-самців очищували запропонованим нами раніше методом за допомогою міні-колонок Sep-Pak C_{18} [9]. Очищений EGF має високий ступінь чистоти (95 % від загальної кількості білка) та зв'язується зі специфічними рецепторами на клітинах лінії А-431 (даних не наведено).

Як продуцент VEGF миші використовували клітини сублінії LLC/R9, які, за даними імуноферментного аналізу, проведеного з використанням набору реактивів для визначення VEGF («R&D», Англія), мають високий рівень продукування цього цитокіну [10]. VEGF очищували із застосуванням схеми двостадійної хроматографії з урахуванням основних фізико-хімічних властивостей цитокіну, а саме – pI , що дорівнює 8,5, а також високу спорідненість до гепарину [11].

Після ліофілізації пептид ідентифікували Вестерн-блот-аналізом з використанням рекомбінантного VEGF миші («Sigma») та поліклональних анти-VEGF-антитіл кози («Sigma») (рис. 1). Як можна бачити, VEGF, очищений нами, за молекулярною масою ідентичний рекомбінантному VEGF («Sigma»). За кількістю білка, перерахованого аналогічно до рекомбінантного VEGF (рис. 1), кількість отриманого нами пептиду дорівнює 1 мкг на 3,6 мкг тотального білка в елюаті. Цей показник враховували при обчисленні концентрації нативного VEGF для визначення його біологічної активності.

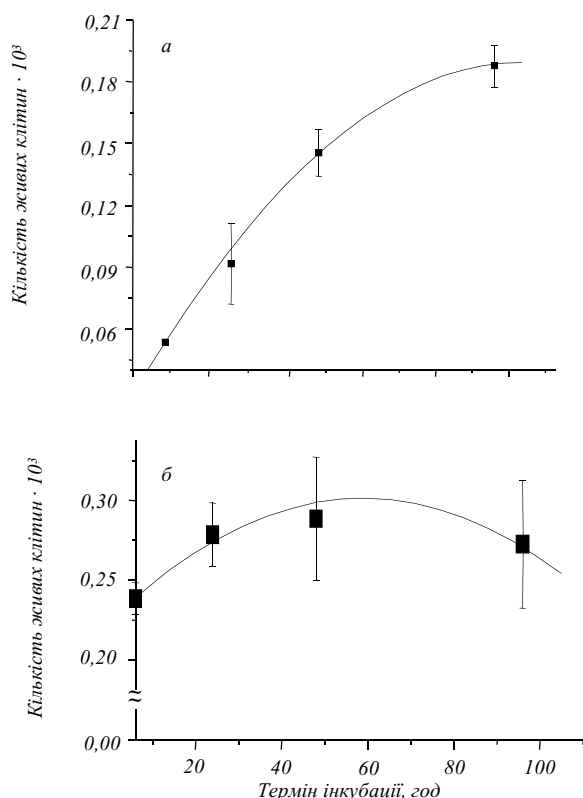


Рис. 2. Кінетика росту клітин лінії МАЕС (6–96 год) при їхньому висіванні з початковою щільністю 5 (а) та 25 тис. клітин на лунку (б)

Дослідження впливу EGF і VEGF на проліферативну активність ендотеліальних клітин. Проліферативну активність ендотеліальних клітин визначали з використанням МТТ-тесту [12] за кількістю живих клітин на лунку (в од. екстинкції при довжині хвилі 540 нм) та рутинним підрахунком клітин у камері Горяєва із застосуванням барвника трипанового синього. Одержані дані щодо кількості живих клітин на лунку, виявлених у МТТ-тесті, виражали у відсотках по відношенню до відповідного контролю (значення контролю приймали за 100 %). Для визначення впливу цитокінів на проліферативну активність ендотеліальних клітин, які перебувають у «стаціонарній» (конфлюентній) та експоненційній фазах росту, дослідним шляхом знаходили початкові щільності для висівання клітин. Як свідчать попередні дані [7, 13] та результати експериментального вивчення, оптимальні концентрації виявилися такими: 5 тис. клітин на лунку 96-лункового планшета – фаза експо-

ненційного росту клітин, майже 4 доби; 25 тис. клітин на лунку – відповідно фаза конфлюентного росту (рис. 2). Для аналізу мітогенного впливу EGF і VEGF останні використовували в широкому діапазоні концентрацій по відношенню до клітин на стадії конфлюентного росту протягом двох діб інкубації. Щоб визначити вплив EGF і VEGF на виживання клітин ендотелію їх досліджували в концентрації 10 нг/мл за умов експоненційного росту у стандартному ростовому середовищі, що містить 10 % FBS та у безсироватковому середовищі.

Результати статистично обробляли параметричними та непараметричними методами за допомогою пакету прикладних програм «Origin 6.0».

Результати і обговорення. Встановлено, що вплив EGF і VEGF на проліферативну активність ендотеліальних клітин значною мірою залежить від фази їхнього росту. Скринінг мітогенної дії EGF і VEGF у широкому діапазоні їхніх концентрацій (1–1000 нг/мл) проводили відносно ендотеліальних клітин, які перебувають у конфлюентній фазі росту. Через 24 год інкубації клітин з цитокінами виявлено, що EGF проявляє мітогенний ефект стосовно конфлюентних клітин у діапазоні концентрацій 1–1000 нг/мл. Це підтверджується зростанням кількості живих клітин на лунку на 17–35 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем (табл. 1). При цьому спостерігається підсилення мітогенного ефекту зі збільшенням концентрації EGF. Останнє корелює з даними інших авторів [14], які показали, що проліферативна активність ендотеліальних клітин серця щурів при моношаровому рості з 10 % сироватки при додаванні EGF у діапазоні концентрацій 0,1–100 нг/мл зростає майже в 1,5 разу, максимальний ефект відмічено при вмісті цитокіну у концентрації 5 нг/мл. При інкубації ендотеліальних клітин з VEGF нами встановлено, що останній суттєво не впливає на проліферативну активність ендотеліоцитів у діапазоні концентрацій 1,0–50,0 нг/мл. У межах концентрацій 100,0–1000,0 нг/мл спостерігається навіть незначне, але статистично достовірне зменшення кількості ендотеліоцитів на 12 % ($p < 0,05$), яке не обумовлене цитотоксичною дією цитокіну, оскільки кількість мертвих клітин не перевищує 5–10 % від їхньої загальної кількості та суттєво не відрізняється від відповідної у контролі.

Таблиця 1

Вплив EGF і VEGF на проліферативну активність та виживання ендотеліальних клітин за умов конфлюентного росту (час інкубації клітин з цитокінами 24 год)

Діапазон концентрації цитокінів, нг/мл	EGF		VEGF	
	Кількість живих клітин, од. екстинкції	Кількість мертвих клітин, % від загальної кількості	Кількість живих клітин, од. екстинкції	Кількість мертвих клітин, % від загальної кількості
0	1,01 0,04	7,9 0,3	1,01 0,04	7,9 0,3
1,0–5,0	1,1 0,1	6,4 1,0	0,98 0,05	6,3 1,3
10,0–50,0	1,18 0,08*	8,1 1,7	0,99 0,05	8,2 1,8
100,0–1000,0	1,32 0,07*	4,9 1,1	0,90 0,04*	7,3 1,5

Примітка. У табл. 1–3 зірочкою позначено достовірну ($p < 0,05$) відмінність показника від відповідного контролю.

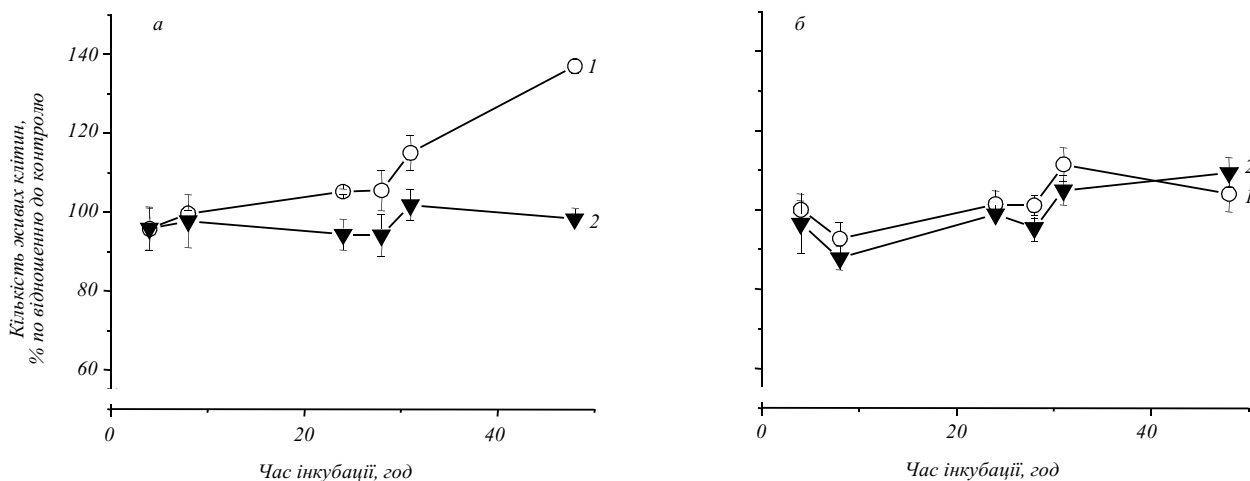


Рис. 3. Вплив EGF (1) і VEGF (2) (концентрація 10 нг/мл) на проліферативну активність ендотеліальних клітин за умов їхнього конфлюентного (а) та експоненційного (б) росту. Інкубація клітин за стандартних умов з 10 % FBS у термін 0–48 год

Незначне пригнічення проліферації (цитостатичний ефект) ендотеліоцитів під дією VEGF через 24 год можна пояснити зворотною регуляцією їхніх специфічних рецепторів під впливом високої концентрації специфічного цитокіну.

При подовженні терміну інкубації до двох діб з проангіогенними цитокінами під дією EGF виявлено підсилення мітогенного ефекту відносно клітин на конфлюентній стадії росту. Так, внаслідок впливу EGF у концентрації 10 нг/мл протягом 48 год зафіксовано $36,5 \pm 1,5$ % зростання ($p < 0,05$) кількості живих клітин на лунку порівняно з відповідним контролем (рис. 3), тоді як стимулювального ефекту VEGF у відповідній концентрації на проліферацію ендотеліоцитів не зареєстровано.

Стосовно росту клітин в експоненційній фазі, то обидва фактори росту при їхній інкубації з кліти-

нами у повноцінному поживному середовищі, що містить 10 % FBS, не виявляють стимулювального або інгібуєного ефекту (рис. 3, б). Також не відмічено підвищення або зниження показника виживання ендотеліальних клітин в експоненційній стадії росту під дією EGF і VEGF (даних не наведено).

Дослідженням впливу цитокінів за умов дефіциту сироваткових факторів встановлено, що EGF і VEGF проявляють різний ефект на проліферативну активність ендотеліоцитів (рис. 4, а, б). Як випливає з представлених даних (рис. 4, а), дія VEGF у концентрації 10 нг/мл на проліферативну активність ендотеліальних клітин є несуттєвою за різної початкової щільності висіву клітин. На відміну від VEGF вплив EGF призводить до зростання проліферативної активності ендотеліо: на першу добу прослідковується лише тенденція до активації про-

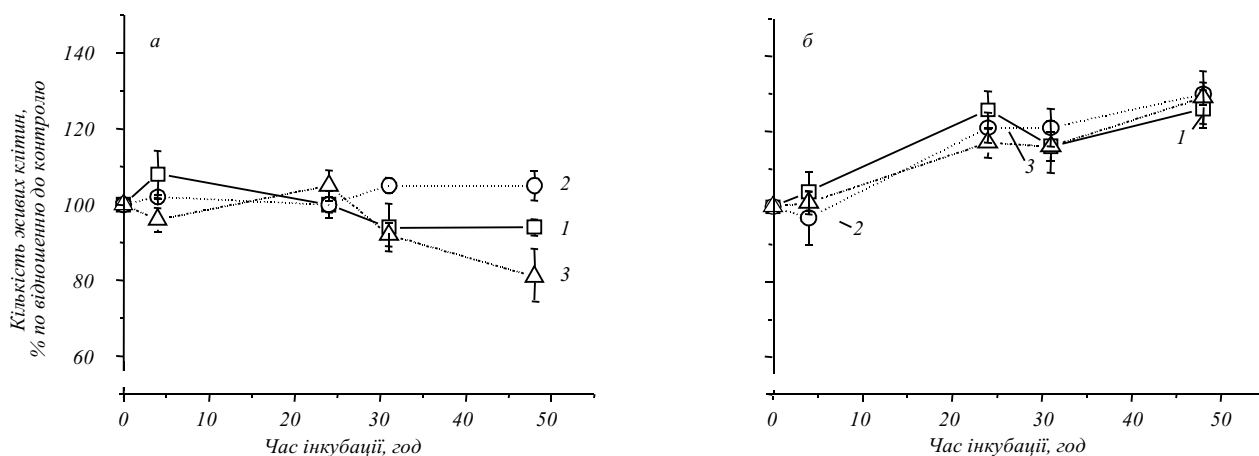


Рис. 4. Вплив VEGF (а) та EGF (б) у концентрації 10 нг/мл на проліферативну активність ендотеліальних клітин за умов їхньої інкубації в безсироватковому середовищі. Клітини висівали з різною початковою щільністю (10 (1), 25 (2), 50 (3) тис. клітин на лунку) та інкубували з цитокіном протягом 4–48 год

ліферації клітин при всіх щільностях їхнього висіву, тоді як на другу добу інкубації за високої концентрації клітин – 50 тис. клітин на лунку – виявлено достовірне зростання кількості живих клітин майже на 30 % ($p < 0,05$) (рис. 4, б).

Варто зазначити, що в контролі (за умов інкубації клітин у безсироватковому поживному середовищі без додавання цитокінів) відмічено прогресивне зростання відсотка мертвих клітин, який на кінець другої доби становить в середньому 36 % ($p < 0,05$) порівняно з 7 % мертвих клітин при їхньому початковому висіванні.

EGF, так само як і VEGF, суттєво зменшує відсоток мертвих клітин на 70 % ($p < 0,05$) після двох діб інкубації, проявляючи здатність сприяти виживанню ендотеліальних клітин за умов дефіциту ростових факторів та поживних речовин (табл. 2, 3).

Отже, одержані результати свідчать про те, що EGF чинить мітогенний вплив відносно ендотеліальних клітин за умов їхнього конфлюентного росту як у повноцінному культуральному середовищі, так і при інкубації клітин у безсироваткових умовах, а також достовірно підвищує показник виживання клітин. Натомість VEGF не проявляє мітогенної дії стосовно ендотеліоцитів, проте також є фактором, що сприяє виживанню клітин.

Таким чином, виявлені нами ефекти щодо впливу EGF і VEGF по відношенню до активно проліферуючих ендотеліальних клітин та ендотеліоцитів за умов їхнього конфлюентного росту можуть свідчити про причетність зазначених ци-

токінів до різних фаз ангиогенезу. Виходячи з того, що EGF *in vitro* проявляє мітогенну дію щодо клітин на конфлюентній стадії росту та при дефіциті сироваткових факторів, він може в умовах *in vivo* впливати на залучення ендотеліальних клітин із кровоносних судин організму до пухлинного ангиогенезу та індукувати проліферацію ендотеліоцитів, у той час як VEGF є фактором, що стимулює процес утворення люменів та формування нових судин.

Існують роботи, де показано, що інгібування EGF-рецептора при конфлюентному рості ендотеліальних клітин призводить до зниження секреції VEGF, яке лежить в основі пригнічення морфогенезу ендотеліальних клітин [15]. Тобто в нашому випадку активація проліферації ендотеліальних клітин лінії MAEC при моношаровому рості під дією EGF і запуску сигнального каскаду через EGF-рецептор може бути також частково обумовлена підвищеною секрецією основного проангіогенного цитокіну – VEGF. Той факт, що обидва цитокіни спричиняють зниження кількості мертвих клітин за умов дефіциту сироваткових факторів, вказує на їхню здатність сприяти виживанню ендотеліальних клітин, що узгоджується з даними публікацій [15, 16].

Останнім часом зростає кількість досліджень, пов'язаних зі стимуляцією проліферації ендотеліальних клітин ростовими факторами [4, 14, 17], а також праць, направлених на інгібування проліферації ендотеліальних клітин як основних міше-

Таблиця 2

Вплив VEGF на виживання ендотеліоцитів (оцінених за кількістю мертвих клітин у луңці у % від загальної кількості) при інкубації їх у безсироватковому середовищі

Час інкубації, год	Початкова щільність клітин, тисяч на луңку					
	10,0		25,0		50,0	
	Контроль	VEGF	Контроль	VEGF	Контроль	VEGF
4,0	4,16±0,4	–	11,4±1,1	–	5,66±1,52	–
24,0	20,6±10	18,5±3,75	10,7±5,8	8,64±1,9	15,4±0,25	3,8±1,5*
31,0	15,05±5,45	9,7±4,5	22,7±3,0	11,2±3,3	18,9±1,5	5,5±0,9*
48,0	47,15±9,9	14,7±3,5	31,2±3,6	10,2±3,4*	27,5±2,9	8,5±0,9*

Таблиця 3

Вплив EGF на виживання ендотеліоцитів (оцінених за кількістю мертвих клітин у луңці у % від загальної кількості) при інкубації їх у безсироватковому середовищі

Час інкубації, год	Початкова щільність клітин, тисяч на луңку					
	10,0		25,0		50,0	
	Контроль	EGF	Контроль	EGF	Контроль	EGF
4,0	4,16±0,4	–	11,4±1,1	–	5,66±1,52	–
24,0	20,6±10	11,68±0,38	10,7±5,8	4,0±0,4	15,4±0,25	7,5±1,7*
31,0	15,05±5,45	8,4±0	22,7±3,0	5,4±2,3*	18,9±1,5	7,5±3,5*
48,0	47,15±9,9	7,7±0,8*	31,2±3,6	8,1±2,3*	27,5±2,9	7,7±1,9*

ней протипухлинної ангіогенез-опосередкованої терапії [6, 18, 19].

Висновки. У результаті проведеної роботи виявлено, що EGF проявляє мітогенний ефект по відношенню до ендотеліальних клітин за умов їхнього конфлюентного росту як у повноцінному культуральному середовищі, так і при інкубації клітин у безсироваткових умовах та не впливає на мітогенну активність ендотеліоцитів в експоненційній фазі росту. Мітогенної активності VEGF, на відміну від EGF, не встановлено. Обидва цитокіни сприяють виживанню ендотеліальних клітин при їхньому рості за умов дефіциту сироваткових факторів.

Роботу виконано за часткової підтримки грантом МОН за № ДП/66 від 27 квітня 2004 року «Неоваскуляризація злоякісних пухлин як мішень для відбору протипухлинних препаратів з антиангіогенною дією» та в рамках цільової програми «Особливості функціонування онкогеному».

Автори виражають подяку доктору Т. Тагенбратт із Стокгольмського ракового центру за люб'язно надані ендотеліальні клітини та консультативну допомогу щодо їхнього культивування.

L. V. Garmanchouk, O. N. Pyaskovskaya, G. I. Solyanik

Influence of pro-angiogenic cytokines on proliferative activity and survival of endothelial cells

Summary

Aim. Tumor angiogenesis in contrast to physiological one is characterized by high level of malignant cell production of pro-angiogenic cytokines, which have different influence on functional activity of endothelial cells. The goal of the study – to carry out a comparative analysis of the influence of a vascular endothelial growth factor (VEGF) and an epidermal growth factor (EGF) on proliferative activity and survival of endothelial cells upon their confluent and exponential growth. **Methods.** The proliferative activity of endothelial cells was determined by MTT-test and their viability was detected by the trypan blue exclusion test. **Results.** It was shown that EGF (irrespectively of the level of serum factors) in concentrations higher than 10 ng/ml activated the proliferative activity of confluent endotheliocytes in a concentration-dependent manner by 18–36 % ($p < 0.05$) as compared to the control, while this cytokine didn't affect the endothelial cells in the exponential growth phase. VEGF in wide concentration range didn't display the mitogenic effect on endotheliocytes in both confluent and exponential growth phases. Furthermore, VEGF in concentrations higher than 100 ng/ml inhibited proliferative activity of confluent endothelial cells by 12 % ($p < 0.05$). In case of deficiency of nutrients, EGF and VEGF promoted the survival of endothelial cells, considerably decreasing their death. **Conclusions.** EGF, in contrast to VEGF, stimulates proliferation and survival of the endothelial cells, whereas VEGF has significant influence only on the survival of the cells.

Keywords: epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor, proliferative activity, endothelial cells.

Л. В. Гарманчук, О. Н. Пясковська, Г. И. Соляник

Влияние проангиогенных цитокинов на пролиферативную активность и выживаемость эндотелиальных клеток

Резюме

Опухолевый ангиогенез в отличие от физиологического характеризуется высоким уровнем продуцирования опухолевыми клетками проангиогенных цитокинов, по-разному влияющих на функциональную активность эндотелиальных клеток. **Цель работы** – провести сравнительный анализ действия фактора роста эндотелиальных клеток (VEGF) и эпидермального фактора роста (EGF) на пролиферативную активность и выживаемость эндотелиальных клеток при их конфлюэнтном и экспоненциальном росте. **Методы.** Проллиферативную активность и выживаемость эндотелиальных клеток линии МАЕС при влиянии EGF и VEGF определяли МТТ-тестом и подсчетом живых клеток с использованием трипанового синего. **Результаты.** EGF (независимо от уровня сывороточных факторов) в концентрациях выше 10 нг/мл активирует пролиферативную активность на конфлюэнтной стадии роста эндотелиоцитов на 18–36 % ($p < 0,05$) эффективнее по сравнению с контролем, тогда как при экспоненциальном росте эндотелиоцитов существенного влияния этого цитокина на пролиферацию клеток зафиксировано не было. VEGF в широком диапазоне концентраций не проявляет митогенного эффекта на эндотелиоциты при их конфлюэнтном и экспоненциальном росте. Более того, в концентрациях выше 100 нг/мл VEGF на 12 % ($p < 0,05$) ингибирует пролиферативную активность эндотелиальных клеток при конфлюэнтном росте. В случае дефицита сывороточных факторов оба цитокина способствуют выживанию эндотелиальных клеток, существенно уменьшая их гибель. **Выводы.** EGF в отличие от VEGF стимулирует как пролиферацию эндотелиальных клеток, так и их выживаемость, тогда как VEGF способствует только выживаемости эндотелиоцитов.

Ключевые слова: эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста эндотелиальных клеток (VEGF), пролиферативная активность, эндотелиальные клетки из аорты мыши линии МАЕС.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Risau W. Differentiation of endothelium // *FASED J.*–1995.–9, N 10.–P. 926–933.
2. Pauly R. R., Passaniti A., Crow M., Kinsella J. L., Papadopoulos N., Monticone R., Lakatta E. G., Martin G. R. Experimental models that mimic the differentiation and dedifferentiation of vascular cells // *Circulation.*–1992.–86, N 6.–P. III. 68–III.73.
3. Folkman J., D'amore P. A. Blood vessel formation: What is its molecular basis? // *Cell.*–1996.–87, N 7.–P. 1153–1155.
4. Joyce N. C., Zhu C. C. Human corneal endothelial cell proliferation: potential for use in regenerative medicine // *Cornea.*–2004.–23, N 8, Suppl.–P. S8–S19.
5. Terramani T. T., Eton D., Bui P. A., Wang Y., Weaver F. A., Yu H. Human macrovascular endothelial cells: optimization

of culture conditions // *In Vitro Cell Develop. Biol. Anim.*–2000.–36, N 2.–P. 125–132.

6. Chen C., Li J., Micko C. J., Pierce G. F., Cunningham M. R., Lumsden A. B. Cytotoxic effects of basic FGF and heparin binding EGF conjugated with cytotoxin saporin on vascular cell cultures // *J. Surg. Res.*–1998.–75, N 1.–P. 35–41.
7. Garmanchouk L. V., Pyaskovskaya O. N., Yanish Yu. V., Shlyakhovenko V. A., Dasyukevich O. I., Solyanik G. I. Influence of aconitine-containing herbal extract BC1 on proliferative and electrokinetic characteristics of endothelial cells // *Exp. Oncol.*–2005.–27, N 4.–P. 262–266.
8. Gumcovski F., Kaminska G., Kaminski M., Morrissey L. W., Auerbach R. Heterogeneity of mouse vascular endothelium. *In vitro* studies of lymphatic, large blood vessel and microvascular endothelial cells. // *Blood Vessels.*–1987.–24, N 1–2.–P. 11–23.
9. Ivashchenko Yu. D., Gout I. T., Garmanchuk L. V., Osipova L. A. Purification of the epidermal growth factor with used HPLC // *Exp. Oncol.*–1985.–7, N 3.–C. 46–49.
10. Solyanik G. I., Pyaskovskaya O. N., Garmanchouk L. V. Cisplatin-resistant Lewis lung carcinoma cells possess increased level of VEGF secretion // *Exp. Oncol.*–2003.–25, N 4.–P. 260–265.
11. Alistratov A. V., Lisniyak I. A., Yatsenko S. M., Vinnitsky V. B. The dependence of VEGF level from characteristics of 3LL carcinoma development in C57B16 mice // *Exp. Oncol.*–2002.–24, N 1.–P. 64–68.
12. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays // *J. Immunol. Meth.*–1983.–65, N 1–2.–P. 55–63.
13. Garmanchuk L. V., Pyaskovskaya O. N., Vovyancko S. I., Plyushch G. I., Solyanik G. I. Vascular endothelial growth factor – prerogative of the actively proliferating endothelial cells // IX Ukrainian biochemical conference (Kharkiv, 24–26 October, 2006).–Kharkiv, 2006.–P. 88.
14. Mooradian D. L., Diglio C. A. Effects of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta 1 on rat heart endothelial cell anchorage-dependent and -independent growth // *Exp. Cell Res.*–1990.–186, N 1.–P. 122–129.
15. Semino C. E., Kamm R. D., Lauffenburger D. A. Autocrine EGF receptor activation mediates endothelial cell migration and vascular morphogenesis induced by VEGF under interstitial flow // *Exp. Cell Res.*–2006.–312.–N 3.–P. 289–298.
16. Suhardja A., Hoffman H. Role of growth factors and their receptors in proliferation of microvascular endothelial cells // *Microsc. Res. Technol.*–2003.–60, N 1.–P. 70–75.
17. Tamama K., Fan V. H., Griffith L. G., Blair H. C., Wells A. Epidermal growth factor as a candidate for *ex vivo* expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells // *Stem Cells.*–2006.–24, N 3.–P. 686–695.
18. Sini P., Wyder L., Schnell C., O'Reilly T., Littlewood A., Brandt R., Hynes N. E., Wood J. The antitumor and antiangiogenic activity of vascular endothelial growth factor receptor inhibition is potentiated by ErbB1 blockade // *Clin. Cancer Res.*–2005.–11, N 12.–P. 4521–4532.
19. Kerbel R., Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors // *Nat. Rev. Cancer.*–2002.–2, N 10.–P. 727–739.

УДК 576.535

Надійшла до редакції 13.01.09